

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SIĞIR VE KOYUN SÜTLERİNDEN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Hande USANMAZ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SIĞIR VE KOYUN
SÜTLERİNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI**

Hande USANMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORM

Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması

Prof.Dr.Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Hande USANMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 28/04/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (5./5.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof.Dr.Hasan ÖZDEMİR	İmza	:
Üye	: Prof.Dr.İlhami GÜLÇİN	İmza	:
Üye	: Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR	İmza	:
Üye	: Doç.Dr.Ercan BURSAL	İmza	:
Üye	: Doç.Dr.Melda ŞİŞECİOĞLU	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 08.06.2014... tarih ve 19/594... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 3001, projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 114Z030

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

LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SIĞIR VE KOYUN SÜTLERİNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Hande USANMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Sığır sütünden laktoperoksidaz (LPO E.C.1.11.1.7) enzimi CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B-L-trozin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. LPO üzerine 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid, 4-amino-3-metil ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid moleküllerinin IC_{50} değeri sırasıyla 346,5 μ M, 57,75 μ M, 11,36 μ M, 86,62 μ M ve 49,5 μ M olarak hesaplanırken, K_i değerleri ise sırasıyla 283,32 μ M, 6,74 μ M, 6,39 μ M 55,62 μ M ve 43,67 μ M olarak tespit edildi. 4-Amino-3-metil benzensülfonilamid yarışmasız inhibisyon gösterirken diğer moleküller yarışmalı inhibisyon gösterdi. İnhibisyon gösteren moleküllerin her biri için afinite jelleri hazırlanarak sığır sütünden LPO enziminin saflaştırma tabloları hazırlandı. Saflaştırma basamakları sonucunda 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan sığır sütü LPO enzimi %12 verimle 453 kat saflaştırılırken koyun sütü LPO enzimi %13 verimle 869 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant bulundu (80 kDa). 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan sığır sütü LPO için optimum pH 6,0, optimum sıcaklık 42°C, K_M değeri 0,13 mM ve V_{max} değeri 0,55 EÜ/ml.dk iken koyun sütü LPO için optimum pH 5,5, optimum sıcaklık 60°C, K_M değeri 0,74, mM ve V_{max} değeri 0,05 EÜ/ml.dk olarak tespit edildi. 2-Kloro-4-sülfamoyilanilin kolonu için LPO'nun bağlanma kapasitesi 15°C'de pH:8,5 ve 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 9,65 mg/g jel olarak belirlendi.

2014, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktoperoksidaz, Saflaştırma, Kinetik

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE ENZYME FROM BOVINE AND SHEEP MILK BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

Hande USANMAZ

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bovine milk Lactoperoxidase (LPO E.C.1.11.1.7) enzyme was purified by Sepharose 4B-L-tyrosine sulfanilamide affinity column chromatography that activated with CNBr. 2-Chloro-4-sulfamoylanil, 5-amino-1-naphthalene sulfanilamide, 4-amino-6-chloro-1,3-benzendisulfanilamid and 3-amino-4-chloro benzensulfonilamid showed the competitive inhibition IC_{50} values were calculated as respectively 346,5 μM , 57,75 μM , 11,36 μM , 86,62 μM and 49,5 μM . On the other hand K_i values determined were respectively 283.32 μM , 6,74 μM , 6,39 μM , 55,62 μM and 43,67 μM . 4-amino-3-methyl benzensulfonilamid inhibitor exhibited noncompetitive inhibition, but the others exhibited competitive inhibition. Affinity gels are prepared for each: inhibitor compound and LPO enzyme purification table were prepared from the bovine and sheep milk. As a result of purification steps through a column of 2-chloro-4-sulfamoylanil bovine milk LPO enzyme was purified 453 fold with 12% yield and sheep milk LPO enzyme was purified 869-fold with 13% yield. The purities of the purified enzymes were checked by SDS-PAGE and one band was found (80 kDa). For each enzyme bovine the milk LPO that purified from 2-chloro-4-sulfamoylanil column, optimum pH was 6,0, optimum temperature was 42°C, K_M values was 0,13 mM and V_{max} values was 0,55 EU / ml.dk while for sheep milk LPO optimum was 5,5, optimum temperature was 60°C, K_M value of 0,74 mM and V_{max} values of 0,05 EU / ml.dk were determined. Binding capacity of LPO by 2-chloro-4-sulfamoylanil column was determined 9,65 mg / g gel at 15°C pH: 8,5 and at a concentration of 0,35 M ionic strength.

2014, 85 pages

Keywords: Lactoperoxidase, Purification, Kinetics.

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. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanlığına, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda şİŞECİOĞLU'na

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL'a, ayrıca araştırma laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a (114Z030) teşekkür ederim.

Hande USANMAZ

Mart, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Peroksidazlar (POD:H ₂ O ₂ -Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7)	4
1.2. Laktoperoksidaz (LPO)	6
1.3. Afinite Kromatografisi	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
2.1. Çalışmanın Amacı	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	22
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	23
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. Protein tayini	28
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	28
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	28
3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite tayini	29
3.2.3. LPO için kullanılan inhibitörler	30
3.3. Sığır LPO Enzimi Üzerine Sülfanilamid Türevlerinin İnhibsyon Çalışmaları ...	32
3.3.1. Sığır LPO enzimi için KM ve Vmax değerlerinin bulunması.....	32
3.3.2. Kullanılan sülfanilamid türevleri için kinetik çalışmalar	33
3.4. Sığır ve Koyun Sütlerinden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	33
3.4.1. Afinite jelinin hazırlanması	33

3.4.1.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	34
3.4.1.b. Sülfanilamid türevlerinin kenetlenmesi.....	35
3.4.1.c. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	38
3.4.2. Enzimin kısmi saflaştırılması ve afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	38
3.5. Enzimin Saflığının Belirlenmesi	39
3.6. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile Hazırlanan Afinite Kolonunun LPO Tutma Kapasitesinin Bulunması.....	41
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	41
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	41
3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	42
3.7. Sığır ve Koyun Sütünden 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile Saflaştırılmış LPO Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar.....	42
3.7.1. Optimum pH çalışmaları	42
3.7.2. Optimum sıcaklık çalışması	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	43
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	43
4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları	43
4.2.1. LPO Enziminin sığır ve koyun sütünden sülfanilamid ve türevleri ile saflaştırma sonuçları.....	44
4.2.2. LPO enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	45
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	46
4.3. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma Sonuçları.....	46
4.3.1. ABTS substratı için pH-Aktivite grafiği	46
4.3.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	47
4.3.3. ABTS Substratı İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	48
4.4. Sülfanilamid Türevlerinin LPO Enzimi Üzerine K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunması.....	49
4.4.1. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları	50

4.4.1.a. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile afinite jelinden sığır LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	52
4.4.1.b. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin İle Afinite Jelinden Koyun LPO Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	53
4.4.1.c. ABTS substratı için pH-Aktivite grafiği	53
4.4.1.d. ABTS Substratı İçin Sıcaklık-Aktivite Grafiği	54
4.4.2. 5-Amino-1-Naftalin Sülfonilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları	55
4.4.3. 3-Amino-4-Kloro benzensülfanilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları.....	58
4.4.4. 4-Amino-3-Metil benzensülfonilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları.....	61
4.4.5. 4-Amino-6-Kloro-1,3-Benzendisülfanilamid İçin Sığır LPO Üzerine ABTS Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar ve Saflaştırma Sonuçları	64
4.5. Sığır ve koyun LPO için sülfanilamid türevi moleküllerin ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmaları ve hazırlanan afinite kolonlarının saflaştırma ve SDS-PAGE toplu sonuçları	67
4.6. Sığır Sütünden 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	68
4.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	68
4.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	69
4.6.3 İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ⁺	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
DMSO	: Dimetil sülfoksil
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
E.Ü.	: Enzim ünitesi
ESI	: Enzim inhibitör substrat kompleksi
I	: İnhibitör
LPO	: Laktoperoksidaz enzimi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
POD	: Peroksidaz
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Serbest radikal ve reaktif türlerin oluşumu.....	3
Şekil 1.2. LPO enziminin X-Ray kristalografi şekli	8
Şekil 1.3. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması	10
Şekil 1.4. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	10
Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	12
Şekil 1.6. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü	14
Şekil 3.1. LPO enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılan sülfanilamid türevleri ...	32
Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	34
Şekil 3.3. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kenetlenmesi	36
Şekil 3.4. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 5-amino-1-naftalin sülfonilamid kenetlenmesi.....	36
Şekil 3.5. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid kenetlenmesi	37
Şekil 3.6. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 4-amino-3-metil benzensülfonilamid kenetlenmesi	37
Şekil 3.7. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid kenetlenmesi	38
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	43
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	44
Şekil 4.3. LPO Enziminin sülfanilamid afinite kolonundan elüsyonu sonucundaki aktivite-tüp sayısı grafik.....	45

Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği.....	47
Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği.....	47
Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	48
Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 2-Kloro-4- Sülfamoyilanilin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	50
Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	51
Şekil 4.9. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği.....	53
Şekil 4.10. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık- Aktivite grafiği.....	54
Şekil 4.11. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	54
Şekil 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 5-amino-1- naftalin sülfonilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	56
Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-1-naftalin sülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	57
Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	58
Şekil 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	59
Şekil 4.16. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-3metil benzensülfonilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	61
Şekil 4.17. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-3metil benzensülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	62
Şekil 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ile elde edilen % Aktivite- Konsantrasyon grafiği.....	64

Şekil 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	65
Şekil 4.20. LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	67
Şekil 4.21. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoyilanilin jelinin sıcaklık-kapasite grafiği .	68
Şekil 4.22. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoyilanilin jelinin pH-kapasite grafiği.....	69
Şekil 4.23. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoyilanilin jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	13
Çizelge 1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller	16
Çizelge 4.1. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	46
Çizelge 4.2. Sığır sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	48
Çizelge 4.3. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.	50
Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratı ile 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	51
Çizelge 4.5. LPO enzimini üzerine 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin inhibitörünün inhibisyon etkisi	52
Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enziminin 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	52
Çizelge 4.7. Koyun sütü LPO enziminin 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	53
Çizelge 4.8. Koyun sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	55
Çizelge 4.9. 5-amino-1-naftalin sülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	55
Çizelge 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-1-naftalin sülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	56
Çizelge 4.11. LPO enzimini üzerine 5-amino-1-naftalin sülfonilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi	57

Çizelge 4.12. Sığır sütü LPO enziminin 5-amino-1-naftalin sülfonilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	57
Çizelge 4.13. 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	58
Çizelge 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	59
Çizelge 4.15. LPO enzimini üzerine 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	60
Çizelge 4.16. Sığır sütü LPO enziminin 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	60
Çizelge 4.17. 4-amino-3metil benzensülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	61
Çizelge 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-3metil benzensülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	62
Çizelge 4.19. LPO enzimini üzerine 4-amino-3metil benzensülfonilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	63
Çizelge 4.20. Sığır sütü LPO enziminin 4-amino-3-metil benzensülfonilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	63
Çizelge 4.21. 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	64
Çizelge 4.22. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	65
Çizelge 4.23. LPO enzimini üzerine 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	66
Çizelge 4.24. Sığır sütü LPO enziminin 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	66

Çizelege 4.25. Sığır ve Koyun LPO için sülfanilamid türevi moleküllerin ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmaları ve hazırlanan afinite kolonlarının saflaştırma toplu sonuçları	67
---	----

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerin katalizörleri olan enzimler kimyasal dönüşümleri sağlayan protein yapısında moleküllerdir. İnsan genomunun büyük bir kısmı enzimlerin şifrelerini bulundurur (Lehninger 2005). Enzimlerin en önemli fonksiyonları katalitik güçleri ve spesifik olmalarıdır. Enzimlerde katalizin gerçekleştiği bölüme aktif bölge denir. Aktif bölge enzimin substratını varsa kofaktörünü bağlayarak bağ yapabilme ve bağ kırabilme özelliği olan birimler içerir. Katalizör özelliğine sahip olan enzimler bir tepkimenin aktivasyon enerjisini azaltır ve böylece tepkime hızını çarpıcı şekilde artırır (Berg *et al.* 2014).

Enzimin katalizlediği reaksiyon, ona karşılık gelen ve katalizlenmeyen tepkimeden milyonlarca kat daha hızlıdır. Enzimler hem katalizledikleri tepkimeye ve tepkime sırasında kullandıkları substratlarına çok özgüdür. Protein yapısında olan bu moleküllerin katalizledikleri tepkimeler sonunda herhangi bir değişikliğe uğramazlar, tükenmezler ve reaksiyonun dengesini değiştirmezler. Enzimler moleküllerdeki bütün güçleri kullanarak substratları en uygun şekilde bir araya getirir kimyasal bağların yapımını ve kırılmasını sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Birçok enzimin aktivitesi için kofaktöre ihtiyaç vardır. Kofaktörler iki alt gruba ayrılır bunlar metaller ve koenzim denilen organik moleküllerdir. Vitamin kökenli olan koenzimler enzimlere sıkı veya gevşek bağlanabilirler. Koenzim enzime sıkı bağlı ise prostetik grup adını alır. Enzimler enerjinin bir formdan diğer bir forma dönüşümünü gerçekleştirirler. Örneğin fotosentez ile ışık enerjisi kimyasal bağ enerjisine çevrilir. Mitokondride gerçekleşen solunumda gıda maddelerinden elde ettiğimiz küçük moleküllerdeki serbest enerji hücrenin kullanabileceği serbest enerji şekline enzimler tarafından dönüştürülür (Bingöl 1983; Sigman and Boyer 1990).

Birçok enzimin aktiviteleri spesifik moleküllerin ve iyonların bağlanmasıyla inhibe edilebilir. Enzimlerin biyolojik sistemlerde inhibe olması kontrol mekanizmasıdır.

Ayrıca birçok ilaç toksik moleküller enzimleri inhibe edebilirler. Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzime sıkı bağlanır ve enzimle çok zor ayrılır. Bazı ilaçlar dönüşümsüz enzim inhibitörleridir. Geri dönüşümlü inhibisyonda inhibitör enzimden hızlıca ayrılabilir yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere iki kısımda incelenir (Berg *et al.* 2014). Yarışmalı inhibisyonda enzim substrata bağlanarak enzim-substrat (ES) kompleksi veya enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşturur, enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşmaz. Yarışmasız inhibisyonda inhibitör sadece enzim substrat kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda substrat derişiminin artırılması inhibisyonu azaltmaz (Gilbert 1992).

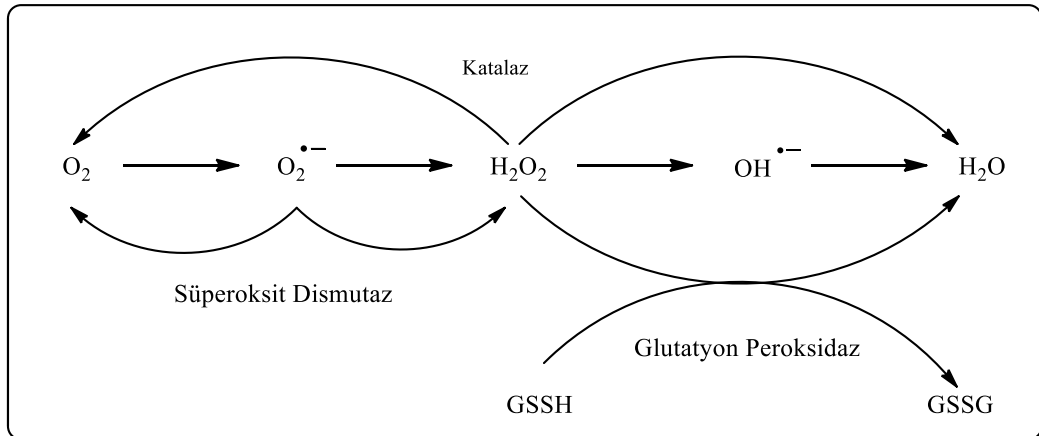
Canlı hücrelerde metabolik reaksiyonların yürüyebilmesi için, serbest radikallere ve oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı korunması gerekir. Bu koruma sisteminin başında, süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, proteazlar, fosfolipaz ve peroksidazlar gibi antioksidan enzimler ve tokoferol, ubikinon gibi antioksidan moleküller etkilidir. Antioksidan enzim ve moleküller aerobik hücrelerde lipid peroksidasyonu ve diğer serbest radikal aracılı reaksiyonları inhibe ederek hücreleri oksidatif strese karşı korurlar. Antioksidanlar, lipit peroksidasyonu gibi çoğu kronik hastalığın ilerlemesine engel olurlar (Gülçin *et al.* 2010a).

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren maddelerdir. Aktif olan radikaller, biyomoleküllere saldırarak onları oksitleyebilir ve biyolojik membran yapılarına zarar verebilirler. Moleküler oksijen aerobik organizma tarafından kullanılan ve elektronlar için büyük bir termodinamik itici gücün sağladığı yüksek afiniteden dolayı ideal bir son elektron alıcı moleküldür (Cheeseman and Slater 1993; Thomas 1995; Halliwell *et al.* 1996). Bu indirgenme sırasında zararlı bileşikler oluşabilir bunlardan biri süper oksit diğeri ise peroksittir. Her iki oluşan bileşikte hücreler için potansiyel bir yıkıcıdır. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bunlardan elde edilen hidroksil radikali (OH^{\cdot}) reaktif oksijen türü (ROS) olarak adlandırılır. ROS ise elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar ve oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik kaynaklı veya UV ışınları,

radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, beslenme, kanserojen maddeler gibi dış kaynaklı olabilir (Aksoy 2002; Gülçin 2012).

Oksijeni indirgeyen elektron transport zincirinin enzimi olan sitokrom C oksidaz ve diğer proteinlerin reaktif ara ürünlerin bırakılmamasında başarılı olmalarına karşın kaçınılmaz şekilde az miktarda süperoksit ve peroksit oluşturulmaktadır. Süperoksit dismutaz süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünde süperoksit toplayıcısı olarak önemli rolü üstlenir. Ökaryotiklerde bu enzim mitokondride ve sitoplazmada lokalize olmuştur. Mitokondride bu enzim bakır ve çinkoya bağlıdır. Süperoksit dismutaz ve farklı süreçlerle oluşturulan hidrojen peroksit katalaz enzimi tarafından yakalanarak moleküler oksijen ve suya dönüştürülür. Her iki enzimde oldukça etkili enzimlerdir. Glutatyon peroksidazda hidrojen peroksitin yakalanmasında önemli bir rol üstlenir (Doumonted and Rousset 1983).

Bunun yanında oksidatif zarara karşı vitamin E ve vitamin C etkili olup lipofilik olması nedeniyle vitamin E hücre membranlarının peroksidasyonundan korunmasında oldukça etkilidir. ROS'ların tehlikesi bilindiği halde yapılan son çalışmalar bu moleküllerin sinyal-iletim yollarının önemli bileşeni olduğunuda göstermektedir. ROS'ların bu zıt davranışı metabolizmanın karmaşıklığına örnek olup, potansiyel tehlikesi olan maddelerin faydalı reaksiyonlardan kullanılabileceğini göstermektedir (Miller 1996).



