

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



**ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BAZİ İLAÇLARA KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ÇİĞDEM BİLEN**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2015**

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



**ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BAZI İLAÇLARA KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ÇİĞDEM BİLEN**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2015**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

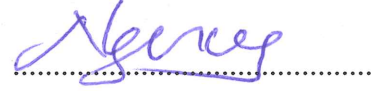
**Çiğdem BİLEN** tarafından hazırlanan “**ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI İLAÇLARA KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.06.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

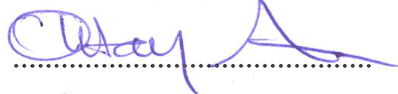
Danışman

Doç. Dr. Nahit GENÇER



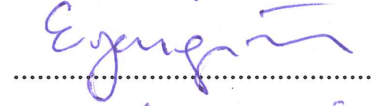
Üye

Prof. Dr. Oktay ARSLAN



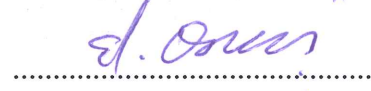
Üye

Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN



Üye

Doç. Dr. Bilgen OSMAN



Üye

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK



Yedek Üye

Prof. Dr. Selma SİNAN

.....

Yedek Üye

Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013/04 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI İLAÇLARA KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ÇİĞDEM BİLEN

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NAHİT GENÇER)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

Bu çalışmada, fosfat metabolizmasında önemli role sahip olan Alkale Fosfatazın (ALP), sütte pastörizasyon belirteci olarak kullanılması gerekçesiyle sütte bulunan izoformu biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılmış ve bazı veteriner ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Enzim, çeşitli organik çözücülerle muamele edilerek amonyum sülfat çöktürme aralıkları tespit edilmiştir. Sütü mayalama işlemi ile hazırlanan farklı enzim çözeltileri de dahil olmak üzere, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılarak elde edilen enzim aktiviteleri ve saflaştırma dereceleri karşılaştırılmıştır. Sütün mayalanması ile elde edilen enzim çözeltileri SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 85 kDa ve 185-190 kDa molekül ağırlığına sahip bandlar elde edilirken doğal jel elektroforezinde yaklaşık 170-190 kDa aralığında tek band elde edilmiştir.

Süt Alkale Fosfatazın p-nitrofenil fosfat substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri, Lineawear-Burk yöntemi ile sırasıyla 2,27 mM ve 555,56 EU/dk olarak bulunmuştur.

Enzim, pastörizasyon sıcaklığına gelindiğinde inaktive olacağından enzim aktivitesinin gözlenmemesi sütün pastörize olduğunu gösterir. Fakat, veteriner ilaçlar tarafından enzimin inaktivasyonu söz konusu olduğunda, pastörizasyon sıcaklığına ulaşılmadan enzim inhibe olacağından doğru bir pastörizasyon gerçekleştirilemeyecektir. Bu sebeple çalışmamızda çoğunluğu antibakteriyel özelliğe sahip çeşitli veteriner ilaçların saflaştırılmış süt ALP enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiş ve inhibisyon etkisi gösteren ilaçların  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak, ilaçlara ait sütte belirlenen maksimum kalıntı limitleriyle karşılaştırılmıştır. ALP'nin bilinen inhibitörü olan Levamisol ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitesini azaltan ilaçların zayıf inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Alkale fosfataz, süt, pastörizasyon, saflaştırma, inhibisyon, veteriner ilaçlar

## **ABSTRACT**

### **PURIFICATION OF ALKALINE PHOSPHATASE ENZYME AND INVESTIGATION OF ENZYME AFFINITY AGAINST SOME DRUGS**

**PH.D THESIS  
CIGDEM BILEN**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
CHEMISTRY  
(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NAHİT GENCER )**

**BALIKESİR, JUNE 2015**

In this study, Alkaline Phosphatase (ALP) which has a critical role in phosphate metabolism was purified via biochemical methods and the effects of some veterinary drugs on purified milk ALP were determined on account of the fact that using as a pasteurization indicator in milk.

Enzyme was homogenized with different organic solvents thereby ammonium sulfate precipitation intervals were determined. The all enzyme samples with different yeasting products were applied to Sephadex G-100 gel filtration column and then the enzyme activities and purification folds obtained from different stages were compared. The different yeasting enzyme products yielded bands, approximately 85 and 185-190 kDa on SDS-PAGE, while yielded a single band, approximately 170-190 kDa on Native-PAGE.

The  $K_M$  and  $V_{max}$  values were determined by using Lineweaver-Burk plots and p-nitrophenyl phosphate as substrate, 2.27 mM and 555.56 EU/min, respectively.

Heat treatment of milk at pasteurization temperature inactivates ALP, which is a good indicator of milk pasteurization. But, in case of decreasing ALP activity by veterinary drugs, inactivation occurs and inaccurate pasteurization performs. Therefore, the in vitro effects of some veterinary drugs, that most of them have antibacterial property, on purified ALP enzyme activity were investigated. The  $IC_{50}$  values of drugs which have inhibitory effect were determined and compared with maximum residue limits in milk belonging to drugs. When compared to Levamisol which is a potent inhibitor of the enzyme, the inhibitory effects of the drugs on the enzyme activity are weak.

**KEYWORDS:** Alkaline phosphatase, milk, pasteurization, purification, inhibition, veterinary drug

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Sütün Bileşimi ve Süt Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri .....	3
1.2 Alkalen Fosfataz (ALP) .....	6
1.3 Alkalen Fosfatazın Önemi .....	7
1.4 Alkalen Fosfatazın Yapısı ve Biyokimyası.....	8
1.5 Alkalen Fosfataz Enziminin Katalitik Mekanizması .....	10
1.6 Süt Yağ Globüler Membranları .....	11
1.7 Bazı Veteriner İlaçların ALP Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi .....	12
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materyaller .....	14
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	14
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	16
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	16
2.2 Yöntemler .....	20
2.2.1 Enzimin Saflaştırılması.....	20
2.2.1.1 Organik Çözücüler ile Muamele .....	20
2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi .....	20
2.2.1.3 Kazein Çöktürme Yöntemleri .....	21
2.2.2 Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini.....	23
2.2.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	24
2.2.4 Doğal Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	25
2.2.5 Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	26
2.2.6 Veteriner İlaçların $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması.....	26
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>27</b>
3.1 Enzimin Saflaştırılması .....	27
3.1.1 Organik Çözücüler ile Muamele, Santrifüj ile Süt Yağının Ayrılması ve Düşük pH' da Kazeinin Çöktürülmesi .....	27
3.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralıklarının Belirlenmesi.....	49
3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri .....	52
3.1.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	54
3.2 Optimum Şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması.....	59
3.3 Amonyum Sülfat Çöktürme Sonrası ve Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılan Çökeleğin Doğal Jel Elektroforezi .....	61
3.4 Sütün Mayalanması ile Elde Edilen Alkalen Fosfatazın SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	62
3.5 Veteriner İlaçların $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması .....	63

<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>93</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>110</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.1:</b>	Kay ve Graham (1933-1935), sütün pastörize edilmesinde ALP inaktivasyonunun indikatör olarak kullanıldığı aktivite metodu.....	7
<b>Şekil 1.2:</b>	ALP enziminin yapısı.....	9
<b>Şekil 1.3:</b>	ALP Enziminin reaksiyon mekanizması.....	10
<b>Şekil 3.1:</b>	Blendir ile homojenizasyon.....	27
<b>Şekil 3.2:</b>	ALP enziminin sütün izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (1); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & santrifüj, (c) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & santrifüj, (e) çiğ süt & toluen %3 & santrifüj, (f) çiğ süt & EDTA % 0,2 & toluen %3 & santrifüj, (g) çiğ süt & EDTA % 0,2 & santrifüj, (h) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8).....	28
<b>Şekil 3.3:</b>	ALP enziminin sütün izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (2); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & santrifüj, (c) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & santrifüj, (e) çiğ süt & toluen %3 & santrifüj, (f) çiğ süt & EDTA % 0,2 & toluen %3 & santrifüj, (g) çiğ süt & EDTA % 0,2 & santrifüj, (h) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8).....	28
<b>Şekil 3.4:</b>	ALP enziminin sütün izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (3); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1), (c) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (d) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1) & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (e) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/2) & kazein çöktürmesi (pH:4,8).....	31
<b>Şekil 3.5:</b>	ALP enziminin sütün izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (4); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1), (c) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (d) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1) & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (e) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/2) & kazein çöktürmesi (pH:4,8).....	31
<b>Şekil 3.6:</b>	ALP enziminin sütün izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (5); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.....	34

<b>Şekil 3.7:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (6); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.....	34
<b>Şekil 3.8:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (7) t(1-2. dk); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.....	37
<b>Şekil 3.9:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (8) t (1-2. dk); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj...	37
<b>Şekil 3.10:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (9); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	40
<b>Şekil 3.11:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (10); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	40
<b>Şekil 3.12:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (11); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	43
<b>Şekil 3.13:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (12); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	43
<b>Şekil 3.14:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (13); 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol (% 2,3,4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	46
<b>Şekil 3.15:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (14); 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol (% 2,3,4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması.....	46
<b>Şekil 3.16:</b>	ALP enziminin %3 n-bütanol ile homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant kullanılarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürme aralıklarının tespit edilmesi t(1.-2. dk).....	50
<b>Şekil 3.17:</b>	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	52

<b>Şekil 3.18:</b>	Diyaliz edilen çökeleğin jel filtrasyonundan geçirilmesiyle elde edilen enzimin elüsyon grafiği.....	54
<b>Şekil 3.19:</b>	Diyaliz edilen çökeleğin 0,1 mM Mg <sup>+2</sup> ilavesi sonrası jel filtrasyonundan geçirilmesiyle elde edilen enzimin elüsyon grafiği.....	55
<b>Şekil 3.20:</b>	Sütün mayalanma & % 3 bütanol ile homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği.....	55
<b>Şekil 3.21:</b>	Sütün % 3 bütanol homojenizasyonu & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği.....	56
<b>Şekil 3.22:</b>	Sütün santrifüj & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği.....	56
<b>Şekil 3.23:</b>	Saflaştırılmış süt Alkalen Fosfataz enziminin p-nitrofenil fosfat substratı ile elde edilen Linaweaver-Burk grafiği.....	59
<b>Şekil 3.24:</b>	Süt Alkalen Fosfataz enziminin doğal jel elektroforezi- (a) Amonyum sülfat çöktürme sonrası elde edilen çökelek (numune tamponu/örnek – 1/1), (b) Çökeleğin jel filtrasyon kromatografisinden geçirilmesiyle elde edilen örnek (numune tamponu/örnek – 1/1), (c) saf ALP (160 kDa), (d) organik çözücü ile homojenizasyonu takiben mayalanan süpernatana JFK uygulanması ile elde edilen enzim (numune tamponu/örnek – 1/2).....	61
<b>Şekil 3.25:</b>	Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan süt Alkalen Fosfataz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi- (a) santrifüj edilip mayalandıktan sonra elde edilen JFK numunesi, (b) organik çözücü ile homojenizasyonu takiben mayalanan süpernatana JFK uygulanması ile elde edilen numune, (c) marker, (d) mayalama işlemini takiben organik çözücü ile homojenizasyon sonrası süpernatana JFK uygulanması sonucu elde edilen numune, (e) marker, (f) % 20-40 çökelek, (g) Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna uygulanan çökelek, (h) saf ALP (160 kDa) (a,b,d,f,g - numune tamponu/örnek – 1/2).....	62
<b>Şekil 3.26:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda (-) Tetramisol Hidroklorür için % aktivite-[I] grafiği.....	63
<b>Şekil 3.27:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Furosemid için % aktivite-[I] grafiği.....	65
<b>Şekil 3.28:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Atropin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği.....	65
<b>Şekil 3.29:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Gentamisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği.....	68
<b>Şekil 3.30:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Toldimfos Sodyum için % aktivite-[I] grafiği.....	68

<b>Şekil 3.31:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Metamizol Sodyum için % aktivite-[I] grafiği.....	71
<b>Şekil 3.32:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Deksametazon 21-Undekanoat için % aktivite-[I] grafiği.....	71
<b>Şekil 3.33:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Enrofloksasin için % aktivite-[I] grafiği.....	74
<b>Şekil 3.34:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Oksitetrasiklin Hidroklorür için % aktivite-[I] grafiği.....	74
<b>Şekil 3.35:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Danofloksasin Mesilat için % aktivite-[I] grafiği.....	77
<b>Şekil 3.36:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Kanamisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği.....	77
<b>Şekil 3.37:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Marbofloksasin için % aktivite-[I] grafiği.....	80
<b>Şekil 3.38:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Tilmikosin için % aktivite-[I] grafiği.....	80
<b>Şekil 3.39:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Doksisiklin Monohidrat için % aktivite-[I] grafiği.....	83
<b>Şekil 3.40:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Tilozin için % aktivite-[I] grafiği.....	83
<b>Şekil 3.41:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Sülfadimidin Sodyum için % aktivite-[I] grafiği.....	86
<b>Şekil 3.42:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Florfenikol için % aktivite-[I] grafiği.....	86
<b>Şekil 3.43:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Neomisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği.....	89
<b>Şekil 3.44:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Fluniksin Meglumin için % aktivite-[I] grafiği.....	89
<b>Şekil 3.45:</b>	Kazein misellerinin koagülasyonunda Kimozin enziminin reaksiyonu.....	97

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1:</b> Sütün bileşimi.....	3
<b>Tablo 1.2:</b> Sütte bulunan proteinler .....	4
<b>Tablo 1.3:</b> Süt proteinlerinin biyokimyasal özellikleri.....	4
<b>Tablo 1.4:</b> Çiğ süt kaymağında bulunan bazı enzimler .....	5
<b>Tablo 1.5:</b> Çiğ süt kaymağında bulunan bazı enzimlerin dağılımı .....	6
<b>Tablo 2.1:</b> Veteriner ilaçların molekül şekilleri.....	15
<b>Tablo 2.2:</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	18
<b>Tablo 3.1:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda, ön saflaştırma basamakları (1), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	29
<b>Tablo 3.2:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda, ön saflaştırma basamakları (2), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	30
<b>Tablo 3.3:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda, ön saflaştırma basamakları (3), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	32
<b>Tablo 3.4:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda, ön saflaştırma basamakları (4), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	33
<b>Tablo 3.5:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (5), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2/2,5-3 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	35
<b>Tablo 3.6:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (6), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2/2,5-3 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	36
<b>Tablo 3.7:</b> ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (7), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	38

<b>Tablo 3.8:</b>	ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (8), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.....	39
<b>Tablo 3.9:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (9), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	41
<b>Tablo 3.10:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (10), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	42
<b>Tablo 3.11:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (11), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	44
<b>Tablo 3.12:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (12), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	45
<b>Tablo 3.13:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (13), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	47

<b>Tablo 3.14:</b>	ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (14), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.....	48
<b>Tablo 3.15:</b>	Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.....	49
<b>Tablo 3.16:</b>	ALP enziminin %3 n-bütanol ile homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant kullanılarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürme aralıklarının tespit edilmesi t(1.-2. dk) / 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, sırasıyla tampon-substrat-enzim (900µl-50µl-50µl) hacimleri kullanılarak elde edilen enzim aktivite sonuçları.....	51
<b>Tablo 3.17:</b>	Bradford yöntemi ile 595 nm'de belirtilen hacimlere göre ölçülen absorbans değerleri ve grafikten hesaplanan protein miktarları.....	53
<b>Tablo 3.18:</b>	% 20-40 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ile elde edilen ALP enzimine diyaliz ve JFK basamaklarının uygulanması sonucu oluşturulan saflaştırma tablosu.....	57
<b>Tablo 3.19:</b>	% 20-40 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ile elde edilen ALP enzimine diyaliz & Mg <sup>+2</sup> (0,1 mM) ve JFK basamaklarının uygulanması sonucu oluşturulan saflaştırma tablosu.....	57
<b>Tablo 3.20:</b>	Çiğ sütün mayalanma & %3 bütanol ile homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatanta JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu.....	58
<b>Tablo 3.21:</b>	Çiğ sütün %3 bütanol homojenizasyonu & mayalanma sonrası elde edilen süpernatanta JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu.....	58
<b>Tablo 3.22:</b>	Çiğ sütün santrifüj & mayalanma sonrası elde edilen süpernatanta JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu.....	58
<b>Tablo 3.23:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enziminin p-nitrofenil fosfat substratı kullanılarak, K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S].....	60
<b>Tablo 3.24:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, (-)-Tetramisol Hidroklorür etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	64
<b>Tablo 3.25:</b>	Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Furosemid etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	66

<b>Tablo 3.26:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Atropin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	67
<b>Tablo 3.27:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Gentamisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	69
<b>Tablo 3.28:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Toldimfos Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	70
<b>Tablo 3.29:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Metamizol Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	72
<b>Tablo 3.30:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Deksametazon 21-Undekanoat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	73
<b>Tablo 3.31:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Enrofloksasin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	75
<b>Tablo 3.32:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Oksitetrasiklin Hidroklorür etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	76
<b>Tablo 3.33:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Danofloksasin Mesilat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	78
<b>Tablo 3.34:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Kanamisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	79
<b>Tablo 3.35:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Marbofloksasin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	81



<b>Tablo 3.36:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Tilmikosin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	82
<b>Tablo 3.37:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Doksisisiklin Monohidrat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	84
<b>Tablo 3.38:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Tilozin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	85
<b>Tablo 3.39:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Sülfadimidin Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	87
<b>Tablo 3.40:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Florfenikol etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	88
<b>Tablo 3.41:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Neomisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	90
<b>Tablo 3.42:</b> Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Fluniksin Meglumin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	91
<b>Tablo 3.43:</b> Süt Alkalin Fosfataz enzimi için 0,5 mM p-nitro fenil fosfat substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan ilaç etken konsantrasyonları, 1 ml ilaca karşılık gelen etken miktarları ve sütteki maksimum kalıntı limitleri (MKL) (Tebliğ No: 2011/20).....	92

## KISALTMA LİSTESİ

<b>NPN</b>	: Non-Protein Azot
<b>LAL</b>	: Lisinoalanin
<b>ALP</b>	: Alkale Fosfataz
<b>NPPaz</b>	: Nükleotit Pirofosfataz
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>TEMED</b>	: Tetrametil Etilendiamin
<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HDL</b>	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>PE</b>	: Fosfatidil Etanolamin
<b>PI</b>	: Fosfatidil İnositol
<b>PS</b>	: Fosfatidil Serin
<b>PC</b>	: Fosfatidil Kolin
<b>PH<sub>I</sub></b>	: İzoelektrik pH
<b>CMC</b>	: Karboksimetil Selüloz
<b>JFK</b>	: Jel Filtrasyon Kromatografisi
<b>BSA</b>	: Bovin Serum Albümin
<b>CPP</b>	: Kazein Fosfopeptid
<b>ACP</b>	: Amorf Kalsiyum Fosfat
<b>SEAP</b>	: Baculovirus Ekspresyon Vektör Sistemi
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>APS</b>	: Amonyum Persülfat
<b>MKL</b>	: Maksimum Kalıntı Limiti
<b>PPM</b>	: (Parts Per Million) Toplam madde miktarının milyonda biri
<b>TMS</b>	: Tetramisol
<b>LMS</b>	: Levamisol
<b>NSAID</b>	: Non-steroid Antienflamatuar (Drug) İlaç
<b>Phe</b>	: Fenil Alanin
<b>Met</b>	: Metiyonin
<b>CMP</b>	: Kazeinomakropeptid
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dizmutaz

## ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, bana esnek çalışma ortamı sağlayan ve beni yüreklendiren, maddi ve manevi desteğini her zaman gördüğüm çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Nahit GENÇER'e en derin saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Kimya Bilimi'ni ve Biyokimya'yı bana ve bizlere sevdirek ufkumuzu açan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım ve hayatıma yön veren çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en içten saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

İlgi ve desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK, Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN, Doç. Dr. Bilgen OSMAN, Prof. Dr. Selma SİNAN, Yrd. Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR'e en içten saygı ve sevgilerimi sunarım.

Ayrıca bütün üniversite hayatımda, üzerimde emeği olan tüm hocalarıma saygı ve sevgilerimi iletirim.

Biyokimya grubumuz Adem ERGÜN, Zübeyde SACKES, Emre YAVUZ, Beste ŞİPAL, Nurcan DEDEOĞLU ve diğer tüm takım arkadaşlarıma sevgilerimi sunar, hayatlarında başarılar dilerim. Sizlerle aynı ortamı paylaşmak çok güzeldi.

Hayatımda maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, beni bugünlere getiren ve her zaman yanımda olan canım ailem İsmail BİLEN, Ayşe BİLEN ve Sinem BİLEN'e en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

**Balıkesir, 2015**

**Çiğdem BİLEN**

# 1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri, yüzyıllardır insan besininin temel ve önemli bileşenini oluşturmuştur. Süt, canlı organizmaların ihtiyaç duyduğu kalsiyum, magnezyum, selenyum, riboflavin, vitamin B<sub>12</sub> ve pantotenik asit (vitamin B<sub>5</sub>) gibi önemli katkılar sağlayan kofaktörlerin yanı sıra çok sayıda besin ihtiva etmektedir [1]. Sütte bulunan proteinlerin, doku farklılaşmaları, büyüme ve gelişmeye katkısının yanı sıra, kalsiyum emilimi ve immün fonksiyonlar üzerine olumlu etkilerinin olduğu, kan basıncını ve kanser riskini azalttığı, vücut ağırlığının kontrolünde etkin olduğu ve dış çürüklerine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Başta vitaminler olmak üzere, sütte bulunan hayati öneme sahip besin öğeleri, ısı ve ışık gibi birçok fiziksel ve kimyasal etkiye karşı son derece duyarlıdır. Sütün işlenmesi sırasında (özellikle ısı ile muamele ve taşınma süreci), besin öğelerinde ultraviyole ışınlarla maruz kalmaları ile oluşan kayıplar sağlık açısından istenilmeyen bir durumdur [2]. Örneğin, enzimatik olmayan kararma ve Lisinoalanin (LAL) oluşumunun ısıl işlem görmüş süt ürünlerinin besin değerini sınırlandıran en önemli sebepler olduğu düşünülmektedir [3]. Yüksek derecede ve uzun süre ısıtılmış sütlerde lizin amino asidinin -NH<sub>2</sub> grubu ile indirgenmiş laktoz şekerinin verdiği Maillard (esmerleşme) reaksiyonu ile sütte bulunan ve esansiyel bir amino asit olan lizin miktarında düşüş olmakta ve sütün besin değeri azalmaktadır [3,4]. Bu nedenle ısıl işlem çığ sütün içeriği ve özelliklerine uygun biçimde yapılmalıdır. Ayrıca sütte bulunan Alkalen Fosfataz (ALP) enziminin de termal kararlılığı, sütte bulunan birçok patojenik mikroorganizmalarının termal dayanıklılığından daha fazla olduğundan, sütte ALP enzim aktivitesinin gözlenmemesi pastörizasyon işleminin yeterli olduğunu göstermektedir [5].

Türk Gıda Kodeksi-Çığ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre pastörizasyon; 'sütteki patojen mikroorganizmaların vejetatif formlarının tamamının ve diğer mikroorganizmaların büyük bir kısmının sayısını indirmek amacıyla yapılan, sütün raf ömrünü uzatan, en az seviyede fiziksel, kimyasal ve duyuşal değişikliklerle sonuçlanan ve en az 72°C'de 15 saniye veya 63°C'de 30 dakika [4] veya diğer eő değer şartlarda gerçekleştirilen ısıl işlemdir' [4,6]. Bu

bilgiler ışığında, çalışmamızda çiğ sütün pastörize edilmesinde indikatör görevi gören alkalen fosfataz [7] enzimi inek sütünden saflaştırılacaktır. Akdeniz ülkelerinde yetiştirilen koyun ve keçi süt ürünlerinin tercihinin yanı sıra, teknolojik ve endüstriyel öneme sahip ALP'nin koyun ve keçi sütündeki termal kararlılığı sınırlı olduğundan [8] enzimin süttten izolasyonunda inek sütü ile çalışılmıştır.

Bu çalışmada, yukarıdaki bilgiler göz önüne alınarak, fosfat metabolizmasında önemli role sahip olan Alkalen Fosfatazın (ALP) [9] sütte pastörizasyon belirteci olarak kullanılması [10-12] enzime endüstriyel önem kazandırdığından ALP'nin süttten saflaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir:

- Enzimin süttten izolasyonunda en uygun organik çözücü tespit edilerek, ön saflaştırma basamakları için optimizasyon çalışmasının yapılması,
- Organik çözücü ile homojenizasyon sonrası amonyum sülfat çöktürme aralıklarının tespit edilmesi,
- Sütte en çok bulunan protein kazeinin uzaklaştırılması amacıyla, saflaştırma prosedürünün değişik aşamalarında rennet koagülasyonu (mayalama) uygulanarak elde edilen ALP aktivitelerinin karşılaştırılması,
- Amonyum sülfat çöktürme sonrası elde edilen çökelek dahil olmak üzere, mevcut numunelerin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılarak enzim aktiviteleri ve saflaştırma derecelerinin karşılaştırılması,
- Doğal jel elektroforezi (Native-PAGE) ve SDS-PAGE elektroforezleri ile enzimin her bir numunedeki yaklaşık moleküler ağırlığının tespit edilmesi,
- Optimum şartlarda enzimin p-nitrofenil fosfat substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması,
- Enzimin farklı veteriner ilaçlara karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla ilaç etkenlerine ait  $IC_{50}$  değerlerinin bulunması,
- Tespit edilen  $IC_{50}$  değerlerinin, Türk Gıda Kodeksinde (Tebliğ No: 2011/20) belirtilen ilaçlara ait maksimum kalıntı limitleriyle karşılaştırılması planlanmıştır.

## 1.1 Sütün Bileşimi ve Süt Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Genel olarak sütün yapısında bulunan azot içeriği; kazein, kesilmiş sütün suyu (peynir altı suyu) ve non-protein azot (NPN) olmak üzere üç bölümde dağılmış olup kazein, azotun yaklaşık % 78'ini, peynir altı suyu % 17 ve sütün protein olmayan kısmı % 5' ini oluşturmaktadır [13].

**Tablo 1.1:** Sütün bileşimi [14].

İnek Sütü	Kuru Madde (% 12,6)	Protein (% 3,1)	Kazein
			Laktoalbümin
			Laktoglobülin
			Proteoz-Pepton
			İmmunoglobülinler
	Yağ (% 3,7)	Trigliseridler	
		Fosfolipidler	
		Steroller	
		Serbest Yağ Asitleri	
		Mumlar	
Su (% 87,4)	Diğer Maddeler	Skualenler	
		Yağda Eriyen Vitaminler	
		Laktoz (% 4,7)	
Mineral Maddeler (% 0,75)	Ca, Na, K, Mg, P, Cl <sub>2</sub>		
		Fe, Cu, I'un fosfat, sitrat ve klorürleri	
Su (% 87,4)	Diğer Maddeler	Gazlar	
		Vitaminler	
		Enzimler	
		Koruyucu Maddeler	
Su (% 87,4)	Diğer Maddeler	Organik Asitler	

**Tablo 1.2:** Sütte bulunan proteinler [15].

Protein	Konsantrasyon (g/kg)	% Toplam Protein (w/w)
<b>Kazein</b>		
$\alpha_{s1}$ -kazein	10,0	30,6
$\alpha_{s2}$ -kazein	2,6	8,0
$\beta$ -kazein	10,1	30,8
$\kappa$ -kazein	3,3	10,1
Toplam Kazein	26,0	<b>79,5</b>
<b>Peynir Altı Suyu (whey) Proteinleri</b>		
$\alpha$ -laktalbümin	1,2	3,7
$\beta$ -laktoglobülin	3,2	9,8
Albümin	0,4	1,2
İmmunoglobülinler	0,7	2,1
Proteoz-Peptonlar	0,8	2,4
Toplam Peynir Altı Suyu Proteinleri	6,3	19,3
<b>Yağ Globuler Membran Proteinleri</b>	0,4	1,2
Toplam Protein	32,7	100

**Tablo 1.3:** Süt proteinlerinin biyokimyasal özellikleri [16].

Protein	~ % Değeri (Yağsız Sütte)	İzoelektrik pH	Molekül Ağırlığı (Da)
$\alpha$ -Kazein	45-55	4,1	23,000
$\kappa$ -Kazein	8-15	4,1	19,000
$\beta$ -Kazein	25-35	4,5	24,000
$\gamma$ -Kazein	3-7	5,8-6,0	--
$\alpha$ -Laktalbümin	2-5	5,1	14,437
$\beta$ -Laktoglobülin	7-12	5,3	18,000
Albümin	0,7-1,3	4,7	68,000
Laktoferrin	0,2-0,8	--	87,000
İmmunoglobülinler:	--	--	--
IgG1	1-2	--	160,000
IgG2	0,2-0,5	--	160,000
IgM	0,1-0,2	--	~1,000,000
IgA	0,05-0,10	--	~400,000
Proteoz Pepton fraksiyonları	2-6	3,3-3,7	4,100 to 200,000

**Tablo 1.4:** Çiğ süt kaymağında bulunan bazı enzimler (sütün tamamında bulunan enzimlerin çoğu sütün kaymağında da mevcut) [17].

<b>Enzim</b>	<b>Literatür</b>
$\beta$ -N-Asetilglukozaminidaz	Mellors (1968)
Asit Fosfataz	Dowben et al. (1967); Kitchen et al. (1970); Kitchen (1974)
Aldolaz	Polis and Schmukler (1950); Dowben et al. (1967); Kitchen et al. (1970)
<b>Alkalen Fosfataz</b>	Hayashi et al. (1965); Dowben et al. (1967); Kitchen et al. (1970); Kitchen (1974)
Katalaz	Mellors (1968); Kitchen et al. (1970); Ito (1972)
Kolinesteraz	Dowben et al. (1967)
Diyaforaz	Morton (1954); Kitchen (1974)
$\beta$ -Galaktozidaz	Anderson and Cheeseman (1975)
Glukoz-6-Fosfataz	Dowben et al. (1967); Kitchen (1970); Kitchen (1974)
$\beta$ -Glukozidaz	Anderson and Cheeseman (1975)
$\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz	Majumder and Ganguli (1972); Kitchen (1974)
İnorganik Pirofosfataz	Kitchen (1974)
$Mg^{+2}$ -ATPaz	Dowben et al. (1967); Patton and Trams (1971); Kitchen (1974)
NADH: Sitokrom c Redüktaz	Dowben et al. (1967)
NADH Dehidrogenaz	Evans and Pillinger (1973); Kitchen (1974)
5' Nükleotidaz	Patton and Trams (1971); Huang and Keenan (1972); Kitchen (1974)
Nükleotit Pirofosfataz	Patton and Trams (1971); Kitchen (1974)
Plazmin	Hofmann et al. (1979)
Ribonükleaz	Kitchen et al. (1970)
Sülfidril Oksidaz	Kitchen (1974)
Ksantin Oksidaz	Dowben et al. (1967); Kitchen et al. (1970); Brilley and Eisenthal (1974, 1975); Kitchen (1974)



**Tablo 1.5:** Çiğ süt kaymağında bulunan bazı enzimlerin dağılımı [17].

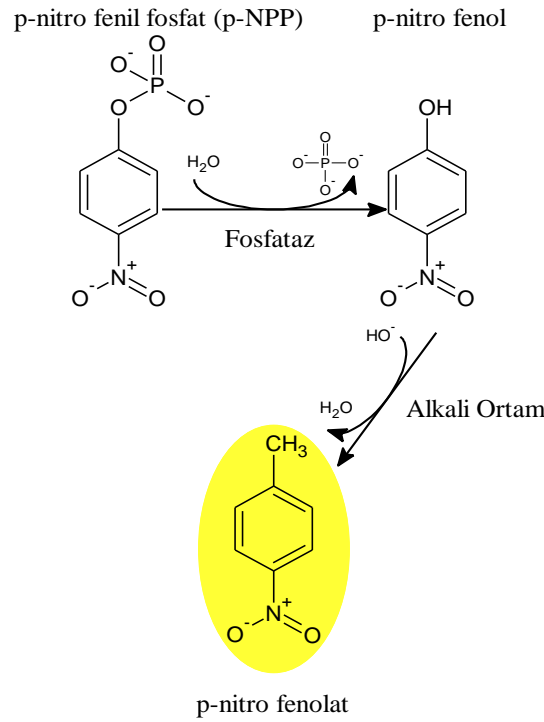
<b>Enzim</b>	<b>% Aktivite (sütün tamamına göre)</b>	<b>Literatür</b>
Asit Fosfataz	21	Bingham et al. (1961)
	23	Kitchen et al. (1970)
Aldolaz	19	Kitchen et al. (1970)
Alkalen Fosfataz	30	Morton (1953)
	40	Zittle et al. (1956)
	31	Kitchen et al. (1970)
	49-91	Stannard (1975)
Katalaz	24	Kitchen et al. (1970)
$\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz	47	Majumder and Ganguli (1972)
	23	Baumrucker (1979)
Ribonükleaz	3	Kitchen et al. (1970)
Ksantin Oksidaz	20-81	Gudnason and Shipe (1962)
	21	Kitchen et al. (1970)
	41-85	Stannard (1975)

## **1.2 Alkalen Fosfataz (ALP)**

Alkalen Fosfataz (ALP), (EC 3.1.3.1) potansiyel biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan iki metal içerikli bir monoester fosfohidrolaz enzimi olup alkali koşullarda nükleotidler, proteinler ve alkaloidler vb. fosfat monoesterlerinden fosfat gruplarının koparılmasını sağlayarak fosforil transfer reaksiyonunu gerçekleştirir [18-20] ve ürün olarak inorganik fosfatı oluşturur [19]. pH 9-10,5'da optimum reaksiyon verir [11]. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 187 kDa, izoelektrik noktası 5,4-6,0 civarındadır [21].

### 1.3 Alkalen Fosfatazın Önemi

ALP enzimi kemik, karaciğer, bağırsak, osteoblast, plazenta ve böbreğin yanı sıra pastörize edilmemiş, çiğ sütte bulunan doğal bir enzim olup safra yoluyla dışarı atılmakta ve bazı yapılarında sialik asit içermektedir. Sütte bulunan patojenik mikroorganizmaların öldürülmesi için gerekli pastörizasyon işleminde ALP enzimi inaktive olduğu [21] için, pastörize sütün içerisinde enzim aktivitesinin gözlenmesi, pastörizasyon işleminin doğru yapılmadığının göstergesi olarak kullanılır. Enzimin aktivite gösterip göstermediği alkali ortamda non-floresans aromatik monofosforik ester substratının ALP tarafından hidrolizi, yüksek floresans özelliğe ürün oluşumuyla sonuçlandığından [22] enzim renk değişiminden nitel olarak tayin edilebilir. Dolayısıyla ALP, pastörizasyon işlemi için iyi bir göstergedir [23-27] ve pastörizasyon işlemi doğru yapılmadığı takdirde çiğ sütte gıda kaynaklı (*Campylobacter jejuni*, *Shigatoxin*-üretici *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella serovars* ve *Yersinia enterocolitica*) patojenik mevcut mikroorganizmalar tanımlanmıştır [28]. ALP'nin süttten saflaştırılması, aktivite ölçümleri ve veteriner ilaç inhibisyon çalışmalarında p-nitro fenil fosfat substratı kullanılmıştır (Şekil 1.1).



