



**BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ İLE
LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK
MEMELİ SÜTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI**

Neslihan MACİT

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR**

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ İLE LAKTOPEROKSİDAZ
ENZİMİNİN AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK MEMELİ
SÜTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI**

Neslihan MACİT

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ İLE LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK MEMELİ SÜTLERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Neslihan MACİT tarafından hazırlanan bu çalışma 19/01/2016 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...**04/02/2016** tarih ve...**6/49**... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ İLE LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK MEMELİ SÜTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI

Neslihan MACİT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada hidrazin türevi olan 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülleri laktoperoksidaz (LPO) enziminin saflaştırılmasında ligand olarak kullanıldı. CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B-L-tirozin matriksine ligandlar kovalent bağlanarak afinite kolonları hazırlandı. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid molekülü ile yapılan saflaştırma sonucunda LPO enzimi; keçi sütünden %1,54 verimle 41,62 kat, manda sütünden %12,83 verimle 137,5 kat, sığır sütünden %5 verimle 900 kat ve koyun sütünden %9,42 verimle 135,41 kat saflaştırıldı. 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile LPO; keçi sütünden %6,25 verimle 166,6 kat, manda sütünden %19,3 verimle 291,66 kat, sığır sütünden %15 verimle 1519 kat ve koyun sütünden %8,72 verimle 261 kat saflaştırıldı. 4-amino-3-klorobenzohidrazid afinite kolonundan ise keçi sütünden %19,8 verimle 260 kat, manda sütünden %35,3 verimle 580,6 kat, sığır sütünden %14,4 verimle 1321 kat saflaştırılırken koyun sütünden LPO enzimi %23,3 verimle 892,2 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant yaklaşık 80 kDa olarak bulundu. Bu sonuçlardan hareketle benzohidrazid moleküllerinin LPO enziminin saflaştırılmasında kullanılabileceği ilk defa bu çalışmada gösterildi. Çalışılan 3 molekül arasında 4-amino-3-bromo benzohidrazid molekülünün memeli sütlerinden LPO saflaştırılmasında kullanılabilmek potansiyeline sahip olduğu belirlendi. 4-amino-3-bromo benzohidrazid afinite kolonu için LPO'nun bağlanma kapasitesi 10°C'de pH:8,5 ve 0,40 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 0,110 mg/g jel olarak belirlendi.

2016, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktoperoksidaz, Benzohidrazid türevleri, Afinite kromatografisi

ABSTRACT

Ms Thesis

PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE ENZYME FROM MAMMALS MILK BENZOHYDRAZIDE DERIVATIVES PREPARED BY USING AFFINITY TECHNIQUE

Neslihan MACİT

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this study, 4-amino-2-methoxybenzohydrazide, 4-amino-3-bromobenzohydrazide and 4-amino-3-chlorobenzohydrazide molecules which were hydrazine derivatives were used in purification of Lactoperoxidase (LPO) as affinity chromatography ligands. Affinity columns were prepared by binding ligand molecules to Sepharose-4B-L-tyrosine matrix activated by CNBr. The purification values of LPO enzyme 4-amino-2-methoxybenzohydrazide molecule from goat, buffalo, cow and sheep milks were determined to be 41,62 fold with a yield of 1,54%, 137,5 fold with a yield of 12,83%, 900 fold with a yield of 5% and 135,41 fold with a yield of 9,42%, respectively. LPO enzyme purified using 4-amino-3-bromobenzohydrazide from goat, buffalo, cow and sheep milks 166,6 fold with a yield of 6,25%, 291,66 fold with a yield of 19,3%, 1519 fold with a yield of 15% and 261 fold with a yield of 8,72%, respectively. When 4-amino-3-chlorobenzohydrazide column was used, purified LPO enzyme values obtained from goat, buffalo, cow and sheep milks were found as 260 fold with a yield of 19,8%, 580,6 fold with a yield of 35,3%, 1321 fold with a yield of 14,4% and 892,2 fold with a yield of 23,3%, respectively. The purities of the enzymes were checked by SDS-PAGE and one band was found about 80 kDa. The results obtained from present study showed that benzohydrazide molecules will be used in purification of Lactoperoxidase (LPO). In addition, it was determined that 4-amino-3-bromobenzohydrazide molecule among the 3 molecules was more effective than other molecules in purification of Lactoperoxidase (LPO) from ruminant milks. For 4-amino-3-bromobenzohydrazide column the binding capacity of the LPO at 10°C, pH 8.5 and 0.40 M ionic strength, concentration was determined as 0.110 mg/g gel.

2016, 60 pages

Keywords: Lactoperoxidase, Benzohydrazide derivatives, Affinity chromatography

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca çalışmalarım için gerekli tüm olanakları sağlayan, teşvikleriyle beni araştırmaya yöneltten, kıymetli fikirleriyle bana yön veren, bu sürecin her aşamasında yanımda yer alarak söz konusu tezin çıkarılmasında büyük katkıları bulunan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarını benden esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İrfan KÜFREVIÖĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın farklı aşamalarında doğrudan yardımlarını gördüğüm Ziraat Fakültesi Dekan Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Mevlüt KARAOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Zeynep KÖKSAL'a, Uzman Songül BAYRAK'a, araştırma laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma, gösterdiği sabır ve manevi desteği için nişanlım Yakup KAVAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Neslihan MACİT

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktoperoksidaz	2
1.2. Afinite Kromatografisi	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. Çalışmanın Amacı	8
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. Çözeltilerin hazırlanması.....	11
3.1.3.a. Afinite kolonunun sentezinde kullanılan çözeltiler	11
3.1.3.b. Kolondan LPO saflaştırmada kullanılan çözeltiler	12
3.1.3.c. Memeli sütlerinden homojenat hazırlamada kullanılan çözeltiler.....	12
3.1.3.d. LPO aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	12
3.1.3.e. Protein tayininde kullanılan çözelti	13
3.1.3.f. SDS-PAGE elektroforez çözeltileri	13
3.1.3.g. Gümüş boyama için hazırlanan çözeltiler	13
3.2. Yöntemler.....	14
3.2.1. Protein tayini	14
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	14
3.2.1.b. Bradford metodu ile protein tayini	14
3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite metodu	15
3.2.3. Benzohidrazid türevi moleküller	16

3.2.4. İnhibitör çalışmaları	17
3.2.4.a. Benzohidrazid türevlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi.....	17
3.2.4.b. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin sentezlenmesi	18
3.2.4.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	18
3.2.4.d. Benzohidrazid türevlerinin kenetlendirme reaksiyonları	19
3.2.4.e. Sentezlenen afinite kolonunun paketlenmesi	21
3.3. Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Süt Homojenatlarından Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması	21
3.3.1. Amberlite CG 50 H ⁺ reçinesi ile kısmi saflaştırma	21
3.3.2. Sentezlenen afinite kolonuna homojenat tatbiki ve elüsyonu	21
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinin Uygulanışı	22
3.5. Saflaştırılan Memeli LPO Enzimleri İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar	23
3.5.1. Optimum pH belirlenmesi	23
3.5.2. Optimum sıcaklık belirlenmesi	23
3.5.3. K _m ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi.....	23
3.6. Sentezlenen Afinite Kolonlarının Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	24
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesi üzerine etkisi	24
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesi üzerine etkisi	24
3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesi üzerine etkisi.....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	26
4.1.1. Bradford protein tayininde hazırlanan standart grafik	26
4.2. İnhibitörlerin K _i ve IC ₅₀ Parametrelerinin Belirlenmesi.....	27
4.2.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar	28
4.2.2. 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar	32
4.2.3. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar	36
4.3. Memeli Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Parametre ve SDS-PAGE Sonuçları	40

4.3.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile bulunan kinetik parametreler	40
4.3.2. pH-aktivite grafiğinin belirlenmesi	40
4.3.3. Sıcaklık-aktivite grafiğinin belirlenmesi	41
4.3.4. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi.....	41
4.4. Memeli Sütleri LPO Enzimleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar	43
4.5. Memeli LPO Enzimlerinin SDS-PAGE Gümüş Boyama Sonuçları.....	45
4.5.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun manda sütleri LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları	45
4.6. Sığır Sütünden 4-amino-3-bromobenzohidrazid Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	45
4.6.1. Kolon kapasitesi üzerine sıcaklık etkisi	45
4.6.2. Kolon kapasitesi üzerine pH'nın etkisi	46
4.6.3. Kolon kapasitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi.....	47
5. TARTIşMA ve SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİş	61

SİMGELER VE KISALTMALAR 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
IC ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	4
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin sentezlenmesindeki reaksiyonların basamakları	18
Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-3-bromobenzohidrazid kenetlendirilmesi	19
Şekil 3.3. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-3-klorobenzohidrazid kenetlendirilmesi	20
Şekil 3.4. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-2-metoksibenzohidrazid kenetlendirilmesi	20
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	26
Şekil 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	28
Şekil 4.3. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-3-bromobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	30
Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-Amino-3-klorobenzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	32
Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-Amino-3-klorobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	34
Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-2-metoksibenzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	36
Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-2-metoksibenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	38
Şekil 4.8. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği	40

Şekil 4.9. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği.....	41
Şekil 4.10. Manda sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	42
Şekil 4.11. Koyun sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	42
Şekil 4.12. Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	43
Şekil 4.13. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda LPO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı.....	45
Şekil 4.14. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği	46
Şekil 4.15. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği.....	46
Şekil 4.16. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Peroksidaz enzim türleri ve bulunduğu hücreler	2
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diazonyum tuzu oluşturabilen benzohidrazid türevleri ve açık kimyasal yapıları	17
Çizelge 4.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid inhibitörü ile afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	28
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 4-amino-3-bromobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	29
Çizelge 4.3. Laktoperoksidaz enzimi üzerine 4-amino-3-bromobenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	30
Çizelge 4.4. 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	31
Çizelge 4.5. 4-Amino-3-klorobenzohidrazid inhibitörü ile afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	32
Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 4-Amino-3-klorobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	33
Çizelge 4.7. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 4-Amino-3-klorobenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	34
Çizelge 4.8. 4-Amino-3-klorobenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları.....	35
Çizelge 4.9. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid inhibitörü ile afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	36
Çizelge 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-2-metoksibenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	37
Çizelge 4.11. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 4-Amino-2-metoksibenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	38

Çizelge 4.12. 4-Amino-2-metoksibenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları	39
Çizelge 4.13. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	43
Çizelge 4.14. Sığır ve manda sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları.....	43
Çizelge 4.15. Keçi ve koyun sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları.....	44
Çizelge 4.16. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimi toplu kinetik sonuçları.....	44
Çizelge 5.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları	54

1. GİRİŞ

Benzohidrazid ve türevleri yapılarında -CO , -NH- ve -NH₂ fonksiyonel moleküllerini barındıran polifonksiyonel moleküllerdir. Bu bileşiklerin birçok reaksiyonunda -NH₂ nükleofil olarak hareket eder (Campodónico *et al.* 2009). Hidrazinler R(Ar)NHNH₂ yapısında kuvvetli bir indirgen olup sulu çözeltilerinde bazik moleküllerdir. Boya, mürekkep, kauçuk ve plastik ürünlerde, patlayıcı maddeler, mantar öldürücü ilaçların yapımında, su arıtmada korozyon önleyici olarak, aromatik aminlerin stabilizasyonu işlemlerinde kullanılmaktadırlar (Schirmann 1989).

Primer aminlerin aldehit ve ketonlarla reaksiyonu sonucu iminler oluşur. Bir karbon veya azot atomunun aril grubuna bağlanmasıyla oluşan iminler Schiff bazı olarak adlandırılır ve ilk olarak Schiff tarafından sentezlenmiştir. Bu bileşikler aktivitelerinin geniş spektrumlarından dolayı biyoloji ve kimya alanında geniş bir yelpazeye sahiptir. Bunlar ev sineklerini dezenfekte edici, bitki büyümesini düzenleyici, rodentisit, böcek öldürücü ve herbisit olarak kullanılmaktadır (Maheswari and Manjula 2015).

Hidrazinlerin keton ya da aldehitlerle reaksiyonu sonucu oluşan hidrazon bileşikleri ilaç ve tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Bu bileşiklerin antimikrobiyal, antidepresan, analjezik, antiinflamatuvar, antitümör, anti-HIV, antikanser, antikonvülsan, antitüberküloz, antisıtma gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır (Raja *et al.* 2010). Bir azometin protonu teşkil eden -NHN=CH- yapısına sahip olan hidrazonlar yeni ilaç gelişimi için önemli bir bileşik sınıfını oluşturmaktadır. Birçok araştırmacı bu yapıları hedef alarak bileşikler sentezlemiş ve biyolojik aktivitelerini değerlendirmiştir. Bu çalışmalar çeşitli biyolojik aktiviteye sahip yeni hidrazonlar geliştirilmesine rehber olmuştur (Allen *et al.* 1987; Maheswari *et al.* 2014).

Oksidoredüktaz olan peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7) prokaryotlarda, ökaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunan enzimlerdir. Bu enzimlerin birçok hücre tipinde olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin yaygın olarak

maya, mantar, bitki, bakteri, turp, lökosit, trombosit, karaciğer, dalak, uterus, akciğer, sitoplazma, mitokondri (Pütter and Becker 1987), süt, tükürük ve göz yaşında bulunmasının yanısıra (Kumar and Bhatla 1995) spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Huystee 1987). POD enzimlerinin yaygın kullanımları sebebi ile dokulardan izolasyonu, karakterizasyonu, inhibisyonu ve aktivasyonu üzerine yapılan çok çalışma vardır. Peroksidazlar ticari amaçla fenolik reçinelerin sentezinde, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör olarak ve tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında malzeme olarak kullanılmaktadır. Ayrıca peroksidaz enzimlerinin kimya, ilaç ve gıda sanayilerinde son yıllarda kullanım alanları dikkat çekmektedir (Kwak 1996).

