

**KEÇİ VE MANDA SÜTÜ LAKTOPEROKSİDAZ
ENZİMİNİN BAZI SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ
KULLANILARAK AFİNİTE TEKNİĞİ
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Songül BAYRAK

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2015
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KEÇİ VE MANDA SÜTÜ LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
BAZI SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK
AFİNİTE TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Songül BAYRAK

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her Hakkı Saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**KEÇİ VE MANDA SÜTÜ LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI
SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE TEKNİĞİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Songül BAYRAK tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30/07/2015 tarih ve 30/1032 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 114Z038

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEÇİ VE MANDA SÜTÜ LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI SÜLFANİLAMİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Songül BAYRAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Laktoperoksidaz (LPO) enziminin inhibitörleri olan 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalinsülfonamid, 4-amino-3-metil sülfonamid, 3-amino-4-kloro benzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid, 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid molekülleri enzimin saflaştırılmasında afinite kromatografisi ligandı olarak kullanıldı. Ligand moleküller ile CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelleri sentezlendi. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin afinite kolonundan keçi sütü LPO enzimi %35,24 verimle 417,7 kat saflaştırılırken manda sütü LPO enzimi %20,34 verimle 151,86 kat saflaştırıldı. 5-amino-1-naftalin sülfonamid kolonundan ise keçi sütü %5,45 verimle 350,18 kat saflaştırılırken, manda sütü %3,48 verimle 388,80 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant bulundu (80 kDa). 5-amino-1-naftalin sülfonamid kolonundan saflaştırılan keçi sütü LPO için optimum pH: 5,5, optimum sıcaklık 70°C, K_m değeri 1,44 mM ve V_{max} değeri 0,09 EÜ/mL iken manda sütü LPO için optimum pH: 5,5, optimum sıcaklık 70°C, K_m değeri 0,08 mM ve V_{max} değeri 0,52 EÜ/mL olarak tespit edildi. 5-amino-1-naftalin sülfonamid kolunu için LPO'nun bağlanma kapasitesi 10°C'de pH:8,5 ve 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 0,05 mg/g jel olarak belirlendi.

2015, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktoperoksidaz, Enzim saflaştırma, Sülfanilamid türevleri, Afinite kromatografisi

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE ENZYME FROM GOAT AND BUFFALO MILK BY USING AFFINITY TECHNIQUE

Songül BAYRAK

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

Molecules which were 2-chloro-4-sulfamoylaniline, 5-amino-1-naphthalenesulfonamide, 3-amino-4-chlorobenzenesulfanilamide, 4-amino-3-methyl benzenesulfanilamide, 4-amino-6-chloro-1,3-benzenedisulfanilamide, 3,4-diamino-benzenesulfonamide, 6-aminopyridine-3-sulfonamide and 4'-amino [1,1'-biphenyl]-4-sulfonamide inhibitors of the Lactoperoxidase (LPO) enzyme using as affinity chromatography ligands for purification of enzyme. CNBr activated Sepharose 4B-L-tyrosine affinity columns were synthesized with these ligand molecules. As a result of purification steps through a column of 2-chloro-4-sulfamoylaniline LPO enzyme from goat and buffalo milk was purified respectively 417.7 fold with a yield of 35.24% and 151.86 fold with a yield of 20.34%. Using with 5-amino-1-naphthalenesulfonamide column goat and buffalo milk LPO enzyme was purified respectively 350.18 fold with a yield of 5.45% and 388.80 fold with a yield of 3.48%. The purities of the purified enzymes were checked by SDS-PAGE and one band was found (80 kDa). Goat milk LPO that purified by 5-amino-1-naphthalenesulfonamide column, optimum pH: 5.5, optimum temperature 70°C, K_m value 1.44 mM and V_{max} value 0.09 EU/mL while for buffalo milk LPO optimum pH: 5.5, optimum temperature 70°C, K_m value 0.08 mM and V_{max} value 0.52 EU/mL were determined. Binding capacity of LPO by 5-amino-1-naphthalenesulfonamide column was determined 0.05 mg/g gel at 10°C pH: 8.5 and at a concentration of 0.35 M ionic strength.

2015, 60 pages

Keywords: Lactoperoxidase, Enzymes purification, Sulfanilamide derivatives, Affinity chromatography

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU'na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLUNA,

Biyokimya çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL'a, Sayın Yeliz DEMİR'e, ayrıca Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı eşim Çetin BAYRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmaları (114Z038) nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a da teşekkür ederim.

Songül BAYRAK

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktoperoksidaz	2
1.2. Afinite Kromatografisi	5
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Çalışmanın Amacı	9
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	10
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	10
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	11
3.2. Yöntemler	14
3.2.1. Protein tayini	14
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	14
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	15
3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite tayini	15
3.3. Manda ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Basamakları	17
3.3.1. Amberlite CG 50 H ⁺ reçinesi kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması	17
3.3.2. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi	17
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	19
3.3.3.a. Sülfanilamid türevleri-Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması. 19	
3.3.3.b. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-tirozin takılması.....	19
3.3.3.c. Sülfanilamid türevlerinin kenetlendirilmesi	20

3.3.3.d. Afinite kolonunun paketlenmesi	22
3.3.3.e. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	22
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi	22
3.5. Manda ve Keçi Sütlerinden Saflaştırılan LPO Enzimleri için Kinetik Çalışmalar.....	24
3.5.1. Optimum pH çalışmaları	24
3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması	24
3.5.3. Stabil pH çalışmaları	24
3.5.4. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	25
3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması	25
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	25
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	26
3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	27
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	27
4.2. 5-amino-1-naftalinsülfonamid ile Saflaştırılan LPO Enzimi İçin ABTS Substratı ile Bulunan Kinetik Parametreler.....	38
4.2.1. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği	38
4.2.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	39
4.2.3. Stabil pH çalışması.....	41
4.3. Memeli Sütleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar	42
4.4. Saflaştırılan LPO Enzimlerinin SDS-PAGE Gümüş Boyama Sonuçları.....	43
4.4.1. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi sütü LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları	43
4.4.2. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan manda sütü LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları.....	44
4.4.3. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan keçi sütü LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları.....	45
4.5. Sığır Sütünden 5-amino-1-naftalinsülfonamid Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	45
4.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	46

4.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	46
4.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
E.C.	: Enzim komisyon
E.Ü.	: Enzim ünitesi
LPO	: Laktoperoksidaz enzimi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
POD	: Peroksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
Litre	: L

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.....	4
Şekil 1.2. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü.....	4
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	19
Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline sülfanilamid türevlerinin kenetlendirilmesi	21
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	27
Şekil 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3,4-diamino-benzensülfonilamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	29
Şekil 4.3. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3,4-diaminobenzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	30
Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 6-aminopiridin-3-sülfonilamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	31
Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 6-aminopiridin-3-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	32
Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak grafiği 4^1 -amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonilamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon	33
Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4^1 -amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	34
Şekil 4.8. Manda ve keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği	38
Şekil 4.9. Manda ve keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	39
Şekil 4.10. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	40

Şekil 4.11. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	40
Şekil 4.12. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak manda sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	41
Şekil 4.13. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	41
Şekil 4.14. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı.....	43
Şekil 4.15. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan manda LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı	44
Şekil 4.16. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan keçi LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı	45
Şekil 4.17. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği	46
Şekil 4.18. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin pH-kapasite grafiği ...	47
Şekil 4.19. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin iyonik şiddet $[M]$ -kapasite grafiği	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	6
Çizelge 3.1. Diazonyum tuzu oluşturabilen sülfanilamid türevleri	18
Çizelge 4.1. 3,4-diamino-benzensülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	28
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 3,4-diaminobenzensülfanilamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	29
Çizelge 4.3. 6-aminopiridin-3-sülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	30
Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 6-aminopiridin-3-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	31
Çizelge 4.5. 4 ¹ -amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonilamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	32
Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS [4 ¹ –amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid] eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	33
Çizelge 4.7. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları.....	35
Çizelge 4.8. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin ile hazırlanan afinite jelinden keçi ve manda LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	35
Çizelge 4.9. 5-amino-1-naftalinsülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden keçi ve manda LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	36
Çizelge 4.10. 4-amino-3-metil-benzensülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	36
Çizelge 4.11. 3-amino-4-klorobenzensülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	37

Çizelge 4.12. 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	37
Çizelge 4.13. Keçi ve manda sütü LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları	42
Çizelge 4.14. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi sütü LPO enzimi için toplu kinetik sonuçlar	42
Çizelge 5.1. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları	55

1. GİRİŞ

Canlı sistemler için gerekli olan ve özgün katalizörler olarak adlandırılan enzimler, tepkimelerin çok hızlı gerçekleştiği özel bir çevre sağlayarak enerjinin bir formdan diğer bir forma dönüşümünü sağlarlar (Berg *et al.* 2014). Hemen hemen her biyokimyasal tepkime bir enzim tarafından katalizlenir (Lehninger 2005).

Oksidoredüktaz enzim grubundan olan peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7) prokaryotlarda, ökaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunan enzimlerdir. Bu enzimler mayalarda, mantarlarda, yüksek bitkilerde, bakterilerde, turp türlerinde ve sütte bulunmakta olup biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Fric 1976; Van Huystee 1987). Memeli POD enzimleri sütte, tükürük ve gözyaşında laktoperoksidaz olarak (Kumar and Bhatla 1995), lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde ve dalakta miyeloperoksidaz, uterus, akciğer duvarları, sitoplazma ve mitokondrilerde glutatyon peroksidaz olarak bulunmaktadır (Pütter and Becker 1987).

Peroksidazlar antioksidan enzimlerdir ve prostetik gruplarının ilki protohemdir. Bu da birçok hemoproteinin tersine olarak apoproteine sadece gevşek şekilde bağlıdır (Doumonted and Rousset 1983). Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda H₂O₂, Oksitleyici özelliğe sahiptir ortamdan hemen uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir (Haliwell 1989; Robert *et al.* 1993).

Prostetik grup olarak peptid zinciri üzerinde glikozid yan zincirleri bulundururlar. Peroksidaz izoenzimlerinin çoğu moleküler ağırlıklarının %15-17'si kadar karbohidrat içerirler (Van Huystee 1987). Hem grubu ve glikozidik grupları ile birlikte kalsiyum (Ca²⁺) iyonu da içerirler, bu iyon peroksidaz salınımı ve yapısal devamlılığı için gereklidir (Fric 1976; Van Huystee 1987).

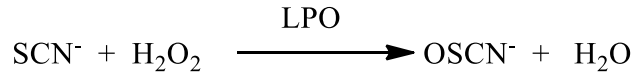
1.1. Laktoperoksidaz

İnsan ve hayvan sütünün normal bir bileşeni olan laktoperoksidaz (LPO) (E.C.1.11.1.7) sütte, tükürükte ve gözyaşında gibi biyolojik sıvılarda bulunan yeni doğanların bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini koruyan önemli bir oksidoredüktazdır (Kumar and Bhatla 1995).

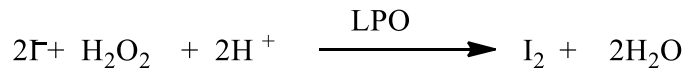
Tiyosiyanatın hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizleyen LPO, hidrojen peroksit ile antibakteriyal etkiye katkı sağlar. LPO, 612 aminoasit, bir hem grubu, dört veya beş karbonhidrat zinciri içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Paul *et al.*1985) ve yaklaşık 85 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Reiter and HaÈrnulv 1984; Elagamy *et al.* 1992; Sisecioglu *et al.* 2010). Katalitik merkezdeki hem grubu protoporfirin IX dur ve polipeptid zincirine disülfid köprüsü boyunca kovalent olarak bağlanmıştır (Thanabal and La Mar 1989). LPO'da demir bileşimi %0,07'dir (Booth *et al.* 1989). LPO bazik bir proteindir ve izoelektrik pH değeri 9,2'dir (Kussendrager and van Hooijdonk 2000).

LPO enzimi bakterilerin büyümesinin baskılanmasında son derece önemlidir (Jacob *et al.* 1998). Sığır LPO'sunun bakteriyal büyümeyi inhibe etmesi, peroksidaz sistemi olarak bilinen H₂O₂ ve tiyosiyanat ile etkisini gösterir (Jacob *et al.* 1998; Özdemir *et al.* 2001). Bu sistemin antimikrobiyal etkisi sütte doğal olarak oluşur ve LPO'nun gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine bakteriyostatik etkisi gösterilmiştir (Haddain *et al.* 1996). LPO enzimi üzerine yapılan antibakteriyal çalışmalarda LPO-tiyosiyanat ve peroksit sisteminin patojenik bakterilerde önemli derecede inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. LPO'nun uygulama alanı çok geniş olup LPO peroksit sistemi hem gıdalarda hem de farmakolojik uygulamalarda koruyucu ve süt işleme tesislerinde sütün muhafazası amacıyla kullanılmaktadır (Barrett *et al.* 1999).