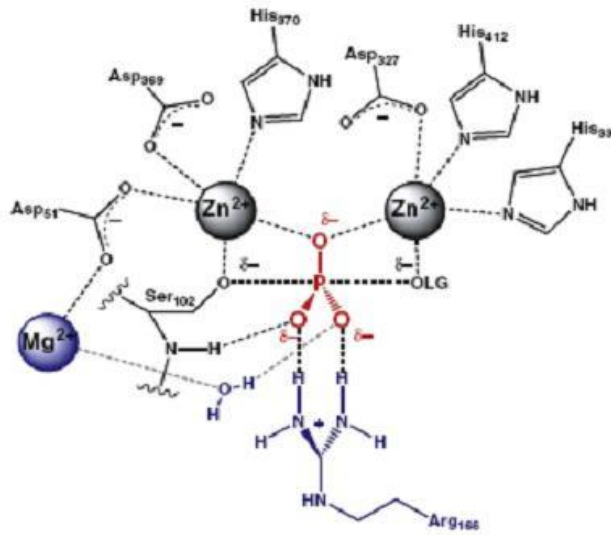
**Şekil 1.1:** Kay ve Graham (1933-1935), sütün pastörize edilmesinde ALP inaktivasyonunun indikatör olarak kullanıldığı aktivite metodu [29-31]

Alkalen fosfataz, bazı hastalıkların teşhis edilmesinde de kullanılan bir enzim türüdür [32]. Kemik tümörleri, karaciğer hasarı, safra yollarının tıkanıklığı gibi patolojilerde enzim aktivitesi artar. Örneğin; kanserli dokularda ALP aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu tip ALP enzimlerinin, mevcut alkalen fosfatazların modifiye formları olabileceği ileri sürülmektedir. Muhtemelen bu durum kanserli hücrelerde siyalil transferaz artışı ile ilgilidir. Fosfatazlar, bir organizmanın hayatta kalabilmesi için gerekli olan en önemli enzim gruplarından biridir. Fosfat sentezleyemeyen mikroorganizmalar ve inorganik fosfat (Pi) kaynağını fosforillenmiş şeker, nükleik asit ve proteinlerden karşılayan hücrelerin yaşam kaynağı olması açısından ALP'nin verdiği enzimatik reaksiyon sonucu oluşan inorganik fosfatlar, enzimi son derece önemli kılmaktadır [33]. Dolayısıyla bu enzim, diğer fosfatazlar gibi metabolitlerin aktif transportu ve modifikasyonu, besin maddelerinin absorpsiyonu, fosforilasyonu ve defosforilasyonu (fosfat metabolizması), hücre-içi sinyal iletimi vb. temel fonksiyonları için gerekli olup hücre içinde epitel hücrelerinin yüzey membranı ile yakın ilişkili olduğu yerlerde lokalize olmuştur [34,35]. Biyosensör ve immünosensör dizaynına dair uygulamalarda da, etiket amaçlı kullanılan fosfatazlara rastlanmıştır [36]. ALP'nin fetusun büyüme ve gelişmesi için de gerekli olduğu tespit edilmiştir. Yeni doğan bebeklerde, hiperbilirubineminin erken teşhisi için serum ALP seviyesinin çok önemli olduğu ve kanda artan bilirubin seviyesine bağlı olarak ALP miktarının da arttığı belirlenmiştir [37]. İlaveten serumda yüksek ALP seviyesinin, kalp-damar hastalıklarıyla da ilişkilendirilebildiği ortaya konulmuştur [38]. Tıbbi ve endüstriyel öneme sahip bu enzim, özellikle son yıllarda moleküler biyoloji alanında da büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Globüler yağ membranlarına bağlı, pastörizasyon indikatörü olarak kullanılan ALP ile mikrobiyal kaynaklı ALP, Western blot yöntemi kullanılarak spesifik antikorları sayesinde ayırt edilebilmektedir [21]. DNA Hibridizasyon ölçüm tekniğinde de ALP'nin oluşturduğu sinyal amplifikasyonundan yararlanılmıştır [39].

#### **1.4 Alkalen Fosfatazın Yapısı ve Biyokimyası**

ALP enziminin varlığı ilk kez 1907 yılında Suzuki ve arkadaşları tarafından fosfatazları ayrı bir enzim sınıfı olarak göstermeleri ile literatüre girmiştir. 1960'lı yıllarda *E.coli* alkalen fosfataz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda enzimin iki

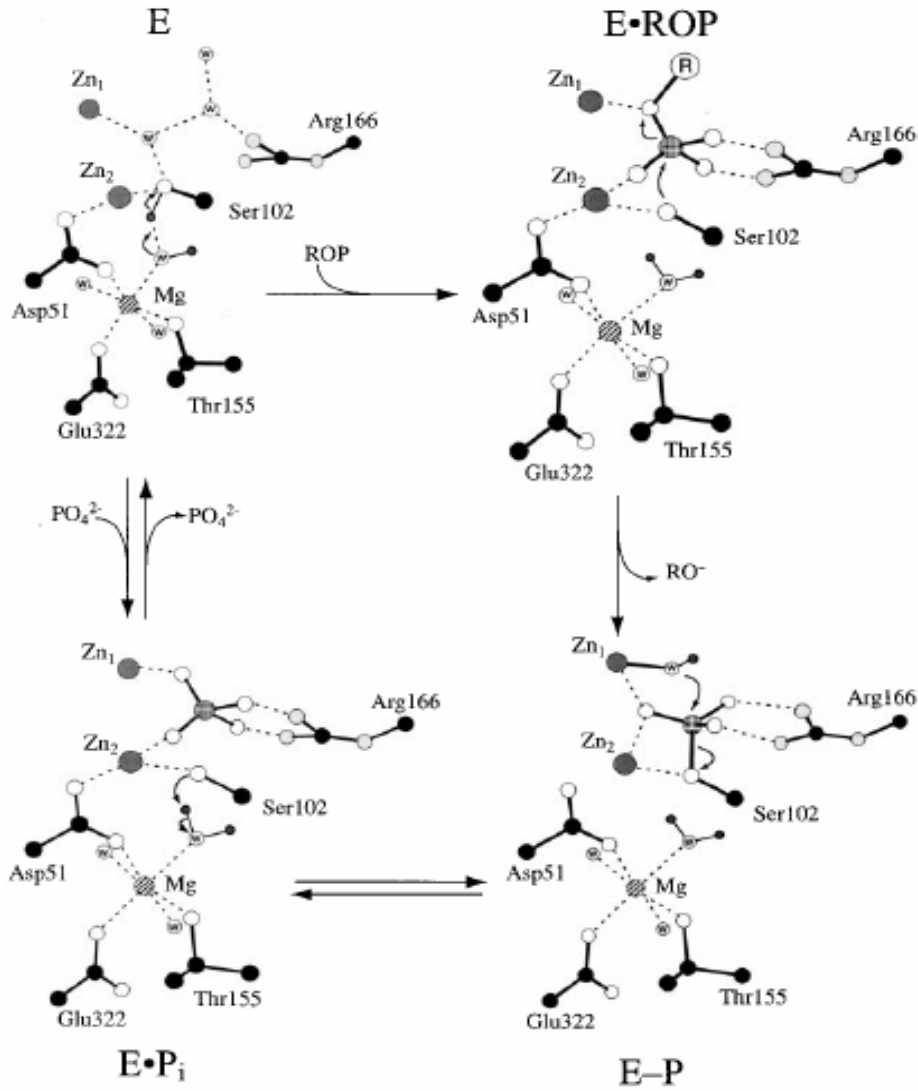
polipeptit zincirinden oluştuğu ve her bir zincirin iki  $Zn^{+2}$  ve bir  $Mg^{+2}$  metal iyonu içeren dimerik bir metaloenzim olduğu rapor edilmiştir [40,41]. Diğer enzim çeşitlerinde olduğu gibi ALP enziminin de farklı organ ve dokularda, çeşitli izomerleri mevcuttur. Örneğin; *E.coli* ALP, *Xanthomonas axonopodis* nükleotit pirofosfatazı (NPPaz) ile iki çekirdekli  $Zn^{+2}$  katalitik merkezleri karşılaştırıldığında hemen hemen aynı bulunmasına rağmen, fosfat monoester veya diesterlerin spesifik hidrolizlerinin birbirinden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla katalitik spesifikliklerinde meydana gelen farklılık, X-Işını Absorpsiyon Spektroskopisi ve X-Işını Kristalografik verilerle belirlenebilir [42]. *E.coli* ALP'sinin aktif bölgesinin X-Işını kristal yapısı, memeli ve maya hücrelerinde bulunan izoformlarıyla benzerdir [43]. Ayrıca süt ALP enzimi de, *E.coli* ALP ve enzimin memeli dokularındaki farklı izoformlarıyla benzer yapıya sahiptir [44]. İnsan sütünde bulunan ALP yapısının da bu enzimin insan karaciğerinde mevcut izoformuyla benzer olmasıyla birlikte sialik asit içeriklerinden dolayı farklılıklar bulunmaktadır. İki boyutlu elektroforetik analizlerle de süt ALP enziminin karaciğerde bulunan izoformundan, sialik asit içeriklerinin birbirinden farklı olmasının bir sonucu olarak alt birim moleküler ağırlığının ve izoelektrik noktasının farklı olduğu görülmüştür [45].



Şekil 1.2: ALP enziminin yapısı [42]

Substratın yapısında bulunan fosfat grubu, enzimin aktif bölgesine yan zincir Serin<sub>102</sub> rezüdüsünün hidroksil grubu üzerinden non-kovalent bağlıdır (Şekil 1.2) [42].

## 1.5 Alkalen Fosfataz Enziminin Katalitik Mekanizması



Şekil 1.3: ALP enziminin reaksiyon mekanizması [47]

Serbest enzimde (E) katalitik grupların yer aldığı fosfat-bağlanma bölgesi, üç su molekülü ile çevrilidir. Mg<sup>+2</sup> iyonu ile koordine olmuş (-OH) iyonu, Ser<sub>102</sub> rezidüsünün hidroksil grubunun hidrojenine nükleofilik atak yaparak serin nükleofilini oluşturur. Ortama substrat (ROP) katılmasıyla Zn<sup>1</sup> atomu ile ester oksijeni ve Zn<sup>2</sup> atomu ile substratın oksijen atomları arasındaki elektrostatik etkileşimler ve Arg<sub>166</sub> rezidüsünün guanidium grubunun H atomlarıyla fosfor atomuna bağlı diğer iki O atomu arasında H-bağları meydana gelir [46,47]. Bütün bu etkileşimler enzim-substrat (E·ROP) kompleksinin oluşumunu tetikler. Serin

nükleofili ayrılacak olan grubun karşı tarafında yer alarak dönüşüm mekanizması için uygun ortamı oluşturur. Bu durumda serin nükleofilinin eksi yüklü O atomu, kısmi pozitif yüklü fosfor atomuna nükleofilik atak yaparak fosfat grubunda inversiyon meydana getirir ve ayrılacak olan grup (RO-) aktif bölgeden ayrılarak kovalent enzim-fosfat (E-P) bağına meydana getirir. Bu defa Zn1 atomu ile koordine haldeki nükleofilik -OH iyonu, kovalent E-P bağına oluşturulan fosfor atomuna atak yapar ve fosfat grubunun konfigürasyonunda ikinci bir inversiyona sebep olarak enzim-inorganik fosfat (E·Pi) kompleksini oluşturur. Mg<sup>+2</sup> iyonu ile koordine olmuş su molekülü de bir asit gibi davranarak serin rezidüsünün negatif yüklü O atomuna kısmi pozitif yüklü hidrojenini verir. Serin grubunun protonlanması da inorganik fosfatın kovalent bağlı olmayan E·Pi kompleksinden ayrılmasını kolaylaştırır. İnorganik fosfat, E·Pi kompleksinden ayrılırken Mg<sup>+2</sup> iyonu ile elektrostatik etkileşerek koordine olmuş su molekülleri tarafından doğrudan protonlanır ve sonuç olarak Pi grubu açığa çıkar [47].

## 1.6 Süt Yağ Globüler Membranları

Süt, vücutları süt üreten genç memelilerden elde edilen, canlıların fizyolojik ve beslenme ihtiyaçları için yararlı ve gerekli birçok gıda içeren, besin değeri yüksek biyolojik bir sıvıdır. Toplam lipit fraksiyonlarının yaklaşık % 97-98'ini oluşturan trigliseridler, doymamışlık derecesine ve farklı zincir uzunluklarına bağlı olarak çeşitli sayıda ve türde yağ asidi (>400) içerdiğinden oldukça kompleks yapıya sahiptir. Birçok biyo-fonksiyonel özelliğe sahip yağ asitleri, trigliserit ve fosfolipit membran komponent konsantrasyonları, beslenme stratejileri ile ayarlanıp kontrol edilebilir. Böylece doymamış yağ asidince zengin gıdalar tüketilmesiyle biyoaktif doymamış yağ asidi yüzdesi artırılarak, doymuş yağ asitlerinin sayısı azaltılabilir.

Membran fosfolipitleri başlıca gliserofosfolipit ve sfingolipitlerden oluşmuştur. Toplam lipit içeriğinin yaklaşık %1'ini oluşturan gliserofosfolipitler de fosfatidil etanolamin (PE; 19,8-42%), fosfatidil inositol (PI; 0,6-13,6%), fosfatidil serin (PS; 1,9-19%), fosfatidil kolin (PC; 19,2-37,3%) ve sfingomiyelinlerden (SM) meydana gelmektedir [48]. Buna bağlı olarak, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve kolesterol plazma konsantrasyonlarındaki

değişimler ile kardiovasküler hastalıklara yakalanma riski azaltılabilir [49]. Süt yağ globüler membranları; ilk yüzey aktif tabakasının çoğunluğu proteinlerden oluşmuş ve proteinlerin etrafı intraselüler nötral yağlarla çevrili üç tabakadan meydana gelmektedir [50]. İç tabaka, apikal (en dış) plazma membranının salgı hücrelerinden oluşmuş çift tabakalı bir membranla çevrilmiştir [51]. Genetik ve [52], çevresel faktörler (Sütteki sfingomiyelin konsantrasyonunun çevresel etmenlerle değişebileceği düşünülmektedir.) [53], beslenme biçimi (Beslenmeye bağlı olarak membranı oluşturan yağ asidi kompozisyonlarının değiştiği gözlenmiştir.) [54], laktasyon süresi [55] ve mikrofiltrasyon süreçleri yağ globüler membranların teknolojik ve fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir [56]. Rola ve Sosnowski tarafından, ALP'nin yaklaşık %30-%40'ının yağ globül membranlarına bağlı olup, geri kalan enzimin yağı ayrılmış sütte bulunan serbest lipoprotein partikülleriyle bağlantılı olduğu rapor edilmiştir [57].

### **1.7 Bazı Veteriner İlaçların ALP Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Sütte antibiyotik kalıntısına rastlanması, alerjik reaksiyonları tetikleyebileceği ve mikrobiyal popülasyonun antibiyotiğe karşı dayanıklılığını arttırabileceğinden, süt üreticileri ve tüketicilerinde büyük endişe yaratmaktadır [58]. Bu durumda sütün besin değeri etkilendiği gibi, sütte bulunan bazı enzimlerin aktivitelerinin de etkilenme riski doğmaktadır. Bu enzimlerden biri de ALP enzimidir. Bu sebeple çeşitli veteriner ilaçların enzim aktivitesi üzerinde etkili olup olmadığına bakılmış ve bu değerler Türk Kıda Kodeksi, Tebliğ No: 2011/20'de belirtilen ilaçların maksimum kalıntı limitleri (MKL) [59] ile karşılaştırılmıştır. Günümüzde veterinerlikte tercih edilen diğer ilaç gruplarına nazaran daha sık kullanılan ve birçok sayıda antibiyotik mevcut olduğundan çoğunlukta veterinerlikte kullanılan antibiyotiklerle çalışılmıştır.

Benzotiazol türevleri, büyük ölçüde biyolojik aktivite gösteren bileşik gruplarıdır. Yapısı gereği bu gruba dahil olan levamisol, koordinasyon kimyasına göre metal atomlarını bağlamada görevli üç farklı atom içermektedir. Levamisolün sadece birkaç inorganik türevi Co, Ni, Pd, Cu ve Zn gibi metal klorürleri ile birlikte tek dişli ligand olarak görev yapar. Bu komplekslerden bazıları immünomodülatör

ilaç olarak önemli biyolojik aktivite gösterirler [60]. Levamisol sentetik bir fenil imidazol türevi olup, 1970'lerden beri insan ve veteriner hekimlikte antiparaziter olarak kullanılmaktadır. Örneğin, balıklarda levamisol ile yapılan çalışmalarda lökosit düzeyindeki değişimlerde önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. Anderson ve Jeney, *Aeromonas salmonicida*'ya karşı bazı bağışıklık düzenleyicilerin etkisini araştırmış ve levamisolün lökosit düzeyini artırdığını ortaya koymuşlardır [61]. Non-steroidal anti-enflamatuar ilaçlar (NSAIDs), çoğunlukla kemik ve meme iltihapları olmak üzere veterinerlikte iltihap önleyici olarak kullanılırlar [62]. Fluniksın: (2-[[2-methyl-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-3-pyridinecarboxylic acid), Metamizol, Deksametazon, Marbofloksasin ve danofloksasin fulorokinolon antibiyotikler grubundan veteriner ilaçlardır [63]. Literatürde Metamizol [64] ve Deksametazon [65] anti-enflamatuar ilaç olarak da geçmektedir.

Çalışmada yer alan diğer bir ilaç Gentamisin de amino glikozidik antibiyotik grubundandır [58]. Tetrasiklin antimikrobiyal ajan grubuna dahil olan oksitetrasiklin ve doksisisiklin, gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı geniş spektruma sahip, yaygın olarak kullanılan ekonomik veteriner ilaçlardır [66]. Çalışılan antibakteriyellerden Kanamisin ve Neomisin Sülfat amino glikozid yapısında olup bu gruba dahil ilaçlar, gram (+) ve gram (-) organizmalara karşı antibakteriyel etki gösteren, insan ve hayvanlarda kullanılan geniş spektrumlu suda çözünebilir bir antibiyotik grubunu kapsar [67]. Sülfonamid ve kinolon türevleri, hayvansal enfeksiyonların önlenmesi ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılan veteriner ilaçlardır [68]. Hayvancılıkta geniş ölçüde kullanılan antibakteriyel bir ilaç olan enrofloksasin florokinolon karboksilik asit türevidir [69]. Florfenikol, Furosemid ve Sülfadimidin Sodyum da sülfonamid yapısından ilaçlar olup, Toldimfos Sodyum da bir fosforik asit türevidir (Tablo 2.1).

Tilmikosin (20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin) ise 16-üyelik halkadan oluşmuş yarı sentetik bir makrolit antibiyotiktir [70]. Tilmikosinin yanı sıra Tilozin veteriner ilacı da makrolit yapısına sahip bir antibakteriyeldir [71]. (Tablo 2.1). Benzen asetik asit türevi olan Atropin sülfat etkeni ise antikolinergik özelliğe sahiptir [72].



## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

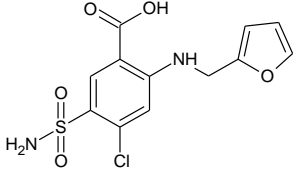
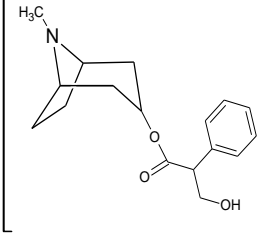
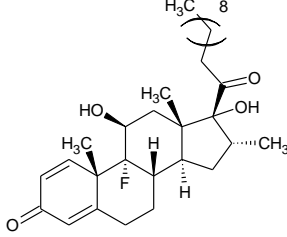
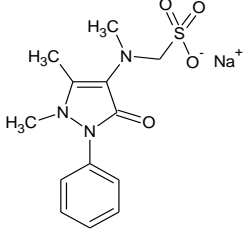
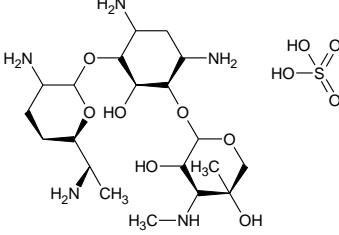
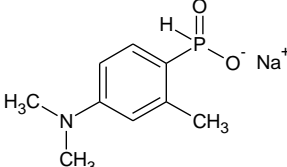
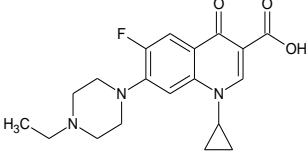
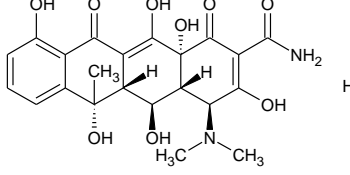
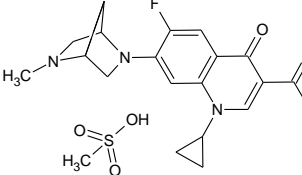
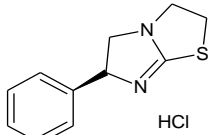
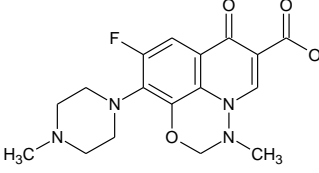
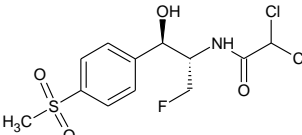
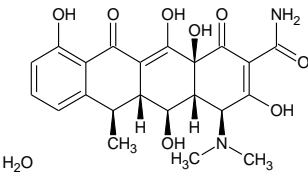
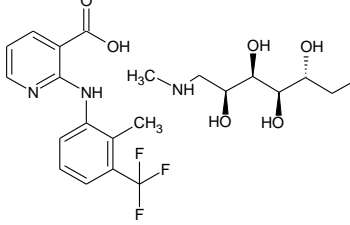
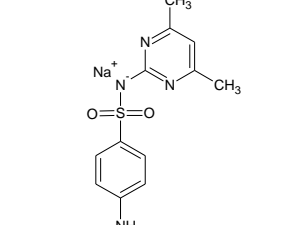
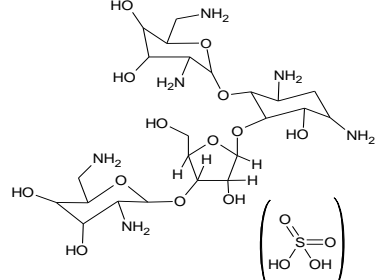
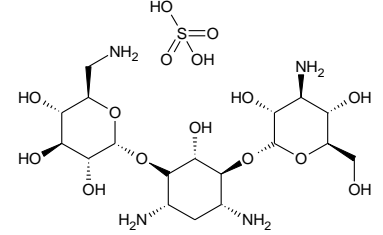
### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

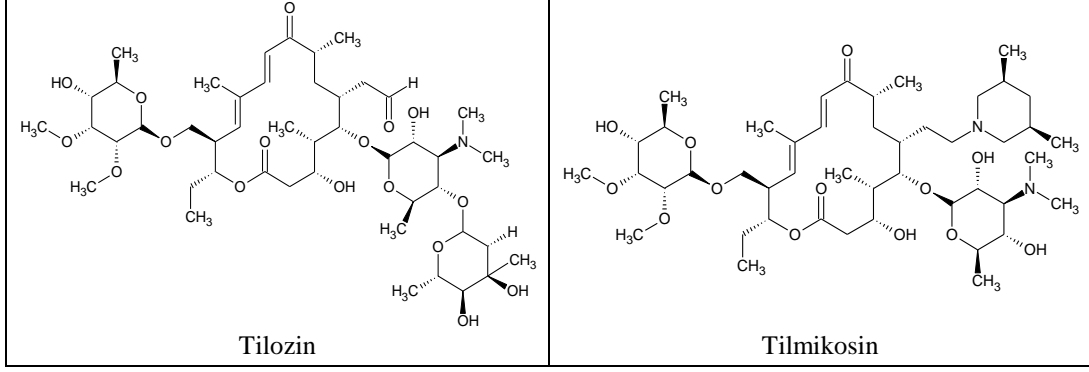
Deneysel çalışmalarda kullanılan, levamisol hidroklorür, toluen, n-bütanol, aseton, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), p-nitrofenil fosfat, sodyum hidroksit, sodyum klorür, amonyum sülfat, hidroklorik asit, magnezyum klorür, çinko klorür, tris-base, tris-HCl, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, asetik asit, etil alkol, folin-ciocalteu fenol reaktifi,  $\beta$ -merkaptöetanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, glisin, Coomassie Brilliant Blue G-250, standart serum albümin ve tetrametil etilendiamin (TEMED), Sigma Chemical ve Merck A.G.' den sağlanmıştır.

Araştırmada, inek sütünden izole edilen ALP enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmek üzere kullanılan veteriner anti bakteriyel ilaçlardan (-)-Tetramisol (Levamisol) Sigma Chemical ve diğer ilaçlar (Furosemid, Atropin ve Gentamisin Sülfat, Toldimfos ve Metamizol Sodyum, Deksametazon, Enrofloksasin, Oksitetrasiklin HCl, Danofloksasin Mesilat, Kanamisin Sülfat, Marbofloksasin, Tilmikosin, Doksisiklin, Tilozin, Sülfadimisin Sodyum, Florfenikol, Neomisin Sülfat ve Fluniksin Meglumine) da yerel eczanelerden temin edilmiştir.

**Tablo 2.1: Veteriner ilaçların molekül şekilleri**

 <p>Furosemid</p>	 <p>Atropin Sülfat</p>	 <p>Deksetazon 21-Undekanoat</p>
 <p>Metamizol Sodyum</p>	 <p>Gentamisin Sülfat</p>	 <p>Toldimfos Sodyum</p>
 <p>Enrofloksasin</p>	 <p>Oksitetrasiklin Hidroklorür</p>	 <p>Danofloksasin Mesilat</p>
 <p>(-)-Tetramisol HCl</p>	 <p>Marbofloksasin</p>	 <p>Florfenikol</p>
 <p>Doksisiklin Monohidrat</p>	 <p>Fluniksın Meglumin</p>	 <p>Sülfadimidin Sodyum</p>
 <p>Neomisin Sülfat</p>		 <p>Kanamisin Sülfat</p>

Tablo 2.1 (devam)



### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj	Sigma Laborzentrifügen 3K 15/10706 / 10707
pH Metre	Orion-Model 920 A
UV-Spektrofotometre	Biotek Power Wave XS
Magnetik Karıştırıcı-Isıtıcı	ARE Magnetic, Heating Stirrer IKA Combimag RCO
Hassas Terazi	Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Otomatik Pipetler	Eppendorf, Medisis
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1,5x10 cm )
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Çalkalayıcı	Biolab 1575-2B Çalkalayıcı

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

- **Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Tampon:** 15,9 g (0,15 mol)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  950 mL ve 8,4 g (0,1 mol)  $\text{NaHCO}_3$  (pH 10,0) distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Substrat Çözeltisi:** 10 mM p-nitrofenil fosfat (0,0186 g / 0,005 L) distile suda iyice çözülerek p-nitrofenil fosfat çözeltisi hazırlandı.

- **Jel Filtrasyon Kromatografisinde Kullanılan Dengeleme Tamponu:** 12.114 g (0,1 mol) Tris-Base (pH 10,0) distile suda çözülerek son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözelti:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Numune Tamponu:**

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

- **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tank Tamponu:**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS	1,0 g

- **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Ayırma ve Yığma Jellerinin Hazırlanışı:** SDS-PAGE elektrofrezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

- **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Renklendirme Çözeltisi:** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

- **SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Renk Açma Çözeltisi:** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

**Tablo 2.2:** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

Kimyasal	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<b><u>Akril amid/Bis</u></b> Akril amid: 15g Bis: 0,4g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL' ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
<b><u>Distile Su</u></b>	20,1 mL	12,2 mL
<b><u>1.5 M Tris-HCL (pH 8.8)</u></b> Tris-HCl: 11.82 g Alınarak pH 8,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 ml	---
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b> Tris-HCl 3.94 g Alınarak pH 6,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	---	5 ml
<b><u>% 10' luk SDS</u></b> SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL' ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µl
<b><u>TEMED</u></b>	25 µL	20 µL
<b><u>%10'luk Amonyum Persülfat</u></b> Amonyum persülfat (APS) 1g alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Alt Tank Tamponu: (63 mM Tris-Base, 0,05 N HCl, pH: 7,5)**

Tris	22,7 g
1N HCl	150 ml
H <sub>2</sub> O	3 litreye tamamlanır.

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Üst Tank Tamponu: (37,6 mM Tris-Base, 40 mM Glisin, pH: 8,9)**

Tris	4,56 g
Glisin	3 g
H <sub>2</sub> O	1 litreye tamamlanır.

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Ayırma Jeli Tamponu: (947 mM Tris-Base, 0,289 N HCl, pH: 8,5)**

Tris	11,47 g
1N HCl	28,92 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml'ye tamamlanır.

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Ayırma Jeli İçin Monomer Çözelti: (% 40 T, % 5 C<sub>bis</sub>)**

Akrilamid	38 g
Bis	2,0 g
H <sub>2</sub> O	100 ml'ye tamamlanır.

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Polimerizasyon Başlatıcı: (% 0,06 APS)**

% 10 APS	0,6 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml'ye tamamlanır.

• **Native-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Sükroz Boya Çözeltisi: (% 50 Sükroz, % 0,1 Bromfenol mavisi)**

Sükroz	5 g
% 1 Bromfenol mavisi	1 ml
H <sub>2</sub> O	10 ml'ye tamamlanır.

Çözelti -20°C'de saklanmalıdır.

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Enzimin Saflaştırılması

#### 2.2.1.1 Organik Çözücüler ile Muamele

Ham ekstraktın hazırlanması amacıyla, çiğ inek sütü +4°C'de bir gece bekletilip, hacminin belirli % oranlarında çeşitli organik çözücülerle ayrı ayrı muamele edilerek ev tipi blender ile 15 dakika süreyle homojenize edildi ve homojenatlar 15000 rpm'de +4°C / 40 dk santrifüj edildi. Taze süt sırasıyla, n-bütanol %2 (v/v), n-bütanol %2 (v/v) - 2mM EDTA, toluen %3 [73] (v/v), toluen %3 (v/v) - 2mM EDTA, aseton %2 (v/v) ve aseton [74] %2 (v/v) - 2mM EDTA ile muamele edildi. Bu homojenizasyon işlemlerine ek olarak, kazeinin asit ile doğrudan çöktürülmesi [75], sütün (1/1) ve (1/2) oranlarında distile su ile seyreltilerek (v/v) asit ile kazein çöktürülmesi, distile su ile (1/1) oranında seyreltme, sütün 15000 rpm'de +4°C'de 40 dk direk santrifüj edilmesi ve (1/1) oranında seyreltilerek santrifüj edilmesi sonucu elde edilen tüm enzim aktiviteleri karşılaştırıldı. En yüksek enzim aktivitesi, n-bütanol %2 ile muamele sonrası gözlemlendiğinden (Şekil 3.2, 3.3, 3.8, 3.9) sırasıyla (v/v) %, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 bütanol oranlarında homojenatlar hazırlanıp elde edilen süpernatant aktiviteleri karşılaştırıldı (Şekil 3.10, 3.11). En yüksek enzim aktivitesi 3% n-bütanol oranında gözlemlendi. Tüm enzim aktiviteleri sırasıyla, 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 ve 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 25mM Tris-Base pH:10 tamponları ile ölçüldü. Bütün basamaklarda, sodyum karbonat - bikarbonat tamponu ile yapılan aktivite ölçümlerinde daha yüksek enzim aktiviteleri elde edildi.

#### 2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, bazı proteinlerin belirli doygunluk derecelerine göre çökmesini sağlayan +2 değerlikli ve çok kullanılan bir tuzdur [76]. Kullanılacak uygun 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: Serum hacmi

S<sub>1</sub>: l'in kesri şeklinde mevcut (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doygunluğu

S<sub>2</sub>: l'in kesri şeklinde istenilen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının belirlenmesi amacıyla, sırasıyla 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 ve 90-100 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralıkta elde edilen çökelek, minimum hacimdeki tamponla çözülerek elde edilen çökelek aktiviteleri, her bir çöktürme işlemi sonrası 1 ml ayrılan süpernatant aktiviteleri ile karşılaştırıldı.

### 2.2.1.3 Kazein Çöktürme Yöntemleri

#### 2.2.1.3.1 İzoelektrik Çöktürme ile Kazeinin Uzaklaştırılması

Gravimetrik metot, çöken kazeinin çözünmesi amacıyla ve NaOH ilavesi ile uygulanan geri titrasyon ve kazein presipitasyonu için asetik asit ile titrasyon yöntemleri ile kazein izoelektrik noktasında (pH<sub>I</sub>) çöktürülür. Gravimetrik metod, kazeinin 2N asetik asit ile çöktürüldükten sonra (pH<sub>I</sub>) filtre edilmesi ve kurutulup tartılması esasına dayanır. Geri titrasyon yönteminde kazeinin aynı şekilde çöktürülmesini takiben 0,1N NaOH ile çöken kısmın çözünmesi sağlanır. Kazein miktarı, çöken kazeinin tamamının çözünebilmesi için kullanılan NaOH hacminden hesaplanır. Asetik asit ile titrasyon işlemi ise, süt 0,1N CH<sub>3</sub>COOH ile çöktürülerek süzülen kısım 0,1N NaOH ile titre edilir [75]. Çalışmada amaç kazeinin saflaştırılması olmadığından, pH: 4,8'de çöken kazein tartma işlemi yapılmadan süzülerek ayrıldı.



