

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI ÇÖZÜCÜLERLE *İN VİTRO* ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE BEYÇİÇ

BALIKESİR, HAZİRAN-2019

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI ÇÖZÜCÜLERLE *İN VİTRO* ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE BEYÇİÇ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU (Tez Danışmanı)

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Sema ÇARIKÇI

BALIKESİR, HAZİRAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuğçe BEYÇİÇ tarafından hazırlanan "LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI ÇÖZÜCÜLERLE İN VİTRO ETKİSİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.05.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç .Dr. Serap UZUNOĞLU

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN
TÜRKOĞLU

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Sema ÇARIKÇI

.....
.....
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI ÇÖZÜCÜLERLE *İN VİTRO*
ETKİSİNİN İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞÇE BEYÇİÇ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SERAP UZUNOĞLU)
BALIKESİR-HAZİRAN 2019**

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapıdaki maddelere ‘enzim’ denir. Laktoperoksidaz (LPO) enzimi; sütte, tükürkte, gözyaşında, yenidoğanların sindirim sisteminde bulunan; prostetik grup olarak hem grubu içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşan glikoproteindir. Çalışmada Sepharose 4B-etilendiamin 4-izotiyosiyonat benzen sulfanomid jeli kullanılarak; sığır sütünden LPO enzimi saflaştırıldı. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Bazı çözücülerin enzim üzerindeki etkileri incelenerek; inhibisyon gösteren çözücüler için IC₅₀ değerleri, inhibisyon türleri ve inhibisyon sabitleri bulunmuştur. En fazla inhibisyon etki gösteren çözücünün 1,82 µM ile asetofenon olduğu belirlenmiştir. 2-propanol, diklorometan, trietil amin, sodyum silikat, perklorik asit çözücülerinin inhibisyon tipi nonkompetitif olarak saptanmış; inhibisyon sabitleri sırasıyla 6,7x10⁻⁴, 8,10x10⁻⁶, 1,17x10⁻⁴, 7,51x10⁻⁶, 8,11x10⁻⁶ bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Laktoperoksidaz enzimi, afinite kromatografisi, inhibisyon, IC₅₀ değeri, Ki değeri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* EFFECT OF LACTOPEROXIDASE ENZYME WITH SOME SOLVENTS

MSC THESIS

TUĞÇE BEYÇİÇ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSOC. DR. SERAP UZUNOĞLU)

BALIKESİR-JUNE 2019

Protein substances that catalyze biochemical reactions are called 'enzymes'. Lactoperoxidase (LPO) enzyme; found in milk, spit, tears, digestive system of newborns; is a glycoprotein consisting of a single polypeptide chain comprising both groups as a prosthetic group. Sepharose 4B-ethylenediamine 4-isothiocyanate benzene sulfanamide gel; LPO enzyme was purified from bovine milk. The purity of the enzyme was checked by SDS-PAGE. By examining the effects of some solvents on the enzyme; IC₅₀ values, inhibition types and inhibition constants were found for the solvents that exhibited inhibition. The most inhibiting solvent was found to be acetophenone with 1.82 μ M. The type of inhibition of 2-propanol, dichloromethane, triethyl amine, sodium silicate, perchloric acid solvents was found to be noncompetitive; Inhibition constants were 6,7x10⁻⁴, 8,10x10⁻⁶, 1,17x10⁻⁴, 7,51x10⁻⁶, 8,11x10⁻⁶ respectively.

KEYWORDS: Lactoperoxidase, affinity chromatography, inhibition, IC₅₀ value, Ki value.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOLE VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzim Kinetiği.....	1
1.2 Peroksidaz (H ₂ O ₂ -Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7)	2
1.3 Laktoperoksidaz Enzimi	3
1.4 Enzimlerin İnhibisyonu	5
1.4.1 Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon.....	6
1.4.2 Nonkompetitif (Yarı-yarışmalı) İnhibisyon.....	6
1.4.3 Unkompetitif (Yarışmasız) İnhibisyon.....	7
1.4.4 Lineer Karışık Tip İnhibisyon.....	7
1.5 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar	9
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	10
2.1 Materyaller	10
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	10
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	10
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	11
2.2 Yöntemler.....	14
2.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması.....	14
2.2.1.1 Enzimin Tuz ile Çöktürülmesi.....	14
2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	15
2.2.3 Kalitatif Protein Tayini	15
2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	15
2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması	16
2.2.6 SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enziminin Saflığının Kontrolü	16
2.2.7 Bazı Kimyasal Maddelerin IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	17
2.2.8 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	18
3. BULGULAR	19
3.1 Enzimin Saflaştırılması.....	19
3.1.1 Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması	19
3.1.2 Proteinlerin Kantitatif Analizi İçin Kullanılan Standart Grafik.....	20
3.1.3 Laktoperoksidaz Enziminin Saflığının Kontrolü	21
3.2 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi.....	22
3.3 Kullanılan Bazı Kimyasal Çözücülerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	22
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
5. KAYNAKLAR	40

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Laktoperoksidaz enziminin yapısı	4
Şekil 1.2: Kompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].....	6
Şekil 1.3: Nonkompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].....	6
Şekil 1.4: Unkompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].....	7
Şekil 1.5: Kompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi	8
Şekil 1.6: Unkompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi	8
Şekil 1.7: Nonkompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi.....	8
Şekil 1.8: Lineer karışık inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi.....	8
Şekil 3.1: Afinite kolonundan LPO enziminin elüsyon grafiği.	19
Şekil 3.2: Commasie Blue metodu ile enzim miktarının belirlenmesi için kullanılan grafik.....	20
Şekil 3.3: Afinite kromotografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafi.....	22
Şekil 3.4: Aseton için % aktivite-[I] grafiği.....	24
Şekil 3.5: Toluen için % aktivite-[I] grafiği	24
Şekil 3.6: Hekzan için % aktivite-[I] grafiği.....	25
Şekil 3.7: 2-propanol için % aktivite-[I] grafiği.....	25
Şekil 3.8: Diklorometan için % aktivite-[I] grafiği.	26
Şekil 3.9: Sodyum silikat için % aktivite-[I] grafiği.	26
Şekil 3.10: Trietil amin için % aktivite-[I] grafiği.	27
Şekil 3.11: Asetofenon için % aktivite-[I] grafiği.....	27
Şekil 3.12: Perklorik asit için % aktivite-[I] grafiği.....	28
Şekil 3.13: Ksilen için % aktivite-[I] grafiği.	28
Şekil 3.14: 1,4-dioksan için % aktivite-[I] grafiği.	29
Şekil 3.15: Benzen için % aktivite-[I] grafiği.	29
Şekil 3.16: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 2-propanol ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	32
Şekil 3.17: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve diklorometan ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.	32
Şekil 3.18: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve ksilen ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	33
Şekil 3.19: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve trietilamin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	33
Şekil 3.20: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve sodyum silikat ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.	34
Şekil 3.21: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve perklorik asit ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.	34
Şekil 3.22: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve hekzan ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Elektroforezde uygulanan jellerin konsantrasyonları ve miktarları	13
Tablo 3.1: LPO enzimi için saflaştırma tablosu.	21
Tablo 3.2: Enzim aktivite ölçümü için kullanılan miktarlar.	23
Tablo 3.3: IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan miktarlar.	30



SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

- SDS** : Sodyum dodesil sülfat.
- PAGE** : Poliakrilamid jel elektroforezi
- U** : Enzim Ünitesi
- IC₅₀** : % 50 İnhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
- OP** : Organo fosfat bileşiği
- LPO** : Laktoperoksidaz
- S** : Substrat
- E** : Enzim
- ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
- Tris** : Trihidroksimetil aminometan
- α** : Alfa
- β** : Beta
- °C** : Santigrat Derece

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın ders aşamasında engin bilgilerini bizim ile paylaşan ve her zaman desteğini hissettiren kıymetli hocam; Prof. Dr. Oktay Arslan'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde desteğini her daim yanımda hissettiren, bilgilerini, emeğini, zamanını benimle paylaşan sevgili danışman hocam; Sayın Doç. Dr. Serap Beyaztaş Uzunoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Kahve seanslarıyla ve hoş sohbetleriyle yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Taner DEMİR, İrem AKINCI, Candan AKDIR, Ulaş KUMRAL'a ve tezimin bana kazandırdığı çiçek insan Pakize ÖZKAYA'ya yanımda olduğu için sonsuz teşekkürler.

Bir telefon kadar uzağımda olan, birlikte üzüldüm, birlikte sevindiğim dert ortaklarım, mesafeleri kısaltan can arkadaşlarım Elif Çatar, Tuğçe Aktaş'a sonsuz teşekkür ederim. Tez yazımının son evrelerinde hayatıma giren, beni destekleyip bırakmak yok diyerek motivasyon veren Olgu Kıymaz'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgmeden hayatımın her aşamasında yanımda olan ve aldığım her kararı destekleyen anneme ve babama gönülden minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Tezim aileme ithafımdır.

Tuğçe BEYÇİÇ

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapıdaki maddelere “enzim” denir [1]. Protein yapısında olduklarından aminoasitlerin diziliş, enzimlerin belirli bir konformasyonu almasında ve üç boyutlu yapı kazanmasında önemli yer tutar. Bu üç boyutlu yapı, katalitik aktivitesinde ve spesifik olmasında etkilidir. Enzimler reaksiyon hızını 10^8 - 10^{12} defa arttırabilirler [2]. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz; reaksiyon verimi %100'dür. Enzimin etki ettiği bileşik substrat olarak adlandırılır ve enzimin her yerine değil aktif merkezine bağlanır; biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yerdir[3,4].

Enzimler tarafından katalizlenen kimyasal tepkimelerin hızının incelenmesi, enzim kinetiği kavramını ortaya çıkartmıştır. Enzimlerin kinetik özelliklerinin incelenmesi için Michaelis-Menten eşitliği geliştirilmiştir. Amacı; biyokimyasal tepkimeler için nitel bir hesaplama yapabilmektir. Bu tepkimelerin çoğu enzim ile katalizlenir ve enzim substratın spesifik bölgesine bağlanır [5].

Her enzimin kendisine spesifik olan bir K_m değeri (yani Michaelis Menten sabiti) bulunur. K_m değeri enzimin substrata karşı olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Michaelis-Menten eşitliğinin ters çevrilmesi ile Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir. Bu grafik ise V_{max} ve K_M değerlerinin doğru bir şekilde belirlenmesini sağlar [6].

1.2 Peroksidaz (H_2O_2 -Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7)

Peroksidazlar; birçok alanda kullanılabilme potansiyeline sahip olan enzimler içerisinde oksidoredüktaz sınıfına dahildir. Yaygın olarak ökoryot ve prokaryot hücrelerde, mantar, maya, bakteri, yüksek bitkilerde turp çeşitlerinde ve sütte bulunmaktadır. Peroksidazlar birçok fonksiyonda görevlidir; bunlardan bazıları savunma mekahnması, hücre duvarı, protein bağlanması ve hormonal etkinlikler şeklindedir. Bu enzim sütte, gözyaşında, tükürükte laktoperoksidaz olarak; trombositler, lökositler, dalak, karaciğer, sitoplazma, mitokondri ve lizozomlarda belirlenmiştir [7].

Peroksidazın prostetik grupları Protohem dir ve apoproteine gevşek olarak bağlanır. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda H_2O_2 ; elektron akseptörü olarak hareket eden askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi birçok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir [8]. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar kompleks bir yapıya sahiptir. Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'nin zararlı etkisini ortadan kaldırmaktadır [9].

Oksitleyici özelliğe sahip, biyolojik sistemler sonucu oluşan H_2O_2 'nin vakit kaybetmeden ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu önemli görevi hücrelerdeki antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir. Antioksidan enzimlerin aynı zamanda serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak biyolojik oksidatif hasarları engellediği bilinmektedir [10,11].

Peroksidazların spesifik aktivite, kofaktör, inhibitöre karşı hassasiyet, substrat ilgisi ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı çok sayıda izoenzimleri bulunmaktadır.

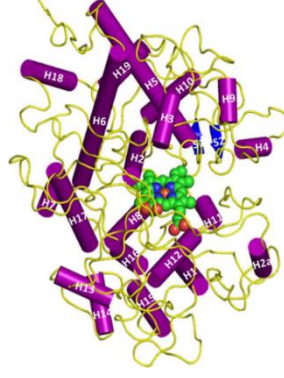
Peroksidazın organizmada ilk olarak protein kısmı sentezlenir. Birçok peroksidaz izoenzimleri ağırlıklarının % 15-17 si kadar karbonhidrat içerirler. Kalsiyum iyonu peroksidaz salınımı ve yapısal devamlılık için gereklidir.

1.3 Laktoperoksidaz Enzimi

Laktoperoksidaz (LPO); peroksidaz ailesinin üyesidir ve 1940'lı yıllarda sığır sütünde belirlenmiştir. Sütte, gözyaşında, tükürükte bulunan; yenidoğanların bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini mikroorganizmalara karşı koruyan oksidoredüktazdır [14, 15]. İnsan ve inek sütünün normal bir bileşenidir. [16,17]. LPO bakterilerin büyümesinin baskı altına alınmasında ve inhibisyonunun desteğinde önemli bir yere sahip olan glikoproteindir [18]. LPO enziminin özelliklerine bakıldığında aşağıdaki bilgilere ulaşılmaktadır.

Tablo 1.1: Laktoperoksidaz enziminin özellikleri [19,20,21].

