

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



**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**BESTE ŞİPAL**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

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



**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**BESTE ŞİPAL**

**Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (Tez Danışmanı)  
Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU (Eş Danışman)  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN  
Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN  
Doç. Dr. Nahit GENCER  
Yrd. Doç. Dr. Arzu GÜMÜŞ  
Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Beste ŞİPAL** tarafından hazırlanan “**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20.06.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

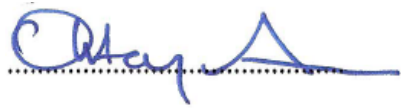
Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK



Eş Danışman  
Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU



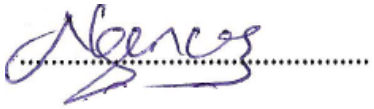
Üye  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye  
Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN



Üye  
Doç. Dr. Nahit GENCER



Üye  
Yrd. Doç. Dr. Arzu GÜMÜŞ



Üye  
Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

## ÖZET

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI  
BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
DOKTORA TEZİ  
BESTE ŞİPAL  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR SEMRA IŞIK)  
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. SERAP UZUNOĞLU)  
BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

Laktoperoksidaz (LPO) enzimi (E.C.1.11.1.7) memelilerin sütünde, gözyaşında ve tükürüğünde bulunan, prostetik grup olarak hem grubu içeren bir glikoproteindir.

Bu çalışmada sığır laktoperoksidaz (LPO) enzimini saflaştırmak için yeni bir afinite jeli sentezlendi. CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriksi üzerine uzantı kolu olarak etilendiamin bağlandı ve ligand olarak enzimin inhibitörü olan 4-izotiyosiyonat benzen sulfonamid kullanıldı. Sentezlenen bu afinite jeli ile sığır sütünden LPO enzimi saflaştırılmıştır.

Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve 80 kDa civarında tek bant elde edilmiştir. Saf enzimin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) Lineweaver-Burk yöntemi ile saptanmıştır.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,4 mM ve 1000 U/mL'dak. olarak belirlenmiştir.

Farklı iyonik şiddet, pH ve sıcaklıklarda kolon şartları incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda optimum şartlar şu şekilde belirlenmiştir; iyonik şiddet için dengeleme ve yıkama tamponunda  $Na_2SO_4$  içermeyen, bağlanmanın en iyi olduğu pH 6 ve sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir..

Bazı veteriner ilaçları ve tarımda kullanılan bazı pestisitlerin enzim üzerindeki etkileri incelenmiş, inhibisyon gösteren bileşikler için  $IC_{50}$  değerleri saptanmıştır. Bu değerlere bakıldığında, pestisitlerin ve veteriner ilaçları türevlerinin tamamı LPO enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Laktoperoksidaz enzimi, glikoprotein, afinite kromatografisi, veteriner ilacı, pestisit, inhibisyon, ligand, aktivite.

## ABSTRACT

### PURIFICATION OF LACTOPEROXIDASE ENZYME AND INVESTIGATION EFFECTS OF SOME COMPOUNDS ON THIS ENZYME

PH.D THESIS

BESTE ŞİPAL

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SEMRA IŞIK )

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SERAP UZUNOĞLU )

BALIKESİR, JUNE 2016

Lactoperoxidase (LPO; E.C.1.11.1.7) is a glycoprotein which presents in mammalian milk, tear, and saliva, which contains prosthetic heme group.

In this study, a new affinity gel was synthesized to purify bovine lactoperoxidase (LPO) enzyme. Ethylenediamine was bound to CNBr-activated Sepharose-4B matrix as a spacer arm, and 4-izotiyosiyonat benzenesulfonamide which is an inhibitor of the enzyme was used as ligand. LPO enzyme was purified from the bovine milk by this affinity gel.

The purity of the enzyme was checked by Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and a single band around 80 kDa was obtained. The kinetic constants of the pure enzyme ( $K_M$  and  $V_{max}$ ) were calculated by Lineweaver-Burk method.  $K_M$  and  $V_{max}$  values were determined as 1,4 mM and 1000 U/mLdak., respectively.

Column conditions were investigated in the different ionic strength, pH and temperature. As a result of these studies, optimum column conditions were detected as follows; for the ionic strength, the best binding values were detected as pH 6 and 25 °C for the  $Na_2SO_4$  free equilibration and washing buffers.

The effects on the enzyme of some veterinary medicine and pesticides used in agriculture were examined and  $IC_{50}$  values were determined for the compounds which show inhibition effect. When we consider these values, It is observed that all of the pesticides and the derivatives of the veterinary medicines inhibited the LPO enzyme.

**KEYWORDS:** Lactoperoxidase enzyme, glicoprotein, affinity chromatography, veterinary medicines, pesticide, inhibition, ligand, activity.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖNSÖZ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Peroksidazlar (POD) .....	1
1.2 Laktoperoksidaz Enzimi .....	5
1.2.1 Laktoperoksidazın Antibakteriyel Etki Mekanizması .....	8
1.3 Veteriner İlaçları .....	12
1.3.1 Bilinçsiz Veteriner İlaç Tüketiminden Kaynaklanan Etkiler .....	12
1.3.1.1 Mikrobiyolojik Etkiler .....	14
1.3.1.2 Toksikolojik Etkiler .....	15
1.3.1.3 İmmunopatolojik Etkiler .....	15
1.3.2 Ülkemizde Geçerli Olan Durum .....	16
1.4 Pestisitler .....	17
1.4.1 Pestisitlerin Gruplandırılması .....	18
1.4.2 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi .....	20
1.5 Çalışmamızda Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitler .....	22
1.5.1 Devamed® .....	22
1.5.2 Diüril® .....	23
1.5.3 Atrol – F® .....	24
1.5.4 Taylomisın® .....	25
1.5.5 Killoxacin® .....	26
1.5.6 Geosol® .....	27
1.5.7 Flumed® .....	28
1.5.8 Doksilin - LA® .....	29
1.5.9 Tilmivet® .....	30
1.5.10 Advocin® .....	31
1.5.11 Kanovet® .....	32
1.5.12 Fostimon® .....	33
1.5.13 Flortek® .....	34
1.5.14 Marboflex® .....	35
1.5.15 Neozid® .....	36
1.5.16 Teknomezathine® .....	37
1.5.17 Vetajin® .....	38
1.5.18 Gentavet® .....	39
1.5.19 Petra 5 EC® .....	40
1.5.20 Rogor® .....	41
1.5.21 Delmetrin 25 EC® .....	42
1.5.22 Mamba Turbo® .....	43
1.5.23 Deltharin 25 EC® .....	44
1.5.24 Decis® .....	45

1.5.25	Alpgor 40 EC® .....	46
1.6	Çalışmanın Amacı.....	47
<b>2.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>48</b>
2.1	MATERYALLER .....	48
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	48
2.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	48
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	49
2.2	YÖNTEMLER.....	53
2.2.1	Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması.....	53
2.2.1.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	53
2.2.2	Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	54
2.2.3	Kalitatif Protein Tayini .....	55
2.2.4	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	55
2.2.5	Afinite Jelinin Hazırlanması .....	56
2.2.5.1	Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi.....	56
2.2.5.2	Etilendiaminin Bağlanması .....	57
2.2.5.3	Ligandın Bağlanması .....	57
2.2.5.4	Afinite Jelinin Kolona Paketlenmesi .....	58
2.2.5.5	Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu .....	58
2.2.6	SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enzimin Saflığının Kontrolü .....	59
2.2.7	Laktoperoksidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması ..	60
2.2.8	Bazı Veteriner İlaçlarının ve Pestisitlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması .....	60
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>62</b>
3.1	Enzimin Saflaştırılması .....	62
3.1.1	Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması.....	62
3.1.2	Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması .....	62
3.1.3	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	63
3.1.4	Laktoperoksidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi...	65
3.2	Laktoperoksidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	65
3.3	Sütteki Laktoperoksidaz (LPO) Enziminin Farklı Kolon Şartlarında Saflaştırılması .....	67
3.3.1	Afinite Kolonundan Saflaştırılan LPO Enzimine Farklı pH Değerlerinin Etkisi .....	68
3.3.1.1	LPO Enziminin 10 mM $Na_2HPO_4$ Tamponu (pH: 6.0) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması .....	68
3.3.1.2	LPO Enziminin 10 mM $Na_2HPO_4$ tamponu (pH: 6.5) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması .....	70
3.3.1.3	LPO Enziminin 10mM $Na_2HPO_4$ tamponu (pH: 7.0) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması .....	71
3.3.1.4	LPO Enziminin 10 mM $Na_2HPO_4$ (pH: 7.5) tamponu ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması. ....	72
3.3.2	Afinite Kolonundan Saflaştırılan LPO Enzimine Farklı İyonik Şiddetlerin Etkisi .....	74
3.3.2.1	LPO Enziminin 0.05 M $Na_2SO_4$ Kullanılarak Saflaştırılması.....	74
3.3.2.2	LPO Enziminin 0.1 M $Na_2SO_4$ Kullanılarak Saflaştırılması.....	76
3.3.2.3	LPO Enziminin 0.15 M $Na_2SO_4$ Kullanılarak Saflaştırılması.....	77
3.3.3	Farklı Sıcaklıklarda LPO Enziminin Saflaştırılması .....	79
3.3.3.1	Afinite Kolonundan LPO Enziminin 5 °C'de Saflaştırılması .....	79
3.3.3.2	Afinite Kolonundan LPO Enziminin 15 °C'de Saflaştırılması ...	81

3.3.3.3	Afinite Kolonundan LPO Enziminin 35 °C'de Saflaştırılması ...	82
3.4	Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitlerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	83
3.5	Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitlerin IC <sub>50</sub> Değerleri .....	115
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>128</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1:	Peroksidazların sentez reaksiyonları.....	2
Şekil 1.2:	Katekol'ün oksidasyonunun genel gösterimi.....	2
Şekil 1.3:	2-Metoksifenol oksidasyonun mekanizması.....	8
Şekil 1.4:	Deksametazon sodyum fosfat.....	22
Şekil 1.5:	Furosemid.....	23
Şekil 1.6:	Atropin sülfat.....	24
Şekil 1.7:	Tilozin.....	25
Şekil 1.8:	Enrofloksasin.....	26
Şekil 1.9:	Oksitetrasiklin hidroklorür.....	27
Şekil 1.10:	Fluniksin Meglumin.....	28
Şekil 1.11:	Doksisiklin mono hidrat.....	29
Şekil 1.12:	Tilmikosin.....	30
Şekil 1.13:	Danofloksasin mesilat.....	31
Şekil 1.14:	Kanamisin sülfat.....	32
Şekil 1.15:	Urofollitropin.....	33
Şekil 1.16:	Florfenikol.....	34
Şekil 1.17:	Marbofloksasin.....	35
Şekil 1.18:	Neomisin sülfat.....	36
Şekil 1.19:	Sülfadimidin sodyum.....	37
Şekil 1.20:	Metamizol sodyum.....	38
Şekil 1.21:	Gentamisin sülfat.....	39
Şekil 1.22:	Sihalotrin.....	40
Şekil 1.23:	Dimethoat.....	41
Şekil 1.24:	Deltametrin.....	42
Şekil 1.25:	<i>N</i> -(fosfonametil) glisin.....	43
Şekil 1.26:	Dimethoat.....	46
Şekil 2.1:	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi.....	56
Şekil 2.2:	Afinite jelinin sentez basamakları.....	58
Şekil 3.1:	Afinite kolonundan LPO enziminin elüsyon grafiği.....	63
Şekil 3.2:	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	64
Şekil 3.3:	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi.....	65
Şekil 3.4:	Sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	67
Şekil 3.5:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> tamponu (pH: 6.0) ile dengelenmiş ve 25mm Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.0) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için absorbans-aktivite grafiği.....	69
Şekil 3.6:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> tamponu (pH: 6.5) ile dengelenmiş ve 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.5) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için absorbans-aktivite grafiği.....	70
Şekil 3.7:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> tamponu (pH: 7.0) ile dengelenmiş ve 25mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 7.0) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.....	71

<b>Şekil 3.8:</b> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> tamponu (pH: 7.5) ile dengelenmiş ve 25mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 7.5) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	72
<b>Şekil 3.9:</b> Farklı pH değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik Aktivite-pH değerleri. ....	73
<b>Şekil 3.10:</b> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.05 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.05 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	75
<b>Şekil 3.11:</b> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	76
<b>Şekil 3.12:</b> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.15 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile dengelenmiş ve 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.15 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	77
<b>Şekil 3.13:</b> Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik Aktivite-[M] değerleri. ....	78
<b>Şekil 3.14:</b> 5 °C'ye soğutulmuş 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 5 °C'ye soğutulmuş 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	80
<b>Şekil 3.15:</b> 15 °C'ye soğutulmuş 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 15 °C'ye soğutulmuş 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	81
<b>Şekil 3.16:</b> 35 °C'ye ısıtılmış 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 35 °C'ye ısıtılmış 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbens-aktivite grafiği. ....	82
<b>Şekil 3.17:</b> Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik aktivite-Sıcaklık değerleri. ....	83
<b>Şekil 3.18:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Ligand bileşiğinin % Aktivite-[I] grafiği. ....	86
<b>Şekil 3.19:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Ligandın inhibisyon etkisi [I <sub>1</sub> ]: 1x10 <sup>-2</sup> mM, [I <sub>2</sub> ]: 2x10 <sup>-2</sup> mM. ....	88
<b>Şekil 3.20:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Devamed adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	90
<b>Şekil 3.21:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Diüril adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	90
<b>Şekil 3.22:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Atrol-F adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	92
<b>Şekil 3.23:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Taylomisın adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	92
<b>Şekil 3.24:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Killoxacin adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	94
<b>Şekil 3.25:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Geosol adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği. ....	94

<b>Şekil 3.26:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Flumed adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	96
<b>Şekil 3.27:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Doksilin-LA adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	96
<b>Şekil 3.28:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Tilmivet adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	98
<b>Şekil 3.29:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Advocin adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	98
<b>Şekil 3.30:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Kanovet adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	100
<b>Şekil 3.31:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Fostimol adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	100
<b>Şekil 3.32:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Flortek adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	102
<b>Şekil 3.33:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Marboflex adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	102
<b>Şekil 3.34:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Neozid adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	104
<b>Şekil 3.35:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Teknomezathine adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	104
<b>Şekil 3.36:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Vetaljin adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	106
<b>Şekil 3.37:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Gentavet adlı veteriner ila­çının % Aktivite - [I] grafiği.....	106
<b>Şekil 3.38:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Petra 5 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	108
<b>Şekil 3.39:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Rogor adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	108
<b>Şekil 3.40:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Delmetrin adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	110
<b>Şekil 3.41:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Mamba Turbo adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	110
<b>Şekil 3.42:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Deltharin 25 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	112
<b>Şekil 3.43:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Decis adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	112
<b>Şekil 3.44:</b> Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Alpgor 40 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.....	114
<b>Şekil 4.1:</b> Dengeleme ve yıkama tamponunda Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içermeyen pH: 6 tamponu ve 25°C'deki şartlarda yapılan saflaştırma grafiği.....	121

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Sığır sütü proteinleri.....	4
<b>Tablo 1.2:</b> Laktoperoksidaz enziminin özellikleri .....	6
<b>Tablo 1.3:</b> Pestisitlerin sınıflandırılması.....	18
<b>Tablo 1.4:</b> Bazı pestisitlerin insan sağlığına etkileri.....	20
<b>Tablo 2.1:</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin miktarları.....	52
<b>Tablo 3.1:</b> LPO Enzimi için saflaştırma tablosu.....	64
<b>Tablo 3.2:</b> Sütteki Laktoperoksidaz enzimi için ABTS substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	66
<b>Tablo 3.3:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ligandın (4-izotiyosiyonat-benzensülfonamid) $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ligand konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	85
<b>Tablo 3.4:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ligandın (4-izotiyosiyonat-benzensülfonamid) $K_i$ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ligandın konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	87
<b>Tablo 3.5:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Devamed ve Diürül adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	89
<b>Tablo 3.6:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Atrol-F ve Taylomisın adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	91
<b>Tablo 3.7:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Killoxacin ve Geosol adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	93
<b>Tablo 3.8:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Flumed ve Doksilin-LA adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	95
<b>Tablo 3.9:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Tilmivet ve Advocin adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	97
<b>Tablo 3.10:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Tilmivet ve Advocin adlı veteriner ilaçlarının $IC_{50}$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	99

<b>Tablo 3.11:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Flortek ve Marboflex adlı veteriner ilaçlarının IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	101
<b>Tablo 3.12:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Neozid ve Teknomezathine adlı veteriner ilaçlarının IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	103
<b>Tablo 3.13:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Vetajin ve Gentavet adlı veteriner ilaçlarının IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	105
<b>Tablo 3.14:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Petra 5 EC ve Rogor adlı pestisitlerin IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	107
<b>Tablo 3.15:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Delmetrin ve Mamba Turbo adlı pestisitlerin IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	109
<b>Tablo 3.16:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Deltharin ve Decis adlı pestisitlerin IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	111
<b>Tablo 3.17:</b> LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Alpgor 40 EC adlı pestisitinin IC <sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar. ....	113
<b>Tablo 3.18:</b> Çalışmamızda kullanılan Veteriner İlaçlarının IC <sub>50</sub> Değerleri. ....	115
<b>Tablo 3.19:</b> Çalışmamızda kullanılan Pestisitlerin IC <sub>50</sub> Değerleri. ....	115
<b>Tablo 3.20:</b> LPO enzimi için ABST substratı kullanılarak %50 inhibisyonuna sebep olan ilaç etken konsantrasyonları, 1 mL ilaca karşılık gelen etken miktarları ve sütteki maksimum kalıntı limitleri (MKL)(Tebliğ No:2011/20).....	116

## SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat.
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>U</b>	: Enzim Ünitesi
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 İnhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
<b>TEMED</b>	: N,N,N', N' - tetrametiletildiamin
<b>OP</b>	: Organo fosfat bileşiği
<b>POD</b>	: Peroksidaz
<b>S</b>	: Substrat
<b>E</b>	: Enzim
<b>ABTS</b>	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
<b>Tris</b>	: Trihidroksimetil aminometan
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>°C</b>	: Santigrat Derece

## ÖNSÖZ

Çalışmalarımın esnasında ve tezimin yazım aşamasında bana hep destek olan değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

**“Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması”** isimli bu doktora çalışması Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK ve Doç. Dr. Serap BEYAZTAŞ UZUNOĞLU'nun danışmanlıklarında gerçekleştirilmiştir.

Tez izleme jürimde bulunan ve çalışmalarım esnasında beni yönlendiren değerli fikirlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN'e teşekkür ederim. Laboratuvar ortamında beni yönlendiren ve değerli fikirlerini benimle paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Nahit GENCER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvarında beraber çalıştığım birlikte üzüldüğüm sevindiğim benimle emek harcayan bütün çalışma arkadaşlarıma en derin duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımız sırasında LPO enzimi kaynağı olarak kullandığım inek sütü temini konusunda desteklerini esirgemeyen ARGAN ailesine teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini esirgmeden hayatımın her aşamasında yanımda olan ve aldığım her kararı destekleyen anneme, babama ve kardeşime gönülden sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Balıkesir, Haziran 2016

Beste ŞİPAL

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Peroksidazlar (POD)

Peroksidazlar, ( $H_2O_2$  -Oksidoredüktaz E.C, 1.11.1.7); biyolojik sistemlerde antioksidatif etki gösteren enzimlerin en önemlileri arasında sayılabilir [1]. Peroksidazlar,  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit)'i kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu gerçekleştirirken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonoid aminler (yalnızca benzidin türevleri) gibi çok sayıda aromatik komponentlerin dehidrojenasyonunu gerçekleştirirler. Bu moleküller arasında 2- krezol, 2-toluidin, guaiacol, pirogallol, homovonillik asit, hidrokinon, 1,2 ve 1,4-fenilendiamin, lökomalaşit yeşili, 2,6-diklorofenolindifenol, 4,4-diaminodifenilamin, propiyonil promozin, benzidin, o-tolidin, di-o-anisidin ve bazı azo boya türevleri gösterilebilir [2, 3].

Peroksidazlar; hayvanlarda, at turpu, ananas, incir, baklagiller, mısır, ıspanak ve tütün gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Memelilerde bulunan peroksidaz enzimleri; sütte, lökositlerde, trombositlerde, karaciğerde, dalak, uterus, tükürük bezleri ve akciğer duvarlarında, sitoplazma, mitokondriler, mikrozoamlar ile lizozomlarda lokalize olmuş halde bulunmaktadır [2].

Peroksidazların prostetik grupları protohemdir. Bu da birçok hemoproteinin aksine apoproteine gevşek şekilde bağlıdır. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda  $H_2O_2$ ; elektron akseptörü olarak görev alan askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi birçok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir [4]. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar kompleks bir yapıya sahiptir ve genel olarak aşağıdaki gibi gösterilen reaksiyonları katalizlemeyi gerçekleştirirler [3].

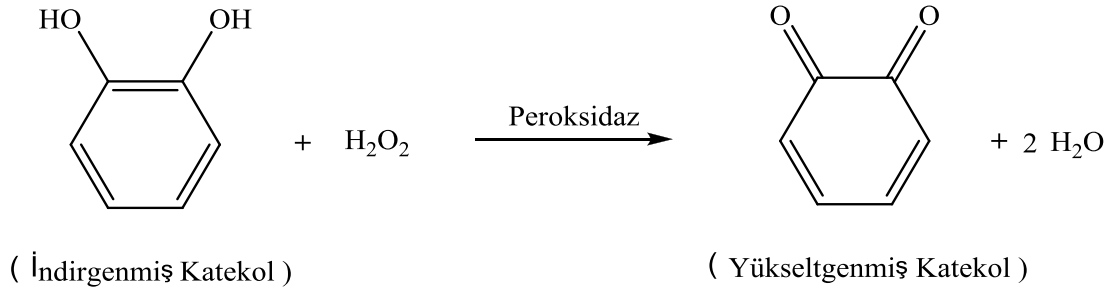




**Şekil 1.1:** Peroksidazların sentez reaksiyonları.

Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin zararlı etkisini ortadan kaldırmaktadır [5].

Örnek vermek istersek katekolun oksidasyonunu gösterebiliriz;



**Şekil 1.2:** Katekol'ün oksidasyonunun genel gösterimi.

Oksitleyici özelliğe sahip, biyolojik sistemler sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin vakit kaybetmeden ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu önemli görevi hücrelerdeki antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir [6]. Antioksidan enzimlerin aynı zamanda serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak biyolojik oksidatif hasarları engellediği bilinmektedir [7].

Peroksidazlar spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere karşı duyarlı ve optimum pH gibi farklı biyokimyasal özelliklere sahip çok sayıda izoenzimlere sahiptirler [8].

Organizmada ilk olarak peroksidazın protein kısmı sentezlenirken enzim fonksiyonel özelliğe sahip değildir. Holoenzim, hem grubu ile apoproteinin bir araya gelmesiyle fonksiyonellik kazanır [3, 8].

Peptid zinciri üzerinde bulunan ikinci prostetik grup glikozid yan zincirleridir. Birçok peroksidaz izoenzimleri, moleküler ağırlıklarının % 15-17'si kadar karbohidrat içermektedir [3]. Hem grubu ve glikozidik gruplarından başka kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) iyonu da peroksidazın oluşumu ve yapısal devamlılığı için gereklidir [3, 8].

Süt yüksek düzeyde besin içeriğine sahiptir. Buna ilaveten süt proteininin birçok faydalı fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Son yirmi yıldır sütün biyolojik özellikleri, gerek bilimsel gerekse endüstriyel alanda dikkat çekmeye başlamıştır. Sütün önemli enzimi ise laktoperoksidazdır [9, 10]. Tablo 1.1'de sığır sütü proteinlerinin konsantrasyonları, molekül ağırlıkları ve biyolojik fonksiyonları gösterilmiştir.

**Tablo 1.1:** Sığır sütü proteinleri.

Protein	Konsantrasyon (g/L)		Molekül Ağırlığı	Biyolojik Fonksiyon
	<i>Kolostrum</i>	<i>Süt</i>	<i>Dalton</i>	
<i>Laktoperoksidaz</i>	0.02	0.03	78000	Antimikrobiyal, immunoglobulin ve laktoferin ile sinerjetik etki.
$\alpha$ -Laktalbumin	8.0	3.3	18400	Retinol taşıyıcısı, potansiyel antioksidan, biyoaktif peptitler için precursor, yağ asitlerini birleştirir.
İmmunoglobulinler	20-150	0.5-1.0	15000 - 1000000	Spesifik immune koruma (antibodiler ve complement sistemi), biyoaktif peptitler için potansiyel precursor.
Glikomakropeptit	2.5	1.2	8000	Antimikrobiyal, antitrombotik.
Kazeinler ( $\alpha_{s1}$ , $\alpha_{s2}$ , $\beta$ ve K)	26	28	14000-22000	İyon taşıyıcı ( $Ca^{2+}$ , $PO_4^{3-}$ , $Fe^{3+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ )
Lizozim	0.0004	0.0004	14000	Antimikrobiyal, immunoglobulin ve laktoferin ile sinerjetik etki
Proteoz-peptonlar	N/A	0.8	4000-40000	Potansiyel mineral taşıyıcı
Serum albumin	1.3	0.3	66300	Biyoaktif peptitler için precursor
Laktoferrin	1.5	0.1	80000	Antimikrobiyal, antioksidan, anti kanserojenik, anti inflamatuvar, demirin taşınması, hücre büyüme düzenleyici, immunomodülatör, biyoaktif peptitler için precursor

## 1.2 Laktoperoksidaz Enzimi

Laktoperoksidaz enzimi (LPO: Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.7); 1940'lı yıllarda sığır sütünde belirlenmiştir. Laktoperoksidaz enzimi memelilerin sütünde, gözyaşında, tükürüğünde ve hava yolları yüzey sıvısında bulunur [11, 12]. Enzim 78 431 Da molekül ağırlığına sahip hem grubu içeren bir glikoproteindir [13, 14, 15]. LPO enzimi patojen mikroorganizmalara karşı ve yeni doğan bebeklerin sindirim sisteminden salgılanan, savunmada önemli bir rol oynayan, süt içerisinde salgılanan bir oksidoredüktazdır [13].

Laktoperoksidaz enzimi yapısında proteinle birlikte % 0.07 Fe<sup>2+</sup> içermesi sebebiyle metalloprotein grubunda yer almaktadır. Yapıda bulunan bu demir atomu enzimin katalitik merkezinde bulunan hem grubunun bir parçasını oluşturmaktadır. LPO'da yer alan hem grubu enzimi disülfid köprüleriyle sıkıca bağlayan protoporfirin IX'dan meydana gelmektedir [16]. Enzimdeki peptid zincirinde 612 amino asit rezidüsü ve 15 yarı sistin rezidüsü bulunmaktadır [17]. LPO enziminin izoelektrik noktası 9.6 dır [16, 18].

Laktoperoksidaz enzimi % 8-10 karbohidrat içeren ve glikoz bağlayıcı bölge bulunduran moleküldür [17].

LPO enziminin sekonder yapısı ile ilgili yapılan çalışmalarda, moleküllerinin % 65  $\beta$  yapısında, % 23  $\alpha$  yapısında ve % 12'sinin düzensiz yapıda olduğu belirlenmiştir [19].