### **2.2.1.3.2 Çitosan ile Kazeinin Çöktürülmesi**

Çitosan, özgün katyonik karakterinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir potansiyele sahip olup anti-mikrobiyal özellik göstermesiyle de atık su arıtım işlemlerinde ve bitkisel gıda süreçlerinden lipit ve proteinlerin geri kazanımında etkili bir koagülasyon ajanı olarak da kullanılır. Çitosanın bu özelliğinden faydalanılarak sütte bulunan kazein çöktürüldü [77]. Bu sebeple, 100mM sodyum asetat (10ml asetik asit / 0,8203g sodyum asetat / 0,2g çitosan, pH:5,9) [78] çözeltisi hazırlanarak çitosanın çözünmesi sağlandı. 25ml çiğ süt, 25ml sodyum asetat çözeltisiyle seyreltilerek 0,1g/100ml çitosan ile karıştırıldı ve (15000 rpm / 30dk / +4°C) santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kullanılarak amonyum sülfat çöktürme aralığı tespit edildi. Sırasıyla (0-10/10-20/20-30/30-40/40-50/50-60/60-70/70-80/80-90/90-100) aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı.

### **2.2.1.3.3 (Rennet) Peynir Mayası ile Kazeinin Uzaklaştırılması**

Taze çiğ sütün yağı ayrıldıktan sonra kazein yağsız süttten rennet (peynir mayası) ile çöktürme işlemi vasıtasıyla, Kuzuya et al. 1980 metodu modifiye edilerek uygulandı [79]. 1 lt çiğ süt, ortalama 0,4 ml maya içecek şekilde, 35°C-45°C sıcaklığında mayalanmaya bırakıldı. Yaklaşık 2 saat mayalama süresinden sonra çöken kısım süzgeç kağıdıyla süzülerek süpernatant ayrıldı.

### **2.2.1.3.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Jel filtrasyon kromatografisi (JFK), moleküllerin, farklı moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasında kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Temel prensibi, moleküllerin gözenekli matriksten oluşan sabit faz ve tampon çözeltinin oluşturduğu hareketli fazdan geçerken büyüklüklerine göre ayrılırlar [80]. Örnek, kolonda paketlenmiş jelle tatbik edilirken, porlara giremeyecek kadar büyük moleküller kolondan daha hızlı yürürken küçük moleküller jel porlarına girerek kolondan daha yavaş yürüyeceklerdir. Böylece azalan molekül ağırlığına göre bileşikler kolondan elüye edildi. Bu metotta kullanılan jeller, genellikle çapraz bağlı

polimerlerdir. Çapraz bağların sayısı, por büyüklüğünü belirlemektedir. Por büyüklüğü de farklı molekül ayırım aralığını belirler.

JFK'da genellikle poliakrilamid, agaroz ve dekstran olmak üzere üç tip polimer kullanılır. Jelin porlarına giremeyen peptid ya da globüler proteinlerin en küçük molekül ağırlığına 'dışlama limiti' denir [81]. Yüksek saflaştırma katsayısının elde edilebilmesi için ince-uzun kolonlar tercih edilmelidir [82].

### 2.2.1.3.5 Enzim Aktivite Tayini

ALP enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak p-NPP substratı kullanılarak tayin edilir (405 nm) [83] Aktivite ölçümü için kuvarz küvete sırasıyla 900µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> tampon + substrat (50µL) + 50µL enzim çözeltisi ilave edilerek 37°C / 405 nm' de köre karşı bir dakikada absorbandsa meydana gelen değişme okunur. 1 Enzim Ünitesi (E.Ü.) reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakikada 1 µmol p-nitrofenil fosfatı p-nitrofenole dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır [84]. Çalışmamızda, ALP enzim aktivite tayini için Aschaffenburg and Mullen (1949) yöntemi uygulanmıştır. Spektrofotometrede belirtilen absorbands farklarından yola çıkılarak aşağıdaki formüle göre enzim ünitesi hesaplandı [27]:

$$E\ddot{U} = \frac{[ \text{Reaksiyon Hacmi (ml)} \times dA/dT ]}{[ \epsilon_{405} \times \text{Enzim Hacmi (ml)} \times d \text{ (cm)} ]} \times 1000$$

$$(\epsilon_{405}) = 18.2 \text{ L. cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$$

d: 1 cm (ışık yolu)

### 2.2.2 Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Çiğ süt, %3 n-bütanol ekstraksiyonu, amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltiler, mayalama sonrası elde edilen süpernatant ve JFK fraksiyonlarına ait protein miktar tayinleri, bu yöntemle belirlendi. Yöntem, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile

kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm’de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır [85]. Bozucu faktörlerin az olması, çok kısa sürede uygulanması, protein boya kompleksinin çözeltelerde uzun süre kalması vb. gibi özelliklerinden dolayı yöntem, diğer protein tayin yöntemlerine göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayin işleminde řu yol izlendi: 1 mL’sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Distile su ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL’ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde kre karşı absorbands değerleri okundu. Kr olarak 100µl distile su içeren 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Enzim örneklerinden 0,1’er mL ayrı tüplere alınarak üzerlerine 5’er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırdıktan 10 dakika sonra 595 nm’de absorbandsları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbandsına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı (şekil 3.17, 3.18).

### **2.2.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Alkalen Fosfataz enziminin mayalama ve JFK metodları ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli [86] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofrez 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 elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Tablo 2.2’de belirtildiği şekilde 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 veya saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra distile su/n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (10 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.

Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen yüksek aktiviteli fraksiyonlar, toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 ve 1:2 oranlarında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutulurken kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 20-30 dakika kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak 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 jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

#### **2.2.4 Doğal Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Amonyum sülfat çöktürme sonrası oluşan çökelek ve çökeleğin jel filtrasyon kromatografisinden geçirilmesiyle elde edilen numune ile saflaştırılmasından sonra ayırma jeli % 10 olacak şekilde doğal (native) jel elektroforezi (Native-PAGE) Laemmli [86] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi ve molekül büyüklüğü kontrol edildi. Ayırma jelinin hazırlanışında; ayırma jeli için

monomer çözelti ve ayırma jeli tamponundan 5 ml, H<sub>2</sub>O 7,5 ml, TEMED 40 µl ve APS'den 500 µl kullanıldı.

### **2.2.5 Optimum Şartlarda K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> Değerlerinin Bulunması**

K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda (37°C'de ve 0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 tamponunda) p-nitro fenil fosfat substratının 14 farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### **2.2.6 Veteriner İlaçların IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

Çalışmada kullanılan veteriner ilaçların IC<sub>50</sub> değerlerini belirlemek amacıyla, optimum şartlarda, p-nitro fenilfosfat substratının 0,5 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce veteriner ilaçları reaksiyon ortamında olmadan enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik veteriner ilaç konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 405 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite -[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir ilaç için IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı.

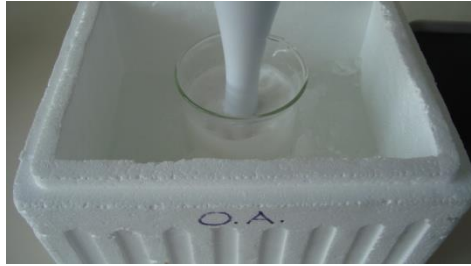
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzimin Saflaştırılması

##### 3.1.1 Organik Çözücüler ile Muamele, Santrifüj ile Süt Yağının Ayrılması ve Düşük pH' da Kazeinin Çöktürülmesi

Organik çözücüler ile homojenizasyon, santrifüj ve (1/1) distile su ile seyreltme sonucu 15000 rpm/+4°C/40 dk. santrifüj sonrası ve asitli ortamda kazeinin ayrılmasından sonra elde edilen süpernatant enzim aktivite ölçümleri, optimum şartlarda, p-nitro fenil substratı kullanılarak 405 nm'de yapıldı. Her ölçüm en az iki defa tekrarlanarak bulunan değerlerin ortalaması hesaplandı. Aktivite değerleri reaksiyon hızı (EU/dk) olarak alındı.

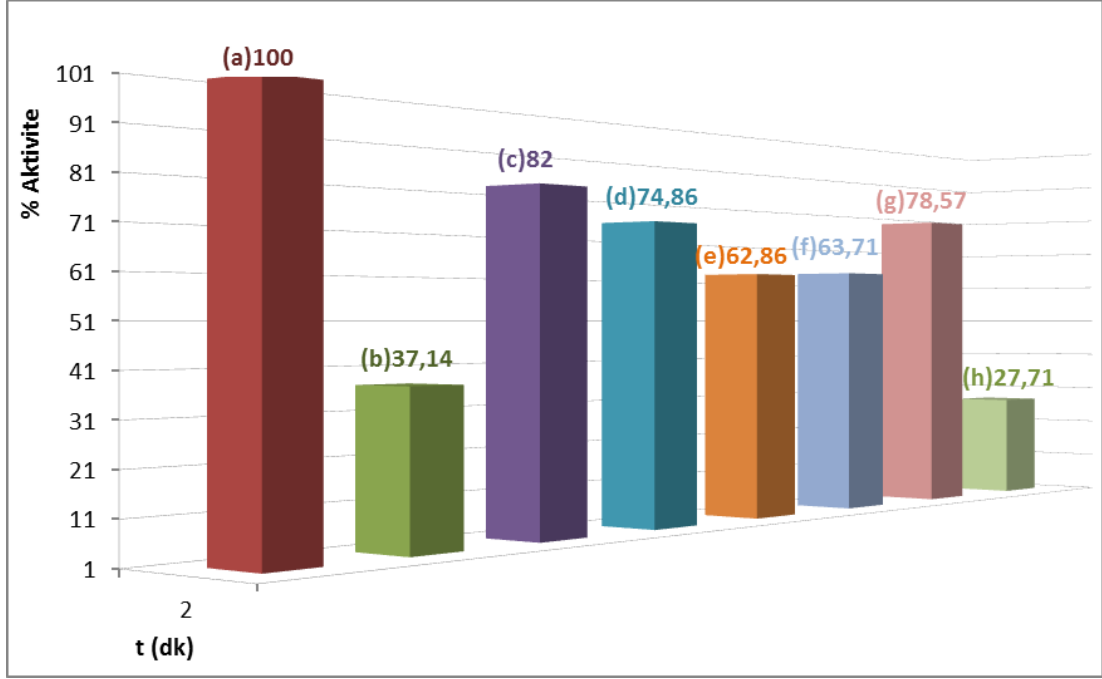
Çiğ Süt



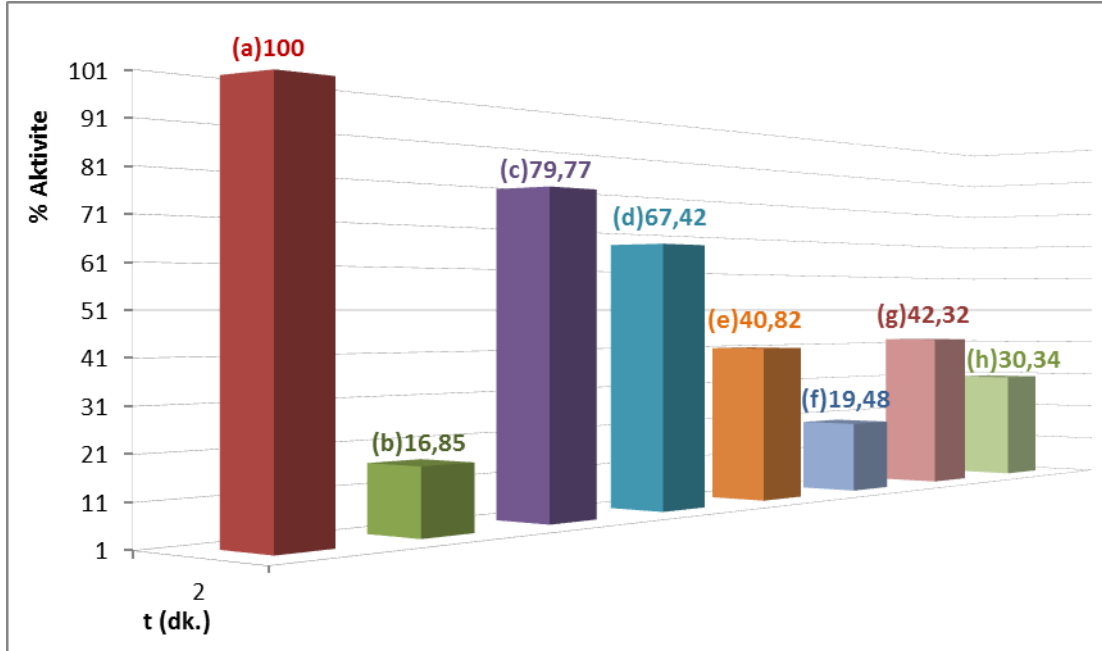
Şekil 3.1: Blendır ile homojenizasyon



Santrifüj (15000 rpm / 40 dk / +4°C)



**Şekil 3.2:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (1); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & santrifüj, (c) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & santrifüj, (e) çiğ süt & toluen %3 & santrifüj, (f) çiğ süt & EDTA % 0,2 & toluen %3 & santrifüj, (g) çiğ süt & EDTA % 0,2 & santrifüj, (h) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8)



**Şekil 3.3:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (2); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & santrifüj, (c) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & santrifüj, (e) çiğ süt & toluen %3 & santrifüj, (f) çiğ süt & EDTA % 0,2 & toluen %3 & santrifüj, (g) çiğ süt & EDTA % 0,2 & santrifüj, (h) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8)

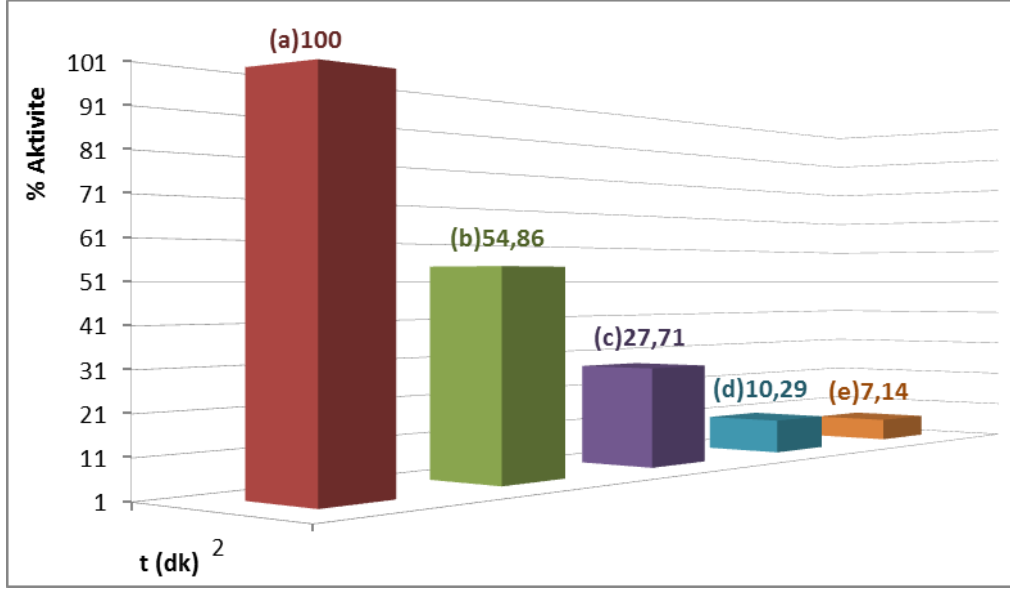
**Tablo 3.1:** ALP enziminin süttten izolasyonunda, ön saflaştırma basamakları (1), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

Örnek	0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,175	192,308	100
Çiğ Süt & Santrifüj						0,065	71,429	37,143
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,143	157,692	82
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,131	143,956	74,857
Çiğ Süt & Toluen %3 & Santrifüj						0,110	120,879	62,857
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Toluen %3 & Santrifüj						0,111	122,527	63,714
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Santrifüj						0,137	151,099	78,571
Çiğ Süt & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,048	53,297	27,714

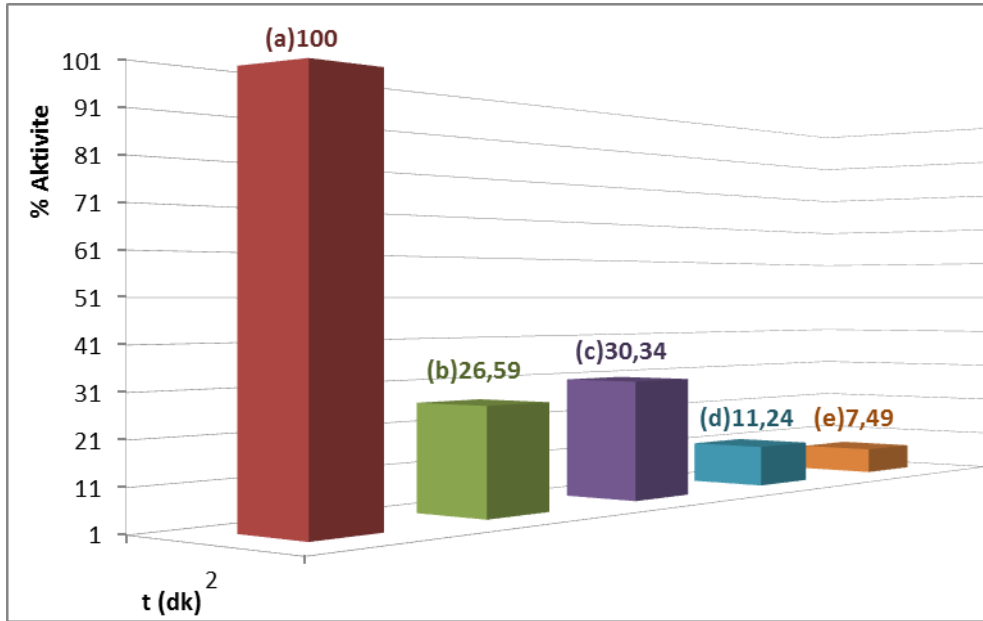


**Tablo 3.2:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (2), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

Örnek	0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 25mM Tris Base pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,133	146,703	100
Çiğ Süt & Santrifüj						0,022	24,725	16,854
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,106	117,033	79,775
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,090	98,901	67,416
Çiğ Süt & Toluen %3 & Santrifüj						0,054	59,890	40,824
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Toluen %3 & Santrifüj						0,026	28,571	19,476
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Santrifüj						0,056	62,088	42,322
Çiğ Süt & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,040	44,505	30,337



**Şekil 3.4:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (3); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1), (c) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (d) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1) & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (e) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/2) & kazein çöktürmesi (pH:4,8)



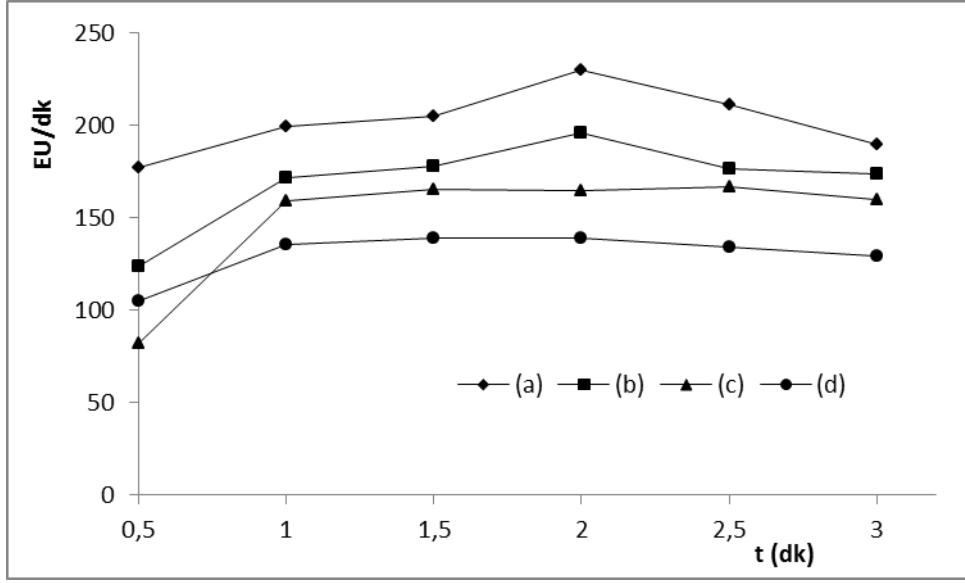
**Şekil 3.5:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (4); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1), (c) çiğ süt & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (d) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/1) & kazein çöktürmesi (pH:4,8), (e) çiğ süt & distile su ile seyreltme (1/2) & kazein çöktürmesi (pH:4,8)

**Tablo 3.3:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (3), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

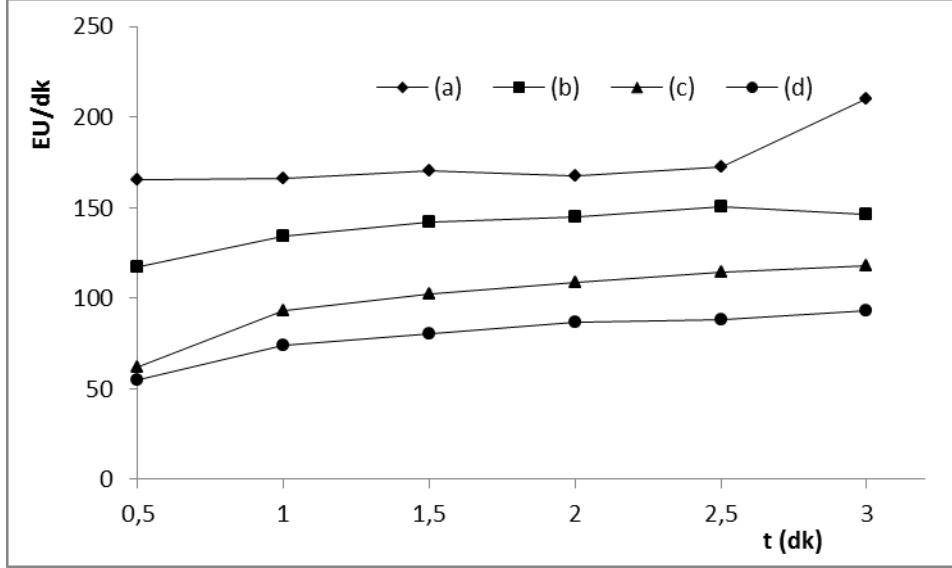
Örnek	0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,175	192,308	100
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/1)						0,096	105,494	54,857
Çiğ Süt & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,048	53,297	27,714
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/1) & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,018	19,780	10,286
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/2) & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,012	13,736	7,143

**Tablo 3.4:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (4), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

Örnek	0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 25mM Tris Base pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,133	146,703	100
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/1)						0,035	39,011	26,592
Çiğ Süt & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,040	44,505	30,337
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/1) & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,015	16,483	11,236
Çiğ Süt & Distile Su ile Seyreltme (1/2) & Kazein Çöktürmesi (pH:4,8)						0,010	10,989	7,491



**Şekil 3.6:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (5); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.



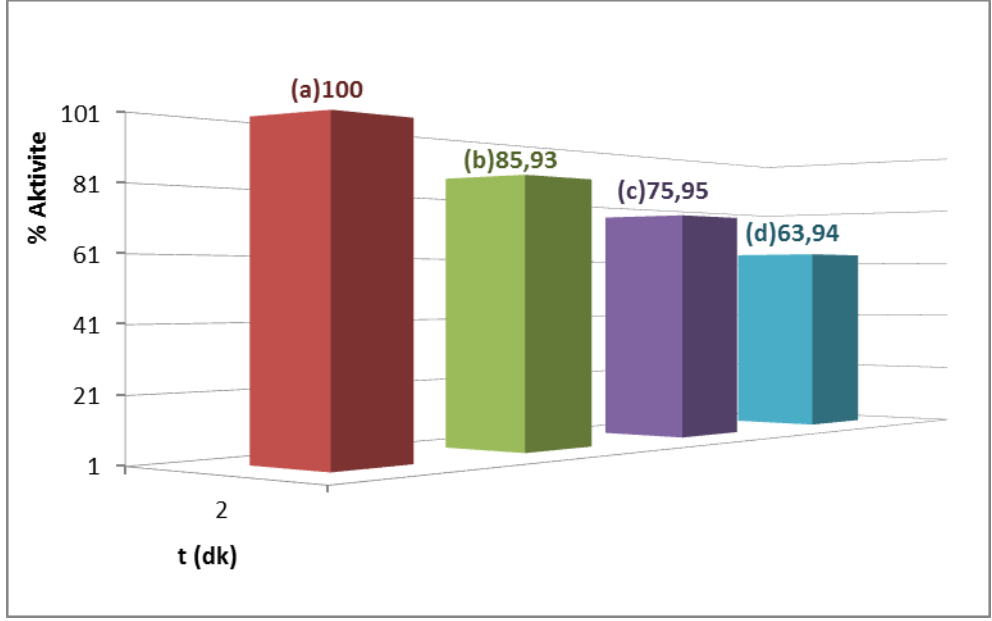
**Şekil 3.7:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (6); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.

**Tablo 3.5:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (5), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2/2,5-3 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

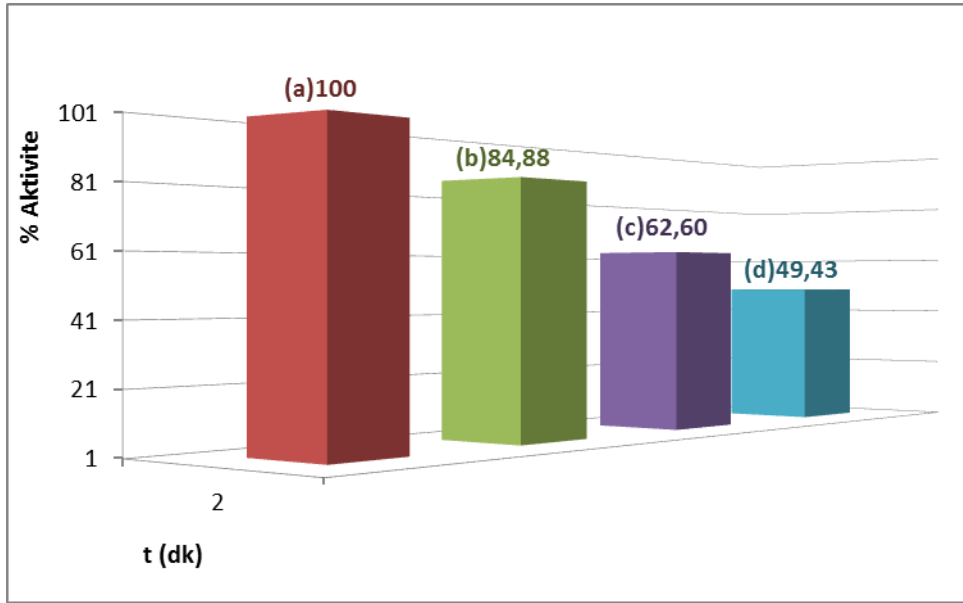
Örnek	(0-0,5 dk) Aralığı		(0,5-1 dk) Aralığı		(1-1,5 dk) Aralığı		(1,5-2 dk) Aralığı		(2-2,5 dk) Aralığı		(2,5-3 dk) Aralığı	
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)
Çiğ Süt	0,161	177,289	0,181	199,267	0,187	205,128	0,209	229,670	0,192	211,355	0,173	189,744
Çiğ Süt & n-butanol %2 & Santrifüj	0,112	123,626	0,156	171,429	0,162	178,022	0,178	195,604	0,160	176,374	0,158	173,626
Çiğ Süt & Aseton %2 & Santrifüj	0,075	82,418	0,144	158,791	0,150	165,385	0,15	164,835	0,151	166,483	0,145	159,890
Çiğ Süt & edta % 0,2 & Aseton %2 & Santrifüj	0,095	104,945	0,123	135,714	0,126	139,011	0,126	139,011	0,122	134,066	0,117	129,121

**Tablo 3.6:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (6), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2/2,5-3 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

Örnek	(0-0,5 dk) Aralığı		(0,5-1 dk) Aralığı		(1-1,5 dk) Aralığı		(1,5-2 dk) Aralığı		(2-2,5 dk) Aralığı		(2,5-3 dk) Aralığı	
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)
Çiğ Süt	0,150	165,385	0,151	166,483	0,155	170,330	0,152	167,582	0,157	172,527	0,191	209,890
Çiğ Süt & n-butanol %2 & Santrifüj	0,107	117,582	0,122	134,066	0,129	141,758	0,132	145,055	0,137	150,549	0,133	146,703
Çiğ Süt & Aseton %2 & Santrifüj	0,056	62,088	0,085	93,407	0,093	102,747	0,099	108,791	0,104	114,286	0,107	118,132
Çiğ Süt & edta % 0,2 & Aseton %2 & Santrifüj	0,050	54,945	0,067	74,176	0,073	80,220	0,079	86,813	0,080	88,461	0,084	92,857



**Şekil 3.8:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (7) t (1-2. dk); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.



**Şekil 3.9:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (8) t (1-2. dk); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: (a) çiğ süt, (b) çiğ süt & n-bütanol %2 & santrifüj, (c) çiğ süt & aseton %2 & santrifüj, (d) çiğ süt & EDTA % 0,2 & aseton %2 & santrifüj.

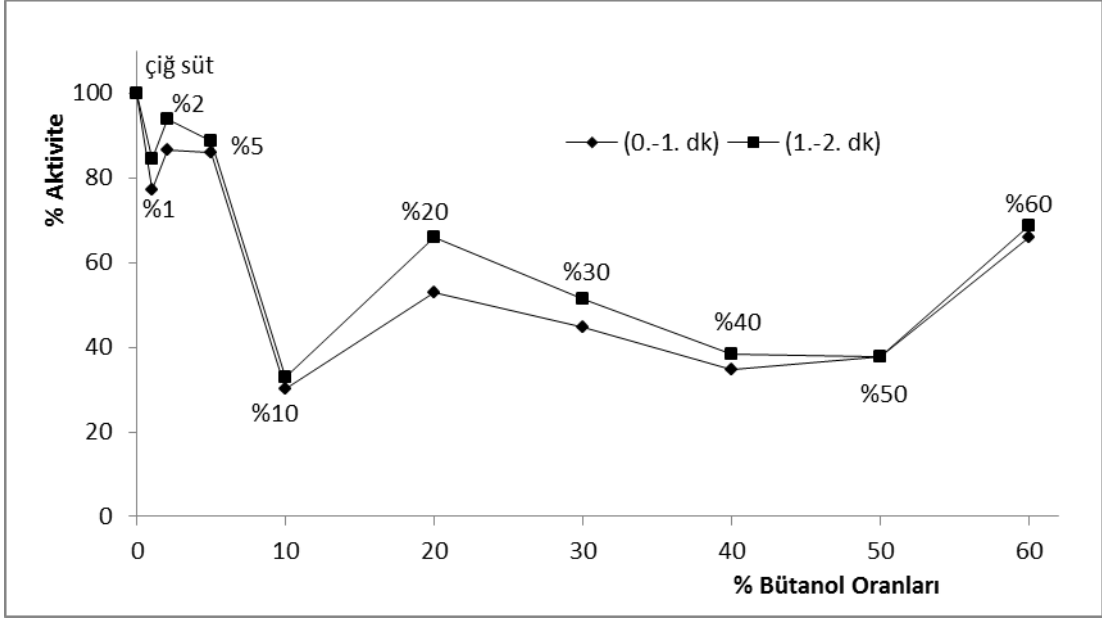


**Tablo 3.7:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (7), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

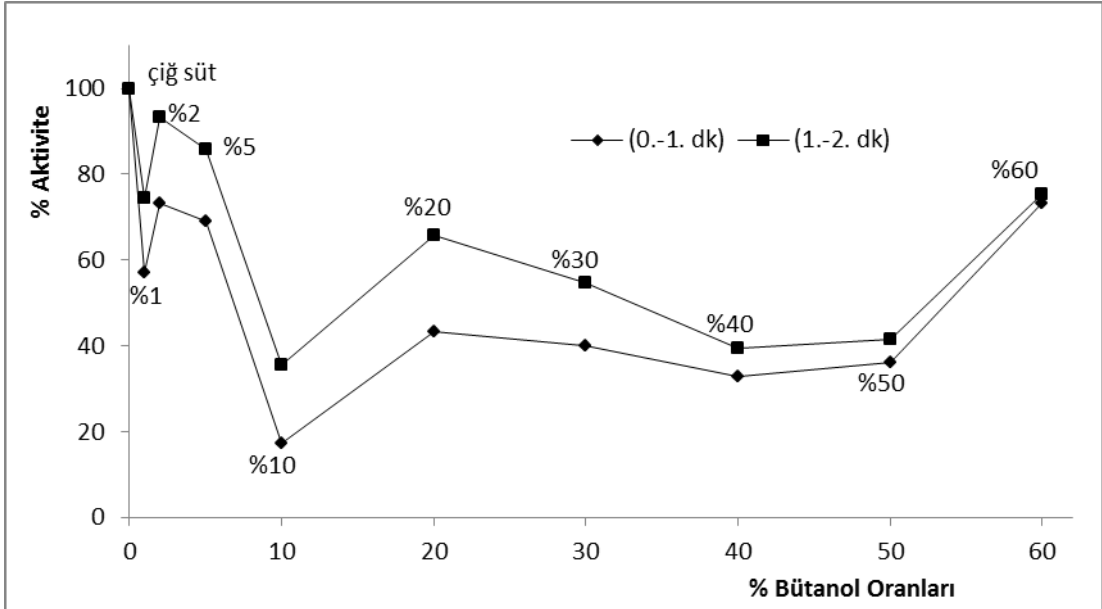
Örnek	0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,396	434,798	100
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,340	373,626	85,931
Çiğ Süt & aseton %2 & Santrifüj						0,300	330,220	75,948
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Aseton %2 & Santrifüj						0,253	278,022	63,943

**Tablo 3.8:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (8), kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (1.-2. dk) aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları.

