

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SIĞIR
SÜTÜNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Ali ATASEVER

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR**

**2010
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SIĞIR SÜTÜNDEN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Ali ATASEVER

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2010**

Her hakkı saklıdır

Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR'in danışmanlığında Ali ATASEVER tarafından hazırlanan bu çalışma 26/05/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ö İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza : 

Üye: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza : 

Üye: Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza : 

Üye: Doç. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza : 

Üye: Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SIĞIR SÜTÜNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Ali ATASEVER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Laktoperoksidaz (LPO) (E.C.1.11.1.7) memelilerin sütünde, gözyaşında ve tükürüğünde bulunan prostetik grup olarak hem grubu içeren bir glikoproteindir. Bu çalışmada sığırların laktoperoksidaz (LPO) enzimi literatürde bilinen mevcut yöntemler haricinde, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriksi üzerine uzantı kolu olarak tirozin takılarak ve ligand olarak enzimin inhibitörleri sülfanilamid ve sülfapiridin kullanılarak sentezlenen kolon materyallerinde enzimin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması yapıldı. 200 ml yağı alınmış sığırların sütü amberlite CG 50 H⁺ reçinesine tatbik edildi ve elde edilen homojenatın 50 ml'si hazırlanan afinite kolonuna verildi. Saflaştırma basamakları sonucunda sülfanilamid bağlı kolonla 200 ml süttten 0,77 mg LPO, %62,3 verimle 409 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant bulundu (80 kDa). Enzim aktivite ölçümünde pH:6'da 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratı kullanıldı. Saflaştırılan LPO'nun 20°C'de pH:6'da KM ve Vmax değerleri sırasıyla 0,14 mM ve 0,55 µmol/min. ml olarak belirlendi. Hazırlanan afinite kolonunda bağlanma kapasitesi 4°C'de pH:8,6 ve 0,25 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 395 mg/g jel olarak belirlendi. Ligand olarak kullanılan sülfanilamid ve sülfapiridin inhibitörleri yarışmalı inhibisyon göstermekte olup, I₅₀ değeri sırasıyla 8,48.10⁻⁴ ve 2,27.10⁻⁴ M olarak, K_i değerleri ise sırasıyla 3,57.10⁻⁵ M ve 6,50.10⁻⁵ olarak tespit edildi.

2010, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: Afinite, Laktoperoksidaz, Kinetik, İnhibisyon.

ABSTRACT

Ph.D.Thesis

PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE ENZYME FROM BOVINE MILK BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

Ali ATASEVER

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

Lactoperoxidase (LPO; E.C.1.11.1.7) is a glycoprotein, present in mammalian milk, tear and saliva, which contains prosthetic heme group. In this study, bovine milk lactoperoxidase (LPO) enzyme was achieved to be purified by a novel affinity chromatography, prepared by using CNBr-activated Sepharose-4B as a matrix, L-tyrosine as a spacer-arm and inhibitors, sulfanilamide and sulphapyridine as the ligands. 200 ml bovine milk was applied to amberlite CG 50 H⁺ resin after the oil was removed, and 50 ml of the obtained homogenate was applied to the prepared affinity column. After the purification steps, 0.77 mg LPO was purified 409-fold in a yield of 62.3% by means of sulfanilamide column. The purity of the enzyme, purified by means of the synthesized affinity gel, was checked by SDS-PAGE, and a single band was detected corresponding to 80 kDa. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) chromogenic substrate was used to in measurement of the activity. K_M and V_{max} values of the purified enzyme were determined to be 0.14 mM and 0.55 $\mu\text{mol}/\text{min. ml}$, respectively, for pH:6 at 20°C. The binding capacity of the affinity gel was determined to be 395 mg/g gel at 4°C, pH:8.6 and 0.25 M ionic strength conditions. The inhibitors, sulfanilamide and sulphapyridine, used as ligands, exhibited competitive inhibition with the I_{50} values of 8.48×10^{-4} and 2.27×10^{-4} M, and K_i constants of 3.57×10^{-5} M and 6.50×10^{-5} respectively.

2010, 79 pages

Keywords: Affinity, lactoperoxidase, kinetics, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi 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 dekanımız Sayın Prof. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU'na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Eğitim Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr Ahmet MAVİ'ye,

Ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ÇANKAYA, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz EKİNCİ'ye Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Arş. Gör. Sayın Melda ŞİŞECİOĞLU'na ve doktora öğrencisi Sayın Bilge ÖZCAN'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 ailemin bütün fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ali ATASEVER

Mayıs 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Afinite Kromatografisi.....	15
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.3.Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	27
3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	28
3.5. Yöntemler.....	32
3.5.1. Protein tayini.....	32
3.5.1.a. Kalitatif protein tayini.....	32
3.5.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	32
3.5.2. Laktoperoksidaz aktivitesi tayini.....	33
3.5.3. Laktoperoksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları.....	34
3.5.3.a.. Amberlite CG 50 H ⁺ reçinesi ile enzimin kısmi saflaştırılması.....	34
3.5.3.b. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi.....	34
3.5.3.c. Afinite jelinin hazırlanması.....	39
3.5.3.d. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	42
3.5.3.e. Afinite kolonununa numune tatbiki ve elüsyonu.....	43
3.5.3.f. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	43
3.5.3.g. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi.....	44
3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması.....	46
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi.....	46
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi.....	46
3.6.3 İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	47

3.7. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	47
3.7.1. Optimum pH çalışmaları.....	47
3.7.2. Optimum sıcaklık çalışması.....	47
3.7.3. LPO enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	48
3.7.4. Kullanılan ligandlar için kinetik çalışmalar.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	50
4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları.....	51
4.2.1. LPO enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	51
4.2.2. Amonyum sülfatla çöktürme sonuçları.....	52
4.2.3. LPO enziminin saflaştırma basamakları sonuçları.....	53
4.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	54
4.3. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	55
4.3.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	56
4.3.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi.....	56
4.3.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	57
4.4. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma Sonuçları.....	58
4.4.1. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği.....	58
4.4.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	58
4.4.3. ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	59
4.4.4. Kullanılan inhibitörlerin K_i ve I_{50} değerlerinin bulunması.....	60
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	67
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	80

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. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	16
Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü.....	20
Şekil 1.3. CNBr ile aktifleştirilmiş matrikse primer amino grubunun katılması.....	22
Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	40
Şekil 3.2. Sülfanilamid kenetlendirilmesi bağlanma modeli.....	41
Şekil 3.3. Sülfapiridin kenetlendirilmesi bağlanma modeli.....	42
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	50
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.....	51
Şekil 4.3. LPO enziminin sülfanilamid afinite kolonundan elüsyonu sonucundaki aktivite-tüpsayısı grafiği.....	52
Şekil 4.4. Sülfanil amid kolonundan saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı....	55
Şekil 4.5. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği.....	56
Şekil 4.6. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin pH-kapasite grafiği.....	57
Şekil 4.7. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği.....	57
Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği.....	58
Şekil 4.9. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen sıcaklık- aktivite grafiği.....	59
Şekil 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen 1/V-1/[S] grafiği....	59
Şekil 4.12. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak sülfapiridin ile elde edilen % aktivite-konsantrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfanilamid eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	64
Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfapiridin inhibitörü eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Sığır sütü proteinleri.....	11
Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	17
Çizelge 1.3.Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri Jeller.....	21
Çizelge 4.1. Sığır sütünden elde edilen LPO enzimi için 1 mM ABTS substratıyla Amonyum sülfatla çöktürmede doygunluk noktası tespiti.....	.53
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid ve sülfapiridin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	54
Çizelge 4.3. Sığır sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmalarının toplu sonuçları.....	60
Çizelge 4.4. Sülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO içinABTS substratıyla yapılan % Aktivite-konsantrasyon deney prosedürü.....	61
Çizelge 4.5. Sülfapiridin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO içinABTS substratıyla yapılan % Aktivite - konsantrasyon deney Prosedürü.....	62
Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla inhibitör kullanılmadan elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	63
Çizelge 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	64
Çizelge 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla Sülfapiridin eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	65
Çizelge 4.9. Sığır LPO'sunun üç farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_i değerleri ve sabit substrat konsantrasyonunda $26,67 \cdot 10^{-2}$ mM ABTS 5 farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen aktivite-[inhibitör] grafiğinden elde edilen I_{50} değerleri.....	66

1.GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalardaki reaksiyonları hiç bir yan ürün oluşturmada n %100'lük bir ürün verimi sağlayarak katalizleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Lehninger 1982).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi koenzimdenilen kompleks bir bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler, büyük bir bölümü protein yapısında olan ve canlı bünyesindeki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyomakromoleküllerdir. Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12.000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptirler. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} veya Se gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metaloorganik moleküllere gereksinim duyarlar.

Bazı enzimlerin ise aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyacı vardır. Protein yapısına çok sıkı olarak hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehitler, koenzim A; açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar.

Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derecede spesifik olmalarıdır. Böylece enzimler, hücre içinde meydana gelen reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşmadan yürütülmesine imkan verirken, aynı zamanda üstün katalizleme gücü sayesinde laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmesi çok zaman alan ve çok sayıda basamağa ihtiyaç duyulan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların hücre içi şartlarda saliselerle ölçülebilecek kısa zaman aralıklarında meydana gelmesini sağlar (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim kinetiği enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon hızlarının incelendiği ve kimyasal kinetiğin temel prensiplerinin geçerli olduğu bir konudur. “Michaelis-Menten” denklemi hemen hemen bütün enzimler için enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde kullanılan temel bir ifadedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

$$V=V_{\max} \times [S] / K_m + [S]$$

Bu denklemde V_{\max} (maksimum hız); enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. V_{\max} değerine belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doyumluk durumunda ulaşılır. Her enzimin V_{\max} değeri birbirlerinden çok farklı olup enzim miktarı, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişir (Lehninger 1982).

Denklemde K_M maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu olarak tarif edilir ve birimi mol/L dir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde her bir substrat için ayrı bir K_M değeri bulunur. K_M değeri enzimin konsantrasyonuna bağlı olmayıp, substratın yapısına, pH'ya, sıcaklığa ve iyonik şiddete bağlıdır. Bir çok enzim için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. Birden fazla substrata sahip enzimlerde her bir substrat için ayrı bir K_M değeri vardır.

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler Michaelis-Menten denkleminde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_m sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{max} değerlerinden elde edilir. değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar bulunarak V - $[S]$ grafiği (Michaelis-Menten grafiği) veya $1/V$ - $1/[S]$ grafiği (Lineweaver-Burk grafiği) ile K_M ve V_{max} değerleri bulunur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim aktivitesi; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin konsantrasyonlarından etkilenir. Enzimler, optimum pH ve doyumluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırıncı dereceden bir reaksiyon oluşur. Enzim kofaktör içeriyorsa, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları doyumluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani bu durumda hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Bu yüzden düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen değerler daha az sağlıklıdır (Lehninger 1982).

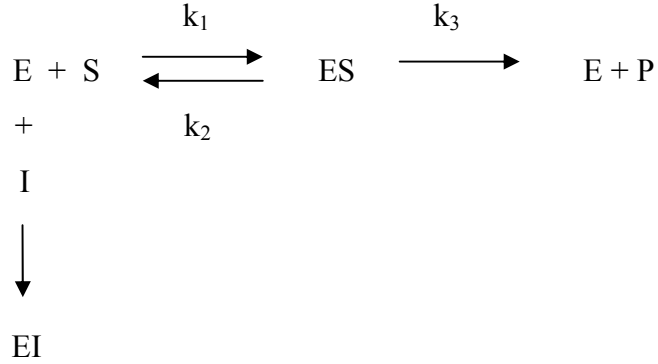
Bir çözelti veya doku ekstraktındaki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanılarak bulunur. Bunun için enzim hakkında; katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi, enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacı olup olmadığı, substrat ve varsa kofaktör için K_M değeri, optimum pH'sı, enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı, substratın kayboluş ve ürün oluşum hızlarının tespit edildiği basit bir analitik metod bilgileri gereklidir. Enzimler için genel ünite tanımı "25°C'de ve optimal şartlarda 1µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı" olarak tanımlanmıştır, buna bir enzim ünitesi denir (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin katalizleme güçleri "turnover sayısı" denilen ve "birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı" olarak tarif edilir. Enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına "inhibisyon", bu olaya sebep olan bileşiklere de "inhibitör" denilir.

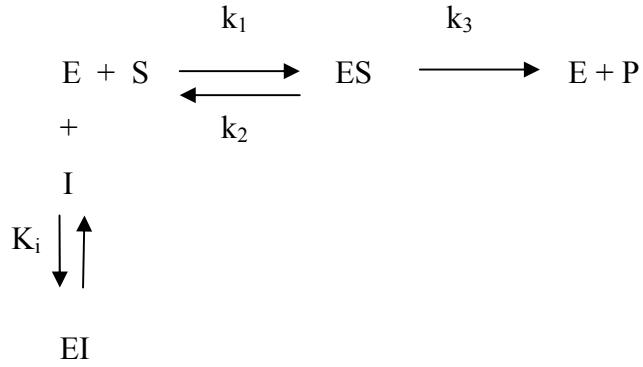
Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimatik inhibisyon başlıca dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının uyarılmasında önemli bir rol oynayan asetil kolin estera enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek inaktif diizopropilflorofosfo-enzimi oluşturur.

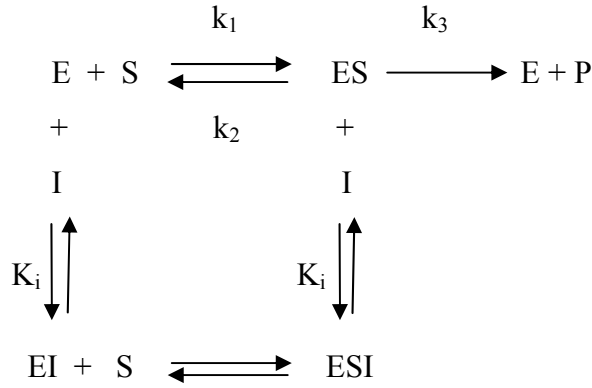
Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması aşağıda gösterildiği gibidir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



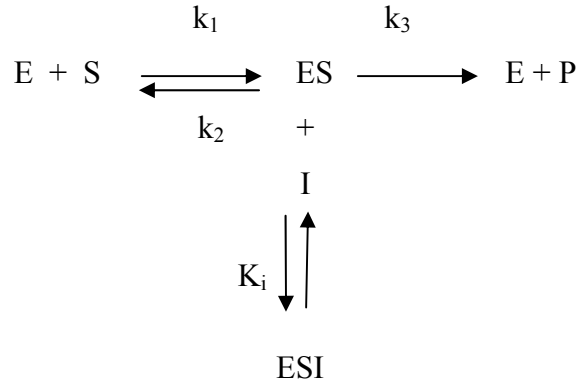
Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılarak inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar. Yarışmalı inhibitör varlığındaki reaksiyonun şeması aşağıda gösterildiği gibidir.



Yine dönüşümlü bir inhibisyon tipi olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon'da inhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada inhibitör ve substrat arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{\max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır. İnhibitör ve substrat farklı bölgelere bağlandığından enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir; EI ve ESI. Reaksiyonun şeması aşağıda gösterildiği gibidir.

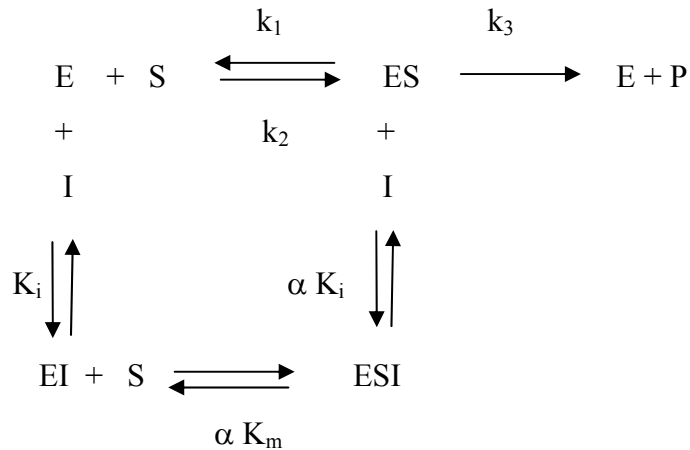


Bir başka dönüşümlü bir inhibisyon tipi olan yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyon'dur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Reaksiyon şeması aşağıda gösterildiği gibidir.



ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{\max} azalır. ESI kompleksini oluşumu vasıtasıyla ES kompleksi ortamdaki sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri de azalır.

Yarı yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tip inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonunda E, S ve I'nın bağlama denge sabitleri farklılaşmaktadır. En basit şekline ait reaksiyon şeması aşağıda verilmiştir (Gilbert 1992).



Birçok multi enzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitelerine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi

inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde substrat bizzat pozitif modülatör olarak etki yaparken, heterotropik allosterik enzimlerde enzim substrattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörden birisi o enzimin substratı, diğeri başka bileşiklerdir.

İnhibisyon çeşidinin ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem, Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir. Grafikteki kesim noktaları değerlendirilerek, inhibisyon çeşidi ve K_i değerleri tesbit edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Canlı vücudunda meydana gelen bütün biyokimyasal reaksiyonlarda enzimin katalitik aktivitesi sorumlu olduğundan biyokimyacıların ilgisi enzimler üzerinde odaklanmış, böylece pek çok araştırma ile hastalıkların oluş nedenleri, hangi sebeplerden etkilendikleri, hastalıkların teşhisi ve tedavisi konusunda ilerlemeler kaydedilmiştir. Enzimler üzerindeki araştırmalar, sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur (Lehninger 1982).

