

**KEÇİ SÜTÜNDEN LAKTOPEROKSİDAZ (LPO) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU, BAZI İLAÇLARIN İNHİBİSYON ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**Mehmet Muhsin EROL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Metin Tansu UĞUZ**

**Aralık 2013**

T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEÇİ SÜTÜNDEN LAKTOPEROKSİDAZ (LPO)  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU, BAZI İLAÇLARIN  
İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehmet Muhsin EROL**

**Enstitü Anabilim Dalı : BiYOLOJi**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Metin Tansu UĞUZ**

**Aralık 2013**

T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİ SÜTÜNDEN LAKTOPEROKSİDAZ (LPO) ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI İLAÇLARIN  
İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Muhsin EROL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 22.01.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Metin Tansu  
UĞUZ

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mustafa KOYUN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Nevzat ESİM

Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Bingöl Üniversitesi ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmayı hazırlamamda çok büyük emeği geçen ve sonsuz hoşgörüsü ile tezimi bitirmemde büyük desteği olan tez hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Metin Tansu UĞUZ'a;

Yüksek lisans ders döneminde ders aldığım ve isimlerini buradan zikredemediğim değerli hocalarım; Çalışmalarımnda yardım ve desteklerini esirgemeyen yengem Öğr. Gör. Fatma Zuhul EROL ve sevgili abim Öğr. Gör. Ebumüslüm EROL'a;

Ayrıca daima yanımda olan, bugünlere gelmemde büyük emek, sabır, hoşgörü ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

**Mehmet Muhsin EROL**

**BİNGÖL - 2013**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
MATERYALLER ve YÖNTEMLER .....	13
2.1. MATERYAL .....	13
2.1.1. Kullanılan Numune ve Kimyasal Maddeler.....	13
2.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	13
2.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	14
2.2. YÖNTEM.....	17
2.2.1. Protein Tayini .....	17
2.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini .....	17
2.2.1.2. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini .....	17
2.2.2. Laktoperoksidaz Aktivitesi Tayini .....	18
2.2.3. Keçi Sütünden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Çalışması..	19
2.2.3.1. Amberlite CG 50 H <sup>+</sup> Reçinesi Kullanılarak Enzimin Kısmi Saflaştırılma.....	19
2.2.3.2. I. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	20
2.2.3.3. CM-Sephadex C-50 İyon Değişim Kromatografisi .....	21

2.2.3.4. II. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz .....	22
2.2.3.5. Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	22
2.2.3.6. III. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz .....	23
2.2.3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi .....	23
2.2.4. Keçi Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	24
2.2.4.1. Keçi Sütü LPO Enzimleri İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması.....	24
2.2.5. Sefotaksim Sodyum'un Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	25

### BÖLÜM 3.

BULGULAR .....	26
3.1. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	26
3.2. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	27
3.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme Sonuçları .....	27
3.2.2. Laktoperoksidaz Enziminin CM-Sephadex C-50 $H^+$ iyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları .....	27
3.2.3. Laktoperoksidaz Enziminin Sephadex- G 100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları .....	28
3.2.4. LPO Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları .....	29
3.2.5. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları .....	30
3.3. ABTS Substratı İçin $K_M$ ve $V_{MAX}$ Değerlerinin Bulunmasına Yönelik çalışma Sonuçları .....	31
3.4. LPO Enzimi Üzerine Sefotaksim Sodyum'un İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi .....	32
3.5. Keçi Sütü LPO'su İle ABTS Substratı İçin Sefotaksim Sodyum İnhibisyon kinetiğinin İncelenmesi(%100 Aktivite).....	34

BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	36
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit)
CFU	:Koloni forming unit
CM -	: Karboksi metil-
POD	: Peroksidaz
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
ESI	:Enzim inhibitör substrat kompleksi
HCL	: Hidroklorik asit
LPS	:LPO-tiyosiyanat –hidrojen peroksit
I	: İnhibitör
LPO	: Laktoperoksidaz enzimi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TCA	: Triklor asedik asit
UV	: Ultraviyole



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.	Lowry yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik .....	26
Şekil 3.2.	Keçi sütü LPO enziminin CM-Sephadex C-50 <sup>+</sup> iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılması sırasında elüatlarda 280 ve 412 nm’de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik .....	28
Şekil 3.3.	Keçi sütü LPO enziminin Sephadex-G100 jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılması sırasında elüatlarda 280 ve 412 nm’de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik .....	29
Şekil 3.4.	Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği .....	31
Şekil 3.5.	LPO enzimi için ABTS substratıyla ilaç (Sefotak-1g sefotaksim Sodyum) inhibitörü eşliğinde elde edilen Lineweaver- Burk grafikleri.....	34
Şekil 3.6.	Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla ve sefotaksim sodyum ile elde edilen % aktivite- konsantrasyon grafiği .....	35

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Keçi sütü LPO enziminin saflaştırılma basamakları sonuçları .....	30
Tablo 3.2.	Keçi sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmalarının toplu sonuçları .....	31
Tablo 3.3.	LPO enzimi için ABTS substratıyla inhibitör kullanılmadan elde edilen deney prosedürü ve $1/V$ , $1/[S]$ değerleri .....	32
Tablo 3.4.	LPO enzimi için ABTS substratıyla ilaç (sefotak-1g Sefotaksim sodyum) inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V$ , $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü .....	33
Tablo 4.1.	Keçi sütünden elde edilen LPO üzerine sefotaksim sodyumun inhibisyon etkisini bulmak için ABTS substratıyla yapılan deney prosedürü ve sonuçları.....	36
Tablo 4.2.	Keçi sütü LPO'sunun üç farklı ilaç konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver- Burk grafiklerinden elde edilen $K_i$ , $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri.....	39

## ÖZET

**Anahtar Kelimeler:** Laktoperoksidaz, Kinetik, İnhibisyon, Sefotaksim Sodyum.

Bu çalışmada laktoperoksidaz enzimi (LPO) (E.C.1.11.1.7) keçi sütünden biyokimyasal ve kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri araştırılmıştır. Laktoperoksidaz enziminin keçi sütünden saflaştırılması için, Amberlite CG-50 H<sup>+</sup> reçinesiyle kısmi saflaştırma yapılarak, % 90 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi, % 90 II. amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi, % 90 III. amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, sırasıyla çalışıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat) elektroforezi ile belirlendi. Bir litre keçi sütünden spesifik aktivitesi 7.21 EU/mg protein belirlendi. ABTS substratı için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri ile optimum pH, optimum sıcaklık belirlendi.

Laktoperoksidaz enzimi saflaştırma işlemleri sonucunda 1 litre yağı alınmış taze süttten 13.35 kat saflaştırıldı ve 1.9 mg (Rz=0.7) LPO elde edildi. Enzim saflaştırılması sırasında aktivite tayinleri için 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) substratı ( $\epsilon_{412nm}=32400M^{-1} cm^{-1}$ ) kullanıldı. Sefotaksim Sodyum'un enzim üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. ABTS ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) substratları kullanılarak yapılan çalışmada kullanılan ilacın enzimi inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin antibiyotik için yarışmalı inhibisyon olduğu bulundu.

# PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTOPEROXIDASE FROM GOAT MILK, INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS OF SOME DRUGS

## ABSTRACT

**Keywords:** Lactoperoxidase, Kinetics, Inhibition, Cefotaxime Sodium.

Lactoperoxidase was purified from healthy goat milk by using biochemical and chromatographic techniques and some kinetics properties (inhibition, antibacterial, antifungal) have been investigated. For the purification of LPO milk was first treated partial purification with Amberlite CG-50 H<sup>+</sup> resins and later I.ammonium sulphate precipitation by using 0-90% saturated ammonium sulfate and dialyze. CM-Sephadex C-50 ion- exchange chromatography, 0-90% saturated II.ammonium sulfate and dialyze. Sephadex G-100 gel filtration chromatography and 0-90% saturated III.ammonium sulfate and dialyze were employed, respectively. Enzyme purity determined by SDS-PAGE electrophoresis. LPO from goat milk (specific activity 7.21 EU/mg protein), per liter were determined. For the ABTS substrate determined enzymes optimum pH and temperature with  $K_m$  and  $V_{max}$  values were determined.

Lactoperoxidase enzyme was purified 13.35 times from 1 liter defatted milk and 1.9 mg of enzyme was obtained. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) substrate ( $\epsilon_{412nm}=32400M^{-1} cm^{-1}$ ) was used for the enzyme activity assays during enzyme purification processes. In this study. Inhibition were measured in the presence of ABTS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates. Some antibiotics has been investigated to effect of inhibition on LPO. For antibiotic inhibition type was found to be competitive.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalardaki reaksiyonları hiç bir yan ürün oluşturmadan % 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 spesifik olmalarıdır (Lehninger, 1982; Keha ve Küfrevioğlu 2000).

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 “koenzim” denilen kompleks bir bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir (Bingöl 1983; Lehninger 1982; Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Enzimlerin katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri maddelere “*substrat*” denir. Önceden enzimler, substrat isimlerinin sonuna ‘az’ eki getirilerek (üreaz, proteinaz, fosfataz gibi) veya enzimi ilk defa keşfeden nasıl bildirmişse (tripsin, pepsin gibi) adlandırılırken, günümüzde daha çok Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırma kullanılmakta ve bu sınıflandırmada her enzimin 4 rakamlı kod numarası (E.C) bulunmaktadır. Sistematik sınıflandırma sonucu enzimler 6 ana grupta toplanmış olup, bunlar sırasıyla: “Oksidoredüktazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, İzomerazlar ve Ligazlar” dır (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 1997).

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 sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Lehninger 1982; Bingöl 1983).

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, 2000).

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

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

Denklemden  $K_m$ ; 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. Bir çok enzim için bu değer  $10^{-1}$  ile  $10^{-6}$  M arasındadır.  $K_m$  değeri enzimin konsantrasyonuna bağlı olmayıp, substratın yapısına, pH'ya, sıcaklığa ve iyonik şiddete bağlıdır. 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. Bu iki değer değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar bulunarak  $V$ -[S] grafiği (Michaelis-Menten grafiği) veya  $1/V$ - $1/[S]$  grafiği (Lineweaver-Burk grafiği) bulunur (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

Bir çözelti veya doku ekstraktındaki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanılarak bulunur. Bunun için enzim hakkında; katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiometrisi, 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 (Lehinger, 1982; Bingöl, 1983; Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

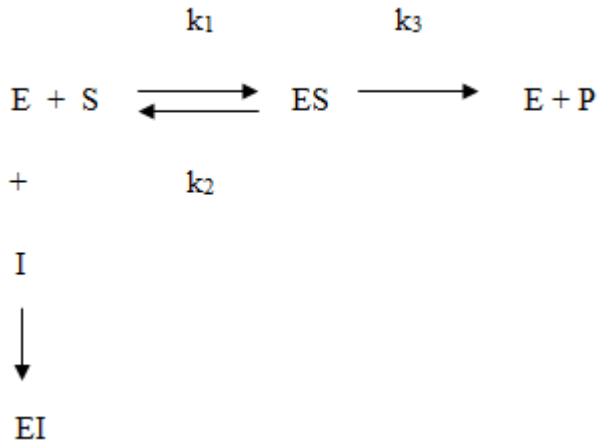
Enzim aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin konsantrasyonlarıdır. Enzimler, optimum pH ve doyumluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırcı dereceden bir reaksiyon oluşur. 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 (Lehinger, 1982) .

