

**SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK
MEMELİ SÜTLERİNDEN LAKTOPEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

Zeynep KÖKSAL

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK MEMELİ
SÜTLERİNDEN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI**

Zeynep KÖKSAL

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

SÜLFANILAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK MEMELİ SÜTLERİNDEN
LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Zeynep KÖKSAL tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/10/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.S./S.)** ile kabul edilmiştir.

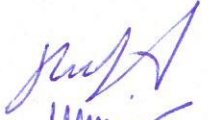
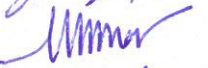



Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

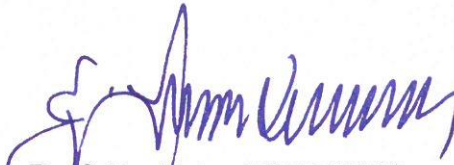
Üye : Prof. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza : 
İmza : 
İmza : 
İmza : 
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 27/10/2015 tarih ve 42/1502 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:114Z038

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

SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK MEMELİ SÜTLERİNDEN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Zeynep KÖKSAL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Laktoperoksidaz (LPO E.C.1.11.1.7) enziminin farklı memeli sütlerinden saflaştırılmasında sülfanilamid türevi olan 5-amino-2-metilbenzensülfonamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin ve sulfaguanidin moleküllerinin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla önceden saflaştırılan sığır LPO enzimi kullanılarak moleküllerin kinetik parametreleri belirlenmiştir. Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değeri herbir molekül için sırasıyla 0,693, 115,00, 346,50, 173,00, 92,24, 309,00, 346,50, 221,70, 3,44, 173,20 ve 17,15 μ M olarak hesaplanırken K_i değerleri ise sırasıyla 0,0004, 16,37, 103,32, 122,00, 90,66, 78,00, 198,00, 182,66, 870,00, 56,30 ve 1,24 μ M olarak tespit edildi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jeli sentezlenerek sığır, koyun, manda ve keçi sütü LPO enzimi için saflaştırma tabloları hazırlandı. Saflaştırma basamakları sonucunda moleküller arasında kullanılma potansiyeli en yüksek olan 5-amino-2-metilbenzensülfonamid molekülü ile sığır sütünden LPO enzimi tek basamakta %82,68 verimle, 1059,37 kat, manda sütünden %34,67 verimle, 509,09 kat, koyun sütünden %14,35 verimle, 232,55 kat ve keçi sütünden ise %11,30 verimle, 161,90 kat saflıkta elde edilmiştir. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve yaklaşık 80 kDa'lık tek bant bulundu. 5-amino-2-metil benzensülfonamid kolonundan saflaştırılan sığır LPO için optimum pH 6,0; optimum sıcaklık 45°C; K_m değeri 0,15 mM ve V_{max} değeri 0,6 EÜ/mL.dk iken koyun sütü LPO için optimum pH 5,5; optimum sıcaklık 60°C; K_m değeri 0,08 mM ve V_{max} değeri 0,05 EÜ/mL.dk olarak, manda sütü LPO için optimum pH 5,5; optimum sıcaklık 70°C; K_m değeri 0,08 mM ve V_{max} değeri 0,46 EÜ/mL.dk olarak, keçi LPO için optimum pH 5,5; optimum sıcaklık 70°C; K_m değeri 1,42 mM ve V_{max} değeri 0,07 EÜ/mL.dk olarak tespit edildi. 5-amino-2-metil benzensülfonamid kolonu için LPO'nun bağlanma kapasitesi 15°C'de, pH: 9,0'da, 0,3 M'lık iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 0,05 mg/g jel olarak tespit edildi.

2015, 94 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktoperoksidaz, Afinite kromatografisi, Memeli sütü, Saflaştırma, Sülfanilamid türevleri

ABSTRACT

Ph.D.Thesis

PURIFICATION OF THE LACTOPEROXIDASE ENZYME WITH USING SULFANILAMIDE DERIVATIVES FROM MAMMALIAN MILK

Zeynep KÖKSAL

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

To investigate the usability for the purification of the Lactoperoxidase (LPO E.C.1.11.1.7) enzyme from different mammalian milk, 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide, 3,5-dichlorosulfanilamide, 2-amino-5-methyl-1,3-benzenedisulfonamide, sulfisomidin, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfisoxazole, sulfacetamide, sulfamethoxypyridazine, sulfaguanidine molecules, which are sulfanilamide derivatives, were studied. For this purpose, the kinetic parameters of the molecules is determined using a pre-purified bovine LPO enzyme. Half maximal inhibitory concentration IC_{50} values were calculated for each molecules respectively 0.693, 115.00, 346.50, 173.00, 92.24, 309.00, 346.50, 221.70, 3.4, 173.20 and 17.15 and on the other hand K_i values were determined respectively 0.0004, 16.37, 103.32, 122.00, 90.66, 78.00, 198.00, 182.66, 870.00, 56.30 and 1.24 μ M. Affinity columns were synthesized for each molecules which showed alternately inhibition and purification tables were prepared for each mammalian LPO enzyme. As a result of the purification step, 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide is the highest potential among used molecules. Bovine LPO enzyme was purified 1059.37-fold with 82.68% yield, buffalo LPO was purified 509.09 -fold with 34.67% yield, sheep LPO was purified 232.55-fold with 14.35% and goat LPO was purified 161.90-fold with a yield of 11.30%. The purity of the purified enzyme was checked by SDS-PAGE and only one band approximately 80 kDa was found. Kinetic parameter of bovine LPO that purified from 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide column, was performed for this purpose optimum pH: 6.0, optimum temperature 45°C, K_m value 0.15 mM and V_{max} value 0.6 EU/mL while for buffalo LPO optimum pH: 5.5, optimum temperature 70°C, K_m value 0.08 mM and V_{max} value 0.46 EU/mL were determined, for sheep LPO optimum pH: 5.5, optimum temperature 60°C, K_m value 0.08 mM and V_{max} value 0.05 EU/mL were determined, for goat LPO optimum pH: 5.5, optimum temperature 70°C, K_m value 1.42 mM and V_{max} value 0.07 EU/mL were determined. Binding capacity was determined 0.05 mg/g gel at 15°C pH: 8.0 and at a concentration of 0.3 M ionic strength.

2015, 94 pages

Keywords: Lactoperoxidase, Affinity chromatography, Mammalian milk, Purification, Sulfanilamide 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.

Öncelikle Atatürk Üniversitesi, İstanbul Medeniyet Üniversitesi ve Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiřtirme Programına, çalışmalarımın bütün safhalarında Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümünün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Bölüm Başkanlığına, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda şİŞECİOĞLU'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis şAKİROĞLU'na,

Eğitimim süresince maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı 114Z038 nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Zeynep KÖKSAL

Ekim, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktoperoksidaz (LPO)	2
1.2. Afinite Kromatografisi	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
2.1. Çalışmanın Amacı	11
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	13
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	13
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	14
3.2. Yöntemler	18
3.2.1. Protein tayini	18
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	18
3.2.1.b. Bradford metodu ile protein tayini	18
3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite tayini	19
3.3. Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Basamakları	20
3.3.1. Amberlite CG 50 H ⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması	20
3.3.2. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi	20
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	22
3.3.3.a. Sülfanilamid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi ..	22
3.3.3.b. Sülfanilamid-Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	23
3.3.3.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	23

3.3.3.d. Sülfanilamid ve türevlerinin kenetlenmesi	24
3.3.3.e. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	27
3.3.3.f. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	27
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi	27
3.5. Memeli Sütlerinden Saflaştırılan LPO Enzimleri İçin Kinetik Çalışmalar	29
3.5.1. Optimum pH çalışmaları	29
3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması	29
3.5.3. Stabil pH çalışmaları	29
3.5.4. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	29
3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması	30
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	30
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	30
3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	32
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	32
4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları	33
4.2.1. LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	33
4.2.2. SDS-Poliakrilamid jel elektrofrezisi sonuçları	34
4.2.3. ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	35
4.3. Kullanılan İnhibitörlerin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunması	36
4.3.1. 5-amino-2-metilbenzensulfonamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	37
4.3.2. 3,5-diklorosülfanilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	40
4.3.3. 2-amino,5-metil-1,3-benzendisülfonamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	43
4.3.4. Sulfisomidin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	46
4.3.5. Sulfadiazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	49

4.3.6. Sulfamerazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	52
4.3.7. Sulfametazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	55
4.3.8. Sulfisokzol için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	58
4.3.9. Sulfasetamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	61
4.3.10. Sulfametoksipiridazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	64
4.3.11. Sulfaguanidin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	67
4.4. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma ve SDS-PAGE Sonuçları.....	70
4.4.1. 5-amino-2-metilbenzensülfonamid ile saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile bulunan kinetik parametreler	70
4.4.2. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği	70
4.4.3. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	71
4.4.4. ABTS substratı için K_m ve V_{max} grafikleri	71
4.4.5. Stabil pH çalışması	73
4.5. Memeli Sütleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar	75
4.6. Saflaştırılan LPO Enzimlerinin SDS-PAGE Gümüş Boyama Sonuçları.....	78
4.6.1. 5-amino-2-metilbenzensülfonamid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda sütleri LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları.....	78
4.7. Sığır Sütünden 5-amino-2-metilbenzensülfonamid Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	79
4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	79
4.7.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	79
4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	80
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
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 ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Laktoperoksidaz enziminin X-Ray kristalografi şekli.....	6
Şekil 1.2. Substrat varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	7
Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	8
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	23
Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid kenetlendirilmesi	26
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	32
Şekil 4.2. Sülfanilamid kolonundan sığır sütü LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatlarda 280 ve 412 nm de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik.....	33
Şekil 4.3. LPO Enziminin sülfanilamid afinite kolonundan elüsyonu sonucundaki aktivite-tüp sayısı.....	34
Şekil 4.4. Sığır LPO enziminin SDS-PAGE gümüş boyama fotoğrafı.....	35
Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	35
Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 5-amino-2-metilbenzensülfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	37
Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-2-metilbenzensülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	38
Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3,5-diklorosülfanilamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	40
Şekil 4.9. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3,5-diklorosülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	41
Şekil 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 2-amino-5-metil-1,3- benzendisülfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	43

Şekil 4.11. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	45
Şekil 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfisomidin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	46
Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfisomidin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	47
Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfadiazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	49
Şekil 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	50
Şekil 4.16. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfamerazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	52
Şekil 4.17. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfamerazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	53
Şekil 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfametazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	55
Şekil 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfametazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	56
Şekil 4.20. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfisokzol ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	58
Şekil 4.21. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfisokzol eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	59
Şekil 4.22. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfasetamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	61
Şekil 4.23. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfasetamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	62
Şekil 4.24. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfametoksipiridazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	64
Şekil 4.25. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfametoksipiridazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	65
Şekil 4.26. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfaguanidin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	67

Şekil 4.27. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfaganidin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	68
Şekil 4.28. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği	70
Şekil 4.29. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği	71
Şekil 4.30. Manda sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	72
Şekil 4.31. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	72
Şekil 4.32. Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	73
Şekil 4.33. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak manda sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	73
Şekil 4.34. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	74
Şekil 4.35. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak sığır sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	74
Şekil 4.36. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	75
Şekil 4.35. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda LPO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı.....	78
Şekil 4.36. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği	79
Şekil 4.37. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin pH-kapasite grafiği	80
Şekil 4.38. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin iyonik şiddet $[M]$ -kapasite grafiği.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diazonyum tuzu oluşturabilen sülfanilamid türevleri ve açık kimyasal yapıları	21
Çizelge 4.1. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	34
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için K_m ve V_{max} değerleri	36
Çizelge 4.3. 5-amino-2-metil-benzensulfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	37
Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 5-amino-2-metilbenzensulfonamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	38
Çizelge 4.5. Laktoperoksidaz enzimi üzerine 5-amino-2-metilbenzensulfonamid inhibitörünün inhibisyon etkisi	39
Çizelge 4.6. 5-amino-2-metilbenzensulfonamid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	39
Çizelge 4.7. 3,5-diklorosulfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	40
Çizelge 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 3,5-diklorosulfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	41
Çizelge 4.9. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 3,5-diklorosulfanilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi	42
Çizelge 4.10. 3,5-diklorosulfanilamid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	42
Çizelge 4.11. 2-amino,5-metil-1,3-benzendisulfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	43
Çizelge 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-amino-5-metil-1,3 benzendisulfonamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	44

Çizelge 4.13. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid inhibitörünün inhibisyon etkisi	45
Çizelge 4.14. Sulfisomidin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .	46
Çizelge 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfisomidin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	47
Çizelge 4.16. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfisomidin inhibitörünün inhibisyon etkisi	48
Çizelge 4.17. Sulfisomidin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	48
Çizelge 4.18. Sulfadiazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	49
Çizelge 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	50
Çizelge 4.20. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfadiazin inhibitörünün inhibisyon etkisi ve saflaştırma tablosu	51
Çizelge 4.21. Sulfadiazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	51
Çizelge 4.22. Sulfamerazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü .	52
Çizelge 4.23. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfamerazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	53
Çizelge 4.24. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfamerazin inhibitörünün inhibisyon etkisi	54
Çizelge 4.25. Sulfamerazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	54
Çizelge 4.26. Sulfametazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	55
Çizelge 4.27. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfametazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	56

Çizelge 4.28. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfametazin inhibitörünün inhibisyon etkisi	57
Çizelge 4.29. Sulfametazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	57
Çizelge 4.30. Sulfisokzol inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	58
Çizelge 4.31. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfisokzol eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	59
Çizelge 4.32. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfisokzol inhibitörünün inhibisyon etkisi	60
Çizelge 4.33. Sulfisokzol ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	60
Çizelge 4.34. Sulfasetamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	61
Çizelge 4.35. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfasetamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	62
Çizelge 4.36. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfasetamid inhibitörünün inhibisyon etkisi	63
Çizelge 4.37. Sülfasetamid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	63
Çizelge 4.38. Sulfametoksipiridazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	64
Çizelge 4.39. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfametoksipiridazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	65
Çizelge 4.40. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfametoksipiridazin inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	66
Çizelge 4.41. Sulfametoksipiridazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	66

Çizelge 4.42. Sulfaguanidin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	67
Çizelge 4.43. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfaguanidin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	68
Çizelge 4.44. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfaguanidin inhibitörünün inhibisyon etkisi	69
Çizelge 4.45. Sulfaguanidin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	69
Çizelge 4.46. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	75
Çizelge 4.47. Sığır ve manda sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları.....	76
Çizelge 4.48. Keçi ve koyun sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları.....	77
Çizelge 4.49. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimi toplu kinetik sonuçları.....	78
Çizelge 5.1. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları	88

1. GİRİŞ

Canlılığın devamı organizmanın kendini kopyalaması ve kimyasal reaksiyonları yüksek seçicilikte kataliz edebilmesine bağlıdır. Biyolojik sistemlerde gerçekleşen kimyasal süreçler katalizör görevi gören enzimler ile çok hızlıdır (Gürdöl ve Ademoğlu 2013). Hemen hemen her biyokimyasal tepkime bir enzim tarafından katalizlenir (Nelson and Cox 2008). Enzimler enerjinin bir formdan diğer bir forma dönüşümünü sağlarlar (Berg *et al.* 2014) ve tepkimelerin çok hızlı gerçekleşebildiği özel bir ortam oluştururlar (Nelson and Cox 2008).

Günümüzde birçok sahada kullanım potansiyeline sahip olan enzimler içerisinde oksidoredüktaz enzim sınıfına dahil olan peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7) çok yaygın olarak prokaryotlarda, ökaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunan enzimlerdir. Bu enzimler mayalarda, mantarlarda, yüksek bitkilerde, bakterilerde, turp türlerinde ve sütte bulunmakta olup spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Van Huystee 1987). Peroksidazlar hücre duvarı proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), çimlenme (Morohashi 2002), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga and Sasaki 2001) gibi birçok fonksiyonda işlev sahibidir.

Metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türleri peroksidazların katalizlediği reaksiyonlar sayesinde zararsız moleküllere dönüştürülürler (Davies 1995). Antioksidan özellik göstererek elektron alıcısı olarak hidrojen peroksiti kullanan organik ve inorganik substratların aralarında gerçekleşen oksidasyonu katalizlerler (Hussain *et al.* 1995). Fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonoid aminler (yalnızca benzidin türevleri) gibi çok sayıda 2-krezol, 2-toluidin, guaiakol, pirogallol gibi aromatik bileşenlerin dehidrogenasyonunu da katalizlerler (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

Memeli POD enzimleri sütte, tükürük ve göz yaşında laktoperoksidaz olarak (Kumar and Bhatla 1995), lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde ve dalakta miyeloperoksidaz, uterus, akciğer duvarları, sitoplazma ve mitokondrilerde glutatyon peroksidaz olarak lokalize olmuştur (Pütter and Becker 1987).

Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda H_2O_2 ; elektron akseptörü olarak hareket eden askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi birçok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir (Doumonted and Rousset 1983). Oksitleyici özelliğe sahip olan H_2O_2 'nin ortamdan hemen uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir (Halliwell and Gutteridge 1984).

Laktoperoksidaz (LPO) insan ve sığır sütünün doğal bileşenidir ve tüm memeli sütlerinde bulunan bir enzimdir (Pruitt and Kamau 1991).

1.1. Laktoperoksidaz (LPO)

Laktoperoksidaz (E.C.1.11.1.7), biyolojik sıvılar içerisinde tükürük ve gözyaşında, yaygın olarak da sütte bulunan bir enzimdir. Başlıca görevi hidrojen peroksit varlığında moleküllerin oksidasyonunu katalizleyerek geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip ürünlerin üretilmesini sağlamaktır. Psödo halojen, tiyosiyanat veya halojenlerin ikinci substrat olarak görev alması, enzimin bu antimikrobiyal etkiyi göstermesi için gerekmektedir (Reiter and HaÈrnulv 1984; Reiter and Perraudin 1991).

LPO sisteminin sığır sütündeki koruyucu etkisi iyi kurgulanmıştır. Bu sistemin aktivasyonu iki reaktant tiyosiyanat ve hidrojen peroksitin konsantrasyonuna bağlıdır. Başlıca bu sistem hidrojen peroksit eşliğinde tiyosiyanatın antibakteriyal özelliklere sahip hipotiyosiyanata dönüşümünü katalizler (Haddain *et al.* 1996)

Bu bileşikler, insanlar için zararsız olan son ürünlere okside olurlar. Hücre membranlarına zarar vererek ve birçok sitoplazmik enzimin aktivitesini inhibe ederek bakteriyal büyümeyi azaltma kabiliyetine sahiptir.

Süt ve süt ürünlerinin beslenmedeki önemi ve insan sağlığına katkısı eski çağlardan bu zamana kadar bilinmektedir. Süt iki büyük protein ailesine sahip bir protein sisteminden oluşmaktadır. Çözünmeyen kazein ve çözünen whey proteinleri. Kazein tüm sütün %80'nini oluşturmaktadır ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle yağı alınmış süttten kolaylıkla ayrılabilir, Whey proteinleri kompleks moleküllerdir, bileşimlerinde asidik veya bazik ve hidrofobik veya hidrofilik amino asitler içeren alfa-heliks motifleri polipeptid zincirleri boyunca oldukça dengeli dağılır. Whey proteinler b-laktoglobulin, a-laktalbumin, immunoglobulins, a-laktalbumin, bovin serum albümin, bovin laktoferrin and laktoperoksidaz ve küçük bileşimler içermektedir. (Madureira *et al.* 2007)

Biyoaktif bileşenler içeren süt makro ve mikro besin elementlerini içermesinin yanı sıra, hastalık risklerini azaltıcı antioksidan bileşenleri de yapısında bulundurmaktadır. Süt, yeni doğan canlıının yaşamını sürdürebilmesini sağlayacak temel besin elementleri ve antioksidan etkiler gösteren bileşenleri de doğal olarak yapısında bulundurmaktadır.

Birçok süt proteini, örneğin laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrin hem yeni doğan hemde yetişkinlerde sağlığı koruması açısından önemlidir (Expo'sito and Recio 2006)

Sığır sütünde bulunduğu rapor edilmiştir (Kumar and Bhatla 1995). Süttten izole edilen peroksidaz enzimi diğer hayvan ve insan peroksidazları ile benzer özellik göstermektedir ve bunun için laktoperoksidaz olarak adlandırılmıştır (Reiter and HaÈrnulv 1984). Sırası ile %55, 54 ve 45 insan Miyeloperoksidaz, Eozonofilperoksidaz ve Tiroidperoksidaz ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Laktoperoksidaz, ksantin oksidazdan sonra süttte en bol bulunan enzimdir ve peynir altı suyunda yaygın olarak bulunmaktadır. Herbir laktoperoksidaz enziminde bir demir molekülü bulunmaktadır. Proteinin konformasyonu şelatlanmış kalsiyum iyonu ile stabilize edilmektedir (Pourtois *et al.* 1991; Atamer *et al.* 1999; Kussendrager and Van Hooijdank 2000).

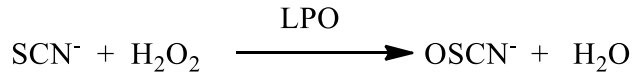
LPO enzimi 612 aminoasit zincirinden ibaret, %8-10 karbohidrat içeren bir glikoproteindir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa (Ozdemir *et al.* 2001, 2002) olan tek polipeptid zincirinden oluşup, prostetik grup olarak hem grubu içeren bazik bir proteindir ve izoelektrik pH değeri yaklaşık olarak 9,2'dir (Pourtois *et al.* 1991; Atamer *et al.* 1999; Kussendrager and van Hooijdank 2000) ayrıca asidik pH da çok aktiftir (Wever *et al.* 1982).

Oldukça hacimli bir molekül olan LPO'yu (Sievers 1980), Ca^{2+} iyonu stabilite eder, pH 5'in altında Ca^{2+} kaybolur ve de enzimin stabiliteside kaybolur.

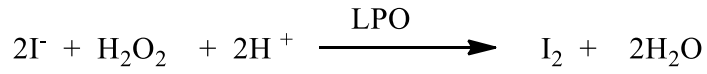
LPO'nun biyosidal aktivitesi katalizlediği kimyasal reaksiyonlardaki ürünlerin sonucudur. Başlıca reaksiyon ürünü hipotiyosiyanat çeşitli proteinlerin tiyol grupları ile etkileşmektedir ve buda patojenlerin yaşayabilirlikleri için önemlidir. LPO nun bakterilere karşı etkisi sülfidril oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. -SH gruplarının oksidasyonu bakteriyal sitoplazmik membranının glukoza, potasyum iyonlarını, amino asitleri ve peptidleri aktarma kabiliyetini kaybetmesine yol açar (Sisecioglu *et al.* 2010).

LPO sütte ve peynirde mikroflora azaltma amaçlı yaygın kullanıma sahiptir (Reiter 1985). Çeşitli hayvan kaynaklarından elde edilen LPO enzimi, bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde önemli bir özelliğe sahiptir. Sığır LPO'sunun bakteriyal büyümeyi inhibe etmesi, H_2O_2 ve tiyosiyanat içeren peroksidaz sistemine atfedilir (Jacob *et al.* 1998). LPO sistemin antimikrobiyal etkisi sütte doğal olarak oluşur. LPO'nun gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine bakteriyostatik etkisi vardır. Deve sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine yapılan antibakteriyal çalışmalarda LPO-tiyosiyanat ve peroksit sisteminin patajonik bakterilerde önemli derecede inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Laktoperoksidazın birçok uygulama alanı vardır. Özellikle süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde kullanılmaktadır (Barrett *et al.* 1999).