**Tablo 1.2:** Laktoperoksidaz enziminin özellikleri [16, 18].

Özellikler	Ortalama Değer
Molekül ağırlığı	78 431 Da
Amino asit rezidüsü	612
Yarı sistin rezidüsü	15
İzoelektrik nokta	pH: 9.6
Karbohidrat içeriği	% 10
Demir içeriği	% 0.07
Hem yapısı	Protoporfirin IX
Sekonder yapısı	% 22 $\alpha$ , % 65 $\beta$

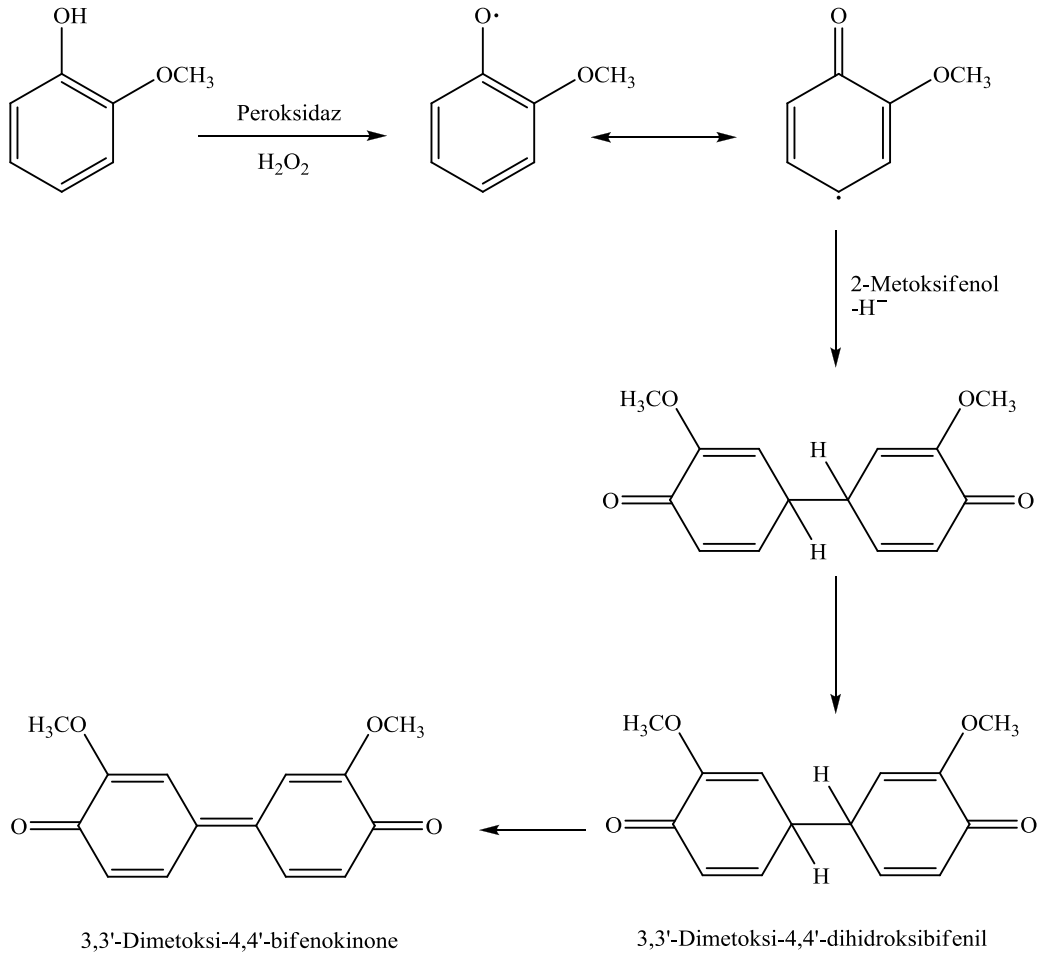
Laktoperoksidaz enzimi 73 °C sıcaklıkta 10 dakika etkisini kaybetmektedir. Çiğ sütte bulunan laktoperoksidaz enziminin 50 ppm'inin 76 °C sıcaklığa 2 dakika bırakılması enzimin % 98'lik kısmının, 72 °C'de 15 saniye bırakılması ise enzimin % 34'lük kısmının inaktif olduğu belirlenmiştir [18, 27]. Enzimin etkisini kaybetmesinde Ca<sup>2+</sup> iyonlarının sebep olduğu saptanmıştır [27].

Laktoperoksidaz enziminin inek sütünde A ve B olmak üzere iki fraksiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu fraksiyonların 10 farklı şekli olduğu belirlenip, bunlar A1, A2/I, A2/III, A3, B1, B2/I, B2/II, B3, B4 ve B5 olarak isimlendirilmiştir [20].

Laktoperoksidaz enzimi (LPO) Riboflavin varlığında ışığa karşı çok duyarlıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda süt birkaç saat gün ışığında bırakılırsa LPO enziminin aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir [20].

LPO enzimi  $H_2O_2$  mevcudiyetinde aromatik aminler, fenoller, aromatik asitler, tirozin, triptofan, askorbat, nitrik ve tiyosiyanatik gibi birçok elektron verici bileşiklerin oksidasyonunu gerçekleştirmektedir [4, 13, 21]. En yaygın bilinen substratları ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit), guaiacol ve katekol gibi basit fenollerdir [22, 23, 24]. LPO enziminin hidrazinler tarafından inhibe edildiğı bilinmektedir [13]. Ayrıca enzimi tiyokarbamid bileşiklerinin inhibe ettiğı belirlenmiştir [25].

LPO enzimi için optimum şartlar belirlenmesine rağmen inhibitörleri tam olarak bulunamamıştır. Fakat çevresel kirleticiler, ağır metaller arasında bir grup elementlerin enzimin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir [26]. Laktoperoksidaz enzimi ile  $H_2O_2$ 'nin varlığında yapılan çalışmada 2-metoksifenol'un oksidasyonun mekanizması aydınlatılmış ve 2-metoksifenol'un 3,3"-dimetoksi-4,4-bifenokinone'a okside olduğı belirlenmiştir [24].



**Şekil 1.3:** 2-Metoksifenol oksidasyonun mekanizması.

### 1.2.1 Laktoperoksidazın Antibakteriyel Etki Mekanizması

Laktoperoksidaz sisteminin antibakteriyel etki mekanizması yapılan çalışmalar sonucunda aydınlatılmıştır [28, 29, 30, 31].

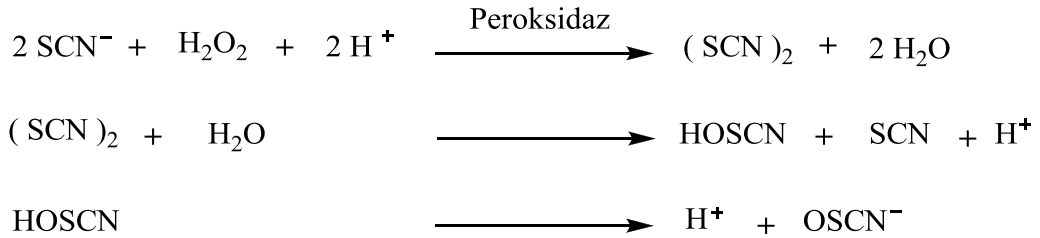
Laktoperoksidaz sisteminin sütteki antibakteriyel etkisi  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında kataliz ettiği reaksiyonla  $\text{SCN}^-$  iyonlarının oksidasyonuna dayanmaktadır [32].

Bu oksidasyon reaksiyonu sırasında oluşan kısa ömürlü ara bileşikler bakteriler üzerinde inhibisyon etkisine sahiptir [33].

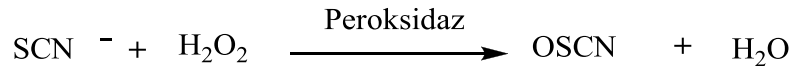
Reaksiyon sırasındaki ara oksidasyon bileşiklerinin oluşumu pH'ya bağlıdır ve normal süt pH'sında kararlı değildir. Oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi pH<6'da maksimum iken, pH 8'de minimumdur [34].

Reaksiyonda oluşan ara ürünler daha ileri seviyede oksidasyona uğrayarak sülfat, karbondioksit ve amonyak gibi bakterilere karşı etki göstermeyen son ürünlere dönüşebildikleri gibi, tekrar tiyosiyanatada dönüşebilirler [35]. Tiyosiyanatın oksidasyonunda oluşan aktif ara ürünün hipotiyosiyanat (OSCN<sup>-</sup>) olduğu kabul edilmektedir [36].

SCN<sup>-</sup>'nin oksidasyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir, birinci yolda SCN<sup>-</sup>'nin oksidasyon reaksiyon sonucu tiyosiyanojen ((SCN)<sub>2</sub>) oluşmakta, bu bileşikte hızla okside olarak hipotiyosiyanöz (HOSCN) asitini oluşturmaktadır. HOSCN asit normal süt pH'sında (6.6-6.8 pH) OSCN<sup>-</sup> iyonlarına dönüşmektedir [30, 37].



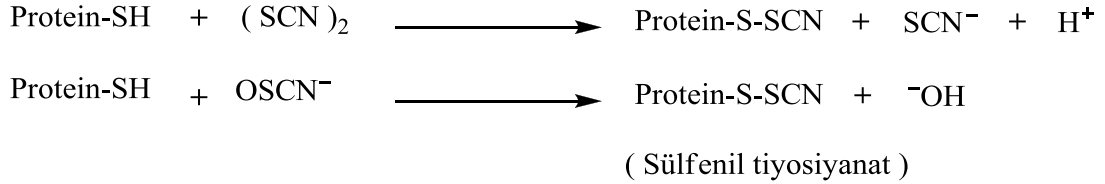
İkinci yolda ise, SCN<sup>-</sup> doğrudan OSCN<sup>-</sup>'ye okside olmaktadır.



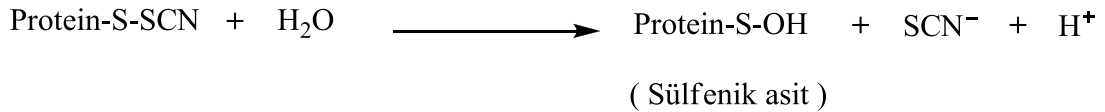


Laktoperoksidaz sisteminin ara aktif oksidasyon ürünleri (HOSCN, OSCN<sup>-</sup>) bazı bakterilerde dış membran, hücre duvarı, stoplazmik membran, taşıma sistemleri glikolitik enzimler ve nükleik asitler gibi hücre sistemleri üzerinde etkiye sahiptir [28].

Tiyosiyanatın oksidasyon ürünleri olan tiyosiyanojen ve hipotiyosiyanat bakteri metabolizmasında hayati öneme sahip olan enzimlerdeki serbest sülfidril (-SH) gruplarını okside edebilme yeteneğine sahiptir. Bu oksidasyon reaksiyonu laktoperoksidaz sisteminin antibakteriyel etkisinde anahtar rolü oynamaktadır [36, 38, 39, 40]. Gerçekleşen reaksiyon aşağıdaki verilmiştir,



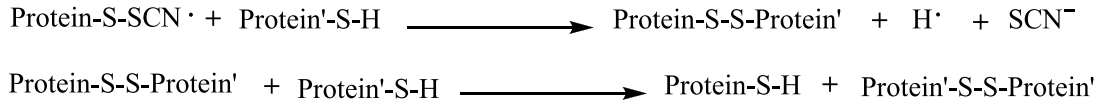
Yukarıda verilen reaksiyon sonucunda sülfenil tiyosiyanat türevleri oluşmaktadır. Sülfenil türevleride düşük seviyede meydana gelen çift yönlü bir hidrolizasyon reaksiyonu sonucu sülfenik asitleri meydana getirmektedir [33, 36, 38].



Bakterilerdeki heksokinaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi önemli fonksiyonlara sahip enzimlerin -SH gruplarının sülfenil tiyosiyanat ve sülfenik aside oksidasyonu, bu önemli enzimlerin biyolojik fonksiyonlarını kaybetmelerine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda, bakteriyel stoplazmik membranlar yapısal zarar görürler ve hücrede K<sup>+</sup>, aminoasit, polipeptit sızıntısı olmaktadır. Arkasından, glukoz, pürin, pirimidin ve aminoasit alınması ile protein, DNA ve RNA sentezi gerçekleşemez [18, 28, 41, 42, 43, 44, 45].

Laktoperoksidaz sistemi geniş bir mikroorganizma grubu üzerinde etki göstermektedir. Bazı özel durumlar dışında, *streptococlar* ve *lactobaciller* gibi *Gram (+)* bakterilere karşı bakteristatik etki gösterirken, *Pseudomonaslar*, *E. Coli* ve *salmonella*'nın enteropatojenik türleri gibi ürünlerde bozulmaya sebep olan *Gram (-)* bakterilerine karşı bakterisit etki gösterir [18, 28, 29, 30, 31, 46]. LP sistemin *Gram (+)* ve *Gram (-)* bakterilere karşı farklı etkisi, bakteri hücre duvarı/membranının yapı ve bileşimindeki farklılıklardan meydana gelmektedir. Başka bir ifade ile *Gram (+)* bakterilerinin sahip olduğu hücre duvarı, *Gram (-)* bakterilerinin sahip olduğu hücre membranına göre LP sisteminin oluşturduğu ürünlerin etkisine karşı daha dayanıklıdır [47].

Laktoperoksidaz sisteminin *Gram (+)* ve *Gram (-)* bakteriler üzerine farklı etkisinin yanı sıra, antibakteriyel etki suşa da bağımlıdır [48]. Bazı bakteriler, LP sisteminin oksidasyon ürünlerini indirgeyen enzim sistemlerine ya da OSCN'ye dayanıklı solunum sistemlerine sahiptirler. Bu şekilde LP sisteminin antibakteriyel etkilerini geri dönüştürebilme özelliğine sahiptirler [30, 49]. Bahsedilen bakteriyel savunma mekanizmasının reaksiyonu aşağıda verilmiştir;



Laktoperoksidaz sistemine en fazla duyarlı olan mikroorganizmalar  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi oluşturma yeteneğine sahip olanlardır [48].

LP sisteminin mikroorganizmalar üzerine antibakteriyel etkisi reaksiyonun şartlarına bağlıdır. Yüksek  $\text{SCN}^-$  miktarı, düşük sıcaklık (0-5 °C) , düşük pH (<5) ve indirgen maddelerin (-SH grubu içeren sistin, glutation v.s.) bulunmaması durumunda bakterisidal etki daha büyük olur [28, 50].

### **1.3 Veteriner İlaçları**

Veteriner ilaçları; hayvanlarda hastalıkları tedavi etmek, hastalıklardan korumak, tanı koymak, fizyolojik fonksiyonları düzeltmek veya değiştirmek amacıyla kullanılan, uygulanan kimyasal veya biyolojik etkin maddeler ve yardımcı maddelerin farmasötik teknolojiye göre belirlenmiş kombinasyonu olarak ifade edilmektedir.

Veteriner ilaçlarının hayvan sağlığına sağladığı katkılarla, hayvan yetiştiriciliğinde kazanılan verimlilik artışı, yaşam kalitesi ve süresinde kazanılan iyileştirmelerle ülkelerin hayvancılık faaliyetinde önemli ve vazgeçilmez bir unsur olarak kabul edilmiştir.

#### **1.3.1 Bilinçsiz Veteriner İlaç Tüketiminden Kaynaklanan Etkiler**

Günümüzde yoğun bir bilgi ve ileri teknoloji ürünü halinde hazırlanan ilaç, uygun olarak kullanılabildiği sürece beklenen yararları sağlayabilir. Hatalı, yanlış ve amaç dışı olarak kullanılması halinde ise insan ve hayvan sağlığını tehlikeye sokan, önemli ekonomik kayıplara ve çevresel sorunlara yol açan tehlikeli bir silah haline gelebilir [51].

Öncelikle etken madde ve farmasötik ürün olarak çeşitlilik gösteren bugün için sayıları binlerle ifade edilebilen ilaçların mutlaka veteriner hekimler tarafından sorunlar esas alınarak bilinçli bir şekilde kullanılması öngörülür. Bilinçli halde kullanılma durumunda bile çok yönlü sakıncalardan bütünüyle arındırılmayan böyle ilaçların rastgele kullanılmaları durumunda çok yönlü sakıncaları kaçınılmaz olur.

Böylece bir yandan ilaç kullanımından beklenen yararlar sağlanamayıp, çok yönlü zehirlenme riski, hastalık halinin devam etmesi, ölümler ve gereksiz ekonomik kayıplar söz konusu olurken, diğer taraftan da toplum ve çevre sağlığına yönelik geniş boyutlu kirlenme sorunu ortaya çıkmaktadır [52].

Hayvansal besinlerin, veteriner ilaç artıklarıyla kirlenme riski, tüketici açısından sürekli endişe yaratan bir durumun doğmasına yol açmaktadır. Çünkü kirlilik halindeki değişmemiş ilaçlar ile çok sayıdaki etkin metabolitlerinin yaratılabileceği çok yönlü toksik etkilerin boyutlarını önceden belirlemek mümkün değildir. Belirtilen gerçekler hiç kalıntı bırakmayan veteriner ilaçlarının bulunamayacağını ve artıklardan tümüyle uzaklaştırılmış hayvansal besin üretiminin ne kadar güç olduğunu ortaya koymaktadır [51, 52].

Veteriner ilaç artıklarıyla kirlenmiş hayvansal besinler tüketici konumundaki insanlarda akut ve kronik toksisite, teratojen, mutajen ve karsinojen etki riski ile bakteriyolojik ve alerjik sakıncalar oluşturur. Bütün veteriner ilaçları içerisinde yaygın nitelikli besin kirlenmelerine yol açmaları ve çok yönlü sağlık sakıncaları yaratmaları açısından antibakteriyel ilaçlar, anabolik hormon çeşitleri ve antelmantikler büyük önem taşımaktadır. Çünkü sıralanan ilaç gurupları çok yönlü kullanım seçeneklerine sahiptirler ve tüketim miktarları diğer çeşitlere göre çok daha fazladır. Ayrıca böyle ilaçlar biyolojik yönden de yüksek derecede etkin olduklarından, çok düşük kalıntı düzeylerinde bile sağlık sorunları oluşturabilirler [53].

### 1.3.1.1 Mikrobiyolojik Etkiler

Hayvanlarda koruyucu ve verim artırıcı amaçlarla düşük düzeyde kullanılan antibakteriyel ilaç artıklarından kaynaklanan kirlenme riski besin güvenliği, çevre ve toplum sağlığını olumsuz etkileyen çok önemli bir sorun konumundadır. Çünkü böyle kirlilikler çok düşük düzeylerde olsalar bile antibakteriyel etkinlik gösterebilirler.

Bu nedenle dirençli bakteri suşlarının gelişmesine ve seleksiyonuna yönelik sürekli bir basınç oluştururlar ve besi hayvanlarının sindirim sistemlerinin mikroflorası dirençli bakteri popülasyonlarının gelişerek ekosistemlere yayılması yönünden çok önemli bir kaynak oluşturur [53].

Bu sorunun sakıncalı yönlerinden biri de belirlenen dirençli bakteri suşlarının hayvandan hayvana ve hayvandan insana geçerek sürekli yayılma eğilimi göstermesidir. İlaveten dirençlilik olgusu antibakteriyel ilaç çeşitlerinden birine karşı olabileceği gibi çapraz ve çoğul dirençlilik şeklinde belirerek aralarında yapısal benzerlik bulunan ve tümüyle farklı olan ilaç çeşitleri için de geçerli olabilir. Belirtilenlere göre söz konusu dirençlilik olguları aynı türden bakteriler arasında olduğu kadar, tümüyle farklı türler arasında da kolayca ve hızlı yayılabilmektedir. Sonuç olarak insan ve hayvan ekosistemlerinde çoğul dirençli bakteri popülasyonları hızla artmakta ve böyle bakterilerin sebep olduğu hastalıklar giderek yaygınlaşmaktadır. Açıklanan sakıncalı durumlara bağlı olarak da mevcut antibakteriyel ilaçların etkinliği hızla azalarak her çeşitten bulaşıcı hastalığın giderilme şansı giderek kaybolur [53].

### **1.3.1.2 Toksikolojik Etkiler**

Besin değeri olan hayvanlarda büyümeyi hızlandırıcı ve ağırlık artışı sağlayıcı ajan olarak kullanılan anabolik hormon çeşitlerinden çoğunluğu besin kirlenmesi riski taşır. Çünkü böyle hormonlar yasal, bilinçli ve doğru olarak kullanılsalar bile hazırlanma şekli ve uygulama seçeneklerinin bir gereği olarak çeşitli hayvansal dokularda ppb (bir litre çözeltideki çözünen maddenin mikrogram cinsinden değeri) düzeylerinde kalıntı bırakma riski oldukça yüksektir. Hormon kullanımından kaynaklanan en önemli sakıncayı oluşturan bu durum stilbent türevleri gibi yasaklanmış sentetik çeşitlerinin kullanılması durumunda, yasal hormonların yanlış yollardan ya da ykseke dozlarda uygulanmaları, ilaçlanmış hayvanların kesim öncesinde öngörülen sürece bekletilmemesi durumlarında daha da tehlikeli boyutlar kazanır.

Hayvansal besinlerde bulunan etkin antibiyotik artıklarının ve toksik metabolitlerinin akut ve kronik toksik etkileri henüz tüm yönleriyle belirlenememiş olmasına rağmen, özellikle kloramfenikol, penisilin ve bütün aminoglikozid antibiyotikler başta olmak üzere antibakteriyel ilaçların çoğunluğu insanlara yönelik eozonifili, trombositopeni, aplastik anemi ve diğer çeşitli kan bozukluklarını ortaya çıkarmakta; karaciğer, böbrek, kemik iliği, duyu ve denge organlarına yönelik olumsuz etkilere neden oldukları saptanmıştır [53].

### **1.3.1.3 İmmunopatolojik Etkiler**

Çok sayıdaki ilaç etken maddesinin hayvan ve insan türlerinde karşılaşılan immunopatolojik olayları başlatma veya böyle olaylara karışma etkinlikleri dikkate alındığında hayvansal kökenli besinleri yansıyan veteriner ilacı artıklarının insanlarda da aynı etkileri meydana getirdiği kabul edilmektedir. Allerjik olaylara yol açma riski bakımından hayvansal besinlere yansıyan penisilin artıkları üzerinde dikkatle durulmaktadır. Çünkü spesifik alerjik olayın başlayabilmesi için mikrogram düzeyinde penisilin farklı yollardan insan organizmasına alınması yeterli olmaktadır.

Yapısında beta-laktam halkası tutan ilaçlarla sağıtılan hayvanların gerekli yasal bekletme süresine uyulmaksızın elde edilen besin çeşitlerinde tehlikeli düzeylerde etkin hepten etkili metabolitlerinin veya antibiyotik artıklarının bulunabileceği çok sayıdaki araştırma sonucuyla da belirlenmiştir [54].

### **1.3.2 Ülkemizde Geçerli Olan Durum**

Son yıllarda ülkemizde hayvancılığın gelişmesine ve yetiştiricinin bilinçlendirilmesine yönelik bir şekilde her çeşit veteriner ilacının üretim ve tüketiminde giderek yükselen bir artış görülmektedir. Belli bilimsel yasal yetiştiricilik ve medikal ilkelere göre gerektiği zaman kullanılması gereken bu tür ilaçların sağlık ve çevresel sorunlara yol açabilecek şekilde üretildiğine tanık olmaktadır. Bu alanda ortaya çıkmış ve çıkabilecek sorunların daha da fazlaşmasına yol açabilecek tehlikeli durumlar ve uygulamaları şöyle özetlemek yerinde olacaktır [51, 52].

- 1.** Bugün ülkemizde tüm veteriner ilaçları denetim tabi tutulmaksızın serbestçe kullanılarak suistimal derecesinde tüketilmektedir.
- 2.** Özellikle antibakteriyel ilaçlar olmak üzere bütün minarel ve vitamin maddeleri anabolik amaçlarla ve gerekse antistres ilaçları halinde sulara ve yemlere katılarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.
- 3.** Son 15-20 yıllık süreçte veteriner ilaçlarının üretim, tüketim ve kontrolüne ilişkin olarak çok sayıda gelişmiş ülke ve uluslararası örgütlerin konuya yaklaşım biçimleri dikkate alındığında özellikle anabolik ve antibakteriyel ilaçlar olmak üzere tüm veteriner ilaçlarının ülkemizde hayvancılık sektöründeki üretim, tüketim, kullanım ve kontrolünü düzenleyen yasal ve bilimsel denetiminden bahsetmek güçtür.

4. İnsan sağlığı açısından son derece önemli öğeleri içeren her çeşit veteriner ilacının mutlaka veteriner reçetesi karşılığında alınarak, veteriner hekim gözetiminde tüketilmesi gerekirken, bu günkü durumuyla yem satış bayilerinde, zirai ilaç bayilerinde ve hatta mahalle, köy barınaklarında rahatça temin edilerek tüketilmektedir.

#### 1.4 Pestisitler

Pestisitler, insan ve hayvan vücudu ile bitki ve cansız cisimlerin çevresinde bulunan veya yaşayan; ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerlerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları (böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, toprak kurdu vb.) ortadan kaldırmak için kullanılan aktif kimyasallardır [54].

Pestisitlerin kullanımı Roma ve eski Yunan'dan beri süregelmektedir. Fakat 19. yüzyılın son dönemlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [55]. 19.yy'da istenmeyen organizmalara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmeye başlanmıştır [56].



### 1.4.1 Pestisitlerin Gruplandırılması

Pestisitler farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırmalar Tablo 1.3'te gösterilmektedir [57].

**Tablo 1.3:** Pestisitlerin sınıflandırılması.

<b>İlacın fiziksel haline göre;</b>	
- Katı formülasyon	- Sıvı formülasyon
<b>İşlevlerine göre;</b>	
- Yaprak dökücü	- Çekici
- Kurutucu	- Kaçırıcı
- Kısırlaştırıcı	- Büyüme yönlendirici
<b>Zararlıların biyolojik dönemine göre</b>	
- Larvaları öldürenler ( Larvasitler )	- Yumurta ve larvaları öldürenler ( Ovarvasitler )
- Yumurtaları öldürenler ( Ovisitler )	- Erginleri öldürenler
<b>Bileşimdeki etkili madde grubuna göre;</b>	
- Organofosfatlar	- Sentetik pyretroidler ve pyretrinler
- N-metilkarbamatlar	- Arsenikler
- Organoklorinler	
<b>Yarı ömürlerine göre;</b>	
- Dayanıksız ( 1-2 hafta )	- Dayanıklı ( 2-5 yıl )
- Orta dayanıklı ( 1- 18 yıl )	
<b>Hedef aldığı organizmaya göre;</b>	
- Böcek öldürenler ( insektisitler )	- Kemiricileri öldürenler ( rodensitler )
- Fungusları öldürenler ( fungusitler )	- Nematodları öldürenler ( nematositler )
- Fungusların faaliyetlerini durduranlar ( fungustatikler )	- Salyangozları öldürenler ( molluskusitler )
- Yabancı otları öldürenler ( herbisitler )	- Algleri öldürenler ( algisitler )
- Örümcekleri öldürenler ( akarisitler )	- Kuşları öldüren veya kaçırıcılar ( avensitler )
- Bakterileri öldürenler ( bakterisitler )	- Kaçırıcılar ( repellentler )
- Yaprak bitlerini öldürenler ( aphisitler )	- Çekiciler ( attractantlar )

Pestisitlerin sınıflandırılması yaygın olarak hedef aldığı organizmaya göre yapılmaktadır. Bu sınıflar arasından Dünyada ve Türkiye’de en yaygın kullanılanları sırasıyla;

- İnektisitler ⇒ Böcek öldürücüler.
- Herbisitler ⇒ Zararlı ot öldürücüler.
- Fungisitler ⇒ Küf ve mantar öldürücüler.
- Nematisitler ⇒ Nematod öldürücüler.
- Rodentisitler ⇒ Sıçanları ve diğer kemirgen öldürücülerdir [58].