Antibakteriyel özelliklere sahip LPO bir redoks enzimidir ve aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyanatın antibakteriyel hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalizlemektedir(Cals *et al.* 1991; Jacob *et al.* 1998; Jacob *et al.* 2000).



Ayrıca iyodürün hidrojen peroksitle oksidasyonu LPO enziminin katalizörlüğünde gerçekleşir (Bayse *et al.* 1972).



LPO enziminin aktif bölgesinde bulunan hem grubu protoporfirin IX tür ve polipeptid zincirine disülfid köprüsü boyunca kovalent olarak bağlanmıştır (Thanabal and La Mar 1989). LPO diğer peroksidazlar gibi H_2O_2 mevcudiyetinde fenoller, aromatik aminler, pirogallol, askorbat ve guaiakol gibi moleküllerin oksidasyonunu da katalizlerler (Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995). LPO ve H_2O_2 mevcudiyetinde yapılan çalışmada guaiakol oksidasyonun mekanizması aydınlatılmış ve guaiakol'lün 3,3'-dimetoksi-4,4-bifenokinone'a okside olduğu bulunmuştur (Daniel *et al.* 1997).

Bilinen yaygın substratları arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit), guaiakol ve katekol gibi fenoller sayılabilir (Shindler and Bardsley 1975; Metodiewa *et al.* 1989; Daniel *et al.* 1997).

Bu mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi Fe^{+4} içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'ı oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. İkinci adımda ise katyon radikali halinde olan bileşik I ortamdaki substrattan (guaiakol) bir proton alarak Fe^{+4} haline indirgenirken substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan (guaiakol) tekrar bir proton alarak ilk durumuna geri döner. Ortamda oluşan radikalik substratlarda birbirleriyle etkileşerek polimerleşirler (Veitch 2004).

1.2. Afinite Kromatografisi

Kompleks biyolojik karışımlardan saflaştırılması istenen biyolojik materyallerin, afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta çok yüksek bir verimde ayrılması, afinite tekniği ile gerçekleştirilebilir. Afinite kromatografisi saflaştırılacak molekülün destek materyaline (matriks) kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir çeşit adsorbsiyon kromatografisidir (Atasever *et al.* 2003).

Bu teknikte çok iyi bir ayırım yapabilmek için, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç vardır. İmmobilize edilecek ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalıdır ve safsızlıklar kolondan uzaklaştıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yönteminde bulunması gerekmektedir.

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

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

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

Sephadex, Sepharose, Biyo-jel agaroz jeli gibi birçok farklı matriks bu teknikte kullanılmaktadır. Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bir şekilde bağlanabilmesi için kolayca reaksiyona girebilir. Bu amaçla matriks olarak kullanımı en çok tercih edilen jel Sepharose-4B'dir (Cuatrecasa 1970).

Axen *et al.* (1967) primer amino grubu bulunduran moleküllerin, siyanojen bromürle aktifleştirilmiş polisakkarit matrikslerine bağlanabileceğini öngörmüştür. Bu çalışmalar afinite kromatografisinin ayırma teknikleri içerisinde kendisine önemli ölçüde etkili olabileceği sonuçlarını çıkarmıştır. 1972 yılında Pharmacia Fine Chemicals tarafından siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose jelini geliştirerek, immobilize edilecek ligandlar için dayanıklı ve hazır bir ortam oluşturmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Laktoperoksidaz (LPO) enziminin sütte bulunduğu ilk kez 1940 yılında bildirilmiştir (Kumar and Bhatla 1995). LPO'nun gıda ve kimya alanlarındaki yaygın kullanımı enzim üzerine inhibisyon çalışmalarına olan ilgiyi artırmıştır. İnhibitör olarak etki gösteren farklı kimyasallar sığır LPO'su üzerinde çalışılmış ve birçoğunun enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir (Ozdemir *et al.* 2002; Ozdemir and Uguz 2005; Sisecioglu *et al.* 2011).

LPO izolasyonu üzerine birçok çalışmalar yapılmış ve birçok yöntemler önerilmiştir (Ozdemir *et al.* 2001; Shin *et al.* 2001; Uguz and Ozdemir 2005). İlk kullanılan saflaştırma metodu iyonik şiddet esasına dayanmaktadır (Ozdemir *et al.* 2001).

Saflaştırma için uygulanan yöntemlerden bazıları CM-Sephadex iyon-değişim kromatoğrafisi (Ozdemir *et al.* 2003; Uguz and Ozdemir 2005), Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatoğrafisi (Shin *et al.* 2001; Ozdemir and Uguz 2005), Fenil-Sepharose CL-4B üzerinde hidrofobik afinite kromatoğrafisi (Langbakk and Flatmark 1984) ve Toyopearl-SP katyon değişim kromatoğrafisidir (Mecitoglu and Yemenicioglu 2007).

LPO'nun insan, sığır, manda, keçi, koyun gibi bazı memeli sütlerinden (Dumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995; Jacob *et al.* 1998) ve aynı zamanda memelilerin tükrük (Monson *et al.* 1988) ve gözyaşından da saflaştırılarak bazı özellikleri ve katalizlediği reaksiyonlar araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ortalama LPO enziminin aktivitesi koyunda 1.4 EU/mL, kuzuda 0.34-2.38 EU/mL, keçide 1.5-4.45 EU/mL, mandada 0.794 EUs/mL, domuzda 22 EU/mL ve insanda 0.06-0.97 EU/mL miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Seifu *et al.* 2005).

LPO saflaştırılması için Dumonted ve Rousset tarafından önerilen yöntemde ham sığır sütünde bulunan kazein uzaklaştırılmış, Amberlit CG-50 H⁺ (NH₄⁺ formunda) ile muamele edilmiş, sodyum asetat çözeltisiyle yıkadıktan sonra bir kolona yüklenip 500

mM'lı asetat çözeltisiyle elüsyon toplanmıştır. Elde edilen elüatlara amonyum sülfat ile protein çöktürmesi yapılmıştır. Böylece hem grubu ihtiva eden ve hem grubu ihtiva etmeyen ham LPO elde edilmiştir. Sephadex G-25 kolona yüklenmiş ve amonyum sülfat ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde ettikleri son ürünü 3,2 mM'lık asetat tamponunda saklamışlardır (Doumonted and Rousset 1983).

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

Laktoperoksidaz enziminin inhibitörleri arasında yer alan sülfanilamid molekülleri ($R-SO_2-NH_2$) (Drew 2000), ilaçların önemli bir sınıfını teşkil ederler, insanlarda ve diğer türlerde çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve besin üreten hayvanların büyümesinde kullanılmaktadır (Supuran 2002).

2013 yılında LPO saflaştırılması için geliştirilen en son yöntemde CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye sülfanilamid ligandı kenetlenerek LPO enziminin afinite tekniği ile saflaştırılması tek basamakta gerçekleştirilmiştir (Atasever *et al.* 2013). Bu yöntemde zayıf katyon değiştirici Amberlit CG-50 H^+ reçinesi kullanmış ve kısmi saflaştırma yapıldıktan sonra CNBr aktifleştirilmiş Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanılmıştır. 2014 yılında yapılan çalışmalarda LPO saflaştırılmasında ligand olarak sülfanilamid türevleri kullanılmış, koyun ve sığır sütlerinden LPO saflaştırılması tek basamakta yapılmıştır (Usanmaz 2014).

2.1. Çalışmanın Amacı

Bu tez kapsamında 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalinsülfonamid, 4-amino-3-metilsülfonamid, 3-amino-4-klorobenzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid, 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid türevlerinden afinite kolonları hazırlanarak ilk kez keçi ve manda sütlerinden LPO enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

- 1) 114Z038 nolu Tübitak projesi kapsamında gerçekleştirilmiş olan doktora tezi ile 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalinsülfonamid, 4-amino-3-metilsülfonamid, 3-amino-4-klorobenzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamidin LPO enzimi üzerine inhibisyon kinetikleri çalışılmış, dönüşümlü inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir.
- 2) Mevcut bu tez kapsamında ilk defa 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid ve 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışılmış, dönüşümlü inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir.
- 3) 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid, 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalinsülfonamid, 4-amino-3-metilsülfonamid, 3-amino-4-klorobenzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid molekülleri ile Sepharose-4B-L-tirozin kullanılarak afinite kolonları sentezlenmiş keçi ve manda sütlerinin ilk kez saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
- 4) Bu enzimler üzerine kinetik parametreler çalışılmış en iyi verimde saflaştırma yapılan afinite kolonları için bağlanma kapasitesi üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreler belirlenip daha önce kullanılan ligandlar ile mukayese edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), Standart serum albumin, Amonyum sülfat, Sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, Sodyum karbonat, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Sodyum klorür, Glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol, 2-kloro-4-sülfamoyilanolin, 5-amino-1-naftalinsülfonamid, 4-amino,3-metilbenzensülfonamid, 3-amino-4-klorobenzen-sülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid, 3,4-diamino-benzen-sülfonamid, 6-aminopiridin-3-sülfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sülfonamid molekülleri Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum dodesilsülfat (SDS) Sodyum perklorat, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzopropanal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit, Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den memeli sütleri piyasadan sağlandı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: SHIMADZU UV-1800
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer

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

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış amaçları ve hazırlanış şekilleri;

Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO_3 pH=10 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanılan): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO_3 200 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mililitreye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO_3 (pH=8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanılan): 0,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) NaHCO_3 80 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8 kadar titre edilerek, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mililitreye tamamlandı.
3. 10 mM NaH_2PO_4 pH=6,8 (Sülfanilamit türevlerinin kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanılan): 6 g ($5 \cdot 10^{-2}$ mol) NaH_2PO_4 ,

450 mL destile suda çözüldü. 1N HCL ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 0,5 L'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 10 mM NaH_2PO_4 pH=6,8 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 12 g ($1 \cdot 10^{-1}$ mol) NaH_2PO_4 , 950 mL destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.
2. 25 mM fosfat pH= 6,8 (Kolonu yıkamada kullanılan tampon): 1,42 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 350 mL destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 mL litreye tamamlandı.
3. 1M NaCl/25mM fosfat pH=6,8 (LPO enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 150 mL destile suda çözüldü. 1,42 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 200 mL litreye tamamlandı.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözeltiler

1. 5 mM NaCH_3COO pH=6,8 (Amberlite CG 50 H^+ reçinesinin şişirilmesinde kullanılan çözelti): 0,4 g ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) NaCH_3COO , 950 mL destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.
2. 20 mM NaCH_3COO pH=6,8 (Süt reçine karışımının yıkanmasında kullanılan çözelti): 0,1968 g (0,0024 mol) NaCH_3COO , 100 mL destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 120 mL' ye tamamlandı.
3. 2 M NaCH_3COO pH=6,8 (Süt ve reçine karışımında bulunan ham enzim ekstraktının elüsyonu için kullanılan çözelti): 19,68 g (0,24 mol) NaCH_3COO , 50 mL destile suda çözüldü. 1N HCL ile pH=6,8'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 60 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaH_2PO_4 pH=6,0 (ABTS hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 12 g (0,1 mol) NaH_2PO_4 950 mL destile suda çözülecek. 1N HCl ile pH>6,0'e kadar titre edilecek, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.
2. 1mM ABTS çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi) : 0,055 g ($1 \cdot 10^{-4}$ mol) ABTS 100 mL 0,1 M NaH_2PO_4 pH=6,0 içinde çözüldü.
3. 3,2 mM H_2O_2 çözeltisi (ABTS substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, LPO aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H_2O_2 'den 32 μL alınarak destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

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

Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. Numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkapt etanol ilave edildi.

4. Yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'lık SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.
5. Renklendirme çözeltisi: 0,66 g coomassie brilliant blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.
6. Renksizleştirme çözeltisi: %7,5 asetik asit %5 metanol ve %87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 60 mL saf su, 30 mL %96'lık etanol, 10 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
2. Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g Sodyum asetat, 45 mL Etanol ve 80 mL saf su karıştırılıp, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutaraldehit eklenip saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su'da çözülüp üzerine 30 µl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su'da çözülecek ve üzerine 120 µl formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin ve 250 mL'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip

aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

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

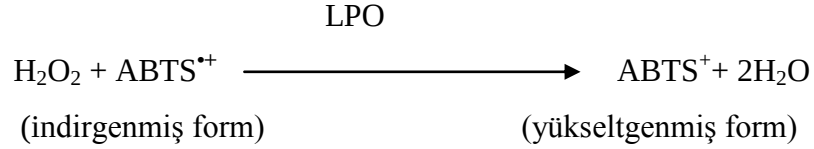
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 μg arası). Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite tayini

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümü, Shindler ve Bardsley yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen prosedüre göre gerçekleştirildi (Shindler and Bardsley 1975). Bu yöntem, H_2O_2 tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana

getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Shindler and Bardsley 1975).