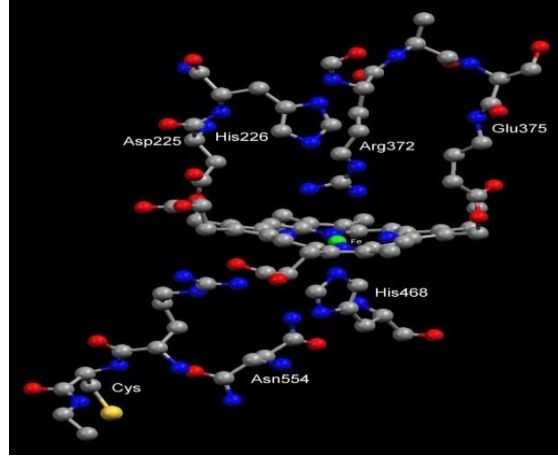
Bu enziminin biyolojik önemi ise mikroorganizmaların istilasına karşı doğal bir koruma sistemi içermesidir. Sığır sütü de antimikrobiyal ajanları içeren tek süttür. Bu antiviral etkinin yanında çeşitli yıkımlara ve peroksidatif etkilere karşı hayvan hücrelerinde koruma sağladığı rapor edilmiştir (Reiter and HaÈrnulv 1984; Reiter and Perraudin 1991; Wolfson and Sumner 1993; de Wit and van Hooydonk 1996). Sütün en önemli enzimi olan laktoperoksidaz (Pakkanen and Aalto 1997; Scammel 2001) patojen mikroorganizmalara karşı ve yeni doğan bebeklerin sindirim sisteminden salgılanan, savunmada önemli bir rol oynayan, süt içerisine salgılanan bir oksidoredüktazdır. LPO enzimi memelilerin non-immun biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşigi olarak işlev görerek, aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyanat iyonunun antibakteriyal hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizler (Kumar and Bhatla 1995).



Laktoperoksidaz enzimi aynı zamanda iyodürün hidrojen peroksitle oksidasyonunu katalizler (Bayse *et al.*1972).



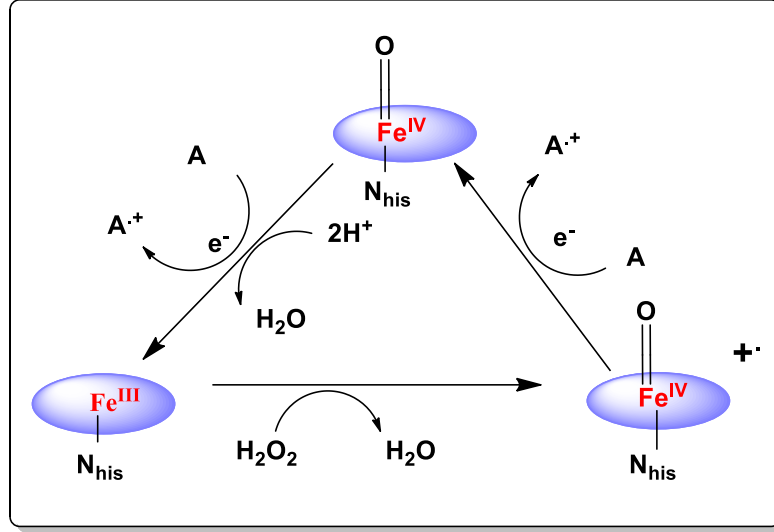
Peroksidazların katalitik mekanizmaları benzer olmasına rağmen, halojenürleri ve psöydö halürleri okside etme kabiliyetleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Örneğin sadece miyeloperoksidaz bromu, iyodu ve kloru nötral pH da okside edebilir. Laktoperoksidaz ise bu şartlar altında sadece iyodu ve tiyosiyanatı okside edebilirken bromu çok az kloru ise hiç okside edemez (Boots and Floris 2006)



Şekil 1.1. Laktoperoksidaz enziminin X-Ray kristalografi şekli

Hem grubu proteine kovalent bağlıdır ve bu bağlanma hem grubunun hidroksil grubu ile proteinin karboksil grubu arasında meydana gelmektedir (Doumonted and Rousset 1983). Molekülün %10 civarı karbohidrattır ve başlıca 5 potansiyel-glikolizasyon bölgesi ve 15 yarı sistin rezidüleri içerir (Reiter and Harnulv 1984; Elagamy *et al.* 1992; Sisecioglu *et al.* 2010). Katalitik merkezdeki hem grubu protoporfirin IX dur ve polipeptid zincirine disülfid köprüsü boyunca kovalent olarak bağlanmıştır (Thanabal and LaMar 1989). LPO daki demir bileşimi %0,07'dir ve hem grubunun bir parçasıdır. Kalsiyum iyonu enzime sıkıca bağlıdır, enzimin moleküler konformasyonunu ve yapısal bütünlüğünü korumasını sağlar (Booth *et al.* 1989).

LPO diğer peroksidazlar gibi H_2O_2 mevcudiyetinde fenoller, aromatik aminler, pirogallol, askorbat ve guaiakol gibi moleküllerin oksidasyonunu da katalizlerler (Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995). LPO H_2O_2 mevcudiyetinde yapılan çalışmada guaiakol oksidasyonun mekanizması aydınlatılmış ve guaiakol'ün 3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokine'a okside olduğu bulunmuştur (Daniel *et al.* 1997). Bilinen en yaygın substratları ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit), guaiakol ve katekol gibi basit fenollerdir (Shindler and Bardsley 1975; Metodiewa *et al.*; 1989 Daniel *et al.* 1997). Ayrıca hidrazinler tarafından da inhibe edildiği bilinmektedir (Kumar and Bhatla 1995). Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sıgır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge 1986).



Şekil 1.2. Substrat varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Bu mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi Fe(IV) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'i oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bu bir redoks reaksiyonu olup hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. İkinci adımda ise katyon radikali halinde olan bileşik I ortamdaki substrattan bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan tekrar bir proton almak suretiyle indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimerleşirler (Veitch 2004).

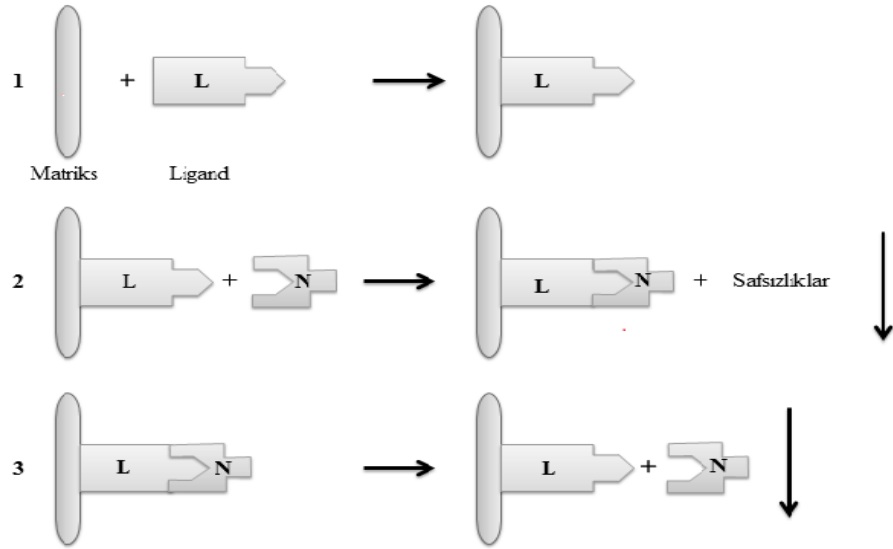
1.2. Afinite Kromatografisi

Biyokimyasal araştırmalarda çokça tercih edilen ayırma teknolojisinin vazgeçilmezlerinden olan afinite kromatografisi, hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını veya özel kimyasal yapılarını esas alarak saflaştırma yapmayı mümkün kılar. Bu teknik diğer kromatografi tekniklerden daha sonra geliştirilmesine rağmen, uygulama sahası çok hızlı gelişmiştir.

Bu teknikte, kolon dolgu maddesi olarak kullanılan matriks, bir bağlanma bileşiğine (ligant) kovalent olarak immobilize edilir. Ayrılması istenen molekül ise liganta spesifik ve tersinir olarak bağlanır. Safılaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Afinite kromatografisinin konsantre edici etkisi de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmak mümkündür (Wilchek *et al.* 1984).

Afinite Kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.3’de gösterilmektedir.

Afinite kromatografisinin genel prensibi:



Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin genel prensibi

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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

LPO'nun potansiyel uygulama alanına sahip olması ve enzimin uygulama alanlarının geliştirilmesi amacıyla birçok araştırmacı LPO'yu düşük maliyetli saflaştırmak için inhibisyon çalışmaları ve saflaştırma araştırmaları yapmaktadır (Morrison and Hultquist 1963; Shin *et al.* 2001; Ozdemir and Uguz 2005; Boots and Floris 2006).

LPO enziminin sığır sütünden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak literatürde bilinen birçok metod vardır (Dumonted and Rousset 1983). Saflaştırmada kullanılan ilk metod iyonik şiddet esasına dayanmaktadır (Ozdemir *et al.* 2001).

Diğer kromatografik metodlar ise iyon değişim, biyo afinite, hidrofobik afinite kromatografisi, CM-Selüloz (Morrison and Hultquist 1963), CM-Sefadeks, iyon-değişim kromatografisi (Morrison and Hultquist 1963; Uguz ve Ozdemir 2005), Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi (Morrison and Hultquist 1963; Shin *et al.* 2001), Fenil-Sefaroz CL-4B üzerinde hidrofobik afinite kromatografisi (Langbakk and Flatmark 1989), Toyopearl-SP katyon değişim kromatografisi (Shimazaki *et al.* 1988) sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler arasındadır.

LPO enziminin çeşitli kaynaklardan izolasyonu araştırma gruplarının hedefi olmuş, farklı teknikler kullanılarak saflaştırılması ise birçok araştırma grubu tarafından denenmiştir (Ozdemir *et al.* 2001). LPO enzimi insan (Langbakk *et al.* 1989; Shin *et al.* 2001), sığır (Xiao *et al.* 2007), manda (Ozdemir *et al.* 2002), keçi (Jacob *et al.* 2000), koyun (Joseph *et al.* 2004) memelilerinde bulunmanın yanısıra ayrıca tükürük (Welk *et al.* 2011; Monson *et al.* 1988) ve gözyaşından (Galijasevic and Hodzic 2014) farklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri ile katalizlediği reaksiyonlar araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda LPO enziminin ortalama aktivitesi koyunda 1.4 Units/mL, kuzuda 0.34-2.38 Units/mL, keçide 1.5-4.45 Units/mL, mandada 0.794 Units/mL, domuzda 22 Units/mL ve insanda 0.06-0.97 Units/mL miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Seifu *et al.* 2005).

LPO saflaştırılması için Doumonted and Rousset (1983) tarafından önerilen yöntemde ham sığır sütünde bulunan kazein uzaklaştırılmış, Amberlit CG-50 H⁺ ile muamele edilmiş, sodyum asetat tamponuyla yıkadıktan sonra bir kolona yüklenip 500 mM'lık asetat tamponuyla elüsyon toplanmıştır. Elde edilen elüatlara amonyum sülfat ile protein çöktürmesi yapılmıştır. Böylece hem grubu ihtiva eden ve hem grubu ihtiva etmeyen ham LPO elde edilmiştir. Sefadex G-25 kolona yüklenmiş ve amonyum sülfat ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde ettikleri son ürünü 3,2 mM'lık asetat tamponunda saklamışlardır.

Geliştirilen bir diğer saflaştırma yönteminde ise zayıf katyon değiştirici reçine Amberlit CG-50 H⁺ kullanılarak, yağı alınmış süt ilk olarak saf su ile daha sonra 20 mM'lık sodyum asetat çözeltisiyle yıkandıktan sonra buchner erleni kullanılarak 500 mM'lık asetat çözeltisiyle ham LPO elde edilmiştir (Ozdemir *et al.* 2003; Uguz and Ozdemir 2005). Bu ürün %90'lık amonyumsülfat doygunluğunda çöktürülerek, 3000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu ürün CM-Sephadex kolonuna yüklenmiş ve gradientli elüsyon yapılmıştır. Elde edilen elüatlar her defasında %90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur ve ürün Sephadex G-100 kolonuna yüklenip elüsyon toplanmış ve LPO enzimini 1 M'lık fosfat tamponunda pH=6,8 saklamışlardır (Sisecioglu *et al.* 2010).

LPO enziminin inhibitörleri arasında yer alan sülfanilamid molekülleri (R-SO₂-NH₂) (Drew 2000), ilaçların önemli bir sınıfını teşkil ederler, insanlarda ve diğer türlerde çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve besin üreten hayvanların büyümesinde kullanılmaktadır (Supuran 2002). Bütün araştırmalar LPO'nun çok zaman alıcı ve çok karmaşık metodlarla saflaştırılabildiğini göstermektedir (Mecitoglu and Yemenicioglu 2007).

2013 yılında geliştirilen en son yöntemde CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye sülfanilamid ligandı kenetlenerek kolon sentezlenmiş, ardından yağı alınmış süt zayıf katyon değiştirici Amberlit CG-50 H⁺ reçinesi kullanılarak kısmi saflaştırılmıştır. CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna tatbik edilen süt

homojenatından tek kademedede LPO saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Atasever *et al.* 2013).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise ligand olarak sülfanilamid türevleri kullanılmış, koyun ve sığır sütlerinden LPO saflaştırılması ilk kez tek basamakta gerçekleştirilmiştir (Usanmaz 2014).

2.1. Çalışmanın Amacı

Laktoperoksidaz enzimi üzerine birçok saflaştırma prosedürü vardır. Daha önceki çalışmalarda sülfanilamid laktoperoksidazın inhibitörü olarak bulunmuş ve afinite jeli hazırlanarak enzimin saflaştırılması yapılmıştır. Bu tez kapsamında enzimin aktivitesi üzerine sülfanilamid türevleri olan 5-amino-2-metilbensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren sülfanilamid türevlerinden afinite jelleri hazırlandı. Hazırlanan afinite jellerinden LPO enzimi saflaştırılarak önceki çalışmalarla mukayese edilmiştir.

Bu tez kapsamında;

1. 5-amino-2-metilbensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin molekülleri kullanılarak önceden saflaştırılmış sığır LPO enzimi üzerine inhibisyon kinetikleri çalışıldı. Bu amaçla IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlendi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerden Sefaroz-4B matriksi kullanılarak afinite jelleri sentezlendi,
2. Hazırlanan afinite jellerinden laktoperoksidaz enzimi memeli sütlerinden ilk defa saflaştırıldı ve daha önce saflaştırmada kullanılan sülfanilamid afinite kolonu ile mukayese edildi,

3. Hazırlanan afinite jelleri ile memeli sütlerinden LPO enziminin saflaştırılması yapılarak kinetik parametreler; optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} değerleri tespit edildi,
4. Saflaştırmada kullanılma potansiyeli olan afinite kolonlarının bağlanma kapasiteleri üzerine sıcaklık, pH ve iyonik Şiddet gibi parametreler hesaplandı ve mevcut yapılmış sülfanilamid kolonu ile tüm parametreler mukayese edildi.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), Standart serum albumin, amonyum sülfat, sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbası, sodyum karbonat, hidrojen peroksit, formaldehit, sodyum tiyosülfat, sodyum klorür, glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, brom timol mavisi, gliserol, L-Tirozin, trihidroksimetilaminometan (Tris), etanol, metanol, 5-amino-2-metilbenzensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin, molekülleri Sigma Chemical Company'den; sodyum sülfat, sodyum dodesilsülfat (SDS), sodyum perklorat, gümüş nitrat, hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit, izoproponal E. Merk AG'den; potasyum fosfat, sodyum hidroksit, triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; glisin ICN Biomedicals. Inc.'den memeli sütleri piyasadan sağlandı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım.

Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800
pH metre	Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez cihazı	Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	Ismatec

Karıştırıcı (Shaker)	IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	Denver Instrument
Otomatik pipet	Eppendorf
Afinite kolonu	Kapalı sistem oluşturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	Nüve
Kar makinesi	Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	Sanyo Medical Freezer

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO₃ pH=10 (CNBr ile aktiveştirilmiş Sefaroz-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanılan): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO₃ 200 mL destile suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mililitreye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO₃ (pH=8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanılan): 0,84 g (1.10⁻² mol) NaHCO₃ 80 mL destile suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=8,8 kadar titre edilerek, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mililitreye tamamlandı.

3. 10 mM NaH₂PO₄ pH=6,8 (Sülfanilamid türevlerinin kenetlenmesinde Sefaroz-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanılan): 6 g ($5 \cdot 10^{-2}$ mol) NaH₂PO₄, 450 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 10 mM NaH₂PO₄ pH=6,8 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 12 g ($1 \cdot 10^{-1}$ mol) NaH₂PO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 L'ye tamamlandı.

2. 25 mM fosfat pH= 6,8 (Kolonu yıkamada kullanılan tampon): 1,42 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na₂HPO₄ 350 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 mL'ye tamamlandı.

3. 1 M NaCl/25 mM fosfat pH=6,8 (LPO enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 150 mL destile suda çözüldü. 1,42 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na₂HPO₄ çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 200 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözeltiler

1. 5 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin şişirilmesinde kullanılan çözelti): 0,4 g ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) NaCH₃COO, 950 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 L'ye tamamlandı.

2. 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Süt reçine karışımının yıkanmasında kullanılan çözelti): 0,1968 g (0,0024 mol) NaCH₃COO, 100 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 120 mL'ye tamamlandı.

3. 2 M NaCH₃COO pH=6,8 (Süt ve reçine karışımında bulunan ham enzim ekstraktının elüsyonu için kullanılan çözelti): 19,68 g (0,24 mol) NaCH₃COO, 50 mL destile suda

çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 60 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaH₂P0₄ pH=6,0 (ABTS hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 12 g (0,1 mol) NaH₂P0₄ 950 mL destile suda çözülecek. 1 M NaOH ile pH:6,0'ya kadar titre edilerek toplam hacim destile suyla 1 L'ye tamamlandı.
2. 1 mM ABTS çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,055 g (1.10⁻⁴ mol) ABTS 100 mL 0,1 M NaH₂P0₄ pH=6,0 içinde çözüldü.
3. 3,2 mM H₂O₂ çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H₂O₂'den 32 µL alınarak destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

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

Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=8,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. Numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10

mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

4. Yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.

5. Renklendirme çözeltisi: 0,66 g coomassie brilliant blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.

6. Renksizleştirme çözeltisi: %7,5 asetik asit %5 metanol ve %87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 60 mL saf su, 30 mL %96'lik etanol, 10 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.

2. Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 45 mL etanol ve 80 mL saf su karıştırılıp, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutaraldehit eklenip saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.

3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su'da çözülüp üzerine 30 µL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su'da çözülecek ve üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.

5. Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin ve 250 mL'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak 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 aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

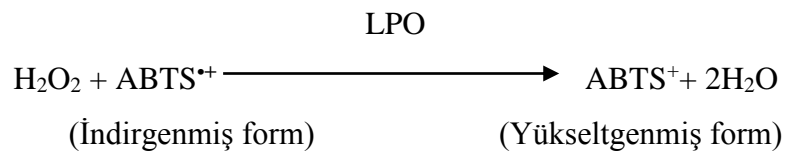
Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçüldü.

3.2.1.b. Bradford metodu ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları 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 μ g arası). 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 μ L konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirildi (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite tayini

Aktivite ölçümü, H₂O₂ tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Shindler and Bardsley 1975).



Aktivite tayininde şu prosedür takip edildi: 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2,8 mL 1 mM ABTS ve 0,1 mL 3,2 mM H₂O₂ pipetlendi. 0,1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek, küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 3 dakika süreyle her 60 saniyede bir olmak üzere kaydedildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M fosfat tamponu pH=6,0 konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanıldı. Aktivite hesabında 1 dakikalık absorbans artışı esas alınmıştır.

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

A = Absorbans

b = Işık mesafesi (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/mL)

ε = Ekstinksiyon kat sayısı (32400 M⁻¹ x cm⁻¹)

D_f = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol /mL.dk.)

Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak ABTS kullanıldığı için, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20°C'de 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlandı.

3.3. Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Basamakları

3.3.1. Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması

Bir litre taze memeli sütü (Sığır, manda, koyun, keçi) önce 2.700 rpm'de 4°C ve 15 dakika 3 kez santrifüj edilerek yağı tamamen uzaklaştırıldı. Yağı alındıktan sonra geri kalan süpernatantlar birleştirilerek bir behere aktarıldı. Zayıf asidik kation değiştirici Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin 22 gramı, 200 mL 5 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisinde şişirilerek yağı alınmış süte katıldı (Dumonte and Rousst 1983; Kumar and Bhatla 1995; Ozdemir *et al.* 2001). Reçine-süt karışımı magnetik karıştırıcı vasıtasıyla 4°C'de 1 saat karıştırıldı. Yarım saat süreyle dinlenmeye bırakılarak, üstte kalan süpernatant dekante edildi. Çökelek önce 2 L destile suyla ve daha sonra 5 mM'lık 1 L NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle yıkandı, devamında 120 mL 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı. Reçineye bağlanmış protein çökeleği Buchner hunisine aktarılarak 60 mL 2 M NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle elüsyon yapıldı ve elde edilen ham ekstraktta Bradford yöntemiyle protein tayini ve aktivite ölçümü yapıldı.

3.3.2. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi

LPO enzimi üzerine yapılan çalışmalarda enzimin inhibitörleri tespit edilmiştir (Doerge 1986; Kumar and Bhatla 1995). Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri; opipramol, lofepramine, dibenzepin, protriptilin, melitrasen, butriptyline, dimetacrine, dosulepin, quinipramine, seçici serotonin geri alım inhibitörleri arasında; alaproclate, etoperidone, seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri arasında; moclobemide, toloxatone, izokarboksiazit, diğer antidepresanlar; viloxazine, minaprine, bifemelane, oxaflozane, medifoxaminedir.

LPO enziminin inhibitörlerinden biride mikroorganizmaları öldüren ve gelişmesini baskılayan sülfanilamid molekülüdür.

Sülfanilamid türevi moleküller

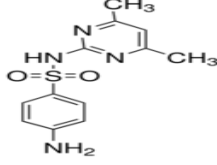
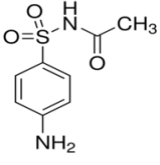
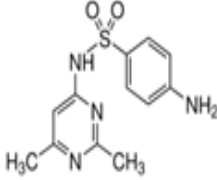
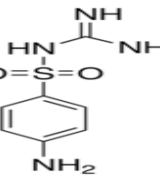
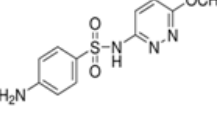
Sülfanilamidin molekül yapısı incelendiğinde diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda tespit edilmiş ve sülfanilamid ile afinite kolonu hazırlanarak LPO saflaştırılmıştı. (Atasever *et al.* 2013).