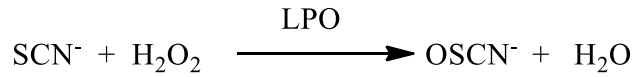
Çizelge 1.1. Peroksidaz enzim türleri ve bulunduğu hücreler

Enzim	Bulunduğu hücreler
Laktoperoksidaz	Süt, gözyaşı, tükürük
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	Karaciğer mitokondri hücrelerinde
Miyeloperoksidaz	Lökositler
Tiroidperoksidaz	Tiroid
Katalaz	Bütün canlılar
Sitokrom c peroksidaz	Sitokrom
Bitki peroksidazları	Bitki kök, mantar

1.1. Laktoperoksidaz

Laktoperoksidaz (LPO: E.C.1.11.1.7), tüm memeli sütlerinde bulunan bir peroksidazdır (Vasavada and Cousin 2005). Sütten izole edilen peroksidaz enzimi tükürük ve gözyaşında bulunan peroksidazlar ile benzer özellik göstermektedir (Reiter and HaÈrnulv 1984). Laktoperoksidazın molekül ağırlığı yaklaşık 78 kDa olup ve 612 aminoasit zincirinden ibaret, %8-10 karbohidrat içeren bir glikoproteindir, prostetik grup olarak ise hem grubu içerir (Pourtois *et al.* 1991; Atamer *et al.* 1999; Kussendrager

and Hooijdkank 2000). LPO hidrojen peroksit varlığında moleküllerin oksidasyonunu katalizleyerek geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip ürünlerin üretilmesini sağlamaktır. Enzimin antimikrobiyal etkiyi göstermesi için psödo halojen, tiosiyanat veya halojenlerin substrat olarak görev alması gerekmektedir (Reiter and HaÈrnulv 1984; Reiter and Perraudin 1991).



Laktoperoksidaz sisteminin bakteriyal inhibisyonda sitoplazmik membrana etki etmesi reaksiyonla oluşan hipotiyosiyanat (OSCN^-) iyonunun enzimlerin serbest SH gruplarına bağlanıp pH düşüşüne, potasyum ve aminoasitlerin hücreden sızmasına neden olması ile olur. Bu durum karbohidratların, aminoasitlerin ve diğer besin elementlerinin hücreye alınımını engeller, çünkü bunların transfer mekanizmaları inhibe edilmiş olur. Ayrıca hücrenin DNA ve RNA sentezleri bozulur. Laktoperoksidazın antimikrobiyal etkisine ek olarak, çeşitli kanserojenlerin bozulmasına yol açtığı ve peroksidatif etkilere karşı hayvan hücrelerini koruduğu da bilinmektedir (Seifu *et al.* 2005).

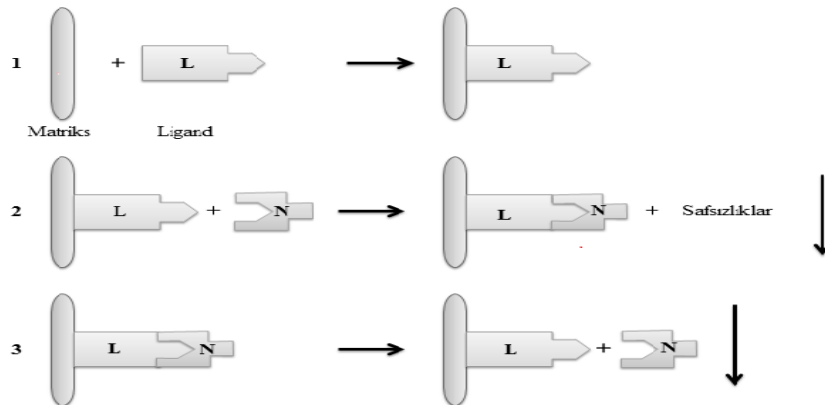
Laktoperoksidazın çok geniş uygulama alanları vardır. Örneğin süt endüstrisinde nakil esnasında sütün muhafazası (Barrett *et al.* 1999), çig sütlerin toplanması ve işleme merkezlerine ulaştırılması sırasında yeterli soğutma olanağı bulunmayan gelişmekte olan ülkelerde kullanılması önerilmektedir (Gonzalez-Chavez *et al.* 2009). Sütteki SCN^- seviyesinin iyot eksikliğinde, tiroid fonksiyonu üzerinde etkisi bulunmaktadır. LPO'nun çocuk felci virüsünü ve ineklerde çiçek hastalığı virüsünü öldürdüğü LPO sistemi ile gösterilmiştir. Bu özel virüsler ısı, kurutma, dezenfektan etkilerine karşı diğer virüslere kıyasla çok daha fazla dayanıklıdırlar (Levay and Viljoen 1995). İn vitro bulgular, LPO/ H_2O_2 /Halojenür sisteminin HIV-1'e karşı güçlü bir virüsidal aktivite sağladığını da göstermektedir (Seifu *et al.* 2005).

LPO H_2O_2 mevcudiyetinde fenol, aromatik amin, pirogallol, askorbat ve en yaygın substratları arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), guaiacol ve katekol gibi basit fenoller sayılabilir (Shindler and Bardsley 1975; Metodiewa *et al.* 1989; Daniel *et al.* 1997). Ayrıca hidrazinler tarafından da inhibe edildiği bilinmektedir (Kumar and Bhatla 1995). Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sıgır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge 1986).

1.2. Afinite Kromatografisi

Saflaştırma prosedürleri içerisinde en çok tercih edilen afinite kromatoğrafisi olup, biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını esas alarak spesifik ve tek kademedede saflaştırma yapma imkanı sağlar. Bu yöntemde, dolgu maddesi olarak matriks bileşiği, bir bağlanma bileşiğine (ligant) kovalent olarak immobilize edilebilir. Saflaştırılacak molekülün liganda spesifik ve tersinir olarak bağlanması gerekir. Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırmalarda saflaştırma katsayısı hem çok yüksek olur hemde kolon defalarca kullanılabilir (Wilchek *et al.* 1984). Bu tekniğin genel prensibi Şekil 1.1'de gösterilmektedir.

Afinite kromatografisinin genel prensibi:



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi

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

Bu teknikte matriks olarak Sephadex, Sepharose, Bio-gel gibi polimerler tercih edilmektedir. Bu şeker polimerlerinde hidroksil grupları, ligandın kovalent bağlanmasında istenilen bir grupla türevlendirilebilir. Afinite kromatografisi spesifik etkileşmelere bağlı olduğundan kullanılan polimerlerin yüksek spesifik bir adsorbsiyon göstermesi gerekir ve genelde sepharose jeli tercih edilir.

Ligand ile saflaştırılacak madde arasında spesifik ve tersinir bağlama afinitesi olmalıdır. Ligandların, serbest çözeltilerde 10^{-4} - 10^{-8} M arasında maddeyi bağlama afinitesine sahip olması arzu edilen aralıktır (Cuatrecasas *et al.* 1968).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

LPO enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve inhibisyon çalışmaları ilgili çeşitli prosedürler literatürde verilmiştir (Dumonted and Rousset 1983). Bu çalışmalarda antibakteriyal etki gösteren LPO sistemi üzerine yoğunlaşmış bu amaçla enzim saflaştırma yöntemleri üzerine en kısa sürede ve tek basamakta saflaştırma çalışmaları üzerine araştırmalar yapılmıştır.

LPO enzimin memeli sütlerinden saflaştırılmasında; kromatografik yöntemler arasında, biyo afinite, hidrofobik afinite kromatoğrafisi, CM-Selüloz (Morrison and Hultquist 1963), CM-Sefadeks, iyon-değişim kromatoğrafisi (Morrison and Hultquist 1963; Ozdemir *et al.* 2001; Uguz ve Özdemir 2005) Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatoğrafisi (Morrison and Hultquist 1963; Shin *et al.* 2001), Fenil-Sefaroz CL-4B üzerinde hidrofobik afinite kromatoğrafisi (Langbakk and Flatmark 1989) ve Toyopearl-SP katyon değişim kromatoğrafisi yer almaktadır (Shimazaki *et al.* 1988).

Laktoperoksidazın memeli sütlerinden, örneğin insan (Langbakk *et al.* 1989; Shin *et al.* 2001), sığır (Xiao *et al.* 2007), manda (Ozdemir *et al.* 2002), keçi (Jacob *et al.* 2000), koyun (Joseph *et al.* 2004), tükürük (Monson *et al.* 1988; Welk *et al.* 2011) ve gözyaşından (Galijasevic and Hodzic 2014) LPO saflaştırılması yapılarak enzimin bazı kinetik özellikleri araştırılmış, ortalama aktivitesi ise insanda 0.06-0.97 Units/mL, koyunda 1.4 Units/mL, kuzuda 0.34-2.38 Units/mL, keçide 1.5-4.45 Units/mL, mandada 0.794 Units/mL ve domuzda 22 Units/mL olarak belirlenmiştir (Seifu *et al.* 2005).

Laktoperoksidaz enziminin süttten saflaştırılması için yapılan çalışmada ilk olarak ham sığır sütündeki kazein, litre başına 10 mg rennet ilave edilerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatantın her bir litresine 40 ml Amberlit CG-50 (NH₄⁺) ilave edilerek karıştırılmış ve reçine önce su ile daha sonra 50 mM'lık sodyum asetat tamponuyla yıkandıktan sonra 500 mM'lı asetat tamponu ile elüe edilmiştir. Elüatlara amonyum sülfat ile protein

çöktürmesi yapılarak elde edilen çözelti santrifüj edilip, çökelek 100 mM'lık sodyum asetat tamponunda çözülerek hem grubu ihtiva eden ve hem grubu ihtiva etmeyen ham LPO elde edilmiştir. Sephadex G-25 kolonu ile ortamdan uzaklaştırılan amonyum sülfattan sonra LPO Amberlit CG-50 kolonuna yüklenerek 0,1-1 M sodyum asetatla gradientli elüsyon yapıp 3,2 mM'lık asetat tamponunda saklanmıştır (Doumonted and Rousset 1983).

Bir başka çalışmada ise yağı alınmış ham sığır sütü ilk olarak Amberlit CG-50 (4,4 g/150 mL) reçinesi ile bir saat boyunca karıştırılıp, önce su sonra 20 mM'lık sodyum asetat tamponuyla yıkanıp buchner erleninde 500 mM asetat tamponuyla yıkanarak ham LPO elde edilmiştir (Uguz and Özdemir 2005). %90'lık amonyumsülfat ile çöktürme yapılarak santrifüj edilmiştir. Ürün CM-Sephadex kolonuna yüklendikten sonra 100 mM-200 mM NaCl ihtiva eden 10 mM'lık fosfat tamponuyla gradientli elüsyon yapılmıştır. Bütün elüatlar %90 doyumlukta amonyum sülfat ile çöktürüldükten sonra elde edilen ürün Sephadex G-100 kolonuna yüklenip 100 mM'lık fosfat tamponuyla elüe edilerek, 1M'lık fosfat tamponu pH=6,8'de saklanmıştır (Sisecioglu *et al.* 2010).

2013 yılında geliştirilen yöntemde CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye sülfanilamid ligandı kenetlenerek kolon sentezlenmiş, ardından yağı alınmış süt zayıf katyon değiştirici Amberlit CG-50 H⁺ reçinesi kullanılarak kısmi saflaştırılmıştır. CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna tatbik edilen süt homojenatından tek kademedede LPO saflaştırılması %61,3 verimle 409,00 kat gerçekleştirilmiştir (Atasever *et al.* 2013).

Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada ise sülfanilamid türevlerinin ligand olarak kullanılması ile memeli sütlerinden LPO saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ligandlardan 5-amino-2-metilbenzensülfonamid molekülü ile sığır sütünden LPO enzimi tek basamakta %82,68 verimle 1059,37 kat; manda sütünden %34,67 verimle 509,09 kat; koyun sütünden %14,35 verimle 232,55 kat ve keçi sütünden ise %11,30 verimle 161,90 kat saflıkta; 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü ile sığır sütünden %12 verimle 453,12 kat, manda sütünden %20,34 verimle 151,86 kat,

koyun sütünden %13 verimle 869,00 kat ve keçi sütünde ise %32,25 verimle 447,57 kat saflıkta; 5-amino-1-naftalinsulfonamid ile sığır sütünden %23 verimle, 353,65 kat; manda sütünden %3,48 verimle 388,88 kat; koyun sütünden %18 verimle 328,50 kat ve keçi sütünde ise %5,45 verimle 350,18 kat saflıkta saflaştırılmıştır (Usanmaz 2014; Köksal 2015).

Literatüre baktığımızda POD'un inhibitörleri arasında hidrazinlerin yer aldığı görülmektedir (Kumar and Bhatla 1995). 4-aminobenzohidrazid molekülü ile bitki POD enziminin afinite kromatografisi tekniği ile karaturp (*raphanus sativus* L.) ve şalgamdan (*brassica rapa* L.) saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Kalın *et al.* 2014). LPO enzimi üzerine hidrazinlerin inhibisyon etkisi olması bilinmesine rağmen LPO saflaştırılmasında kullanılma potansiyeli üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.1. Çalışmanın Amacı

Bu tez kapsamında;

1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid, 4-amino-3-klorobenzohidrazid, 4-amino-2-metoksibenzohidrazid molekülleri kullanılarak önceden saflaştırılmış sığır LPO enzimi üzerine inhibisyon kinetikleri çalışıldı. Bu amaçla IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipleri belirlendi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerden Sefaroz-4B matriksi kullanılarak afinite jelleri sentezlendi,
2. Hazırlanan afinite jellerinden laktoperoksidaz enzimi memeli sütlerinden ilk defa saflaştırıldı ve daha önce saflaştırmada kullanılan sülfanilamid türevleri ile hazırlanmış afinite kolonları ile mukayese edildi,
3. Hazırlanan afinite jelleri ile memeli sütlerinden LPO enziminin saflaştırılması yapılarak kinetik parametreler; optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri tespit edildi,
4. Saflaştırılmada kullanılma potansiyeli olan afinite kolonlarının bağlanma kapasiteleri üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreler hesaplandı ve

mevcut yapılmış sülfanilamid türevleri ile hazırlanan kolon ile tüm parametreler mukayese edildi.



3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-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, L-Tirozin, trihidroksimetilaminometan (Tris), etanol, metanol, molekülleri Sigma Chemical Company'den; sodyum sülfat, sodyum dodesilsülfat (SDS), sodyum perklorat, gümüş nitrat, hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit, izoproponal E. Merk AG'den; potasyum fosfat, sodyum hidroksit, triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; glisin ICN Biomedicals. Inc.'den memeli sütleri piyasadan sağlandı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım.

Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800
pH metre	Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez cihazı	Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	Ismatec
Karıştırıcı	IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	Denver Instrument

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

3.1.3. Çözeltilerin hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir. Kullanılan su, saf sudur.