Zararlı canlı kontrolünde vazgeçilmez kimyasal mücadele aracı olan pestisitlerin büyük bir kısmı, esas hedefleri olan zararlı organizmalara karşı spesifik olmadıkları için insan ve hayvanlarda da zehirleyici olmaktadır. Organik klorlu pestisitler kalıcı özelliklerin nedeniyle çevrede birikerek ve besin zincirine girerek toplum ve çevre sağlığı için önemli bir risk taşımaktadırlar. Böylece, dinamik bir denge halinde kalmaya çalışan çevrede ekolojik denge bozukluklarına sebep olurlar. Pestisitler hava, su, toprak, besin yoluyla ve ilaveten barınaklar, çevre ve alan ilaçlamaları sonucunda kalan artıkları ile besin kirlenmesine neden olurlar. Kalıcı pestisitlerin uygulanması sonucu ortaya çıkan en önemli kronik zehirlenme riski çevre kirliliği sonucu besin zincirine giren ve sonuçta nihai tüketici olan insana kadar her kademedede gittikçe yoğunlaşarak ulaşan pestisit kalıntılarıdır [59].

#### 1.4.2 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

Değişik yollardan vücuda giren pestisitlerin, belirli bir kısmı idrarla dışarı atılırken, birçoğu ise özellikle yağ dokusunda depolanmaktadır. Kadınlar daha fazla yağ dokusu içerdiği için pestisit birikimi erkeklere oranla daha fazla olmaktadır. Bazı pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri Tablo 1.4'de gösterilmiştir [58].

**Tablo 1.4:** Bazı pestisitlerin insan sağlığına etkileri.

<b>Akut Etkiler</b>	Baş dönmesi
	Kırmızı, yaşlı, yanan gözler
	Uykusuzluk
	Yorgunluk
	Aşırı terleme
	Bulanık görme
	Baş ağrısı
	Kas ağrısı
	Kusma
	Mide krampları
	Cilt kızarıklıkları
	<b>Şiddetli Akut Etkiler</b>
İshal	
Solunum zorluğu	
Felç	
Çırpınmalar	
Ağız, burundan akıntılar	
Koma veya bilinçsizlik	
Ölüm	

**Tablo 1.4 (devam):** Bazı pestisitlerin insan sağlığına etkileri.

<b>Uzun Vadeli Etkiler</b>	Beyin hasarı
	Bağışıklık sisteminde hasar
	Karaciğerde hasar
	Kanser
	Kısırlık
	Genetik hasar
	Sinir sisteminde hasar
	Böbreklerde hasar
	Deri hastalıkları
	Çocuk düşürme
	Ceninde hasar

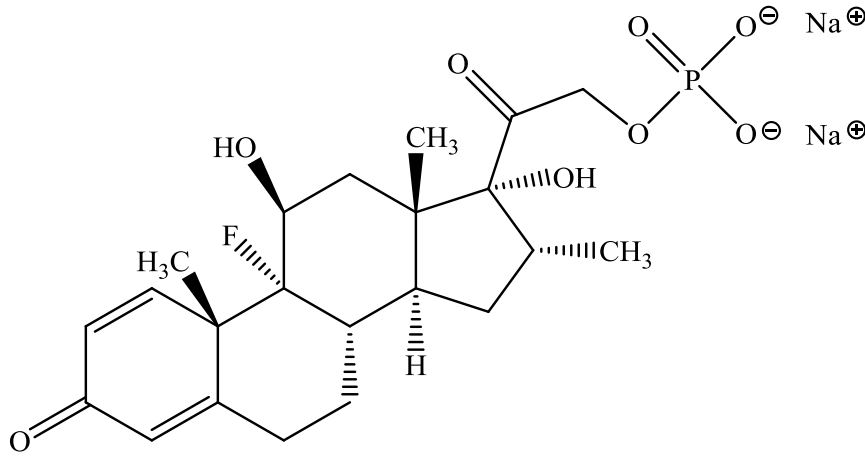
## 1.5 Çalışmamızda Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitler

### 1.5.1 Devamed®

#### İlaç Etken Maddesi :

Devamed 1 mL steril, apirojen, berrak ve renksiz çözelti içeriğinde 2.5 mg deksametazona eşdeğer 4 mg *Deksametazon sodyum fosfat* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.4: Deksametazon sodyum fosfat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

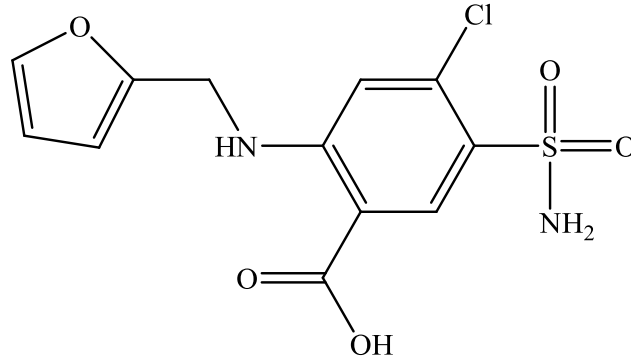
Devamed Enjeksiyonluk Çözelti, sığır, at, köpek ve kedilerde genel kapsamiyla intermediler metabolizma hastalıklarının ve çeşitli etmenlere bağlı olarak gelişen yangısal, romatizmal, toksik, alerjik ve anafaktik hastalıkların sağaltımında, tek başına veya çoğunlukla yapıldığı gibi diğer spesifik sağaltım seçeneklerini destekleyici olarak kullanılır [60].

### 1.5.2 Diüril®

#### İlaç Etken Maddesi :

**Diüril** enjeksiyonluk çözelti, kokusuz, hemen hemen renksiz, berrak bir çözelti olup, beher mL'sinde; 10 mg *Furosemid* bulunur [60] .

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



**Şekil 1.5:** Furosemid.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

Sığır, at, kedi ve köpeklerde aşağıdaki durumlarda kullanılır.

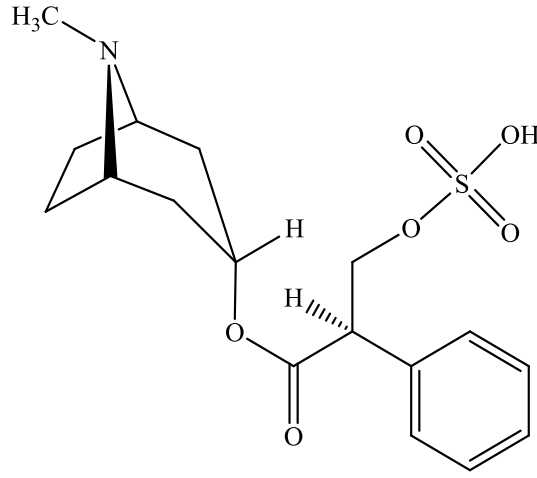
- 1) Ödem tedavisinde
- 2) Vücut boşluklarında (hidrotoraks, asites), içi boşluklu olan organlarda (bronkopnömani, hidroperikardium) ve eklem, tendo ve bursalarda biriken sıvının eliminasyonunda destekleyici tedavi amacıyla kullanılır.
- 3) Atlarda laminitis ve paralitik miyoglobinuride, dişi köpeklerde yalancı gebelikte destekleyici tedavi amacıyla kullanılır [60].

### 1.5.3 Atrol – F®

#### İlaç Etken Maddesi :

Atrol-F her 1 mL'lik ampulde; 2 mg *Atropin sülfat* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.6: Atropin sülfat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

Atropin Sülfat antikolinergik ve spazmolitik etkisinden dolayı;

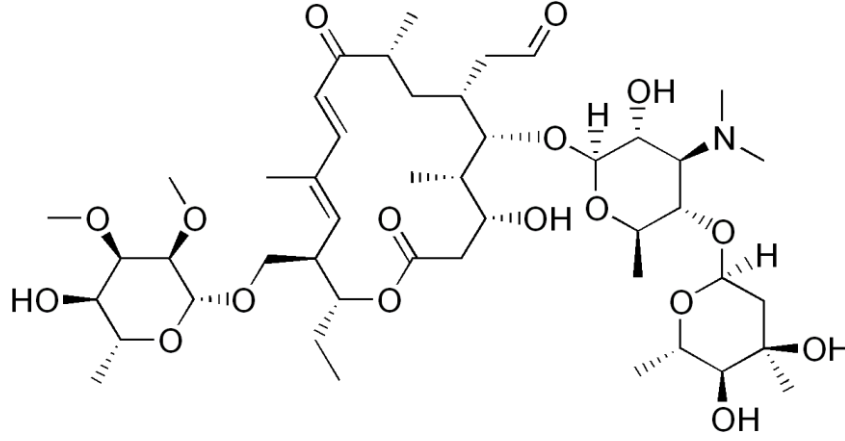
- Vagal etkinliğin artışına bağlı bradikardilerde,
- Ameliyat esnasında ortaya çıkabilen bradikardi, hipotansiyon ve aritmiler gibi vagal etkilerin giderilmesinde ayrıca kardiyopulmoner canlandırmada,
- Anestezi sırasında solunum yollarının ifrazatlarını azaltmak ya da önlemek için (preanestezi medikasyonda antisialagog olarak),
- Pilor, ince bağırsak ve kolon spazmlarında (irritabl bağırsak sendromu),
- Kolinesteraz inhibitörlerinin (neostigmin, pridostigmin, pilokarpin gibi), muskarin (*Inocybe* ve *Clitocybe* türü mantar zehirlenmelerinde) veya organofosfat pestisitlerin toksisitelerinin tedavisinde antidot olarak kullanılır [60].

#### 1.5.4 Taylomisın®

##### İlaç Etken Maddesi :

Taylomisın enjeksiyonluk çözelti, her 1 mL'sinde 200 mg *Tilozin* baz içeren açık amber renkli, steril enjeksiyonluk çözeltilidir [60].

##### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.7: Tilozin.

##### İlacın Klinik Özellikleri :

Sığırlarda; duyarlı bakteriler tarafından meydana getirilen solunum enfeksiyonları, pneumoni, bronkopneumoni, difteri, metrit ve foot rot (necrotic pododermatitis) tedavisinde endikedir [60].

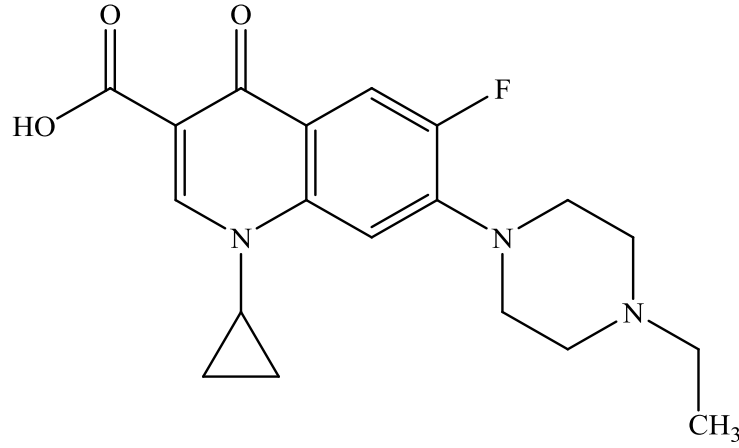


### 1.5.5 Killoxacin®

#### İlaç Etken Maddesi :

Killoxacin; hafif sarımsı renkte berrak çözelti halinde olup her mL'sinde 100 mg *Enrofloksasin* içerir [60] .

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.8: Enrofloksasin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

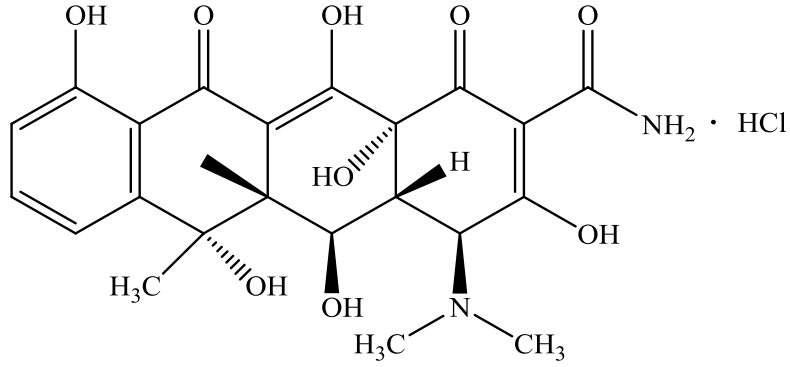
Killoxacin sığır, koyun, keçi, kedi ve köpeklerde enrofloksasine duyarlı *Gram negatif*, *Gram pozitif* bakterilerle mikoplazmaların oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde; viral hastalıklar sırasında oluşan enrofloksasine duyarlı bakteriyel komplikasyonlarda kullanılmaktadır [60].

### 1.5.6 Geosol®

#### İlaç Etken Maddesi :

Geosol oral çözelti tozu, sarı renkli, kristal hidroskopik bir tozdur ve beher g'da 54 mg Oksitetrasiklin baza eşdeğer *Oksitetrasiklin Hidroklorür* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.9: Oksitetrasiklin hidroklorür.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

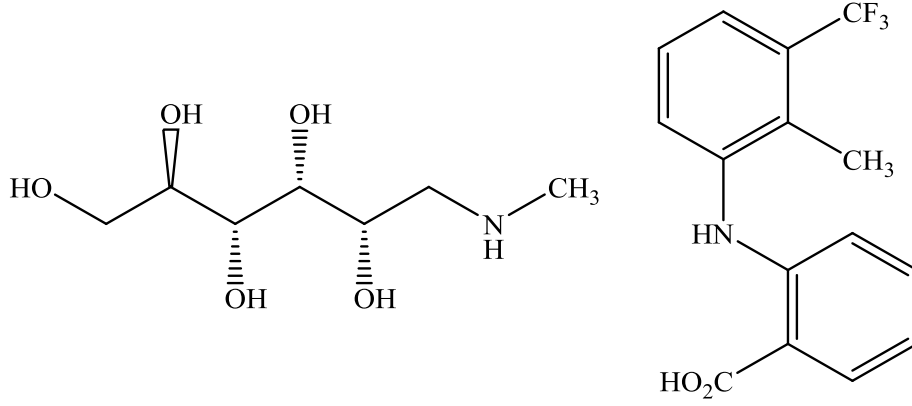
Kanatlılarda (civciv, piliç, tavuk ve hindilerde); Kronik solunum yolu enfeksiyonları (CRD), kanatlı korizası ve kolerası, diğer bakteriyel enteritisler, pullorum, mavi ibik, enfeksiyöz sinovit, ve sinuzit. Hindilerde; Erisipel enfeksiyonu. Tay, buzağı ve kuzularda (Rumen aktivitesi henüz başlamamış); Neonatal septisemilere bağlı ishallerde, *Septisemia neonatorum*'a bağlı akciğer ve barsak enfeksiyonları, viral enfeksiyonlarla birleşen bakteriyel solunum sistemi enfeksiyonlarına endikedir [60].

### 1.5.7 Flumed®

#### İlaç Etken Maddesi :

Fulimed enjeksiyonluk çözelti; berrak, renksiz, kokusuz, akışkan bir çözelti olup her mL’inde 50 mg Fluniksine eşdeğer *Fluniksine Meglumin* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.10: Fluniksine Meglumin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

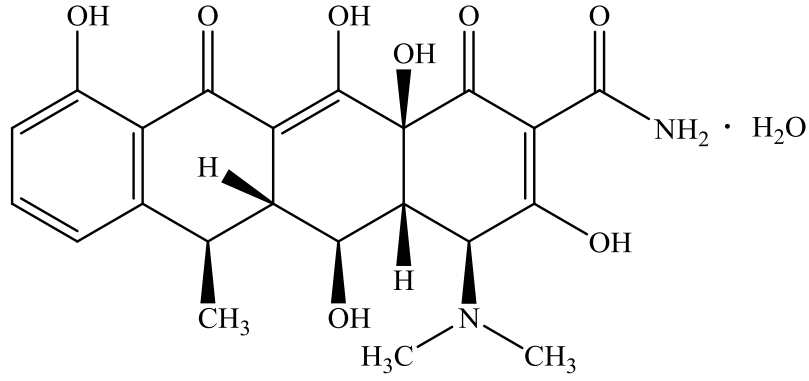
Fulimed enjeksiyonluk çözelti; sığır, at ve köpeklerde non-steroidal anti-enflamatuvar, anti-endotoksik, antipiretik ve non-narkotik analjezik olarak kullanılır [60].

### 1.5.8 Doksilin - LA<sup>®</sup>

#### İlaç Etken Maddesi :

Doksilin-LA her kapsülde; 100 mg Doksisiklin'e eşdeğer 112 mg *Doksisiklin mono hidrat* içermektedir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.11: Doksisiklin mono hidrat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

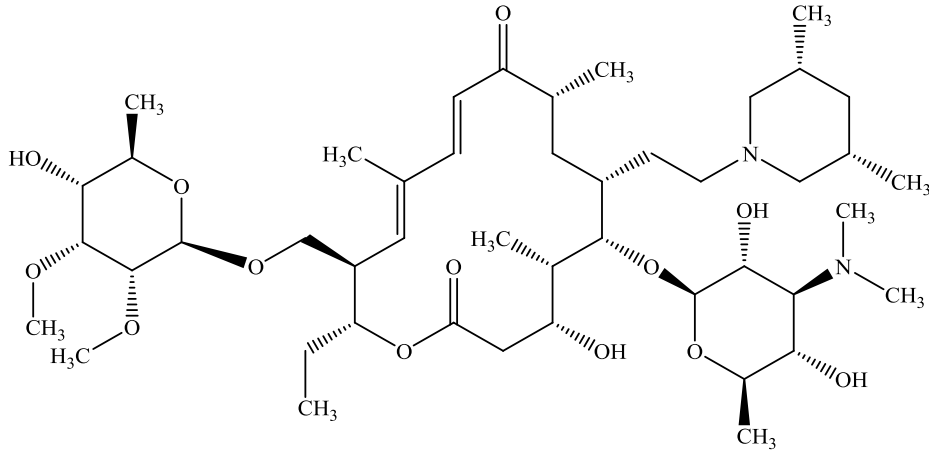
Doksilin-LA, *Gram-negatif* ve *Gram-pozitif* bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde endikedir [60].

### 1.5.9 Tilmivet®

#### İlaç Etken Maddesi :

Tilmivet enjeksiyonluk çözelti, kahverengimsi sarı renkte, steril, berrak bir çözelti olup 1 mL’de 300 mg *tilmikosin* bulunmaktadır [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.12: Tilmikosin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

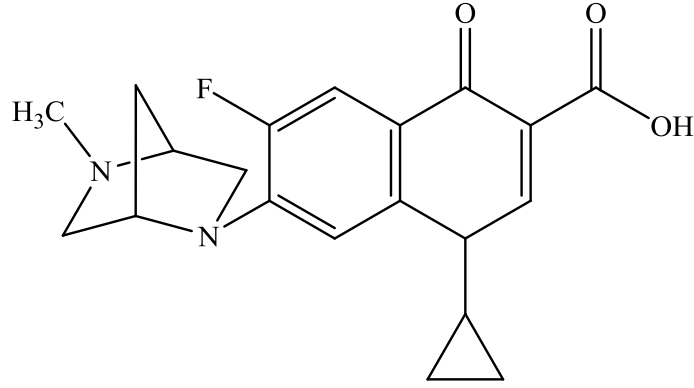
Tilmivet, sığır ve koyunlarda *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica* ve diğer tilmikosine duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu pneumonilerin (Shipping fever - Transit fever), Sığır Solunum Yolu Hastalığı Kompleksi (Bovine Respiratory Disease Complex-BRD Complex) *Staphylococcus aureus* ve *Mycoplasma agalactiae*'nin neden olduğu koyun mastitislerinin tedavisinde, sığırlarda interdigital necrobacillosis (Bovine Pododermatitis) tedavisinde endikedir [60].

### 1.5.10 Advocin®

#### İlaç Etken Maddesi :

Her ml Advocin 25 mg *danofloksasin mesilat* içerir [60].

#### İlacın Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.13: Danofloksasin mesilat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

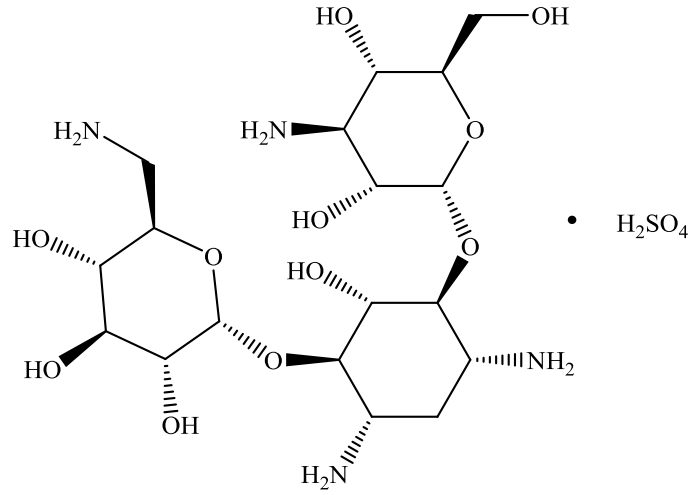
Advocin enjektabi solüsyon, veteriner sahada öneme sahip *Gram (-)* ve *Gram (+)* bakteriler ve belirli mikoplazma türleri de dahil olmak üzere, danofloksasin'e duyarlı organizmaların oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde ve kontrolünde kullanılır. Spesifik endikasyon alanları şunlardır; sığırlar (buzağı, dana, düve gibi genç damızlıklar, besi sığırları ve süt inekleri); *Pasteurella haemolytica* ve *Pasteurella multocida* tarafından oluşturulan sığır solunum sistemi hastalıkları (shipping fever, pnomoni), *Escherichia coli* ve *Salmonella* türlerinin neden olduğu bağırsak enfeksiyonları [60].

### 1.5.11 Kanovet®

#### İlaç Etken Maddesi :

Kanovet enjeksiyonluk çözelti; berrak, renksiz, karakteristik kokulu, steril bir çözelti olup beher mL'de; 250 mg Kanamisin baza eşdeğer *Kanamisin sülfat* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.14: Kanamisin sülfat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

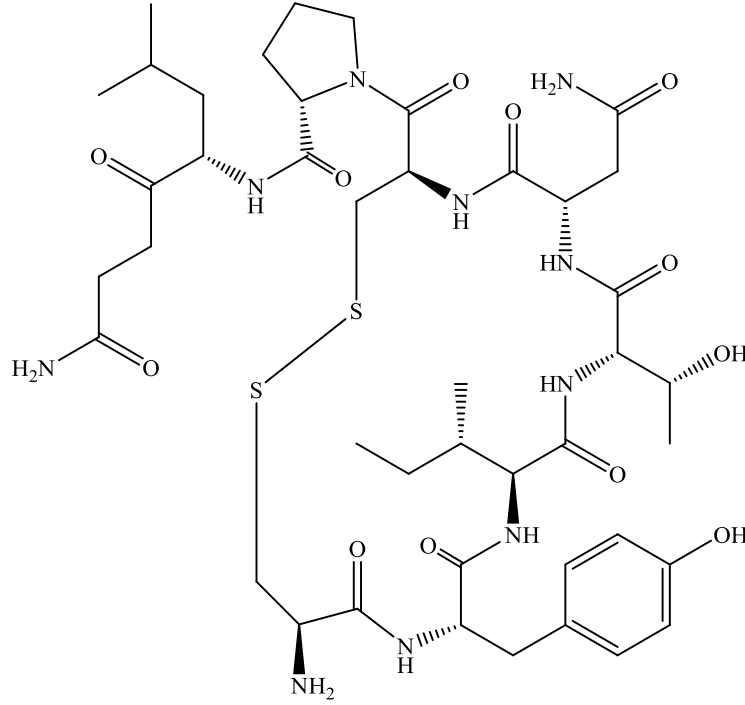
Sığır, at, koyun, köpek, kedilerde duyarlı bakterilerin neden olduğu solunum sistemi, üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku ve deri enfeksiyonları ile duyarlı bakterilerin karıştığı sekonder enfeksiyonların tedavisinde, sepsisemilerde kullanılır [60].

### 1.5.12 Fostimon®

#### İlaç Etken Maddesi :

Fostimon, etkin madde olarak gonadotropin grubundan yüksek saflıkta folikül uyarıcı hormon (FSH) olan *Urofollitropin* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.15: Urofollitropin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

Vücut dışı dölleme (IVF), gametlerin fallop tüplerine transferi (GIFT) ve zigotların fallop tüplerine transferi (ZIFT) gibi ‘‘Yardımcı Üreme Teknikleri’’ ile tedavilerde çok sayıda yumurta elde edilmesi için yumurtalıkları normalde olduğundan daha fazla uyarılmasında kullanılır [60].

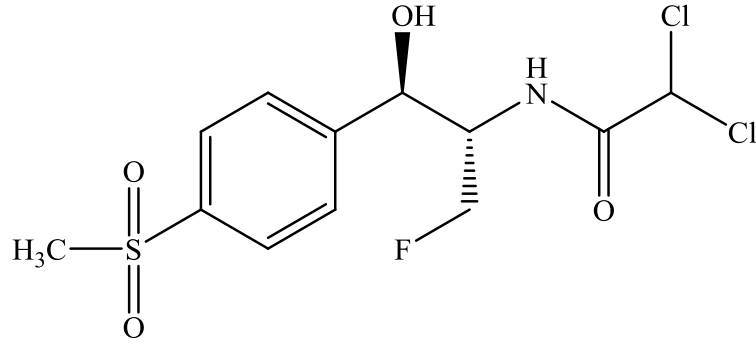


### 1.5.13 Flortek®

#### İlaç Etken Maddesi :

Renksiz veya soluk sarı renkli, berrak, hafif viskoz, steril bir çözelti olan Flortek enjeksiyonluk çözelti, her mL'sinde 300 mg *Florfenikol* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.16: Florfenikol.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

Flortek enjeksiyonluk çözelti; sığırlarda florfenikole duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.

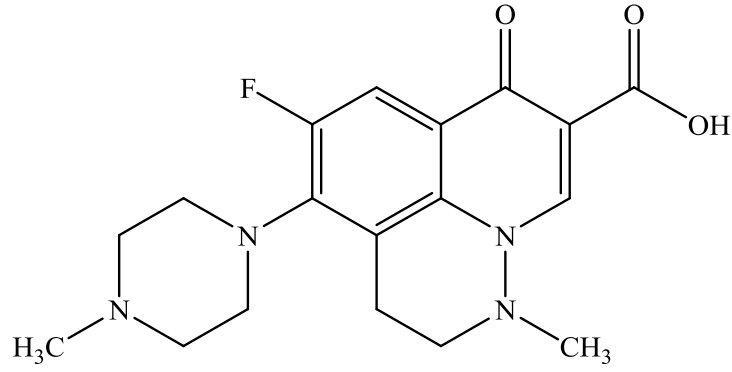
Özellikle sığırlarda *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Corynebacterium pyogenes* ve florfenikole diğer mikroorganizmaların neden olduğu solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır [60].

### 1.5.14 Marboflex®

#### İlaç Etken Maddesi :

Marboflex, sarı renkli, kemik şeklinde, ortası çentikli olan her tabletinde 40 mg *Marbofloksasin* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.17: Marbofloksasin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

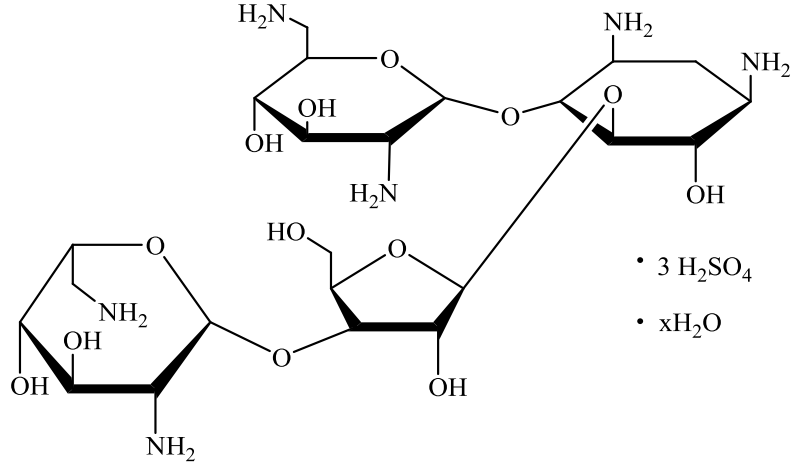
Marboflex tablet, marbofloksasine duyarlı bakterilerin neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (*Pyoderma*, *Impedigo*, *Follikulitis*, *Frunculosis*, *selülitis*), duyarlı bakteriler tarafından oluşturulan ve *Prostatitis* ile ilişkili olan ya da olmayan idrar yolları enfeksiyonları, solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır [60].