Bu çalışmadan hareketle diazonyum tuzu oluşturabilecek ve literatürde tespit ettiğimiz ve satın aldığımız saf sülfanilamid türevlerinin sığır LPO enzimi üzerine inhibisyonları araştırıldı. Çizelge 3.1'den görüldüğü gibi sığır LPO enzimi üzerine (5-amino-2-metilbenzensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin) moleküllerinin inhibisyonları incelenerek IC₅₀, K_i ve inhibisyon tipleri belirlendi. İnhibisyon gösteren sülfanilamid türevi moleküller için afinite kolonları sentez edilip daha iyi verimle memeli LPO enzimlerinin saflaştırılması sağlandı.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diazonyum tuzu oluşturabilen sülfanilamid türevleri ve açık kimyasal yapıları

Molekülün Adı	Açık kimyasal yapısı	Molekülün Adı	Açık kimyasal yapısı
2-Amino-5-metil-1,3-benzendisulfonamid		5-Amino-2-metilbenzensulfonamid	
3,5-Diklorosulfanilamid		Sulfadiazin	
Sulfisokzol		Sulfamerazin	

Çizelge 3.1 (devam)

Sulfametazin		Sulfasetamid	
Sulfisomidin		Sulfaguanidin	
Sulfametoksipiridazin			

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

3.3.3.a. Sülfanilamid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

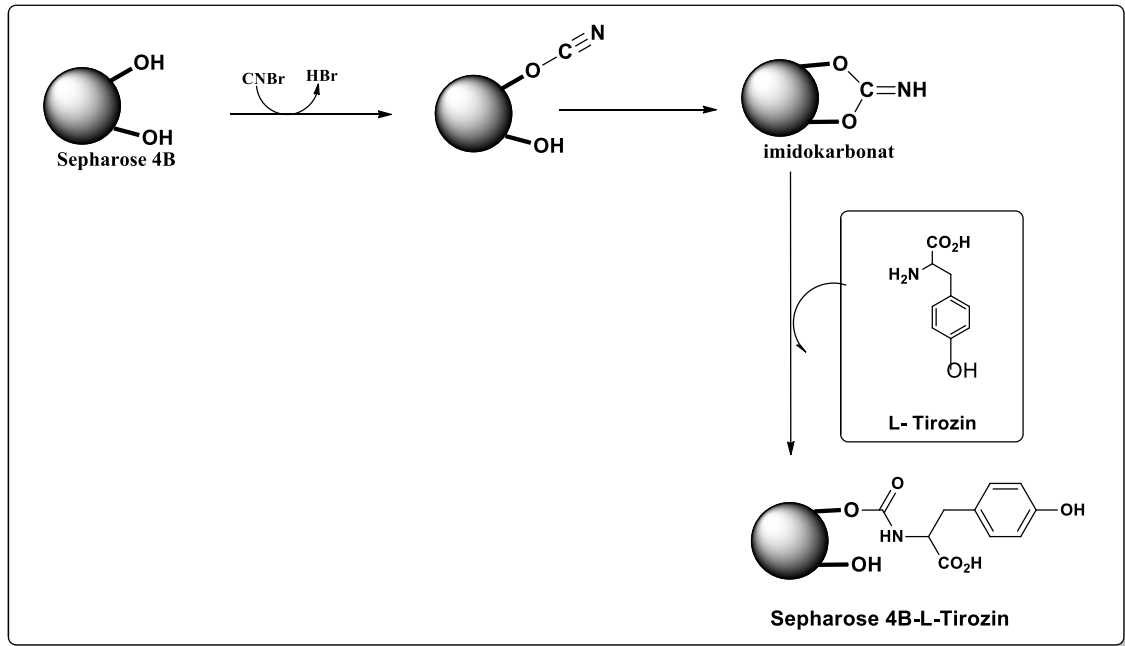
Önceden Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonundan saflaştırılmış laktoperoksidaz enzimi üzerine çalışılması planlanan, 5-amino-2-metilbensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile;

Sabit substrat konsantrasyonunda (ABTS) 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı, %Aktivite ve buradan %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu değerleri IC_{50} çalışıldı. Daha sonra 5 farklı sabit substrat konsantrasyonunda ve her bir inhibitör için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Linewaver–Burk grafikleri yardımıyla K_i değerleri tespit edildi. İnhibisyon gösteren türevler Sefaroz-4B'ye bağlanarak afinite jelleri hazırlandı.

3.3.3.b. Sülfanilamid-Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matrisi üzerinde hazırlanmıştır. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takılmıştır. Daha sonra Sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendirilmiştir. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır:

3.3.3.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması



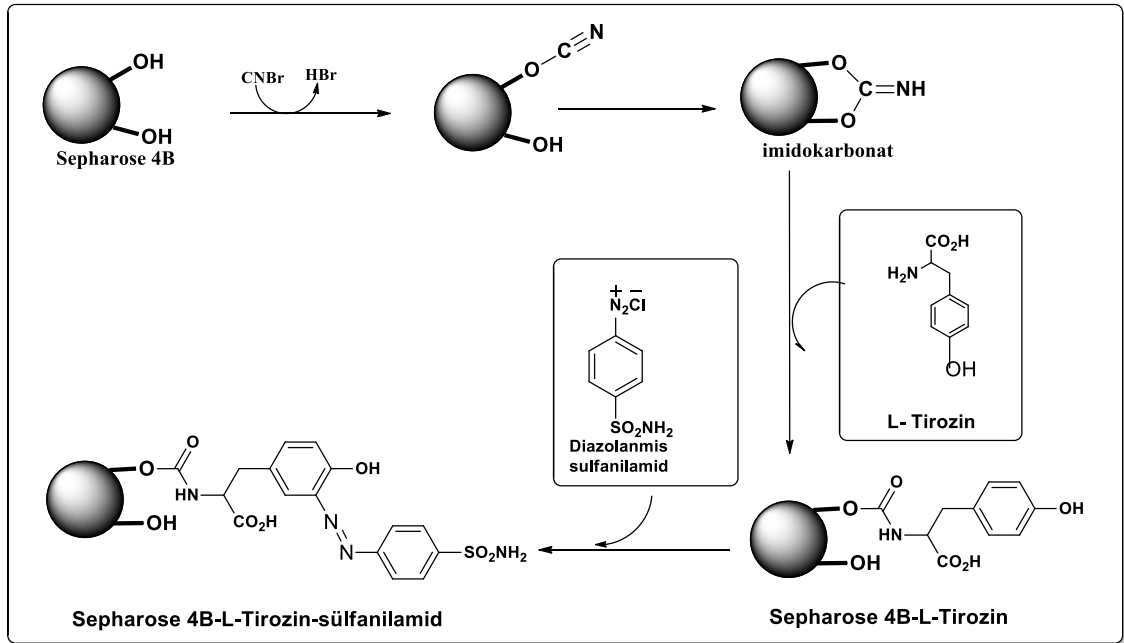
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de

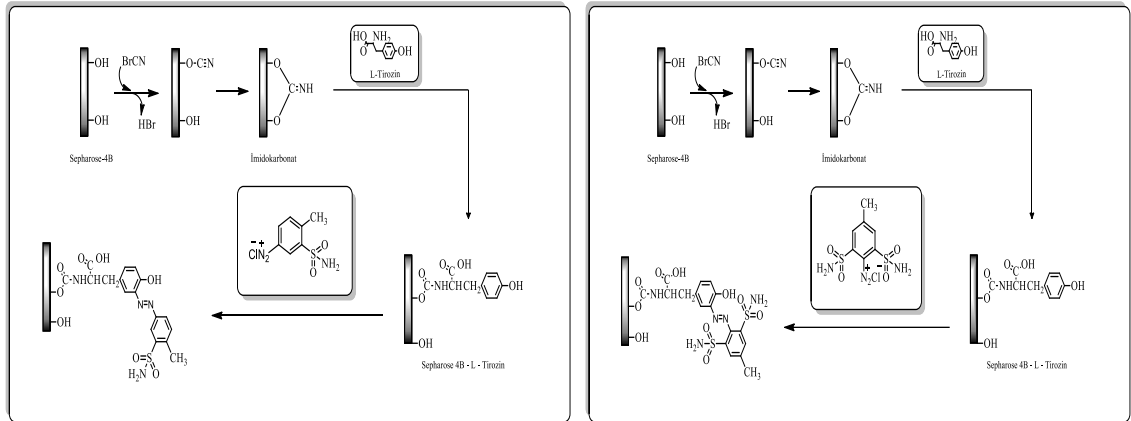
absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponu ile (pH=8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

3.3.3.d. Sülfanilamid ve türevlerinin kenetlendirilmesi

Sülfanilamitden (Sülfanilamid türevi olan moleküllerin her birinden) 25 mg alınarak, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO_2 bulunan 0°C 'deki 5 mL çözelti, her bir inhibitör çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL fosfat tamponu pH:6,8 ile yıkandı ve aynı tamponda saklandı (Whitney 1974).

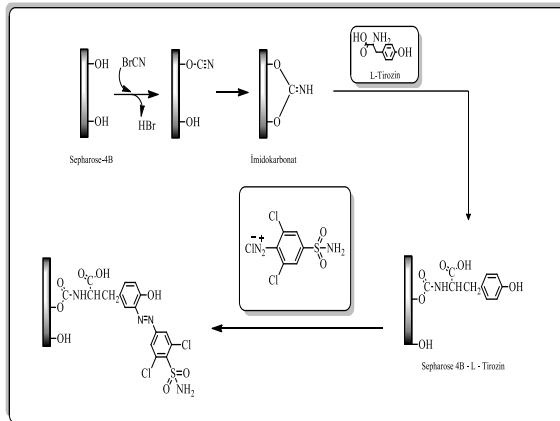


Şekil 3.2. (devam)

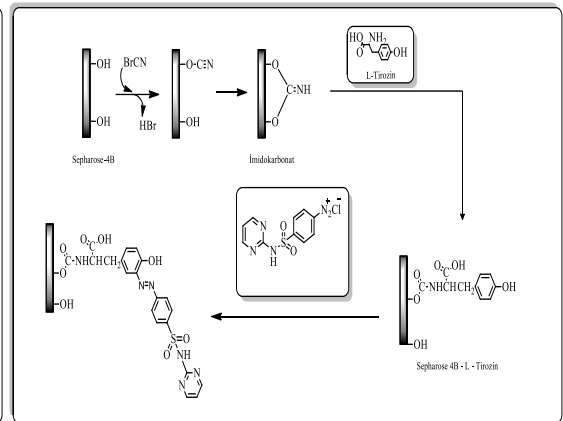


5-amino-2-metil benzensülfanamid

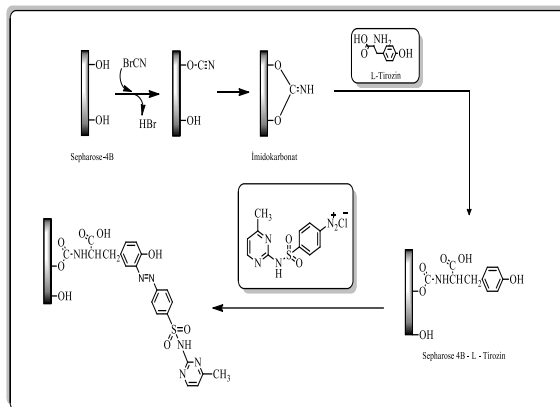
2-amino-5-metil-1,3-benzendisulfonamid



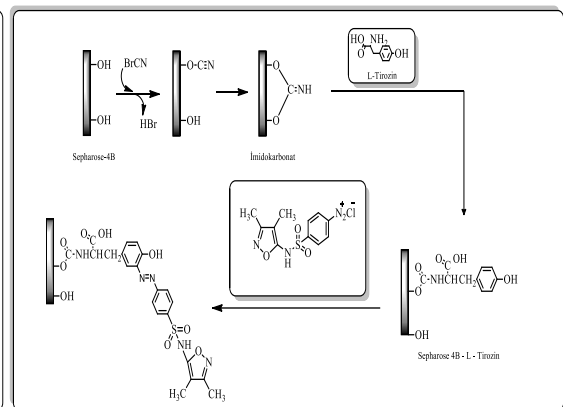
3,5-diklorosülfanilamid



Sülfadiazin

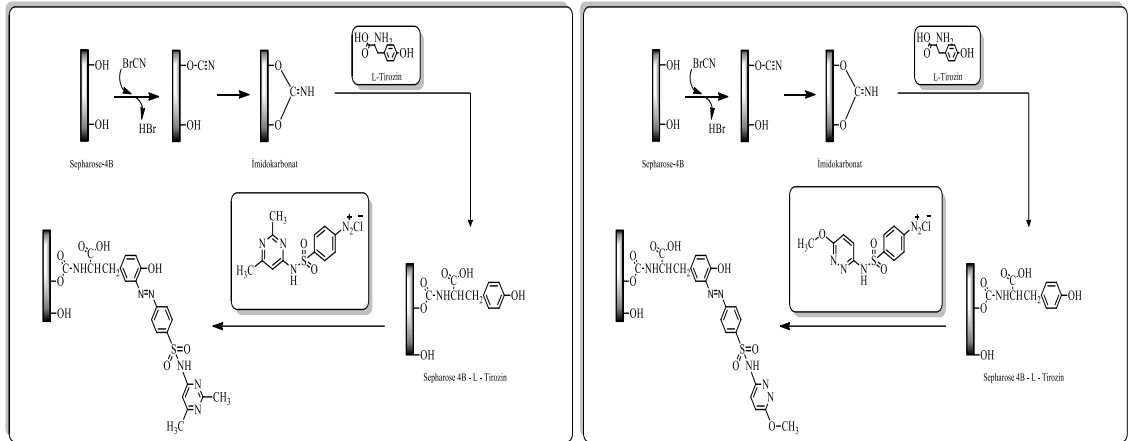


Sulfamerazin



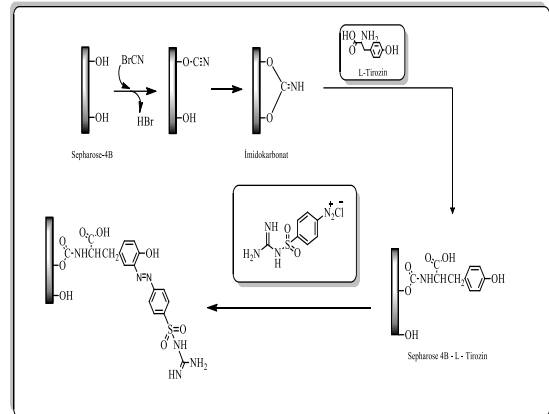
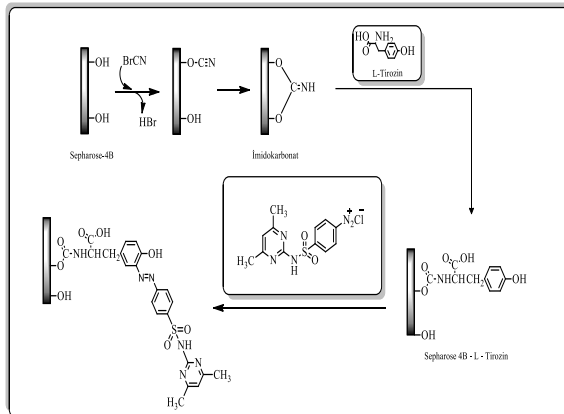
Sulfisokzol

Şekil 3.2. (devam)



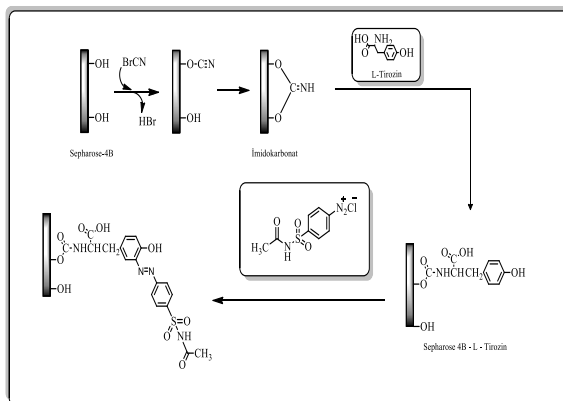
Sulfisomidin

Sulfametoksipiridazin



Sulfametazin

Sulfaguanidin



Sulfasetamid

Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid kenetlendirilmesi

3.3.3.e. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan her bir jel dengeleme tamponu (10 mM fosfat tamponu pH: 6,8) içine alınarak, süspanse edildi ve 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jeller kolona tatbik edildikten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu geçirildi. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.3.3.f. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan farklı memeli homojenatları kolonlara tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH=6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,8) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Elüatlar 5'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Toplanan elüatlardan absorban gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 412 nm'de peroksidaz aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

LPO enzimi her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kıskaçlarla tutturuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 5 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10 SDS, 0,13 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

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

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar pipetle döküldü. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak, elektroforeze pipet yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltilisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltilisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltilisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltilisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiliyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Memeli Sütlerinden Saflaştırılan LPO Enzimleri İçin Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Optimum pH çalışmaları

Optimum pH çalışmaları, enzimin substrata doyduğu noktalarda pH=5,0-8,0 aralığında fosfat tamponu çözeltilerinde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi

3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması

Optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla, sığır, koyun, manda ve keçi sütlerinden saflaştırılacak LPO enzimi için 5-85°C'de sıcaklık aralığında ve optimum pH da doygun substrat konsantrasyonlarında yapıldı. Bu işlem için -20 ile 100°C'ye ayarlanabilen su banyosu kullanıldı. İstenilen sıcaklığa getirilen aktivite ölçüm ortamına en son olarak enzim çözeltisi pipetlenip spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.3. Stabil pH çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 5,0 ile 8,0 arasında olan 10 mM NaH₂PO₄ tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.4. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,5-1,5 mL arasında alındı.

Her bir ABTS konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 mL H₂O₂ katılarak, spektrofometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Her ölçüm 3 defa tekrarlandı. 1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K_m ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enzimlerinin saflaştırma tabloları hazırlanarak kapasitesi yüksek olan jeller için kolon tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı. Jellerin 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 laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

LPO enziminin saflaştırılmasında hazırlanan kolonlardan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH:6,8'da 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

LPO enzimi için kolonlarda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında) değişen tamponlar kullanılarak en uygun pH için sonuçlar (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

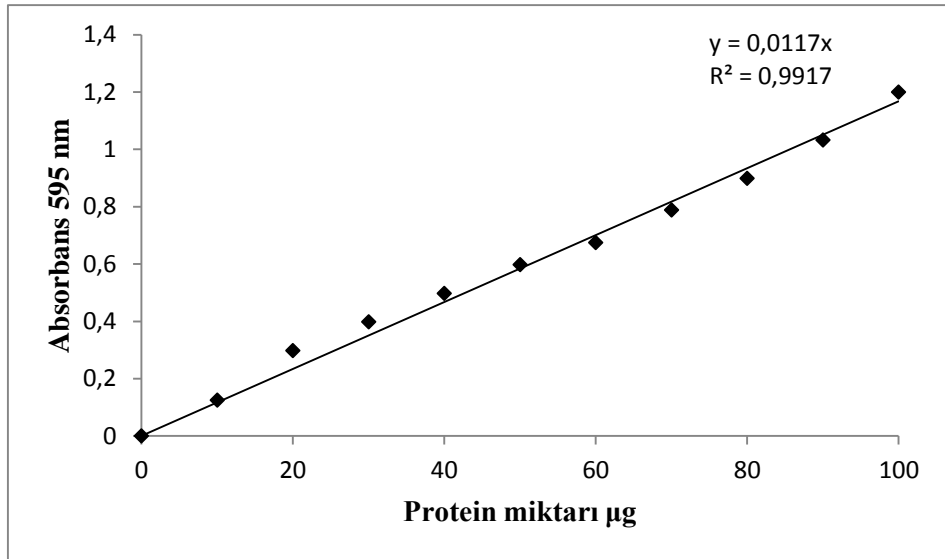
Laktoperoksidaz enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirildi, sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Afinite kolonlardan saflaştırılan LPO enziminin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla bölüm 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1’de ki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.

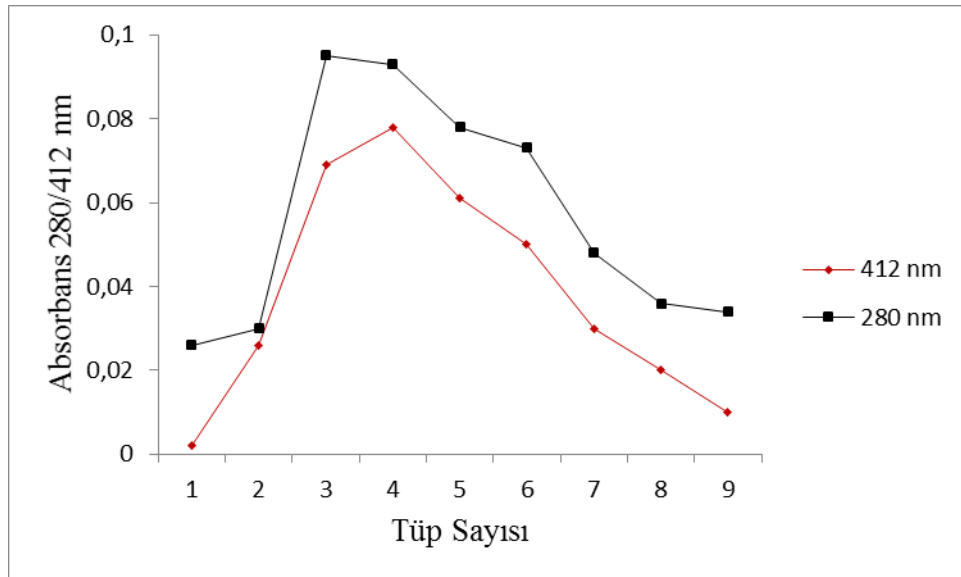


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

4.2.1. LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

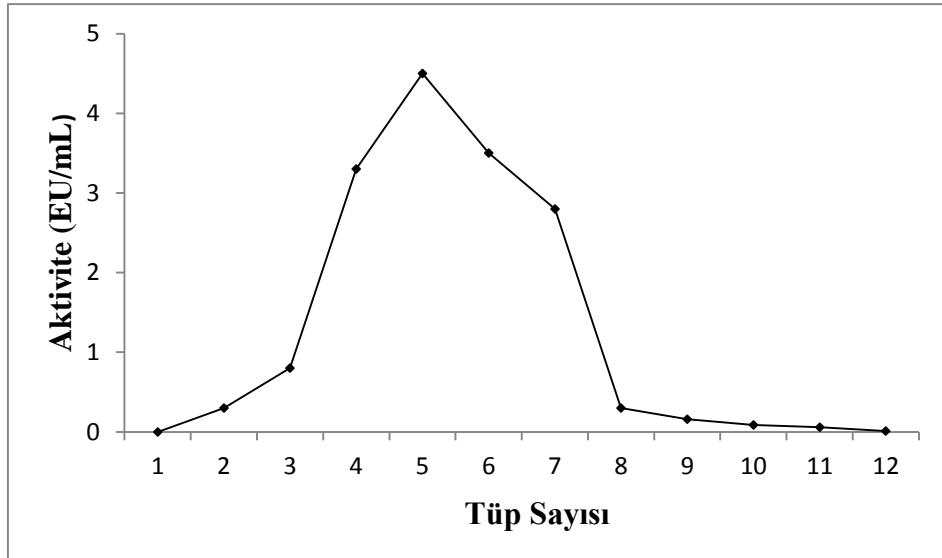
Bölüm 3.3.3.b’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.3.1.’de Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenattan 55 mL, dengelenmiş kolonlara pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 60 mL/saat’e ayarlanarak 5’er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm’deki absorbans değerleri ölçülerek R_z değeri ($R_z=A_{412}/A_{280}$) 0,60 den büyük olan tüpler birleştirildi. Sülfanilamid kolonundan alınan sonuçlar 280 ve 412 nm’de ölçülen absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2’de verildi. 412 nm de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.3’de gösterildi.



