

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
GLUTARALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI
AĞIR METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HESNA ECEM SAYIT

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Hesna Ecem SAYIT tarafından hazırlanan “**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, GLUTARALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.06.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU

Üye
Doç. Dr. Mahmut ERZENGIN

Üye
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK

.....

.....

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
GLUTARALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI AĞIR
METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HESNA ECEM SAYIT
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI:YRD. DOÇ. DR. SERAP UZUNOĞLU)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

Bu çalışmada laktoperoksidaz enzimi afinite kromatografisi tekniğine göre Oktay Arslan tarafından sentezlenen CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B-L-trozin-sülfanilamid kimyasal yapısına sahip afinite kolonu kullanılarak işlem görmemiş inek sütünden saflaştırılmış ve gluteraldehit ile immobilizasyonu sağlanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan laktoperoksidaz enzimi % 28,69 verimle ve 407,94 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve 78 kDa civarında tek bant gözlenmiştir.

Laktoperoksidaz enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-Sülfonik asit) (ABTS) bileşiği substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir ve Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $2 \times 10^{-3} M$ ve 5000 U/ml'dak olarak bulunmuştur.

$CoCl_2$, $CuSO_4$, $MgSO_4$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$, bileşikleri ile laktoperoksidaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri araştırılmıştır. Çalışılan bileşiklerden inhibisyona neden olan bileşiklerin IC_{50} değerleri $CoCl_2$ için $5,043 \times 10^{-4} M$, $CuSO_4$ için $7,781 \times 10^{-4} M$, $CdCl_2$ için $4,621 \times 10^{-4} M$, $NiCl_2$ için $6,939 \times 10^{-4} M$, $HgCl_2$ $0,858 \times 10^{-4} M$ ve $FeCl_3$ $4,930 \times 10^{-4} M$ olarak bulunmuştur. Ayrıca $MgSO_4$ ve $MnCl_2$ bileşikleri laktoperoksidaz enziminin aktivitesini artırmışlardır.

Enzim farklı glutaraldehit yüzdelerinde immobilize edilmiş ve enzim aktivitesi en fazla % 12 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzimde gözlenmiştir. Immobilize enzimin kinetik sabitleri, ABTS bileşiği substrat olarak kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilmiştir. K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $1,67 \times 10^{-3} M$ ve 3333,33 U/mL.dak olarak bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Laktoperoksidaz (LPO), afinite kromatografisi, enzim immobilizasyonu, gluteraldehit.

ABSTRACT

PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE, IMMOBILIZATION WITH GLUTARALDEHYDE OF LACTOPEROXIDASE AND INVESTIGATION OF SOME HEAVY METALS EFFECTS ONTO THE ENZYME AFFINITY

MSC THESIS

HESNA ECEM SAYIT

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSIST.PROF.DR.SERAP UZUNOĞLU)

BALIKESİR, JUNE 2015

In this study, the enzyme Lactoperoxidase was purified by Sepharose-4B-L-tyrosine-sulfonamide. This gel synthesized by Arslan O. according to affinity chromatography technique. Lactoperoxidase was purified and immobilization on glutaraldehyde was investigated. Lactoperoxidase which was purified by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography was obtained with 28,69 % yield and 407,94 degree of purification. Purity of the enzyme was checked by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and a single band was observed around 78 kDa.

Lactoperoxidase enzyme kinetic constants (K_M and V_{max}) were determined by using 2'-azino-bis (3-ethylbenziazolin-6-Sulfonik asit) (ABTS) compound as substrate. K_M and V_{max} values obtained from the Lineweaver-Burk graph were $2 \times 10^{-3} M$ and 5000 U/ml.min respectively.

In vitro effects of $CoCl_2$, $CuSO_4$, $MgSO_4$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$ compounds on lactoperoxidase enzyme were investigated and IC_{50} values were $5,043 \times 10^{-4} M$ for $CoCl_2$, $7,781 \times 10^{-4} M$ for $CuSO_4$, $4,621 \times 10^{-4} M$ for $CdCl_2$, $6,939 \times 10^{-4} M$ for $NiCl_2$, $0,858 \times 10^{-4} M$ for $HgCl_2$ and $4,930 \times 10^{-4} M$ for $FeCl_3$. In addition, $MgSO_4$ and $MnCl_2$ were increased the enzyme activity.

The enzyme was immobilized on different percentages of glutaraldehyde and maximum enzyme activity of the immobilized enzyme was observed in the rate of 12 % glutaraldehyde. Immobilized enzyme's kinetic constants were obtained from Lineweaver-Burk graph using ABTS compound as substrate. K_M and V_{max} values were found $67 \times 10^{-3} M$ and 3333,33 U / mL.min respectively.

KEYWORDS: Lactoperoxidase (LPO), affinity chromatography, inhibition, enzyme inhibition, Glutaraldehyde.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktoperoksidaz Enzimi	1
1.1.1 Enzimin Biyokimyasal Yapısı... ..	2
1.1.2 Enzimin Etki Mekanizması.....	3
1.1.3 Laktoperoksidazın Antimikrobiyal Etkisi.....	4
1.2 Ağır Metaller ve Çevreye Etkileri.....	7
1.3 Enzim İmmobilizasyonu	8
1.3.1 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri	10
1.4 Araştırmanın Amacı	11
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	12
2.1 Materyal.	12
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	12
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	13
2.2 Yöntemler	16
2.2.1 Laktoperoksidaz Enzimi Çözeltisinin Hazırlanması ve Saflaştırılması.....	16
2.2.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	17
2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	17
2.2.3 Kalitatif ProteinTayini	18
2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	18
2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması	19
2.2.5.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin Kolona Bağlanması.....	19
2.2.5.2 Sülfonamidin Kenetlenmesi.....	20
2.2.5.3 Afinite Kolonunun Paketlenmesi	21
2.2.5.4 Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu	22
2.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS- PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	22
2.2.7 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	23
2.2.8 IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	23
2.2.9 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı.....	24
3. BULGULAR	26
3.1 Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri.....	26
3.2 Enzimin Saflaştırılması	27

3.2.1	Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması	27
3.2.2	Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması	27
3.3	SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	31
3.4	Bazı Bileşiklerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	31
3.5	Enzim İmmobilizasyon Basamağı	40
3.5.1	Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması	40
3.5.2	Glutaraldehit ile % 12 Oranında Karıştırılarak İmmobilize Edilen LPO Enzimi için Aktivite Tayini	42
3.5.3	İmmobilize Enzim için K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması	44
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
5.	KAYNAKLAR.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Laktoperoksidazın Yapısı.....	3
Şekil 2.1: Sepharose-4B nin aktifleştirilmesi.	20
Şekil 2.2: L- Tirozinin bağlanması.	21
Şekil 2.3: Sülfonamid bileşiğinin bağlanması.	21
Şekil 2.4: Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi.	24
Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.	26
Şekil 3.2: LPO enziminin Sepharose-4B- L- Tirozin sülfonamid jeli ile saflaştırma grafiği	27
Şekil 3.3: Saflaştırılmış LPO enziminin ABTS substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	29
Şekil 3.4: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE görüntüsü.....	31
Şekil 3.5: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CoCl_2 bileşiğinin % aktivite grafiği	32
Şekil 3.6: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CuSO_4 bileşiğinin % aktivite grafiği.	33
Şekil 3.7: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine MgSO_4 bileşiğinin % aktivite grafiği.....	34
Şekil 3.8: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CdCl_2 bileşiğinin % aktivite grafiği.	35
Şekil 3.9: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine NiCl_2 bileşiğinin % aktivite grafiği.....	36
Şekil 3.10: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine HgCl_2 bileşiğinin % aktivite grafiği.....	37
Şekil 3.11: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine MnCl_2 bileşiğinin % aktivite grafiği.....	39
Şekil 3.12: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine FeCl_3 bileşiğinin % aktivite grafiği.....	40
Şekil 3.13: %12 oranında glutaraldehit ile immobilize edilmiş enzim için aktivite grafiği.....	44

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: LPO sisteminin antimikrobiyal spektrumu..	5
Çizelge 2.1: Kullanılan laboratuvar gereçleri.....	12
Çizelge 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu.....	14
Çizelge 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu.	15
Çizelge 2.4: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı.	15
Çizelge 2.5: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi.....	16
Çizelge 2.6: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi.....	16
Çizelge 3.1: LPO enzimi için saflaştırma tablosu.	28
Çizelge 3.2: LPO enziminin ABTS substratı kullanılarak K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	30
Çizelge 3.3: $CoCl_2$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.	32
Çizelge 3.4: $CuSO_4$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.....	33
Çizelge 3.5: $MgSO_4$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.	34
Çizelge 3.6: $CdCl_2$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.	35
Çizelge 3.7: $NiCl_2$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.....	36
Çizelge 3.8: $HgCl_2$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.....	37
Çizelge 3.9: $MnCl_2$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.	38
Çizelge 3.10: $FeCl_3$ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.....	39
Çizelge 3.11: Serbest enzim, farklı yüzdelerdeki GA miktarları ve immobilize enzim aktiviteleri.....	41
Çizelge 3.12: İmmobilize LPO enziminin ABTS substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	43
Çizelge 3.13: İmmobilize ve serbest enzim için katalitik etkinlik, V_{max} ve K_M değerlerinin karşılaştırılması.....	45

SEMBOL LİSTESİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
DMSO	: Dimetil sülfoksil
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
GA	: Glutaraldehit
I	: İnhibitör
LPO	: Laktoperoksidaz enzimi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
POD	: Peroksidaz
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen; fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan, tavsiyeleri ve cesaretlendirmeleri ile her zaman yanımda olduğunu hissettiğim çok değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU 'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Reyhan İRKİN, Yrd. Doç. Dr. Nahit GENCER ve Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK ' a ilgi ve alakaları için teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında, bana hep destek olan, bilgi ve yorumları ile beni yönlendiren sevgili çalışma arkadaşlarım Çiğdem BİLEN, Başak GÖKÇE ve Sinem SÜMERSAN ' a

Çalışmalarımda daima moral ve motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım, her zaman yanımda olan ve bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen değerli aileme ve eşim Ömer SAYIT 'a

En içten saygı ve sevgilerimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım,

iyi ki varsınız.

Balıkesir, Haziran 2015

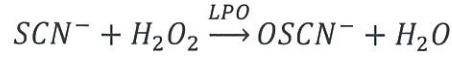
Hesna Ecem SAYIT

1. GİRİŞ

Laktoperoksidaz (LPO) (Hidrojen peroksit Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7) Memelilerin gözyaşı, meme, tükürük bezleri ile bu bezlere ait salgılarda bulunan [1] prostetik hem grubu içeren bir glikoproteindir [2, 3]. Laktoperoksidaz, tüm memeli sütlerinde bulunmaktadır [4]. LPO enzimi memelilerin non-immun biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşenidir ve patojen mikroorganizmalara karşı yeni doğan yavrunun bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini korumada önemli bir role sahiptir [5, 6].

İlk olarak 1940'lı yıllarda sığır sütünde bulunduğu rapor edilmiştir. Laktoperoksidaz enzimi, çiğ süt kalitesini koruma amaçlı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [4].

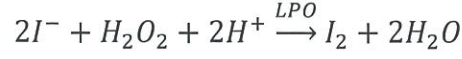
Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tiyosiyonat iyonu (SCN^-) ile birlikte antimikrobiyal bir sistem oluşturmaktadır [4]. LPO, süt içindeki önemli enzimlerden biridir ve aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi tiyosiyonat iyonunun sütte doğal olarak bulunan [7] antibakteriyal hipotiyosiyanata peroksidasyonunu katalizler [8, 3, 9].



Çiğ sütte tiyosiyanat ve H_2O_2 düşük konsantrasyonda olmasına rağmen, laktoperoksidaz fazla miktarda bulunur [10].

LPO sistem ortamda hidrojen peroksit ve tiyosiyanat iyonu bulunduğu zaman sütte doğal bir inhibitör olarak etki gösterir [8]. Hastalık yapıcı bakteriye ait metabolik enzimlerin fonksiyonlarını bozar [11, 12]. Yani patojenlerin yaşamı için önemli olan çeşitli proteinlerin tiol gruplarıyla reaksiyona girer, önemli enzim ve protein sistemlerini inaktive eder [13].