Özellikler	Ortalama Değer
Molekül ağırlığı	78 431 kDa
Amino asit rezidüsü	612
Yarı sistin rezidüsü	15
İzoelektrik nokta	pH: 9.6
Karbohidrat içeriği	% 8-10
Demir içeriği	% 0.07
Sekonder yapısı	% 23 α , % 65 β



Şekil 1.1: Laktoperoksidaz enziminin yapısı [23].

LPO enzimi tiyosiyanat iyonunun antibakteriyal hiposiyanata oksidasyonunu katalizler [15].

Süt içerisinde az miktarda hidrojen peroksit bulunur lakin, bu sütteki laktik asit bakterileri tarafından da üretilebilir. Bunun yanı sıra sütte serbest oksijen var ise hidrojen peroksit ksantin oksidaz askorbik asit ve bakır sülfidril reaksiyonu ile oluşabilir. Çünkü; hidrojen peroksit kararlı olmadığından bazı enzimler ile bağlanıp katalaz aracılığıyla indirgenebilir [22].

LPO aracılığıyla oluşan reaksiyon sitoplazmik membrana etki eder. Çünkü OSCN⁻ enzimlerin serbest -SH gruplarına bağlanır. Bunun sonucu olarak potasyum ve aminoasit hücreden kaçabilir ve bunun akabinde pH düşer. Hücreye alınacak olan aminoasit, protein, karbonhidratın yanında diğer besinlerin hücreye alınımı engellenir. Bu sebep ile hücrenin DNA ve RNA sentezleri bozulur [23].

LPO nun gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde bakteriyostatik bir etkisi bulunmaktadır. Enzim ile yapılan antibakteriyal çalışmalar peroksit sistem ve tiyosiyanat sisteminin patojenik bakterilerde inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. [16,23].

LPO iyodürün hidrojen peroksit ile oksidasyonunu da katalizler [14, 19, 24, 25].

LPO enziminin etkisi 73 °C ile 10 dakika içerisinde bitmektedir. Çiğ sütte bulunan LPO enziminin 76 °C 50 ppm'inin sadece 2 dakika bırakılması sonucu enzimin % 98'lik kısmının aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir [22, 26]. Enzimin etkisini yitirmesine kalsiyum iyonlarının sebep olduğu belirlenmiştir [26].

LPO enzimi Vitamin B2 varlığında ışığa karşı çok duyarlıdır. Yapılan araştırmalarda süütün birkaç saat gün ışığına bırakıldığında enzimin aktivitesi azalmaktadır [27].

LPO enziminin inhibitörleri tam olarak bilinmemektedir. Buna karşı bazı kirleticiler ile ağır metaller arasındaki bazı elementlerin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir [28,29].

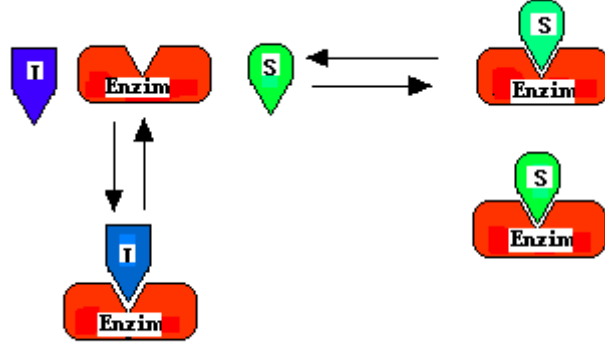
1.4 Enzimlerin İnhibisyonu

Enzimlerin bazı hücre dışı ve hücre içi aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından düşürülmesi hatta yok edilmesine "inhibisyon" denir. Bu olaya neden olan bileşiklere de "inhibitör" adı verilmektedir. İnhibitör, bir iyon veya küçük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. İnhibisyon çalışmaları enzim-substrat özgünlüğünü, aktif merkezde bulunan fonksiyonel grupları ile fiziksel, kimyasal yapısını ve reaksiyonların kinetik mekanizmaları hakkında bilgi verir. Küçük molekül ağırlığına sahip olan bileşikler ve iyonlar genel olarak inhibitörleri oluşturur.

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime kovalent olarak ya da ayrışması zor olan bir kompleks oluşturarak bağlanır. Dönüşümlü inhibisyon ise enzim ve inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu oluşturur. Dönüşümlü inhibisyon 3'e ayrılır [30]. Bunlar; yarışmalı inhibisyon, yarı-yarışmalı inhibisyon ve karışık tür inhibisyonudur.

1.4.1 Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon

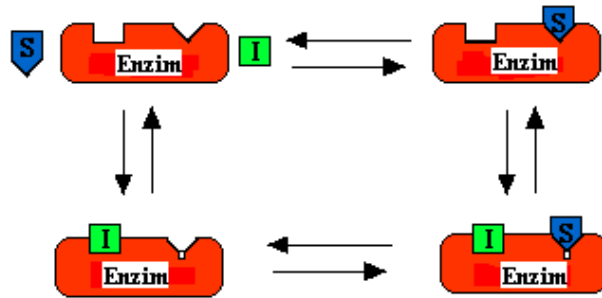
İnhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanamaz, yarış halindedir. Bağlanma yeri enzimin aktif bölgesidir.



Şekil 1.2: Kompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].

1.4.2 Nonkompetitif (Yarı-yarışmalı) İnhibisyon

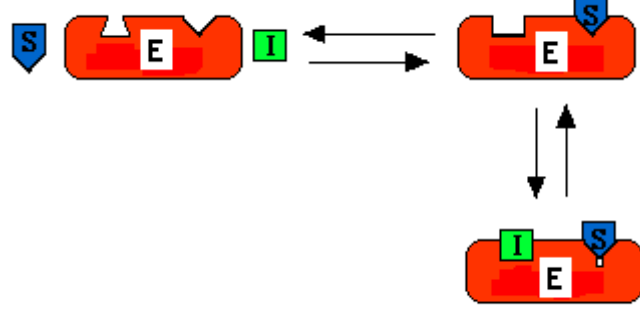
İnhibitör ve substrat arasında yarış halinde değildir. Her ikisinde enzime bağlanarak EIS kompleksi oluşturur.



Şekil 1.3: Nonkompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].

1.4.3 Unkompetitif (Yarışmasız) İnhibisyon

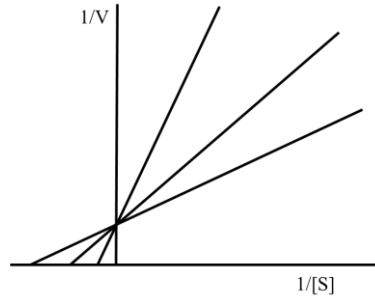
İnhibitör serbest enzime bağlanmaz. Bağlanma yeri ES kompleksidir.



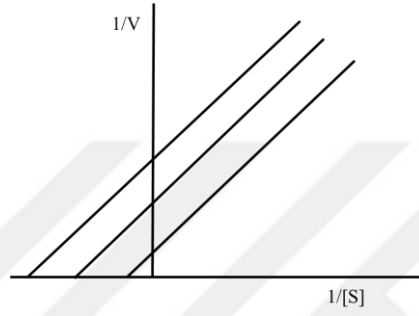
Şekil 1.4: Unkompetitif inhibisyon enzim-substrat ilişkisi [1].

1.4.4 Lineer Karışık Tip İnhibisyon

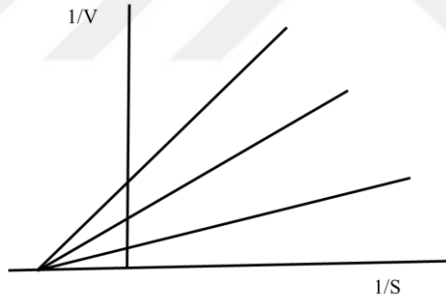
Nonkompetitif inhibisyonun özel bir durumudur. Substrat EI kompleksine, inhibitör ES kompleksine bağlanarak gerçekleşir. Sonuç olarak ESI kompleksi oluşur.



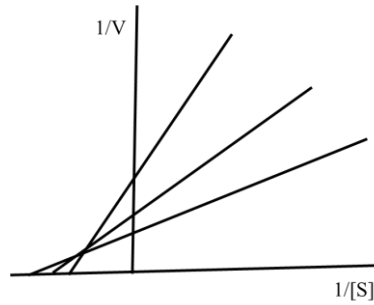
Şekil 1.5: Kompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi



Şekil 1.6: Unkompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi



Şekil 1.7: Nonkompetitif inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi



Şekil 1.8: Lineer karışık inhibisyon için Linewaer-Burk eğrisi

1.5 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı.

<i>Toluen</i>	<i>Diklorometan</i>
<i>Aseton</i>	<i>1,4-dioksan</i>
<i>1-Bütanol</i>	<i>Sodyum silikat</i>
<i>Sülfürik asit</i>	<i>Sodyum hipoklorit</i>
<i>Hekzan</i>	<i>Hidroflorik asit</i>
<i>Nitrik asit</i>	<i>Trietil amin</i>
<i>Karbon tetraklorür</i>	<i>Kojik asit</i>
<i>Kloroform</i>	<i>n-Pentan</i>
<i>2-Merkaptoetanol</i>	<i>Dietil eter</i>
<i>Hidrojen peroksit</i>	<i>Etil asetat</i>
<i>2-Propanol</i>	<i>Asetofenon</i>
<i>Asetik asit</i>	<i>Benzen</i>
<i>Orto fosforik asit</i>	<i>Perklorik asit</i>
<i>Formik asit</i>	<i>Ksilen</i>
<i>Formaldehit</i>	<i>Amonyak</i>
<i>İndol 3-bütirik asit</i>	<i>Anilin</i>

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar; Sepharose 4-B, L-tirozin, etilendiamintetra asetik asit (EDTA), standart serum albümin, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit (ABTS), TEMED, amonyum sülfat, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum asetat, sodyum fosfat, sodyum karbonat, sodyum klorür, hidrojen peroksit, hidroklorik asit, coomassie brillant blue G-250, Tris-HCl, Sigma Chemical Company'den; toluen, aseton, 1-bütanol, sülfürik asit, hekzan, nitrik asit, karbon tetra klorür, kloroform, 2-merkaptoetanol, hidrojen peroksit, 2-propanol, asetik asit, orto fosforik asit, formik asit, indol 3-bütirik asit, diklorometan, 1,4-dioksan, sodyum silikat, sodyum hipoklorit, hidroflorik asit, trietil amin, kojik asit, n-pentan, dietil eter, etil asetat, asetofenon, benzen, perklorik asit, ksilen, amonyak, anilin, formaldehit, 200 mL süt dışarıdan sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma sırasında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

Buz Makinesi	: Fiocchetti AF10
Elektroforez Sistemi	: Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	: Sigma (1.5 ×10 cm)
Manyetik Karıştırıcı- Isıtıcı	: WiseStir MSH-20 A
Otomatik pipetler	: Transferpette, Nichipet EX
pH metre	: Hana pH 211 Microprocessor
Soğutmalı Santrifüj	: Sigma 3K15
UV-Spektrofotometresi	: Biotek Power Wave XS
Vorteks	: Fisons Whirli Mixer

Terazi	: Precisa XB 220A
Jel Görüntüleme Sistemi	: Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Gradient Mikser	: Atta magnetik karıştırıcı ve gradient tüp
Otomatik Pipetler	: ISOLAB, Brand

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Afinite jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler:

0,1 M NaHCO₃ Tamponu (pH 10.0); 8,401 g (0,1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH: 10.0'a kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 1 L' ye tamamlandı.

0,2 M NaHCO₃ Tamponu (pH 8,8); 8,401 g (0,1 mol) NaHCO₃ 450 mL distile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 8.8'e kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 500 mL' ye tamamlandı.

Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon; 1,79 g (0,01 mol) Na₂HPO₄.2H₂O, 950 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH: 6.8'e kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 1L' ye tamamlandı.

Afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon; 1,77 g (0,0125 mol) Na₂HPO₄.2H₂O 400 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH: 6.8'e kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 500 mL' ye tamamlandı.

Afinite jeline tutulmuş LPO enziminin elüsyonu için kullanılan tampon; 1M NaCl / 25mM Na₂HPO₄.2H₂O pH: 6.3 (LPO enziminin elüe edilmesinde kullanıldı) 14,61 g (2,5.10⁻¹ mol) NaCl bir miktar saf suda çözüldü, üzerine 1,112 g (6,25.10⁻³ mol) Na₂HPO₄.2H₂O eklenerek son hacim distile suyla 250 mL' ye tamamlandı.

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan fosfat tampon; 17,8 g (0,1 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 950 mL distile suyla çözüldü. 1N HCl ile pH:6.0'a kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 1L' ye tamamlandı.

Laktoperoksidaz enziminin substrat çözeltisi; 0,055 g ($1 \cdot 10^{-4}$ mol) ABTS 0,1 M 100 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH: 6.0 ile çözüldü.

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan H_2O_2 çözeltisi; % 30'luk, 1,11 g / mL % 30'luk olan H_2O_2 'den 32 μL alındı ve son hacim distile suyla 100 mL' ye tamamlandı.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) uygulanan numune ve tank tamponunun hazırlanmasında kullanılan miktarları;

1,25 mL	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
2,0 mL	% 10'luk SDS
1,0 mL	Gliserol
0,5 mL	2-merkaptoetanol
0,005 g	Fenol boyası
0,25 mL	Saf Su
1,5 g	Tris-HCl
7,2 g	Glisin
0,5 g	SDS

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;

0,33 g Coomassie Brilliant Blue, 60 mL metil alkol içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin üzerine asetik asit ve 60 mL saf su katılarak ilgili renk reaktifi hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde uygulanan yıkama çözeltisi;

Araştırmamızda yıkama çözeltisi asetik asit, metanol ve saf su karışımından oluşmaktadır (Hacimce sırasıyla %7,5- %5- %87,5).