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.

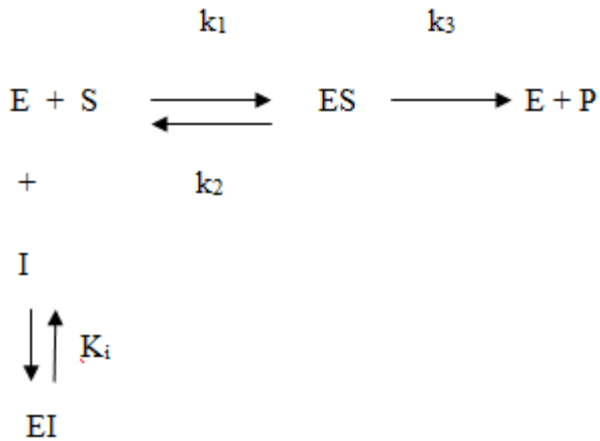
Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimatik inhibisyon başlıca dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyon’da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır yada kolay ayrılamayan bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının uyarılmasında önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir.

Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır,  $K_m$  ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması aşağıda gösterildiği gibidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).



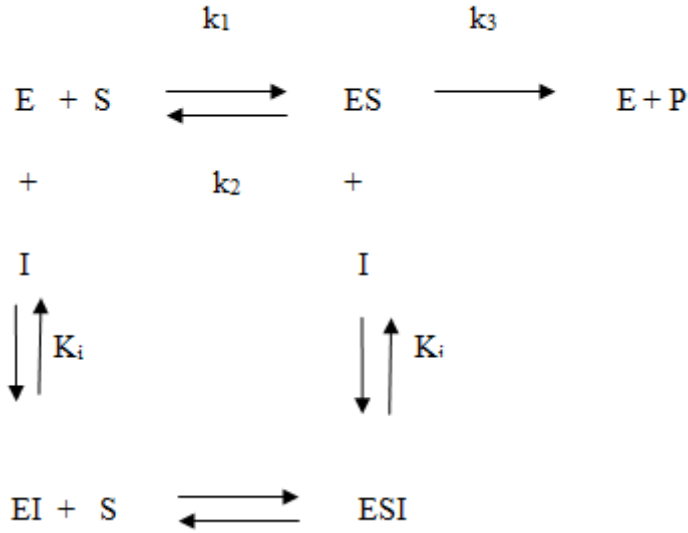
Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyon'dur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın 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.



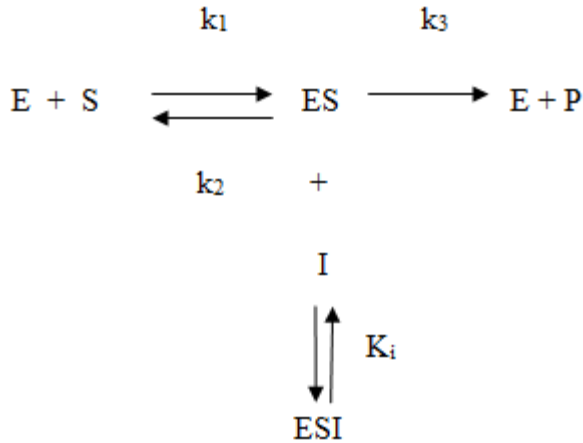
Yine dönüşümlü bir inhibisyon tipi olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon'da inhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek 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 ortamdan sürekli

çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve  $K_m$  değeri de azalır.

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, 2000).

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).

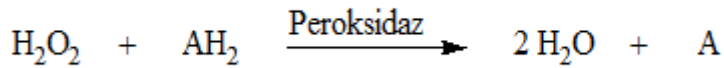
**Peroksidazlar** (POD) ( $H_2O_2$ -oksidoreduktaz E.C, 1.11.1.7); Peroksidazlar, biyolojik sistemlerde antioksidatif etkiye sahip olan enzimlerin en önemlileri arasında sayılabilir (Hussain *et al.*1995).  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit)'i kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonoid aminler (yalnızca benzidin türevleri) gibi çok sayıda aromatik komponentlerin dehidrojenasyonunu da katalizlerler. Bu moleküller arasında 2- krezol, 2-toluidin, guaiacol, pirogallol, homovonillik asit, hidrokinon, 1,2 ve 1,4-fenilendiamin, lökomalaşit yeşili, 2,6-diklorofenolindifenol, 4,4'-diaminodifenilamin, propiyonil promozin, benzidin, o-tolidin, di-o-anisidin ve bazı azo boya türevleri sayılabilir (Pütter and Becker, 1987; VanHuystee, 1987).

Peroksidazlar ; hayvanlarda, at turpu, ananas, incir, baklagiller, mısır, ıspanak ve tütün gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda 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).

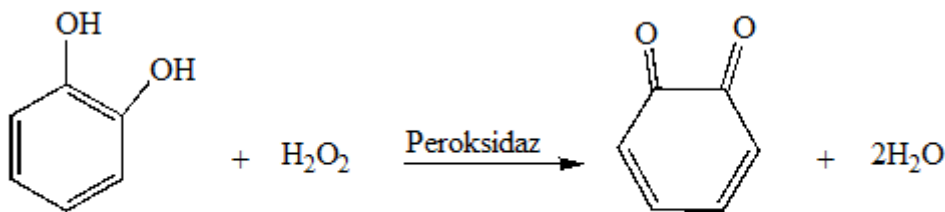
Biyolojik materyallerde guaiacol'ün substrat olarak kullanıldığı ilk renk reaksiyonu 1809'da kaydedilmiş, peroksidaz terimi bundan yaklaşık 100 yıl sonra at turpundan izole

edilen enzim için kullanılmıştır ve özellikle bitki fizyolojisinde artan fizyolojik fonksiyonların sayısının birçoğu peroksidazlarla bağdaştırılmaktadır (VanHuystee, 1987).

Peroksidazların prostetik grupları protohem'dir. Bu da birçok hemoproteininin tersine olarak apoproteine sadece gevşek şekilde bağlıdır (Doumonted and Rousset, 1983). Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda  $H_2O_2$  ; elektron akseptörü olarak hareket eden askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi bir çok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir (Doumonted and Rousset, 1983). Peroksidazlar tarafından kataliz edilen reaksiyon komplekstir ve aşağıda genel formülü verilen reaksiyonları katalizlerler (VanHuystee, 1987).



Antioksidan enzimlerin aynı zamanda serbest oksijen radikallerini gidererek biyolojik oksidatif hasarları engellediği bildirilmektedir (Harris, 1992). 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 verelim:



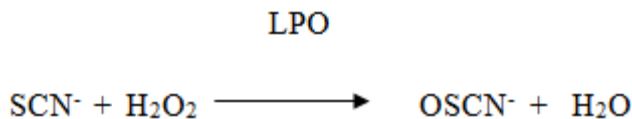
POD; spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimden oluşmuştur (Fric, 1976).

İlk sentezlenen peroksidazın protein kısmı fonksiyonel değildir. Holoenzim, hem grubu ile apoproteininin birleştirilmesi ile fonksiyonellik kazanır (Fric, 1976; VanHuystee, 1987). Peptid zinciri üzerindeki ikinci prostetik grup glikozid yan zincirleridir. Çoğu peroksidaz

izoenzimleri moleküler ağırlıklarının % 15-17'si kadar karbohidrat içerirler (VanHuystee, 1987). Hem grubu ve glikozidik gruplara ilaveten kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ ) iyonu da peroksidaz salınımı ve yapısal devamlılığı için gereklidir (Fric, 1976; VanHuystee, 1987). Değişik araştırmacılar tarafından at turpu (horse radish) peroksidazın 31-33,8 kdal molekül ağırlıkta olduğu ve hem grubuna ilaveten bir glikozid yan zincir içerdiği kaydedilmiştir (VanHuystee, 1987). İzoenzimlerin sayısı çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin mevcudiyetinde değişebilmektedir (Fric, 1976).

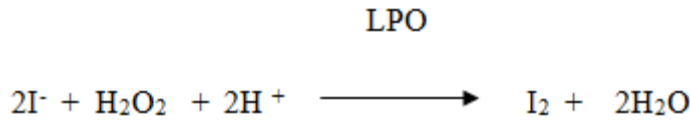
Peroksidazların birçok fizyolojik olayda rol aldığı ve bir çok metabolik reaksiyonun gerçekleşmesine yardımcı olduğu bilinir. Her geçen gün yeni yapılan kapsamlı araştırmalarla çok sayıda fonksiyona sahip oldukları anlaşılmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarla daha birçok fonksiyon ve özelliklerinin ortaya çıkacağı inancındayız.

**Laktoperoksidaz** enzimi (LPO) ( Hidrojen peroksit Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7); Memelilerin sütünde, gözyaşında, tükürüğünde ve hava yolları yüzey sıvısında (Prince, 2000; Conner et al, 2002) bulunan prostetik grup olarak hem grubu içeren bir glikoproteindir (Kumar and Bhatla, 1995; Boats and Floris, 2006; Amornkul, 2007). 1940'lı yıllarda sığır sütünde bulunduğu rapor edilmiştir. 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. (Naidu, 2000; Toruch et al., 2004). Keçi sütünde 0.1- 0.7 mg/ml konsantrasyonda bulunur. (Naidu, 2000; Fonteh Et al., 2002). LPO enzimi memelilerin non-immun biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşeni olarak işlev görerek, aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyanat iyonunun sütte doğal olarak bulunan (Wolfson, 1993) antibakteriyal hipotiyosiyanata peroksidasyonunu katalizler (Reiter, 1984; Kumar and Bhatla, 1995; Hamon, CB; Shin Et al, 2001) .Çiğ sütte tiyosiyanat ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  düşük konsantrasyonda olmasına rağmen, laktoperoksidaz fazla miktarda bulunur (KussenDrager and Van Hooijdonk, 2000).



LPO sistem ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) ve Tiyosiyanat iyonu bulunduğu zaman sütte doğal bir inhibitör olarak etki gösterir (Reiter, 1984). Hastalık yapıcı bakteriye ait metabolik enzimlerin fonksiyonlarını bozar (Hoogendorn and H.Piessens, 1977; Pruitt, 1982). Yani patojenlerin yaşamı için önemli olan çeşitli proteinlerin tiol gruplarıyla reaksiyona girer, öyle de önemli enzim ve protein sistemlerini inaktive eder (Sermon et al, 2005).

Laktoperoksidaz enzimi aynı zamanda iyodürün hidrojen peroksitle oksidasyonunu da katalizler (Bayse *et al*, 1972). Bu peroksidazlar memeli sisteminde yaygın olarak bulunurlar (Sing, 2009).