Laktoperoksidaz enzimi aynı zamanda iyodürün hidrojen peroksitle oksidasyonunu da katalizler [14]. Bu peroksidazlar memeli sisteminde yaygın olarak bulunurlar [15].



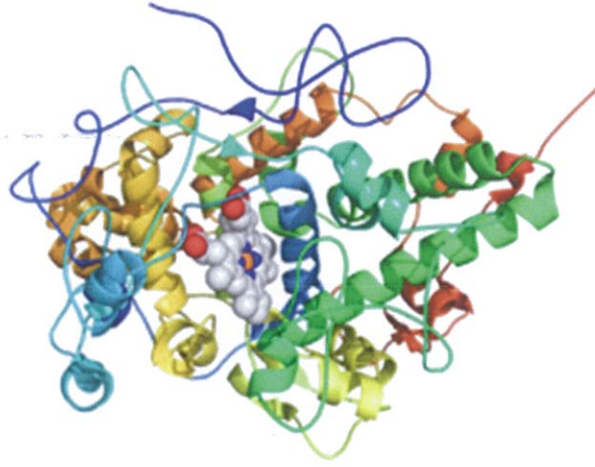
Tiyosiyanat iyonu mide ve böbreklerde, tiroid bezinde, tükürükte ve hayvan dokularında yaygın bir şekilde dağılmıştır ve hayvan türlerine göre değişiklik gösterir [16]. Aynı zamanda hayvan cins ve laktasyon dönemlerine [17] mevsimlere ve beslenmeye göre de farklılık gösterir [18]. İyodin metabolizması ve bunun sonucu olarak tiroid fonksiyonlarının araya girmesiyle tiyosiyanat iyonunun aşırı alımının yüksek düzeyde toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [19].

LPO sistemin görevi çeşitli karsinojenlerin parçalanması yanında peroksidatif etkiye karşı hayvan hücrelerini koruduğu rapor edilmiştir [20].

1.1.1 Enzimin Biyokimyasal Yapısı

Laktoperoksidaz enzimi, %8-10 karbohidrat ve 608 aminoasit rezidüsü içeren tek bir polipeptit zincir ihtiva eder ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 78 kDa'dur. Yüksek bir izoelektrik noktaya sahip olan laktoperoksidaz, demir hem grubu olan bir glikoprotein olup en az 10 izoformu bilinmektedir [4]. LPO, taze sütün pH aralığı olan pH 4- pH 7 arasında en yüksek aktiviteye sahiptir.

Değişik araştırmacılar tarafından proteinin 3 boyutlu yapısı güçlü bir şekilde, bir kalsiyum iyonuyla stabilize olduğu ifade edilmiştir [21].



Şekil 1.1: Laktoperoksidaz yapısı [2].

Yukarıdaki şekilde laktoperoksidazın kristal üç boyutlu yapısı gösterilmektedir. Her bir protein zinciri farklı renktedir. Hem grubu beyaz, azotlar mavi ve demir grubu ise portakal rengi ile gösterilmiştir [15].

Hem grubu proteine kovalent bağlıdır ve bu bağlanma hem grubunun hidroksil grubu ile proteinin karboksil grubu arasında meydana gelmektedir [22].

1.1.2 Enzimin Etki Mekanizması

LPO diğer peroksidazlar gibi H_2O_2 mevcudiyetinde fenoller, aromatik aminler, pirogallol, askorbat ve guaiakol gibi moleküllerin oksidasyonunu da katalizlerler [22,2]. En yaygın substratları arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), guaiakol ve katekol gibi basit fenoller sayılabilir [23,24,25]. Ayrıca hidrazinler tarafından da inhibe edildiği bilinmektedir [2]. Bazı tiyokarbamid bileşiklerinin sığır LPO enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir [26].

LPO enzimi için optimum şartlar rapor edilmesine rağmen inhibitörleri tam olarak bilinmemektedir. Fakat çevresel kirleticiler, ağır metaller arasında bir grup elementlerin enzimin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir. Laktoperoksidaz (LPO) H_2O_2 mevcudiyetinde yapılan çalışmada guaiacol oksidasyonun mekanizması aydınlatılmış ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinon'a okside olduğu bulunmuştur [25].

1.1.3 Laktoperoksidazın Antimikrobiyal Etkisi

Laktoperoksidaz enzimi,



reaksiyonunu katalizler, bu nedenle hem hidrojen peroksit hem de tiyosiyanat, antimikrobiyal aktivite için önemlidir [27]. LPO'nun antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olan tiyosiyanat anyonu (SCN^-), hayvan dokuları ve salgılarında bulunmaktadır. Özellikle meme, tükürük, tiroid bezleri ve onların salgılarında bulunur ve konsantrasyonu hayvanın türüne, yemleme şekline, laktasyon dönemine, yem kompozisyonuna bağlı olarak değişmektedir [4, 28].

LPO'nun antibakteriyal aktivitesinden sorumlu olan tiyosiyanatın en önemli ara oksidasyon ürünü fizyolojik pH'da hipotiyosiyanat (OSCN^-)'dır ve OSCN^- , H_2O_2 'nin bire bir sitokiyometrik oranında üretilir.

Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu diğer ürünler ise, siyanosülfüroz ve siyanosülfirik asittir. Bu bileşenler bakteriyal proteinlerin sülfhidril gruplarını okside edebilirler. Hipotiyosiyanat anyonunun bakterileri yok etmede arabulucu olduğu düşünülmektedir [4,29].

Çoğu laktobasil, laktokok ve streptokoklar aerobik şartlarda LPO sistemi aktive etmek için yeterli miktarda H_2O_2 üretirler. H_2O_2 sisteme dışarıdan ilave edildiği gibi, sodyum perkarbonat, glikoz oksidaz gibi H_2O_2 üreten sistemlerin ilavesiyle de sağlanabilir [4]. Çünkü hidrojen peroksit fazla kararlı değildir, katalaz tarafından indirgenebilir veya laktoperoksidaz gibi enzimlerce bağlanabilir [30].

LPO'nun mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özelliği ve buna ek olarak farklı karsinojenleri parçalama ve hayvan hücrelerini peroksidatif etkilere karşı koruması onun biyolojik önemini göstermektedir. LPO sistemin antioksidan olarak da rol oynadığı ve bu nedenle memeli hücrelerini koruduğu da bildirilmiştir [4]. Laktoperoksidaz sistemi bakteri, mantar ve virüsler de dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal ve bakteriyostatik aktiviteye sahiptir.

Çizelge 1.1: Laktoperoksidaz sisteminin antimikrobiyal spektrumu [4].

Mikroorganizma	Antimikrobiyal Aktiviteyi Sağlayan	Etkisi
Gram Pozitif Bakteriler		
<i>Streptococcus cremoris</i>	SCN ⁻	Oksijen Alımı
<i>Streptococcus lactis</i>	SCN ⁻	Büyüme İnhibisyonu
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SCN ⁻	Şeker Taşınımı
<i>Streptococcus mutans</i>	SCN ⁻	Glukoz Alımı
<i>Streptococcus mutans</i>	SCN ⁻	Enzim İnhibisyonu
<i>Streptococcus sanguis</i>	I ⁻	Bakterisidal
Gram Negatif Bakteriler		
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	SCN ⁻ /I ⁻	Bakterisidal
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	I ⁻	Büyüme İnhibisyonu
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	SCN ⁻ /I ⁻	Bakterisidal
<i>Helicobacter pylori</i>	SCN ⁻	Bakterisidal
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	SCN ⁻ /I ⁻	Bakterisidal
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	SCN ⁻	Bakterisidal
<i>Prevotella loescheii</i>	SCN ⁻	Bakterisidal
<i>Prevotella intermedia</i>	SCN ⁻	Bakterisidal
<i>Prevotella melaninogenica</i>	SCN ⁻	Bakterisidal
<i>Yersinia enterocolitica</i>	SCN ⁻	Büyüme İnhibisyonu
Mantarlar		
<i>Candida albicans</i>	SCN ⁻	Yaşama Yeteneğinin Kaybı
Virüsler		
<i>HIV-1</i>	SCN ⁻	Enzim İnhibisyonu

(SCN⁻; Tiyosiyonat iyonu, I⁻; iyodür iyonu)

Tabloda verilmiş mikroorganizmalar dışında farklı bakteri grupları, laktoperoksidaz sistemine karşı değişen derecelerde duyarlılık gösterirler. *Shigella*, *Salmonella*, *Coliform*, *Pseudomonas* gibi katalaz pozitif mikroorganizmalar ve gram negatif bakteriler, laktoperoksidaz sistemi ile yalnızca inhibe edilmekle kalmaz aynı zamanda ortam şartlarına bağlı olarak (pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, hücre yoğunluğu) H₂O₂'nin ilavesi ile öldürülebilir. *Streptococ*, *Lactobacil* gibi katalaz negatif bakteriler ve gram pozitif bakteriler laktoperoksidaz sistemi tarafından öldürülmezler genelde inhibe edilirler [4].

Laktoperoksidaz sistemi tarafından gerçekleştirilen bakteriyal inhibisyon sitoplazmik membrana etki eder çünkü hipotiyosiyanat (OSCN⁻) enzimlerin serbest -SH gruplarına bağlanır, bu da pH düşüşüne, potasyum ve aminoasitlerin hücreden sızmasına neden olur. Bu durum karbohidratların, aminoasitlerin ve diğer besin elementlerinin hücreye alımını engeller çünkü bunların transfer mekanizmaları inhibe edilmiş olur. Ayrıca hücrenin DNA ve RNA sentezleri bozulur. Gram (-) bakteriler, gram (+) bakterilere göre laktoperoksidaz sistemi tarafından parçalanmaya ve öldürülmeye daha elverişlidir. Bu durum muhtemelen bu iki hücre türündeki hücre duvarı ve kalınlık farklarına bağlıdır. Bazı gram (+) *Streptococlar* hipotiyosiyanata karşı dirençlidirler [31].

H₂O₂ ve sodyum klorür (NaCl) varlığında aflatoksinin parçalanması laktoperoksidaz sisteminin başka bir özelliğidir. Araştırmalar, elma suyunda ve tuz çözeltisinde H₂O₂ kaynağı olarak glukoz oksidaz ile laktoperoksidaz sisteminin antifungal aktivite gösterdiğini belirtmiştir [4]. Başka bir araştırmada ise, laktoperoksidazın çocuk felci virüsü ve ineklerde çiçek hastalığı virüsünün her ikisini de öldürdüğü gösterilmiştir. Bu özel virüsler ısı, kurutma, dezenfektan etkilerine diğer virüslere kıyasla çok daha fazla dayanıklıdır [32].

Laktoperoksidazın biyolojik olarak önemi, patojen mikroorganizmalara karşı doğal konak savunma sistemine dâhil olduğundan [4].

1.2 Ağır Metaller ve Çevreye Etkileri

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [33]. Ancak bu etkenlerin insanların nüfus artışı, teknolojik gelişmeler ve tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak zarar görmesi ve bu zararın rahatsız edici seviyelere ulaşması sonucu kirlenmesi söz konusudur. Böylece çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır. Çevre kirliliği geçici veya sürekli bir biçimde canlılara zarar veren gaz, sıvı ve katı maddeler ile radyasyonun; cisim, sistem ve çevre de meydana getirdiği olumsuz değişimlerdir. Bir başka deyişle hava, su ve toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde meydana gelen arzu edilmeyen değişimlerdir [34].

Çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin başında ağır metaller gelmektedir. Ağır metallerin (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, Mo, Co, Cr, gibi) toprak kirlenmesi ve çevreye yaptığı zararlar çok önemli güncel sorunlar haline gelmiştir.

Hızlı şehirleşme, endüstrileşme, gübreleme ve pestisit kullanımı, toprak ve su kaynaklarında toksik metal kirliliği ile sonuçlanmaktadır. Toksik metallerin birikimindeki artma, ekosistemde dengesizliğe neden olmakta, toksik metallerin yüksek miktarlarda çoğu habitatın canlı gelişimi boyunca birikmektedir. Bu durum biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte ve biriktirilmektedir. Ayrıca bu metallerin besin zincirindeki yüksek konsantrasyonu yaşayan insan ve hayvan sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmesiyle sonuçlanmaktadır.