Şekil 4.2. Sülfanilamid kolonundan sığır sütü LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatlarda 280 ve 412 nm de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik

Çizelge 4.1. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU /mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Amberlit CG 50 H ⁺ reçinesi	60,00	1,10	15,00	66,00	900,00	0,07	100,00	1,00
Sepharose 4B afinite jeli ve diyaliz	10,00	4,90	0,16	49,00	1,65	30,00	74,00	428,57



Şekil 4.3. LPO Enziminin sülfanilamid afinite kolonundan elüsyonu sonucundaki aktivite-tüp sayısı

4.2.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu sülfanilamid kolonu kullanılarak sığır sütünden saflaştırılan laktoperoksidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı (Şekil 4.4). Bunun için Bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforezine saflaştırılan LPO’lar yerleştirildi.

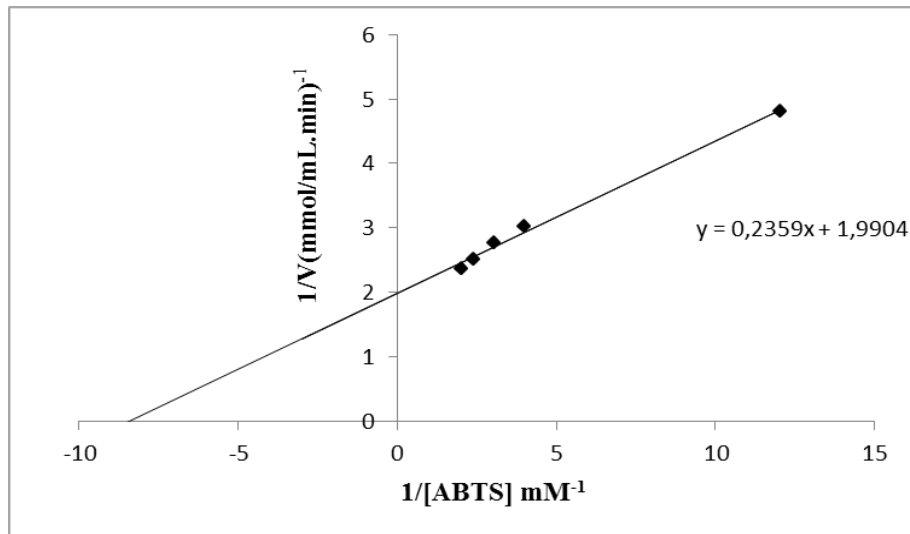


Şekil 4.4. Sığır LPO enziminin SDS-PAGE gümüş boyama fotoğrafı

1. Standartlar; a. (170 kDa), b. (130 kDa), c. (100 kDa), d. (70 kDa), e. (55 kDa), f. (40 kDa), g. (35 kDa), h. (25 kDa), i. (15 kDa) 2: Sülfanilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi (78 kDa)

4.2.3 ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

Optimum pH ve 20°C sıcaklıkta en az 5 ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V-1/[S]$ değerleri yardımıyla *Lineweaver-Burk* grafikleri çizildi. Bu grafiklerden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Çizilen grafik Şekil 4.5'de gösterildi sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi.



Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için K_m ve V_{max} değerleri

Kinetik Çalışmalar	
K_m	0,11 mM
V_{max}	0,50 EU/mL.dk

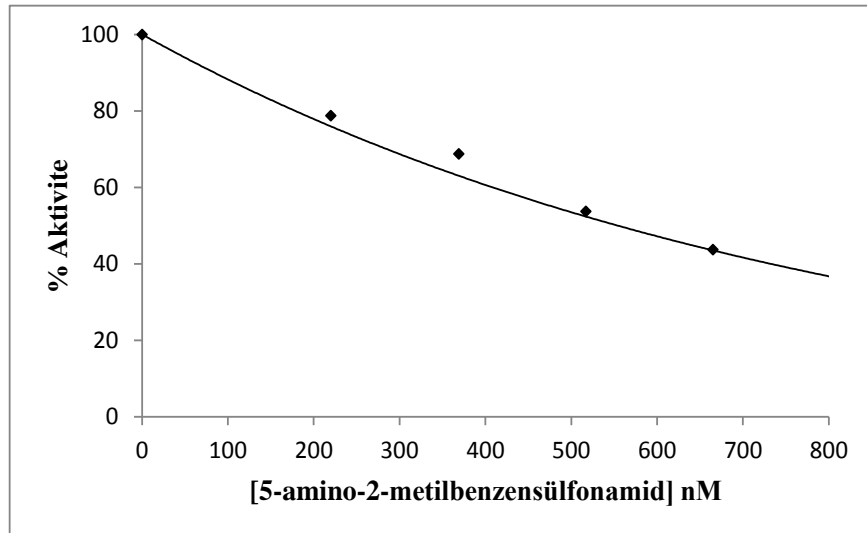
4.3. Kullanılan İnhibitörlerin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunması

Bu çalışmada kullanılan inhibitörlerin LPO enzimi üzerine ABTS substratı ile etkileri incelendi. ABTS substratı doygunluğun altında alındı ve böylece reaksiyon hızı ABTS'ye bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda ABTS (0,66 mM) 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. K_i ve IC_{50} deney prosedürleri ve saflaştırma tabloları Çizelge 4.3-4.43'de gösterildi. %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi. IC_{50} ve K_i değerleri Şekil 4.6-4.27'de gösterildi.

4.3.1. 5-amino-2-metilbenzensulfonamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.3. 5-amino-2-metil-benzensulfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

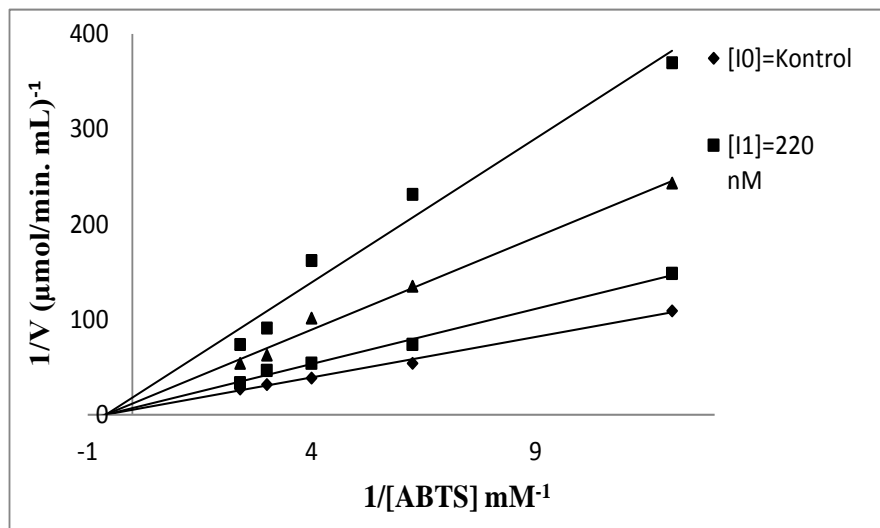
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü						
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ mL	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	Aktivite (%)	[I] nM
5-amino-2metil benzensulfonamid	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,870	0,1	0,03	2,0	0,82	0,1	0,03	0,05	78,7	220
	2,0	0,850	0,1	0,05	2,0	0,80	0,1	0,05	0,05	68,7	369
	2,0	0,830	0,1	0,07	2,0	0,78	0,1	0,07	0,05	53,7	517
	2,0	0,810	0,1	0,09	2,0	0,76	0,1	0,09	0,05	43,7	665
	2,0	0,790	0,1	0,11	2,0	0,74	0,1	0,11	0,05	33,7	813



Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 5-amino-2-metilbenzensulfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 5-amino-2-metilbenzen-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
[I] ₁	0,250	2,620	0,1	0,03	0,250	2,570	0,1	0,03	0,05	148,5	12,48
	0,500	2,370	0,1	0,03	0,500	2,320	0,1	0,03	0,05	73,63	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,03	0,750	2,070	0,1	0,03	0,05	54,054	4
	1,0	1,870	0,1	0,03	1,0	1,820	0,1	0,03	0,05	46,296	3,003
	1,25	1,620	0,1	0,03	1,25	1,570	0,1	0,03	0,05	33,33	2,4
[I] ₂	0,250	2,580	0,1	0,07	0,250	2,530	0,1	0,07	0,05	243,3	12,48
	0,500	2,330	0,1	0,07	0,500	2,280	0,1	0,07	0,05	135,135	6,25
	0,750	2,080	0,1	0,07	0,750	2,030	0,1	0,07	0,05	101,317	4
	1,0	1,830	0,1	0,07	1,0	1,780	0,1	0,07	0,05	62,5	3,003
	1,25	1,580	0,1	0,07	1,25	1,550	0,1	0,07	0,05	54,054	2,4
[I] ₃	0,250	2,560	0,1	0,09	0,250	2,510	0,1	0,09	0,05	370	12,48
	0,500	2,310	0,1	0,09	0,500	2,260	0,1	0,09	0,05	231,481	6,25
	0,750	2,060	0,1	0,09	0,750	2,010	0,1	0,09	0,05	162,07	4
	1,0	1,810	0,1	0,09	1,0	1,760	0,1	0,09	0,05	90,9	3,003
	1,25	1,560	0,1	0,09	1,25	1,510	0,1	0,09	0,05	73,63	2,4



Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-2-metilbenzen-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.5. Laktoperoksidaz enzimi üzerine 5-amino-2-metilbenzensülfonamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 5-amino-2-metilbenzensülfonamid	Sığır LPO	IC ₅₀	Ortalama K _i	İnhibisyon tipi
		0,693	0,412	Yarışmasız

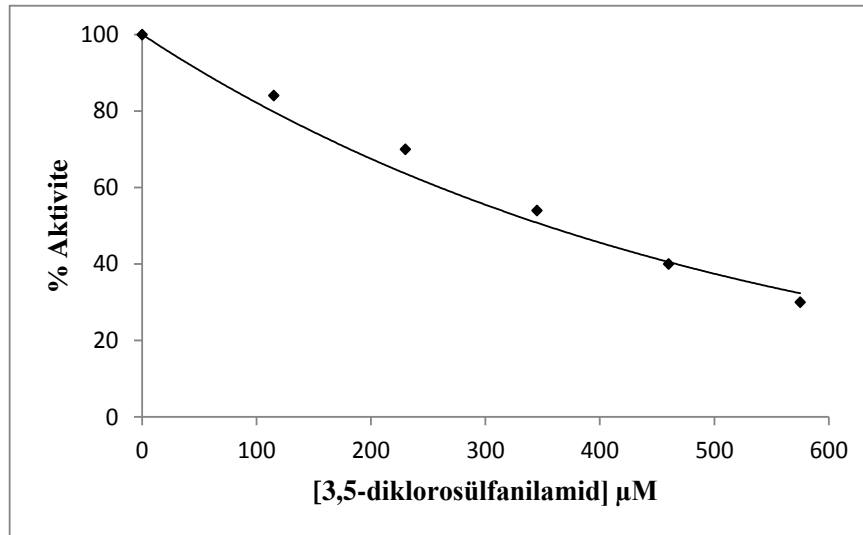
Çizelge 4.6. 5-amino-2-metilbenzensülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

5-amino-2-metilbenzensülfonamid ile saflaştırma sonuçları		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saf. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	10,00	1,23	15,00	12,30	150,00	0,08	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	3,00	3,39	0,04	10,17	0,12	84,75	82,68	1059,37
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	10,00	4,36	13,00	43,60	130,00	0,33	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	3,00	5,04	0,03	15,12	0,09	168,00	34,67	509,09
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	55,00	0,38	14,00	20,90	770,00	0,03	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,30	0,04	3,00	0,43	6,97	14,35	232,558
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	10,00	0,92	13,00	9,25	130,00	0,07	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	3,00	0,34	0,03	1,02	0,09	11,3	11,00	161,90

4.3.2. 3,5-diklorosülfanilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.7. 3,5-diklorosülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

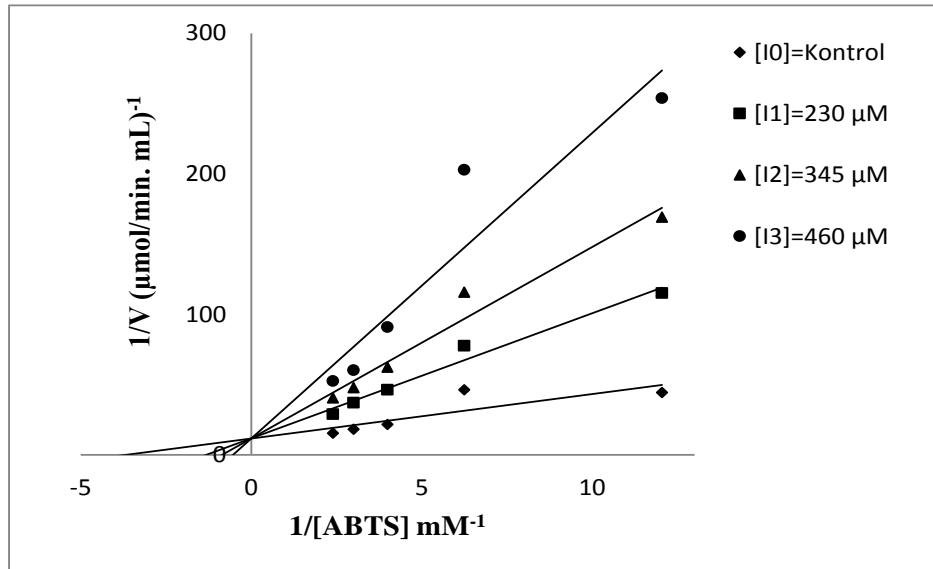
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] μ M
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp. (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST (mL)	Fosfat Tamp. (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
3,5-Diklorosülfanilamid	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,82	0,1	0,025	0,05	84	115
	2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,80	0,1	0,050	0,05	70	230
	2,0	0,825	0,1	0,075	2,0	0,77	0,1	0,075	0,05	54	345
	2,0	0,800	0,1	0,10	2,0	0,75	0,1	0,10	0,05	40	460
	2,0	0,775	0,1	0,125	2,0	0,72	0,1	0,125	0,05	30	575



Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3,5-diklorosülfanilamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 3,5-diklorosülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü				Numune Tüpü					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,250	2,600	0,1	0,05	0,250	2,550	0,1	0,05	0,05	115,1	12,48
	0,500	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	77,529	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	46,296	4
	1,0	1,850	0,1	0,05	1,0	1,800	0,1	0,05	0,05	37,03	3,003
	1,25	1,600	0,1	0,05	1,25	1,550	0,1	0,05	0,05	28,98	2,4
[I] ₂	0,250	2,575	0,1	0,075	0,250	2,525	0,1	0,075	0,05	169,2	12,48
	0,500	2,325	0,1	0,075	0,500	2,275	0,1	0,075	0,05	115,74	6,25
	0,750	2,075	0,1	0,075	0,750	2,025	0,1	0,075	0,05	62,5	4
	1,0	1,825	0,1	0,075	1,0	1,775	0,1	0,075	0,05	47,84	3,003
	1,25	1,575	0,1	0,075	1,25	1,520	0,1	0,075	0,05	40,5	2,4
[I] ₃	0,250	2,550	0,1	0,1	0,250	2,500	0,1	0,1	0,05	253,8	12,48
	0,500	2,300	0,1	0,1	0,500	2,250	0,1	0,1	0,05	202,839	6,25
	0,750	2,050	0,1	0,1	0,750	2,000	0,1	0,1	0,05	90,9	4
	1,0	1,800	0,1	0,1	1,0	1,750	0,1	0,1	0,05	60,24	3,003
	1,25	1,550	0,1	0,1	1,25	1,500	0,1	0,1	0,05	52,63	2,4

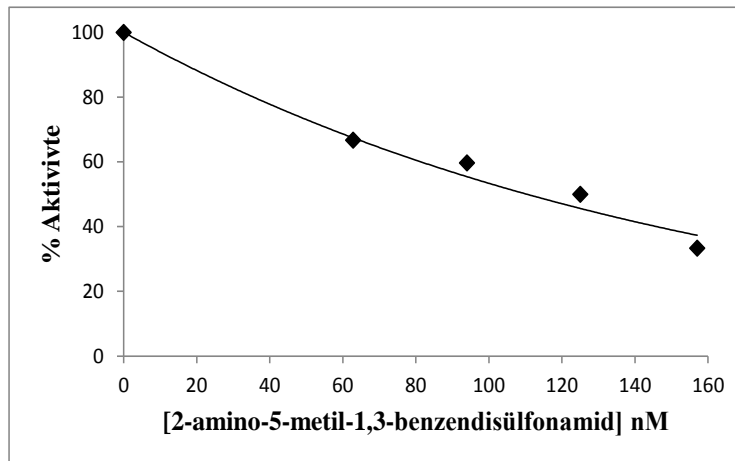


Şekil 4.9. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3,5-diklorosülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

4.3.3. 2-amino,5-metil-1,3-benzendisülfonamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.11. 2-amino,5-metil-1,3-benzendisülfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

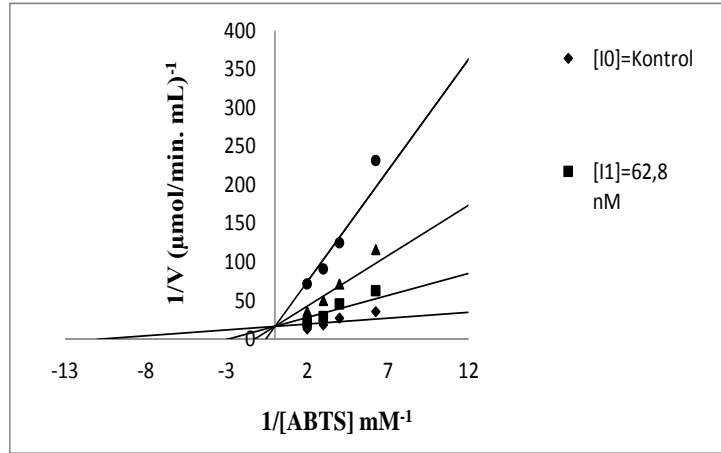
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABST (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO(mL)		
2-amino,5-metil-1,3-benzendisülfonamid	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,85	0,1	0,05	2,0	0,80	0,1	0,05	0,05	66,6	62,8
	2,0	0,825	0,1	0,075	2,0	0,775	0,1	0,075	0,05	59,64	94
	2,0	0,80	0,1	0,1	2,0	0,750	0,1	0,1	0,05	50	125
	2,0	0,775	0,1	0,125	2,0	0,725	0,1	0,125	0,05	33,33	157
	2,0	0,75	0,1	0,150	2,0	0,700	0,1	0,150	0,05	24,56	188



Şekil 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 2-amino-5-metil-1,3- benzendisülfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

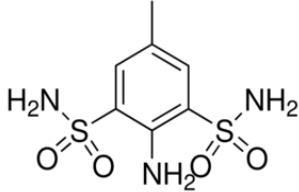
Çizelge 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-amino-5-metil-1,3 benzendisülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)	$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$)	$1/S$ mM ⁻¹
[I] ₁	0,250	2,600	0,1	0,050	0,250	2,550	0,1	0,050	0,05	80,399	12,48
	0,500	2,350	0,1	0,050	0,500	2,300	0,1	0,050	0,05	62,50	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,050	0,750	2,050	0,1	0,050	0,05	45,45	4,00
	1,000	1,850	0,1	0,050	1,000	1,800	0,1	0,050	0,05	28,98	3,00
	1,250	1,600	0,1	0,050	1,250	1,550	0,1	0,050	0,05	21,32	2,00
[I] ₂	0,250	2,550	0,1	0,100	0,250	2,500	0,1	0,100	0,05	167,00	12,48
	0,500	2,300	0,1	0,100	0,500	2,250	0,1	0,100	0,05	115,74	6,25
	0,750	2,050	0,1	0,100	0,750	2,000	0,1	0,100	0,05	71,42	4,00
	1,000	1,800	0,1	0,100	1,000	1,750	0,1	0,100	0,05	50,00	3,00
	1,250	1,550	0,1	0,100	1,250	1,500	0,1	0,100	0,05	35,71	2,00
[I] ₃	0,250	2,500	0,1	0,150	0,250	2,450	0,1	0,150	0,05	352,65	12,48
	0,500	2,250	0,1	0,150	0,500	2,200	0,1	0,150	0,05	231,48	6,25
	0,750	2,000	0,1	0,150	0,750	1,950	0,1	0,150	0,05	124,68	4,00
	1,000	1,750	0,1	0,150	1,000	1,700	0,1	0,150	0,05	90,90	3,00
	1,250	1,500	0,1	0,150	1,250	1,450	0,1	0,150	0,05	71,28	2,00



Şekil 4.11. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.13. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 <p>2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid</p>	Sığır LPO	IC₅₀ (µM)	Ortalama K_i (µM)	İnhibisyon tipi
		115,00	16,37	Yarışmalı

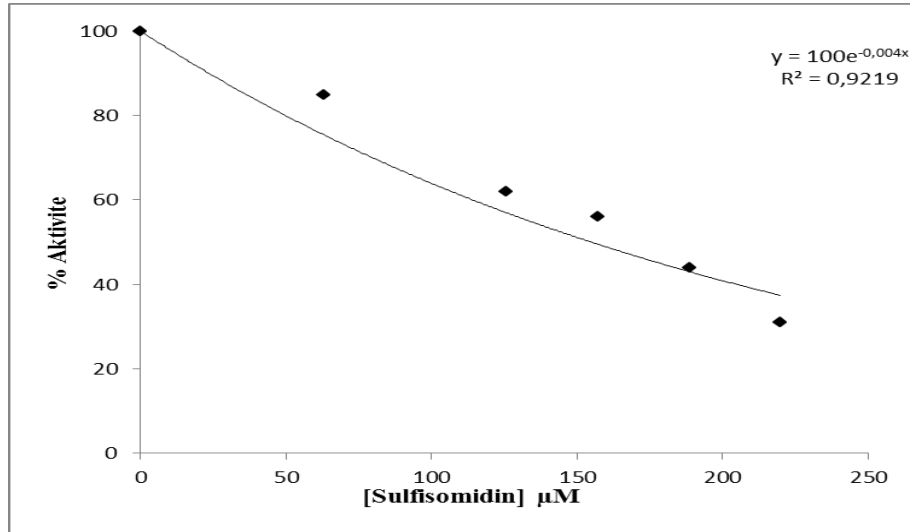
Saflaştırma sonuçları:

Sentezlenen kolon ile memeli sütlerinden LPO enziminin saflaştırılması gerçekleştirilemedi.