Enzimin saflığının kontrolünde uygulanan elektroforezdeki ayırma ve yığma jellerinin hazırlanması ;

Bu amaçla kullanılan ayırma ve yığma jel karışımlarında kullanılan bileşiklerin konsantrasyonları ve hacimleri Tablo 2.1 de sunulmuştur.

Tablo 2.1: Elektroforezde uygulanan jellerin konsantrasyonları ve miktarları

	% 10' luk Ayırma Jeli	% 3' lük Yığma Jeli
Akril amid/ Bis (%30)	2,775 mL	0,433 mL
Destile Su	3,35 mL	2,03 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,08 mL	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 µL	833 µL
% 10' luk SDS	0,1 µL	30 µL
TEMED	5 µL	4 µL
% 10' luk amonyum persülfat	150 µL	100 µL

2.2 Yöntemler

2.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması

200 mL taze sığır sütü +4 °C'de buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün 200 mL süt 8 mL toluen ile blendırda iyice karıştırıldı. Daha sonra blendırda toluenle iyice muamele edilen süt +4 °C'de 1 saat 14000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra altta kalan çöken kısım atıldı, üstte kalan sıvı kısım bir mezüre alınarak hacmi belirlendi. Ölçülen sıvı kısma % 60'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Ardından tekrar +4 °C'de 1 saat 14000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısım atıldı, alttaki çöken kısım alındı. Daha sonra çöken kısım dengeleme tamponunda çözüldü.

2.2.1.1 Enzimin Tuz ile Çöktürülmesi

Bu amaçla, amonyum tuzu kullanılmıştır. Söz konusu bileşik 2 değerlikli ve çözünürlüğünün iyi olması amacıyla birçok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir. Araştırmamızda % 60'lık doygunlukta amonyum sülfat kullanılmıştır. Kullanılan miktar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan sıvının hacmi.

S₁ : l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğunu.

S₂ : l'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğunu.

2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini

1 mL'lik spektrofotometre küvetine fosfat tamponundan 850 µL (0,1 M pH=6), ABTS çözeltisinden 67 µL (1 mM), H₂O₂ çözeltisinden 33 µL (3,2 Mm) konuldu ve 50 µL enzim çözeltisi ilave edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı okundu. 75 saniye süreyle her 15 saniyede bir olmak üzere değerler kaydedildi. Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak ABTS kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20°C'de 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlanır. 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 dayanmaktadır [31].

2.2.3 Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin 280 nm de UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanır [32]. Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçüldü.

2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenir. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, proteinler üzerindeki pozitif yüke bağlanır ve negatif yüke sahiptir. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturma, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır [33]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede

uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Hassasiyet bu yöntemde 1-100 µg arasındadır.

Bu amaçla standart olarak, sığır serum albümin kullanılmıştır. Protein çözeltisi farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde 10 tüpe alındı. Herbir tüp 100 mM pH:8 olan TRİS tamponu ile hacimleri 0,1 mL tamamlandı. Tüm tüplere 5 mL boya çözeltisi ilave edildi. Tüpler vorteks ile hızlı bir şekilde karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm de absorbansları köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerine karşı mikrogram protein miktarları grafik halinde verildi.

Aynı işlemler enzim örnekleri içinde tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerinden, örnekteki protein miktarları standart grafik yardımıyla belirlendi.

2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması

Sepharose 4-B-etilendiamin- 4-izotiyosiyonat benzen sülfonamid jeli kullanılmıştır [34].

2.2.6 SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enziminin Saflığının Kontrolü

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin saflığının kontrolü, Laemelli tarafından önerilen elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan elektroforez ortamı % 3 ve % 10 akrilamid olacak şekilde hazırlandı (sırasıyla yığma jeli ve ayırma jeli) [35].

Elektroforez işlemi için ilk olarak kullanılan cam plakalar iyice temizlendi. Daha sonra cam plakalar arasında kalınlık oluşturucu olacak şekilde sabitlendi. Tablo 2.1 de gösterildiği şekilde reaktifler kullanılarak ayırma jeli enjektör yardımıyla plakalar arasına döküldü. Jlin üzerine bütül alkol ilave edilerek jel yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Polimerleşme tamamlandıktan sonra ilgili tabakada belirtildiği üzere

yığma jeli reaktifleri plakalar arasına ilave edildi. Son olarak elektroforez tarağı yerleştirilerek polimerleşmenin tamamlanması beklendi. Yığma jelinin polimerleştiğinden emin olunduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Elde edilen kuyucuklar saf su ve yürütme tamponu ile iyice yıkandı. Ayırma ve yığma jelinin bulunduğu kaset tanka yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısmına uygun miktarlarda yürütme çözeltisi ilave edildi.

Afinite tekniği ile elde edilen elüantlardan yüksek proteine karşılık yüksek aktivite gösteren tüpler toplam hacim 75 µL olacak şekilde 2:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler cam plakalara alındıktan sonra sıcak su banyosunda bekletilir ve numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 180 V ayarlandı. Elektroforez işlemine ayırma jelinin altına 1 cm kalacak şekilde devam edildi. Daha sonra elektrik akımı durdurularak işlem sonlandırıldı. İlgili aparatlar sökülerek cam plakalar arasındaki jel çıkarıldı. Proteinlerin ayrıldığı jel (ayırma jeli) bantların tespiti için boyama çözeltisine alındı ve iki saat bu çözelti içerisinde çalkalandı. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için renk açma çözeltisi ile spesifik olmayan boyalar uzaklaştırıldı. Çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

2.2.7 Bazı Kimyasal Maddelerin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Araştırmamızda kullanılan bileşiklerden inhibisyona sebep olan maddelerin IC₅₀ değerleri bulundu. Bu amaçla substrat olarak ABTS kullanıldı. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamda enzim aktiviteleri hesaplanarak, inhibitör konsantrasyonuna karşı yüzde aktiviteler grafik haline getirildi. IC₅₀ değerleri bu grafiklerin denklemlerinden hesaplandı.

2.2.8 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Kinetik sabitlerin (K_M ve V_{max}) saptanması amacı ile optimum şartlarda Laktoperoksidaz enzimi, ABTS substratının yirmi farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapılır. Elde edilen ölçümlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Kinetik sabitler elde edilen doğru denklemlerinden bulundu [36].

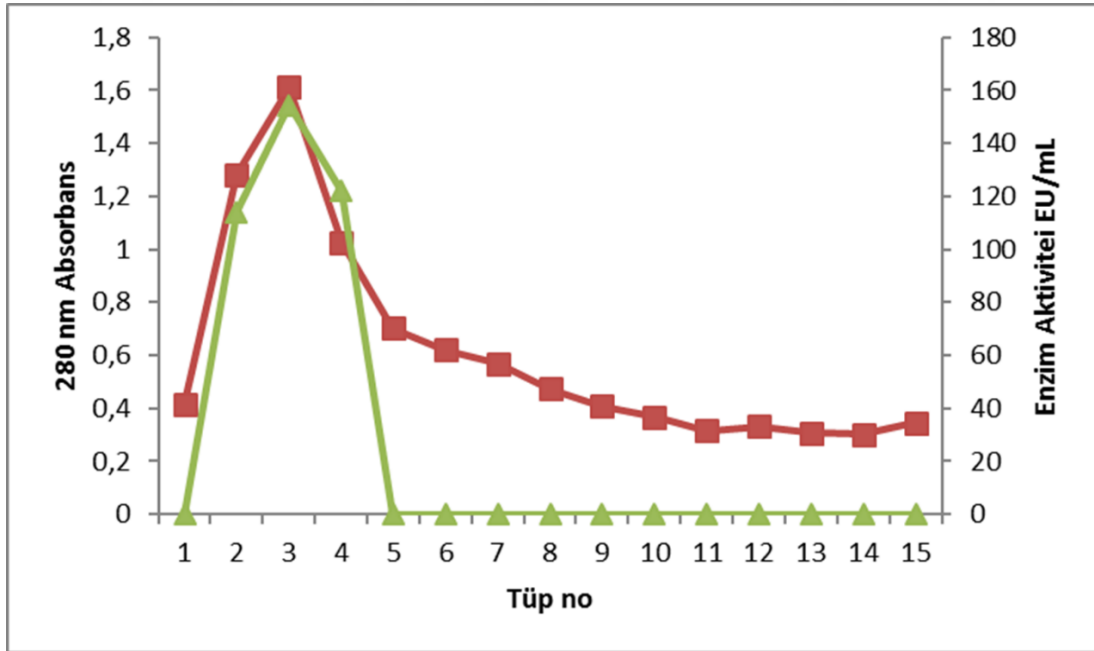


3. BULGULAR

3.1 Enzimin Saflaştırılması

3.1.1 Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

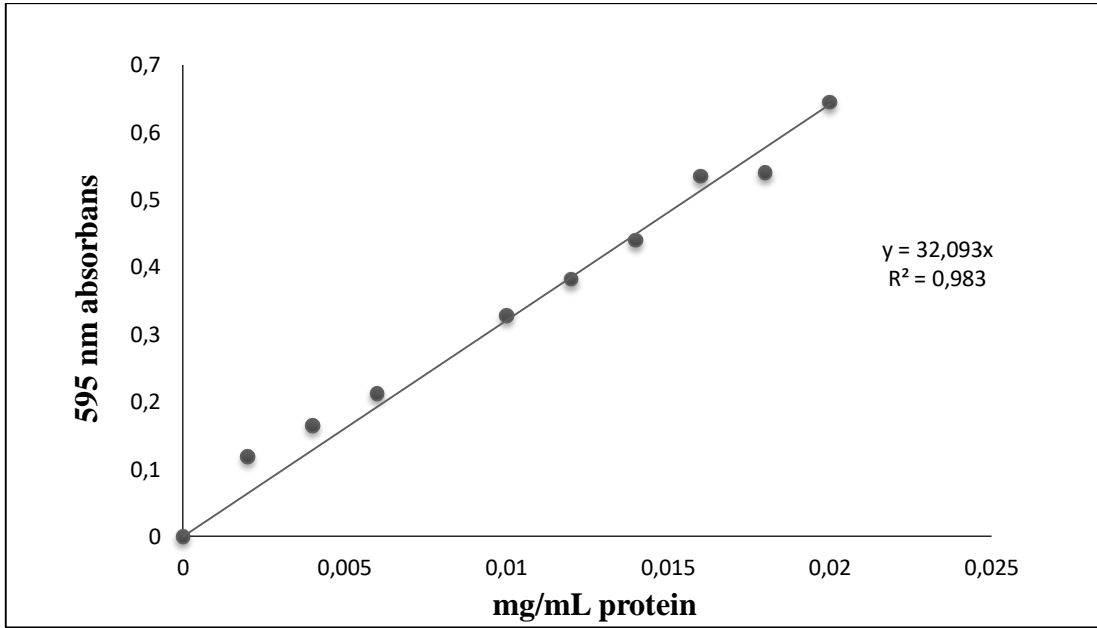
Çökeleğin dengeleme tamponunda çözünmesi ile elde edilen 50 mL homojenat 10 mM fosfat (pH: 6,8) tamponu ile dengelenen kolona yavaş yavaş ilave edildi. Numunenin ilavesinden sonra kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH: 6,8) tamponu ile yıkandı. Böylelikle enzimin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,8) elüsyon tamponu eklenerek laktoperoksidaz enzim elüe edildi ve elüatlar 2'er mL'lik ependorf tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorbands değerleri köre karşı ölçüldü (Şekil 3.1). (□ Protein 280 nm ; Δ Aktivite'yi ifade etmektedir.)



Şekil 3.1: Afinite kolonundan LPO enziminin elüsyon grafiği.