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlükler rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinlerin üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilendiği

için enzimler kısa sürede aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır. Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklükleri,
2. Çözünürlük farklılıkları,
3. Elektriksel yükleri,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri, spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir.

Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7); hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonoid aminler (yalnızca benzidin türevleri) gibi çok sayıda aromatik komponentlerin dehidrojenasyonunu da katalizlerler. Bu moleküller arasında 2- krezol, 2-toluidin, guaiakol, pirogallol, homovonillik asit, hidrokinon, 1,2 ve 1,4-

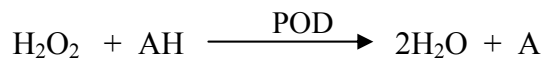
fenilendiamin, lökomalaşıit yeşili, 2,6-diklorofenolin difenol, 4,4-diamino difenilamin, propiyonil promozin, benzidin, o-toluidin, di-o-anisidin ve bazı azo boya türevleri sayılabilir (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

Peroksidazlar, biyolojik sistemlerde antioksidatif etkiye sahip olan enzimlerin en önemlileri arasında sayılabilir (Hussain *et al.* 1995).

Peroksidazlar; hayvanlarda, at turpu, ananas, incir, baklagiller, mısır, ıspanak ve tütün gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde mevcuttur. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri; sütte, lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde, dalak, uterus, tükürük bezleri ve akciğer duvarlarında, sitoplazma, mitokondriler, mikrozomlar ile lizozomlarda lokalize olmuştur (Pütter and Becker 1987).

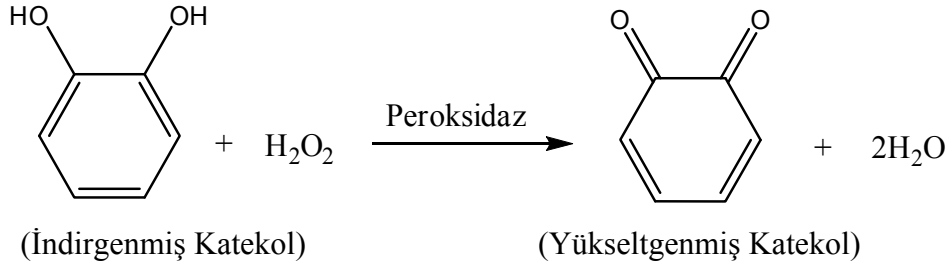
Biyolojik materyallerde guaiacolün substrat olarak kullanıldığı ilk renk reaksiyonu 1809'da kaydedilmiş, peroksidaz terimi bundan yaklaşık 100 yıl sonra at turpundan izole edilen enzim için kullanılmıştır ve özellikle bitki fizyolojisinde artan fizyolojik fonksiyonların sayısının birçoğu peroksidazlarla bağdaştırılmaktadır (Van Huystee 1987).

Peroksidazların prostetik grupları protohemdir. Bu da birçok hemoproteininin tersine olarak apoproteine sadece gevşek şekilde bağlıdır (Dumonted and Rousset 1983). Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda H₂O₂; elektron akseptörü olarak hareket eden askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi birçok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir (Dumonted and Rousset 1983). Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar komplekstir ve genel olarak aşağıdaki gibi gösterilmektedir (Van Huystee 1987).



Peroksidazlar çeşitli aromatik komponentleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirmektedir (Robert *et al.* 1993).

Örnek olarak, katekolun oksidasyonunu verebiliriz.



Oksitleyici özelliğiyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir (Haliwell 1984). Antioksidan enzimler aynı zamanda serbest oksijen radikallerini gidererek biyolojik oksidatif hasarları engellediği bildirilmektedir (Harris 1992).

POD; spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Fric 1976). Organizmada peroksidazın ilk olarak protein kısmı sentezlenir ve enzim fonksiyonel değildir. Holoenzim, hem grubu ile apoproteinin birleştirilmesi ile fonksiyonellik kazanır (Fric 1976; Van Huystee 1987).

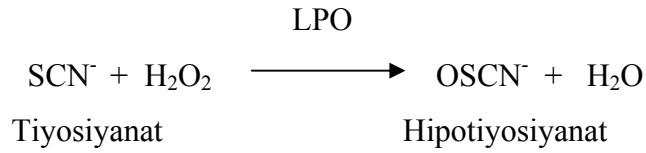
Peptid zinciri üzerindeki ikinci prostetik grup glikozid yan zincirleridir. Çoğu peroksidaz izoenzimleri moleküler ağırlıklarının %15-17'si kadar karbohidrat içerirler (Van Huystee 1987). Hem grubu ve glikozidik gruplara ilaveten kalsiyum (Ca^{2+}) iyonu da peroksidaz salınımı ve yapısal devamlılığı 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).

Sütün yüksek düzeyde besin içeriğinin olduğu iyi bilinmektedir. Aynı zamanda süt proteininin birçok faydalı fonksiyonları iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Son yirmi yıldır sütün biyolojik özellikleri, gerek bilimsel gerekse endüstriyel ilgi odağı olmuştur. İmmunoglobulinler, laktoferin ve büyüme faktörleri gibi peynir altı suyu proteinlerinin çoğusu kolostrumda süttten daha fazla konsantrasyonda bulunur. Sütün önemli enzimi ise laktoperoksidazdır. (Pakkanen and Aalto 1997; Scammel 2001). Çizelge 1.1’de sığır sütü proteinlerinin konsantrasyonları, molekül ağırlıkları ve biyolojik fonksiyonları verilmiştir.

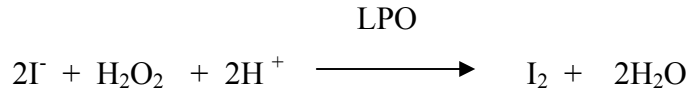
Çizelge 1.1. Sığır sütü proteinleri

Protein	Konsantrasyon (g/L)		Molekül Ağırlığı	Biyolojik fonksiyon
	Kolostrum	Süt	Dalton	
Kazeinler (α_{s1} , α_{s2} , β ve K)	26	28	14,000-22,000	İyon taşıyıcı (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu),
β -laktoglobulin	8.0	3.3	18,400	Retinol taşıyıcısı, potansiyel antioksidan, biyoaktif peptitler için precursor, yağ asitlerini birleştirir
α -Laktalbumin	3.0	1.2	14,200	Meme bezinde laktoz sentezi, kalsiyum taşıyıcısı, immunomodülatör, biyoaktif peptitler için precursor, anti kanserojen
Immunoglobulinler	20-150	0.5-1.0	150,000-1,000,000	Spesifik immune koruma (antibodiler ve complement sistemi), biyoaktif peptitler için potansiyel precursor
Glikomakropeptit	2.5	1.2	8,000	Antimikrobiyal, antitrombotik,
Laktoferrin	1.5	0.1	80,000	Antimikrobiyal, antioksidan, anti kanserojenik, anti inflamatuvar, demirin taşınması, hücre büyüme düzenleyici, immunomodülatör, biyoaktif peptitler için precursor
Laktoperoksidaz	0.02	0.03	78,000	Antimikrobiyal, immunoglobulin ve laktoferin ile sinerjetik etki
Lizozim	0.0004	0.0004	14,000	Antimikrobiyal, immunoglobulin ve laktoferin ile sinerjetik etki
Serum albumin	1.3	0.3	66,300	Biyoaktif peptitler için precursor
Proteoz-peptonlar	N/A	0.8	4,000-40,000	Potansiyel mineral taşıyıcı

Laktoperoksidaz enzimi (LPO: Hidrojen peroksit Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7); 1940'lı yıllarda sığır sütünde bulunduğu rapor edilmiştir. Memelilerin sütünde, gözyaşında ve tükürüğünde bulunan prostetik grup olarak hem grubu içeren bir glikoproteindir (Kumar and Bhatla 1995). Bu enzim süt içindeki önemli enzimlerden biridir. Ayrıca LPO patojen mikroorganizmalara karşı ve yeni doğan bebeklerin sindirim sisteminden salgılanan, savunmada önemli bir rol oynayan, süt içersine salgılanan bir oksidoredüktazdır. LPO enzimi memelilerin non-immun biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşiği olarak işlev görerek, aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyanat iyonunun antibakteriyal hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizler (Kumar and Bhatla 1995).



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

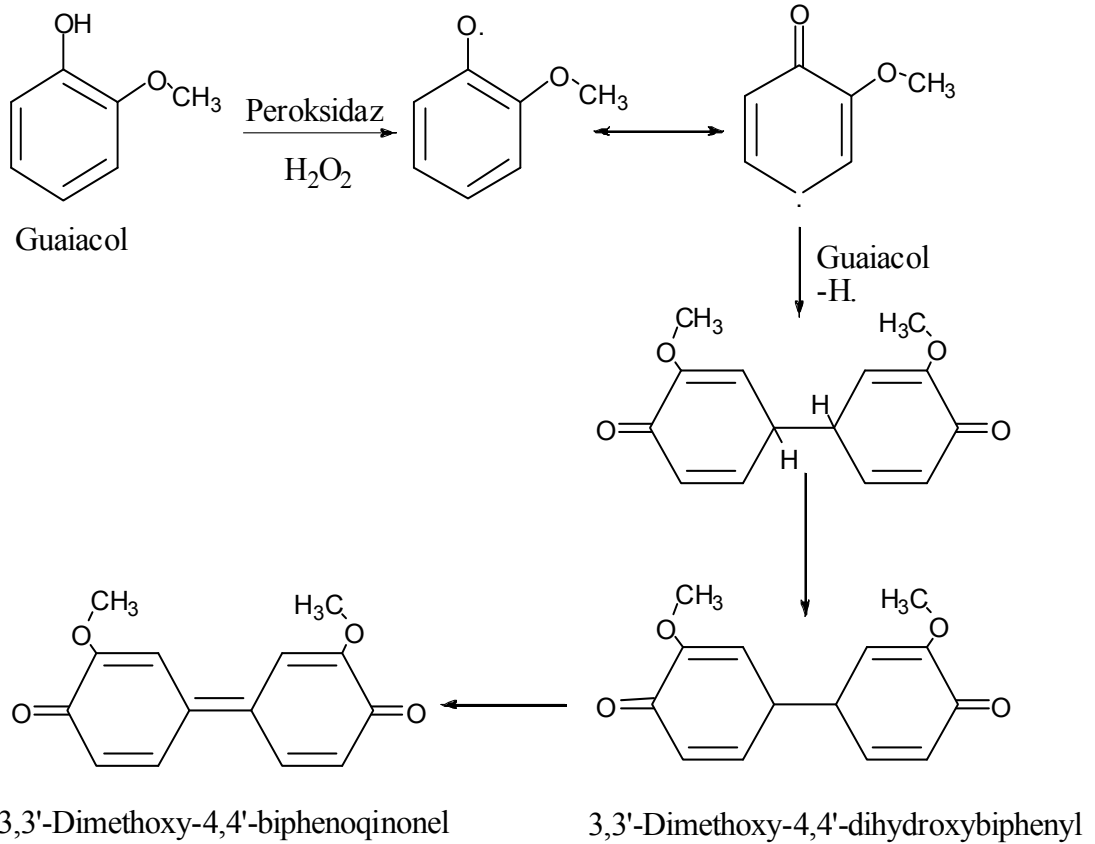


Laktoperoksidaz enzimi, %8-10 karbohidrat içeren ve molekül ağırlığı 70.000-85.000 dal olan tek bir polipeptid zincirinden oluşur. Değişik araştırmacılar tarafından LPO enziminin 612 amino asit zincirinden ibaret tek bir polipeptid zinciri ihtiva ettiği bildirilmiştir (Sievers 1981). Antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bir hem grubu ve yaklaşık %10 karbohidrat ihtiva ettiği, bir kalsiyum iyonu bulunduğu ve molekül kütlesinin yaklaşık 70.000-85.000 Da olduğu ifade edilmiştir (Kumar and Bhatla 1995).

Hem grubu proteine kovalent bağlıdır ve bu bağlanma hem grubunun hidroksil grubu ile proteinin karboksil grubu arasında meydana gelmektedir (Doumonted and Rousset 1983).

LPO diğer peroksidazlar gibi H_2O_2 mevcudiyetinde fenoller, aromatik aminler, pirogallol, askorbat ve guaiacol gibi moleküllerin oksidasyonunu da katalizler (Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995). 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 inhibe edildiği bilinmektedir (Kumar and Bhatla 1995). Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sığır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge 1986).

Laktoperoksidaz H_2O_2 mevcudiyetinde yapılan çalışmada guaiacol oksidasyonun mekanizması aydınlatılmış ve guaiacol'ün 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinone'a okside olduğu bulunmuştur (Daniel *et al.* 1997).



LPO enzimi; 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 LPO aktivitesinin stabilizasyonu üzerine surfaktanların etkileri (Marcozzi *et al.* 1998), keçi sütünde laktoperoksidaz 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 laktoperoksidaz 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 laktoperoksidazının yapısının araştırılması (Sievers 1980) ve indol-3 asetik asitin peroksida katalize singlet oksijen üretimi (Kanofsky 1988) vb. konular çalışılmıştır.

Aynı zamanda insan kolestrumundaki LPO, enzimi immün afinite kolon kromatografisi kullanılarak çalışılmış, molekül ağırlığı sığır LPO enzimi ile aynı bulunmuştur (Langbakk *et al.* 1989).

Çeşitli hayvan kaynaklarından elde edilen LPO enzimi, bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde önemli bir özelliğe sahiptir (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. LPO' nun gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine bakteriyostatik etkisi vardır. Deve sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine yapılan antibakteriyel çalışmalarda LPO-tiyosiyanat ve peroksit sisteminin patojenik bakterilerde önemli derecede inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Laktoperoksidazın birçok uygulama alanı vardır. Özellikle süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde kullanılmaktadır (Barrett *et al.* 1999).

1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, ayırma teknolojisinde eşsiz bir yer tutar; çünkü bu yöntem hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonları veya özel kimyasal yapıları esasına dayanarak saflaşmasını mümkün kılar. Bu teknik diğer kromatografi tekniklerinden daha sonra geliştirilmesine rağmen, uygulama sahası çok hızlı gelişmiştir. Bugün bu teknik, biyokimyasal çalışmalarla ilgilenen hemen hemen her laboratuvarında kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Saflaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle, saflaştırılması çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyal, bu teknikle tek bir basamakta saflaştırılabilir. Afinite kromatografisinin konsantre edici etkisi de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmak mümkündür. Ayırımların yüksek seçicilikleri, birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden kaynaklanır. Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi şu amaçlarla kullanılabilir:

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

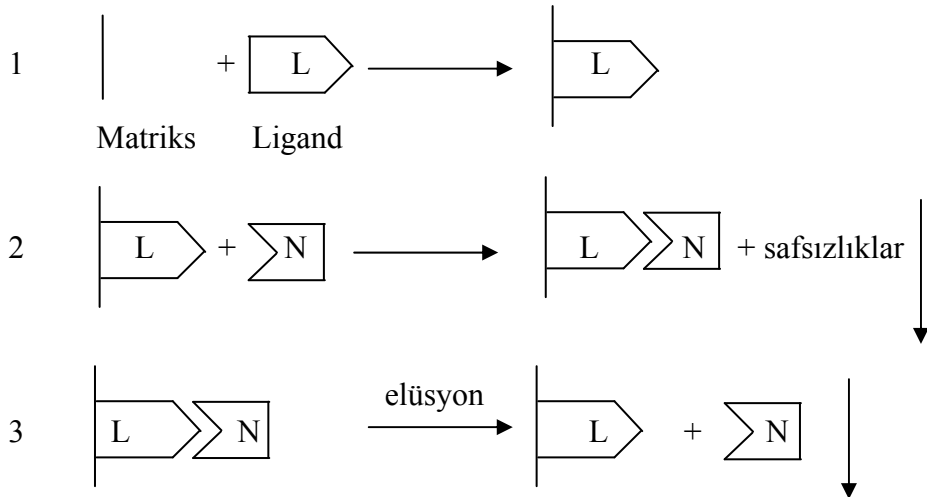
Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın, çözünmeyen nişastaya adsorbsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır, fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı kolon materyallerinin bulunmayışı bu tekniğin uygulanmasını geciktirmiştir. Bununla birlikte 1967'de Axen Porath Ernback primer amino grubu

ihativa eden moleküllerin, siyanojen bromürle aktive edilmiş polisakkarit matrikslerine bağlanabileceğini kaydetmiştir.

Bu da afinite kromatografisinin rutin bir ayırma tekniği olarak başlangıcını teşkil etmiştir. Siyanojen bromür aktivasyonu da, bugün ligandları bağlamak için kullanılan en genel bir yöntem olmuştur. Pharmacia Fine Chemicals, 1972 yılında siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose jelini geliştirdi; böylece immobilize edilecek ligandlar için dayanıklı ve hazır bir ortam elde edilmiş oldu. Çok yakın zamanda farklı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla matrikslere immobilize edilen bir seri ligand elde edildi; böylece birçok biyolojik maddeyi ve hücreleri güvenilir şekilde ayırabilecek spesifik adsorbanlar hazır hale getirildi (Axen *et al.* 1967).

Afinite kromatografisinin genel prensibi:

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.1’de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi

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

Başarılı bir ayırım, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerektirir. Bununla birlikte şu iki husus çok önemlidir;

- a) İmmobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olması.
- b) Safsızlıklar aktıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması önemlidir.