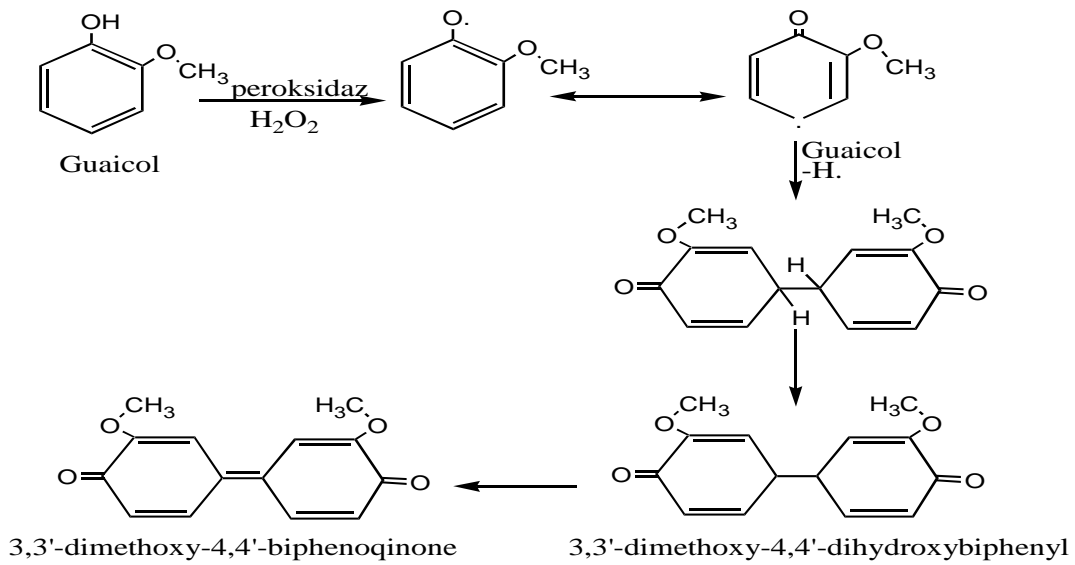
Tiyosiyanat iyonu mide ve böbreklerde, tiroid bezinde tükürükte ve hayvan dokularında yaygın bir şekilde dağılmıştır (Food Standarts, 2002) ve hayvan türlerine göre değişiklik gösterir (Wit, 1996) aynı zamanda hayvan cins ve laktasyon dönemlerine göre, (Zapico, 1991) yıl mevsimlerine (Dabur, 96) ve beslenmeye göre de farklılık gösterir (Thomas, 1981). İyodin metabolizması ve bunun sonucu olarak tiroid fonksiyonlarının araya girmesiyle tiyosiyanat iyonunun aşırı alımının yüksek düzeyde toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Vilkki, 1962).

Laktoperoksidaz enzimi, %8-10 karbohidrat içeren ve molekül ağırlığı yaklaşık 80-85 kdal (Thomas EL, 1991) olan tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Elegamy, Ruppner, İsmail, Champagne, Şişecioğlu, 2010). Değişik araştırmacılar tarafından LPO enziminin 612 amino asit zincirinden ibaret tek bir polipeptid zinciri ihtiva ettiği (Paul et al, 1985). antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu (Haddain et al, 1996) Laktoperoksidazın her molü başına bir demir molekülü ve yaklaşık %10 karbonhidrat ihtiva ettiği, ve proteinin 3 boyutlu yapısı güçlü bir şekilde çelatlanmış bir kalsiyum iyonu ile stabilize olduğu ifade edilmiştir (Björck L., 1979 ). LPO Sistemin görevi çeşitli karsinojenlerin parçalanması

yanında peroksidatif etkiye karşı hayvan hücrelerini koruduğu rapor edilmiştir (Tenovuo, J.O., 1985 ).

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 katalizlerler (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 da inhibe edildiği bilinmektedir (Kumar and Bhatla, 1995). Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sığır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge, 1986).

LPO enzimi için optimum şartlar rapor edilmesine rağmen inhibitörleri tam olarak bilinmemektedir. Fakat çevresel kirleticiler, ağır metaller arasında bir grup elementlerin enzimin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir (M.B Hinojosa, 2001 ). Laktoperoksidaz (LPO)  $H_2O_2$  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 göz yaşından da saflaştırılarak bazı özellikleri ve katalizlediği reaksiyonlar araştırılmıştır.

Bu bağlamda sığır sütü laktoperoksidazın prostetik hem grubu yapısal karakteristikleri (Rae et al, 1998) 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 peroksidede katalize singlet oksijen üretimi (Kanofsky, 1988) anti tümör aktivitesi (Stanis Lawski, 1989), immun sistem düzenleyici etkisi (Lefkowitz, 1990 ) vb. konular çalışılmıştır. Aynı zamanda insan kolestrumunda LPO enzimi immun afinite kolon kromatografisi kullanılarak çalışılmış, molekül ağırlığı sığır LPO enzimi ile aynı bulunmuştur (Langbakk et al, 1989).

LPO'ya  $H_2O_2$ , Tiyosiyanat ve halojenlerin varlığında sütte antimikrobiyal özelliğinden dolayı birçok yazar tarafından dikkat çekilmiştir (Ravanis and Lewis, 1995).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 bakteriyal büyümeyi inhibe etmesi,  $H_2O_2$  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 bakteriostatik etkisi vardır. Sütteki anti bakteriyal etki inaktif protein pro kürsörlerinden yapılan peptitler ve doğal olarak ortaya çıkan protein ve peptitlerin sinerjistik aktivitesine bağlı olabilir (Gobbetti et al, 2004 ). Süt proteinlerinin antimikrobiyal peptit ön maddeleri olarak davrandığı ispatlandı (Pellegrini, 2003).

Deve sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine yapılan antibakteriyal çalışmalarda LPO-tiyosyanat ve peroksit sisteminin patojenik bakterilerde önemli derecede inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Laktoperoksidazın bir çok uygulama alanı vardır. Süte ısı uygulamasından sonra bu sistem aktive olabilir bu durumda pastörize sütün raf ömrünü arttırmaya katkıda bulunabilir (Barrett et al, 1999).

LPO enzimi Özellikle süt işleme tesislerinde nakil ve depolama esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde (Barrett et al., 1999), kozmetiklerde, diş ve oftalmik solüsyonlarda, antitümör ve antiviral ajan olarak (Björck, 1979) ayrıca çiçeklerin, meyvelerin gelişiminin korunmasında kullanılmaktadır ( Touch et al, 2004 ; Le Niguyen et al, 2005).

Keçi, koyun veya Buffalo sütü içeren günlük ürünler gelişen pazarların bu alana ilgisini arttırabilir (Renkin et al, 2010). Koyun ve keçi sütü çiftçiliği birçok ülkelerde özellikle Akdeniz ve Ortadoğu bölgelerinde ulusal ekonominin hayati bir parçasıdır (FAO, 2003). Özellikle de Fransa, İtalya, İspanya ve Yunanistanda iyi organize dir (Park and Haenlein, 2006). LPO sistemin non-immun biyolojik savunma sisteminden sorumlu olması, bazı bakteriyal hastalıklarda antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması, literatür çalışmalarında da antibakteriyal, antifungal, antiviral etkilerinin gözlenmesi nedeniyle antibiyotikle inhibisyon çalışması yapıldı ayrıca çalışması yapılan LPO enziminin keçi sütünden saflaştırılması, literatürlerde fazla yer almamaktadır. LPO enzim aktivitesi farklı cinslerde değişiklik göstermesi nedeniyle keçi sütü üzerinde bu çalışma yapıldı.



## **BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kullanılan Numune ve Kimyasal Maddeler**

Çalışmalarımızda kullanılan, CM-Sephadex C50, Amberlite CG 50 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Sephadex G-100, 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), standart serum albumin, amonyum sülfat, sodyum asetat, sodyum fosfat, sodyum tartarat, sodyum hidroksit, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, diyaliz torbası, Fluka'dan; Folin reaktifi, triklor asetik asit (TCA), sodyum karbonat, hidrojen peroksit, sodyum klorür, hidroklorik asit, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, coomassie brillant blue R-250, sodyum dodesilsülfat (SDS), merkaptoetanol, metanol, keçi sütü Bingöl yöresinden taze olarak temin edilmiştir.

#### **2.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar**

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: IEC Clinical Centrifuge USA
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech Suprafuge-22
Spektrofotometre	: Pharmacia LKB-Biochrom, ULTROSPEC-III
pH metre	: Perkin-Elmer , Coleman 28 C Metrion IV pH meter
Elektroforez tankı	: OWL-Cole Parmer
Peristaltik pompa	: Henry Hight Speed Casette Pomp
Hassas Terazi	: Mettler Ha 51 Ga

Otomatik pipetler : Fischer (50-200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, 10 $\mu$ l)

Kromatografi kolonu : Sigma

Su Banyosu : Grant LTD6G, Schmidt, (-20 ile 100°C arasında çalışabilen)

Kolon kromatografisi : Silikajel 60X70-200 mesh ASTM (Merck)

### 2.1.3.Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hangi amaçla kullanıldığı ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

- 1.) 5 mM NaCH<sub>3</sub>COO pH=6,8 (Amberlite CG 50 H<sup>+</sup> reçinesinin şişirilmesinde kullanılan dengeleme tamponu): 0,68 g (5.10<sup>-3</sup> mol) NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.
- 2.) 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO pH=6,8 (Süt reçine karışımının yıkanmasında kullanılan tampon): 2,72 g (2.10<sup>-2</sup> mol) NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.
- 3.) 500 mM NaCH<sub>3</sub>COO pH=6,8 (Süt ve reçine karışımında bulunan ham enzim ekstraktının elüsyonu için kullanılan tampon): 68 g ( 0,5mol) NaCH<sub>3</sub>COO.3.H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.
- 4.) 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,8 (Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeleğin alınması ve diyaliz edildiği tampon): 1,34 g (5.10<sup>-3</sup> mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.
- 5.) 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,8 ( CM-Sephadex C50 iyon değişim reçinesinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 2,68 g (1.10<sup>-3</sup> mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

6.) 100 mM NaCl içeren 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,8 ( CM-Sephadex C50 iyon değişim reçinesinin yıkanmasında ve gradientli elüsyonunda kullanılan tampon): 5,85 g (0,1 mol) NaCl ve 2,68 g (0,01mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

7.) 200 mM NaCl içeren 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,8 ( CM-Sephadex C50 iyon değişim reçinesinin gradientli elüsyonda kullanılan tampon): 11,7 g (0,2 mol) NaCl ve 2,68 g (0,01mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

8.) 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,8 (Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan dengeleme ve elüsyon tamponu): 26,8 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

9.) 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,0 (ABTS hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 35,8 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,0'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

10.) 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,0 (III. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra enzimin diyalizinde kullanılan tampon) : 134,25 g (0,5 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 950 ml distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,0'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

11.) 1 mM ABTS çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi) : 0,055 g ( 1.10<sup>-4</sup> mol) ABTS 100 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6,0 içinde çözüldü.

12.) 3,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 32 µL alınarak distile suyla 100 ml 'ye tamamlandı.