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

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

D_f = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (μmol/mL.dk.)

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

3.3. Manda ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Basamakları

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

Bir litre taze memeli sütü (manda, keçi) önce 2700 rpm'de 4°C ve 15 dakika 3 kez santrifüj edilerek yağı tamamen uzaklaştırıldı. Yağı alındıktan sonra geri kalan süpernatantlar birleştirilerek bir behere aktarıldı. Zayıf asidik katyon değiştirici Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin 2,2 gramı, 200 mL 500 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisinde şişirilerek yağı alınmış süte katıldı (Dumonte and Rousst 1983; Özdemir *et al.* 2001; Kumar and Bhatla 1995). Reçine-süt karışımı magnetik karıştırıcı vasıtasıyla 4°C'de 1 saat karıştırıldı. Yarım saat süreyle dinlenmeye bırakılarak, üstte kalan süpernatant dekante edildi. Çökelek önce 2 L destile suyla ve daha sonra 5 mM 1 L NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle yıkandı, devamında 120 mL 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı. Reçineye bağlanmış protein çökeleği Buchner hunisine aktarılarak 60 mL 2 M NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle elüsyon yapıldı ve elde edilen ham ekstraktta Bradford yöntemiyle protein tayini ve aktivite ölçümü yapıldı.

3.3.2. LPO inhibitörleri ve ligand seçimi

LPO enziminin literatürde belirlenen birçok inhibitörleri vardır (Doerge 1986; Kumar and Bhatla 1995). Bunlardan bazıları, seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri; seçici serotonin geri alım inhibitörleri, seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri ve antidepresanlardan bazıları sayılabilir. LPO enziminin inhibitörleri arasında sülfanilamid molekülünde yer almaktadır.

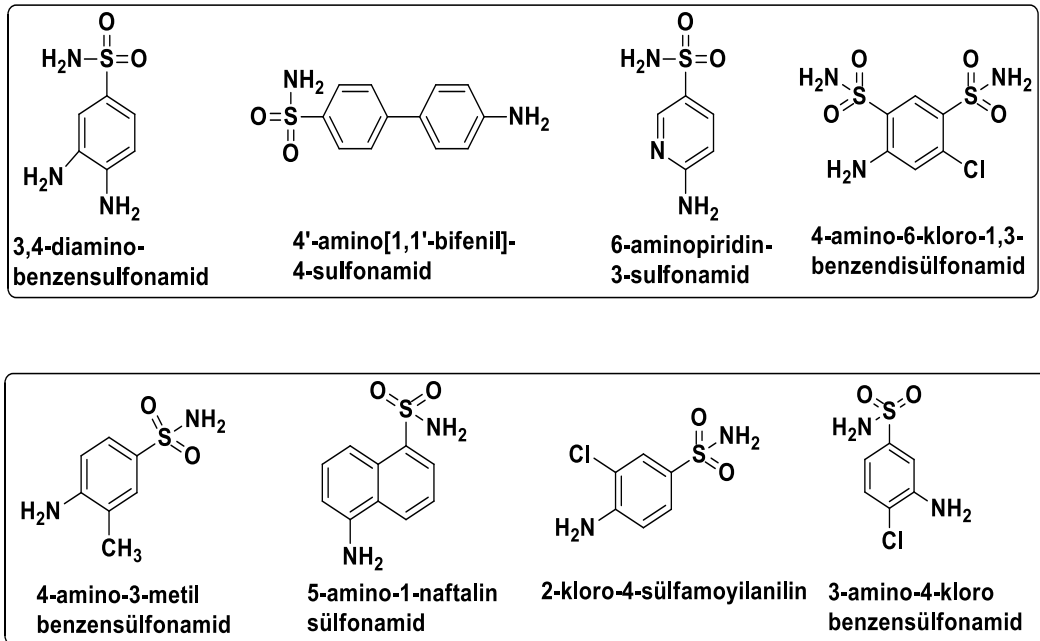
Sülfanilamid türevi moleküller

Molekül yapısı itibarıyla diazonyum tuzu oluşturabilecek bir bileşik olan sülfanilamid serbest $-NH_2$ grubuna sahiptir böylece afinite kolonu sentezlenerek LPO saflaştırılmıştır (Atasever *et al* 2013).

Bu çalışmadan hareketle diazonyum tuzu oluşturabilecek ve literatürde tespit edilip satın alınan saf sülfanilamid türevlerinin sığır LPO enzimi üzerine inhibisyonları doktora tezi kapsamında araştırılmış Çizelge 3.1'den görüldüğü gibi sığır LPO enzimi üzerine 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonamid, 4-amino-3-metil sülfonamid, 3-amino-4-klorobenzenesülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid moleküllerinin inhibisyonları incelenerek IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir (Usanmaz 2014).

Inhibisyon gösteren sülfanilamid türevi moleküller için afinite kolonları sentez edilip daha iyi verimle keçi ve manda LPO enzimlerinin saflaştırılması sağlandı.

Çizelge 3.1. Diazonyum tuzu oluşturabilen sülfanilamid türevleri

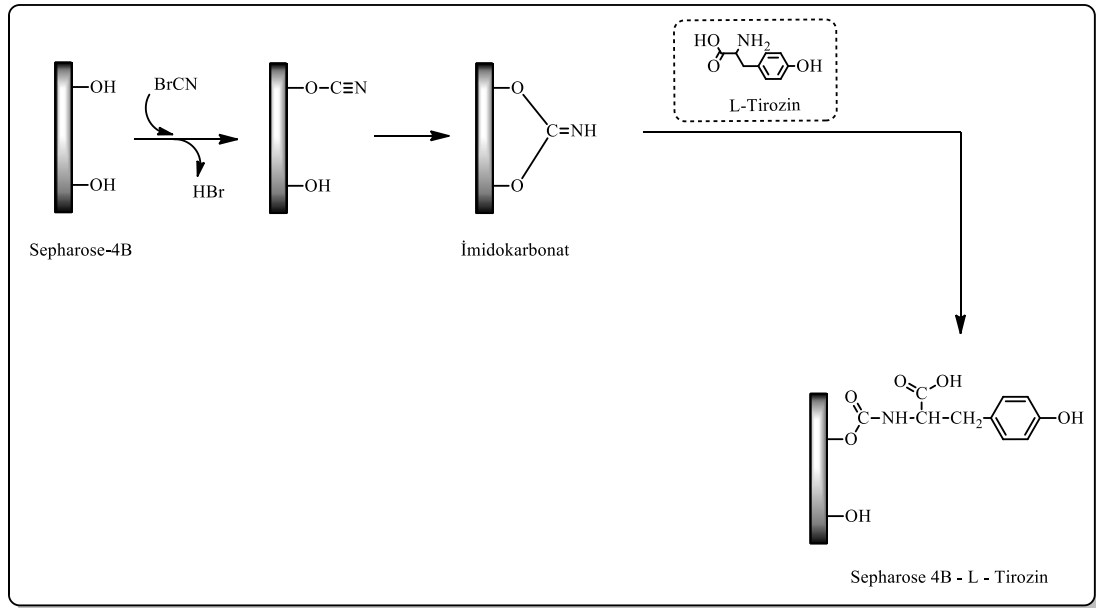


3.3.3. İnhibitör çalışmaları

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

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

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



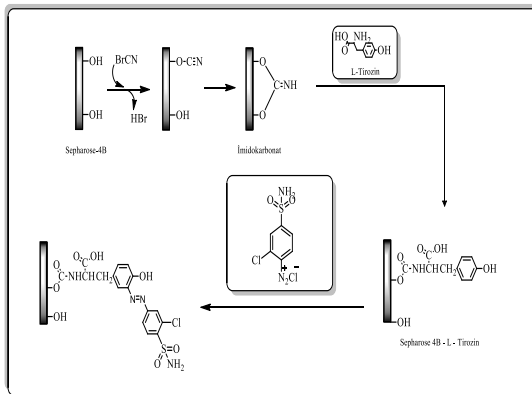
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

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

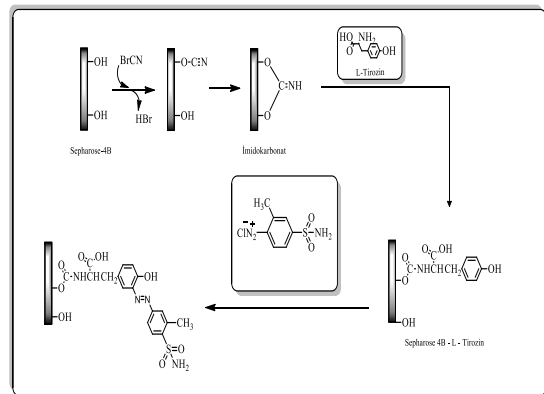
bundan sonra süspansiyon, 4°C’de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ve 16 saat boyunca 4°C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

3.3.3.c. Sülfanilamid türevlerinin kenetlendirilmesi

Sülfanilamid türevi olan moleküllerin her birinden 25 mg alınarak, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C’deki 5 mL çözelti, her bir inhibitör çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL fosfat tamponuyla pH:6,8 yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

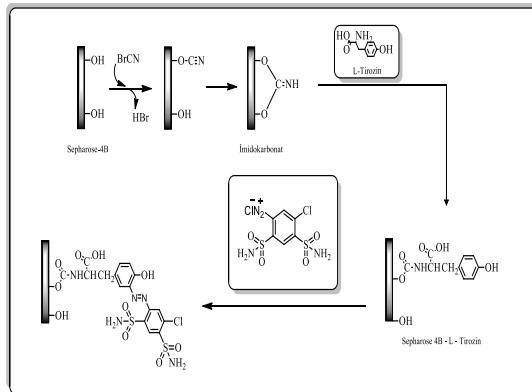


2-kloro-4-sulfamoylanilin

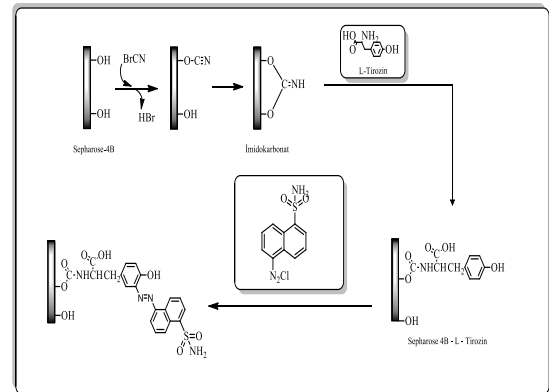


4- amino-3 -metil benzensulfonamid

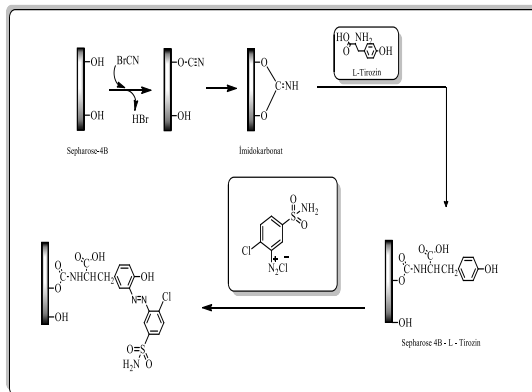
Şekil 3.2. (devam)



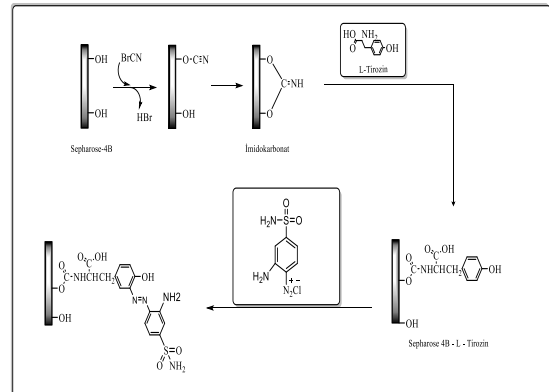
4-amino-6-kloro-1,3-benzendisulfonamid



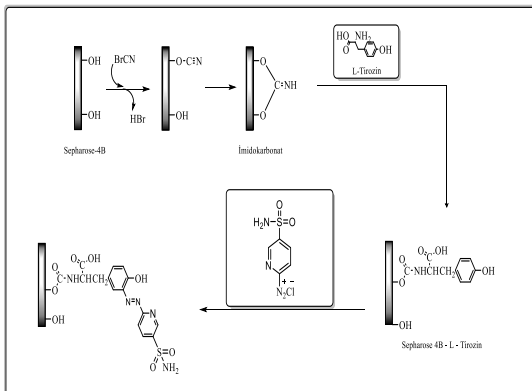
5 - amino - 1 - naftalin sulfonamid



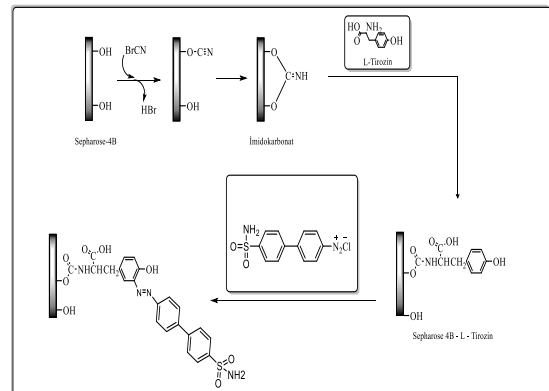
3 - amino - 4 - kloro benzensulfonamid



3,4-diamino- benzensulfonamid



6-aminopiridin- 3-sulfonamid



4'-amino[1,1'-bifenil]- 4-sulfonamid

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

3.3.3.d. Afinite kolonunun paketlenmesi

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

3.3.3.e. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

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

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

LPO enzimi her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi gümüş boyama yöntemi ile kontrol edildi (Chavellet *et al.* 2006). Standart olarak molekül ağırlığı belli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu.

Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

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

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

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

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan

sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Manda ve Keçi Sütlerinden Saflaştırılan LPO Enzimleri İçin Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Optimum pH çalışmaları

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

3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması

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

3.5.3. Stabil pH çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 10 mM NaH₂PO₄ tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.4. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,1 mL, 0,5 mL, 0,8 mL, 1,1 mL ve 1,5 mL alındı. Her bir ABTS konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 mL H_2O_2 katılarak, spektrofometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K_m ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi. Aynı işlemler H_2O_2 substratına bağlı olarak da benzer şekilde yapıldı.

3.6. Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Bulunması

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enzimlerinin saflaştırma tabloları hazırlanarak kapasitesi yüksek olan jeller için kolon tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı. Jellerin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1×10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

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

3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

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

3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

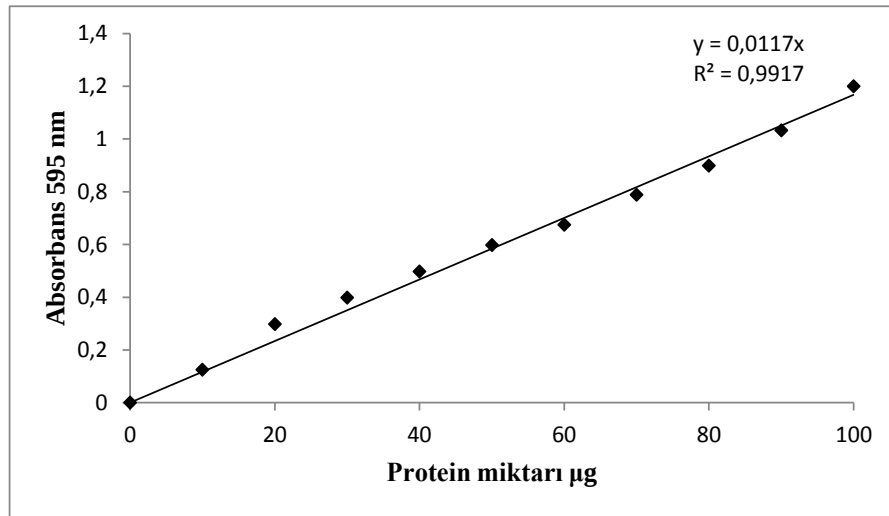
Laktoperoksidaz enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirildi, sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

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



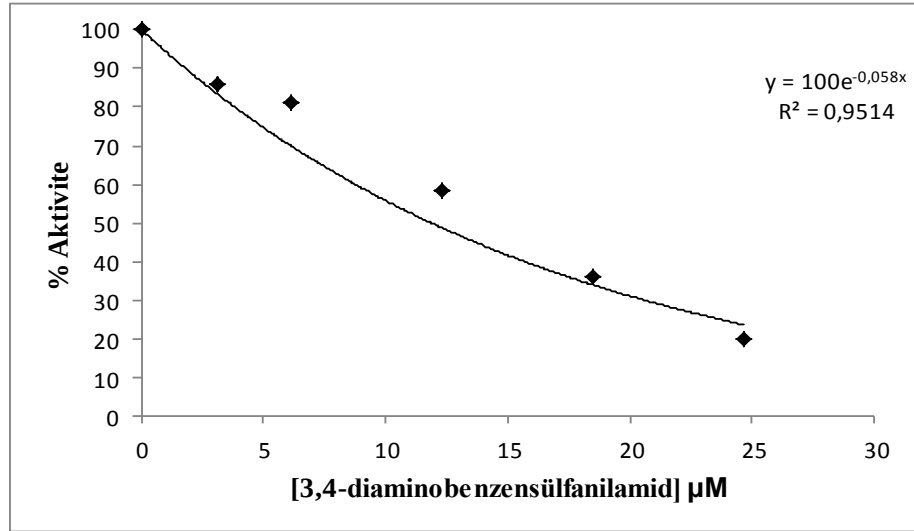
Şekil 4.1. Kantitatif proteinlerin tayini için kullanılan standart grafik

Sığır LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Önceki çalışmalarımızda kullanılan sülfanilamid afinite jeli ile LPO enzimi saflaştırılarak çalışmada kullanılan inhibitörlerin inhibisyon kinetikleri çalışıldı. Sığır sütünden LPO enzimi %74,20 verimle 406,70 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim ile kinetik çalışmalar yürütülmüştür (Atasever *et al.* 2013).

Çizelge 4.1. 3,4-diamino-benzensülfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

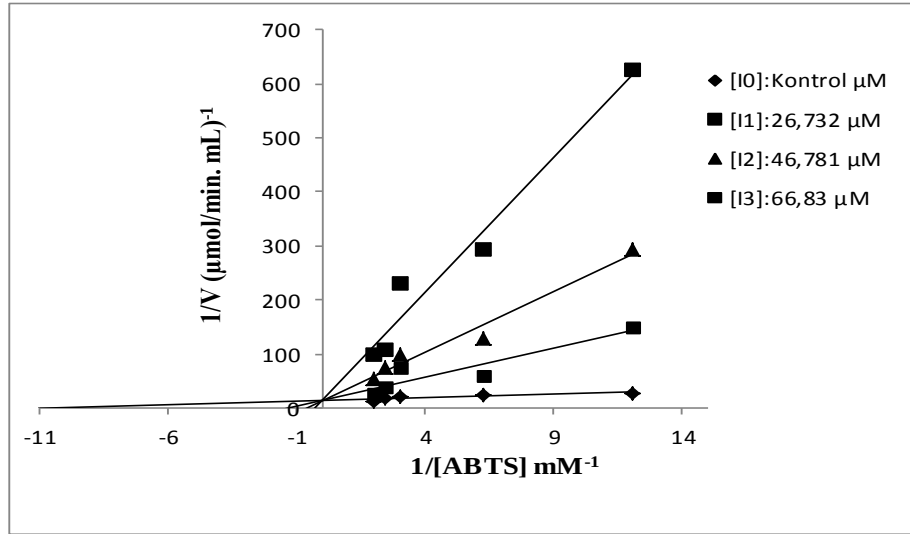
Kör Tüpü					Numune Tüpü						
Inhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	LPO(mL)	%Aktivite	[I] mM
3,4-diamino-benzensülfonilamid	2,0	0,90	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,82	0,1	0,07	2,0	0,77	0,1	0,07	0,05	87,7	20,04
	2,0	0,80	0,1	0,10	2,0	0,75	0,1	0,10	0,05	79,2	26,73
	2,0	0,72	0,1	0,17	2,0	0,67	0,1	0,17	0,05	50,0	46,78
	2,0	0,70	0,1	0,20	2,0	0,65	0,1	0,20	0,05	40,7	53,46
	2,0	0,65	0,1	0,25	2,0	0,60	0,1	0,25	0,05	30,0	66,83



Şekil 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 3,4-diaminobenzenesülfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 3,4-diaminobenzenesülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü				Numune Tüpü					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,25	2,55	0,1	0,1	0,25	2,50	0,1	0,1	0,05	125,00	12,48
	0,50	2,30	0,1	0,1	0,50	2,25	0,1	0,1	0,05	92,59	6,25
	0,75	2,05	0,1	0,1	0,75	2,00	0,1	0,1	0,05	50,00	4,00
	1,00	1,80	0,1	0,1	1,00	1,75	0,1	0,1	0,05	40,65	3,00
	1,25	1,55	0,1	0,1	1,25	1,50	0,1	0,1	0,05	35,71	2,40
[I] ₂	0,25	2,47	0,1	0,17	0,25	2,42	0,1	0,17	0,05	247,00	12,48
	0,50	2,22	0,1	0,17	0,50	2,17	0,1	0,17	0,05	202,51	6,25
	0,75	1,97	0,1	0,17	0,75	1,92	0,1	0,17	0,05	120,00	4,00
	1,00	1,72	0,1	0,17	1,00	1,67	0,1	0,17	0,05	50,00	3,00
	1,25	1,475	0,1	0,17	1,25	1,42	0,1	0,17	0,05	43,29	2,40
[I] ₃	0,25	2,40	0,1	0,250	0,25	2,35	0,1	0,25	0,05	511,00	12,48
	0,50	2,15	0,1	0,250	0,50	2,10	0,1	0,25	0,05	405,02	6,25
	0,75	1,90	0,1	0,250	0,75	1,85	0,1	0,25	0,05	202,51	4,00
	1,00	1,65	0,1	0,250	1,00	1,60	0,1	0,25	0,05	129,70	3,00
	1,25	1,40	0,1	0,250	1,25	1,35	0,1	0,25	0,05	68,96	2,40



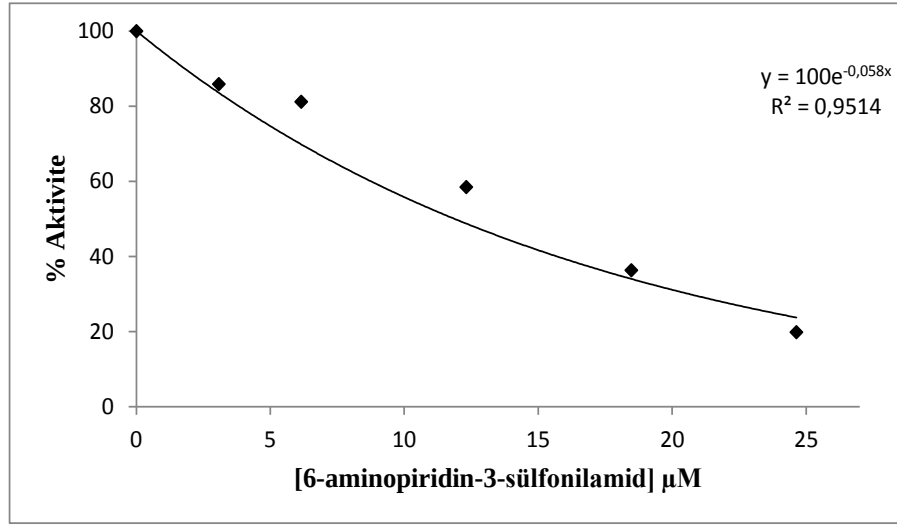
Şekil 4.3. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 3,4-diaminobenzenesülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Saflaştırma sonuçları:

Sepharose-4B-L-tirozin-3,4-diaminobenzenesülfanilamid molekülünün Bölüm 3.3.3.c’de anlatıldığı gibi afinite jeli sentezlendi (Şekil 3.2). Bu kolondan keçi ve manda sütü laktoperoksidaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4.3. 6-aminopiridin-3-sülfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