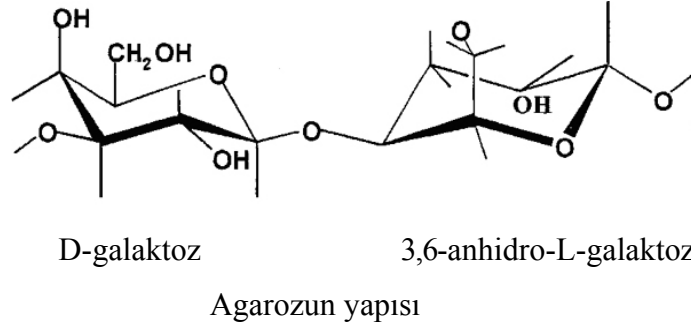
Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Axen and Ernback 1971).

Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.

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

Matriks

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Sephadex, Sepharose, Bio-gel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Bu jel, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonu işleminde başarılı bir matriks için gerekli olan bütün özelliklere sahiptir



Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca derivatize edilebilir. Bunlardan Sepharose-4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır. Jel filtrasyon kromatografisindeki dışarılama limiti, (molekül ağırlığı olarak) 60×10^3 - 20×10^6 Da olan Sepharose-4B'nin açık porlu yapısı, iç tarafını ligand bağlanmasına müsait hale getirir ve büyük moleküller için bile, iyi bir bağlanma kapasitesi temin eder.

Söz konusu jel, oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon gösterir; bunun böyle olması, afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı zaruridir. Sepharose jeli küresel ve rijit bir yapıya sahiptir, üzerinde yapılan işlemlerden sonra jel'in bu yapısı değişmez. Sepharose üzerinde hazırlanan adsorbanlar;

- 1) Yüksek ve düşük pH
- 2) Deterjanlar
- 3) Disosiye edici maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklıdır

Fakat Organik çözücülerin, Yüksek sıcaklıkların, Guanidin hidroklorür gibi parçalayıcı elüentlerin gerektiği durumlarda, kovalent şekilde çapraz bağlanmış Sepharose olan Sepharose-CL en ideal ortamdır. Mesela; Protein A-Sepharose-CL-4B ve Blue Sepharose-CL-6B adsorbanları Sepharose-CL üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-CL 'nin destek maddesi olduğu adsorbanlar az miktarda substitüe olmuştur ve Sepharose-4B'ye bağlı adsorbanlardan daha az kapasiteleri vardır; çünkü çapraz bağlama, ligandın bağlanabileceği bölge sayısını azaltır (Cuatrecasas 1970).

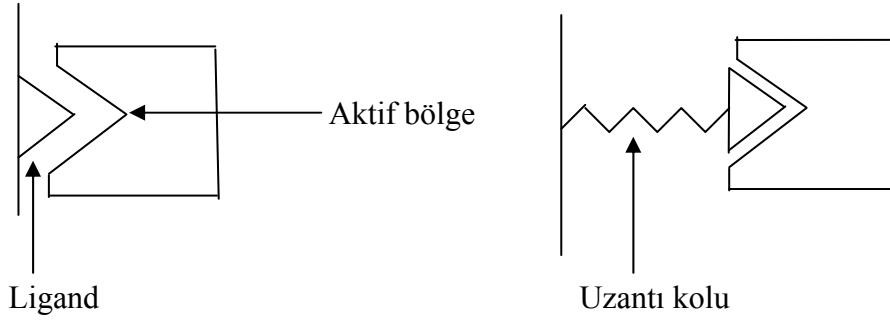
Ligand

Afinite kromatografisi için ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenir. Birincisi ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözeltide 10^{-4} - 10^{-8} M arasında olması idealdir. 10^{-4} M'dan daha büyük ayrışma sabitlerini içine alan etkileşmeler (mesela bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilişki gibi), başarılı afinite koromatografisi için uygun değildir. 10^{-8} M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddelerden (mesela bir hormon ve reseptörü arasındaki ilişki gibi) meydana gelen afinite koromatografisinde ise, bağlı maddenin inaktive etmeden elüsyonu zor olacaktır.

Eğer bağlanma kompleksinin dayanıklılığı hususunda herhangi bir bilgi bulunamıyorsa deneme yanılma yöntemi kullanılmalıdır. Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi de önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse saflaştırılacak molekülle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

Uzantı kolu

Enzimlerin aktif bölgesi genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Küçük ligandları (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü

Uzantı kolunun uzunluğu da önemlidir. Şayet çok kısa ise, kol etkisiz olur ve ligand numunedeki maddeyi bağlayamaz. Aksine çok uzunsa, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları, çok uzun uzantı kollarının numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını göstermiştir. Spesifik olmayan hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisinde arzu edilmez (Ocarra *et al.* 1974).

Ligandı bağlayacak jelin seçimi

Ligandı bağlayacak jelin uygun şekilde seçimi için; Ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi, saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilir.

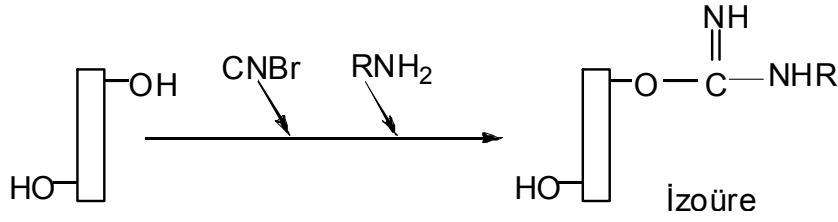
Ligandın matrikse kovalent bağlanması, normal bağlanma reaksiyonunu minimum oranda engellemek amacıyla, molekülün en az etkili bölgesine yapılmalıdır. Mesela, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları vasıtasıyla bağlanabilir; bu suretle inhibitörün enzimle spesifik bağlanma afinitesi korunmuş olur. Bununla birlikte amino grupları da bağlanma reaksiyonuna girerlerse, bu durumda zaruri olmayan başka bir grupla bağlamak gerekecektir. Ligandlardaki bağlanma bölgelerinin yeri hakkında önceden bilgi bulunmadığı durumlarda, deneme yanılma yöntemi kullanılmalıdır. Ligandı immobilize etmek için çoğunlukla kullanılan gruplar Çizelge 1.3'de verilmiştir. Bu grupların her biri tarafından ligandların bağlanabileceği jeller de karşılarında gösterilmiştir (Keha 1981).

Çizelge 1.3. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller

Ligand	Fonksiyonel grup	Bağlanacak jel
Protein, peptit amino asit	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-4B Epoksi-aktif. Sepharose-6B
	Hidroksil	Epoksi-aktif. Sepharose-6B
Şeker	Amino	CH-Sepharose-4B Aktif. CH- Sepharose-4B Epoksi-aktif Sepharose-6B
	Karboksil	AH-Sepharose-4B
	Amino	CNBr ile aktif. Sepharose-4B Tiyopropil-Sepharose-6B

Siyanojen bromür aktivasyonu

Sepharose-4B ile siyanojen bromürün reaksiyonu, proteinler, nükleik asitler veya diğer biyopolimerlerin, ılımlı şartlarda amino grupları veya benzer nükleofilik grupları vasıtasıyla bağlanabileceği bir ürünü netice verir. CNBr, Sepharose üzerindeki hidroksil grupları ile reaksiyona girer. Aktifleşmiş gruplar, ligandın primer amino gruplarıyla reaksiyona girerek izoüre oluşturur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. CNBr ile aktifleştirilmiş matrikse primer amino grubunun katılması.

Çok noktalı bağlanma, proteinlerin ve diğer biyopolimerlerin matriksten hidroliz olmamasını sağlar. Aktivasyon işlemi, Sepharose'u çapraz bağlar ve böylece kimyasal dayanıklılık artar. Bu da elüsyon şartlarının seçiminde daha fazla bir esneklik sağlar.

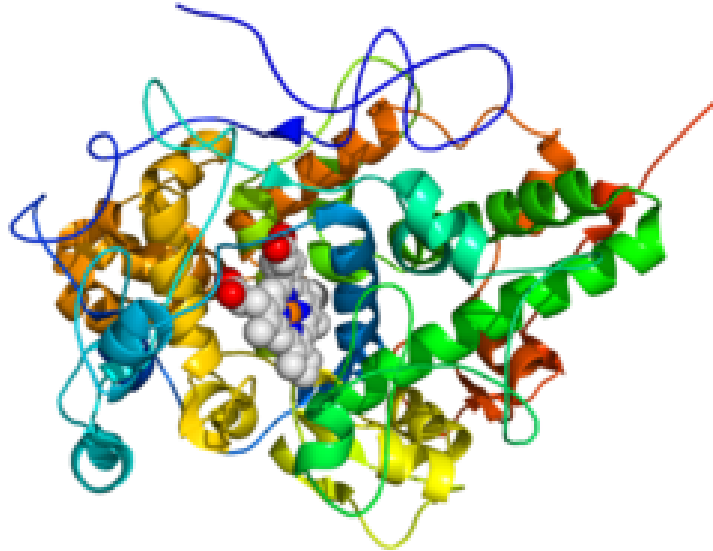
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B protein ve nükleik asit gibi ligandların bağlanmasında kullanılır. Mesela, insan hemoglobini CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanmıştır ve bu adsorban antihemoglobin antikörlerini fraksiyonlamak için kullanılmıştır. Bu işlem, azalan pH ve artan asetik asit konsantrasyonu ihtiva eden bir elüent kullanmak suretiyle başarılmıştır. Aynı zamanda CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B, spesifik antikörleri saflaştırmak için adsorban hazırlamada kullanılır; bu antikörler, daha sonra immunassay'de kullanılmak için radyoaktif madde ile işaretlenirler (Cuatrecasas 1970).

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak hazırlanan ve transferrin veya anti-transferrin ihtiva eden adsorbanlar, iki yıl süreyle aktivite kaybı olmaksızın tekrar tekrar kullanılmışlardır. CNBr yöntemi kullanılarak DNA'da, Sepharose-4B'ye bağlanmıştır ve DNA-Sepharose, hem nükleik asitlerin, hem de DNA'yı bağlayan enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Kohn and Wilchek 1978).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

LPO, patojen mikroorganizmalara karşı, yeni doğan sindirim sistemi ve süt bezlerinden salgılanan, koruyucu role sahip, süt içine salgılanan bir oksidoredüktazdır. Çiğ sütte doğal ortaya çıkan LPO sistemi antimikrobiyal özelliğe sahiptir (Ueda *et al.* 1997).

Memeli sütleri lizozim, laktoferrin, immunglobulinler ve LPO gibi antimikrobial 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. LPO, 85 kdal ağırlığında 612 a.a rezidüsü içeren tek bir polipeptid zincir içerir. Molekülün %10 civarı karbohidrat ve %15 yarı sistin rezidüleri içerir (Paul and Ohlsson 1985). Laktoperoksidaz enziminin X-Ray kristalografi 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).



LPO enziminin sığır sütünden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak literatürde bilinen birçok metod vardır. Bunlardan birisi Doumonted ve Rousset tarafından 1983 yılında yapılan saflaştırma metodudur. Doumonted ve Rousset ham

sığır sütünü alarak ilk önce içerisinde bulunan kazeini uzaklaştırmışlar. Bu işlem için litre başına 10 mg rennet ilave ederek oda sıcaklığında pıhtılaşma gerçekleşinceye kadar çalkalamışlar. Bu işlemin dışındaki bütün kademeleri +4°C'de gerçekleştirmişler. Pıhtılaşmış materyali daha sonra 2600xg'de 15 dakika santrifüj etmişler ve elde ettikleri çökeleği uzaklaştırmışlar.

Elde ettikleri supernatantın her bir litresi için, su ile yıkanmış 40 ml Amberlit CG-50 (NH₄⁺ formunda) ilave edilerek 3 saat boyunca karıştırmışlar. 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'lık asetat tamponuyla elüsyon toplamışlar. Elde edilen elüatlara amonyum sülfat kullanılarak protein çöktürmesi yapılmış ve amonyum sülfat ilavesi sonunda elde edilen çözelti 3000xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen çökelek 100 mM'lık sodyum asetat tamponu ile çözülmüştür.

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 yapmışlar. Böylece hem grubu ihtiva etmeyen LPO ile hem grubu ihtiva eden LPO birbirinden ayrılmıştır. Elde ettikleri son ürünü 3,2 mM'lık asetat tamponunda saklamışlar (Doumonted and Rousset 1983).

Sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılması ile ilgili olarak Özdemir ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, yağı alınmış sığır sütü ilk kademede Amberlit CG-50 (22 g/L) 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'lık asetat tamponuyla ham LPO'yu elde etmişler. Elde edilen bu ürün %90'lık amonyumsülfat doygunluğunda çöktürülerek, 3000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

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 yapmışlar. Elde edilen elüatları her defasında %90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutmuşlar. 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) saklamışlar (Fric 1976).

Örneğin, Afinite kromatografisi tekniğiyle karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, ilk olarak 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra da değişik araştırmacılar tarafından değişik afinite jelleri hazırlanarak bu enzim saflaştırılmıştır. Bu amaçla matriks olarak; Sephadex-G-150, Sepharose-2B, 4B, 6B, CM-Sephadex-G50, CM-Bio-gel A gibi materyaller kullanılmıştır. Ligand olarak da; karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri olan; p-amino benzen sülfonamid, p-amino metil sülfonamid, 2-amino-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid, sülfanilamid gibi bileşikler kullanılmıştır.

Aromatik ve heterosiklik sülfonamidlerin inhibisyon sabitleri (K_i), yani afinite dereceleri, 10^{-5} ile 10^{-8} M arasında değişmektedir. Bu sabitlerin izoenzimler için farklı, pH ile değişken olması ve değişik tek değerlikli anyonların bu enzimlere bağlanma sabitlerinin bilinip, bu anyonların aynı aktif bölge için sülfonamidlerle yarışma içinde bulunması, bu bileşiklerin ideal ligand görevi yapabileceklerini göstermektedir.

Çalışmanın amacı

Laktoperoksidaz enzimi üzerine birçok saflaştırma prosedürü vardır. Literatürde enzimin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması ile ilgili detaylı bilgiye rastlanmamıştır. Bu amaçla ilk defa LPO enzimini mevcut metotlara göre daha az zaman alan ve daha az masrafla saflaştırılacak bir yöntem yani afinite tekniği bulunması çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Bu amaçla enzime ait daha önce bilinen inhibitörlerinden ligand olarak kullanılabilecekler için ön çalışmalar yapılarak afinite jeli hazırlanmış ve LPO enziminin farklı memeli sütlerinden saflaştırılması denenmiştir. LPO enziminin saflaştırılması için bulunacak bir afinite kromatografisi tekniği bu konuda çalışanlara çok faydalı olacağı ve diğer peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasına ışık tutacağı kanaatindeyiz. Bu tez kapsamında;

- 1) Laktoperoksidaz enziminin daha önce bilinen inhibitörlerinden faydalanılarak ve sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite jeli hazırlanmıştır.
- 2) Hazırlanan jeller kullanılarak laktoperoksidaz enzimi saflaştırılmıştır.
- 3) Afinite ile saflaştırılan LPO enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık, K_M ve V_{max} gibi kinetik parametrelerini tespit edilmiştir.
- 4) Kullanılan affinite kolanlarının bağlanma kapasiteleri üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplanmıştır.
- 5) Ligand olarak kullanılan inhibitörler için kinetik parametreler belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1 Materyal

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B, 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-Sülfonik asit) (ABTS), Standart serum albumin, Amonyum sülfat, Sodyum asetat, Sodyum fosfat, Sodyum tartarat, Diyaliz torbası, Sodyum karbonat, Hidrojen peroksit, Sodyum klorür, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Amberlite CG 50 H⁺, Potasyum fosfat, Sülfanilamid, Sülfapiridin, Tirozin, Sigma Chemical Company'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, 2-merkaptolanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; 200 ml sığır sütü piyasadan sağlanmıştır.

3.3.Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer

Hassas terazi	: Gecavery (UK)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chilten Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar):	Sanyo Ultra Low

3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

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

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 kullanılacak 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.

4. 5 mM Na₂HPO₄ pH:6,8 (Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeleğin alınması ve diyaliz edilen tampon): 1,34 g ($5 \cdot 10^{-3}$ 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.

5. 0,1 M NaHCO₃ pH:10 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye trozin takılırken yıkamada kullanıldı): 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.

6. 0,2 M NaHCO₃ (pH:8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) NaHCO₃ 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mililitreye tamamlandı.

7. 0,05 M Tris-SO₄ (pH:7,4) (Sülfanilamid kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanıldı): 1,211 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

8. 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.

9. 25 mM fosfat pH: 6,8 (Amonyum sülfatla çöktürülen ve ardından da diyaliz edilerek hazırlanan homojenatın kolona tatbikinden sonra kolonu yıkamada kullanıldı): 1,42 g

($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 350 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 ml'ye tamamlandı.

10. 1M NaCl/25mM Na_2HPO_4 pH:6,3 (laktoperoksidaz enziminin elüe edilmesinde kullanıldı) 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 200 ml destile suda çözüldü.

11. 0,1 M Na_2HPO_4 pH:6,0 (ABTS hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 26,8 g (0,1 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

12. 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 Na_2HPO_4 pH:6,0 içinde çözüldü.

13. 3,2 mM H_2O_2 çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan H_2O_2 'den 32 μL alınarak destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

14. Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

15. SDS-PAGE Elektroforezi için kullanılan çözeltiler:

i) 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 ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

ii) 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 ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

iii) 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, kullanılmadan hemen önce 950 µl numune tamponunda 50 µl olacak şekilde β-merkapt etanol ilave edildi.

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

v) 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.

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

16. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin stok konsantrasyonları.

17. Sülfanilamid: $9,28 \cdot 10^{-3}$ M

18. Sülfapiridin: 0,020 M

3.5. Yöntemler

3.5.1. Protein Tayini

3.5.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası 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 kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbsansları ölçüldü.