13.) Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler:

i) 0,8 N NaOH çözeltisi : 32 g (0,8 mol) NaOH alınarak bir litre distile suda çözüldü.

- ii) Lowry reaktifi A : 0,2 g sodyum tartarat ve 10 g sodyum karbonat 55 ml 1 N NaOH içinde çözülerek toplam hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.
- iii) Lowry reaktifi B : 2 g sodyum tartarat ve 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 100 ml 0,1 N NaOH içinde çözüldü.
- iv) Lowry reaktifi C : Ticari folin reaktifinin distile suyla 1/2 (V/V) oranında katılmasıyla taze olarak hazırlandı.

14.) 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 kullanmadan hemen önce 950  $\mu\text{l}$  numune tamponunda 50  $\mu\text{l}$  olacak şekilde  $\beta$ -merkaptto 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'lik 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 distile suyun ilavesiyle hazırlandı.
- vi) Renksizleştirme çözeltisi : %7,5 asetik asit % 5 metanol ve % 87,5 distile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

15.) İnhibitör çalışmasında kullanılan antibiyotik madde konsantrasyonu:

Sefotaksim Sodyum : 0,524 M

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Protein Tayini

#### 2.2.1.1. 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.

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

#### 2.2.1.2. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem Folin reaktifinin aromatik amino asitlerle indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-200 µg'dır (Lehninger 1982).

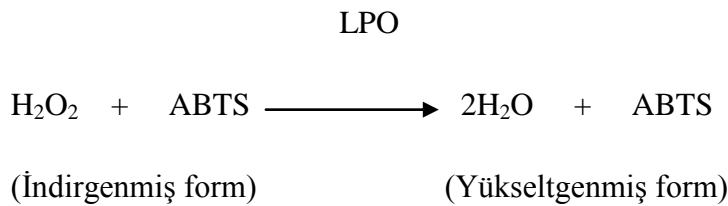
Protein tayini işlemlerinde şu yol izlendi: önce standart bir eğri hazırlandı. Bu amaçla 8 ayrı tüpe standart serum albumin çözeltilisinden (0,5 mg/ml); 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 µl otomatik pipetlerle konuldu ve daha sonra toplam hacimler distile suyla 600 µl 'ye tamamlandı. Her bir tüpe %24'lük TCA'dan 200 µl ilave edilerek karıştırıldı ve 5 dakika kadar 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra proteinler tüp tabanına çöktüğünden, üstteki sıvı dökülerek, tüpler baş aşağı çevrilerek 1-2 dakika kadar süzgeç kağıdı üzerinde tutuldu. Her tüpe 450 µl "reaktif karışımı" eklenerek karıştırıldı ve daha sonra 2x300 µl Lowry reaktifi C, iki kısım halinde 1-2 dakika zaman aralığıyla ilave edilerek iyice karıştırıldı.

30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra, 750 nm'de 1. tüp sıfır absorbansa ayarlanarak bütün tüpler sırasıyla okundu. Absorbans değerleri, proteine karşılık grafiğe geçirilerek standart grafik elde edildi. Bu işlemlere paralel olarak, uygun miktarlarda numune 2 ayrı tüpe alınarak aynı şekilde çalışıldı ve sonuçlar standart grafikten değerlendirildi.

Deneyde kullanılan reaktif karışımı için: 25 kısım 0,8 N NaOH, 18 kısım Lowry reaktifi A, 2 kısım Lowry reaktifi B ihtiyaç duyulduğu kadar karıştırıldı, bu işlem deneyden hemen önce yapıldı.

### 2.2.2. Laktoperoksidaz Aktivitesi Tayini

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümü, Shindler ve Bardsley yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen prosedür ile yapıldı (Shindler and Bardsley, 1975). Bu yöntem, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlendi. 0,1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek hemen kronometre çalıştırıldı. 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 edilerek, kör olarak enzim çözeltisi yerine

0,1 M pH= 6 fosfat tamponu konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanıldı. Aktivite tayininde aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

$D_f$  = Seyreltme katsayısı

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

Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak ABTS kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20°C'de 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlanır.

### 2.2.3. Keçi Sütünden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

#### 2.2.3.1. Amberlite CG 50 H<sup>+</sup> Reçinesi Kullanılarak Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Bir litre taze keçi sütü önce 2700 rpm'de + 4°C ve 15 dakika 3 kez santrifüj edilerek yağı tamamen uzaklaştırıldı (Kumar and Bhatla 1995). Yağı tamamen alındıktan sonra geri kalan süpernatantlar birleştirilerek bir behere aktarıldı. Zayıf asidik katyon değiştirici Amberlite CG 50 H<sup>+</sup> reçinesinin 22 gramı, 5 mM 200 ml NaCH<sub>3</sub>COO pH= 6,8 tamponunda şişirilerek yağı alınmış süte katıldı. (Dumonte and Rousset 1983, Kumar and Bhatla 1995). Reçine-süt karışımı magnetik karıştırıcı vasıtasıyla + 4°C'de 1 saat karıştırıldı. Reçinenin tamamen çökmesi için, 1/2 saat süreyle dinlenmeye bırakılarak, Üstte kalan süpernatant dekante edildi. Çökelek önce 500 ml destile suyla ve daha sonra 300 ml 20 mM pH= 6,8 NaCH<sub>3</sub>COO çözeltisiyle 280 nm'de absorbans vermeyinceye

kadar yıkanma işlemi yapıldı. Reçineye bağlanmış olan protein çökeleği Buchner hunisine aktarılarak, 200 ml 500mM pH= 6,8 NaCH<sub>3</sub>COO çözeltisiyle elüsyon yapıldı. Elde edilen ham ekstrakta protein tayini ve aktivite ölçümü yapılarak, + 4°C' de buzdolabında saklandı.

### 2.2.3.2. I. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir, bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözülden 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 (Keha ve Küfrevioğlu 2000, Lehninger 1993). Deneyde proteinlerin bu özelliklerinden faydalanıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi için uygun doygunluk noktası önceden tespit edildiği için %90 aralığında çöktürme yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarı şu formülle tespit edildi.

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

V = Süpernatantın hacmi

S<sub>1</sub>= 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>= 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi için, elüsyondan sonra elde edilen ham ekstrakta katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yavaş yavaş porsiyonlar halinde katıldı (0°C de). Her porsiyon ilavesi sırasında daha önce katılan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'lerin çözünmüş olmasına dikkat edildi. Çöktürmeden sonra elde edilen çözelti 12.000 rpm de 5°C'de 1 saat süreyle soğutmalı



santrifüjle santrifüj edilerek oluşan çökelek 25 ml 5mM pH= 6,8 fosfat tamponunun çözünebildiği en az miktarında çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildikten sonra, enzimin içinde bulunduğu tampona (5 mM pH= 6,8 fosfat tamponu ) karşı 1-2 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyalize bırakıldı. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buzdolabı içinde ( 4°C'de ) gerçekleştirildi.

### 2.2.3.3. CM-Sephadex C-50 İyon Değişim Kromatografisi

Bu çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Sephadex C-50 iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir (Özdemir, Aygül ve Küfrevioğlu 2001). Bu amaçla 45-50 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g jel, 100ml destile suya konularak 80-90 °C'de 5 saat süreyle bekletilerek şişirmeye bırakıldı. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml NaOH içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N HCl ile nötralize edildi. Jel materyali havası uzaklaştırılıp 3 cm<sup>2</sup>x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 10 mM pH= 6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponuyla dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 20-30 ml/saat'e ayarlanarak, jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek I. diyalizden elde edilen ham ekstrakt pipet vasıtasıyla dikkatli bir şekilde kolona tatbik edildi. Daha sonra 100 mM NaCl içeren 10 mM pH= 6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine, üsten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin kolonun altından alınan elüatların pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mixerin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml (100 mM NaCl içeren 10 mM pH= 6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) tamponu, bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml (200 mM NaCl içeren 10mM pH= 6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ) tamponu doldurularak, artan iyonik şiddetli lineer gradient elüsyonu uygulandı.

Elüatlar kolon akış hızı 50 ml/saat'e ayarlanarak fraksiyon kollektör yardımı ile 10 ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorbans değerleri köre karşı ölçülerek R<sub>z</sub> değeri (  $R_z = A_{412}/A_{280}$  ) 0,75 den büyük olan tüpler birleştirildi.

Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için *Lowry* metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

#### **2.2.3.4. II. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz**

İyon değişim kolonundan elde edilen birleştirilmiş elüatlar, Bölüm 2.2.3.2' de anlatıldığı gibi, uygun amonyum sülfat doygunluğunda çöktürüldü. Oluşan çökelek 5 mM pH= 6,8 fosfat tamponunun çözünebildiği en az miktarında çözüldü ve sonra diyaliz işlemi yapıldı.

#### **2.2.3.5. Sephadex G–100 Jel Filtrasyon Kromatografisi**

100ml'lik yatak hacmi elde etmek için 5 g Sephadex G-100, 100 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda 5 saat bekletilerek polimer materyal (Sephadex G–100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyal, pH'sı 6,8 olan 0,1 M fosfat tamponuyla dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktararak, aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı (Kumar and Bhatla 1995). Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla altından alınan tamponun pH ve 280 nm de absorbans değerleri belirli zaman aralıklarında ölçülerek, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi.

Dengelenen kolonda jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirilerek, II. diyalizden sonra elde edilen enzim çözeltisinin 5 ml' si kolona tatbik edildi. Tatbik edilen çözelti jele emdirilerek, aynı tamponla elüsyon yapıldı.

Elüatlar kolon akış hızı 50 ml/saat ayarlanarak 10 ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm de absorbans değerleri köre karşı ölçülerek  $R_z$  değeri ( $R_z=A_{412}/A_{280}$ ) 0,75 den büyük olan tüpler birleştirildi.

Birleştirilen elüat çözeltileri ve II. diyalizden sonra kolona tatbik edilen enzim numunesi için *Lowry* metoduyla kantitatif protein tayini ve 412 nm de aktivite tayinleri yapılarak, spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

### 2.2.3.6. III. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Jel filtrasyon kolonundan elde edilen birleştirilmiş elüatlar, Bölüm 2.2.3.2.' de anlatıldığı gibi, katı amonyum sülfatla uygun doygunlukta çöktürüldü. Oluşan çökelek 5 mM pH=6,8 fosfat tamponunun çözünbildiği en az miktarında çözülerek, enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Enzim çözeltisi 0,5 M pH= 6,8 fosfat tamponuna karşı 1-2 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Elde edilen enzim çözeltisinde *Lowry* yöntemiyle protein tayini ve 412 nm' de aktivite tayini yapılarak, spesifik aktivite ve saflaştırma oranları hesaplandı.