### 1.5.15 Neozid®

#### İlaç Etken Maddesi :

Neozid oral çözelti tozu; beyazımtırak akışkan toz olup her 1 g toz içeriğinde 500 mg neomisine eşdeğer *Neomisin sülfat* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.18: Neomisin sülfat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

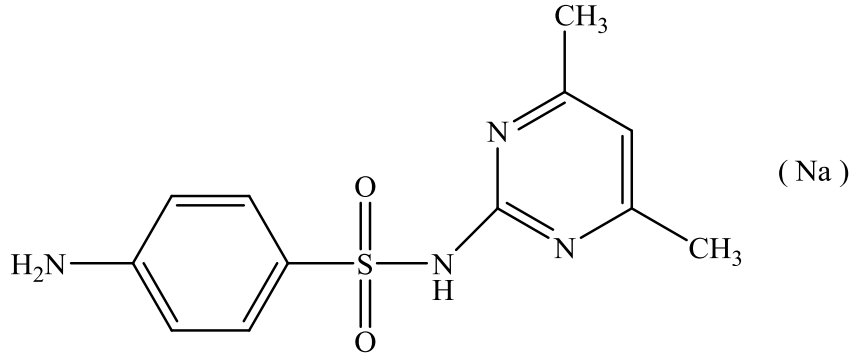
Sığır, at, koyun, keçi, köpek, kedi ve tavuklarda *E. coli*, *Salmonella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Proteus* gibi duyarlı bakteriler tarafından meydana getirilen bakteriyel enteritiserin tedavisinde kullanılır [60].

### 1.5.16 Teknomezathine®

#### İlaç Etken Maddesi :

Berrak, kırmızı renkli bir çözelti olan Teknomezathine % 16 oral çözelti, her mL'sinde 160 mg *Sülfadimidin sodyum* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.19: Sülfadimidin sodyum.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

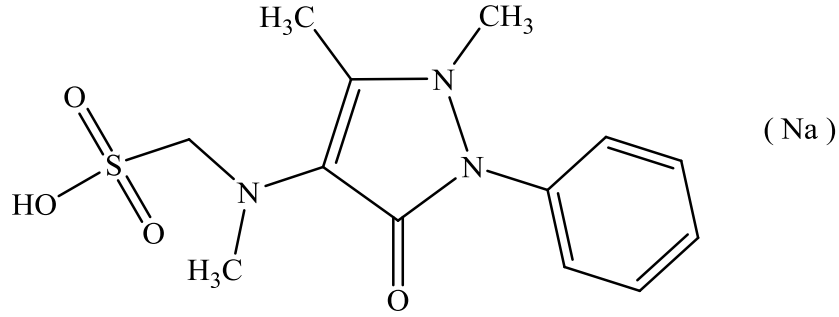
Sığır, koyun ve keçilerde duyarlı bakteriler tarafından meydana getirilen gastroenteritis, kolibasillosis ve koliseptisemi gibi enfeksiyonların koksidiyozis tedavisinde kullanılır [60].

### 1.5.17 Vetaljin®

#### İlaç Etken Maddesi :

Vetaljin bir tablette 500 mg *metamizol sodyum* içerir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.20: Metamizol sodyum.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

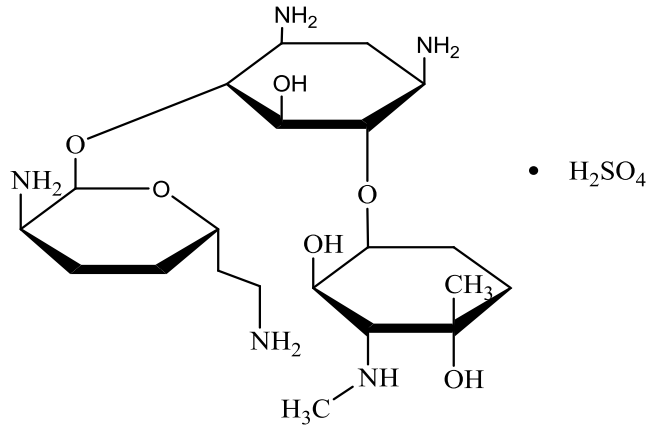
Metamizolün analjezik, antipiretik ve antispazmodik etkileri vardır. Metamizol büyük olasılıkla kombine bir santral ve periferik etki şekline sahiptir. Afferent lifler, omurilik ve periakvaduktal gri madde düzeyindeki santral etki mekanizmaları metamizolün analjezik etkisine katkıda bulunabilir [60].

### 1.5.18 Gentavet®

#### İlaç Etken Maddesi :

Gentavet enjeksiyonluk çözelti, beher mL'inde 100 mg Gentamisin baza eşdeğer *Gentamisin sülfat* içeren, açık sarı renkli bir çözeltidir [60].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.21: Gentamisin sülfat.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

Sığır, at, kedi ve köpeklerde;

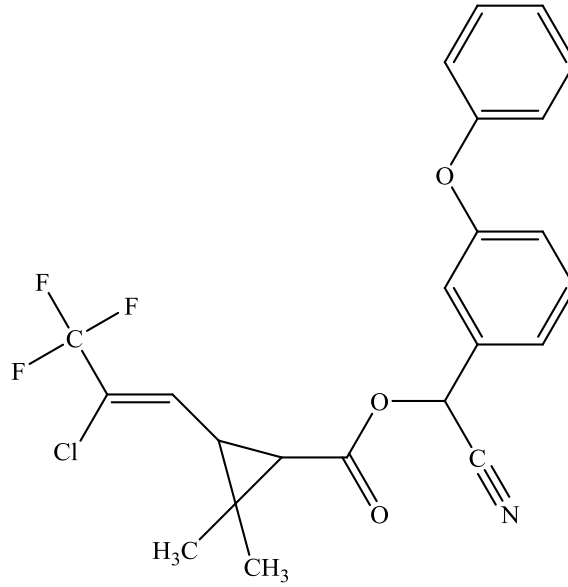
- Solunum sistemi enfeksiyonları,
- Ürogenital sistem enfeksiyonları,
- *Kolibasillosis*, *Salmonella* ve *Gentamisine* duyarlı bakterilerin neden olduğu bakteriyemi, sepsisemi, yumuşak doku enfeksiyonları,
- Kedi ve köpekte otitis externa olgusunda ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılır [60].

### 1.5.19 Petra 5 EC<sup>®</sup>

#### İlaç Etken Maddesi :

Petra 5 EC, lambda 50 g/L *Sihalotrin* içerir [61].

#### İlaç Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



**Şekil 1.22:** Sihalotrin.

#### İlacın Klinik Özellikleri :

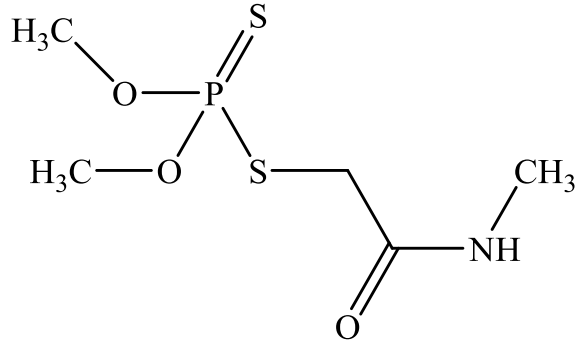
Petra 5 EC, böceklerin sinir sistemi üzerinde ve nöronların işlevini sodyum kanalı etkileşimi ile bozar. Sistemik olmayan kontak ve mide etkili kovucu özelliğe ile hızlı ani ve uzun rezidüel etkilidir. Persistan insektisit ve akarisit kontak ve mide etkili. Petra 5 EC, değme ve mide yoluyla etkili olup, ani ve yeterli kalıcı etkiye sahiptir. İlaçlamadan iyi sonuç alabilmek için ilaçlamaların zararlıların uygun dönemlerinde ve iyi bir kaplama yapabilecek şekilde uygulanması gerekir [61].

### 1.5.20 Rogor®

#### Pestisit Etken Maddesi :

Rogor, litrede 400 gr *Dimethoat* içerir [62].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.23: Dimethoat.

#### Pestisitinin Özellikleri :

Rogor adlı bitki koruma ürünü, etki mekanizmasına göre 1B grubu olarak sınıflandırılmış bir insektisittir [62].

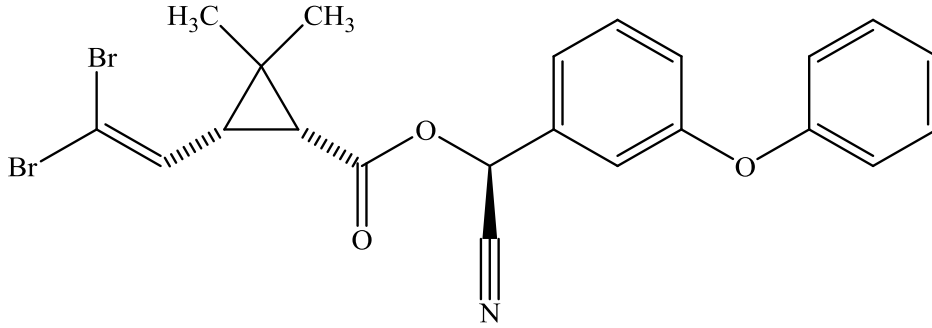


### 1.5.21 Delmetrin 25 EC<sup>®</sup>

#### Pestisit Etken Maddesi :

Delmetrin 25 EC, litrede 2.8 g *Deltametrin* içerir [63].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.24: Deltametrin.

#### Pestisitinin Özellikleri :

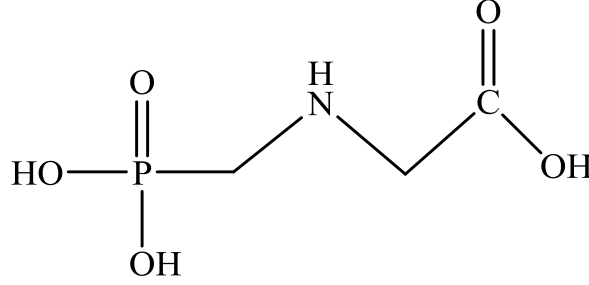
Delmetrin 25 EC adlı bitki koruma ürünü, etki mekanizmasına göre 3A grubu olarak sınıflandırılmış bir insektisittir [63].

### 1.5.22 Mamba Turbo®

#### Pestisit Etken Maddesi :

Mamba Turbo; litresinde 680 g *N*-(fosfonametil) glisin içerir [64].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.25: *N*-(fosfonametil) glisin.

#### Pestisitinin Özellikleri :

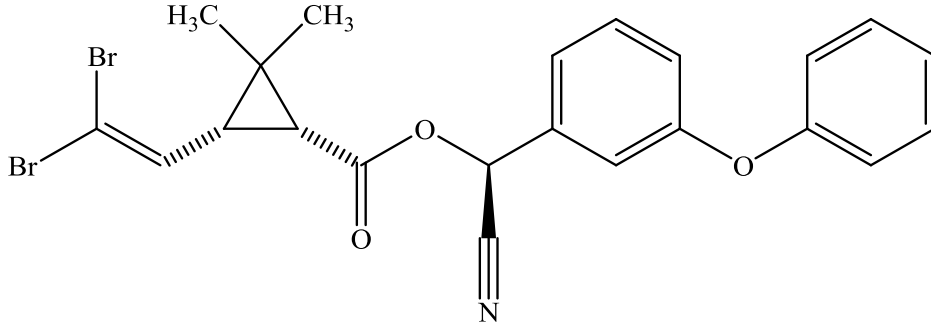
Mamba Turbo, sahip olduğu etki mekanizması nedeniyle G9 grubu bir herbisit (Yabancı Ot İlacı) olarak sınıflandırılmıştır [64].

### 1.5.23 Deltharin 25 EC®

#### Pestisit Etken Maddesi :

Deltharin 25 EC, hacimce % 3 *Deltametrin* içerir [65].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.24: Deltametrin.

#### Pestisitın Özellikleri :

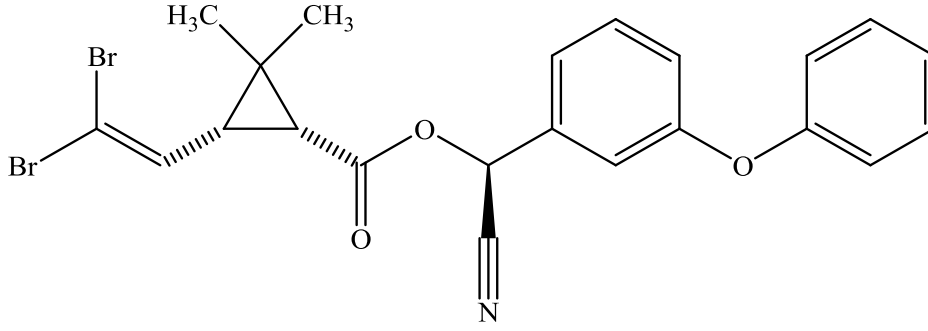
Deltharin 25 EC adlı bitki koruma ürünü, etki mekanizmasına göre 3A grubu olarak sınıflandırılmış bir insektisittir (Böcek İlacı) [65].

### 1.5.24 Decis®

#### Pestisit Etken Maddesi :

Decis, litrede 25 g *Deltametrin* içerir [66].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.24: Deltametrin.

#### Pestisitın Özellikleri :

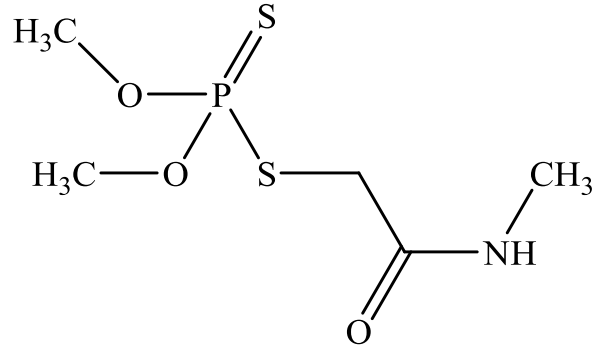
Decis adlı bitki koruma ürünü, etki mekanizmasına göre 3A grubu olarak sınıflandırılmış bir insektisitir (Böcek İlacı) [66].

### 1.5.25 Algor 40 EC®

#### Pestisit Etken Maddesi :

Algor 40 EC, litrede 400 gr *Dimethoat* içerir [67].

#### Pestisit Etken Maddenin Kimyasal Yapısı :



Şekil 1.26: Dimethoat.

#### Pestisitinin Özellikleri :

Algor 40 EC adlı bitki koruma ürünü, etki mekanizmasına göre 1B grubu olarak sınıflandırılmış bir insektisittir (Böcek İlacı) [67].

## 1.6 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada sığır sütünden yeni bir afinite jeli ile LPO enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda kullanılan veteriner ilaçları ve pestisitler ülkemizde ve dünyanın bazı bölgelerinde ürün verimi arttırılması amacı ile çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Sütte antibakteriyel etki gösteren LPO enziminin söz konusu veteriner ilaçları ve bu pestisitler tarafından ne ölçüde etkilendiğini bilinmesinin önemli olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca yeni bir afinite jelinden saflaştırılan LPO enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin araştırılması ile elde edilen sonuçların diğer kaynaklardan saflaştırılan LPO enzimi ile karşılaştırılma imkanı sağlanacaktır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar; CNBr, Sepharose-4B, etilendiamin, L-trozin, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-Sülfonik asit) (ABTS), Standart serum albumin, Amonyum sülfat, Sodyum asetat, Sodyum fosfat, Sodyum karbonat, Hidrojen peroksit, Sodyum klorür, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Coomassie brillant blue G-250, Sigma Chemical Company'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, 2-merkaptotanol, Brom timol mavisi, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, Glisin, Fosforik asit, Metanol, Etanol, Akrilamid, *N,N'*-metilen bisakrilamid ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; 150 mL sığır sütü piyasadan sağlanmıştır.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Doktora çalışmamızda kullanılan alet ve cihazlar aşağıda gösterilmiştir.

Buz Makinesi	: Fiocchetti AF10
Elektroforez Sistemi	: Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	: Sigma (1.5 ×10 cm)
Manyetik Karıştırıcı- Isıtıcı	: WiseStir MSH-20 A
Otomatik pipetler	: Transferpette, Nichipet EX
pH metre	: Hana pH 211 Microprocessor
Soğutmalı Santrifüj	: Sigma 3K15
UV-Spektrofotometresi	: Biotek Power Wave XS

Vorteks	: Fisons Whirli Mixer
Terazi	: Precisa XB 220A
Jel Görüntüleme Sistemi	: Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Gradient Mikser	: Atta magnetik karıştırıcı ve gradient tüp

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### **Afinite jelinin sentezinde kullanılan çözeltiler:**

**0.1 M NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (pH 10.0);** 8.401 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L' ye tamamlandı.

**0.2 M NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (pH 8.8);** 8.401 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

**Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon;** 1.79 g (0.01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 950 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH: 6.8'e getirildi, toplam hacim 1 L oluncaya kadar saf su ilavesi yapıldı.

**Afinite jeli için kullanılan yıkama tamponu;** 1.77 g (0.0125 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 400 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH: 6.8'e getirildi, toplam hacim 500 mL oluncaya kadar saf su ilavesi yapıldı.



**Afinite jeline bağlanmış Laktoperoksidaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon;** 1M NaCl / 25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O pH: 6.3 (laktoperoksidaz enziminin elüe edilmesinde kullanıldı) 14.61 g (2.5.10<sup>-1</sup> mol) NaCl, bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra 1.112 g (6.25.10<sup>-3</sup> mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ilave edilip toplam hacim 250 mL oluncaya kadar saf su ilavesi yapıldı.

**Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan fosfat tamponu;** 17.8 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 950 mL destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH:6.0'a getirildi ve toplam hacim 1 litre oluncaya kadar saf su ilavesi yapıldı.

**Laktoperoksidaz enziminin substrat çözeltisi;** 0.055 g (1.10<sup>-4</sup> mol) ABTS 100 mL 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O pH: 6.0 içinde çözüldü.

**Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.2 mM) çözeltisi;** % 30'luk, 1.11 g / mL yoğunluğa sahip olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 32 µL alındı, toplam hacim 100 mL oluncaya kadar saf su ilavesi yapıldı.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

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

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;**

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.1’de verilmektedir.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;**

0.66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözülür ve bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edilir.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;**

Hacimce % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol 875 mL saf su ile karıştırılır.

**Tablo 2.1:** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	% 10	% 3
<b><u>Akril amid/Bis</u></b> Akril amid : 15 g, Bis : 0.4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Distile su	20.1 mL	12.2 mL
<b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b> 11.82 g Tris-HCl alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	-
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b> 3.94 g Tris-HCl alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	-	5 mL
<b><u>% 10 'luk SDS</u></b> 1g SDS alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 µL	200 µL
<b>TEMED</b>	25 µL	20 µL
<b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b> 1g Amonyum persülfat alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması

150 mL taze sığır sütü +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün 150 mL süt 5 mL toluen ile blendırda iyice karıştırıldı. Daha sonra blendırda toluenle iyice muamele edilen süt +4 °C’de 45 dakika süre ile 15000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra altta kalan çökelek kısım atılır, üstte kalan sıvı kısım bir mezüre alınarak hacmi belirlenir. Ölçülen sıvı kısma % 60’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılır ve arkasından +4 °C’de 45 dakika süre ile 15000 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısım atılır, alttaki çökelek kısım alınır. Çökelek dengeleme tamponunda çözülür.

#### 2.2.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu nedenle % 60’lık amonyum sülfat çöktürmesi aşağıda verilen formülle belirlendi;

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

**V** : Santrifüj işlemi sonrası üste kalan sıvının hacmi.

**S<sub>1</sub>** : 1’in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu.

**S<sub>2</sub>** : 1’in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu.

### 2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini

Laktoperoksidaz enzimi için aktivite ölçümü, Bardsley ve Shindler yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen prosedür ile yapılmıştır. [22]. Bu yöntem, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır [22].

Aktivite tayininde şu işlem basamakları uygulanmaktadır:

1 mL'lik spektrofotometre küvetine 66 µL 1mM ABTS, 0.1 M pH: 6 fosfat tamponundan 835 µL ve 33µL 3.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlendi. 66 µL enzim çözeltisi ilave edilerek hemen kronometre çalıştırıldı küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 75 saniye süreyle her 15 saniyede bir olmak üzere kaydedildi.

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

d=1 cm, ışık yolu.

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

### 2.2.3 Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapılmıştır. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan ) 280 nm deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır [68].

Kromatografi sonucunda elüatlar kuvartz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçülür.

### 2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brillant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [69]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

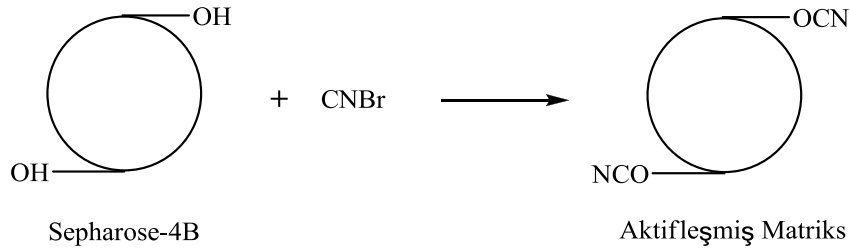
Protein tayini işleminde izlenen yol: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1 mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brillant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8.00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.2).

Enzim örneklerinden 0.1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

## 2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması

### 2.2.5.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

30 mL Sepharose-4B katı destek materyali, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Üzerine eşit hacimde saf su eklendi. Karıştırılmakta olan süspansiyonuna 4 g CNBr tek seferde eklendi. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e getirildi ve reaksiyonun bu pH'da kalması sağlandı. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (15-20 dakika). Bol miktarda saf sudan hazırlanmış buz süspansiyona eklendi ve karışım bir buncher hunisine aktarıldı. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10.00) ile yıkandı (Şekil 2.1) ve bir behere alındı.



**Şekil 2.1:** Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi.

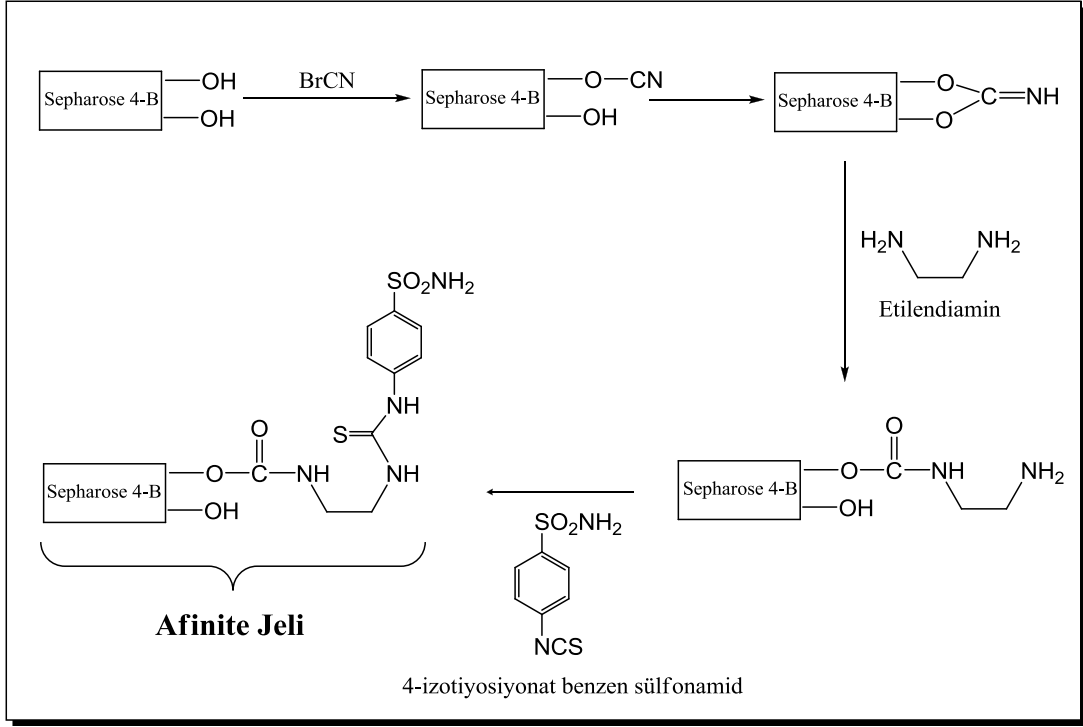
### **2.2.5.2 Etilendiaminin Bağlanması**

0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH: 10 çözeltisine alınan süspansiyona 10 mL etilendiamin yavaş yavaş eklenir. 2 saat karışmaya bırakılır. Daha sonra süspansiyon 16 saat 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen etilendiamin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10) ile tekrarlandı. Etilendiamin ile modifiye Sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

### **2.2.5.3 Ligandın Bağlanması**

100 mg 4-izotiyosiyonat benzen sülfonamid 5 mL DMSO içerisinde çözüldü ve Sepharose-4B-L-etilendiamin süspansiyonuna ilave edildi. Oluşan bu karışımın pH: 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 2-3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.2).





**Şekil 2.2:** Afinite jelinin sentez basamakları.

#### 2.2.5.4 Afinite Jelinin Kolona Paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH: 6.8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolonlara paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmesi, eluat ile dengeleme tamponunun 280 nm'de absorbanasının en az 0.02'ye düşmesi ile anlaşılmıştır.

#### 2.2.5.5 Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu

Bölüm 2.2.1'de anlatıldığı gibi saflaştırma basamakları sonunda elde edilen 40 mL homojenat 10 mM fosfat (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra numune eklenmiş kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH: 6.8) tamponu ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) elüsyon tamponu eklenerek laktoperoksidaz enziminin elüe edilmesi sağlandı.

Elüatlar 2'er mL'lik ependorf tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm'de absorpsiyon değerleri köre karşı ölçüldü. Absorpsiyon olarak yüksek proteine karşılık yüksek aktivite gösteren elüatlar birleştirildi ve absorpsiyon değerleri belirlendi.

### **2.2.6 SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enzimin Safliğinin Kontrolü**

Laktoperoksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından bulunan yöntemle çalışılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [70].

Bu amaçla elektroforez cam plakalarının önce saf su, sonra etil alkol ile iyice temizle işlemi yapıldı. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Tablo 2.1'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 ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki *n*-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığıma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (20-30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek proteine karşılık yüksek aktivite gösterenler tüpler toplam hacim 75 µL olacak şekilde 2:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler cam plakalara alındıktan sonra sıcak su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulmuş kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 200 volt'a ayarlandı. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1 cm 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 1.5-2 saat 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.

### **2.2.7 Laktoperoksidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması**

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda Laktoperoksidaz enzimi, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) substratının dokuz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı.

$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### **2.2.8 Bazı Veteriner İlaçlarının ve Pestisitlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması**

Bazı veteriner ilaçlarının ve pestisitlerin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak için, optimum şartlarda ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) substratında çalışıldı. Önce veteriner ilaçsız ve pestisitler ortamdaki enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı.