4.3.4. Sulfisomidin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.14. Sulfisomidin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

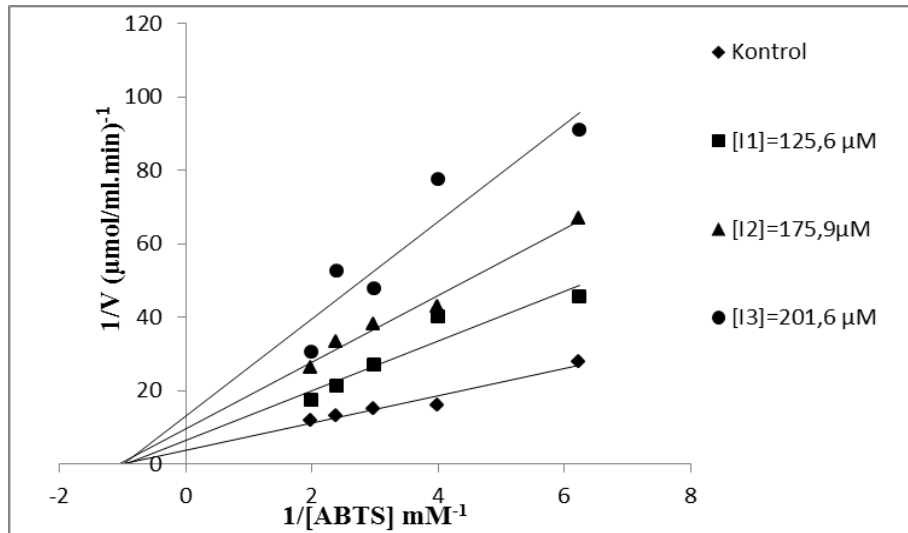
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] μ M
Inhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfisomidin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,870	0,1	0,03	2,0	0,820	0,1	0,03	0,05	91,00	62,83
	2,0	0,850	0,1	0,05	2,0	0,800	0,1	0,05	0,10	62,00	125,6
	2,0	0,830	0,1	0,07	2,0	0,780	0,1	0,07	0,15	56,00	188,5
	2,0	0,810	0,1	0,09	2,0	0,760	0,1	0,09	1,25	44,00	157,0
	2,0	0,79	0,1	0,11	2,0	0,740	0,1	0,11	1,75	24,00	219,9



Şekil 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfisomidin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

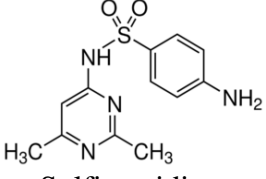
Çizelge 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfisomidin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,500	2,300	0,1	0,1	0,500	2,250	0,1	0,1	0,05	45,45	6,25
	0,750	2,050	0,1	0,1	0,750	2,000	0,1	0,1	0,05	40	4
	1,0	1,800	0,1	0,1	1,0	1,750	0,1	0,1	0,05	27,03	3,003
	1,25	1,550	0,1	0,1	1,25	1,500	0,1	0,1	0,05	21,27	2,4
	1,5	1,300	0,1	0,1	1,5	1,250	0,1	0,1	0,05	17,24	2
[I] ₂	0,500	2,260	0,1	0,14	0,500	2,210	0,1	0,14	0,05	67	6,25
	0,750	2,210	0,1	0,14	0,750	1,960	0,1	0,14	0,05	43	4
	1,0	1,760	0,1	0,14	1,0	1,710	0,1	0,14	0,05	38	3,003
	1,25	1,510	0,1	0,14	1,25	1,460	0,1	0,14	0,05	33,33	2,4
	1,5	1,240	0,1	0,14	1,5	1,210	0,1	0,14	0,05	26	2
[I] ₃	0,500	2,220	0,1	0,16	0,500	2,190	0,1	0,16	0,05	90	6,25
	0,750	1,190	0,1	0,16	0,750	1,940	0,1	0,16	0,05	77,5	4
	1,0	1,740	0,1	0,16	1,0	1,690	0,1	0,16	0,05	47	3,003
	1,25	1,490	0,1	0,16	1,25	1,440	0,1	0,16	0,05	52	2,4
	1,5	1,220	0,1	0,16	1,5	1,190	0,1	0,16	0,05	30	2



Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfisomidin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.16. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfisomidin inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfisomidin	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		173,00	122,00	Yarışmasız

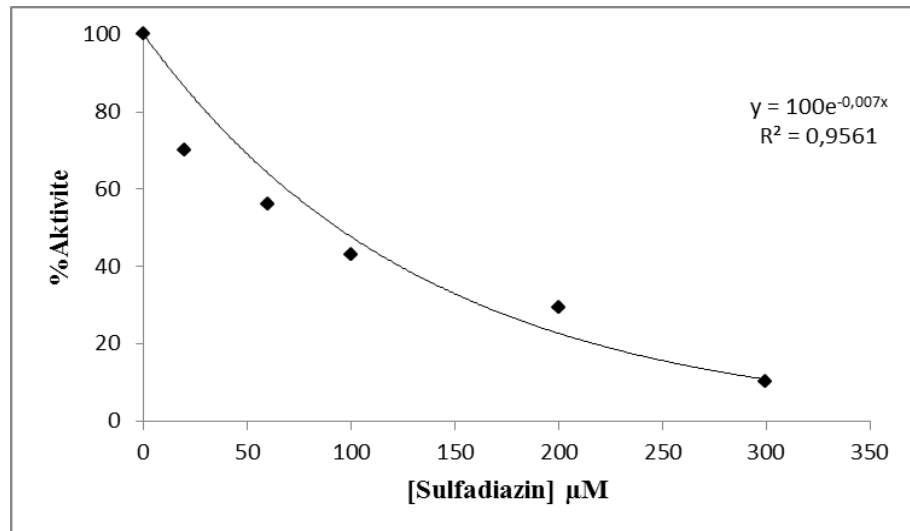
Çizelge 4.17. Sulfisomidin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfisomidin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	8,25	15,00	495,00	900,00	0,55	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,04	0,03	0,40	0,30	1,42	1,42	2,60
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	2,96	12,00	177,60	720,00	0,25	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,03	0,01	0,27	0,14	1,92	0,15	7,68
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,78	14,00	107,00	840,00	0,13	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,02	0,06	0,20	0,61	0,31	0,17	2,44
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,80	13,00	47,40	780,00	0,06	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	-	-	-	-	-		

4.3.5. Sulfadiazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.18. Sulfadiazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

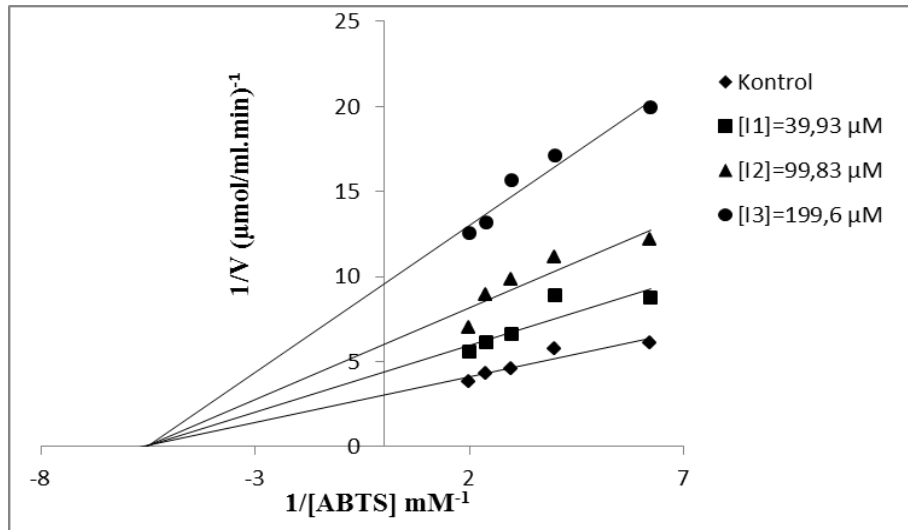
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfadiazin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,870	0,1	0,03	2,0	0,820	0,1	0,03	0,05	70	19,96
	2,0	0,850	0,1	0,05	2,0	0,800	0,1	0,05	0,05	55	59,9
	2,0	0,830	0,1	0,07	2,0	0,780	0,1	0,07	0,05	42	99,83
	2,0	0,810	0,1	0,09	2,0	0,760	0,1	0,09	0,05	29	199,9
	2,0	0,790	0,1	0,110	2,0	0,740	0,1	0,11	0,05	10	299,5



Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfadiazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

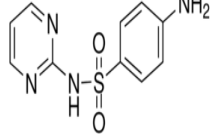
Çizelge 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,500	2,390	0,1	0,01	0,500	2,340	0,1	0,01	0,05	9,94	6,25
	0,750	2,140	0,1	0,01	0,750	2,090	0,1	0,01	0,05	8,849	4
	1,0	1,890	0,1	0,01	1,0	1,840	0,1	0,01	0,05	6,578	3,003
	1,25	1,640	0,1	0,01	1,25	1,590	0,1	0,01	0,05	6,097	2,4
	1,5	1,390	0,1	0,01	1,5	1,340	0,1	0,01	0,05	5,52	2
[I] ₂	0,500	2,375	0,1	0,025	0,500	2,325	0,1	0,025	0,05	12,048	6,25
	0,750	2,125	0,1	0,025	0,750	2,100	0,1	0,025	0,05	11,11	4
	1,0	1,875	0,1	0,025	1,0	1,825	0,1	0,025	0,05	9,8	3,003
	1,25	1,625	0,1	0,025	1,25	1,600	0,1	0,025	0,05	8,92	2,4
	1,5	1,375	0,1	0,025	1,5	1,325	0,1	0,025	0,05	6,99	2
[I] ₃	0,500	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	20,4	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	17	4
	1,0	1,850	0,1	0,05	1,0	1,800	0,1	0,05	0,05	15,625	3,003
	1,25	1,600	0,1	0,05	1,25	1,550	0,1	0,05	0,05	13,157	2,4
	1,5	1,350	0,1	0,05	1,5	1,300	0,1	0,05	0,05	12,5	2



Şekil 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.20. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfadiazin inhibitörünün inhibisyon etkisi ve saflaştırma tablosu

 <p>Sulfadiazin</p>	Sığır LPO	IC₅₀ (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon tipi
		92,24	90,66	Yarışmasız

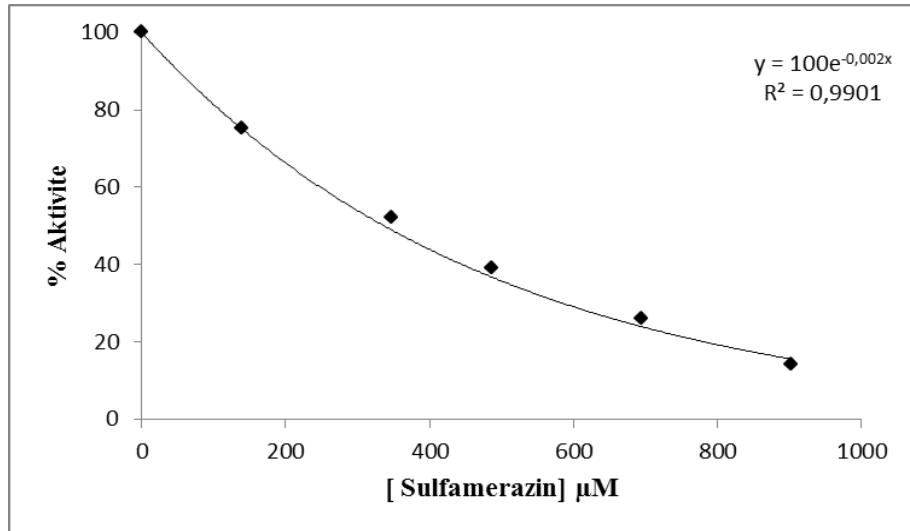
Çizelge 4.21. Sulfadiazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfadiazin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	-	-	-	-	-	-	-
	Sepharose 4B Afinite	10,00	-	-	-	-	-	-	-
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	-	-	-	-	-	-	-
	Sepharose 4B Afinite	10,00	-	-	-	-	-	-	-
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	-	-	-	-	-	-	-
	Sepharose 4B Afinite	10,00	-	-	-	-	-	-	-
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,430	13,00	25,80	780,00	0,03	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,050	0,07	0,50	0,74	0,67	2,00	20,47

4.3.6. Sulfamerazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.22. Sulfamerazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

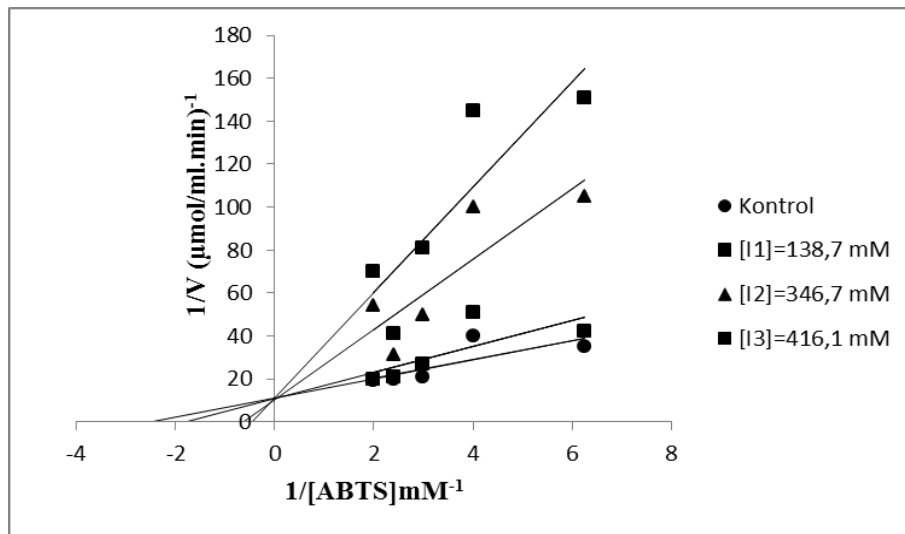
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfamerazin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,890	0,1	0,01	2,0	0,840	0,1	0,01	0,05	75	138,7
	2,0	0,875	0,1	0,25	2,0	0,825	0,1	0,25	0,05	52	346,7
	2,0	0,865	0,1	0,35	2,0	0,840	0,1	0,35	0,05	39	485,45
	2,0	0,850	0,1	0,50	2,0	0,800	0,1	0,50	0,05	26	693,5
	2,0	0,835	0,1	0,65	2,0	0,785	0,1	0,65	0,05	14	901



Şekil 4.16. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfamerazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

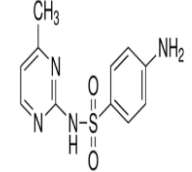
Çizelge 4.23. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfamerazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
[I] ₁	0,500	2,390	0,1	0,01	0,500	2,340	0,1	0,01	0,05	52	6,25
	0,750	2,140	0,1	0,01	0,750	2,090	0,1	0,01	0,05	51	4
	1,0	1,890	0,1	0,01	1,0	1,840	0,1	0,01	0,05	27	3,003
	1,25	1,640	0,1	0,01	1,25	1,590	0,1	0,01	0,05	21	2,4
	1,5	1,390	0,1	0,01	1,5	1,340	0,1	0,01	0,05	20	2
[I] ₂	0,500	2,375	0,1	0,025	0,500	2,325	0,1	0,025	0,05	105	6,25
	0,750	2,125	0,1	0,025	0,750	2,100	0,1	0,025	0,05	100	4
	1,0	1,875	0,1	0,025	1,0	1,825	0,1	0,025	0,05	50	3,003
	1,25	1,625	0,1	0,025	1,25	1,600	0,1	0,025	0,05	31	2,4
	1,5	1,375	0,1	0,025	1,5	1,325	0,1	0,025	0,05	24	2
[I] ₃	0,500	2,370	0,1	0,030	0,500	2,320	0,1	0,030	0,05	152	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,030	0,750	2,095	0,1	0,030	0,05	145	4
	1,0	1,870	0,1	0,030	1,0	1,820	0,1	0,030	0,05	81	3,003
	1,25	1,620	0,1	0,030	1,25	1,595	0,1	0,030	0,05	41	2,4
	1,500	1,370	0,1	0,030	1,500	1,320	0,1	0,030	0,05	70	2



Şekil 4.17. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfamerazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.24. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfamerazın inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfamerazin	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		309,00	78,00	Yarışmalı

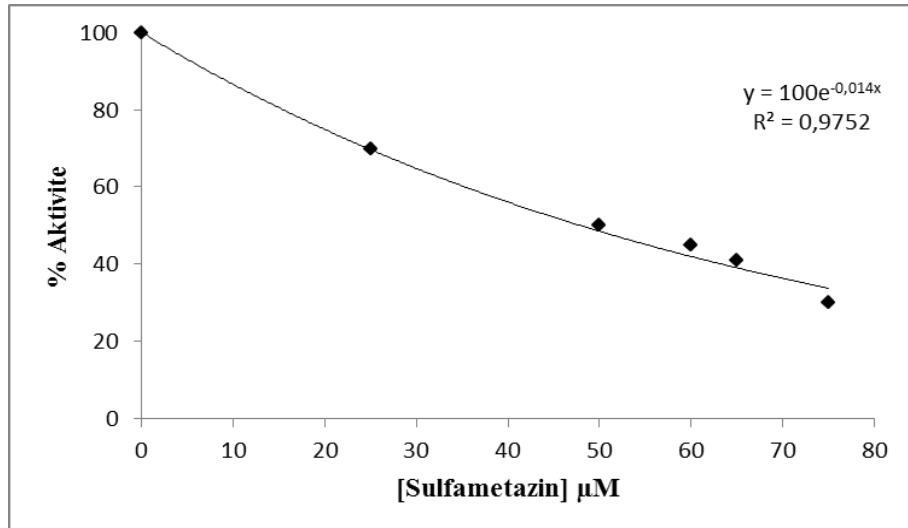
Çizelge 4.25. Sulfamerazın ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfamerazın		Toplam Hacim (mL)	Aktivite EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	8,69	15,00	521,48	900,00	0,58	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,32	0,05	3,20	0,53	6,07	0,61	10,46
Manda	Amberlit CG-50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	46,29	12,00	2760,00	720,00	3,83	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	5,22	0,04	52,00	0,37	140,54	1,88	36,69
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	5,06	14,00	303,70	840,00	0,36	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	2,34	0,10	23,40	1,00	23,40	7,00	65,00
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,46	13,00	28,00	780,00	0,03	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,08	0,06	0,80	0,62	1,29	2,85	36,85

4.3.7. Sulfametazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.26. Sulfametazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

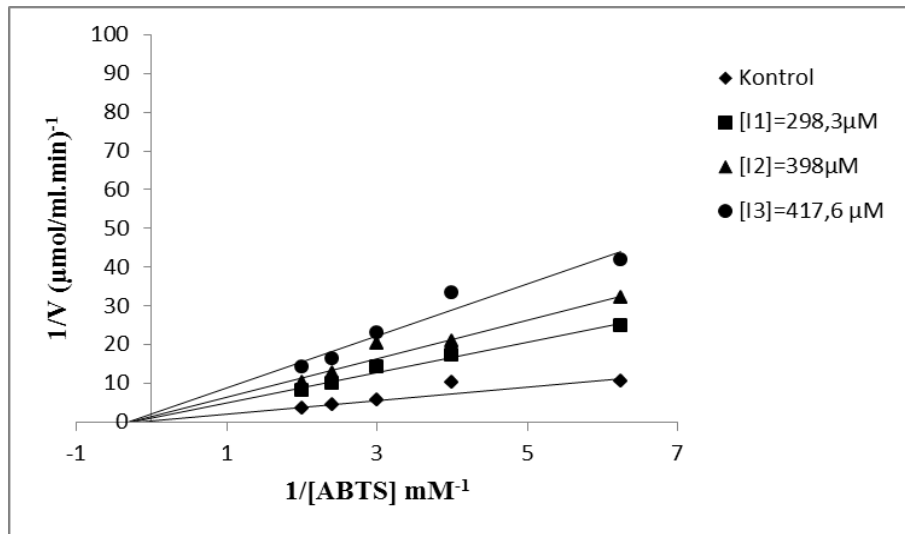
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfoamethazin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,750	0,1	0,025	0,05	65	238,66
	2,0	0,825	0,1	0,05	2,0	0,700	0,1	0,05	0,05	55	298,3
	2,0	0,815	0,1	0,06	2,0	0,690	0,1	0,06	0,05	46,42	387,8
	2,0	0,810	0,1	0,065	2,0	0,685	0,1	0,065	0,05	37,85	447,5
	2,0	0,800	0,1	0,075	2,0	0,675	0,1	0,075	0,05	30	596,6



Şekil 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfametazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

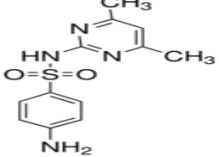
Çizelge 4.27. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfametazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,500	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	25	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	17,241	4
	1,0	1,850	0,1	0,05	1,0	1,800	0,1	0,05	0,05	14,285	3,003
	1,25	1,600	0,1	0,05	1,25	1,550	0,1	0,05	0,05	10	2,4
	1,5	1,350	0,1	0,05	1,5	1,300	0,1	0,05	0,05	8,13	2
[I] ₂	0,500	2,340	0,1	0,06	0,500	2,290	0,1	0,07	0,05	32	6,25
	0,750	2,090	0,1	0,14	0,750	2,040	0,1	0,07	0,05	20,83	4
	1,0	1,840	0,1	0,14	1,0	1,790	0,1	0,07	0,05	20	3,003
	1,25	1,590	0,1	0,14	1,25	1,540	0,1	0,07	0,05	12,5	2,4
	1,5	1,340	0,1	0,14	1,5	1,290	0,1	0,07	0,05	10	2
[I] ₃	0,500	2,330	0,1	0,07	0,500	2,280	0,1	0,09	0,05	42	6,25
	0,750	2,080	0,1	0,16	0,750	2,030	0,1	0,09	0,05	33,33	4
	1,0	1,830	0,1	0,16	1,0	1,780	0,1	0,09	0,05	23,25	3,003
	1,25	1,580	0,1	0,16	1,25	1,530	0,1	0,09	0,05	16,6	2,4
	1,500	1,330	0,1	0,16	1,500	1,280	0,1	0,09	0,05	14,28	2



Şekil 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfametazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.28. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfametazin inhibitörünün inhibisyon etkisi

 <p>Sulfametazin</p>	Sığır LPO	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i (μ M)	İnhibisyon tipi
		346,05	198,00	Yarışmasız

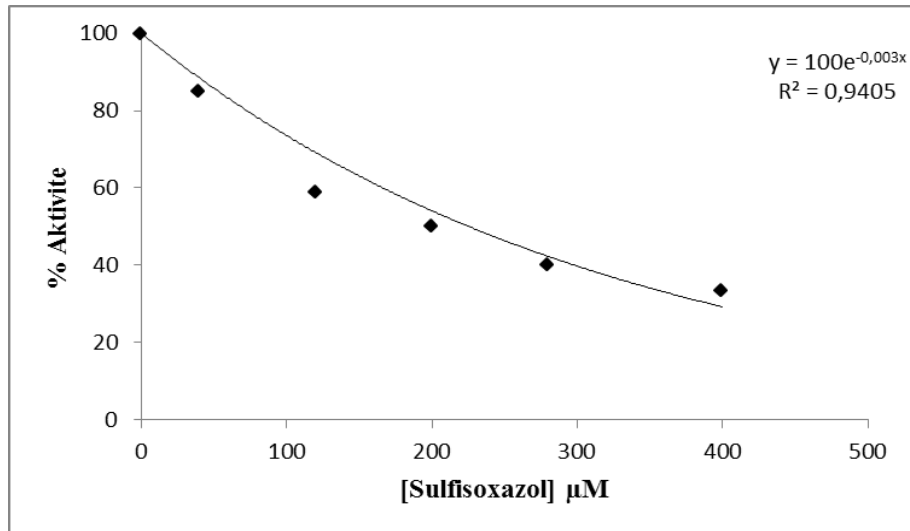
Çizelge 4.29. Sulfametazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfametazin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	2,84	15,00	170,40	900,00	0,18	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,22	0,01	2,16	0,14	14,82	1,26	78,43
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	5,68	12,00	340,80	720,00	0,47	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,79	0,31	7,90	3,14	2,51	2,31	5,03
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,93	14,00	115,90	840,00	0,13	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,13	0,07	1,30	4,62	0,28	1,21	2,03
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,36	13,00	21,48	780,00	0,03	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,01	0,06	0,15	0,61	0,24	0,70	8,19