Örnek	0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 25mM Tris Base pH:10 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	900	50	50	1	0,5	0,307	337,912	100
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj						0,261	286,813	84,878
Çiğ Süt & aseton %2 & Santrifüj						0,192	211,538	62,602
Çiğ Süt & EDTA % 0,2 & Aseton %2 & Santrifüj						0,152	167,033	49,431



**Şekil 3.10:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (9); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması



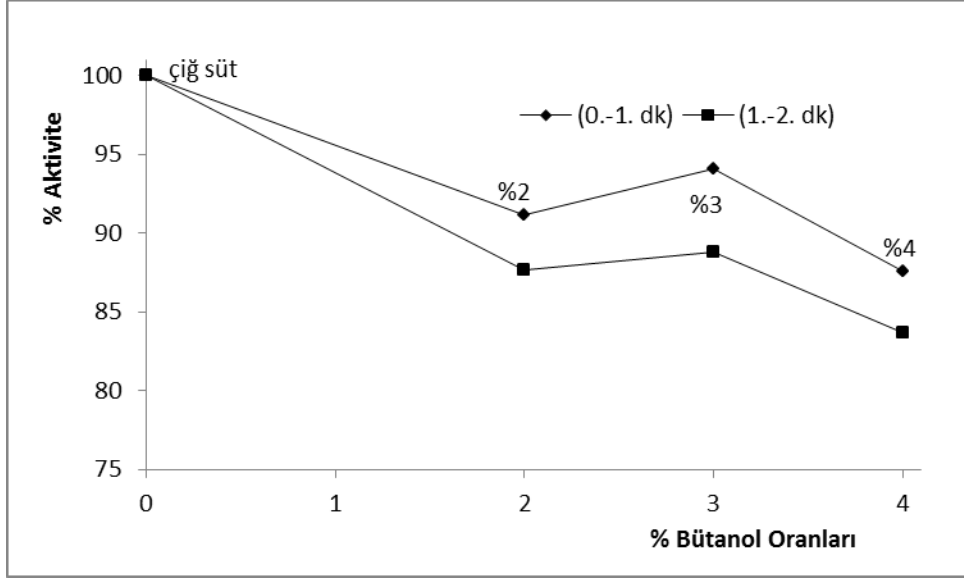
**Şekil 3.11:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (10); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması

**Tablo 3.9:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (9), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

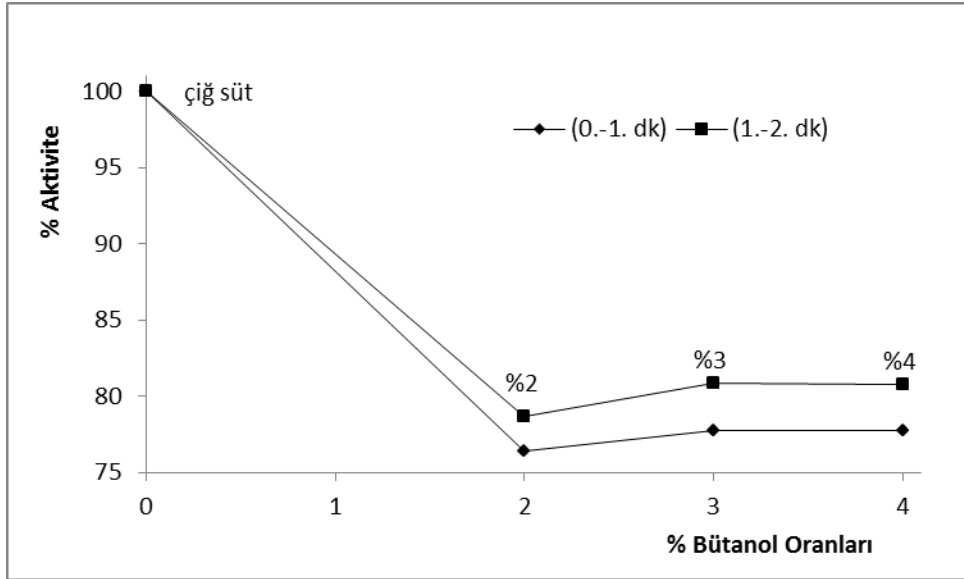
		% n-Bütanol Oranları									
		Çiğ Süt	1	2	5	10	20	30	40	50	60
t (0.-1.dk)	<b>ΔA (405nm)</b>	0,369	0,285	0,32	0,318	0,112	0,195	0,165	0,128	0,139	0,244
	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	406,044	313,736	351,648	349,450	123,077	214,286	181,868	141,209	153,297	267,765
	<b>% Aktivite</b>	100	77,267	86,603	86,062	30,311	52,774	44,790	34,777	37,754	65,945
t (1.-2.dk)	<b>ΔA (405nm)</b>	0,377	0,319	0,354	0,334	0,124	0,248	0,194	0,145	0,142	0,260
	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	414,835	350,549	389,011	367,582	136,264	273,077	213,187	159,341	156,593	285,348
	<b>% Aktivite</b>	100	84,503	93,775	88,609	32,848	65,828	51,391	38,411	37,748	68,786

**Tablo 3.10:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (10), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

		% n-Bütanol Oranları									
		Çiğ Süt	1	2	5	10	20	30	40	50	60
<b>t (0.-1.dk)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	0,332	0,19	0,243	0,229	0,057	0,144	0,133	0,109	0,12	0,243
	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	364,835	208,791	267,582	252,198	62,637	158,242	146,154	119,780	131,868	267,582
	<b>% Aktivite</b>	100	57,229	73,343	69,126	17,169	43,373	40,060	32,831	36,145	73,343
<b>t (1.-2.dk)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	0,308	0,229	0,287	0,264	0,109	0,203	0,168	0,121	0,127	0,232
	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	338,461	251,648	315,385	290,659	120,330	223,077	184,615	133,516	140,110	255,494
	<b>% Aktivite</b>	100	74,351	93,182	85,877	35,552	65,909	54,545	39,448	41,396	75,487



**Şekil 3.12:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (11); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivite değerlerinin karşılaştırılması



**Şekil 3.13:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (12); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivite değerlerinin karşılaştırılması

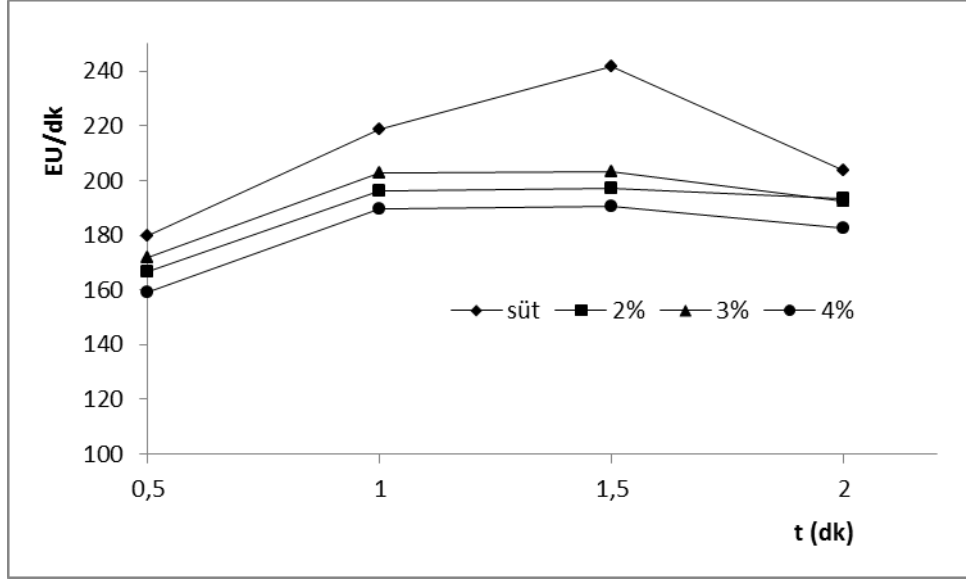
**Tablo 3.11:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (11), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

Örnek	t (0.-1. dk)			t (1.-2. dk)		
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	0,362	398,352	100	0,405	445,604	100
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj	0,330	363,004	91,126	0,355	390,476	87,628
Çiğ Süt & n-bütanol %3 & Santrifüj	0,341	374,725	94,069	0,360	395,604	88,779
Çiğ Süt & n-bütanol %4 & Santrifüj	0,317	348,718	87,540	0,339	372,894	83,683

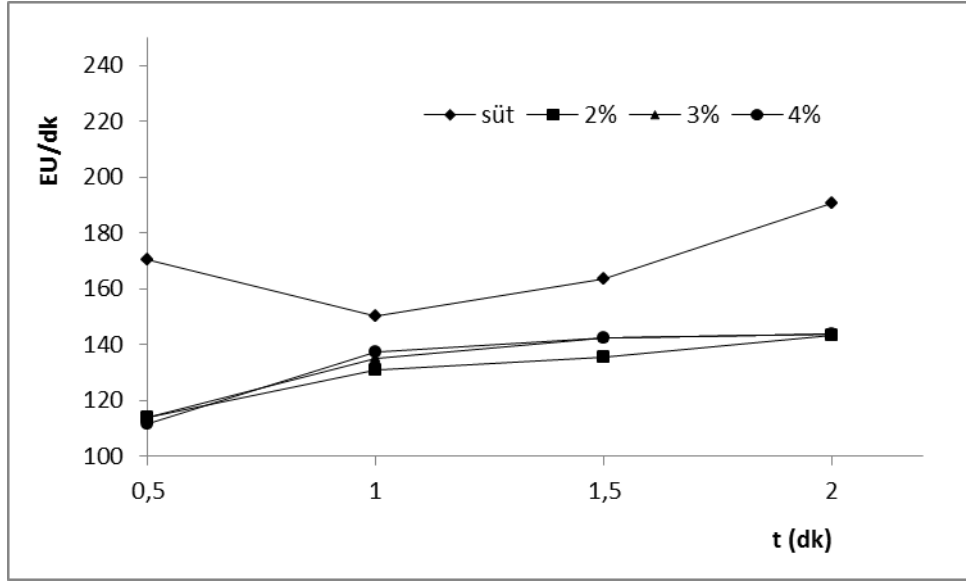
**Tablo 3.12:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (12), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-1/1-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

Örnek	t (0.-1. dk)			t (1.-2. dk)		
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
Çiğ Süt	0,291	320,330	100	0,322	354,396	100
Çiğ Süt & n-bütanol %2 & Santrifüj	0,223	244,689	76,386	0,254	278,755	78,656
Çiğ Süt & n-bütanol %3 & Santrifüj	0,227	249,084	77,759	0,261	286,447	80,827
Çiğ Süt & n-bütanol %4 & Santrifüj	0,226	248,901	77,701	0,260	286,264	80,775





**Şekil 3.14:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (13); 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 aktivite tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol (% 2,3,4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivite değerlerinin karşılaştırılması



**Şekil 3.15:** ALP enziminin süttten izolasyonunda ön saflaştırma basamakları (14); 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10 tamponu ile ölçülen aktivite değerleri: Farklı % n-bütanol (% 2,3,4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivite değerlerinin karşılaştırılması

**Tablo 3.13:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktivitelerinin karşılaştırılması (13), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

Örnek	t (0.-0,5. dk)		t (0,5.-1. dk)		t (1.-1,5. dk)		t (1,5.-2. dk)	
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)
Çiğ Süt	0,163	179,670	0,199	218,681	0,220	241,758	0,185	203,846
Çiğ Süt & n-butanol %2 & Santrifüj	0,152	166,67	0,179	196,337	0,179	197,070	0,176	193,407
Çiğ Süt & n-butanol %3 & Santrifüj	0,156	171,795	0,185	202,930	0,185	203,297	0,175	192,308
Çiğ Süt & n-butanol %4 & Santrifüj	0,145	158,974	0,173	189,744	0,173	190,476	0,166	182,418

**Tablo 3.14:** ALP enziminin farklı % n-bütanol (% 2, 3, 4) oranlarında homojenizasyon sonrası santrifüj ile elde edilen süpernatant aktiviteilerinin karşılaştırılması (14), bu değerlere karşılık gelen substrat, enzim konsantrasyonları ve t (0-0,5/0,5-1/1-1,5/1,5-2 dk) zaman dilimi aralıklarında elde edilen aktivite sonuçları. (Tampon: 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/25 mM Tris Base pH:10/900 µl; Substrat Çözeltisi: 50 µl; Enzim Çözeltisi: 50 µl; Toplam Küvet Hacmi: 1ml; Küvet Substrat Konsantrasyonu [S]: 0,5 mM.

Örnek	t (0.-0,5. dk)		t (0,5.-1. dk)		t (1.-1,5. dk)		t (1,5.-2. dk)	
	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)
Çiğ Süt	0,155	170,330	0,136	150,000	0,149	163,736	0,173	190,659
Çiğ Süt & n-butanol %2 & Santrifüj	0,104	113,919	0,119	130,769	0,123	135,531	0,130	143,223
Çiğ Süt & n-butanol %3 & Santrifüj	0,104	113,919	0,123	135,165	0,130	142,491	0,131	143,956
Çiğ Süt & n-butanol %4 & Santrifüj	0,101	111,538	0,125	137,363	0,129	142,308	0,131	143,956

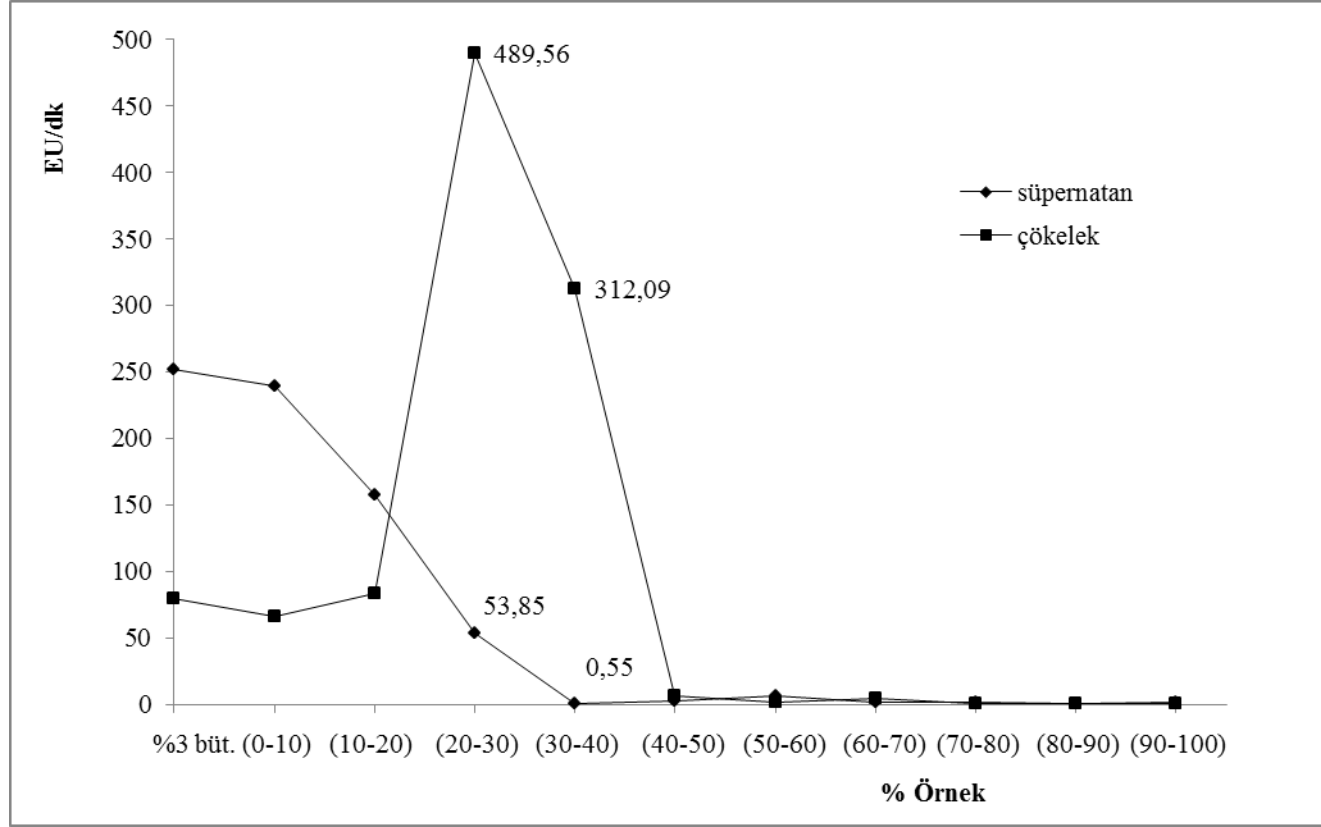
- Çiğ süttten ALP'nin ayrılması için ön saflaştırma basamaklarında, EDTA ile muamele ve kazein çöktürmenin yanısıra n-bütanol, toluen ve aseton gibi organik çözücüler ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm süpernatant enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, enzim aktivitelerinin bütanol ekstraksiyonuna oranla düşük çıktığı gözlemlendi.
- Sonraki adımlar için ALP enziminin, lipoprotein partiküllerinden ayrılmasında n-bütanol organik çözücü olarak kullanıldı.
- Çiğ süt, bütanol ile sırasıyla (% 0,1,2,3,4,5,10,20---60) farklı oranlarda muamele edildi ve yapılan deneyler sonucu en yüksek ALP aktivitesi %3 bütanol oranında gözlemlendi.
- Sodyum karbonat tamponu ile yapılan aktivite ölçümlerinde, sodyum sülfat tamponuna göre daha yüksek enzim aktivitesi gözlemlendi.

### 3.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralıklarının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığını belirlemek için; Tablo 3.15'de belirtilen hacimlere yine Tablo 3.15'de verilen amonyum sülfat miktarları 0°C'de eklenmiştir. 30 dakika manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak eklenen amonyum sülfatın çözünmesi sağlanarak, 15000 rpm / 30dk / +4°C'de santrifüj edildi. Her bir aralıkta amonyum sülfat ilave edilmeden süpernatandan 1 ml ayrıldı. Tuz çöktürme sonrası elde edilen çökelekler de minimum hacimde 100 mM karbonat tamponunda (pH:10) çözülerek ölçülen süpernatant ve çökelek aktiviteleri karşılaştırıldı (Tablo 3.16).

**Tablo 3.15:** Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Çöktürme Aralığı	Hacim (ml)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)
0-10	90,0	4,631
10-20	87,0	4,610
20-30	86,5	4,725
30-40	79,0	4,453
40-50	73,0	4,250
50-60	69,0	4,154
60-70	67,0	4,176
70-80	64,5	4,167
80-90	62,0	4,157
90-100	57,5	4,007



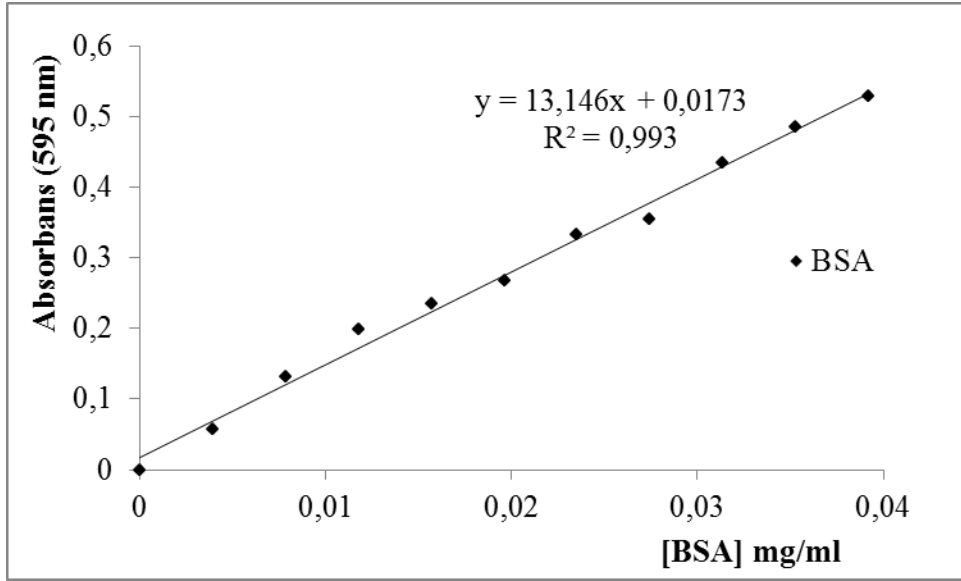
**Şekil 3.16:** ALP enziminin %3 n-bütanol ile homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant kullanılarak  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürme aralıklarının tespit edilmesi t(1.-2. dk)

**Tablo 3.16:** ALP enziminin %3 n-bütanol ile homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant kullanılarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme aralıklarının tespit edilmesi t(1.-2. dk) / 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, sırasıyla tampon-substrat-enzim (900 $\mu$ l-50 $\mu$ l-50 $\mu$ l) hacimleri kullanılarak elde edilen enzim aktivite sonuçları

		<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math> Çöktürme Aralığı</b>											
		<b>%3 bütanol süpernatant</b>	<b>(0-10)</b>	<b>(10-20)</b>	<b>(20-30)</b>	<b>(30-40)</b>	<b>(40-50)</b>	<b>(50-60)</b>	<b>(60-70)</b>	<b>(70-80)</b>	<b>(80-90)</b>	<b>(90-100)</b>	
<b>t (1.-2.dk)</b>	<b>Süpernatant</b>	<b><math>\Delta A</math> (405nm)</b>	0,230	0,218	0,143	0,049	0,0005	0,003	0,006	0,0015	0,0015	0,001	0,002
		<b>Aktivite (EU/dk)</b>	252,381	239,560	157,692	53,846	0,549	3,297	6,593	1,648	1,648	1,099	2,198
	<b>Çökelek</b>	<b><math>\Delta A</math> (405nm)</b>	0,073	0,060	0,076	0,445	0,284	0,006	0,002	0,004	0,001	0,001	0,001
		<b>Aktivite (EU/dk)</b>	80,220	66,483	83,150	489,560	312,088	6,593	2,198	4,396	1,099	1,099	1,099

### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Jel filtrasyon kromatografisi sonunda elde edilen en yüksek aktiviteli tüp ve ön saflaştırma basamaklarından elde edilen numuneler için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı (Tablo 3.17). Ölçülen aktivite değerleri de kullanılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi (Tablo 3.18, 3.19). Organik çözücü ile homojenizasyon işlemi ve herbir saflaştırma basamağı sonucunda elde edilen enzim çözeltilerinin protein miktarları, Bradford çözeltisi (Bovine Serum Albümin (BSA) 2mg/ml) kullanılarak elde edilen standart eğrilere göre belirlendi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

**Tablo 3.17:** Bradford yöntemi ile 595 nm'de belirtilen hacimlere göre ölçülen absorbans değerleri ve grafikten hesaplanan protein miktarları

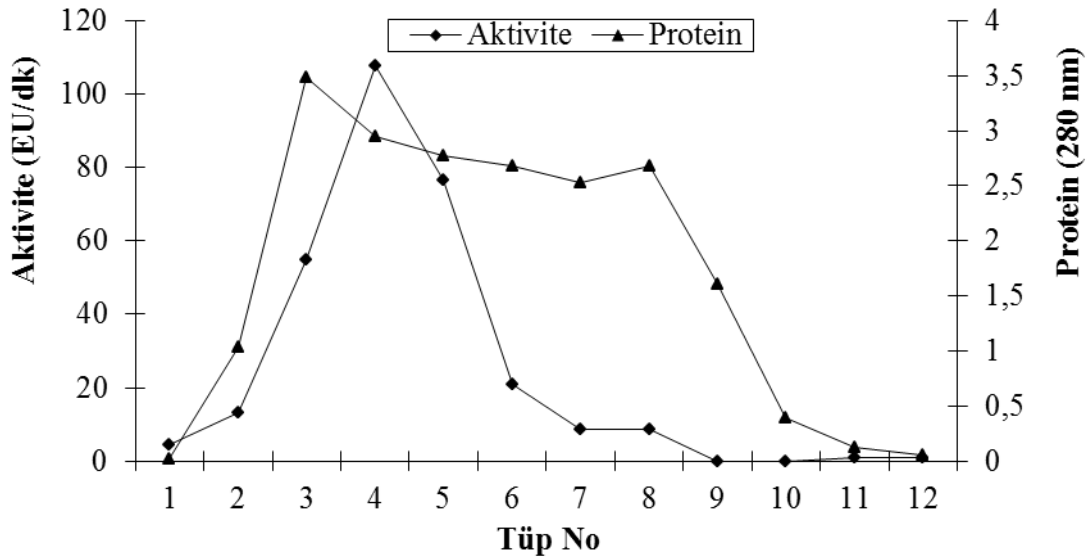
V	mg/ml	$\Delta A$ (595 nm)
0	0	0
10	0,003922	0,058
20	0,007843	0,132
30	0,011765	0,198
40	0,015686	0,235
50	0,019608	0,267
60	0,023529	0,333
70	0,027451	0,355
80	0,031373	0,434
90	0,035294	0,485
100	0,039216	0,529

Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı (Tablo 3.17). Seyreltilmiş, diyaliz uygulanmış çökelek ve maya numunelerine ait ölçülen aktivite değerleri kullanılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi (Tablo 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22). Organik çözücü ile homojenizasyon işlemi ve herbir saflaştırma basamağı sonucunda elde edilen enzim çözeltilerinin protein miktarları, Bradford çözeltisi (Bovine Serum Albumin (BSA) 2mg/ml) kullanılarak elde edilen standart eğriye göre belirlendi (Şekil 3.17).

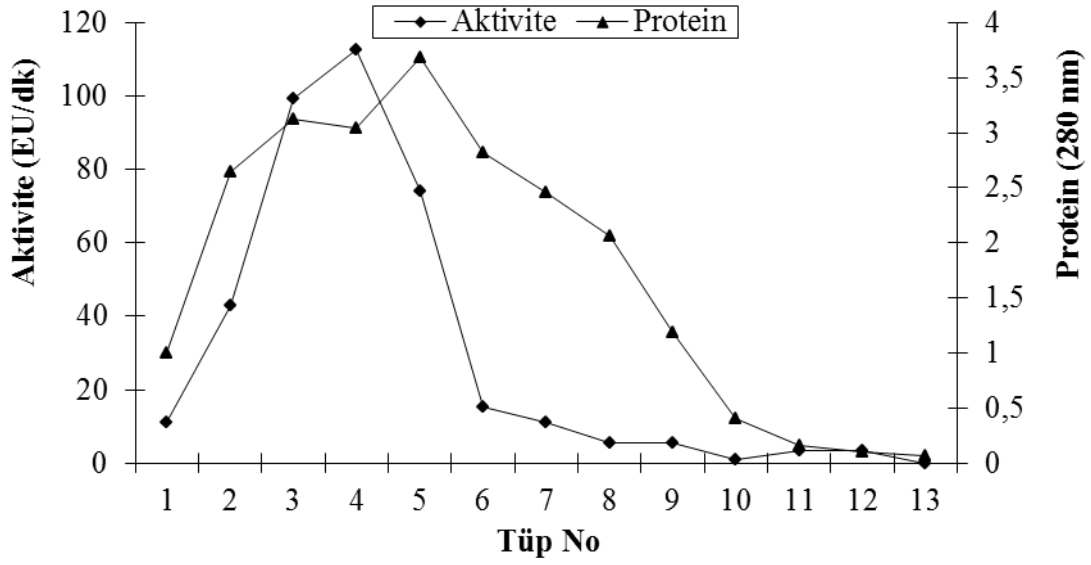


### 3.1.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

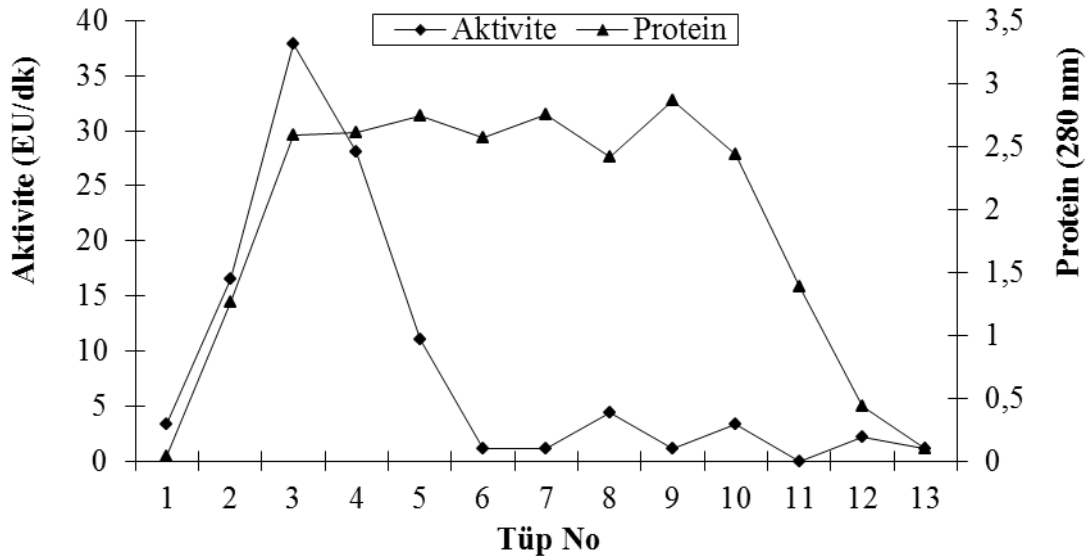
Bölüm 2.2.1.4'de belirtilen kromatografik yöntem için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu 0,1 M Tris-Base pH:10,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Farklı enzim çözeltileri kolona tatbik edilerek aynı tampon ile numuneler kolondan molekül büyüklüklerine göre 2 ml'lik fraksiyonlar halinde elüye edildi. 0,1 M Tris-Base pH:10,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 405 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.18-3.22).



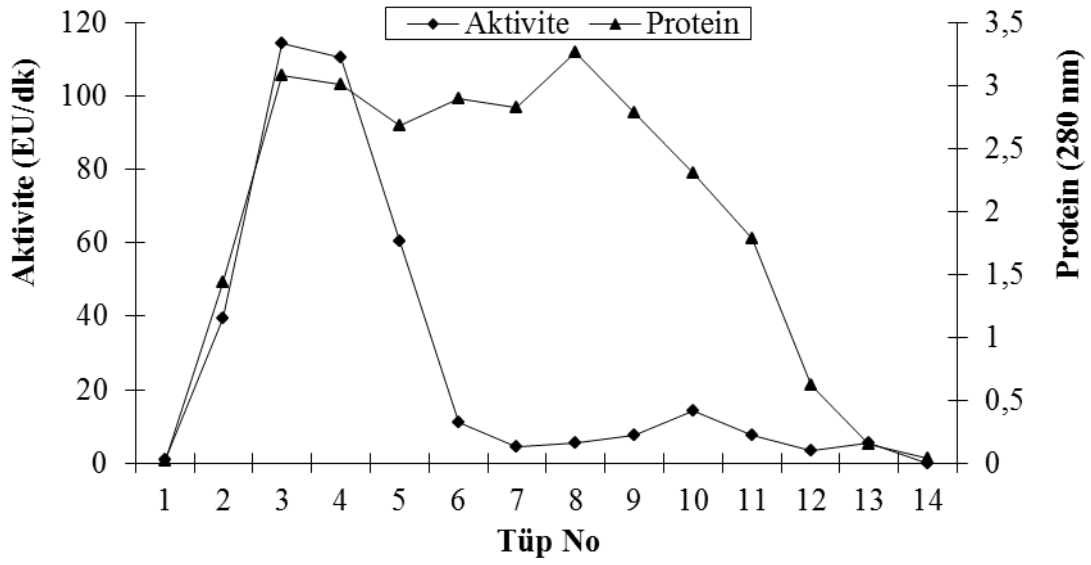
**Şekil 3.18:** Diyaliz edilen çökeleğin jel filtrasyonundan geçirilmesiyle elde edilen enzimin elüsyon grafiği



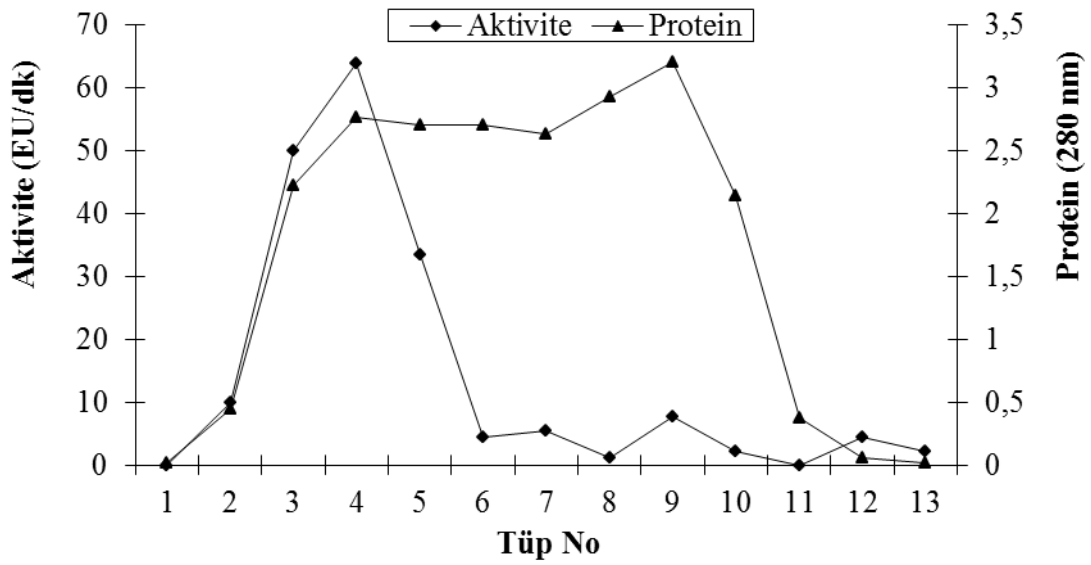
**Şekil 3.19:** Diyaliz edilen çökeleğin 0,1 mM Mg<sup>+2</sup> ilavesi sonrası jel filtrasyonundan geçirilmesiyle elde edilen enzimin elüsyon grafiği



**Şekil 3.20:** Sütün mayalanma & % 3 bütanol ile homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği



Şekil 3.21: Sütün % 3 bütanol homojenizasyonu & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği



Şekil 3.22: Sütün santrifüj & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen enzime ilişkin elüsyon grafiği

**Tablo 3.18:** % 20-40 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile elde edilen ALP enzimine **diyaliz** ve JFK basamaklarının uygulanması sonucu oluşturulan saflaştırma tablosu- % 20-40 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi sonucu oluşan çökelek 0,1M pH:10 Tris-Base tamponunda çözülüp Sephadex G-100 den geçirildi. Çökelek 11,5ml tamponda çözüldü, toplam çökelek hacmi 13,5ml (Tampon: 0,1M T-Base pH:10). Her bir basamağa ait (1.-2. dk) aralıklarında ölçülen enzim aktiviteleri dikkate alındı.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	30	172,527	5175,824	0,638	19,135	270,488	100	-
%3 Bütanol Süpernatant	24	150,549	3613,186	0,238	5,723	631,299	69,809	2,334
%20-40 çökelek	6,25	315,385	1971,154	0,417	2,608	755,888	38,084	2,794
Çökelek diyaliz	6	191,209	1147,253	0,337	2,024	566,771	22,166	2,095
JFK	2	54,945	109,890	0,025	0,051	2156,142	2,123	7,971

**Tablo 3.19:** % 20-40 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile elde edilen ALP enzimine **diyaliz & Mg<sup>+2</sup>** (0,1 mM) ve JFK basamaklarının uygulanması sonucu oluşturulan saflaştırma tablosu- % 20-40 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi sonucu oluşan çökelek 0,1M pH:10 Tris-Base tamponunda çözülüp Sephadex G-100 den geçirildi. Çökelek 11,5ml tamponda çözüldü, toplam çökelek hacmi 13,5ml (Tampon: 0,1M T-Base pH:10). Her bir basamağa ait (1.-2. dk) aralıklarında ölçülen enzim aktiviteleri dikkate alındı.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	30	172,527	5175,824	0,638	19,135	270,488	100	-
%3 Bütanol Süpernatant	24	150,549	3613,186	0,238	5,723	631,299	69,809	2,334
%20-40 çökelek	6,25	315,385	1971,154	0,417	2,608	755,888	38,084	2,794
Çökelek diyaliz	6	196,154	1176,923	0,383	2,298	512,143	22,739	1,893
JFK	2	103,297	206,593	0,025	0,051	4053,547	3,991	14,986

**Tablo 3.20:** Çiğ sütün mayalanma & % 3 bütanol ile homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	50	130,220	6510,988	0,910	45,518	143,043	100	-
Mayalama	29	61,538	1784,615	0,052	1,500	1189,683	27,409	8,317
%3 Bütanol Süpernatana	6	31,868	191,209	0,035	0,213	897,084	2,937	6,271
JFK	2	32,418	64,835	0,026	0,053	1228,131	0,996	<b>8,586</b>

**Tablo 3.21:** Çiğ sütün % 3 bütanol homojenizasyonu & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu

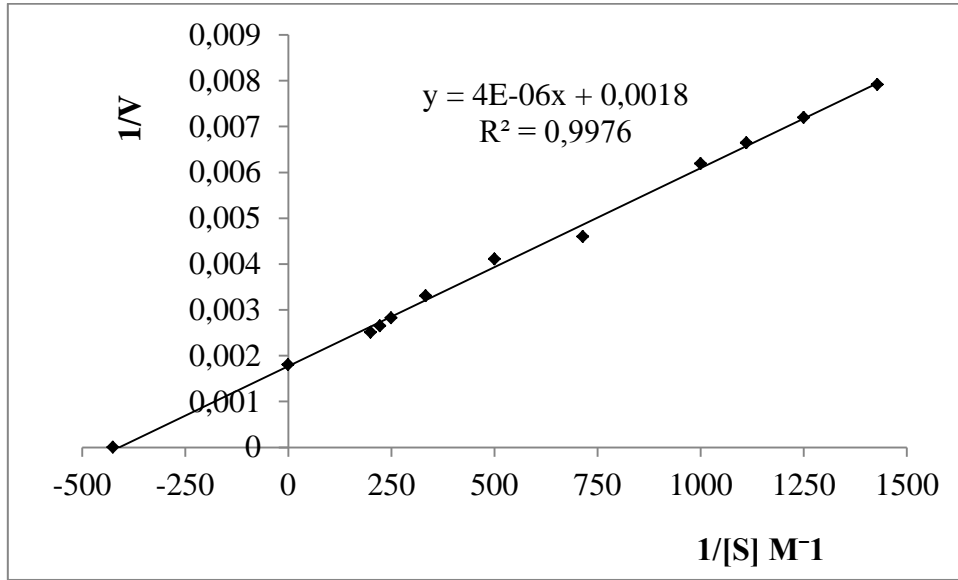
Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	50	129,670	6483,516	0,922	46,088	140,676	100	-
%3 Bütanol Süpernatana	40,5	131,868	5340,659	0,412	16,690	319,989	82,373	2,275
Mayalama	6	112,088	672,527	0,038	0,227	2964,804	10,373	21,075
JFK	2	112,637	225,275	0,015	0,030	7516,399	3,475	<b>53,430</b>

**Tablo 3.22:** Çiğ sütün santrifüj & mayalanma sonrası elde edilen süpernatana JFK işlemi uygulanması sonucu elde edilen örneğe ilişkin saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Toplam Aktivite (EU)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	50	130,769	6538,461	0,868	43,426	150,566	100	-
Santrifüj	42	60,989	2561,538	0,503	21,142	121,158	39,176	0,805
Mayalama	6	54,945	329,670	0,034	0,204	1615,901	5,042	10,732
JFK	2	47,253	94,505	0,004	0,009	10897,970	1,445	<b>72,380</b>

### 3.2 Optimum Şartlarda Km ve Vmax Değerlerinin Bulunması

K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla, optimum şartlarda p-nitrofenil fosfat substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki kere tekrarlanarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 405 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (EU/dakika) olarak alındı. 1/V ve 1/S değerleri hesaplanarak Linaweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.23). Grafikten yararlanarak K<sub>M</sub> değeri 2,27 mM ve V<sub>max</sub> değeri 555,56 EU/dk olarak bulundu.