3.1.3.a. Afinite kolonunun sentezinde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO_3 çözeltisi (pH=10): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO_3 200 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH=10'a kadar titre edildi, toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO_3 çözeltisi (pH=8,8): 0,84 g (0,01 mol) NaHCO_3 80 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH=8,8'e kadar titre edildi, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. 10 mM NaH_2PO_4 (pH=6,8): 6 g (0,05 mol) NaH_2PO_4 , 450 mL destile suda çözülerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Kolondan LPO saflaştırmada kullanılan çözeltiler

1. Dengeleme Tamponu: 10 mM NaH₂P0₄ (pH=6,8): 12 g (0,1 mol) NaH₂P0₄, 950 mL destile suda çözümlenerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, son hacim destile suyla 1 L'ye tamamlandı.
2. Yıkama Tamponu: 25 mM fosfat (pH= 6,8): 1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄, 350 mL destile suda çözümlenerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, son hacim destile suyla 400 mL'ye tamamlandı.
3. Elüsyon Tamponu: 1 M NaCl/25 mM fosfat (pH=6,8): 11,7 g (0,2 mol) NaCl 150 mL destile suda çözümlenip, 1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ çözeltiliye ilave edildi. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edilip, son hacim destile suyla 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Memeli sütlerinden homojenat hazırlamada kullanılan çözeltiler

1. 5 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Reçinenin şişirilmesinde kullanılan çözeltili): 0,4 g (0,005 mol) NaCH₃COO, 950 mL destile suda çözümlenerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.
2. 20 mM NaCH₃COO pH=6,8 (Süt-reçine karışımını yıkamada kullanılan çözeltili): 0,1968 g (2,4 mmol) NaCH₃COO, 100 mL destile suda çözümlenerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, son hacim destile suyla 120 mL'ye tamamlandı.
3. 2 M NaCH₃COO pH=6,8 (Enzimin elüsyonu için kullanılan çözeltili): 19,68 g (0,24 mol) NaCH₃COO, 50 mL destile suda çözümlenerek, 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi ve son toplam hacim destile suyla 60 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. LPO aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaH₂P0₄ pH=6,0 (Enzim aktivite tayini ve ABTS hazırlamada kullanılan tampon): 12 g (0,1 mol) NaH₂P0₄ 950 mL destile suda çözümlenerek, 1 M NaOH ile pH:6,0'ya kadar titre edilip son hacim destile suyla 1 L'ye tamamlandı.
2. 1 mM ABTS çözeltilisi: 0,055 g (1.10⁻⁴ mol) ABTS tartılarak, 100 mL 0,1 M NaH₂P0₄ pH=6,0 tamponu içinde çözüldü.

3. 3,2 mM H₂O₂ çözeltisi: %30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H₂O₂'den 32 µL alınıp son hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Protein tayininde kullanılan çözelti

Bradford metodu ile proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan boya Coomassie brilliant blue G-250'dir. Bu boyadan 100 mg tartılıp, 50 mL %95'lik etanolde çözülür, %95'lik 100 mL fosforik asit çözeltiye ilave edilip, son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.f. SDS-PAGE elektroforez çözeltileri

1. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözülerek, 1 M HCl ile pH=8,8'e ayarlanıp, son 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 çözülür, 1 M 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 karıştırılır. Numune tamponu kullanılmadan hemen önce 950 µL 'sine 50 µL β-merkaptotanol ilave edilir ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.
4. Yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL saf suda çözülür, 5 mL %10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlanır.

3.1.3.g. Gümüş boyama için hazırlanan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 60 mL saf su, 30 mL %96'lik etanol, 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
2. Redüksiyon çözeltisi: Önce 45 mL etanol ve 80 mL saf su karıştırılır, sonra 4,8 g sodyum asetat ilave edilip, asetik asitle pH 6'ya ayarlanır, ardından 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit eklenip hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mL saf suya 30 µL formaldehit karıştırılıp, içine 100 mg gümüş nitrat ilave edilmesiyle hazırlandı.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat tartılıp 270 mL saf su'da çözülür ve üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin ile 250 mL'lik %5'lik asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

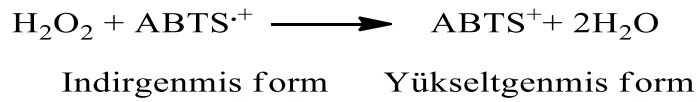
Warburg metodu ile kalitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntemin esası 280 nm'de aromatik aminoasitlerden özellikle tirozinin UV ışınlarını absorblamasına dayanır (Segel 1968).

3.2.1.b. Bradford metodu ile protein tayini

Saflaştırılan enzim ve hazırlanan memeli süt homojenatlarındaki protein miktarları Bradford metodu ile belirlendi. Bu yöntemin hassasiyeti (1-100 µg) arasındadır. Boya olarak negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır, protein üzerindeki pozitif yüke bağlanarak, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Bütün tüplere 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilir, saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanır ve (1 mL/1 mg)'lık standart sığır albumin çözeltisi hazırlanarak sırasıyla tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konulup vorteks ile karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyondan sonra 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ve 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlanır (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Laktoperoksidaz aktivite metodu

Substrat olarak kullanılan 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS)'nin H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve 412 nm'de absorbans artışının izlenmesine dayanır (Shindler and Bardsley 1975).



Numune küveti: 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 1 mM'lık ABTS çözeltisinden 2,8 mL, 3,2 mM'lık H_2O_2 çözeltisinden 0,1 mL ve enzim çözeltisinden 0,1 mL ilave edilir. Kör olarak numune küvetinden farklı olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M fosfat tamponu pH=6,0 konulur. Spektrofotometrede köre karşı 3 dakika süreyle 412 nm'de absorbans artışı okunur.

Lambert-Beer yasasından yararlanarak aktivite enzim ünitesi cinsinden hesaplandı. Aktivite hesabında 1 dakikalık absorbans artışı esas alınmıştır.

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

A = Absorbans

b = Işık mesafesi (1 cm)

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

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

D_f = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı ($\mu\text{mol /mL.dk.}$)

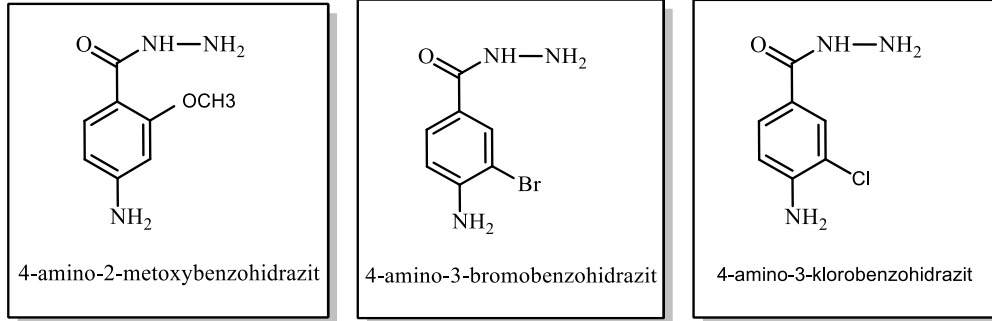
1 enzim ünitesi: 20°C'de 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarıdır.

3.2.3. Benzohidrazid türevi moleküller

LPO enziminin inhibitörlerini belirlemek adına yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Doerge 1986; Kumar and Bhatla 1995). Bu çalışmalar ile bazı moleküllerin örneğin opipramol, lofepramine, dibenzepin, protriptilin, melitrasen, butriptyline, dimetacrine, dosulepin, quinipramine, alaproclate, etoperidone, moclobemide, toloxatone, izokarboksiazit, antidepresanlar; viloxazine, minaprine, bifemelane, oxaflozane, medifoxaminenin inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. LPO enziminin inhibitörleri arasında mikroorganizmaları öldüren ve gelişmesini baskılayan sülfanilamid molekülünde bulunmaktadır. Ayrıca enzimin hidrazinler tarafından da inhibe edildiği belirtilmiştir (Kumar and Bhatla 1995). Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sığır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Doerge 1986). Aromatik 4-amino benzohidrazid molekülleri kullanılarak afinite kromatografisi ile karaturp ve şalgam POD enzimi saflaştırılmıştır (Kalin *et al.* 2014).

Bu verilerden yola çıkarak diazonyum tuzu oluşturabilecek bazı aromatik benzohidrazid moleküllerinin önce sığır LPO enzimi üzerine inhibisyonları araştırıldı. Bu amaçla; Çizelge 3.1'den görüldüğü gibi sığır LPO enzimi üzerine 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid, 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülleri kullanıldı. Dönüşümlü inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin herbiri için afinite kolonları sentezlenerek memeli LPO enzimlerinin saflaştırılması sağlandı.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diazonyum tuzu oluşturabilen benzohidrazid türevleri ve açık kimyasal yapıları



3.2.4. İnhibitör çalışmaları

3.2.4.a. Benzohidrazid türevlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi

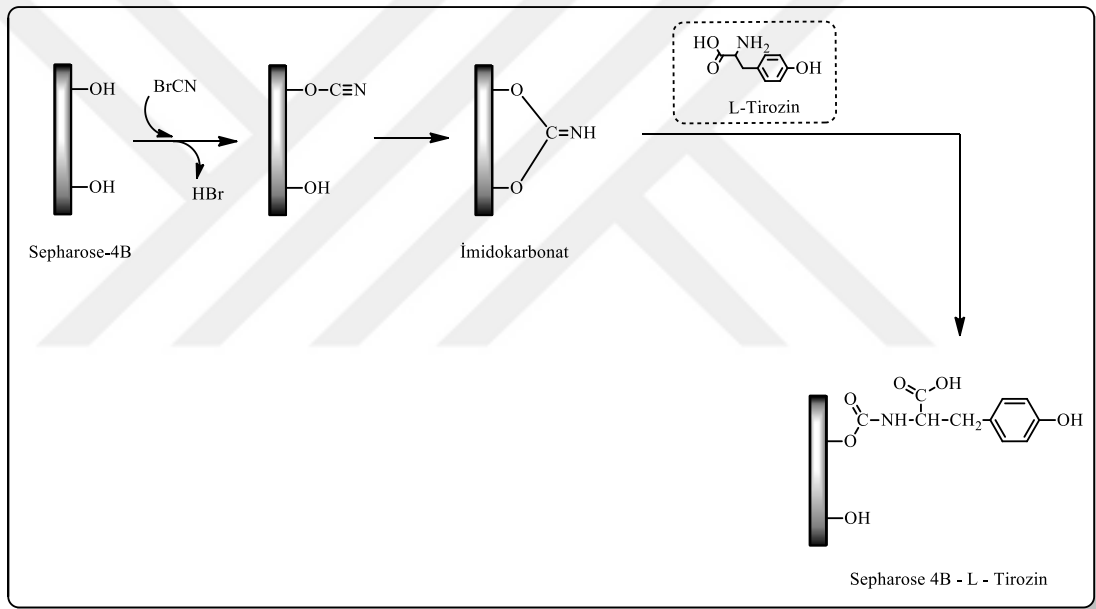
Sefaroz-4B-L-tirozin-5-amino-2-metilbenzosülfonamid afinite kolonundan saflaştırılmış sığır laktoperoksidaz enzimi üzerine, 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid, 4-amino-3-klorobenzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetiklerini incelemek için enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) ve K_i parametreleri belirlendi.

Sabit ABTS konsantrasyonu ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonu ile aktivite değerleri hesaplanarak her bir inhibitör için, %Aktiviteye karşı inhibitör konsantrasyonu grafik edilip buradan %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu bulunur. K_i değerini belirlemek adına 5 farklı sabit substrat konsantrasyonu ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında aktivite değerleri tespit edilip Linewaver–Burk grafikleri yardımıyla K_i değerleri tespit edildi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren türevler Sefaroz-4B matriksine bağlanarak afinite jelleri sentezlendi.

3.2.4.b. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin sentezlenmesi

Matriks olarak kullanılan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin kovalent takılmıştır. Benzohidrazid türevleri ise diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. 4-aminobenzohidrazid kısmı enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre sentezlenmiştir:

3.2.4.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

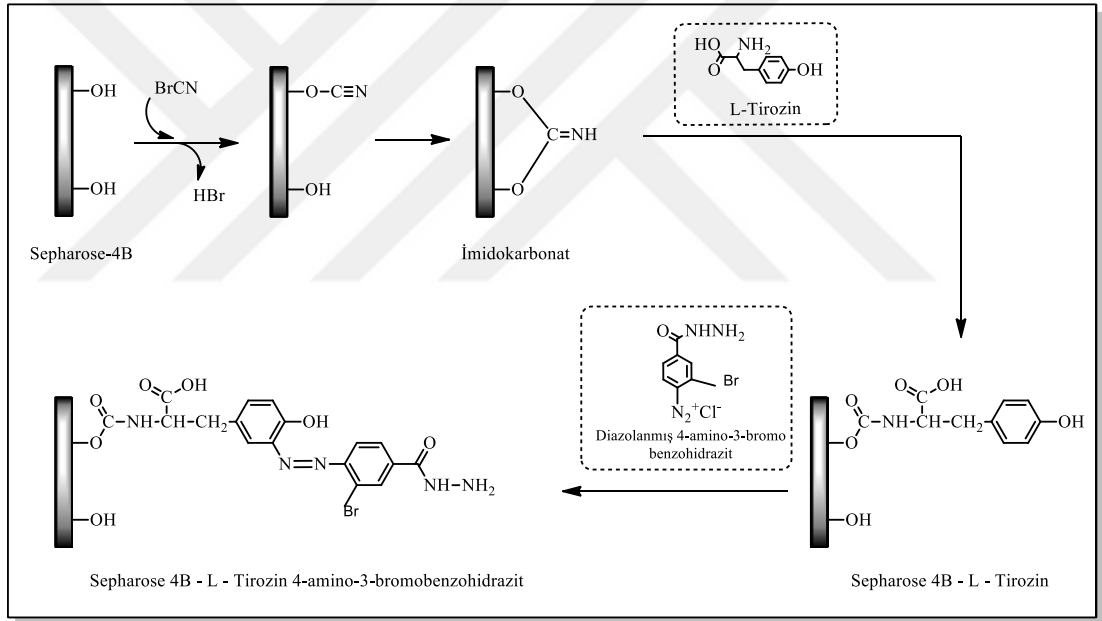


Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin sentezlenmesindeki reaksiyonların basamakları

