



**4-AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ  
KULLANILARAK KARATURP VE ŞALGAMDAN  
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

**Aykut ÖZTEKİN**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı  
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR  
2016  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**4-AMİNO BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK  
KARATURP VE ŞALGAMDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI**

Aykut ÖZTEKİN

**KİMYA ANABİLİM DALI**  
**Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM**  
**2016**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**4-AMİNO BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK KARATURP  
VE ŞALGAMDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Aykut ÖZTEKİN tarafından hazırlanan bu çalışma, 29.12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5./5.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 29/12/2016 tarih ve 50/15 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ  
Enstitü Müdürü

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

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

## ÖZET

Doktora Tezi

### 4-AMİNO BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK KARATURP VE ŞALGAMDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Aykut ÖZTEKİN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu tez kapsamında amino benzohidrazid molekülleri kullanılarak bitki peroksidaz enzimlerinin tek basamakta saflaştırılması için en etkili ve yeni afinite ligantlarının belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, literatürde 4-amino benzohidrazid ile yapılan bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırma çalışmalarına katkı sağlamak için ilk defa 4-amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid türev molekülleri sentezlenerek POD enzimlerinin saflaştırılmasında kullanıldı. Türev moleküllerin metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapılarak, karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlanarak elde edilen afinite jelleri ile tek kademede karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirildi. 4-amino 2-metil benzohidrazid molekülü kullanıldığında POD enzimi, karaturptan %14,1 verimle 211,4 kat, şalgamdan %11,7 verimle 444,6 kat, 4-amino 3-metil benzohidrazid ile karaturptan %14,2 verimle 191,6 kat, şalgamdan %10,2 verimle 234 kat, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid ile karaturptan %33,6 verimle 676,4 kat, şalgamdan %20,1 verimle 806,7 kat, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid ile karaturptan %10,1 verimle 244,3 kat ve şalgamdan %12,2 verimle 653,9 kat saflaştırma yapıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan enzimlerin molekül ağırlığı ve enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Karaturp POD enzimi için 43-47 kDa'da tek bant, şalgam POD enzimi için ise 47 kDa'da tek bant gözlemlendi. Tüm kolonların saflaştırma sonuçları karşılaştırıldı ve en iyi kolon olan Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-2-metoksi benzohidrazid kolonu için kolon tutma kapasitesi, karaturp ve şalgam POD enzimleri için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde (*I*) çalışıldı. Karaturp POD enzimi için optimum şartlar: pH 8,0, sıcaklık 15°C, *I* 0,35 M, şalgam POD enzimi için ise pH 8,0, sıcaklık 15°C, *I* 0,3 M olarak hesaplandı.

**2015, 81 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Peroksidaz, Afinite kromatografisi, Karaturp, Şalgam, Saflaştırma, 4-Amino benzohidrazid türevleri

## ABSTRACT

Ph. D.Thesis

### PURIFICATION OF BLACK RADISH AND TURNIP POD ENZYMES USING WITH 4-AMINO BENZOHYDRAZIDE DERIVATES

Aykut ÖZTEKİN

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this thesis, it was aimed to determine the most effective and novel affinity ligands for purification of plant peroxidase enzymes in one step using amino benzohydrazide molecules. For this purpose, in order to contribute to the purification studies of plant peroxidase enzymes made with 4-amino benzohydrazide in the literature, 4-amino 2-methyl benzohydrazide, 4-amino 3-methyl benzohydrazide, 4-amino 2-methoxy benzohydrazide, 4-amino 3-methoxy benzohydrazide derivative molecules were used for the purification of POD enzymes for the first time. The inhibition effects on the POD enzymes of black radish and turnip were investigated by carrying out the hydrazine synthesis from the methyl benzoate forms of the derivative molecules and the purification of black radish and turnip POD enzymes in one step was performed with affinity gels obtained by binding alternating inhibitory molecules to Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material. When 4-amino 2-methyl benzohydrazide was used as ligand, POD enzyme was purified 211.4 fold with a yield of 14.1% from the black radish, 444.6 fold with a yield of 11.7% from the turnip, 191.6 fold with a yield of 14.2% from the black radish with 4-amino 3-methyl benzohydrazide, 234 fold with a yield of % 10.2 from the turnip with 4-amino 3-methyl benzohydrazide, 676.4 fold with a yield of % 33.6 from the black radish with 4-amino 2-methoxy benzohydrazide, 806.7 fold with a yield of 20.1% from the turnip with 4-amino 2-methoxy benzohydrazide, 244.3 fold with a yield of % 10.1 from the black radish with 4-amino 3-methoxy benzohydrazide and 653.9 fold with a yield of 12.2% from the turnip with 4-amino 3-methoxy benzohydrazide. The molecular weight and enzyme purity of the enzymes purified from all the columns were controlled by SDS-PAGE. Single band at 43-47 kDa for black radish POD enzyme and single band at 47 kDa for turnip POD enzyme were observed. The purification results of all the columns were compared and the column holding capacity for Sepharose-4B-L-Tyrosine-4-amino-2-methoxy benzohydrazide column, which is the best column, different pH, temperature, ionic strengths (*I*) for the black radish and turnip POD enzymes were studied. The optimum conditions for the black radish POD enzyme were calculated as pH 8.0, temperature 15°C, *I* 0.35 M and the optimum conditions for the turnip POD enzyme were calculated as pH 8.0, temperature 15°C, *I* 0.3 M.

**2015, 81 pages**

**Keywords:** Peroxidase, Affinity chromatography, Black Radish, Turnip, Purification, 4-Amino benzohydrazide derivatives

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deđerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü'ne, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Doç. Dr. Melda şİşECİOĞLU'na, Sayın Dr. Hatice SEÇİNTİ'ye,

Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığım Ağrı İbrahim een Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü'ne, çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen eřim ve kızıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doktora süresi boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

**Aykut ÖZTEKİN**

**Aralık, 2016**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Peroksidazlar .....	2
1.2. Bitki Peroksidazları .....	4
1.3. Afinite Kromatografisi .....	9
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>10</b>
2.1. Bitkilerden POD Enzimi Safılaştırılması Çalışmaları .....	10
2.2. Çalışmanın Amacı .....	12
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>13</b>
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler .....	13
3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar .....	13
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	14
3.2. Yöntemler .....	17
3.2.1. Protein tayini .....	17
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini .....	17
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi .....	17
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	18
3.3. Karatürp ve Şalgamdan Peroksidaz Enziminin Safılaştırılması Çalışmaları .....	19
3.3.1. Ligand seçimi .....	19
3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	20
3.3.3. İnhibitör çalışmaları .....	21
3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi.....	21

3.3.4. Sepharose-4B-L-Tirozin-(1a, 2a, 3a, 4a) afinite jellerinin hazırlanması .....	22
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	22
3.3.4.b. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin (1a, 2a, 3a, 4a) Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi. ....	23
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi .....	24
3.3.5.a. Afinite kolonlarına numune tatbiki ve elüsyonu .....	24
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi .....	25
3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması.....	26
3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi .....	27
3.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi .....	27
3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	27
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>28</b>
4.1. 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi .....	28
4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik Hazırlanması .....	33
4.3. Karaturp ve Şalgam POD Enzimlerinin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile Saflaştırılması Çalışma Sonuçları .....	33
4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin $K_i$ ve $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	34
4.4.1. 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	36
4.4.2. 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	39
4.4.3. 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	42
4.4.4. 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	45
4.4.5. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	48
4.4.6. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	51
4.4.7. 4-Amino-3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	54



4.4.8. 4-Amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....	57
4.5. Karatürp ve Şalgam POD Enzimlerinin 4-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları .....	60
4.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	63
4.6.1. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid molekülü kullanılarak hazırlanan afinite kolonunun karatürp ve şalgam POD enzimlerini tutma kapasitesinin belirlenmesi .....	66
4.6.1.a. Kolon kapasitesine sıcaklığın etkisi sonuçları.....	66
4.6.1.b. pH'nın kolon kapasitesine etkisi sonuçları.....	67
4.6.1.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi sonuçları .....	68
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>70</b>
KAYNAKLAR .....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	82

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

E.C.	Enzim kod numarası
E.Ü.	Enzim ünitesi
LPO	Laktoperoksidaz enzimi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
IC <sub>50</sub>	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
PABH	Para amino benzoikhidrazid (4-amino benzohidrazid)
DAB	[1,1'-bifenil]-3,3',4,4'-tetraamin
ABTS	(2Z,2'Z)-2,2'-(hidrazin-1,2-diliden)bis(3-etil-2,3-dihidrobenzo[d]tiazol-6-sulfonat)
OPD	Benzene-1,2-diamin
TMB	3',4,5,5'-tetrametil-[1,1'-bifenil]-3,4'-diamin
HRP	Horseradish Peroxidase (At turpu peroksidazı)
TLC	İnce tabaka kromatografisi
DMSO	Dimetil sülfoksit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HRP oksidasyon-redüksiyon döngüsü.....	5
Şekil 1.2. Peroksidaz enzimlerinin substrat olarak kullandığı aromatik bileşikler.....	6
Şekil 1.3. Laktoperoksidaz enziminin guaiakol substratını, guaiakolun renkli oksidasyon ürününe çevirme reaksiyonu .....	7
Şekil 1.4. Aromatik substrat varlığında peroksidaz enziminin polimer reaksiyonu katalizleme döngüsü.....	8
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	19
Şekil 3.2. Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılacak moleküller .....	20
Şekil 3.3. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması ..	21
Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu.....	23
Şekil 3.5. 4-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlenmesi reaksiyonu .....	24
Şekil 4.1. 4-Amino 2-metil benzohidrazid (1a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	29
Şekil 4.2. 4-Amino 3-metil benzohidrazid (2a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	30
Şekil 4.3. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid (3a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	31
Şekil 4.4. 4-Amino 3-metoksi benzohidrazid (4a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	32
Şekil 4.5. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik .....	33
Şekil 4.6. Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-2-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	36
Şekil 4.7. Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	38

<b>Şekil 4.8.</b> Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	39
<b>Şekil 4.9.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....	41
<b>Şekil 4.10.</b> Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	42
<b>Şekil 4.11.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....	44
<b>Şekil 4.12.</b> Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	45
<b>Şekil 4.13.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....	47
<b>Şekil 4.14.</b> Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	48
<b>Şekil 4.15.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	50
<b>Şekil 4.16.</b> Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	51
<b>Şekil 4.17.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....	53
<b>Şekil 4.18.</b> Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	54
<b>Şekil 4.19.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	56

<b>Şekil 4.20.</b> Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3- metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği .....	57
<b>Şekil 4.21.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	59
<b>Şekil 4.22.</b> Karaturp ( <i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin 4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonundan elüsyonu aktivite/absorbans grafiği .....	61
<b>Şekil 4.23.</b> Şalgam ( <i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin 4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonundan elüsyonu aktivite/absorbans grafiği .....	62
<b>Şekil 4.24.</b> 4-Amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp POD enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafi .....	64
<b>Şekil 4.25.</b> 4-Amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan şalgam POD enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafi .....	64
<b>Şekil 4.26.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp POD enzimlerinin SDS-PAGE substratla boyama fotoğrafi .....	65
<b>Şekil 4.27.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği .....	66
<b>Şekil 4.28.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği .....	67
<b>Şekil 4.29.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için pH-kapasite grafiği .....	67
<b>Şekil 4.30.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için pH-kapasite grafiği .....	68
<b>Şekil 4.31.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği .....	68
<b>Şekil 4.32.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması .....	4
<b>Çizelge 4.1.</b> 4-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları .....	28
<b>Çizelge 4.2.</b> 4-Amino benzohidrazid kolonundan karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflaştırma sonuçları .....	34
<b>Çizelge 4.3.</b> 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	36
<b>Çizelge 4.4.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü .....	37
<b>Çizelge 4.5.</b> Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	38
<b>Çizelge 4.6.</b> 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	39
<b>Çizelge 4.7.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü .....	40
<b>Çizelge 4.8.</b> Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	41
<b>Çizelge 4.9.</b> 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	42
<b>Çizelge 4.10.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü .....	43
<b>Çizelge 4.11.</b> Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	44
<b>Çizelge 4.12.</b> 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	45

<b>Çizelge 4.13.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü .....	46
<b>Çizelge 4.14.</b> Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	47
<b>Çizelge 4.15.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	48
<b>Çizelge 4.16.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen deney prosedürü.....	49
<b>Çizelge 4.17.</b> Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	50
<b>Çizelge 4.18.</b> 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	51
<b>Çizelge 4.19.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü.....	52
<b>Çizelge 4.20.</b> Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	53
<b>Çizelge 4.21.</b> 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .....	54
<b>Çizelge 4.22.</b> Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü .....	55
<b>Çizelge 4.23.</b> Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	56
<b>Çizelge 4.24.</b> 4-Amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	57
<b>Çizelge 4.25.</b> Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü.....	58

<b>Çizelge 4.26.</b> Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi .....	59
<b>Çizelge 4.27.</b> Karaturp ve şalgam POD enzimleri için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları .....	60
<b>Çizelge 4.28.</b> Afinite kolonlarından elde edilen karaturp POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu .....	62
<b>Çizelge 4.29.</b> Afinite kolonlarından elde edilen şalgam POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu .....	63





## 1. GİRİŞ

Canlıların yaşamlarını devam ettirebilmesi için biyokimyasal reaksiyonlarını katalizlemesi gerekir. Kataliz olmaksızın yıllarca sürebilecek kimyasal reaksiyonlar katalizörler varlığında saniyeler içinde gerçekleşir. Enzimler benzer substratlar arasında seçim yapabilen, reaksiyonun gerçekleşme hızını  $10^{17}$  kat kadar arttırabilen özgül biyomoleküllerdir. Enzimlerin 5.000'e yakın biyokimyasal reaksiyon tipini katalizlediği bilinmektedir. Enzimlerin katalizlediği tepkimelerde kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin üretimi sağlanır (Lehninger 2005).

Enzimler protein yapısındadır, reaksiyon spesifikliği çok yüksektir. Bu özellikleri enzimlerin eşsiz üç boyutlu yapısından kaynaklanmaktadır. Metabolizmada protein yapısında olmayıp reaksiyonları katalizleyen katalitik RNA molekülleri (ribozim) de vardır (Schomburg *et al.* 2013).

İnhibitörler, enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesine neden olan maddelerdir. Bu maddeler, çoğunlukla küçük molekül yapısına sahip bileşikler, iyonlar veya şelatlayıcılarıdır. Enzim inhibisyonu, biyolojik sistemlerdeki kontrol mekanizmalarının önemli bir kısmını oluşturur. Kimyasal maddeler, ilaçlar ve zehirli bileşikler bu yolla etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

İnhibisyon, dönüşümsüz ya da dönüşümlü olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana getirir. Bu durumda enzimin tekrar aktivite göstermesi beklenemez. Dönüşümlü inhibisyonunda ise enzim ile inhibitörün etkileşmesi bir denge reaksiyonu oluşturur. Bu inhibisyon tipi yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonunda, inhibitör ile substratın yapıları benzerlik gösterir ve enzimin aynı aktif bölgesine bağlanırlar. İnhibitörün etkisi, substrat konsantrasyonu arttırıldıkça

denge substrata doğru kaydığı için azalır. Bu sebepten yarışmalı inhibisyonda  $K_M$  değerinde artış gözlenir, enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez. Yarışmasız inhibisyon tipinde ise inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanır, genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda  $V_{max}$  değerleri inhibitör konsantrasyonu arttıkça azalır fakat  $K_M$  değerleri değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör ES (Enzim-Substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerlerinde aynı anda bir azalma görülür. İnhibitör etkilerini yarışmalı veya yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

### 1.1. Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD, E.C: 1.11.1.7) oksidoredüktazlar sınıfında olan ve hem grubu içeren proteinlerdir. Bu enzimler bazı indirgeyiciler ve peroksitler arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizler. Hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunurlar.

Tüm hem grubu içeren peroksidazlar aktif bölgelerinde ferriprotoporfirin IX prostetik grubunu ihtiva eder. Katalitik mekanizmaları ping-pong mekanizmasını içeren iki elektronun hidrojen peroksitten heme transferiyle başlar ve enzimin oksitlenmiş formu oluşur. Ardışık tek elektron azaltımları ile enzim doğal formuna döner veya indirgenmiş bölge enzimin ara oksitlenmiş formunu oluşturur (Dunford *et al.* 2010).

Polipeptit zinciri üzerindeki ikinci prostetik grubu ise glikozid yan zincirleri oluşturur. Peroksidaz enzimlerinin çoğu moleküler ağırlıklarının %15-17'si kadar karbohidrat içerir (Van Huystee 1987). Hem grubu ve glikozidik grupların yanında kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) iyonu da peroksidaz salınımı ve polipeptit zincirinin yapısal devamlılığı için gereklidir (Fric 1976; Van Huystee 1987).

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

Metabolizma sırasında oluşan, oksitleyici özelliği olan  $H_2O_2$ 'in ortamdan çok hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerekir. Hücrede bu görev enzimatik antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidazlar tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Hücre içindeki hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda katalazlar tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde ise peroksidaz enzimleri çeşitli aromatik bileşikler oksitler, elektronları  $H_2O_2$ 'ye transfer eder (Robert *et al.* 1993) ve  $H_2O_2$ 'yi suya dönüştürür (Scandalios *et al.* 1994).

Laktoperoksidaz sütte, tükürük ve gözyaşında, (Kumar and Bhatla 1995), miyeloperoksidaz lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde ve dalakta, glutatyon peroksidaz ise uterus, akciğer duvarları, sitoplazma ve mitokondrilerde bulunan peroksidaz enzimlerine örnek olarak verilebilir (Pütter and Becker 1987).

Peroksidaz enzim ailesi spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimden oluşur (Fric 1976).

Peroksidazlar, üç yapısal sınıfa ayrılabilir. Sınıf I: Maya, bakteri peroksidazları ve yüksek bitki askorbat peroksidazlarını içerir. Sınıf II: Mantarlarda bulunan mangan peroksidazdan oluşmaktadır. Sınıf III ise klasik salgı bitki peroksidazlarından oluşur (Hiraga *et al.* 2001). Klasik salgı bitki peroksidazları (Sınıf III Prx, E.C. 1.11.1.7) bitkilerde hidrojen peroksit kullanarak, farklı alt substratların oksitlenmesini mümkün kılan enzimlerdir.

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

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

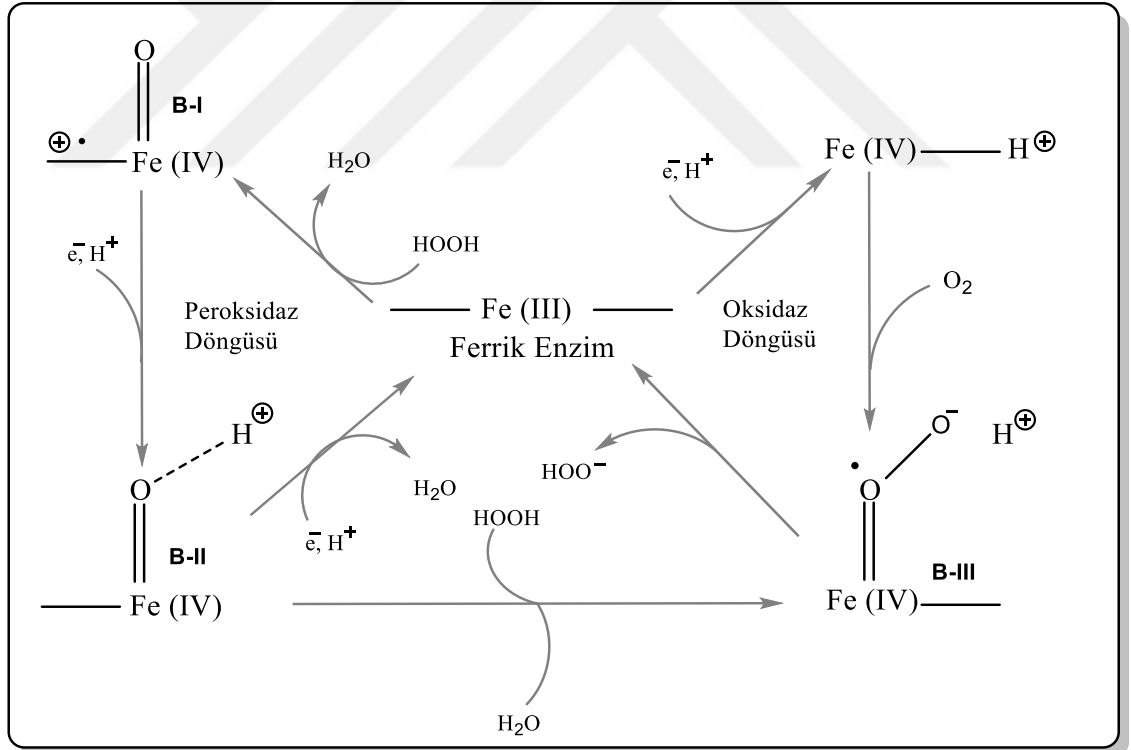
## 1.2. Bitki Peroksidazları

Bitki peroksidazları; katekol, katekin, klorojenik asit, luminol ve guaiakol gibi aromatik moleküllerin peroksit varlığında oksidasyonunu katalizler (Onsa *et al.* 2004). Bu aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılırken, metabolizmada oluşan hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürür (Kampis *et al.* 1984; McLellan and Robinson 1987).