### 2.2.3.7. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

LPO enzimi saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan saf karbonik anhidraz ve saf glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimleri kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektrofrez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözünmüş daha sonra 40-50°C'ye getirilmiş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımıyla ilave edildi. Hava olmamasına dikkat edildi. Katılaşmaya kadar yaklaşık yarım saat bekletildi. Katılaştıktan sonra üsteki SDS döküldü. Daha sonra yığılma jeli yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 mg olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu konuldu. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, jeldeki yerine ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan "anot" kablo üstten "katot" kablo yerleştirildi. Önce 80

voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına alındı. Jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi ile dolduruldu ve 1-1,5 saat çalkalandı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli zaman periyotlarında değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğraf çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH= 8,8), 13,2 ml % 30' luk akrilamid - %0,8' lik bisakrilamid, 0,61 ml %10' luk SDS, 0,4 ml %5' lik TEMED (N,N,N'.N'-tetrametil etilendiamin) ve 9,4 ml destile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5' lik amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 1 M'lik Tris-HCl (pH=6,8)' den 1,24 ml, %30' luk akrilamid- %0,8' lik bisakrilamid' den 1 ml, %10' lik SDS' den 0,1 ml, %5' lik TEMED' den 0,1 ml ve sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5' lik PER' den 0,20 ml ilave edildi.

#### **2.2.4. Keçi Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar**

Keçi sütünden saflaştırılan laktoperoksidaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere ABTS için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tayin edildi. Optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri ayrıca çalışıldı.

##### **2.2.4.1. Keçi Sütü LPO Enzimleri İçin $K_m$ 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 substratın stok çözeltilerinden sırasıyla 0,1 ml, 0,5 ml, 0,8 ml, 1,1 ml ve 1,5 ml alındı. Substrat konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 ml'ye tamamlandı.

Daha sonra her bir tüpe 0,1 ml enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katılarak, spektrofometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Her ölçüm 2 defa tekrarlandı. 1/V-1/[S] değerleri bulunarak *Lineweaver-Burk* grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi.

### 2.2.5. Sefotaksim Sodyum'un Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

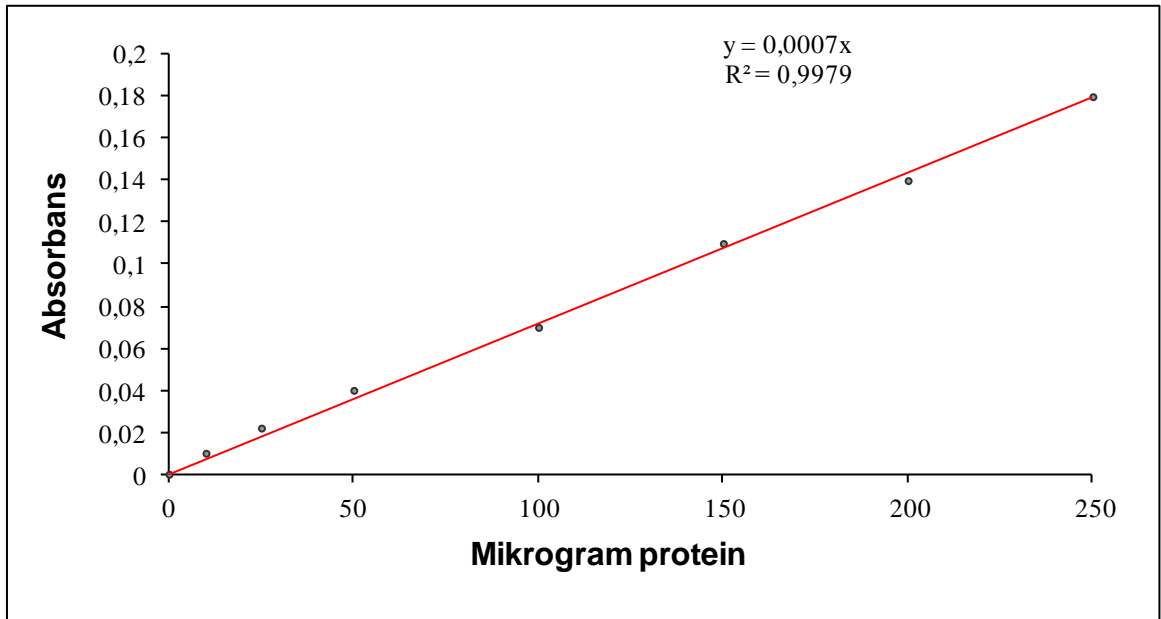
Günümüzde kullanılan suda çözünebilen ilaçlar temin edilerek, saf haldeki LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Kullanılan ilacın ABTS substratına bağlı olarak, I<sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi amacıyla; oda sıcaklığında ve optimum pH'da, doygun olmayan ABTS (26.67x10<sup>-2</sup>mM) ve doygun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10,67x10<sup>-2</sup>) konsantrasyonunda, ortama farklı hacimlerde ilaç ilave edildi. İlaç ilave edilmediği enzim aktivitesi 100 kabul edilerek, % Aktivite- Konsantrasyon grafikleri çizildi.

Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (ABTS) 6 farklı hacimde ilaç ilave edilerek, aktivite değerleri hesaplanarak % Aktivite hesaplandı ve buradan % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu değerleri (I<sub>50</sub>) her bir çalışılacak ilaç için tespit edildi. Daha sonra 5 farklı sabit ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit ilaç konsantrasyonlarında aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu aktivite değerleriyle Lineweaver –Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K<sub>i</sub> değerleri tespit edildi.

## BÖLÜM 3. BULGULAR

### 3.1. Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde lowry yöntemi kullanıldı (Lehninger 1982). Standart grafik, bölüm 2.2.1.2.' de anlatıldığı gibi hazırlandı. ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltilerin mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Lowry Yöntemiyle Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

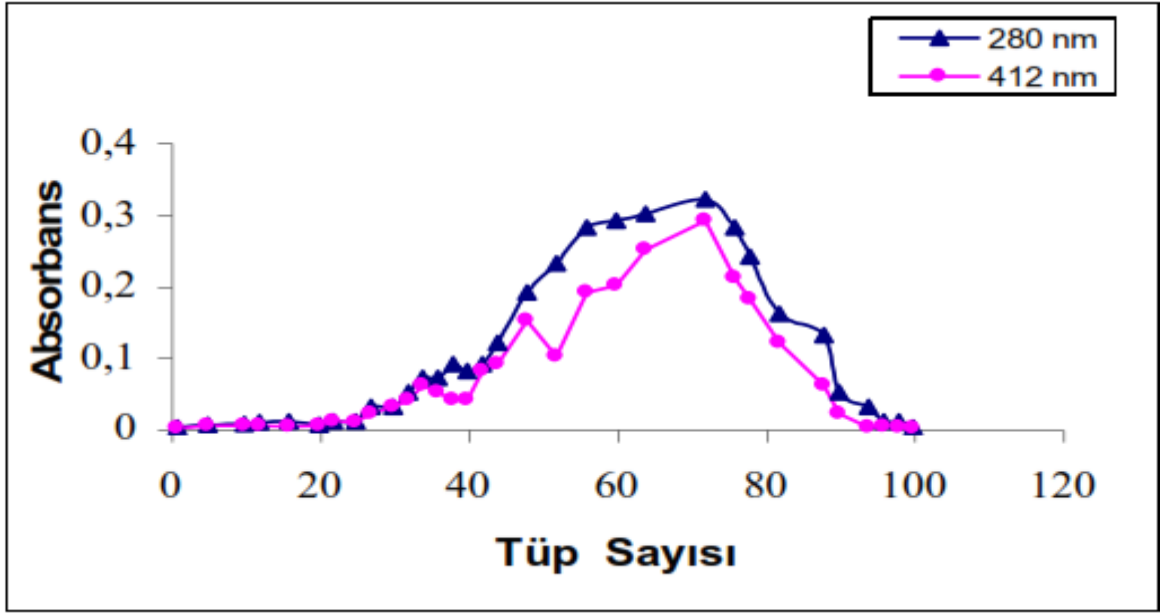
## **3.2. Keçi Sütünden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırma Çalışması Sonuçları**

### **3.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme Sonuçları**

Amonyum sülfat çöktürmesinde uygun doygunluk noktası LPO enzimi için önceden tespit edildiğinden; keçi sütünden elde edilen ham LPO çözeltisine %90 aralığında çöktürme yapıldı. Her çöktürme kademesi için gerekli olan katı amonyum sülfat miktarı bölüm 2.2.3.2.' de anlatıldığı gibi tespit edildi ve her çöktürme kademesindeki çökelekler çözünebildiği en az miktardaki 5 mm fosfat tamponunda (pH= 6,8) çözüldü. Her basamaktaki süpernatant ve çökelek için LPO enzim aktiviteleri, 1 mM ABTS substratıyla bölüm 2.2.2.' de açıklandığı şekilde belirlendi.

### **3.2.2. Laktoperoksidaz Enziminin CM-Sephadex C-50 H<sup>+</sup> İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırma Sonuçları**

Bölüm 2.2.3.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve diyalizlenmiş enzim çözeltileri, pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mixerin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml 100 mM NaCl içeren 10 mM pH=6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu, bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml 200 mM NaCl içeren 10 mM pH=6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu dolduruldu ve lineer gradiyent elüsyona başlandı. Elüatlar kolon akış hızı 50 ml/saat'e ayarlanarak fraksiyon toplayıcı yardımı ile 10 ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm' deki absorbens değerleri ölçülerek Rz değeri ( $R_z = A_{412}/A_{280}$ ) 0,75 den büyük olan tüpler birleştirildi. 280 ve 412 nm de ölçülen absorbens değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 3.2' de verildi.

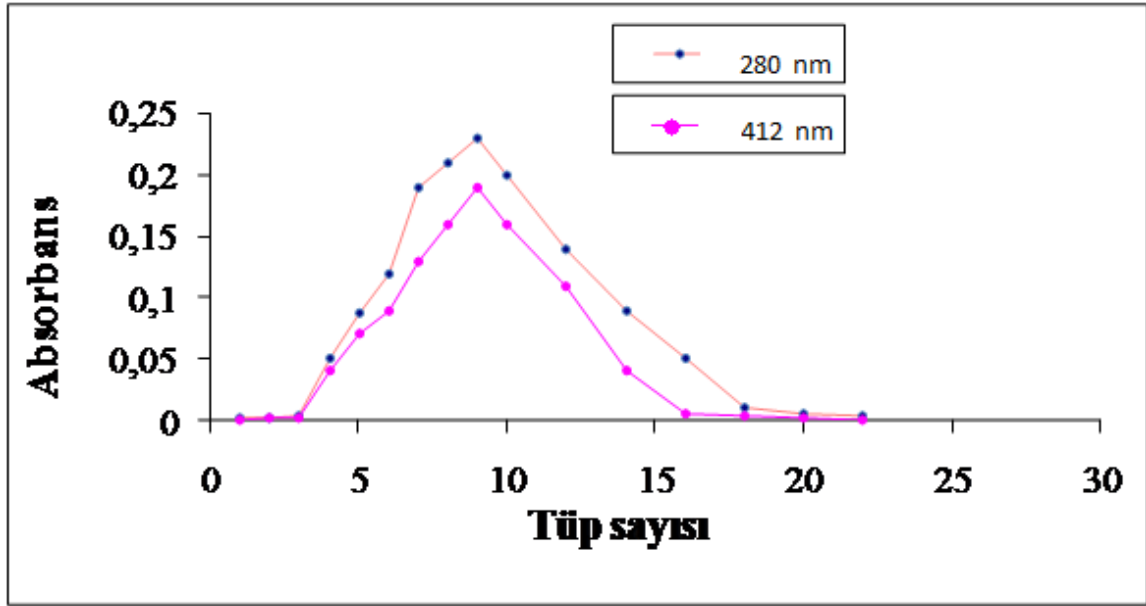


**Şekil 3.2.** Keçi sütü LPO enziminin CM-Sephadex C-50 H<sup>+</sup> iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılması sırasında elüatlarda 280 ve 412 nm de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik

### 3.2.3. Laktoperoksidaz Enziminin Sephadex-G 100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

İyon değişim kromatografisinden elde edilen ve enzim ihtiva eden elüatlar % 90 amonyum sülfat doygunluğuna getirilip 5 mM pH= 6,8 fosfat tamponunda çözüldü. bir gece diyaliz edildikten sonra 5 ml' lik porsiyonlar halinde alınarak, bölüm 2.2.3.5.' de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona tatbik edildi. Kolon akış hızı 50 ml/saat'e ayarlanarak elüatlar 10 ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek  $R_z$  değeri ( $R_z = A_{412}/A_{280}$ ) 0,75' den büyük olan tüpler birleştirildi. 280 ve 412 nm de ölçülen absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 3.3' de verildi.