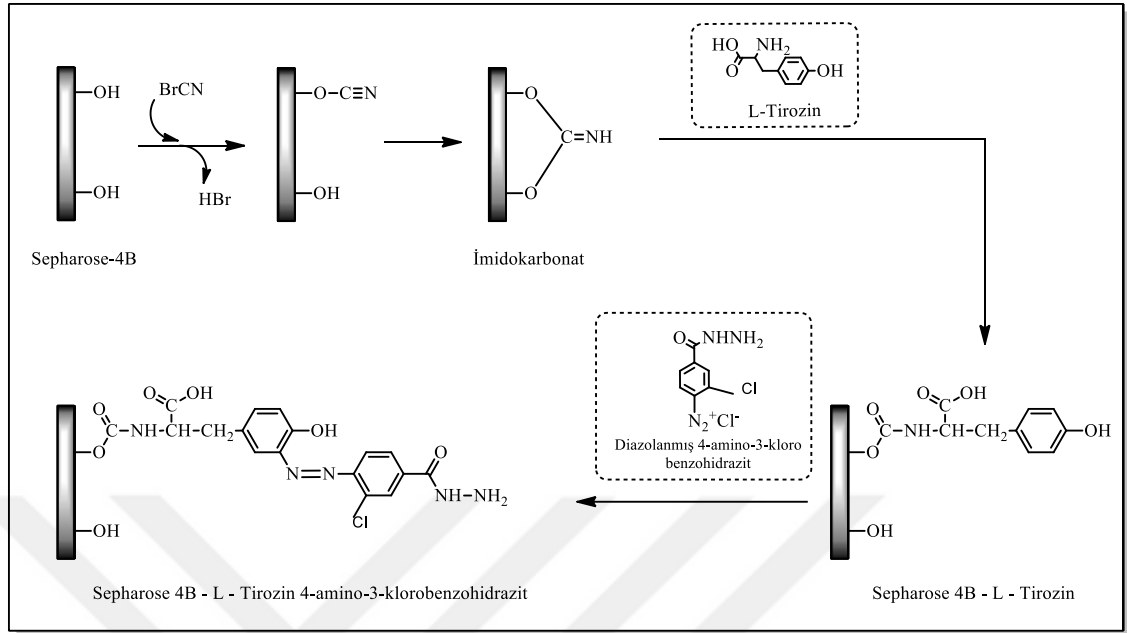
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkandı. Bu tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözülerek matriks ile karıştırıldı. 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin sonunda yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen tirozin uzaklaştırıldı. 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH=8,8) ile yıkanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

3.2.4.d. Benzohidrazid türevlerinin kenetlendirme reaksiyonları

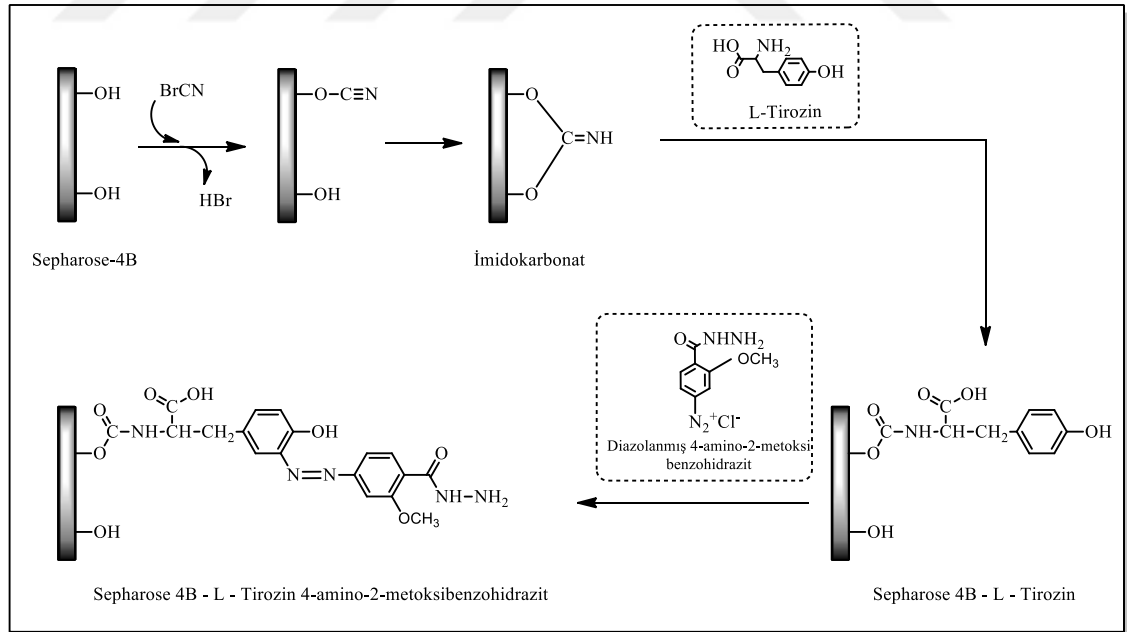
Benzohidrazid türevi olan moleküllerin her birinden 25 mg alınarak, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü. İçerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, her bir inhibitör çözeltilisine yavaşça katıldı, diazolanmış bulunan 4-aminobenzohidrazid türevleri 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edilerek, pH=9,5'a 1 M NaOH ile çıkarılarak sabit tutuldu 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL fosfat tamponu pH:6,8 ile yıkanarak aynı tamponda saklandı (Whitney 1974).



Şekil 3.2. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-3-bromobenzohidrazid kenetlendirilmesi



Şekil 3.3. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-3-klorobenzohidrazid kenetlenirilmesi



Şekil 3.4. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeline 4-amino-2-metoksibenzohidrazid kenetlenirilmesi

3.2.4.e. Sentezlenen afinite kolonunun paketlenmesi

Sentezlenen her bir jel dengeleme tamponu ile süspanse edildi ve 1x10 cm'lik kolona peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu eşliğinde paketlenildi.

3.3. Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Süt Homojenatlarından Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

3.3.1. Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi ile kısmi saflaştırma

Yağı tamamen uzaklaştırılan bir litre taze memeli sütü (sığır, manda, koyun, keçi) 200 mL 5 mM NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisinde şişirilmiştir, 22 gram zayıf asidik katyon değiştirici Amberlite CG 50 H⁺ reçinesinin içine katılır (Dumonte and Rousst 1983; Kumar and Bhatla 1995; Ozdemir *et al.* 2001). Reçine-süt karışımı magnetik karıştırıcı vasıtasıyla 4°C'de 1 saat karıştırılıp, dinlenmeye bırakıldı, üstte kalan süpernatant dekante edildi. Çökelek 2 L destile suyla daha sonra 5 mM'lık 1 L NaCH₃COO pH=6,8 çözeltisiyle yıkandı sonra 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 elüe edildi.

3.3.2. Sentezlenen afinite kolonuna homojenat tatbiki ve elüsyonu

Dengelenmiş kolonlara, farklı memeli homojenatları tatbik edildi. Ardından 400 mL 25 mM fosfat (pH=6,8) çözeltisi ile kolon yıkandı. Böylece safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Elüsyon tamponu olarak 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,8) hazırlanarak kolona tatbik edildi. Laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakılarak absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 412 nm'de LPO aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinin Uygulanışı

Saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) ile tespit edildi. Her bir afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimleri diyaliz edildi ve standart olarak molekül ağırlığı belli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Ayırma jelinin hazırlanma prosedürü: 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 karıştırılır sonunda ise bu karışıma 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

Yığma jelinin hazırlama prosedürü: 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 ile 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, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez 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 denatüre edildi. Numuneler soğutulurken, elektrofrez 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.

Jel önce 30 dakika tespit çözeltisinde, daha sonra 30 dakika redüksiyon çözeltisinde 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. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Saflaştırılan Memeli LPO Enzimleri İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Optimum pH belirlenmesi

Doğru substrat konsantrasyonunda pH'sı 5,0-8,0 arasında değişen fosfat tampon çözeltileri kullanılarak Herbir memeli LPO enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi

3.5.2. Optimum sıcaklık belirlenmesi

Optimum pH ve doğru substrat konsantrasyonunda 5-85°C sıcaklık aralığında en son LPO enziminin pipetlenmesi ile Herbir memeli LPO enziminin aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.3. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

ABTS substratı kullanılarak optimum pH ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda LPO enziminin aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla 1 mM'lık ABTS'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,5-1,5 mL arasında alındı. Her bir ABTS konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin 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 (Lineweaver and Burk 1934).

3.6. Sentezlenen Afinite Kolonlarının Laktoperoksidaz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Herbir kolon için hazırlanan saflaştırma tablolarından, LPO tutma kapasitesi yüksek olan jeller için sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Sentezlenen jelden 1 mL alınarak 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve dengelendi. Laktoperoksidaz enzimi ile doyuruldu. Yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan laktoperoksidaz enzimi elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden laktoperoksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesi üzerine etkisi

pH:6,8'de 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda kolon dengelendi, LPO ile doyuruldu, yıkandı ve elüe edildi. Protein tayini yapılarak, (mg protein/g jel başına) grafik edildi ve tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.2. pH'nın kolon kapasitesi üzerine etkisi

pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak kolon dengelendi, LPO ile doyuruldu, yıkandı ve elüe edildi. Protein tayini yapılarak, (mg protein/g jel başına) grafik edildi ve tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesi üzerine etkisi

Optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında kolon dengelendi, LPO ile doyuruldu, yıkandı ve iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek elüsyon yapıldı. Sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

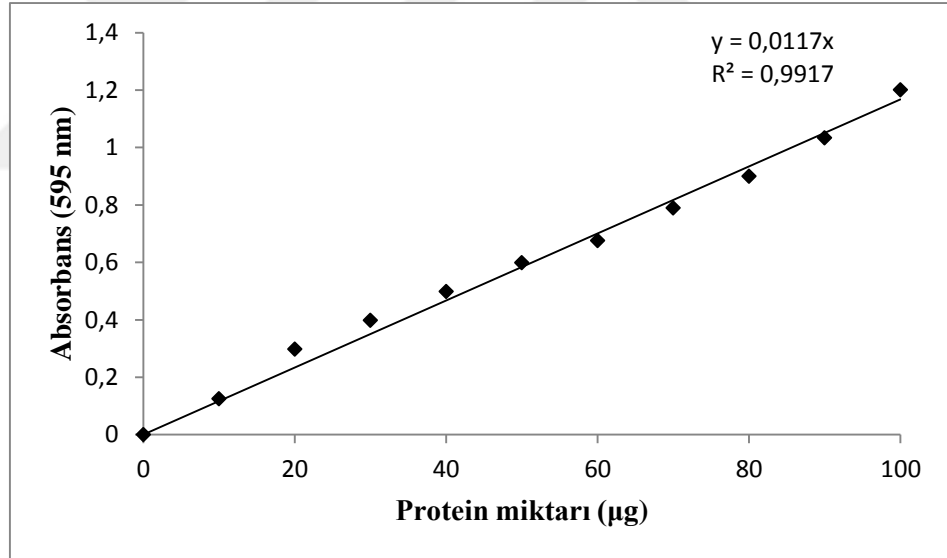


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktoperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Bradford protein tayininde hazırlanan standart grafik

Saflaştırılan her bir memeli LPO enzimlerinin kantitatif protein tayini Bradford metoduyla belirlendi. Bu amaçla Bölüm 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı ve Şekil 4.1’de ki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



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

4.2. İnhibitörlerin K_i ve IC_{50} Parametrelerinin Belirlenmesi

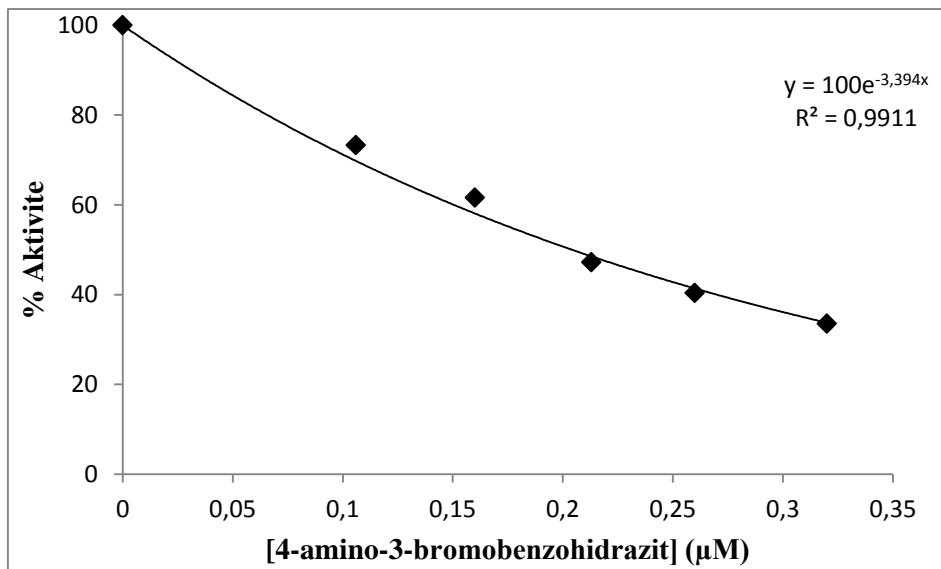
Bu çalışmada kullanılan LPO enzimi 5-amino-2-metilbensülfonamid ligandı kullanılarak sentezlenmiş kolon ile sığır sütünden %56,50 verimle 662,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim ile kinetik çalışmalar yürütülmüştür (Köksal 2015).

İnhibitörlerin LPO enzimi üzerine inhibisyon etkileri ABTS substratı kullanılarak incelendi. Sabit substrat konsantrasyonunda ABTS (0,66 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değerleri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürleri ve saflaştırma tabloları Çizelge 4.1-4.12’de gösterildi. %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi. IC_{50} ve K_i değerleri Şekil 4.2-4.7’de gösterildi.