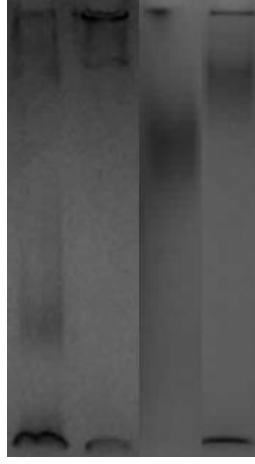


**Şekil 3.23:** Saflaştırılmış süt Alkalen Fosfataz enziminin p-nitrofenil fosfat substratı ile elde edilen Linaweaver-Burk grafiği

**Tablo 3.23:** Saflaştırılmış süt ALP enziminin p-nitrofenil fosfat substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Substrat Çözeltisi Hacim (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (M)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	1/V	1/[S] (M <sup>-1</sup> )
880		70		0,0007	0,115	126,3736	0,007913	1428,571
870		80		0,0008	0,1265	139,011	0,007194	1250
860		90		0,0009	0,137	150,5494	0,006642	1111,111
850		100		0,001	0,147	161,5384	0,00619	1000
810	50	140	1	0,0014	0,198	217,5824	0,004596	714,2857
750		200		0,002	0,2215	243,4066	0,004108	500
650		300		0,003	0,2755	302,7472	0,003303	333,3333
550		400		0,004	0,3225	354,3956	0,002822	250
500		450		0,0045	0,344	378,0219	0,002645	222,2222
450		500		0,005	0,363	398,9011	0,002507	200

### 3.3 Amonyum Sülfat Çöktürme Sonrası ve Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılan Çökeleğin Doğal Jel Elektroforezi

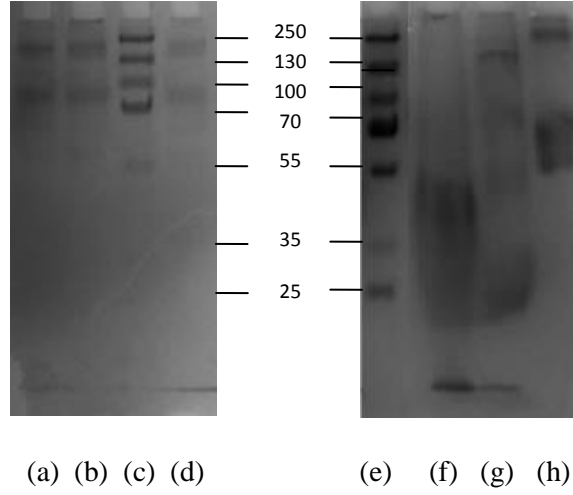


(a) (b) (c) (d)

**Şekil 3.24:** Süt Alkalen Fosfataz enziminin doğal jel elektroforezi- (a) Amonyum sülfat çöktürme sonrası elde edilen çökelek (numune tamponu/örnek – 1/1), (b) Çökeleğin jel filtrasyon kromatografisinden geçirilmesiyle elde edilen örnek (numune tamponu/örnek – 1/1), (c) saf ALP (160 kDa), (d) organik çözücü ile homojenizasyonu takiben mayalanan süpernatana JFK uygulanması ile elde edilen enzim (numune tamponu/örnek – 1/2)



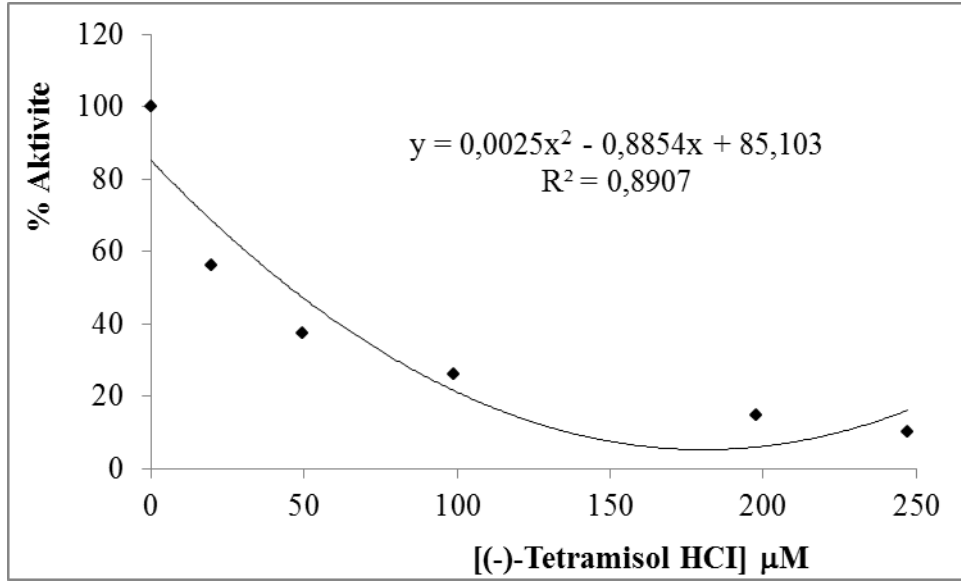
### 3.4 Sütün Mayalanması ile Elde Edilen Alkalen Fosfatazın SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi



**Şekil 3.25:** Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan süt Alkalen Fosfataz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi- (a) santrifüj edilip mayalandıktan sonra elde edilen JFK numunesi, (b) organik çözücü ile homojenizasyonu takiben mayalanan süpernatana JFK uygulanması ile elde edilen numune, (c) marker, (d) mayalama işlemini takiben organik çözücü ile homojenizasyonu sonrası süpernatana JFK uygulanması sonucu elde edilen numune, (e) marker, (f) % 20-40 çökelek, (g) Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna uygulanan çökelek, (h) saf ALP (160 kDa) (a,b,d, f, g - numune tamponu/örnek – 1/2)

### 3.5 Veteriner İlaçların IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

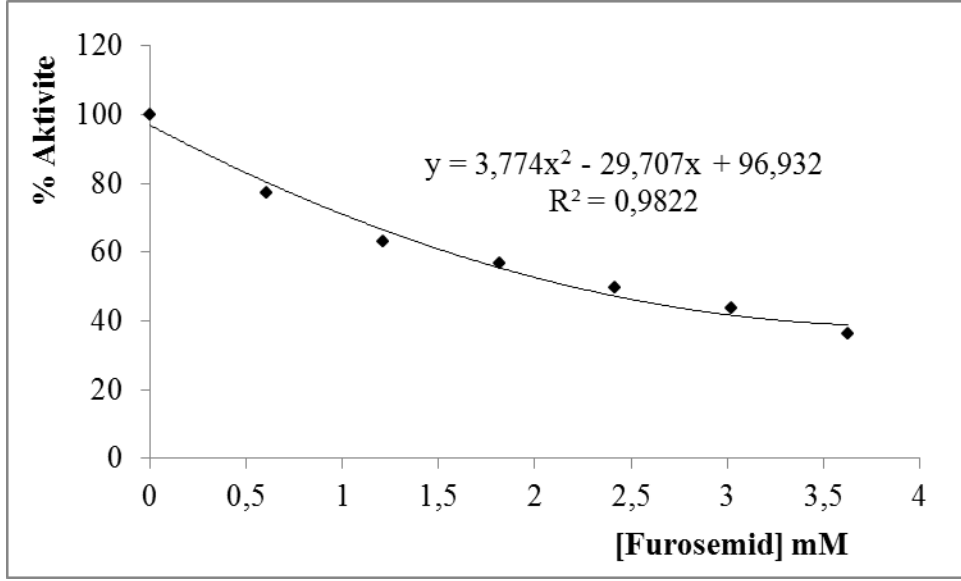
Çalışmamızda kullandığımız veteriner ilaçların IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, optimum şartlarda p-nitrofenil fosfat substratının 0,5 mM küvet konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisinden her ölçümde 0,05 ml p-nitrofenil fosfat alındı ve ilaçların çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,0 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan tampon + substrat + veteriner ilaç çözeltisine eklenerek 405 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak kullanılan ve inhibisyonun gözlemlendiği her bir ilaç için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.



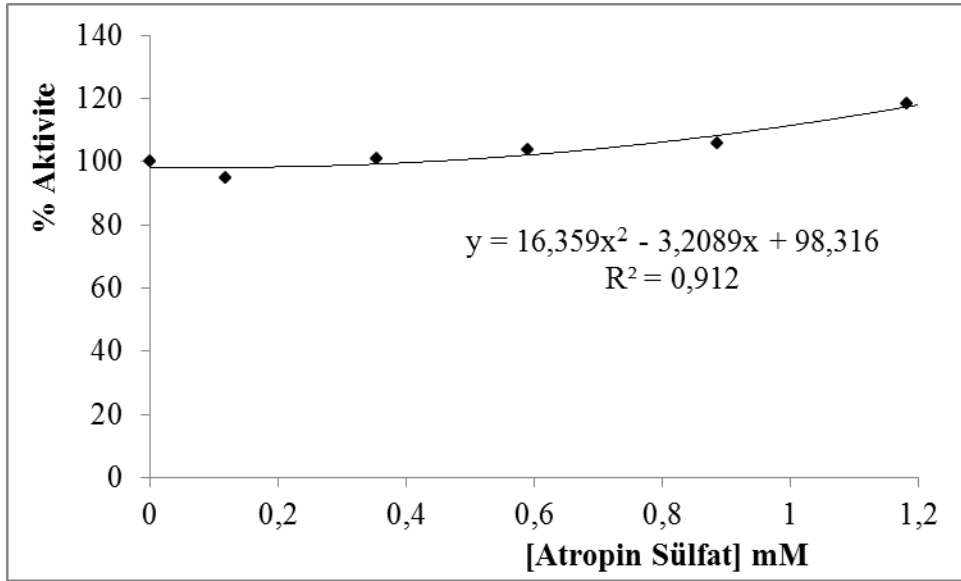
**Şekil 3.26:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda (-)- Tetramisol HCl için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.42:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, (-)-Tetramisol HCl etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat Çözeltisi (µl)</b>	<b>Enzim Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (µM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
950	50	50	1,05	0,5	-	0	0,291	335,769	100
930					20	19,771	0,163	188,654	56,186
900					50	49,429	0,108	125,192	37,285
800					100	98,857	0,076	87,692	26,117
750					200	197,714	49,615	14,777	197,714
700					250	247,143	34,038	10,137	247,143



**Şekil 3.27:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Furosemid için % aktivite-[I] grafiği



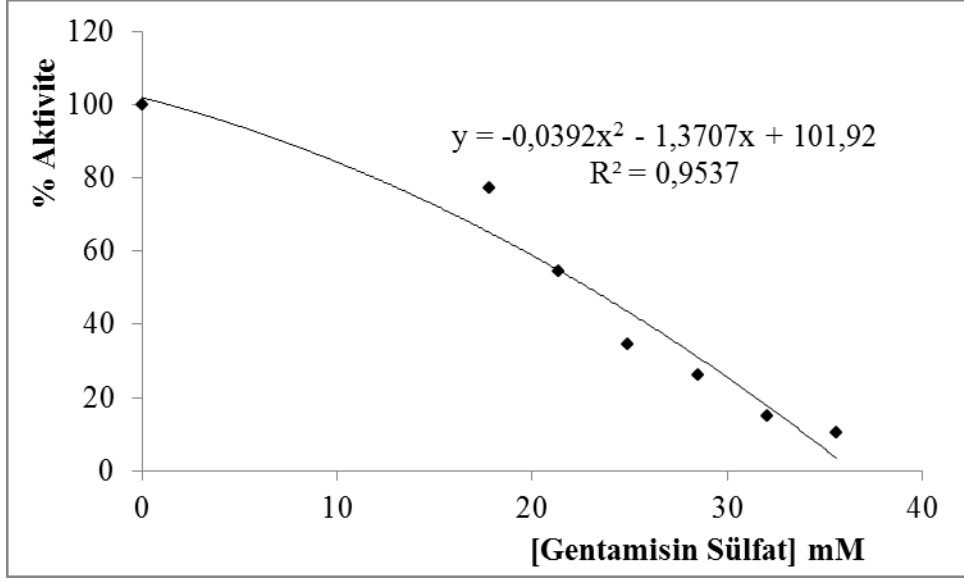
**Şekil 3.28:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Atropin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.24:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Furosemid etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

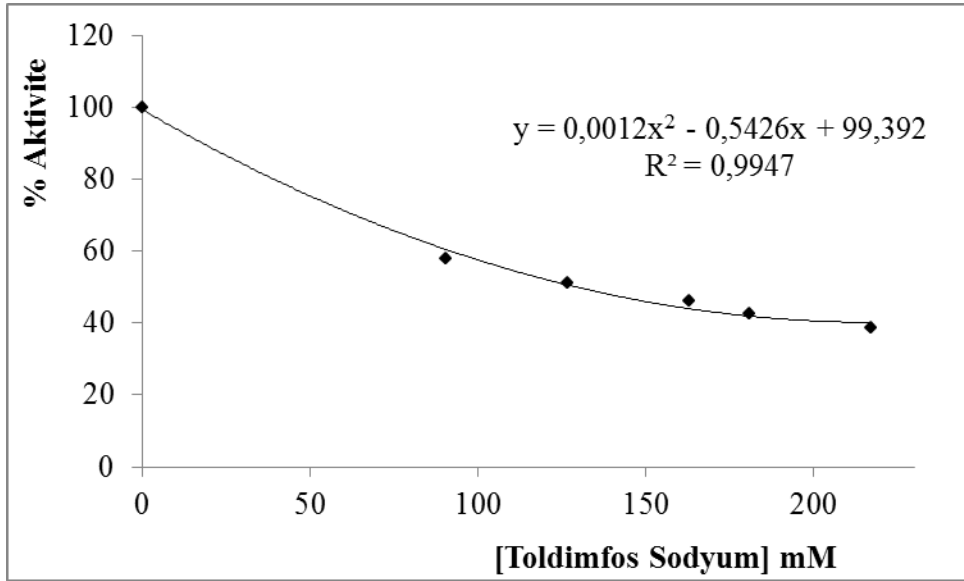
0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çözeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,100	110,440	100
880					20	0,605	0,077	85,165	77,114
860					40	1,209	0,063	69,780	63,184
840					60	1,814	0,057	62,637	56,716
820					80	2,419	0,050	54,945	49,751
800					100	3,023	0,044	48,352	43,781
780					120	3,629	0,036	40,110	36,318

**Tablo 3.25:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Atropin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan zelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)	Substrat zeltisi (μl)	Enzim zeltisi (μl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör zeltisi (μl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,104	114,286	100
860					40	0,118	0,099	108,242	94,7115
780					120	0,355	0,105	115,385	100,961
700					200	0,591	0,108	118,681	103,847
600					300	0,887	0,110	120,880	105,770
500					400	1,182	0,123	135,165	118,270



**Şekil 3.29:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Gentamisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.30:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda Toldimfos Sodyum için % aktivite-[I] grafiği

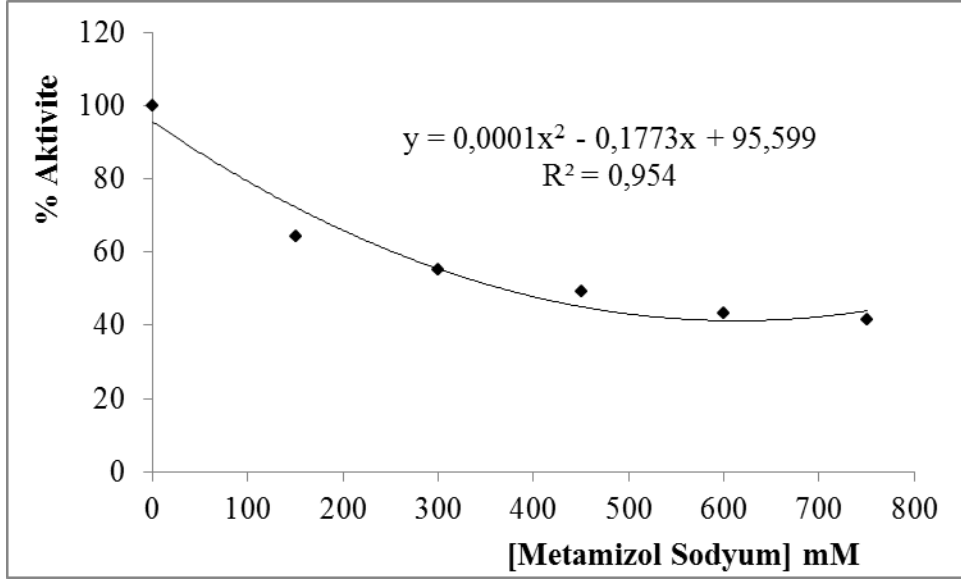
**Tablo 3.26:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Gentamisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çözeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,120	132,418	100
800					100	17,805	0,093	102,198	77,178
780					120	21,366	0,065	71,978	54,357
760					140	24,927	0,041	45,604	34,440
740					160	28,488	0,031	34,615	26,141
720					180	32,049	0,018	19,780	14,938
700					200	35,610	0,012	13,736	10,373

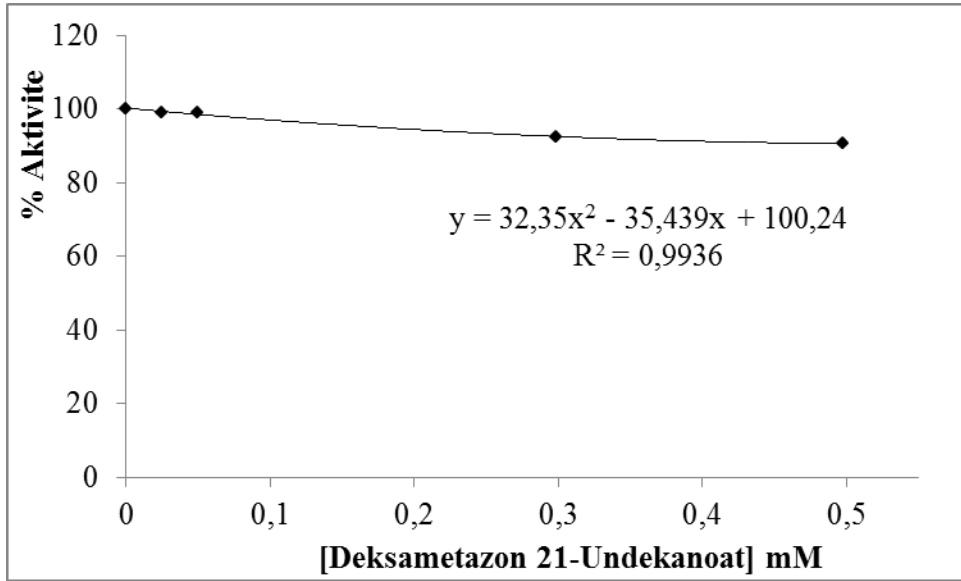


**Tablo 3.27:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Toldimfos Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat zeltisi (µl)	Enzim zeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör zeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,109	120,330	100
800					100	90,429	0,063	69,780	57,991
760					140	126,600	0,056	61,538	51,141
720					180	162,771	0,050	55,494	46,119
700					200	180,857	0,046	51,099	42,466
660					240	217,029	0,042	46,703	38,813



**Şekil 3.31:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Metamizol Sodyum için % aktivite-[I] grafiği



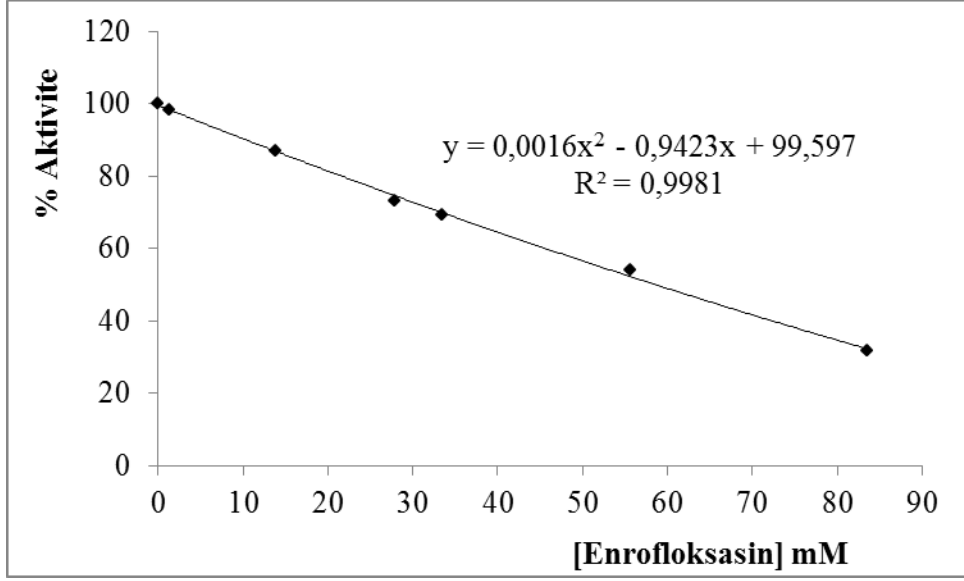
**Şekil 3.32:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Deksametazon 21-Undekanoat için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.28:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat k¼vet konsantrasyonunda, Metamizol Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan ¼zelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibit¼r konsantrasyonları ve elde edilen sonu¼lar

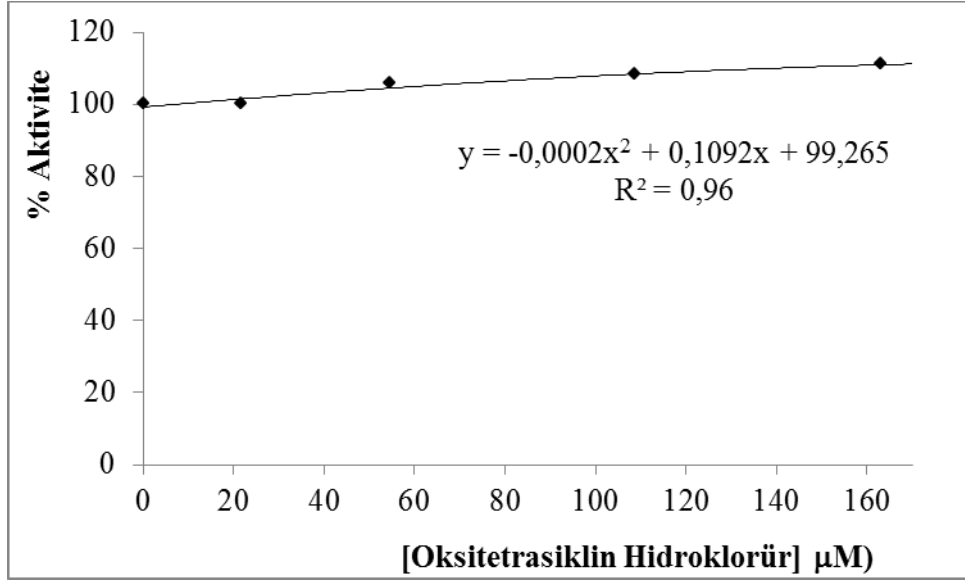
0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat ¼zeltisi (µl)	Enzim ¼zeltisi (µl)	K¼vetteki Toplam Hacim (ml)	K¼vetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibit¼r ¼zeltisi (µl)	K¼vetteki İnhibit¼r Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,112	123,077	100
800					100	149,997	0,072	79,121	64,286
700					200	299,995	0,062	68,132	55,357
600					300	449,992	0,055	60,440	49,107
500					400	599,990	0,048	53,297	43,304
400					500	749,987	0,046	51,099	41,518

**Tablo 3.29:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Deksametazon 21-Undekanoat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)</b>	<b>Substrat zeltisi (μl)</b>	<b>Enzim zeltisi (μl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör zeltisi (μl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,118	129,670	100
895					5	0,025	0,117	128,571	99,153
890					10	0,050	0,117	128,571	99,153
840					60	0,298	0,109	119,780	92,373
800					100	0,497	0,107	117,582	90,678



**Şekil 3.33:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Enrofloksasin için % aktivite-[I] grafiği



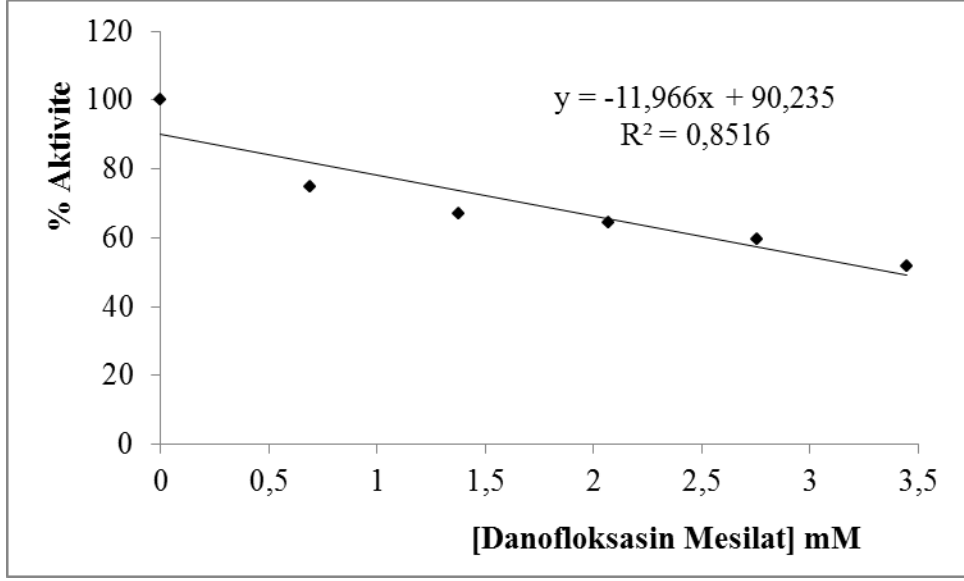
**Şekil 3.34:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Oksitetrasiklin Hidroklorür için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.30:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Enrofloksasin etkisinin incelenmesinde kullanılan zelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

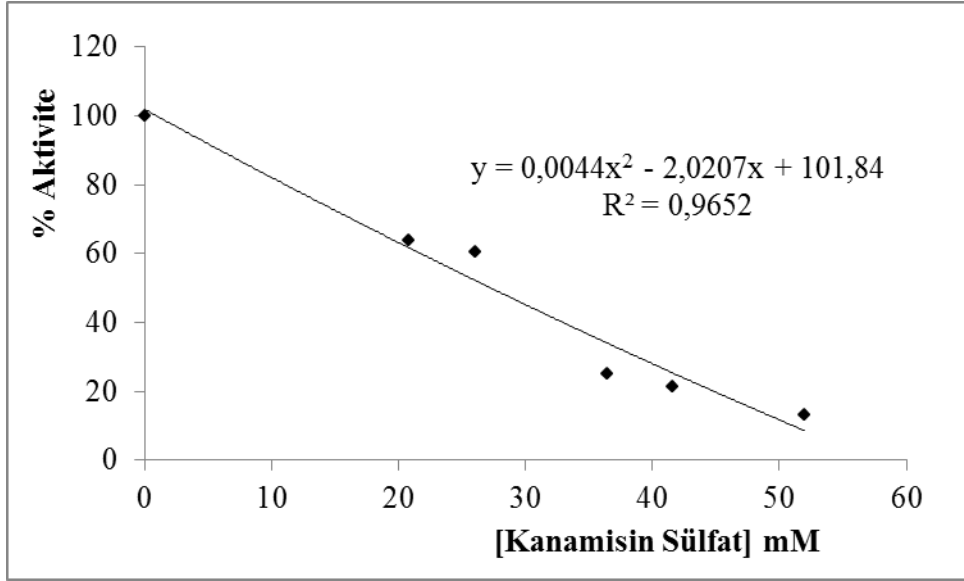
0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat zeltisi (µl)	Enzim zeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör zeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,120	131,868	100
895					5	1,391	0,118	129,670	98,333
850					50	13,912	0,104	114,835	87,083
800					100	27,824	0,088	96,703	73,333
780					120	33,389	0,083	91,209	69,167
700					200	55,649	0,065	71,429	54,167
600					300	83,473	0,038	41,758	31,667

**Tablo 3.31:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Oksitetrasiklin Hidroklorür etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat Çözeltisi (µl)</b>	<b>Enzim Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (µM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,109	119,780	100
880					20	21,740	0,109	119,780	100
850					50	54,350	0,115	126,374	105,505
800					100	108,700	0,118	129,670	108,257
750					150	163,050	0,121	132,967	111,009



**Şekil 3.35:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Danofloksasin Mesilat için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.36:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Kanamisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği

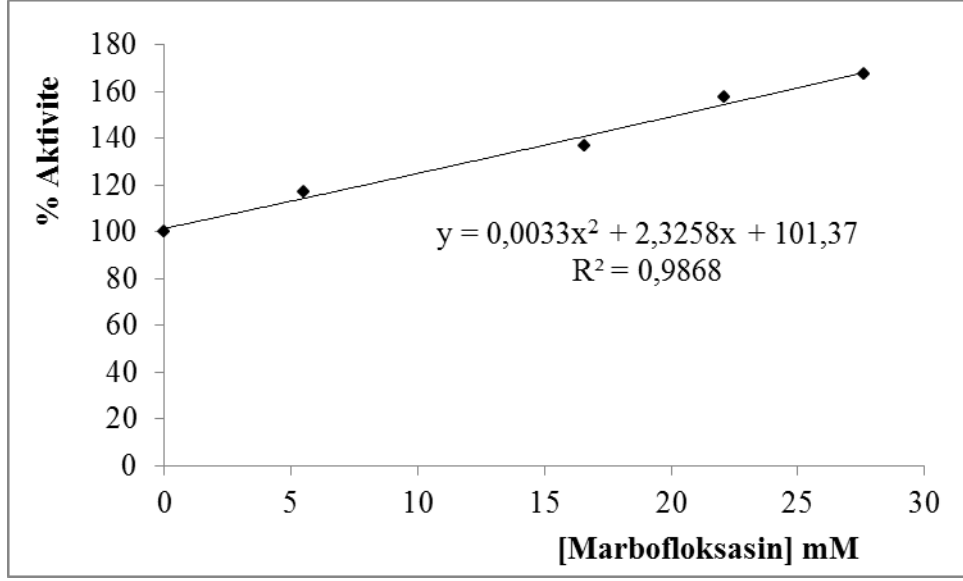


**Tablo 3.32:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Danofloksasin Mesilat etkisinin incelenmesinde kullanılan czelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