Şekil 1.1. Serbest radikal ve reaktif türlerin oluşumu

Serbest radikallerin özellikleri ve reaktif türlerin oluşumu Şekil 1.1’de özetlenmiştir. Metabolizma sırasında oluşan bu radikallerin giderilmesinde süper oksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimlerinin radikal söndürmede birinci derecede etkili olduğu gözükmektedir (Gökpınar *et al.* 2006). Hidroksil radikali (OH^\cdot), hidroksit iyonlarının nötral formudur. Bu radikal yaklaşık 10^{-9} s’lik yarılanma ömrü ile en reaktif tür olarak bilinir (Gülçin 2012). Hidroksil (OH^\cdot) radikali H_2O_2 ’in indirgenmesiyle oluşur (Fantal 1996; Halliwell and Gutteridge 1989; Nordberg and Arner 2001). Çok reaktif olan hidroksil ve hidroperoksil (HOO^\cdot) gibi radikaller lipid peroksidasyonunu başlatabilir ayrıca protein hasarı, enzim inhibisyonu ile denatürasyonuna sebep olur. (Stadtman 1992; Lenaz 2001; Gülçin 2008; Elmastas *et al.* 2006).

Süperoksit anyon radikali (O_2^\cdot), metabolizmada en fazla ve en kolay oluşan oksijen merkezli radikaldir (Halliwell 1989). Süperoksit anyon radikali (O_2^\cdot) süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon ile hidrojen peroksite dönüştürülür (Cadenas and Packer 1996). Hidrojen peroksit çok kolay oluşan membran yapısında lipid yapısını bozan metabolizmada peroksidasyon reaksiyonlarında kullanılan birçok bitki peroksidazları tarafından kullanılan moleküldür (Öztürk Sarıkaya 2009; Adam ve Yiğitoğlu 2012).

1.1. Peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7)

Metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türleri enzimler sayesinde zararsız moleküllere dönüşürler (Davies 1995, Champe *et al.* 2007). Peroksidazlar 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 aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu da katalizlerler. Bu moleküller arasında 2-krezol, 2-toluidin, guaiakol, pirogallol, homovonillik asit, hidrokinon, 1,2 ve 1,4-fenilendiamin, lökomalaşit yeşili, 2,6-diklorofenolin difenol, 4,4-diamino difenilamin, propiyonil promozin, benzidin, o-toluidin, di-o-anisidin ve bazı azo boya türevleri sayılabilir (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

Peroksidazlar çok yaygın olarak prokaryotlarda, ökaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunurlar. Farklı turp türlerinde, baklagillerde, tütün gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Birçok bitki türünden farklı peroksidaz izoenzimleride karakterize edilmiştir. POD; spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Fric 1976; Van Huystee 1987). Bitki peroksidazlar hücre duvarı proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), çimlenme (Morohashi 2000, savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2002), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi birçok fonksiyonda görev alırlar.

Memelilerdeki peroksidaz enzimleri; sütte tükürük bezlerinde ve göz yaşında LPO (Kumar and Bhatla 1995), lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde ve dalakta miyeloperoksidaz, uterus, akciğer duvarlarında, sitoplazma ve mitokondrilerde glutasyon peroksidaz, mikrozoimler ile lizozomlarda peroksidazlar lokalize olmuştur (Pütter and Becker 1987).

Organizmada peroksidazın ilk olarak protein kısmı sentezlenir ve enzim fonksiyonel değildir. Holoenzim, hem grubu ile apoprotein birleştirilmesi ile fonksiyonellik kazanır (Fric 1976; Van Huystee 1987). Peroksidazların prostetik gruplarının ilki protohemdir. Bu da birçok hemoprotein tersine olarak apoproteine sadece gevşek şekilde bağlıdır (Doumonted and Rousset 1983). 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 (Haliwell 1984; Robert *et al.* 1993). Antioksidan enzimler aynı zamanda serbest oksijen radikallerini gidererek biyolojik oksidatif hasarları engellediği bildirilmektedir (Harris 1992).

Peptid zinciri üzerindeki ikinci prostetik grup glikozid yan zincirleridir. Çoğu peroksidaz izoenzimleri moleküler ağırlıklarının %15-17'si kadar karbohidrat içerirler (Van Huystee 1987). Hem grubu ve glikozidik gruplara ilaveten kalsiyum (Ca^{2+}) iyonu da peroksidaz salınımları ve yapısal devamlılığı için gereklidir (Fric 1976; Van Huystee, 1987). Değişik araştırmacılar tarafından at turpu (horseradish) peroksidazın 31-33,8 kD molekül ağırlıkta olduğu ve hem grubuna ilaveten bir glikozid yan zincir içerdiği kaydedilmiştir (Van Huystee 1987).

Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar genel olarak aşağıdaki gibi gösterilmektedir (Van Huystee 1987).



Peroksidazlar metabolik reaksiyonların, enzimlerin fonksiyonu ve protein yapı çalışmalarında oldukça yaygın kullanılmaktadır. Çünkü aktivitelerinin kromojenik metodlarla kolay ölçülebilmesi ve sıcaklıklara karşı dayanıklı olma özelliklerinden ileri gelmektedir. (Hiraga *et al.* 2001). POD klinik tanı ve mikroanalitik uygulamalar, ilaç ve gıda sanayilerinde oldukça önemli bir enzim olarak sıklıkla tercih edilmektedir (Kwak *et al.* 1996).

1.2. Laktoperoksidaz (LPO)

LPO peroksidaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim sütte, tükürükte ve gözyaşında bulunan bir oksidoredüktaz olup, patojen mikroorganizmalara karşı yeni doğanların bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini korumada önemli bir role sahiptir. LPO inek ve insan sütünün normal bir bileşenidir. Memelilerin süt, tükürük ve gözyaşı bezleri ile bunlara ait salgılarda bulunmakta ve hem kimyasal hem de immünolojik olarak benzer özellikler göstermektedir (Kumar and Bhatla 1995). LPO bazik bir proteindir ve izoelektrik pH değeri 9,2'dir (Kussendrager and van Hooijdonk 2000).

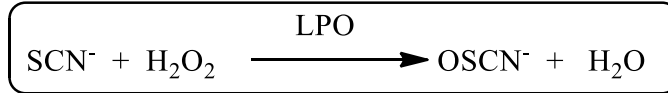
LPO, tiyosiyanatı hipotiyosiyanata okside etmek için, hidrojen peroksitten yararlanan, çeşitli anatomik kısımlarda aktive olan memeli peroksidazlarının bir üyesidir. LPO, 612 amino asit kalıntısı, tek bir hem protez grubu, dört veya beş karbonhidrat zinciri içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Paul *et al.* 1985) ve yaklaşık 85 kDa molekül ağırlığı ile toplam kütlede yaklaşık %10'unu oluşturur. (Elagamy *et al.* 1992; Reiter and HaÈrnulv, 1984; Sisecioglu, *et al.* 2010). Katalitik merkezdeki hem grubu protoporfirin IX dur ve polipeptid zincirine disülfid köprüsü boyunca kovalent olarak bağlanmıştır (Thanabal and La Mar 1989). LPO'daki demir bileşimi %0,07'dir (Booth *et al.* 1989).

Memeli sütlerinden edilen LPO enzimi, bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde oldukça önemlidir (Jacob *et al.* 1998). Sığır LPO'sunun bakteriyel büyümeyi inhibe etmesi, H₂O₂ ve tiyosiyanat içeren peroksidaz sistemine atfedilir (Jacob *et al.* 1998). Bu sistemin antimikrobiyal etkisi sütte doğal olarak oluşur (Haddain *et al.* 1996). LPO'nun gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine bakteristatik etkisi vardır. LPO enzimi üzerine yapılan antibakteriyel çalışmalarda LPO-tiyosiyanat ve peroksit sisteminin patojenik bakterilerde önemli derecede inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. LPO'nun birçok uygulama alanı vardır. LPO sistem hem gıdalarda hem de farmakolojik uygulamalarda koruyucu olarak kullanılabilen ve süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde kullanılmaktadır (Barrett *et al.* 1999).

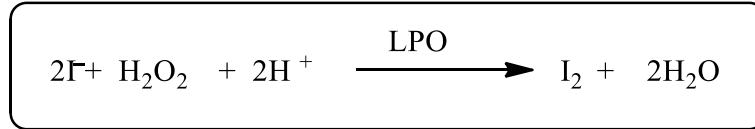
LPO H₂O₂ tarafından güçlü oksidan ve bakterisit maddeleri oluşturmak için, tiyosiyanat gibi halojenürler ve pseudohalojenürlerin oksidasyonunu katalize eder. Endojen hipotiyosiyanatın antibakteriyel hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizleyen LPO, süt ve tükürük gibi biyolojik sıvılar içinde bulunan antibakteriyel özelliklere sahip bir redoks enzimidir. (Cals *et al.* 1991; Jacob *et al.* 1998; Jacob *et al.* 2000).

LPO enziminin biyolojik önemi 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

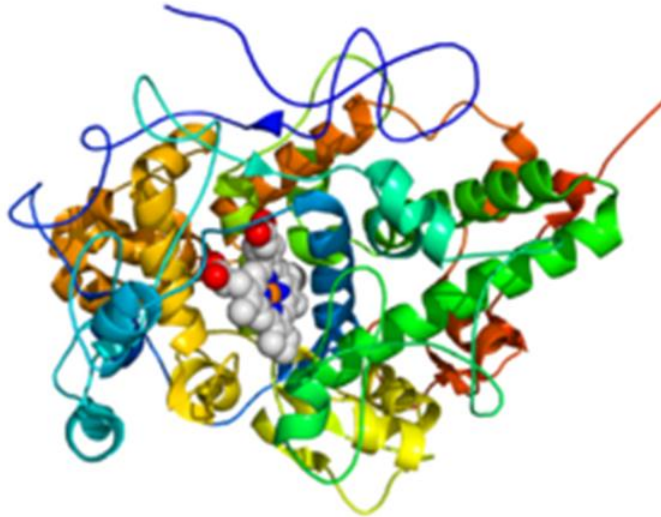
koruma sağladığı rapor edilmiştir (Reiter and HaÈrnulv 1984; Reiter and Perraudin 1991; Wolfson and Sumner 1993; de Wit and van Hooydonk 1996).Sütün en önemli enzimi LPO'dır (Pakkanen and Aalto 1997; Scammel 2001). LPO enzimi, aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyanat iyonunun antibakteriyal hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizler (Kumar and Bhatla 1995).



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



LPO enziminin X-Ray kristalografisi şekli (Her bir protein zinciri farklı renkte gösterilmiştir. Ayrıca hem grubu beyaz, azotlar mavi ve demir grubu portakal rengi ile ifade edilmiştir (Singh *et al.* 2007).



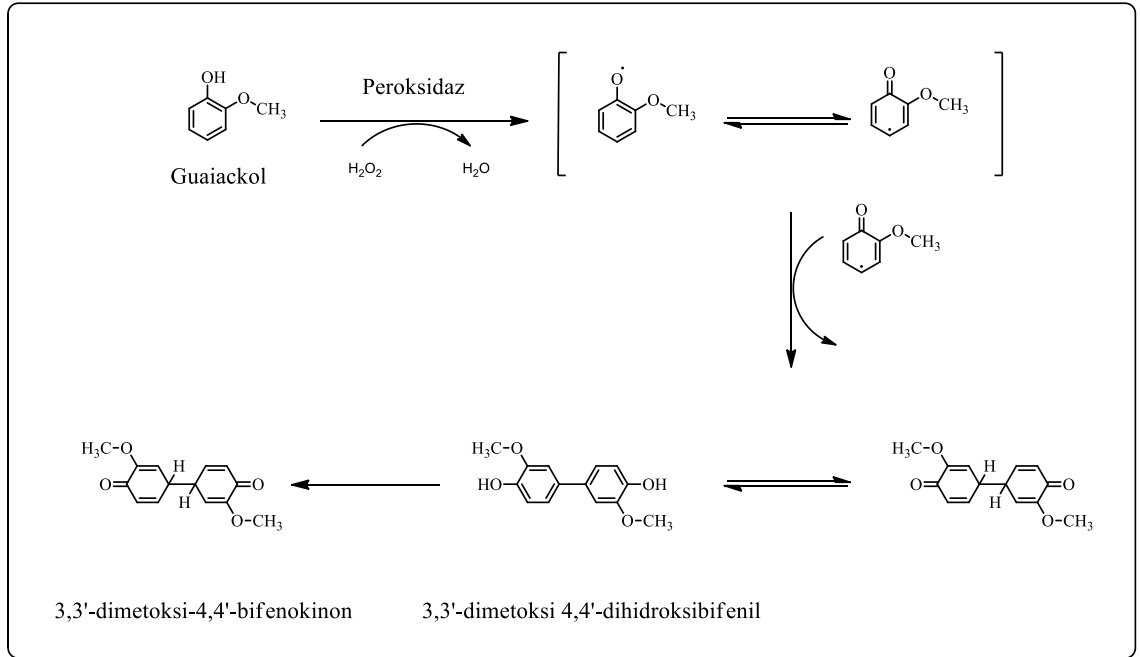
Şekil 1.2. LPO enziminin X-Ray kristalografisi şekli

Hem grubu proteine kovalent bağlıdır ve bu bağlanma hem grubunun hidroksil grubu ile proteinin karboksil grubu arasında meydana gelmektedir (Doumonted and Rousset 1983). Memeli sütleri lizozim, laktoferrin, immunglobulinler ve LPO gibi antimikrobiale faktörler içermesine bağlı yüksek biyolojik değere sahiptir (Elagamy *et al.* 1992).

LPO, tiyosiyanatı hipotiyosiyanata okside etmek için, hidrojen peroksitten yararlanan, çeşitli anatomik kısımlarda aktive olan memeli peroksidazlarının bir üyesidir. Katalitik merkezdeki hem grubu protoporfirin IX'dur ve polipeptid zincirine disülfid köprüsü boyunca kovalent olarak bağlanmıştır (Thanabal and La Mar 1989). LPO diğer peroksidazlar gibi H₂O₂ mevcudiyetinde fenoller, aromatik aminler, pirogallol, askorbat ve guaiacol gibi moleküllerin oksidasyonunu da katalizlerler (Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995).

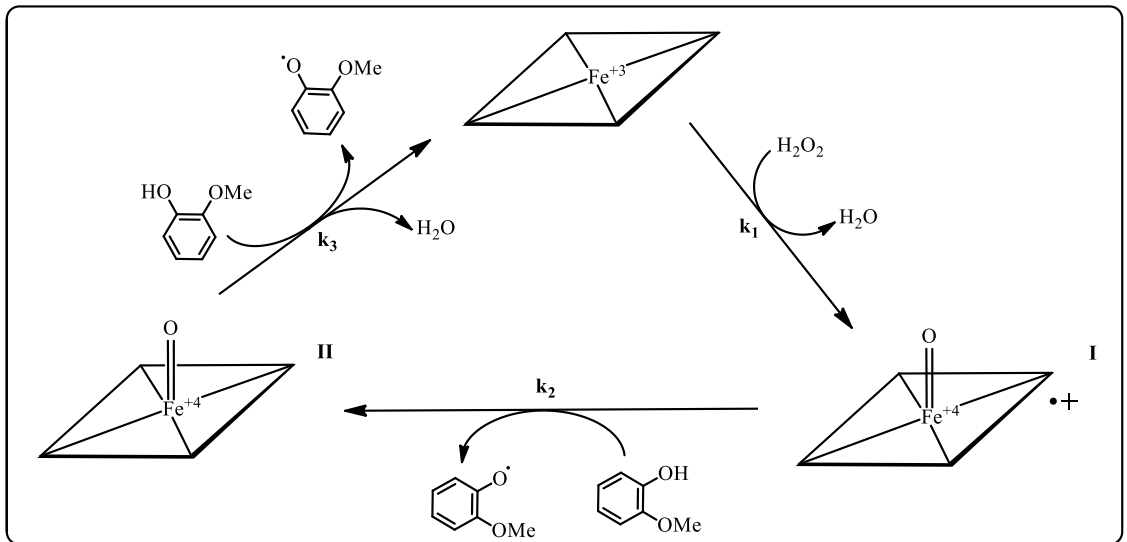
LPO H₂O₂ mevcudiyetinde yapılan çalışmada guaiacol oksidasyonunun mekanizması aydınlatılmış ve guaiacol'ün 3,3'-dimetoksi-4,4-bifenokinone'a okside olduğu bulunmuştur (Daniel *et al.* 1997).

En yaygın substratları arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit), guaiacol ve katekol gibi basit fenoller sayılabilir (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 sığır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge 1986).



Şekil 1.3. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması

Hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltildiği reaksiyon mekanizması üç basamakta gerçekleşir;



Şekil 1.4. Guaiakol substratı 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 (guaiakol) 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 (guaiakol) tekrar bir proton almak suretiyle indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimerleşirler (Veitch 2004).

1.3. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi saflaştırılması istenen molekülün bir destek materyaline (matriks) kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir ve bir adsorbsiyon kromatografisidir. Saflaştırılması birçok basamak isteyen birçok biyolojik materyal, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta çok yüksek bir verimde kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak, bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabi şekillerini ayırmak ve büyük miktarlardaki kirleticiyi, küçük miktardaki biyolojik materyallerden ayırmak için kullanılabilir.

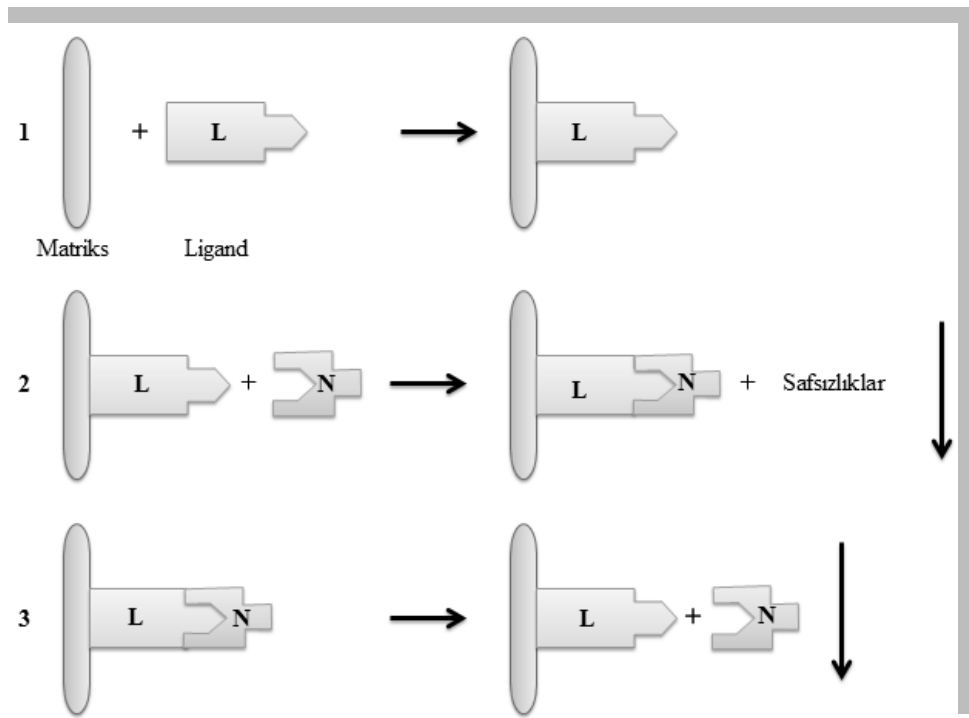
1910 yılında yapılan amilazın afinite kromatografisi ile saflaştırılması çalışmalarında, nişastaya adsorbsiyonu ile izolasyonu amaçlanmış ancak ligandların kovalent olarak bağlanacakları dayanıklı kolon materyalleri bulunmadığı için bu uygulama etkisiz kalmıştır. 1967'de Axen Porath Ernback primer amino grubu bulunduran moleküllerin, siyanojen bromürle aktifleştirilmiş polisakkarit matrikslerine bağlanabileceğini öngörmüştür. Bu çalışmalar afinite kromatografisinin ayırma teknikleri içerisinde kendisine önemli ölçüde etkil olabileceği sonuçlarını çıkarmıştır.