Esansiyel olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir [35,36]. Önemli bir kirletici grubu oluşturdukları bilinen ağır metallerin; toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi, canlı organizmalarda birikmesi de söz konusudur. Krom, civa, kurşun, kadmiyum, mangan, kobalt, nikel, bakır ve çinko gibi metaller doğada genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların suda çözünürlükleri oldukça düşüktür.

Çok küçük miktarlarda bile genellikle kuvvetli zehir etkisine sahip olan ağır metaller, kirlenmiş sularda metal, katyon, tuz ve kısmen anyon şeklinde bulunurlar [36].

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır [37].

Ağır metaller biyolojik döngü içinde en önemli zararlarını bitkilerde meydana getirmektedir. Tohum çimlenmesi, çıkış, fide büyüme ve gelişimi, bitkilerde büyüme ve gelişmede gerilikler, biyomas üretiminin düşmesi, çiçek ve meyve tutumunda azalma, verimde düşme ve ürün kalitesinde bozulma bu zararlardan bazılarıdır. Bundan başka ağır metallerin fotosentetik aktiviteyi sekteye uğratması, azot döngüsü ve bağlanmasını bozması, klorofil miktarını azaltması, enzim sistemlerinde bozulmalara yol açması; bitkilere yarayışlı diğer elementlerin alımını engellemesi gibi hücre içi mekanizmalarda da olumsuz etkileri bulunmaktadır [38].

Genelde ağır metallerin çevre açısından yarattığı sorunlar; insan, hayvan ve bitki sağlığı ile su ekosistemleri üzerindeki etkileri açısından önemli olmaktadır.

1.3 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, canlı sistemlerinde kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Belirli bir düzen ile sıralanmış binlerce atomdan meydana gelmiş bu moleküller, canlı hücrelerde cereyan eden farklı kimyasal reaksiyon topluluklarının katalizlenmesini sağlarlar. Biyolojik proseslerde, hastalık ve sağlıktaki rolleri geniş bir şekilde incelenmektedir [39].

Enzimler oldukça ılıman koşullarda, yüksek derecede substrat seçiciliği ile reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptir. Böylece yan ürün oluşumunu azaltır. Katalizlenen reaksiyonlar arasında, mevcut organik kimya metodlarıyla ulaşılamayan, biyolojik makromoleküller arasında son derece fazla, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları vardır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımları

için son derece önemli kılmıştır [39]. 20. yüzyılın başlarında, enzimlerin fermentasyon işlemlerinden sorumlu olduğu bulunmuş, yapıları ve kimyasal bileşenleri dikkatle inceleme altına alınmıştır. Bunun sonucunda biyolojik katalizlerin geniş kapsamlı teknolojik kullanımı tekstil, ilaç ve diğer kimya endüstrisi gibi farklı alanlara da öncülük etmiştir [40]. Ancak pek çok enzimin kararsız olması, saflaştırılması için oldukça yüksek ücret gereksinimi ve kullanıldıktan sonra reaksiyon karışımından aktif enzimin tekrar kullanımı için kurtarılması teknik olarak oldukça zordur [41].

Enzimler çözültide tek başına, diğer bileşenleriyle kümeleşerek veya bir yüzeye bağlı olmak gibi değişik durumlarda kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler. Yüzeye bağlanma veya immobilizasyon özellikle teknik kullanım için üzerinde son derece yoğunlaşılabilir durumdadır [42].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere bağlanmasının veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması, bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak ifade edilebilir [43, 44]. İmmobilize edilmiş enzimler genel olarak endüstriyel uygulamalarda katalitik özelliklerinin yanında, ekonomik olarak da son derece geliştirilmiş olmasının önemi bir hayli fazladır [45].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Japonya'nın Tanebe Seiyaku Limited şirketinde Chibata ve arkadaşları tarafından, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae* aminoasilaz'ın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir [46]. İmmobilize enzimlerin diğer önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak verilebilir. Bunun yanında bazı endüstriyel süreçlerde, istenilen enzimi içeren bütün mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılabilir [47].

Endüstriyel olarak uygulamalarından başka, biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıpta kullanılan ilaçlardaki pek çok biyoteknolojik ürünlere enzim immobilizasyonunun temel teşkil ettiği görülmektedir [48].

Özellikle son 20 veya 30 yıla baktığımızda, immobilizasyon teknikleri hızla gelişmiştir ve immobilizasyon teknikleriyle ilgili tasarımlar önemli oranda artmıştır. Ancak halen mevcut işlemlerde ilerleme gerekmektedir. İmmobilize enzimlerin

diğer pratik işlemlere uygulanabilirliğini artırmak için yeni metodolojilerin geliştirilmesi ve mevcut tekniklerin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

1.3.1 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri

Enzim immobilizasyonunun sonucu olarak enzim molekülünün termal stabilitesi ve katalitik aktivitesi gibi bazı özellikleri, çözünebilir eşleniklerine göre değişiklik gösterebilir [49]. Özelliklerinin modifikasyonlarındaki değişimin nedeni, immobilize enzimin esas aktivitesindeki değişimle veya immobilize enzimle substrat arasındaki etkileşimin farklı olmasından kaynaklanır. İmmobilizasyonların katalitik özelliklerindeki gözlenen değişim proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki konformasyonlarındaki değişimle, enzim ve substrat arasındaki bağlanmayla ilgili olduğu düşünülmektedir [50].

Genel olarak enzimler immobilize edildiğinde, enzimin çalışma stabilitesi arttırılır. Stabilizasyon kavramı, immobilizasyon yapılacak enzimler için son derece önemli etkileyici bir güçtür. Pek çok durumda gözlenen operasyonel stabilizasyon, enzimin bağlanma sonucuyla ilgilidir. Ancak, moleküler seviyedeki doğru stabilizasyonun gösterilmesi, proteinlerin immobilizasyonunun çok noktaya kovalent bağlanması ile olabilmektedir [51]. Farklı metodların kullanımı ile ilgili pek çok bilimadami tarafından gösterilen çalışmalarda stabilizasyon ve matrikse enzimin kovalent bağlarla bağlanma sayıları ile önemli bir bağlantı olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin kullanımı ile ilgili temel problemlerden birisi, özellikle enzimlerin makromoleküler substratlarıyla gösterdiği katalitik aktivitenin kaybıdır [52].

Enzimin aktif bölgesine substratların ulaşımının sınırlanmasından dolayı, substratın sadece yüzeydeki gruplara ulaşmasının sonucu olarak aktivite düşebilir. Bu sterik sınırlama zamanla makromoleküler substratlardan türeyen ürünlerin karakteristik özelliklerini değiştirebilir. Bu sterik problemlerden uzaklaşmak için pek çok strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; izole makromoleküler zincirlerin ağlarından oluşmuş taşıyıcıların seçimi, immobilize olacak enzim rezidülerinin dikkatli seçimi ve hidrofilik inert uzantı kollarının kullanılmasıdır [53].

1.4 Araştırmanın Amacı

Son yıllarda süt enzimleri üzerinde birçok çalışma yapıldı. Araştırmamızda, sütte bulunan laktoperoksidaz enziminin yapısı ve özellikleri ile antimikrobiyal aktiviteleri ve gıda sanayinde kullanım alanları hakkında bilgi verildi. Bu amaçla, LPO enziminin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması üzerinde çalışıldı. Bu teknik sayesinde, minimum zaman ve masraf harcamasıyla maksimum verim elde edilerek enzim saflaştırılması çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Yüksek verimle saflaşmış enzimin farklı ağır metal türlerinin enzim üzerine inhibitör/aktivatör etkileri gözlenmeye çalışılmıştır.

Araştırmamızın son bölümünde ise, saflaştırılan enzim glutraldehit üzerine immobilize edilecektir. Elde edilecek sonuçların endüstride ve klinik çalışmalarda önemli olabileceği düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B, sülfamid, L-trozin, p-nitro fenil asetat, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-Sülfonik asit) (ABTS), diyaliz torbaları, akrilamid, N, N, N',N'- tetra metil etilendiamin(TEMED),N,N'- metilen bisakrilamid, β - merkaptoetanol, SDS, glisin, standart serum albumin, amonyum sülfat, coomassie brilliant blue G-250, coomassie brilliant blue R-250, brom-timol mavisi Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat , trihidroksi metil aminometan(Tris), sodyum klorür, hidrojen peroksit, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, fosforik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat ve diğer kimyasal maddeler Merck A.G'den; sodyum monohidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, metanol, etanol ve amonyum persülfat Riel de Haen A.G'den sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada yararlanılan alet ve cihazlar aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 2.1: Kullanılan laboratuvar gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
Buz Makinesi	Fiocchi Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1,5 cm çap ve 10cm uzunluk)
pH Metre	WTW, Almanya
Dijital Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır.

* **Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Yıkama Tamponu (0,2 M NaHCO₃, pH=8,8):** 16.8 g (0.02 mol) NaHCO₃ 950 mL suda çözülür. 1M NaOH ile pH=8.8'e ayarlanarak toplam hacmi 1L'ye tamamlanır.

* **Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Saklama Tamponu (0,1 M NaHCO₃, pH=10.0):** 8.4 g (0.01) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülür. 1 M NaOH ile pH=10'a ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

* **Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Elde Edilen Çökeleğin Alındığı ve Diyaliz Edilen Tampon (5 mM Na₂HPO₄, pH:6,8):** 1,34 g (5.10⁻³ mol) Na₂HPO₄.7H₂O, 950 ml destile suda çözülür. 1N HCl ile pH:6,8'e ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

* **CNBr İle Aktifleştirilmiş Sepharose-4B Afinite Jelinin Dengelenmesinde Kullanılan Tampon (10 mM Na₂HPO₄, pH:6,8):** 2,68 g (1.10⁻³ mol) Na₂HPO₄.7H₂O, 950 ml saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH:6,8'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

* **CNBr İle Aktifleştirilmiş Sepharose-4B Afinite Kolonunun Yıkama Tamponu (25 mM Na₂HPO₄, pH:6,8):** 1,19 g(1.10⁻³ mol) Na₂HPO₄.7H₂O, 950 ml saf suda çözülür ve 1N HCl ile pH:6,8'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

* **LPO Enziminin Elüsyon Tamponu (1M NaCl/25mM Na₂HPO₄, pH:6,3):** 11,7 g (0,2 mol) NaCl 200 ml saf suda çözülür.

* **LPO Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan 1mM ABTS Substrat Çözeltisi:** 0,055 g (1.10⁻⁴ mol) ABTS 100 ml 0,1 M Na₂HPO₄ pH:6,0 tamponu içinde çözülür.

* **LPO Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan 3,2 mM H₂O₂ Çözeltisi:** %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan H₂O₂'den 32 µL alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

***Bradford Çözeltisi:** 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözülür ve çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek hacmi 1L'ye tamamlanır.

* **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tamponlar**

Çizelge 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tampon.

Kimyasal Madde	Miktar
0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkaptoetanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 mL

Çizelge 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon.

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g
Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır	

Çizelge 2.4: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı.

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	%10	%3
<u>Akrilamid/Bis (% 30)</u> Akrilamid 15 g Bisakrilamid 0.4 g Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> Tris-HCl 11.82 g pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	-

Çizelge 2.4: (devam)

<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

Çizelge 2.5: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi.

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant blue R-250	0.66 g
Metanol	120 mL
Glasiyal asetik asit	24 mL
Destile su	120 mL

Çizelge 2.6: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi:

% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su.