Peroksidazlar bitkilerde birçok hücresel süreçte rol oynar. Bu süreçler içinde bitkilerin gelişimi ve strese karşı olan cevabı da bulunmaktadır. Bitkilerde büyümenin hormonal düzenlenmesi, hücre duvarı metabolizması ve hücrelerin oksidasyon defansında

etkilidirler. Diğer taraftan, peroksidazlar biyotik ve abiyotik stresleri gösteren bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir (Jouili *et al.* 2011).

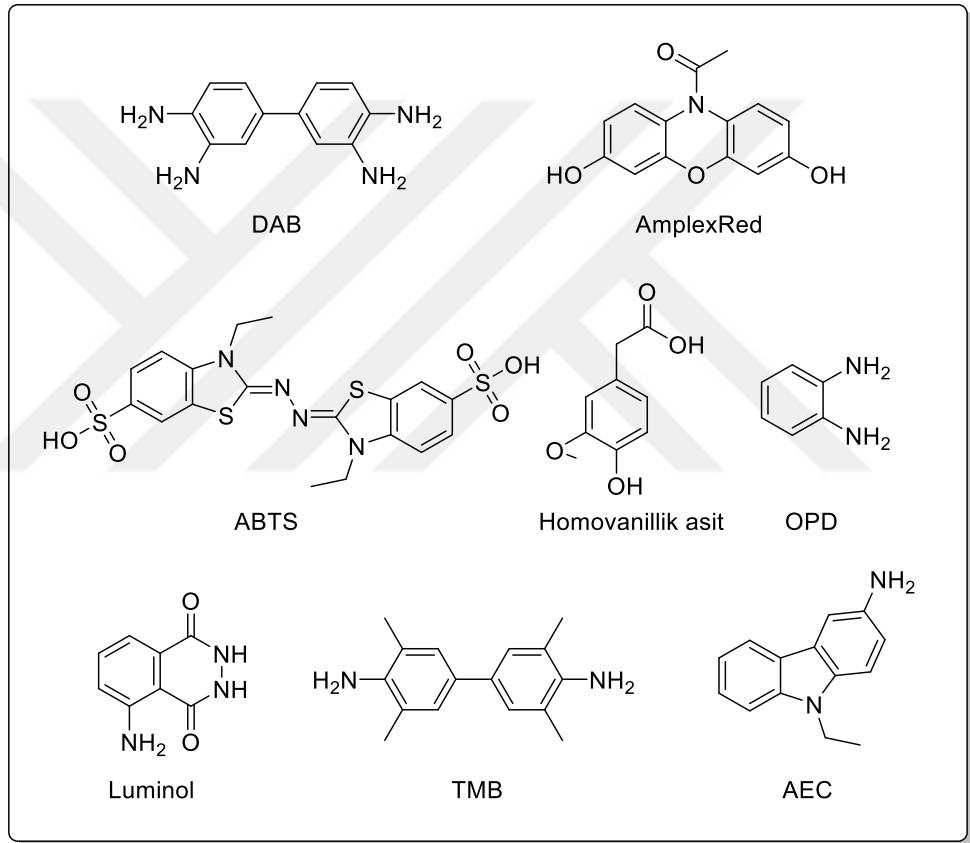
Peroksidaz enzimleri bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), çimlenme (Morohashi 2002), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi biyolojik olaylarda görev alır. Ayrıca organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda da kullanılır (Adam *et al.* 1999). Klinik tanı ve analitik uygulamalarda da tercih edilen enzimlerdir (Kwak *et al.* 1996).



**Şekil 1.1.** HRP oksidasyon-redüksiyon döngüsü (Berglund *et al.* 2002).

Şekil 1.1'de yaban turpu peroksidazın beş farklı oksidasyon durumu görülmektedir (Berglund *et al.* 2002). Redoks tepkimesi sırasında hidrojen peroksit reaksiyonu

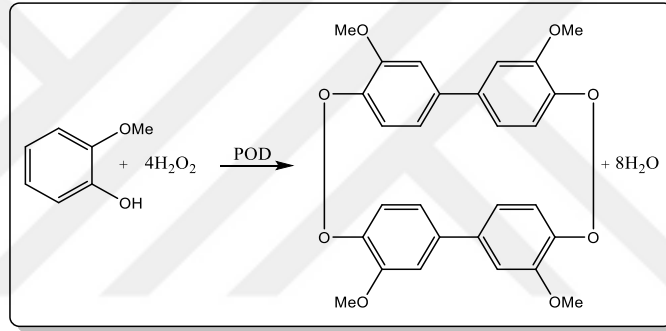
başlatan boş oktahedral pozisyondaki demir atomuna bağlanır. Reaksiyonda 3 farklı ara bileşen oluşmaktadır (**B-I**, **B-II**, **B-III**). Şekil 1.1’de görülen bu bileşenler ya elektrona bağlıdır ya da hidrojen peroksit ile reaksiyona girmiştir. Bileşen I’in Bileşen II’ye indirgenmesi ve Bileşen II’nin bekleme durumuna geçmesiyle substratların indirgenmesi sağlanır. Bu substratlar genellikle fenoller ve aromatik aminlerdir (Dunford *et al.* 2010).



**Şekil 1.2.** Peroksidaz enzimlerinin substrat olarak kullandığı aromatik bileşikler

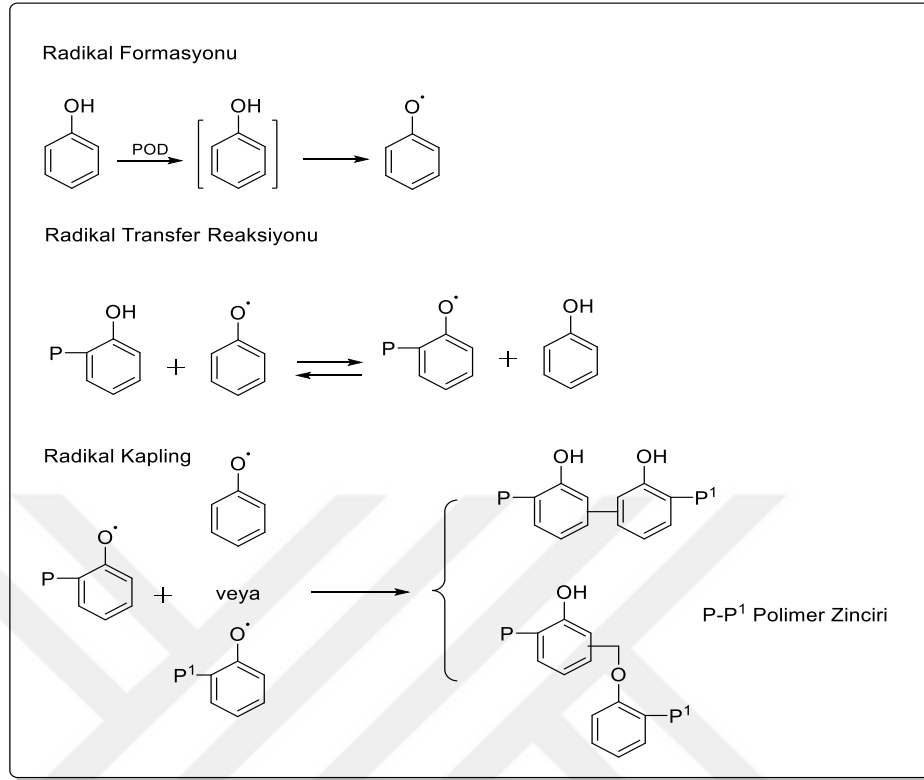
Şekil 1.2’de çeşitli peroksidaz enzimlerinin substrat olarak kullandığı aromatik aminler ve fenol türevlerine örnekler verilmiştir. Bu örnekler içerisinde luminol özellikle dikkat çekicidir. HRP, ELISA ve Western Blot tekniklerinde sekonder antibadi olarak kullanılır. Bu tekniklerde, luminolün HRP tarafından 3-aminopitalata dönüşümü sonucu 428 nm de maksimum absorbands vermesinden yararlanır.

Aynı bitki içerisinde çok sayıda farklı peroksidaz enziminin varlığı tespit edilmiştir. Farklı peroksidazların özel fonksiyonları, düşük substrat özgüllüğü ve birçok izoenzimlerinin varlığı, görevleri hakkında bilgi edinmeyi zorlaştırır (Hiraga *et al.* 2001). Bazı izozimler yapısal olarak ifade edilirken bazıları bitki yapısı ve gelişiminde önemli yer tutar. Aynı bitkide bulunan farklı peroksidaz izozimleri fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 1998), hücre uzaması (Liszka *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009), fitohormon metabolizması (Cosio and Dunand 2009), hücre duvarları bileşenlerinin çapraz bağlanması, suberin ve lignin oluşumunda görev alır (Marjamaa *et al.* 2009).



**Şekil 1.3.** Laktoperoksidaz enziminin guaiakol substratını, guaiakolun renkli oksidasyon ürününe çevirme reaksiyonu (Ghada *et al.* 2011)

Guaiakol substratı peroksidaz enzimleri varlığında yükseltgenerek tetraguaiakol ürününe çevrilir. Bu ürünün 470 nm'de max absorbans vermesinden yararlanılarak peroksidaz enzimlerinin aktivite tayini bu substrat varlığında kolayca yapılabilmektedir (Ghada *et al.* 2011).



**Şekil 1.4.** Aromatik substrat varlığında peroksidaz enziminin polimer reaksiyonu katalizleme döngüsü (Shoda *et al.* 2016).

Aromatik substratların peroksidaz enzimleri varlığında yükseltgenerek polimerleştiği genel reaksiyon mekanizması üç basamakta gerçekleşir. Şekil 1.4'te belirtilen mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi fenolden elektron kopararak serbest fenoksi radikalini oluşturur. İki radikal, moleküler kaplink yoluyla dimerize olur. Genel reaksiyon olarak peroksidaz radikal oluşturur ve enzim oluşan daha büyük molekülü tanımayanaya kadar radikal birleşme devam eder. Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşiklerden dimer, trimer, tetramer, oligomer veya polimer oluşturma kapasiteleri olan enzimlerdir. Aromatik bileşiklerden sağlanan elektronlar ise enzim tarafından çeşitli peroksitlere aktarılabilir.



### 1.3. Afinite Kromatografisi

Biyokimya araştırmalarında ayırma teknolojisinin vazgeçilmezlerinden olan afinite kromatografisi, hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını veya özelleşmiş kimyasal yapılarını esas alarak saflaştırma yapmayı mümkün kılar.

Afinite kromatografisi bir tür adsorbsiyon kromatografisidir. Saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşimine (ligant) spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Saflaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve hazırlanan aktif materyalin geri kazanılması olasılığı genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan, hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyalin, bu teknikle bir tek basamakta ayrımı gerçekleştirilir. Afinite kromatografisinin konsantre edici özelliği de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmayı mümkün kılmaktadır. Ayrımların yüksek seçiciliği, birbirini etkileyen moleküllerin doğal spesifitesinden kaynaklanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi saflaştırma çalışmalarında halen önemini korumaktadır. Afinite kromatografi şu amaçlarla kullanılabilir:

- Kompleks biyolojik karışımlardan tek bir maddeyi saflaştırmak için,
- Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden doğal şekillerini ayırmak için,
- Kirletici büyük miktarlardaki madde karışımlarından küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için.

Başarılı bir ayırım, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerektirir. Afinite kromatografisi kullanılarak spesifik ve yüksek verimde bir ayırım yapabilmek için şu iki husus çok önemlidir;

- İmmobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlanma afinitesinin olması,
- Safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gereklidir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Bitkilerden POD Enzimi Saflaştırılması Çalışmaları

Bitkisel kaynaklı peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında literatürde farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmış ve halen bu çalışmalar devam etmektedir. Kullanılan yöntemler arasında amonyum sülfat çöktürmesi, metal ve hidrofobik afinite, ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik adımlar bulunmaktadır. Bu metodların kullanıldığı birçok çalışmadan bir kısmı aşağıda özetlemiştir. Bu çalışmalara örnek olarak afinite tekniği kullanılarak tek kademedede karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat, şalgamdan 269,13 kat %9 verimle (Kalın *et al.* 2014), kırmızı lahanadan 120 kat %2.9 verimle (Somtürk *et al.* 2014), at turpundan 3 kromatografik kademedede 291 kat %71 verimde (Lavery *et al.* 2010), rekombinant HRP 12 kat %55 verimle (Spadiut *et al.* 2014), kırmızı pancardan %84,6 verimle 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007), karalahanadan POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat %33 verimle (Gülçin ve Yıldırım 2005), vanilya çekirdeğinden iki kromatografik adımda 1563,5 (EÜ/mg) 21 kat %19 verimle (Marquez *et al.* 2008), papayadan POD enzimini üç kromatografik adımda 68,59 (EÜ/mg) 30,22 kat %44,37 verimle (Pandey *et al.* 2012), hurma yapraklarından üç kromatografik adımda 906,2 (EÜ/mg) 17 kat %5,8 verimle (Al-Senaidy *et al.* 2011), karnabahardan POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) 19,33 kat %0,2 verimle (Köksal and Gülçin 2008) POD enzimi saflaştırılmıştır. Ve yine literatürde farklı kaynaklardan bitki peroksidazlarının saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Bunlar da; *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden, papayadan (Pandey and Dwivedi 2011, Pandey *et al.* 2012), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005, Köksal and Gülçin 2008), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002, Al-Senaidy *et al.* 2011), çilekten (Civello *et al.* 1995), kırmızı biberden (Martinez *et al.* 2008), marula meyvesinden (Mdluli 2005), mısırdan (Mika *et al.* 2008), çavdar

yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), ve at turpundan (Lavery *et al.* 2010) örnekler vardır.

Yapılan saflaştırma çalışmaları neticesinde peroksidaz enzimi için birçok izoenzim yapısı bulunmuştur. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen bu izoenzimlerin; moleküler ağırlık, substrat spesifitesi, optimum pH, stabil sıcaklık ve fizyolojik rol gibi karakteristik özelliklerinin farklı olduğu belirlenmiştir (Tıpawan and Barrett 2005). Örneğin bu karakteristik özelliklerden molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla; at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) ve domatesde (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, karalâhanada (Gülçin and Yıldırım 2005) 95 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44kDa, hurma yapraklarında (Al-Senaidy *et al.* 2011) 55 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak tespit edilmiştir. Bir diğer karakteristik özellik olan optimum pH değerlerinin ise 5,0-7,5 aralığında değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Tıpawan and Barrett 2005).

Peroksidaz üzerine yapılan en son saflaştırma yönteminde ise afinite kromotografisinde 4-amino benzohidrazid ligand olarak kullanılmıştır (Kalin *et al.* 2014). Yapılan çalışmada şalgam ve karaturptan peroksidaz enziminin tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Karaturp için 40.3 kat saflaştırma ve %10,6 verime şalgam için ise 269.3 kat saflaştırma ve %9 verime ulaşılmıştır (Kalin *et al.* 2014).

Literatürlerden özetle görüleceği gibi; bitki peroksidazlarının saflaştırma yöntemleri üzerine birkaç örnek hariç, en az iki kromatografik yöntemle başvurulmuş ve sadece tek bir bitki için spesifik kullanılmıştır. Yine bu çalışmalardan görüleceği gibi saflaştırma verimleri yüzde 02 – 70 arasında değişmektedir. Aromatik bir hidrazin kullanılarak karaturp ve şalgam POD enziminin tek basamakta saflaştırılması ise sadece tek bir literatürde gösterilmiştir. Literatürde birden fazla bitki peroksidazını saflaştıracak ne yeni bir afinite jeli, ne de yeni bir ligand molekülü üzerine bir çalışmaya

rastlanılmamaktadır. Var olan çalışmalarda ise saflaştırma katsayısı ve % verim ticari kullanıma uygun değildir.

## 2.2. Çalışmanın Amacı

Bitki peroksidazları üzerine birçok saflaştırma prosedürü vardır. Daha önceki çalışmalarda 4-amino benzohidrazid peroksidaz inhibitörü olarak bulunmuş ve afinite jeli hazırlanarak enzimin saflaştırılması yapılmıştır. Bu tez kapsamında ise enzimin aktivitesi üzerine 4-amino benzohidrazid türevi olan: 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid, 4-amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jelleri hazırlandı. Afinite jellerinden peroksidaz enzimi karaturp ve şalgamdan saflaştırılarak önceki çalışmalardaki sonuçlarla mukayesesi yapıldı. Peroksidaz enziminin daha yüksek verimle saflaştırılması amacıyla bulunan yeni bir benzohidrazid türevi, karaturp ve şalgam peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında yeni bir yöntem olarak sunuldu ve diğer bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasına da ışık tutacak kapasiteye sahip olduğu belirlendi. Karaturp ve şalgam POD saflaştırma çalışmalarımızın tek basamakta ve uygun maliyette olması, ticari bir kullanım potansiyeli ortaya çıkardı. Bu tez kapsamında;

4-Amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak karaturp ve şalgamdan peroksidaz enzimi saflaştırıldı, daha sonra saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerine sentezlediğimiz 4-amino benzohidrazid türevi 4 molekül için inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu 4 molekülün  $K_i$ ,  $IC_{50}$  değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. İnhibisyon gösteren moleküllerin Sepharose-4B matriksi kullanılarak afinite jelleri hazırlandı.

Hazırlanan afinite jellerinden karaturp ve şalgam peroksidaz enzimi saflaştırıldı ve daha önce saflaştırılan 4 –amino benzohidrazid afinite kolonu ile mukayese edildi. En iyi kolon için kolon kapasitesi parametreleri çalışıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Guaiakol, Standart serum albumin, Sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, Sodyum karbonat, 4-amino benzohidrazid, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Sodyum klorür, Glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol, Dikloro metan, Etil asetat, Sodyum Nitrit, %64 Hidrazin monohidrat, Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum dodesilsülfat (SDS) Sodyum perklorat, Sodyum azotür, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit, Triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den;  $\beta$ -merkaptotanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den, 4-amino 2-metil metilbenzoat, 4-amino 3-metil metilbenzoat, 4-amino 2-metoksi metilbenzoat, 4-amino 3-metoksi metilbenzoat Fluorochem firmasından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800
pH metre	: Mettler Toledo Seven Compact
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic

Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	: Sigma
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
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo
Rotary Evaporatör	: Heidolph
NMR	: Bruker 400 MHz

### 3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanış biçimleri aşağıdaki gibidir. Aksi belirtilmediği takdirde kullanılan su saf sudur.

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

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonunda: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,0) tampon çözeltisi kullanıldı: 0,84 g (0,01 mol) NaHCO<sub>3</sub> 75 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9,0 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 100 mL'ye tamamlandı.

2. Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 4-amino benzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi işleminde: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,8) tampon çözeltisi kullanıldı: 0,42 g (0,005 mol) NaHCO<sub>3</sub> 20 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 8,8 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 25 mL'ye tamamlandı.

3. Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino ( $R_1$ ,  $R_2$ ) benzohidrazid afinite jellerinin yıkanması işleminde: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6,8 kullanıldı. 3 g (0,025 mol)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim suyla 250 mL'ye tamamlandı.

#### **Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:**

1. Afinite kolonlarının dengelenmesinde: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) kullanıldı. 12 g ( $1 \cdot 10^{-1}$  mol)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 950 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 1 L'ye tamamlandı.

2. Afinite kolonlarının yıkanmasında: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) tamponu kullanıldı. 1,42 g ( $1 \cdot 10^{-2}$  mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  350 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.

3. POD enziminin elüe edilmesinde: 1 M NaCl içeren 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) kullanıldı. 11,7 g ( $2 \cdot 10^{-1}$  mol) NaCl 150 mL suda çözüldü. 1,42 g ( $1 \cdot 10^{-2}$  mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.

#### **Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti**

1. Karaturp ve şalgamdan homojenat elde edilmesinde: 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) tamponu kullanıldı. 8,16 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 160 mL suda çözüldü. 1N NaOH ile pH 7,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.

#### **Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:**

1. POD enzimi aktivite ölçümünde: 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,0) tampon çözeltisi kullanıldı. 2,72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 160 mL suda çözüldü. 1N NaOH ile pH 6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.

2. Substrat çözeltisi: 45 mM Guaiakol çözeltisi kullanıldı. 996  $\mu\text{L}$  guaiakol alınarak son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

3. Substrat çözeltisi: 22,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi kullanıldı. Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 456 µL alınarak suyla 200 mL'ye tamamlandı.