1972 yılında Pharmacia Fine Chemicals tarafından siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose jelini geliştirerek, immobilize edilecek ligandlar için dayanıklı ve hazır bir

ortam oluşturmuştur. Ayrıca günümüzde yapılan çalışmalarda farklı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla matrikslere immobilize edilen bir seri ligand elde edilmiş; böylece birçok biyolojik maddeyi ve hücreleri güvenilir şekilde ayırabilecek spesifik adsorbanlar hazır hale getirilmiştir (Axen *et al.* 1967).

Afinite kromatografisinin genel prensibi:

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.5’de özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin genel prensibi

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

Verimli bir ayırım yapabilmek için, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç vardır. İmmobilize edilecek ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalıdır. Safsızlıklar kolondan uzaklaştıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gerekmektedir.

Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Axen and Ernback 1971)

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

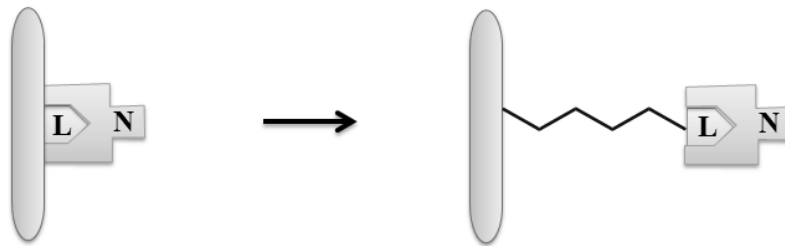
Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, bağlayıcı protein
Hormon, Vitamin	Reseptör taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini,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

Sephadex, Sepharose, Bio-gel agaroz jeli gibi birçok farklı matriks bu teknikte kullanılmaktadır. Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bir şekilde bağlanabilmesi için kolayca derivatize edilebilir ve en iyi jel Sepharose-4B’dir. Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlı olduğu için kullanılan jelin oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon göstermesi gerekir. Küresel ve rijit bir yapıya sahip olan sepharose jeli bu şartı sağlayan en iyi jeldir. Ayrıca sepharose jeli; yüksek ve düşük pH, deterjanlar ve disosiyatif maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklılık göstermektedir. Bazı durumlarda bu jel yerine yine bu jelin bir başka türevi kullanılabilir. Örneğin; organik çözücülerin, yüksek sıcaklıkların ve guanidin hidroklorür gibi parçalayıcı elüentlerin gerektiği durumlarda, kovalent şekilde çapraz bağlanmış Sepharose-CL jeli kullanmak daha idealdir (Cuatrecasas 1970).

Afinite kromatografisi için seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması gerekir. Ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. Ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır.

Seçilen ligandın, serbest çözeltilerde 10^{-4} - 10^{-8} M arasında maddeyi bağlama afinitesine sahip olması arzu edilen aralıktır. 10^{-4} M'dan daha büyük (bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilişki) ya da 10^{-8} M'dan daha küçük (bir hormon ve reseptörü arasındaki ilişki) ayrışma sabitine sahip olan etkileşmeleri içeren bir afinite kromatografisinde, bağlı olan maddeyi denatüre etmeden elüsyonunu yapmak oldukça zorlaşacaktır. Afinite kromatografisi için kullanılacak ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ise bu ligandın matrikse bağlandığı bölgede önemlidir. Bu bağlanma ligandın saflaştırılacak molekülle en düşük ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup ile matriks arasında yapılmalıdır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

Enzimlerin aktif bölgesi genellikle molekülün içi kısımlarına doğru yerleşmiştir. Bu yüzden küçük ligandların (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlanması sonucu hazırlanan adsorbanlarda, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında istenmeyen etkileşimler meydana gelebilir. Bu durumlar da istenmeyen bağlanmaları ortadan kaldırmak için ligand ile matriks arasına uzantı kolu adı verilen moleküller sokulur (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü

Uzantı kolunun işlevini tam olarak yerine getirebilmesi için uzunluğu çok önemlidir. Eğer uzantı kolu çok kısa olursa, kol etkisiz kalır ve ligand numunedeki saflaştırılacak maddeyi bağlayamaz. Aksine uzantı kolu çok uzun olursa, spesifik olmayan etkiler fazlalaşır ve böylece ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları çok uzun uzantı kolu kullanarak yaptığı deneyde, uzantı kolunun numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını gözlemlemiştir. Spesifik olmayan bu hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisi için arzu edilen bir durum değildir (Ocarra *et al.* 1974).

Ligandı bağlayacak jelin seçiminde; ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi ve saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilmelidir.

Normal bağlanma reaksiyonunu minimum oranda engellemek için, ligandın matrikse kovalent bağlanması, molekülün en az etkili bölgesinden yapılmalıdır. Örneğin, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları aracılığıyla bağlanabilir; bu sayede inhibitörün enzimle spesifik bağlanma afinitesi korunmuş olur. Şayet amino grupları bağlanma reaksiyonlarına girerlerse, inhibitör ile enzim arasındaki bağlanma istenmeyen başka bir grup tarafından gerçekleşecektir. Eğer liganlardaki bağlanma bölgeleri hakkında önceden bilgi bulunmuyorsa, deneme yanılma yöntemi ile bağlanma bölgesi belirlenebilir. Yaygın olarak ligandı immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bu gruplarla ligandların bağlanabileceği jeller Çizelge 1.3'de verilmiştir (Keha 1981).

Çizelge 1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller

Ligand	Fonksiyonel grup	Bağlanacak jel
Protein Peptid Aminoasit	Amino	CNBR ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		CH-Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH-Sepharose 4B
	Tiyol	Tiyopropil-Sepharose 6B
		Aktifleştirilmiş tiyol Sepharose
Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B		
Şeker	Hidroksil	Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Amino	CH-Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
Karboksil	AH-Sepharose 4B	
Polinükleotit	Amino	CNBR ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		Tiyopropil-Sepharose 6B

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Birçok araştırma grubunun amacı LPO enzimini saflaştırmak ve enzimin inhibitörlerini çalışmaktır (Özdemir and Uguz 2005; Özdemir *et al.* 2001; Shin *et al.* 2001). İnhibitör olarak etki gösteren farklı kimyasallar sığır LPO'su üzerinde çalışılmış ve birçoğunun enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir (Özdemir *et al.* 2002, 2003; Özdemir and Uguz 2005; Sisecioglu *et al.* 2011). Enzimi saflaştırmada kullanılan ilk metod tuz konsantrasyonu ile çöktürme esasına dayanmaktadır. Amonyum sülfat bu methodda yaygın kullanılan nötral tuzdur (Özdemir *et al.* 2001, 2003). Kromatoğrafik methodlardan ise iyon değişim, biyo afinite ve hidrofobik afinite kromatoğrafisi kullanılmıştır. İyon değişimin moleküler yükler için, biyo afinitenin ise biyomoleküler etkileşim için kullanıldığı rapor edilmiştir (Nandini and Rastogi 2010; Shin *et al.* 2001). Bu tür yöntemler için ilk hazırlık hücreleri parçalama ve santrifügasyon aşamalarıdır. Jel filtrasyon metodu ile moleküler ağırlık hesaplanmaktadır (Voet and Voet 1959).

LPO enziminin; farklı teknikler kullanılarak saflaştırılması birçok araştırma grubu tarafından denenmiş (Özdemir *et al.* 2001; 2002) ve insan, sığır, buffalo, keçi, koyun gibi bazı memeli sütlerinden (Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995; Jacob *et al.* 1998) ve aynı zamanda memelilerin tükürük (Monson *et al.* 1988) ve gözyaşından da saflaştırılarak bazı özellikleri ve katalizlediği reaksiyonlar araştırılmıştır.

Sığır sütü LPO'nun prostetik hem grubunun yapısal karakteristikleri (Rae and Goff 1998), sığır LPO aktivitesinin stabilizasyonu üzerine surfaktanların etkileri (Marcozzi *et al.* 1998), keçi sütünde LPO sistem komponentleri üzerine laktasyon günlerinin etkileri (Zapico *et al.* 1991), LPO vasıtasıyla norepinefrin peroksidatif oksidasyonu (Metodiwa *et al.* 1989), LPO tarafından tirozinin iyodasyonu mekanizması üzerine çalışmalar (Huber *et al.* 1989), tropik sıcaklıklarda ham sütün muhafazası için LPO sisteminin potansiyalizasyonu (Paricio *et al.* 1986), sütte lipoliz ve lipoprotein lipaz aktiviteleri üzerine LPO'nun etkisi (Ahrne *et al.* 1985), sirkular dikroizm ve farklı absorpsiyon spektroskopisi yöntemlerini kullanarak süt LPO'nun yapısının araştırılması (Sievers

1980) ve indol-3 asetik asitin perokside katalize singlet oksijen üretimi (Kanofsky 1988) vb. konular çalışılmıştır. Aynı zamanda insan kolestrumunda LPO enzimi immün afinite kolon kromatografisi kullanılarak çalışılmış, molekül ağırlığı sığır LPO enzimi ile aynı bulunmuştur (Langbakk *et al.* 1989).

LPO enziminin sığır sütünden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak literatürde bilinen birçok metod vardır. Örneğin, CM-Sephadex iyon-değişim kromatografisi (Özdemir *et al.* 2003; Uguz and Özdemir 2005), Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi (Shin *et al.* 2001; Özdemir and Uguz 2005), Fenil-Sepharose CL-4B üzerinde hidrofobik afinite kromatografisi (Langbakk and Flatmark 1984) ve Toyopearl-SP katyon değişim kromatografisi (Mecitoglu and Yemenicioglu 2007) sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler arasındadır. Bütün araştırmalar LPO'nun çok zaman alıcı ve çok karmaşık metodlarla saflaştırılabildiğini göstermektedir (Mecitoglu and Yemenicioglu 2007). Şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda %64 verimle 31 kat, %45 verimle 10 kat, %29 verimle 13,2 kat saflaştırılmıştır (Nandini and Rastogi 2010; Shin *et al.* 2001).

1983 yılında Doumonted ve Rousset tarafından, LPO enziminin saflaştırılması üzerine bir çalışma yapılmıştır. Ham sığır sütünü alarak ilk önce içerisinde bulunan kazeini uzaklaştırmışlardır. Bu işlem için litre başına 10 mg rennet ilave ederek oda sıcaklığında pıhtılaşma gerçekleşinceye kadar çalkalamışlardır. Bu işlemin dışındaki bütün kademeleri +4°C'de gerçekleştirmişlerdir. Pıhtılaşmış materyali daha sonra 2600xg'de 15 dakika santrifüj etmişler ve elde ettikleri çökeleği uzaklaştırmışlardır. Elde ettikleri süpernatantın her bir litresi için, su ile yıkanmış 40 ml Amberlit CG-50 (NH₄⁺ formunda) ilave edilerek 3 saat boyunca karıştırmışlardır. Daha sonra elde ettikleri Amberlit CG-50 çökeleğini ilk önce su ile daha sonra 50 mM'lık sodyum asetat tamponuyla yıkadıktan sonra bir kolona yükleyip 500 mM'lı asetat tamponuyla elüsyon toplamışlardır. Elde edilen elüatlara amonyum sülfat kullanılarak protein çöktürmesi yapmışlar ve amonyum sülfat ilavesi sonunda elde edilen çözeltiyi 3000xg'de 30 dakika santrifüj etmişlerdir. Santrifüj sonunda elde edilen çökeleği 100 mM'lık sodyum asetat tamponu ile çözmüşlerdir. Böylece hem grubu ihtiva eden ve hem grubu ihtiva etmeyen

ham LPO elde edilmiştir. Bundan sonraki basamakta elde edilen bu ürün 100 mM'lık sodyum asetat ile dengelenmiş Sephadex G-25 kolona yüklenmiş ve amonyum sülfat ortamdan uzaklaştırılmıştır. İkinci saflaştırma basamağı ürünü, Amberlit CG-50 kolonuna yüklenmiş ve 100 mM-1M sodyum asetatla gradientli elüsyon yapmışlardır. Böylece hem grubu ihtiva etmeyen LPO ile hem grubu ihtiva eden LPO birbirinden ayrılmıştır. Elde ettikleri son ürünü 3,2 mM'lık asetat tamponunda saklamışlardır (Dumonted and Rousset 1983).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, yağı alınmış sığır sütü ilk kademedede Amberlit CG-50 (4,4 g/150 mL) ile bir saat boyunca karıştırıldıktan sonra, ilk olarak su ile daha sonra 20 mM'lık sodyum asetat tamponuyla yıkadıktan sonra buchner erleni kullanılarak 500 mM'lı asetat tamponuyla ham LPO'yu elde etmişlerdir (Özdemir *et al.* 2003; Uguz and Özdemir 2005). Elde edilen bu ürün %90'lık amonyumsülfat doygunluğunda çöktürülerek, 3000xg'de 15 dakika santrifüj etmişlerdir. Daha sonra elde edilen bu ürün CM-Sephadex kolona yüklenmiş ve 100 mM-200 mM NaCl ihtiva eden 10 mM'lık fosfat tamponuyla gradientli elüsyon yapmışlardır. Elde edilen elüatları her defasında %90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutmuşlardır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen ürün son olarak, Sephadex G-100 kolona yüklenip 100 mM'lık fosfat tamponuyla elüsyon toplanmıştır. Elde ettikleri LPO enzimini 1M'lık fosfat tamponunda pH=6,8 saklamışlardır (Sisecioglu *et al.* 2010).

Sülfanilamid bileşikleri (R-SO₂-NH₂) asidik nitrojen gruplarına sahip heterosiklik aromatik iminlerden histidin ve imidazol ihtiva etmektedir (Drew 2000). Sülfanilamid insanlarda ve diğer türlerde çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve besin üreten hayvanların büyümesinde ek olarak kullanılmaktadır. Sülfanilamidler ilaçların önemli bir sınıfını teşkil eder ve antibakteriyel, antiglokomatöz, diüretik, hipoglisemik ve antitiroid etkiye sahip farmakolojik ajanlardır (Supuran 2002). Yeni sülfanilamid türevlerinin yapısal olarak bir proteaz inhibitörü özelliği gösterdiği bildirilmiştir (Supuran 2003).

Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye sülfanilamide kenetlemek kolay bir yöntemdir. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak sülfanilamid bileşiklerinden LPO enziminin afinite tekniği ile saflaştırılması şimdiye kadar yapılmamıştır. LPO üzerine yapılan en son saflaştırma tekniğinde ise, LPO'nun afinite tekniği ile tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ligand olarak da sülfanilamid kullanılmıştır (Atasever *et al.* 2013).

Yapılan çalışmada sülfanilamid bileşiklerinin LPO üzerine kinetik özellikleri ilk kez rapor edilmiştir. Sülfanilamidin LPO'nun güçlü ve yarışmalı geri dönüşümlü inhibitörü olduğu bulunmuştur. K_i değeri $3,55 \times 10^{-5}$ M ve IC_{50} değerinin 0,848 mM olduğu enzimin 428,57 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Atasever *et al.* 2013).

2.1. Çalışmanın Amacı

Bu tez kapsamında sığır sütünden LPO enzimi sepharose 4B-tirozin-sulfanilamid ligandı kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim üzerine ilk defa (2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid) sülfanilamid türevlerinin inhibisyon etkileri incelendi. Bu türevlerden afinite kolonu hazırlanarak sığır LPO enzimi üzerine inhibisyon gösteren moleküller için afinite kolonu hazırlandı ve afinite kolonlardan sığır ve koyun sütünden LPO enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi.

Mevcut tez kapsamında

- 1) LPO enzimi sığır sütünden sülfanilamid-sepharose 4B jeli kullanılarak saflaştırıldı.
- 2) Afinite ile saflaştırılan LPO enziminin aktivitesi üzerine 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamidin

inhibisyon kinetikleri üzerine çalışmalar yapılarak IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlendi.

3) İnhibisyon gösteren türev sülfanilamid moleküllerin her biri için afinite jelleri hazırlandı. Hazırlanan bu jellerden sığır ve koyun sütlerinden LPO enzimi saflaştırıldı.

4) Sığır ve koyun sütlerinden sülfanilamid türevleri ile en iyi verimde saflaştırma yapılan afinite kolonu için bağlanma kapasitesi üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreler belirlenip daha önce yapılan saflaştırma prosedürleri ile 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-etilbenzotiazolin-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, Glutaldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol, 2-kloro-4-sülfamoyilanolin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Sodyum perklorat, Sodyum azotür, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit, Triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptetanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den; sığır ve koyun sütü piyasadan sağlandı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım.

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

Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri;

Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO₃ pH=10 (CNBr ile aktiveleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanılan): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO₃ 200 ml destile suda çözüldü. 1 N 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 N NaOH ile

pH=8,8 kadar titre edilerek, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mililitreye tamamlandı.

3. 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) (Sülfanilamit türevlerinin kenetlenmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanılan): 1,211 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 litreye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 10 mM Na₂HPO₄ pH=6,8 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 2,68 g ($1 \cdot 10^{-3}$ mol) Na₂HPO₄·7H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye 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. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 ml litreye tamamlandı.