Kimyasal Madde	Miktar
Metanol	50 mL
Glasiyal asetik asit	75 mL
Destile su	875 mL

2.2 Yöntemler

2.2.1 Laktoperoksidaz Enzimi Çözeltisinin Hazırlanması ve Saflaştırılması

Taze, işlem görmemiş süt +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Bir miktar katı EDTA ve 2 mL toluen eklenerek blendır ile 30 dakika muamele edildi. Sütün sıcaklığı bir miktar yükseldi ve dolaba sıcaklığın düşmesi için bırakıldı. Tekrar 30 dakika boyunca blendır ile muamele edildi. Toplam hacim 150 ml olacak şekilde +4 °C’de 60 dakika boyunca 15000 rpm’de ve santrifüj yapıldı. Sütün çökeleği atılarak süzgeç kağıdıyla süzülen sıvı kısma % 60’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve arkasından +4 °C’de 60 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra üsteki süpernant atıldı ve altta kalan çökelek 0,05 M pH=7.0 Tris-HCl ‘den her tüpe 2 mL olacak şekilde eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

2.2.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Blender ile işlem görmüş süt hacmi,

S₁: 1’in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu,

S₂: 1’in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümü, Shindler ve Bardsley yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen prosedür ile yapıldı. Bu yöntem, H₂O₂ tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır [23].

Aktivite tayininde şu prosedür takip edildi:

1 ml'lik küvete 0,1 M pH= 6.0 fosfat tamponundan 867 µL, 67 µL 1mM ABTS ve 33 µL H₂O₂ pipetlendi. 33 µL enzim çözeltisi ilave edilerek hemen kronometre çalıştırıldı küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 3 dakika süreyle her 15 saniyede bir olmak üzere kaydedildi. Her aktivite ölçümü 3 kez tekrar edildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M fosfat tamponu (pH:6) kullanıldı.

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

$$EU = \frac{\left[\text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \times \frac{dA}{dt} \times 1000 \right]}{\epsilon_{412} \times \text{Enzim Hacmi (mL)} \times d}$$

d=1 cm, ışık yolu

2.2.3 Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır [54].

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

2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

1mL'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Tüplerin hacimleri 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8.00) kullanılarak 0,1 mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595nm'de 3ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okutuldu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100mM Tris-HCl (pH:8.00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0,1' er ml 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı .

2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden (Şekil 2.1) sonra, tirozin kovalent olarak

bağlandı. (Şekil 2.2) Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek LPO enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır.

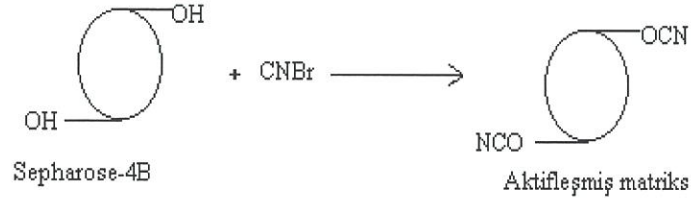
Afinite jeli aşağıda anlatılan prosedüre göre hazırlanmıştır.

2.2.5.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin kolona bağlanması

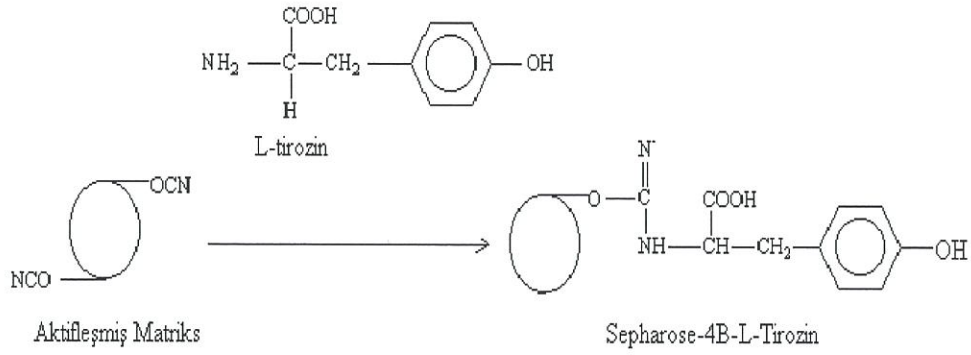
20 mL kadar Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılmakta olan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11 değerine çıkarılarak reaksiyon bu pH değerinde sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buncher hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 8 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek yavaşça karıştırılan süspansiyonda, bağlanma derecesini öğrenmek için, her 15 dakika içinde jel bulunmayan 0,2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm dalga boyunda absorbansı belirlendi. İşleme absorbans değerinde önemli bir değişme olmayıncaya kadar devam edildi. Bir süre (bağlanma süresi) yaklaşık 90 dakika sürdü. Bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 16 saat süresince bekletildi. Bu sürecin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH=8,8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

2.2.5.2 Sülfonamidin Kenetlenmesi

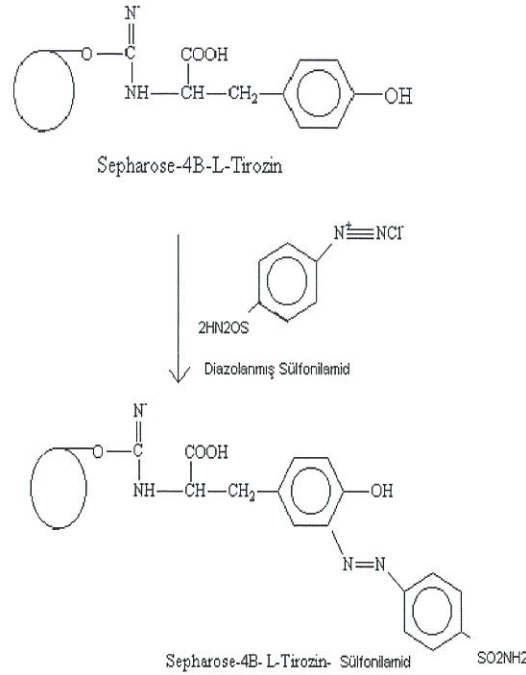
25 mg sülfonilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfonilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan sülfonilamid 40 mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH=9,5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L destile su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı.



Şekil 2.1: Sepharose-4B nin aktifleştirilmesi.



Şekil 2.2: L-Tirozinin bağlanması.



Şekil 2.3: Sülfonamid bileşiğinin bağlanması.

2.2.5.3 Afinite Kolonunun Paketlenmesi

Hazırlanan jeller dengeleme tamponu içine alınarak jeller süspansiyon edilerek havası alındı. Süspansiyon edilmiş jeller, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolonlara paketlenerek yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorptanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

2.2.5.4 Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu

2.2.1.'de belirtildiği gibi enzimin kısmi saflaştırılması ile elde edilen enzim ekstraktının 12 mL'si 25 mM Tris-HCl/ 0.1 M Na₂SO₄ (pH:7.0) tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon Tris-HCl/ 22 mM Na₂SO₄ (pH:7.0) çözeltisi ile yıkandı. Sonra 1M NaCl/ 50 mM Na₂HPO₄ (pH:6.3) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Toplanan her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorptans değerleri belirlendi.

2.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Bu amaçla iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntem uygulandı [55].

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Çizelge 2.18’te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol uzaklaştırıldı. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volta ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 200 volta çıkartıldı. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1–1.5saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renk açma

çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel, renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

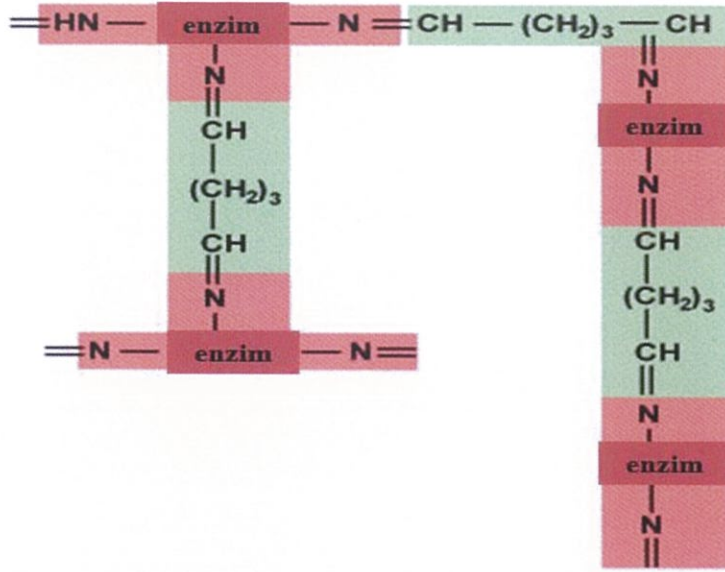
2.2.7 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda LPO, ABTS substratının altı farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. Buna dayalı olarak, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

2.2.8 IC_{50} Değerlerinin Bulunması

Co^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının laktoperoksidaz enzimi üzerine in vitro etkileri araştırılıp tüm bu iyonlardan inhibisyona neden olan iyonlar için IC_{50} değerleri tespit edildi.

2.2.9 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı



Şekil 2.4: Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi [56,57].

Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi; serbest enzim molekülleri ile glutaraldehit homo çapraz bağlayıcı reaktifi kullanılarak çapraz bağlı enzim agregasyonları oluşturulur (Şekil 2.4). Glutaraldehit reaktantının önemi, her iki ucunun da reaktif olmasıdır. Böylelikle birçok enzim molekülünün bir arada bulunmasıyla çözünür yapı çözünmez özellik kazanarak enzim molekülleri güçlü bağlanır. Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon immobilizasyonu, çapraz bağlı immobilizasyon çeşidinin bir alt kümesi olarak düşünülebilir. Bu yöntemin avantajı, glutaraldehit dışında herhangi bir taşıyıcıya gerek duyulmadığından uygulaması diğer immobilizasyon çeşitlerine göre daha basittir. Ayrıca uygulaması kolay olduğu için zamandan tasarruf edilir, maliyeti de düşüktür.

%25'lik 0.265g/ml yoğunluktaki glutaraldehit (GA), saf enzime farklı yüzdelerde ilave edildi. Glutaraldehit/ serbest enzim karışımı, 25°C de, 65-70 rpm çalkalama hızında bir gün inkübasyona bırakılarak enzim agregasyonları oluşturuldu. Serbest enzim renksiz iken immobilize enzimin renginde kahverengi bir çökelek gözlemlendi. Bir gün sonrasında immobilize enzim (5000 rpm, 4°C, 5 dakika) santrifüj edilerek katı ve sıvı faz ayrıldı. Laktoperoksidaz enzimi, çöken katı kısımda kaldığından, katı faz minimum hacimde soğuk su ile yıkama işlemine tabi

tutulduktan sonra enzim aktivitesi hem serbest hem de immobilize enzim için spektrofotometrede ölçülerek karşılaştırma yapıldı.

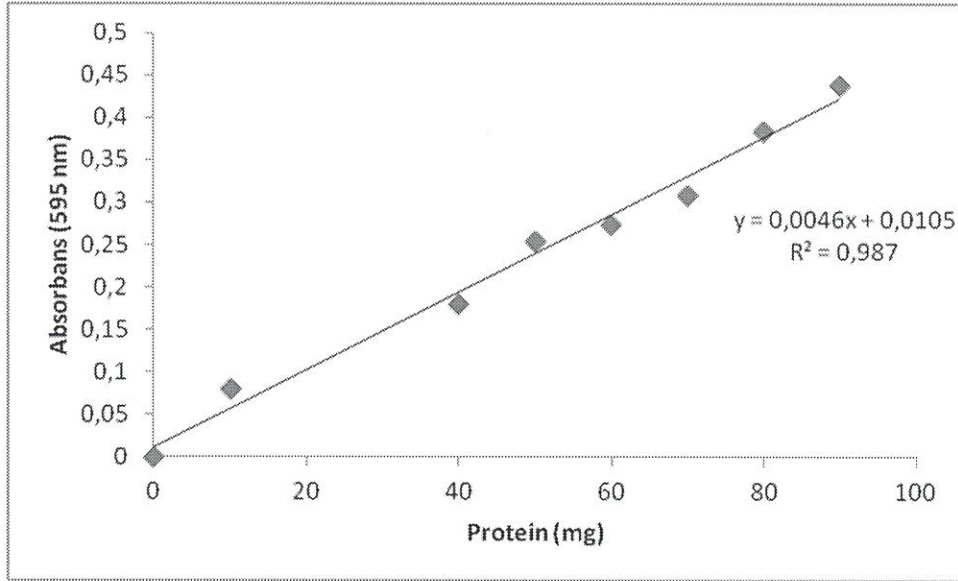
3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.4 açıklandığı gibi hazırlandı. Çeşitli basamaklardan sonra süttten elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi.

Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.



Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.

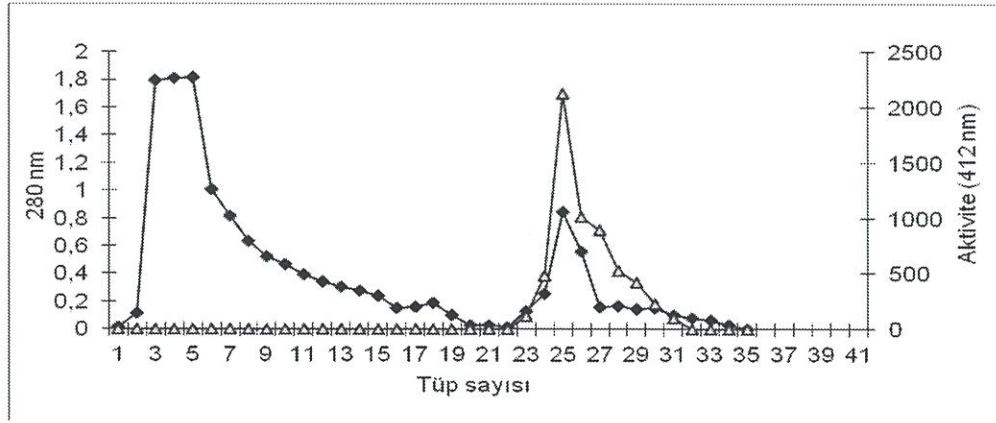
3.2 Enzimin Saflaştırılması

3.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması

Taze, işlem görmemiş süt +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde +4 °C’de santrifüj yapıldı. Sütün yağ kısmı atılarak süzgeç kağıdıyla süzülen sıvı kısma %60’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve arkasından +4 °C’de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra kalan çökelek Tris-HCl eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

3.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

Hazırlana homojenatın 10 mM fosfat (pH:6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolona 400 ml 25 mM fosfat (pH:6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek laktoperoksidaz enzimi elüe edildi. Eliüatlar 2 mL’lik fraksiyonlar halinde toplandı ve 280 nm’ absorbanları alındı. Her bir fraksiyona aktivite ölçümü yapıldı (Şekil 3.2).



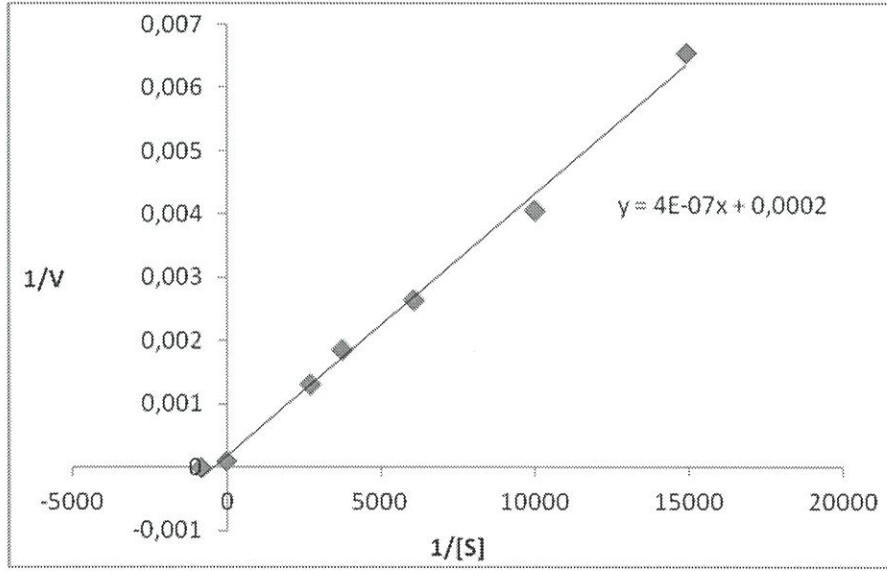
Şekil 3.2: LPO enziminin Sepharose 4B-L-Tirozin-Sülfonamid jeli ile saflaştırma grafiği.

Çizelge 3.1: LPO enzimi için saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	150	296	44400	0,1876	28,14	1577	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	12	789	9468	0,0076	0,0912	103815	21,32	65,83
Afinite Kromatografisi	6	2123	12738	0,0033	0,0198	643333	28,69	407,94

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda ABTS substratının değişen konsantrasyonlarında (Çizelge 3.2) enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı ve Linewear-Burk grafikleri çizildi.

Grafikten yararlanarak K_M değeri 2×10^{-3} M ve V_{max} değeri 5000 U/mL.dak olarak bulundu (Şekil 3.3).



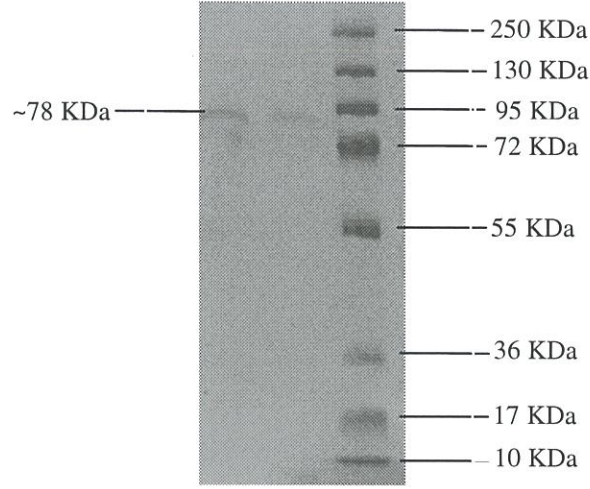
Şekil 3.3: Saflaştırılmış LPO enziminin ABTS substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.

Çizelge 3.2: Laktoperoksidaz enziminin ABTS substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

pH=6 0,1 M Fosfat Tamponu	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ L)	H ₂ O ₂ Çözeltisi Hacmi (μ L)	Küvetteki Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu [S] x10 ⁻⁵ M	Δ OD (412 nm)	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
867	33	67	33	1000	6,7	0,069	117	8,55	14925
834	33	100	33	1000	10	0,113	246	4,06	10000
767	33	167	33	1000	16,5	0,174	379	2,64	6060
667	33	267	33	1000	26,5	0,234	510	1,96	3773
567	33	367	33	1000	36,5	0,352	767	1,30	2739

3.3 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

LPO enziminin saflık kontrolü, sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi ile yapıldı (Şekil 3.4).



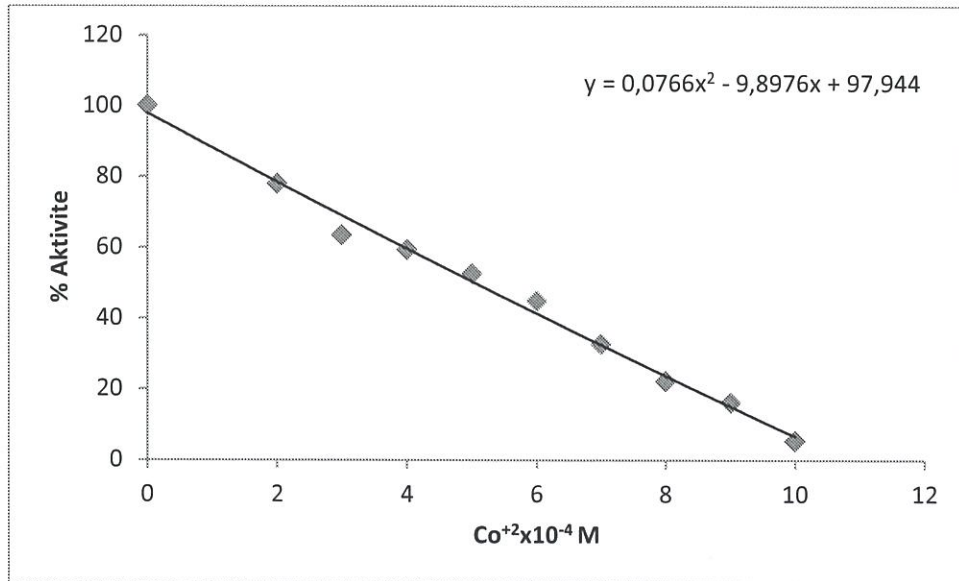
Şekil 3.4: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE görüntüsü.

3.4 Bazı Bileşiklerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10^{-2} M stok konsantrasyonuna sahip bileşiklerin laktoperoksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.3- 3.10 ve Şekil 3.5-3.12)

Çizelge 3.3: CoCl₂ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

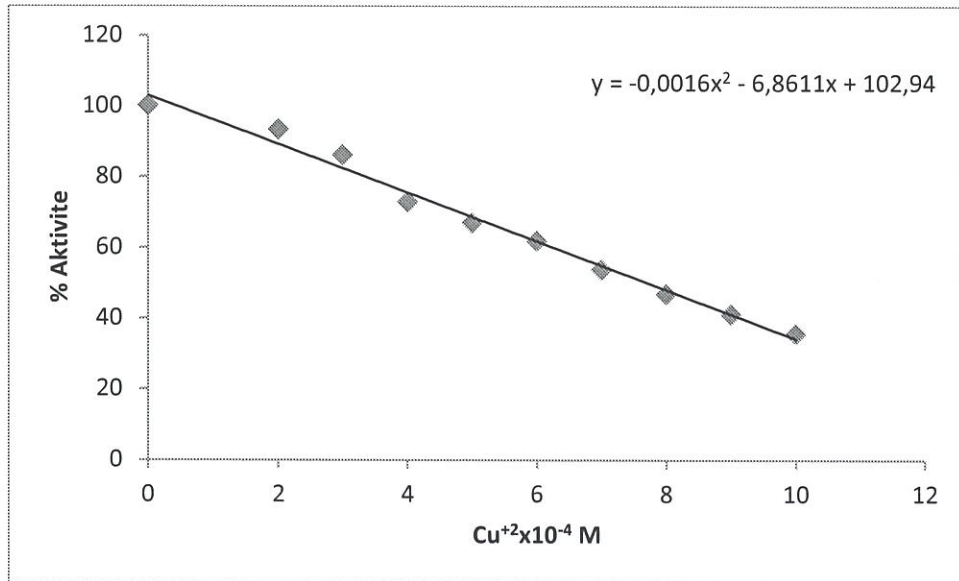
Küvetteki İnhibitor konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,974	2123,3	100
2	0,759	1654,7	77,93
3	0,618	1347,3	63,45
4	0,577	1257,9	59,24
5	0,512	1116,2	52,57
6	0,437	952,7	44,87
7	0,318	693,2	32,65
8	0,217	473,0	22,28
9	0,156	340,0	16,07
10	0,052	113,3	5,34



Şekil 3.5: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CoCl₂ bileşiğinin % aktivite grafiği (IC₅₀=5,043 × 10⁻⁴M).

Çizelge 3.4: CuSO₄ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

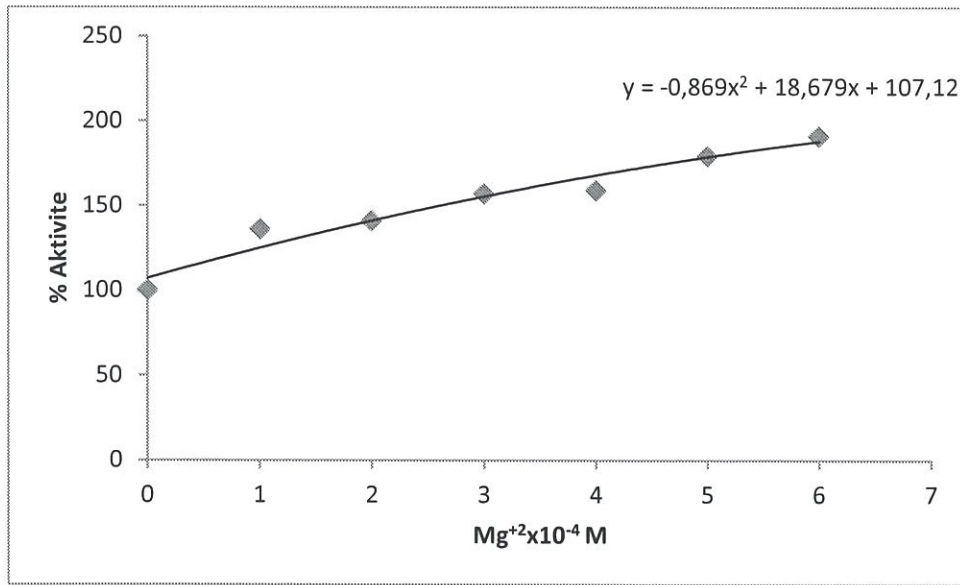
Küvetteki İnhibitor konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,759	1654,7	100
2	0,708	1543,5	93,28
3	0,654	1425,8	86,16
4	0,552	1203,4	72,72
5	0,508	1107,4	66,93
6	0,470	1024,6	61,92
7	0,407	887,2	53,62
8	0,356	776,1	46,9
9	0,312	680,2	41,1
10	0,271	590,8	35,7



Şekil 3.6: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CuSO₄ bileşiğinin % aktivite grafiği (IC₅₀= 7,781x10⁻⁴M).