3.1.2 Proteinlerin Kantitatif Analizi İçin Kullanılan Standart Grafik

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin miktarını belirlemek amacıyla Coomassie Blue metodu ile protein tayini yapıldı. Daha önceden enzim ünitesi hesaplanmış elüantların spesifik aktiviteleri belirlendi. Bu değerler kullanılarak hesaplanan saflaştırma dereceleri Tablo 3.1’de verildi. Protein tayini için standart grafik Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



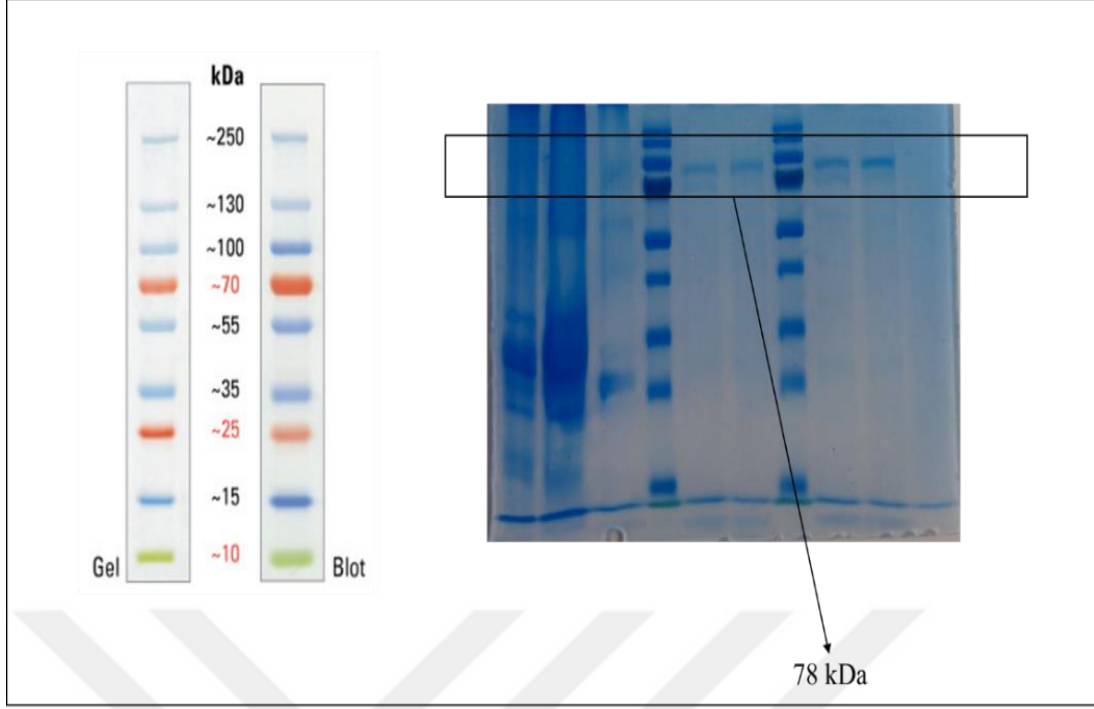
Şekil 3.2: Coomassie Blue metodu ile enzim miktarının belirlenmesi için kullanılan grafik.

Tablo 3.1: LPO enzimi için saflaştırma tablosu.

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U)	Toplam Aktivite (U)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μ /mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	200	1528	315600	125	25000	12,62	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	10	1331	13310	58	580	22,94	4,22	1,82
Afinite Kromotografisi	4	584	2336	0.002	0.008	212000	0,74	9241,44

3.1.3 Laktoperoksidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin saflık derecesini belirlemek amacıyla elektroforez işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonucu elde edilen bantlar ve kullandığımız standartlar Şekil 3.3 gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.

3.2 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} sabitlerinin saptanması amacıyla; 5 farklı konsantrasyonda ABTS substratı kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Spektrofotometrede 412 nm de ölçülen absorbans değerleri izlenerek aktiviteler belirlendi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Laktoperoksidaz enziminin kinetik değerlerinden K_M , 1.44 mM; V_{max} , 1000 U/mL dakika olarak bu grafiklerden belirlendi.

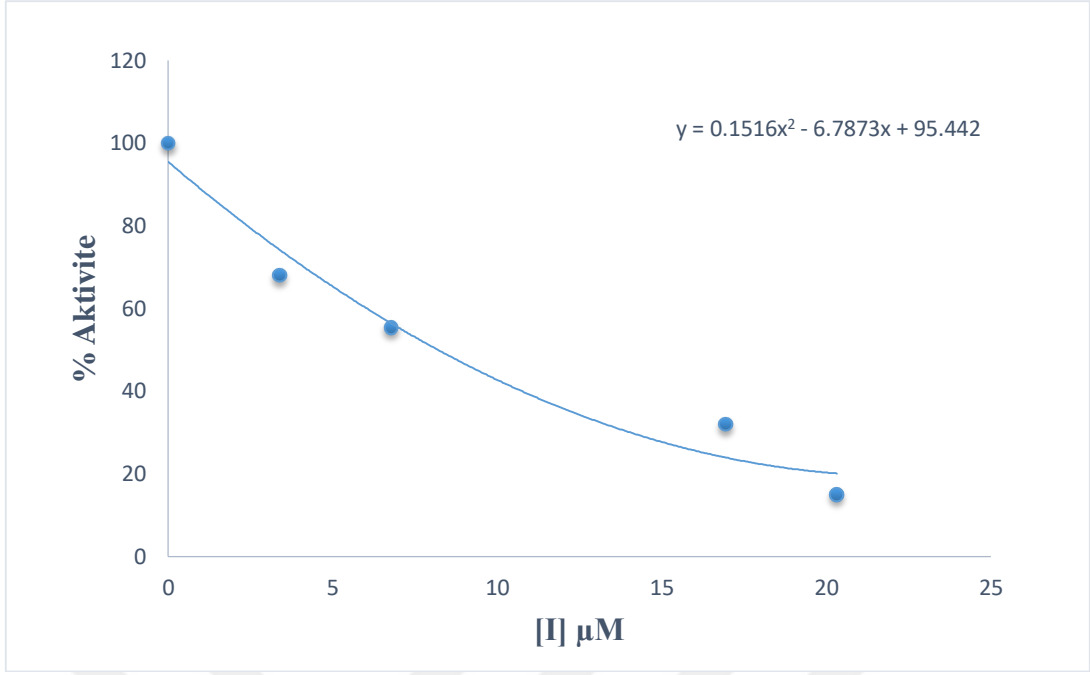
3.3 Kullanılan Bazı Kimyasal Çözücülerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız ligand; bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerine etkilerini belirlemek için, optimum şartlarda ABTS substratının sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 67 μ L ABTS alındı.

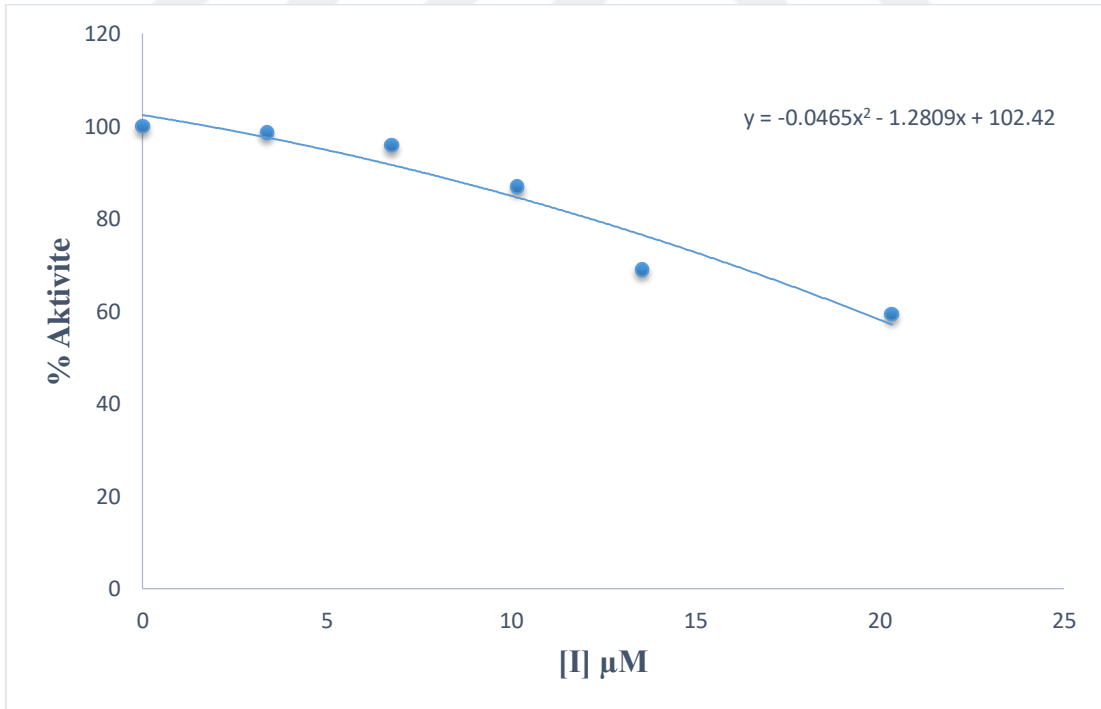
Laktoperoksidaz enzimi üzerine etkisi incelenen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu reaksiyon karışımlarında enzim aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca inhibitörsüz ortamda da ilgili enzimin aktivitesi bulundu. Ve bu değer kontrol olarak kullanıldı. % aktiviteye karşı inhibitör konsantrasyonları grafik haline getirilerek IC₅₀ değerleri saptandı.

Tablo 3.2: Enzim aktivite ölçümü için kullanılan miktarlar.

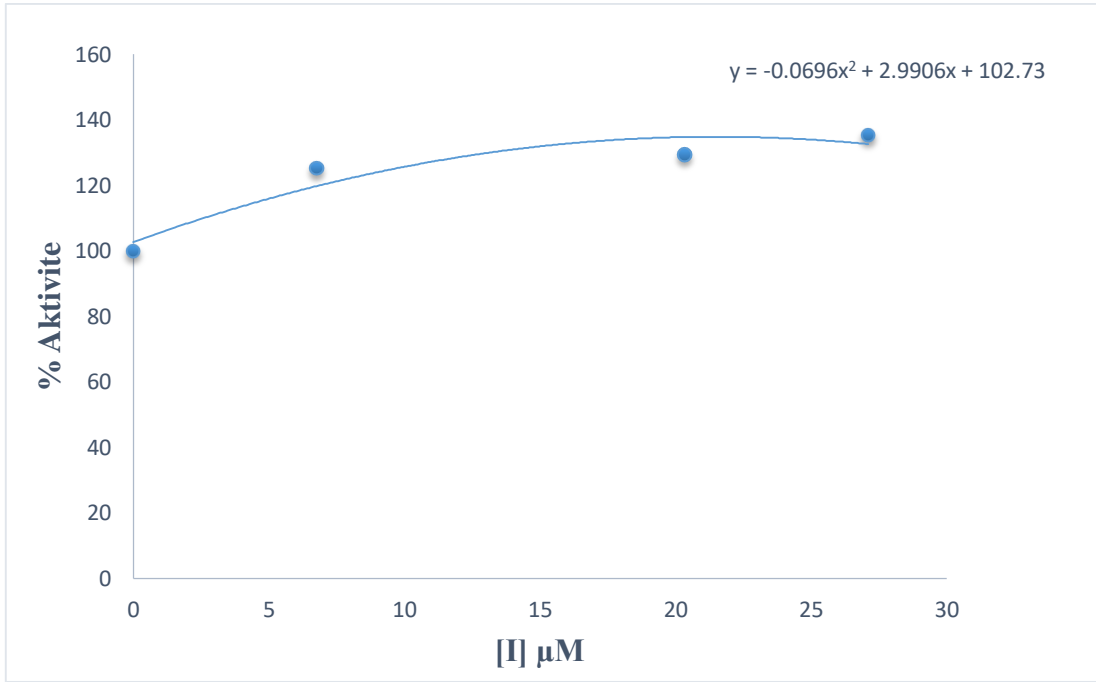
	Tampon Çözelti	Substrat (ABTS)	H₂O₂ Çözeltisi	Enzim (Laktoperoksidaz)
Kör	850 µL + 50µL	67µL	33µL	-
Numune	850 µL	67µL	33µL	50µL



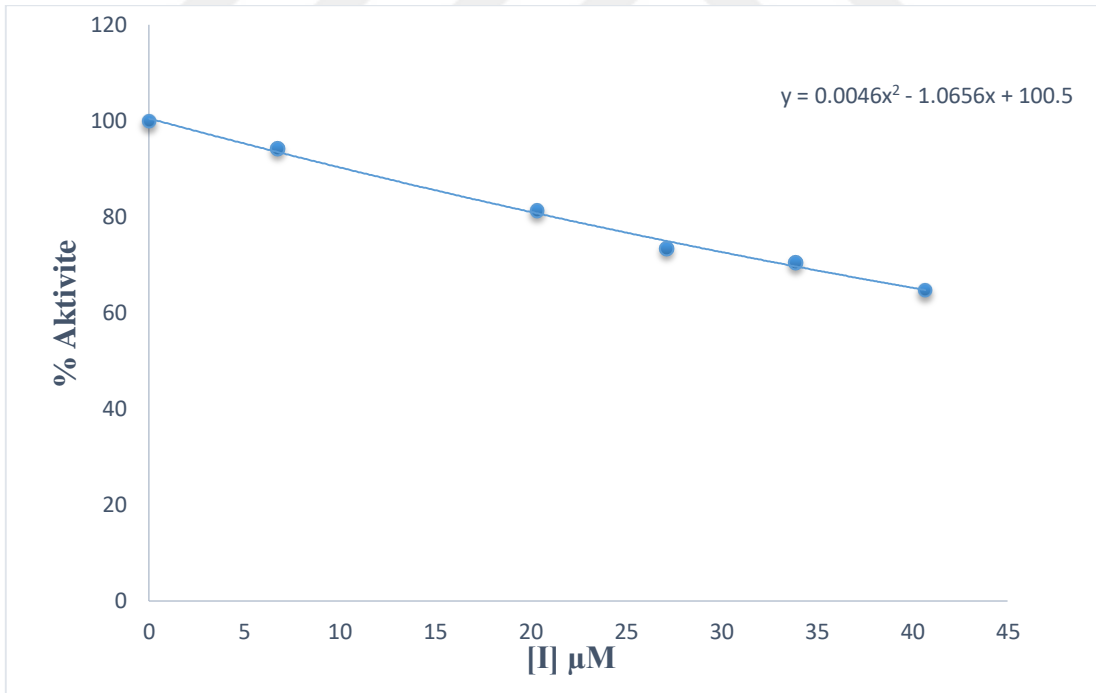
Şekil 3.4: Aseton için % aktivite-[I] grafiği.