3.5.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

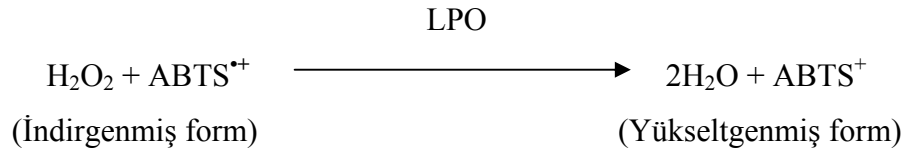
Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbsans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. 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 absorbsans değerleri okundu. Kör olarak numune yerine 100 µl aktivite tayin tamponu ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanıldı. Absorbsans değerlerine

karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde hazırlandı. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.5.2. Laktoperoksidaz aktivitesi tayini

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümü, Shindler ve Bardsley yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen prosedür ile yapıldı (Shindler and Bardsley 1975). Bu yöntem, H₂O₂ tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Shindler and Bardsley 1975).



Aktivite tayininde şu prosedür takip edildi: 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 2,8 ml 1mM ABTS ve 0,1 ml 3,2 mM H₂O₂ pipetlendi. 0,1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek hemen kronometre çalıştırıldı küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 3 dakika süreyle her 15 saniyede bir olmak üzere kaydedildi. Her aktivite ölçümü 3 kez tekrar edildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M fosfat tamponu (pH:6) konuldu. Diğer çözeltiler ile 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 (µmol/ml)

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

D_f = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol x dak. /ml)

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

3.5.3. Laktoperoksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları

3.5.3.a. Amberlit CG 50 H⁺ reçinesi ile enzimin kısmi saflaştırılması

200 ml taze sığır sütü önce 2700 rpm'de 4°C ve 15 dakika 3 kez santrifüj edilerek sütün yağı tamamen uzaklaştırıldı. Yağı alındıktan sonra geri kalan süpernatantlar birleştirilerek bir behere aktarıldı. Zayıf asidik katyon değiştirici Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin 2,4 gramı, 200 ml 5 mM NaCH₃COO pH:6,8 tamponunda şişirilerek yağı alınmış süte katıldı (Dumonte and Rousst 1983; Kumar and Bhatla 1995; Özdemir, Aygül ve Küfrevioğlu 2001). Reçine-süt karışımı magnetik karıştırıcı vasıtasıyla 4°C'de 1 saat karıştırıldı.

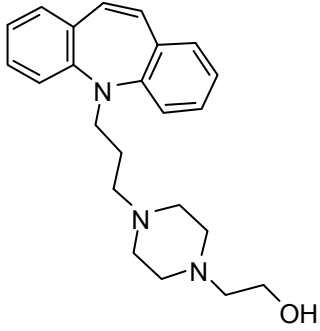
Reçine süt karışımı yarım saat süreyle dinlenmeye bırakılarak, üstte kalan süpernatant dekante edildi. Çökelek önce 400 ml destile suyla ve daha sonra 100 ml 20 mM NaCH₃COO pH:(6,8) tamponuyla 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı. Reçineye bağlanmış protein çökeleği Buchner hunisine aktarılarak 50 ml 500 mM NaCH₃COO pH:(6,8) tamponuyla elüsyon yapıldı. Elde edilen ham ekstraktın (50 ml) protein tayini ve aktivite ölçümünden sonra hazırlanan afinite kolonuna tatbik edildi.

3.5.3.b. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi

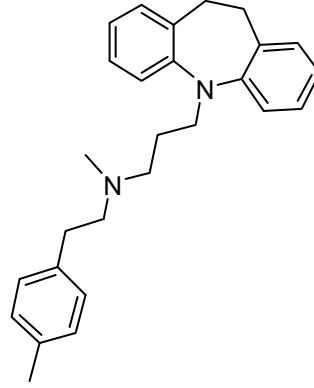
Laktoperoksidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarında literatürde enzimin inhibitörleri tespit edildi (F. Geike *et al.* 1975, Doerge 1986, Kumar and Bhatla 1995). Literatürde bulunan inhibitörlerden faydalanarak LPO'nun afinite kromatografisi

ile saflaştırılmasından en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligandlar seçilerek afinite jellerinin hazırlanması yapıldı. LPO'nun bilinen inhibitörleri aşağıda verilmiştir.

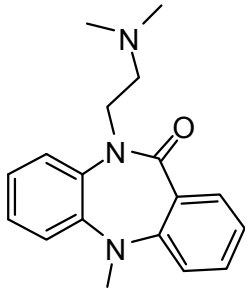
Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri



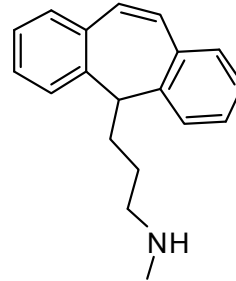
Opipramol



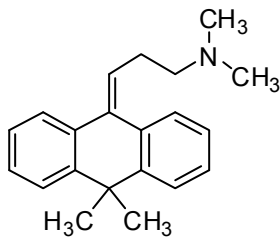
Lofepramine



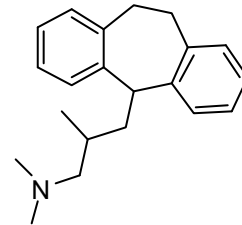
Dibenzepin



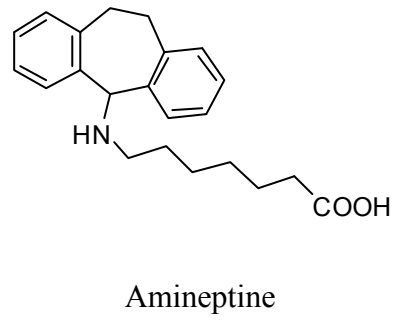
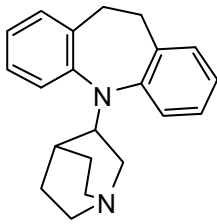
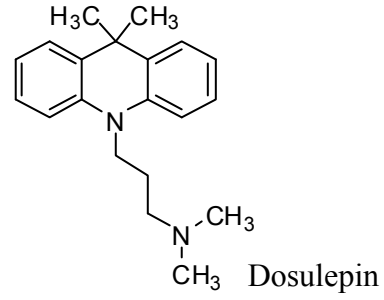
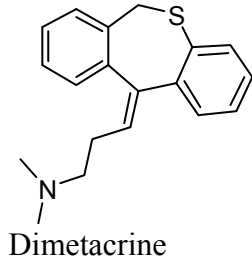
Protriptyline



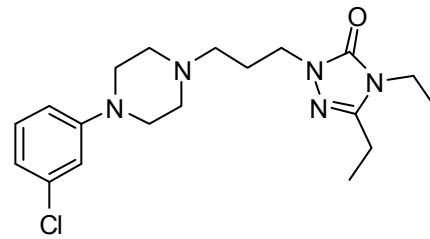
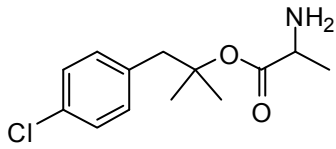
Melitracen



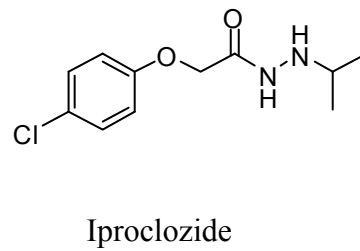
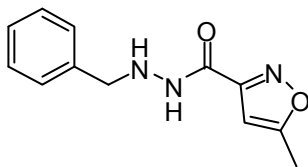
Butriptyline

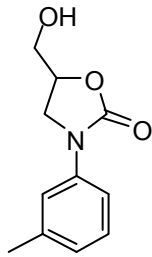


Seçici serotonin geri alım inhibitörleri

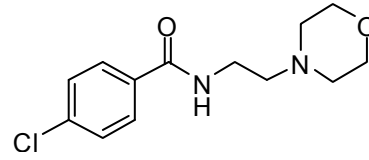


Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri



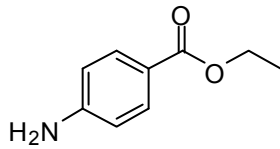


Toloxatone



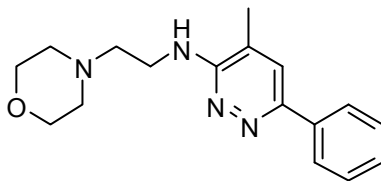
Moclobemide

Lokal anestezik inhibitör

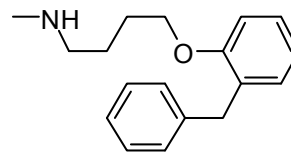


Benzocaine

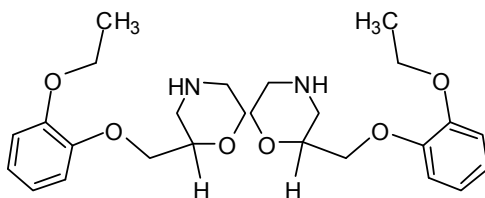
Antidepresanlar



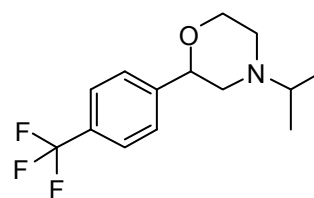
Minaprine



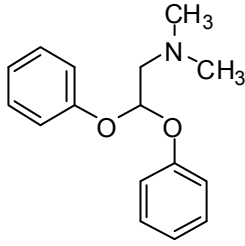
Bifemelane



Viloxazine

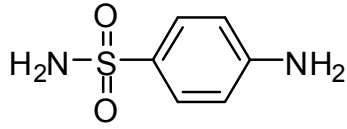


Oxaflozane

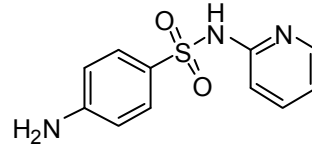


Medifoxamine

Mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan inhibitörler

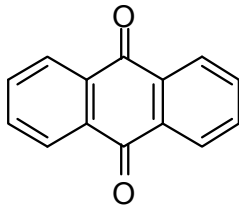


Sulfanilamid

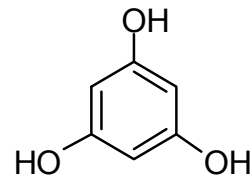


Sulfapiridin

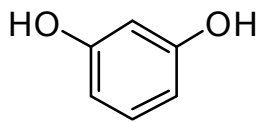
Bilinen diğer organik moleküller



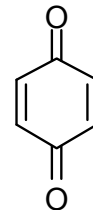
1,8-Dioksiyantraquinone



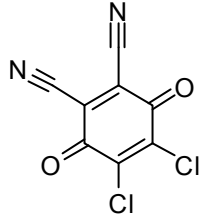
Fhloroglusinol



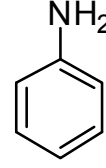
Resorsinol Aniline



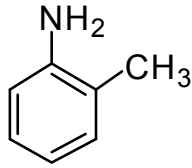
P-Benzokinon



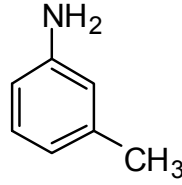
2,3-Diklor-5,6-disyano-1,4-benzokininon



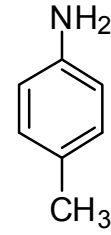
Aniline



o-Toludin



m-Toludin



p-Toludin

Bilinen bu inhibitörlerden molekül yapıları tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu oluşturabilecek olanlar sülfanilamid, sülapiridin, o-toluidine, m-toluidine p-toluidine, aniline ve benzokain olduğu tespit edildi. Zaten sülfanilamid eritrositlerde karbonik anhidraz enzimi içinde kullanılan bir ligand olarak bulunmuştur (Arslan *et al.* 1996; Falkbring *et al.* 1972). Bizde çalışmamızda öncelikle sülfanilamid ve sülapiridin inhibitörlerini afinite kolonunun ligandı olarak kullanmayı ve LPO enzimini saflaştırmayı hedefledik.

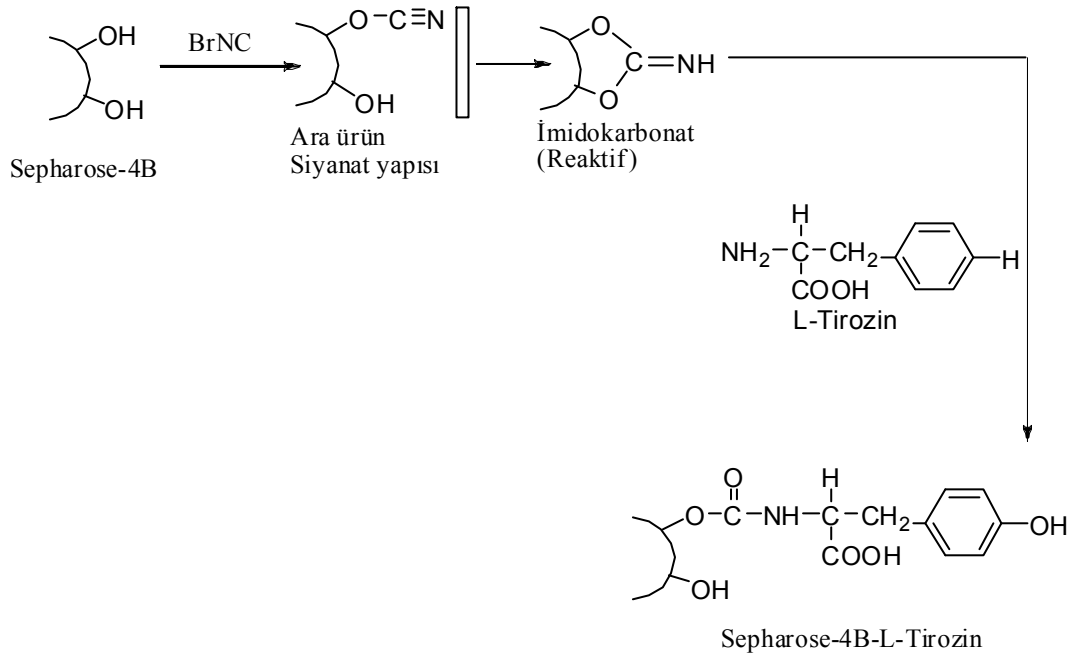
3.5.3.c. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid ve sülfapyridine inhibitörleri ayrı ayrı önceden hazırlanmış jeller diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup karbonik anhidraz saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Arslan *et al.*

1996). Karbonik anhidraz için kullanılan afinite jeli hazırlanması metodu LPO enzimin saflaştırılmasında kullanılacaktır. Kullanılan afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

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

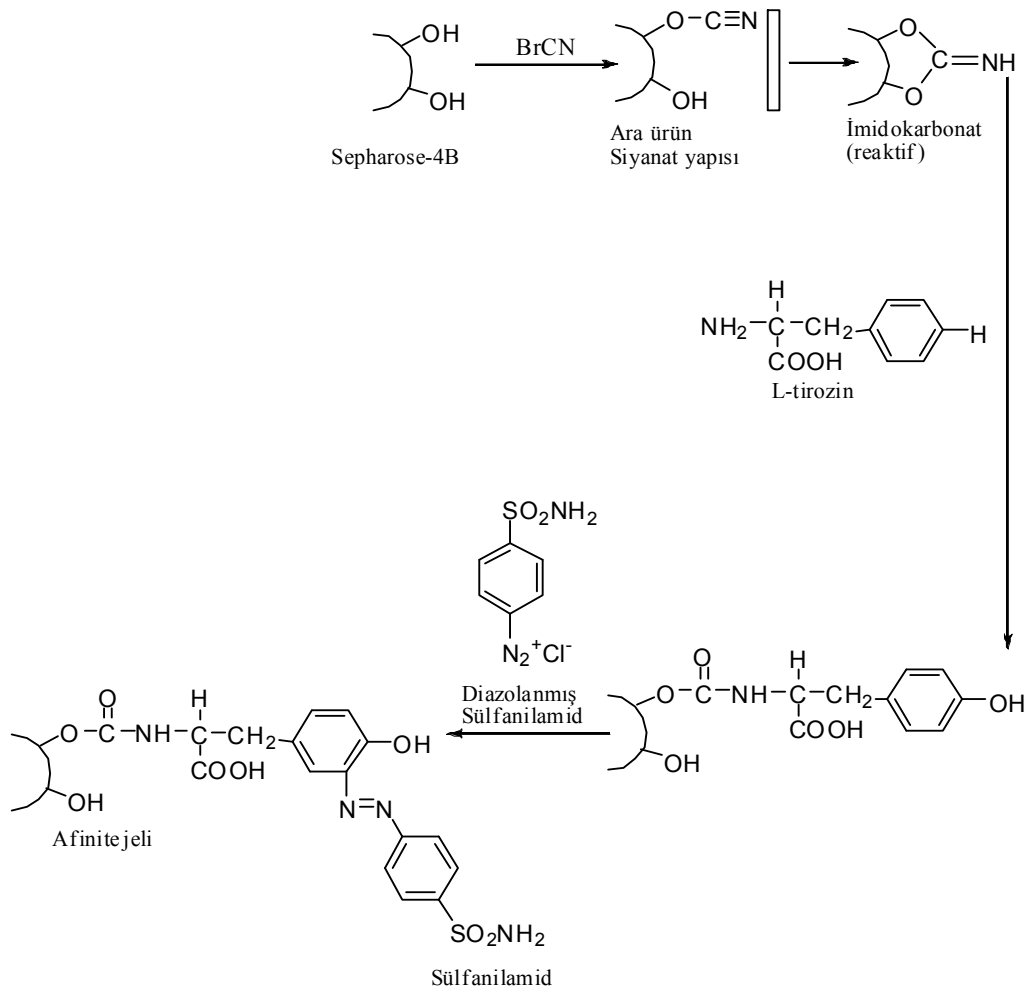
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede 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 absorbans 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. (Şekil 3.1.)