Şekil 3.3. Keçi sütü LPO enziminin Sephadex-G100 Jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılması sırasında elüatlarında 280 ve 412 nm de elde edilen absorbans değerlerini gösteren grafik

### 3.2.4. LPO Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları

Keçi sütünden laktoperoksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde Shindler ve Bardsley yöntemiyle (Shindler and Bardsley 1975) 412 nm de aktivite tayini ve Lowry yöntemiyle kantitatif protein tayini yapıldı. Sonuçlar tablo 3.1' de gösterildi. Aktivite tayininde 1 enzim ünitesi "20°C'de 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlandı.

**Tablo 3. 1.** Keçi sütü LPO enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

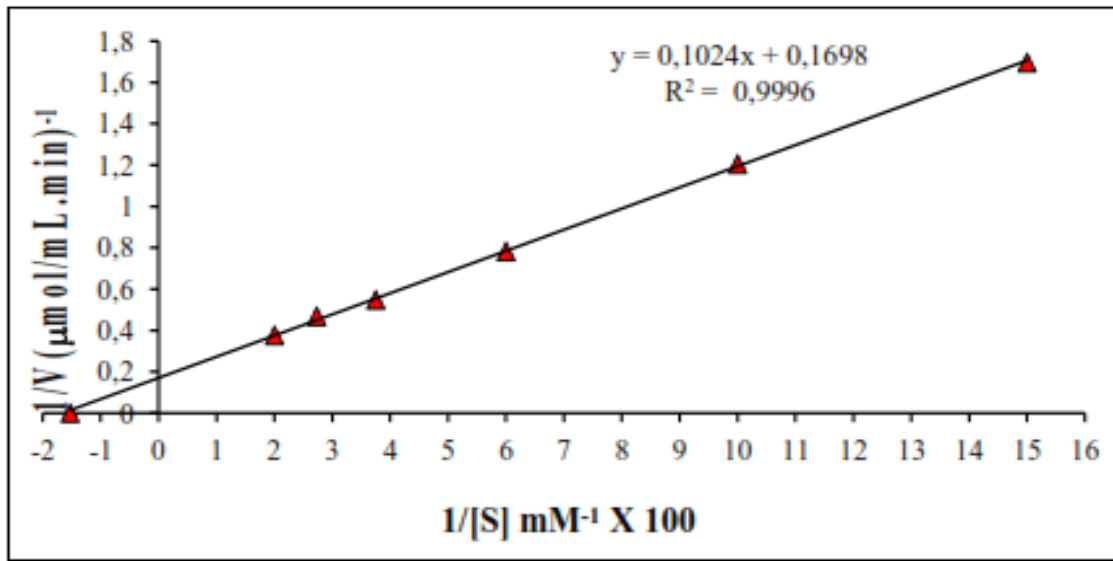
Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	0,76	120	1,40	168	91,2	0,54	100	1,00
I.(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çöktürmesi	3,81	20	1,58	28,6	76,2	2,66	83,5	4,92
İyon Değişim Kromatografi	0,25	240	0,05	13,2	60,0	4,54	65,8	8,40
II.(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çöktürmesi	1,98	20	0,35	7,0	39,6	5,65	43,4	10,46
Jel Filtrasyon Kromatografi	0,25	90	0,04	3,6	22,5	6,25	24,6	11,57
III.(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çöktürmesi ve Diyaliz	0,98	14	0,14	1,9	13,7	7,21	15,0	13,35

### 3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu keçi sütünden saflaştırılan laktoperoksidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapıldı. Bunun için bölüm 2.2.3.7.'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektrofrezine saflaştırılan LPO' lar yerleştirildi. Keçi sütü için standart olarak molekül ağırlığı belli olan enzim markırları kullanılarak enzim saflığı belirlendi.

### 3.3. ABTS Substratı İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışma Sonuçları

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 grafikler Şekil 3.4.'de gösterildi.



Şekil 3.4. Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Tablo 3. 2.** Keçi sütünden elde edilen LPO'nun ABTS substratı ile yapılan kinetik çalışmalarının toplu sonuçları

LPO elde edildiği kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (EU/ml)
Keçi	6,0	50	0,6	5,89

**Tablo 3. 3.** LPO enzimi için ABTS substratıyla inhibitör kullanılmadan elde edilen deney prosedürü ve  $1/V, 1/[S]$  değerleri

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V$ ( $\mu\text{mol/mL.dak}^{-1}$ )	$1/[S]$ $\text{mM}^{-1}$
Inhibitör No	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ml)	Inhibitör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ml)	Inhibitör (ml)	LPO (ml)		
[I] <sub>0</sub>	0.2	2.7	0.1	-	0.2	2.6	0.1	-	0.1	1,69	15
	0.3	2.6	0.1	-	0.3	2.5	0.1	-	0.1	1,20	10
	0.5	2.4	0.1	-	0.5	2.3	0.1	-	0.1	0,78	6
	0.8	2.1	0.1	-	0.8	2.0	0.1	-	0.1	0,55	3.75
	1.1	1.8	0.1	-	1.1	1.7	0.1	-	0.1	0,47	2.73
	1.5	1.4	0.1	-	1.5	1.3	0.1	-	0.1	0,37	2

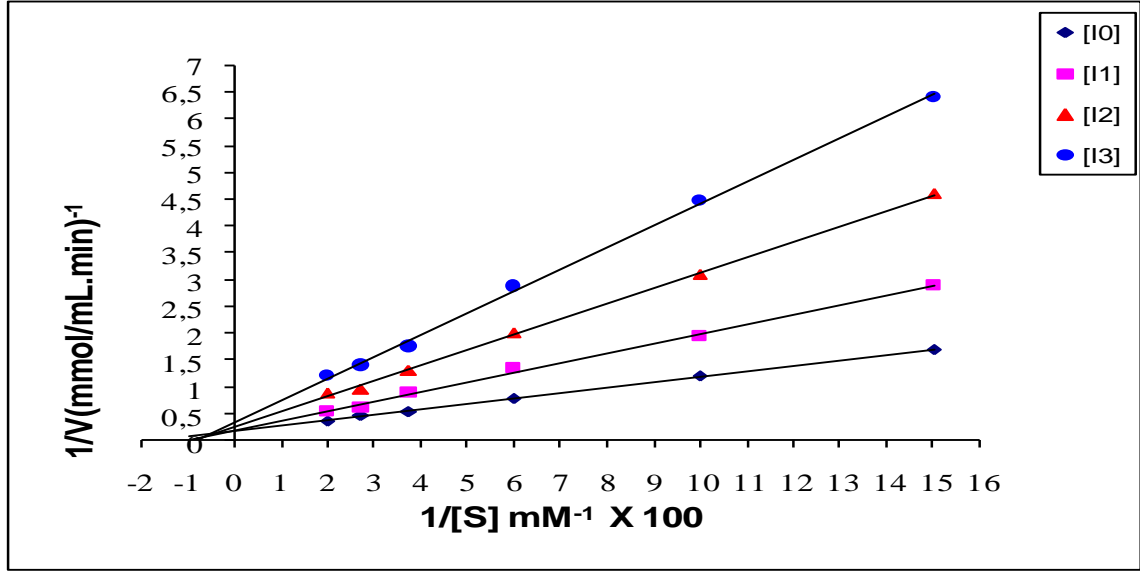
### 3.4. LPO Enzimi Üzerine Sefotaksim Sodyumun İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi

Bu tez kapsamında Sefotak (1g sefotaksim Sodyum), temin edilip keçi sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi test edildi. İlacın LPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gözlemlendi. İlacın inhibisyon tipi,  $K_m$  ve  $V_{Max}$  değerleri ile  $K_i$  ve  $I_{50}$  değerleri tespit edildi. İnhibisyon tipinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; oda sıcaklığı ve optimum pH'da 6 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit ilaç konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Oda sıcaklığında dakikada  $1\mu\text{mol}$  substratı katalizleyen enzim miktarı bulundu. Elde edilen bu aktivite değerleriyle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon değerleri ve  $K_i$  değerleri bulundu.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri Tablo 3.4' de gösterildi. İnhibitörlü çalışmaların aktivite ölçüm değerleri ve deney prosedürleri ise Tablo 3.4–3.7'de gösterildi.

Aktivite değerleri önceden anlatıldığı şekilde belirlendi. (Shindler and Bardsley, 1975)  
Bu grafik Şekil 3.5’de gösterildi. Elde edilen  $K_i$  değerleri ise tartışma kısmında anlatıldı.