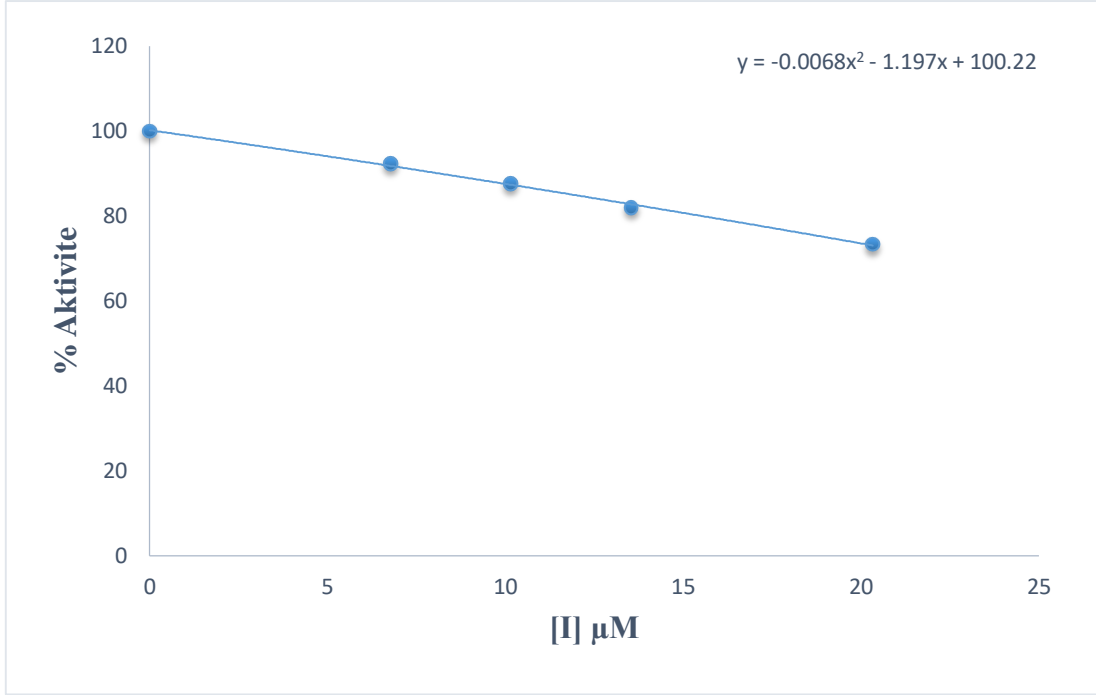
Şekil 3.5: Toluen için % aktivite-[I] grafiği



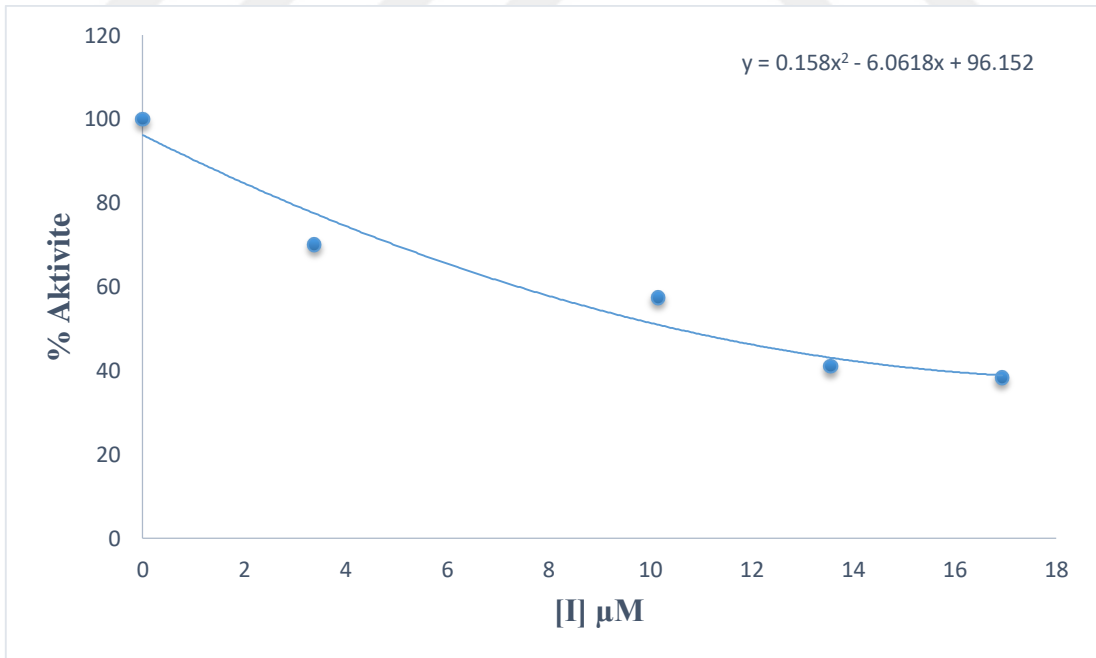
Şekil 3.6: Hekzan için % aktivite-[I] grafiği.



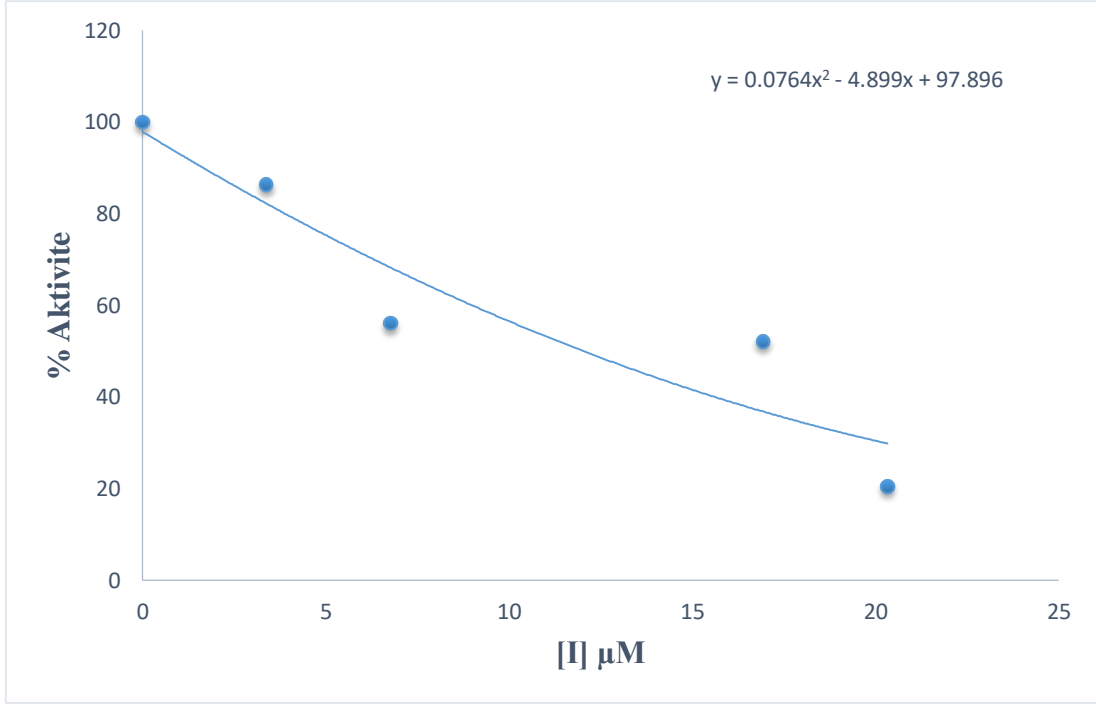
Şekil 3.7: 2-propanol için % aktivite-[I] grafiği.



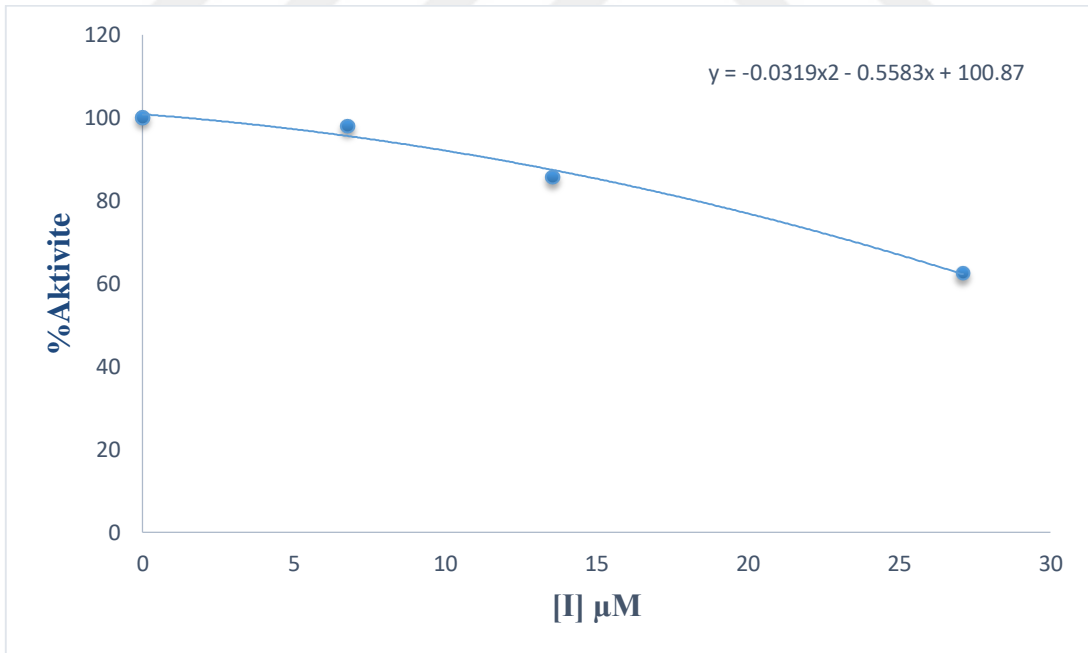
Şekil 3.8: Diklorometan için % aktivite-[I] grafiği.



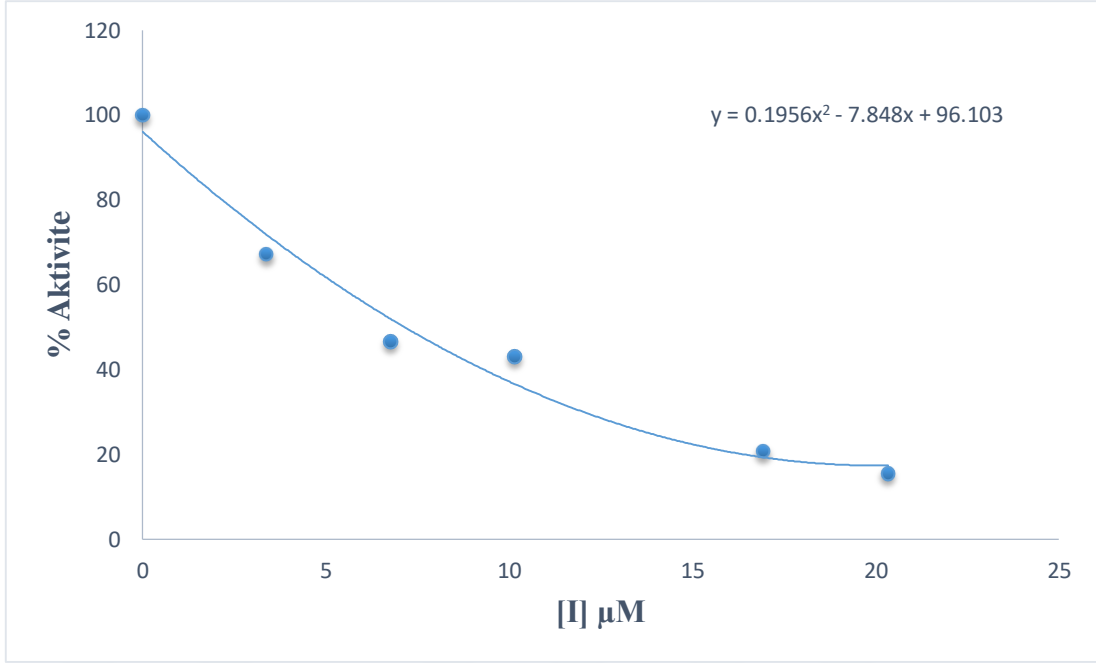
Şekil 3.9: Sodyum silikat için % aktivite-[I] grafiği.