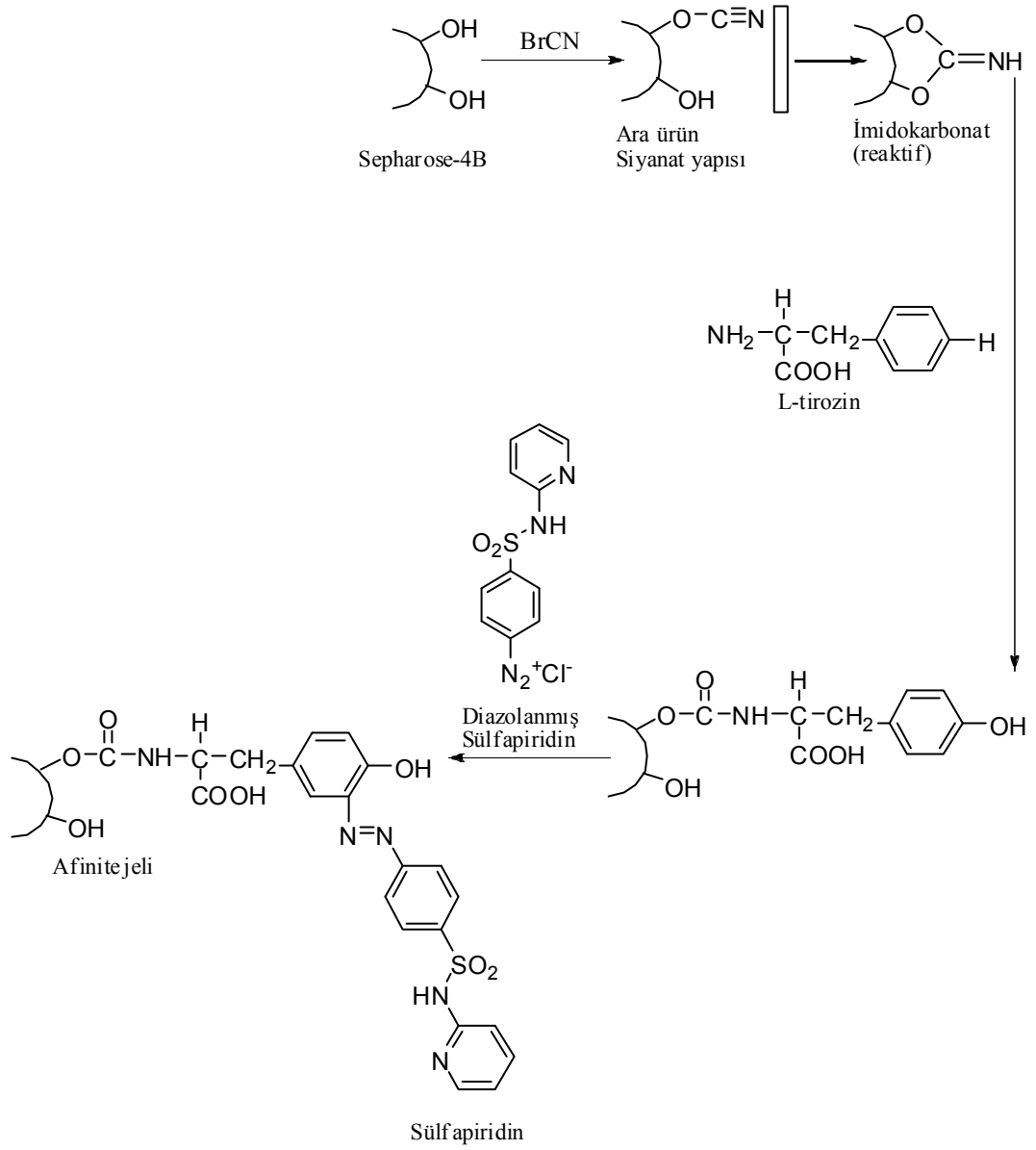
Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

b. Sülfanilamid ve Sülfapiridin kenetlendirilmesi:

Her bir inhibitör'den 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 çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH:9,5'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). Hazırlanan jellerde bağlanma modelleri Şekil 3.2-3.3 de verildi.



Şekil 3.2. Sülfanilamid kenetlendirilmesi bağlanma modeli



Şekil 3.3. Sülfapiridin kenetlenilmesi bağlanma modeli

3.5.3.d. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jeller dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jeller süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jeller, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolonlara paketlendi. Jeller çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun

dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorptionslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.5.3.e. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

3.5.3.a.'da belirtildiği gibi Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenatin 50ml'si 10 mM fosfat (pH:6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolona 400 ml 25 mM fosfat (pH:6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorptions değerleri köre karşı ölçülerek R_z değeri ($R_z = A_{412}/A_{280}$) 0,6'dan büyük olan tüpler birleştirildi ve absorptionslarına bakıldı.

3.5.3.f. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir, bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözeltiden kantitatif olarak çöktülebilir. Bu olayın esası, yüksek tuz konsantrasyonunda protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su moleküllerinin tuzdaki iyonlar tarafından çekilmesi ve proteinlerin çökmesini sağlamasıdır. Proteinlerin çökmesinde molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında, değişik proteinler çöker (Lehninger 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Elde ettiğimiz elüatlarda proteinlerin bu özelliklerinden faydalanıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi için uygun doygunluk noktasını bulmak amacıyla %0-20, 20-40, 40-60, 60-80 ve 80-90 aralıklarında çöktürme yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları şu formülle tespit edildi.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \cdot V (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V = Süpernatantın hacmi

S₁= 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂= 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi için, afinite kolonundan elde edilen elüatlar birleştirildikten sonra, katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş porsiyonlar halinde katıldı (0°C'de). Her porsiyon ilavesi sırasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Çöktürmeden sonra elde edilen çözelti 12.000 rpm'de 5°C'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüj ile santrifüj edilerek oluşan çökelek 25 ml 5 mM fosfat tamponunun pH:(6,8) çözünebildiği en az miktarında çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildikten sonra, enzimin içinde bulunduğu tampona 5 mM fosfat tamponu pH:(6,8) karşı 2 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buzdolabı içinde (4°C'de) gerçekleştirildi.

3.5.3.g. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

LPO enzimi afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-10 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. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konularak ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Ayırma ve yığma 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 %0,1 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 0,8 ml %1,5'lik amonyum persülfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 0,44 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,48 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2,45 ml saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,2 ml ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar (yaklaşık yarım saat) bekletilip katılaştıktan sonra üzerindeki %1'lik SDS döküldü. 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 soğutulurken, 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 2 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı.

Jel, sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA+ %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. İki saat boyunca çalkalayıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme

çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jel saf su içine alındı ve fotoğrafları çekildi. Renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanılabilir. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Renksizleştirme çözeltisi ise %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması

Hazırlanacak jellerin proteini tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelenmelidir. 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 laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu ve enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

LPO enziminin safalaştırılmasında 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. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar

Hazırladığımız afinite kromatografisi kolanlarından saflaştırılacak LPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için ABTS substratı kullanarak optimum pH, optimum sıcaklık ve ABTS için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

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 laktoperoksidaz 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.

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

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,2 ml, 0,3 ml, 0,5 ml, 0,8 ml ve 1,1 ml alındı. Her bir ABTS konsantrasyonun 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 regrasyon doğru denklemi kullanıldı. K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak tabloda gösterildi.

3.7.4. Kullanılan ligandlar için kinetik çalışmalar

LPO enzimi Sülfanilamid, gentamisin sülfat, amfisilin sodyum (Çankaya ve ark 2006) sülfapiridin ve benzokain (Geike and Parasher 1975) gibi maddelerce inhibe edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmalarda ligand olarak kullandığımız inhibitörlerin K_i ve I_{50} değerleri hesaplanması üzerine ve inhibisyon tipleri hakkında literatürde detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sülfanilamid ve sülfapiridin inhibitörleri ligand olarak kullanılmadan önce K_i ve I_{50} değerleri hesaplandı. Böylece saflaştırmada kullanılan sülfanilamid ve sülfapiridin için detaylı kinetik özellikler de belirlenmiş oldu.

Ligand olarak kullanılan inhibitörlerin ABTS substratına bağlı olarak, I_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH'da, doygun olmayan ABTS ($26,67 \cdot 10^{-2}$ mM) konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi.

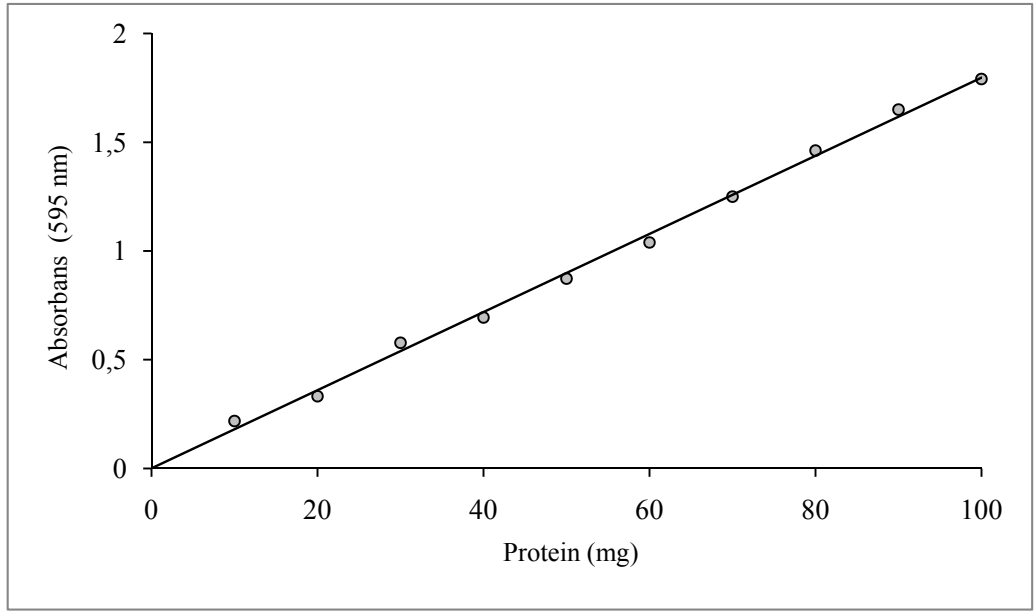
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda

ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulundu.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Afinite kolonlardan saflaştırılan LPO enziminin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla 3.5.1.b'de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1'deki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.

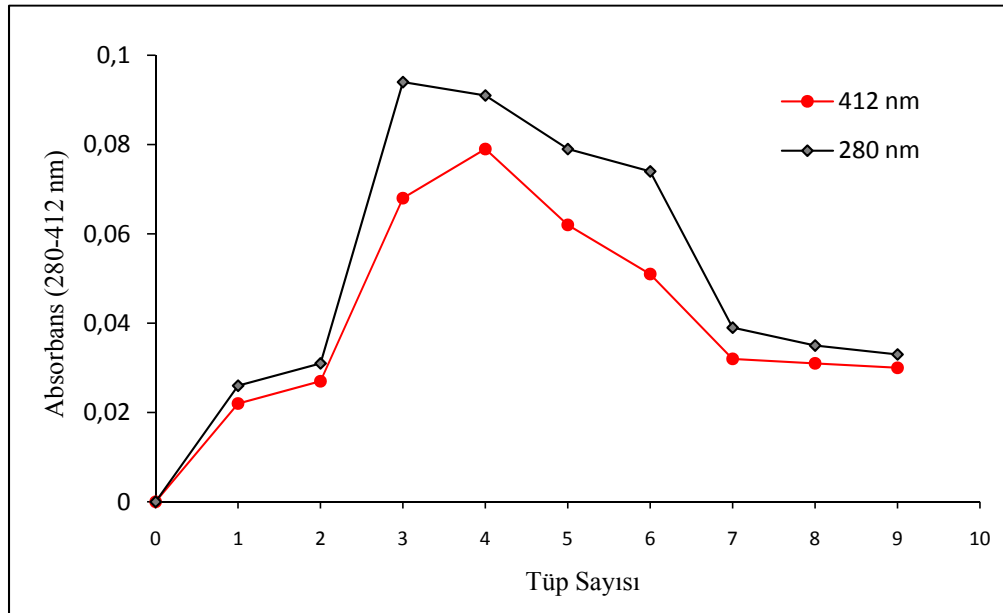


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

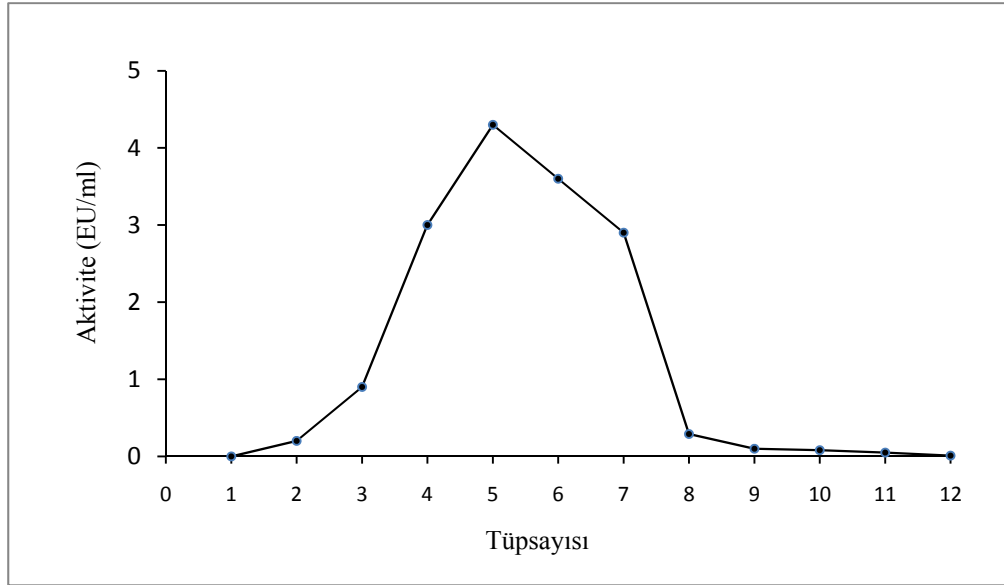
4.2. Sığır Sütünden LPO Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

4.2.1. LPO enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Bölüm 3.5.3.d’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.5.3.a.’da 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 absorbans 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 absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2’de verildi. 412 nm de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.3’de gösterildi.



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



Şekil 4.3. LPO Enziminin sülfanilamid afinite kolonundan elüsyonu sonucundaki aktivite-tüpsayısı garafik.

4.2.2 Amonyum sülfatla çöktürme sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesinde uygun doygunluk noktasını tespit etmek amacıyla; sülfanilamid kolonundan alınan elüatlardan elde edilen LPO çözeltilisine %0-20, 20-40, 40-60, 60-80 ve 80-90 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her çöktürme kademesi için gerekli olan katı amonyum sülfat miktarı bölüm 3.5.3.f'de anlatıldığı gibi tespit edildi ve her çöktürme kademesindeki çökelekler çözünebildiği en az miktardaki 5mM fosfat tamponunda (pH:6,8) çözüldü. Her basamaktaki süpernatant ve çökelek için LPO enzim aktiviteleri, 1 mM ABTS substratıyla bölüm 3.5.2'de açıklandığı şekilde belirlendi.

Çöktürme kademelerindeki çökelek ve süpernatantların aktiviteleri Çizelge 4.1'de verildi. Tablolar incelendiğinde %60-90 amonyum sülfat doygunluğunda maksimum enzim aktivitesi olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Sığır sütünden elde edilen LPO enzimi için Amonyum sülfatla çöktürmede doyunluk noktası tespiti.

Doygunluk %	0-20	20-40	40-60	60-80	80-90
Çökelek Aktivite (EÜ/ml)	0,15	0,58	1,66	2,87	4,5
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	11,55	9,91	6,68	3,27	0,02

4.2.3. LPO enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Bölüm 3.5.3.c’de anlatıldığı gibi hazırlanan jeller kolono paketlendikten sonra 10 mM Na₂HPO₄ pH:6,8 fosfat tamponu ile dengelendi. 3.5.3.a.’da 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 laktoperoksidaz enziminin kolonlara tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat’e ayarlandı.

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=A₄₁₂/A₂₈₀) 0,6’dan büyük olan tüpler birleştirildi ve Bölüm 3.5.3.f’de anlatıldığı gibi %90 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve diyaliz edildi ve SDS elektroforezi yapılarak saflığı kontrol edildi. Sülfapiridin kolonundan yapılan elüsyon sonucunda LPO enziminin aktivitesi bulunamadığı gibi R_z değeri hesaplanamadı.

Ligand olarak sülfanilamit ve sülfapiridin kullanılan kolondan, sığır sütünden laktoperoksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde Shindler ve Bardsley yöntemiyle (Shindler and Bardsley 1975) 412 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. LPO enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Çizelge 4.2’de gösterildi.