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

Proteinlerin kantitatif tayininde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi kullanıldı. 200 mg Coomassie brilliant blue G-250, 100 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 200 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi saf su ile son hacim 2 L olacak şekilde ayarlandı.

### **Elektroforezde kullanılan çözeltiler:**

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8): 24,2 g (0,2 mol) Tris, 160 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8): 24,2 g (0,2 mol) Tris, 160 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.
3. Numune tamponu: 1,3 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 6 mL %10'luk SDS ve 3 mL %100'lük gliserin, 2 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim su ile 20 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan önce 1000 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptolanol ilave edildi.
4. Yürütme tamponu: 3 g Tris ve 14,4 g glisin, 200 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 10 mL %10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

### **Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler**

1. Stabilizasyon çözeltisi: 240 mL su, 120 mL %96'lik etanol, 20 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
2. Redüksiyon çözeltisi: 9,6 g sodyum asetat, 90 mL etanol ve 160 mL saf su karıştırılıp, pH 6,0'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 300 mg sodyum tiyosülfat, 6 mL glutaraldehit eklenip su ile 300 mL'ye tamamlandı.



3. Boyama çözeltisi: 200 mg gümüş nitrat, 300 mL suda çözülüp üzerine 60 µL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 7,5 g sodyum karbonat, 540 mL suda çözüldü ve üzerine 240 µL formaldehit ilave edildi.

### **Substrat ile boyamada kullanılan çözelti**

Boya çözeltisi 500 µL guaiakol ve 300 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin 150 mL suda çözülmesiyle hazırlandı.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Protein tayini**

#### **3.2.1.a. 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 (Segel 1968).

Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlar kuvarz küvetlere konuldu. Spektrofotometrede, proteinin içinde bulunduğu tamponun köre karşı absorbansları ölçüldü.

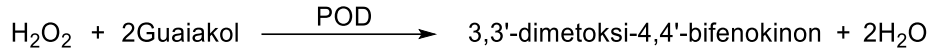
#### **3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi**

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenatlardaki protein konsantrasyonları Bradford 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  $\mu\text{g}$  arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{L}$  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 protein numunesinin içinde bulunmadığı tampondan, ölçüm için ise 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden oluşan karışımlar kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 250 ve 500  $\mu\text{L}$  alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

### **3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini**

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür,  $\text{H}_2\text{O}_2$  tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

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

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

$D_f$  = Seyreltme katsayısı

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

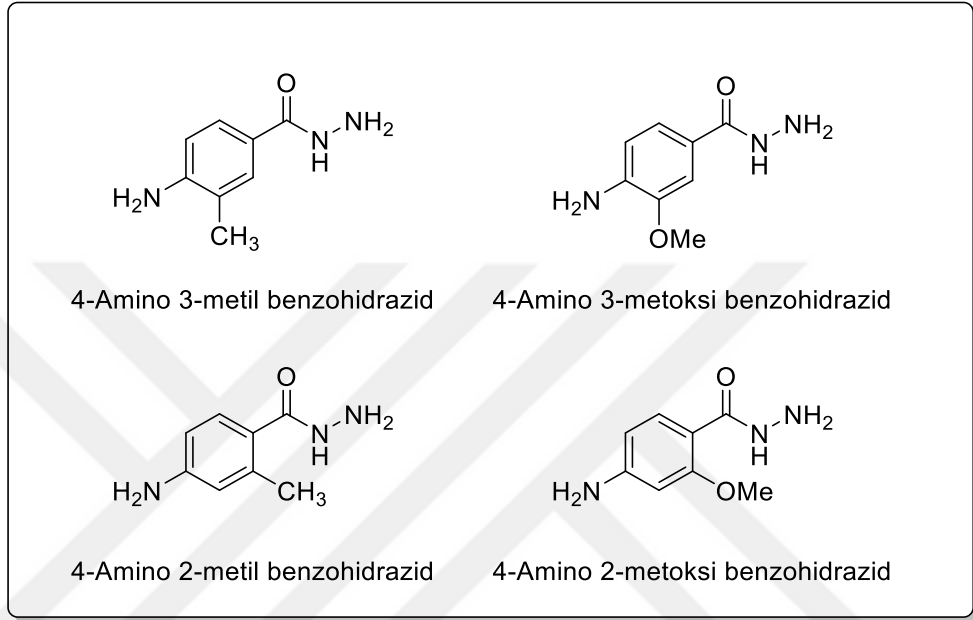
Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak guaiakol kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi  $20^\circ\text{C}$ 'de 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### 3.3. Karaturp ve Şalgamdan Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

#### 3.3.1. Ligand seçimi

Peroksidaz enzimini saflaştırılması amacı ile 4-amino 2-metil metilbenzoat, 4-amino 3-metil metilbenzoat, 4-amino 2-metoksi metilbenzoat, 4-amino 3-metoksi metilbenzoat maddeleri satın alındı, bu 4 molekülün hidrazin formları tarafımızca sentezlendi ve

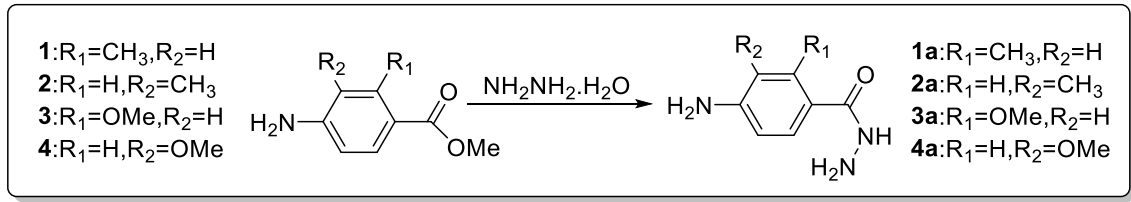
inhibisyon çalışmaları ve ligand olarak kullanılabilirliği incelendi (Şekil 3.2). Sentezlenen bu moleküllerin önemi POD'un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olmalarıdır.



**Şekil 3.2.** Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılacak moleküller

### 3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metil benzohidrazid bileşikleri ticari olarak temin edilemediklerinden dolayı bu bileşikler, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



**Şekil 3.3.** 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması

4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri (Hiroshi *et al.* 2012) yönteminde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda 4-amino metil benzoatlar (**1**, **2**, **3**, **4**) (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 ml metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanmaya kadar geri soğutucu altında ısıtıldı (Reaksiyon TLC ile takip edildi). Çözücü uzaklaştırıldı ve katı pellet etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı. Oluşan beyaz kristaller süzgeç kağıdı yardımıyla ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 4-amino benzohidrazid türevi olan 4 molekül (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) sentezlenmiş oldu ve karakterizasyonları H<sup>1</sup>-NMR yöntemiyle doğrulandı.

### 3.3.3. İnhibitör çalışmaları

#### 3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Literatürde önceden sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine çalışılması planlanan, sentezlediğimiz 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**), inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu değerleri (IC<sub>50</sub>) bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver–Burk grafikleri çizildi ve K<sub>i</sub> değerleri tespit edildi.

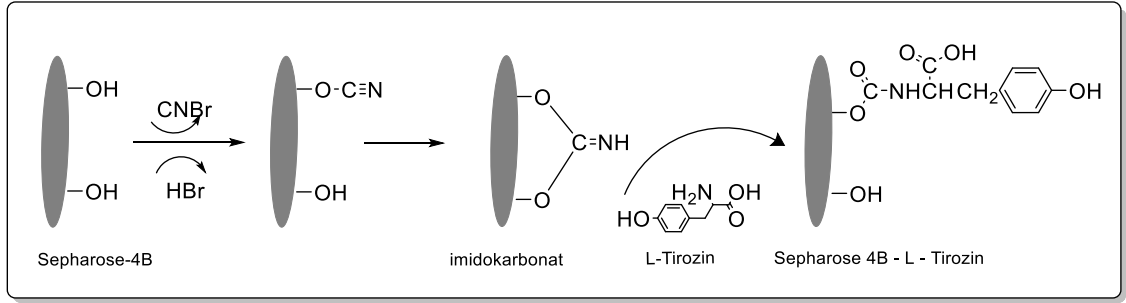
### 3.3.4. Sepharose-4B-L-Tirozin-(1a, 2a, 3a, 4a) afinite jellerinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak bağlandı, daha sonra 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) ligand olarak önceden hazırlanan Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline, ligandlar diazolanarak Tirozin'deki benzen halkasının 3 pozisyonuna kenetlendirildi. Hazırlanan afinite jelinde Sepharose 4-B matriksi, tirozin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimlerin spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Kullanılan inhibitörler tarafımızca sentezlenen yeni POD enzim inhibitörleridir.

Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

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

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk su ile yıkanarak 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,0) ile bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 50 mL'sinde 70 mg tirozin çözülerek çözelti Sepharose 4-B ile aynı behere aktarılarak reaksiyon başlatıldı. 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 bol su ile jel yıkandı, böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 200 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH 8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4'te verilmiştir.

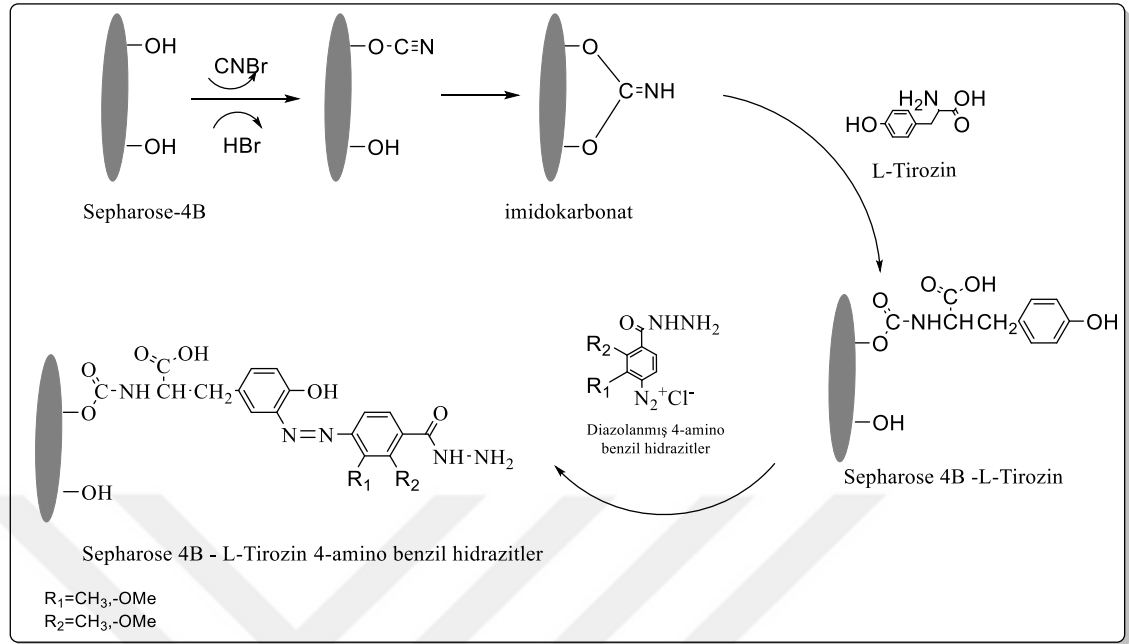


**Şekil 3.4.** CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu

### 3.3.4.b. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin (1a, 2a, 3a, 4a) Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi.

4-Amino benzohidrazid türevi 4 molekülden 100'er  $\mu\text{mol}$  alınarak  $0^\circ\text{C}$  civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 20 mg  $\text{NaNO}_2$  bulunan  $0^\circ\text{C}$ 'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltilisine damla damla reaksiyon çözeltilisine eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'a çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 100 mL, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

Hazırlanan 4-amino benzohidrazid türevi afinite jelleri için reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.5'te gösterildi.



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

### 3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

Hazırlanan jeller dengeleme tamponu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspansiyon edilmiş jel,  $1 \times 10$  cm'lik kapalı sistemden oluşan kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu kullanılarak yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğunun anlaşılmasında, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmesine bakıldı.

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

Hazırlanan homojenatlar 10 mM fosfat (pH 6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolonlara tatbik edildi ve kolonlar 50 mL 25 mM fosfat (pH 6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karaturp ve şalgam peroksidaz enzimleri kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı ve 280



nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı.

#### **3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Belirlenmesi**

POD enzimleri her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin moleköl ağırlıkları ve saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak moleköl ağırlığı belirli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bu işlem için elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

**Ayırma jeli şöyle hazırlandı:** 10 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 8,8 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,4 mL %10 SDS, 0,26 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 6,26 mL saf su karıştırdı. Bu karışımın üzerine 0,04 mL %10'luk amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) ilave edildi.

**Yığma jeli şöyle hazırlandı:** 0,82 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,06 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED ve 2,45 mL saf su alınarak karıştırdı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,02 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. Yığma jeli tarak üst seviyesine kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için beklendi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da

yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg 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 90 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 130 volta çıkarılarak 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 muamele 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. Yıkama 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 (Temel 2006).

### **3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması**

Hazırlanan afinite jellerinin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden peroksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan peroksidaz enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutulularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden peroksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

### **3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi**

Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için hazırlanan kolonda, sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8'de, 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve  $\mu\text{g}$  protein /g jel başına grafik edildi.

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

Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında) tamponlar kullanıldı. En uygun pH için sonuçlar  $\mu\text{g}$  protein /g jel başına grafik edildi.

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

Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı. Bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek, sonuçlar  $\mu\text{g}$  protein /g jel başına grafikte gösterildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

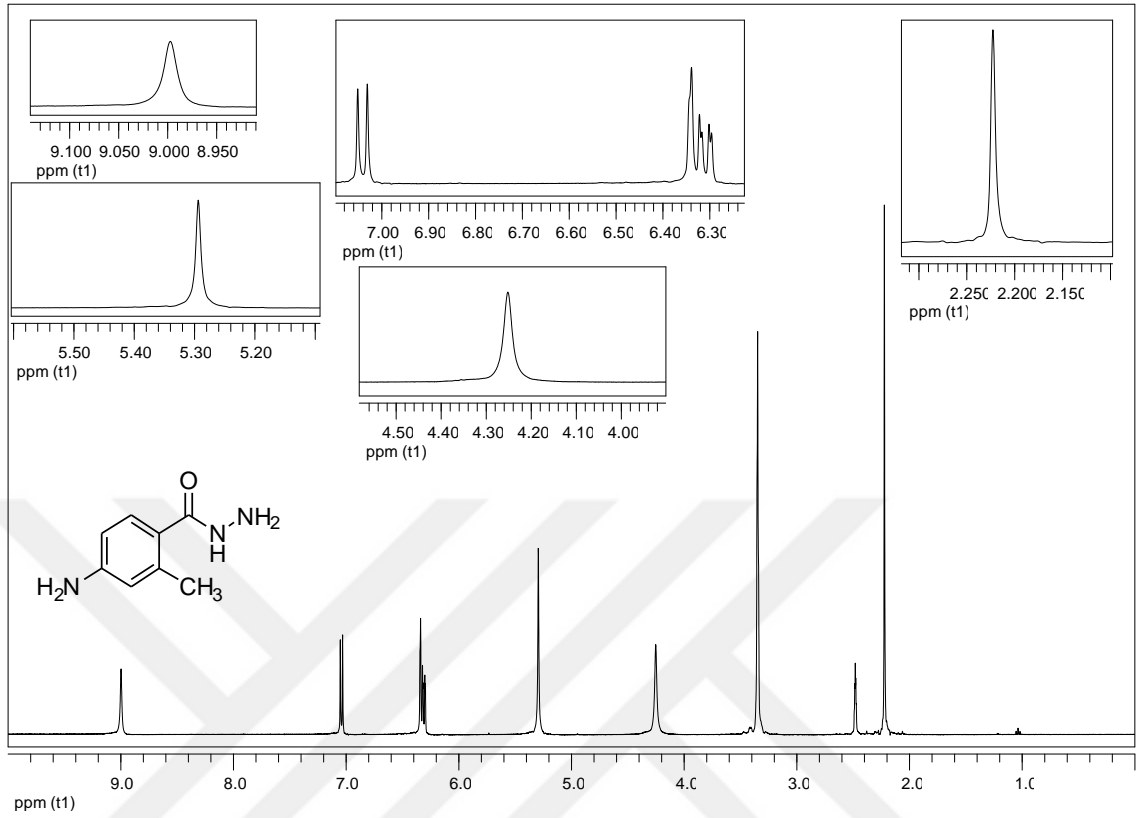
### 4.1. 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

Tez kapsamında çalışılması planlanan 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) molekülleri ticari olarak temin edilemediğinden dolayı bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı ve <sup>1</sup>H-NMR’la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı.

**Çizelge 4.1.** 4-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları

Reaktant 1	Reaktant 2	R <sub>1</sub> /R <sub>2</sub> mmol	Ürün	Süre	% Verim
4-amino 2- metil metil benzoat ( <b>1</b> )	Hidrazin monohidrat	3/12	4-amino 2-metil benzohidrazid ( <b>1a</b> )	18 saat	52
4-amino 3- metil metil benzoat ( <b>2</b> )	Hidrazin monohidrat	3/12	4-amino 3-metoksi benzohidrazid ( <b>2a</b> )	24 saat	45
4-amino 2- metoksi metil benzoat ( <b>3</b> )	Hidrazin monohidrat	3/9	4-amino 2-metoksi benzohidrazid ( <b>3a</b> )	12 saat	61
4-amino 3- metoksi metil benzoat ( <b>4</b> )	Hidrazin monohidrat	3/9	4-amino 2-metil benzohidrazid ( <b>4a</b> )	12 saat	56

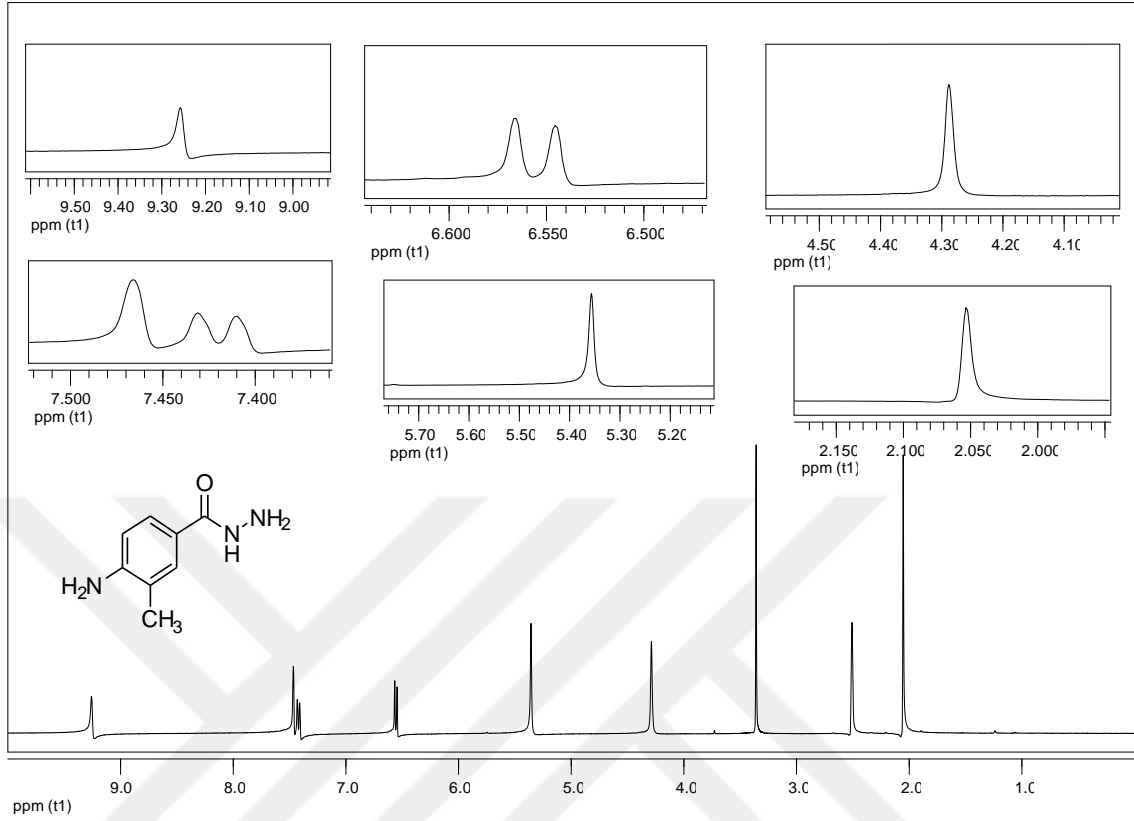
Ticari olarak temin edilen 4-amino 2-metil metilbenzoat (**1**), 4-amino 3-metil metilbenzoat (**2**), 4-amino 2-metoksi metilbenzoat (**3**), ve 4-amino 3-metoksi metilbenzoat (**4**) çıkış molekülleri olarak kullanılarak hidrazin formları sentezlendi. Sonuçlar Çizelge 4.1.’de ve sentezlenen moleküllerin <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektrumları Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4’te gösterildi.