Değişik veteriner ilaçlarının ve pestisitlerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 412 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite – [I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir veteriner ilacı ve pestisit için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

### **3. BULGULAR**

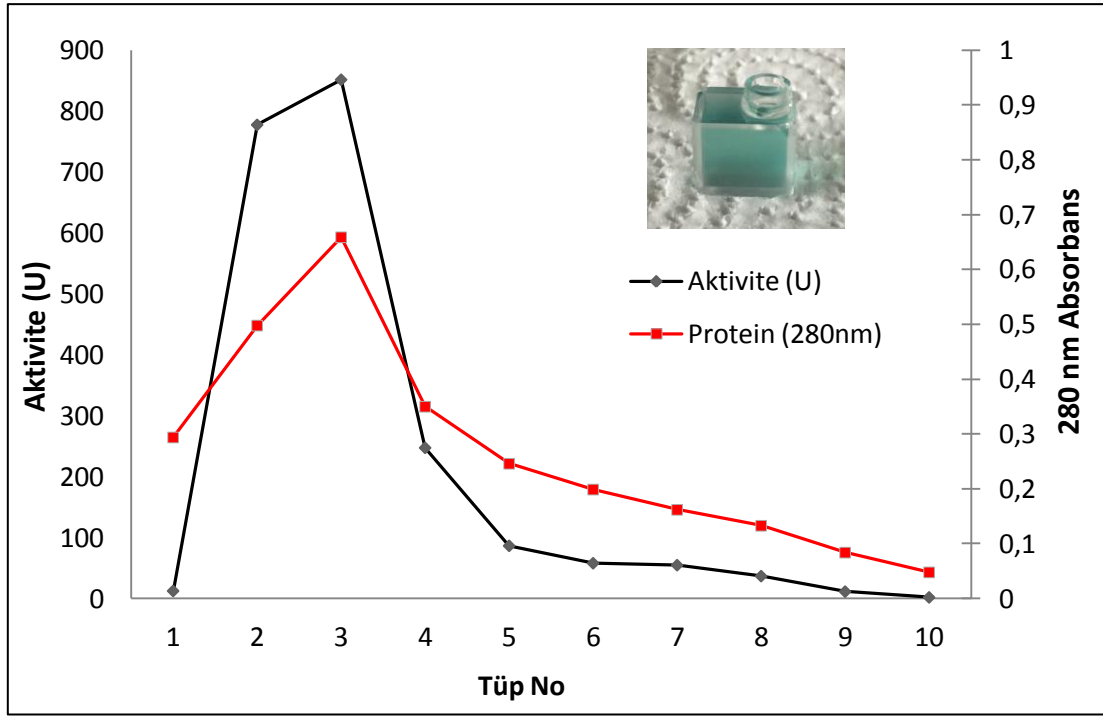
#### **3.1 Enzimin Saflaştırılması**

##### **3.1.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması**

150 mL taze sığır sütünü +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün 150 mL süt 5 mL toluen ile blendırda iyice karıştırıldı. Daha sonra blendırda toluenle iyice muamele edilen süt +4 °C’de 45 dakika süre ile 15000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra altta kalan çökelek kısım atılır, üstte kalan sıvı kısım bir mezüre alınarak hacmi belirlenir. Ölçülen sıvı kısma % 60’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılır ve arkasından +4 °C’de 45 dakika süre ile 15000 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısım atılır, alttaki çökelek kısım alınır. Çökelek dengeleme tamponunda çözülür.

##### **3.1.2 Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması**

Çökeleğin dengeleme tamponunda çözünmesi ile elde edilen 40 mL homojenat 10 mM fosfat (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra numune eklenmiş kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH: 6.8) tamponu ile yıkandı. Böylece laktoperoksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) elüsyon tamponu eklenerek laktoperoksidaz enziminin elüe edilmesi sağlandı. Elüatlar 2’er mL’lik ependorf tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm ve 412 nm’de absorbans değerleri köre karşı ölçüldü (Şekil 3.1).

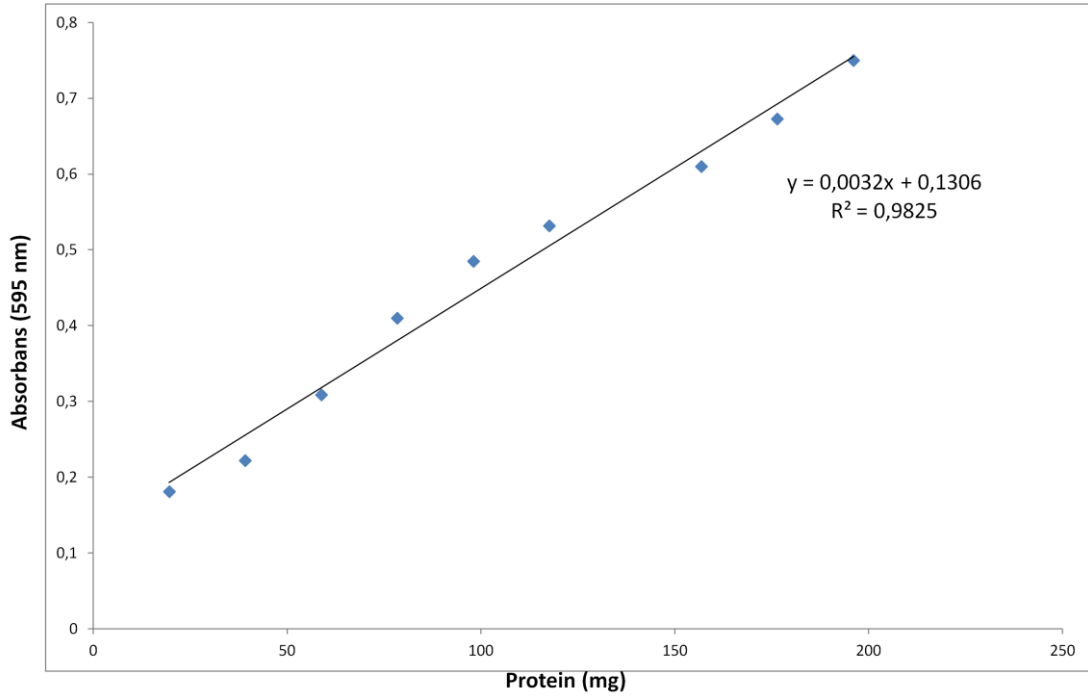


**Şekil 3.1:** Afinite kolonundan LPO enziminin elüsyon grafiği.

### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler belirlendi. Kolona tatbik edilen numune ve enzim aktivitesi rastlanan elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Tablo 3.1’de verildi.

Sütten elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



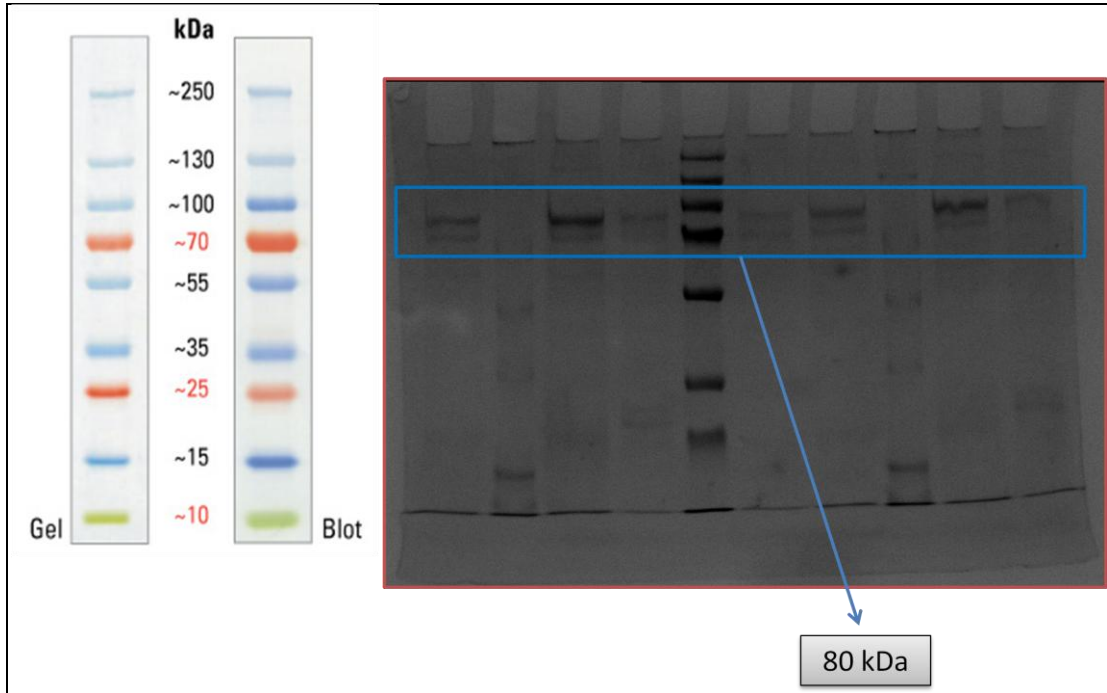
**Şekil 3.2:** Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.

**Tablo 3.1:** LPO Enzimi için saflaştırma tablosu.

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U)	Toplam Aktivite (U)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	150	460.19	69027.98	88	13200	5.23	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	40	555.39	22215.9	75	3000	7.41	32.18	1.024
Afinite Kromotografisi	12	777.56	9330.678	0.06	0.72	12959.27	13.52	2477.87

### 3.1.4 Laktoperoksidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kolonundan saflaştırılan laktoperoksidaz (LPO) enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine süttten saflaştırılan laktoperoksidaz (LPO) enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (şekil 3.3).



**şekil 3.3:** Afinite kromotografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi.

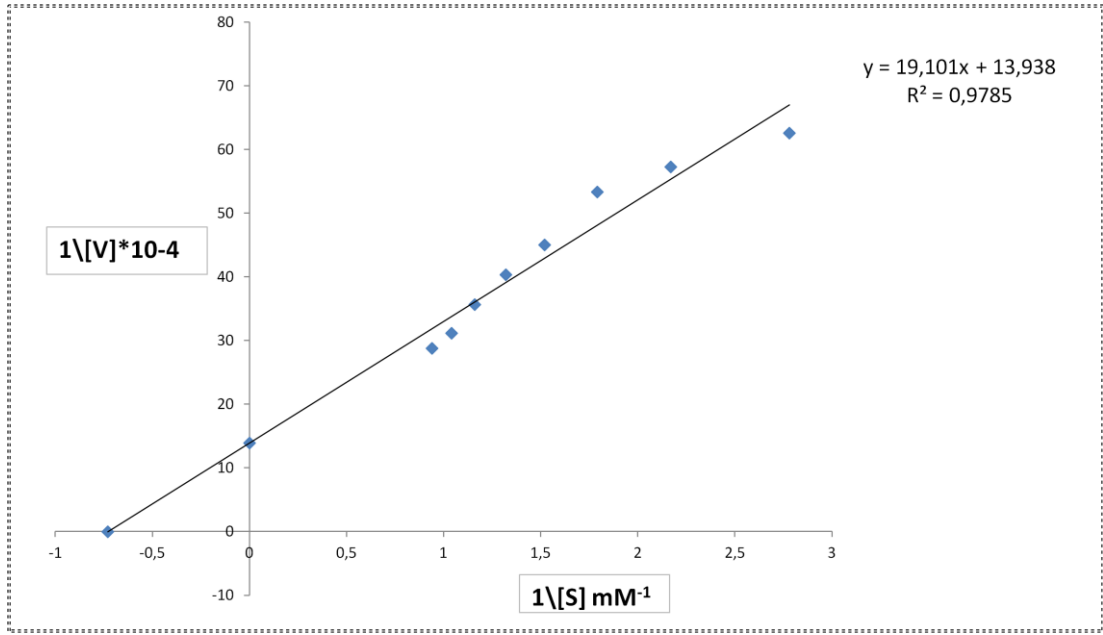
### 3.2 Laktoperoksidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla; ABTS substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 412 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mL dakika) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (şekil 3.4). Grafikten yararlanarak LPO enzimi için  $K_M$  değeri 1.4 mM ve  $V_{max}$  değeri 1000 U/mL dakika olarak bulundu.



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

Aktivite Fosfat tamponu ( $\mu\text{L}$ )	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Substrat ABST çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Ligand Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Kuvetteki Toplam Hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	$\Delta A$ (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	$1/V \cdot 10^{-4}$	$1/[S]$
835	66	36	33	30	1000	0.36	0.151	159.74	62.6	2.78
825		46	33	30		0.46	0.165	174.55	57.3	2.17
815		56	33	30		0.56	0.177	187.25	53.4	1.79
805		66	33	30		0.66	0.210	222.159	45.06	1.52
795		76	33	30		0.76	0.234	247.55	40.4	1.32
785		86	33	30		0.86	0.265	280.34	35.7	1.16
775		96	33	30		0.96	0.302	319.49	31.2	1.04
765		106	33	30		1.06	0.328	346.99	28.8	0.94



**Şekil 3.4:** Sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

### 3.3 Sütteki Laktoperoksidaz (LPO) Enziminin Farklı Kolon Şartlarında Saflaştırılması

LPO enziminin saflaştırılması için, ekstrakt direkt kolona tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işlemleri, farklı pH değerleri (6.0, 6.5, 7.0, 7.5), farklı sıcaklık (5 °C, 15 °C ve 35 °C) ve farklı iyonik şiddetlerde (0.05, 0.1, 0.15) gerçekleştirildi. Farklı kolon şartlarından elde edilen elüatlara enzim aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler grafiklere aktarıldı.

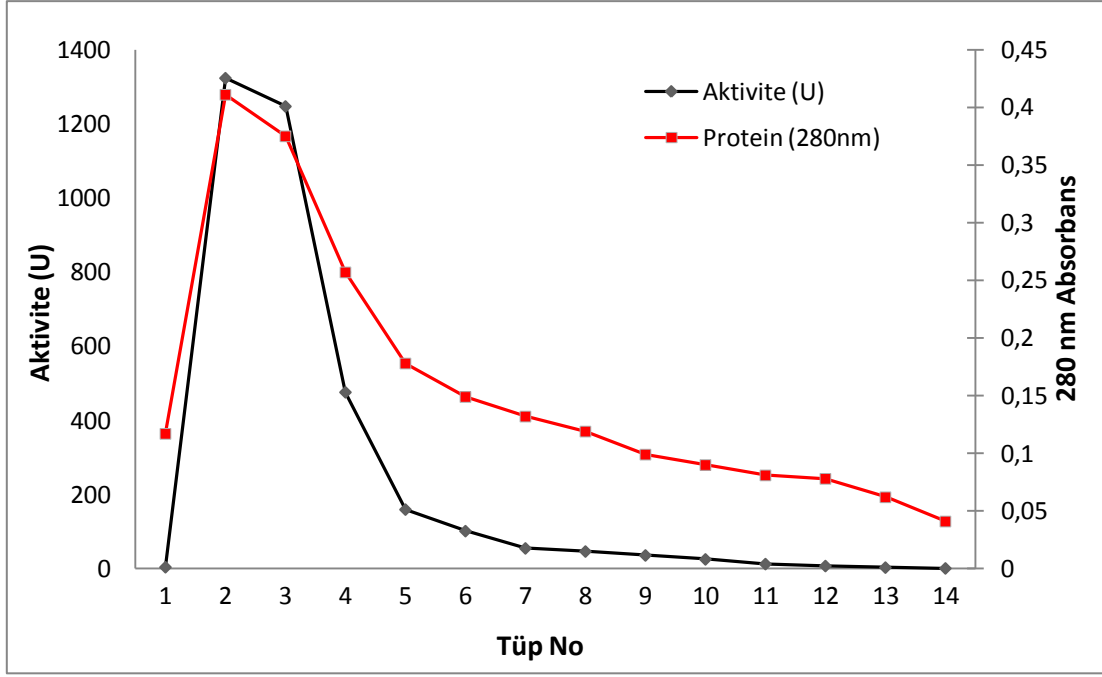
### **3.3.1 Afinite Kolonundan Saflaştırılan LPO Enzimine Farklı pH Değerlerinin Etkisi**

#### **3.3.1.1 LPO Enziminin 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Tamponu (pH: 6.0) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması**

Bölüm 2.2.5’de belirtildiği gibi şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.0) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Saflaştırma basamakları sonucunda elde edilen 40 mL homojenat kolona yavaş yavaş eklendi.

Homojenat tamamen geçtikten sonra kolon 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH:6.0) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık olarak 0.02 ye düşünceye kadar devam edildi.

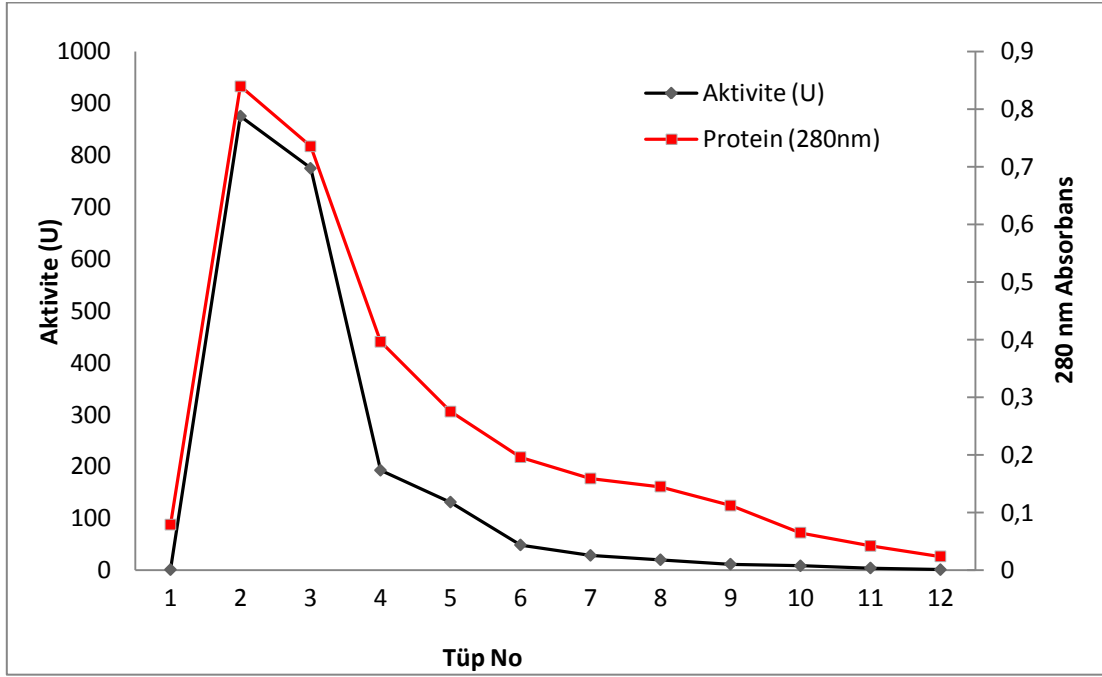
Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.3) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 2’er mL halinde ependorf tüplerine alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık 0.04 oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kabul edilerek her bir tüpün 280 nm’deki protein miktarı ve 412 nm’deki aktivitesine bakıldı (şekil 3.5).



**Şekil 3.5:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.0) ile dengelenmiş ve 25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.0) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için absorbans-aktivite grafiği.

### 3.3.1.2 LPO Enziminin 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.5) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması

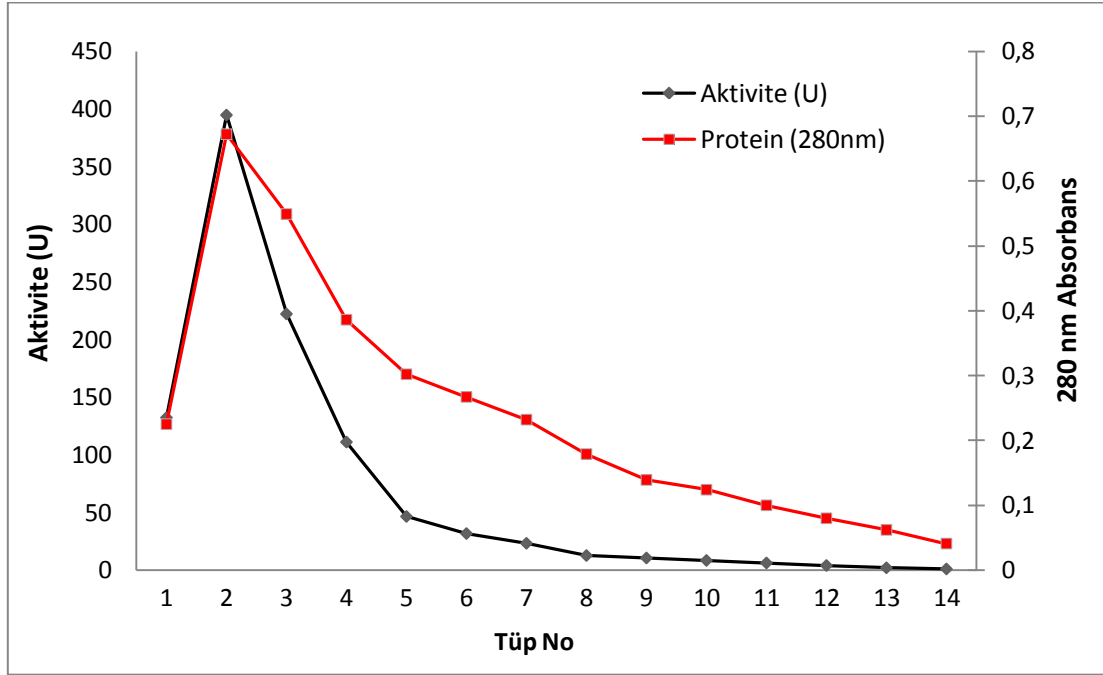
Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.5) dengeleme ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.5) yıkama tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6’da verilmiştir.



**Şekil 3.6:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.5) ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.5) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için absorbans-aktivite grafiği.

### 3.3.1.3 LPO Enziminin 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 7.0) ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması

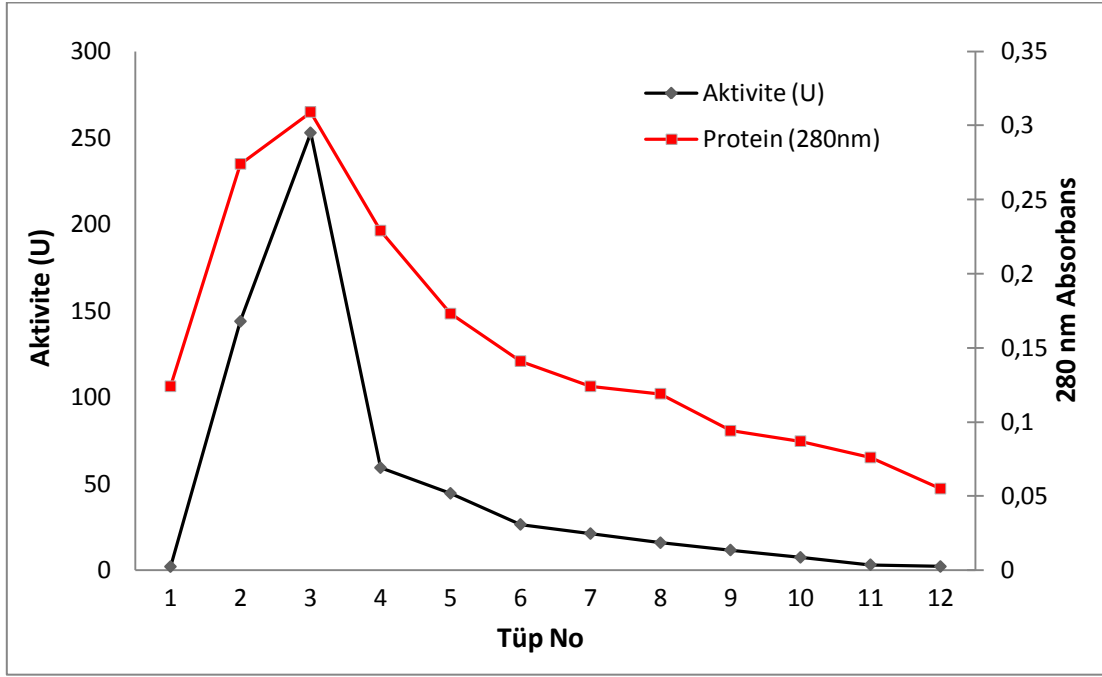
Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.0) dengeleme ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.0) yıkama tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.7’de verilmiştir.



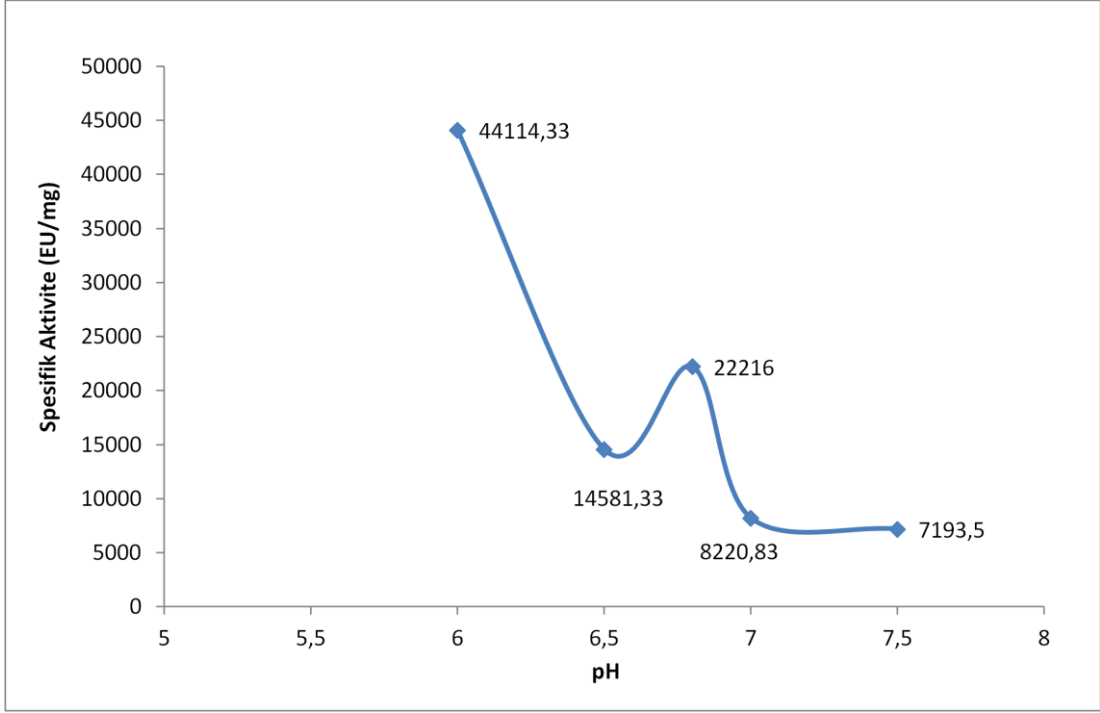
**Şekil 3.7:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 7.0) ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.0) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.

### 3.3.1.4 LPO Enziminin 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.5) tamponu ile Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması.

Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.5) dengeleme ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.5) yıkama tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8’de verilmiştir.



**Şekil 3.8:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 7.5) ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.5) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.