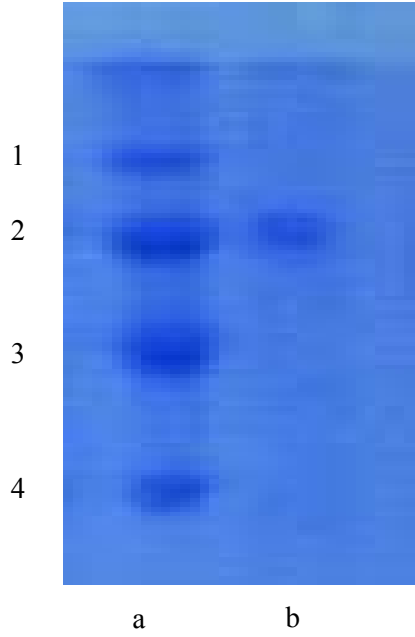
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamid ve sülfapiridin kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.

	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Protein Miktarı	Total Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Amberlit CG 50 H ⁺ Reçinesi Elüsyonu	50	1,01	10	500	50,5	0,1	100	1
Sepharose 4B Afinite Jeli ve Diyaliz	7	4,50	0,11	0,77	31,5	40,9	62,3	409

4.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu sülfanilamid kolonu ile sığır sütünden saflaştırılan laktoperoksidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.5.3.g’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforezine saflaştırılan LPO’lar yerleştirildi.

Sığır sütü için standart olarak molekül ağırlığı belli olan MBP (Maltose-bağlı protein)- β -galactosidase (175 kDa), MBP (Maltose-bağlı protein)-paramyosin (fusion ile MBP and paramyosin) (80 kDa), MBP-CBD (chitin bağli domain) (fusion ile MBP ve chitin bağli domain) (58 kDa), CBD-*Mxe* Intein-2CBD (fusion ile chitin bağli dotmain ve *Mxe* Intein) (46kDa) enzimleri kullanıldı. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.4).



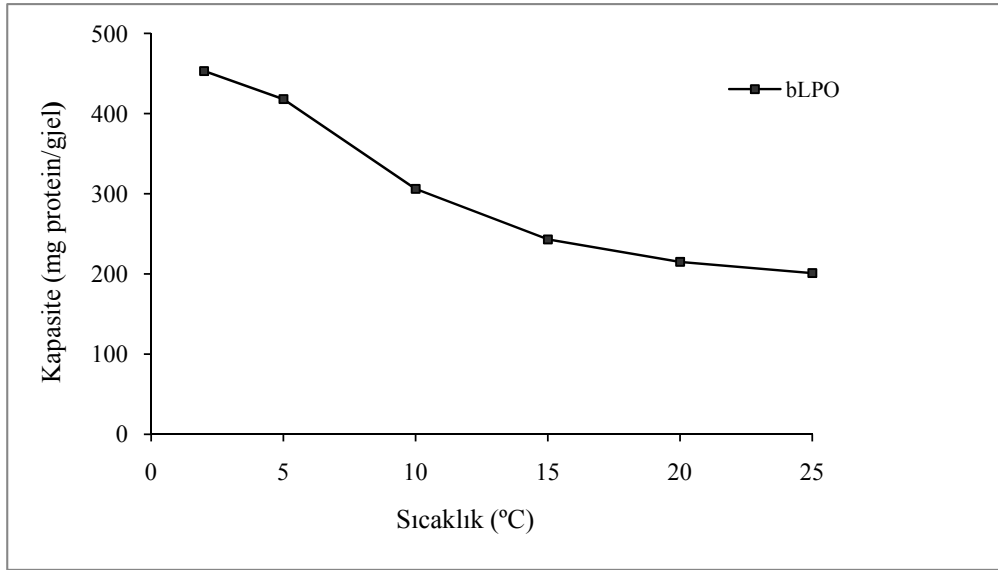
Şekil 4.4. Sülfanilamid kolonundan saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı:
 *(Bant a; Standartlar; 1. MBP (Maltose-bağlı protein)- β -galactosidase (175 kDa) 2. MBP (Maltose-bağlı protein)-paramyosin (fusion ile MBP and paramyosin) (80 kDa), 3. MBP-CBD (chitin bağli domain) (fusion ile MBP ve chitin bağli domain) (58 kDa), 4. CBD-*Mxe* Intein-2CBD (fusion ile chitin bağli dotmain ve *Mxe* Intein) (46kDa) Bant b; saflaştırılmış sığır LPO.)

4.3. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanacak 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 laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

4.3.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

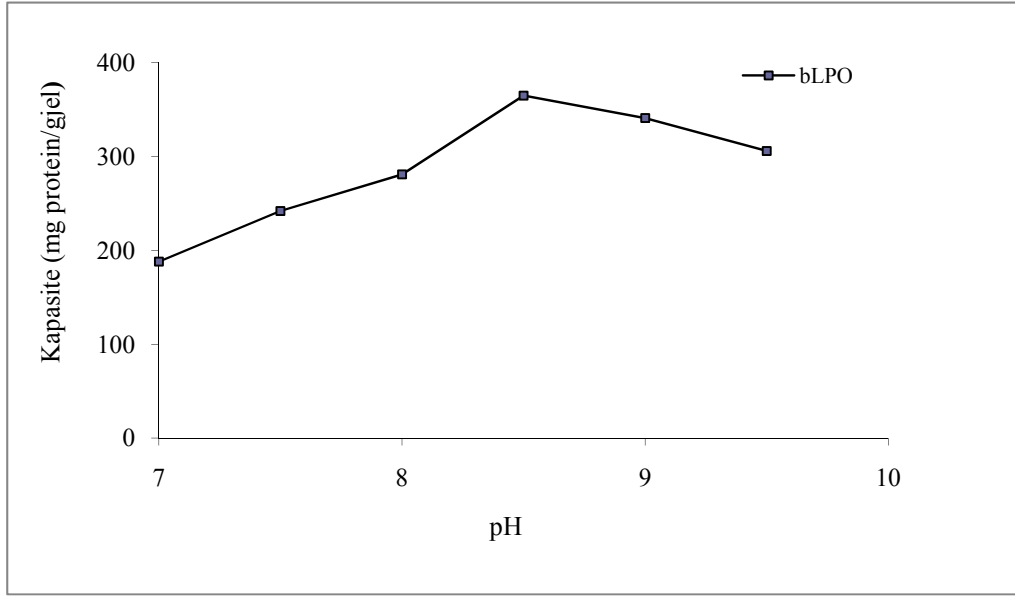
pH:6,8’de laktoperoksidaz farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel) sonuçlar Şekil 4.5’de verildi.



Şekil 4.5. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.3.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

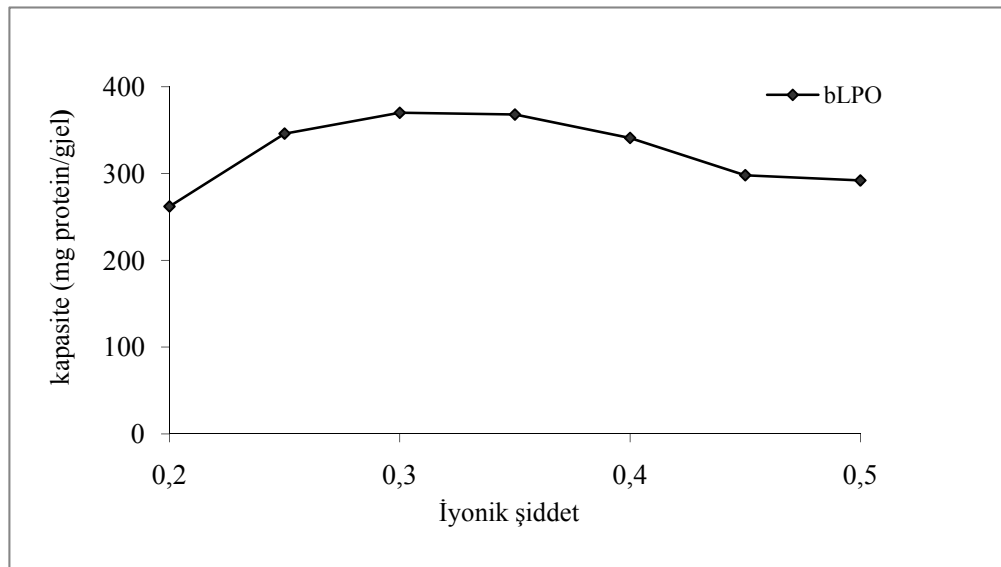
Bu bölümdeki deneyler pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.6'da verildi.



Şekil 4.6. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin pH-kapasite grafiği

4.3.3 İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

Laktoperoksidaz enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.7’de verildi.

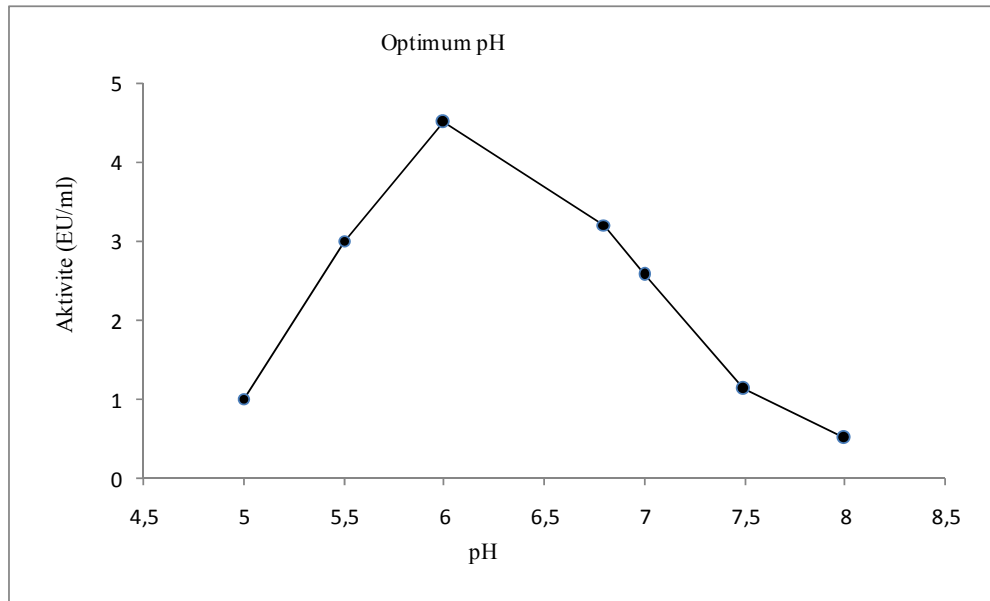


Şekil 4.7. Sepharose-4B-sülfanilamid jelinin iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği

4.4. Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışma Sonuçları

4.4.1. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği

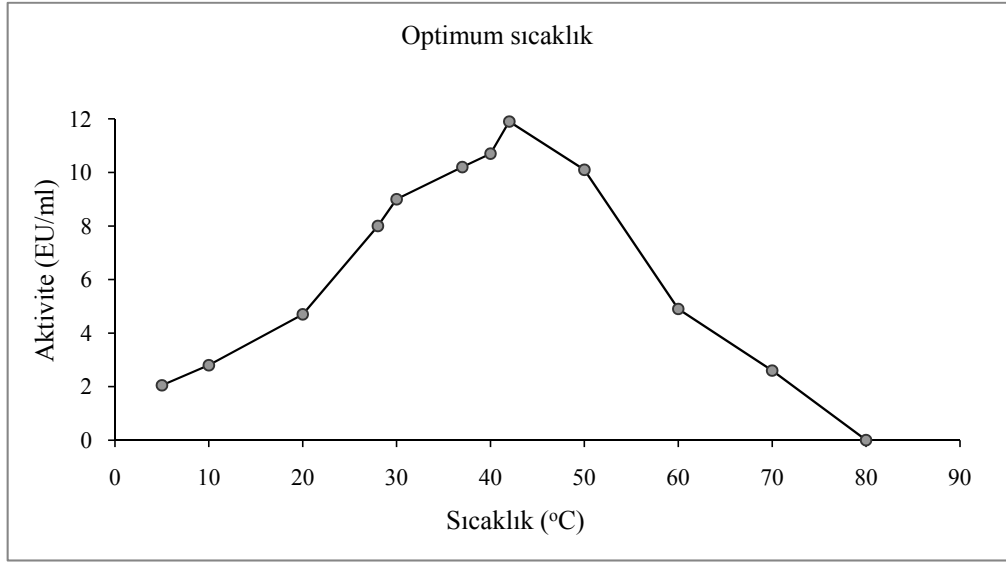
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde pH 5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Sığır sütünden elde edilen ölçümler sonucunda aktivite değerleri ile pH grafiği Şekil 4.8’de verildi.



Şekil 4.8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.4.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

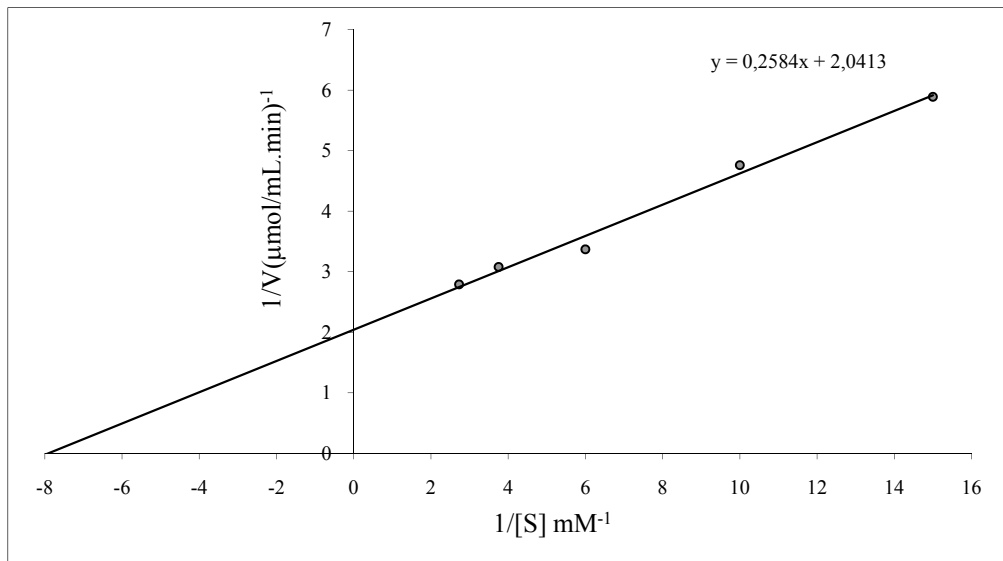
Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.9’da verildi.



Şekil 4.9. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği.

4.4.3. ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

Optimum pH ve 20°C sıcaklıkta en az 5 ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V-1/[S]$ değerleri yardımıyla *Lineweaver-Burk* grafikleri çizildi. Bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Çizilen grafik Şekil 4.10'da gösterildi sonuçlar Çizelge 4.3'de verildi.



Şekil 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.

Çizelge 4.3. Sığır sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmalarının toplu sonuçları.

Kinetik Çalışmalar	
Optimum sıcaklık	42°C
Optimum pH	6,0
K_M	0,14 mM
V_{max}	0,55 EÜ/ml.dk

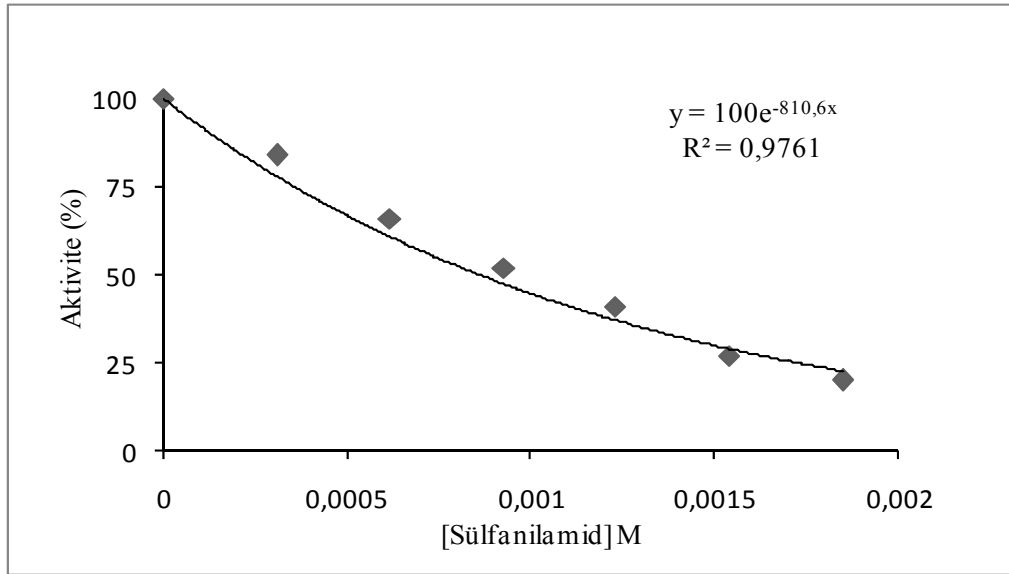
4.4.4. Kullanılan inhibitörlerin K_i ve I_{50} değerlerinin bulunması

Bu çalışmada sülfanilamid ve sülfapiridin inhibitörleri DMSO'da çözülerek LPO enzimi üzerine ABTS substratı için etkileri incelendi. ABTS substratı doygunluğun altında alındı ve böylece reaksiyon hızı ABTS'ye bağlı olarak bulundu.

Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda ABTS ($26,67 \cdot 10^{-2}$ mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.4-4.5'de gösterildi ve % aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek I_{50} değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.11-4.12'de gösterildi.

Çizelge 4.4. Sülfanilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-konsantrasyon deney prosedürü.