3. 1M NaCl/25mM Na₂HPO₄ pH=6,3 (LPO enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 200 ml destile suda çözüldü.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözeltiler

1. 5 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin şişirilmesinde kullanılan dengeleme tamponu): 0,68 g ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) NaCH₃COO·3H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

2. 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Süt reçine karışımının yıkanmasında kullanılan tampon): 2,72 g ($2 \cdot 10^{-2}$ mol) NaCH₃COO.3H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

3. 500 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Süt ve reçine karışımında bulunan ham enzim ekstraktının elüsyonu için kullanılan tampon): 68 g (0,5mol) NaCH₃COO.3.H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M Na₂HP0₄ pH=6,0 (ABTS hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 26,8 g (0,1 mol) Na₂HP0₄.7H₂O, 950 ml destile suda çözülecek. 1 N HCl ile pH>6,0'e kadar titre edilecek, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

2. 1mM ABTS çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi) : 0,055 g ($1 \cdot 10^{-4}$ mol) ABTS 100 ml 0,1 M Na₂HP0₄ 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 brillant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözülecek, bu

çözeltiyeye %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 N 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 N 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-merkapt etanol 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 glutalaldehit 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 hazırıldı.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

1. 21,9 mM 2-kloro-4-sülfamoyilanilin: 13,6 mg 2-kloro-4-sülfamoyilanilin tartılıp DMSO ile 3ml'ye tamamlandı.
2. 5,36 mM 4-amino-3-metil benzen-sülfonilamid: 1 mg 4-amino-3-metil benzen-sülfonilamid tartılıp DMSO ile 1 ml'ye tamamlandı.
3. 4,49 mM 5-amino-1-naftalin sülfonilamid: 1 mg 5-amino-1-naftalin sülfonilamid tartılıp DMSO ile 1 ml'ye tamamlandı.

4. 0,349 mM 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid: 1mg 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid tartılıp DMSO ile 3 ml'ye tamamlandı.

5. 0,0145 mM 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid: 3 mg 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid tartılıp DMSO ile 4 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Kromatografi sonucunda elüatlar kuvartz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorpsanları ölçüldü.

3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlenecek. 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). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden

bir olmak üzere kaydedildi. Her aktivite ölçümü 3 kez tekrar edildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M fosfat tamponu pH=6 konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanıldı. Aktivite tayininde aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

ϵ = Ekstinksiyon kat sayısı ($32400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

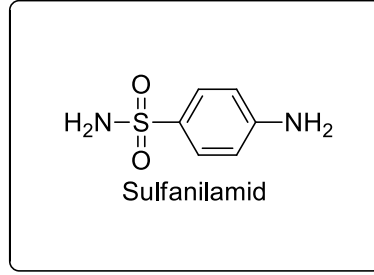
D_f = Seyreltme katsayısı

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

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

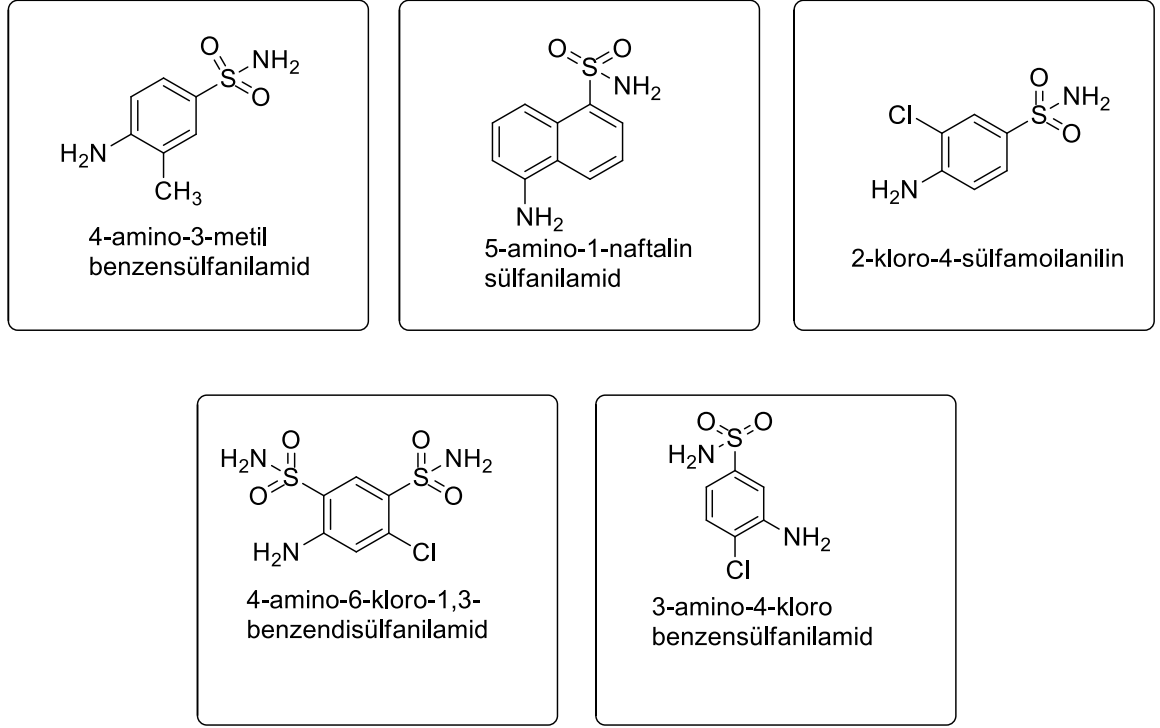
3.2.3. LPO için kullanılan inhibitörler

LPO enzimi üzerine yapılan çalışmalarda enzimin inhibitörleri tespit edilmiştir (Doerge 1986; Kumar and Bhatla 1995). Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri; Opipramol, Lofepamine, Dibenzepin, Protriptyline, Melitracen, Butriptyline, Dimetacrine, Dosulepin, Quinipramine, Seçici serotonin geri alım inhibitörleri arasında; Alaproclate, Etoperidone, Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri arasında; Moclobemide, Toloxatone, Isocarboxazid, Diğer antidepresanlar; Viloxazine, Minaprine, Bifemelane, Oxaflozane, Medifoxaminedir. LPO enziminin inhibitörlerinden biride mikroorganizmaları öldüren ve gelişmesini baskılayan sülfanilamid molekülüdür. Sülfanilamid LPO'nun yarışmalı bir inhibitörü olup ilk defa afinite kromatografisi tekniği ile ligand olarak LPO saflaştırılmasında kullanılmıştır (Atasever *et al.* 2013).



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

Bu çalışmadan hareketle diazonyum tuzu oluşturabilecek ve literatürde tespit ettiğimiz ve satın aldığımız saf sulfanilamid türevlerinin sığır LPO enzimi üzerine inhibisyonları araştırıldı. Şekil 3.1'den görüldüğü gibi sığır LPO enzimi üzerine (2-kloro-4-sulfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensulfonilamid, 5-amino-1-naftalin sulfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisulfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensulfonilamid) inhibisyonları incelenerek IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlendi. İnhibisyon gösteren sulfanilamid türevi moleküller için afinite kolonları sentez edilip daha iyi verimle sığır ve koyun LPO enziminin saflaştırılması sağlandı.



Şekil 3.1. LPO enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılan sülfanilamid türevleri

3.3. Sığır LPO Enzimi Üzerine Sülfanilamid Türevlerinin İnhibisyon Çalışmaları

3.3.1. Sığır LPO enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

Sepharose 4B-Tirozin-sülfanilamid afinite kolonundan saflaştırılmış LPO enzimi için öncelikle K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması yapıldı. 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 0,25 ile 1,5 ml aralıklarında 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 H_2O_2 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 tabloda gösterildi.

3.3.2. Kullanılan sülfanilamid türevleri için kinetik alışmalar

Sığır sütünden saflaştırılmış LPO enzimi üzerine ligand olarak kullanılması planlanmış sülfanilamid türevleri için inhibisyon kinetiklerine bakıldı. Bu amaçla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri ilk defa çalışıldı. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid molekülleri LPO enzimin saflaştırılmasında ligand olarak kullanılmadan önce K_i ve IC_{50} değerleri hesaplandı. Böylece saflaştırmada kullanılan bu türevler için detaylı kinetik özellikler de belirlenmiş oldu.

IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, sülfanilamid türevlerinin ABTS substratına bağlı olarak oda sıcaklığında ve optimum pH'da, doygun olmayan ABTS ($26,67 \cdot 10^{-2}$ mM) konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör zltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi. K_i değerlerinin tespit edilmesi ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla, oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve her bir sülfanilamid türevi için 3 farklı sabit konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulundu. Sülfonilamid türevlerinin inhibisyon gösterenleri için afinite kolonları hazırlandı.

3.4. Sığır ve Koyun Sütlerinden LPO Enziminin Saflaştırılması alışmaları

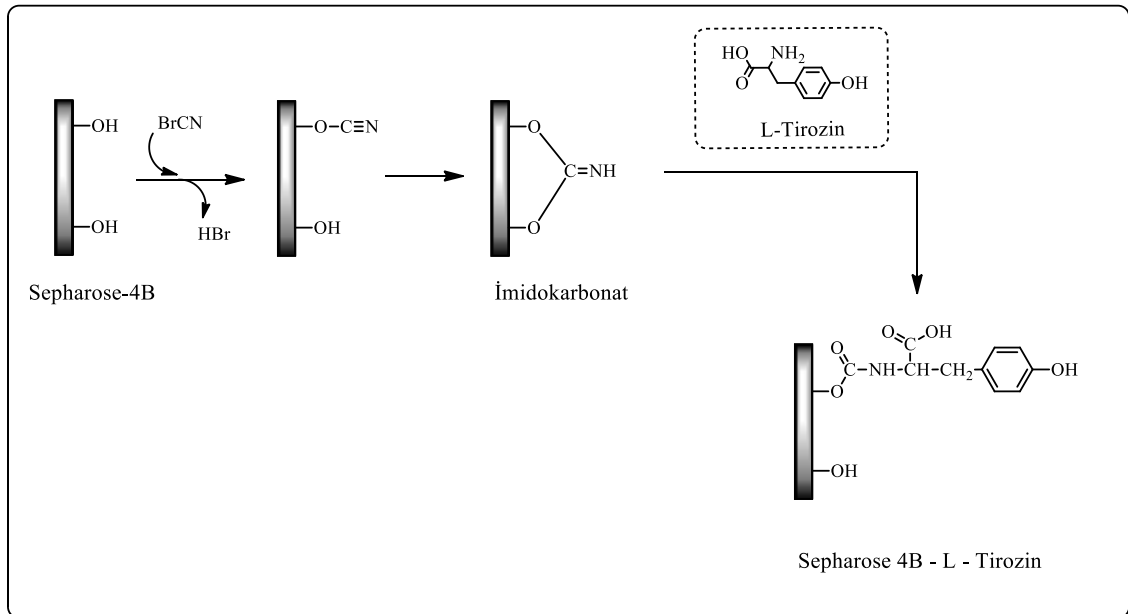
3.4.1. Afinite jelinin hazırlanması

2-Kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro

benzensülfonilamid moleküller için yapılan inhibisyon çalışmalarından sonra inhibitör etkisi gösteren türevler için afinite kolonları hazırlandı.

Bu amaçla CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi kullanıldı. Matrikse L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak takılarak daha sonra sulfanilamid türevi moleküller ayrı ayrı önceden hazırlanmış jeller diazollanarak tirozine kenetlendirildi. Bu kenetlenme esnasında diazonyum tuzları renkli bileşik oluşturmalarından dolayı afinite jellerinin renginin kırmızı-turuncu renge dönüşmesi ile kontrol edildi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

3.4.1.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

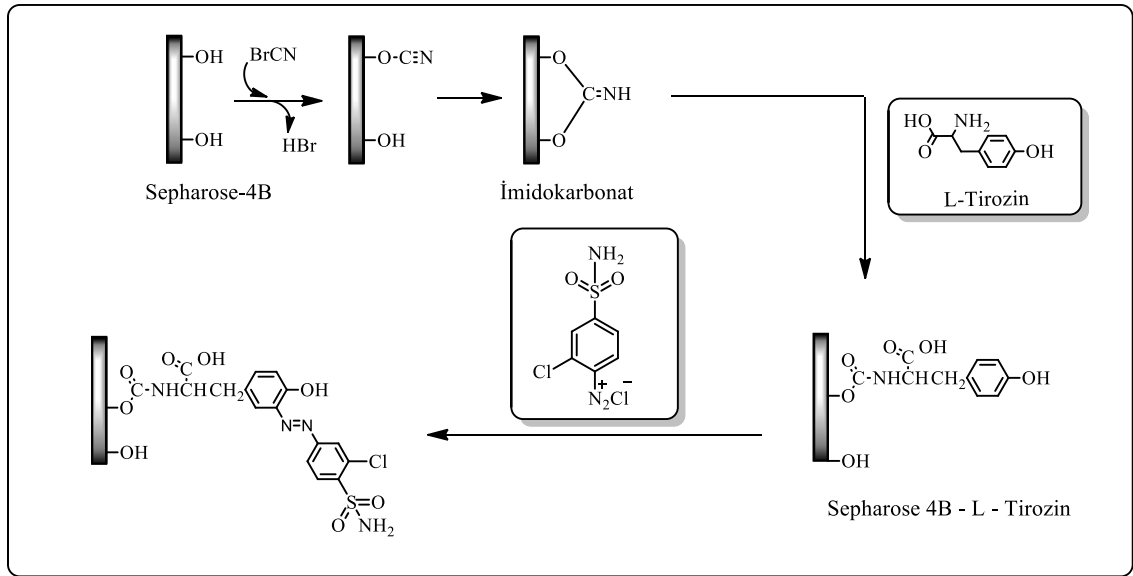


Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

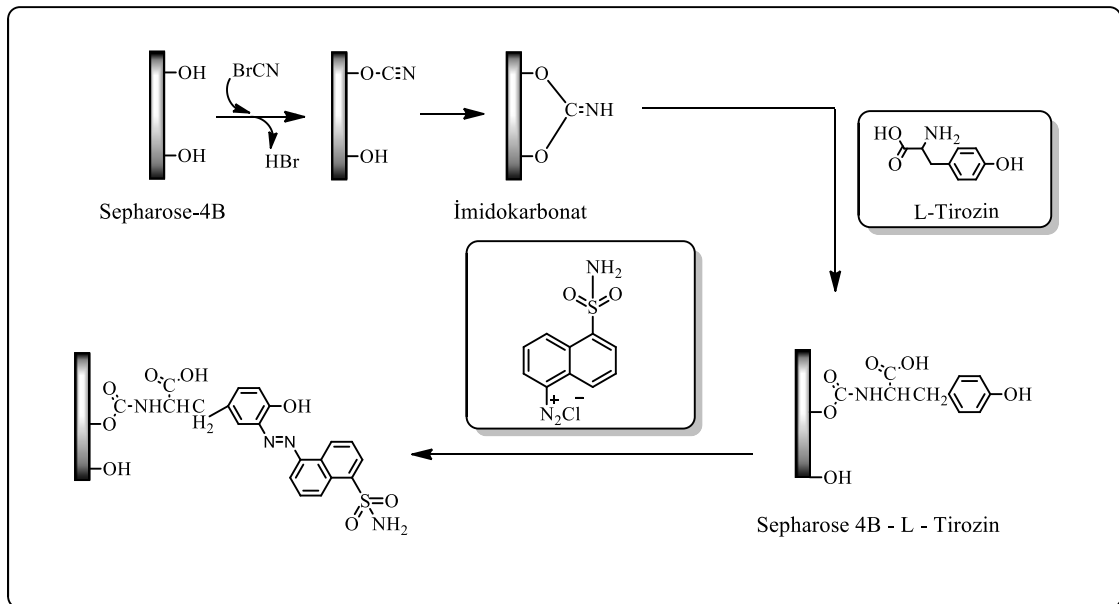
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorban vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı (Arslan *et al.* 1996; Atasever *et al.* 2013).

3.4.1.b. Sülfanilamid türevlerinin kenetlenmesi

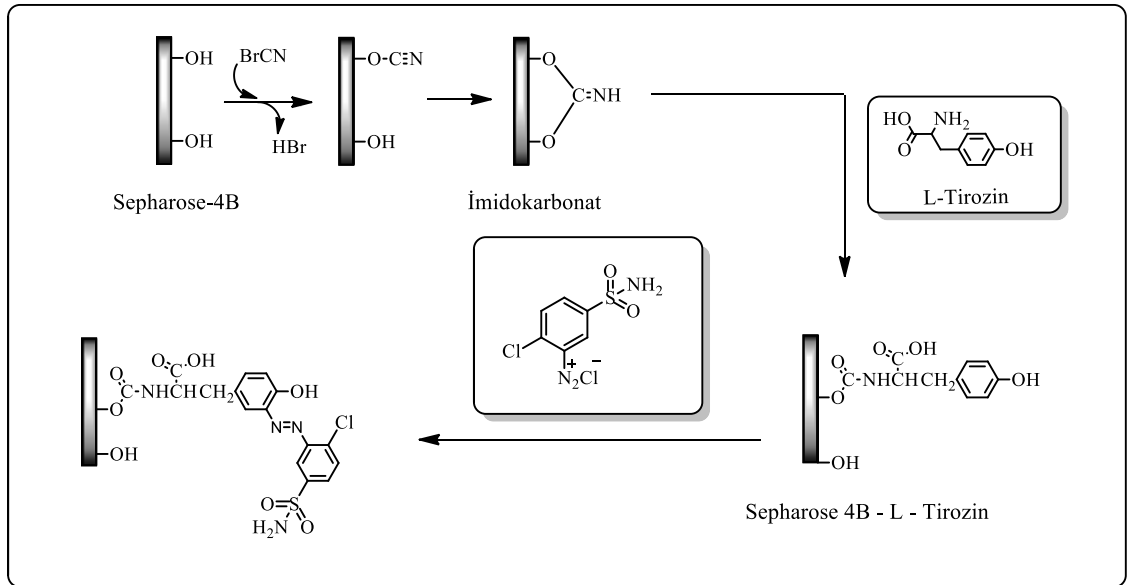
Şekil 3.3-3.7'den görüldüğü gibi sığır LPO enzimi üzerine inhibisyon gösteren (2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid) moleküllerin her birinden 25 mg alınarak 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, inhibitör çözeltilisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).