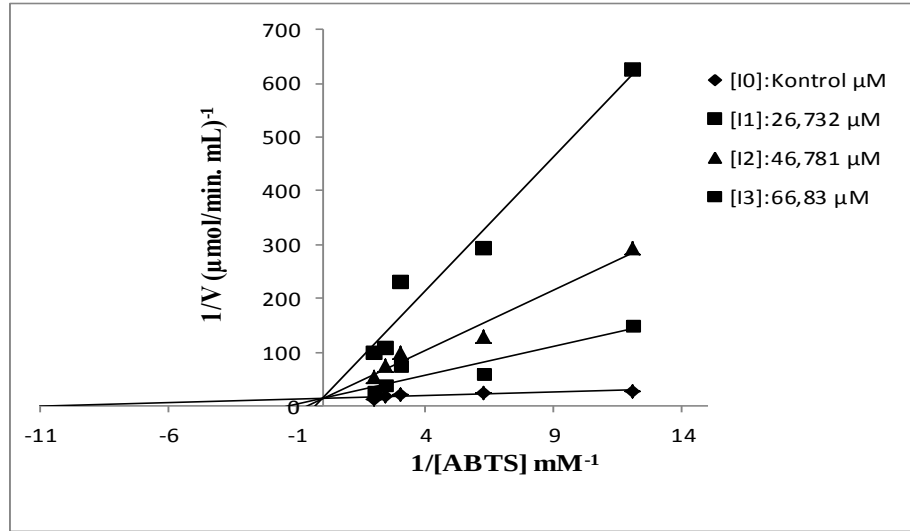
Kör Tüpü					Numune Tüpü					%Aktivite	[I] nM
Inhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	LPO(mL)		
6-aminopiridin-3-sülfonilamid	2,0	0,90	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,85	0,1	0,50	2,0	0,80	0,1	0,50	0,05	85,84	3,07
	2,0	0,80	0,1	0,10	2,0	0,75	0,1	0,1	0,05	81,13	6,15
	2,0	0,70	0,1	0,20	2,0	0,65	0,1	0,20	0,05	58,49	12,31
	2,0	0,60	0,1	0,30	2,0	0,65	0,1	0,30	0,05	36,32	18,47
	2,0	0,50	0,1	0,40	2,0	0,45	0,1	0,40	0,05	19,83	24,63



Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 6-aminopiridin-3-sülfolamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiğı

Çizelge 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 6-aminopiridin-3-sülfolamid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değeri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,25	2,50	0,1	0,15	0,25	2,45	0,1	0,15	0,05	150,27	12,48
	0,50	2,25	0,1	0,15	0,50	2,20	0,1	0,15	0,05	58,82	6,25
	0,75	2,00	0,1	0,15	0,75	1,95	0,1	0,15	0,05	73,63	4,00
	1,00	1,75	0,1	0,15	1,00	1,70	0,1	0,15	0,05	40,00	3,00
	1,25	1,50	0,1	0,15	1,25	1,45	0,1	0,15	0,05	25,64	2,40
[I] ₂	0,25	2,40	0,1	0,250	0,25	2,35	0,1	0,25	0,05	294,55	12,48
	0,50	2,15	0,1	0,250	0,50	2,10	0,1	0,25	0,05	129,70	6,25
	0,75	1,90	0,1	0,250	0,75	1,85	0,1	0,25	0,05	100,00	4,00
	1,00	1,65	0,1	0,250	1,00	1,60	0,1	0,25	0,05	73,63	3,00
	1,25	1,40	0,1	0,25	1,250	1,350	0,1	0,250	0,05	53,19	2,40
[I] ₃	0,25	2,30	0,1	0,35	0,250	2,250	0,1	0,350	0,05	626,00	12,48
	0,50	2,05	0,1	0,35	0,500	2,000	0,1	0,350	0,05	294,55	6,25
	0,75	1,80	0,1	0,35	0,750	1,750	0,1	0,350	0,05	231,48	4,00
	1,00	1,55	0,1	0,35	1,000	1,500	0,1	0,350	0,05	108,00	3,00
	1,25	1,30	0,1	0,35	1,250	1,250	0,1	0,350	0,05	100,00	2,40



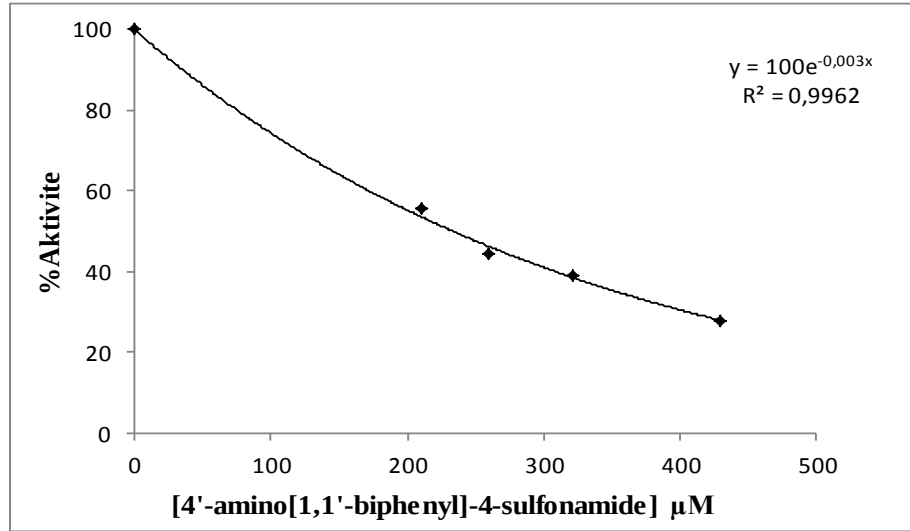
Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 6-aminopiridin-3-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Saflaştırma sonuçları:

Sepharose-4B-L-tirozin-6-aminopiridin-3-sülfonamid molekülünün Bölüm 3.3.3.c’de anlatıldığı gibi afinite jeli sentezlendi (Şekil 3.2). Bu kolondan keçi ve manda sütü laktoperoksidaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4.5. 4'-amino[1,1'biphenyl]-4-sülfonamid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

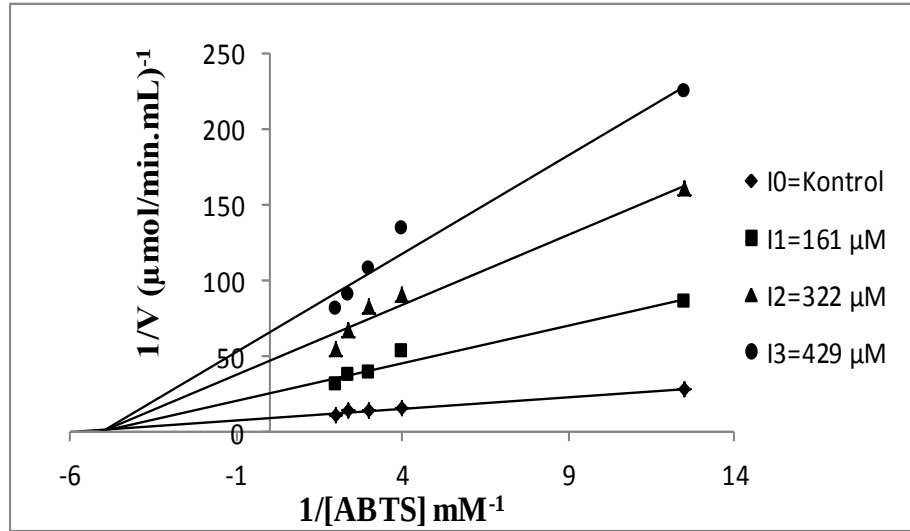
Kör Tüpü					Numune Tüpü					%Aktivite	[I] nM
Inhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	ABTS(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	LPO(mL)		
4'-amino[1,1'biphenyl]-4-sülfonilamid	2,0	0,90	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,80	0,1	0,10	2,0	0,75	0,1	0,10	0,05	55,6	210
	2,0	0,77	0,1	0,12	2,0	0,72	0,1	0,12	0,05	44,3	260
	2,0	0,75	0,1	0,15	2,0	0,70	0,1	0,15	0,05	39,1	322
	2,0	0,70	0,1	0,20	2,0	0,65	0,1	0,20	0,05	27,8	429



Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak grafiği 4'-amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon

Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 4'-amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid eşliğinde elde edilen $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör no	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,250	2,575	0,1	0,075	0,250	2,525	0,1	0,075	0,05	86,07	12,48
	0,500	2,325	0,1	0,075	0,500	2,275	0,1	0,075	0,05	52,6	6,25
	0,750	2,075	0,1	0,075	0,750	2,025	0,1	0,075	0,05	40,00	4,00
	1,000	1,825	0,1	0,075	1,000	1,775	0,1	0,075	0,05	37,03	3,00
	1,250	1,575	0,1	0,075	1,250	1,525	0,1	0,075	0,05	31,25	2,40
[I] ₂	0,250	2,500	0,1	0,150	0,250	2,450	0,1	0,150	0,05	160,93	12,48
	0,500	2,250	0,1	0,150	0,500	2,200	0,1	0,150	0,05	90,90	6,25
	0,750	2,000	0,1	0,150	0,750	1,950	0,1	0,150	0,05	83,33	4,00
	1,000	1,750	0,1	0,150	1,000	1,700	0,1	0,150	0,05	66,66	3,00
	1,250	1,500	0,1	0,150	1,250	1,450	0,1	0,150	0,05	55,55	2,40
[I] ₃	0,250	2,450	0,1	0,200	0,250	2,400	0,1	0,200	0,05	225,00	12,48
	0,500	2,200	0,1	0,200	0,500	2,150	0,1	0,200	0,05	135,13	6,25
	0,750	1,950	0,1	0,200	0,750	1,900	0,1	0,200	0,05	108,69	4,00
	1,000	1,700	0,1	0,200	1,000	1,650	0,1	0,200	0,05	90,90	3,00
	1,250	1,450	0,1	0,200	1,250	1,400	0,1	0,200	0,05	81,30	2,40



Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4' –amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiği

Saflaştırma sonuçları:

Sepharose-4B-L-tirozin-[4'-amino[1,1'-biphenyl]-4-sülfonamid] kolonu Bölüm 3.3.3.c'de anlatıldığı gibi sentezlendi (Şekil 3.2). Bu kolondan keçi ve manda laktoperoksidaz enzimleri için saflaştırma gerçekleştirilememiştir.

114Z038 nolu Tübitak projesi kapsamında tamamlanmış doktora tezinde 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonamid, 4-amino-3-metilbenzensülfonamid, 3-amino-4-klorobenzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid moleküllerinin IC₅₀ ve K_i kinetik parametreleri çalışılmış, dönüşümlü inhibisyon gösterdikleri belirlenmiş ve afinite kolonları sentezlenmiştir. Sentezlenen afinite kolonlarından sığır ve koyun laktoperoksidaz enzimleri ilk kez saflaştırılmıştır (Usanmaz 2014). Bu tez kapsamında ise bu moleküllerden keçi ve manda laktoperoksidaz enzimlerinin ilk kez saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.7. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC₅₀ (μM)	K_i (μM)	İnhibisyon Tipi
3,4-diamino-benzensülfonamid	43,31	2,94	Yarışmalı
6-aminopiridin-3-sülfonamid	11,94	0,90	Yarışmalı
4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sülfonamid	231,00	77,49	Yarışmasız
2-kloro-4-sülfamoyilanilin	346,50	283,32	Yarışmalı
5-amino-1-naftalin sülfonamid	57,75	6,74	Yarışmalı
3 - amino - 4 - kloro benzensülfonamid	49,50	43,67	Yarışmalı
4- amino-3 –metil-benzensülfonamid	86,62	55,62	Yarışmasız
4 -amino-6 - kloro - 1,3 - benzendisülfonamid	11,36	6,39	Yarışmalı

Çizelge 4.8. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin ile hazırlanan afinite jelinden keçi ve manda LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

2-kloro-4-sülfamoyilanilin		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	55,00	0,97	13,00	53,35	715,00	0,07	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	1,88	0,06	18,80	0,60	31,33	35,24	447,57
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	55,00	7,00	12,00	385,00	660,00	0,60	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	7,83	0,08	78,30	0,86	91,11	20,34	151,86

Çizelge 4.9. 5-amino-1-naftalin sülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden keçi ve manda LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

5-amino-1-naftalin sülfonamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	55,00	0,70	13,00	38,50	715,00	0,05	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,21	0,01	2,10	0,12	17,50	5,45	350,18
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	55,00	4,02	12,00	221,10	660,00	0,33	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	10,00	0,77	0,006	7,70	0,06	128,33	3,48	388,80

Çizelge 4.10. 4-amino,3-metil-benzensülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

4- amino,3 –metil-benzensülfonamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--

Çizelge 4.11. 3-amino-4-klorobenzenesülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

3-amino-4-kloro benzenesülfonamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--

Çizelge 4.12. 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid ile hazırlanan afinite jelinden manda, keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

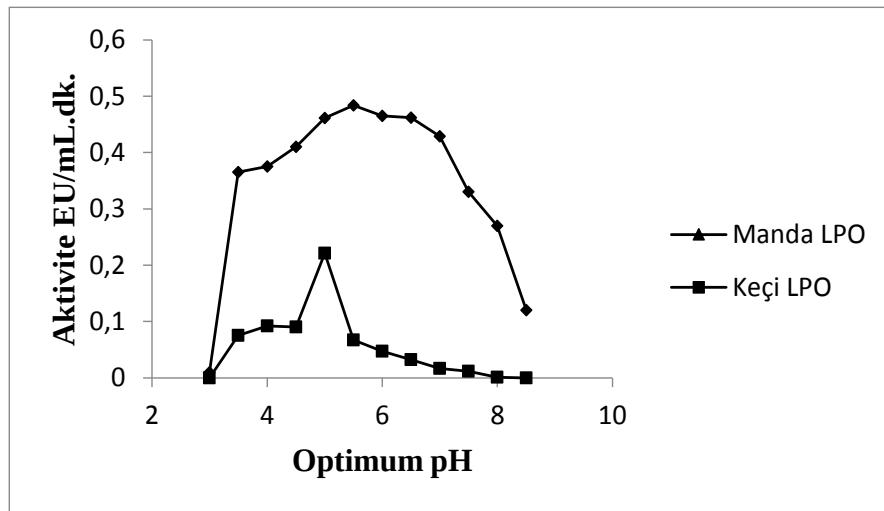
4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Keçi	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--
Manda	Amberlit CG 50 H ⁺ Elüsyonu	--	--	--	--	--	--	--	--
	Sepharose 4B Afinite	--	--	--	--	--	--	--	--

4.2. 5-amino-1-naftalinsulfonamid ile Saflaştırılan LPO Enzimi İçin ABTS Substratı ile Bulunan Kinetik Parametreler

Optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Manda ve keçi sütünden elde edilen sonuçlar Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ile Çizelge 4.13’de gösterildi.