4.2.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar

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

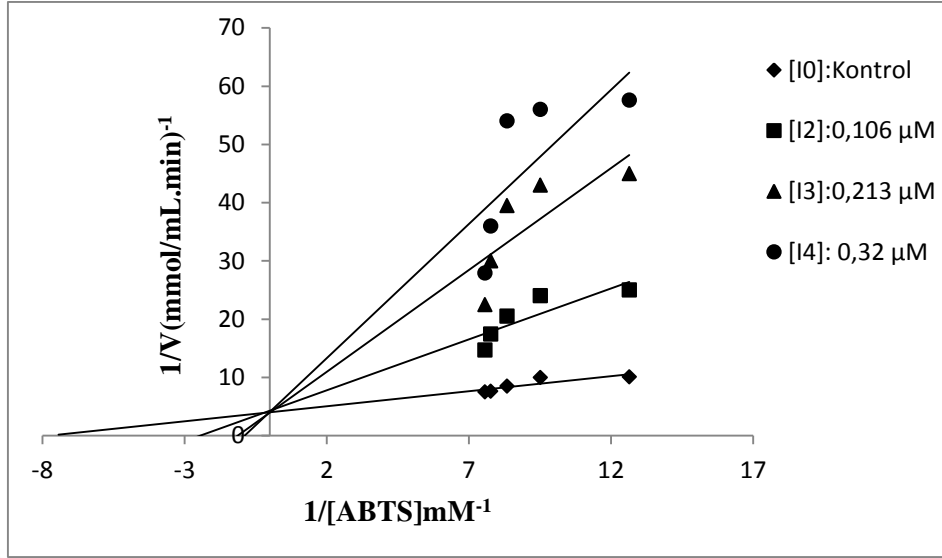
Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tampon(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tampon(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)	Aktivite (%)	[I] µM
4-amino-3-bromobenzohidrazid	2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100,00	0
	2,0	0,890	0,1	0,010	2,0	0,840	0,1	0,010	0,05	73,30	0,10
	2,0	0,885	0,1	0,015	2,0	0,835	0,1	0,015	0,05	61,60	0,16
	2,0	0,880	0,1	0,020	2,0	0,830	0,1	0,020	0,05	47,20	0,21
	2,0	0,875	0,1	0,025	2,0	0,825	0,1	0,025	0,05	40,40	0,26
	2,0	0,870	0,1	0,030	2,0	0,820	0,1	0,030	0,05	33,50	0,32



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

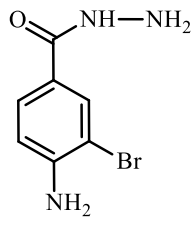
Çizelge 4.2. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 4-amino-3-bromobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V (\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min})^{-1}$	$1/S \text{ mM}^{-1}$
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tampon(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tampon (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,500	2,390	0,1	0,010	0,500	2,340	0,1	0,010	0,05	52,63	6,25
	0,750	2,140	0,1	0,010	0,750	2,090	0,1	0,010	0,05	37,03	4,00
	1,0	1,890	0,1	0,010	1,0	1,840	0,1	0,010	0,05	20,83	3,00
	1,25	1,640	0,1	0,010	1,25	1,590	0,1	0,010	0,05	17,54	2,40
	1,500	1,390	0,1	0,010	1,500	1,340	0,1	0,010	0,05	14,92	2,00
[I] ₂	0,500	2,380	0,1	0,020	0,500	2,330	0,1	0,020	0,05	100,00	6,25
	0,750	2,130	0,1	0,020	0,750	2,080	0,1	0,020	0,05	58,82	4,00
	1,0	1,880	0,1	0,020	1,0	1,830	0,1	0,020	0,05	40,00	3,00
	1,25	1,630	0,1	0,020	1,25	1,580	0,1	0,020	0,05	30,30	2,40
	1,500	1,380	0,1	0,020	1,500	1,330	0,1	0,020	0,05	22,72	2,00
[I] ₃	0,500	2,370	0,1	0,030	0,500	2,320	0,1	0,030	0,05	250,00	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,030	0,750	2,070	0,1	0,030	0,05	102,04	4,00
	1,0	1,870	0,1	0,030	1,0	1,820	0,1	0,030	0,05	55,55	3,00
	1,25	1,620	0,1	0,030	1,25	1,570	0,1	0,030	0,05	37,03	2,40
	1,500	1,370	0,1	0,030	1,500	1,320	0,1	0,030	0,05	28,57	2,00



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

Çizelge 4.3. Laktoperoksidaz enzimi üzerine 4-amino-3-bromobenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino-3-bromobenzohidrazit	Sığır LPO	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon tipi
		204,00	38,95 ± 6,34	Yarışmalı

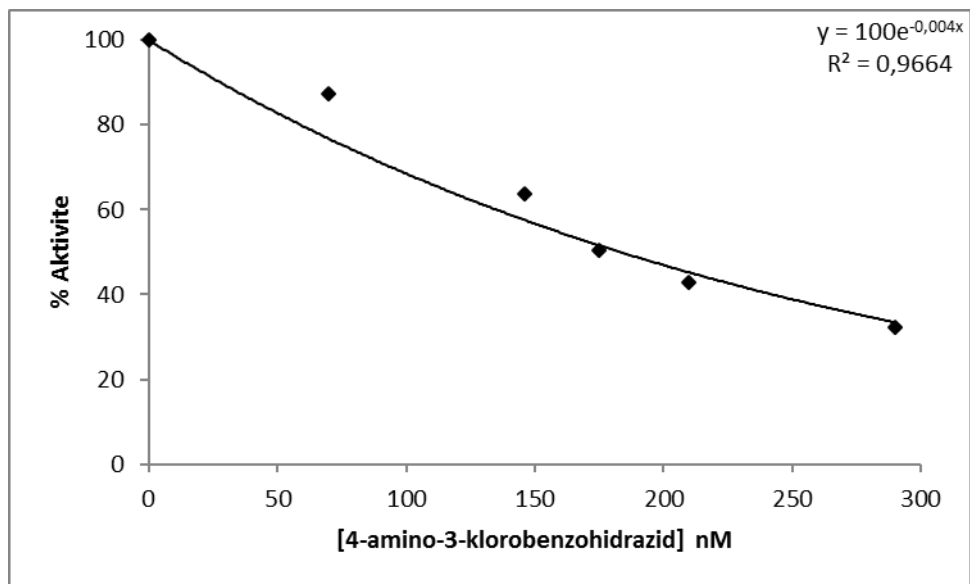
Çizelge 4.4. 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

4-amino-3-bromobenzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Sığır sütü	Homojenat	60	7,09	15	425,4	900	0,47	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	6,4	0,008	64	0,08	714,28	15,00	1519,0
Keçi sütü	Homojenat	60	0,8	13	48	780	0,06	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	0,3	0,030	3	0,3	10	6,25	166,6
Koyun sütü	Homojenat	60	3	14	180	840	0,20	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	1,57	0,030	15,7	0,3	52,30	8,72	261,0
Manda sütü	Homojenat	60	15,7	12	942	720	1,30	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	18,2	0,048	182	0,48	379,16	19,30	291,6

4.2.2. 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.5. 4-Amino-3-klorobenzohidrazid inhibitörü ile afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

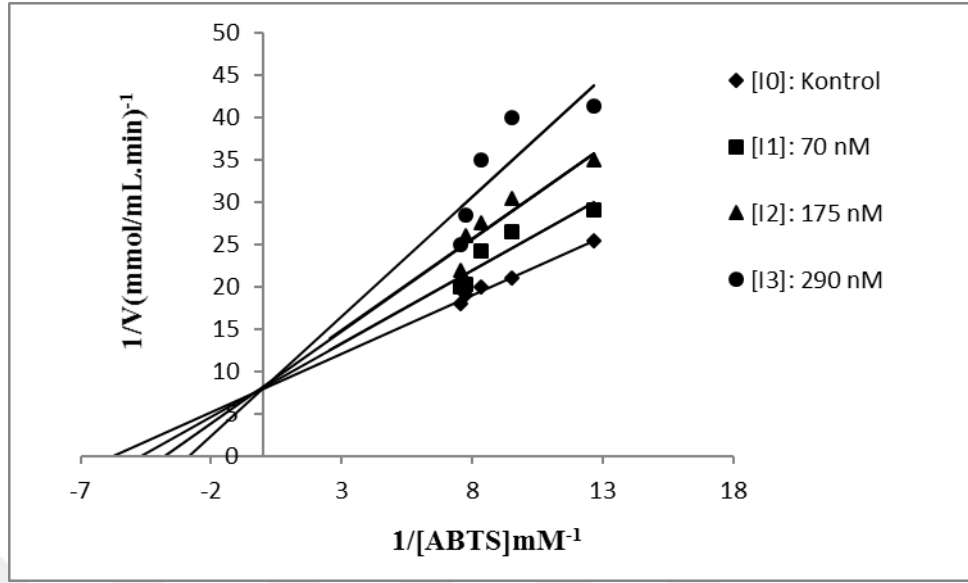
Kör Tüpü					Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
İnhibitör	ABTS(mL)	Fosfat Tamp.(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABST (mL)	Fosfat Tamp.(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)		
4-Amino-3-klorobenzohidrazid	2,0	0,900	0,1	-	2,0	0,850	0,1	-	0,05	100,00	0
	2,0	0,895	0,1	0,005	2,0	0,845	0,1	0,005	0,05	87,25	70,0
	2,0	0,890	0,1	0,010	2,0	0,840	0,1	0,010	0,05	63,70	146
	2,0	0,888	0,1	0,012	2,0	0,838	0,1	0,012	0,05	50,50	175
	2,0	0,885	0,1	0,015	2,0	0,835	0,1	0,015	0,05	42,80	210
	2,0	0,880	0,1	0,020	2,0	0,830	0,1	0,020	0,05	32,40	290



Şekil 4.4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-Amino-3-klorobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS 4-Amino-3-klorobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V(\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min})^{-1}$	$1/S \text{ mM}^{-1}$
İnhibitör	ABTS(mL)	Fosfat Tampon(mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör(mL)	ABTS(mL)	Fosfat Tampon (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör(mL)	LPO(mL)		
[I] ₁	0,500	2,600	0,1	0,05	0,250	2,550	0,1	0,05	0,05	115,10	6,25
	0,750	2,350	0,1	0,05	0,500	2,300	0,1	0,05	0,05	77,52	4,00
	1,000	2,100	0,1	0,05	0,750	2,050	0,1	0,05	0,05	46,29	3,00
	1,250	1,850	0,1	0,05	1,000	1,800	0,1	0,05	0,05	37,03	2,40
	1,500	1,600	0,1	0,05	1,250	1,550	0,1	0,05	0,05	28,98	2,00
[I] ₂	0,250	2,575	0,1	0,075	0,250	2,525	0,1	0,075	0,05	169,20	6,25
	0,500	2,325	0,1	0,075	0,500	2,275	0,1	0,075	0,05	115,74	4,00
	0,750	2,075	0,1	0,075	0,750	2,025	0,1	0,075	0,05	62,50	3,00
	1,000	1,825	0,1	0,075	1,000	1,775	0,1	0,075	0,05	47,84	2,40
	1,250	1,575	0,1	0,075	1,250	1,520	0,1	0,075	0,05	40,50	2,00
[I] ₃	0,250	2,550	0,1	0,1	0,250	2,500	0,1	0,1	0,05	253,80	6,25
	0,500	2,300	0,1	0,1	0,500	2,250	0,1	0,1	0,05	202,83	4,00
	0,750	2,050	0,1	0,1	0,750	2,000	0,1	0,1	0,05	90,90	3,00
	1,000	1,800	0,1	0,1	1,000	1,750	0,1	0,1	0,05	60,24	2,40
	1,250	1,550	0,1	0,1	1,250	1,500	0,1	0,1	0,05	52,63	2,00



Şekil 4.5. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-Amino-3-klorobenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.7. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 4-Amino-3-klorobenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino-3-klorobenzohidrazit	Sığır LPO	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon tipi
		173,2	151,05 ± 77,20	Yarışmalı

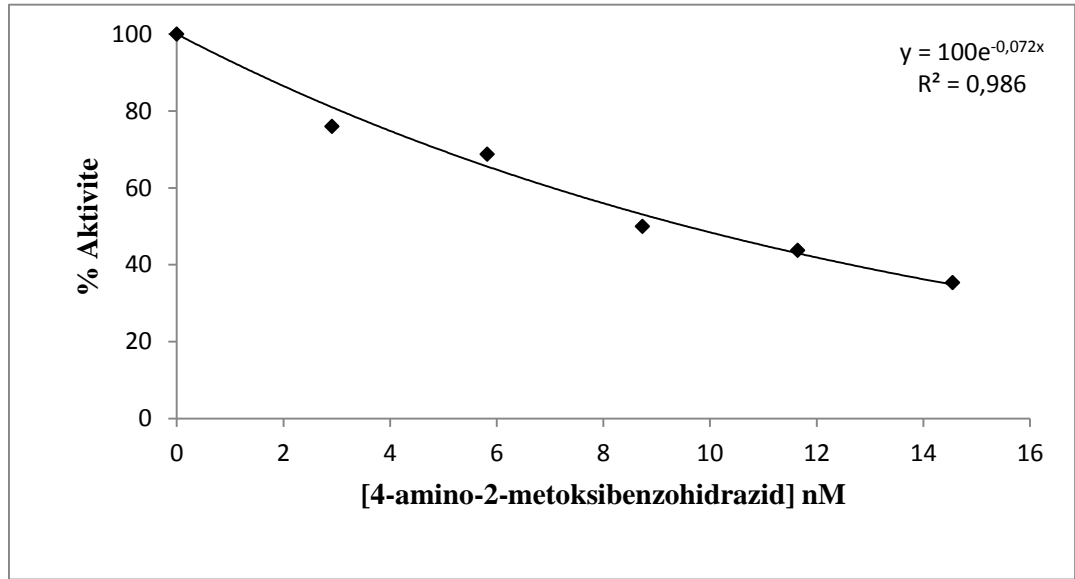
Çizelge 4.8. 4-Amino-3-klorobenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

4-Amino-3-klorobenzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Sığır sütü	Homojenat	60	4,3	15	258	900	0,28	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	3,7	0,01	37	0,1	370	14,4	1321
Keçi sütü	Homojenat	60	1,75	13	105,5	780	0,134	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	2,09	0,06	20,9	0,6	34,83	19,8	260
Koyun sütü	Homojenat	60	3,08	14	184,8	840	0,22	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	4,3	0,02	43	0,2	196,3	23,3	892,2
Manda sütü	Homojenat	60	15,4	12	924	720	1,28	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	32,7	0,044	327	0,44	743,1	35,3	580,6

4.2.3. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid molekülü ile ABTS substratı kullanılarak sığır LPO üzerine yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.9. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid inhibitörü ile afinite kolonundan elde edilen LPO için, ABTS substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