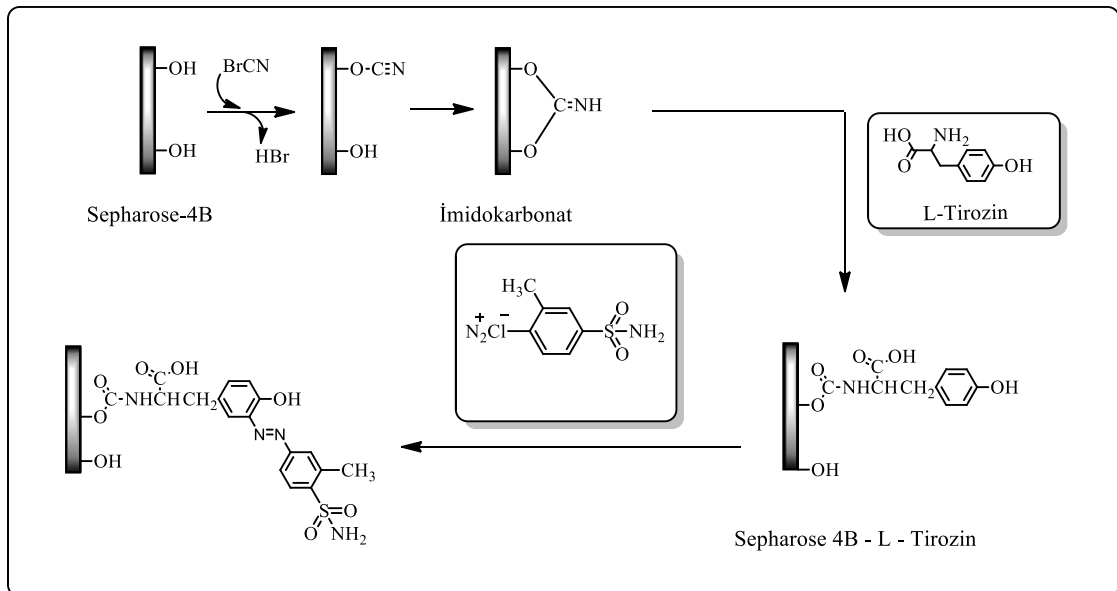
Şekil 3.3. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 2-kloro-4-sülfamoylanilin kenetlendirilmesi



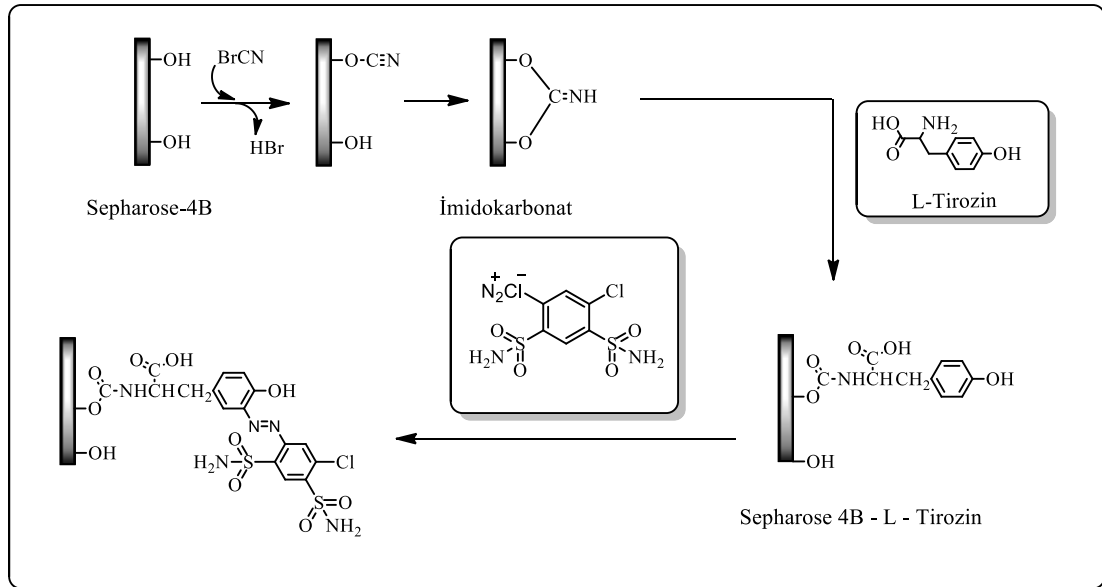
Şekil 3.4. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 5-amino-1-naftalin sülfonilamid kenetlendirilmesi



Şekil 3.5. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid kenetlendirilmesi



Şekil 3.6. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 4-amino-3-metil benzensülfonilamid kenetlendirilmesi



Şekil 3.7. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevi olan 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid kenetlendirilmesi

3.4.1.c. Afinitite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan afine jelleri jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7,8) içine alınarak jel süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havaları alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolonlara paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.4.2. Enzimin kısmi saflaştırılması ve afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Bir litre taze memeli sütü (sığır ve koyun) 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 katyon 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; Aygöl and Küfrevioğlu 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 litre destile suyla ve daha sonra 500 ml 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı. Reçineye bağlanmış protein çökeleği Buchner hunisine aktarılarak 200 ml 500 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözelti elüsyon yapıldı ve elde edilen ham ekstraktta Bradford yöntemiyle protein tayini ve aktivite ölçümü yapıldı.

Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenat 10 mM fosfat (pH=6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM fosfat (pH=6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece LPO enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış olur. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3) tamponu tatbik edilerek LPO enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.

3.5. Enzimin Saflığının Belirlenmesi

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

Bunun için elektroforez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kıskaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Ayırma ve yığıma jelleri hazırlandı.

Ayırma 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 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (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 enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit 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 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) ve fotoğrafı çekildi

3.6. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile Hazırlanan Afinite Kolonunun LPO Tutma Kapasitesinin Bulunması

Hazırlanan afinite jellerinden sığır ve koyun sütünden LPO enziminin saflaştırılması yapılarak saflaştırma tabloları hazırlandı. Hazırlanan bu tablolardan saflaştırma katsayısı en yüksek ve verimi iyi olan kolon materyali üzerine enzim tutma kapasitesi çalışmalarına bakıldı.

Hazırlanan jellerin proteini 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 afinite ile elde edilen LPO enzimi ile doyuruldu ve enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan LPO enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden LPO 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 belirlenerek (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

LPO enzimi için kolonlarda pH 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

Kolonların bağlanma kapasitelerini etkileyen iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH'sında ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı. İyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

3.7. Sığır ve Koyun Sütünden 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile Saflaştırılmış LPO Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar

3.7.1. Optimum pH çalışmaları

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

3.7.2. Optimum sıcaklık çalışması

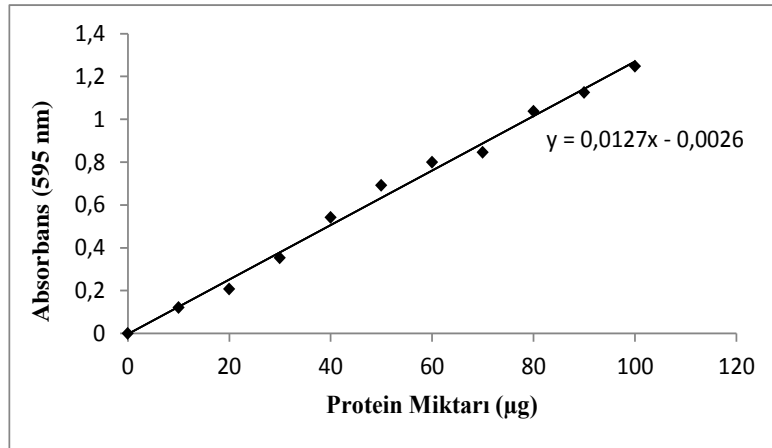
Optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla, afinite kolonlarından saflaştırılan LPO enzimi için 5-85°C sıcaklık aralığında ve optimum pH'da doygun substrat konsantrasyonlarında LPO enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. Bu işlem için -20 ile 100°C'ye ayarlanabilen su banyosu kullanıldı. İstenilen sıcaklığa getirilen aktivite ölçüm ortamına en son olarak enzim çözeltisi pipetlendi ve kronometre çalıştırılarak bir dakika sonra spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Afinite kolonlardan saflaştırılan LPO enziminin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Afinite kromatografisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1'deki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



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

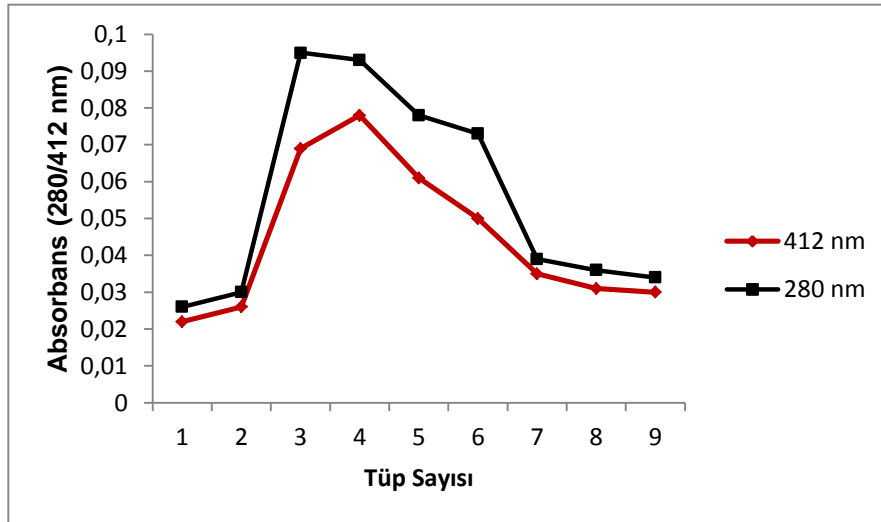
4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

Bu tez kapsamında öncelikle sığır LPO enzimi sepharose 4B-tirozin-sulfanilamid jeli hazırlanarak saflaştırıldı ve (2-kloro-4-sülfamoyilanolin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid) sülfanilamid türevlerinin

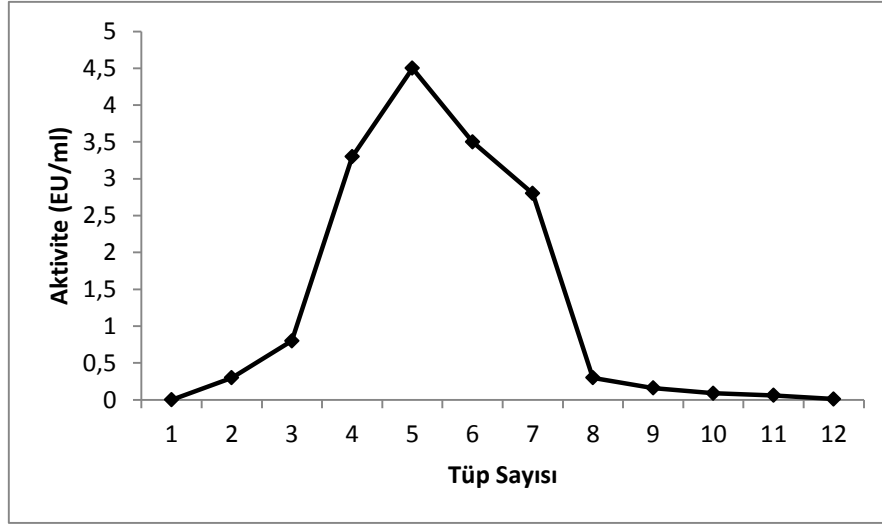
inhibisyon etkileri incelendi. Bu türevlerden inhibisyon etkisi gösteren moleküller için afinite kolonu hazırlanama prosedürü aşağıdaki şekilde yapıldı.

4.2.1. LPO Enziminin sığır ve koyun sütünden sülfanilamid ve türevleri ile saflaştırma sonuçları

Bölüm 3.4.1.b’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.4.2’de Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenattan 50 ml, dengelenmiş kolonlara pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 60 ml/saat’e ayarlanarak fraksiyon kollektör yardımı ile 5’er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm’deki absorbens değerleri ölçülerek R_z değeri ($R_z=A_{412}/A_{280}$) 0,60 den büyük olan tüpler birleştirildi. Kolonlardan sadece sülfanilamid kolonundan sonuç alındığı tespit edildi ve 280 ve 412 nm’de ölçülen absorbens 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’te gösterildi.



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



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

4.2.2. LPO enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Bölüm 3.4.1.b’de anlatıldığı gibi hazırlanan jeller kolono paketlendikten sonra 10 mM Na_2HPO_4 pH:6,8 fosfat tamponu ile dengelendi. 3.4.2’de belirtildiği gibi Amberlite CG 50 H^+ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenatın 50 ml’si kolona tatbik edildi ve kolonlar 400 ml 25 mM fosfat (pH:6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece LPO enziminin kolonlara tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM Na_2HPO_4 (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek LPO enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat’e ayarlandı.

Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5’er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm’de absorbans değerleri köre karşı ölçülerek, R_z değeri ($R_z=A_{412}/A_{280}$) 0,6’den büyük olan tüpler birleştirildi ve %90 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve diyaliz edildi ve SDS elektroforezi yapılarak saflığı kontrol edildi.

Ligand olarak sülfanilamid kullanılan kolondan, sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılma kademelerinde Shindler ve Bardsley yönteminiyle (Shindler and Bardsley

1975) 412 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. LPO enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1’de gösterildi.

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 Elüsyonu	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

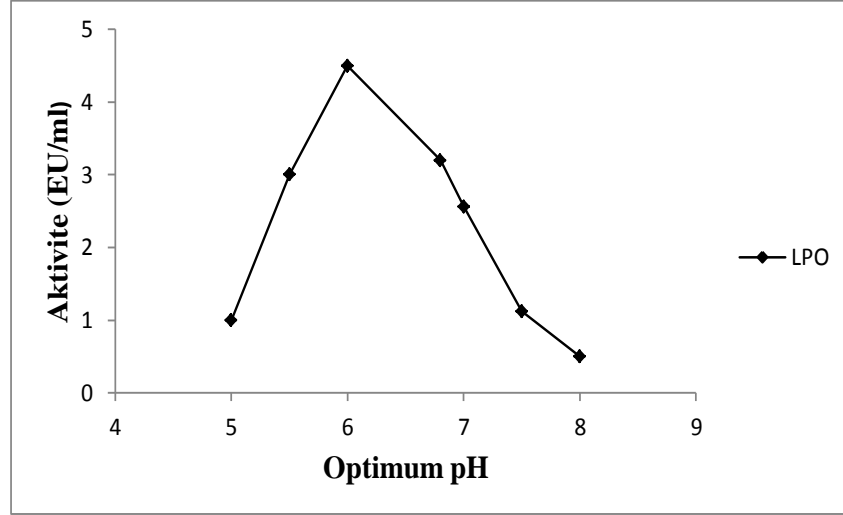
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu sülfanilamid kolonu ile sığır sütünden saflaştırılan LPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.5’te anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforezine saflaştırılan LPO’lar yerleştirildi ve sonucu Şekil 4.20’de verildi.

4.3. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma Sonuçları

4.3.1. ABTS substratı için pH-Aktivite grafiği

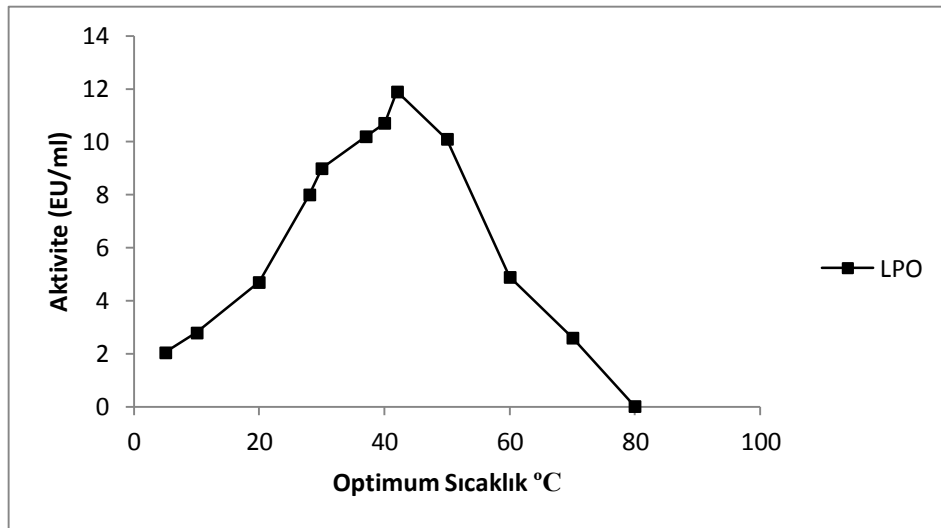
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde pH 5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Sığır sütünden elde edilen ölçümler sonucunda aktivite değerleri ile pH grafiği Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.3.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.5’de verildi.

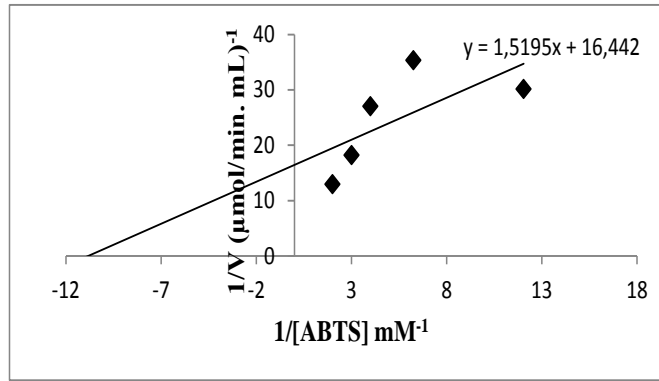


Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği

4.3.3. ABTS Substratı İçin 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 4.6'da gösterildi sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi.

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. Sığır sütünden hazırlanan homojenat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'ten elde edilen denklemden hesaplandı.



Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.2. Sığır sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

Kinetik Çalışmalar	
K_M (mM)	0,13
V_{max} (EÜ/ml.dk)	0,55

4.4. Sülfanilamid Türevlerinin LPO Enzimi Üzerine K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunması

Sığır sütünden saflaştırdığımız LPO enzimi üzerine sülfanilamid türevi moleküllerin kinetik özellikleri incelendi. İnhibisyon etkisi gösteren türev moleküller için bölüm 3.4.1.b'de anlatılan prosedürler kullanılarak afinite kolonları hazırlanarak sığır ve koyun sütünden LPO enzimi saflaştırılması yapıldı.

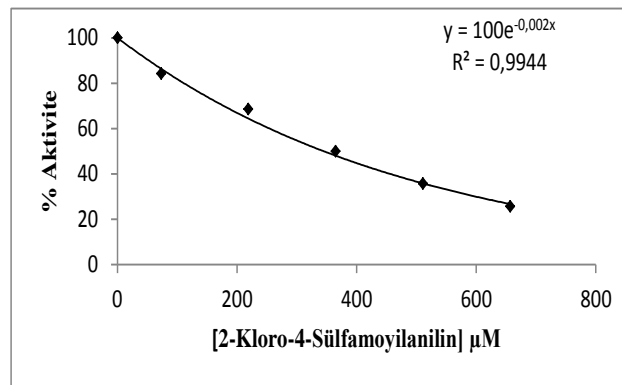
Bu çalışmada (2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid) sülfonilamid türevleri satın alınarak stok konsantrasyonları hazırlandı. LPO enzimi üzerine ABTS substratı kullanılarak inhibisyon 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 konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.3-4.9-4.13-4.17-4.21'de gösterildi ve % aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.7-4.12-4.14-4.16-4.18'de gösterildi.

4.4.1. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları

Çizelge 4.3. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.