Çizelge 3.5: MgSO₄ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

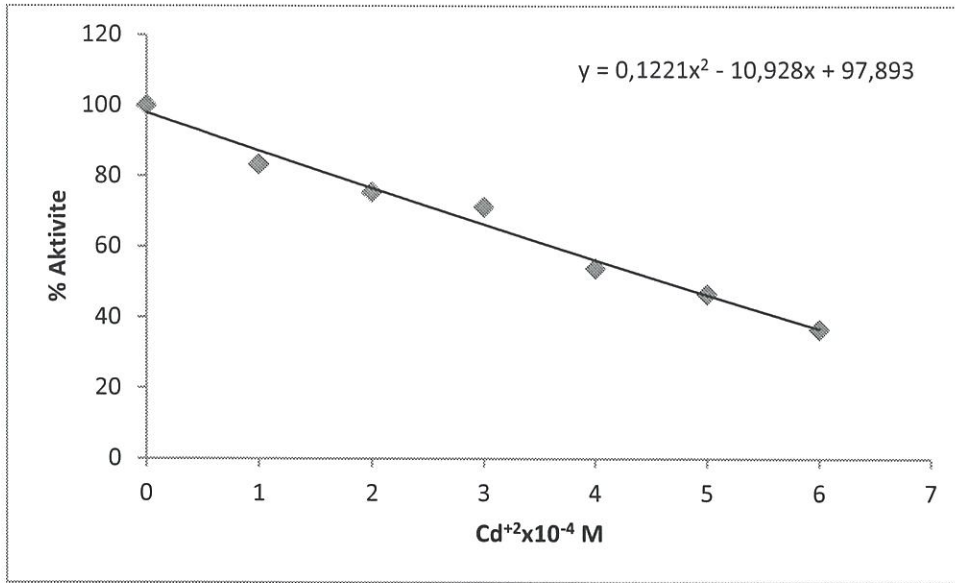
Küvetteki Aktivatör konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,272	592,9	100
1	0,371	808,8	136
2	0,384	837,1	141
3	0,429	935,2	157
4	0,433	943,9	159
5	0,489	1066,0	179
6	0,521	1135,8	191



Şekil 3.7: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine MgSO₄ bileşiğinin % aktivite grafiği.

Çizelge 3.6: CdCl₂ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

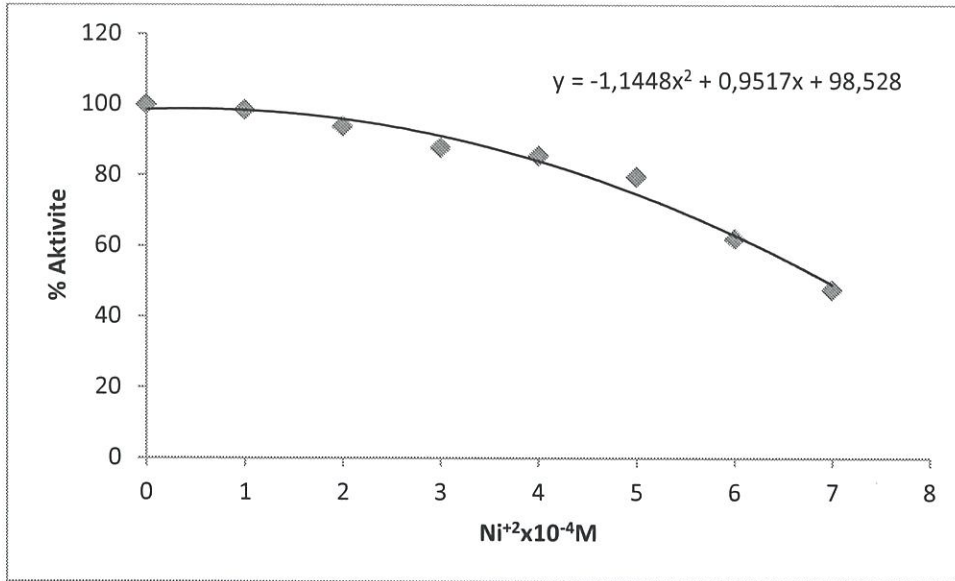
Küvetteki İnhibitor konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A ₂ - A ₁	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,468	1020,2	100
1	0,390	850,2	83,33
2	0,353	769,6	75,43
3	0,333	725,9	71,15
4	0,252	549,4	53,85
5	0,218	475,2	46,58
6	0,171	372,8	36,54



Şekil 3.8: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine CdCl₂ bileşiğinin % aktivite grafiği (IC₅₀ = 4,621x10⁻⁴M).

Çizelge 3.7: NiCl₂ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

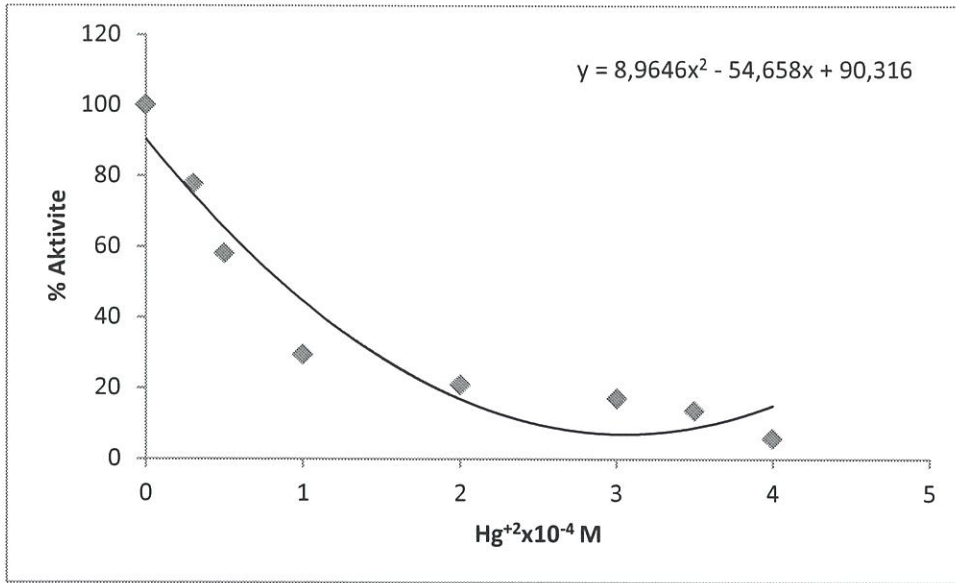
Küvetteki İnhibitor konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,456	994,1	100
1	0,449	978,8	98,46
2	0,427	930,9	93,64
3	0,400	872,0	87,72
4	0,390	850,2	85,53
5	0,363	791,3	79,6
6	0,283	616,9	62,06
7	0,217	473,1	47,59



Şekil 3.9: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine NiCl₂ bileşiğinin % aktivite grafiği (IC₅₀=6,939 x 10⁻⁴M).

Çizelge 3.8: HgCl₂ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

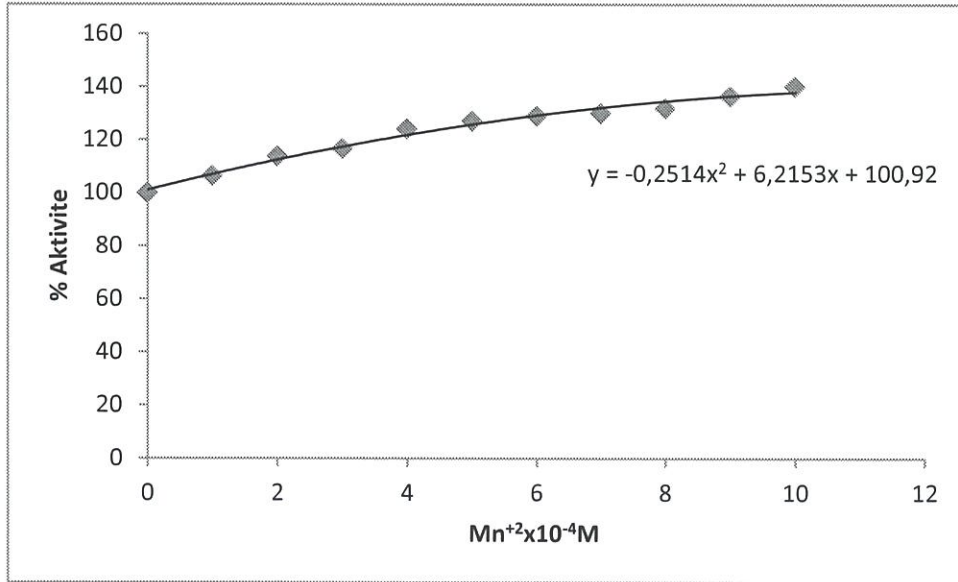
Küvetteki İnhibitor konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A ₂ - A ₁	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,427	930,9	100
0,3	0,332	723,8	77,75
0,5	0,248	540,6	58,08
1	0,126	274,7	29,51
2	0,089	194,0	20,84
3	0,073	159,1	17,1
3,5	0,066	147,0	13,58
4	0,025	54,5	5,85



Şekil 3.10: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine HgCl₂ bileşiğinin % aktivite grafiği (IC₅₀=0,858 x10⁻⁴M).

Çizelge 3.9: MnCl₂ bileşiğinin LPO enzimi üzerine etkisi.

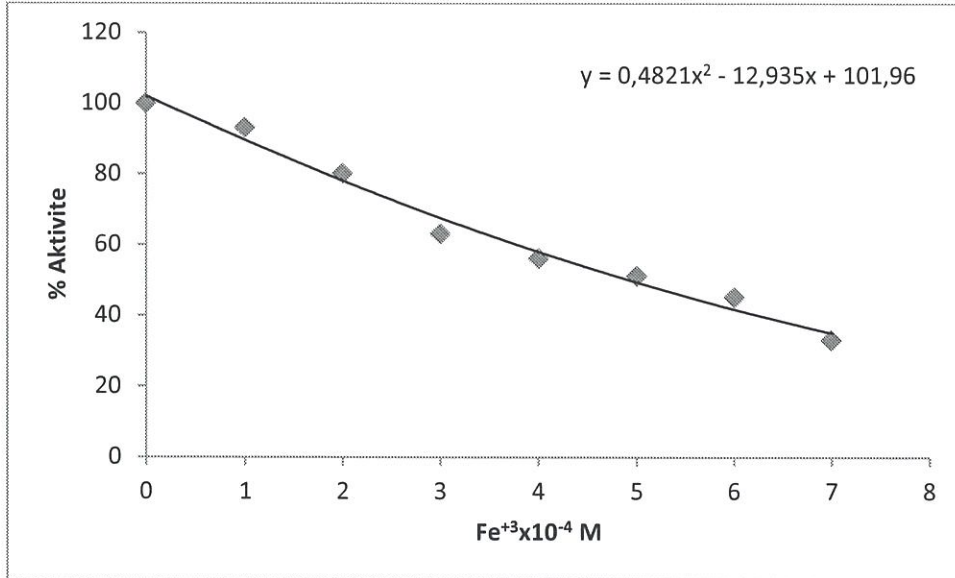
Küvetteki Aktivatör konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,319	695,4	100
1	0,339	739,0	106,27
2	0,363	791,4	113,79
3	0,372	810,9	116,61
4	0,396	868,3	124,14
5	0,405	882,9	126,96
6	0,412	898,2	129
7	0,414	902,5	130
8	0,421	917,8	131,97
9	0,435	948,3	136,36
10	0,447	974,5	140,12



Şekil 3.11: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine MnCl₂ bileşiğinin % aktivite grafiği.