**Tablo 3.4.** LPO enzimi için ABTS substratıyla ilaç (Sefotak-1g sefotaksim Sodyum) inhibitörü eşliğinde elde edilen  $1/V, 1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü

İnhibitor No	Kör Tüpü				Numune Tüpü					$1/V$ ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{dak}$ ) <sup>-1</sup>	$1/[S]$ mM <sup>-1</sup>
	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
[I] <sub>1</sub>	0.2	2.6	0.1	0.1	0.2	2.5	0.1	0.1	0.1	2,9	15
	0.3	2.5	0.1	0.1	0.3	2.4	0.1	0.1	0.1	1,95	10
	0.5	2.3	0.1	0.1	0.5	2.2	0.1	0.1	0.1	1,34	6
	0.8	2.0	0.1	0.1	0.8	1.9	0.1	0.1	0.1	0,9	3.75
	1.1	1.7	0.1	0.1	1.1	1.6	0.1	0.1	0.1	0,61	2.73
	1.5	1.3	0.1	0.1	1.5	1.2	0.1	0.1	0.1	0,55	2
[I] <sub>2</sub>	0.2	2.5	0.1	0.2	0.2	2.4	0.1	0.2	0.1	4,6	15
	0.3	2.4	0.1	0.2	0.3	2.3	0.1	0.2	0.1	3,1	10
	0.5	2.2	0.1	0.2	0.5	2.1	0.1	0.2	0.1	2,02	6
	0.8	1.9	0.1	0.2	0.8	1.8	0.1	0.2	0.1	1,32	3.75
	1.1	1.6	0.1	0.2	1.1	1.5	0.1	0.2	0.1	0,96	2.73
	1.5	1.2	0.1	0.2	1.5	1.1	0.1	0.2	0.1	0,9	2
[I] <sub>3</sub>	0.2	2.4	0.1	0.3	0.2	2.3	0.1	0.3	0.1	6,4	15
	0.3	2.3	0.1	0.3	0.3	2.2	0.1	0.3	0.1	4,48	10
	0.5	2.1	0.1	0.3	0.5	2.0	0.1	0.3	0.1	2,87	6
	0.8	1.8	0.1	0.3	0.8	1.7	0.1	0.3	0.1	1,75	3.75
	1.1	1.5	0.1	0.3	1.1	1.4	0.1	0.3	0.1	1,4	2.73
	1.5	1.1	0.1	0.3	1.5	1.0	0.1	0.3	0.1	1,2	2



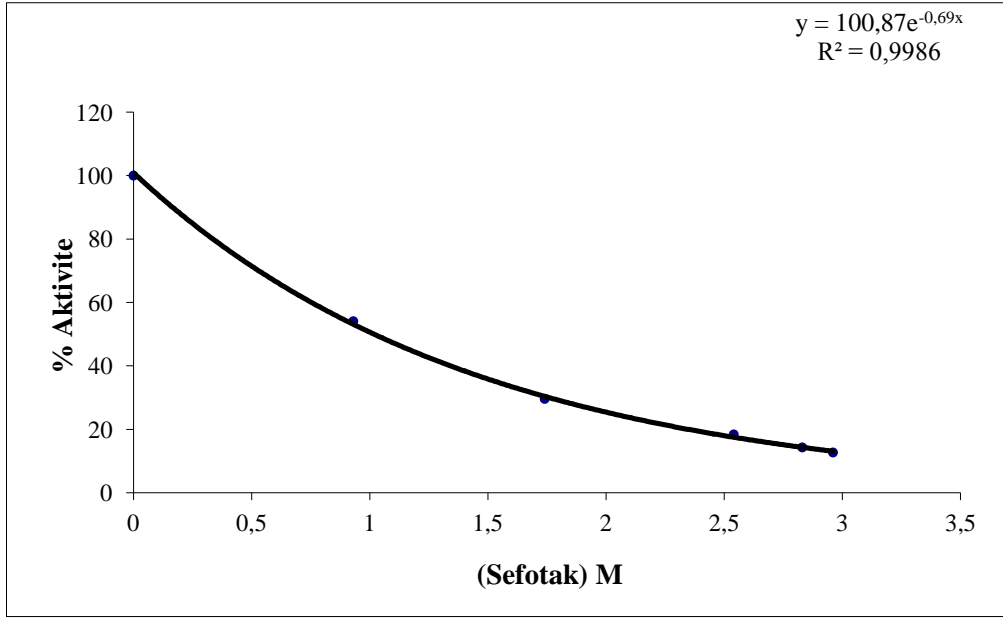
Şekil 3. 5. LPO enzimi için ABTS substratıyla ilaç (Sefotak-1g sefotaksim Sodyum) inhibitörü eşliğinde elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri ([I<sub>1</sub>]= 0,017 M, [I<sub>2</sub>]= 0,034 M, [I<sub>3</sub>]= 0,051 M, [I<sub>0</sub>]= kontrol

### 3.5. Keçi Sütü LPO'su ile ABTS Substratı İçin Sefotaksim Sodyum İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi (% Aktivite)

Bu çalışma için suda çözünebilir antibiyotik temin edilerek keçi sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine etkisi incelendi. ABTS substratı için Sefotak (1g sefotaksim Sodyum), ile yapılan kinetik çalışmada elde edilen  $1/V-1/[S]$  değerleri ve  $K_i$  değerleri bulundu.

Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda ABTS ( $26.67 \times 10^{-2}$  mM) ve  $H_2O_2$  ( $10.67 \times 10^{-2}$  mM) farklı konsantrasyonlarda 1g sefotaksim Sodyum, ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Bunun için  $H_2O_2$  konsantrasyonu doyumluğun üzerinde alınırken ABTS substrat konsantrasyonu doyumluğun altında alındı. Böylece reaksiyon hızı ABTS'ye bağlı olarak bulundu.

Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü tablo 3.5.'de gösterildi ve % aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulundu. Bu grafik Şekil 3.6'de gösterildi. Elde edilen  $I_{50}$  değerleri ise tartışma ve sonuç kısmında belirtildi.



**Şekil 3. 6.** Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla ve Sefotaksim Sodyum ile elde edilen % aktivite-konsantrasyon grafiği

## BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

LPO enziminin kromatografik işlemler sonucu saflaştırılmasında, başlangıçta yağı tamamen alınan süt içerisine, zayıf asidik katyon değiştirici olan Amberlit CG 50 H<sup>+</sup> katılarak kısmi bir saflaştırma yapıldı (Doumonted and Rousset 1983). LPO enzimi reçineye bağlanarak süt içerisindeki diğer bazı safsızlıklar uzaklaştırıldı. Daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi için en uygun doygunluk noktası % 90 olduğundan bu doygunlukta enzim çöktürüldükten sonra 5 mM fosfat tamponu (pH= 6,8) içine alınan enzim çözeltisi aynı tampona karşı diyaliz edildi.

**Tablo 4. 1.** Keçi sütünden elde edilen LPO üzerine Sefotaksim Sodyumun inhibisyon etkisini bulmak için ABTS substratıyla yapılan deney prosedürü ve sonuçları

İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] M
	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	İnhibitör (ml)	ABTS (ml)	Fosfat Tamp. (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	İnhibitör (ml)	LPO (ml)		
Sefotak	0.8	2.1	0.1	-	0.8	2.0	0.1		0.1	100	0
	0.8	1.9	0.1	0.2	0.8	1.8	0.1	0.2	0.1	54,1	0.93
	0.8	1.8	0.1	0.3	0.8	1.7	0.1	0.3	0.1	29,6	1.74
	0.8	1.6	0.1	0.5	0.8	1.5	0.1	0.5	0.1	18.4	2.54
	0.8	1.3	0.1	0.8	0.8	1.2	0.1	0.8	0.1	14.3	2.83
	0.8	1.2	0.1	0.9	0.8	1.1	0.1	0.9	0.1	12.7	2.96



Daha sonra sırayla CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi, % 0-90 doygunlukta II. amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi, % 0-90 doygunlukta III. amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 3.1’de gösterilmiştir. Enzim saflığının kontrolünü yapmak için SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Sonuçta keçi sütü LPO enziminin moleköl ağırlığı 80-85 kdal olduğu bulunmuştur.

Kromatografik işlemler sonucu elüatlardan saf halde elde edilen LPO (Laktoperoksidaz) 280 nm ve 412 nm’deki absorbens değerleri ölçülerek  $R_z = A_{412}/A_{280}$  oranı belirlendi.  $R_z$  değeri 0,75’den büyük olan elüatlar birleştirildi. 280 nm absorbens ölçümünde esas; proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (*fenilalanin, tirozin, triptofan*) 280 nm dalga boyunda UV ışınlarını absorblaması esasına dayanmaktadır. 412 nm’de ise LPO enziminin hem grubunun söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblaması esasına dayanır. Bu prensip LPO enziminin saflaştırılması çalışmalarında sıklıkla araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Shindler and Bardsley 1975, Doumonted and Rousset 1983, Jacob *et al.* 1998).

Kantitatif protein tayinleri, *Lowry* yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem; Folin reaktifinin aromatik amino asitlerle indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Başlangıçta alkali ortamda bir Cu-protein kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks fosfomolibdat ve fosfowolframat (Folin reaktifi)’ni indirger ve koyu mavi renk meydana gelir. 578 nm, 660 nm veya 750 nm’de ölçüm yapılabilir. Bu yöntem kantitatif protein tayinlerinde birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır ve bugüne kadar en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-200µg arasındadır. Saflaştırılan LPO enziminin kantitatif miktarını bulmak amacıyla *Lowry* yöntemiyle hazırlanan standart eğri gösterilmektedir (Şekil 3.1). Bu eğri mikrogram proteine karşı absorbensler ölçülerek hazırlandı. Her seferinde standard çalışması gerektiren bir metod olması bakımından, saflaştırma basamaklarındaki enzim numuneleri saklanarak hepsine birden bakıldı.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği

absorbans artışının 412 nm’de izlenmesi esasına dayanır. Saflaştırılan LPO enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni; Literatürde enzimin bilinen en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının verilmesidir ( $\epsilon_{412nm} = 32400M^{-1} cm^{-1}$ ). Enzim aktivite ölçüm sonuçları 1 enzim ünitesi; “20°C’de 1 dakikada 1  $\mu$ mol ABTS’nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı” olarak tanımlandı.

Tablo 3.1 keçi sütü LPO enziminin saflaştırma basamaklarını göstermektedir. Toplam 6 adet saflaştırma basamağı uygulanmıştır. Saflaştırma işlemlerinin sonunda spesifik aktivite ölçümü 0,54 EÜ/mg değerinden 7,21 EÜ/mg değerine yükselmiştir. Bu durumda enzim 13,35 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 15 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda başlangıçta 1litre süt kullanılmış ve saflaştırma sonunda 1,9 mg LPO ( $R_z = 0,75$ ) elde edilmiştir. Literatürde ise 1litre keçi sütünden 0,7 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz saf LPO miktarı literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Optimum pH ve 20 °C’da ABTS substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek üzere, enzim için en az beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen  $1/V-1/[S]$  değerleri yardımıyla *Lineweaver-Burk* grafiği çizilerek (Şekil 3.4),  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. ABTS substratı için  $V_{max}$  değeri; 5,89 EU/ml,  $K_m$  ; 0,6 olarak tesbit edildi.

Keçi sütünden elde edilen LPO enzimi için yapılan kinetik çalışmada 6 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit ilaç konsantrasyonunda spektrofotometrik olarak aktivite ölçümü yapıldı. *Lineweaver-Burk* grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Sefotak (1g Sefotaksim Sodyum), için inhibisyon çeşiti ve  $K_i$  değeri bulundu. Elde edilen  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri yardımıyla *Lineweaver-Burk* grafikleri çizilerek (Şekil 3.5)  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Sonuçlar tablo 3.3-3.4’de verildi.

Bu değerlere göre Sefotak (1g Sefotaksim Sodyum), yarışmalı inhibisyon etkisi göstermektedir.  $K_i$  değeri ise 0,015 M’dir.

ABTS substratı için Sefotak (1g Sefotaksim Sodyum),  $V_{max}$  değeri ; 5.89 EU/ml,  $K_m$  değeri ise yaklaşık 2 bulunmuştur. Keçi sütünden saflaştırılan LPO enzimi için inhibitörden elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri aşağıda özetlenmiştir.