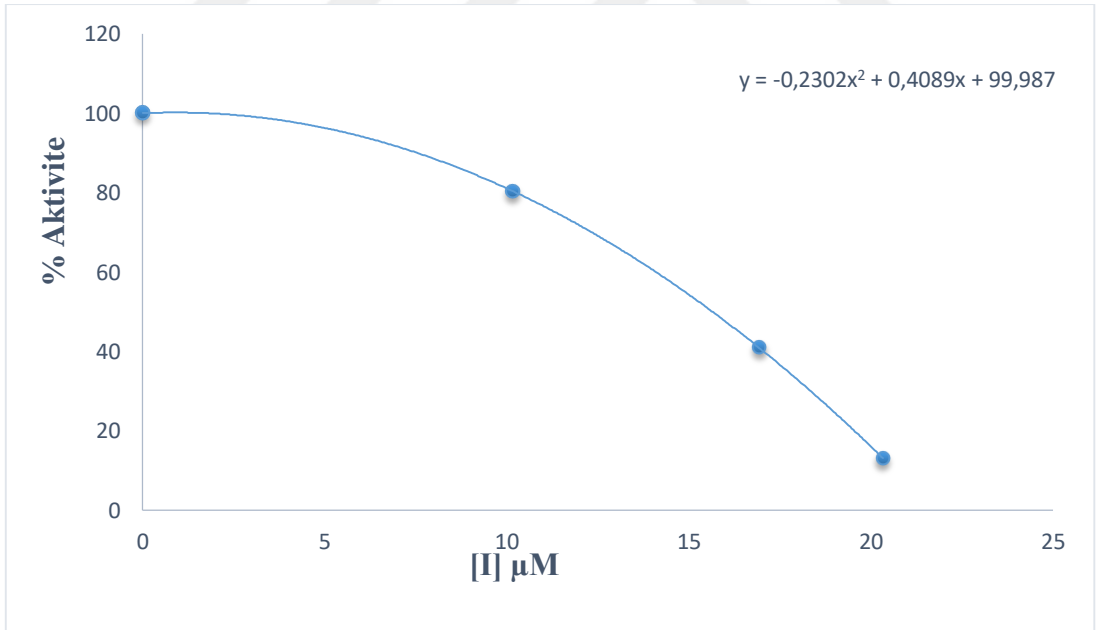
Şekil 3.10: Trietil amin için % aktivite-[I] grafiği.



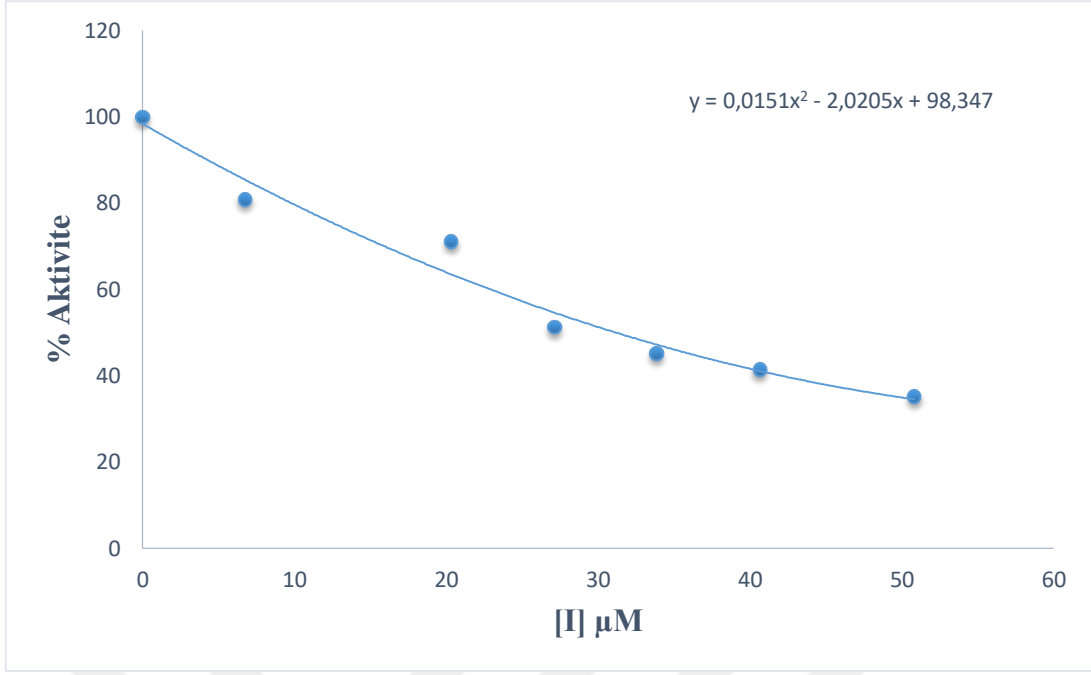
Şekil 3.11: Asetofenon için % aktivite-[I] grafiği.



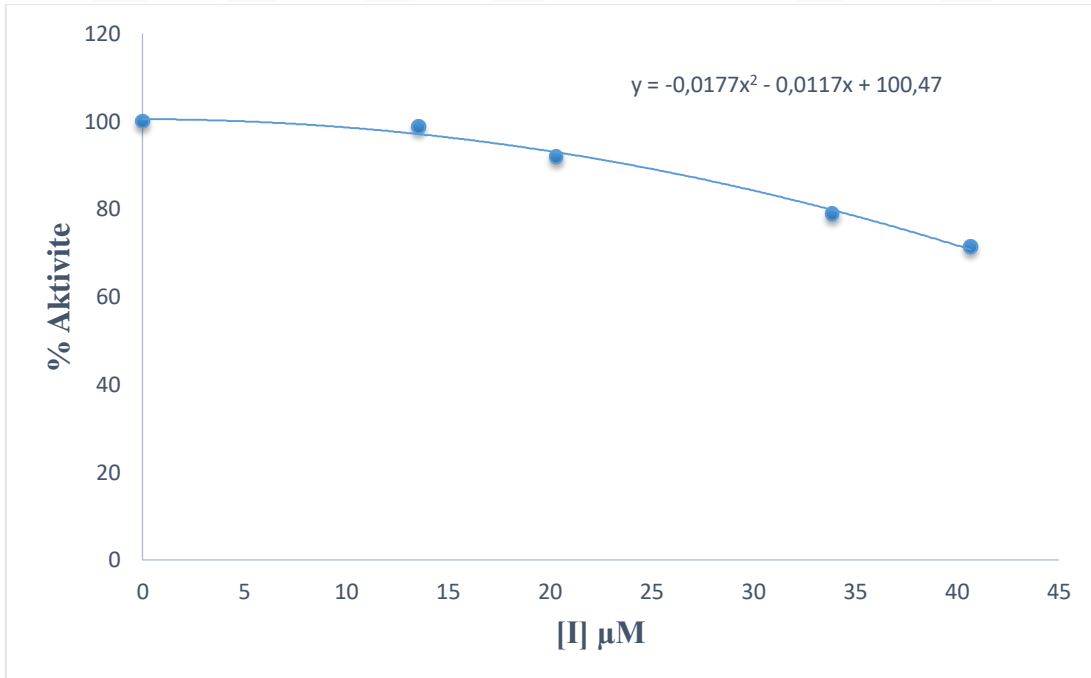
Şekil 3.12: Perklorik asit için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.13: Ksilen için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.14: 1,4-dioksan için % aktivite-[I] grafiği.



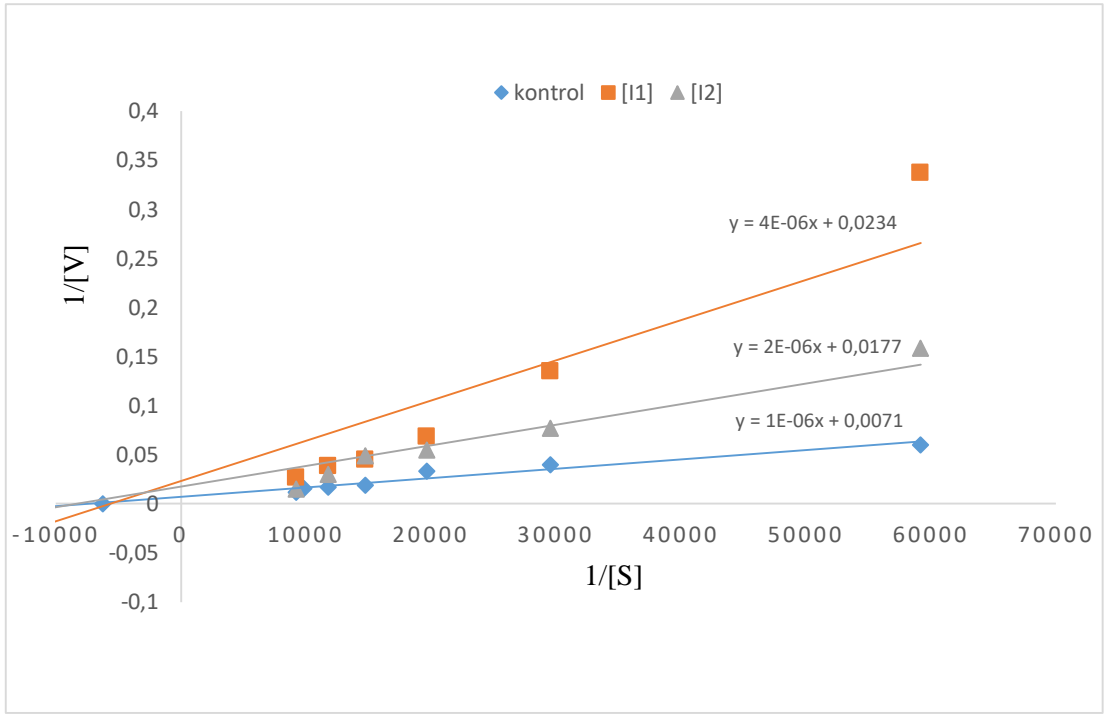
Şekil 3.15: Benzen için % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.3: IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan miktarlar.

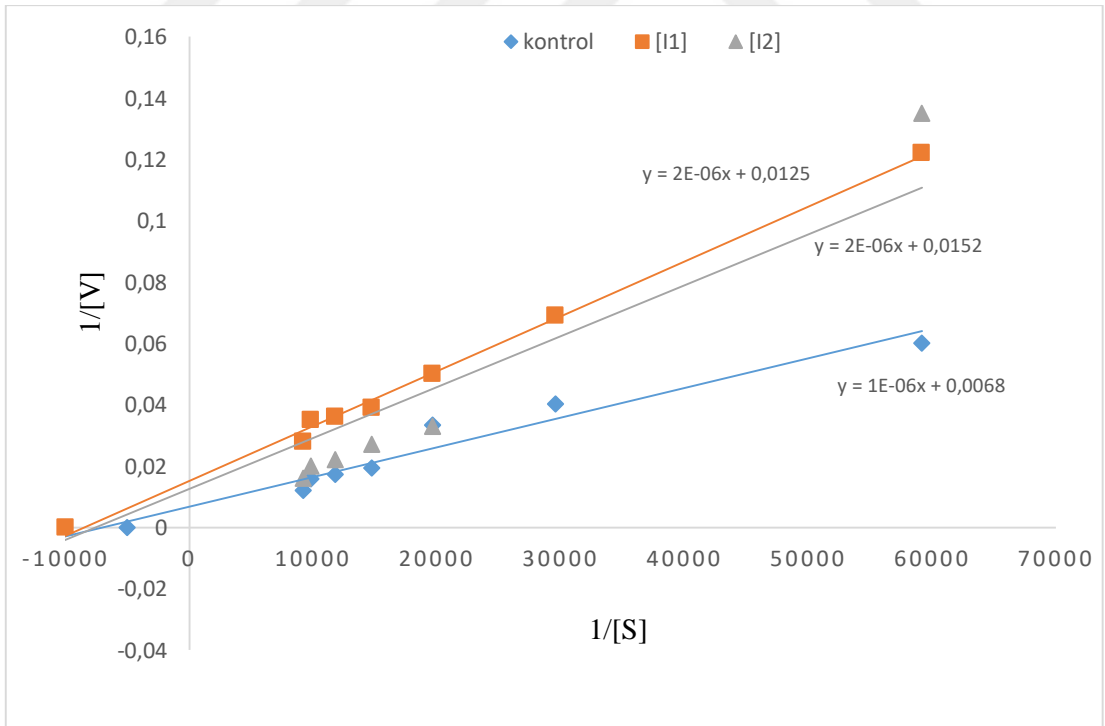
İnhibitör	Tampon	Substrat (ABTS)	H₂O₂	Enzim
Kör	900µL	67µL	33µL	-
0 µL	850µL	67µL	33µL	50µL
2 µL	848µL	67µL	33µL	50µL
4 µL	846µL	67µL	33µL	50µL
6 µL	844µL	67µL	33µL	50µL
8 µL	842µL	67µL	33µL	50µL
10 µL	840µL	67µL	33µL	50µL
12 µL	838µL	67µL	33µL	50µL
15 µL	835µL	67µL	33µL	50µL

	IC₅₀ (µM)
Aseton	8,3
Toluen	22,47
Hekzan	56,39
2-propanol	66,41
Diklorometan	36,38
Sodyum silikat	10,48
Trietil amin	12,02
Asetofenon	1,82
Perklorik ast	13,08
Ksilen	15,63
1,4-dioksan	31,20
Benzen	53,06