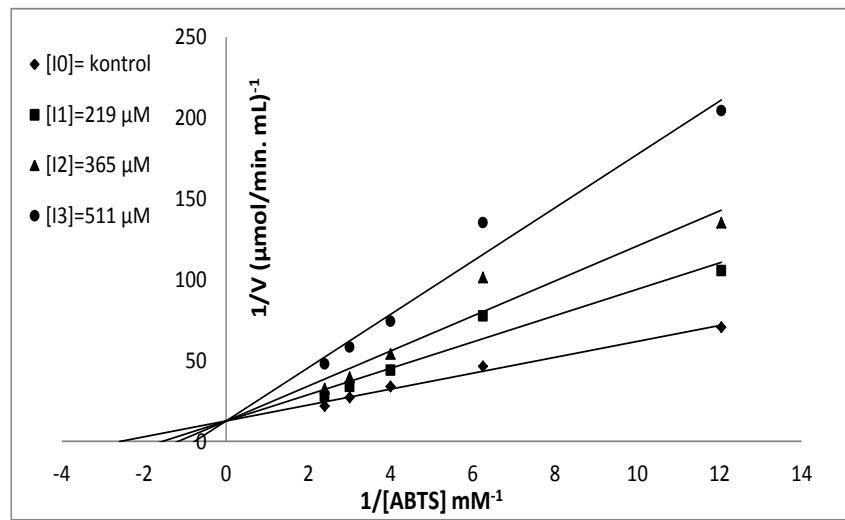
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] μ M
	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	ABST (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,89	0,1	0,01	2,0	0,84	0,1	0,01	0,05	86	73
	2,0	0,87	0,1	0,03	2,0	0,82	0,1	0,03	0,05	69	219
	2,0	0,85	0,1	0,05	2,0	0,80	0,1	0,05	0,05	50	365
	2,0	0,83	0,1	0,07	2,0	0,78	0,1	0,07	0,05	36	511
	2,0	0,81	0,1	0,09	2,0	0,76	0,1	0,09	0,05	26	657



Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratı ile 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V (\mu\text{mol}/\text{ml. min})^{-1}$	$1/S \text{ mM}^{-1}$
İnhibitör	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)		
[I] ₁	0,25	2,62	0,1	0,03	0,25	2,57	0,1	0,03	0,05	105	12,48
	0,50	2,37	0,1	0,03	0,50	2,32	0,1	0,03	0,05	77	6,25
	0,75	2,12	0,1	0,03	0,75	2,07	0,1	0,03	0,05	44	4,00
	1,00	1,87	0,1	0,03	1,00	1,82	0,1	0,03	0,05	34	3,00
	1,25	1,62	0,1	0,03	1,25	1,57	0,1	0,03	0,05	28	2,40
[I] ₂	0,25	2,60	0,1	0,05	0,25	2,55	0,1	0,05	0,05	135	12,48
	0,50	2,35	0,1	0,05	0,50	2,30	0,1	0,05	0,05	101	6,25
	0,75	2,10	0,1	0,05	0,75	2,05	0,1	0,05	0,05	54	4,00
	1,00	1,85	0,1	0,05	1,00	1,80	0,1	0,05	0,05	40	3,00
	1,25	1,60	0,1	0,05	1,25	1,55	0,1	0,05	0,05	32	2,40
[I] ₃	0,25	2,58	0,1	0,07	0,25	2,53	0,1	0,07	0,05	204	12,48
	0,50	2,33	0,1	0,07	0,50	2,28	0,1	0,07	0,05	135	6,25
	0,75	2,08	0,1	0,07	0,75	2,03	0,1	0,07	0,05	74	4,00
	1,00	1,83	0,1	0,07	1,00	1,78	0,1	0,07	0,05	58	3,00
	1,25	1,58	0,1	0,07	1,25	1,53	0,1	0,07	0,05	47	2,40



Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.5. LPO enzimini üzerine 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon türü
2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin	346,5	± 283,32	Yarışmalı

4.4.1.a. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile afinite jelinden sığır LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

Yukardaki sonuçlardan görüldüğü üzere sığır LPO enzimi üzerine 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin kompetitif inhibisyon göstermiştir. İnhibisyon etkisi gösteren 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile bölüm 3.4.1.b’de anlatılan prosedüre göre afinite jeli ve bölüm 3.4.2’ye göre homojenat hazırlanarak koyun ve sığır sütü LPO enzimi için saflaştırma tabloları Çizelge 4.6 – 4.7’de ve SDS-PAGE sonuçları Şekil 4.20’de verdi.

Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enziminin 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/ml)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Amberlit CG 50 H ⁺ Reçinesi Elüsyonu	55,00	4,90	15,00	269,50	825	0,32	100	1.00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	3,20	0,022	32,00	0,22	145,00	12,00	453,00

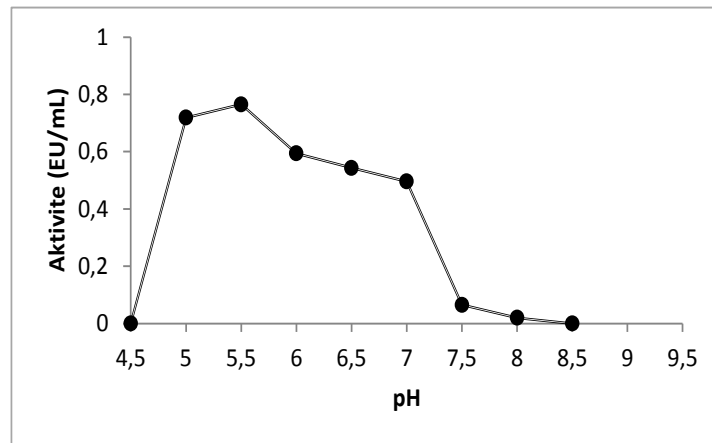
4.4.1.b. 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin İle Afinite Jelinden Koyun LPO Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

Çizelge 4.7. Koyun sütü LPO enziminin 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/ml)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Amberlit CG 50 H ⁺ Reçinesi Elüsyonu	55,00	2,40	15,00	132,00	825,00	0,16	100	1,00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	1,67	0,012	16,70	0,12	139,00	13,00	869,00

4.4.1.c. ABTS substratı için pH-Aktivite grafiği

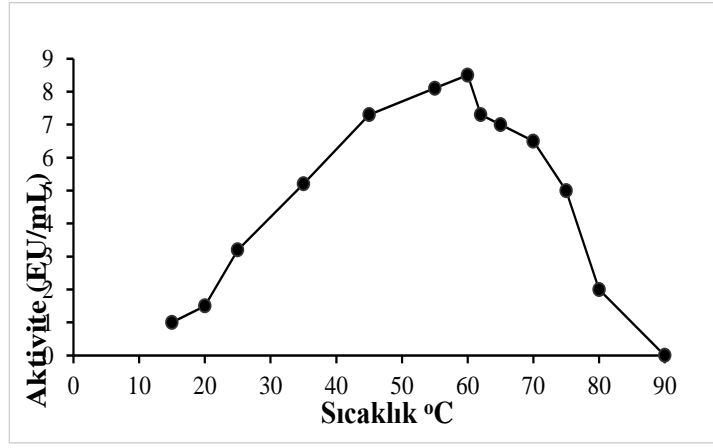
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde pH 5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Sığır sütünden elde edilen ölçümler sonucunda aktivite değerleri ile pH grafiği Şekil 4.9’da verildi.



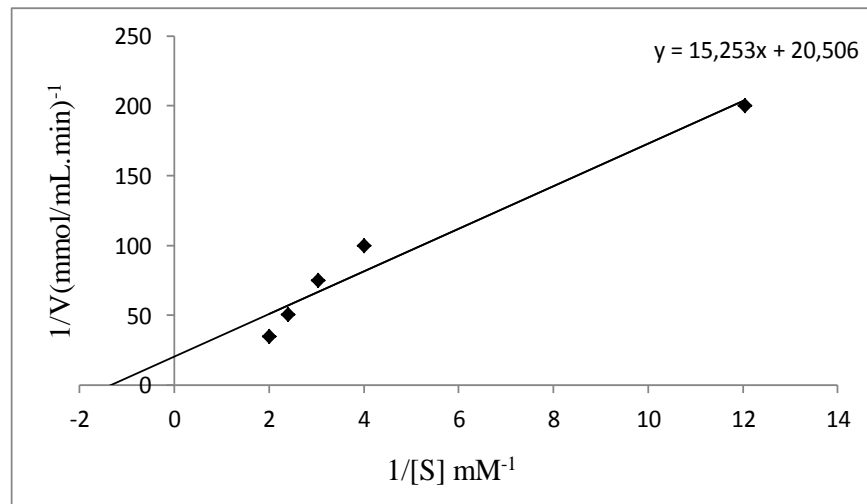
Şekil 4.9. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.4.1.d. ABTS Substratı İçin Sıcaklık-Aktivite Grafiği

Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.10’da verildi.



Şekil 4.10. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği



Şekil 4.11. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen 1/V-1/[S] grafiği

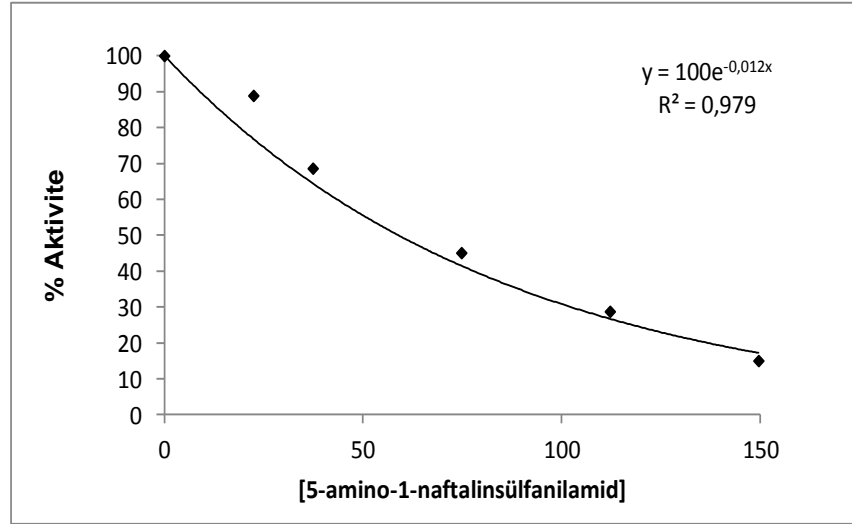
Çizelge 4.8. Koyun sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

Kinetik Çalışmalar	
K_M (mM)	0,05
V_{max} (EÜ/ml.dk)	0,74

4.4.2. 5-Amino-1-Naftalin Sülfonilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları

Çizelge 4.9. 5-amino-1-naftalin sülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

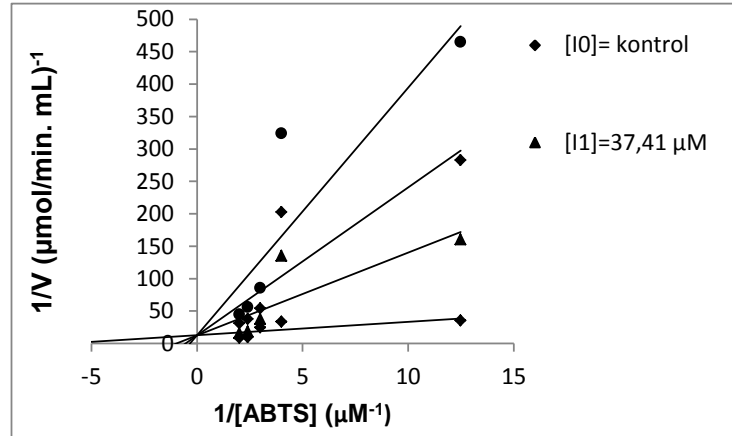
	Kör Tüpü				Numune Tüpü				% Aktivite	[I] nM		
	İnhibitör	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)			İnhibitör (ml)	LPO (ml)
5-amino-1-naftalin sülfonilamid		2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100	0
		2,0	0,885	0,1	0,015	2,0	0,835	0,1	0,06	0,05	89	22
		2,0	0,875	0,1	0,030	2,0	0,825	0,1	0,03	0,05	69	37
		2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,800	0,1	0,05	0,05	45	73
		2,0	0,825	0,1	0,070	2,0	0,775	0,1	0,07	0,05	29	112
		2,0	0,800	0,1	0,100	2,0	0,750	0,1	0,10	0,05	15	150



Şekil 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 5-amino-1-naftalin sülfonilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-1-naftalin sülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V(\mu\text{mol}/\text{ml. min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
İnhibitör	ABTS (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H_2O_2 (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H_2O_2 (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
[I] ₁	0,25	2,625	0,1	0,025	0,25	2,575	0,1	0,025	0,05	160	12,4
	0,75	2,125	0,1	0,025	0,75	2,075	0,1	0,025	0,05	135	4,0
	1,00	1,875	0,1	0,025	1,00	1,825	0,1	0,025	0,05	38	3,0
	1,25	1,625	0,1	0,025	1,25	1,575	0,1	0,025	0,05	19	2,4
	1,50	1,375	0,1	0,025	1,50	1,325	0,1	0,025	0,05	16	2,0
[I] ₂	0,25	2,600	0,1	0,050	0,25	2,550	0,1	0,050	0,05	282	12,4
	0,75	2,100	0,1	0,050	0,75	2,050	0,1	0,050	0,05	202	4,0
	1,00	1,850	0,1	0,050	1,00	1,800	0,1	0,050	0,05	54	3,0
	1,25	1,600	0,1	0,050	1,25	1,550	0,1	0,050	0,05	37	2,4
	1,50	1,350	0,1	0,050	1,50	1,300	0,1	0,050	0,05	31	2,0
[I] ₃	0,25	2,575	0,1	0,075	0,25	2,525	0,1	0,075	0,05	465	12,4
	0,75	2,075	0,1	0,075	0,75	2,025	0,1	0,075	0,05	324	4,0
	1,00	1,825	0,1	0,075	1,00	1,775	0,1	0,075	0,05	85	3,0
	1,25	1,575	0,1	0,075	1,25	1,525	0,1	0,075	0,05	56	2,4
	1,50	1,325	0,1	0,075	1,50	1,275	0,1	0,075	0,05	45	2,0



Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 5-amino-1-naftalin sülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.11. LPO enzimini üzerine 5-amino-1-naftalin sülfonilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon türü
5-amino-1-naftalin sülfonilamid	57,75	± 6,74	Yarışmalı

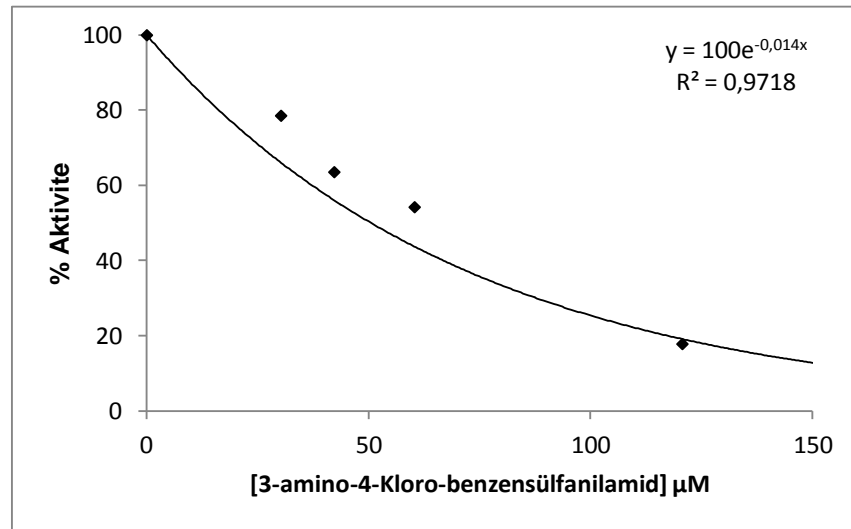
Çizelge 4.12. Sığır sütü LPO enziminin 5-amino-1-naftalin sülfonilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

	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 Elüsyonu	55,00	1,23	15,00	67,87	825,00	0,08	100	1,00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	1,54	0,05	15,43	0,54	29,00	23,00	353,00

4.4.3. 3-Amino-4-Kloro benzensülfanilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları

Çizelge 4.13. 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

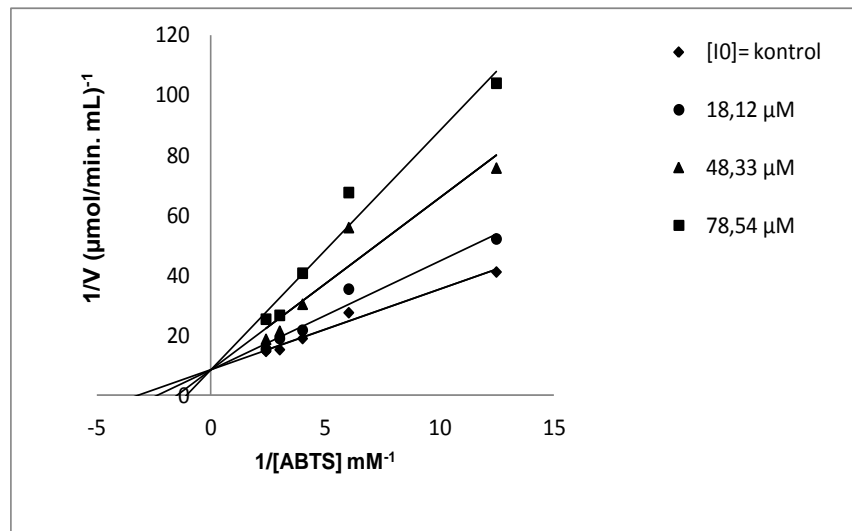
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
Inhibitör	ABTS(ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Inhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Inhibitör (ml)	LPO (ml)		
3-amino-4-kloro benzensülfanilamid	2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,825	0,1	0,025	0,05	78	30
	2,0	0,865	0,1	0,030	2,0	0,815	0,1	0,035	0,05	63	42
	2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,800	0,1	0,050	0,05	54	60
	2,0	0,800	0,1	0,100	2,0	0,750	0,1	0,100	0,05	18	121
	2,0	0,775	0,1	0,125	2,0	0,725	0,1	0,125	0,05	11	151



Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V(\mu\text{mol}/\text{ml. min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
İnhibitör	ABTS (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H_2O_2 (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H_2O_2 (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
[I] ₁	0,25	2,635	0,1	0,015	0,25	2,585	0,1	0,015	0,05	52	12,4
	0,50	2,385	0,1	0,015	0,50	2,335	0,1	0,015	0,05	35	6,02
	0,75	2,135	0,1	0,015	0,75	2,085	0,1	0,015	0,05	22	4,00
	1,00	1,885	0,1	0,015	1,00	1,835	0,1	0,015	0,05	19	3,00
	1,25	1,635	0,1	0,015	1,25	1,585	0,1	0,015	0,05	15	2,40
[I] ₂	0,25	2,610	0,1	0,040	0,25	2,560	0,1	0,040	0,05	76	12,4
	0,50	2,360	0,1	0,040	0,50	2,310	0,1	0,040	0,05	56	6,02
	0,75	2,110	0,1	0,040	0,75	2,060	0,1	0,040	0,05	30	4,00
	1,00	1,860	0,1	0,040	1,00	1,810	0,1	0,040	0,05	21	3,00
	1,25	1,610	0,1	0,040	1,25	1,560	0,1	0,040	0,05	19	2,40
[I] ₃	0,25	2,585	0,1	0,065	0,25	2,535	0,1	0,065	0,05	104	12,4
	0,50	2,335	0,1	0,065	0,50	2,285	0,1	0,065	0,05	68	6,02
	0,75	2,085	0,1	0,065	0,75	2,035	0,1	0,065	0,05	41	4,00
	1,00	1,835	0,1	0,065	1,00	1,785	0,1	0,065	0,05	27	3,00
	1,25	1,585	0,1	0,065	1,25	1,535	0,1	0,065	0,05	25	2,40



Şekil 4.15. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.15. LPO enzimini üzerine 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (µM)	Ortalama K _i (µM)	İnhibisyon türü
3-amino-4-kloro benzensülfanilamid	49,5	± 43,67	Yarışmalı

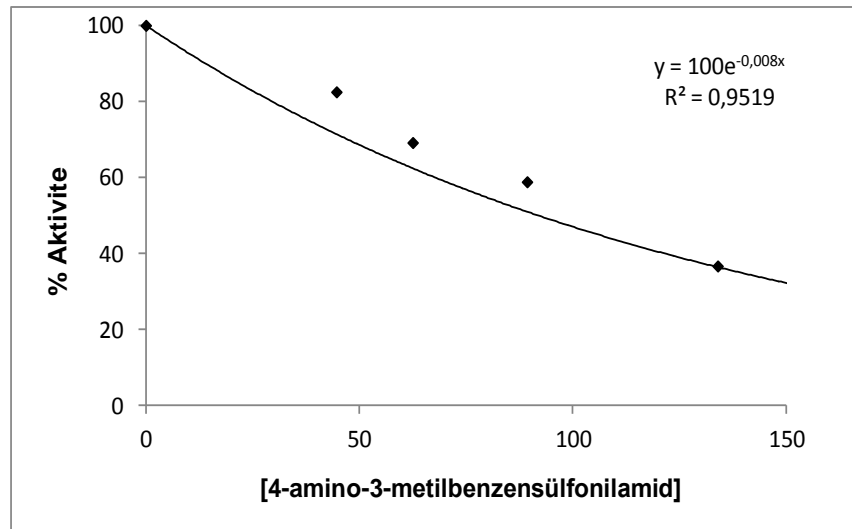
Çizelge 4.16. Sığır sütü LPO enziminin 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.