**Tablo 4. 2.** Keçi sütü LPO'sunun üç farklı ilaç konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_i$ ,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri

İlaç	[İlaç] M	$K_i$ değeri (M)	Ortalama $K_i$ (M)	İnhibisyon Şekli	$K_m$	$V_{max}$
	0,1	0,012			1,4	5,89
Sefotak	0,2	0,014	0,015	Yarışmalı	2,0	5,89
	0,3	0.02			2,13	5,89

Keçi sütünden elde edilen LPO enzimiyle yapılan inhibisyon çalışması sonucunda, Sefotak (1g sefotaksim sodyum), enzimi inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin bu ilaç için yarışmalı olduğu tespit edildi.

ABTS substratı için Sefotak (1g sefotaksim sodyum), ile yapılan kinetik çalışmada elde edilen değerlerle % aktivite- konsantrasyon grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değeri bulundu. Bu grafik Şekil 3.6'da gösterildi. Bu sonuca göre  $I_{50}$  değeri sefotaksim sodyum için 0,93 M dır.

Çalışması yapılan LPO enziminin keçi sütünden saflaştırılması, literatürlerde fazla yer almamaktadır. LPO enzim aktivitesi farklı cinslerde değişiklik göstermesi nedeniyle bu çalışma yapıldı. Non-immun biyolojik savunma sisteminden sorumlu olması, bazı bakteriyel hastalıklarda antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması, literatür çalışmalarında da antibakteriyel, antifungal, antiviral etkilerinin gözlenmesi nedeniyle antibiyotikle inhibisyon çalışması yapıldı. Özellikle antibiyotikler yan etkileri fazla olduğundan sürekli kullanılmamalıdır. Kullanımı sınırlandırılmadığı zaman immun sistemde doğal bağışıklığın zayıflamasına neden olduğu klinik araştırmalar neticesinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda Sefotaksim sodyumun enzimimizi inhibe ettiği tespit edildiğinden LPO ile ilgili çalışmaların daha geniş yelpazede araştırılması gerekmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

AHRNE, L., AND BJORCK, L.,1985, .Effects of the lactoperoxidase system on lipoprotein lipase activity and lipolysis in milk.J Dairy Res .52(4)513.

AMORNKUL, Y. AND D.R. HENNING, 2007.Utilization of Microfiltration or Lactoperoxidase system or Both for Manufacture of Cheddar Cheese from Raw milk. J. Dairy. Sci., 90: 4988-5000.

BARRETT, N.E., GRENDISON, A.S., LEWIS, M..J., 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. J. Dairy, 66(1), 73-75.

BAYSE, G.S., MICHAELIS, A.W. AND MORISSON ,M, 1972. Lactoperoxidase catalyzed iodination of tyrosine peptides. Biochim. Biophys Acta, 30, 284.

BJÖRCK. 1979 L., O.CLAESSON AND W. SCHULTHESS,1979. The Lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. Milchwissenschaft, 34: 726-729.

BİNGÖL, G., 1983.Biyokimya.Güven Matbaası, Ankara, s.285.

DANIEL R., RAO, L.D., AND MONA, I.C., 1997, Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Anal. Biochem. 250 , 10.

DOERGE D.R.,1986 Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitro genens ,Biochemistry 16,4724.

DOUMONTED, C. AND ROUSSET B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. J. Biological Chem. 258, 14166.-14172.

ELEGAMY, E., RUPPANNER, R., İSMAIL, A., CHAMPAGNE, C.P., ASSAL, R., 1992. J. Dairy. Res. 59, 169-175.

FONTEH, F.A., A.S. GRANDISON AND M.J. LEWIS, 2002 Variations of Lactoperoxidase Activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. J. Dairy Res., 69: 401-409

FRIC,F.,1976,oxidativeEnzymes.In pirson, A. and Zimmerman, M.H.(Ed).Encyclopedia of plant physiology, 4,6 17 New York.

- GOBBETTI, M., MINERVINI, F., RIZZELLO, C.G., 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 173-188
- HADDAIN, M. S., İBRAHİM, S. A., ROBINSON, R. K. *FOOD. CONTR.* 1996. 7, 149-152.
- HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.*, 1992, 6, 2675-2683.
- HOOGENDORN, J.P., PIESSENS, W. SCHOLTES AND A. STODDARD, 1977. Hypothiocyanite ion: The inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Res.* 11:77-84.
- HUBER RE, EDWARDS LA CORNE TJ. 1989. Studies on the mechanism of the iodination of tyrosine by lactoperoxidase. *J Biol chem.* 264(3),1381.
- HUSSAIN, S., SLIKKER, W., ALI, S. F. Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different region of Mouse brain, *Int.J. Devl. Neuroscience*, 1995, 13, 811-817.
- JACOB, B.M, MONOJ N.K., AND HARIDAS, M., 1998, Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology* , 31, 808.
- KANOFSKY JR. 1988 Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *J Biol chem* 263 (28)14171.
- KEHA, E.E., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2000. *Biyokimya. Aktif yayınevi. İstanbul*, 344-345.
- KUMAR, R., BHATLA, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Cryst.* 51, 1094-1096.
- KUSSENDRAGER, K.D. AND VAN HOOIJDONK, A.C., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties Occurrence mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84, Suppl. 1, 59-68.
- LAEMMLI, D.K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227, 680.
- LANGBAKK, B., FLATMARK, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, vol; 259, page; 627-631
- LEFKOWITZ, D.L., HSIEH, T.C., MILLS, K., AND CASTRO, a. 1990. Induction of tumor necrosis factor and cytotoxicity by macrophages exposed to lactoperoxidase and microperoxidase. *Life Sci.* 47, 703-709
- LEHINGER, A.L., 1982, *Principles of Biochemistry.* Worth publishers, inc., NewYork., 64.

MARCOZZI, G., DIDOMENICO, C SPERTI N., 1998 .Effects of Surfactans on the stabilization of the bovine lactoperoxidase activity. *Bioltechnolprog.*, 4, 653.

METODIEWA, D., RESZKA, K., AND DUNFURD H.B., 1989. Oxidation of the substituted catechols dihydroxyphenylalanine methyl ester and trihydroxyphenylalanine by lactoperoxidase and its compounds. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 274, 601.

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.

NAIDU, A.S., 2000 lactoperoxidase. In A.S. Naidu (ed.), *Natural food antimicrobial systems*. pp: 103-132. Boca Raton, FL: CRC Press.

ÖZDEMİR, H., AYGÜL, İ., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2001, Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties, *Prep Biochem and Biotech.* 31(2), 125-134.

PARICIO M.A, PERALTA L.M,GARCIA H.S 1986. Potentiazilation of the lactoperoxidase system for preservation of raw milk in the tropics. *Arclatinoam Nutr.*36 (4),725.

PARK, Y.W., HAENLEIN, G.F.W., 2006. Goat milk, its products and nutrition. In: Hui, Y.H., *Handbook of food products manufacturing*. John Wiley, New York N.Y.

PAUL, K.G., OHLSSON, P.I. 1985 In *The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance*; Prull, K.M., Otenovue. J., Eds. 15-29.

PELLEGRINI, A., 2003. Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1225-1238.

PRINCE, A. AND A.J. RATNER, 2000. Lactoperoxidase. *Am. J. Respir Cell Mol., Biol.*, 22: 642-644.

PRUITT, K.M., TENOVUO, J.O., ANDREWS, R.W., AND MCKANE, T. 1982. Lactoperoxidase catalysed oxidation of thiocyanate: Polarographic study of the oxidation products. *Biochemistry*, 21, 562-567.

PÜTTER, J. AND BECKER, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*. Bergmeyer, third edition, VCH. New York, 286.

RAE T.D.GOFF HM. 1998. The heme prosthetic group of lactoperoxidase Structural characteristic of heme 1 and heme1- peptides. *J.BiolChem.* 273 (43),27968.

RANKIN, S.A., CHRISTIANSEN, A., LEE, W., BANAVARA, D.S., LOPEZ-HERNANDEZ, A. 2010 Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J. Dairy Sci.* 93, 5538-5551.

RAVANIS, S. AND LEWIS, M.J. 1995. Observations on the effects of raw milk quality on the keeping quality of pasteurised milk. *Letters in applied microbiology*. 20, 164-167.

REITER, B. AND G. HARNULV, 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Protec.*, 47: 724-732.

ROBERT. K. M , PETTER A. M. , DARLY, K.G., AND VICTOR, W.R., 1993, Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 141.

SERMON, J., K. VANOIRBEEK, P. DE SPIEGELEER, R. VAN HOUTT, A. AERTSEN AND C.W. MICHIELS, 2005. Unique stress response to the Lactoperoxidase-thiocante enzyme system in *E. Coli Res.* *Microbiol.* 156: 225-232.

SHIN, K., H. HAYASAWA, AND B. LONNERDAL. 2001. Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by the Lactoperoxidase hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system. *J. Appl. Microbiol.* 90: 489-493.

SIEVERS, G., 1980, Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 624(1)249.

SISECIOGLU, M., CANKAYA, M., GULCIN, I, OZDEMIR, H. 2010. Interactions of melatonin and serotonin to Lactoperoxidase enzyme. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*

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., 1980, Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 624(1)249.

STANISLAWSKI, M., ROUSSEAU, V., GOAVEC, M., AND ITO, H. 1989. Immunotoxins containing glucose oxidase and lactoperoxidase with tumoricidal properties: In vitro killing effectiveness in a mouse plasmacytoma cell model. *Cancer Res* 15, 5497-5504.

THOMAS, E.L., P.M. BOZEMAN, AND D.B. LEARN. 1991. Lactoperoxidase: structure and catalytic properties. *In Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol.II. Everse, K.E. Everse, and M.B. Grisham, editors. CRC Press. Boca Raton, FL. 123-142.

TOUCH, V., S. HAYAKAWA, S. YAMADA AND S. KANEKO, 2004. Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. *Int. J. Food microb.*, 93: 175-183.

VAN HUYSTEE, R.B., 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38, 205.

VILKKI, P AND E. PIIRONEN, 1962. Studies on the goitrogenic influence of cow's milk on man. *Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A. II. Chem.*, 110:3-14.

WIT, DE J.N. AND A.C.M. VAN HOOYDONK, 1996. Structure functions and applications of Lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. Netherlands Milk and Dairy J., 50: 227-244.

WOLFSON, L.M. AND S.A SUMMER, 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review . J. Food Prot., 56: 887-892.

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.



## **ÖZGEÇMİŞ**

Mehmet Muhsin EROL 1985 yılında Muş'un Bulanık ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bitlis'te tamamladıktan sonra, 2004 – 2008 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2008-2009 yılında Bitlis'in Tatvan ilçesinde bir ilköğretim okulunda öğretmenlik yaptı. 2009-2010 eğitim öğretim yılında Diyarbakır'da özel bir dershanede öğretmenlik yaptı. 2010-2011, 2011-2012 ve 2012 – 2013 eğitim öğretim yıllarında Bitlis'in Tatvan ilçesinde özel bir eğitim kurumunda öğretmenlik yaptı. 2010 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. Halen Bitlis'in Tatvan ilçesinde bir özel eğitim merkezinde öğretmenlik görevini sürdürmektedir.