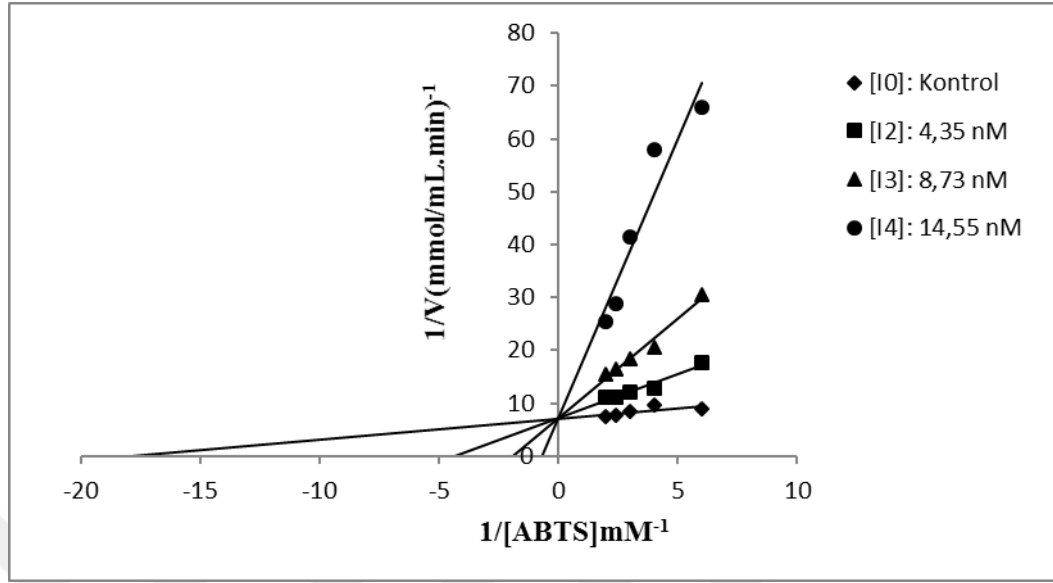
İnhibitör	Kör Tüpü				Numune Tüpü					% Aktivite	[I] nM
	ABTS (mL)	Fosfat Tampon(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	ABST(mL)	Fosfat Tampon(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	LPO(mL)		
4-amino-2-metoksibenzohidrazid	2,0	0,9	0,1	-	2,0	0,85	0,1	-	0,05	100	0
	2,0	0,890	0,1	0,010	2,0	0,840	0,1	0,010	0,05	76,04	2,91
	2,0	0,880	0,1	0,020	2,0	0,830	0,1	0,020	0,05	68,75	5,82
	2,0	0,870	0,1	0,030	2,0	0,820	0,1	0,030	0,05	50	8,73
	2,0	0,860	0,1	0,040	2,0	0,810	0,1	0,040	0,05	43,75	11,64
	2,0	0,850	0,1	0,050	2,0	0,800	0,1	0,050	0,05	35,42	14,55



Şekil 4.6. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak 4-amino-2-metoksibenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

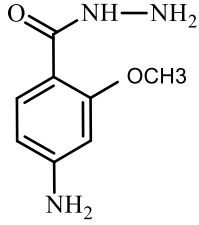
Çizelge 4.10. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-2-metoksibenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü					Numune Tüpü					$1/V(\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S \text{ mM}^{-1}$
İnhibitör	ABTS (mL)	Fosfat Tampon (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	ABTS (mL)	Fosfat Tampon (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	LPO (mL)		
[I] ₁	0,500	2,385	0,1	0,015	0,500	2,335	0,1	0,050	0,05	17,54	6,25
	0,750	2,135	0,1	0,015	0,750	2,085	0,1	0,050	0,05	12,82	4,00
	1,000	1,885	0,1	0,015	1,000	1,835	0,1	0,050	0,05	12,19	3,00
	1,250	1,635	0,1	0,015	1,250	1,585	0,1	0,050	0,05	11,23	2,40
	1,500	1,385	0,1	0,015	1,500	1,335	0,1	0,050	0,05	11,11	2,00
[I] ₂	0,500	2,370	0,1	0,030	0,500	2,320	0,1	0,100	0,05	31,25	6,25
	0,750	2,120	0,1	0,030	0,750	2,070	0,1	0,100	0,05	20,83	4,00
	1,000	1,870	0,1	0,030	1,000	1,820	0,1	0,100	0,05	18,51	3,00
	1,250	1,620	0,1	0,030	1,250	1,570	0,1	0,100	0,05	16,39	2,40
	1,500	1,370	0,1	0,030	1,500	1,320	0,1	0,100	0,05	15,62	2,00
[I] ₃	0,500	2,350	0,1	0,050	0,500	2,300	0,1	0,150	0,05	83,34	6,25
	0,750	2,100	0,1	0,050	0,750	2,050	0,1	0,150	0,05	58,82	4,00
	1,000	1,850	0,1	0,050	1,000	1,800	0,1	0,150	0,05	41,66	3,00
	1,250	1,600	0,1	0,050	1,250	1,550	0,1	0,150	0,05	29,41	2,40
	1,500	1,350	0,1	0,050	1,500	1,300	0,1	0,150	0,05	25,64	2,00



Şekil 4.7. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla 4-amino-2-metoksibenzohidrazid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.11. Laktoperoksidaz enzimini üzerine 4-Amino-2-metoksibenzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino-2-metoxybenzohidrazit	Sığır LPO	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon tipi
		9,62	93,30 ± 40,41	Yarışmalı

Çizelge 4.12. 4-Amino-2-metoksibenzohidrazid ile hazırlanan afinite jelinden sığır, manda, koyun ve keçi LPO enziminin saflaştırılması sonuçları

4-amino-2-metoksibenzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Sığır sütü	Homojenat	60	2,6	15	156	900	0,1	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	0,9	0,01	9	0,1	90	5	900
Keçi sütü	Homojenat	60	2,16	13	129,6	780	0,16	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	0,2	0,03	2	0,3	6,66	1,54	41,62
Koyun sütü	Homojenat	60	2,3	14	138	840	0,16	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	1,3	0,06	13	0,6	21,66	9,42	135,41
Manda sütü	Homojenat	60	10,1	12	600	720	0,8	100	1
	Sepharose 4B Afinite	10	7,7	0,07	77	0,7	110	12,83	137,50

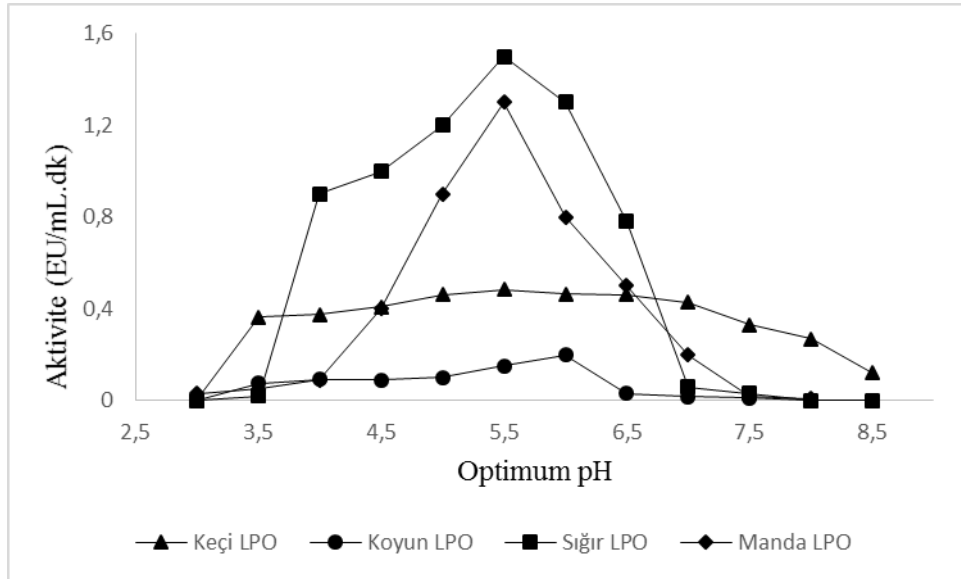
4.3. Memeli Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Parametre ve SDS-PAGE Sonuçları

4.3.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile bulunan kinetik parametreler

Kinetik parametrelerden optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} değerlerinin ABTS substratı için belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.4’de anlatıldığı şekilde LPO aktivite ölçümleri yapıldı. Sığır, manda, koyun ve keçi sütünden elde edilen sonuçlar Şekil 4.3, 4.5, 4.7 ile Çizelge 4.3, 4.7, 4.11’de gösterildi.

4.3.2. pH-aktivite grafiğinin belirlenmesi

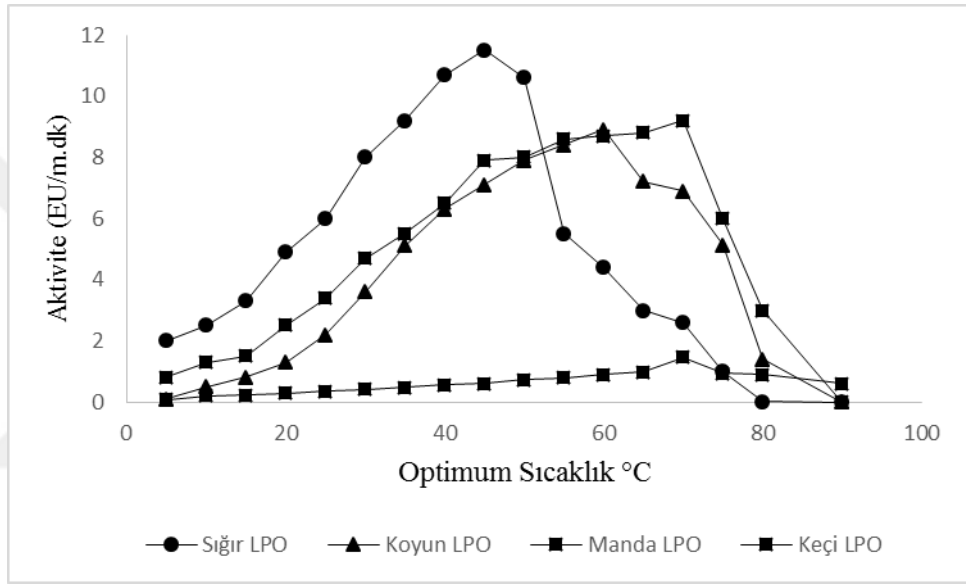
ABTS substratı için memeli LPO enzimlerinin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde pH:5,0-8,0 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.8’de verildi



Şekil 4.8. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.3.3. Sıcaklık-aktivite grafiğinin belirlenmesi

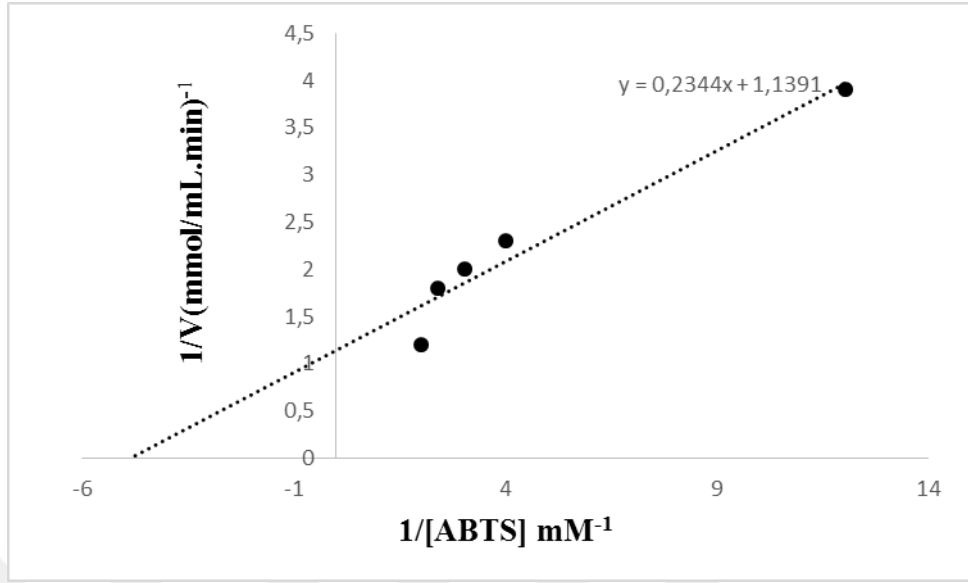
ABTS substratı için her bir memeli LPO enziminin optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde 5-85°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği Şekil 4.9’da verildi.



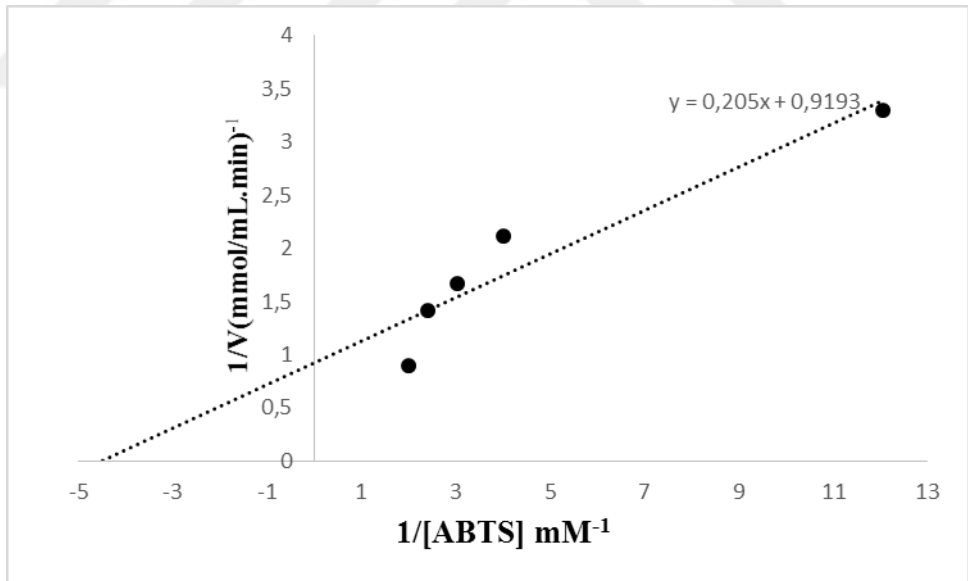
Şekil 4.9. Memeli sütleri LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği

4.3.4. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

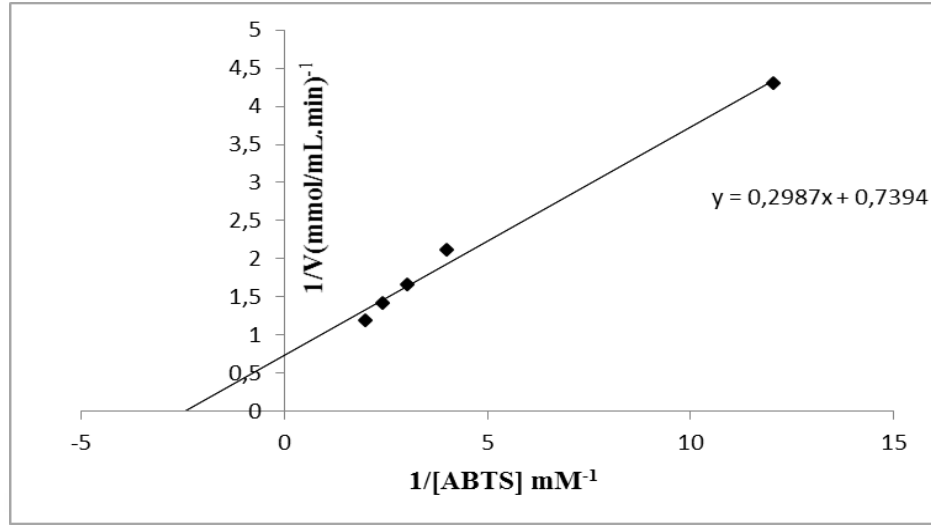
Her bir memeli LPO enziminin ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; Bölüm 3.4.4’de anlatıldığı şekilde ABTS kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.10, 4.11, 4.12’de verildi.