**Şekil 4.1.** 4-Amino 2-metil benzohidrazid (1a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

#### 4-Amino 2-metil benzohidrazid (1a) molekülü için NMR sonuçları:

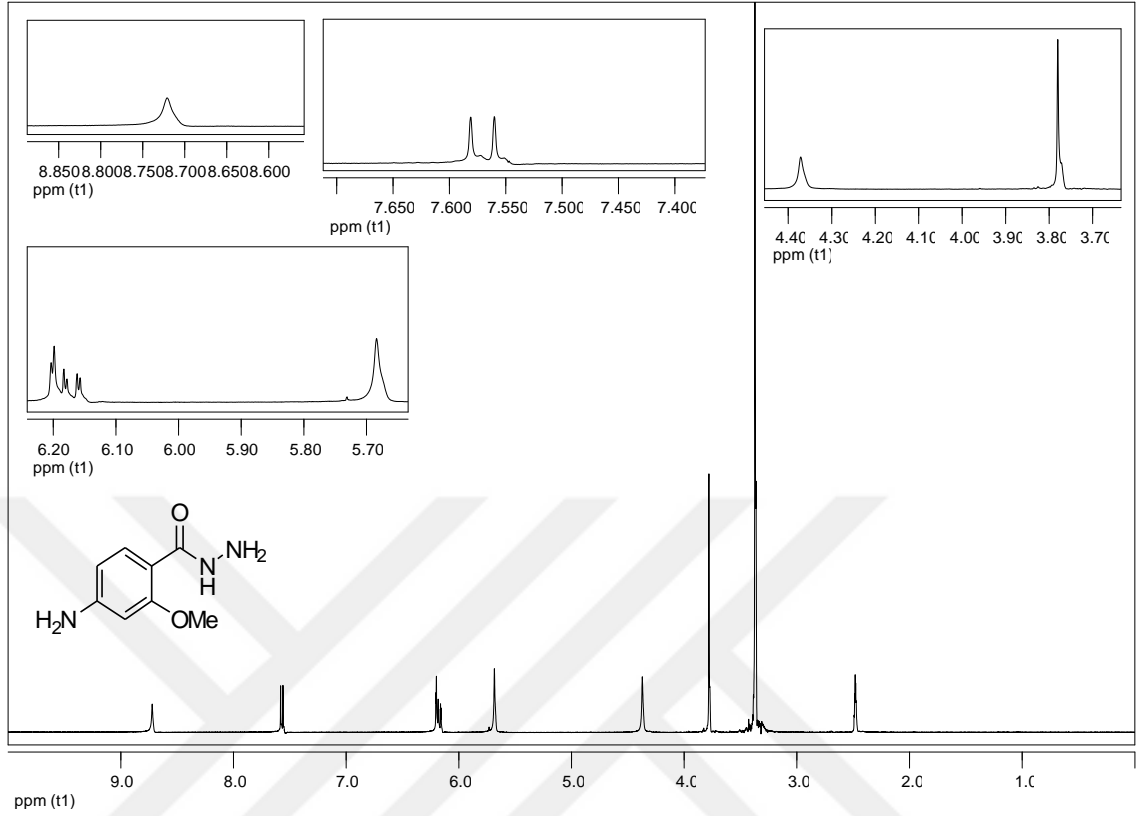
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO): 9.00 (bs, 1H, -NH), 7.04 (d,  $J_{65} = 8.18$  Hz, 1H, H<sub>6aril</sub>), 6.34 (d,  $J_{35} = 2.12$  Hz, 1H, H<sub>3aril</sub>), 6.31 (dd,  $J_{56} = 8.20$  Hz,  $J_{53} = 2.12$  Hz, 1H, H<sub>5aril</sub>), 5.29 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.25 (bs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).



**Şekil 4.2.** 4-Amino 3-metil benzohidrazid (2a) molekülünün 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

#### 4-Amino 3-metil benzohidrazid (2a) molekülü için NMR sonuçları:

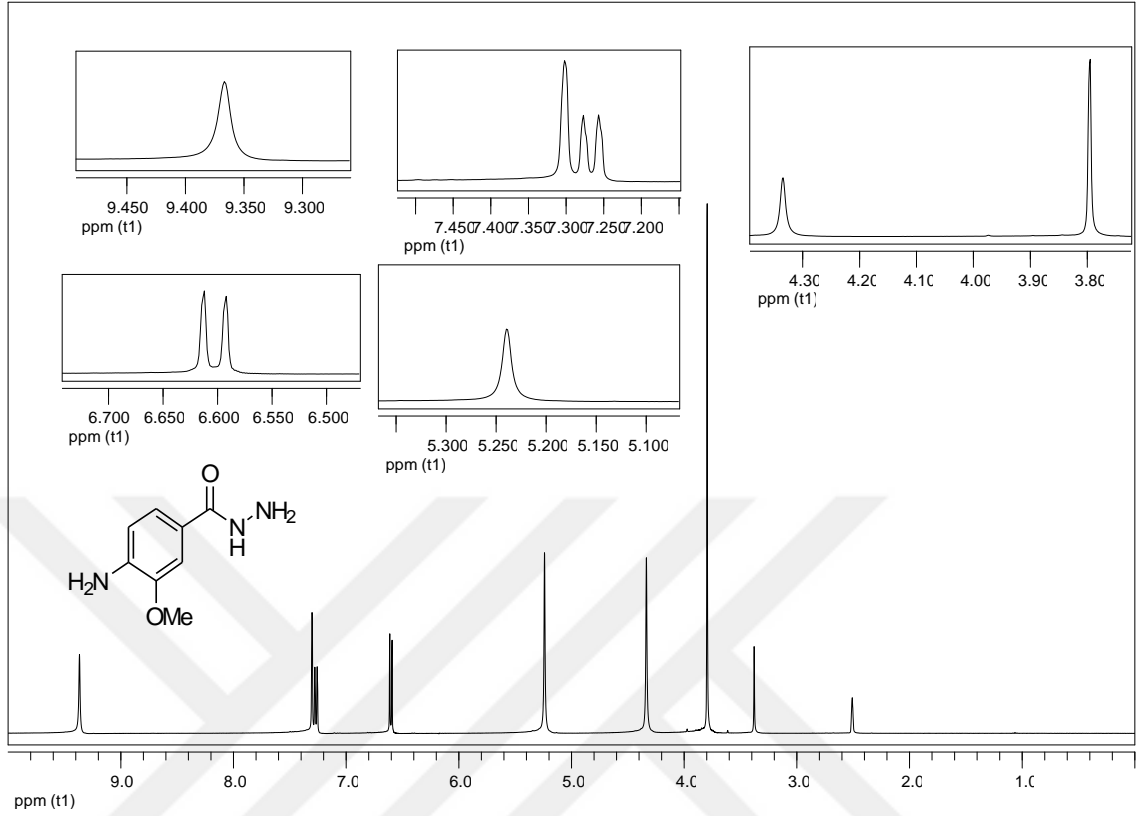
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO): 9.26 (bs, 1H, -NH), 7.47(s, 1H,  $\text{H}_{2\text{aril}}$ ), 7.42 (d,  $J_{65} = 8.36$  Hz, 1H,  $\text{H}_{6\text{aril}}$ ), 6.56 (d,  $J_{56} = 8.30$  Hz, 1H,  $\text{H}_{5\text{aril}}$ ), 5.36 (s, 2H, - $\text{NH}_2$ ), 4.29 (s, 2H, - $\text{NH}_2$ ), 2.05 (s, 3H, - $\text{CH}_3$ ).



**Şekil 4.3.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid (3a) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

#### 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid (3a) molekülü için NMR sonuçları:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO): 8.72 (bs, 1H, -NH), 7.57(d,  $J_{65} = 8.40\text{Hz}$ , 1H, H<sub>6aril</sub>), 6.20 (d,  $J_{35} = 1.91\text{ Hz}$ , 1H, H<sub>3aril</sub>), 6.17 (dd,  $J_{56} = 8.42\text{ Hz}$ ,  $J_{53} = 1.96\text{ Hz}$ , 1H, H<sub>5aril</sub>), 5.68 (bs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.37 (bs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>).



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

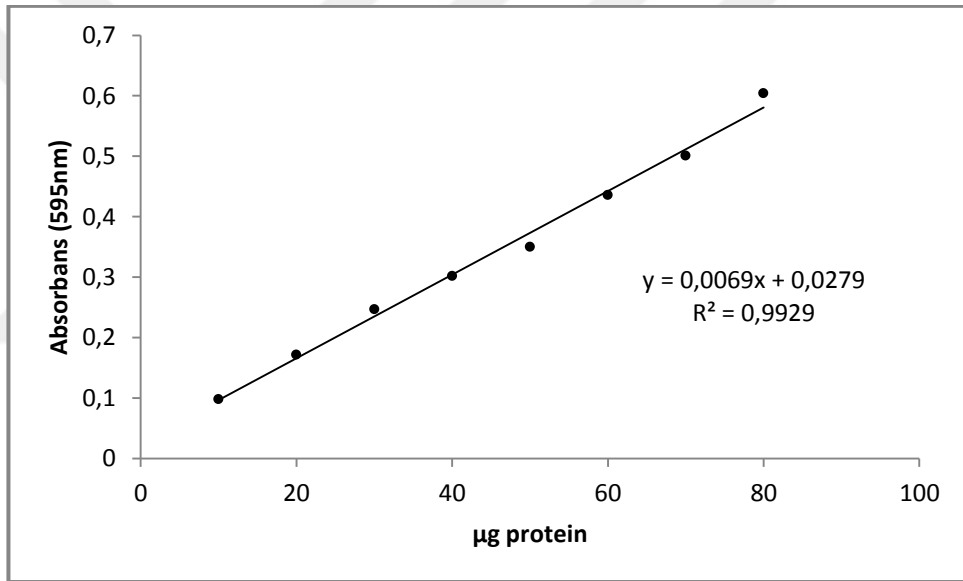
**4-Amino 3-metoksi benzohidrazid (4a) molekülü için NMR sonuçları:**

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO): 9.37 (bs, 1H, -NH), 7.30 (s, 1H, H<sub>2aril</sub>), 7.27 (d, *J*<sub>65</sub> = 8.16 Hz, 1H, H<sub>6aril</sub>), 6.60 (d, *J*<sub>56</sub> = 8.06 Hz, 1H, H<sub>5aril</sub>), 5.24 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.33 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>).



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

4-Amino benzohidrazid türevlerinin (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) ligand olarak kullanıldığı afinite jelleriyle saflaştırılan karaturp ve şalgam POD enzimlerinin kantitatif protein tayini Bradford metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu metotta ilk olarak standart grafik hazırlandı. Kolonlardan elde edilen enzim çözeltilerinde, homojenatta ve SDS-PAGE'ye yüklenen protein miktarları bu yöntem kullanılarak belirlendikten sonra Şekil 4.5'teki standart grafikten faydalanılarak hesaplandı.



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

#### 4.3. Karaturp ve Şalgam POD Enzimlerinin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

Tez kapsamında afinite jellerinde ligand olarak kullanılacak 4-amino benzohidrazid türevlerinin (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) inhibisyon kinetiklerini belirleyebilmek için daha önceden literatürde bilinen 4-amino benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanılarak karaturp ve şalgam POD enzimleri saflaştırıldı. Karaturp ve şalgamdan hazırlanan 5'er mL homojenat, dengelenmiş 4-amino benzohidrazid kolonuna pipet vasıtasıyla tatbik edildi.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 40 mL/saate ayarlanarak 1,5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alındı. Her bir eluatta aktivite ve protein tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan eluatlar birleştirilerek, diyaliz edildi ve 4-amino benzohidrazid türevlerinin inhibisyon parametrelerini belirlemede kullanılmak üzere -20 derecede saklandı. 4-amino benzohidrazid molekülü kullanılarak karaturp ve şalgam POD enzimleri için saflaştırma sonuçları tablo 4.2'de gösterildi.

**Çizelge 4.2.** 4-Amino benzohidrazid kolonundan karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflaştırma sonuçları

	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim %	S. Katsayısı
<b>Homojenat Karaturp</b>	5	45	0,88	51,1	100	1,0
<b>Afinite-PABH</b>	3	2,2	0,0012	1833,3	2,9	35,9
<b>Homojenat Şalgam</b>	5	62	0,72	86,1	100	1,0
<b>Afinite-PABH</b>	3	4,9	0,0008	6125	4,7	71,1

#### 4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin $K_i$ ve $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada sentezlenen 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**), 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) moleküllerinin karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Guaiakol substratı doygunluğun altında alındı ve böylece reaksiyon hızı guaiakole bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit guaiakol konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise  $K_i$  değerleri belirlendi.  $IC_{50}$  ve  $K_i$  deney prosedürleri karaturp ve şalgam POD enzimleri 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) molekülü için sırasıyla

Çizelge 4.3, 4.4, 4.6, 4.7’de, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) molekülü için Çizelge 4.9, 4.10, 4.12, 4.13’te, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) molekülü için Çizelge 4.15, 4.16, 4.18, 4.19’da, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) molekülü için Çizelge 4.21, 4.22, 4.24, 4.25’te gösterildi. %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden  $K_i$  değerleri tespit edildi.

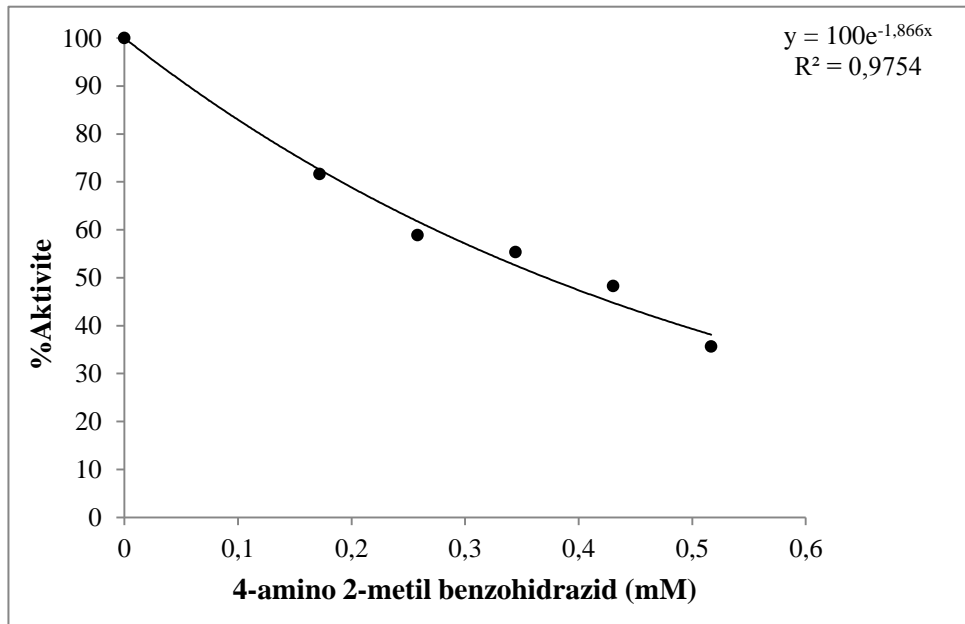
$IC_{50}$  ve  $K_i$  grafikleri karaturp ve şalgam POD enzimleri 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) molekülü için sırasıyla Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9’da, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) molekülü için Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13’te, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) molekülü için Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.17’de, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) molekülü için Şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21’de gösterildi.

Belirtilen deney prosedürleriyle gerçekleştirilen inhibisyon çalışmaları sonucunda her molekül ve her enzim için ayrı ayrı çizilen  $IC_{50}$  ve  $K_i$  grafiklerinden yararlanılarak moleküllerin  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Karaturp ve şalgam POD enzimleri, 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) molekülü için bu değerler sırasıyla Çizelge 4.5 ve 4.8’de, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) molekülü için Çizelge 4.11 ve 4.14’te, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) molekülü için Çizelge 4.17 ve 4.20’de, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) molekülü için Çizelge 4.23 ve 4.26’da gösterildi.

#### 4.4.1. 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.3.** 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

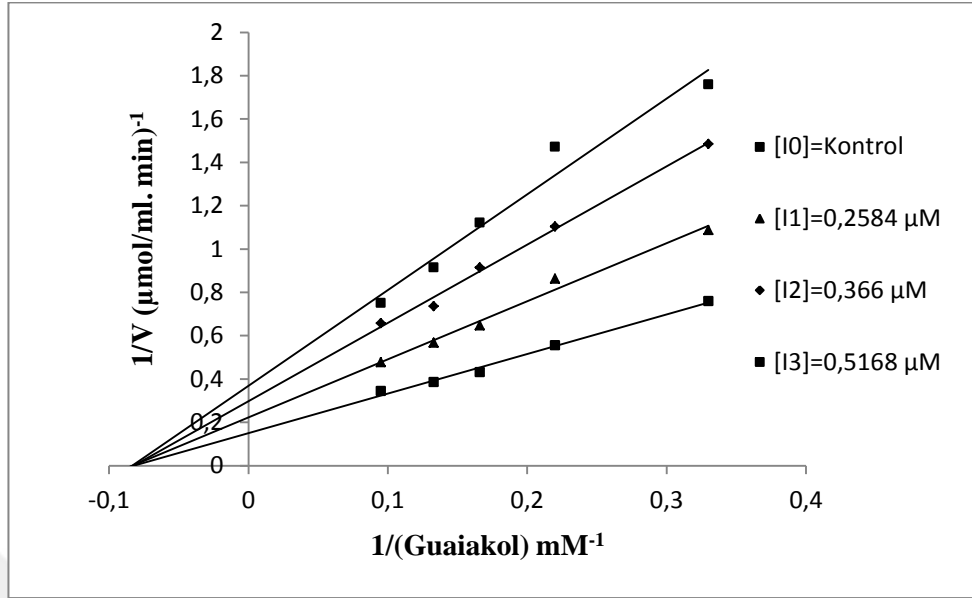
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	inhibitör	POD	Su	[I] mM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,460	0,5	1,0	1,0	0,04	0,010	0,450	0,1722	71,63
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,010	0,430	0,2584	58,86
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,010	0,410	0,3445	55,31
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,010	0,380	0,4307	48,22
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,380	0,5	1,0	1,0	0,12	0,010	0,370	0,5168	35,62



**Şekil 4.6.** Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-2-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

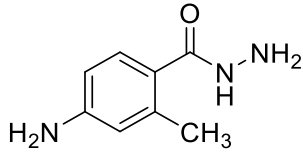
**Çizelge 4.4.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1	-	0,785	0,015	0,759	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1	-	0,685	0,015	0,556	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1	-	0,585	0,015	0,431	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1	-	0,485	0,015	0,386	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1	-	0,385	0,015	0,344	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1	0,06	0,725	0,015	1,088	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1	0,06	0,625	0,015	0,863	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1	0,06	0,525	0,015	0,647	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1	0,06	0,425	0,015	0,568	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1	0,06	0,325	0,015	0,477	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,085	0,715	0,2	1,0	1	0,085	0,700	0,015	1,485	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,085	0,615	0,3	1,0	1	0,085	0,600	0,015	1,104	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,085	0,515	0,4	1,0	1	0,085	0,500	0,015	0,915	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,085	0,415	0,5	1,0	1	0,085	0,400	0,015	0,736	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,085	0,315	0,6	1,0	1	0,085	0,300	0,015	0,658	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,12	0,68	0,2	1,0	1	0,12	0,665	0,015	1,759	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,12	0,58	0,3	1,0	1	0,12	0,565	0,015	1,472	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,12	0,48	0,4	1,0	1	0,12	0,465	0,015	1,121	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,38	0,5	1,0	1	0,12	0,365	0,015	0,915	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,12	0,28	0,6	1,0	1	0,12	0,265	0,015	0,750	0,09



**Şekil 4.7.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

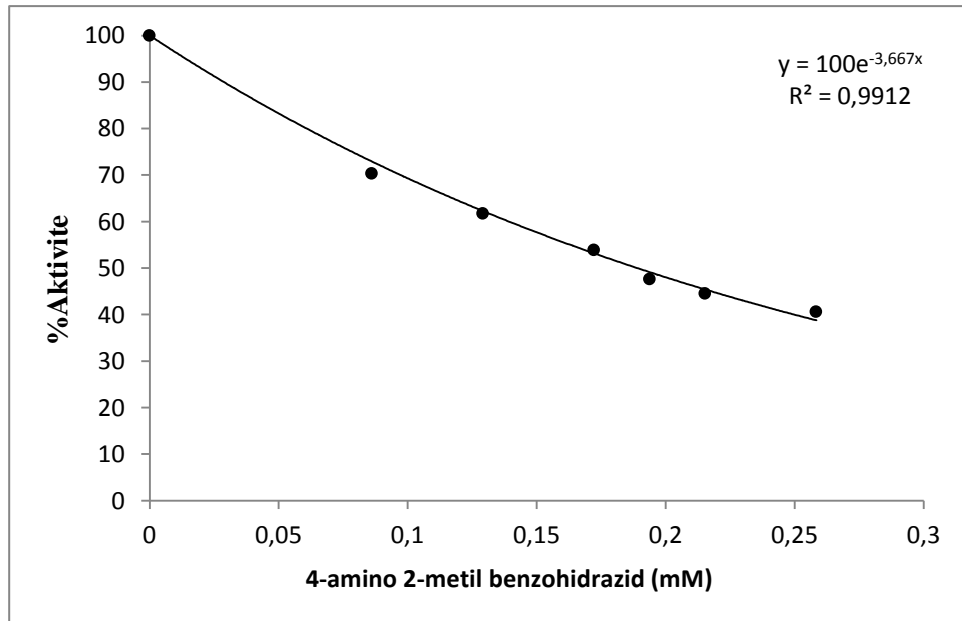
**Çizelge 4.5.** Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi

	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>Ortalama</b> <b>K<sub>i</sub> <math>\pm</math> S.D.</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>İnhibisyon tipi</b>
		371	415 $\pm$ 86,2

#### 4.4.2. 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.6.** 4-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] mM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,02	0,480	0,5	1,0	1,0	0,02	0,010	0,470	0,0861	70,31
	0,5	1,0	1,0	0,03	0,470	0,5	1,0	1,0	0,03	0,010	0,460	0,1292	61,71
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,460	0,5	1,0	1,0	0,04	0,010	0,450	0,1722	53,9
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,010	0,440	0,2153	44,53
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,010	0,430	0,2584	40,62

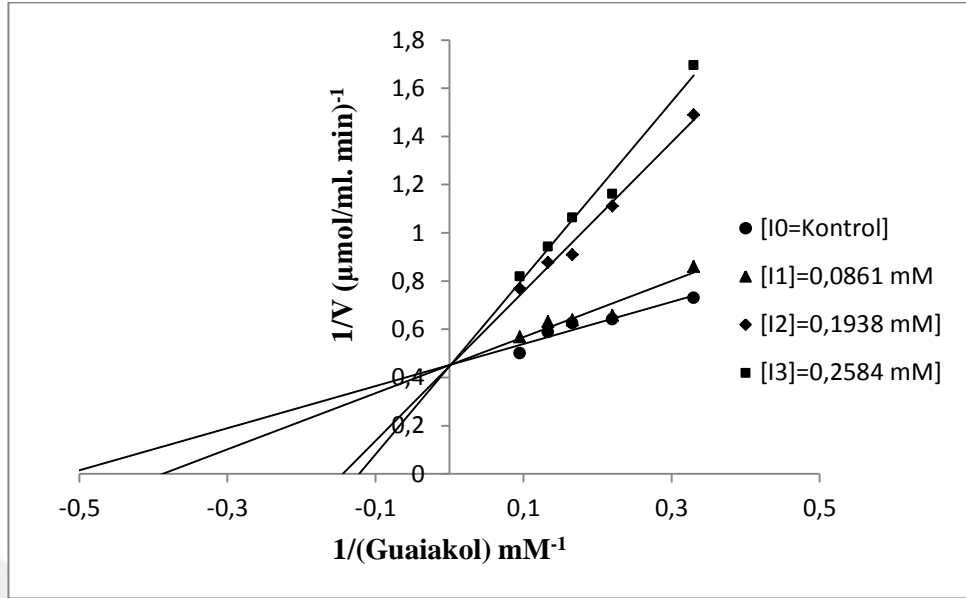


**Şekil 4.8.** Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

**Çizelge 4.7.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

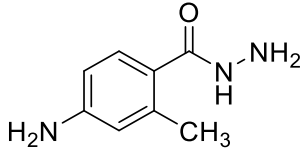
İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,71	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,641	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,625	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,588	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,500	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,02	0,78	0,2	1,0	1,0	0,02	0,77	0,010	0,88	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,02	0,68	0,3	1,0	1,0	0,02	0,67	0,010	0,657	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,02	0,58	0,4	1,0	1,0	0,02	0,57	0,010	0,639	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,02	0,48	0,5	1,0	1,0	0,02	0,47	0,010	0,632	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,02	0,38	0,6	1,0	1,0	0,02	0,37	0,010	0,568	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,045	0,755	0,2	1,0	1,0	0,045	0,745	0,010	1,472	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,045	0,655	0,3	1,0	1,0	0,045	0,645	0,010	1,111	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,045	0,555	0,4	1,0	1,0	0,045	0,545	0,010	0,909	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,045	0,455	0,5	1,0	1,0	0,045	0,445	0,010	0,877	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,045	0,355	0,6	1,0	1,0	0,045	0,345	0,010	0,769	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,73	0,010	1,705	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,63	0,010	1,162	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,53	0,010	1,063	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,43	0,010	0,943	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,33	0,010	0,819	0,09





**Şekil 4.9.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

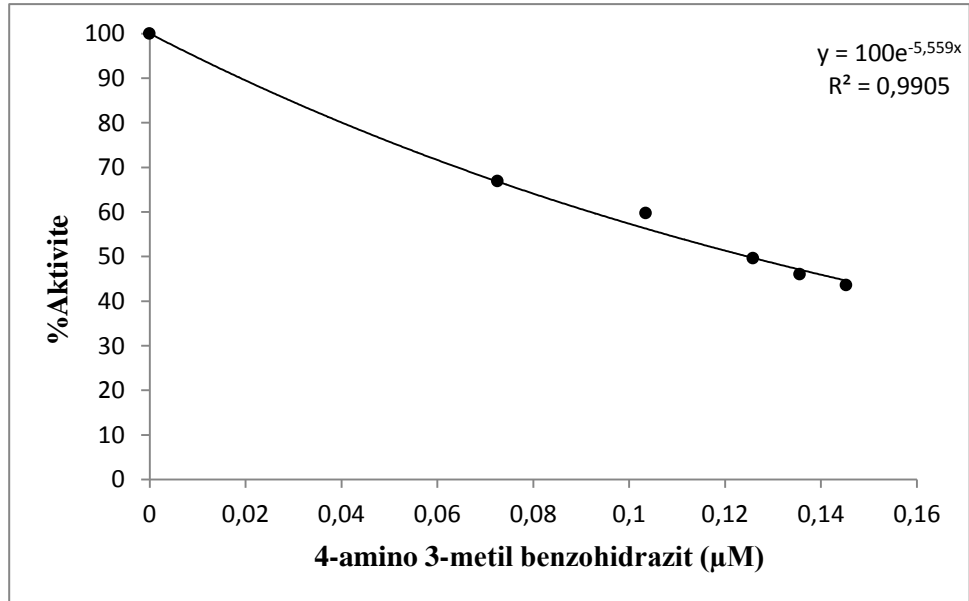
**Çizelge 4.8.** Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi

	IC <sub>50</sub> (µM)	Ortalama K <sub>i</sub> ± S.D. (µM)	İnhibisyon tipi
	188	92,3 ± 31,4	Yarışmalı

#### 4.4.3. 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.9.** 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

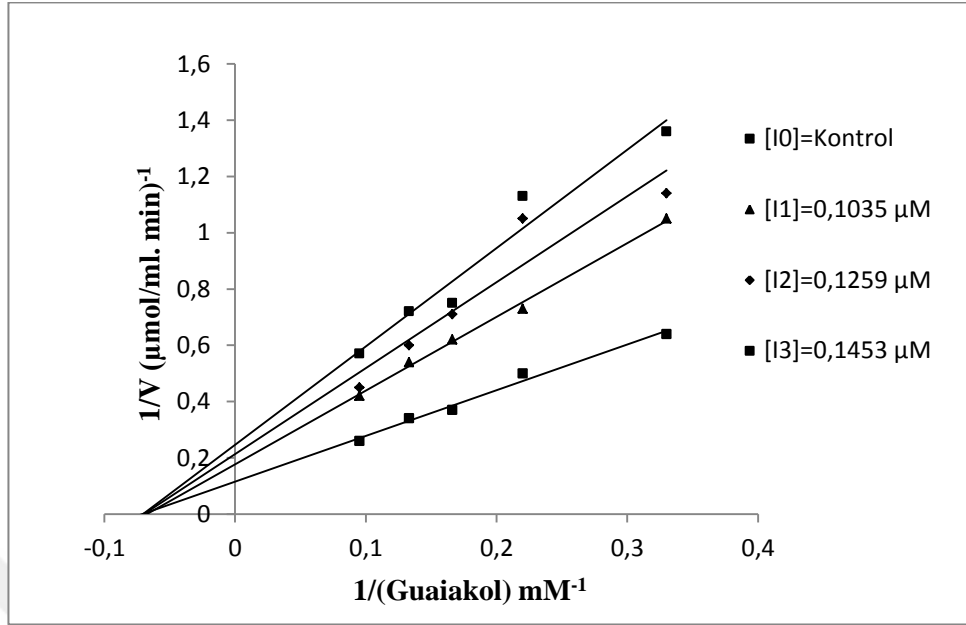
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] µM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,010	0,340	0,0726	66,9
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,300	0,5	1,0	1,0	0,20	0,010	0,290	0,1035	59,71
	0,5	1,0	1,0	0,26	0,240	0,5	1,0	1,0	0,26	0,010	0,230	0,1259	49,64
	0,5	1,0	1,0	0,28	0,220	0,5	1,0	1,0	0,28	0,010	0,210	0,1356	46,04
	0,5	1,0	1,0	0,30	0,200	0,5	1,0	1,0	0,30	0,010	0,190	0,1453	43,6



**Şekil 4.10.** Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

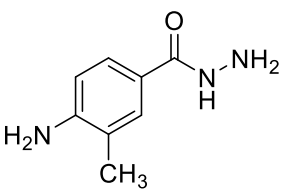
**Çizelge 4.10.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,785	0,015	0,64	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,685	0,015	0,5	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,585	0,015	0,37	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,485	0,015	0,34	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,385	0,015	0,26	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,200	0,600	0,2	1,0	1,0	0,200	0,585	0,015	1,05	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,200	0,500	0,3	1,0	1,0	0,200	0,485	0,015	0,73	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,200	0,400	0,4	1,0	1,0	0,200	0,385	0,015	0,62	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,200	0,285	0,015	0,54	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,200	0,200	0,6	1,0	1,0	0,200	0,185	0,015	0,42	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,260	0,540	0,2	1,0	1,0	0,260	0,525	0,015	1,14	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,260	0,440	0,3	1,0	1,0	0,260	0,425	0,015	1,05	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,260	0,340	0,4	1,0	1,0	0,260	0,325	0,015	0,71	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,260	0,240	0,5	1,0	1,0	0,260	0,225	0,015	0,6	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,260	0,140	0,6	1,0	1,0	0,260	0,125	0,015	0,45	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,300	0,500	0,2	1,0	1,0	0,300	0,485	0,015	1,36	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,300	0,400	0,3	1,0	1,0	0,300	0,385	0,015	1,13	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,300	0,300	0,4	1,0	1,0	0,300	0,285	0,015	0,75	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,300	0,200	0,5	1,0	1,0	0,300	0,185	0,015	0,72	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,300	0,100	0,6	1,0	1,0	0,300	0,085	0,015	0,57	0,09



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

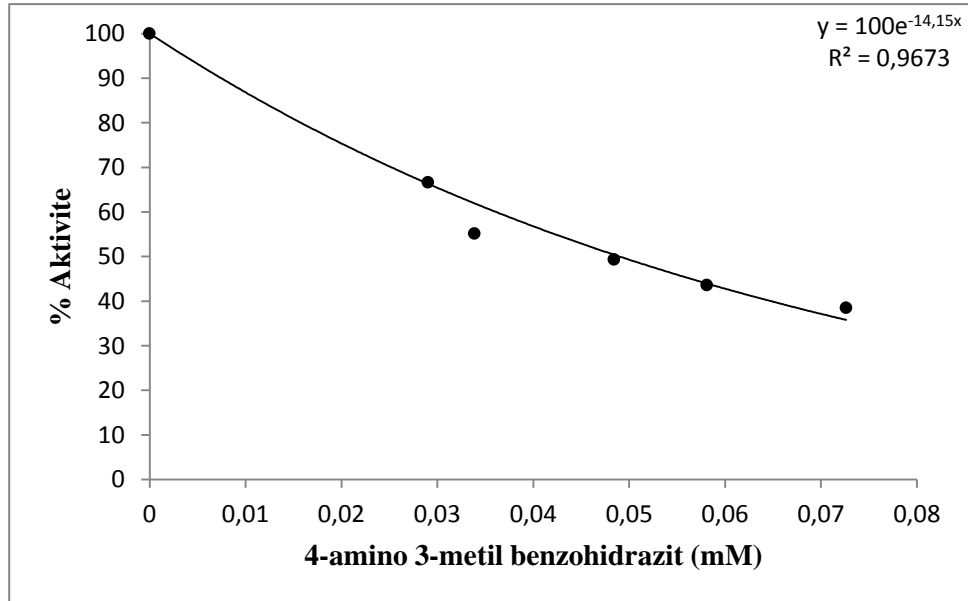
**Çizelge 4.11.** Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi

	<b>IC<sub>50</sub></b> (μM)	<b>Ortalama K<sub>i</sub></b> ± S.D. (μM)	<b>İnhibisyon</b> <b>tipi</b>
	0,124	0,155 ± 0,033	Yarışmasız

#### 4.4.4. 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.12.** 4-Amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

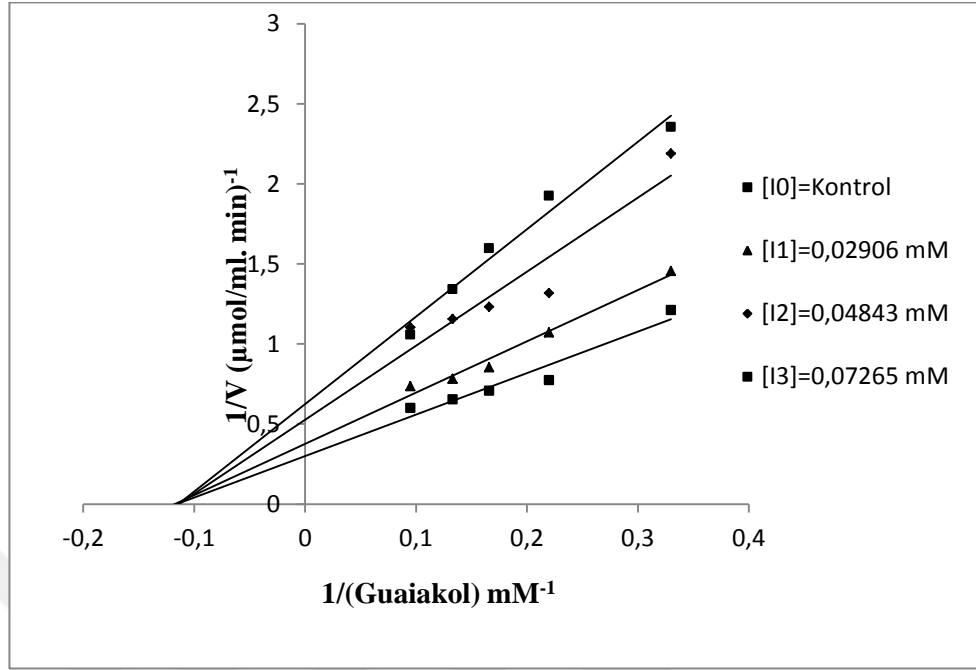
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] mM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,015	0,425	0,02906	66,66
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,015	0,415	0,0339	55,128
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,015	0,385	0,04843	49,35
	0,5	1,0	1,0	0,120	0,380	0,5	1,0	1,0	0,120	0,015	0,365	0,05812	43,58
	0,5	1,0	1,0	0,150	0,350	0,5	1,0	1,0	0,150	0,015	0,335	0,07265	38,46



**Şekil 4.12.** Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

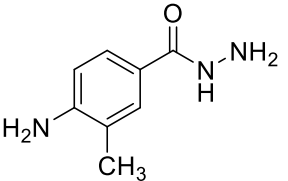
**Çizelge 4.13.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör no	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	POD	1/V (µmol/ mL. min) <sup>-1</sup>	1/S mM <sup>-1</sup>
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,785	0,015	1,212	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,685	0,015	0,773	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,585	0,015	0,708	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,485	0,015	0,653	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,385	0,015	0,600	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,725	0,015	1,455	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,625	0,015	1,072	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,525	0,015	0,853	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,425	0,015	0,782	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,325	0,015	0,736	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,100	0,700	0,2	1,0	1,0	0,100	0,685	0,015	2,19	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,100	0,600	0,3	1,0	1,0	0,100	0,585	0,015	1,317	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,100	0,500	0,4	1,0	1,0	0,100	0,485	0,015	1,231	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,385	0,015	1,156	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,100	0,300	0,6	1,0	1,0	0,100	0,285	0,015	1,104	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,150	0,65	0,2	1,0	1,0	0,150	0,635	0,015	2,355	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,150	0,55	0,3	1,0	1,0	0,150	0,535	0,015	1,926	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,150	0,45	0,4	1,0	1,0	0,150	0,435	0,015	1,597	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,150	0,35	0,5	1,0	1,0	0,150	0,335	0,015	1,342	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,150	0,25	0,6	1,0	1,0	0,150	0,235	0,015	1,058	0,09



Şekil 4.13. Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

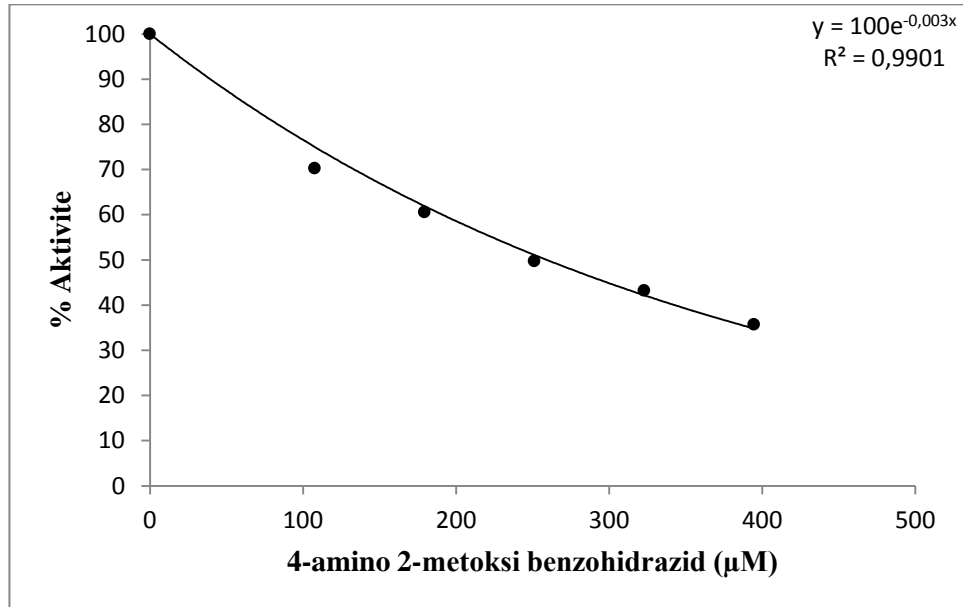
Çizelge 4.14. Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 3-metil benzohidrazid inhibitörü etkisi

	IC <sub>50</sub> (µM)	Ortalama K <sub>i</sub> ± S.D. (µM)	İnhibisyon tipi
		48,9	81,6 ± 28,9

#### 4.4.5. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.15.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] $\mu$ M	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,010	0,460	107,68	70,27
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,010	0,440	179,46	60,54
	0,5	1,0	1,0	0,070	0,430	0,5	1,0	1,0	0,070	0,010	0,420	251,25	49,72
	0,5	1,0	1,0	0,090	0,410	0,5	1,0	1,0	0,090	0,010	0,400	323,04	43,24
	0,5	1,0	1,0	0,110	0,390	0,5	1,0	1,0	0,110	0,010	0,380	394,83	35,67