Çizelge 3.10: FeCl₃ bileşiminin LPO enzimi üzerine etkisi.

Küvetteki İnhibitör konsantrasyonu (10 ⁻⁴ M)	Absorbans farkı A2 - A1	Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dak)	% Aktivite
0	0,330	719,4	100
1	0,307	669,2	93
2	0,267	582,1	80
3	0,208	453,4	63
4	0,186	405,5	56
5	0,171	372,8	51
6	0,150	327,0	45
7	0,111	241,9	33



Şekil 3.12: Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine FeCl₃ bileşiminin % aktivite grafiği (IC₅₀=4,930x10⁻⁴M).

3.5 Enzim İmmobilizasyon Basamağı

3.5.1 Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması

%25'lik 0.265g/ml yoğunluğundaki glutaraldehit, farklı yüzdelerde (% 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11, 12, 13, 14 ve 15) saf enzime ilave edilerek 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve enzim immobilize edildi ve enzim aktivitesi en fazla % 12 oranında glutaraldehit ilave edilen enzimde görüldü (Çizelge 3.11). Saf enzim çözeltisi, aktivitenin ve protein miktarının yüksek çıktığı tüplerden enzim örnekleri kullanılarak elde edildi.

Çizelge 3.11: Serbest enzim, farklı yüzdelerdeki GA miktarları ve immobilize enzim aktiviteleri.

Glutaraldehit /Saf Enzim	Glutaraldehit	Glutaraldehit	Serbest Enzim	Absorbans Farkı (Katı Faz)	İmmobilize Enzim Aktivitesi
% Oran	Kütle (g)	Hacim (µL)	Kütle (g)	[A2 – A1]	EU (mol/dk)
1	0,0135	12,75	1,2624	*	*
2	0,0281	26,58	1,3029	0,027	58,86
3	0,0423	39,98	1,2930	0,066	143,88
4	0,0572	54,04	1,2970	0,028	61,04
5	0,0731	69,04	1,3118	0,016	35,65
6	0,0896	84,70	1,3271	0,084	187,16
7	0,1046	98,80	1,3126	0,041	89,38
8	0,1216	114,88	1,3211	0,018	39,24
9	0,1375	129,90	1,3135	0,085	185,30
10	0,1541	145,57	1,3102	0,024	52,32
11	0,1713	161,80	1,3091	0,042	91,56

Çizelge 3.11: (devam)

12	0,1875	177,14	1,2990	0,579	1262,26
13	0,2086	197,06	1,3188	0,076	165,68
14	0,2287	216,02	1,3270	0,133	289,94
15	0,2463	232,66	1,3184	0,055	119,90

Yukarıdaki çizelgede de görüldüğü gibi; immobilize laktoperoksidaz enzim aktivitesi en fazla, % 12 glutaraldehit ile karıştırıldığında gözlenmiştir. Dolayısıyla sonraki deneysel basamaklarda % 12 (GA / saf enzim) oranı dikkate alınarak immobilize enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.5.2 Glutaraldehit ile % 12 Oranında Karıştırılarak İmmobilize Edilen LPO Enzimi İçin Aktivite Tayini

İmmobilize laktoperoksidaz enzimi için en yüksek aktivite % 12 oranında glutaraldehit ilavesiyle gözlendiğinden, afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan tüplerden en yüksek aktivite ve en yüksek protein miktarı içeren tüplerdeki enzim çözeltileri kullanılarak, tamamı % 12 oranında immobilize edildi (Çizelge 3.11) ve bu immobilize enzim için 412 nm’de aktivite tayini yapıldı.

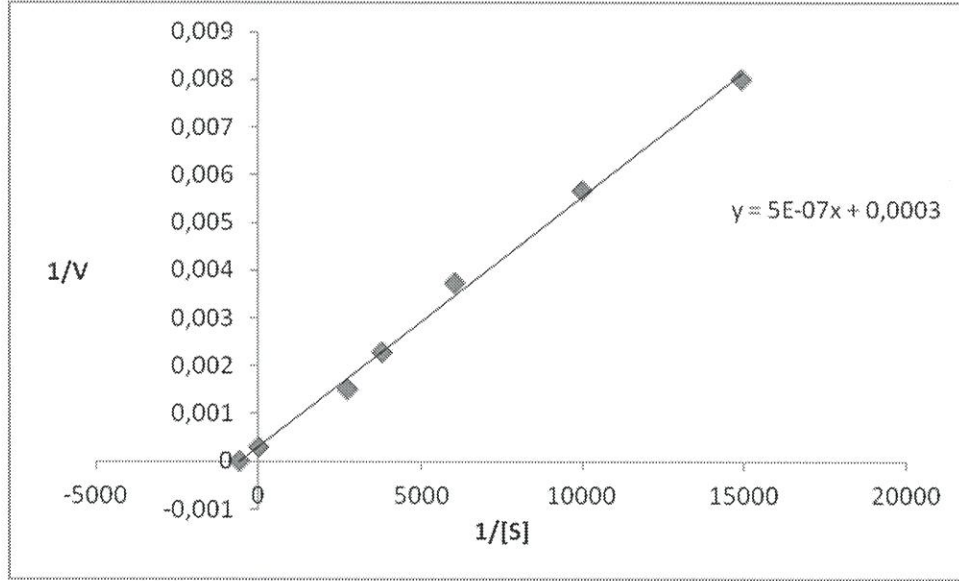
Çizelge 3.12: İmmobilize Laktoperoksidaz enziminin ABTS substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

pH=6 0,1 M Fosfat Tamponu	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μL)	H_2O_2 Çözeltisi Hacmi (μL)	Küvetteki Toplam Hacim (μL)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu [S] x 10^{-5}M	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
867	33	67	33	1000	6,7	0,043	94	11	14925
834	33	100	33	1000	10	0,069	150	6,67	10000
767	33	167	33	1000	16,5	0,123	268	3,73	6060
667	33	267	33	1000	26,5	0,200	436	2,29	3773
567	33	367	33	1000	36,5	0,305	664	1,51	2739

İmmobilize enzim aktivitelerine ilişkin enzim ünite değerleri, laktoperoksidaz enzim aktivite tayininde belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. Substrat konsantrasyonu ise; $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülüne göre hesaplanmıştır. Reaksiyonun toplam hacmi 1000 μ l {867 μ l pH= 6,0 fosfat tamponu 67 μ l substrat çözeltisi (0,1 mM ABTS) + 33 μ l enzim çözeltisi} olup farklı substrat hacimleri ve konsantrasyonları da Çizelge 3.12' de verilmektedir.

3.5.3 İmmobilize Enzim İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

İmmobilize enzim için bulgular çizelge 3.12'da hesapladığımız enzim ünitesi ve substrat konsantrasyonlarından yola çıkılarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Linawear-Burk metoduna göre, doğrunun x-eksenini ($-1/K_M$) ve y-eksenini ($1/V_{max}$) kestiği noktalardan yola çıkılarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. (Sekil 3.13).



Şekil 3.13: % 12 oranında GA ile immobilize edilmiş enzim için aktivite grafiği.

Çizelge 3.13: İmmobilize ve serbest enzim için katalitik etkinlik,
V_{max} ve K_M değerlerinin karşılaştırılması.

	V _{max} (EU)	K _M (M)	V _{max} /K _M (x10 ⁵ EU/M)
Serbest Enzim	5000	2x10 ⁻³	25
İmmobilize Enzim	3333,33	1,67x10 ⁻³	19,96

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmaları üç ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak yukarıda anlatıldığı gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip LPO'ın daha önceden Oktay Arslan tarafından *Sepharose 4B-L-tirozin-Sülfonamid* kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak saflaştırıldı ve saflaştırılan söz konusu enzimin ağır metaller üzerine *in vitro* etkisi araştırıldı. Araştırmanın üçüncü bölümünde ise immobilizasyonda kullanma potansiyeline sahip bu enzimi glutaraldehit ile immobilize etmektir.

Laktoperoksidaz daha ekonomik ve hızlı bir şekilde saflaştırılması gereklidir. LPO'ın biyolojik olarak önemi, patojen mikroorganizmalara karşı doğal savunma sisteminde yer almasıdır. Ayrıca, LPO'ın mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özelliği ve buna ek olarak farklı karsinojenleri parçalama ve hayvan hücrelerini peroksidatif etkilere karşı koruması onun biyolojik önemini göstermektedir, bu özelliklerinden dolayı bu enzimin antioksidan olarak da rol aldığı da bildirilmektedir [4]. Laktoperoksidazın birçok uygulama alanı vardır. Özellikle süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde kullanılmaktadır [58]. LPO enziminin, son yıllarda birçok organik sentezlerde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca bu enzimin endüstriyel öneminin de olması daha pratik saflaştırma metotlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [58].

LPO sığır ve insan sütünün normal bir bileşenidir ve ayrıca memeli sütlerinde bulunmaktadır [4]. LPO enzimi memelilerin bağışıklık sistemi dışındaki biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşeni olarak işlev görerek, patojen mikroorganizmalara karşı yeni doğan yavrunun bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini korumada önemli bir role sahiptir [5,6]. Laktoperoksidaz enzimi, sığır sütünde oldukça fazla bulunduğundan dolayı enzim kaynağı olarak sığır sütü tercih edilmiştir. Sığır sütüne, afinite kromatografisi tekniğinden önce ön saflaştırma tekniklerinden biri olan nötral tuzlarla çöktürme işlemi uygulanmıştır. Nötral tuz olarak amonyum sülfat tercih edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürme aralığının LPO enzimi için % 50 olduğu bulundu. Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite

kromatografisi ile saflaştırılan laktoperoksidaz enzimi % 28,69 verimle ve 407,94 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir.

Enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE uygulanmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 78 kDa ağırlığında olduğu bulunmuş ve tahmin edilen LPO enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir [4].

Çalışmamızın bu bölümünde süttten saflaştırılan LPO enzimi üzerine, civa klorür, demir (III) klorür, bakır sülfat, magnezyum sülfat, kadmiyum klorür, nikel klorür, mangan klorür ve çinko klorür bileşiklerinin enzim üzerine *in vitro* etkileri incelenmiştir. LPO enzimi için optimum şartlar rapor edilmesine rağmen inhibitörleri tam olarak bilinmemektedir. Fakat çevresel kirleticiler, ağır metaller arasında bir grup elementlerin enzimin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir. [25]. Çalışılan bileşiklerin enzim üzerine etkilerini içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışılan bileşiklerin bazılarının ağır metal içerikli olduğu bilinen bu bileşiklerin seçilmesinin en önemli nedeni medikal alanda ve endüstride oldukça sık bir şekilde kullanılmasıdır. Giriş bölümünde ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bu enzim üzerine söz konusu bileşiklerin nasıl etkili olduğunun saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. İnhibisyona neden olan bu bileşiklerin inhibisyon etkisi IC₅₀ değerleri bulunarak verilmiştir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, yukarıdaki bileşiklerin değişik konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan bileşik konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

CoCl₂, CuSO₄, MgSO₄, CdCl₂, NiCl₂, HgCl₂, MnCl₂, FeCl₃, bileşikleri ile çalışılmıştır. Çalışılan bileşiklerden inhibisyona neden olan bileşiklerin IC₅₀ değerleri CoCl₂ için 5,043x10⁻⁴M, CuSO₄ için 7,781x10⁻⁴M, CdCl₂ için 4,621x10⁻⁴M, NiCl₂ için 6,939x10⁻⁴M, HgCl₂ 0,858 x10⁻⁴M ve FeCl₃ 4,930x10⁻⁴M olarak bulunmuştur. Ayrıca MgSO₄ ve MnCl₂ bileşikleri laktoperoksidaz enziminin aktivitesini artırmışlardır. Özellikle MgSO₄ bileşiğın düşük konsantrasyonlar da bile aktiviteyi oldukça artırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında HgCl₂ enzimi oldukça düşük konsantrasyonlarda bile inhibe ettiği bulunmuştur.

Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonamid yapıları afinite jeli kullanılarak saflaştırılan LPO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) ABTS bileşiği substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri ABTS substrat olarak kullanıldığında sırasıyla $2 \times 10^{-3} M$ ve 5000 U/ml'dak olarak bulunmuştur.

Laktoperoksidaz enziminin immobilize edilmesi araştırmamızın öncelikli hedefidir. Immobilize edilen söz konusu enzim % 12'lik glutaraldehit oranında maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. % 12'lik glutaraldehit ile immobilize edilen laktoperoksidaz enziminin Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $1,67 \times 10^{-3} M$ ve 3333,33 U/mL.dak olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Sütten LPO enzimini saflaştırmak için Arslan O. tarafından sentezlenen *Sepharose 4B-L-tirozin- Sülfonamid* kimyasal yapısına sahip afinite kromatografisi jeli kullanılmıştır.
- Sığır sütünden LPO, yüksek verimde ve yüksek saflaştırma derecesinde (% 28,69 verim ve 407,94 saflaştırma derecesi) saflaştırılmıştır.
- Yaygın olarak kullanılan bileşiklerden $CoCl_2$, $CuSO_4$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$ ve $FeCl_3$ LPO enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmış ve IC_{50} değerleri tespit edilerek inhibe ettiği görülmüştür. Bu bileşikler içinde laktoperoksidaz enzimi için $HgCl_2$ en fazla inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, $MgSO_4$ ve $MnCl_2$ bileşikleri laktoperoksidaz enziminin aktivitesini artırmışlardır.
- Araştırmanın asıl amacının LPO'nun, immobilize edilmesi olduğu yukarıda belirtilmiştir. Enzim farklı glutaraldehit oranlarında (% 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 15) immobilize edilmiş, en yüksek aktivitenin hangi oranda olduğu araştırılmış ve % 12 immobilize edilen enzimde olduğu gözlenmiştir.
- % 12 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzim için enzim ünitesi ve substrat konsantrasyon değerleri hesaplanarak buradan katalitik etkinlik, K_M ve

V_{max} değerleri elde edilmiştir. Aynı işlemler serbest enzim için de denenmiş ve katalitik etkinliğin serbest enzimde biraz az olduğu gözlenmiştir. İmmobilize enzimin K_M değeri artsa da defalarca kullanılarak yüksek konsantrasyonda çalışılabilir. Bu da immobilize enzimin avantajı olarak yorumlanabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Prince, A. and Ratner A.J., "Lactoperoxidase", *Am. J. Respir Cell Mol Biol*, 22, 642-644, (2000).
- [2] Kumar, R. and Bhatla, K.L., "Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk", *Acta Cryst*, 51, 1094-1096, (1995).
- [3] Amornkul, Y. and Henning, D.R., "Utilization of Microfiltration or Lactoperoxidase system or Both for Manufacture of Cheddar Cheese from Raw milk", *J. Dairy. Sci*, 90, 4988-5000, (2007).
- [4] Seifu E., Buys E. and Donkin E., Significance of The Lactoperoxidase System in the Dairy Industry and Its Potential Applications: A Review, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 137-154, (2005).
- [5] Naidu, A.S., *Lactoperoxidase. In A.S. Naidu (ed.), Natural food antimicrobial systems.* pp: 103-132, Boca Raton, FL: CRC Press. (2000).
- [6] Touch V., Hayakawa S., Yamada S. and Kaneko S., "Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on Salmonella enteritidis in animal or vegetable foods". *Int. J. Food microb.*, 93, 175-183, (2004).
- [7] Wolfson, L.M. and Summer S.A., Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. *J. Food Prot.*, 56, 887-892, (1993).
- [8] Reiter, B. and Harnulv G., "Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications". *J. Food Protec.*, 47, 724-732, (1984).
- [9] Shin, K., Hayasawa H. and Lonnerdal B., "Inhibition of Escherichia coli respiratory enzymes by the Lactoperoxidase hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system". *J. Appl. Microbiol.*, 90, 489-493, (2001).
- [10] Kussendrager, K.D. and Van Hooijdonk, A.C., "Lactoperoxidase: physico-chemical properties Occurrence mechanism of action and applications". *Br. J. Nutr.* 84, *Suppl.*, 1, 59-68, (2000).
- [11] Hoogendorn, J.P., Piessens, W. and Scholtes, A.S., "Hypothiocyanite ion: The inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide". *Caries Res.*, 11, 77-84, (1977).

- [12] Pruitt, K.M., Tenovuo, J.O., Andrews, R.W. and Mckane, T., "Lactoperoxidase catalysed oxidation of thiocyanate: Polarographic study of the oxidation products". *Biochemistry*, 21, 562-567, (1982).
- [13] Sermon, J., Vanoirbeek K., De Spiegeleer P., Van Houdt R., Aertsen A. and Michiels C.W, Unique stress response to the Lactoperoxidase-thiocante enzyme system in *E. Coli*, *Res. Microbiol*, 156, 225-232, (2005).
- [14] Bayse, G.S., Michaelis, A.W. and Morisson, M., "Lactoperoxidase catalyzed iodination of tyrosine peptides". *Biochim. Biophys Acta*, 30, 284, (1972).
- [15] Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Kaur, P., Srinivasan, A. and Singh, T.P., Crystal Structure of Lactoperoxidase at 2.4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 376, 1060-1075, (2007).
- [16] Wit, De J.N. and Van Hooydonk A.C.M., "Structure functions and applications of Lactoperoxidase in natural antimicrobial systems". *Netherlands Milk and Dairy J.*, 50, 227-244, (1996).
- [17] Zapico, P., Gaya, P., Depaz, M., Nunez, M. and Medina, M., "Influence of breed animal and days of lactation of lactoperoxidase system componets in goat milk". *J.Dairy Sci*, 3,783, (1991).
- [18] Thomas, E.L., Bozeman, P.M. and Learn, D.B., Lactoperoxidase: structure and catalytic properties in Peroxidases in Chemistry and Biology, (Vol, I.J., Everse, K.E. and Grisham, M.B., editors.) CRC Press. Boca Raton, FL. 123-142, (1991).
- [19] Vilkki, P. and Piironen E., Studies on the goitrogenic influence of cow's milk on man. *Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A. II. Chem.*, 110:3-14, (1962).
- [20] Tenovuo, J.O. and Pruitt, K.M., "The Peroxidase System in Human Secretions in The Lactoperoxidase System". *Chemistry and Biological Significance*, New York: Dekker, 272, (1985).
- [21] Björck, L., Claesson, O. and Schulthess, W., "The Lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries". *Milchwissenschaft*, 34, 726-729, (1979).
- [22] Doumonted, C. and Rousset B., "Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk". *J. Biological Chem.* 258, 14166.-14172, (1983).
- [23] Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., "Steady-state kinetics of Lactoperoxidase with ABTS as Chromogen". *Biochem. and Biophys. Res. Comm*, 67, 1307-1312, (1975).
- [24] Metodiewa, D., Reszka, K. and Dunfurd H.B., "Oxidation of the subsituted catechols dihydroxyphenylalanine methyl ester and trihydroxyphenylalanine by lactoperoxidase and its compounds". *Arch. Biochem. and Biophys.*, 274, 601, (1989).

- [25] Daniel R., Rao, L.D. and Mona, I.C., "Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases". *Anal. Biochem.*, 250, 10, (1997).
- [26] Doerge D.R., "Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitro genens", *Biochemistry*, 16, 4724, (1986).
- [27] Yılmaz, B. ve Tosun, H., *Celal Bayar Ünv. Fen Bil. Dergisi*, 11-20, (2013).
- [28] Madureira, AR., Pereira, CI., Gomes, AMP., Pintado, ME. and Malcata, FX. "Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties". *Food Research International*, 40,1197-1211, (2007).
- [29] Siragusa, GR. and Johnson, MG., "Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth by the Lactoperoxidase Thiocyanate-H₂O₂ Antimicrobial System". *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2802-2805, (1989).
- [30] Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M. "Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* Behavior in Raw Milk at Refrigeration Temperatures". *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (11) 3355-3360, (1991).
- [31] Vasavada, P. and Cousin, M., *Dairy Science and Technology, Handbook, Volumes 13*. (John Wiley & Sons, 978-1-56081-078-0. Edited by: Hui, Y.H), (2005).
- [32] Levay, P. and Viljoen, M., "Lactoferrin: A General Review", *Haematologica* 80: 252-267, (1995).
- [33] Topçu, S., Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları, *Çukurova Ünv. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 207 Ders Kitapları Yayın No: A-65*. 269, (1998).
- [34] Çepel, N., Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdigi Zararlar. *Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayın No, 14* 3-35, (1997).
- [35] Rai, U.N., Tripathi, R.D. and Vajpayee, P., Bioaccumulation of Toxic Metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of *Euryale Ferox* Salisb. (Makhana). *Chemosphere*, 46, 267- 272, (2002).
- [36] Ceran, M., Kayseri , *l. Çevre Durum Raporu S*, 53-61, (2004).
- [37] Bigersson B., Sterner O. and Zimerson, E., "Chemie und Gesundheit , Eine verst 2ndliche Einführung in die Toxikologie", *VCHVerlagsgesellschaft*, (1988).
- [38] Pandey, N. and Sharma, C.P., "Effect of Heavy Metals Co₂, Ni₂ and Cd₂ on Growth and Metabolism of Cabbage", *Plant Science*, 163, 753-758, (2002).
- [39] Mikkelsen, S.R. and Corto'n, E., *Bioanalytical Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, 16, (2004).

- [40] Stryer, L., Berg, J.M. and Tymoczko, J.L., *Biochemistry*, New York, 190, (2005).
- [41] Polaina, J. and MacCabe, A.P., *Industrial Enzymes*, Springer, The Netherlands, 9, (2007).
- [42] Mikkelsen, S.R. and Corto'n, E., *Bioanalytical Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, 16, (2004).
- [43] Dekker, M., *Protein immobilization: fundamentals and applications*, Taylor, New York, 85, (2000).
- [44] Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F., *Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes*. In: Gupta MN (Ed.) *Thermostability of enzymes*, Springer, Berlin, 163, (2000)
- [45] Bakker, M., "Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions" PhD Thesis, Technical University Delft, The Netherlands, (2000).
- [46] Clark, D.S., "Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity" *Trends Biotechnol.*, 12, 439-443, (1994).
- [47] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Matuo, Y., Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp.: *Fermentation Technology Today*, 83-389, (1972).
- [48] Schulze, B. and Wubbolts, M.G., "Biocatalysis for industrial production of fine chemicals", *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 609–615, (1999).
- [49] Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B., Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, 409, 258–268, (2001).
- [50] Knowles, J.R., Enzyme catalysis: not different, just better, *Nature*, 350, 121–124, (1991).
- [51] Rozzell, J. D., Biocatalysis at commercial scale: myths and realities, *Chimica Oggi*, 6 (7), 42-47, (1999).
- [52] Zaks, A., "Industrial biocatalysis Curr. Opin." *Chem. Biol.* 5, 130–136, (2001).
- [53] Murza, A., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., "Essential role of the concentration of immobilised ligands in affinity chromatography: purification of guanidinobenzoatase on an ionized ligand", *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 740, 211–218, (2000).
- [54] Segel, I.H., *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 403. (1968).

[55] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., “Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1”, *Diabetologia*, 46, 593, (2003).

[56] Arslan, O., Çakır, Ü. and Uğraş, H.İ., “Synthesis of New Sulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase”, *Biochemistry (Moscow)*, 67, 9, 1273-1276, (2002).

[57] Linder, N., Rapola., J. and Raivio, K.O., “Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues”. *Lab. Invest.*, 79, 967-74, (1999).

[58] Atasever, A. “Laktoperoksidaz Enziminin Sığır Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniğı ile Saflaştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2010).