**Şekil 3.9:** Farklı pH değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik Aktivite-pH değerleri.

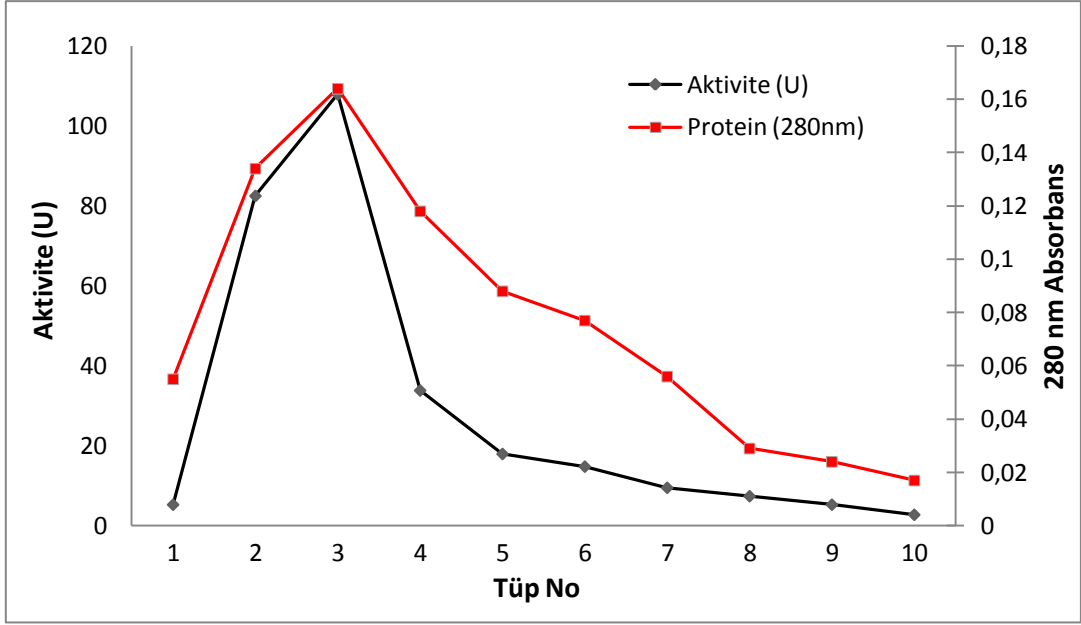


### **3.3.2 Afinite Kolonundan Saflaştırılan LPO Enzimine Farklı İyonik Şiddetlerin Etkisi**

#### **3.3.2.1 LPO Enziminin 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Kullanılarak Saflaştırılması**

Bölüm 2.2.5’de belirtildiği gibi şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Saflaştırma basamakları sonucunda elde edilen 40 mL homojenat kolona yavaş yavaş eklendi. Homojenat tamamen geçtikten sonra kolon 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık olarak 0.02 ye düşünceye kadar devam edildi.

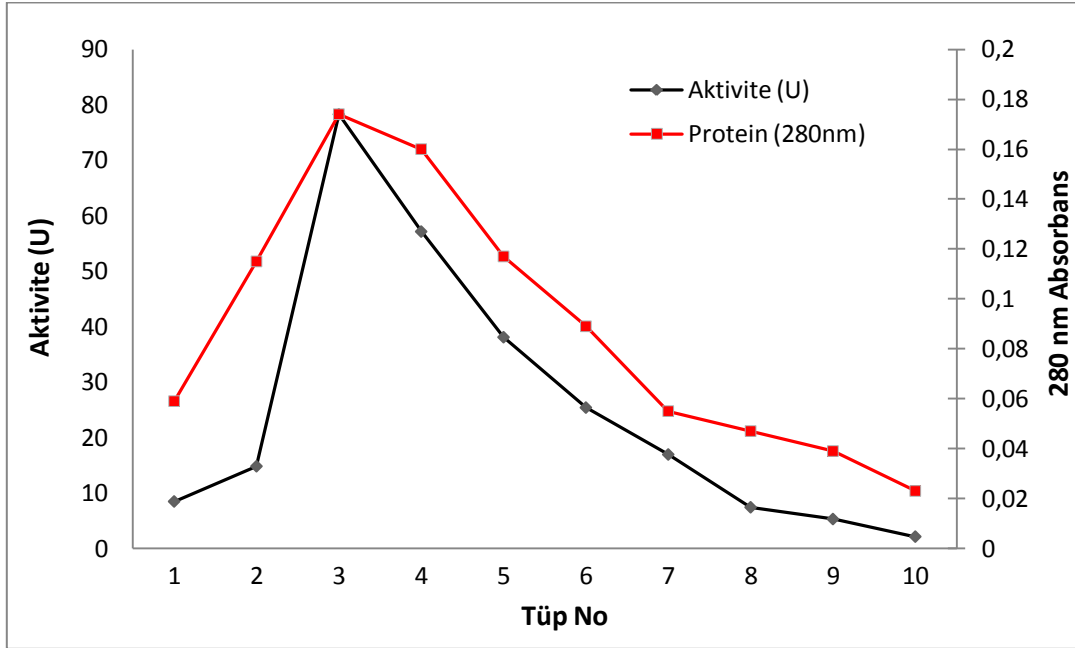
Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.3) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 2’er mL halinde ependorf tüplerine alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık 0.04 oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kabul edilerek her bir tüpün 280 nm’deki protein miktarı ve 412 nm’deki aktivitesine bakıldı (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.

### 3.3.2.2 LPO Enziminin 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Kullanılarak Saflaştırılması

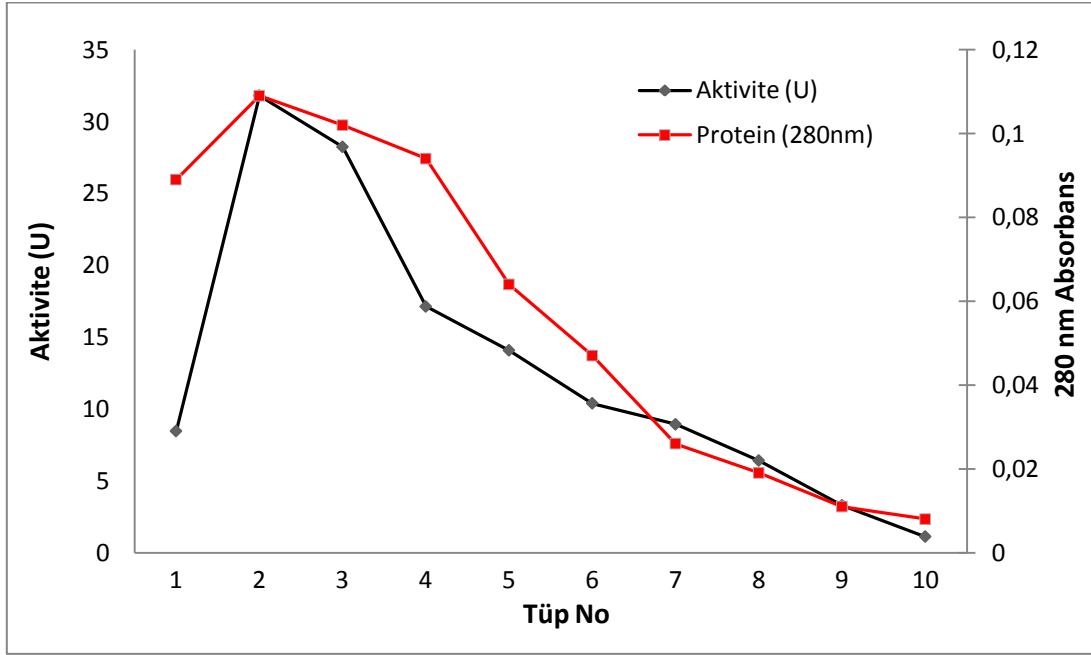
Bölüm 3.3.2.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6,8) dengeleme ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6,8) yıkama tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11’da verilmiştir.



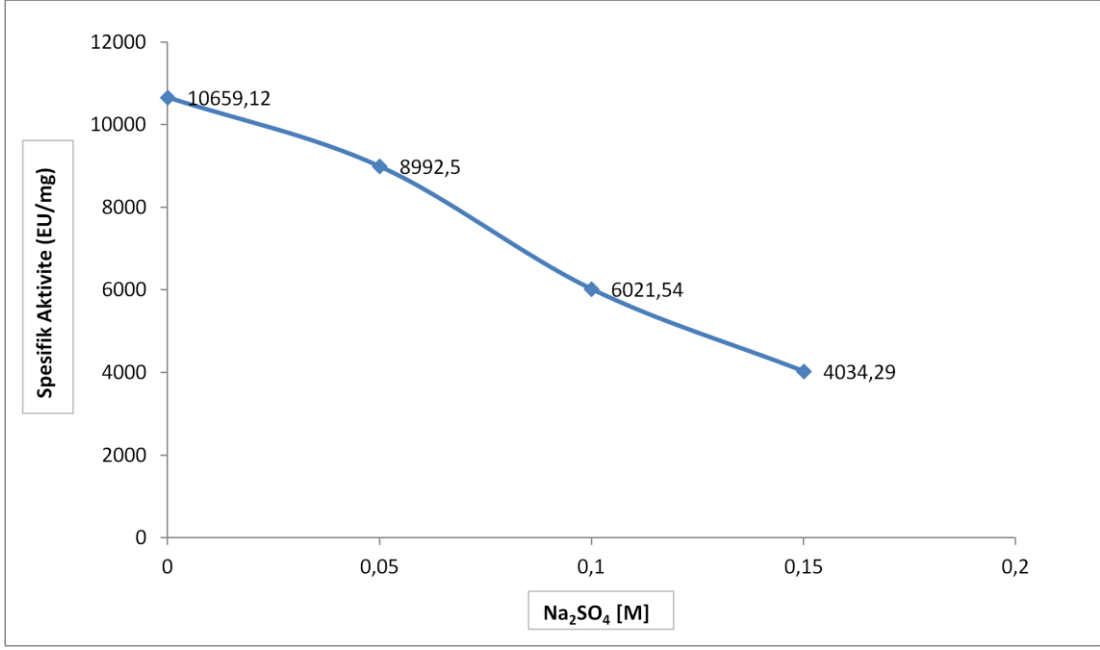
**Şekil 3.11:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorban-aktivite grafiği.

### 3.3.2.3 LPO Enziminin 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Kullanılarak Saflaştırılması

Bölüm 3.3.2.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) dengeleme ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) yıkama tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12’de verilmiştir.



**Şekil 3.12:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile dengelenmiş ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.



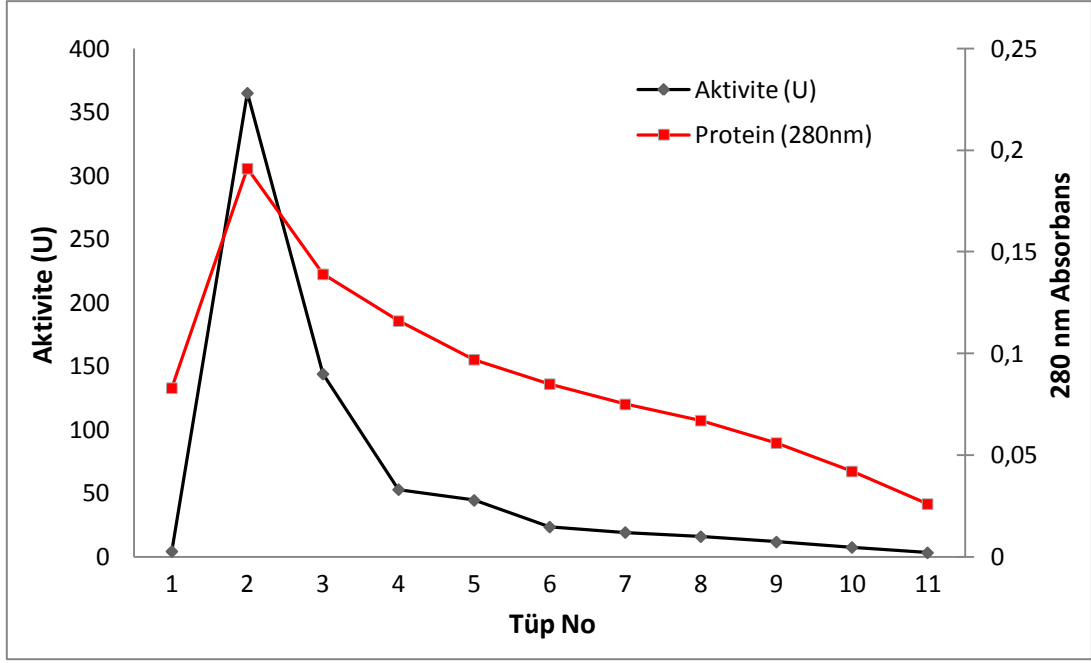
**Şekil 3.13:** Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik Aktivite-[M] değerleri.

### **3.3.3 Farklı Sıcaklıklarda LPO Enziminin Saflaştırılması**

#### **3.3.3.1 Afinite Kolonundan LPO Enziminin 5 °C’de Saflaştırılması**

Bölüm 2.2.5’ de belirtildiği gibi şekilde hazırlanan afinite kolonu önce soğuk su banyosunda 5 °C’ye getirildi. Daha sonra 5 °C’ye soğutulmuş 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Saflaştırma basamakları sonucunda elde edilen 40 mL homojenat kolona yavaş yavaş eklendi. Homojenat tamamen geçtikten sonra kolon 5 °C’ye soğutulmuş 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.8) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık olarak 0.02 ye düşünceye kadar devam edildi.

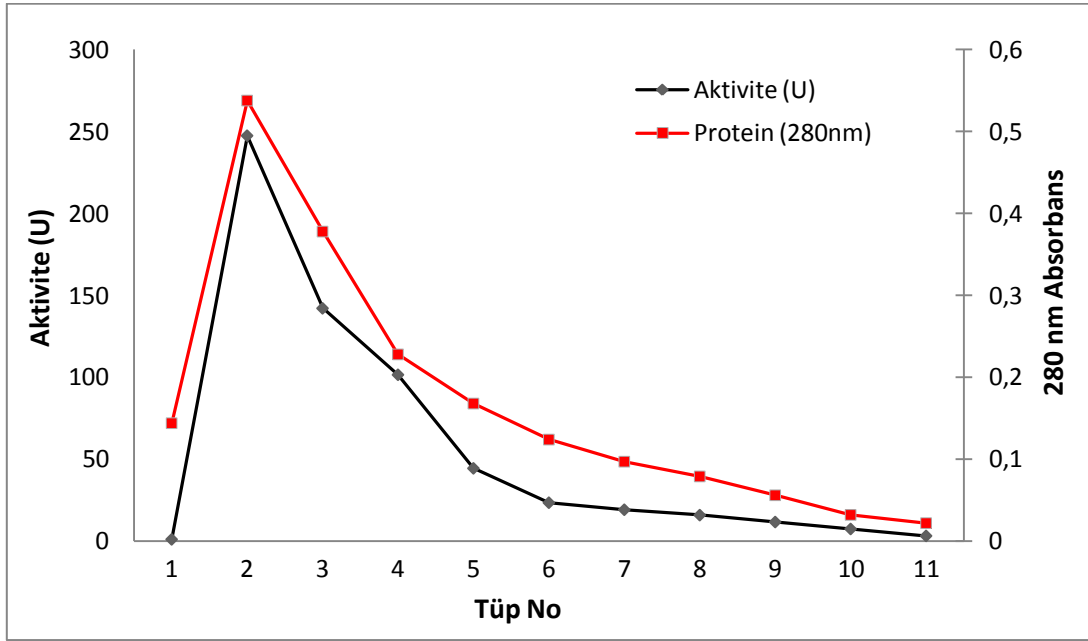
Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon 5 °C’ye soğutulmuş 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.3) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 2’er mL halinde ependorf tüplerine alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans yaklaşık 0.04 oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kabul edilerek her bir tüpün 280 nm’deki protein miktarı ve 412 nm’deki aktivitesine bakıldı (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14:** 5 °C'ye soğutulmuş 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 5 °C'ye soğutulmuş 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.

### 3.3.3.2 Afinite Kolonundan LPO Enziminin 15 °C’de Saflaştırılması

Bölüm 3.3.3.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 15 °C’ye soğutulmuş 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) dengeleme ve 15 °C’ye soğutulmuş 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) yıkama tamponu ve 15 °C’ye soğutulmuş 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.3) elüsyon tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15’de verilmiştir.

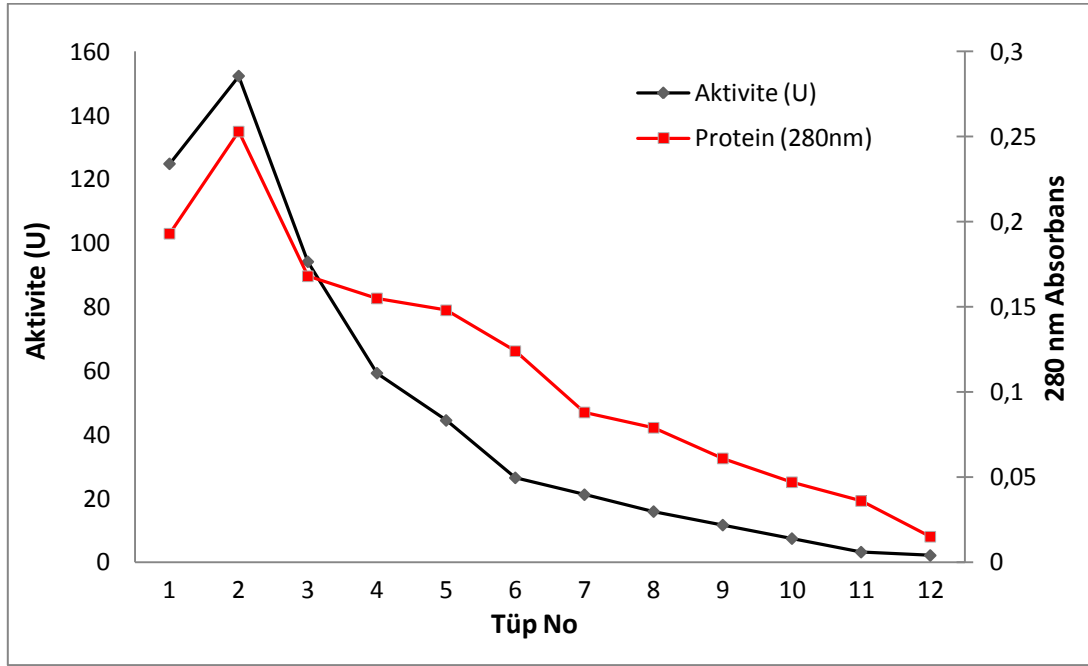


**Şekil 3.15:** 15 °C’ye soğutulmuş 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 15 °C’ye soğutulmuş 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkanmış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.

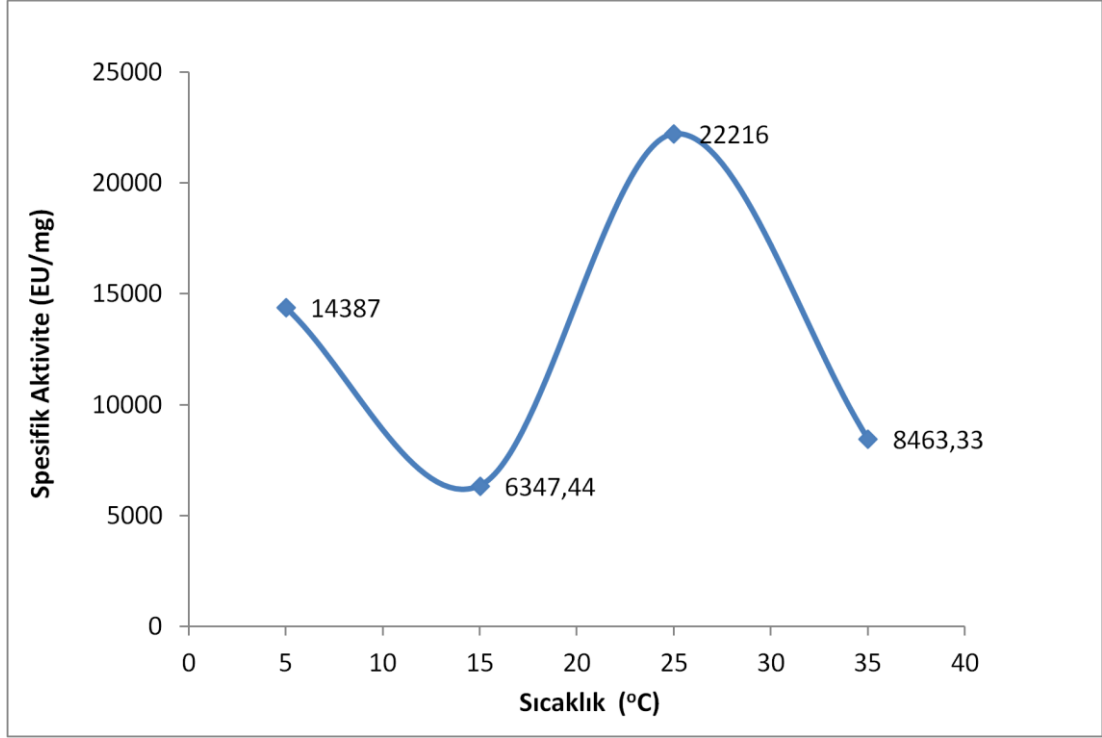


### 3.3.3.3 Afinite Kolonundan LPO Enziminin 35 °C’de Saflaştırılması

Bölüm 3.3.3.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon 35 °C’ye ısıtıldı. Daha sonra 35 °C’ye ısıtılmış 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) dengeleme ve 35 °C’ye ısıtılmış 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) yıkama tamponu ve 35 °C’ye ısıtılmış 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH: 6.3) elüsyon tamponu kullanılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.16’de verilmiştir.



**Şekil 3.16:** 35 °C’ye ısıtılmış 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş ve 35 °C’ye ısıtılmış 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.8) tamponu ile yıkamış afinite kolonundan saflaştırılan LPO enziminin absorbans-aktivite grafiği.



**Şekil 3.17:** Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan LPO enziminin Spesifik aktivite-Sıcaklık değerleri.

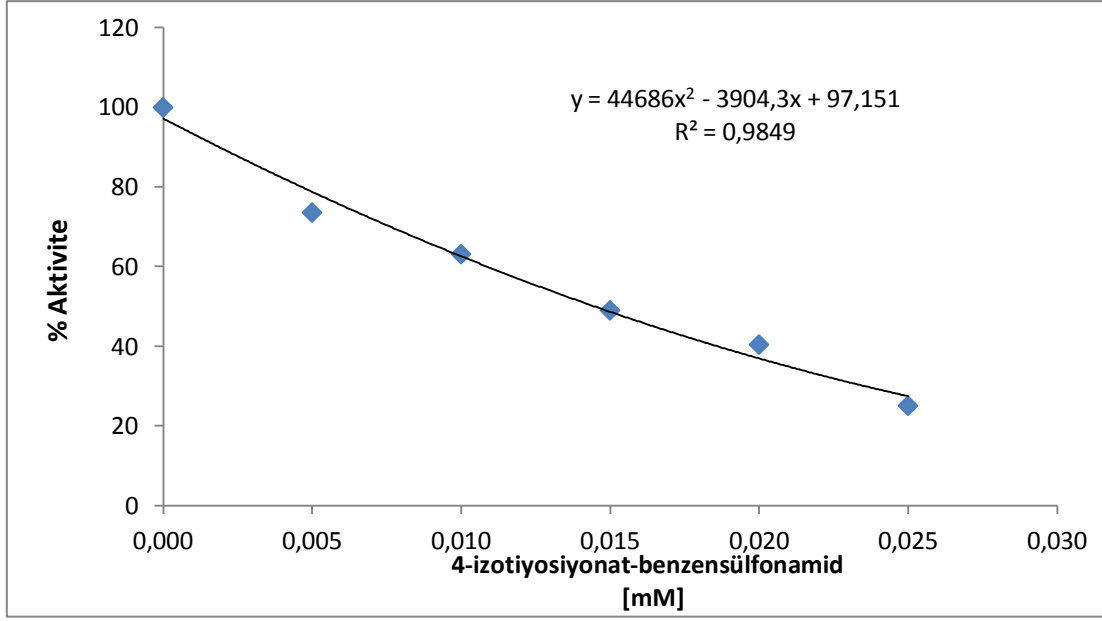
### 3.4 Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitlerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız ligand, veteriner ilaçları ve bazı pestisitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine etkilerini belirlemek için, optimum şartlarda ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) substratının sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 67 µL ABTS alındı ve veteriner ilaçları ve bazı pestisit çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kabul edildi.

Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 67  $\mu\text{L}$  enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan tampon + substrat (ABTS) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi + hazırlanan veteriner ilaçları ve pestisit çözeltilerine hızlı bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 75 saniyede absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite - [I] grafikleri çizildi (Şekil 3.20 - 3.44). Bu grafiklerden yararlanarak kullanılan ligand, veteriner ilaçları ve pestisitler için  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı. Daha sonra çalışmada kullanılan ligand için 2 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, ABTS substratı kullanılarak aktivite belirlendi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafiği çizildi (Şekil 3.4, Şekil 3.19). Bu grafikten yararlanarak  $K_i$  değeri ve inhibisyon türü tespit edildi.