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



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



Şekil 4.12. Keçi sütü LPO enzimi için ABTS substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

4.4. Memeli Sütleri LPO Enzimleri İçin Bulunan Toplu Sonuçlar

Çizelge 4.13. Sığır sütü LPO enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	İnhibisyon Tipi
4-amino-3-bromobenzohidrazid	204,00	38,95 ± 6,34	Yarışmalı
4-amino-3-klorobenzohidrazid	173,2	151,05 ± 77,20	Yarışmalı
4-amino-2-metoksibenzohidrazid	9,62	93,30 ± 40,41	Yarışmalı

Çizelge 4.14. Sığır ve manda sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	Sığır LPO			Manda LPO		
	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-amino-3-bromobenzohidrazid	714,28	15,00	1519,0	379,16	19,3	291,6
4-amino-3-klorobenzohidrazid	370,00	14,40	1321,0	743,18	35,3	580,6
4-amino-2-metoksibenzohidrazid	90,00	5,00	900,0	110,00	12,8	137,5

Çizelge 4.15. Keçi ve koyun sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ligand moleküllerin toplu sonuçları

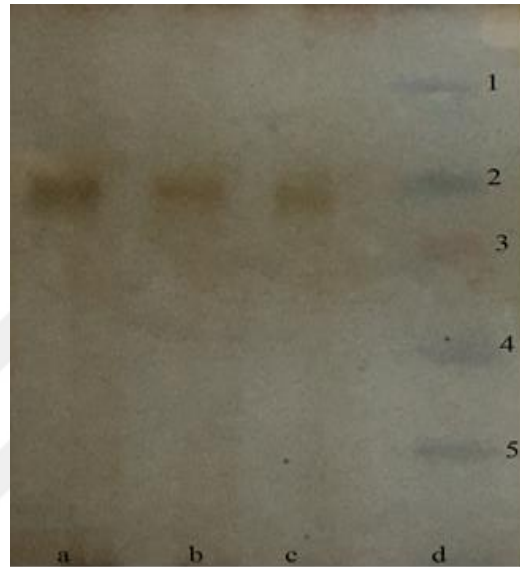
LİGAND MOLEKÜLLER	Keçi LPO			Koyun LPO		
	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı	S.Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-amino-3-bromobenzohidrazid	10,00	6,25	166,60	52,30	8,72	261,00
4-amino-3-klorobenzohidrazid	34,83	19,80	260,00	196,3	23,30	892,20
4-amino-2-metoksibenzohidrazid	6,66	1,54	41,62	21,66	9,42	135,41

Çizelge 4.16. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimi toplu kinetik sonuçları

Memeli sütleri	K_m	V_{max}	Optimum pH	Optimum Sıcaklık
Sığır LPO	0,12	0,49	5,5	45
Manda LPO	0,20	0,87	5,5	70
Koyun LPO	0,22	1,08	6,0	60
Keçi LPO	0,40	1,35	5,5	70

4.5. Memeli LPO Enzimlerinin SDS-PAGE Gümüş Boyama Sonuçları

4.5.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun manda sütleri LPO enzimi SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları



Şekil 4.13. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan sığır, koyun ve manda LPO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı

*a: Sığır LPO enzimi (78 kDa) b: Koyun LPO enzimi (78 kDa) c: Manda LPO enzimi (78 kDa)

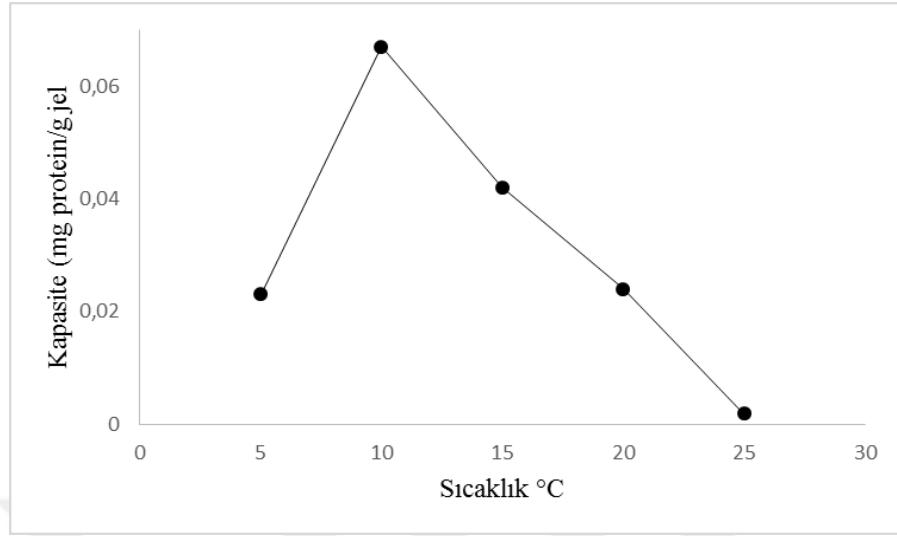
d. Standartlar; 1. (130 kDa), 2. (100 kDa), 3. (70 kDa), 4. (55 kDa), 5. (40 kDa).

4.6. Sığır Sütünden 4-amino-3-bromobenzohidrazid Afinite Kolonunun Laktoperoksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Sentezlenen jelin LPO tutma kapasitesi belirlenirken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.4’de anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.6.1. Kolon kapasitesi üzerine sıcaklık etkisi

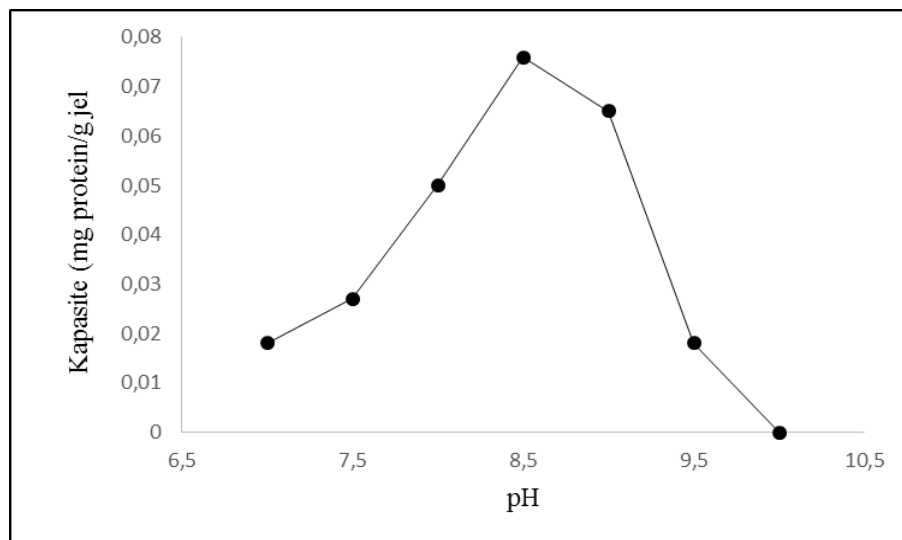
Farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda pH:6,8’de kolonun LPO tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.14’de verildi.



Şekil 4.14. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.6.2. Kolon kapasitesi üzerine pH'nın etkisi

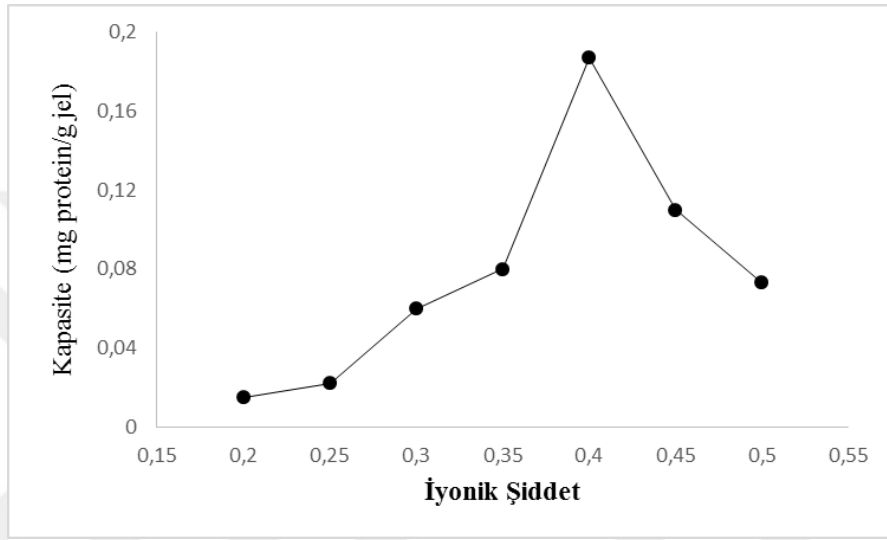
pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak kolonun LPO tutma kapasitesi çalışıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.15'de verildi.



Şekil 4.15. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği

4.6.3. Kolon kapasitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi

Optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında iyonik şiddetin 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilmesi ile sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.16'da verildi.



Şekil 4.16. Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-bromobenzohidrazid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt, memelilerin büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan beyaz veya krem renkli sıvıdır (Marshall 2004). Yapısında bulunan immünoglobulinler, enzimler, büyüme hormonları, antibakteriyel ajanlar gibi protein ve peptid yapılı öğeler ile yağ asitleri, vitamin ve minerallerden dolayı canlılar için önemlidir (McIntosh *et al.* 1998; McMahon *et al.* 2008).

Sütün özelliğini koruyabilmesi için bakteri faaliyetlerinin durdurulması, soğutulması ve sıcaklıktan uzaklaştırılması gerekir. Soğutma tam olarak gerçekleştirilemeyince süte kimyasal madde ilavesi kullanımı günümüzde çok yaygındır. Çiğ sütlerin korunmasında doğal antibakteriyel sistem laktoperoksidaz/ tiyosiyanat/ hidrojen peroksit (LPO) sistemi olarak tanımlanmaktadır. Anılan sistemin sütteki antibakteriyel etkisi H₂O₂ varlığında laktoperoksidaz enziminin katalize ettiği reaksiyonla SCN⁻ iyonlarının oksidasyonuna dayanmaktadır (Smithers 2008).

LPO'nun süt endüstrisindeki bu öneminden ötürü bilim insanları enzim üzerine farklı moleküllerin inhibisyonunu araştırmışlar ve saflaştırma için çok çeşitli kromatografik yöntemler denemişlerdir. Örneğin Amberlite CG 50 H⁺ reçinesi ile kısmi bir saflaştırma yapıp, sonra amonyum sülfat çöktürmesi, CM Sephadex iyon değişim, Sephadex G100 jel filtrasyon kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak 5 mg LPO 1 lt süttten elde edilmiştir (Ozdemir *et al.* 2001; Cankaya *et al.* 2006).

Kromatografik yöntemlerden afinite tekniği ile LPO enzimi tek basamakta saflaştırılmıştır. Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri olan afinite kromatografisi spesifik ligand esasına dayanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Ligand olarak sülfanilamidin kullanılmasıyla LPO'nun tek basamakta 409,00 kat saflaştırılması sağlanmıştır. LPO'nun yarışmalı inhibitörü olduğu bulunan sülfanilamidin K_i değerinin 3,55x10⁻⁵ M ve IC₅₀ değerinin 0,848 mM olduğu bildirilmiştir (Atasever *et al.* 2013).

Farklı ligandlar kullanılarak afinite kolonları sentezlenmiş LPO saflaştırma çalışmaları daha ileriye götürülmüştür. Bazı sülfanilamid türevi moleküllerin ligand olarak kullanılmasıyla memeli sütlerinden LPO enziminin daha yüksek verim ve saflaştırma katsayısı ile saflaştırılması başarılmıştır. 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü ile sığır sütünden spesifik aktivite 145,00 olup enzim 453,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 12,00 olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonunda 200 ml süttten 0,77 mg LPO ($R_z=0,6$) elde edilmiştir (Usanmaz 2014). 5-amino-2-metilbensülfonamid molekülü ile saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır sütünden 84,75 spesifik aktiviteyle %82,68 verimle 1059,37 kat saflaştırılmıştır (Köksal 2015). Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,12 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Hidrazid türevlerinin LPO'nun inhibitörü olduğu literatürde bildirilmiştir (Kumar and Bhatla 1995). Bu fikirden yola çıkarak bu tez çalışmasında bazı benzohidrazid türevi moleküllerden afinite kolonları sentezlenerek, memeli sütlerinden LPO enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

5-amino-2-metilbenzosulfonamid ligandı kullanılarak saflaştırılan sığır LPO enzimi üzerine 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı bu çalışmalar sırasında küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.1, 4.5 ve 4.9'da verildi. ABTS substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doymun olmayan ABTS (26.67×10^{-2} mM) reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu.

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.2, 4.4 ve 4.6'da gösterildi. Çizelge 4.3, 4.7 ve 4.11 'deki sonuçlara göre IC_{50} değerleri 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülleri için sırası ile 9,62, 204,0, 173,2 olarak bulundu. Tüm moleküllerin IC_{50} değerlerinin sonuçlarına

bakıldığında LPO enziminin inhibitörü olabileceği ortaya konuldu. İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile K_i değerlerinin hesaplanması çalışmalarına geçildi.

Sığır LPO enzimi için 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.6 ve 4.10'da gösterildi. 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri belirlendi (Lineweaver *et al.* 1934).

Sığır LPO için bu grafikler Şekil 4.3, 4.5 ve 4.7'de gösterildi. K_i değerleri 4-amino-2-metoksibenzohidrazid, 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid için sırasıyla $38,95 \pm 6,34$; $151,05 \pm 77,20$ ve $93,3 \pm 40,41$ Çizelge 4.12'de belirtildiği gibidir. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan benzohidrazid molekülleri LPO enziminin yeni inhibitörleri olarak tespit edildi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi (Şekil 3.2; Şekil 3.3; Şekil 3.4).