4.3.8. Sulfisokzol için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.30. Sulfisokzol inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

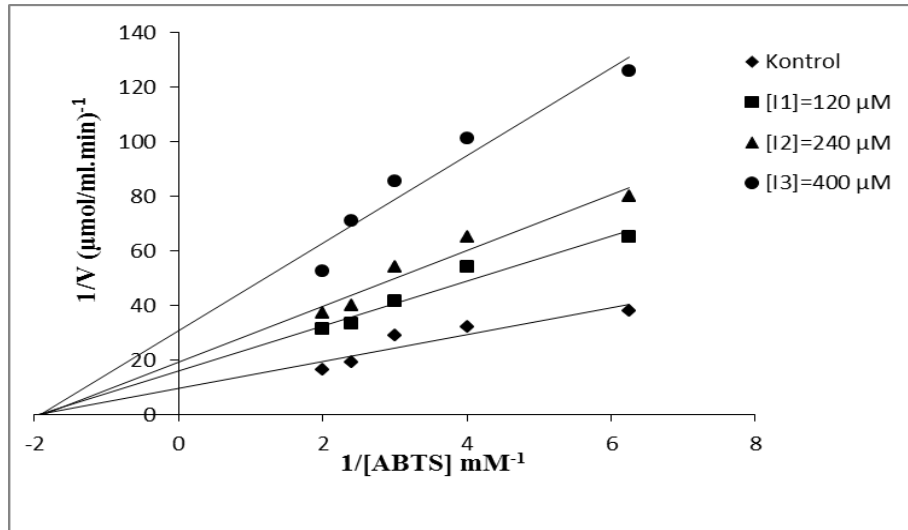
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfisoxazol	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,895	0,1	0,005	2,0	0,845	0,1	0,005	0,05	85	40
	2,0	0,885	0,1	0,015	2,0	0,835	0,1	0,015	0,05	58,8	120
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,825	0,1	0,025	0,05	50	200
	2,0	0,865	0,1	0,035	2,0	0,815	0,1	0,035	0,05	40	280
	2,0	0,845	0,1	0,050	2,0	0,795	0,1	0,050	0,05	33,3	400



Şekil 4.20. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfisokzol ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

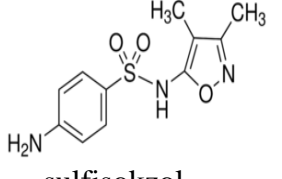
Çizelge 4.31. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfisokzol eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,500	2,385	0,1	0,015	0,500	2,335	0,1	0,015	0,05	65	6,25
	0,750	2,135	0,1	0,015	0,750	2,110	0,1	0,015	0,05	54,054	4
	1,0	1,885	0,1	0,015	1,0	1,835	0,1	0,015	0,05	41,66	3,003
	1,25	1,635	0,1	0,015	1,25	1,610	0,1	0,015	0,05	33,33	2,4
	1,500	1,385	0,1	0,015	1,500	1,335	0,1	0,015	0,05	31,25	2
[I] ₂	0,500	2,370	0,1	0,030	0,500	2,320	0,1	0,030	0,05	80	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,030	0,750	2,095	0,1	0,030	0,05	64,905	4
	1,0	1,870	0,1	0,030	1,0	1,820	0,1	0,030	0,05	54	3,003
	1,25	1,620	0,1	0,030	1,25	1,595	0,1	0,030	0,05	40	2,4
	1,500	1,370	0,1	0,030	1,500	1,320	0,1	0,030	0,05	37	2
[I] ₃	0,500	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	126	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	101	4
	1,0	1,850	0,1	0,05	1,0	1,800	0,1	0,05	0,05	85	3,003
	1,25	1,600	0,1	0,05	1,25	1,550	0,1	0,05	0,05	70	2,4
	1,5	1,350	0,1	0,05	1,5	1,300	0,1	0,05	0,05	52	2



Şekil 4.21. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfisokzol eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.32. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfisokzol inhibitörünün inhibisyon etkisi

 <p>sulfisokzol</p>	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		221,7	182,66	Yarışmasız

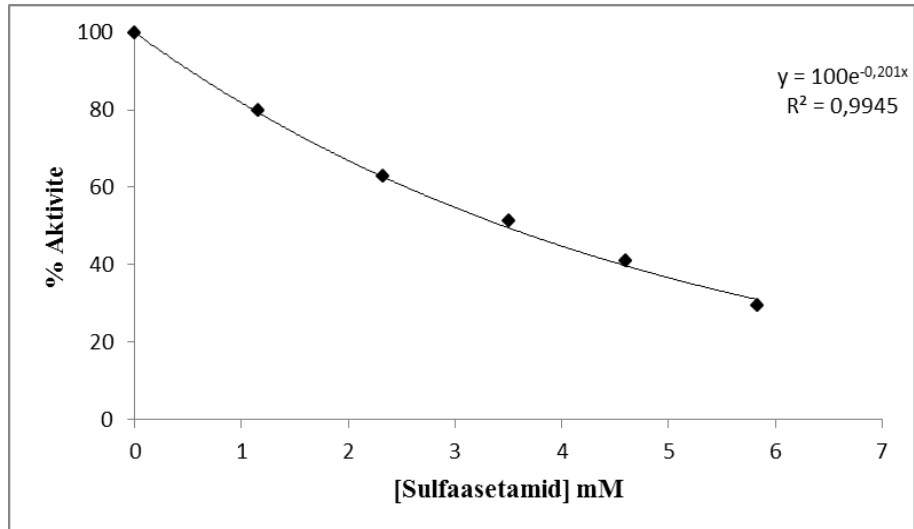
Çizelge 4.33. Sulfisokzol ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfisokzol		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	8,87	15,00	532,22	900,00	0,59	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,11	0,03	1,10	0,26	4,23	0,21	7,16
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	39,19	12,00	2351,00	720,00	3,26	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	4,89	0,04	48,90	0,40	122,25	2,07	37,50
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,84	14,00	50,40	840,00	0,06	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,12	0,13	1,20	1,30	0,92	2,35	15,38
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,40	13,00	84,00	780,00	0,10	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,14	0,10	1,41	1,04	1,35	1,67	13,50

4.3.9. Sulfasetamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.34. Sulfasetamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

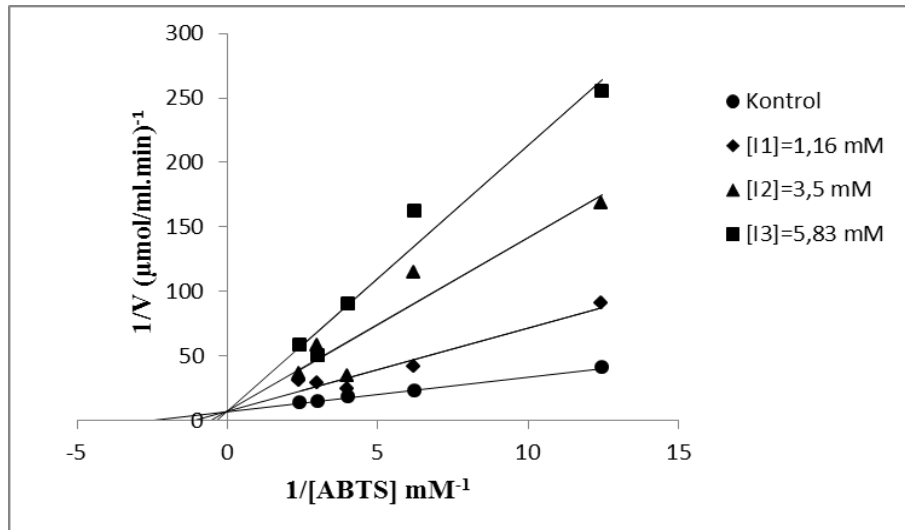
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] mM
Inhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfasetamid	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,895	0,1	0,03	2,0	0,845	0,1	0,005	0,05	79,8	1,16
	2,0	0,890	0,1	0,05	2,0	0,840	0,1	0,010	0,05	63	2,33
	2,0	0,885	0,1	0,07	2,0	0,835	0,1	0,015	0,05	51	3,5
	2,0	0,880	0,1	0,09	2,0	0,830	0,1	0,020	0,05	41	4,6
	2,0	0,850	0,1	0,110	2,0	0,800	0,1	0,05	0,05	19	11,83



Şekil 4.22. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfasetamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

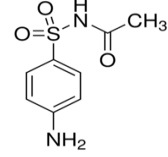
Çizelge 4.35. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfasetamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü				Numune Tüpü					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,25	2,645	0,1	0,005	0,25	2,595	0,1	0,005	0,05	91	12,48
	0,500	2,395	0,1	0,005	0,500	2,345	0,1	0,005	0,05	41	6,25
	0,750	2,145	0,1	0,005	0,750	2,095	0,1	0,005	0,05	31	4
	1,0	1,895	0,1	0,005	1,0	1,845	0,1	0,005	0,05	29	3
	1,25	1,645	0,1	0,005	1,25	1,595	0,1	0,005	0,05	24	2,4
[I] ₂	0,25	2,635	0,1	0,015	0,25	2,785	0,1	0,015	0,05	169	12,48
	0,500	2,385	0,1	0,015	0,500	2,335	0,1	0,015	0,05	115	6,25
	0,750	2,315	0,1	0,015	0,750	2,265	0,1	0,015	0,05	58	4
	1,0	1,885	0,1	0,015	1,0	1,835	0,1	0,015	0,05	37	3
	1,25	1,635	0,1	0,015	1,25	1,585	0,1	0,015	0,05	34	2,4
[I] ₃	0,25	2,625	0,1	0,025	0,25	2,575	0,1	0,025	0,05	255	12,48
	0,500	2,375	0,1	0,025	0,500	2,325	0,1	0,025	0,05	162	6,25
	0,750	2,125	0,1	0,025	0,750	2,075	0,1	0,025	0,05	90	4
	1,0	1,875	0,1	0,025	1,0	1,825	0,1	0,025	0,05	58	3
	1,25	1,625	0,1	0,025	1,25	1,575	0,1	0,025	0,05	50	2,4



Şekil 4.23. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfasetamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.36. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfasetamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfasetamid	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		3,447	370,00	Yarışmalı

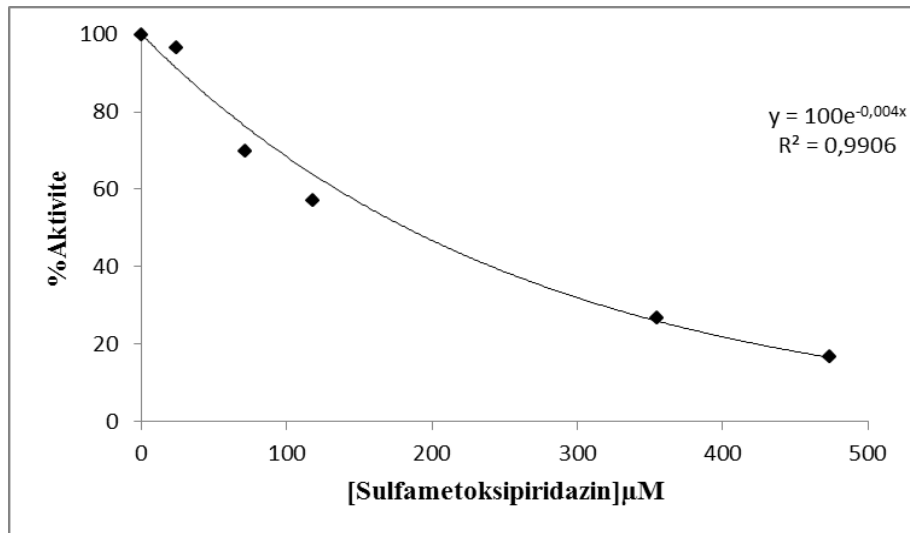
Çizelge 4.37. Sülfasetamid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sülfasetamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saf. Kat.
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	4,84	15,00	290,40	900,00	0,32	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	1,65	0,03	16,50	0,30	55,00	5,68	168,40
Manda	Amberlit CG50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	5,13	12,00	307,92	720,00	0,43	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	6,37	0,08	63,70	0,85	74,94	20,68	175,00
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	2,48	14,00	148,88	840,00	0,17	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	2,13	0,03	21,30	0,27	78,88	14,31	445,65
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,25	13,00	75,18	780,00	0,09	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,23	0,03	2,32	0,30	7,73	3,00	80,52

4.3.10. Sulfametoksipiridazin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.38. Sulfametoksipiridazin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

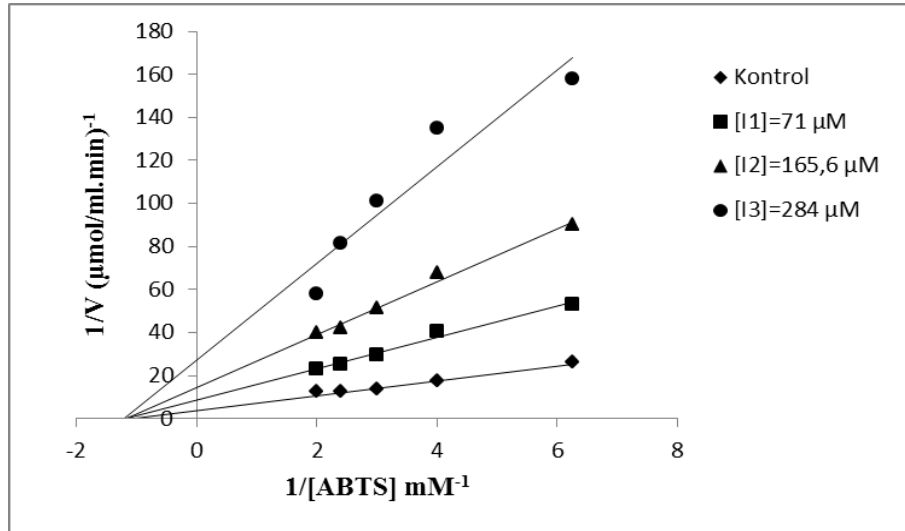
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfametoksipiridazin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,895	0,1	0,015	2,0	0,845	0,1	0,005	0,05	96,63	23,66
	2,0	0,885	0,1	0,025	2,0	0,835	0,1	0,015	0,05	69	71
	2,0	0,875	0,1	0,035	2,0	0,825	0,1	0,025	0,05	57	118,3
	2,0	0,865	0,1	0,045	2,0	0,815	0,1	0,075	0,05	26	355
	2,0	0,755	0,1	0,050	2,0	0,705	0,1	0,100	0,05	16	473



Şekil 4.24. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfametoksipiridazin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

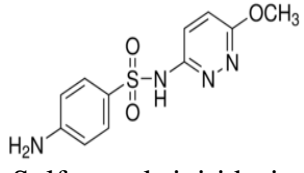
Çizelge 4.39. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfametoksipiridazin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,500	2,385	0,1	0,015	0,500	2,335	0,1	0,015	0,05	53	6,25
	0,750	2,135	0,1	0,015	0,750	2,130	0,1	0,015	0,05	40	4,8
	1,0	1,885	0,1	0,015	1,0	1,835	0,1	0,015	0,05	29	3
	1,25	1,635	0,1	0,015	1,25	1,610	0,1	0,015	0,05	25	2,4
	1,5	1,385	0,1	0,015	1,5	1,335	0,1	0,015	0,05	23	2
[I] ₂	0,500	2,365	0,1	0,035	0,500	2,315	0,1	0,07	0,05	89	6,25
	0,750	2,115	0,1	0,035	0,750	2,065	0,1	0,07	0,05	67	4,8
	1,0	1,865	0,1	0,035	1,0	1,815	0,1	0,07	0,05	50	3
	1,25	1,615	0,1	0,035	1,25	1,565	0,1	0,07	0,05	41	2,4
	1,500	1,365	0,1	0,035	1,500	1,315	0,1	0,07	0,05	39	2
[I] ₃	0,500	2,340	0,1	0,060	0,500	2,290	0,1	0,09	0,05	158	6,25
	0,750	2,090	0,1	0,060	0,750	2,040	0,1	0,09	0,05	135	4,8
	1,0	1,845	0,1	0,060	1,0	1,795	0,1	0,09	0,05	131	3
	1,25	1,590	0,1	0,060	1,25	1,540	0,1	0,09	0,05	81	2,4
	1,500	1,340	0,1	0,060	1,500	1,290	0,1	0,09	0,05	58	2



Şekil 4.25. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfametoksipiridazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.40. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfametoksipiridazin inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfametoksipiridazin	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		173,2	56,3	Yarışmasız

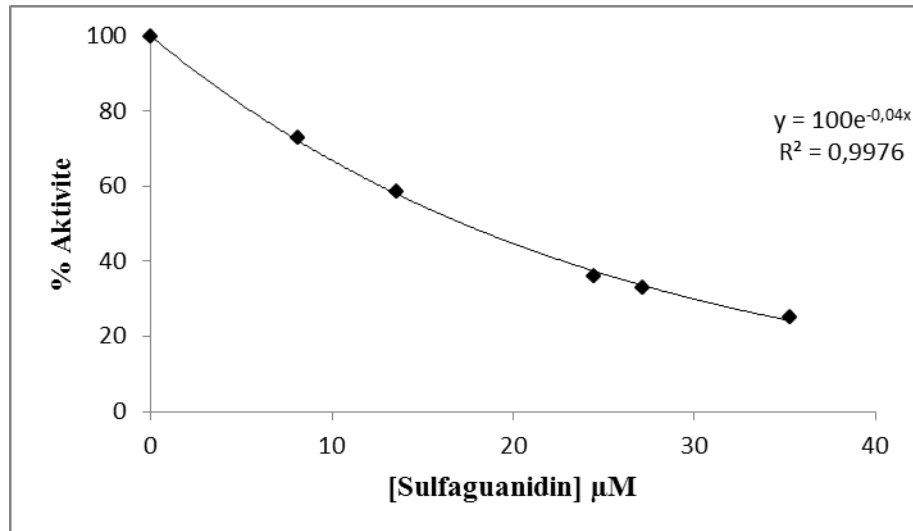
Çizelge 4.41. Sulfametoksipiridazin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

Sulfametoksi piridazin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saf. Kat.
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	4,63	15,00	277,77	900,00	0,30	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	8,55	0,19	85,55	1,95	43,73	30,00	145,7
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	5,7	12,00	342,00	720,00	0,47	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,79	0,31	7,90	3,14	2,51	2,30	5,34
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,00	14,00	60,00	840,00	0,07	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,07	0,01	0,76	0,11	6,90	1,26	98,00
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	10,00	--	--	--	--	--	--	--

4.3.11. Sulfaguanidin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.42. Sulfaguanidin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

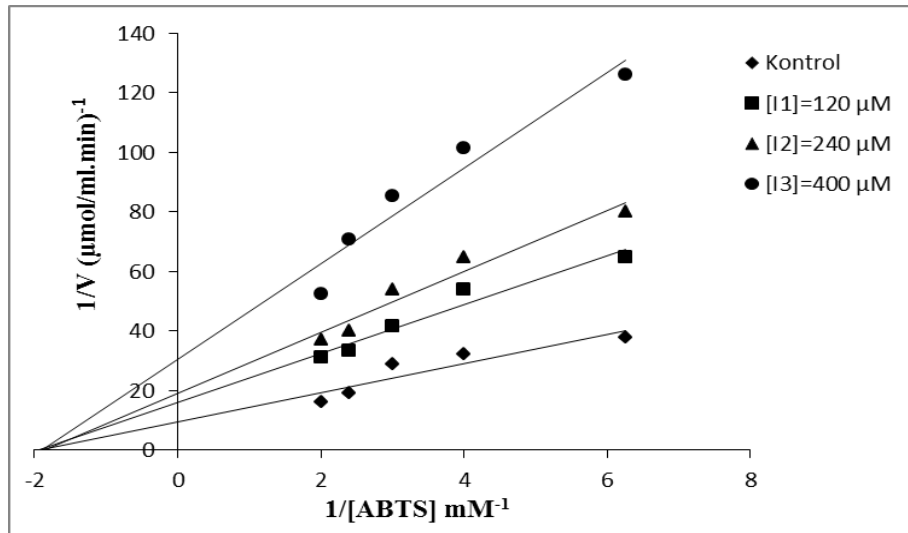
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)		
Sulfaguanidin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,870	0,1	0,015	2,0	0,820	0,1	0,015	0,05	72,82	8,15
	2,0	0,850	0,1	0,025	2,0	0,800	0,1	0,025	0,05	58,74	13,58
	2,0	0,830	0,1	0,035	2,0	0,780	0,1	0,035	0,05	35,92	24,45
	2,0	0,810	0,1	0,045	2,0	0,760	0,1	0,045	0,05	33	27,16
	2,0	0,790	0,1	0,050	2,0	0,740	0,1	0,050	0,05	25	35,31



Şekil 4.26. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sulfaguanidin ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

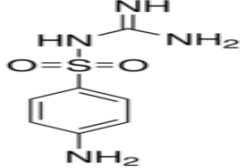
Çizelge 4.43. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS sulfaguanidin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,500	2,385	0,1	0,015	0,500	2,335	0,1	0,015	0,05	17	6,25
	0,750	2,135	0,1	0,015	0,750	2,130	0,1	0,015	0,05	13	4
	1,0	1,885	0,1	0,015	1,0	1,835	0,1	0,015	0,05	10	3
	1,25	1,635	0,1	0,015	1,25	1,610	0,1	0,015	0,05	8	2,4
	1,5	1,385	0,1	0,015	1,5	1,335	0,1	0,015	0,05	6	2
[I] ₂	0,500	2,370	0,1	0,03	0,500	2,350	0,1	0,03	0,05	34	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,03	0,750	2,070	0,1	0,03	0,05	24	4
	1,0	2,070	0,1	0,03	1,0	2,020	0,1	0,03	0,05	16	3
	1,25	1,820	0,1	0,03	1,25	1,970	0,1	0,03	0,05	13,8	2,4
	1,5	1,970	0,1	0,03	1,5	1,920	0,1	0,03	0,05	13	2
[I] ₃	0,500	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	65	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	38	4
	1,0	1,850	0,1	0,05	1,0	1,800	0,1	0,05	0,05	33	3
	1,25	1,600	0,1	0,05	1,25	1,550	0,1	0,05	0,05	25	2,4
	1,5	1,350	0,1	0,05	1,5	1,300	0,1	0,05	0,05	23	2



Şekil 4.27. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sulfaguanidin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.44. Laktoperoksidaz enzimini üzerine sulfaguanidin inhibitörünün inhibisyon etkisi

 <p>Sulfaguanidin</p>	Sığır LPO	IC₅₀ (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon tipi
		173,2	122,0	Yarışmasız

Çizelge 4.45. Sulfaguanidin ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

sulfaguanidin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saf. Kat.
Sığır	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	7,320	15,000	439,200	900,00	0,48	100	1,00
	Sepharose 4B Afinitite	10,00	0,003	0,020	0,037	0,20	0,18	0,008	0,37
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	49,351	12,000	2961,000	720,00	4,11	100	1,00
	Sepharose 4B Afinitite	10,00	0,670	0,016	6,700	0,16	41,87	0,220	10,18
Koyun	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	0,550	14,000	33,330	840,00	0,04	100	1,00
	Sepharose 4B Afinitite	10,00	0,002	0,0002	0,025	0,002	17,85	0,07	446,25
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	60,00	1,360	13,000	81,660	780,00	0,10	100	1,00
	Sepharose 4B Afinitite	10,00	0,002	0,030	0,016	0,33	0,05	0,195	0,48

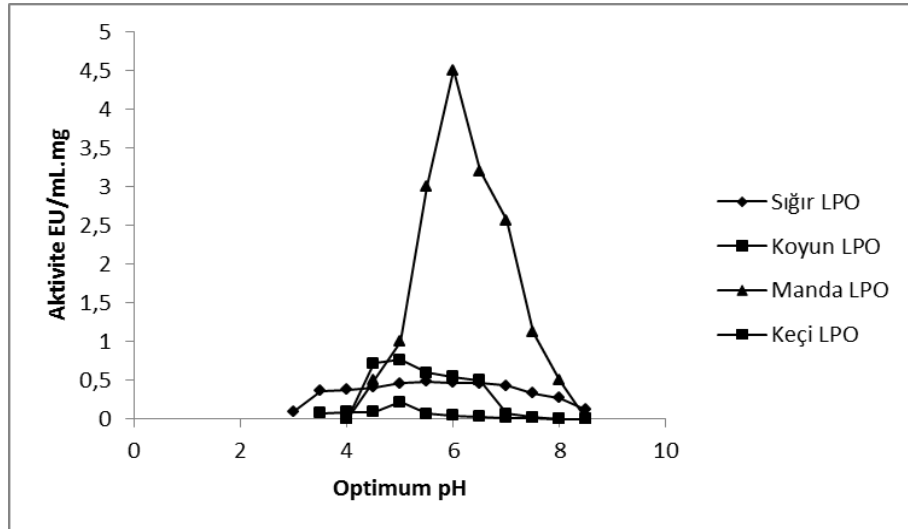
4.4. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma ve SDS-PAGE Sonuçları

4.4.1. 5-amino-2-metilbensülfonamid ile saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile bulunan kinetik parametreler

Optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Sığır, manda, koyun ve keçi sütünden elde edilen sonuçlar Şekil 4.28; 4.29; 4.30; 4.31; 4.32; 4.33; 4.34; 4.35 ile çizelge 4.46’da gösterildi.