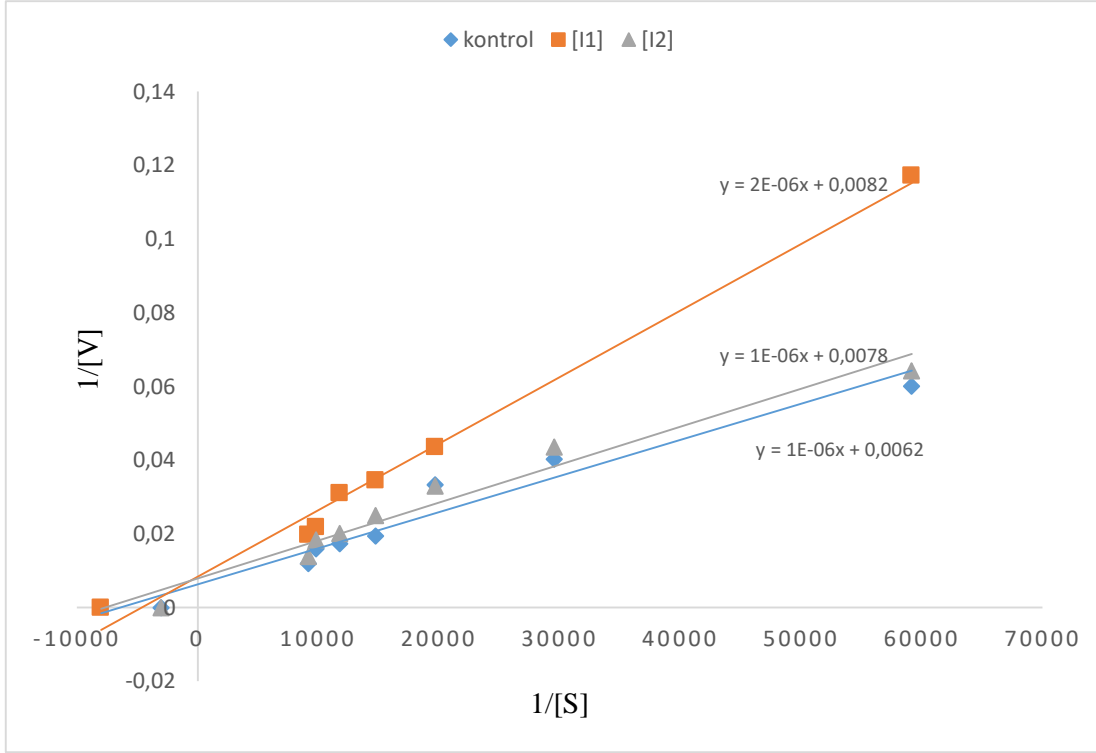
Daha sonra çalışmada kullanılan ligand için 2 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, ABTS substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi. Hesaplamalar sonucunda çalışmada kullanılan kimyasallardan bazılarının LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisinin varlığı gözlemlendi ve grafikleri çizildi.



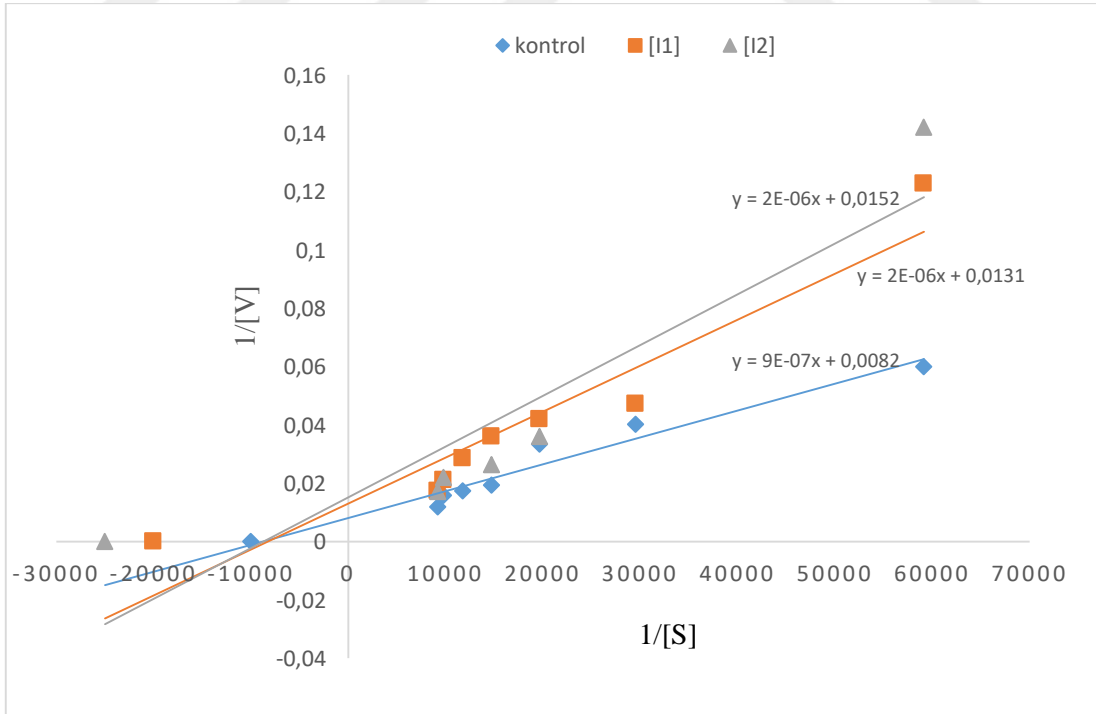
Şekil 3.16: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 2-propanol ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



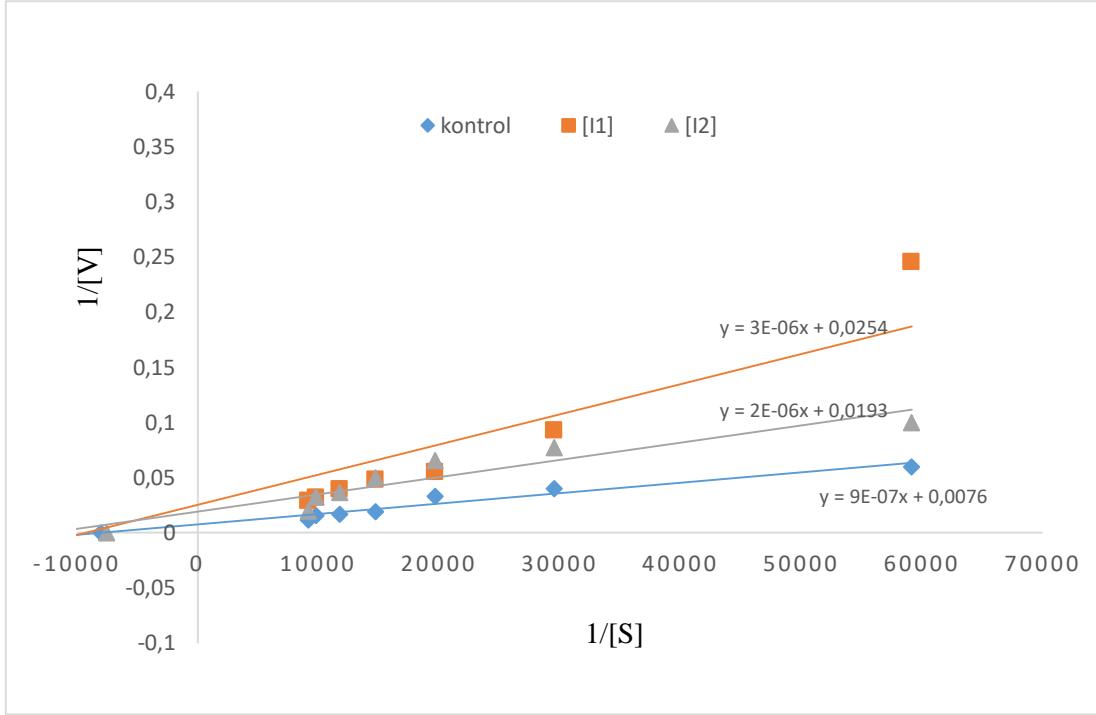
Şekil 3.17: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve diklorometan ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



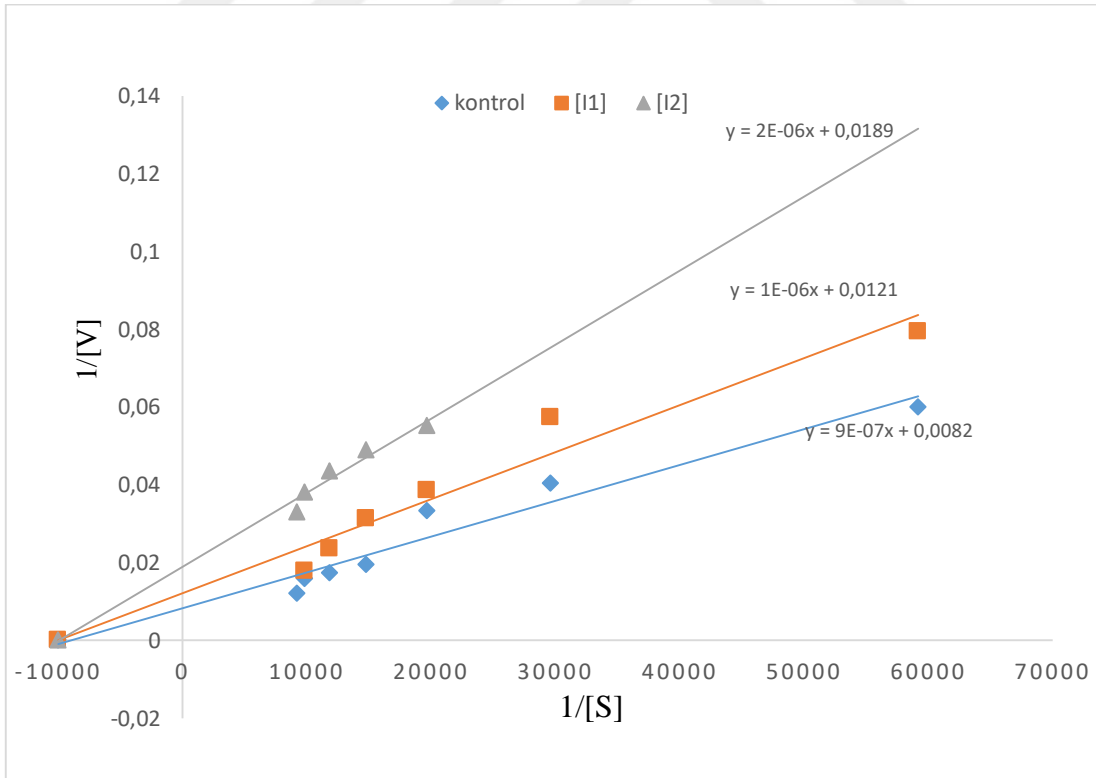
Şekil 3.18: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve ksilen ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



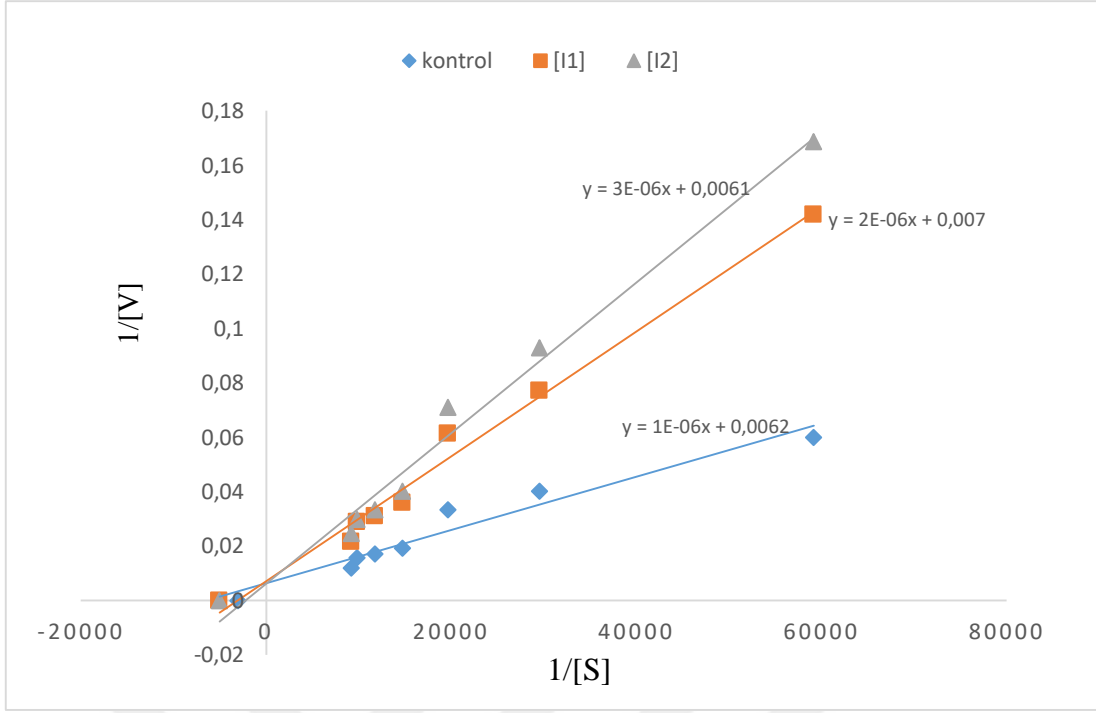
Şekil 3.19: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve trietilamin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



Şekil 3.20: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve sodyum silikat ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



Şekil 3.21: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve perklorik asit ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



Şekil 3.22: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve hekzan ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bilim insanları LPO enzimi üzerine farklı kimyasalların inhibisyonunu araştırmış ve saflaştırma için birçok kromatografik yöntem denemiştir. Çalışmamızda LPO saflaştırılması için afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Afinite kromatografisi proteinlerin ayrılması için kullanılır ve spesifik ligand esasına dayanır [37]. Bradford metodu ile kantitatif protein tayini yapılmış ve hemolizattaki protein miktarları bulunmuştur. Bu metod proteine Coomassie Brilliant Blue G-250 bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbands gösterir. Protein ile boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşir. Bu kompleks çözeltilerde uzun süre kalır. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [33]. LPO enziminin aktivitesi, Bardsley ve Shindler yönteminin belirlenen prosedürüne göre yapıldı. Bu yöntem ABTS kromojenik substratın H₂O₂ tarafından yükseltgenmesine aynı zamanda oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbands artışının 412 nm’de izlenmesi esasına dayanır. LPO enziminin aktivitesi belirlenirken bu yöntemin belirlenmesinin sebebi; enzimin literatürde en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının verilmiş olmasıdır ($\epsilon_{412}=32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi 20°C’de 1 dakikada 1 µmol ABTS’nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. 20 °C ve optimum pH da ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerleri en az yedi farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerine bakılarak inhibisyon varlığı tespit edildi [37].