**Tablo 3.3:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ligandın (4-izotiyosiyonat-benzensülfonamid) IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ligand konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

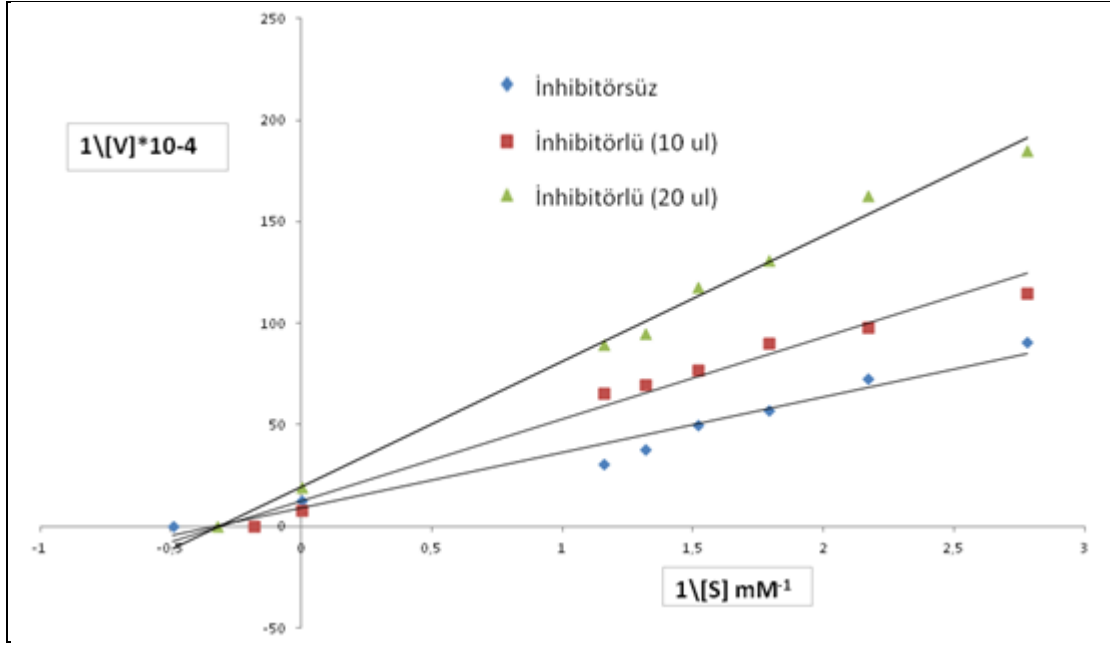
Aktivite Fosfat tamponu (µL)	LİGAND	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin Hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Ligand Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Ligand Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	4-izotiyosiyonat-benzensülfonamid	33	66	66	-	-	0.163	172.44	100
830					5	0.005	0.120	126.948	73.62
825					10	0.01	0.103	108.96	63.19
820					15	0.015	0.080	84.632	49.08
815					20	0.02	0.066	69.82	40.49
810					25	0.025	0.041	43.37	25.15



**Şekil 3.18:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Ligand bileşiğinin % Aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.4:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ligandın(4-izotiyosiyonat-benzensülfonamid)  $K_i$  değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ligandın konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu ( $\mu\text{L}$ )	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Ligand Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. [I] (mM)	$\Delta\text{A}$ (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	$1/V \cdot 10^{-4}$	$1/[S]$
835	66	36	33	10	1000	0.36	0.01	0.082	87.03	114.9	2.78
825		46	33	10		0.46	0.01	0.096	101.88	98.15	2.17
815		56	33	10		0.56	0.01	0.105	111.09	90.02	1.79
805		66	33	10		0.66	0.01	0.123	130.20	76.8	1.52
795		76	33	10		0.76	0.01	0.135	142.86	70.01	1.32
785		86	33	10		0.86	0.01	0.144	152.44	65.6	1.16
795		36	33	20		0.36	0.02	0.051	54.05	185.3	2.78
785		46	33	20		0.46	0.02	0.058	61.39	162.9	2.17
775		56	33	20		0.56	0.02	0.072	75.75	131.2	1.79
765		66	33	20		0.66	0.02	0.080	84.96	117.7	1.52
755		76	33	20		0.76	0.02	0.099	105.59	94.7	1.32
745		86	33	20		0.86	0.02	0.105	111.48	89.7	1.16

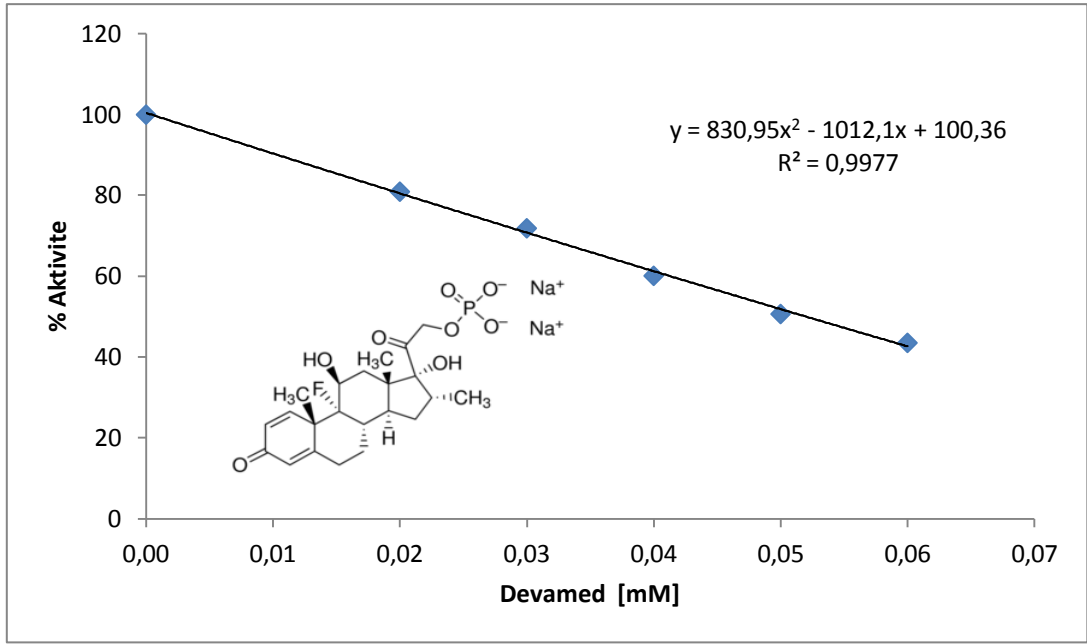


**Şekil 3.19:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Ligandın inhibisyon etkisi  
 $[I_1]: 1 \times 10^{-2} \text{ mM}$ ,  $[I_2]: 2 \times 10^{-2} \text{ mM}$

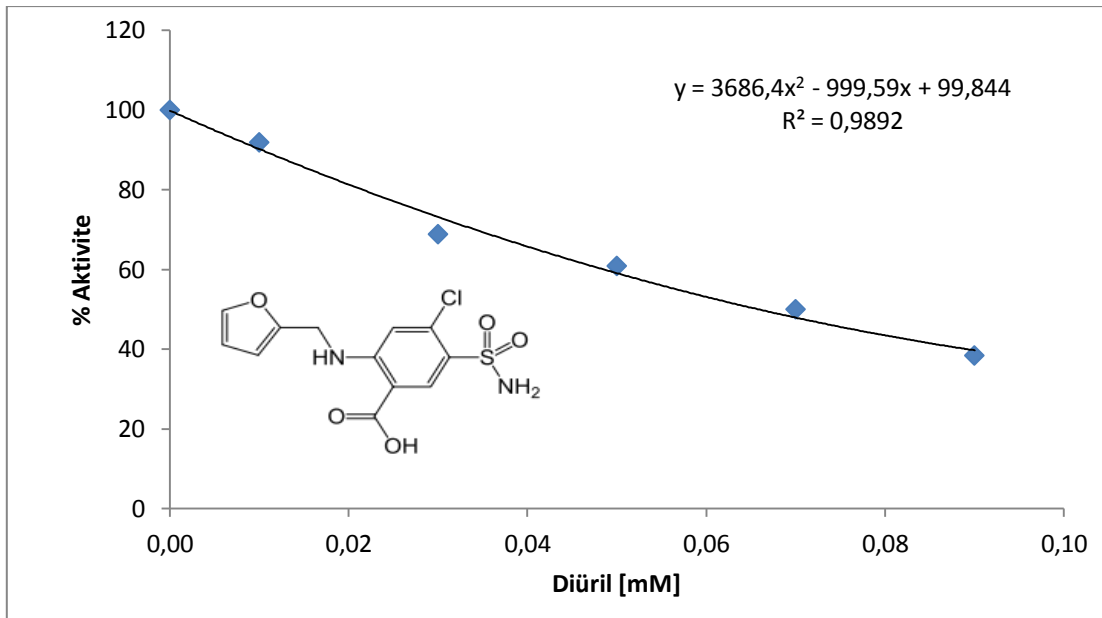
**Tablo 3.5:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Devamed ve Diürül adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Devamed</b>	33	66	66	-	-	0.434	459.129	100
815					20	0.02	0.386	408.349	88.94
805					30	0.03	0.312	330.064	71.89
795					40	0.04	0.276	291.980	63.59
785					50	0.05	0.220	232.738	50.69
775					60	0.06	0.189	199.943	43.55
835	<b>Diüril</b>	33	66	66	-	-	0.138	145.99	100
825					10	0.01	0.126	134.35	91.88
805					30	0.03	0.095	100.50	68.84
785					50	0.05	0.084	88.86	60.87
765					70	0.07	0.069	72.99	50.00
745					90	0.09	0.053	56.06	38.40





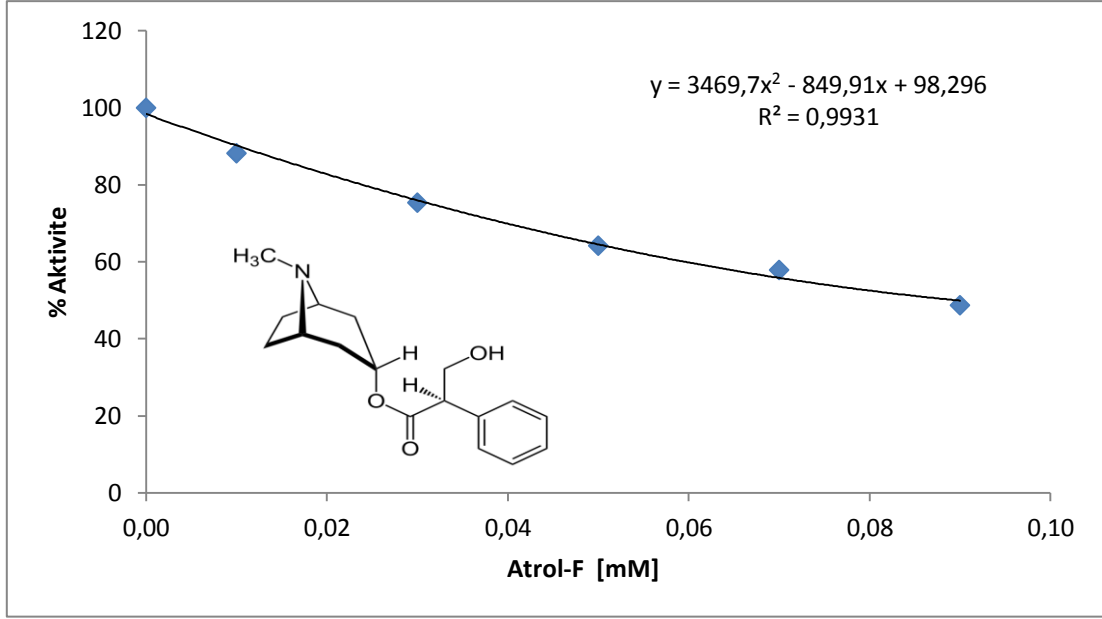
**Şekil 3.20:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Devamed adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.



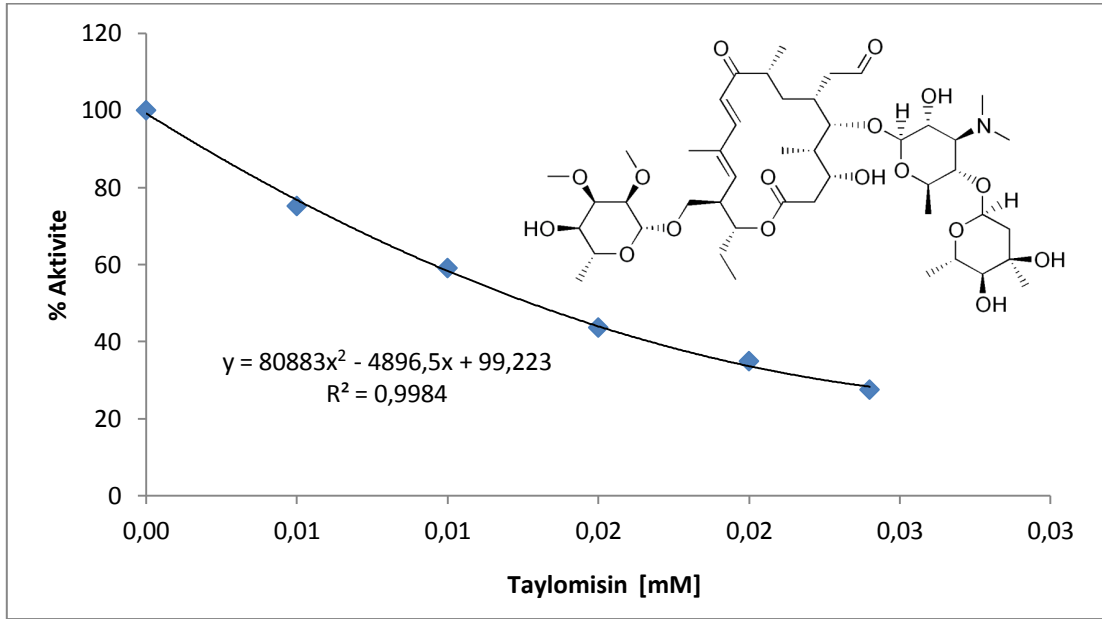
**Şekil 3.21:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Diüril adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.6:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Atrol-F ve Taylomisın adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	Atrol -F	33	66	66	-	-	0.492	520.49	100
825					10	0.01	0.434	459.13	88.21
805					30	0.03	0.371	392.48	75.40
785					50	0.05	0.316	334.30	64.23
765					70	0.07	0.285	301.50	57.93
745					90	0.09	0.240	253.90	48.78
835	Taylomisın	33	66	66	-	-	0.149	157.63	100
830					5	0.005	0.112	118.48	75.16
825					10	0.01	0.088	93.10	59.06
820					15	0.015	0.065	68.76	43.62
815					20	0.02	0.052	55.01	34.90
810					25	0.025	0.041	43.37	27.51



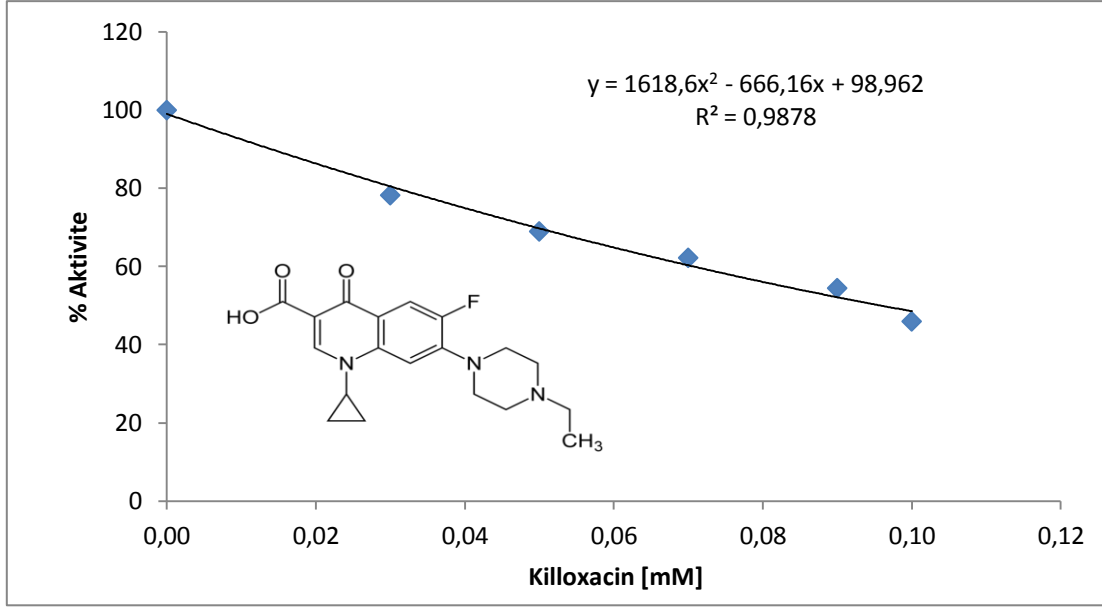
**Şekil 3.22:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Atrol-F adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.



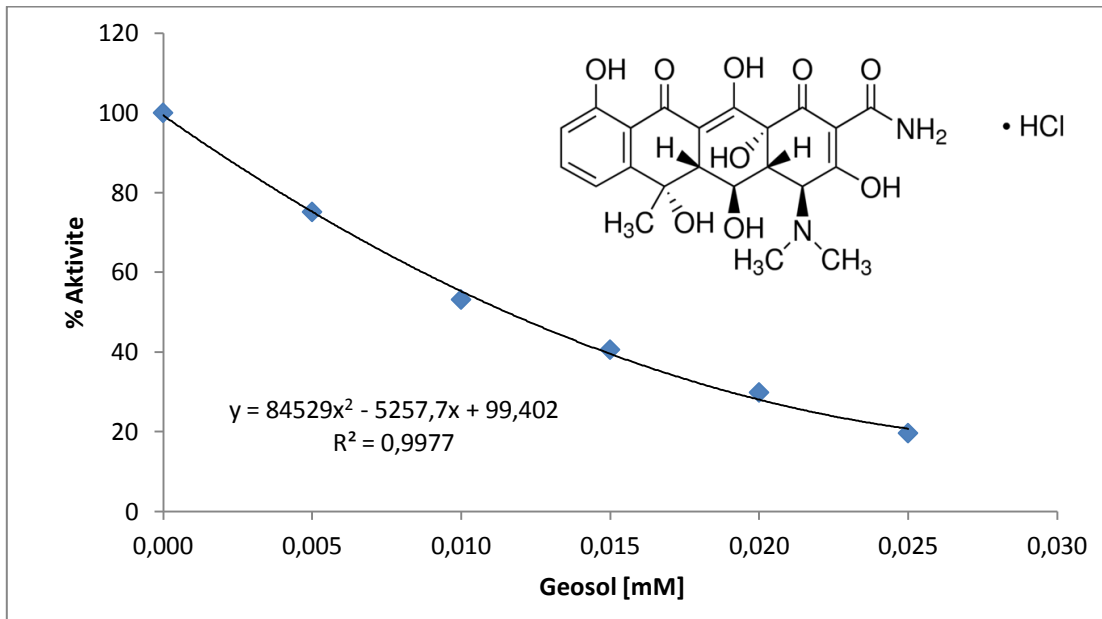
**Şekil 3.23:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Taylomisın adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.7:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Killoxacin ve Geosol adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Killoxacin</b>	33	66	66	-	-	0.400	423.16	100
805					30	0.01	0.313	331.12	78.26
785					50	0.05	0.276	291.98	69.00
765					70	0.07	0.249	263.42	62.25
745					90	0.09	0.218	230.62	54.50
725					110	0.1	0.184	194.65	46.00
835	<b>Geosol</b>	33	66	66	-	-	0.382	404.12	100
830					5	0.005	0.287	303.62	75.13
825					10	0.01	0.203	214.75	53.14
820					15	0.015	0.155	163.97	40.57
815					20	0.02	0.114	120.60	29.84
810					25	0.025	0.075	79.34	19.63



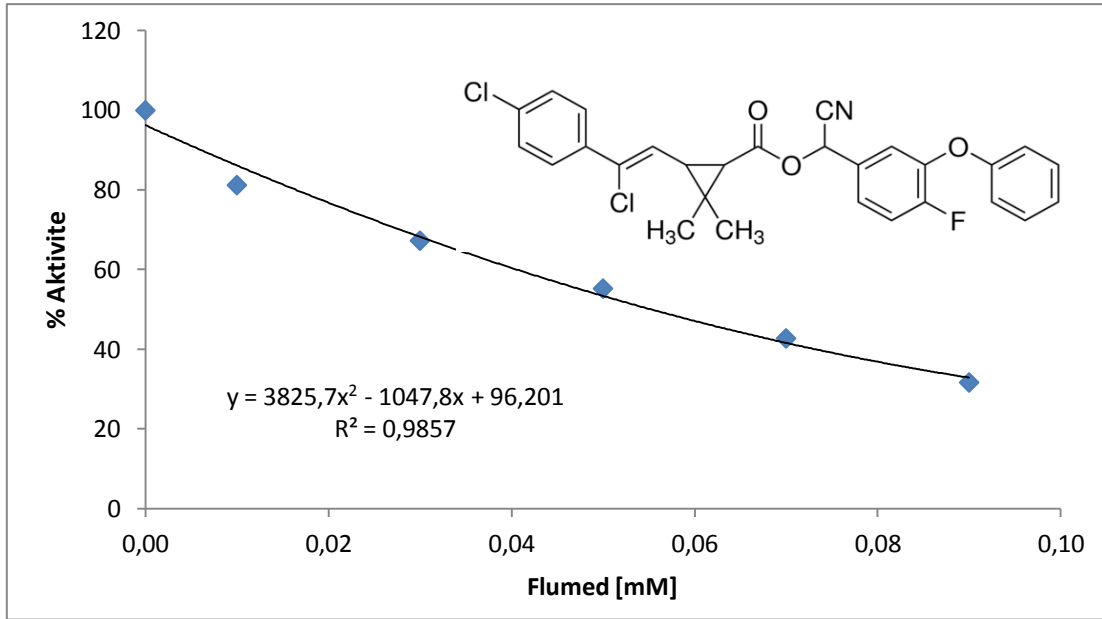
**Şekil 3.24:** Safılaştırılmış LPO enzimi üzerine Killoxacin adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.



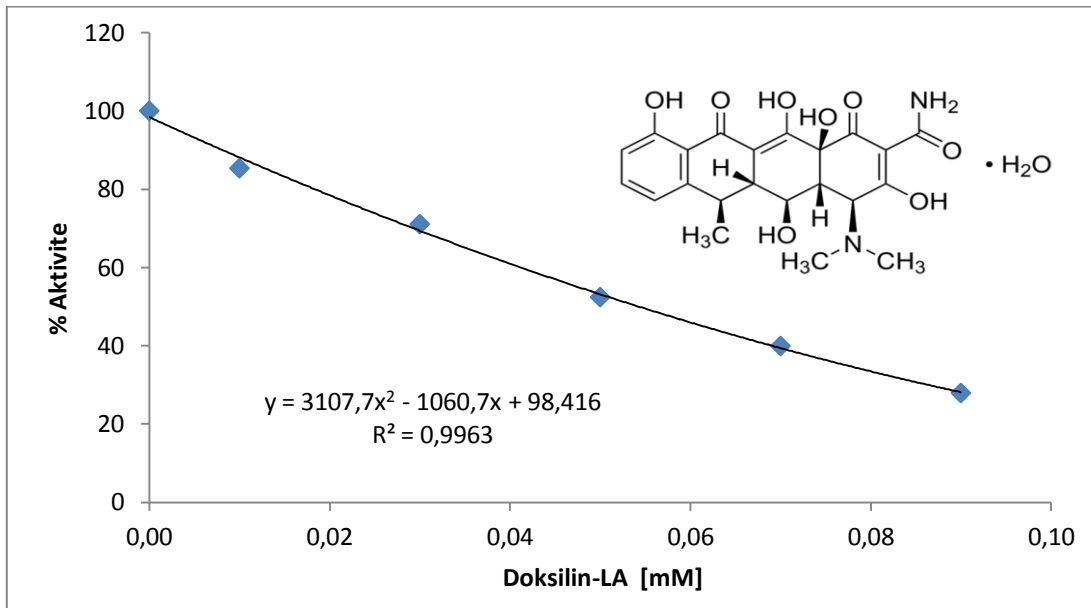
**Şekil 3.25:** Safılaştırılmış LPO enzimi üzerine Geosol adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.8:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Flumed ve Doksilin-LA adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Flumed</b>	33	66	66	-	-	0.208	220.04	100
825					10	0.01	0.169	178.79	81.25
805					30	0.03	0.140	148.11	67.31
785					50	0.05	0.115	121.66	55.29
765					70	0.07	0.089	94.15	42.79
745					90	0.09	0.066	69.82	31.73
835	<b>Doksilin-LA</b>	33	66	66	-	-	0.208	220.04	100
825					10	0.01	0.177	187.76	85.33
805					30	0.03	0.147	156.36	71.06
785					50	0.05	0.109	115.31	52.40
765					70	0.07	0.083	87.81	39.91
745					90	0.09	0.058	61.36	27.89



Şekil 3.26: Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Flumed adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.

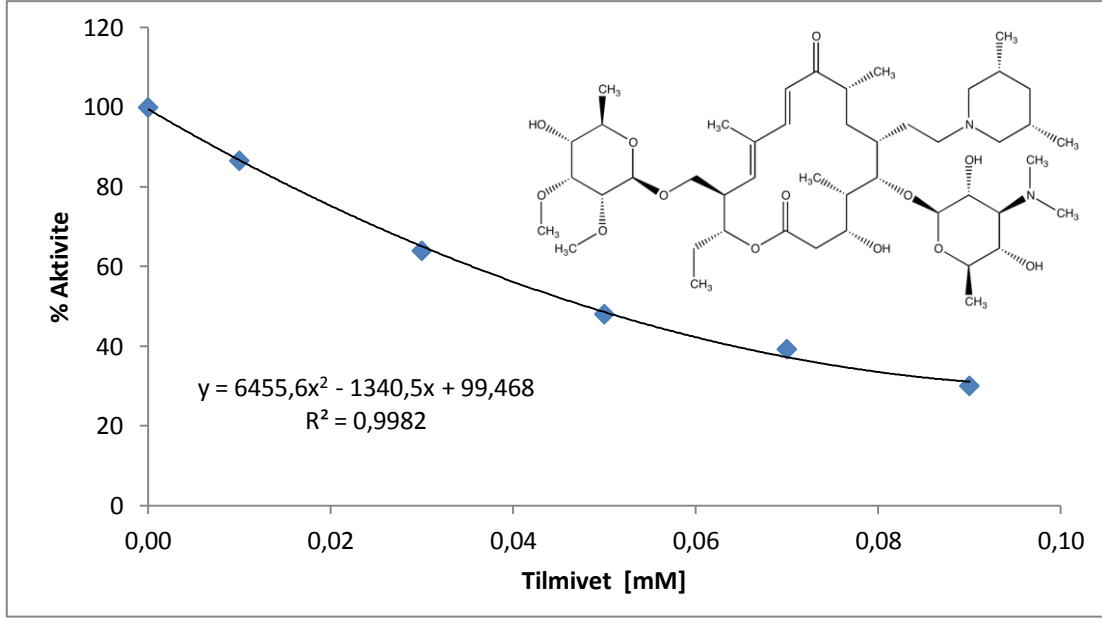


Şekil 3.27: Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Doksilin-LA adlı veteriner ilacının % Aktivite - [I] grafiği.

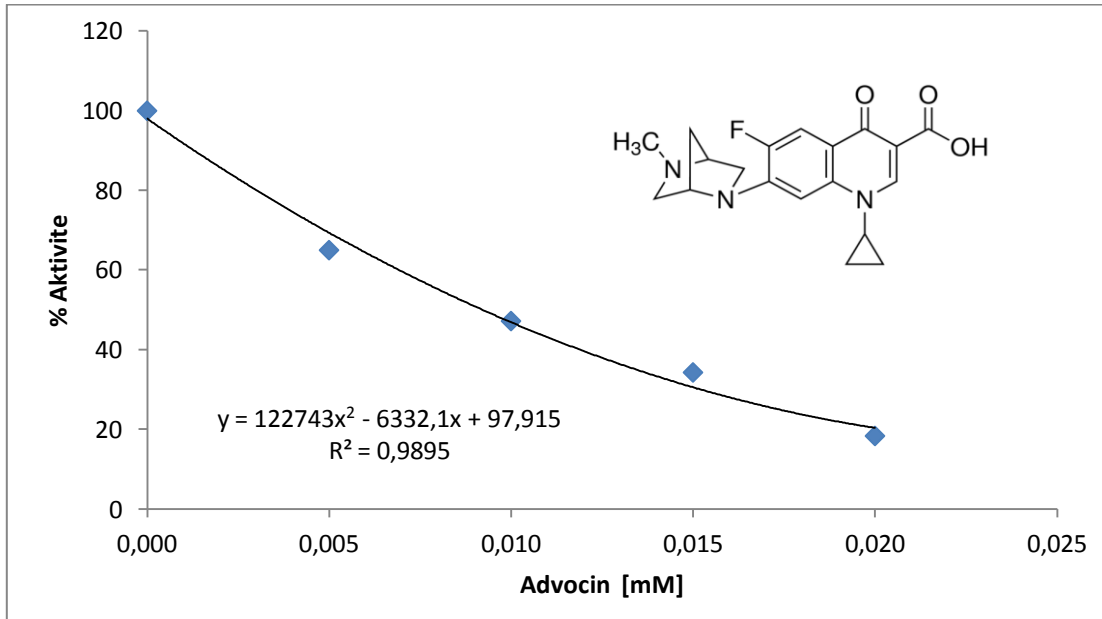
**Tablo 3.9:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Tilmivet ve Advocin adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Tilmivet</b>	33	66	66	-	-	0.239	252.84	100
825					10	0.01	0.207	218.99	86.61
805					30	0.03	0.153	161.86	64.02
785					50	0.05	0.115	121.66	48.12
765					70	0.07	0.094	99.44	39.33
745					90	0.09	0.072	76.17	30.13
835	<b>Advocin</b>	33	66	66	-	-	0.163	172.44	100
830					5	0.005	0.106	112.14	65.03
825					10	0.01	0.077	81.46	47.24
820					15	0.015	0.056	59.24	34.35
815					20	0.02	0.030	31.74	18.41





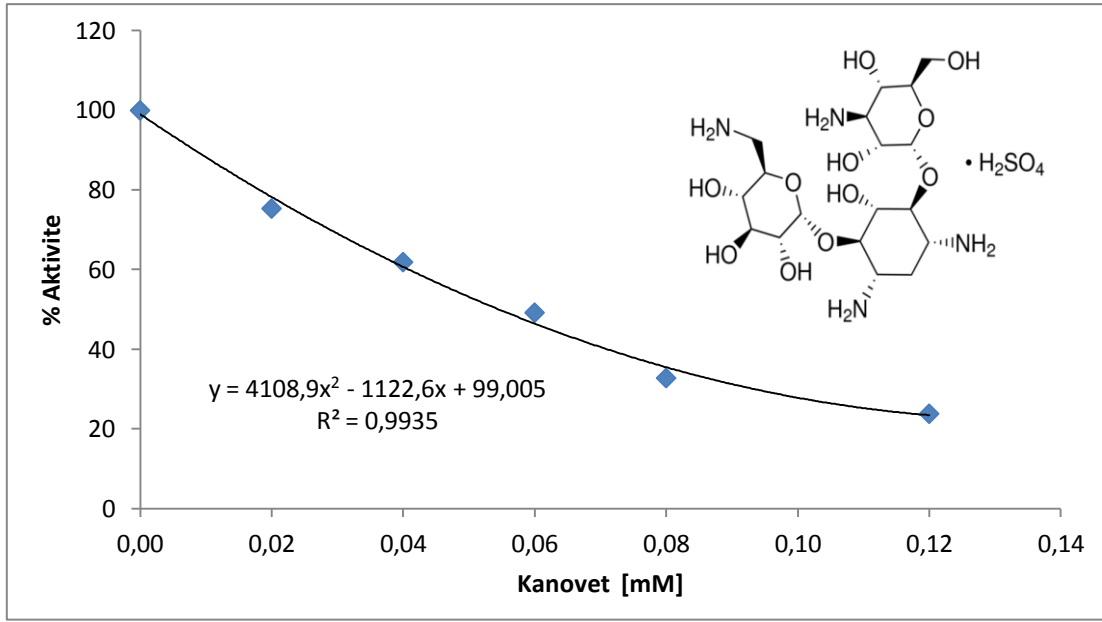
**Şekil 3.28:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Tilmivet adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.