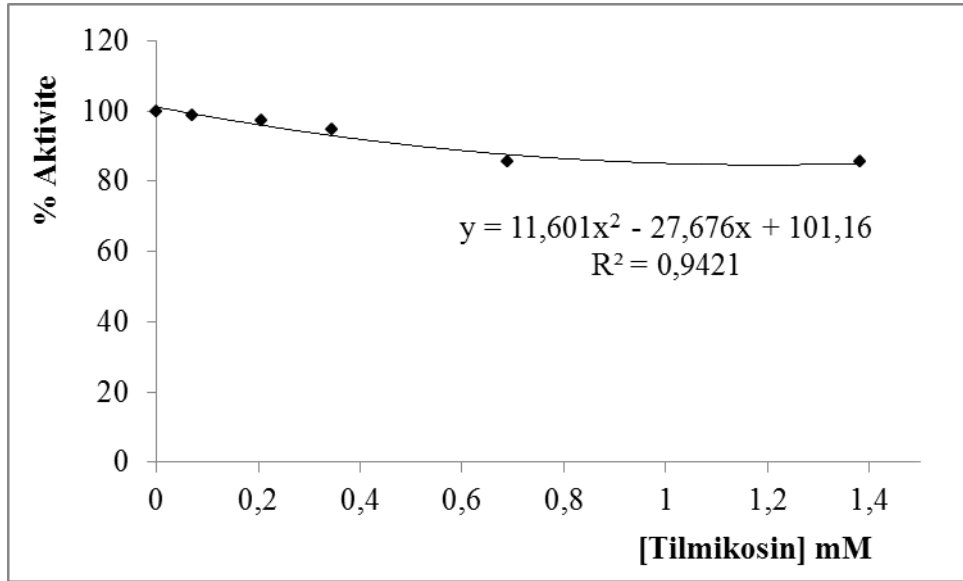
<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)</b>	<b>Substrat zeltisi (μl)</b>	<b>Enzim zeltisi (μl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör zeltisi (μl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,079	86,813	100
800					100	0,689	0,059	64,835	74,683
700					200	1,378	0,053	58,242	67,089
600					300	2,067	0,051	56,044	64,557
500					400	2,756	0,047	51,648	59,494
400					500	3,445	0,041	45,055	51,899

**Tablo 3.33:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Kanamisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çözeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,068	74,725	100
860					40	20,798	0,043	47,802	63,971
850					50	25,997	0,041	45,055	60,294
830					70	36,395	0,017	18,681	25,00
820					80	41,594	0,014	15,934	21,323
800					100	51,993	0,009	9,890	13,235



**Şekil 3.37:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Marbofloksasin için % aktivite-[I] grafiği



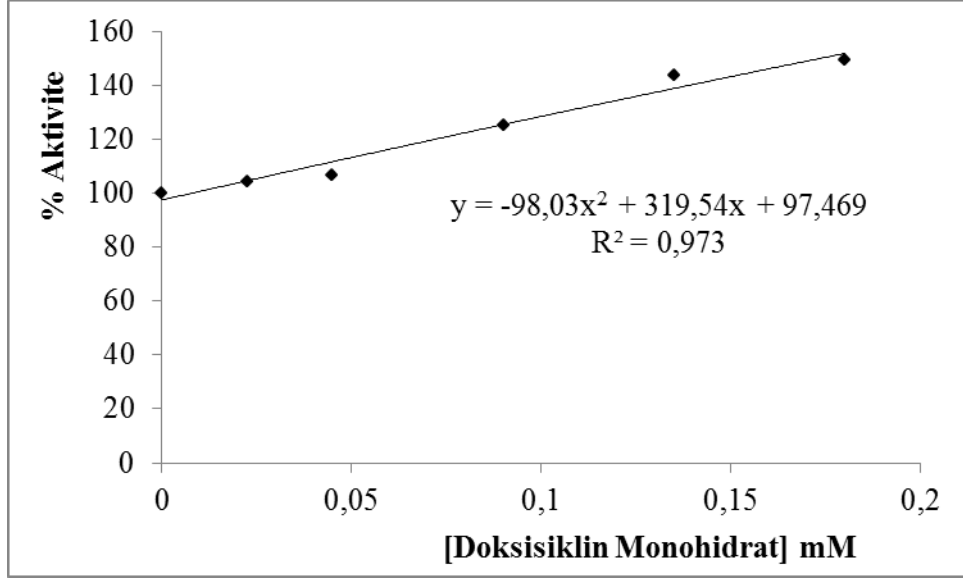
**Şekil 3.38:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Tilmikosin için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.34:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Marbofloksasin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

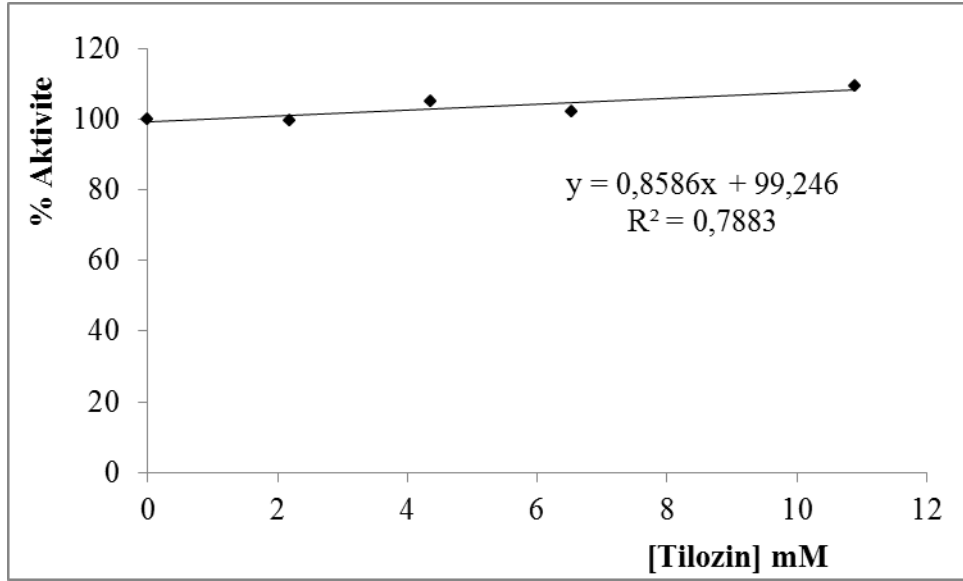
<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat zeltisi (µl)</b>	<b>Enzim zeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör zeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,052	57,143	100
880					20	5,519	0,061	67,033	117,308
840					60	16,558	0,071	78,022	136,538
820					80	22,078	0,082	90,110	157,692
800					100	27,597	0,087	95,604	167,308

**Tablo 3.35:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Tilmikosin etkisinin incelenmesinde kullanılan zelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat zeltisi (µl)	Enzim zeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör zeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,079	86,813	100
880					20	0,069	0,078	85,714	98,734
840					60	0,207	0,077	84,615	97,468
800					100	0,345	0,075	82,418	94,937
700					200	0,690	0,067	74,176	85,443
500					400	1,381	0,067	74,176	85,443



**Şekil 3.39:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Doksisiklin Monohidrat için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.40:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Tilozin için % aktivite-[I] grafiği

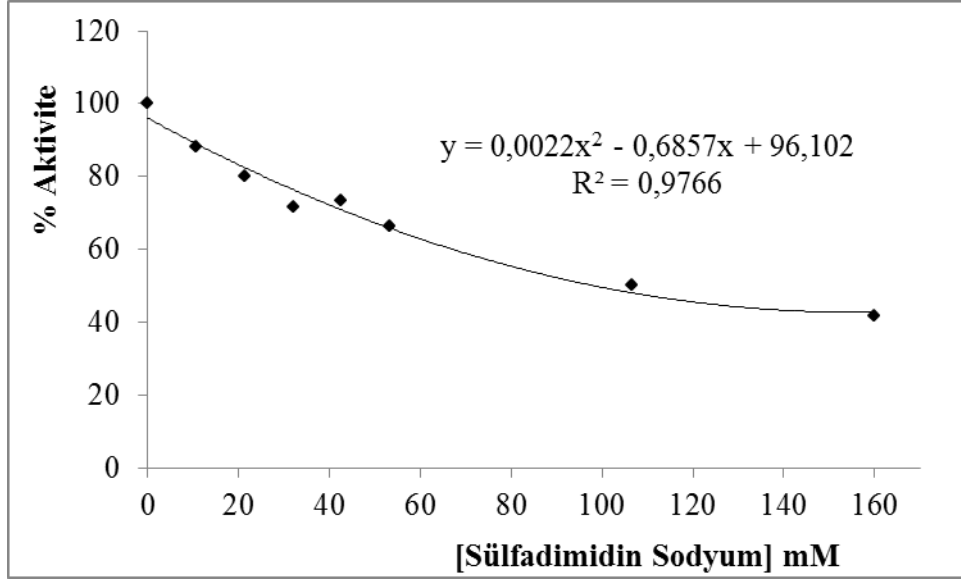
**Tablo 3.36:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Doksisiklin Monohidrat etkisinin incelenmesinde kullanılan czelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)	Substrat zeltisi (μl)	Enzim zeltisi (μl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör zeltisi (μl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
840	50	50	1	0,5	0	0	0,146	160,439	100
830					10	0,045	0,152	167,582	104,452
820					20	0,090	0,156	171,429	106,849
810					30	0,135	0,183	201,099	125,342
800					40	0,180	0,210	230,769	143,836

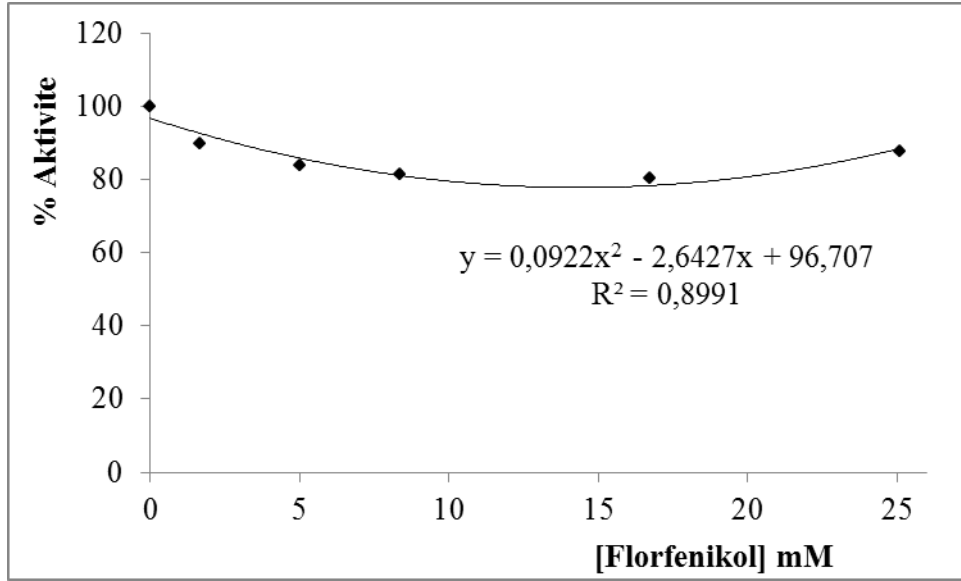
**Tablo 3.37:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Tilozin etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)	Substrat Çözeltisi (μl)	Enzim Çözeltisi (μl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çözeltisi (μl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,059	64,835	100
800					100	2,18	0,059	64,663	99,735
700					200	4,36	0,062	68,200	105,191
600					300	6,54	0,060	66,415	102,436
500					500	10,9	0,065	70,965	109,454





**Şekil 3.41:** Safleştirilmiş süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Sülfadimidin Sodyum için % aktivite-[I] grafiği



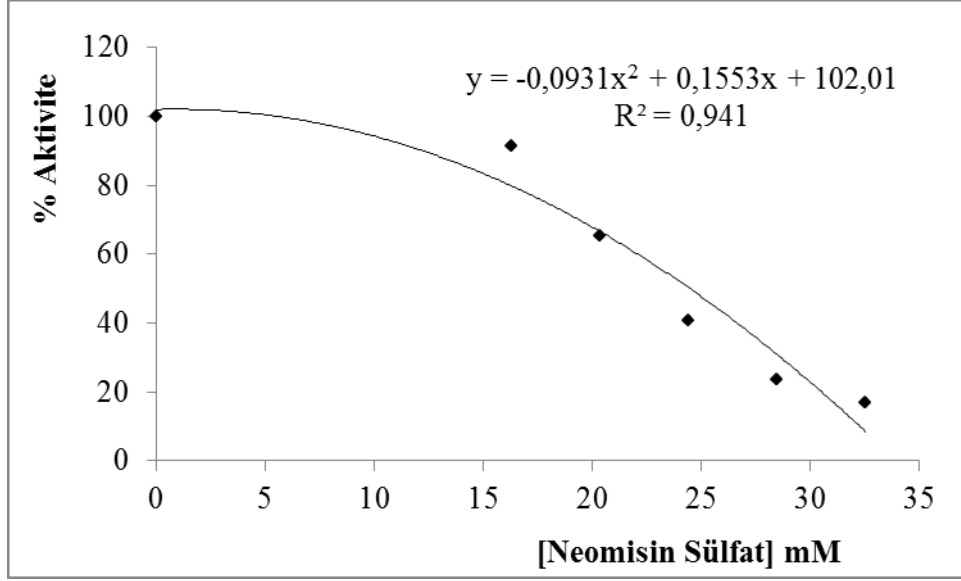
**Şekil 3.42:** Safleştirilmiş süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvet konsantrasyonunda Florfenikol için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.38:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kúvet konsantrasyonunda, Súlfadimidin Sodyum etkisinin incelenmesinde kullanılan çúzelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

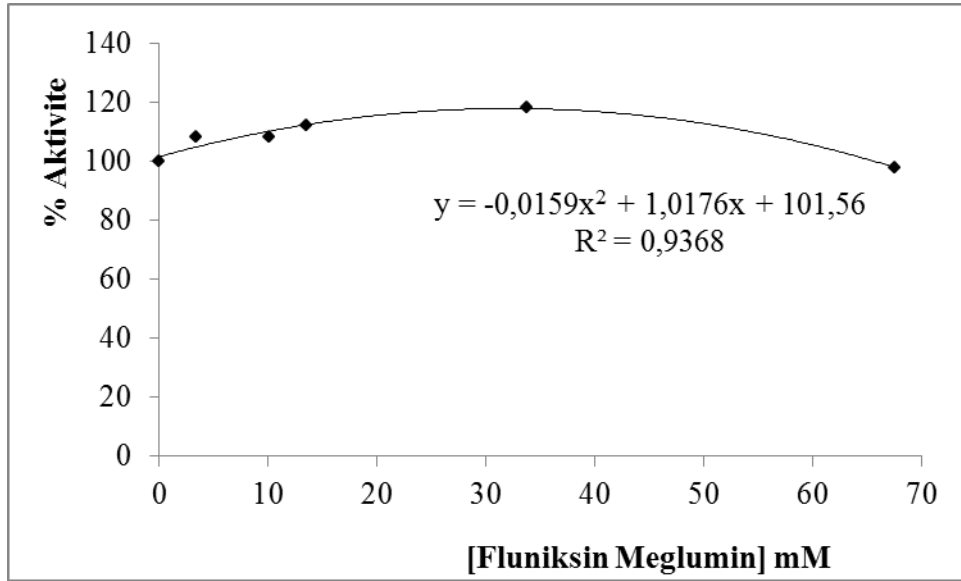
0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (μl)	Substrat Çúzeltisi (μl)	Enzim Çúzeltisi (μl)	Kúvetteki Toplam Hacim (ml)	Kúvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çúzeltisi (μl)	Kúvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,075	82,967	100
880					20	10,656	0,066	73,077	88,079
860					40	21,312	0,060	66,483	80,132
840					60	31,968	0,054	59,341	71,523
820					80	42,624	0,055	60,989	73,510
800					100	53,280	0,050	54,945	66,225
700					200	106,560	0,038	41,758	50,331
600					300	159,840	0,031	34,615	41,722

**Tablo 3.39:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Florfenikol etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat Çözeltisi (µl)</b>	<b>Enzim Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör Çözeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,079	86,813	100
880					20	1,674	0,071	78,081	89,941
840					60	5,022	0,066	72,645	83,679
800					100	8,37	0,064	70,505	81,215
700					200	16,74	0,063	69,758	80,354
600					300	25,11	0,069	76,073	87,629



**Şekil 3.43:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Neomisin Sülfat için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.44:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat kuvvet konsantrasyonunda Fluniksin Meglumin için % aktivite-[I] grafiği

**Tablo 3.40:** Safılaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Neomisin Sülfat etkisinin incelenmesinde kullanılan zelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

<b>0,15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat zeltisi (µl)</b>	<b>Enzim zeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki Toplam Hacim (ml)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons. (mM)</b>	<b>İnhibitör zeltisi (µl)</b>	<b>Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)</b>	<b>ΔA (405nm)</b>	<b>Aktivite (EU/dk)</b>	<b>% Aktivite</b>
900	50	50	1	0,5	0	0	0,059	64,835	100
700					200	16,28	0,054	59,341	91,525
650					250	20,35	0,038	42,308	65,254
600					300	24,42	0,024	26,374	40,678
550					350	28,49	0,014	15,385	23,729
500					400	32,56	0,010	10,989	16,949

**Tablo 3.41:** Saflaştırılmış süt ALP enzimi üzerine 0,5 mM p-nitrofenil fosfat küvet konsantrasyonunda, Fluniksin Meglumın etkisinin incelenmesinde kullanılan çözelti miktarları, bu değerlere karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0,15M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,1M NaHCO <sub>3</sub> pH:10,5 Tamponu (µl)	Substrat Çözeltisi (µl)	Enzim Çözeltisi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	İnhibitör Çözeltisi (µl)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
900	50	50	1	0,5	0	0	0,049	53,846	100
880					20	3,374	0,053	58,242	108,163
840					60	10,122	0,053	58,242	108,163
820					80	13,496	0,055	60,440	112,245
700					200	33,740	0,058	63,736	118,367
500					400	67,480	0,048	52,747	97,959

**Tablo 3.43:** Süt Alkalen Fosfataz enzimi için 0,5 mM p-nitro fenil fosfat substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan ilaç etken konsantrasyonları, 1 ml ilaca karşılık gelen etken miktarları ve sütteki maksimum kalıntı limitleri (MKL) **(Tebliğ No: 2011/20)**

İlaç Etkeni	İlaç Türü	Ampuldeki Miktarı (mg/ml)	Sütteki Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)	Sütteki Maksimum Kalıntı Limiti (µM)	IC <sub>50</sub> (mM)
<b>(-)- Tetramisol HCl</b>	Antihelmintik	0,25	---	---	45,485*10 <sup>-3</sup>
<b>Furosemid</b>	Diüretik	10	---	---	2,188
<b>Atropin Sülfat</b>	Antikolinergik	2	---	---	---
<b>Gentamisin Sülfat</b>	Antibakteriyel	100	100	0,183	22,891
<b>Toldimfos Sodyum</b>	Besin Takviyeli	200	---	---	126,315
<b>Metamizol Sodyum</b>	Antibakteriyel	500	50	0,154	312,130
<b>Deksametazon 21-Undekanoat</b>	Antibakteriyel	2,5	0,3	0,61*10 <sup>-3</sup>	---
<b>Enrofloksasin</b>	Antibakteriyel	100	100	0,286	58,431
<b>Oksitetrasiklin HCl</b>	Antibakteriyel	54	100	0,207	---
<b>Danofloksasin Mesilat</b>	Antibakteriyel	25	30	0,068	3,362
<b>Kanamisin Sülfat</b>	Antibakteriyel	250	150	0,265	27,274
<b>Marbofloksasin</b>	Antibakteriyel	100	75	0,213	---
<b>Tilmikosin</b>	Antibakteriyel	300	50	0,059	---
<b>Doksisiklin Monohidrat</b>	Antibakteriyel	200	---	---	---
<b>Tilozin</b>	Antibakteriyel	200	50	0,056	---
<b>Sülfadimidin Sodyum</b>	Antibakteriyel	160	100	0,343	98,120
<b>Florfenikol</b>	Antibakteriyel	300	---	---	---
<b>Neomisin Sülfat</b>	Antibakteriyel	74	1500	1,698	24,48
<b>Fluniksın Meglumin</b>	Antibakteriyel	50	40	0,084	---

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, Alkalen Fosfataz enziminin saflaştırılmasında çiğ inek sütü ile çalışılmıştır. Ön saflaştırma basamaklarında, EDTA ile muamele ve kazein çöktürmenin yanısıra n-bütanol, toluen ve aseton gibi organik çözücüler ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı ön saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek aktivite bütanol ekstraksiyonunda gözlenmiştir (Şekil 3.2, 3.3, 3.6-3.9). Dolayısıyla sonraki saflaştırma aşamalarında, enzimin lipoprotein partiküllerinden ayrılmasında organik çözücü olarak n-bütanol kullanılmıştır [87]. Organik çözücü ile muamele aşamasında, diğer çözücüler ve farklı n-bütanol yüzdeleriyle karşılaştırıldığında, en yüksek ALP aktivitesi % 3 n-bütanol oranında muamele ile elde edilmiştir (Şekil 3.10-3.15). Çiğ süt, n-bütanol %3 (v/v) ile homojenize edildikten sonra çökelekten ayrılan süpernatana (40 ml örnek için 16 µl maya) peynir mayası 36°C'de ilave edilerek 2,5 saat mayalanmaya bırakılmış ve kazein çöktürülerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatandan enzim, Sephadex G-100 kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile ayrılmıştır. Diğer peynir altı suyunda bulunan enzimler ve süt yağ globüleri enzimleriyle karşılaştırıldığında,  $\gamma$ -kazein (pI: 5,8-6,0) [88] ve süt alkalen fosfatazın (pI: 5,4-6,0) [21] izo elektrik pH değerleri hemen hemen aynı olduğundan total ALP'nin süttten izolasyonu oldukça zordur. Bunun yanı sıra  $\gamma$ -kazein dışında;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  olmak üzere kazein bir çok alt birimden oluşmuştur ve süt proteinlerinin % 79-80' nini (Tablo 1.2) içermektedir [15]. Dolayısıyla kazeinin uzaklaştırılması için çeşitli yöntemlere başvurulmuştur. Sütün dondurularak kazeinin çöktürülmesi işleminde, süt -7°C'de 1 aya yakın bekletildiğinde, küçük boyutlu kazeinatlar dışında kazeinin büyük çoğunluğunun destabilize olduğu gözlemlendiği rapor edilmiştir [89]. Fakat bu işlemle kazein partiküllerinin tamamen ayrılması söz konusu değildir. Ayrıca çalışmamızda, süt bir gece +4°C'de bekletilip direk 15000 rpm/+4°C/40 dakikada santrifüj edildiğinde elde edilen süpernatandan enzim aktivitesinin bütanol ekstraksiyonuna oranla daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 3.2, 3.3). Bu şekilde kazeini tamamen ayırmak mümkün olmadığı gibi yağ globüleri membranlara fosfatidil inositol ile kovalent bağlı alkalen fosfatazlar [11] da santrifüj ile birlikte çöken kısımda kaldığından ALP izolasyonunda bu işlem tercih sebebi değildir.



Ayrıca sütün dondurularak saklanması sürecinde, sütte bulunan fosfataz enzimlerinin aktiviteleri ile meydana gelen proteoliz sonucu serbest tirozin amino asitlerinin sayısında hafif bir artışın meydana geldiği rapor edilmiştir [89].

Bu çalışmada, kazeinin süttten ayrılmasında rennet (peynir mayası) ile çöktürme işleminden yararlanılmıştır [79]. Peynir mayası ile çöktürme işlemi sonucu süzme işlemi ile ayrılan peynir altı suyunda bulunan inorganik fosfat ve kalsiyum iyonlarının çözünürlüğünde kısmi bir azalma olduğu rapor edilmiştir [89]. Peynir oluşumu, ortama çöktürücü madde olarak  $Ca^{+2}$  iyonları ve emülgatör görevi gören (poli)fosfat iyonlarının ilave edilmesiyle kazeinin çöktürülmesi vasıtasıyla gerçekleştirilir. Sütte kazein miselleri 100-300 nm çapında ve kolloidal partiküller halinde bulunur. Misellerin % 93,3'ü kazein, % 6,6'sı ise inorganik bileşenlerden meydana gelir. Misellerin protein yapısında olmayan komponenti %37,5 kalsiyum, %50 fosfat, %7,5 sitrat ve %2 magnezyum olmak üzere düşük molekül ağırlıklı iyonlardan oluşmaktadır. Bu nedenle kazein misellerinin temel organik bileşeni kolloidal kalsiyum fosfatlardır. Kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyonuna spesifik afinitesi olan  $\beta$ -kazein, en büyük süt proteinlerinden birisidir. Sistein rezidüsü içermeyen bu protein 24 kDa moleküler ağırlığa sahip olup, toplam zincir uzunluğu 720 Å olan 209 amino asit rezidüsünden oluşmaktadır. 209 amino asit rezidülerinden ilk 50'si hidrofilik olup geri kalanı ise çoğunlukla hidrofobik karakterdedir. Uzun hidrofobik zincirinden dolayı  $\beta$ -kazein misel yapısında bulunmaktadır [90]. Literatürde misel yapısına dair 3 farklı model önerilmiştir. İlk model, kazein alt birimlerince çevrelenen diğer protein bileşimlerinin merkezde yer aldığı çekirdek-tabaka modelidir. Bu yapıda  $\alpha_s$  ve  $\beta$ -kazeinler iç tarafta yer alırken,  $\kappa$ -kazein dış tarafta yer almaktadır. Diğer bir hipoteze göre de çoğunlukla  $\beta$ -kazeinler iç taraftayken  $\alpha_s$  ve  $\kappa$ -kazeinlerin dış tarafta bulunduğu rapor edilmiştir. 2. model, tüm misel yapısının farklı kazein alt birimlerinin yer aldığı üç boyutlu ağdan oluşmaktadır. Bu modele göre, ağın merkezine ya da dış kısmına spesifik bölgelerde yer alan herhangi bir protein tanımlanmamıştır. 3. model ise tüm kazein alt birimlerinin, kalsiyum ve fosfat köprüleriyle bir araya gelerek agregasyon oluşturduğu alt-misel modelidir [90].

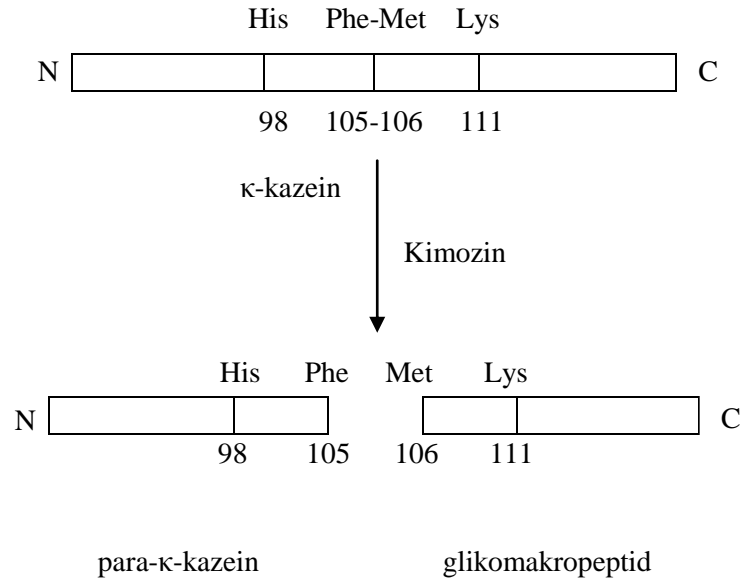
Süt proteinlerinin büyük çoğunluğunu kazein oluşturduğundan çalışmamızda kazein çöktürme yöntemleri araştırılmıştır. Uygulanan yöntemlere ilaveten diğer

çöktürme yöntemleri; kazeinin dondurularak ultrasantrifüj ile çöktürülmesi, karboksimetil ve katyonik hidroksietil selüloz ile çöktürme ve CO<sub>2</sub> ile basınç uygulanarak çöktürme yöntemleridir. Kazeinin dondurularak ultrasantrifüj ile çöktürülmesinde, çiğ süt -7°C veya -20°C'de belirli bir süre dondurulur ve 37°C'deki su banyosunda, dondurulmuş sütün tamamen çözünmesi beklenip 20.000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek kazeinin büyük çoğunluğu ayrılır. Çiğ sütün dondurularak destabilizasyonun gerçekleşmesi, çözünür özellikteki kalsiyum, fosfat ve sitrat iyonlarının da kaybını beraberinde getirir. Dondurularak destabilize olan bu proteinin kazein olduğu serbest solüsyon ve selüloz-asetat elektroforezleriyle kanıtlanmıştır [89].  $\beta$ -kazein ile karboksimetil selüloz (CMC), asidik ortamda önemli oranda etkileşmektedir. Reometre ile (akış ölçer) 25°C ve pH:5,5'de bu etkileşim, çözelti viskozitesinin artması sebebiyle net olarak belirlenebilmektedir. Viskozitedeki artış, CMC ile  $\beta$ -kazeinin düşük pH'de çözünür özellikte kompleks oluşturmasından ileri gelmektedir. CMC omurgası, globüler proteinlerle büyük oranda etkileşebilmek için oldukça rijit bir yapıyı tercih eder. Düşük pH'de, polimer omurgası üzerindeki serbest yüklerin indirgenmesiyle makromolekül rijitlik kazanarak CMC ile  $\beta$ -kazeinin etkileşimi sağlanır [91]. Ayrıca sodyum kazeinatın yüzey hidrofobik karakteri ve elektrostatik etkileşim gerekçesiyle protein-polisakkarit oranı değiştirilebilir ve farklı kıvamalarda asit jeller elde edilebilir [92]. Diğer bir yöntemde ise kazein, 38°C tepkime kazanında, süt içerisine 5520 kPa CO<sub>2</sub> basıncı uygulanarak (5 dk) çöktürülür ve kazein, peynir altı suyu proteinleri, laktoz ve minerallerden uzaklaştırılmak amacıyla yıkanarak liyofilize edilir [93]. Katyonik hidroksietil selüloz ile çöktürme işleminde de çiğ süt (1ml), 0.1 mL (0-10 mg/ml) kuaterner amin grubu içeren katyonik selüloz, Hidroksietil Selüloz *Poliquaternium-10* (PQ10) ile belirli bir süre inkübe edilerek kazeinin uzaklaştırıldığı rapor edilmiştir [94]. Amorf yapıdaki kalsiyum fosfat (ACP), yapay hidroksiapatit ticari adıyla da üretilen esansiyel bir mineraldir. Kazein fosfopeptidleri (CPP), bir seri -Ser (P) – Ser (P) – Ser ve (P) –Glu – Glu amino asit rezidüleri içermektedir. Kazein fosfopeptidlerin fosfoseril rezidüleri sayesinde, CPP-ACP kompleksi stabilize edilir [95]. Kalsiyum iyonları, kazein moleküllerinin fosfat grubu içeren rezidülerine karşı, aspartat ve glutamat amino asit rezidülerinden daha güçlü afiniteye sahiptir. Dolayısıyla iyonlar, kazeinin fosfat rezidüleriyle etkileşmeyi tercih ederler [96]. Bu etkileşimin pH değişimine de bağlı olduğu rapor edilmiştir. Örneğin pH:7,5'de solüsyondaki bir  $\beta$ -kazein molekülünün presipitasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonu sayısı deneysel

bulgulara göre 220 olarak belirlenmiş iken, pH:5,5'de bu sayı 88'e düşmüştür. Buradan düşük pH'lerde  $\beta$ -kazeinin çöktürülmesi için daha az kalsiyum iyonu gerektiği bulunmuştur. pH:7,5'de kazeinin yükü molekül başına (-12) iken, bu değer pH:5,5'de (-7)'dir. Çünkü düşük pH'lerde, protein zinciri üzerindeki net negatif yük daha az olduğundan, presipitasyonun gerçekleşmesini sağlayan elektrostatik nötralizasyona daha az  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ile ulaşılabilir. Protein agregasyonlarındaki kalsiyum-fosfat kristallerinin polarize optik mikroskopu ile belirlenebildiği rapor edilmiştir. Yine Guo ve arkadaşları tarafından,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının  $\beta$ -kazeinin 6 serin rezidüsünün fosfat gruplarına güçlü bir şekilde bağlandığı belirtilmiştir. Ortama fosfat gruplarının da ilave edilmesiyle kazein presipitasyonunda yeni bir mekanizma açığa çıkmaktadır.  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları, sadece  $\beta$ -kazein ile çökelme oluştururken, kalsiyum fosfat mikro kristalleri tüm kazein birimleri ile etkileşip çoklu agregasyona uğramaktadırlar. Böylelikle kazeinin süttten ayrılma mekanizması, protein ve kalsiyum fosfat mikro kristallerinin birlikte çökerek ko-presipitasyonun meydana gelmesiyle açıklanabilir. Dolayısıyla kazein, kalsiyum ve fosfat varlığında daha iyi ayrılmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi, kalsiyumun kazein fosfat gruplarına karşı güçlü afinitesinden dolayı sütte kalsiyum fosfat kristallerinin oluşumu engellenir ve sütteki kolloidal kalsiyum fosfat bu durumda amorf yapıda stabilize edilebilir. Bu nedenle sütte yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen kalsiyum ve fosfatlardan yüksek biyo-yararlanım mümkündür [90]. Bu bilgiler ışığında, kazein alt birimlerinin toplu olarak, pH:7,5 gibi kazeinin izoelektrik pH değerinden daha yüksek pH'lerde çöktürülebileceği mümkün kılınmaktadır. ALP ve  $\beta$ -kazeinin izoelektrik pH'leri hemen hemen aynı olduğundan [88] bu durum ALP'nin kazein birimlerinden ayrılmasında avantaj teşkil etmektedir. Yani, enzim pH:5,4-6,0 [88] izoelektrik noktasına sahip olduğundan çökmeden süpernatanda kalabilecektir.