4.2.1. ABTS substratı için pH-aktivite grafiği

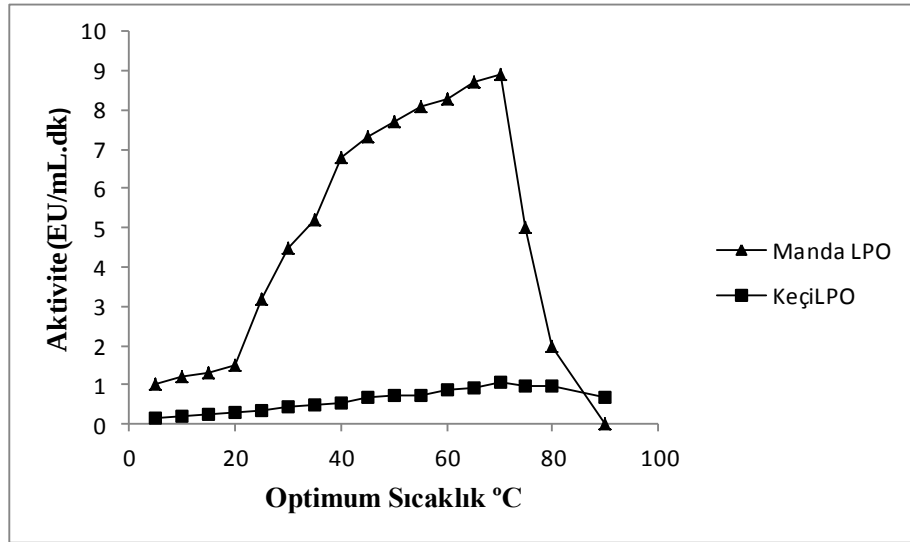
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı şekilde pH:5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.8’de verildi



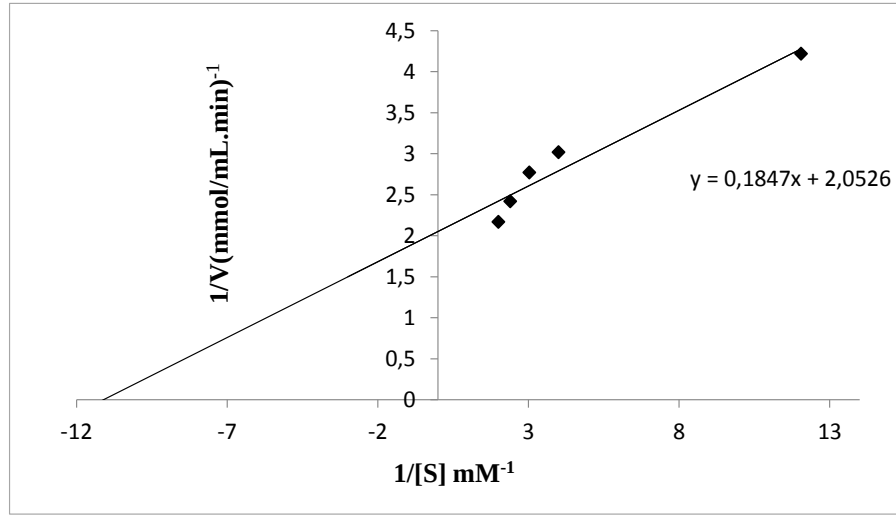
Şekil 4.8. Manda ve keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.2.2. ABTS substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

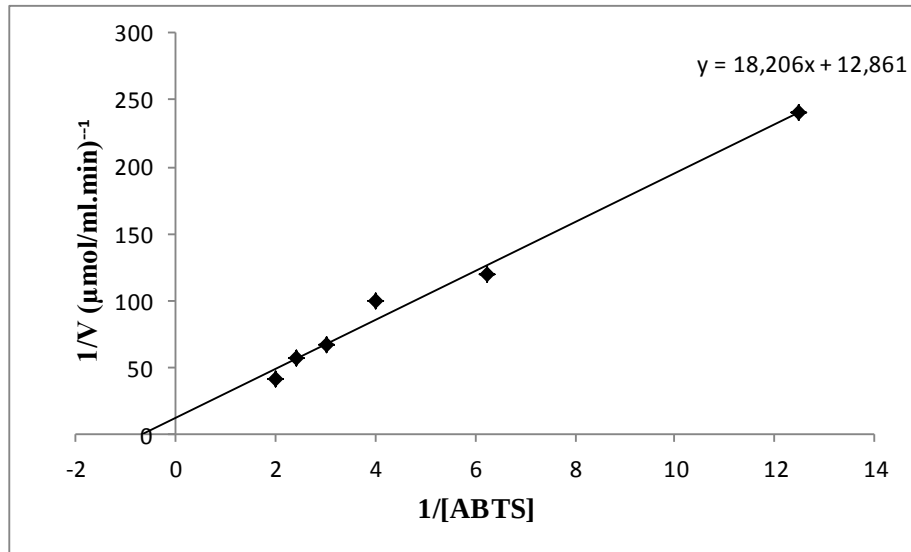
Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.9’da verildi.



Şekil 4.9. Manda ve keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen sıcaklık-aktivite grafiği



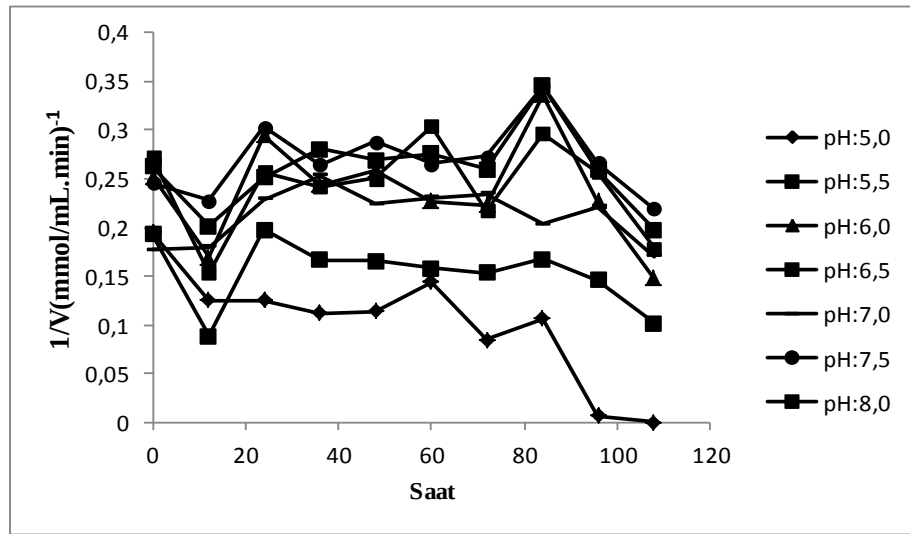
Şekil 4.10. 5-amino-1-naftalinsulfonamid kolonundan saflaştırılan manda sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



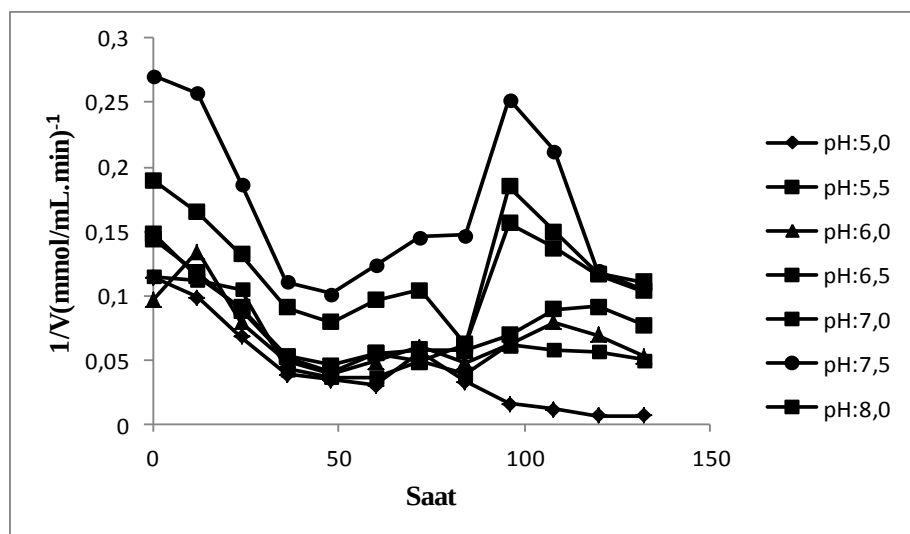
Şekil 4.11. 5-amino-1-naftalinsulfonamid kolonundan saflaştırılan keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

4.2.3. Stabil pH çalışması

Stabil pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.3’de anlatıldığı şekilde pH:5-8 aralığında her 12 saatte bir 7 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.12’de verildi.



Şekil 4.12. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak manda sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



Şekil 4.13. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi sütü LPO enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.3. Memeli Sütleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar

Çizelge 4.13. Keçi ve manda sütü LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları

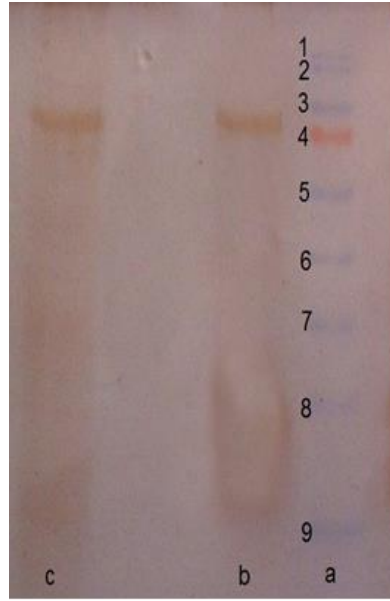
LİGAND MOLEKÜLLER	Keçi LPO			Manda LPO		
	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
2-kloro-4-sülfamoyilanolin	31,33	35,24	417,7	91,11	20,34	151,86
5-amino-1-Naftalin sülfanilamid	17,50	5,45	350,18	113,23	3,48	388,88
3-amino-4-klorosülfanilamid	--	--	--	--	--	--
4-amino-3-Metil-Sülfanilamid	--	--	--	--	--	--
4-amino-6-klorosülfanilamid	--	--	--	--	--	--
3,4-diamino-benzensulfonamid	--	--	--	--	--	--
6-aminopiridin-3-sulfonamid	--	--	--	--	--	--
4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid	--	--	--	--	--	--

Çizelge 4.14. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi sütü LPO enzimi için toplu kinetik sonuçlar

Memeli sütleri	K_m	V_{max}	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Stabil pH
Manda LPO	0,08	0,52	5,5	70	8,0
Keçi LPO	1,44	0,09	5,5	70	5,5

4.4. Saflaştırılan LPO Enzimlerinin SDS-Page Gümüş Boyama Sonuçları

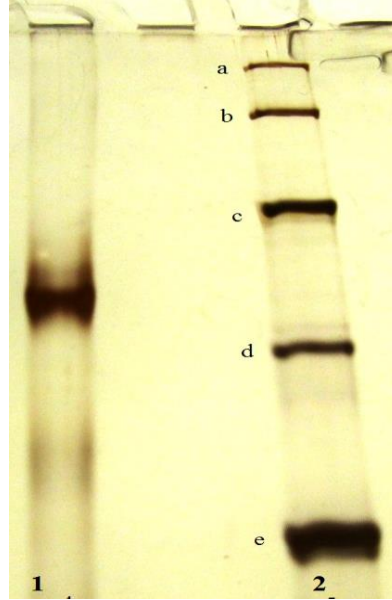
4.4.1. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi sütü LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları



Şekil 4.14. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda ve keçi LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı

a. *Standartlar; 1. (170 kDa) 2. (130 kDa), 3. (100 kDa), 4. (70 kDa), 5. (55 kDa), 6. (40 kDa), 7 (35 kDa), 8. (25 kDa), 9. (15 kDa) **b.** Manda LPO enzimi (80 kDa) **c.** Keçi LPO enzimi (80 kDa).