	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 Elüsyonu	55,00	1,23	15,00	67,87	825,00	0,08	100	1,00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	0,04	0,02	0,38	0,21	1,81	0,55	22,00

4.4.4. 4-Amino-3-Metil benzensülfonilamid için sığır LPO üzerine ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmalar ve saflaştırma sonuçları

Çizelge 4.17. 4-amino-3metil benzensülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

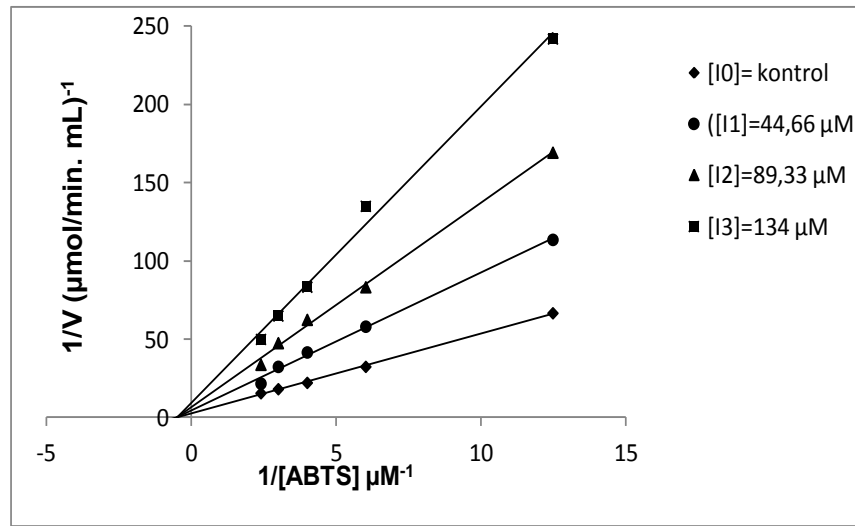
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
Inhibitör	ABTS(ml)	Fosfat T amp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Inhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat T amp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Inhibitör (ml)	LPO (ml)		
4-amino-3metil benzensülfonilamid	2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,825	0,1	0,020	0,05	82	45
	2,0	0,865	0,1	0,035	2,0	0,815	0,1	0,035	0,05	69	63
	2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,800	0,1	0,050	0,05	59	90
	2,0	0,825	0,1	0,075	2,0	0,775	0,1	0,075	0,05	37	134
	2,0	0,800	0,1	0,100	2,0	0,750	0,1	0,100	0,05	22	178



Şekil 4.16. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-3metil benzensülfonilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-3metil benzensülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	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($\mu\text{mol}/\text{ml. min.}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,25	2,625	0,1	0,025	0,25	2,575	0,1	0,025	0,05	114	12,4
	0,50	2,375	0,1	0,025	0,50	2,325	0,1	0,025	0,05	58	6,02
	0,75	2,125	0,1	0,025	0,75	2,075	0,1	0,025	0,05	42	4,00
	1,00	1,875	0,1	0,025	1,00	1,835	0,1	0,025	0,05	32	3,00
	1,25	1,625	0,1	0,025	1,25	1,585	0,1	0,025	0,05	22	2,40
[I] ₂	0,25	2,600	0,1	0,050	0,25	2,550	0,1	0,050	0,05	169	12,4
	0,50	2,350	0,1	0,050	0,50	2,300	0,1	0,050	0,05	83	6,02
	0,75	2,100	0,1	0,050	0,75	2,050	0,1	0,050	0,05	62	4,00
	1,00	1,850	0,1	0,050	1,00	1,800	0,1	0,050	0,05	48	3,00
	1,25	1,60	0,1	0,050	1,25	1,550	0,1	0,050	0,05	34	2,40
[I] ₃	0,25	2,575	0,1	0,075	0,25	2,525	0,1	0,075	0,05	242	12,4
	0,50	2,325	0,1	0,075	0,50	2,275	0,1	0,075	0,05	135	6,02
	0,75	2,075	0,1	0,075	0,75	2,025	0,1	0,075	0,05	83	4,00
	1,00	1,825	0,1	0,075	1,00	1,775	0,1	0,075	0,05	65	3,00
	1,25	1,575	0,1	0,075	1,25	1,525	0,1	0,075	0,05	50	2,40



Şekil 4.17. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-3metil benzensülfonilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.

Çizelge 4.19. LPO enzimini üzerine 4-amino-3metil benzensülfonilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC₅₀ (µM)	Ortalama K_i (µM)	İnhibisyon türü
4-amino-3-metil benzensülfonilamid	86,62	± 55,62	Yarışmasız

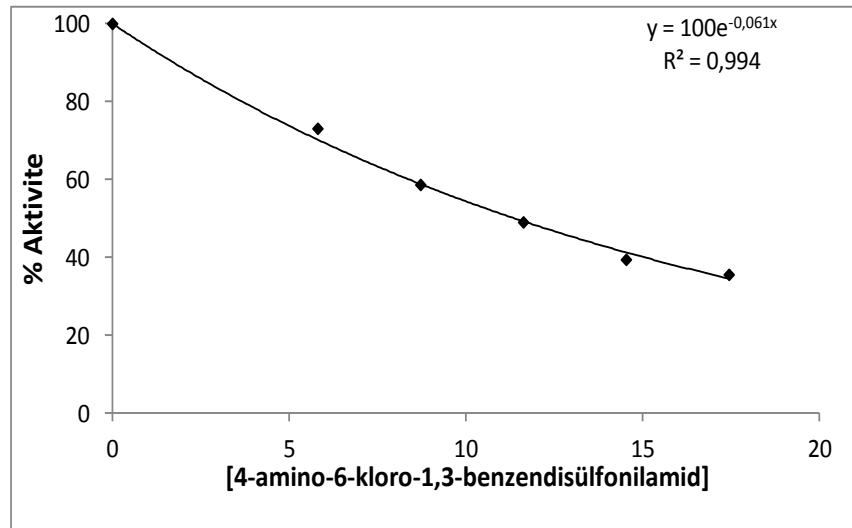
Çizelge 4.20. Sığır sütü LPO enziminin 4-amino-3-metil benzensülfonilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.

	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 Elüsyonu	55,00	1,23	15,00	67,87	825	0,08	100	1,00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	0,15	0,05	1,54	0,52	3,00	23,00	36,00

4.4.5. 4-Amino-6-Kloro-1,3-Benzendisülfanilamid İçin Sığır LPO Üzerine ABTS Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar ve Saflaştırma Sonuçları

Çizelge 4.21. 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.

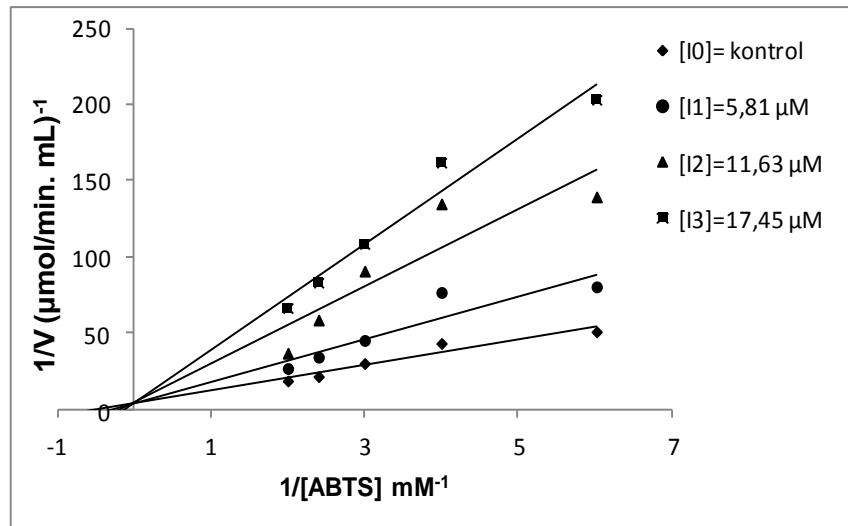
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS(ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid	2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,800	0,1	0,050	0,05	73	0,6
	2,0	0,825	0,1	0,075	2,0	0,775	0,1	0,075	0,05	59	9
	2,0	0,800	0,1	0,100	2,0	0,750	0,1	0,100	0,05	49	12
	2,0	0,775	0,1	0,125	2,0	0,725	0,1	0,125	0,05	39	14
	2,0	0,750	0,1	0,150	2,0	0,700	0,1	0,150	0,05	35	17



Şekil 4.18. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.22. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	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)	$1/V(\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S \text{ mM}^{-1}$
[I] ₁	0,50	2,35	0,1	0,05	0,50	2,30	0,1	0,05	0,05	81	6,02
	0,75	2,10	0,1	0,05	0,75	2,05	0,1	0,05	0,05	77	4,00
	1,00	1,85	0,1	0,05	1,00	2,80	0,1	0,05	0,05	45	3,00
	1,25	1,60	0,1	0,05	1,25	1,55	0,1	0,05	0,05	34	2,40
	1,50	1,35	0,1	0,05	1,50	1,30	0,1	0,05	0,05	27	2,00
[I] ₂	0,50	2,30	0,1	0,10	0,50	2,25	0,1	0,10	0,05	140	6,02
	0,75	2,05	0,1	0,10	0,75	2,00	0,1	0,10	0,05	135	4,00
	1,00	1,80	0,1	0,10	1,00	1,75	0,1	0,10	0,05	91	3,00
	1,25	1,55	0,1	0,10	1,25	1,50	0,1	0,10	0,05	59	2,40
	1,50	1,30	0,1	0,10	1,50	1,25	0,1	0,10	0,05	37	2,00
[I] ₃	0,50	2,25	0,1	0,15	0,50	2,20	0,1	0,15	0,05	203	6,02
	0,75	2,00	0,1	0,15	0,75	1,95	0,1	0,15	0,05	162	4,00
	1,00	1,75	0,1	0,15	1,00	1,70	0,1	0,15	0,05	109	3,00
	1,25	1,50	0,1	0,15	1,25	1,45	0,1	0,15	0,05	83	2,40
	1,50	1,25	0,1	0,15	1,50	1,20	0,1	0,15	0,05	67	2,00



Şekil 4.19. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.

Çizelge 4.23. LPO enzimini üzerine 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (µM)	Ortalama K _i (µM)	İnhibisyon türü
4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid	11,36	± 6,39	Yarışmalı

Çizelge 4.24. Sığır sütü LPO enziminin 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

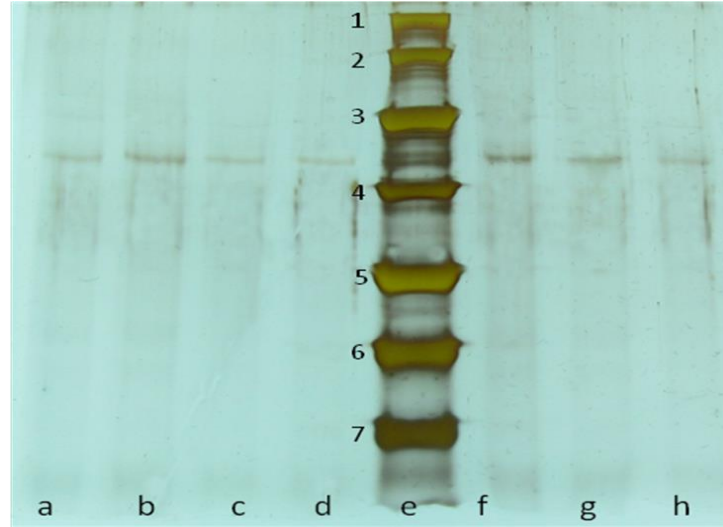
	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Amberlit CG 50 H ⁺ Reçinesi Elüsyonu	55,00	1,23	15,00	67,87	825,00	0,08	100	1,00
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	10,00	0,05	0,07	0,46	0,77	0,59	0,67	7,00

4.5. Sığır ve koyun LPO için sülfanilamid türevi moleküllerin ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmaları ve hazırlanan afinite kolonlarının saflaştırma ve SDS-PAGE toplu sonuçları

Çizelge 4.25. Sığır ve Koyun LPO için sülfanilamid türevi moleküllerin ABTS substratıyla yapılan kinetik çalışmaları ve hazırlanan afinite kolonlarının saflaştırma toplu sonuçları

	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i (μ M)	İnhibisyon türü	% Verim	Saflaştırma kat sayısı
2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin	346,50	283,32	Yarışmalı	12,00 *13,00	453,00 *869,00
5-amino-1-naftalin sülfonilamid	57,75	6,74	Yarışmalı	23,00	353,00
3-amino-4-kloro benzensülfanilamid	49,50	43,67	Yarışmalı	0,55	22,00
4-amino-3-metil benzensülfonilamid	86,62	55,62	Yarışmasız	23,00	36,00
4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid	11,36	6,39	Yarışmalı	0,67	7,00

*2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin afinite kolonunu vasıtasıyla koyun sütünden saflaştırılan LPO sonuçları.



Şekil 4.20. LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

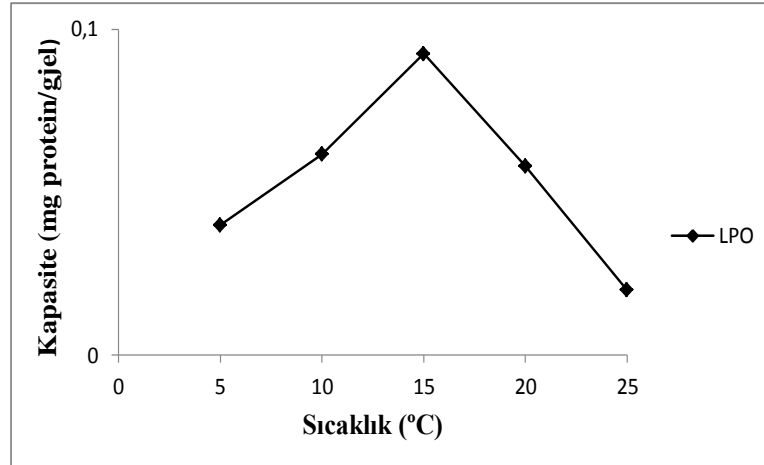
a: 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile saflaştırılan sığır LPO enzimi b; 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin ile saflaştırılan koyun LPO enzimi c; 5-amino-1-naftalin sülfonilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi d; 3-amino-4-kloro benzensülfanilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi f; 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi g; 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi h; Sülfonilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi (780000) e; Standartlar; 1. (170 kDa) 2. (130 kDa), 3. (100 kDa), 4. (70 kDa) 5.(55 kDa) 6.(40 kDa) 7.(35 kDa)

4.6. Sığır Sütünden 2-Kloro-4-Sülfamoyilanilin Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan jelin 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 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 belirlendi. Aynı zamanda jel kurutulularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden LPO enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

4.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

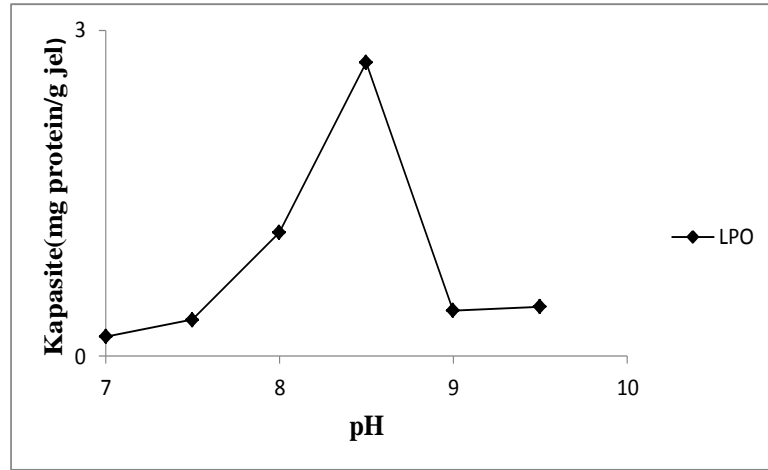
pH:6,8'de LPO farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel) sonuçlar Şekil 4.21'de verildi.



Şekil 4.21. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoyilanilin jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

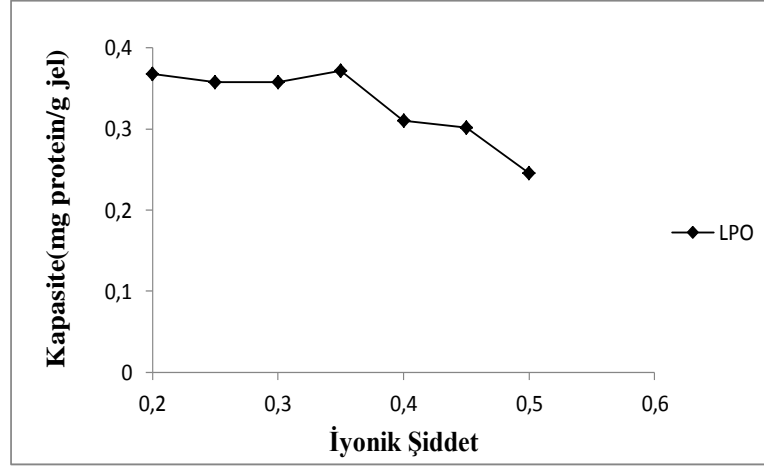
Bu bölümdeki deneyler pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.22'de verildi.