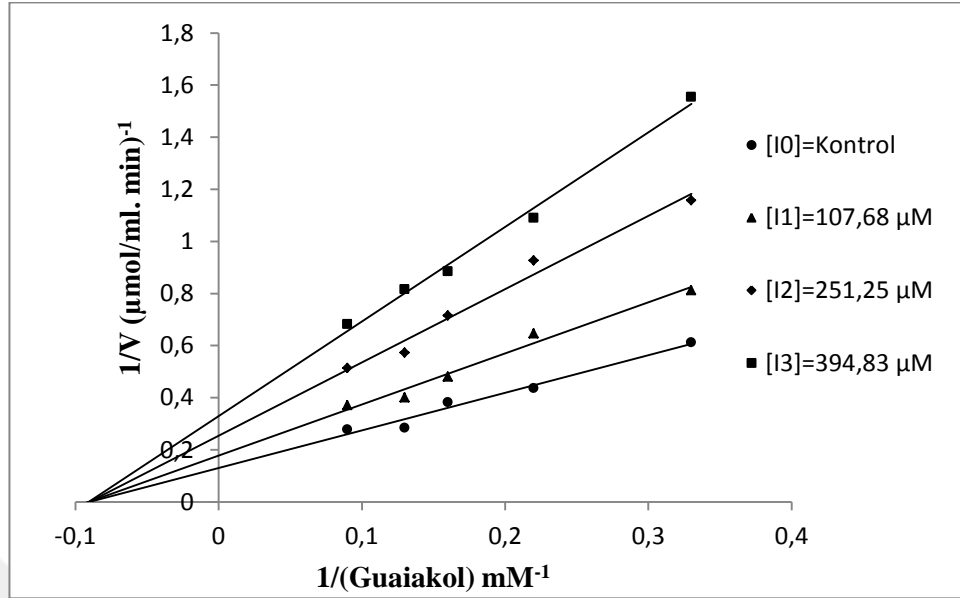


**Şekil 4.14.** Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



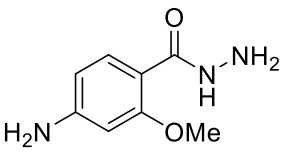
**Çizelge 4.16.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör no	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	POD	1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$ ) <sup>-1</sup>	1/S $\text{mM}^{-1}$
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,785	0,015	0,612	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,685	0,015	0,436	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,585	0,015	0,383	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,485	0,015	0,284	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,385	0,015	0,278	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,030	0,770	0,2	1,0	1,0	0,030	0,755	0,015	0,813	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,030	0,670	0,3	1,0	1,0	0,030	0,655	0,015	0,647	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,030	0,570	0,4	1,0	1,0	0,030	0,555	0,015	0,481	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,455	0,015	0,401	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,030	0,370	0,6	1,0	1,0	0,030	0,355	0,015	0,371	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,070	0,730	0,2	1,0	1,0	0,070	0,715	0,015	1,158	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,070	0,630	0,3	1,0	1,0	0,070	0,615	0,015	0,927	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,070	0,530	0,4	1,0	1,0	0,070	0,515	0,015	0,715	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,070	0,430	0,5	1,0	1,0	0,070	0,415	0,015	0,573	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,070	0,330	0,6	1,0	1,0	0,070	0,315	0,015	0,514	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,110	0,690	0,2	1,0	1,0	0,110	0,675	0,015	1,555	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,110	0,590	0,3	1,0	1,0	0,110	0,575	0,015	1,09	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,110	0,490	0,4	1,0	1,0	0,110	0,475	0,015	0,885	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,110	0,390	0,5	1,0	1,0	0,110	0,375	0,015	0,816	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,110	0,290	0,6	1,0	1,0	0,110	0,275	0,015	0,682	0,09



**Şekil 4.15.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

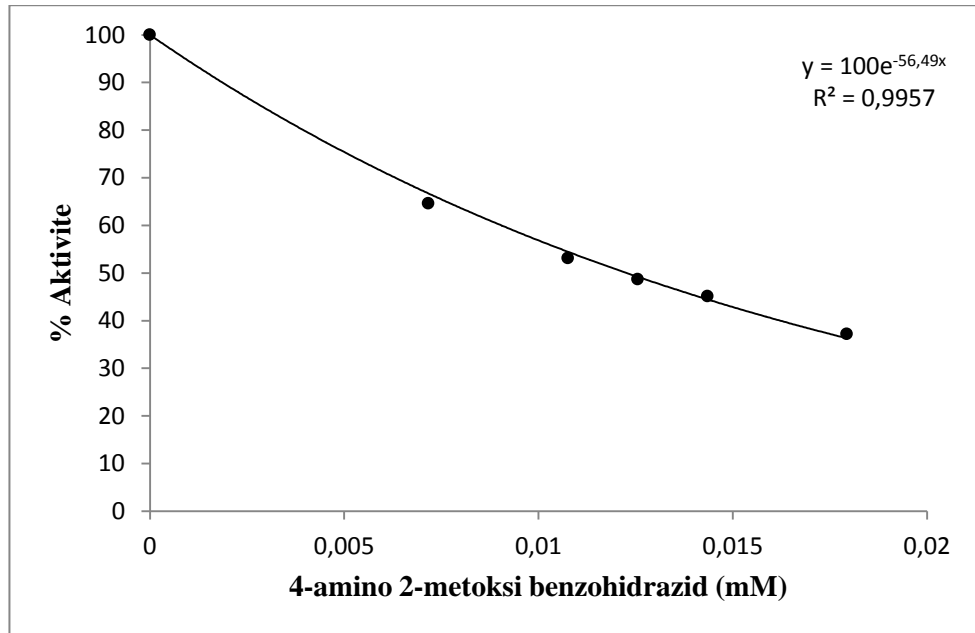
**Çizelge 4.17.** Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi

	IC <sub>50</sub> (μM)	Ortalama K <sub>i</sub> ± S.D. (μM)	İnhibisyon tipi
	231	271,5 ± 19,9	Yarışmasız

#### 4.4.6. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.18.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

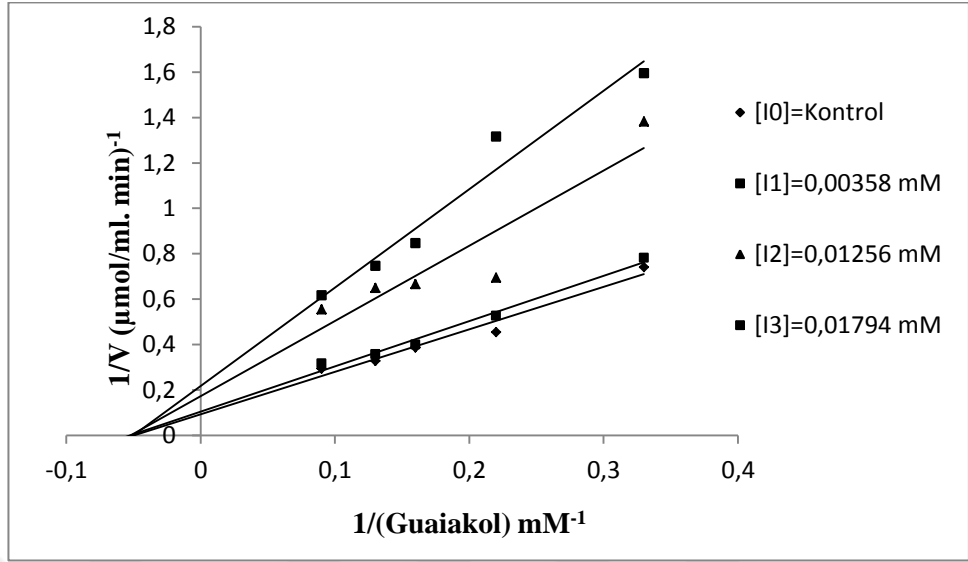
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] mM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,020	0,480	0,5	1,0	1,0	0,020	0,010	0,470	0,00717	64,6
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,010	0,460	0,01076	53,09
	0,5	1,0	1,0	0,035	0,465	0,5	1,0	1,0	0,035	0,010	0,455	0,01256	48,67
	0,5	1,0	1,0	0,040	0,460	0,5	1,0	1,0	0,040	0,010	0,450	0,01435	45,13
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,010	0,440	0,01794	37,16



**Şekil 4.16.** Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

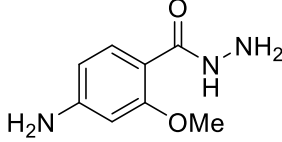
**Çizelge 4.19.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,74	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,454	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,387	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,328	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,294	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,010	0,790	0,2	1,0	1,0	0,010	0,780	0,010	0,781	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,010	0,690	0,3	1,0	1,0	0,010	0,680	0,010	0,526	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,010	0,590	0,4	1,0	1,0	0,010	0,580	0,010	0,400	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,010	0,490	0,5	1,0	1,0	0,010	0,480	0,010	0,357	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,010	0,390	0,6	1,0	1,0	0,010	0,380	0,010	0,316	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,035	0,765	0,2	1,0	1,0	0,035	0,755	0,010	1,382	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,035	0,665	0,3	1,0	1,0	0,035	0,655	0,010	0,694	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,035	0,565	0,4	1,0	1,0	0,035	0,555	0,010	0,666	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,035	0,465	0,5	1,0	1,0	0,035	0,455	0,010	0,649	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,035	0,365	0,6	1,0	1,0	0,035	0,355	0,010	0,555	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,050	0,750	0,2	1,0	1,0	0,050	0,740	0,010	1,595	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,050	0,650	0,3	1,0	1,0	0,050	0,640	0,010	1,315	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,050	0,550	0,4	1,0	1,0	0,050	0,540	0,010	0,847	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,440	0,010	0,746	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,050	0,350	0,6	1,0	1,0	0,050	0,340	0,010	0,617	0,09



**Şekil 4.17.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

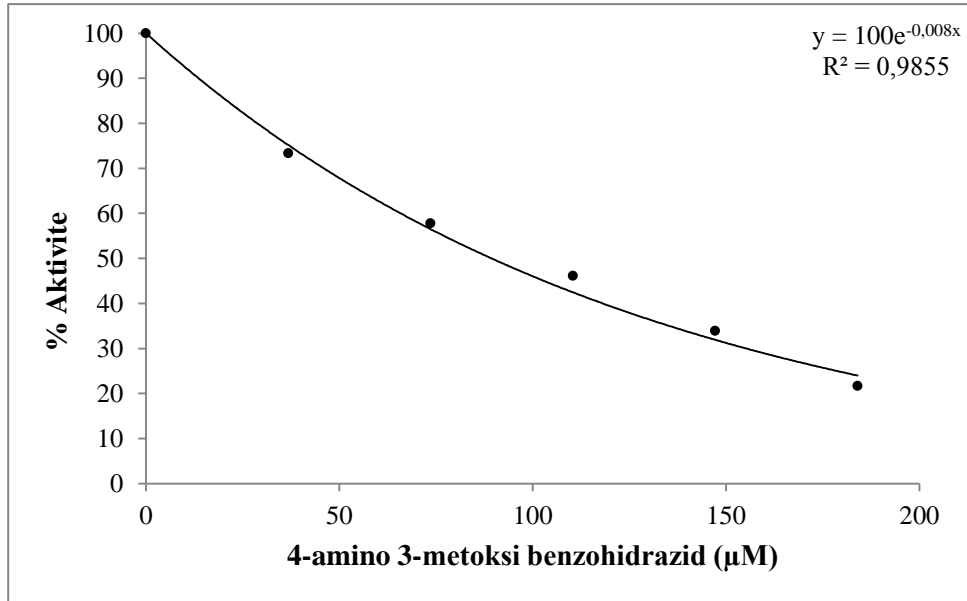
**Çizelge 4.20.** Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 2-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi

	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>Ortalama K<sub>i</sub></b> $\pm$ S.D. ( $\mu\text{M}$ )	<b>İnhibisyon</b> <b>tipi</b>
	12,26	17,93 $\pm$ 7,2	Yarışmasız

#### 4.4.7. 4-Amino-3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.21.** 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

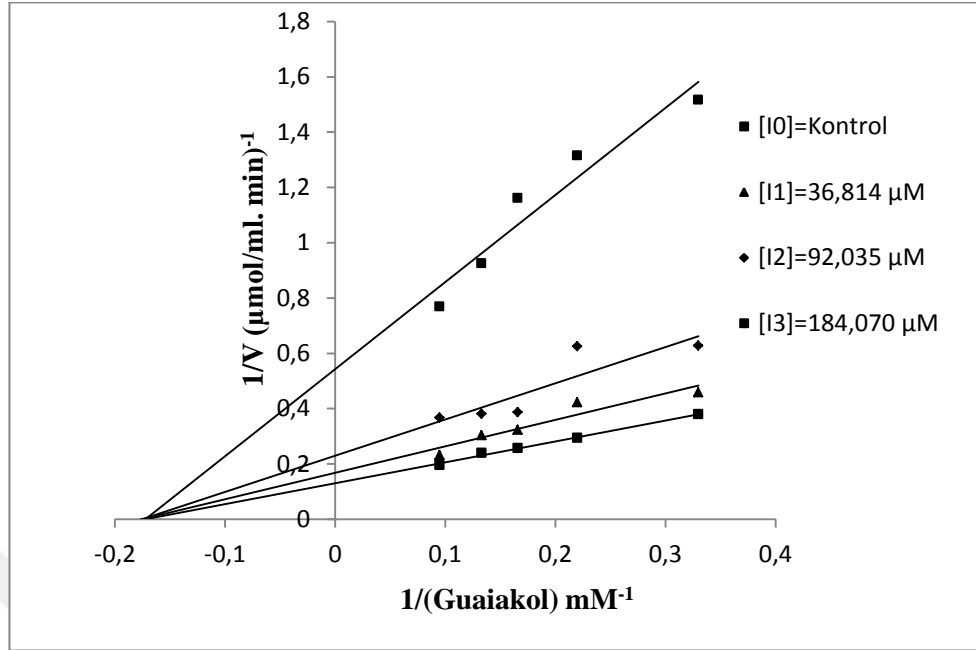
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] µM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,010	0,490	0,5	1,0	1,0	0,010	0,010	0,480	36,814	73,33
	0,5	1,0	1,0	0,020	0,480	0,5	1,0	1,0	0,020	0,010	0,470	73,628	57,77
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,010	0,460	110,442	46,11
	0,5	1,0	1,0	0,040	0,460	0,5	1,0	1,0	0,040	0,010	0,450	147,225	33,88
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,010	0,440	184,07	21,66



**Şekil 4.18.** Karaturp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

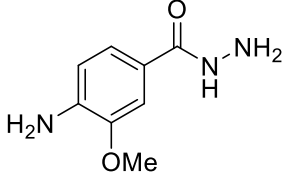
**Çizelge 4.22.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,38	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,294	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,257	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,24	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,196	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,010	0,790	0,2	1,0	1,0	0,010	0,780	0,010	0,459	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,010	0,690	0,3	1,0	1,0	0,010	0,680	0,010	0,423	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,010	0,590	0,4	1,0	1,0	0,010	0,580	0,010	0,324	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,010	0,490	0,5	1,0	1,0	0,010	0,480	0,010	0,304	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,010	0,390	0,6	1,0	1,0	0,010	0,380	0,010	0,232	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,025	0,775	0,2	1,0	1,0	0,025	0,765	0,010	0,628	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,025	0,675	0,3	1,0	1,0	0,025	0,665	0,010	0,625	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,025	0,575	0,4	1,0	1,0	0,025	0,565	0,010	0,387	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,025	0,475	0,5	1,0	1,0	0,025	0,465	0,010	0,381	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,025	0,375	0,6	1,0	1,0	0,025	0,365	0,010	0,367	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,050	0,750	0,2	1,0	1,0	0,050	0,740	0,010	1,517	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,050	0,650	0,3	1,0	1,0	0,050	0,640	0,010	1,315	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,050	0,550	0,4	1,0	1,0	0,050	0,540	0,010	1,162	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,440	0,010	0,925	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,050	0,350	0,6	1,0	1,0	0,050	0,340	0,010	0,769	0,09



**Şekil 4.19.** Karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Çizelge 4.23.** Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi

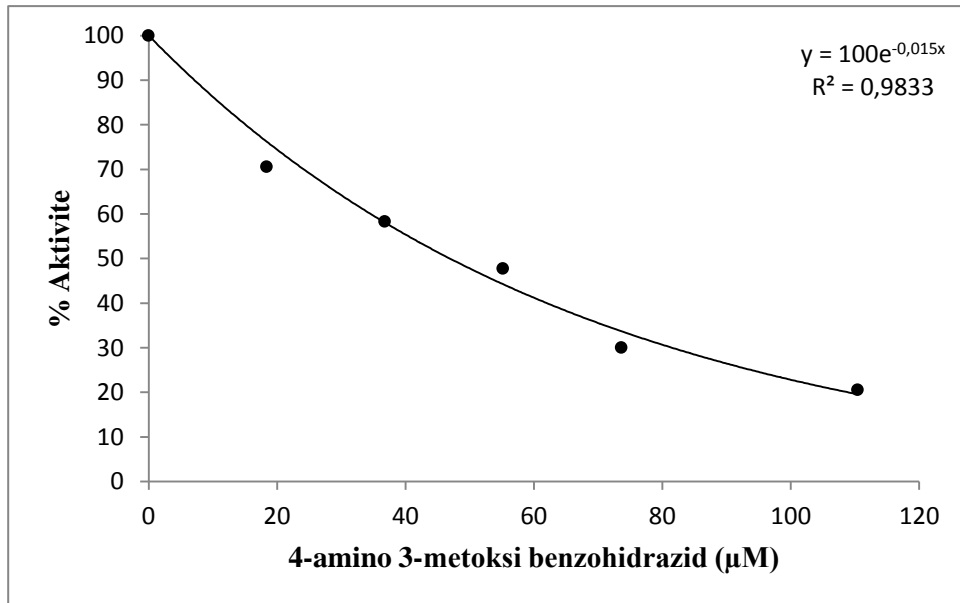
	<b>IC<sub>50</sub></b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>Ortalama K<sub>i</sub> ± S.D.</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>İnhibisyon tipi</b>
	86,6	103,3 ± 39,2	Yarışmasız



#### 4.4.8. 4-Amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.24.** 4-Amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

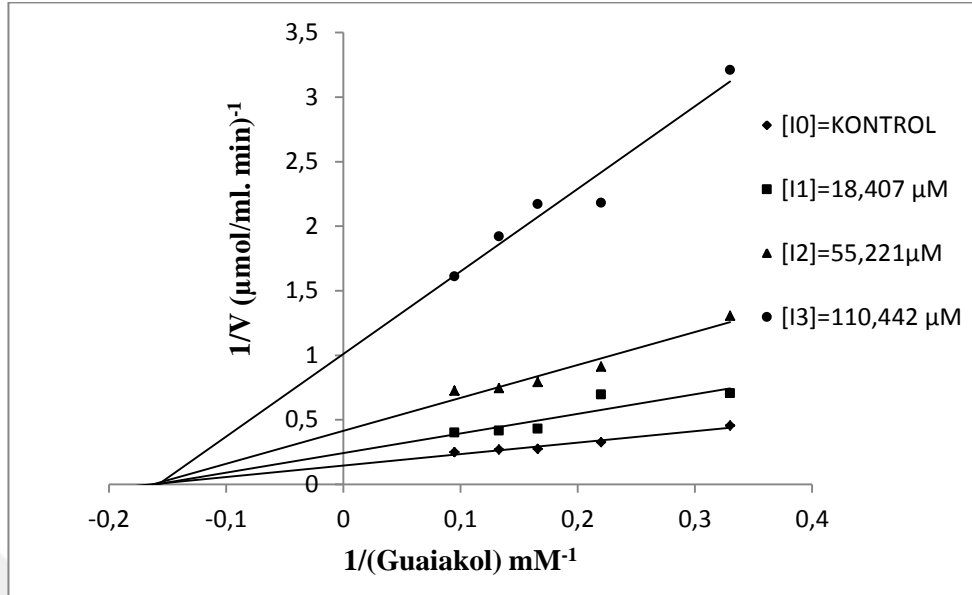
Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
Inhibitör	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	Su	Guaikol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibitör	POD	Su	[I] µM	%Aktivite
	0,5	1,0	1,0	0,005	0,495	0,5	1,0	1,0	0,005	0,010	0,485	18,407	70,55
	0,5	1,0	1,0	0,01	0,490	0,5	1,0	1,0	0,01	0,010	0,480	36,814	58,33
	0,5	1,0	1,0	0,015	0,485	0,5	1,0	1,0	0,015	0,010	0,475	55,221	47,77
	0,5	1,0	1,0	0,02	0,480	0,5	1,0	1,0	0,02	0,010	0,470	73,628	30
	0,5	1,0	1,0	0,03	0,470	0,5	1,0	1,0	0,03	0,010	0,460	110,442	20,55



**Şekil 4.20.** Şalgam POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3-metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

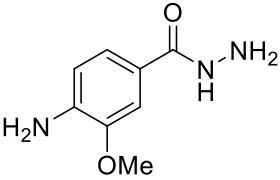
**Çizelge 4.25.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						1/V ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	1/S $\text{mM}^{-1}$
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İnhibitör	Su	POD		
[I] <sub>0</sub>	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,454	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,326	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,274	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,268	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,25	0,09
[I] <sub>1</sub>	0,2	1,0	1,0	0,005	0,795	0,2	1,0	1,0	0,005	0,785	0,010	0,705	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,005	0,695	0,3	1,0	1,0	0,005	0,685	0,010	0,694	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,005	0,595	0,4	1,0	1,0	0,005	0,585	0,010	0,431	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,005	0,495	0,5	1,0	1,0	0,005	0,485	0,010	0,416	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,005	0,395	0,6	1,0	1,0	0,005	0,385	0,010	0,4	0,09
[I] <sub>2</sub>	0,2	1,0	1,0	0,015	0,785	0,2	1,0	1,0	0,015	0,775	0,010	1,305	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,015	0,685	0,3	1,0	1,0	0,015	0,675	0,010	0,912	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,015	0,585	0,4	1,0	1,0	0,015	0,575	0,010	0,793	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,015	0,485	0,5	1,0	1,0	0,015	0,475	0,010	0,746	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,015	0,385	0,6	1,0	1,0	0,015	0,375	0,010	0,724	0,09
[I] <sub>3</sub>	0,2	1,0	1,0	0,030	0,770	0,2	1,0	1,0	0,030	0,760	0,010	3,208	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,030	0,670	0,3	1,0	1,0	0,030	0,660	0,010	2,18	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,030	0,570	0,4	1,0	1,0	0,030	0,560	0,010	2,17	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,460	0,010	1,92	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,030	0,370	0,6	1,0	1,0	0,030	0,360	0,010	1,61	0,09