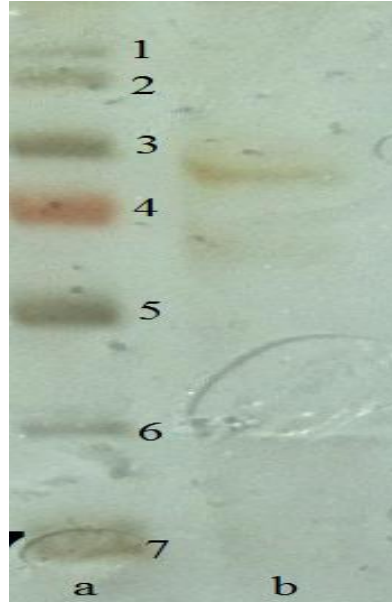
4.4.2. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan manda sütü LPO enzimi
SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları



Şekil 4.15. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan manda LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı

***1:** Manda LPO enzimi (78 kDa) **2:** Standartlar; a. (170 kDa), b. (130 kDa), c. (100 kDa), d. (70 kDa), e. (55 kDa)

4.4.3. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan keçi sütü LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları



Şekil 4.16. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan keçi LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı

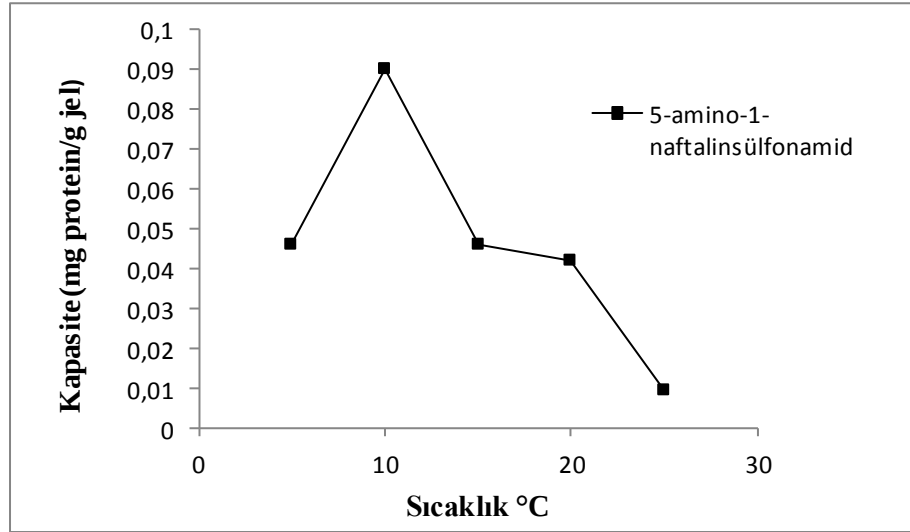
***a.**Standartlar; 1. (250 kDa), 2. (150 kDa), 3. (100 kDa), 4. (70 kDa), 5. (50 kDa), 6. (40 kDa), 7. (30 kDa), **b.** Keçi LPO (80 kDa)

4.5. Sığır Sütünden 5-amino-1-naftalinsülfonamid Maddesi ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan jelin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen LPO enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan LPO enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden LPO enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

4.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

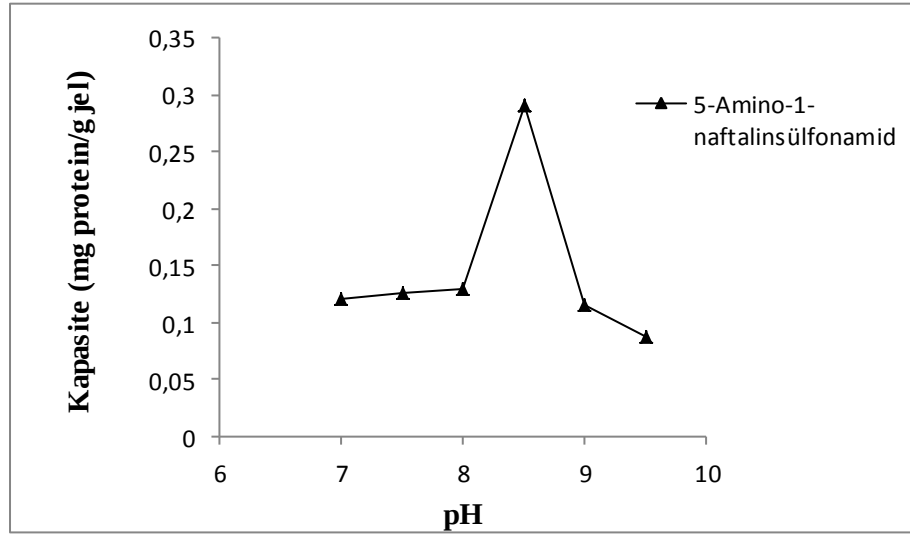
pH:6,8’de LPO farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.17’de verildi.



Şekil 4.17. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.5.2. pH’nın kolon kapasitesine etkisi

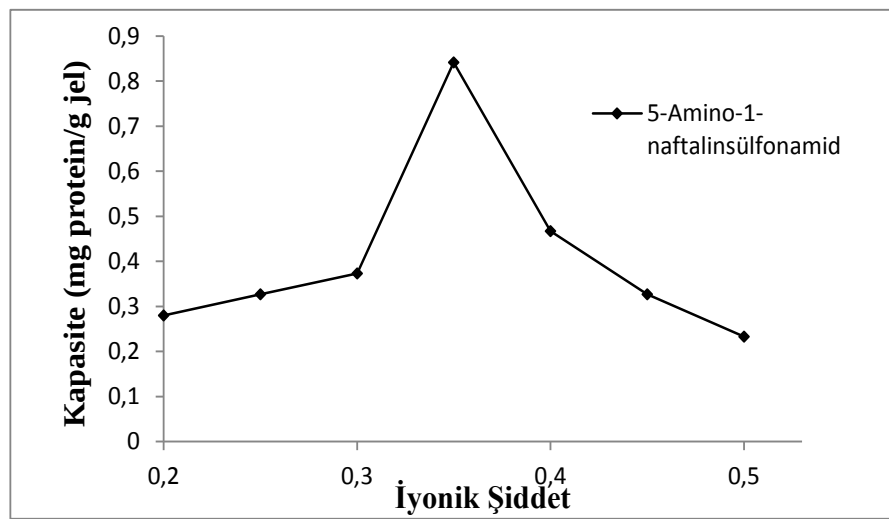
Bu bölümdeki deneyler pH’sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein/g jel başına) belirlenerek Şekil 4.18’de verildi.



Şekil 4.18. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin pH-kapasite grafiği

4.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

LPO enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.19’da verildi.



Şekil 4.19. Sepharose-4B-5-amino-1-naftalinsülfonamid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez kapsamında LPO enziminin tek basamakta saflaştırılması hedefelenmiş ve bu hedef doğrultusunda kromatografik yöntemler yardımı ile enzimin saflaştırılmasını başarılmıştır. Çalıştığımız yöntemlerin esasını belirtmek gerekirse; kromatografik yöntem olarak kullandığımız afinite kromatografisi ucuz ve ligand takılabilmesi koşulu ile uygulanması kolay bir teknik olup saflaştırılacak molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent ve tersinir bağlanır. Genelde matriks olarak polimer madde olan sefadeks, sefaroze ve biyojeller tercih edilir. Matriksle ligand arasında etkileşimleri azaltmak için araya uzantı kolları takılması gerekebilir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Saflaştırılan enzimlerin kantitatif protein tayinleri Bradford metoduyla yapıldı ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle bulundu. Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanması ve kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Protein ile boya etkileşmesi çok hızlı olur. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976) (Şekil 4.1).

Saflaştırma basamakları sırasında LPO enzimi aktivitesi, Shindler ve Bardsley yönteminin hafif bir modifikasyonu sonucu belirlenen prosedüre göre yapıldı (Shindler and Bardsley 1975; Doumonted and Rousset 1983; Kumar and Bhatla 1995). Bu yöntem ABTS kromojenik substratın H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır. LPO enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi, ABTS literatürde enzimin bilinen en iyi substratıdır ve molar ekstinksiyon katsayısı bilinmektedir ($\epsilon_{412nm}=32400 M^{-1} cm^{-1}$). Çalışmalar sırasında kullandığımız 1 enzim ünitesi 20°C'de 1 dakikada µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

LPO enziminin saflaştırılması konusunda birçok kromatografik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler uzun ve ekonomik olmayan yöntemlerdir. Önceki çalışmalarımızda Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi ile kısmi bir saflaştırma yapıp, sonra amonyum sülfat çöktürmesi, CM Sephadex iyon değişim, Sephadex G100 jel filtrasyon kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak 1 lt süttten 5 mg LPO elde edilmiştir (Özdemir *et al.* 2001; Çankaya *et al.* 2006).

LPO ilk kez afinite tekniği kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Bu çalışmada sülfanilamidin LPO'nun yarışmalı inhibitörü olduğu K_i değerinin 3,55x10⁻⁵ M ve IC₅₀ değerinin 0,848 mM olduğu ve enzimin 409 kat saflaştırıldığı bulunmuştur (Atasever *et al.* 2013). Literatürde sülfanilamidlerin LPO inhibisyonu yaptığı ilk defa tarafımızdan bulunmuştur.

Tez kapsamındaki saflaştırma çalışmalarını daha ileriye götürme ve verimi artırmak için keçi ve manda sütleri LPO enziminin sülfanilamid türevi moleküllerinden saflaştırılması hedeflendi. Çizelge 3.1'de verilen bu türevlerin önce inhibisyonlarına bakıldı sonra jellerin sentezine geçirilerek saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Sülfanilamid ligandı kullanılarak hazırlanan afinite kolonundan saflaştırılan sığır LPO enzimi üzerine 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid molekülleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı, bu çalışmalar sırasında küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.1, 4.3 ve 4.5' de verildi. ABTS substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doymuş olmayan ABTS (26.67x10⁻² mM) reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu.

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.2, 4.4 ve 4.6'da gösterildi. Bu sonuçlara göre IC₅₀ değerleri 3,4-diamino-benzensulfonamid için 43,31 µM, 6-aminopiridin-3-sulfonamid

için 11,94 μM ve 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid için ise 231,00 μM olarak bulundu.

Sığır LPO enzimi için 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları çizelge 4.2, 4.4 ve 4.6'da gösterildi. 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid molekülleri için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu.

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.3, 4.5 ve 4.7'de gösterildi. 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid molekülleri yarışmalı inhibisyon, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid molekülü ise yarışmasız inhibisyon etkisi göstermektedir. K_i değerleri 3,4-diamino-benzensulfonamid için 2,94 μM , 6-aminopiridin-3-sulfonamid için 0,90 μM ve 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid molekülü için ise 77,49 μM olarak bulunmuştur. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilk kez tespit edilmiş oldu (Çizelge 4.7).

3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid ve 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid moleküllerinin LPO enzimini inhibe ettiği ve dönüşümlü inhibisyon gösterdikleri gözlemlendi ve bundan hareketle dönüşümlü inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi (Şekil 3.2)

Şekil 3.2'de görüldüğü gibi CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-tirozin uzantı kolu kenetlenerek, her bir inhibitörden 25 mg alınarak Sepharose-4B-L-tirozin- ligand jelleri hazırlandı. Afinite jellerinin sentezlendiği sülfanilamid türevlerinin diazonyum tuzu oluşturarak jelin renklenmesinden anlaşıldı. Diazonyum tuzları bileşikler renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir (Atasever *et al.* 2013).