Şekil 4.22. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoylanilin jelinin pH-kapasite grafiği

4.6.3 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 4.23'de verildi.



Şekil 4.23. Sepharose-4B-2-kloro-4-sülfamoylanilin jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Memelilerin sütünde, gözyaşında ve tükürüğünde bulunan prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden laktorepoksidad enzimi bir glikoproteindir (Tenovuo 1985). LPO enzimi bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesi (Shah 2000), endüstride LPO kimya endüstrisinde, süt endüstrisinde, süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası (Uguz 2005) yönlerinden önemli bir enzimdir.

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri olan afinite kromatografisi olup spesifik ligand esasına dayanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bugün bir çok protein afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılması başarılmıştır. Afinite kromatografisinde, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir teknik olarak bilinmektedir. Genelde dolgu maddeleri Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jellerden oluşur. Ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekir. Matriksle ligand arasında etkileşmeler olmasın diye uzantı kolları takılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

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 0,7 den büyük olan elüatlar birleştirildi. 280 nm absorbans ölçümünde proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin, triptofan) söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblama esasına dayanmaktadır. 412 nm de ise LPO enziminin hem grubunu söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblaması esasına dayanır. 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).

Protein tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi ve standart grafik hazırlandı: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Her bir tüpe Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 4,9 ml ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak numune yerine 100 µl aktivite tayin tamponu ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde hazırlandı. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

LPO enziminin aktivitesi, Shindler ve Bardsley yönteminin bazı modifikasyonu sonucu belirlenen prosedüre göre yapıldı (Shindler and Bardsley 1975; Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995). Bu yöntem ABTS kromojenik substratın H₂O₂ 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 ($\epsilon_{412nm}=32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi 20°C'de 1 dakikada 1µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılması konusunda birçok kromatografik yöntem kullanıldı (Çankaya *et al.* 2006). Bu 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 edidi (Özdemir *et al.* 2001).LPO üzerine yapılan bir diğer çalışmada, LPO'nun afinite tekniği ile tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirildi (Atasever *et al.* 2013). Sülfanilamidin LPO'nun güçlü ve yarışmalı geri dönüşümlü inhibitörü olduğu, Ki değerinin $3,55 \times 10^{-5}$ M ve IC_{50} değerinin 0,848 mM olduğu hesaplandı ve enzimin 409 kat saflaştırıldığı bildirildi (Atasever *et al.* 2013). Bu saflaştırma çalışmalarının daha ileri götürme ve verimi artırmayı katkı sağlamak amacı ile sığır ve koyun sütünden LPO enzimini saflaştırılmasında sülfanilamid türevi moleküllerin çalışılması hedeflendi.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi öncelikle LPO enzimi sığır sütünden 74 verimle 428,57 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim için K_M değeri 0,13 mM ve V_{max} değeri 0,55 EÜ/ml.dk olarak bulundu (Çizelge 4.2) ve SDS-PAGE ile enzimin saflığı kontrol edildi ve literatürde belirtildiği gibi tek bant ve yaklaşık 80.000 kdal molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.4).

Saflaştırılan LPO enzimi üzerine 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı bu çalışmalar sırasında küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.9, 4.13, 4.17, 4.21'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 4.7, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18 'de gösterildi. Elde edilen IC_{50} değerleri ise Çizelge 4.5, 4.11, 4.15, 4.19, 4.23 'da gösterildi. Bu sonuçlara göre IC_{50} değerleri 2-kloro-4-sülfamoyilanilin için; 346,5 μ M, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid için; 57,75 μ M, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid için; 86,62 μ M, 4-

amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid için; 11,36 μM ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid için ise 49,5 μM olarak bulundu.

Sığır LPO enzimi için 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantarsyonları çizelge 4.4, 4.10, 4.14, 4.18, 4.22 'de gösterildi. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu.

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.8, 4.13, 4.15, 4.17, 4.19 'de gösterildi.Çizelge 4.5, 4.11, 4.15, 4.19, 4.23'de görüldüğü gibi, 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid yarışmalı inhibisyon, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ise yarışmasız inhibisyon etkisi göstermektedir. K_i değerleri 2-kloro-4-sülfamoyilanilin için 283,32 μM ,5-amino-1-naftalin sülfonilamid için 6,74 μM , 4-amino-3-metil benzensülfonilamid için 55,62 μM , 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid 6,39 μM ve 3-amino-4-kloro için 43,67 μM dır. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detayli kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan sülfanilamid moleküllerinin LPO enzimin yeni inhibitörleri olarak tespit edildi.

Çizelge 4.25 'te görüldüğü gibi, 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid LPO enzimini inhibe ettiği gözlemlendi ve bundan hareketle inhibisyon etkisi göstren bu moleküllerin her biri için sığır sütü LPO enziminin saflaştırılması için ligand olarak afinite jelleri hazırlandı.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, tirozin 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 Rz değeri ($Rz=A_{412}/A_{280}$) 0,6 dan büyük olan tüpler birleştirildi ve absorbanslarına bakıldı. Afinite jellerinin sentezlendiği sülfanilamid türevlerinin diazonyum tuzu oluşturarak jelin renklenmesinden anlaşıldı. Diazonyum tuzları bileşikleri renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir (Atasever *et al.* 2013).

Çizelge 4.25'te görüldüğü gibi, sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid türevlerinden saflaştırma basamaklarını göstermektedir. Hazırlanan afinite jellerinden sadece 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid kolonu enzimi iyi bağlamış, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid kolonu ile hazırlanmış jellerde ise iyi sonuç alınamamıştır. 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ligand olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 3 olup enzim 36 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 23 olarak bulunmuştur. 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid ligand olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 0,59 olup enzim 7,47 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 0,67 olarak bulunmuştur. 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid ligand olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 1,809 olup enzim 22 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 0,55 olarak bulunmuştur. 5-amino-1-naftalin sülfonilamid ligand olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 29 olup enzim 353 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 23 olarak bulunmuştur. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin ligand olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 145 olup enzim 453 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 12 olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonunda 200 ml

sütten 0,77 mg LPO ($R_z=0,6$) elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995). Sülfanilamidin LPO'nun yarışmalı dönüşümlü inhibitörü olduğu belirlenmiş enzimin 428,57 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Atasever *et al.* 2013). Bu çalışmada koyun sütünden LPO elde edilmemiştir. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü sülfanilamid ile mukayese edildiğinde saflaştırılma katsayısı biraz daha arttığı görülmüş ve bulunan bu yeni türevle koyun LPO enzimi ilk defa tek basamakta saflaştırılmıştır.

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi, ilk kez koyun sütünden yine 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml alınarak kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 139 olup enzim 869 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 13 olarak bulunmuştur.

Çalışılan moleküllerin hazırlanan kolonlarında elde edilen LPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Elektroforezin 1 kanalına molekül ağırlığı β -galactosidase (175 kDa), paramyosin (80 kDa), fusion ile MBP ve chitin bağı domain) (58 kDa), CBD-Mxe Intein-2CBD (46 kDa) proteinler konuldu. Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi LPO enzimi literatürde belirtildiği gibi tek bant ve yaklaşık 80.0 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi (Çankaya *et al.* 2006).

Hazırlanan 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonu için LPO enzimini tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı. Enzimin kolona tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametrelerini 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 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 4.21.'ten görüldüğü gibi 15 °C de jel bağlanma kapasitesi diğer sıcaklıklardan daha verimli oldu.

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 4.22'de grafik edildi. Buradan pH:8,5 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 4.23'de görüldüğü gibi 0,3-0,4 M konsantrasyonunda bağlanma maksimum olduğu belirlenerek hazırladığımız afinite kolonundan LPO enzimi için tutma kapasitesi testleri yapılmış oldu. 15 °C'de pH 8,5'da 0,35 M iyonik şidet konsantrasyonunda optimum bağlanma 9,65 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sülfonilamid kolonundan saflaştırılan sığır 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 4.5 'de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 6 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 4.6'de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 42°C olduğu bulundu.

2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan 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 4.9'da gösterildi. Bu grafikden 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 °C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.10'da gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 60 °C olduğu bulundu.

Sığır, sütünden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Parametreler	Sığır Sütü LPO enzimi
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	146
Saflaştırma katsayısı	453
Optimum pH	6,0
Optimum Sıcaklık (°C)	42
K _M (mM)	0,14
V _{Max} (EÜ/ml)	0,55
Molekül ağırlığı (Dalton)	85,0

Koyun, sütünden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Parametreler	Sığır Sütü LPO enzimi
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	139
Saflaştırma katsayısı	869
Optimum pH	5,5
Optimum Sıcaklık (°C)	60
K _M (mM)	0,74
V _{Max} (EÜ/ml)	0,05
Molekül ağırlığı (Dalton)	85,0

Sonuç Olarak;

- 1) 2-Kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfanilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid için detaylı kinetik parametreler IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlenerek LPO enziminin yeni inhibitörleri tespit edildi.
- 2) İnhibisyon gösteren türev sülfanilamid moleküllerin her biri için afinite jelleri hazırlandı. Hazırlanan bu jellerden sığır sütü LPO enzimi ilk defa tek kademede saflaştırıldı. En iyi sonuç gösteren 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü ilede koyun LPO enzimi ilk defa tek basamakta saflaştırılmış oldu.
- 3) 2-Kloro-4-sülfamoyilanilin afinite jeli ile saflaştırılan sığır ve koyun LPO enzim için optimum pH, optimum sıcaklık, K_M ve V_{max} gibi kinetik parametreleri tespit edildi. Kolona enzimin bağlama kapasitesi sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplandı.

KAYNAKLAR

- Adam, B., Yiğitoğlu, M.R., 2012. Tibbi Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 52-549, İstanbul.
- Ahrne, L., and Bjorck, L., 1985. Effects of the lactoperoxidase system on lipoprotein lipase activity and lipolysis in milk. *J Dairy Res*, 52, 513.
- Aksoy, Y., 2002. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Klinik Tıp Bilimleri*. 22: 442-448.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., Kufrevioglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136 864–870.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214, 1302-1304.
- Axen, R., Ernback, S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *Eur. J. Biochem*, 18, 351-360.
- Barrett, N.E., Grendison, A.S., Lewis, M.J., 1999, Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy*, 66, 73.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.
- Bayse, G.S., Michaelis, A.W., and Morisson, M., 1972, Lactoperoxidase catalyzed iodination of tyrosine peptides. *Biochim. Biophys Acta*, 30, 284.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. *Palme Yayıncılık*, 241-247p, Ankara.
- Bingöl, G., 1983. *Biyokimya Güven Matbaası*, Ankara, s.285.
- Booth, KS, Kimura, S., Lee, HC., Ikeda-Saito, M., Caughey, WS., 1989. Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity binding site for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 879-902.
- 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
- Cadenas, E., Packer, L., 1996. Handbook of antioxidants. *Marcel and Dekker Inc*, 23-25, New York.
- Cals, M.M., Maillart, P., Brignon, G., Anglade, P., Dumas, B.R. 1991. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *European Journal of Biochemistry*, 198, 733–739.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., and Anfinsen, C.B., 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography, *Proc. Nat. Acad. Sci*, 61, 636-643.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa

- Daniel, R., Rao, L.D., and Mona, I.C., 1997. Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem*, 250, 10.
- Davies, KJ., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61:1–31.
- de Wit, JN., & van Hooydonk, ACM., 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 genens. *Biochemistry*, 16,472.
- Doumonted, C., and Rousset B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *J. Biological Chem*, 258, 141.
- Drew, J., 2000. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287, 1960–1964.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579.
- Elagamy, E., Ruppner, R., Ismail, A., Champagne, C.P., Assal, R., 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy. res*, 59, 169-175.
- Elmastas, M., Gülçin, I., Beydemir, S., Küfrevioğlu, Ö.İ., Aboul-Enein, HY., 2006. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L) seeds extracts. *Anal Lett*, 39:47–65
- Fantal, A.G., 1996. “Reactive Oxygen Species In Developmental Toxicity”, Review and Hypothesis. *Teratology*, 53: 96-217.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. In pirson, A. and Zimmerman, M.H.(Ed)., *Encyclophedia of plant physiology*, 4-17, New York.
- Fry, S.C., 1986. Cross-Linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Plant Biology*, 35, 165-186.
- Gilbert, H.F., 1992. Basic concepts in biochemistry. Mc Graw-Hill Inc. Germany, 81.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioxidants. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23, 85-89.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2010a. Antioxidant and Antimicrobial Activities of an Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34, 175-188.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Haddain, M.S., İbrahim, 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., Gutteridge, JMC., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. *Clarendon Press*,
- Halliwell, B., Oxford, Gutteridge, J.M.C., 1996. *Free radicals in biology and medicine*, pp 11-21.
- Halliwell, B., 1989. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. *Acto Neurologica Scandivanica.*, 126, 23-33.

- Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.*, 6, 2675-2683.
- Hiraga, S., Sasaki, K., 2001. A large family of class-III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42, 462-468.
- Huber, R.E., Edwards, L.A., Corne, T.J., 1989. Studies on the mechanism of the iodination of tyrosine by lactoperoxidase. *J Biol chem.* 264,1381.
- 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. *Int.J. Devl. Neuroscience.* 13, 811-817.
- 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.
- Jacob, B.M., Monoj, N.K., Haridas, M., 1998, Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology.* 31, 808.
- Kanofsky, J.R., 1988. Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *JBiol chem.* 263, 141.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Biyokimya, Aktif Yayınları, Erzurum, s.97.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Erzurum.
- Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Cryst,* D51, 1094.
- Kussendrager. Klaas, D., van Hooijdonk, A.C.M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1, S19-S25
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Lenaz, G., 2001. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*, 52, 159-64.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4, *Nature.*, 227, 680.
- Langbakk, B., Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Lehinger, A.L., 1982. Principles of Biochemistry. *Worth publishers, inc*, NewYork., s587.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Marcozzi, G., Didomenico, C., Sperti, N., 1998. Effects of Surfactans on the stabilization of the bovine lactoperoxidase activity. *Bioltechnolprog*, 4, 653.
- Mecitoglu, C., & 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.
- Metodiewa, D., Reszka, K., and Dunfurd H.B., 1989. Oxidation of the substituted catechols dihydroxyphenylalanine methyl ester and trihydroxyphenylalanine by lactoperoxidase and its compounds. *Arch. Biochem. and Biophys*, 274, 601.

- Metodiwa, D., Reszk, K., and Dunferd H.B., 1989. Evidence for a peroxidatic oxidation of Norepinephrine, catecholamine by lactoperoxidase. *Biochemical Res. Commun.*, 160,1183.
- Miller, D.D., 1996. Minerals. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 617-649. Marcel Dekker, New York.
- 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*, 53 , 1643-1650.
- Nandini, K.E., Rastogi, N.K., 2010. Single step purification from whey involving reverse Micelles-assisted extraction and its comeration with reverse micellar extraction. *Biotechnology Progress*, 26, 763–771.
- Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 1287-1312.
- Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. *Febs Letters*, 43, 169-175.
- Özdemir, H., Aygul, I., Kufrevioglu, O.I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125–134.
- Özdemir, H., Hacibeyoglu, H.I., Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 143–155.
- Özdemir, H., Hacibeyoglu, H.I., & Kufrevioglu, O.I., 2003. Effects of the watermiscible organic solvents on lactoperoxidase purified from creek-water buffalomilk. *Biochemistry Moscow*, 68, 329–333.
- Özdemir, H., & 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.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Pakkanen, R., Aalto, J., 1997. Growth Factors and Antimicrobial Factors Ofbovine colostrum. *Int Dairy*, 7, 285-97.
- Paricio M.A., peralta, L.M, Garcia, H.S., 1986. Potentiazilation of the lactoperoxidase system for preservation of raw milk in the tropics. *Arclatinoam Nutr*, 36(4),725.
- Paul, K.G., Ohlsson, P.I., 1985. In the Lactoperoxidase System: Pruitt KM, and Tenovue YO, (Eds.) *Chemistry and Biological Significance*, New York, USA: Marcel Dekker Inc. p.15-29.
- Pütter, J., Becker, R., 1987, *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases* Bergmeyer, third edition, VCH , New York, s.286 .

- Rae, T.D., Goff, H.M., 1998. The heme prosthetic group of lactoperoxidase Structural characteristic of heme 1 and heme1-peptids. *J.BiolChem*, 273,279.
- Reiter, B., HaÈrnulv, G., 1984. Lactoperoxidase antibacterialsystem: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724-732.
- Reiter, B., Perraudin, J.P., 1991. Lactoperoxidase: biological functions. *In Peroxydases in Chemistry and Biology*, pp. 143-180. Boca Raton: CRC Press.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Scammel, A.W., 2001. Production and Uses of Colostrum. *Journal of Dairy Technology*, 56, 74-82.
- Segel, I.H., 1968, Biochemical Calculations. John Wiley and Sons , Inc , New York, s.403.
- Shah N.P., 2000. Effects of milk-derived bioactives an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.
- Shin, K., Hayasawa, H., 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.
- Shindler, J.S., Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 67, 1307.
- Sievers, G., 1980. Structure of milk lactoperoxidase.A study using circular dichroism and difference absorption sperctroscopy.*Biochim Biophys Acta*, 624, 249.
- Sigman, D.S., Boyer, P.D., 1990. The enzymes. Academic Press, (3rd. Ed.), 19, 118.
- Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Kaur, P., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2007. Crystal Structure of Lactoperoxidase at 2,4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 376, 1060-1075.
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Atasever, A., Ozdemir, H., 2010. The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5,1351-1356.
- Sisecioglu, M., Uguz, M. T., Cankaya, M., Ozdemir, H., Gulcin, I. 2011. Effects of ceftazidimepentahydrate, prednisolone, amikacinsulfate, ceftriaxone sodium and teicoplanin on bovine milk lactoperoxidase activity. *International Journal of Pharmacology*, 7, 79-83.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Clare, B.W., 2002. Bacterial protease inhibitors Medicinal, *Research Reviews*, 22, 329-372.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors Medicinal. *Research Reviews*, 23, 146-189
- Stadtman, E., 1992. Protein oxidation and aging. *Sciences*, 257, 1220-1224.
- Tenovuo, J.O., Pruitt, K.M., 1985. The peroxidase system in human secretions in the lactoperoxidase system. *Chemistry and Biological Significance*, New York: Dekker, 272.
- Thanabal, V., 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.
- Thomas, M.J., 1995. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35, 21-39.

- Uguz, M.T., Ozdemir, H., 2005. Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated., *Applied. Biochemistry and Microbiology*, 41, 397–401.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Voet & Voet, 1959. John Wiley and Sons.
- Zapico, P., Gaya, P., Depaz, M., Nunez, M., Medina, M., 1991. Influence of breed animal and days of lactation of lactoperoxidase system components in goat milk. *J.Dairy Sci*, 3,78.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Wolfson, LM., Sumner, SS., 1993. Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system., A review. *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2006 Yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2010 yılında "Kiral hipervalent iyodosil bileşiklerinin sentezi ve bu bileşiklerle aklenlerin oksidasyonu" konulu tezini tamamladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.