4.4.2. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği

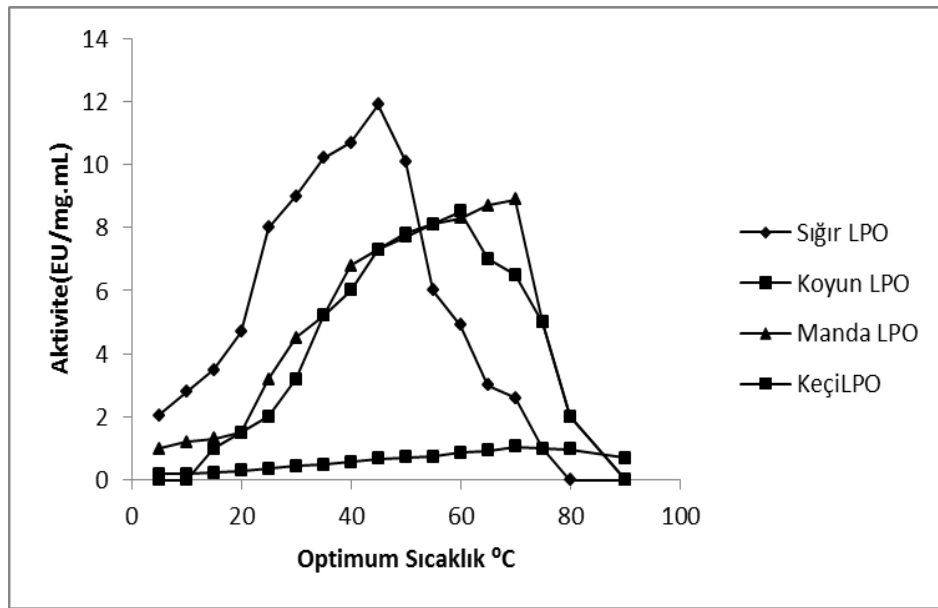
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde pH:5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.28’de verildi



Şekil 4.28. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.4.3. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

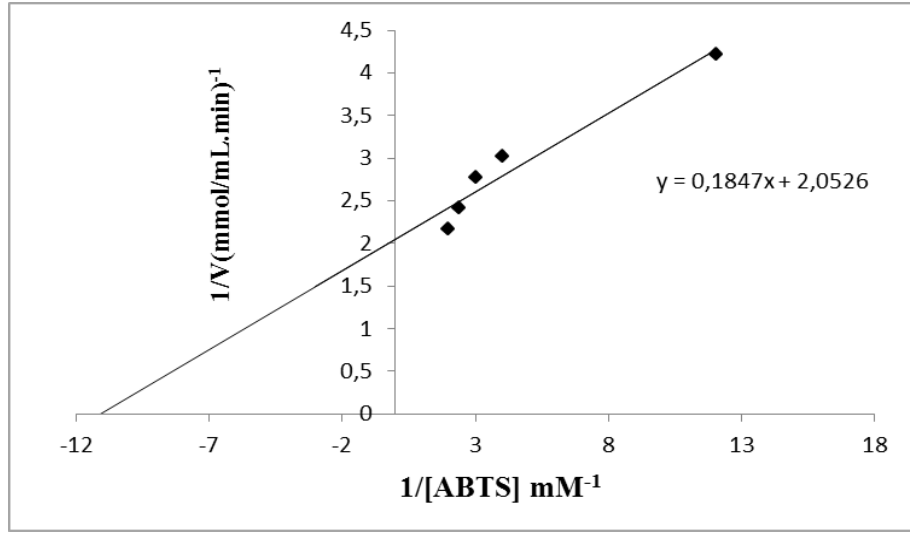
Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla B3l3m 3.4.2’de anlatıldığı Şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite 3l3mleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.29’da verildi.



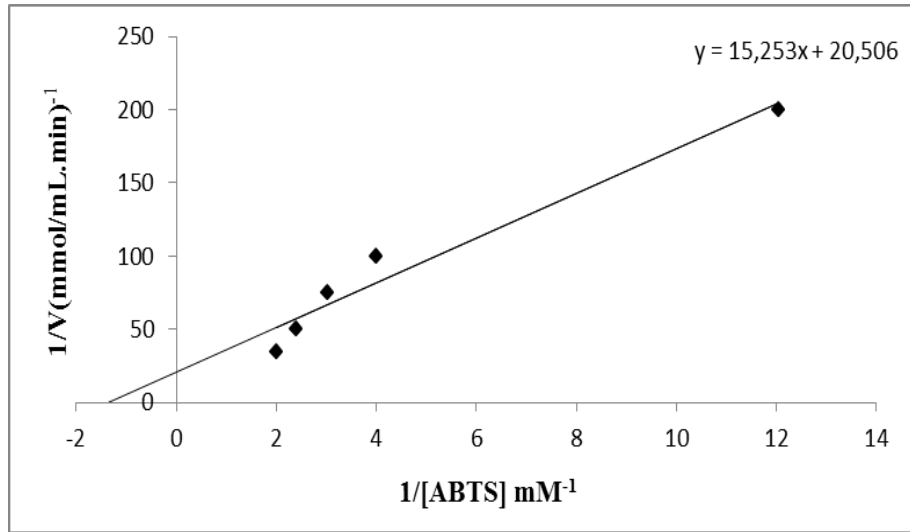
Şekil 4.29. Memeli s3tleri LPO enzimi i3in ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği

4.4.4. ABTS substratı i3in K_m ve V_{max} grafikleri

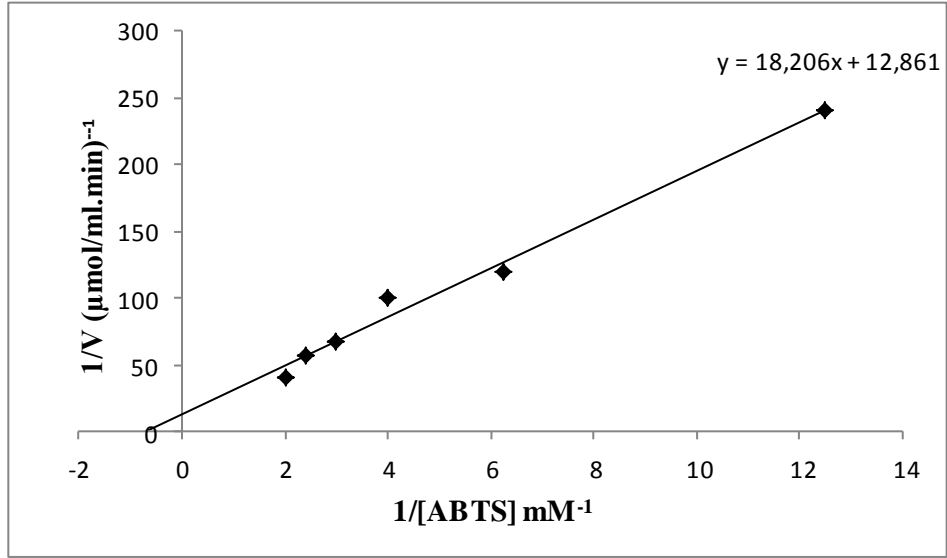
K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; B3l3m 3.4.4’de anlatıldığı Şekilde ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri 3l3ld3. Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.30; 4.31; 4.32’de verildi.



Şekil 4.30. Manda sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



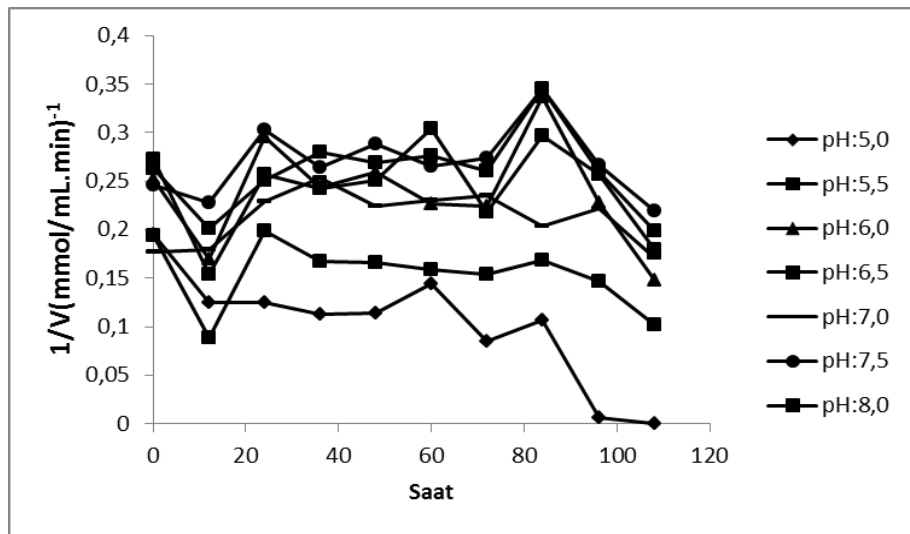
Şekil 4.31. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



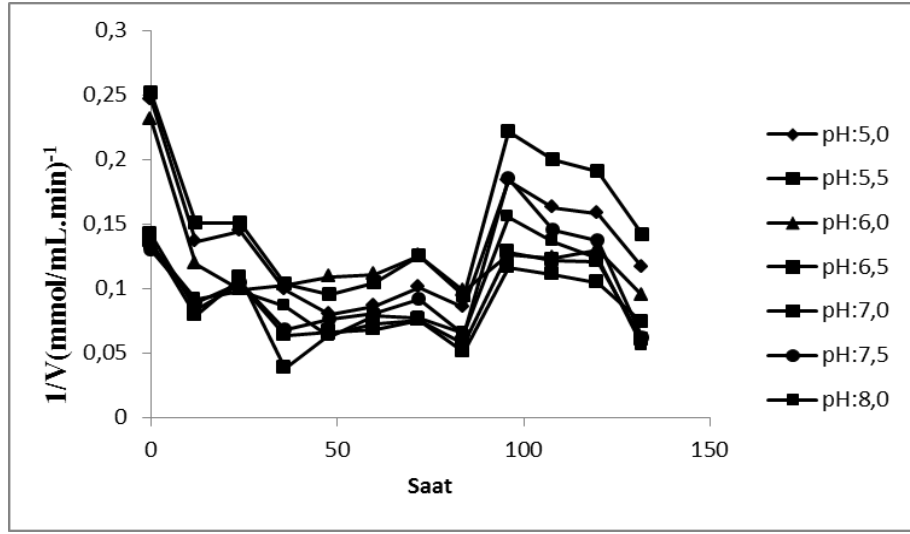
Şekil 4.32. Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

4.4.5. Stabil pH çalışması

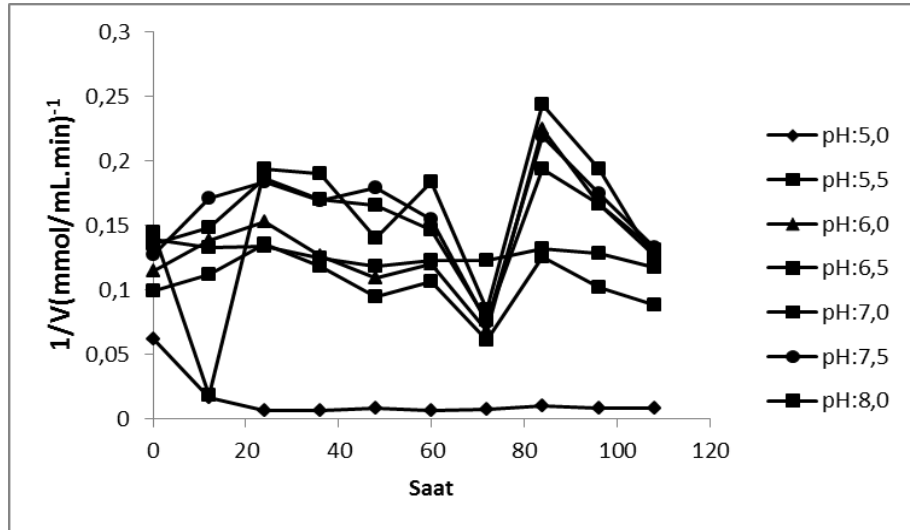
Stabil pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.3'de anlatıldığı şekilde pH:5,0-8,0 aralığında her 12 saatte bir 7 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.32'de verildi.



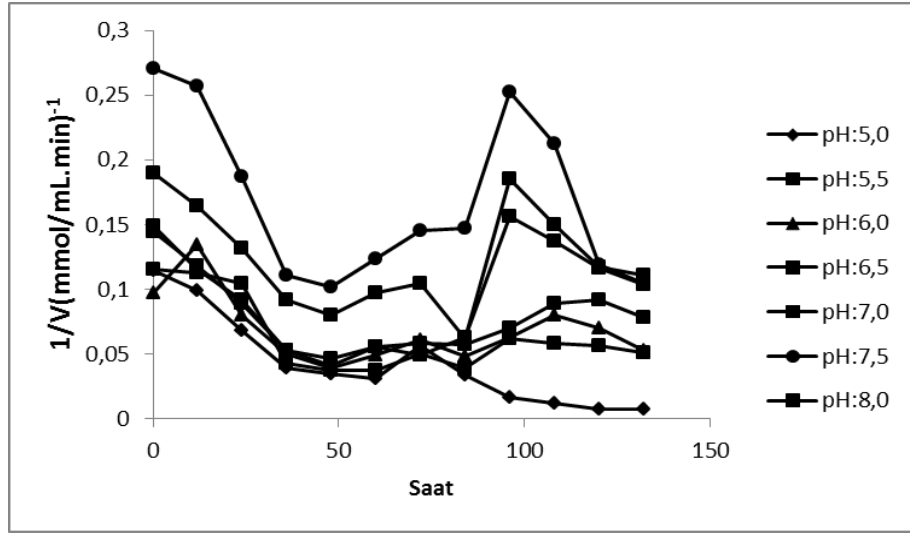
Şekil 4.33. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak manda sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



Şekil 4.34. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



Şekil 4.35. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak sığır sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



Şekil 4.36. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.5. Memeli Sütleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar

Çizelge 4.46. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC ₅₀ (µM)	K _i (µM)	İnhibisyon Tipi
5-amino-2-metil benzensülfonamid	0,693	0,412	Yarışmasız
3,5-diklorosülfanilamid	346,5	103,32	Yarışmalı
2-amino-5-metil 1,3-benzendisülfonamid	115	16,37	Yarışmalı
Sulfisomidine	173	122	Yarışmasız
Sulfadiazin	92,24	90,66	Yarışmasız
Sulfomerazine	309	78	Yarışmalı
Sülfametazin	346,5	198	Yarışmasız
Sulfisokzol	221,7	182,66	Yarışmasız
Sülfasetamid	3447	870	Yarışmalı
Sulfametoksipiridazin	173,2	56,3	Yarışmasız
Sulfoguanidin	17,15	1,24	Yarışmalı

Çizelge 4.47. Sığır ve manda sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	Sığır LPO			Manda LPO		
	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
5-amino-2-metil benzen Sülfonamid	84,75	82,68	1059,3	168,00	34,67	509,09
3,5-diklorosülfanilamid	43,40	2,65	135,00	---	---	---
2-amino-5-metil-1,3- benzendisülfonamid	---	---	---	----	---	---
Sulfisomidin	1,42	1,42	2,60	1,92	0,15	7,68
Sulfadiazin	--	--	--	--	--	--
Sulfamerazin	6,07	0,61	10,46	140,54	1,88	36,69
Sülfametazin	14,82	1,26	78,43	2,51	2,31	5,03
Sulfisokzol	4,23	0,21	7,16	122,25	2,07	37,50
Sülfasetamid	55,00	5,68	168,40	74,94	20,68	175,00
Sulfametoksipiridazin	43,73	30,00	145,70	2,51	2,30	5,34
Sulfaguanidin	0,18	0,01	0,37	41,87	0,22	10,18

Çizelge 4.48. Keçi ve koyun sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları

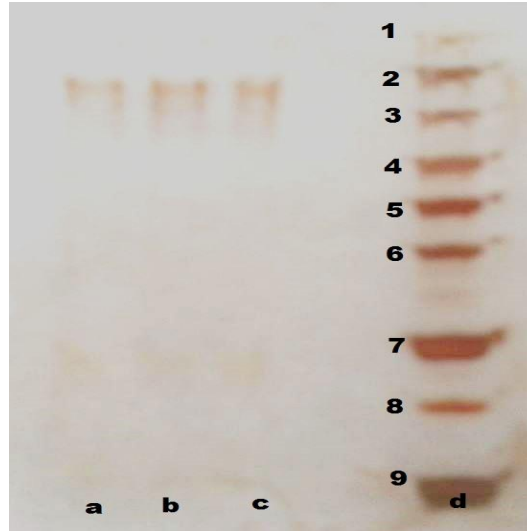
LİGAND MOLEKÜLLER	Keçi LPO			Koyun LPO		
	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
5-amino-2-metil benzensülfonamid	11,3	11,00	161,90	6,97	14,35	232,558
3,5-diklorosülfanilamid	---	---	---	----	---	---
2-amino-5-metil-1,3- benzendisülfonamid	---	---	---	----	---	---
Sulfisomidin	--	--	--	0,31	0,17	2,44
Sulfadiazin	0,67	2,00	20,47	--	--	--
Sulfamerazin	1,29	2,85	36,85	23,40	7,00	65,00
Sülfametazin	0,24	0,70	8,19	0,28	1,21	2,03
Sulfisokzol	1,35	1,67	13,50	0,92	2,35	15,38
Sülfasetamid	7,73	3,00	80,52	78,88	14,31	445,65
Sulfametoksipiridazin	--	--	--	6,90	1,26	98,00
Sulfaguanidin	0,05	0,19	0,48	17,85	0,07	446,25

Çizelge 4.49. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimi toplu kinetik sonuçları

Memeli sütleri	K_m	V_{max}	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Stabil pH
Sığır LPO	0,14	0,55	6,0	42	6,5
Manda LPO	0,09	0,48	5,5	70	8,0
Koyun LPO	0,74	0,05	5,5	60	8,0
Keçi LPO	1,42	0,07	5,5	70	5,5

4.6. Saflaştırılan LPO Enzimlerinin SDS-PAGE Gümüş Boyama Sonuçları

4.6.1. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda sütleri LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları.



Şekil 4.35. 5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda LPO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı

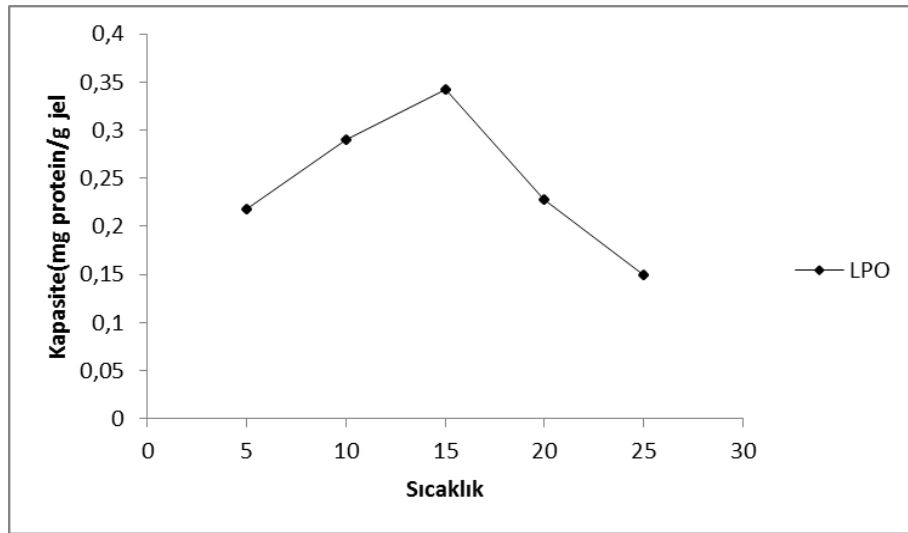
*a: Sığır LPO enzimi (78 kDa) b: Koyun LPO enzimi (78 kDa) c: Manda LPO enzimi (78 kDa) 4. Standartlar; 1. (130 kDa), 2. (100 kDa), 3. (70 kDa), 4. (55 kDa), 5. (40 kDa), 6 (35 kDa), 7. (25 kDa), 8. (15 kDa), 9. (5 kDa)

4.7. Sığır Sütünden 5-amino-2-metilbensülfonamid Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan jelin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

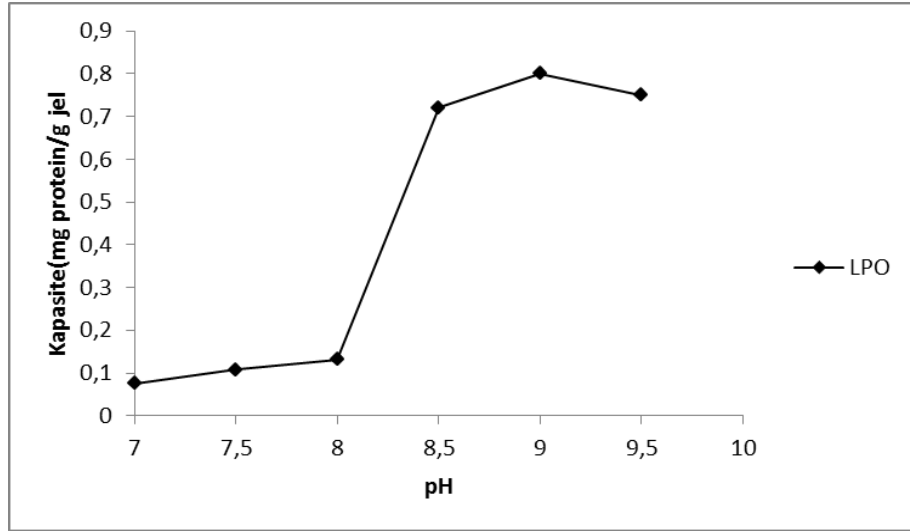
pH:6,8’de LPO farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.36’da verildi.