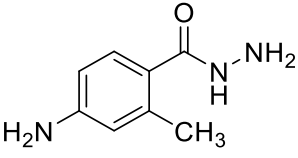
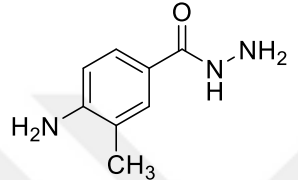
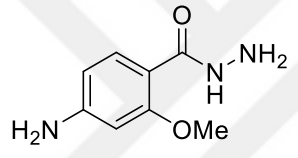
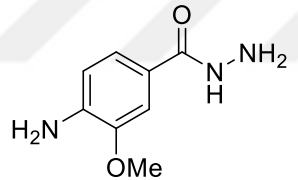


**Şekil 4.21.** Şalgam POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Çizelge 4.26.** Şalgam POD enzimi üzerine 4-amino 3-metoksi benzohidrazid inhibitörü etkisi

	IC <sub>50</sub> (µM)	Ortalama K <sub>i</sub> ± S.D. (µM)	İnhibisyon tipi
	46,2	25,7 ± 6,1	Yarışmasız

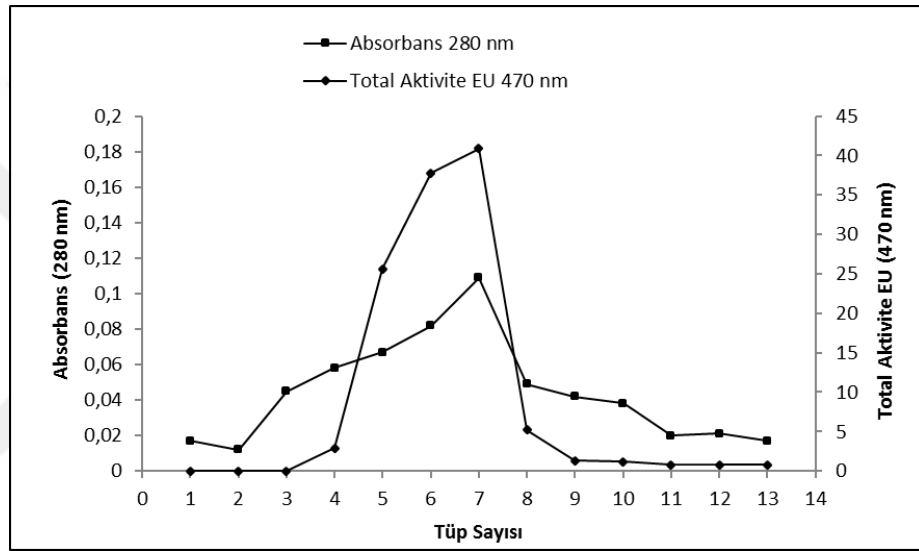
**Çizelge 4.27.** Karaturp ve şalgam POD enzimleri için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları

İnhibitör		Karaturp POD (µM)	Şalgam POD (µM)
	IC <sub>50</sub>	371	188
	Ort. K <sub>i</sub> ± S.D.	415 ± 86,2	92,3 ± 31,3
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız	Yarışmalı
	IC <sub>50</sub>	0,124	48,9
	Ort. K <sub>i</sub> ± S.D.	0,155 ± 0,032	81,66 ± 28,93
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız	Yarışmasız
	IC <sub>50</sub>	231	12,26
	Ort. K <sub>i</sub> ± S.D.	271,5 ± 19,9	17,9 ± 7,2
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız	Yarışmasız
	IC <sub>50</sub>	86,6	46,2
	Ort. K <sub>i</sub> ± S.D.	103,3 ± 39,2	25,7 ± 6,1
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız	Yarışmasız

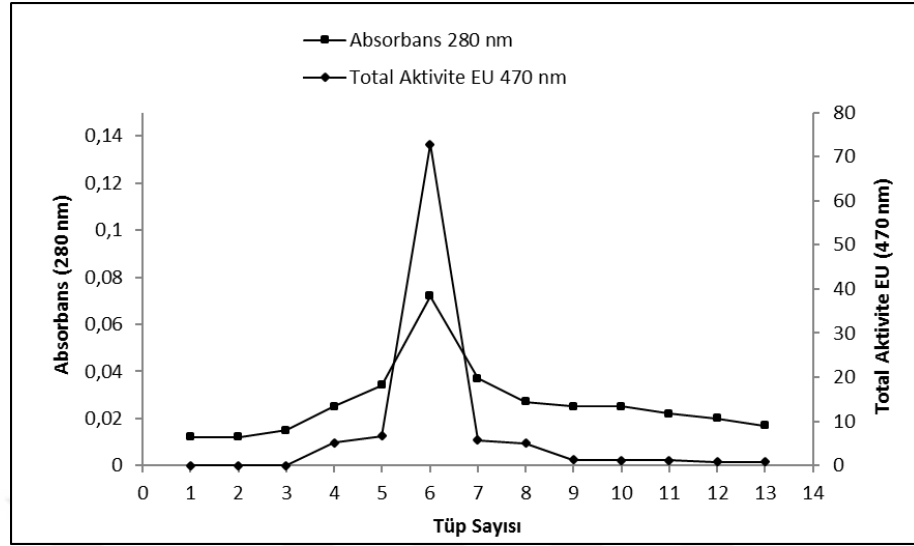
#### 4.5. Karaturp ve Şalgam POD Enzimlerinin 4-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

Karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**), 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**), 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) moleküllerinin inhibisyon etkileri incelendikten sonra bu moleküllerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 3-metoksi benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 2-metoksi benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 2-metil benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 3-metil benzohidrazid kolonlarının sentezi bölüm 3.3.4.b'de anlatıldığı gibi yapıldı.

Hazırlanan kolonlardan karaturp ve şalgam bitkilerinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Saflaştırma kademelerinde en iyi kolon olan 4-amino 2-metoksi benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanıldığı kolon için elüsyon grafikleri Şekil 4.22 ve 4.23'te ve tüm kolonlardan saflaştırılan POD enzimlerinin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.28 ve 4.29'da gösterildi.



**Şekil 4.22.** Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin 4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonundan elüsyonu aktivite/absorbans grafiği



Şekil 4.23. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin 4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonundan elüsyonu aktivite/absorbans grafiği

Çizelge 4.28. Afinite kolonlarından elde edilen karaturp POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

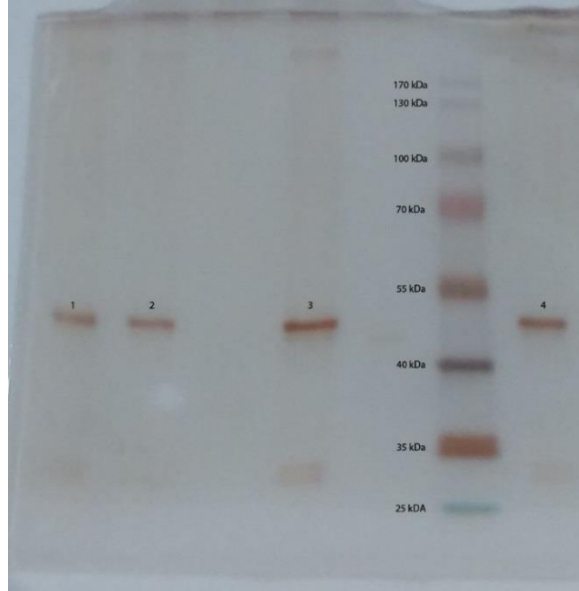
Karaturp POD Enzimi		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-amino 3-metoksi benzohidrazid	Homojenat	5	108	1,45	540	7,25	74,5	100	1,0
	Sepharose 4B Afinité	3	18,2	0,001	54,6	0,003	18200	10,1	244,3
4-amino 2-metoksi benzohidrazid	Homojenat	5	108	1,45	540	7,25	74,5	100	1,0
	Sepharose 4B Afinité	4,5	40,3	0,0008	181,4	0,0036	50389	<b>33,6</b>	<b>676,4</b>
4-amino 3-metil benzohidrazid	Homojenat	5	108	1,45	540	7,25	74,5	100	1,0
	Sepharose 4B Afinité	3	25,7	0,0018	77,1	0,0054	14277	14,2	191,6
4-amino 2-metil benzohidrazid	Homojenat	5	108	1,45	540	7,25	74,5	100	1,0
	Sepharose 4B Afinité	3	25,2	0,0016	75,6	0,0048	15750	14,1	211,4

**Çizelge 4.29.** Afinite kolonlarından elde edilen şalgam POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

Şalgam POD Enzimi		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
<b>4-amino 3-metoksi benzohidrazid</b>	Homojenat	5	148	1,29	740	6,45	114,7	100	1,0
	Sepharose 4B Afinitite	1,5	60	0,0008	90	0,0012	75000	12,2	653,9
<b>4-amino 2-metoksi benzohidrazid</b>	Homojenat	5	148	1,29	740	6,45	114,7	100	1,0
	Sepharose 4B Afinitite	1,5	98,7	0,0011	148,1	0,0016	92531	<b>20,1</b>	<b>806,7</b>
<b>4-amino 3-metil benzohidrazid</b>	Homojenat	5	148	1,29	740	6,45	114,7	100	1,0
	Sepharose 4B Afinitite	1,5	50,1	0,0019	75,15	0,0028	26839	10,2	234
<b>4-amino 2-metil benzohidrazid</b>	Homojenat	5	148	1,29	740	6,45	114,7	100	1,0
	Sepharose 4B Afinitite	1,50	57,8	0,0011	86,7	0,0017	51000	11,7	444,6

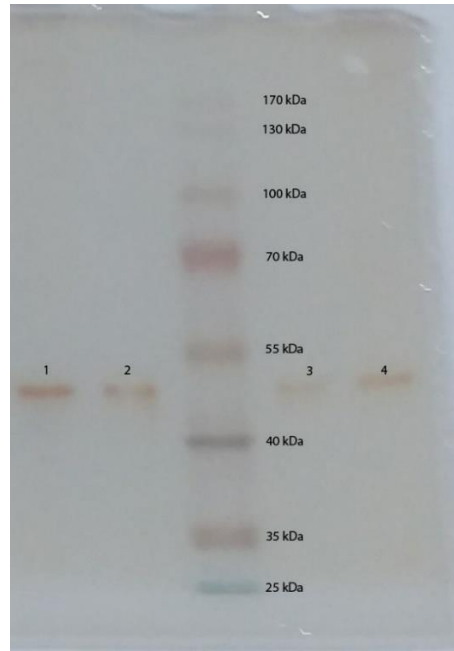
#### 4.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin-(**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) afinite jellerinden saflaştırdığımız karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında gümüş boyama metodu daha hassas olduğu için tercih edildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 4.24 ve 4.25'te gösterildi.



**Şekil 4.24.** 4-Amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp POD enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

\*Karaturp POD enzimi (1,2,3,4) **1:**4-amino 2-metil benzohidrazid kolonu, **2:**4-amino 3-metil benzohidrazid kolonu, **3:** 4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonu, **4:** 4-amino 3-metoksi benzohidrazid kolonu

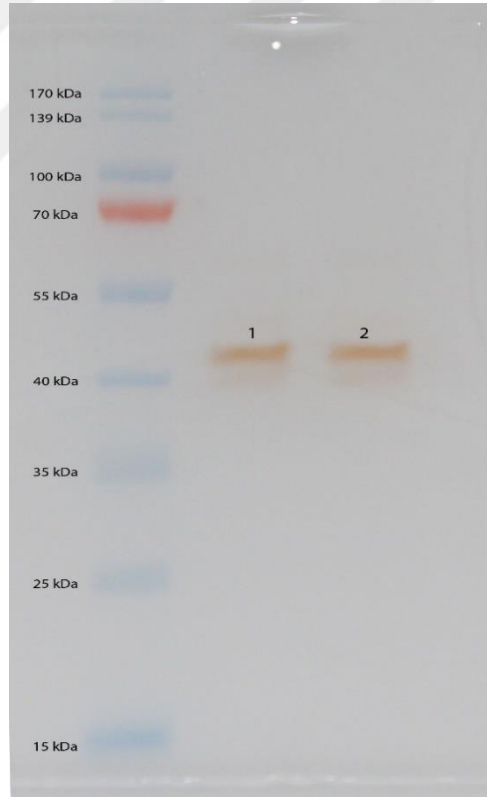


**Şekil 4.25.** 4-Amino 2-metil benzohidrazid, 4-amino 3-metil benzohidrazid, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan şalgam POD enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

\*Şalgam POD enzimi (1,2,3,4) **1:**4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonu, **2:**4-amino 3-metil benzohidrazid kolonu, **3:** 4-amino 2-metil benzohidrazid kolonu, **4:** 4-amino 3-metoksi benzohidrazid kolonu.



Safılaştırılan karaturp ve şalgam POD enzimlerinin molekül ağırlıkları, SDS-PAGE’de standart proteinler kullanılarak saptandı. Karaturp POD enziminin molekül ağırlığı 47 kDa ve şalgam POD enziminin molekül ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı. şekil 4.24 ve 4.25’teki SDS-PAGE fotoğraflarında da görüldüğü gibi farklı kolonlardan safılaştırılan tüm enzimlerin tek bant verdiği tespit edildi. Hazırlanan afinite jellerinin, tek bir izoenzime mi yoksa farklı izoenzimlere de mi spesifik olduğunu belirlemek için 4-amino 3-metoksi benzohidrazid ve 4-amino 2-metoksi benzohidrazid jellerinden safılaştırılan karaturp POD enzimleri SDS-PAGE sonrası kendi renkli substratı ile boyandı. şekil 4.26’da görüldüğü gibi yine tek bant elde edildi. Safılaştırılan enzimin molekül ağırlığı 43 kDa olarak hesaplandı.



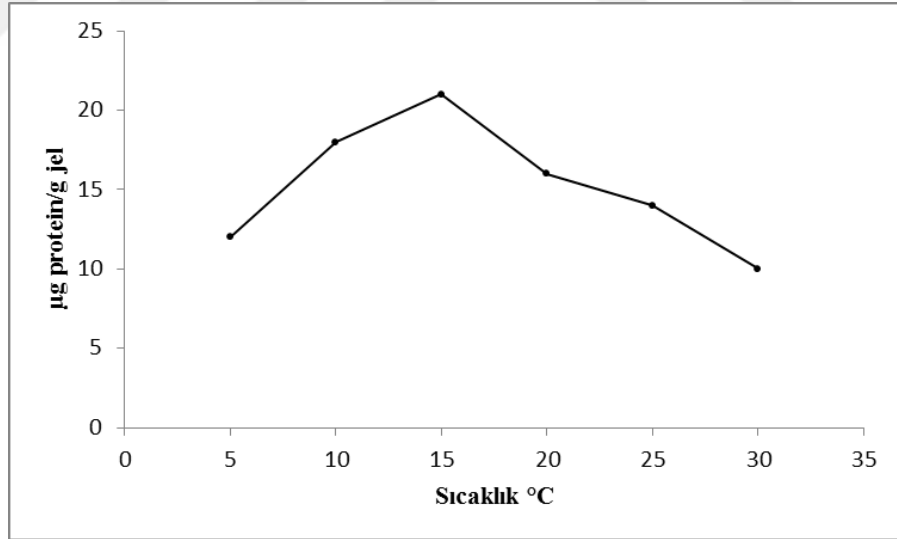
**şekil 4.26.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid afinite kolonlarından safılaştırılan karaturp POD enzimlerinin SDS-PAGE substratla boyama fotoğrafı.  
\*Karaturp POD enzimi (1,2) 1:4-amino 2-metoksi benzohidrazid kolonu, 2:4-amino 3-metoksi benzohidrazid kolonu

#### 4.6.1. 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid molekülü kullanılarak hazırlanan afinite kolonunun karaturp ve şalgam POD enzimlerini tutma kapasitesinin belirlenmesi

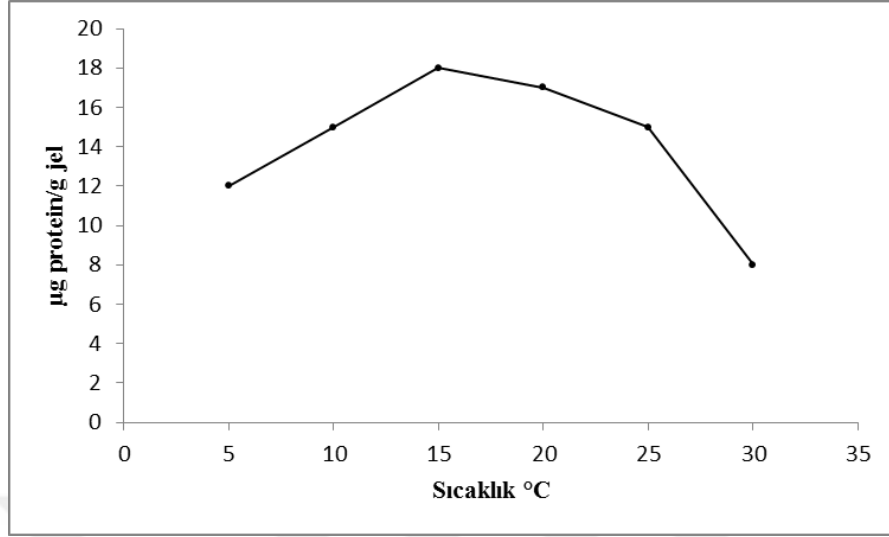
4-Amino 2-metoksi benzohidrazid molekülünü ligand olarak kullanılarak hazırlanan afinite jelinin karaturp ve şalgam POD enzimlerini tutma kapasitesi değişik sıcaklık, pH ve iyonik şiddetlerde incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde uygulandı.

##### 4.6.1.a. Kolon kapasitesine sıcaklığın etkisi sonuçları

Karaturp ve şalgam POD enzimleri için farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20, 25, 30°C pH 6,8 sabit) kolon tutma kapasiteleri belirlendi, sonuçlar  $\mu\text{g}$  protein/g jel olarak Şekil 4.27 ve 4.28'de verildi.



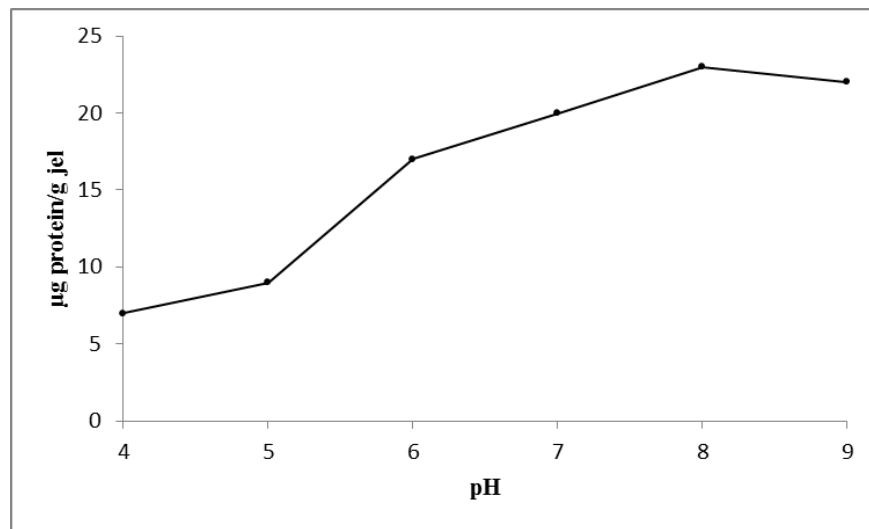
**Şekil 4.27.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği



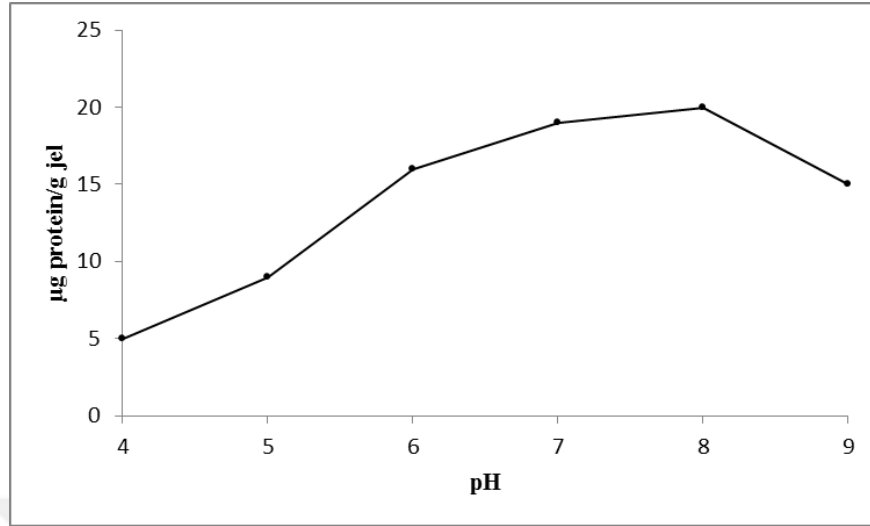
**Şekil 4.28.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği

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

Karaturp ve şalgam POD enzimleri için pH'sı 4 ile 9 arasında değişen tamponlar kullanılarak afinite jelinin tutma kapasitesi  $\mu\text{g protein/g jel}$  olarak belirlendi ve sonuçlar Şekil 4.29 ve 4.30'da verildi.