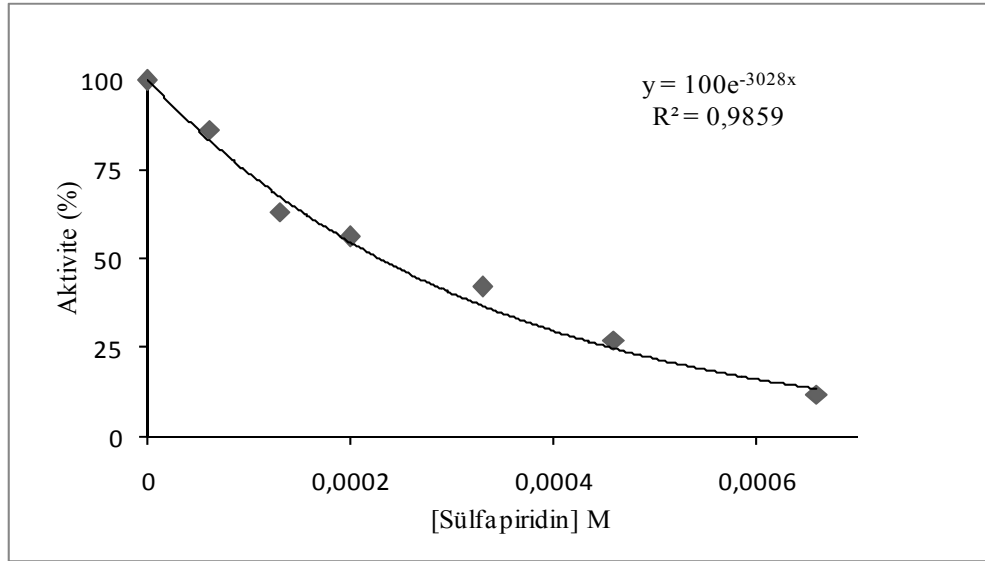
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] M
İnhibitör	ABTS (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi-tör (ml)	ABST (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi-tör (ml)	LPO (ml)		
Sülfanilamid	0,8	2,10	0,1	-	0,8	1,90	0,1	-	0,2	100	0
	0,8	2,09	0,1	0,01	0,8	1,89	0,1	0,01	0,2	84	$3,09 \cdot 10^{-5}$
	0,8	2,08	0,1	0,02	0,8	1,88	0,1	0,02	0,2	66	$6,18 \cdot 10^{-5}$
	0,8	2,07	0,1	0,03	0,8	1,87	0,1	0,03	0,2	52	$9,28 \cdot 10^{-5}$
	0,8	2,06	0,1	0,04	0,8	1,86	0,1	0,04	0,2	41	$12,3 \cdot 10^{-5}$
	0,8	2,05	0,1	0,05	0,8	1,85	0,1	0,05	0,2	27	$15,4 \cdot 10^{-5}$



Şekil 4.11. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak Sülfanilamid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.5. Sülfapiridin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-konsantrasyon deney prosedürü.

Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] M
Inhibitör	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)		
Sülfapiridin	0,8	2,10	0,1	-	0,8	1,90	0,1	-	0,2	100	0
	0,8	2,09	0,1	0,01	0,8	1,89	0,1	0,01	0,2	86	$0,6 \cdot 10^{-4}$
	0,8	2,08	0,1	0,02	0,8	1,88	0,1	0,02	0,2	63	$1,3 \cdot 10^{-4}$
	0,8	2,07	0,1	0,03	0,8	1,87	0,1	0,03	0,2	56	$2 \cdot 10^{-4}$
	0,8	2,05	0,1	0,05	0,8	1,85	0,1	0,05	0,2	42	$3,3 \cdot 10^{-4}$
	0,8	2,03	0,1	0,07	0,8	1,83	0,1	0,07	0,2	27	$4,6 \cdot 10^{-4}$



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

Daha sonra innhibisyon tipinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tesbit edilmesi amacıyla 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit solvent konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Kontrol amaçlı yapılan ve ABTS substratıyla yapılan tüm çalışmalarda kullanılan aktivite ölçümü değerleri ve prosedürü Çizelge 4.6'da

gösterilmiştir. İnhibitörlü çalışmaların aktivite ölçüm değerleri ve deney prosedürleri ise Çizelge 4.7-4.8’de gösterilmiştir. Aktivite değerleri bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde belirlendi. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulundu. K_i değerleri bulunmasında kompetitif inhibisyonlar için formülü

$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Non kompetitif inhibisyonlarda ise

$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

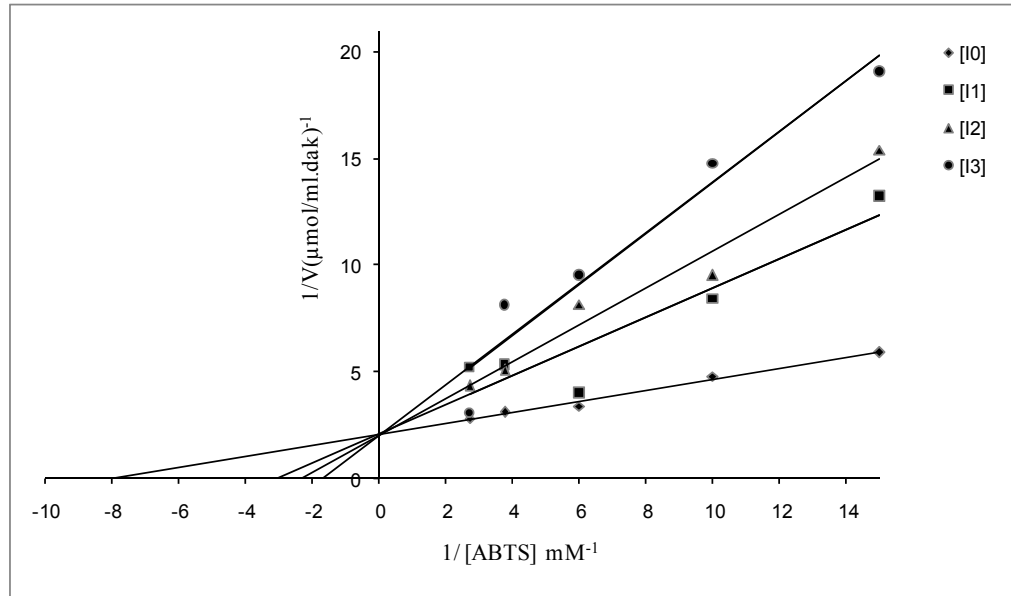
förmülü kullanıldı. Bu grafikler Şekil 4.13-4.14’de gösterildi. Elde edilen K_i değerleri ise Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla inhibitör kullanılmadan 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 no	ABTS (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi -tör (ml)	LPO (ml)		
[I] ₀	0,2	2,7	0,1	-	0,2	2,5	0,1	-	0,2	5,89	15
	0,3	2,6	0,1	-	0,3	2,4	0,1	-	0,2	4,76	10
	0,5	2,4	0,1	-	0,5	2,2	0,1	-	0,2	3,37	6
	0,8	2,1	0,1	-	0,8	1,9	0,1	-	0,2	3,08	3,75
	1,1	1,8	0,1	-	1,1	1,6	0,1	-	0,2	2,89	2,73

Çizelge 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

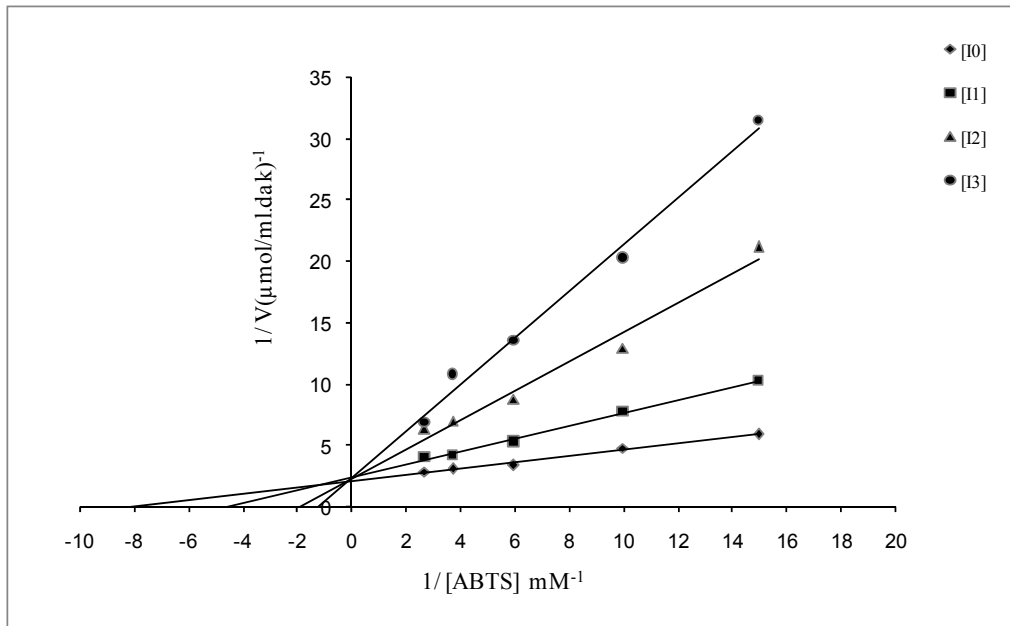
İnhibi-tör no	Kör Tüpü				Numune Tüpü					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml. min}^{-1}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	ABTS (ml)	Fosfat Tam (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi-tör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi-tör (ml)	LPO (ml)		
[I] ₁	0,2	2,69	0,1	0,01	0,2	2,49	0,1	0,01	0,2	13,50	15
	0,3	2,59	0,1	0,01	0,3	2,39	0,1	0,01	0,2	6,0	10
	0,5	2,39	0,1	0,01	0,5	2,19	0,1	0,01	0,2	3,90	6
	0,8	1,91	0,1	0,01	0,8	1,89	0,1	0,01	0,2	3,41	3,75
	1,1	1,79	0,1	0,01	1,1	1,59	0,1	0,01	0,2	3,24	2,70
[I] ₂	0,2	2,67	0,1	0,03	0,2	2,47	0,1	0,03	0,2	15,42	15
	0,3	2,57	0,1	0,03	0,3	2,37	0,1	0,03	0,2	9,52	10
	0,5	2,37	0,1	0,03	0,5	2,17	0,1	0,03	0,2	6,23	6
	0,8	2,07	0,1	0,03	0,8	1,87	0,1	0,03	0,2	5,06	3,75
	1,1	1,77	0,1	0,03	1,1	1,57	0,1	0,03	0,2	4,32	2,70
[I] ₃	0,2	2,65	0,1	0,05	0,2	2,45	0,1	0,05	0,2	19,05	15
	0,3	2,55	0,1	0,05	0,3	2,35	0,1	0,05	0,2	14,72	10
	0,5	2,35	0,1	0,05	0,5	2,15	0,1	0,05	0,2	9,52	6
	0,8	2,05	0,1	0,05	0,8	1,85	0,1	0,05	0,2	8,10	3,75
	1,1	1,75	0,1	0,05	1,1	1,55	0,1	0,05	0,2	6,23	2,70



Şekil 4.13. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla Sülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği. ($[I_1]=3,09 \cdot 10^{-5}$ M, $[I_2]=9,28 \cdot 10^{-5}$ M, $[I_3]=15,46 \cdot 10^{-5}$ M, $[I_0]=$ kontrol)

Çizelge 4. 8. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfapiridin 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	$1/S$ mM^{-1}
İnhibi- tör no	ABTS (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi- tör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibi- tör (ml)	LPO (ml)		
[I] ₁	0,2	2,69	0,1	0,01	0,2	2,59	0,1	0,01	0,1	11,17	15
	0,3	2,59	0,1	0,01	0,3	2,49	0,1	0,01	0,1	0,87	10
	0,5	2,39	0,1	0,01	0,5	2,29	0,1	0,01	0,1	5,31	6
	0,8	2,09	0,1	0,01	0,8	1,99	0,1	0,01	0,1	4,20	3,75
	1,1	1,79	0,1	0,01	1,1	1,69	0,1	0,01	0,1	4,05	2,73
[I] ₂	0,2	2,67	0,1	0,03	0,2	2,57	0,1	0,03	0,1	20,25	15
	0,3	2,57	0,1	0,03	0,3	2,47	0,1	0,03	0,1	12,96	10
	0,5	2,37	0,1	0,03	0,5	2,27	0,1	0,03	0,1	8,75	6
	0,8	2,07	0,1	0,03	0,8	1,97	0,1	0,03	0,1	7,04	3,75
	1,1	1,77	0,1	0,03	1,1	1,67	0,1	0,03	0,1	6,35	2,73
[I] ₃	0,2	2,65	0,1	0,05	0,2	2,55	0,1	0,05	0,1	29,45	15
	0,3	2,55	0,1	0,05	0,3	2,45	0,1	0,05	0,1	20,25	10
	0,5	2,35	0,1	0,05	0,5	2,25	0,1	0,05	0,1	13,50	6
	0,8	2,05	0,1	0,05	0,8	1,95	0,1	0,05	0,1	10,80	3,75
	1,1	1,75	0,1	0,05	1,1	1,65	0,1	0,05	0,1	6,89	2,73



Şekil 4.14. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla sülfapiridin inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği. ($[I_1]=6,6 \cdot 10^{-5}$, $[I_2]=2 \cdot 10^{-4}$ M, $[I_3]=3,3 \cdot 10^{-4}$ M, $[I_0]=\text{kontrol}$)

Çizelge 4.9. Sığır LPO'sunun üç farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_i değerleri ve sabit substrat konsantrasyonunda $26,67 \cdot 10^{-2}$ mM ABTS 5 farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen aktivite – [inhibitör] grafiğinden elde edilen I_{50} değerleri.

İnhibitör	I_{50} (M)	[inhibitör] (M)	K_i değeri (M)	Ortalama K_i (M)	İnhibisyon şekli
Sülfanilamid	$8,48 \cdot 10^{-4}$	$3,09 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$	$3,57 \cdot 10^{-5} \pm 4,88 \cdot 10^{-6}$	Yarışmalı
		$9,28 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$		
		$15,46 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$		
Sülfapiridin	$2,27 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,50 \cdot 10^{-5} \pm 3,61 \cdot 10^{-6}$	Yarışmalı
		$2 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-5}$		
		$3,3 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^{-5}$		

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Laktoperoksidaz enzimi (LPO) memelilerin sütünde, gözyaşında ve tükürüğünde bulunan prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir glikoproteindir (Tenovuo 1985). LPO enzimi bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesi gibi önemli bir özelliğe sahiptir (Shah 2000). Endüstride laktoperoksidaz kimya endüstrisinde, süt endüstrisinde, süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla kullanılmaktadır (Uğuz 2005). Bu çalışmada özellikle memelilerin non-immun biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşiği olan laktoperoksidaz enziminin (LPO) yeni bir yöntemle afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. LPO enzimi literatürde enzimin saflaştırılması üzerine birçok kromatografik metod olup mevcut yöntemler hem uzun hemde maliyeti bizim bulduğumuz yöntemle göre daha pahalıdır (Özdemir *et al.* 2001).

Afinite kromatografisi proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri 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).

Enzimlerin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması çok önemlidir. Bu sebeple sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılması için ilk kez afinite jelleri hazırlandı. Bu hazırlanan kolonlardan saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri, SDS-PAGE elektroforezi ve kullanılan ligandların kinetik özellikleri belirlendi. Elde edilen değerleri tartışmadan önce araştırmada kullanılan yöntemlerin seçiliş sebeplerini açıklayalım.

Çalışmalarımız esnasında 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 belirlendi. 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 gelişir. 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.

Laktoperoksidaz 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.

Sulfanilamid ve sülfapiridin LPO inhibitörü olduğu literatür’de biliniyordu (Doerge and Decker 1994), fakat bu inhibitörlerin detaylı kinetik özellikleri hakkında bir çalışmaya rastlanmadı. Sülfanilamid ve sülfapiridin gibi inhibitörler yapılarında -NH₂ bulundurur. Sülfanilamid karbonik anhidraz enziminde bir inhibitörü olup bu enzimin saflaştırılmasında ligand olarak kullanılmıştır (Arslan *et al.* 1996). Sülfanilamid ve sülfapyridine inhibitörleri ile afinite jeli hazırlayarak LPO enziminin saflaştırılmasını bu kolonlarda denedik. Bu jellerin sentezlendiği sulfanilamid ve sülfapyridine diazonyum tuzu oluşturarak uzantı koluna bağlanmasında jelin renklenmesinden anlaşılmaktadır. Zaten diazonyum tuzları bileşikleri renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir. Kullanılan afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

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 çözünmüş 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 absorbans 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. Bu prosedür daha önce karbonik anhidrazın saflaştırılması sırasında başarı ile kullanıldı (Aslan *et al.* 1996).

Her bir inhibitörden 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 çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH:9,5'e 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

Hazırlanan jeller dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jeller süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jeller, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolonlara paketlenildi. Jeller çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı.

Hazırlanan afinite kolonlarına numune tatbiki için homojenat hazırlandı, 200 ml sütün yağı alınarak süt içerisine zayıf asidik katyon değiştirici olan Amberlit CG 50 H⁺ katılarak kısmi bir saflaştırma yapıldı (Doumonted and Rousset 1983). Burada LPO enzimi bu reçineye bağlanarak süt içerisindeki diğer bazı safsızlıklar uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra sırayla Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen homojenat 10 mM fosfat (pH:6,8) tamponu ile dengelenmiş olan hazırlanan kolonlara tatbik edildi ve kolonlar 400 ml 25 mM fosfat (pH:6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış olur. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz 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. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorbans değerleri köre karşı ölçülerek Rz değeri (Rz=A₄₁₂/A₂₈₀) 0,6 dan büyük olan tüpler birleştirildi absorbanslarına bakıldı.