Deneysel aşamalarda, kazein koagülasyonunda kullanılan peynir mayasının içeriğinde enzim çözeltisi (su / proteaz), NaCl ve Sodyum Benzoat bulunmaktadır. Rennet enzimi olarak da isimlendirilen koagülant proteaz, sütte en çok bulunan temel protein kazeinin çöktürülmesinde kullanılmaktadır [97]. Birçok peynir çeşidi, pıhtılaştırıcı özelliğe sahip proteaz kimozen içeren rennet tarafından, süttün enzimatik koagülasyonu ile üretilmektedir. Bu enzim, kazein miselinin (kolloidal kazein partikülü) yüzeyinde bulunan  $\kappa$ -kazein proteinini Phe105-Met106 amino asit rezidülerinden spesifik olarak parçalar ve genellikle kazeinomakropeptid (CMP)

olarak isimlendirilen (-) yüklü C-terminal uçlara sahip moleküller  $\kappa$ -kazeinden ayrılır. Kazein misellerinin stabilizasyonu bozulmaya başlar ve sütte koagülasyon meydana gelir. Misel agregasyonunun başlayabilmesi için yaklaşık % 90 civarında  $\kappa$ -kazein hidrolizi gerekmektedir [98].  $\kappa$ -kazeinin, rennin olarak isimlendirilen kimozinin spesifik substratı olduğu rapor edilmiştir [99]. Rennin enziminin etkisiyle  $\kappa$ -kazein molekülü, para- $\kappa$ -kazein ve glikomakropeptid (CMP) molekülüne parçalanmaktadır. Enzimatik proteoliz sırasında makropeptit moleküllerinin ayrılması nedeniyle miseller küçülür, negatif yükleri azalır ve viskozite geriler. Bu durumda kalsiyum karşısında  $\alpha$ -s1 ve  $\beta$  kazeinlerin stabilitesi bozulur [100]. Mayanın içeriğinde yer alan tuz ile de pH:6,5'da  $\beta$ -kazein hidrolizi inhibe edilir [101]. Bu durumda, hidrolizi önlenen  $\alpha$ -s ve  $\beta$ -kazeinlerin, misel stabilitesinde rol oynayan kolloidal kalsiyum fosfat bağlarının ayrılmasıyla serbest kalan  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarına bağlanmaları ile de (-) yükler azalarak kalsiyum parakazeinat oluşur ve viskozite azalır. Kazein miseli üzerindeki para- $\kappa$ -kazeinin (+) yükü ile diğer misel üzerindeki  $\kappa$ -kazeinin (-) yüklü grupları arasındaki etkileşim misellerin bir araya gelmesini sağlar [100].



**Şekil 3.45:** Kazein misellerinin koagülasyonunda Kimozin enziminin reaksiyonu [101-103]

Kimozinin kazein miselleri üzerindeki aktivasyonu, enzimatik parçalanma ve misellerin çöktürülmesi olmak üzere iki basamakta incelenebilir. Peynir üretiminde ısıtılmamış veya düşük pastörize sütler tercih edilmektedir. Bu koşullar altında iken kimozin aktivasyonunun incelenebildiği rapor edilmiştir. Enzim aktivitesi pH, sıcaklık ve kalsiyum konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca kimozinin sadece kazein miselleri üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir [104]. Süte pH:6,3'den daha düşük pH'lerde ısı işlem uygulandığında, kazein misellerine bağlanan peynir altı suyu proteinlerinin miktarında önemli oranda artış meydana gelir. Diğer yandan, pH:7,1'e kadar uzanan pH değerlerinde peynir altı suyu proteini /  $\kappa$ -kazein kompleksinin çözünürlüğünde artış olduğu rapor edilmiştir [98]. Bunun yanı sıra çalışmamızda, membran-bağlı ALP'nin endüstriyel önemi esas alındığından, enzimin mikrobiyal kaynaklı ALP izoformundan da ayırt edilmesi önemlidir. Bu iki izoformun ayırt edilebilmesi için izlenilen yollardan birincisi; repastörizasyon işlemi sonrasında tekrar elde edilen pozitif ALP testinin (enzimin aktivite göstermesi) mikrobiyal kaynaklı alkalen fosfatazdan kaynaklandığı rapor edilmiştir [105]. Buradan sütte lipoproteinlere bağlı, doğal olarak bulunan ALP enzimi ile mikrobiyal ALP'nin termal kararlılığının birbirinden farklı olmasıyla bu durum pastörizasyon sürecinde sıcaklık ve zaman değişimine yol açacağından, pastörizasyon doğru olarak yapılamaz sonucuna varılabilir ve bu durum insan sağlığı açısından olumsuzluk teşkil etmektedir. Bu iki enzimin birbirinden ayrılmasında kullanılan ikinci yol, Western Blot yöntemi kullanılarak enzimlerin birbirinden farklı spesifik antikorları sayesinde ayırt edilebilmeleridir [21]. Üçüncü yol ise globüler yağ membranlarına bağlı, pastörizasyon indikatörü olarak kullanılan ALP'nin izoelektrik noktası 5,4-6,0 civarında iken, mikrobiyal kaynaklı ALP'nin izoelektrik noktasının 6,0-6,9 civarında olduğu rapor edilmiştir [21]. Deneysel çalışmada, mayalanma sonrası süzülerek ayrılan peynir altı suyunun pH değeri 6,2-6,3 civarında ölçülmüştür. Dolayısıyla, mikrobiyal kaynaklı alkalen fosfatazın izoelektrik noktasında agregasyon gerçekleştiğinden, mikrobiyal kaynaklı enzimin de kazein fraksiyonlarıyla beraber çökerek ortamdan ayrılması beklenir ve ortamda membran-bağlı alkalen fosfatazlar çökmeden kalırlar. Peynir altı suyunda ölçülen enzim aktivitesinin bir önceki basamağa göre biraz azalmasının, mikrobiyal enzimlerin ortamdan uzaklaşmasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülebilir. Çünkü, sütte görülen ALP aktivitesi non-

spesifik olduğundan [21], ortamda her ikisinin de olduğu durumda ölçülen aktivitenin ne kadarının mikrobiyal ALP ve ne kadarının membran-bağlı enzime ait olduğu bilinemez. Dolayısıyla, moleküler biyoloji tekniklerinden farklı olarak, sütte doğal olarak bulunan ALP ile mikrobiyal ALP'nin birbirinden ayrılmasında biyokimyasal tekniklerden faydalanılması, çalışmaya değişik bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Deneysel çalışmalarda, peynir mayası süte farklı basamaklarda ilave edilerek (sütün direk mayalanması / organik çözücü ile muamele sonrası süpernatanın mayalanması / sütün soğukta santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatanın mayalanması) her bir örnekte, pıhtılaşılan kısımdan geriye kalan peynir altı suyu enzim aktiviteleri karşılaştırılmış ve mayalama işleminin %3 (v/v) n-bütanol ile muamele sonrası uygulanmasıyla maksimum ALP aktivitesi gözlenmiştir. Mayalanma - %3 bütanol ile homojenizasyon / %3 bütanol - mayalanma / santrifüj - mayalanma işlemleri sonucu her basamaktaki örneğe JFK işlemi uygulanmış ve elde edilen enzim aktiviteleri sırasıyla, 32,418; 112,637 ve 47,253 EU/ml olarak ölçülmüştür (Tablo 3.20-3.22). Dolayısıyla ALP aktivitesi, kazein çöktürme öncesi n-bütanol homojenizasyonunun yapıldığı saflaştırma yönteminde daha yüksek bulunmuştur ve elde edilen deneysel bulgular, bütanolün mayalama aşamasından önce kullanılmasıyla, sütün santrifüj edilip 2. adımda mayalanmasına nazaran enzim aktivitesinin yaklaşık 2 katına çıktığını göstermektedir. Bu sonuç, ALP'nin yaklaşık %30-%40' ının yağ globül membranlarına bağlı olup, geri kalan enzimin yağı ayrılmış sütte bulunan serbest lipoprotein partikülleriyle bağlantılı olduğu [57] teorisini doğrulamaktadır. İlâveten, her üç yöntem için de ölçülen aktiviteler ve Bradford yöntemi ile hesaplanan protein miktarları kullanılarak, saflaştırma katsayıları ve % verimler sırasıyla; 8,586 - 0,996 %, 53,430 - 3,475 %, 72,380 - 1,445 % olarak belirlenmiştir (Tablo 3.20-3.22).

Her bir yöntem için, kazein çöktürme sonrası elde edilen peynir altı suyu proteinleri, 0,1 M Tris-Base (pH: 10) tamponu ile dengelenmiş Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna tatbik edilip aynı tampon ile elüye edilerek, toplanan 2 ml'lik fraksiyonlara ait protein absorbans değerleri 280 nm'de okunmuştur. Her bir elüata ait enzim aktivite değerleri ölçüldükten sonra yüksek aktiviteli enzim saflaştırma tablosunun oluşturulmasında kullanılmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi, çalışmada elde

edilen en yüksek saflaştırma katsayıları sırasıyla; 72,38 ve 53,43 olarak bulunmuştur (Tablo 3.21, 3.22). Bu deneysel veriler, literatürde daha önce süt alkalin fosfatazi ile yapılan çalışmalar ve ALP'nin diğer izoenzimleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Örneğin; çiğ inek sütünden izole edilen ALP için, Concanavalin A Agaroz afinite jeli ve elektroelüsyon yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırmalarda, saflaştırma kat sayıları sırasıyla 7,4 ve 8,5 kat bulunmuştur. Saflaştırma prosedürü, Macro-Prep High Q Anyon Değişim Kromatografisi, Sephacryl S-200 ve Concanavalin A Agarose Afinite Kromatografisinden oluşmaktadır [21]. İnsan plazental ALP enzimi için, n-bütanol ekstraksiyonu, % 95 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi, ısı muamele ve Sephadex G-200 jel filtrasyon basamaklarının uygulandığı saflaştırma prosedürü ile 29,1 kat saflaştırma kat sayısı elde edilmiştir [106]. Zhang et al. (2001), Baculovirus Ekspresyon Vektör Sistemi tarafından salgılanan alkalin fosfatazi (SEAP), hücre ve virüs spermatanını kullanarak elde ettikleri konsantre ham ekstraktan izole etmişlerdir. 4-amino benzil fosfonik asidin, histidil-epoksi gruplarıyla aktifleştirilmiş Sefaroz matriksine bağlanması suretiyle elde edilen afinite kolonu kullanılarak, SEAP enzimi afinite kromatografisi ile 27 kat saflaştırılmıştır [107].

Süt alkalin fosfatazinin, 150 kDa'dan daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan böbrek, beyin ve karaciğer alkalin fosfatazlarına benzer olarak aynı gruba ait olduğu belirtilmektedir [108]. Çalışmamızda süt ALP enziminin saflık kontrolü için yapılan SDS-PAGE elektroforezinde, markerin 72-95 kDa aralığına denk gelen kalın bir bant görüntülenmesiyle enzimin her bir moleküler ağırlığı yaklaşık 85 kDa olan homo-dimerik iki alt birimden oluştuğu [17] teorisi doğrulanmaktadır (bkz. Şekil 3.25). Şekil 3.24'de belirtilen Native-PAGE elektroforezinde ise çökelek ve JFK numunelerine ait bantlarda, enzim denatüre olmadığından tek band görünümü mevcuttur. Ayrıca çökelekte kazeinin tam olarak ayrılamadığı görülmektedir. Literatürde Linden ve Alais (1978), inek sütünden izole edilen ALP'nin SDS-PAGE elektroforezinde, dimerik yapıda olup özdeş iki alt birimden oluştuğunu belirtmişlerdir [108]. Diğer yandan, Dinnella ve arkadaşları (2004) tarafından enzimin özdeş iki alt birimden oluştuğu belirtilemeksizin moleküler ağırlığı 180 kDa olarak rapor edilmiştir [84]. Vega-Warner ve arkadaşları (1999) ise enzimin molekül ağırlığını 187 kDa olarak belirlemişlerdir [21]. Bunun yanı sıra, inek sütünde enzimin 2 ile 4 arasında değişen izoformlarının olduğu ve [109,110] sığır sütü

alkalen fosfatazının  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  olmak üzere üç izoformadan oluştuğu belirtilmiştir [109]. Sütün yağsız kısmında enzimin baskın olan formu  $\alpha$  iken,  $\beta$  formu da kompleks kuaterner yapısından dolayı daha yüksek molekül ağırlığına sahip olup yağ globüler membranlara bağlı olarak bulunmaktadır [21]. Baskın olan  $\alpha$  formunun izoelektrik noktası 5,4-6,0 civarında bulunmuş iken [21], bu değer Chuang ve Yang (1990) tarafından 5,5 olarak rapor edilmiştir [111]. Mikrobiyal kaynaklı ALP'nin izoelektrik noktası ise 6,0-6,9 civarında rapor edilmiştir. İsoelektrik odaklama metodu ile membran-bağlı ALP'nin yanı sıra mikrobiyal ALP (pI: 6,0-6,9) gibi enzimin çeşitli formlarının elde edilmesi, içerdikleri siyalik asit rezidülerinin farklılıklarından kaynaklanmaktadır [21].

Enzimlerin aynı reaksiyonu katalizleyen farklı izo enzimleri, farklı amino asit dizilimlerine sahip olup, elektroforez veya izo elektrik odaklama teknikleri ile birbirlerinden ayrılabilir. Ayrıca, süt ALP enziminin üç ayrı formunun ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) da moleküler ağırlıklarının farklı olduğu rapor edilmiştir [7] Bu durumda, çalışmamızda SDS-PAGE elektroforezinde görüntülenen 130-250 kDa aralığına denk gelen bandın farklı bir protein olma ihtimalinin yanı sıra, enzimin farklı bir izoformu olduğu düşünülebilir (bkz. Şekil 3.25).

Tablo 1.4'de belirtilen enzimlerin molekül ağırlıklarını inceleyecek olursak; Plazmin 88 kDa, Asit Fosfataz 42 kDa, dimerik yapıda olan Ksantin Oksidaz enziminin doğal molekül ağırlığı 300 kDa, çizelgede yer almayan ve sütte bulunan diğer enzimlerden ise Laktoperoksidaz 78 kDa ve Lipaz 100 kDa olarak rapor edilmiştir [101]. Levinson ve Ellory tarafından, Asetilkolinesteraz enziminin tek bir monomerinin 75 kDa olarak bulunduğu ve farklı izoformlarının 60-400 kDa arasında yer aldığı belirtilmiştir [112]. Schrader ve arkadaşlarına göre, Katalaz ve Aldolaz enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla, 240 ve 158 kDa olarak göstermişlerdir [113]. McSweeney ve Fox tarafından ise, süt katalaz enziminin SDS-PAGE elektroforezinde 11'den 55 kDa ağırlığına kadar uzanan 5 alt birime ayrıldığı rapor edilmiştir [114]. Sütte bulunan diğer enzimlerden Süperoksit Dizmutaz (SOD) enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 31-33 kDa, L-Laktat Dehidrogenaz enzimi, 140 kDa moleküler ağırlığına sahip tetramerik yapıda ve  $\gamma$ -Glutamil Transferaz ise 80 kDa olarak rapor edilmiştir [103]. 80 kDa moleküler ağırlığına sahip  $\gamma$ -Glutamil Transferazın (Transpeptidaz), SDS-PAGE'de 57 ve 25 kDa olmak üzere iki



heterodimer yapıya sahip olduğu belirtilmiştir [11]. Fox ve Kelly tarafından, N-asetil glukozaminidazların A ve B izoformlarının her birinin sırasıyla 55 ve 25 kDa olmak üzere heterodimer yapıdan oluştukları ve SOD'nin özdeş iki alt birimden (16 kDa) meydana geldiği bildirilmektedir. Sülfidril Oksidaz'ın tek bir monomeri 89 kDa olup, sütte buluna Aldolaz enzimine özgü kDa değeri belirtilmezken, tavşan kasından izole edilen Aldolaz'ın her bir alt birimi 40 kDa olan homotetramer yapıya sahip olduğu rapor edilmiştir. Her biri 4 özdeş alt birimden (21 kDa) oluşan tetramerik enzim Glutasyon Peroksidaz ise, sütte az miktarda bulunmaktadır. Ayrıca Ribonükleaz enziminin de 13,68 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu rapor edilmiştir [11]. NADH Dehidrogenaz enziminin doğal elektroforezinde molekül ağırlığının 450 kDa'dan fazla olduğu belirtilirken, SDS-PAGE'de monomer biriminin molekül ağırlığı 17,5 kDa civarında görüntülenmiştir [115]. Chakraborty ve arkadaşları tarafından *Clostridium thermocellum* türüne ait diyaforaz molekül ağırlığının 24 kDa olduğu rapor edilmiştir [116]. Chen ve arkadaşları tarafından ise  $\beta$ -Galaktozidazın SDS-PAGE elektroforezinde 70 kDa civarında tek band verdiği ve [117] Rekombinant  $\beta$ -Glikozidazın SDS-PAGE'de 120 kDa moleküler ağırlığında olduğu [118] tespit edilmiştir. Diğer bir kaynağa göre, kas hücrelerine ait plazma-membran ATPazların moleküler ağırlığı 130-140 kDa aralığında iken, sarkoplazmik retikuluma bağlı izoformunun 100-110 kDa civarında olduğu belirtilmiştir [119]. NADH sitokrom b<sub>5</sub> redüktaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE'de 43 kDa [120], Lenfosit 5'-Nükleotidaz enziminin 130 kDa [121], Nükleotit Pirofosfatazların çeşitli izoformlarının 127 kDa civarında olduğu [122] ve inorganik pirofosfatazların da ALP enzimi ile benzer özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir [123]. Diğer bir kaynağa göre ise, insan ve hayvanlarda mevcut Alkalen Fosfataz'ların aynı zamanda Pirofosfatazlar olarak geçtiği de bildirilmektedir [124]. *Lactobacillus casei* türünden izole edilen fosfohidrolazın (Glukoz-6-Fosfataz) ise tek bir alt biriminin 32 kDa olup dimerik yapıdan oluştuğu rapor edilmiştir [125]. Bu bilgiler ışığında, sütte mevcut diğer enzim veya izoenzimlerinin molekül ağırlıkları dikkate alındığında, görülen iki bandın ALP enzimine ait olduğu hipotezi doğrulanmaktadır (bkz. Şekil 3.25). Ayrıca diğer bir kaynağa göre, süt Alkalen Fosfataz'ının moleküler ağırlığının 170-190 kDa olduğu belirtilmektedir [126].

Çalışmamızda, ALP enzimi için p-nitrofenil fosfat substratı kullanılarak elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 2,27 mM ve 555,56 EU/dk olarak

bulunmuştur. Njoku ve arkadaşları tarafından, *Lepus townsendii* türüne ait tavşan karaciğerinden ekstrakte edilen ALP enzimine ilişkin bu değerler sırasıyla 0,5 mM -  $20 \cdot 10^{-6}$  M/dk [127], '*Fasiolopsis buski*' sınıfından bir bağırsak parazitinden izole edilen ALP için 2.5 mM - 16.67  $\mu$ M/dk [128] ve Ahn ve Snow tarafından ise sütte bulunan membran bağlı ALP için Km değeri 0,456 mM olarak belirlenmiştir [129]. Çalışmamızda bulunan  $K_M$  değerinin, enzimin membran bağlı  $\beta$  formu ve diğer türlerde bulunan izoformlarına ait Km değerleri ile benzer bulunmasının, ortamda farklı bir protein olma ihtimalinin yanı sıra, enzimin mevcut izoformlarından ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan p-nitro fenil fosfat dışında, Fox ve Kelly tarafından ALP enziminin diğer substratları sırasıyla; fenil fosfat (2,6-dibromokinon kloroimid ilavesi ile mavi renkte ürün oluşumu - Scharer, 1938), fenol fitalein (kırmızı renkte ürün oluşumu- Huggins ve Talalay, 1948 ve Kleyn, 1978) ve adamantil-1,2-dioksetan fenil fosfat (Girotti, Ferri, Ghini, Budini, ve Roda (1994) olarak rapor edilmiştir [11].  $\alpha$  ve  $\beta$ -Gliserol fosfat, 2 ve 3 fosfogliserat, Trioz fosfat, glukoz 1-fosfat, glukoz 6-fosfat, früktoz 1-fosfat, fruktoz-6 fosfat, fruktoz 1:6-difosfat, Adenozin 3'-fosfat ve Adenozin 5'-fosfat ise Morton tarafından belirtilen diğer substratlarıdır [130].

Endüstriyel alanda, sütün yeterince ve uygun pastörize edilip edilmediğinin anlaşılmasında ALP enzim aktivitesinden yararlanılmaktadır. Bu özelliğiyle çiğ sütte doğal olarak bulunan ALP, süt endüstrisinin en önemli enzimidir. Pastörizasyon sürecinde enzim inaktivasyonundan yararlanır [57]. Enzim, pastörizasyon sıcaklığına gelindiğinde inaktive olacağından enzim aktivitesinin gözlenmemesi sütün pastörize olduğunu gösterir [21]. Fakat, hayvanlara verilen çeşitli veteriner ilaçlar tarafından enzimin inhibisyonu söz konusu olduğunda enzim aktivitesi azalacağından, daha pastörizasyon sıcaklığına ulaşılmadan (72°C'de 15 saniye veya 63°C'de 30 dakika [6]) enzim inhibe olacak ve pastörizasyon sıcaklığına ulaşıldığı yanlışlıkla olması gereken sıcaklıktan daha düşük bir sıcaklıkta işleme son verileceğinden doğru bir pastörizasyon gerçekleştirilemeyecektir. Bu sebeple çalışmamızda, veteriner ilaç etkenlerinin süt ALP enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Tezde çalışılan veteriner ilaçlara ait sütteki MKL değerlerine Türk Gıda Kodeksinden (Tebliğ No: 2011/20) bakılmıştır [59]. ALP enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etki gösteren veteriner ilaç etkenleri için  $IC_{50}$  değerleri, % Aktivite/[I] grafiğinden hesaplandı. 1L süt yaklaşık olarak 1,029 kg olduğundan, Gentamisin için sığır sütlerinde 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri, Gentamisin Sülfat için 0,183  $\mu\text{M}$  konsantrasyona karşılık gelmektedir. Çalışmada, Gentamisin Sülfat için  $IC_{50}$  değeri 22,891 mM olarak bulundu. Sığır sütlerinde Metamizol için 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri, Metamizol Sodyum için 0,154  $\mu\text{M}$  konsantrasyona eşdeğer iken, Metamizol Sodyum için bulunan  $IC_{50}$  değeri 312,13 mM'dır. Sığır, koyun ve keçi sütlerinde Enrofloksasin için 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri 0,286  $\mu\text{M}$  konsantrasyona denk iken, etken için bulunan  $IC_{50}$  değeri 58,43 mM'dır. Sığır, koyun ve keçi sütlerinde Danofloksasin için 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri, Danofloksasin Mesilat için 0,068  $\mu\text{M}$  konsantrasyona eşdeğer iken, Danofloksasin Mesilat için bulunan  $IC_{50}$  değeri 3,362 mM'dır. Balık hariç, hayvansal gıda olarak tüketilen tüm türlere ait sütlerde, Kanamisin için 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri, Kanamisin Sülfat için 0,265  $\mu\text{M}$  konsantrasyona eşdeğer iken, Kanamisin Sülfat için bulunan  $IC_{50}$  değeri 27,274 mM'dır. Sülfonamid grubuna ait tüm maddeler için sığır, koyun ve keçi sütlerinde, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MKL değeri, Sülfadimidin Sodyum için 0,343  $\mu\text{M}$  konsantrasyona eşdeğer iken, Sülfadimidin Sodyum için bulunan  $IC_{50}$  değeri 98,12 mM'dır. Furosemid ve Toldimfos için MKL değeri belirtilmemekle birlikte elde edilen  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla; 2,188 ve 126,31 mM olarak hesaplandı. Hayvansal gıda olarak tüketilen tüm türlerde, Neomisin için MKL değeri sütte 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  iken, bu değer Neomisin Sülfat için 1,698  $\mu\text{M}$ 'a karşılık gelmektedir. Fluniksin türevi için sığır sütlerinde bulunan MKL değeri de 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  iken, Fluniksin Meglumün için bu değer de 0,084  $\mu\text{M}$ 'a karşılık gelmektedir. Fluniksin Meglumün enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etki göstermezken Neomisin Sülfat için bulunan  $IC_{50}$  değeri 24,48 mM'dır (bkz. Tablo 3.43). (-)- Tetramisol HCl (levamisol izomeri) için bulunan  $IC_{50}$  değeri ise 45,48  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, literatürde daha önce levamisol ile yapılan inhibisyon çalışmasıyla da doğrulanmaktadır [131]. Diğer yandan Atropin Sülfat, Oksitetrasiklin HCl, Marbofloksasin, Doksisisiklin Monohidrat ve Tilozin ALP enzim aktivitesini artırırken (Şekil 3.27, 3.33, 3.36, 3.38, 3.39); Dekametazon 21-Undekanoat, Tilmikosin ve Florfenikolün enzim aktivitesini etkilemediği görülmüştür (Şekil 3.31, 3.37, 3.41). Enzim aktivitesini etkilemeyen ve

enzimi aktive eden diğerk etkenlere ait MKL değerleri de IC<sub>50</sub> değerleriyle birlikte belirtilmiştir (bkz. Tablo 3.43). Glikokortikoid sınıfından olan Deksametazon için sütte tespit edilen maksimum kalıntı limiti (bkz. Tablo 3.43), Deceuninck ve arkadaşları tarafından rapor edilen MKL değeri ile de uyuşmaktadır [132].

Gentamisin Sulfat, Metamizol Sodyum, Enrofloksasin, Danofloksasin Mesilat, Kanamisin Sulfat, Sulfadimidin Sodyum, Furosemid, Toldimfos Sodyum ve Neomisin Sulfat için elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri tetramisol (levamisol) ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin daha zayıf olduğu tespit edildi. Ayrıca % enzim aktivitesini yarıya dűşürebilmek için gerekli ilaç inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>), maksimum kalıntı limitinin üstünde olduğundan, süte geçen ilaç kalıntıları, % ALP enzim aktivitesini yarıya dűşüremeden daha az oranlarda inhibe edecektir. Bu durumda bu ilaçların, sütün pastörizasyon işlemine olumsuz etkilerinin bilinen inhibitörüne (levamisol) göre [133] daha az olduğu sonucu çıkarılabilir.

Larry ve arkadaşları, diüretik olarak bilinen [134] furosemidin, hamile sığırların süt bezlerindeki fizyolojik ödemin giderilmesinde kullanıldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca ineklerde furosemid süte geçtiğinden, vücuda verilmesinden itibaren süttten 48 saatlik bir ayrılma süresinin olduğu bildirilmiştir [135] Tavřanlarda *Pasteurella*, *Salmonella* ve *E.Coli* kaynaklı solunum yolu ve bağırsak enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan [136] oksitetrasiklin, ineklerde bronş-akciğer, meme ve rahim iltihaplarının iyileştirilmesinde de kullanılır. Bu nedenle ilaç kalıntılarının sütte de bulunabileceği dűřünölmektedir. Yine hayvanlarda, meme ve rahim iltihaplarıyla birlikte; koksidiyoz (kanlı ishal), aktinobasiloz ve solunum sistemi enfeksiyonları sulfonamid yapısındaki ilaçlar ile tedavi edilmektedir [137]. Aktinobasiloz, geviş getiren hayvanlarda yumuşak dokuların lenf nodüllerinde, gram (-) bakterilerin neden olduğu abseleşme ile karakterize edilen kronik bir enfeksiyonel hastalıktır [138]. Sulfadimidinler, Türkiye’de çiftlik hayvanlarında da kullanılmaktadır [137]. Ek olarak, anti-mikrobiyal danofloksasinin Otero ve arkadaşları tarafından meme iltihaplarında 6 mg/kg terapötik dozda kullanıldığı rapor edilmiştir [139]. İlaveten, danofloksasin, marbofloksasin, tilmikosin ve tilozin için Teblię No: 2011/20’ ye göre sütte tespit edilen maksimum µg/kg kalıntı limitleri (bkz. Tablo 3.43), Vidal ve arkadaşları tarafından rapor edilen MKL değeri ile de

uyuşmaktadır [140]. Marbofloksasin ineklerde meme iltihaplarının iyileştirilmesinde kullanılmaktadır [141]. Avcı ve Elmas, tilozinin *Mycoplasma* ve gram pozitif bakterilerine karşı bakteriyostatik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Tilozin serum ve süt proteinlerine sırasıyla 25–47 % ve 15 % oranlarında bağlanmaktadır. Vücuda verilen tilozinin süte hızla geçtiği ve sütteki konsantrasyonunun, serum konsantrasyonuna göre 5 kat daha fazla olabileceği rapor edilmiştir.

Tilmikosinin sığır ve buzağılarda, zatürreye sebep olan *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumonia* ve *Mycoplasma* türlerine karşı koruyucu ve terapötik amaçlı kullanıldığı rapor edilmiştir [70].

Pastörizasyon işlemi kadar süütün kompozisyonu da endüstriyel açıdan önem arz etmektedir. Süt proteinlerinin oran ve konsantrasyonları, süütün imalata uygun olup olmadığı konusunda büyük oranda etkilidir. Örneğin; ineklerde besin emiliminin azalması ve laktasyon dönemindeki ineklere atropin verilmesi, süt proteinlerinin üretiminde azalmaya neden olduğu gibi aynı zamanda amino asitlerin kan-plazma konsantrasyonlarındaki düşüşü de tetiklemektedir [142]. Diğer yandan, atropin sülfat, veterinerlikte kullanılan preanestetik bir ajan olup, kompetitif asetilkolin esteraz inhibitörü olarak parasempatik etkiye yol açmasıyla, organofosfat ve karbamat insektisitlerine karşı spesifik panzehir özelliği göstermektedir [72]

Amino glikozidik bir antibiyotik olan Gentamisin, mikromonosporlar tarafından sentezlenmektedir. İnsan ve hayvanlarda gram (-) bakterilerin sebep olduğu bakteriyel enfeksiyonların iyileştirilmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Gentamisin, ototoksisite ve nefrotoksisiteye yol açtığından, sütte gentamisin kalıntısının belirlenmesi önemlidir [58]. Ayrıca gentamisin, polar antibiyotik olmasıyla ekstraselüler matrikse dağılımı ve renal filtrasyon mekanizması ile eliminasyonu mümkündür [143].

Florfenikol, veterinerlikte geniş spektrumlu antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Bakteriyostatik (bakteri gelişimini engelleyen) özelliğiyle bakteri hücrelerinde protein sentezini engeller [144]. Florfenikol kalıntısı bulunan sığır, koyun, keçi süt ve yumurtaları ve Doksisisiklin kalıntısı içeren sığır sütlerinin insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmayacağı ve diğer MKL değeri verilmeyen

ilaçlarda ise bu limitin gerekmediği rapor edilmiştir. Furosemidin ise sadece damar içi uygulanmasında kalıntı limiti gerekmemektedir. Levamisol türevi olan Tetramisol ise Tebliğ No: 2011/20 şartnamesinde belirtilmemiştir [59]. Diğer bir kaynağa göre, levamisolün süttten uzaklaşmasında iki günlük bir atılım süresinin süttün korunmasında yeterli olacağı ve maksimum kalıntı limitinin 0,01 ppm olduğu belirtilmiştir [145]. 0,01 ppm birimi 10 µg/kg'a karşılık gelmektedir. (±)-2,3,5,6-Tetrahidro-6-fenilimidazo [2,1-b] tiyazol HCl (tetramisol hidroklorür, TMS), parazitik enfeksiyonların iyileştirilmesinde kullanılan kiral antihelmintik bir ilaçtır. Bileşiğin, levo-izomeri olan ve daha çok levamisol (LMS) aktivitesinin görüldüğü rasemik karışımdan oluştuğu rapor edilmiştir. L-enantiyomer Levamisol birçok ülkede insanlar için antihelmintik ve malign (kötücül) hastalıkları tedavi edici olarak kullanılırken, rasemik form tetramisol ise veteriner ilaç olarak kullanılmaktadır [146]. (S)-Levamisol HCl, insanların kullanımı için onaylanmış antihelmintik bir ilaç gibi farelerde tümör gelişimini engelleyerek anjiyogenetik inhibitör rolü oynamaktadır. Aynı zamanda, farklı kanser türleri için kemoterapi tedavisinde immüno uyarıcı adjuvan olarak işlev görmesinin yanısıra; romatoid artrit (RA, ağrı ve eklem aşınması sebebiyle önemli oranda hareket kaybının görülmesi) iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır [147].

Arslan ve arkadaşları tarafından, fosforik asit türevi olan Toldimfos Sodyum'un (4-dimetil amino-2-metil-fenil-fosfinik asit sodyum tuzu) genç hayvanlarda gelişim ve beslenme ile ilgili rahatsızlıklar için, doğum ve doğum öncesi periyotlara bağlı olarak gelişen hastalıklardan korunma amaçlı ve kemik gelişimi, kasılma, kısmi felç gibi kalsiyum, magnezyum ve fosfor metabolizmalarıyla bağlantılı rahatsızlıkların iyileştirilmesinde kullanıldığı rapor edilmiştir [64]. Örneğin, bağırsaklardan fosfor emiliminin azalmasına bağlı olarak görülen hipofosfatemi hastalığının tedavisinde kullanılan kan pıhtılaştırıcı özelliğe sahip çay bitkisi, kırmızı renkte idrar oluşumunu engeller. Çay bitkisinin yanında hayvanlara alternatif tedavi yöntemi olarak toldimfos sodyum da birlikte verilir [148]. Anti-enfektif profilaksi ve ağrı kesici özelliğe sahip olan metamizol ise doğum sonrası kanamayı önleyici [149] olarak kullanılan non-steroidal anti-enflamatuar ilaç grubuna dahil bir pirazolon türevidir [63]. Metamizol için Tebliğ No: 2011/20' ye göre sütte tespit edilen maksimum kalıntı limiti (bkz. Tablo 3.43), Jedziniak ve arkadaşları tarafından rapor edilen MKL değeri ile de uyuşmaktadır [150].

Prednizolonun sentetik analogu olan deksametazonun da çeşitli hormonal ve metabolik etkileri olan baskın bir anti-enflamatuar terapötik ajan olduğu rapor edilmiştir. Hayvanlar üzerine uygulanan deneysel çalışmalarla da deksametazonun birçok steroidlere göre daha iyi anti-enflamatuar aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Sedef hastalığı, egzama, eklem iltihaplarının yanı sıra katarakt ameliyatından sonra verilmektedir [64]. Hayvanlarda, ödeme bağlı olarak gelişen beyin tümörlerinin iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır [151].

Mitchell tarafından enrofloksasinin gram-pozitif ve gram-negatif patojenik mikroorganizmalara karşı anti-bakteriyel aktivite sergilemesinin yanı sıra intraselüler patojenleri kontrol amaçlı kullanıldığı da rapor edilmiştir [152]. San Martin ve arkadaşlarına göre, sığır sütünde enrofloksasin kalıntısının saptandığı limit 1 ml'de 5 ng olarak tespit edilmiştir [153].

Tetrasiklinler; karaciğer hasarı, dişlerde sararma ve toksik özellikleri sebebiyle gastrointestinal rahatsızlıklara da yol açabilirler. Düşük konsantrasyonlarda bile alerjik reaksiyon verebilirler. Ayrıca uzun periyotlarda tüketimi, mikrobun ilaca direnci ile ilgili problemleri de tetikleyebilir. Bu sebeple tetrasiklinlerin et ve yumurtanın yanı sıra sütteki maksimum kalıntı limitleri de 100 µg/kg olarak rapor edilmiştir [66].