Çizelge 4.9'da gösterildiği gibi 5-amino-1-naftalinsulfonamid molekülü ligand olarak kullanıldığında 200 mL keçi sütünden amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 mL

kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 17,50 olup enzim 350,18 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 5,45 olarak bulunmuştur. 200 mL manda sütünden amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 mL kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 128,30 olup enzim 388,80 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 3,48 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8’de gösterildiği gibi 2-kloro-4-sülfamoyilani lin ligand olarak kullanıldığında 200 mL keçi sütünden amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 mL kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 31,30 olup enzim 447,57 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 35,24 olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,6 mg LPO ($R_z=0,6$) elde edilmiştir. Literatürde ise 1 L sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

200 mL manda sütünden amberlit ile hazırlanan homojenattan 50 mL kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 91,10 olup enzim 151,86 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 20,34 olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,86 mg LPO ($R_z=0,6$) elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

5-amino-1-naftalin sülfonamid ligand olarak kullanıldığında, manda sütünden %3,48 verimle 388,00 kat ve keçi sütünden %5,45 verimle 350,18 kat saflaştırılmıştır. Tüm memeli sütlerinden saflaştırma yapabilen moleküldür. 5-amino-1-naftalinsülfonamid molekülünün ligand olarak kullanılma potansiyeli bu tez kapsamında ortaya konulmuştur.

3-amino-4-kloro benzensülfonamid, 4-amino-3-metil benzensülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid, 3,4-diamino-benzensulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid ligand olarak kullanıldığında keçi ve

manda sütünden saflaştırma hiç gerçekleştirilemediği gözükmektedir. Ligand olarak saflaştırılmada kullanılması uygun değildir. Bu moleküllerin 4-amino grubu dışında 3-amino gruplarının yapmış olduğu diazen bağlarının kararsız olması sebebi ile renkli bileşikler, dizonyum tuzları oluşmamakta veya çok kararsız olup reaksiyonun tam olarak enzim saflaştırılması için yeterli olmadığı anlaşılmaktadır.

Çalışılan moleküllerden hazırlanan kolonlardan elde edilen LPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Elektroforezin ilk kuyusuna molekül ağırlığı bilinen proteinler konuldu, diğer kuyulara ise keçi, manda LPO enzimleri konularak molekül ağırlıkları ve saflıkları kontrol edildi. Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16’dan görüldüğü gibi LPO enziminin literatürde belirtildiği gibi tek bant ve yaklaşık 80.0 kdal molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi (Çankaya *et al.* 2006).

5-amino-1-naftalinsülfonamid çalışılan moleküller içerisinde LPO saflaştırılmasında etkili olduğu bulunan molekülerden biridir. Hazırlanan afinite kolonundan saflaştırılan keçi ve manda sütü LPO enzimleri için kinetik parametreleri tespit etmek amacı ile yapılan çalışmalar sonucu aşağıdaki gibidir.

5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan manda LPO enzimi için optimum pH değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5-8 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm’de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.8’de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre manda sütünden elde edilen LPO için optimum pH’nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm’de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.9’da gösterildi. Bu grafikten çıkarılan sonuçlara göre manda sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu.

Manda LPO enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,1 mL, 0,5 mL, 0,8 mL, 1,1 mL ve 1,5 mL alındı. Her bir ABTS konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 mL H_2O_2 katılarak, spektrofometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regrasyon doğru denklemi kullanıldı, şekil 4.10'da verildiği gibi K_m ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi. K_m değeri 0,08, V_{max} değeri ise 0,52 olarak tespit edildi.

Manda LPO enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek amacıyla pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 10 mM NaH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak $+4^\circ C$ 'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde manda LPO enziminin stabil olduğu pH değeri Şekil 4.12'de gösterildiği gibi 8,0 olarak belirlendi.

5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonundan saflaştırılan keçi LPO enzimi için optimum pH değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5-8 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.8'de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre keçi sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.9'da gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre keçi sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu.

Keçi LPO enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,1 mL, 0,5 mL, 0,8 mL, 1,1 mL ve 1,5 mL alındı. Her bir ABTS konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 mL H_2O_2 katılarak, spektrofometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regrasyon doğru denklemi kullanıldı, Şekil 4.11'de verildiği gibi K_m ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi. K_m değeri 1,44, V_{max} değeri ise 0,09 olarak tespit edildi.

Keçi LPO enziminin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek amacıyla pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 10 mM NaH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak $+4^\circ C$ 'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde keçi LPO enziminin stabil olduğu pH Şekil 4.13'de gösterildiği gibi 5,5 olarak belirlendi.

Özet Sonuçlar Çizelge 5.1'de gösterildi.

Çizelge 5.1. 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları

Memeli Sütleri		
Parametreler	Keçi	Manda
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	17,5	113,23
Saflaştırma katsayısı	350,18	388,88
Optimum pH	5,5	5,5
Optimum Sıcaklık (°C)	70	70
K _m (mM)	1,44	0,08
V _{max} (EÜ/mL)	0,09	0,52
Stabil pH	5,5	8,0
Molekül ağırlığı (Da)	80,0	80,0

Hazırlanan 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonu için;

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

LPO enziminin saflaştırılmasında 5-amino-1-naftalinsülfonamid ile hazırlanan kolonun sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8 da 5, 10, 15, 20 ve 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.17'den görüldüğü gibi 5-amino-1-naftalinsülfonamid kolonu için uygun bağlanma sıcaklığı 10°C olarak tespit edildi.

LPO enzimi için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 6,8 ile 9,5 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.18'de grafik edildi. Buradan 5-amino-1-naftalinsülfonamid için pH:8,5 civarında maksimum bağlanma olduğu tespit edildi.

Kolonların bağlanma kapasitelerini etkileyen iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı ve bu iyonik şiddet 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi 5-amino-1-naftalinsülfonamid için 0,35 M konsantrasyonunda bağlanma maksimum olduğu belirlenerek hazırladığımız afinite kolonundan LPO enzimi için tutma kapasitesi testleri yapılmış oldu. 5-amino-1-naftalinsülfonilamid için 10°C'de pH 8,5'da 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 0,05 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sonuç Olarak;

1. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonamid, 4-amino-3-metil benzensülfonamid, 3-amino-4-klorobenzen-sülfonamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid, 3,4-diamino-benzen-sulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid, 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid moleküllerinin her biri için afinite jelleri sentezlendi. Bu jellerden keçi ve manda sütü LPO enzimleri için ilk defa tek kademedeki saflaştırma sonuçları verildi.

2. 3,4-diamino-benzen-sulfonamid, 6-aminopiridin-3-sulfonamid ve 4'-amino[1,1'-bifenil]-4-sulfonamid moleküllerinin LPO enziminin yeni inhibitörleri olduğu bulundu.

3. 5-amino-1-naftalinsülfonilamid afinite jelleri ile saflaştırılan keçi ve manda sütleri LPO enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreleri tespit edildi.

4. 5-amino-1-naftalinsülfonilamid kolonları için enzimin kolon bağlama kapasitesi sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplandı.

Bu kolonlardan saflaştırılan enzimlerin SDS PAGE gümüş boyama yapılarak saflığı gösterildi.

KAYNAKLAR

- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., Kufrevioglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136, 864–870.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214, 1302-1304.
- Axen, R., Ernback, S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *Eur. J. Biochem*, 18, 351-360.
- Barrett, N.E., Grendison, A.S., Lewis, M. J., 1999, Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy*, 66, 73.
- Bayse, G.S., Michaelis, A.W., and Morisson, M., 1972, Lactoperoxidase catalyzed iodination of tyrosine peptides. *Biochim. Biophys Acta*, 30, 284.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. *Biyokimya*. Palme Yayıncılık, 241-247, Ankara.
- Booth, KS, Kimura, S., Lee, HC., Ikeda-Saito, M., Caughey, WS., 1989. Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity binding site for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 879-902.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–251.
- Cals, M.M., Maillart, P., Brignon, G., Anglade, P., Dumas, B.R., 1991. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *European Journal of Biochemistry*, 198, 733–739.
- Chevallet, M., Luche, S., Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1, 1852–1858.
- Cuatrecasa, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059–3065.
- Çankaya, M., Şişecioğlu, M., Yörük, Ö., Özdemir, H., 2006. In Vitro Effects of Some Antibiotic Drugs on Bovine Lactoperoxidase Enzyme. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306.
- Daniel, R., Rao, L.D., and Mona, I.C., 1997. Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem*, 250, 10.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitro genens. *Biochemistry*, 16,472.
- Doumonted, C., and Rousset B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *J. Biological Chem*, 258, 141.
- Drew, J., 2000. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287, 1960–1964.
- Elagamy, E., Ruppanner, R., Ismail, A., Champagne, C.P., Assal, R., 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy. res*, 59, 169-175.

- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. In pirson, A. and Zimmerman, M.H.(Ed)., Encyclophedia of plant physiology, 4-17, New York.
- Haddain, M.S., İbrahim, S.A., and Robinson, R.K., 1996. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7, 149-152.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press,
- Jacob, B.M., Monoj, N.K., Haridas, M., 1998, Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology*. 31, 808.
- Jacob, B.M., Anthony, K.E., Sreekumar, B., Haridas, M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk. *Life Sciences Including Pharmacology Letter*. 66, 2433–2439.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya, Aktif Yayınları*, Erzurum, s. 97.
- Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Cryst*, D51, 1094.
- Kussendrager Klaas, D., van Hooijdonk, A.C.M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1, S19-S25
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Langbakk, B., Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Mecitoglu, C., Yemenicioglu, A., 2007. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry*, 104, 726–733.
- Metodiewa, D., Reszka, K., and Dunfurd H.B., 1989. Oxidation of the substituted catechols dihydroxyphenylalanine methyl ester and trihydroxyphenylalanine by lactoperoxidase and its compounds. *Arch. Biochem. and Biophy*, 274, 601.
- Metodiwa, D., Reszk, K., and Dunferd H.B., 1989. Evidence for a peroxidaticoxidation of Norepinephrine, catecholamine by lactoperoxidase. *Biochemicial Res.commun.*, 160, 1183.
- 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.
- Özdemir, H., Aygul, I., Kufrevioglu, O.I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125–134.
- Özdemir, H., Hacıbeyoglu, H.I., Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 143–155.
- Özdemir, H., Hacıbeyoglu, H.I., Kufrevioglu, O.I., 2003. Effects of the watermiscible organic solvents on lactoperoxidase purified from creek-water buffalomilk. *Biochemistry Moscow*, 68, 329–333.

- Özdemir, H., Uguz, M.T., 2005. In vitro effects of some anaesthetic drugs on lactoperoxidase enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 491–495.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Paul, K.G., Ohlsson, P.I., 1985. In the Lactoperoxidase System: Pruitt KM, and Tenovue YO, (Eds.) *Chemistry and Biological Significance*, New York, USA: Marcel Dekker Inc. p.15-29.
- Pütter, J., Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases* Bergmeyer, third edition, VCH, New York, s.286 .
- Reiter, B., HaÈrnulv, G., 1984. Lactoperoxidase antibacterialsystem: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724-732.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. Harper'ın *Biyokimyası*. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Segel, I.H., 1968, *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc, New York, s.403.
- Seifu, E., Buys, E.M., and Donkin, E. F. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in food science & technology*, 16.4, 137-154.
- Shin, K., Hayasawa, H., Lonnerdal, B., 2001. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immuno adsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 984–989.
- Shindler, J.S., Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 67, 1307.
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Atasever, A., Ozdemir, H., 2010. The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5, 1351–1356.
- Sisecioglu, M., Uguz, M. T., Cankaya, M., Ozdemir, H., Gulcin, I. 2011. Effects of ceftazidimepentahydrate, prednisolone, amikacinsulfate, ceftriaxone sodium and teicoplanin on bovine milk lactoperoxidase activity. *International Journal of Pharmacology*, 7, 79–83.
- Stadtman, E., 1992. Protein oxidation and aging. *Sciences*, 257, 1220-1224.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Clare, B.W., 2002. Bacterial protease inhibitors *Medicinal, Research Reviews*, 22, 329–372.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Thanabal, V., La Mar, GN., 1989. A nuclear overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 28, 7038-7044.

- Usanmaz, H., 2014. Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniğı ile Saflaştırılması. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity Chromatography of Carbonic Anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon’da doğdu. İlk,orta ve lise öğrenimini Trabzon’da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Bayburt Meslek Yüksek Okulu, Kimya Teknolojisi Bölümü’nden 2006 yılında mezun oldu. 2009 Yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünde laborant olarak çalışmaya başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitime başlayıp, 2012 yılında tamamladı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. Evli olup halen aynı bölümde çalışmaktadır.