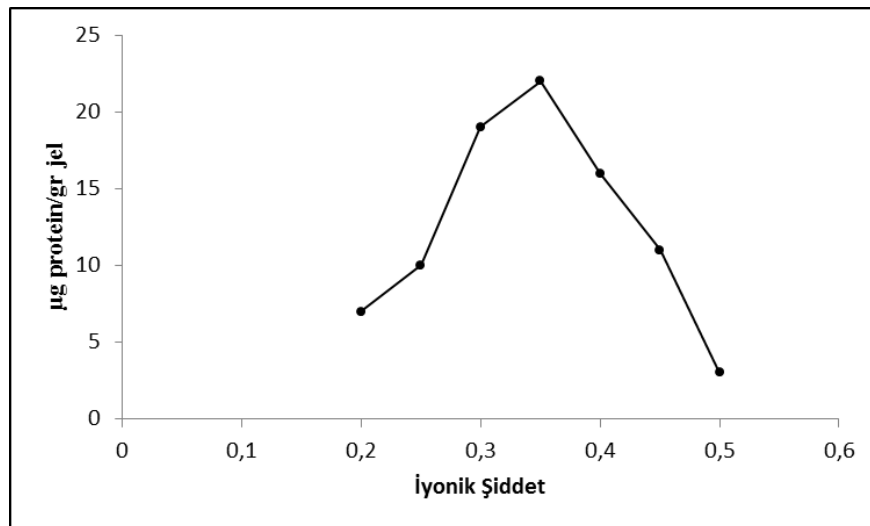
**Şekil 4.29.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için pH-kapasite grafiği



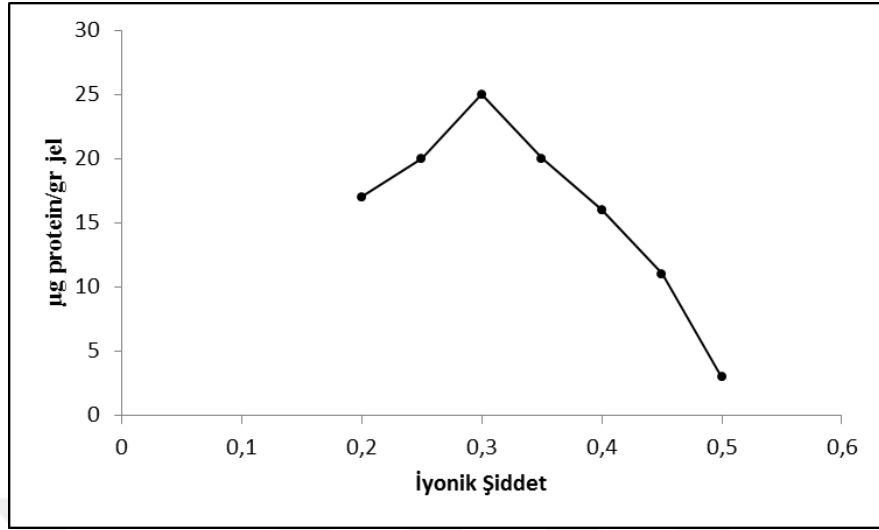
**Şekil 4.30.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için pH-kapasite grafiği

#### 4.6.1.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi sonuçları

Karaturp ve şalgam POD enzimlerinin kolona bağlanması için optimum şartlarda (pH, sıcaklık sbt.) iyonik şiddet 0,2-0,5 M arası tuz konsantrasyonlarında deneyler gerçekleştirildi, sonuçlar µg protein/g jel başına grafik Şekil 4.31 ve 4.32’de verildi.



**Şekil 4.31.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği



**Şekil 4.32.** 4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jelinin şalgam POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidazlar, oksitleyici olarak hidrojen peroksit veya organik peroksitleri kullanan oksidoredüktaz enzim sınıfının bir grup üyesidir. Bitkisel peroksidazlar (POD veya POX) ise peroksidaz enzim ailesinin küçük bir bölümünü oluşturur. Bitki peroksidazları birçok proste önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde peroksidaz enzim grupları hücre duvar proteinlerinin oluşturulması (Fry 1986), çimlenme başlangıcı (Morohashi 2002), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indolasetik asit miktarının ayarlanması, lignin biyosentezi (Agostini *et al.* 1997; Duarte *et al.* 2000) gibi yapısal gelişim faaliyetlerinde, savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) ve hormonal düzenleme (Wakamatsu and Takahama 1993) gibi devamlılık fonksiyonlarında önemli görevler almaktadır. POD'un organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılması bir başka önemli fonksiyondur (Adam *et al.* 1999; Zilbeyaz *et al.* 2012). Peroksidazlar ticari amaçla fenolik reçinelerin sentezinde katalizör olarak, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör olarak ve tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında malzeme olarak kullanılmaktadır. Ayrıca peroksidaz enzimlerinin kimya, ilaç ve gıda sanayilerinde son yıllarda kullanım alanları dikkat çekmektedir (Kwak *et al.* 1996).

Uygulama alanlarının yaygın olması ve ticari önemi olan enzimler olmaları dolayısıyla bitki peroksidaz enzimlerinin saf olarak eldesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Enzimlerinin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılması birçok araştırmacının temel hedefidir. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak bağlanan liganda spesifik ve tersinir bir şekilde tutunur ve seçimli bir biçimde liganntan ayrılır. Başarılı bir ayırım yapabilmek için öncelikle biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda bu ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalı ve safsızlıklar

uzaklaştırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metod bulunması gerekmektedir.

Bitkisel kaynaklı peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında literatürde farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmış ve halen bu çalışmalar devam etmektedir. Kullanılan yöntemler arasında amonyum sülfat çöktürmesi, metal ve hidrofobik afinite, ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik yöntemler bulunmaktadır. Bu metodların kullanıldığı birçok çalışma vardır ve bir kısmı aşağıda özetlemiştir. Bu çalışmalara örnek olarak *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden, papayadan (Pandey and Dwivedi 2011; Pandey *et al.* 2012), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), karalâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002; Al-Senaidy *et al.* 2011), kırmızı biberden (Martinez *et al.* 2008), marula meyvesinden (Mdluli. 2005), mısırdan (Mika *et al.* 2008), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009) ve at turpundan (Lavery *et al.* 2010) örnek verilebilir.

Peroksidaz enzimleri literatürde at turpundan 3 kromatografik kademedede 291 kat %71 verimde (Lavery *et al.* 2010), rekombinant HRP 12 kat %55 verimle (Spadiut *et al.* 2012), kırmızı pancardan, POD enzimini üç kromatografik adımda 10500 (EÜ/mg) ve %84,6 verimle 15 kat saflaştırmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Yine at turpundan POD enzimi iki kromatografik adımda 772,25 (EÜ/mg) ve 291 kat %71,3 verimle (Lavery *et al.* 2010), karalâhanadan POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat %33 verimle (Gülçin and Yıldırım 2005), vanilya çekirdeğinden POD enzimi iki kromatografik adımda 1563,5 (EÜ/mg) 21 kat %19 verimle (Marquez *et al.* 2008), papayadan POD enzimini üç kromatografik adımda 68,59 (EÜ/mg) 30,22 kat %44,37 verimle (Pandey *et al.* 2012) saflaştırılmıştır.

Afinite kromatografisi tekniğinde PABH ligand olarak kullanılarak POD enzimi karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat, şalgamdan ise 269,13 kat %9 verimle (Kalın *et al.* 2014), kırmızı lahanadan 120 kat %2,9 verimle (Somtürk *et al.* 2014) saflaştırılması yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında ise karaturp ve şalgam POD enzimlerini, 4-amino benzohidrazid türevi molekülleri (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi hedeflenmiştir. Çizelge 3.2’de verilen bu türevler (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) ticari olarak temin edilemediğinden dolayı, moleküller metil benzoat türevleri (**1**, **2**, **3**, **4**) olarak satın alındı, hidrazin sentezleri tarafımızca yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterildi. Sentezi yapılan 4-amino benzohidrazid türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerin afinite jellerinin sentezi yapıldı. Saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Çalışmamızın tüm basamaklarında kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi.

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi.

Karaturp ve Şalgam POD enzimleri ilk olarak literatürde verildiği gibi 4-amino benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanılarak karaturp POD enzimi için %2,9 verim ve 35,9 saflaştırma katsayısıyla, şalgam POD enzimi ise %4,7 verim 71,1 kat saflaştırma katsayısıyla saflaştırıldı. Saflaştırılan bu enzimler üzerine 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**), 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9, 4.12, 4.15, 4.18, 4.21 ve 4.24’te gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doymun



olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri bulundu. Karaturp ve şalgam POD enzimleri için bu grafikler Şekil 4.6, 4.8, 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18 ve 4.20'de gösterildi.

Karaturp ve şalgam POD enzimleri için sırasıyla  $IC_{50}$  değerleri 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) için; 371  $\mu$ M ve 188  $\mu$ M, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) için; 0,124  $\mu$ M ve 48,9  $\mu$ M, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) için; 231  $\mu$ M ve 12,26  $\mu$ M 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) için; 86,6  $\mu$ M ve 46,2  $\mu$ M olarak hesaplandı. Tüm moleküllerin  $IC_{50}$  değerlerinin sonuçlarına bakıldığında POD enzimi inhibitörü olabileceği ortaya konuldu.

İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile  $K_i$  değerlerinin hesaplanması çalışmaları yapıldı. Karaturp ve şalgam POD enzimleri için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.4, 4.7, 4.10, 4.13, 4.16, 4.19, 4.22 ve 4.25'te gösterildi. 4-Amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**), 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ve 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve  $K_i$  değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine denenen inhibitörlerin  $K_i$  grafikleri Şekil 4.7, 4.9, 4.11, 4.13, 4.15, 4.17, 4.19 ve 4.21'de gösterildi. Karaturp ve şalgam POD enzimleri  $K_i$  değerleri sırasıyla 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) için 415  $\mu$ M ve 92  $\mu$ M, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) 0,155  $\mu$ M ve 81,7  $\mu$ M, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) için 272  $\mu$ M ve 17,9  $\mu$ M, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) için 103,3  $\mu$ M ve 25,7  $\mu$ M olarak grafiklerden yararlanılarak hesaplandı. Böylece saflaştırmada ligand olarak kullanılacak moleküllerin detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan 4-amino benzohidrazid türevi moleküllerin (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) karaturp ve şalgam POD enzimlerinin yeni inhibitörleri

olarak belirlendi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 µmol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-(**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A<sub>470</sub> yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Karaturp ve şalgam POD enzimleri saflaştırma tabloları Çizelge 4.28 ve 4.29'da gösterildi. Karaturp ve şalgam POD enzimlerini saflaştırmak için 4-amino 2-metil benzohidrazid (**1a**) molekülü ligand olarak kullanıldığında sırasıyla %14,1 verimle 211,4 kat ve %11,7 verimle 444,6 kat, 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**) ile %14,2 verimle 191,6 kat ve %10,2 verimle 234 kat, 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) ile %33,6 verimle 676,4 kat ve %20,1 verimle 806,7 kat, 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) ile %10,1 verimle 244,3 kat ve %12,2 verimle 653,9 kat saflaştırma yapıldı.

Karaturp ve şalgam POD enzimleri literatürde afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %10,6 verimle 40,3 kat ve %9 verimle 269,13 kat saflaştırılması yapılmıştır (Kalın *et al.* 2014). Literatürle kıyaslandığında 4-amino benzohidrazid molekülü halkasının 2 ve 3 pozisyonlarına metil ve metoksi grupları bağlandığında, elde edilen bu moleküllerin enzime olan afinitesinin arttığı saptandı. Özellikle 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**) molekülü ile yapılan saflaştırma çalışmalarında karaturp POD enziminde %33,6 verime ve 676,4 kat ve şalgam POD enziminde %20,1 verime ve 806,7 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Afinite tekniği kullanılarak karaturp ve şalgam POD enzimlerini saflaştırmada 4-amino 2-metoksi benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanılabilmesinin oldukça önemli olduğu belirlendi ve bu çalışma ilk defa tarafımızdan gerçekleştirildi.

Karaturp ve şalgam POD enzimlerini kolon tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/gram-jel cinsinden karaturp ve şalgam POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işlemlerinde en yüksek

verim ve saflaştırma katsayısına ulaşılan kolon olan 4-amino 2-metoksi benzohidrazid jelinden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen karaturp ve şalgam POD enzimleri ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan POD enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Jel kurutulup tartılarak mg protein/gram-jel cinsinden POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi (Arslan *et al.* 1996). Karaturp POD enzimi için 25 °C, pH 6,8 ve 0,3 M iyonik şiddette kolon tutma kapasitesi 14 µg/g jel, şalgam POD enzimi için ise aynı şartlar altında 16 µg/g jel olarak tespit edildi.

Karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflaştırılmasında 4-amino 2-metoksi benzohidrazid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (µg protein/g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.27, 4.28'den görüldüğü gibi 15°C'de karaturp ve şalgam POD enzimlerinin jele bağlanma kapasitesi maksimum ve sırasıyla 23 µg/g jel ve 18 µg/g jeldir.

Karaturp ve şalgam POD enzimleri için 4-amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jeline pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 4 ile 9 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (µg protein/gram-jel başına) Şekil 4.29 ve 4.30'da grafik edildi. Buradan 4-amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jeli için karaturp ve şalgam POD enzimlerinin pH=8,0'de maksimum bağlandığı ve sırasıyla 24 µg/g jel ve 20 µg/g jel olarak belirlenmiştir.

4-Amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jeline Karaturp ve şalgam POD enzimlerinin bağlanma kapasitesine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı ve bu iyonik şiddet 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda karaturp POD enziminin 23 µg/g jel, Şekil 4.32'de görüldüğü gibi 0,3 M iyonik şiddet konsantrasyonunda şalgam POD enziminin 25 µg/g jel başına ve bağlanmanın maksimum olduğu tespit edildi.

Saflaştırılan karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflığını ve moleköl ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.25'te karaturp POD enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi ve aynı enzim için moleköl ağırlığı 47 kDa ve Şekil 4.26'da şalgam POD enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi ve moleköl ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı. Karaturp POD enzimi için yapılan substrat ile boyama çalışması için SDS-PAGE yapıldı, numune tamponunda denature edici ajanlar kullanılmadı ve ısıtma işlemi yapılmadı. SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 4.27'de gösterildi. Karaturp POD enziminin moleköl ağırlığı 43 kDa olarak hesaplandı.

#### Sonuç Olarak;

4-Amino 2-metil benzohidrazid (**1a**), 4-amino 3-metil benzohidrazid (**2a**), 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (**3a**), 4-amino 3-metoksi benzohidrazid (**4a**) moleküllerinin sentezi yapıldı ve karaturp ve şalgam POD enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Çalışılan 4 molekölün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.

Bu moleküller kullanılarak afinite jelleri hazırlandı, karaturp ve şalgam POD enzimleri tek basamakta saflaştırıldı. Karaturp ve şalgam POD enzimlerinin saflaştırılmasında; 4-amino 2-metoksi benzohidrazid molekölünün çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligand olduğu belirlendi. Literatürde 4-amino benzohidrazid afinite yöntemiyle 40,3 kat saflaştırılan karaturp POD enzimi **676** kat, 269 kat saflaştırılan şalgam POD enzimi ise **807** kat saflaştırıldı.

Sonuçlar literatür ile kıyaslandığında saflaştırmada elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının literatürde olan çalışmalardan çok daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmada ligand olarak kullandığımız 4-amino 2-metoksi benzohidrazid molekölünün ucuz maliyette ve yüksek verimde karaturp ve şalgam POD enzimlerini saflaştırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da saflaştırmada kullanılma potansiyelinin olduğu literatüre kazandırıldı.

**KAYNAKLAR**

- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U. and Scherier, P., 1999. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74–108.
- Adams, J.B., 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-shorttime processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281–297.
- Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S.R. and Tigier, H., 1997. properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596–598.
- Almagro, L., Gómez, Ros L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. and Pedreño, M. A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botanic*, 60, 377–390.
- Al-Senaidy, M., Abdurrahman, M. and Mohammad, A., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 293–298.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163–166.
- Somtürk, B., Kalın, R. and Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173:1815–1828.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H. and Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen., and Hajdu J., The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 23, 417(6887), 463–8.
- Bernardes, A., Textor, L.C., Santos, J.C., Cuadrado, N.H., Kostetsky, E.Y., Roig, M.G., Bavro, V.N., Muniz, J.R.C., Shnyrov, V.L. and Polikarpov, I., 2015. Crystal Structure Analysis of Peroxidase from the Palm Tree *Chamaerops Excelsa*. *Biochimie* 111: 58.
- Bradford. M.M. and Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274–274.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R. and Anon, M. C., 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*-Duch) partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Cosio C. and Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot*, 60, 391–408.
- Deepa, S. S. and Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C. and 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.
- Dunford, H. B. and Jones, P. A., 2010. Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley and Sons Inc.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. Encyclophedia of Plant Physiology, Pirson, A., Zimmerman, M.H. (Ed). 4-17, New York.
- Fry S.C., 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 32, 507–515.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165-186.
- Ghada, J. C., Sotiris, K. H., Athanasios, C. T., Maciej K., Bakas, T. and Hadjiliadis, N., 2011. Inhibition of peroxidase-catalyzed iodination by thioamides: experimental and theoretical study of the antithyroid activity of thioamides. *New Journal of Chemistry*, 35, 213-224.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42 (5), 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y. and Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium İon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72–77.
- Jouili H., Bouazizi H., Ferjani E. E., 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33,2075.
- Kalin, R., Atasever, A. and Ozdemir, H., 2013. The Single-Step Purification of Peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish Blackradish and Turnip Roots. *Food Chemistry*, 10.125.
- Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A. and Aosvigyazo, V., 1984. Changes in peroxidasesactivity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu. Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayımları, 97-125, Erzurum.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Erzurum.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *Intenational Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Köksal, E. and Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassicaoleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15.

- Kumar, R. and Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Crystallographica*, 51, 1094-1096.
- Kumar, R., Sing, K.A., Sing, V.K. and Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H. and Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G. and D’Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic Press, New York.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685 1934.
- Liszakay, A., Kenk, B. and Schopfer, P., 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217, 658–667.
- Marjamaa K., Kukkola, E. M. and Fagerstedt K. V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botanic*, 60, 367–376.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M. and Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Food Science and Technology*, 41, 1372-1379.
- McLellan, K.M. and Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Mika, A., Buck, F. and Lühje, S., 2008. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71, 412-424.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643-1650.
- Murakami, S., Takahara, H. and Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J. and Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376.

- Pandey, V. P., and Dwivedi, U. N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, (2), 367–376.
- 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.
- Pütter, J. and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases*. Bergmeyer, Third Edition, VCH. 286, New York.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M. and Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S. and 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.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M, Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M. and Schomburg, D., 2013. Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA". *Nucleic Acids Research*, 41 (Database issue): D764–72.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Serrano-Martinez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M. and Nunez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193–199.
- Shoda, S., Uyama H., Kadokawa J., Kimura S. and Kobayashi S., 2016. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev*, 116, 2307–2413.
- Singh, W. N. and Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Spadiut O., Rossetti L., Dietzsch C. and Herwig C., 2012. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expression and Purification*, 86, 89–97.
- Şişeciöğlü, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B. and Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.



- Tipawan, T. and Barrett M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V. and Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228, 487-495.
- Van Huystee, R.B., 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Biology*, 38, 205-219.
- Wakamatsu, K. and Takahama, U., 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Zilbeyaz, K., Kilic, H., Sisecioglu, M., Ozdemir H. and Gungor A.A., 2012. Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation of E-chalcone. *Tetrahedron*, 23, 594-601.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Edirne’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Edirne’de tamamladıktan sonra 2004 yılında Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü’nde başladığı üniversite eğitimini 2009 yılında tamamladı. 2009 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2009 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimini 2011 yılında tamamladı ve aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora eğitimine başladı.