LPO enziminin saflaştırılması ile ilgili literatürde birçok yöntem kullanılmaktadır. Atasever ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-Sülfanilamid jel ile saflaştırmayı gerçekleştirerek kolonun uzun süre kullanılabilirliğini ve daha ekonomik olduğunu tespit etmiştir. Sülfanilamid için IC₅₀ değeri $0,848 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve K_i değeri $3,57 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak bulmuşlardır. Saflaştırdıkları LPO enzimi için kinetik sabitleri K_M ve V_{max} değerlerini sırası ile 0,14 mM ve 0,55 µmol/min mL olarak bulunmuşlardır [25].

Usanmaz’ın çalışmasında; 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ve 3-amino-4-kloro benzensülfonilamid LPO enzimini inhibe ettiğini gözlemiş ve bu moleküllerin herbiri

için sığır sütü LPO enziminin saflaştırılması için ligand olarak afinite jellerini hazırlamıştır. Aynı zamanda herbir molekül için kinetik parametreleri IC_{50} , K_i ve inhibisyon tiplerini belirleyerek LPO enzimi için yeni inhibitörler tespit etmiştir. Hazırladığı jellerden sığır sütü LPO enzimi ilk kez tek aşamada saflaştırılmış ve en iyi sonuç 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü ile elde edilmiştir. Aynı zamanda koyun LPO enzimi içinde ilk defa tek basamakta saflaştırılma gerçekleştirilmiştir [14].

Köksal'ın çalışmaları sonucunda LPO enzimi üzerine 11 adet sülfanilamid türevi olan moleküllerin kinetik çalışmaları yapılmıştır. Çalıştığı maddelerin LPO enzimine etkili inhibitör olduğu ve ligand olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca sadece sığır sütü LPO enzimi değil; manda, koyun ve keçi sütleride 11 molekülden hazırlanan afinite kolonlarından tek basamakta saflaştırılmıştır. En etkili ligand olarakta 5-amino-2-metilbenzen sülfonamid molekülü tespit edilmiş ve LPO enzimi 1059,37 kat saflaştırılmıştır. Bunun yanında tek kademede ve ucuz maliyette LPO saflaştırılması yapabilebilen 5-amino-2-metilbenzen sülfanomid molekülü literatüre geçmiştir [24].

Şişecioğlu ve arkadaşları sığır sütünde elde ettikleri Laktoperoksidaz enzimini 3 adımda saflaştırmışlardır. Sırasıyla Amberlite CG-50 reçinesi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisidir. Profolün LPO enzimi üzerindeki etkisini substrat olarak ABTS kullanılarak belirlemişlerdir. Profolün IC_{50} değeri 15.97 μ M olarak, K_i değeride 3.72 μ M bulunmuştur [36].

Erol 'un [referans] yapmış olduğu yüksek lisans çalışmasında keçi sütünden elde edilen LPO enzimi için yapılan kinetik çalışmada 6 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı konsantrasyonda Sefotak ilacının aktivite ölçümü yapılmıştır. 0,2 M Sefotak için IC_{50} değeri 0,93 M, K_i değeri 0,015 M olarak bulunmuş ve inhibisyon tipi de yarışmalı olarak tespit edilmiştir.

Şipal'in [referans] yapmış olduğu doktora çalışmasında sığır sütünden LPO enzimini saflaştırmak için Sepharose 4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapısına sahip jel sentezlenmiştir. Hazırlanan bu kolonun diğer saflaştırma metodlarıyla karşılaştırıldığında daha ekonomik ve çok uzun süre kullanılabildiği tespit edilmiştir. Sepharose-4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzene sülfonamid

yapılı afinite jel için farklı sıcaklıklarda, farklı iyonik şiddet ve pH çalışmaları yapmıştır. Bunun sonucunda dengeleme ve yıkama tamponunda Na₂SO₄ içermeyen bağlanmanın en iyi olduğu pH:6 ve sıcaklık 25 °C bulmuştur. Çalışmasında veteriner ilaçları ve pestisitlerin LPO enzimi üzerine farklı oranlarda in vitro etki gösterdiğini tespit ederek IC₅₀ değerlerini belirlemiştir. Sonuç olarakta bu bileşiklerin, laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiğini belirlemiştir. Çalışmada kullanılan veteriner ilaçlarından en güçlü inhibitör olarak IC₅₀ değeri 9 µM olan Advocin olarak bulmuştur. Bunun yanı sıra değerlere bakıldığında çalışmadaki bütün veteriner ilaçlarının güçlü inhibitör özelliği gösterdiğini belirlemiştir. Çalışmasında kullandığı bir diğer kimyasal olan pestisitler içerisinde en güçlü inhibitörü 11 µM olan Ragor olarak bulmuştur [28].

Çalışmada Sepharose-4B-L-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak piyasadan kolay bulunabilen ve maliyetinin az olduğu sığır sütünden LPO enzimi saflaştırılmıştır. LPO enziminin saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 212000 EU/mg olarak, yüzde verim ise 0.75 olarak bulunmuştur. Daha sonar afinite jelinden saflaştırılan LPO enzimine karşı bazı organik çözücülerin in vitro etkilerine bakılmıştır. Kullanılan bu organik çözücülerin IC₅₀ değerlerini bulmak için ABTS substratında çalışılarak % aktivite hesaplanarak, % aktivite - [I] grafikleri çizilmiştir. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için 7 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 32 farklı kimyasal maddelerin konsantrasyonunda enzim aktivite ölçümü yapılmıştır. 1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak inhibisyon varlığı tespit edildi.

Çalışmada kullanılan organik çözücüler; toluen, aseton, 1-bütanol, sülfürik asit, hekzan, nitrik asit, karbon tetra klorür, kloroform, 2-merkaptotanol, hidrojen peroksit, 2-propanol, asetik asit, orto fosforik asit, formik asit, indol 3-bütirik asit, diklorometan, 1,4-dioksan, sodyum silikat, sodyum hipoklorit, hidroflorik asit, trietil amin, kojik asit, n-pentan, dietil eter, etil asetat, asetofenon, benzen, perklorik asit, ksilen, amonyak, anilin, formaldehit şeklindedir.

Sonuç olarak elde edilen veriler şu şekildedir;

1-bütanol, sülfürik asit, nitrik asit, karbon tetra klorür, kloroform, 2-merkaptotanol, hidrojen peroksit, asetik asit, orto fosforik asit, formik asit, indol 3-

bütirik asit, sodyum hipoklorit, hidroflorik asit, kojik asit, n-pentan, dietil eter, etil asetat, amonyak, anilin, formaldehit çözücülerinin LPO enzimi üzerine aktivite etkisi gözlenmemiştir. 2-propanol, diklorometan, trietil amin, sodyum silikat ve Perklorik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla 66,41; 36,38; 12,02; 10,48 ve 13.08 olarak bulunmuştur. Kimyasalların inhibisyon tipleri Nonkompetitif olarak belirlenmiş olup K_i değerleri sırasıyla $6,7 \times 10^{-4}$; $8,10 \times 10^{-6}$; $1,17 \times 10^{-4}$; $7,51 \times 10^{-6}$ ve $8,11 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur. Bu bileşiklerin LPO enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sayesinde ilerleyen dönemlerde biyosensör alanında, savunma sanayinde, eczacılıkta, tarımda, endüstride, tıp alanındaki çalışmalarda yenilik oluşturması amacıyla kullanılacaktır.



5. KAYNAKLAR

- [1] Arslan, O., *Biyomoleküller teori ve uygulamaları*, Balıkesir, 81, (2008).
- [2] Bugg, T., D., *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Blackwell, Publishing, 19-30, (2004).
- [3] Nelson, D., Cox, M. and Kılınç, N., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Ankara, 975-8982- 18-4, Palme Yayıncılık, 244-269, (2005).
- [4] Beyaztaş, S. “Ksantin oksidaz (XO) enziminin saflaştırılması için yeni bir affinite jelinin sentezi, saflaştırılan enzim ile tiyosemikarbazon türevlerinin biyotransformasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması”, Doktora tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).
- [5] Sel, S., “Bazı sülfonil üre grubu herbisit etken maddelerinin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve enzim inhibisyon mekanizmasının kare dalga voltametri ve floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, (2014).
- [6] Sorensen R. and Novak N., *The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Pysiology Teaching Laboratories. Biochemical Education*, 0307-4412, (1995).
- [7] Hiraga, S. and Sasaki, K., *A large family of class-III plant peroxidases Plant Cell Physiol*, 42, 462-468, (2001).
- [8] Van Huystee, R.B., Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies, *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 205, (1987).
- [9] Doumonted, C. and Rousset B., Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *J. Biological Chem.* 258, 14166.-14172, (1983).

- [10] Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M., “Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers”, *J. Bioact. Compat. Pol.*, 3: 243-312, (1988).
- [11] Carr, P.W., and Bowers, L.D., “Support considerations in chemical analysis”, *Enzymes*, Academic Press, New York, (56), 167-170, (1980).
- [12] Fric, F., “Oxidative Enzymes”, (eds: Pirson, A. and Zimmerman, M.H.), *Encyclophedia of Plant Physiology*, 4, New York, 6-17, (1976).
- [13] Pakkanen, R., Aalto, J., “Growth Factors and Antimicrobial Factors Ofbovine colostrum”, *Int Dairy*, 7, 285-97, (1997).
- [14] Usanmaz, H., “Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2014).
- [15] Kumar, R., and Bhatla, K.L., “Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk”, *Acta Cryst.*, (51), 1094-1096, (1995).
- [16] Vasavada P., and Cousin M., “Dairy Science and Technology “, Handbook, Volumes 13. John Wiley & Sons, 978-1-56081-078-0. Edited by: Hui, Y.H, (2005).
- [17] Yılmaz, B. ve Tosun, H., “Sütte bulunan doğal antimikrobiyal sistemler ve bunların gıda sanayinde kullanımı”, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 11-20, (2014).
- [18] Jacob, B.M., Monoj N.K., and Haridas, M., Antibacterial Property of Goat Milk Lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology*, (31), 808, (1998).
- [19] Bayse, G. S., Michaels, A. W., and Morrison, M., “Lactoperoxidase-catalyzed iodination of tyrosine peptides”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 284(1), 30-33, (1972).

- [20] Sievers, G., “Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy”, *Biochemica et Biophysics Acta*, 624, 249-259, (1980).
- [21] Anonymous, K., “Lactoferrin and lactoperoxidase bio-active milk proteins”, *Food Technology Europe*, 1996, 39-43, (1955).
- [22] Wit, J.N. and Hooydonk, V., “Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems”, *Netherland Milk and Dairy Journal*, (50), 227-244, (1996).
- [23] Sharma, S., Singh, A. K., Kaushik, S., Sinha, M., Singh, R. P., et al., “Lactoperoxidase structural insights into the function, ligand binding and inhibition” *International journal of biochemistry and molecular biology*, 4(3), 108, (2013).
- [24] Köksal, Z., “Sülfanilamid Türevleri Kullanılarak Memeli Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması”, *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, (2015).
- [25] Atasever, A., “Laktoperoksidaz Enziminin Sığır Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniği İle Saflaştırılması”, *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, (2010).
- [26] Herrandez, C.M.M., Markwijk, B.W. and Vreeman, H.J., “Isolation and Properties of Lactoperoxidase from Bovine Milk”, *Netherland Milk and Dairy Journal*, (44), 213-231, (1990).
- [27] Claesson, O. and Björck, L., “Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *E. coli*”, *Journal of Dairy Science*, (63), 919-922, (1980).
- [28] Şipal, B., “Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir*, (2016).

- [29] Özdemir, H., Aygül, G. and Küfrevioğlu, Ö.G., “Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties”, *Prep. Biochem and Biotech*, 31(2), 125-134, (2001).
- [30] Voet, D., and Voet, J.G., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. US, (2003).
- [31] Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., “Steady-state kinetics of Lactoperoxidase With ABTS as Chromogen”, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, (67), 1307-1312, (1975).
- [32] Segel, I.H., “*Biochemical Calculations*”, 403, New York: John Wiley and Sons, (1968).
- [33] Bradford, M. A. “Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* (72), 248-254, (1976).
- [34] Bozdog, M., Isik, S., Beyaztas, S., Arslan, O., and Supuran, C. T. “Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases”. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30(2), 240-244, (2015).
- [35] Laemmli, D. K., “Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*”, London, 227, 680, (1970).
- [36] Sisecioglu, M., Çankaya, M., Gulcin, I., and Ozdemir, H. The inhibitory effect of propofol on bovine lactoperoxidase. *Protein and peptide letters*, 16(1), 46-49, (2009).
- [37] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., *Biyokimya*, 6. Baskı, İstanbul: Aktif yayınevi, (2009)