Matriks olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, uzantı kolu olarak ise L-tirozin kullanıldı ve pH: 10 tamponunda karıştırılarak 4°C'de 16 saat boyunca şişirildi. Her bir inhibitörden 25 mg alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-ligand jelleri hazırlandı (Atasever *et al.* 2013). Hazırlanan afinite kolonlarına yağı alınarak süt içerisine zayıf asidik katyon değiştirici olan Amberlit CG 50 H⁺ katılarak kısmi bir saflaştırma yapıldı (Dumonted and Rousset 1983). Afinite jellerinin sentezlendiği benzohidrazid türevlerinin diazonyum tuzu oluşturduğu jelin renklenmesinden anlaşıldı. Diazonyum tuzlarının bileşiklerinin renkli ürünler verdiği literatürde belirtilmiştir (Atasever *et al.* 2013).

Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi; 200 mL memeli sütü-amberlit ile hazırlanan homojenatların herbirinden 50 mL, 4-amino-3-bromobenzohidrazid afinite kolonuna tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır sütünden 714,28 spesifik aktiviteyle %15,00 verimle 1519,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda

200 mL süttten 0,26 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır süttünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Enzim manda süttünden 379,16 spesifik aktivite ile %19,30 verimle 291,66 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 1,6 mg LPO elde edilmiştir.

LPO enzimi koyun süttünden 52,30 spesifik aktivite ile %8,72 verimle 261,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 1,00 mg LPO elde edilmiştir ve keçi süttünden 10,00 spesifik aktivite ile %6,25 verimle 166,60 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 1,00 mg LPO elde edilmiştir.

Çizelge 4.8'den görüldüğü gibi; 200 mL memeli süttü-amberlit ile hazırlanan homojenatların herbirinden 50 mL, 4-amino-3-klorobenzohidrazid afinite kolonuna tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır süttünden 370,00 spesifik aktiviteyle %14,40 verimle 1321,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,33 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır süttünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Enzim manda süttünden 743,18 spesifik aktivite ile %35,30 verimle 892,20 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 1,46 mg LPO elde edilmiştir. LPO enzimi koyun süttünden 196,30 spesifik aktivite ile %23,30 verimle 261,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,66 mg LPO elde edilmiştir ve keçi süttünden 34,83 spesifik aktivite ile %19,80 verimle 260,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 2,00 mg LPO elde edilmiştir.

Çizelge 4.12'den görüldüğü gibi; 200 mL memeli süttü-amberlit ile hazırlanan homojenatların herbirinden 50 mL, 4-amino-2-metoksibenzohidrazid afinite kolonuna tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır süttünden 90,00 spesifik aktiviteyle %5,00 verimle 900,00 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,33 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır süttünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır (Kumar and Bhatla 1995).

Enzim manda sütünden 110,00 spesifik aktivite ile %12,83 verimle 137,50 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 2,33 mg LPO elde edilmiştir. LPO enzimi koyun sütünden 21,66 spesifik aktivite ile %9,42 verimle 135,41 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 2,00 mg LPO elde edilmiştir ve keçi sütünden 6,66 spesifik aktivite ile %1,54 verimle 41,62 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 1,00 mg LPO elde edilmiştir.

Şimdiye kadar afinite tekniğinin kullanılması ile yapılmış LPO saflaştırma çalışmalarında ligand olarak sülfanilamid molekülünün kullanılmasıyla sığır sütü %74 verimle 406,57 kat, 5-amino-2-metilbenzen-sülfonamid molekülü ile %82,68 verimle saflaştırma katsayısı iki katına çıkarılmıştır. Aynı kolondan ilk defa manda sütü 509,09 kat, koyun sütünün 232,55 kat ve keçi sütünün 161,90 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülü ile saflaştırma katsayısı sığır LPO enzimi için 1321,00 kata çıkarılırken, 4-amino-3-bromobenzohidrazid molekülü ile saflaştırma katsayısı sığır LPO için daha da artırılarak 1519,00 kata çıkarılmıştır. Ayrıca bu kolondan diğer memeli LPO enzimlerinin saflaştırılmasında gerçekleştirilmiştir. 4-amino-3-metoksibenzohidrazid ile de sığır sütü 900,00 kat saflaştırılmıştır.

4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonundan saflaştırılan memeli sütleri LPO enzimleri için kinetik parametreleri tespit etmek amacı ile aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

ABTS substratı için optimum pH çalışması; pH 5,0-8,0 aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü ve Aktivite-pH grafikleri Şekil 4.8'de gösterildi. Bu grafikden sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerini 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 sığır sütünden elde edilen LPO için

optimum sıcaklığın 45°C olduğu bulundu. Koyun LPO enziminin optimum pH değerini 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 koyun sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 6,0 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerinin tespit edilmesi 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 koyun sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklık 60°C olarak bulundu.

Manda LPO enzimi için optimum pH değerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için pH 5,0-8,0 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 değerini 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 manda sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu.

Keçi LPO enzimi için optimum pH değerini 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 sığır sütünden elde edilen LPO için optimum pH'nın 5,5 olduğu bulundu. Kolondan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerini tespit etmek amacıyla, ABTS substratı için sıcaklık 5-80° aralığında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafikleri Şekil 4.9'da gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre sığır sütünden elde edilen LPO için optimum sıcaklığın 70°C olduğu bulundu. Özet Sonuçlar Çizelge 5.1'de gösterildi.

Çizelge 5.1. 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonu memeli sütlerinden afinite kromatografisi ile elde edilen LPO enzimi için yapılan saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları

Parametreler	Memeli Sütleri			
	Sığır	Koyun	Keçi	Manda
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	714,28	52,30	10,00	379,16
Saflaştırma katsayısı	1519,00	261,00	166,60	291,66
Optimum pH	5,5	6,0	5,5	5,5
Optimum Sıcaklık (°C)	45	60	70	70
K _m (mM)	0,12	0,22	0,40	0,20
V _{max} (EÜ/mL.dk.)	0,49	1,08	1,35	0,87
Molekül ağırlığı (Dalton)	80,0	80,0	80,0	80,0

Hazırlanan 4-amino-3-bromobenzohidrazid kolonu için LPO enzimini tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı.

Kolonun LPO tutma kapasitesini belirlemek için 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 (Aslan *et al.* 1996).

LPO enziminin saflaştırılmasında 4-amino-3-bromobenzohidrazid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8 da 5, 10, 15, 20 ve 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.14'den görüldüğü gibi 10°C'de jel bağlanma kapasitesi maksimumdur.

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 4.15'de grafik edildi. Buradan 5-amino-2-metil benzensülfonamid 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 4.16'da görüldüğü gibi 0,4 M iyonik şiddet konsantrasyonunda bağlanmanın maksimum olduğu tespit edildi. Kolon tutma kapasitesi sonuçlarına göre, A10°C'de pH 8,5'da 0,40 M iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 0,110 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sonuç Olarak;

1. 3 benzohidrazid türevi molekülün önceden saflaştırılan sığır LPO enzimi üzerine kinetik çalışması yapıldı. Çalışılan 3 molekülün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.
2. Bu moleküllerden hazırlanan afinite kolonlarından sığır manda, koyun ve keçi sütleri tek basamakta saflaştırıldı. LPO saflaştırılmasında; 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligandlar olarak tespit edildi. Literatürde sülfanilamid ligandı ile 409,00 kat ve 5-amino-2-metilbenzosulfonamid molekülü ile 1059,00 kat saflaştırılan sığır LPO enzimi, bu tez kapsamında sığır sütünden 4-amino-3-bromobenzohidrazid molekülü ile 1519,00 kat saflaştırıldı. Çalıştığımız 4-amino-3-metoksibenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülleri memli sütlerinden LPO saflaştırılmasında literatürdeki yöntemlere göre çok üstün olduğu tespit edildi.
3. Sonuçlar literatür ile kıyaslandığında çalıştığımız hidrazin moleküllerinin herhangi birisi ile LPO enzimi dört memeli sütünden tek basamakta saflaştırılacak yeni ligandlar bulunmuştur.

4. Böylece mevcut tez kapsamında yöntem geliştirilerek tek kademede ve ucuz maliyette LPO saflaştırması yapabilen benzohidrazid türevlerinden 4-amino-3-bromobenzohidrazid ve 4-amino-3-klorobenzohidrazid molekülleri literatüre kazandırılmıştır.



KAYNAKLAR

- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor, R. 1987. Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), 1-19.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163–166.
- Atamer, M., Kocak, C., Cimer, A., Odabasi, S., Tamucay, B. and Yamaner, N., 1999. Some quality characteristics of Kasar cheese manufactured from milk preserved by activation of lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide (LP) system. *Milchwissenschaft*, 54, 553–556.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gülcin, I., Küfrevioglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136, 864–870.
- Barrett, N.E., Grendison, A.S., Lewis, M.J., 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy*, 66 (1), 73.
- 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.
- Campodónico, P. R., Aliaga, M. E., Santos, J. G., Castro, E. A., Contreras, R., 2009. Reactivity of benzohydrazide derivatives towards acetylation reaction. Experimental and theoretical studies. *Chemical Physics Letters* 488, 86–89.
- Cankaya, M., Sisecioğlu, M., Yörük, O., Ozdemir, H., 2006. In vitro effects of some antibiotic drugs on bovine lactoperoxidase enzyme. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306.
- Cuatrecasas, P., and Wilchek, M., 1968. "Single-step purification of avidin from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns." *Biochemical and biophysical research communications* 33.2: 235-239.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitro genens, *Biochemistry* 16, 4724.
- Doumonted, C. and Rousset, B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 14166.
- Galijasevic, S., Hodzic, E., 2014. Melatonin Mediates Classic Lactoperoxidases Catalytic Mechanism. *International Journal of Pharmacology*, 4(1), 1-6.
- Gonzalez-Chavez S., Arevalo-Gallegos S. ve Rascon-Cruz Q., 2009. "Lactoferrin: Structure, Function and Applications", *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 301.e1–301.e8.
- 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.

- Joseph, P. V., Jacob, C. and Maridas, M., 2004. Purification of sheep lactoperoxidase from colostrum: Characterization and antifungal studies. *International Journal of Chemical Sciences*, 2(1), 120-125
- Kalin, R., Atasever, A., and Özdemir, H., 2014. "Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots." *Food chemistry* 150: 335-340.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Erzurum
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. *Biyokimya. Aktif Yayınları*, 97s, Erzurum.
- Köksal, Z., 2015. Sülfanilamid Türevleri Kullanılarak Memeli Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Kumar, R. and Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Crystallographica*, 51, 1094.
- Kussendrager, Klaas D. and van Hooijdonk, A. C. M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, 1, 19-25.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43,565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4., *Nature*, 227, 680.
- Langbakk, B. and Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Levay P. and Viljoen M., 1995. ‘‘Lactoferrin: A General Review’’, *Haematologica* 80: 252-267.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Maheswari R, Manjula J, 2015. Synthesis, Characterization and Biological Applications of Benzohydrazide derivatives *International Journal of Applied Research* 1(10): 587-592.
- Maheswari R., Manjula J., Veeramanikandan S. and Benita Sherine H., 2014. Synthesis and characterization of novel benzohydrazide derivatives *Pelagia Research Library Der Chemica Sinica*, 5(6):42-47.
- Marshall, K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review* 9:136-156
- McIntosh, G.H., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinstead, R. L., *et al.* 1998. Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal* 8: 425-434.
- McMahon, D.J., Oommen, B.S. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science* 91:1709–1721.
- 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.
- Morrison, M., and Hultquist, D.E. 1963. Lactoperoxidase II Isolation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 238:8, 2843-2849.

- Ozdemir, H., Aygul, I. and Kufrevioglu, O. I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125–134.
- Ozdemir, H., Hacibeyoglu, H. I. and Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 143–155.
- Ozdemir, H. and 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.
- Pourtois, M., Binet, C., Van Tieghem, N., Courtois, P. R., Vandenabeele, A. and Thirty, L., 1991. Saliva can contribute in quick inhibition of HIV infectivity. *AIDS*, 5, 598–600.
- Pütter, J., and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*. Bergmeyer, third edition, 286p, VCH, New York, USA.
- Raja A. S., Agarwal A. K., Mahajan N., Pandeya S. N., Ananthan A., 2010. Antibacterial and antitubercular activity of some diphenyl hydrazone and semicarbazone, *Ind, J Chem*, 49B:1384-1388
- Reiter, B. and HaErnolv, G., 1984. Lactoperoxidase antibacterialsystem: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724-732.
- Reiter, B. and Perraudin, J.P., 1991. Lactoperoxidase: biological functions. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*, 1. CRC Press, Boca Raton, FL, 143–180, Canada, USA.
- Schirmann, Jean-Pierre, and Paul Bourdauducq, 1989. "Hydrazine." *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* .
- Segel, I.H., 1968. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley and Sons, New York, 403p, New York.
- Seifu E., Buys E., ve Donkin E., 2005. ‘Significance of The Lactoperoxidase System in the Dairy Industry and Its Potential Applications: A Review’, *Trends in Food Science & Technology* 16: 137–154.
- Shimazaki, K., Nishio, M., Kawano, N., 1988. Separation of biologically active proteins from whey. *Rakuno Kagaku, Shokuhin no Kenkyu*, 37(2), 45-51.
- Shin, K., Hayasawa, H., and 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. and Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 1307.
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Atasever, A. and Ozdemir, H., 2010. The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5,1351–1356.
- Smithers, G. W. 2008. Whey and whey proteins— From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal* 18: 695-704.

- Stork, G.; Benaim, J. (1977). "Monoalkylation of α,β -Unsaturated Ketones via Metalloenamines: 1-butyl-10-methyl- $\Delta^1(9)$ -2-octalone". *Org. Synth.* 57: 69.; Coll. Vol. 6, p. 242.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Uguz, M. T. and Ozdemir, H., 2005. Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 397–401.
- Usanmaz, H., 2014. Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- VanHuystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 205.
- Vasavada P., ve Cousin M., "Dairy Science and Technology", Handbook, Volumes 13. John Wiley & Sons, 978-1-56081-078-0. Edited by: Hui, Y.H, (2005).
- Welk, A., Rudolph, P., Kreth, J., Schwahn, Ch., Kramer, A., Below, H., 2011. Microbicidal efficacy of thiocyanate hydrogen peroxide after adding lactoperoxidase under saliva loading in the quantitative suspension test. *Archives Of Oral Biology*, 56, 1576 –1582.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity Chromatography of Carbonic Anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Wilchek, M., Miron, T. and Kohn, J. 1984. Affinity chromatography. *Methods in enzymology*, 104, 3-55.
- Xiao, L., Li, C., Xin, S. 2007. Isolation and purification of lactoperoxidase in bovine milk. *Zhongguo Rupin Gongye*, 35(3), 23-25

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum'un Oltu ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yakutiye Araştırma Hastanesi, Hematoloji Laboratuvarında çalışmaktadır.