Şekil 4.36. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.7.2. pH’nın kolon kapasitesine etkisi

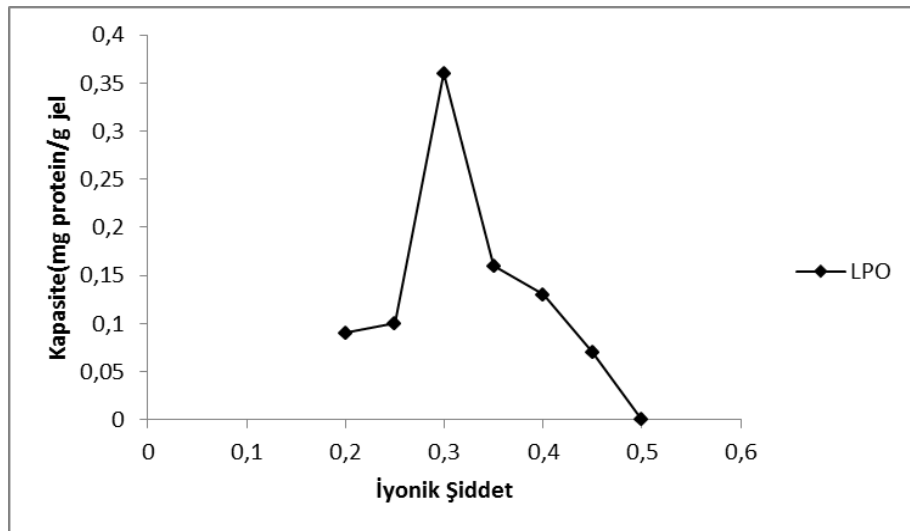
Bu bölümdeki deneyler pH’sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.37’de verildi.



Şekil 4.37. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin pH-kapasite grafiği

4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

LPO enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.38’de verildi.



Şekil 4.38. Sepharose-4B-5-amino-2-metilbensülfonamid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde peroksidazlar gibi enzimlerin kullanım sahalarının genişlemesi ve ticari değerlerinin yüksek olmasından ötürü bu enzimlerin saf olarak, yüksek verimde ve düşük maliyette elde edilmeleri önem arz etmektedir.

Memeli peroksidazlarından olan Laktoperoksidaz öncelikle bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde antibakteriyal hipotiyosiyanat oluşturması ile bilinen (Shah 2000), süt endüstrisinde, süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla kullanılan bir enzimdir (Uguz and Ozdemir 2005).

Laktoperoksidaz ile çalışan bilim insanları enzim üzerine farklı moleküllerin inhibisyonunu araştırmışlar ve saflaştırma için çok çeşitli kromatografik yöntemler denemişlerdir. Bu kromatografik yöntemler genellikle uzun ve ekonomik değildir. Önceki çalışmalarda Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi ile kısmi bir saflaştırma yapıp, sonra amonyum sülfat çöktürmesi, CM Sephadex iyon değişim, Sephadex G100 jel filtrasyon kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak 5 mg LPO 1 lt süttten elde edilmiştir (Ozdemir *et al.* 2001; Cankaya *et al.* 2006).

LPO üzerine yapılan bir diğer çalışmada, afinite tekniği kullanılmıştır. Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri olan afinite kromatografisi spesifik ligand esasına dayanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Ligand olarak sülfanilamid kullanılarak enzimin tek basamakta saflaştırılması sağlanmıştır. Bu çalışmada sülfanilamidin LPO'nun yarışmalı inhibitörü olduğu K_i değerinin 3,55x10⁻⁵ M ve IC₅₀ değerinin 0,848 mM olduğu ve enzimin 409,00 kat saflaştırıldığı bulundu. Literatürde sülfanilamidlerin LPO inhibitörü olduğu ilk defa tarafımızdan bulunmuş oldu (Atasever *et al.* 2013).

Bu tez çalışmasında ise saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürme ve verimi artırmaya katkı sağlamak amacı ile; sadece sığırdan değil diğer memeli sütlerinden de LPO

enziminin sülfanilamid türevi moleküllerden saflaştırılması hedeflendi. Çizelge 3.1’de verilen bu türevlerin önce inhibisyonlarına bakılarak dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerin afinite jellerinin sentezine geçirildi. Saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Çalışmalarımız için hazırlanan afinite kolonlarından elde edilen elüatlardaki enzim muhtevası, 280 nm ve 412 nm deki absorbans değerleri ölçülerek $R_z=A_{412}/A_{280}$ oranı olarak belirlendi. R_z değeri 0,6 den büyük olan elüatlar birleştirildi. Bu değer LPO enziminin saflaştırılması çalışmalarında hemen bütün araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Shindler and Bardsley 1975; Doumonted and Rousset 1983; Jacob *et al.* 1998).

Kantitatif protein tayinleri Bradford metoduyla ile yapıldı ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle bulundu. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı olur. Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

LPO enziminin aktivitesi, ABTS kromojenik substratın H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm’de izlenmesi esasına dayanır. Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlarda LPO enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi, literatürde enzimin bilinen en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının literatürde verilmesidir ($\epsilon_{412}=32400 M^{-1} cm^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi $20^\circ C$ ’de 1 dakikada 1µmol ABTS’nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

LPO enzimi sığır sütünden sülfanilamid ligandı ile Çizelge 4.1’den görüldüğü gibi %74,00 verimle 428,57 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim için K_m değeri 0,11 mM ve V_{max} değeri 0,50 EÜ/mL.dk olarak bulundu (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2). SDS-PAGE ile

enzimin saflığı kontrol edildi ve literatürde belirtildiği gibi tek bant yaklaşık olarak 80 kDa'da bulundu (Şekil 4.4.). 1. kuyuya standartlar; a. (170 kDa), b. (130 kDa), c. (100 kDa), d. (70 kDa), e. (55 kDa), f. (40 kDa), g. (35 kDa), h. (25 kDa), ı. (15 kDa) konuldu, 2. Kuyuya ise sülfanilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi konuldu.

Saflaştırılan LPO enzimi üzerine 5-amino-2-metilbensülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı bu çalışmalar sırasında küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.7, 4.11, 4.15, 4.19, 4.23, 4.27, 4.31, 4.35, 4.39 ve 4.43'de verildi. ABTS substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doymun olmayan ABTS (26.67×10^{-2} mM) reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu.

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.6, 4.8, 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18, 4.20, 4.22, 4.24 ve 4.26'de gösterildi. Çizelge 4.46'daki toplu sonuçlara göre IC_{50} değerleri 5-amino-2-metilbensülfonamid için; 0,69 μ M, 3,5-diklorosülfanilamid için; 346,50 μ M, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid için; 115,00 μ M, sulfisomidin için; 173,00 μ M, sulfadiazin için; 92,24 μ M, sulfamerazin için; 309,00 μ M, sulfametazin için; 346,50 μ M, sulfisokzol için; 221,70 μ M, sulfasetamid için; 3,45 μ M, sulfametoksipiridazin için; 173,20 μ M sulfaguanidin için; 17,15 μ M olarak bulundu. Tüm moleküllerin IC_{50} değerlerinin sonuçlarına bakıldığında LPO enziminin inhibitörü olabileceği ortaya konuldu. İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile K_i değerlerinin hesaplanması çalışmalarına geçildi.

Sığır LPO enzimi için 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.4, 4.8, 4.12, 4.16, 4.20, 4.24, 4.28, 4.32, 4.36, 4.40 ve 4.44'de gösterildi. 5-amino-2-metilbensülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-

benzendisulfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.7, 4.9, 4.11, 4.13, 4.15, 4.17, 4.19, 4.21, 4.23, 4.25 ve 4.27'de gösterildi. Tablo 4.1'den görüldüğü gibi, K_i değerleri 5-amino-2-metilbenzensulfonamid için 0,41 nM, 3,5-diklorosulfanilamid için 103,32 μ M, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisulfonamid için 16,37 μ M, sulfisomidin için 122,00 μ M, sulfadiazin için 90,66 μ M, sulfamerazin için 78,00 μ M, sulfametazin için 198,00 μ M, sulfisokzol için 182,66 μ M, sulfasetamid için 870,00 μ M, sulfametoksipiridazin için 56,30 μ M, sulfoguanidin için 1,24 μ M'dır. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan sulfanilamid molekülleri LPO enziminin yeni inhibitörleri olarak tespit edildi (Çizelge 4.46) ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi (Şekil 3.2).

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı ve pH: 10 tamponunda karıştırılarak 4°C'de 16 saat boyunca şişirildi. Her bir inhibitörden 25 mg alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-ligand jelleri hazırlandı (Atasever *et al.* 2013). Hazırlanan afinite kolonlarına yağı alınarak süt içerisine zayıf asidik katyon değiştirici olan Amberlit CG 50 H⁺ katılarak kısmı bir saflaştırma yapıldı (Doumonted and Rousset 1983). Homojenat hazırlanan kolonlara tatbik edildi, R_z değeri ($R_z=A_{412}/A_{280}$) 0,6'dan büyük olan tüpler birleştirildi ve absorbanslarına bakıldı. Afinite jellerinin sentezlendiği sulfanilamid türevlerinin diazonyum tuzu oluşturarak jelin renklenmesinden anlaşıldı. Diazonyum tuzları bileşikleri renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir (Atasever *et al.* 2013).

Çizelge 4.47-4.48'den görüldüğü gibi; 200 mL memeli sütü-amberlit ile hazırlanan homojenatların herbirinden 50 mL, 5-amino-2-metilbenzensulfonamid afinite kolonuna tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır sütünden 84,75 spesifik aktiviteyle %82,68 verimle 1059,37 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda

200 mL süttten 0,12 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Enzim manda sütünden 168,00 spesifik aktivite ile %35 verimle 509,09 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,09 mg LPO elde edilmiştir.

LPO enzimi koyun sütünden 6,97 spesifik aktivite ile %14,3 verimle 232,558 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,43 mg LPO elde edilmiştir ve keçi sütünden 11,30 spesifik aktivite ile %11 verimle 161,90 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,09 mg LPO elde edilmiştir.

Sülfanilamid molekülü ile yaptığımız çalışmada sığır sütü %74 verimle 428,57 kat saflaştırılmıştı, 5-amino-2-metilbensensülfonamid ile %82,68 verimle saflaştırma katsayısı iki katına çıkarılmıştır. Aynı kolondan ilk defa manda sütünün 509,09 kat, koyun sütünün 232,55 kat ve keçi sütünün 161,90 kat saflaştırılmasında oldukça önemlidir ve ilk defa yapılmıştır.

2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, sulfisomidin, sulfadizin, sülfametazin, sulfometokspiridazin, sulfaguanidin ve sulfisokzol ligand olarak kullanıldığında sığır, keçi, koyun ve manda sütünden saflaştırma hiç gerçekleştirilemediği gözükmektedir. Ligand olarak saflaştırılmada kullanılması uygun değildir.

Sulfamerazin ligand olarak kullanıldığında sığır, keçi, koyun ve manda sütünden saflaştırmada; manda sütünden enzim 36,69 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 1,88 olarak bulunmuştur, koyun sütünden enzim 65,11 kat saflaştırılmıştır, keçi sütünden 36,85 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmalar da verimler çok düşüktür saflaştırma katsayıları da dikkate değer bulunmamıştır. Ligand olarak saflaştırılmada kullanılması uygun değildir.

Sulfasetamid ligand olarak kullanıldığında sığır sütünden %5,68 verimle 168,40 kat, manda sütünden %20,68 verimle 175,00 kat; koyun sütünden %14,31 verimle 445,65 kat ve keçi sütünden çok düşük verimle 80,52 kat saflaştırılmıştır. Bu sonuçlar molekülün memeli sütlerinin hepsini saflaştırabildiğini ama koyun sütünü 445,65 kat saflaştırması bakımından önemli olduğunu göstermektedir. Ama verimler düşük olduğundan ligand olarak kullanılması uygun değildir.

Sülfanilamidin sığır LPO'nun yarışmalı inhibitörü olduğu daha önce enzimin 406,57 kat saflaştırıldığı bildirilmişti (Atasever *et al.* 2013). Bu tez kapsamında saflaştırma verimi ve katsayısı sadece sığır için değil, diğer memeli sütleri içinde artırılmış ve 5-amino-2-metil benzensülfonamid molekülü bu tez kapsamında ilk kez bulunmuştur.

5-amino-2-metilbensülfonamid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimleri için kinetik parametreleri tespit etmek amacı ile aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

Optimum pH çalışması; ABTS substratı için pH 5,0-8,0 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.28'de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 6,0 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.29'da gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 42°C olduğu bulundu.

Koyun LPO enzimi için optimum pH değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5-8 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.28'de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre koyun sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler

spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.29'da gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre koyun sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 60°C olduğu bulundu.

Manda LPO enzimi için optimum pH değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5,0-8,0 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.28'de gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre manda sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.29'da gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre manda sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu.

Keçi LPO enzimi için optimum pH değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5-8 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.28'de gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80° aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.29'da gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu. Özet Sonuçlar Çizelge 5.1'de gösterildi.

Çizelge 5.1. 5-amino-2-metilbenzensulfonamid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları

Parametreler	Memeli Sütleri			
	Sığır	Koyun	Keçi	Manda
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	84,75	6,97	11,30	168,00
Saflaştırma katsayısı	1059,30	232,558	161,90	509,09
Optimum pH	6,0	5,5	5,5	5,5
Optimum Sıcaklık (°C)	45	60	70	70
K_m (mM)	0,15	0,08	1,42	0,08
V_{max} (EÜ/mL.dk.)	0,60	0,05	0,07	0,46
Molekül ağırlığı (Dalton)	80,0	80,0	80,0	80,0

Hazırlanan 5-amino-2-metilbenzensulfonamid kolonu için LPO enzimini tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı.

Enzimin kolona tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/gram-jel cinsinden LPO enziminin tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işleminde hazırlanan jelden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen LPO enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan LPO enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu jel kurutulup tartılarak mg protein/gram-jel cinsinden LPO enziminin tutma kapasitesi belirlendi (Aslan *et al.* 1996).

LPO enziminin saflaştırılmasında 5-amino-2-metilbenzensulfonamid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8 da 5, 10, 15, 20 ve 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.36'dan görüldüğü gibi 15°C'de jel bağlanma kapasitesi maksimumdur.

LPO enzimi için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 6,8 ile 9,5 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.37'de grafik edildi. Buradan 5-amino-2-metil benzensülfonamid için pH:9,0 civarında maksimum bağlanma olduğu tespit edildi.

Kolonların bağlanma kapasitelerini etkileyen 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 4.38'de görüldüğü gibi 0,3 M iyonik şiddet konsantrasyonunda bağlanmanın maksimum olduğu tespit edildi. Kolon tutma kapasitesi sonuçlarına göre, 5-amino-2-metilbensülfonamid için 15°C'de pH 9,0'da 0,30 M iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 0,05 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sonuç Olarak;

1. 11 ticari sülfanilamid türevi molekülün sığır LPO enzimi üzerine kinetik çalışması yapıldı. Çalışılan 11 molekülün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.
2. Bu moleküllerden hazırlanan afinite kolonlarından sadece sığır sütü LPO enzimi değil, ilk defa manda, koyun ve keçi sütleri de tek basamakta saflaştırıldı. LPO saflaştırılmasında; 5-amino-2-metilbensülfonamid çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligandlar olarak tespit edildi. Mevcut yöntemde sülfanilamid ligandı ile 409,00 kat saflaştırılan sığır LPO enzimi 5-amino-2-metilbensülfonamid molekülü ile 1059,37 kat saflaştırıldı.
3. Sonuçlar literatür ile kıyaslandığında tekbir molekül ile dört memeli sütünü saflaştıracak hiçbir ligand olmadığı görülmektedir.
4. Böylece mevcut tez kapsamında bize ait olan yöntemimiz geliştirilerek tek kademedede ve ucuz maliyette LPO saflaştırması yapabilen 5-amino-2-metilbensülfonamid molekülü literatüre kazandırılmıştır.

KAYNAKLAR

- 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.
- Atamer, M., Kocak, C., Cimer, A., Odabasi, S., Tamucay, B. and Yamaner, N., 1999. Some quality characteristics of Kasar cheese manufactured from milk preserved by activation of lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide (LP) system. *Milchwissenschaft*, 54, 553–556.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gülcin, I., Küfrevioglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136, 864–870.
- Barrett, N.E., Grendison, A.S., Lewis, M.J., 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy*, 66 (1), 73.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–25.
- Bayse, G.S., Michaelis, A.W. and Morisson, M., 1972. Lactoperoxidase catalyzed iodination of tyrosine peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 30, 284.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. *Biyokimya*. Palme Yayıncılık, 241-247, Ankara.
- Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikeda-Saito, M. and Caughey, W.S., 1989. Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity binding site for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 879-902.
- Boots, J.W. and Floris, R., 2006. Review Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*, 16, 1272–1276.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–251.
- Chevallet, M., Luche, S., Rabilloud, T., 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1, 1852–1858.
- Cankaya, M., Sisecioğlu, M., Yörük, O., Ozdemir, H., 2006. In vitro effects of some antibiotic drugs on bovine lactoperoxidase enzyme. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306.
- Daniel, R., Rao, L.D. and Mona, I.C., 1997. Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10.
- Davies, K.J., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61(1), 31.
- De Wit, J.N. and van Hooydonk, A.C.M., 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50, 227-244.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitro genes, *Biochemistry* 16, 4724.

- Doumonted, C. and Rousset, B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 14166.
- Drew, J., 2000. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287, 1960–1964.
- Fry, S.C., 1986. Cross-Linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Plant Biology*, 35, 165-186.
- Galijasevic, S., Hodzic, E., 2014. Melatonin Mediates Classic Lactoperoxidases Catalytic Mechanism. *International Journal of Pharmacology*, 4(1), 1-6.
- Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E., 2013. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2. Baskı, 347s, İstanbul.
- Haddain, M.S., Ibrahim, S.A. and Robinson, R.K., 1996. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7, 149-152.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.
- Hiraga, S. and Sasaki, K., 2001. A large family of class-III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42, 462-468.
- Hussain, S., Slikker, W., Ali, S. F., 1995. Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different region of Mouse brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13, 811-817.
- Iva'n L.E. and Isidra, R. 2006. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins Review. *International Dairy Journal* 16, 1294–1305.
- Jacob, B.M., Monoj, N.K. and Haridas, M., 1998. Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31, 808.
- Jacob, B.M., Anthony, K.E., Sreekumar, B., Haridas, M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk. *Life Sciences Including Pharmacology Letter*. 66, 2433–2439.
- Joseph, P. V., Jacob, C. and Maridas, M., 2004. Purification of sheep lactoperoxidase from colostrum: Characterization and antifungal studies. *International Journal of Chemical Sciences*, 2(1), 120-125
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. *Biyokimya. Aktif Yayınları*, 97s, Erzurum.
- Kumar, R. and Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Crystallographica*, 51, 1094.
- Kussendrager, Klaas D. and van Hooijdonk, A. C. M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, 1, 19-25.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4., *Nature*, 227, 680.
- Langbakk, B. and Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties Review. *Food Research International* 40, 1197–1211.

- Mecitoglu, C. and Yemenicioglu, A., 2007. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry*, 104, 726–733.
- Monson, R.B., Rahemtulla F, Baldone D.C, Pruitt, K.M. and Hjerpe, A., 1988. Purification and characterization of human salivary peroxidase *Biochemistry*, 1, 233.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 5, 1643-1650.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. and Cox, M. M., 2013. *Lehninger principles of biochemistry*. Palme Yayıncılık, 5. Baskıdan çeviri, 185s, Ankara.
- Ozdemir, H., Aygul, I. and Kufrevioglu, O. I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125–134.
- Ozdemir, H., Hacibeyoglu, H. I. and Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 143–155.
- Ozdemir, H. and Uguz, M. T., 2005. In vitro effects of some anaesthetic drugs on lactoperoxidase enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 491–495.
- Pakkanen, R., Aalto, J., 1997. Growth Factors and Antimicrobial Factors of bovine colostrum. *International Dairy*, 7, 285-97.
- Pourtois, M., Binet, C., Van Tieghem, N., Courtois, P. R., Vandenabeele, A. and Thirty, L., 1991. Saliva can contribute in quick inhibition of HIV infectivity. *AIDS*, 5, 598–600.
- Pruitt, K. M. and Jorma, O. T., 1985. The lactoperoxidase system. Chemistry and biological significance, *Proteins and enzymes*. Marcel Dekker Inc, 257p, New York, USA.
- Pütter, J., and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*. Bergmeyer, third edition, 286p, VCH, New York, USA.
- Reiter, B. and HaErnulv, G., 1984. Lactoperoxidase antibacterialsystem: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724-732.
- Reiter, B. and Perraudin, J.P., 1991. Lactoperoxidase: biological functions. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*, 1. CRC Press, Boca Raton, FL, 143–180, Canada, USA.
- Scammel, A.W., 2001. Production and Uses of Colostrum. *Journal of Dairy Technology*, 56, 74-82.
- Segel, I.H., 1968. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley and Sons, New York, 403p, New York.
- Seifu, E., Elna, M.B. and Donkin, E.F., 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its Potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 137–154.
- Shah, N.P., 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.

- Shimazaki, K., Nishio, M., Kawano, N., 1988. Separation of biologically active proteins from whey. *Rakuno Kagaku, Shokuhin no Kenkyu*, 37(2), 45-51.
- Shin, K., Hayasawa, H., and Lonnerdal, B., 2001. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immuno adsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 984–989.
- Shin, K., Tomita, M., Lonnerdal, B., 2000. Identification lactoperoxidase in mature human milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(94), 102.
- Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 1307.
- Sievers, G., 1980. Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 1, 249.
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Atasever, A. and Ozdemir, H., 2010. The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5, 1351–1356.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Clare, B.W., 2002. Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22, 329–372.
- 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.
- Thanabal, V. and La Mar G.N., 1989. A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 28, 7038-7044.
- Uguz, M. T. and Ozdemir, H., 2005. Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 397–401.
- Usanmaz, H., 2014. Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinitive Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- VanHuystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 205.
- Veitch, N. C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Welk, A., Rudolph, P., Kreth, J., Schwahn, Ch., Kramer, A., Below, H., 2011. Microbicidal efficacy of thiocyanate hydrogen peroxide after adding lactoperoxidase under saliva loading in the quantitative suspension test. *Archives Of Oral Biology*, 56, 1576 –1582.
- Wever, R, Kast W.M., Kasinodin, J.H., Boelens, R., 1982. The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 709(2), 212–9.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity Chromatography of Carbonic Anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.

- Wilchek, M., Miron, T. and Kohn, J. 1984. Affinity chromatography. *Methods in enzymology*, 104, 3-55.
- Wolfson, L. M. and Sumner, S.S., 1993. Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system. A review. *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.
- Xiao, L., Li, C., Xin, S. 2007. Isolation and purification of lactoperoxidase in bovine milk. *Zhongguo Rupin Gongye*, 35(3), 23-25

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzincan'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzincan'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılında girdiği Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladı ve aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2012 yılında İstanbul Medeniyet Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve doktora eğitimini tamamlamak üzere Atatürk Üniversitesinde görevlendirildi.