Kanamisin de yaygın olarak kullanılan bir amino glikozid antibiyotik olup hayvanlardan elde edilen gıdalarda kanamisin kalıntısının ciddi yan etkilere sebep olabileceği rapor edilmiştir [154]. Kanamisine spesifik bir sensör ile ilacın sütteki kalıntısı tespit edilmiştir [155]. Yine amino glikozid antibiyotik olan neomisin kalıntısına inek sütünde rastlanması, laktasyon döneminde iken hayvanın süt bezlerine neomisin sülfat infüze edilmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [156].

Süt bezlerinde oluşan iltihaplar için antibiyotik terapiyi tamamlayıcı olarak fluniksin megluminin de kullanıldığı rapor edilmiştir. Fluniksin, non-narkotik analjezik olmasının yanı sıra ateş düşürücü özelliğe de sahiptir. Veterinerlikte fluniksin daha çok fluniksin meglumin çözünür formunda kullanılır. İlacın kullanım sürecinde ve uygulandığından itibaren 24 veya 36 saat içerisinde tüketime sunulmaması gerektiği rapor edilmiştir [62]. Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

1) Enzimin sütün izolasyonunda en uygun organik çözücü tespit edilerek optimizasyon çalışmasının yapılmıştır,

2) Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının tespit edilmesiyle elde edilen çökelek ile maya örnekleri JFK'dan geçirilerek ölçülen enzim aktiviteleri ve saflaştırma dereceleri karşılaştırılmıştır. Enzimin maya numunelerinde sütün daha iyi ayrıldığı tespit edilmiştir,

3) Doğal jel elektroforezi (Native-PAGE) ve SDS-PAGE elektroforezleri ile enzimin her bir numunedeki yaklaşık moleküler ağırlığının tespit edilmiştir,

4) Optimum şartlarda enzimin p-nitrofenil fosfat substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunmuştur,

5) Enzimin farklı veteriner ilaçlara karşı ilgisi araştırılarak ilaç etkenlerine ait  $IC_{50}$  değerlerinin bulunmuş ve enzim üzerinde inhibisyon etki gösteren ilaçların enzimin poten inhibitörü levamisole göre zayıf inhibitörü belirlenmiştir,

6) Tespit edilen  $IC_{50}$  değerleri, Türk Gıda Kodeksinde (Tebliğ No: 2011/20) belirtilen ilaçlara ait maksimum kalıntı limitleriyle karşılaştırılmıştır.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] Muehlhoff, E., Bennett, A. and McMahon D. (Eds.), *Milk and dairy products in human nutrition*, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2013).
- [2] Ünal, R. N. ve Besler, H. T., *Beslenmede Sütün Önemi*, Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara: Klasmat, (2008).
- [3] Lacroix, M., Léonil, J., Bos, C., Henry, G., Airinei, G., Fauquant, J., et al., “Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [15N] Milk Protein Measured in Rats”, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1508-1517, (2006).
- [4] Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi (Megep), “Gıda Teknolojisi, Pastörize ve Sterilize İçme Sütü, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı”, Rapor No: 541G10015, Ankara, (2007).
- [5] Holsinger, V. H., Rajkowski, K. T. and Stabel, J. R., “Milk pasteurisation and safety: a brief history and update”, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (2), 441-451, (1997).
- [6] Food and Drug Administration, “Grade ‘A’ Pasteurized Milk Ordinance”, USA: U.S. Department of Health and Human Services, (2009).
- [7] Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., Lopez-Hernandez, A., “Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization”, *J Dairy Sci.*, 93(12), 5538-51, (2010).

- [8] Vamvakaki, A.-N., Zoidou, E., Moatsou, G., Bokari, M. and Anifantakis, E., “Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk”, *Small Ruminant Research*, 65, 237-241, (2006).
- [9] Orimo, H., “The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease, Review”, *J Nippon Med Sch*, 77(1), (2010).
- [10] Fenoll, J., Jourquin, G., and Kauffmann, J.-M., “Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products”, *Talanta*, 56, 1021–1026, (2002).
- [11] Fox, P. F. and Kelly, A. L., “Indigenous Enzymes in Milk: Overview and Historical Aspects-Part 2, Review”, *International Dairy Journal*, 16, 517-532, (2006).
- [12] Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F. and Wan, J., “Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 217-223, (2008).
- [13] Jenkins, T. C. and McGuire, M. A., “Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition”, *J. Dairy Sci.*, 89, 1302–1310, (2006).
- [14] Şenel, E., “Sütün Nitelikleri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi”, (15 Ocak 2015), [www.agri.ankara.edu.tr](http://www.agri.ankara.edu.tr).
- [15] Bylund, G., *Dairy Processing Handbook/Chapter 2- The chemistry of milk*, Teknotext AB (Ed.), Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, (1995).
- [16] Bremel, R. D., course notes, University of Wisconsin, (25 Ocak 2015), [http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milksynth\\_proteinbiochem.html](http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milksynth_proteinbiochem.html).

- [17] Houlihan, A. V., *Chapter 5 - Enzymatic Activity Other Than Lipase*, Australia: International Food Institute of Queensland, Department of Primary Industries.
- [18] Hatayama, K., Nishihara, Y., Kimura, S., Goto, K., Nakamura, D., Wakita A., et al., “Alkaline phosphatase isoenzymes in Mouse plasma detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis”, *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(2), 211-219, (2011).
- [19] Bihani, S. C., Das, A., Nilgiriwala, K. S., Prashar, V., Pirocchi, M., Apte, S. K., et al., “X-Ray Structure Reveals a New Class and Provides Insight into Evolution of Alkaline Phosphatases”, *Plos One*, 6(7), e22767, (2011).
- [20] Zalatan, J. G., Fenn, T. D. and Herschlag, D., “Comparative Enzymology in the Alkaline Phosphatase Superfamily to Determine the Catalytic Role of an Active-Site Metal Ion”, *J. Mol. Biol.*, 384, 1174–1189, (2008).
- [21] Vega-Warner, A. V., Wang, C.-H., Smith, D. M. and Ustunol, Z., “Milk Alkaline Phosphatase Purification and Production of Polyclonal Antibodies”, *Journal of Food Science*, 64(4), (1999).
- [22] Cox, W. G. and Singer, V. L., “A High-resolution, Fluorescence-based Method for Localization of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity”, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(11), 1443–1455, (1999).
- [23] Marchand, S., Merchiers, M., Messens, W., Coudijzer, K., and Block, J. D., “Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk”, *International Dairy Journal*, 19, 763-767, (2009).
- [24] Wilinska A., Bryjak, J., Illeova, V. and Polakovic, M., “Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer”, *International Dairy Journal*, 17, 579-586, (2007).

- [25] Payne C. and Wilbey, R. A., “Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of fluorophos and colourimetric procedures”, *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00503.x, (2009).
- [26] Cassidy, S., Daly, C., Early J. and Rowe, M. T., “Alkaline phosphatase activity in United Kingdom cheeses made from bovine pasteurised milk”, *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), doi: 10.1111/1471-0307.12115 (2014).
- [27] Fadiloğlu, S., Erkmén, O. and Şekeroğlu, G., “Thermal and carbon dioxide inactivation of alkaline phosphatase in buffer and milk”, *Food Technol. Biotechnol.*, 42(1), 27-32, (2004).
- [28] Schmidt, R. H. and Davidson, P. M., “Milk Pasteurization and the Consumption of Raw Milk in the United States, International Association for Food Protection (IAFP) Position Statement”, *Food Protection Trends*, (2008).
- [29] [www.gbiosciences.com / ResearchProducts / PhosphataseAssay - desc.aspx](http://www.gbiosciences.com / ResearchProducts / PhosphataseAssay - desc.aspx), (10 Şubat 2015).
- [30] Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. and Rege, D. V., *Handbook of Indices of food quality and authenticity*, England: Woodhead Publishing Series in Food Science and Technology, (1997).
- [31] Aschaffenburg, R., and Mullen, J. E. C. “A rapid and simple phosphatase test for milk”, *Journal of Dairy Research*, 16, 58–67, (1949).
- [32] Serra, B., Morales, M. D., Reviejo, A. J., Hall, E. H. And Pingarrón, J. M., “Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor”, *Analytical Biochemistry*, 336, 289-94, (2005).

- [33] Dhaked, R. K., Alam, S. I., Dixit, A. and Singh, L., “Purification and characterization of thermo-labile alkaline phosphatase from an Antarctic psychrotolerant *Bacillus* sp. P9”, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 855–861, (2005).
- [34] Temelli, Ö., “Primer ve sekonder akciğer adeno kanser vakalarında; alkalin fosfataz, sitokeratin 7, sitokeratin 8 immünositokimyasal bulgularının değerlendirilmesi”, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale Üniversitesi*, (2006).
- [35] Cho-Ngwa, F., Mbua, E. N., Nchamukong, K. G., Titanji, V.P.K., “Detection, purification and characterisation of a secretory alkaline phosphatase from *Onchocerca* species”, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 156, 136–143, (2007).
- [36] Yorganci, E. and Akyilmaz, E., “Alkaline Phosphatase Based Amperometric Biosensor Immobilized by Cysteamine-Glutaraldehyde Modified Self-Assembled Monolayer”, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 39, 317–323, (2011).
- [37] Nalbantoğlu, A., Ovalı F. and Nalbantoğlu, B., “Alkaline phosphatase as an early marker of hemolysis in newborns”, *Pediatrics International*, 53, 936–938, (2011).
- [38] Abramowitz, M., Muntner, P., Coco, M., Southern, W., Lotwin, I., Hostetter, T. H., et al., “Serum Alkaline Phosphatase and Phosphate and Risk of Mortality and Hospitalization”, *Clin J Am Soc Nephrol*, 5, 1064–1071, (2010).
- [39] Kaatz, M., Schulze, H., Ciani, I., Lisdat, F., Mount, A. R. and Bachmann, T. T., “Alkaline phosphatase enzymatic signal amplification for fast, sensitive impedimetric DNA detection”, *Analyst*, 137, 59, (2012).

- [40] Van Dyk, J. S., Pletschke, B., “Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment”, *Chemosphere*, 82, 291–307, (2011).
- [41] Yalçın, E., Maraş, M. and Çavuşoğlu, K., “Kurşun ve civa ağır metal iyonlarının albino farelerde canlı ağırlık ve serum alkalin fosfataz düzeyi üzerine etkisi”, *BAÜ FBE Dergisi*, 9(1), 61-67, (2007).
- [42] Bobyr, E., Lassila, J. K., Wiersma-Koch, H. I., Fenn, T. D., Lee, J. J., Nikolic-Hughes, I., et al., “High-Resolution Analysis of Zn<sup>2+</sup> Coordination in the Alkaline Phosphatase Superfamily by EXAFS and X-ray Crystallography”, *J. Mol. Biol.*, doi:10.1016/j.jmb.2011.10.040, (2011).
- [43] Chena, Q.-X., Zhenga, W.-Z., Lina, J.-Y., Shia, Y., Xieb, W.-Z. and Zhou, H.-M., “Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 879-885, (2000).
- [44] O’Keefe, R. B., & Kinsella, J. E., “Alkaline phosphatase from bovine mammary tissue: Purification and some molecular and catalytic properties”, *International Journal of Biochemistry*, 10, 125–134, (1979).
- [45] Hamilton, T. A., Gornicki, S. Z., and Sussman, H. H., “Alkaline phosphatase from human milk. Comparison with isoenzymes from placenta and liver”, *Biochemical Journal*, 177, 197–201, (1979).
- [46] Coleman, J., “Structure and mechanism of alkaline phosphatase”, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 441–483, (1992).
- [47] Stec, B., Holtz, K. M. and Kantrowitz, E. R., “A Revised Mechanism for the Alkaline Phosphatase Reaction Involving Three Metal Ions”, *J. Mol. Biol.*, 299, 1303-1311, (2000).

- [48] Guerra, E., Verardo, V. and Caboni, M. F., “Determination of bioactive compounds in cream obtained as a by-product during cheese-making: Influence of cows' diet on lipid quality”, *International Dairy Journal*, 42, 16-25, (2015).
- [49] Givens, D. I., “Symposium on “The challenge of translating nutrition research into public health nutrition’ Session 4: Challenges facing the food industry in innovating for health Impact on CVD risk of modifying milk fat to decrease intake of SFA and increase intake of cis-MUFA”, *Proceedings of the Nutrition Society*, 67, 419–427, (2008).
- [50] Contarini, G. and Povolo, M., “Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies, Review”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 2808-2831, (2013).
- [51] Evers, J. M., Haverkamp, R. G., Holroyd, S. E., Jameson, G. B., Mackenzie, D.D.S. and McCarthy, O. J., “Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques”, *Int. Dairy J.*, 18, 1081–1089, (2008).
- [52] Argov-Argaman, N., Mida, K., Cohen, B.-C., Visker, M., and Hettinga, K., “Milk fat content and DGAT1 genotype determine lipid composition of the milk fat globule membrane”, *PLoS One*, 8, e68707, (2013).
- [53] Graves, E. L. F., Beaulieu, A. D., and Drackley, J. K., “Factors affecting the concentration of sphingomyelin in bovine milk”, *Journal of Dairy Science*, 90, 706-715, (2007).
- [54] Palmquist, D. L., and Schanbacher, F. L., “Dietary fat composition influences fatty acid composition of milk fat globule membrane in lactating cows”, *Lipids*, 26, 718e722, (1991).

- [55] Mesilati-Stahy, R., and Argov-Argaman, N., “The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage”, *Food Chemistry*, 145, 562-570, (2014).
- [56] Michalski, M. C., Leconte, N., Briard-Bion, V., Fauquant, J., Maubois, J. L. and Goudédranche, H., “Microfiltration of Raw Whole Milk to Select Fractions with Different Fat Globule Size Distributions: Process Optimization and Analysis”, *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3778-3790, (2006).
- [57] Rola, J. G. and Sosnowski, M. “Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Milk and Milk Products by Fluorimetric Method”, *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 537-542, (2010).
- [58] Yu, T., Ho, J., Chan, C-C, Chan, K.-H., Wang, Y.-C., Lin, J.-T., et al., “Development of a novel bead-based 96-well filtration plate competitive immunoassay for the detection of Gentamycin”, *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 126–132, (2013).
- [59] Türk Gıda Kodeksi, Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Veteriner İlaçlarına ait Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2011/20, (2011).
- [60] Sadeghi, S., Fathi, F. and Abbasifar, J., “Potentiometric sensing of levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymer”, *Sensors and Actuators B*, 122, 158–164, (2007).
- [61] Dörücü, M., İspir, Ü. ve Türk, C., “Levamisolün Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W)’nın Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin Araştırılması”, *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (2), 405-411, (2005).



- [62] Jedziniak, P., Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., Smulski, S., Kaczmarowski, M. and Zmudzki, J., “Identification of flunixin glucuronide and depletion of flunixin and its marker residue in bovine milk”, *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 36, 571—575, (2013).
- [63] González-Lobato, L., Real, R., Herrero, D., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Marqués, M. M., Álvarez, A. I. And Merino, G., “Novel in vitro systems for prediction of veterinary drug residues in ovine milk and dairy products”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31:6, 1026-1037, (2014).
- [64] Erpek, S., Kılıç, N., Kozacı, D., Dikicioğlu, E. and Kavak, T., “Effects of flunixin meglumine, diclofenac sodium and metamizole sodium on experimental wound healing in rats”, *Revue Méd. Vét.*, 157, 4, 185-192, (2006).
- [65] Arslan, M., Gencer, N., Arslan, O. and Guler, O. O., “Research Article, In vitro efficacy of some cattle drugs on bovine serum paraoxonase 1 (PON1) activity”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(5): 722–729, (2012).
- [66] Nebot, C, Guarddon, M., Seco, F., Iglesias, A., Miranda, J. M., Franco, C. M., et al., “Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS”, *Food Control*, 46, 495–501, (2014).
- [67] Serrano, J. M. and Silva, M., “Research Article, Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine milk by MEKC with LIF detection”, *Electrophoresis*, 27, 4703–4710, (2006).
- [68] Jiang, W., Beloglazova, N. V., Wang, Z., Jiang, H., Wen, K., de Saeger, S., et al., “Development of a multiplex flow-through immunoaffinity chromatography test for the on-site screening of 14 sulfonamide and 13 quinolone residues in milk”, *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 124–128, (2015).

- [69] Nowara, A., Burhenne, J. and Spiteller, M., “Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivatives to Clay Minerals”, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1459–1463, (1997).
- [70] Avci, T. and Elmas, M., “Research Article, Milk and Blood Pharmacokinetics of Tylosin and Tilmicosin following Parenteral Administrations to Cows”, *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 869096, 1-6, (2014).
- [71] Sulyok, K. M., Kreizinger, Z., Fekete, L., Hrivnák, V., Magyar, T., Jánosi, S., et al., “Research article, Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary”, Central Europe, *BMC Veterinary Research*, 10, 256, (2014).
- [72] Mohammad, F. K., Abachi, F. T., Alias, A. S., Al-Attar, M. Y., A-Sawah, T. A. and Al-Talib, T. A., “Preparation and Evaluation of Veterinary 0.1% Injectable Solution of Atropine Sulphate”, *Vet. World*, 5(3), 145-149, (2012).
- [73] Özer, N., Müftüoğlu, M., Ataman, D., Ercan, A., Ögüs, I. H., “Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 39: 153–159, (1999).
- [74] Inouye M., “Effect of Acetone on Alkaline Phosphatase Activity”, *J Biochem*, 54(2), 138-145, (1963).
- [75] Căpriță R. and Căpriță A., “Comparative Study on Milk Casein Assay Methods”, *Zootehnie si Biotehnologii*, 41(1), (2008).
- [76] Gençer, N., Arslan, O., “Paraoksonaz Q ve R İzoenzimlerinin Saflaştırılması ve Bazı Çevre Kirleticilere Karşı Afinitesinin Araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir, (2008).

- [77] Casal, E., Corzo, N., Moreno, F. J. and Olano, A., “Selective Recovery of Glycosylated Caseinmacropeptide with Chitosan”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1201-1204, (2005).
- [78] Ausar, S. F., Bianco, I. D., Badini, R. G., Castagna, L. F., Modesti, N. M., Landa, C. A., et al., “Characterization of Casein Micelle Precipitation by Chitosans”, *J. Dairy Sci.*, 84, 361–369, (2001).
- [79] Kuzuya, Y., Kanamaru, Y. and Tanahashi, T., “Partial Purification and Some Properties of Bovine Milk Alkaline Phosphatase”, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51(7), 501-510, (1980).
- [80] O’Fagain, C., Cummins P. M. and O’Connor, B. F., “Gel Filtration Chromatography, Methods in Molecular Biology”, 681, 25-33, (2011).
- [81] Arslan, O., *Biyomoleküller, Teori ve Uygulamalarıyla*, Balıkesir: Onur Ltd, Şti., (2003).
- [82] Stanton, P., “Gel Filtration Chromatography, HPLC of Peptides and Proteins Methods in Molecular Biology™” 251, 55-73, (2004).
- [83] Chen, H. T., Xie, L. P., Yu, Z.-Y., Xu, G.-R. and Zhanga, R.-Q., “Chemical modification studies on alkaline phosphatase from pearl oyster (*Pinctada fucata*): a substrate reaction course analysis and involvement of essential arginine and lysine residues at the active site”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 1446–1457, (2005).
- [84] Dinnellaa, C., Monteleone, E., Farenga, M. F. and Hourigan, J. A., “The use of enzymes for thermal process monitoring: modification of milk alkaline phosphatase heat resistance by means of an immobilization technique”, *Food Control*, 15, 427–433, (2004).

- [85] Bradford M.cM., “A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, 248–251, (1976).
- [86] Laemmli, D. K., “Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriohhoge T4”. *Nature*, 227, 680, (1970).
- [87] Morton R. K., “Alkaline Phosphatase of Milk Association of the Enzyme with a Particulate Lipoprotein Complex”, Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, 55, (1953).
- [88] Belitz, H.-D., Grosch, W. and Schieberle, P., *Food Chemistry*, 4th Revised and Extended Edition, Berlin: Springer, (2009).
- [89] Yamauchi, K., Chen, C.-M. and Tsugo, T., “Studies on Destabilization of Caseinate Complex during Frozen Storage of Milk Part I. Destabilization of Caseinate Complex and Some Associated Changes during Frozen Storage of Skim Milk”, *Agr. Biol. Chem.*, 31(5), 581-588, (1967).
- [90] Guo, C., Campbell, B. E., Chen, K., Lenhoff, A. M., Velez, O. D., “Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 297-307, (2003).
- [91] Delben, F. and Stefancich, S., “Interaction of Food Proteins with Polysaccharides, I. Properties upon Mixing”, *Journal of Food Engineering*, 31, 325-246, (1997).
- [92] Hidalgo, M. E., Riquelme, B. D., Alvarez, E. M., Wagner, J. R. and Risso, P. H., “Acid-Induced Aggregation and Gelation of Bovine Sodium Caseinate-Carboxymethylcellulose Mixtures”, (ed: Valdez, B.), *Food Industrial Processes-Methods and Equipment, Chapter-6*, 905-9, (2012).

- [93] Tomasula, P. M., Parris, N., Yee, W. and Coffin, D., "Properties of Films Made from CO<sub>2</sub>-Precipitated Casein", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4470-4474, (1998).
- [94] Ausar, S. F., Bianco, I. D., Castagna, L. F., Alasino, R. V., Narambuena, C. F., Leiva, E. P., et al., "Reversible Precipitation of Casein Micelles with a Cationic Hydroxyethylcellulose", *J. Agric. Food Chem.*, 53(23), 9031-9038, (2005).
- [95] Zhao, J., Liu, Y., Sun, W.-B. and Zhang, H., "Review, Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry", *Chemistry Central Journal*, 5:40, (2011).
- [96] Bingham, E. W., Farrell Jr., H. M. and Carroll, R. J., "Properties of Dephosphorylated  $\alpha$ 1-Casein. Precipitation by Calcium Ions and Micelle Formation", *Biochemistry*, 11(13), 2450-2454, (1972).
- [97] Amos, L. M., "Enzymes from yeast adjuncts in proteolysis during cheddar cheese ripening", Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, Master Thesis, Faculty of Agricultural and Natural Science, at the University of the Free State, Bloemfontein, South Africa, (2007).
- [98] Kethireddipalli, P., Hill, A. R. and Dalgleish, D. G., "Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation", *International Dairy Journal*, 20, 838-843, (2010).
- [99] McKenzie, H. A. (Ed.), *Milk Proteins, Chemistry and molecular biology*, 2. Cilt, New York: Academic Press, Inc., (1971).
- [100] Küçüköner, E., "Peynir ve Yoğurt Oluşum Mekanizması, Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri", Ankara, (2011).

- [101] Hui, Y. H. (Ed), *Handbook of food science, technology and engineering*, 4 Volume set, New York: Taylor & Francis Group, (2005).
- [102] Laht, T.-M., *Rennet coagulation of milk*, Tallinn University of Technology, (1918).
- [103] Tamime, A. Y. (Ed.), *Brined Cheeses, Society of Dairy Technology*, USA: Blackwell Publishing, (2006).
- [104] Vasbinder, A. J., *Casein - whey protein interactions in heated milk*, ISBN 90-393-3194-4, (2002).
- [105] Ninios, A. I., “Alkaline phosphatase activity in Finnish hard cheeses and milk products”, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, Helsinki, (2013).
- [106] Keskinėge, A., Sunguroğlu, K., “Purification of Placental Alkaline Phosphatase and Investigation of Kinetic Properties of the Enzyme”, Medical Faculty”, Ankara University, 52(3), (1999).
- [107] Zhang, F., Wolff, M. W., Williams, D., Busch, K., Sybi, C., Lang, S. C., et al., “Affinity Purification of Secreted Alkaline Phosphatase Produced by Baculovirus Expression Vector System”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 90, (2001).
- [108] Linden, G. and Alais, C., “Alkaline phosphatase in human, cow and sheep milks: Molecular and catalytic properties and metal ion action”, *Ann. Biol. anim Bioch. Biophys.*, 18(3), 749-758, (1978).
- [109] Peereboom J. W. C., “Studies on alkaline milk phosphatase. II. Occurrence of various phosphatase isoenzymes in dairy products”, *Neth. Milk. Dairy J.*, 22, 137-152, (1968).

- [110] Buruiana L. M. and Dema A., “Separation, polymorphism and kinetics of the cow milk phosphatase”, *Rev. roum. Biochim.*, 6, 275-282, (1969).
- [111] Chuang, N.N. and Yang, B.C., “A comparative study of alkaline phosphatases among human placenta, bovine milk, hepatopancreases of shrimp *Penaeus monodon* and clam *Meretrix lusoria*: To obtain an alkaline phosphatase with improved characteristics as a reporter”, *Comp. Biochem. Physiol.*, 96(4), 787-789, (1990).
- [112] Levinson, S. R. and Ellory, J. C., “The molecular form of acetylcholinesterase as determined by irradiation inactivation (Short Communication)”, *Biochem J.*, 137(1), 123–125, (1974).
- [113] Schrader, T., Rienhöfer, A. and Andreesen, J. R., “Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri*”, *Eur. J. Biochem.*, 264, 862-871, FEBS, (1999).
- [114] McSweeney, P.L.H. and Fox, P. F. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1A, Proteins: Basic Aspects*, 4th edition, New York: Springer, (2013).
- [115] Nisimoto, Y., Wilson, E., Heyl, B. L. and Lambeth, J. D., “NADH Dehydrogenase from Bovine Neutrophil Membranes, Purification and Properties”, *The Journal of Biological Chemistry*, 261(1), 285-290, (1986).
- [116] Chakraborty, S., Sakka, M., Kimura, T. and Sakka, K., “Two Proteins with Diaphorase Activity from *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (3), 877–879, (2008).
- [117] Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F. and Zhang H., “Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*”, *J Dairy Sci.*, 91(5), 1751-8, (2008).

- [118] Li, B., Wang, Z., Li, S., Donelan, W., Wang, X., Cui, T. et al., "Research article, Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*", *BMC Biotechnology*, 13:73, (2013).
- [119] Carsten, M. E. and Miller, J. D. (Eds.), *Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects*, New York: Plenum Pres, (1990).
- [120] Nisimoto, Y., Tamura, M. and Lambeth, J. D., "A Menadione-stimulated Pyridine Nucleotide Oxidase from Resting Bovine Neutrophil Membranes, Purification, properties, and immunochemical cross-reactivity with the human neutrophil nadph oxidase", *The Journal of Biological Chemistry*, 263(24), 11657-11663, (1988).
- [121] Dornand, J., Bonnafous, J.-C. and Man, J.-C., "Purification and Properties of 5'-Nucleotidase from Lymphocyte Plasma Membranes", *Eur. J. Biochem.* 87, 459-465, (1978).
- [122] Cardenal, A., Masuda, I., Haas, A. L. and Mccarty, D. J. "Specificity of a Porcine 127-kd Nucleotide Pyrophosphohydrolase for Articular Tissues", *Arthritis & Rheumatism*, 39(2), 245-251, (1996).
- [123] Fox, P. F. and McSweeney, P.L.H., *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B*, New York: Kluwer Academic/Plenum, (2003).
- [124] Moss, D. W., Eaton, R. H., Smith, J. K. and Whitby, L. G., "Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations", *Biochem J.*, 102(1), 53-57, (1967).
- [125] London, J., Hausman, S. Z. and Thompson, J., "Characterization of a Membrane-Regulated Sugar Phosphate Phosphohydrolase from *Lactobacillus casei*", *Journal of Bacteriology*, 951-956, (1985).



- [126] John R. Whitaker, Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S., *Handbook of Food Enzymology*, New York: Marcel Dekker, (2003).
- [127] Njoku, V. O., Chikezie, P. C. and Kaoje, A. M., Kinetic studies of alkaline phosphatase extracted from rabbit (*Lepus townsendii*) liver, *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3157-3162, (2011).
- [128] Swargiary, A., Roy, B. and Ronghang, B., Partial characterisation of alkaline phosphatase in *Fasciolopsis buski* – an intestinal fluke treated with crude extract of *Alpinia nigra* (Zingiberaceae), *Herbert Open Access Journals, Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research*, doi: 10.7243/2050-120X-2-5, (2013).
- [129] Ahn, Y. S., Snow, L. D., Selective extraction of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase from milk fat globule membranes by a single phase n-butanol procedure, *Prep Biochem.*, 23(3), 409-19, (1993).
- [130] Morton, R. K., He substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases of cow's milk and intestinal mucosa, *Biochem J.*, 61(2), 232-240, (1955).
- [131] Khodaparast-Sharifi, S. H., Snow L. D., "Levamisole inhibition of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase of bovine milk fat globule membranes", *Int J Biochem.*, 21(4), 401-5, (1989).
- [132] Deceuninck, Y., Bichon, E., Monteau, F., Dervilly-Pinel, G., Antignac, J. P. And Le Bizec, B., "Fast and multiresidue determination of twenty glucocorticoids in bovine milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1294, 76– 86, (2013).

- [133] Bingham, E. W., Malin, E. L., “Alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary gland and the milk fat globule membrane. Release by phosphatidylinositol-specific phospholipase C”, *Comparative Biochemistry and Physiology. B*, 102(2), 213-218, (1992).
- [134] Evans, E. F. and Klinke, R., “The Effects of Intracochlear and Systemic Furosemide on the Properties of Single Cochlear Nerve Fibres in the Cat”, *J. Physiol.*, 331, 409-427, (1982).
- [135] Stanker, L. H., Muldoon, M. T., Buckley, S. A., Braswell, C., Kamps-Holtzapfle, C. and Beier, R. C., “Development of a Monoclonal Antibody-Based Immunoassay To Detect Furosemide in Cow’s Milk”, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2455-2459, (1996).
- [136] Villa R., Cagnardi P., Bacchetta S., Sonzogni O., Faustini M., Carli S., “Tissue Distribution and Residue Depletion of Oxytetracycline in the Rabbit”, *World Rabbit Science*, 9(4), 159-164, (2001).
- [137] Oruç, H. H. and Sonal, S., “Determination of Oxytetracycline, Penicillin G and Sulphadimidine Residues in Cow Milks in Bursa”, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 24, 1-2-3-4: 11-13, (2005).
- [138] Angelo, P., Alessandro, S., Noemi, R., Giuliano, B., Filippo, S., and Marco, P., “An atypical case of respiratory actinobacillosis in a cow”, *J Vet Sci.*, 10(3), 265-267, (2009).
- [139] Otero, J. A., Barrera, B., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Marqués, M., Álvarez, A. I., et al., “Short communication: The gain-of-function Y581S polymorphism of the ABCG2 transporter increases secretion into milk of danofloxacin at the therapeutic dose for mastitis treatment”, *Journal of Dairy Science*, 98(1), 312–317, (2015).

- [140] Vidal, J.L.M., Frenich, A. G., Aguilera-Luiz, M. M. and Romero-González, R., “Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry”, *Anal Bioanal Chem*, 397, 2777–2790, (2010).
- [141] Pillet, F., Montreuil, C., Roy, O., Grandemange, E. and Woehrle, F., “Field experience with a single intravenous injection of marbofloxacin 16% in lactating dairy cows with acute clinical mastitis”, 164(12), 537-545, (2013).
- [142] Auldist, M. J., Menzies, C. M. and Prosser, C. G., “Effects of atropine on plasma amino acid profiles and on the synthesis of individual milk proteins in dairy cows fed with pasture”, *Journal of Dairy Research*, 70, 373–378, (2003).
- [143] Martin-Jimenez, T., Riviere, J. E., “Mixed effects modeling of the disposition of gentamicin across domestic animal species”, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 24, 321-332, (2001).
- [144] Power, C., Sayers, R., Danaher, M., Moloney, M., O'Brien, B., Furey, A., et al., “Investigation of the persistence of florfenicol residues in bovine milk and fate during processing”, *International Dairy Journal*, 39, 270-275, (2014).
- [145] Crosby, N. T., “Determination of veterinary residues in food”, *Woodhead Publishing Series in Food Science and Technology*, (1997).
- [146] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Santi, M., Massolini, G., Blaschke, G., “Enantioseparation of tetramisole by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography and application of these techniques to enantiomeric purity determination of a veterinary drug formulation of L-levamisole”, *J. Sep. Sci.*, 25, 733–740, (2002).

- [147] Hansen, A. N., Bendiksen, C. D., Sylvest, L., Friis, T., Staerk, D., Jørgensen, F.S., et al., Synthesis and Antiangiogenic Activity of N-Alkylated Levamisole Derivatives, *Plos One*, 7(9), e45405, (2012).
- [148] Durrani, A. Z., Kamal, N., Shakoori, A. R. and Younus, R. M., “Research Article, Prevalence of post parturient haemoglobinuria in buffalo and therapeutic trials with toldimfos sodium and tea leaves in Pakistan”, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 34(1), 45-51, (2010).
- [149] Diogene, E., Aragon, C., Vidal, X. and Laporte, J. R., “Multicenter Study on the Use of Drugs During Pregnancy in Spain 4. the Drugs Used During Lactancy”, *Medicina Clinica*, 98(19), 726-730, (1992).
- [150] Jedziniak, P., Szprengier-juszkiewicz, T. and Olejnik, M., “Multi-residue screening method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in cow’s milk with HPLC-UV and its application to meloxicam residue depletion study”, *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 731-739, (2009).
- [151] Heiss, J. D., Papavassiliou, E., Merrill, M. J. Nieman, L., Knightly, J. J. and Walbridge, S., “Mechanism of Dexamethasone Suppression of Brain Tumor-associated Vascular Permeability in Rats, Involvement of the Glucocorticoid Receptor and Vascular Permeability Factor”, *The Journal of Clinical Investigation*, 98(6), 1400–1408, (1996).
- [152] Mitchell, M. A., “Therapeutic Review, Enrofloxacin”, *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15(1), 66-69, (2006).
- [153] San Martin, A., Canon, H. and Iraguen, D., “A fast assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk by high performance liquid chromatography”, *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33(1), 115-124, (2001).

- [154] Zhou, N. D., Luo, J. B., Zhang, J, You, Y.D., and Tian, Y. P., “A label-free electrochemical aptasensor for the detection of kanamycin in milk”, *Analytical Methods*, 7(5), 1991-1996, (2015).
- [155] Li, F. L., Guo, Y. M., Sun, X. and Wang, X. Y., “Aptasensor based on thionine, graphene-polyaniline composite film, and gold nanoparticles for kanamycin detection”, *European Food Research and Technology*, 239(2), 227-236, (2014).
- [156] Heller, D. N., Clark, S. B. and Righter, H. F., “Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry”, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 39–49, (2000).