Çizelge 4.2'de sığır sütü LPO enziminin saflaştırma basamaklarını gösterilmektedir. Hazırlanan afinite jellerinden sadece sülfanilamid kolonu enzimi bağlamış sülfapiridin kolonu ile hazırlanmış jelde herhangi bir sonuç alınamamıştır. Sülfanilamid ligand

olarak kullanıldığında 200 ml süttten amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 ml kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 40,9 olup enzim 409 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 62,3 olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonunda 200 ml süttten 0,77 mg LPO ($R_z=0,6$) elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır süttünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Enzimin literatürde saflaştırılması konusunda birçok kromatografik yöntem kullanılmaktadır (Çankaya *et al.* 2006). Bu çalışmalarda 3 farklı kolon kullanılarak LPO saflaştırılması yapılmaktadır. Yağı alınmış sütte önce Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi ile kısmı bir saflaştırma yapılmış sonra Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak CM Sephadex iyon değişim kromatografisi ile gradiyentli elüsyon sonucunda tekrar amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizden sonra Sephadex G100 jel filtrasyon kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak enzim saflaştırılması başarılmış. Bu çalışmalar sonucunda yağı alınmış 1 lt süttten 5 mg LPO elde edilmiş ve SDS-PAGE ile saflığı kontrol edilmiştir (Özdemir *et al.* 2001). Literatürde saflaştırma prosedürü gerçekten çok uzun ve oldukça maliyetlidir. Oysa bizi hazırladığımız afinite jelinin tekrar tekrar çok uzun süre kullanmak tek kolonla saflaştırmak daha az zaman alıcı ve daha az maliyetli olduğu da gözükmektedir.

Saflaştırılan LPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 3.5.3.g'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) protenler konuldu. Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi LPO enzimi literatürde belirtildiği gibi tek bant ve yaklaşık 80.000 k dal molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi (Çankaya *et al.* 2006).

Hazırlanan sülfanilamid 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 laktoperoksidaz 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 laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu ve jel kurutularak tartılarak ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi (Aslan *et al.* 1996).

LPO enziminin safalaştırılmasında 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 4.5'ten görüldüğü gibi 4°C de jel bağlanma kapasitesi diğer sıcaklıklardan daha verimli oldu.

LPO enzimi için kolonlarda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 6,8 ile 9,5 arasında) tamponlar kullanılarak en pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.6'da grafik edildi. Buradan pH:8 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 4.7'de görüldüğü gibi 0,3-0,4 M konsantrasyonunda bağlanma maksimum olduğu belirlenerek hazırladığımız afinite kolonundan LPO enzimi için tutma kapasitesi testleri yapılmış oldu. 4°C'de pH 8,6'da 0,25 M iyonik şidet konsantrasyonunda optimum bağlanma 395 mg/gjel olarak tespit edildi.

Kolondan saflaştırılan enzimin 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 4.8'de gösterildi. Bu grafiklerden çıkarılan sonuçlara göre bulunan optimum pH'lar; Çizelge 4.3'de verildi. Sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 6 olduğu bulundu.

Optimum sıcaklık belirlenmesinde de yine ABTS substratı ile enzimlerin optimum pH'larında 5-85°C sıcaklık aralığında 412 nm'de aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite optimum sıcaklık grafikleri Şekil 4.9'da gösterildi. Bu grafiklerden elde edilen optimum sıcaklıklar Çizelge 4.3'de verildi. Bu sonuçlara göre optimum sıcaklık sığır sütü LPO'su için 42°C olarak belirlendi. Bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak tespit edildi (Özdemir *et al.* 2001).

Optimum pH ve 20°C'de ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere, her bir enzim için en az beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Şekil 4.10'da K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Sonuçlar Çizelge 4.3'de verildi. Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi K_M değerleri, sığır sütü LPO'su için 0,14 mM, olarak bulundu. Bulunan bu sonuç daha önce farklı yöntemlerle saflaştırılan LPO için literatürle uygunluk içerisindedir (Özdemir *et al.* 2001). Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, ABTS substratı için V_{max} değeri, sığır sütü LPO'su için 0,55 $\mu\text{mol/ml.dk}$ olarak 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
Protein (mg/200 ml)	0,77
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	57,1
Saflaştırma katsayısı	401
Optimum pH	6,00
Optimum Sıcaklık (°C)	42,00
K_M (mM)	0,14
V_{Max} (EÜ/ml)	0,55
Molekül ağırlığı (Dalton)	85,000

Ligand olarak kullanılan sülfanilamid ve sülfapiridin inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı. ABTS substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla,

doygun 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 I_{50} değerleri bulundu.

LPO için bu grafikler Şekil 4.11-4.12'de gösterildi. Elde edilen I_{50} değerleri ise Çizelge 4.9'da gösterildi. Bu sonuçlara göre I_{50} değerleri Sülfanilamid ve sülfapiridin için sırasıyla $8,48 \cdot 10^{-4}$ ve $2,27 \cdot 10^{-4}$ olarak bulundu.

Daha sonra elde edilen LPO enzimleriyle 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Sülfanilamid ve sülfapiridin için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Şekil 4.13-4.14 inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu. Elde edilen bu değerler Çizelge 4.9'da gösterildi.

Bu değerlere göre sülfanilamid ve sülfapiridin yarışmalı inhibisyon etkisi göstermektedir. K_i değerleri Sülfanilamid ve sülfapiridin için sırasıyla $3,57 \cdot 10^{-5}$ ve $6,50 \cdot 10^{-5}$ dir. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilkez bu tez kapsamında tespit edilmiş oldu.

LPO enziminin saflaştırılması ile ilgili bir çok kromatografik yöntem olmasına rağmen enzimlerin saflaştırılmasında çok önemli bir yöntem olan afinite kromatografisi ile ilgili literatürde çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Bu çalışmada kullandığımız siyanojen bromürle aktive edilmiş Sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması ile ilgili hiçbir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu amaçla ilk defa LPO enzimi mevcut metotlara göre farklı bir afinite jeli hazırlanıp saflaştırılması yeni bir yöntem olarak literatüre katkı sağlayacak olması çalışmamızı önemli kılmaktadır. Sülfanilamid ve sülfapiridin gibi diazonyum tuzu oluşturacak inhibitörler enzimin saflaştırılmasında afinite kolonunun ligandı olarak ilk kez kullanılmıştır. Sülfapiridin enzimin inhibitörü olmasına rağmen kolonda enzim bağlanmada etkisi olmadığı bunun yanında sülfanilamidin enzimi mevcut yöntemlere

göre çok iyi bağladığı sonuçlarımızdan görölmektedir. Bu alışmamız LPO enziminin saflaştırılmasında diğer inhibitörlerin (anilin, benzokain ve o-toluidin gibi) araştırılması gerektiğini inhibitörler içerisinde en iyi ligand belirlenmesi için bir başlangıçtır. LPO enzimi için bulduğumuz afinite kromatografisi tekniği mevcut yöntemlere göre daha ucuz, daha kısa ve daha verimli ve hazırlanan kolon materyali defalarca kullanılabilir özelliktedir.

Sonuç Olarak;

1. Laktoperoksidaz enzimi mevcut yöntemler haricinde Sepharose-4B-L-tirozin-Sülfanilamid jeli ile saflaştırılması ilk defa bu çalışmada gerçekleştirildi.
2. Enzimin literatürde mevcut saflaştırma yöntemlerine üstünlüğü ortaya konularak hazırlanan kolonun çok uzun süre kullanılabilirdiği ve daha ekonomik olduğu tespit edildi.
3. Afinite ile saflaştırılan enzim için optimum pH, optimum sıcaklık, K_M ve V_{max} gibi kinetik parametreleri tespit edildi.
4. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan sülfanilamid ve sülfapiridin için detaylı kinetik parametreler K_i , I_{50} ve inhibisyon tipleri ilk defa bulundu.
5. Hazırlanan affinite kolonunun bağlama kapasitesi sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplandı.

KAYNAKLAR

- Adam, W., Fell, R.T., Hoch, U., R.Saha-Müller, C., Schreier, P., 1995. Kinetic Resolution of Chiral α -Hydroperoxy Esters by Horseradish Peroxidase-Catalyzed Enantioselective Reduction to α -Hydroxy Esters. *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 1047-1052.
- Adam, W., Hoch, U., Lazarus, M., R.Saha-Müller, C., Schreier, P., 1995, Enzyme-Catalyzed Asymmetric Synthesis: Kinetic Resolution of Racemic Hydroperoxidase by Enantioselective Reduction to Alcohols With Horseradish Peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*. 117, 11898-11901.
- Ahrne L., Björck L., 1985. Effect of The Lactoperoxidase System on Lipoprotein-Lipase Activity And Lipolysis in Milk. *Journal of Dairy Research*, 52, 513-520.
- 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.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature*, 214(5095), 1302-1304.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical Fixation of Enzymes to Cyanogen Halide Activated Polysaccharide Carriers. *European Journal of Biochemistry*, 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. *Journal of Dairy Research*, 66, 73-80.
- Bayse, G.S., Michaelis, A.W., and Morisson, M., 1972. Lactoperoxidase Catalyzed Iodination of Tyrosine Peptides. *Biochim Biophys Acta*, 30, 284.
- Bingöl, G., 1983. *Biyokimya*. Güven Matbaası, 285, Ankara.
- Bradford. M.M., Williams W.L., 1976. New, Rapid, Sensitive Method For Protein Determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1987. *Biyokimya*, Nobel Kitap Evi, 51, İstanbul.
- Cuatrecas. P., 1970. Protein Purification by Affinity Chromatography - Derivatizations Of agarose And Polyacrylamide Beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059-3065.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The Effect of a Competitive Inhibitor on the Acetylation of Tyrosyl and Lysyl Residues of Staphylococcal Nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- Cuatrecasas. P., 1970. Protein Purification by Affinity Chromatography, *The J. of Biological Chemistry* 245, 3059-3065.
- Çankaya, M., Şişecioglu, M., Yörük, Ö., Özdemir, H., 2006. In Vitro Effects of Some Antibiotic Drugs on Bovine Lactoperoxidase Enzyme. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306.
- Daniel, R., Rao, L.D., and Mona, I.C., 1997. Identification of Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-Based Inhibition of Lactoperoxidase by Thiocarbamide Goitrogens. *Biochemistry*, 25, 4724-4728.

- Doerge, D.R., and Decker, C.J., 1994. Inhibition of Peroxidase-Catalyzed Reactions by Arylamines: Mechanism for the Anti-Thyroid Action of Sulfamethazine. *Chemical Research in Toxicology*, 7, 164-169.
- Doumonted, C., and Rousset, B., 1983. Identification Purification and Characterization of a Non-Heme Lactoperoxidase in Bovine Milk. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 14166.-14172.
- Elagamy, E., and Ruppner, R., 1992. Antibacterial and Antiviral Activity of Camel Milk Protective Proteins. *Journal of Dairy Research*, 59 (2), 169-175.
- Falkbrin, S.O., Sundberg, L., Porath, J., 1972. Affinity Chromatography of Carbonic-Anhydrase. *Febs Letters*, 24, 229-235.
- Fric, F., 1976, Oxidative Enzymes. in Pirson, A. and Zimmerman, M.H. (Ed). *Encyclophedia of Plant Physiology*, 4,6 17 New York.
- Geike, F., and Parasher, C.D., 1975. Simple Screening-test for Detection of Lactoperoxidase Inhibitors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 276, 77-78.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*, Mc Graw-Hill Inc. 81, Germany
- Graham Solomons T.W, 1988, *Organic Chemistry*, John Wiley and Sons inc. NewYork, 172-173.
- Halliwell, B. 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Harris, E.D., 1992. Regulation of Antioxidant Enzymes. *Faseb Journal*, 6, 2675-2683.
- Huber R.E., Edwards L.A., Corne T.J., 1989. Studies on the Mechanism of the Iodination of Tyrosine by Lactoperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 1381-1386
- Hussain, S.A., Hassan M.Q., Zeki, M.A., 1995. Antioxidant Profile of Human Erythrocytes After Kidney-Transplantation. *Clinical Biochemistry*, 28, 607-610
- Jacob, B.M., Monoj N.K., and Haridas, M., 1998. Antibacterial Property of Goat Milk Lactoperoxidase. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31, 808-810.
- Jaenicke, L., 1966, *Proteinbestimmung. Einführung in the Praxis des Biochemikers*, Köln, 39.
- Kanofsky, J.R., 1988. Singlet Oxygen Production from the Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Indole-3-Acetic The *Journaolf Biological Chemistry*, 263, 14171-1475.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. *Doçentlik tezi*, Erzurum.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*. 6. Baskı. Aktif yayınevi. İstanbul.
- Khmelnistky, Y., Levashov, N.L., Klyachko, K., Martinec, N., 1988. *Enzyme and Microbial Technology*. 10, 710-718
- Kise H., Hayakava A., 1991. Immobilization of Proteases to Porous Chitosan Beads and Their Catalysis for Ester and Peptide Synthesis in Organic Solvents. *Enzyme Microb Technol*, 13,584-588.
- Kohn, J., Wilchek, M., 1978. A Colorimetric Method for Monitoring Activation of Sepharose by Cyanogen Bromide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84, 7-14.
- Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Analysis of Lactoperoxidase From Buffalo Milk . *Acta Cryst*, 51, 1094-1096.

- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Heat of Bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Langbakk, B., Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase From Human Colostrum. *Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Lehninger, A.L., 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers Inc New York, 64.
- Marcozzi, G., Domenico D.C., 1998. Spreti N Effects of Surfactants on the Stabilization of the Bovine Lactoperoxidase Activity. *Biotechnology Progress*, 14, 653-656.
- 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 Biophys*, 274, 601.
- 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.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık*.
- Norbert, M., Maier, P.F., Wolfgang, L., 2001. Separation of Enantiomers Needs Challenges Perspectives. *Journal of Chromatography A*, 906, 3-33.
- 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.
- Okazaki, S., Uchimura, Y., Goto, M., Furusaki, S., 2000. Surfactant Lpo Complex Catalically Active in Organic Media *Biochemical Engineering Journal*. 6, 103-107.
- Özdemir, H., Aygül, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Purification of Lactoperoxidase From Bovine Milk and Investigation of Kinetic Properties, *Prep Biochem and Biotech*. 31(2), 125-134.
- 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, 725.
- Paul, K.G., Ohlsson, P.I., Stigbrand, T., 1986. Interactions of Lactoperoxidase With Hydrophobic Surfaces and a Monoclonal-Antibody. *Caries Research*, 20, 148-192.
- Propp, J.L., Kirk., T.K., 1991. Oxidation of Methoxybenzenes by Manganese Peroxidase and by Mn³⁺. *Arch Biochem Biophys*, 288, 145-148.
- Pütter, J., and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases*. Bergmeyer, Third Edition, VCH. New York, 286.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. *Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi*, 141, İstanbul.
- Ryu, K., Dordick, J.S., 1990. *Resour. Conserv. Recycling*, 3, 177-185.
- Ryu, K., Dordick, J.S., 1992, . How do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function *Biochemistry*, 10, 2588-98.
- Sato. K., Hasumi A., Tsikidate. A., 1995. *Biochim.Biophys. Acta*, 1253, 94-102.
- 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, 403.

- Shah N.P., 2000. Effects of Milk-Derived Bioactives an Overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.
- Shindler , J.S., and Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of Lactoperoxidase With ABTS as Chromogen. *Biochem. and Biophys. Res. Comm*, 67, 1307-1312.
- Sievers, G., 1981. Structure of Milk Lactoperoxidase Evidence for a Single Polypeptide Chain. *FEBS Letters*, 127, 257-262.
- 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.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), İzmir, 59.
- 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.
- Ueda, T., Sakamaki, K., Kuroki, T., Yano, I., and Nagata, S., 1997. Molecular Cloning and Characterization of the chromosomal for Human Lactoperoxidase. *European Journal of Biochemistry*, 243, 32-41.
- Uğuz, M.T., Ozdemir, H., 2005. Purification of Bovine Milk Lactoperoxidase and Investigation of Antibacterial Properties at Different Thiocyanate Mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 349-353.
- Van Huystee, R.B., 1987, Some Molecular Aspects of Plant Peroxidase Biosynthetic Studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219.
- Vazquez-Duhalt, D.V.S., Westlake, Fedrak, P.M., 1993. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb Technol*, 15, 936-943.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity Chromatography of Carbonic Anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1988. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *Journal of Biological Chemistry*, 15, 8017-8021.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1988. Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *Journal of Biological Chemistry*, 5, 3194-201.
- Zapico, P., Gaya, P., Depaz, M., Nunez, M., Medina., M., 1991. Influence of Breed Animal And Days of Lactation of Lactoperoxidase System Componets in Goat Milk. *J.Dairy sci*, 3, 783-787.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında İspir’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rize’de tamamladı. 1987 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 1991 yılında mezun oldu. 1992 yılında Milli Eğitim Bakanlığı Muş Bulanık Lisesinde Kimya öğretmeni olarak göreve başladı. 1994 yılında Rize Derepazarı Lisesinde kimya öğretmeni olarak çalıştı. 1997 yılında Atatürk Üniversitesi İspir Hamza Polat Meslek Yüksek Okulunda Öğr. Gör. Olarak göreve başladı. 1998 Yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, sağlık Bilimleri Enstitüsünde Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2002 yılında “Farklı Avlanma Metodlarının Gökkuşacağı Alabalığı (*Onchorynchuss Mykiss*) Antioksidant Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Araştırılması” konulu tezini tamamladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Halen Atatürk Üniversitesi İspir Hamza Polat Meslek Yüksek Okulunda Öğr. Gör. Olarak görev yapmakta olup, evli ve iki çocuk babasıdır.

Mayıs-2010