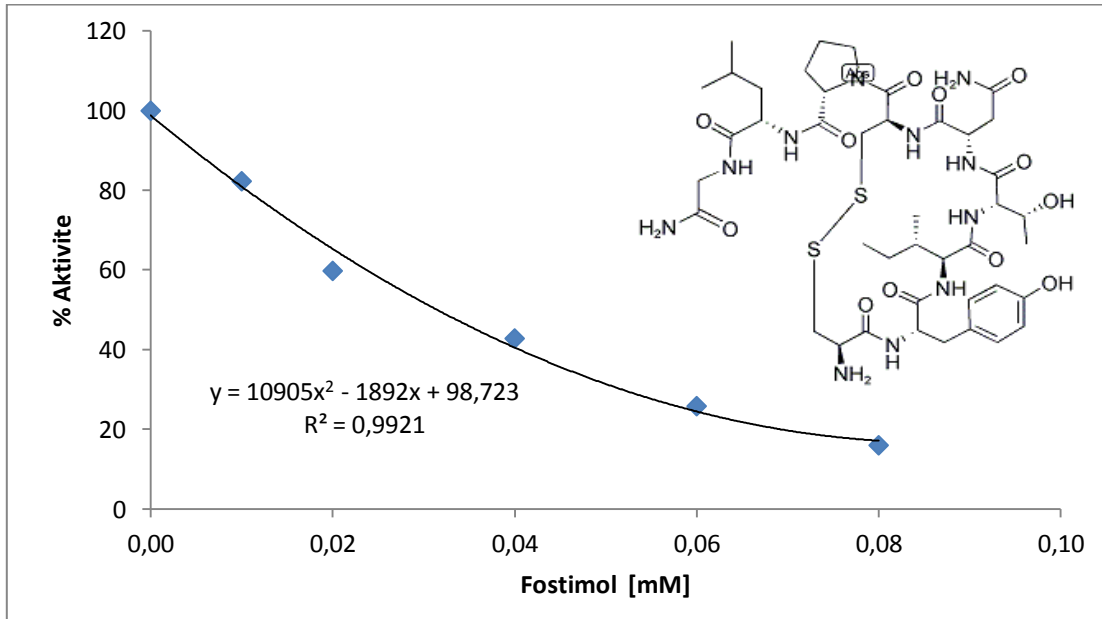
**Şekil 3.29:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Advocin adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.10:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Tilmivet ve Advocin adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Kanovet</b>	33	66	66	-	-	0.134	141.76	100
815					20	0.02	0.101	106.85	75.37
795					40	0.04	0.083	87.81	61.94
775					60	0.06	0.066	69.82	49.25
755					80	0.08	0.044	46.55	32.84
715					120	0.12	0.032	33.85	23.88
835	<b>Fostimol</b>	33	66	66	-	-	0.112	118.48	100
825					10	0.01	0.092	85.69	82.32
815					20	0.02	0.067	70.88	59.82
795					40	0.04	0.048	50.78	42.86
775					60	0.06	0.029	30.68	25.89
755					80	0.08	0.018	19.04	16.07



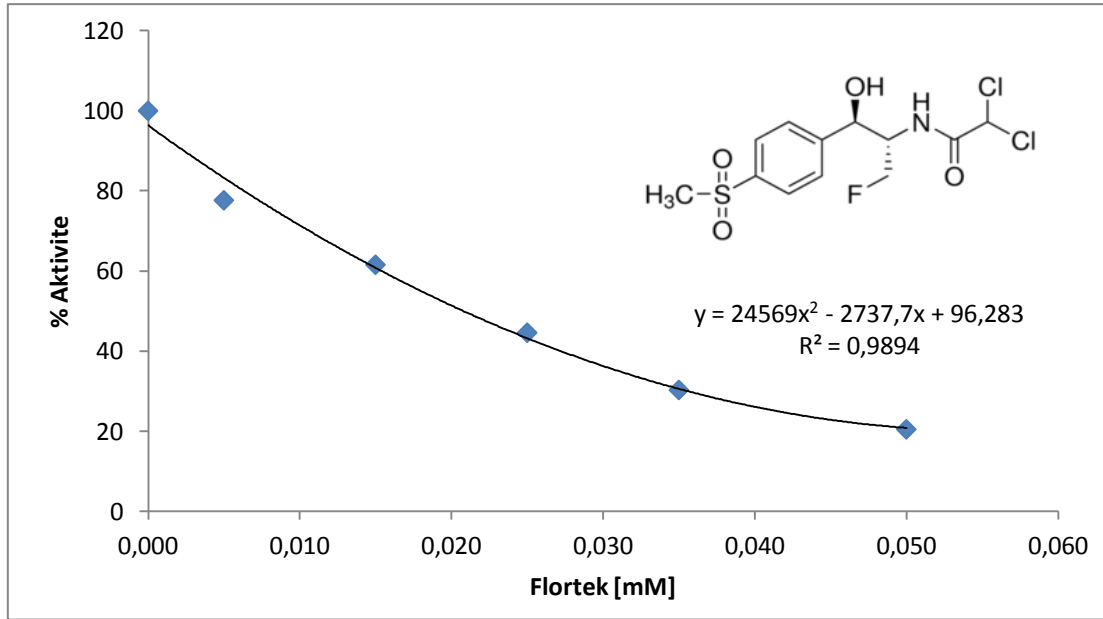
**Şekil 3.30:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Kanovet adlı veteriner ilaının % Aktivite - [I] grafiği.



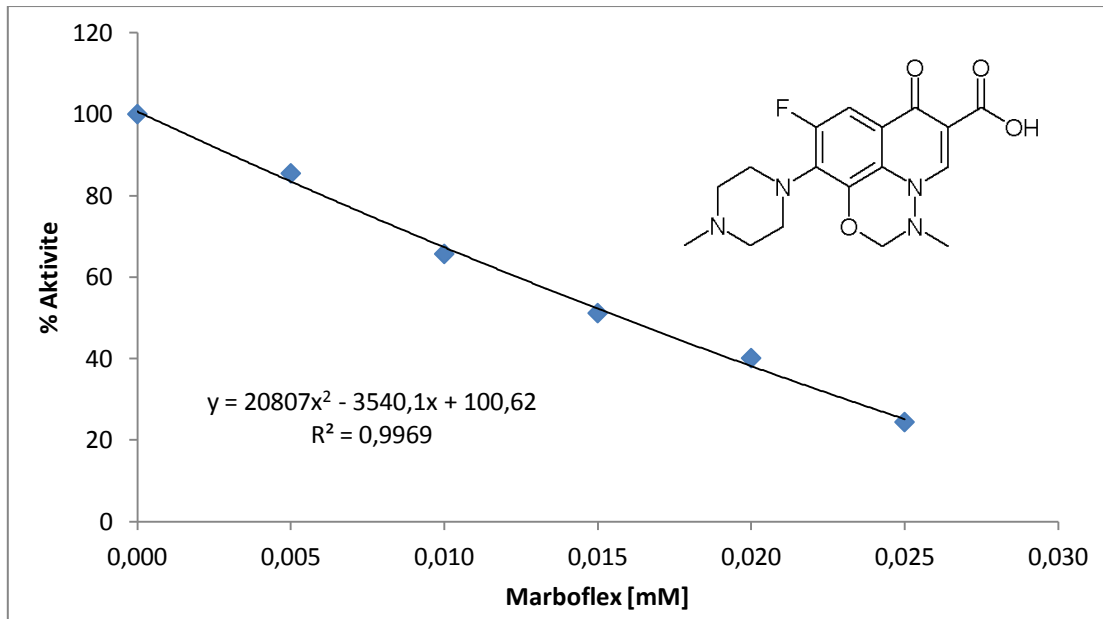
**Şekil 3.31:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Fostimol adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.11:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Flortek ve Marboflex adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	Flortek	33	66	66	-	-	0.112	118.48	100
830					5	0.005	0.087	92.03	77.68
820					15	0.015	0.069	72.99	61.60
810					25	0.025	0.050	52.89	44.64
800					35	0.035	0.034	35.96	30.36
785					50	0.05	0.023	24.33	20.54
835	Marboflex	33	66	66	-	-	0.172	181.96	100
830					5	0.005	0.147	155.51	85.46
825					10	0.01	0.113	119.54	65.69
820					15	0.015	0.088	93.09	51.16
815					20	0.02	0.069	72.99	40.11
810					25	0.025	0.042	44.43	24.42



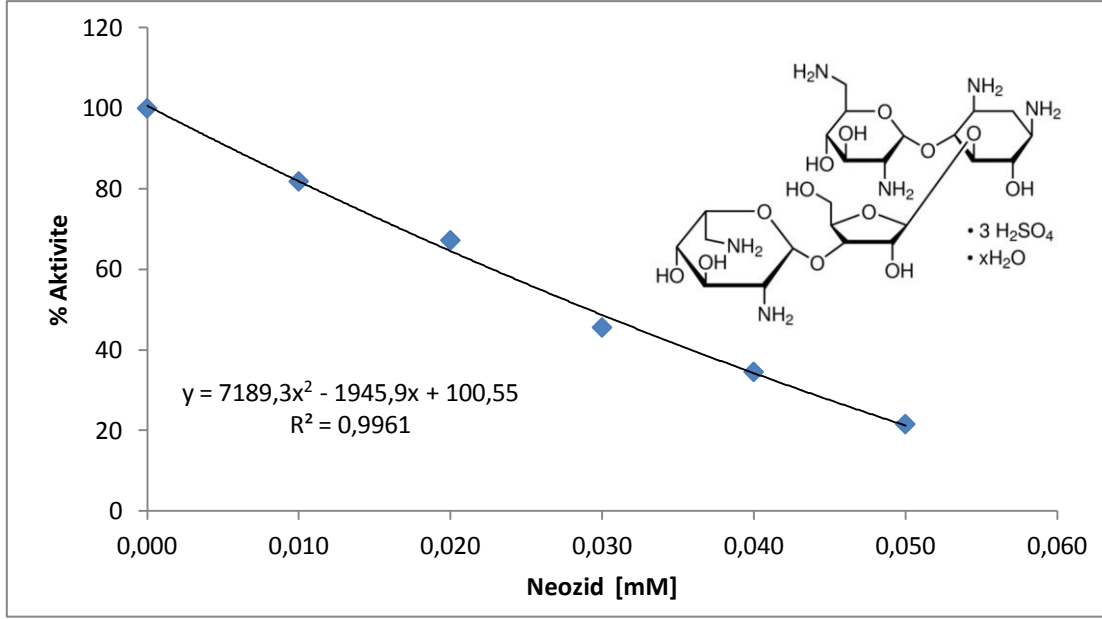
**Şekil 3.32:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Flortek adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.



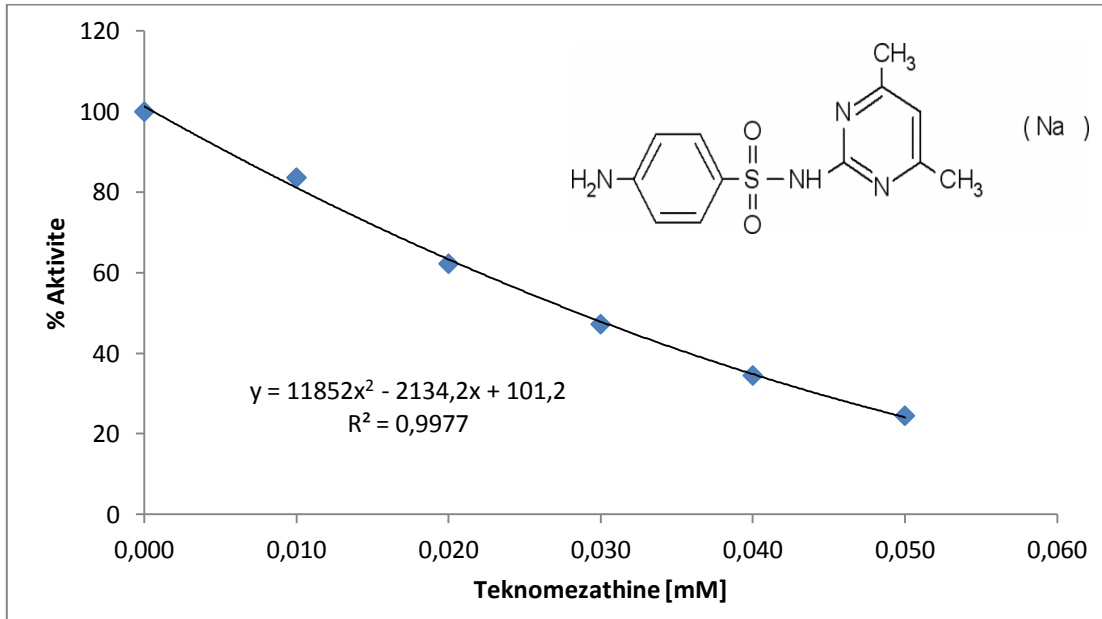
**Şekil 3.33:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Marboflex adlı veteriner ilaçının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.12:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Neozid ve Teknomezathine adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	Neozid	33	66	66	-	-	0.171	180.90	100
825					10	0.01	0.140	148.11	81.87
815					20	0.02	0.115	121.66	67.25
805					30	0.03	0.078	82.52	45.62
795					40	0.04	0.059	61.42	34.51
785					50	0.05	0.037	39.14	21.64
835	Teknomezathine	33	66	66	-	-	0.220	232.74	100
825					10	0.01	0.184	194.65	83.63
815					20	0.02	0.137	144.93	62.27
805					30	0.03	0.104	110.02	47.27
795					40	0.04	0.076	80.40	34.54
785					50	0.05	0.054	57.12	24.54



**Şekil 3.34:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Neozid adlı veteriner ilaının % Aktivite - [I] grafiği.

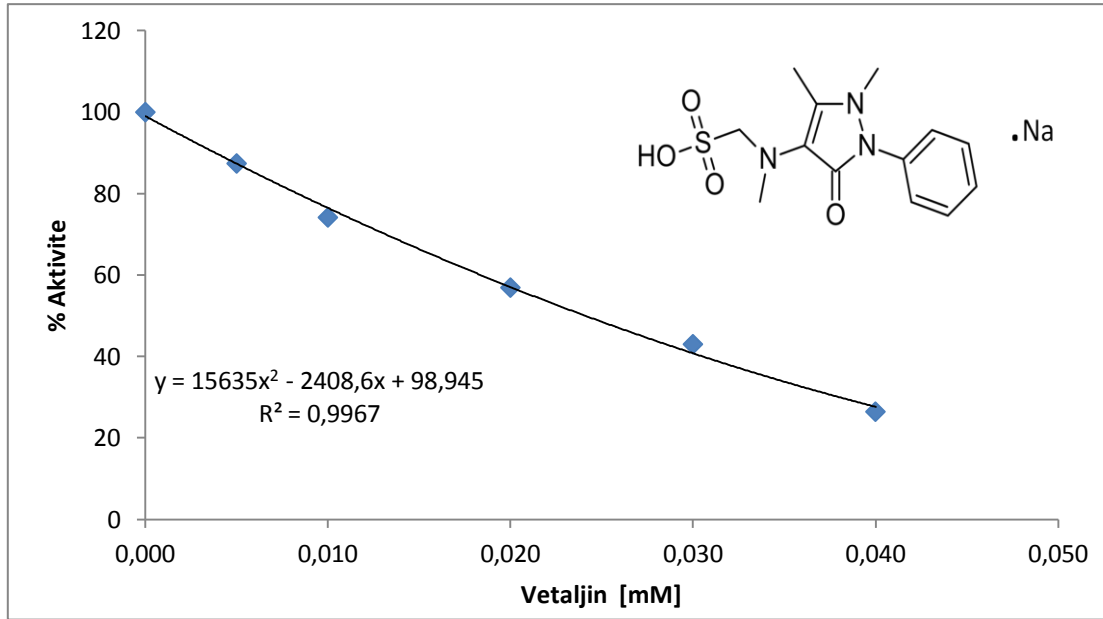


**Şekil 3.35:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Teknomezathine adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği.

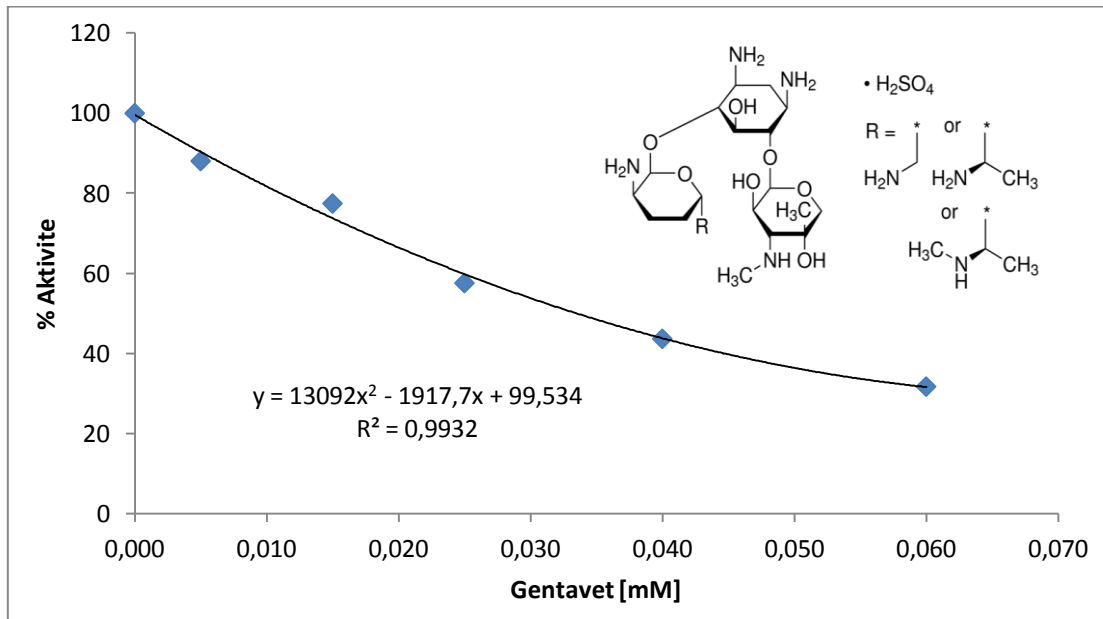
**Tablo 3.13:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Vetajin ve Gentavet adlı veteriner ilaçlarının IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ilaç konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	İlaç	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Vetajin</b>	33	66	66	-	-	0.151	159.74	100
830					5	0.005	0.132	139.64	87.41
825					10	0.01	0.112	118.48	74.17
815					20	0.02	0.086	90.97	56.95
805					30	0.03	0.065	68.76	43.05
795					40	0.04	0.040	42.32	26.49
835	<b>Gentavet</b>	33	66	66	-	-	0.151	159.74	100
830					5	0.005	0.133	140.70	88.08
820					15	0.015	0.117	123.77	77.48
810					25	0.025	0.087	92.03	57.62
795					40	0.04	0.066	69.82	43.71
775					60	0.06	0.048	50.77	31.79





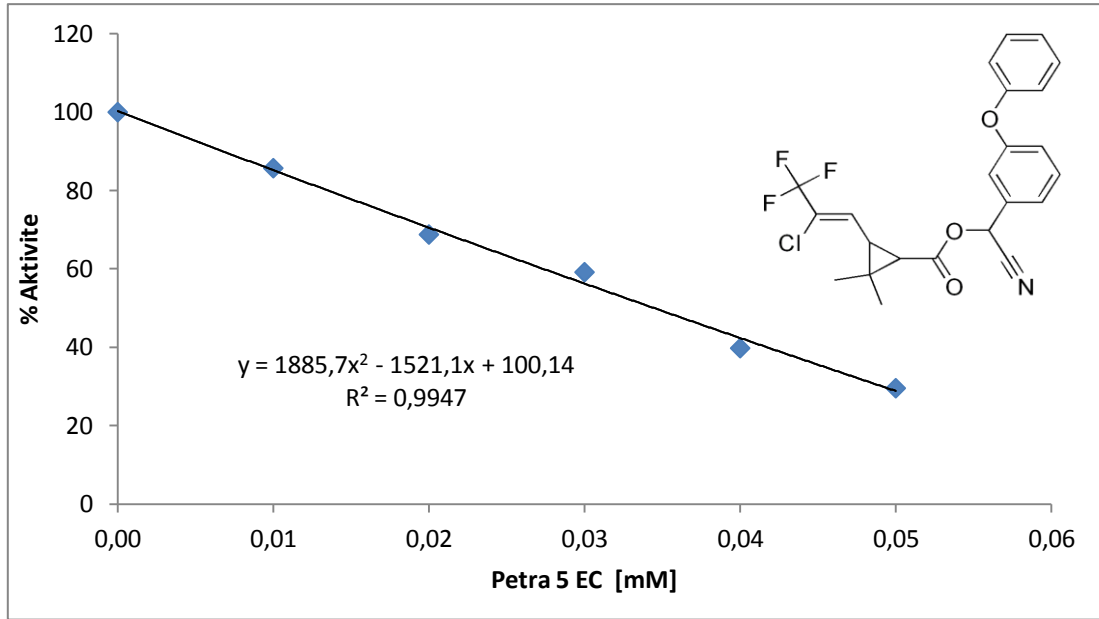
**Şekil 3.36:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Vetajin adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği.



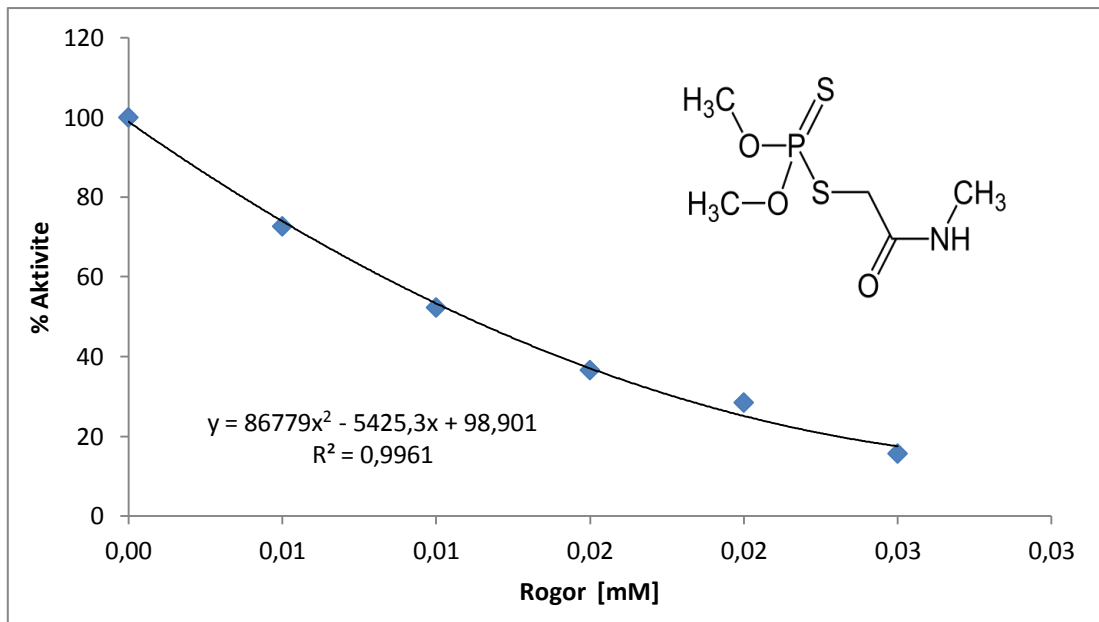
**Şekil 3.37:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Gentavet adlı veteriner ilağının % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.14:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Petra 5 EC ve Rogor adlı pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	Pestisit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Ligand Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	Petra 5 EC	33	66	66	-	-	0.196	207.35	100
825					10	0.03	0.168	177.73	85.71
815					20	0.02	0.135	142.64	68.79
805					30	0.03	0.116	122.72	59.18
795					40	0.04	0.078	82.52	39.80
785					50	0.05	0.058	61.36	29.59
835	Rogor	33	66	66	-	-	0.172	181.96	100
830					5	0.005	0.125	132.24	72.68
825					10	0.01	0.090	95.211	52.33
820					15	0.015	0.063	66.65	36.63
815					20	0.02	0.049	51.84	28.49
810					25	0.025	0.027	28.56	15.70



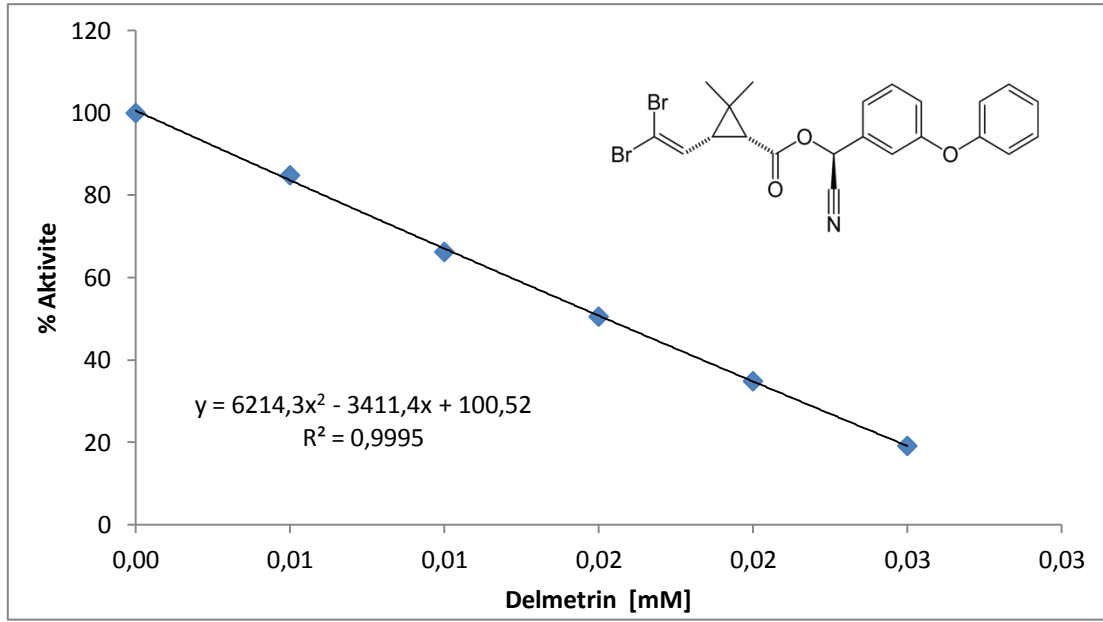
**Şekil 3.38:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Petra 5 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.



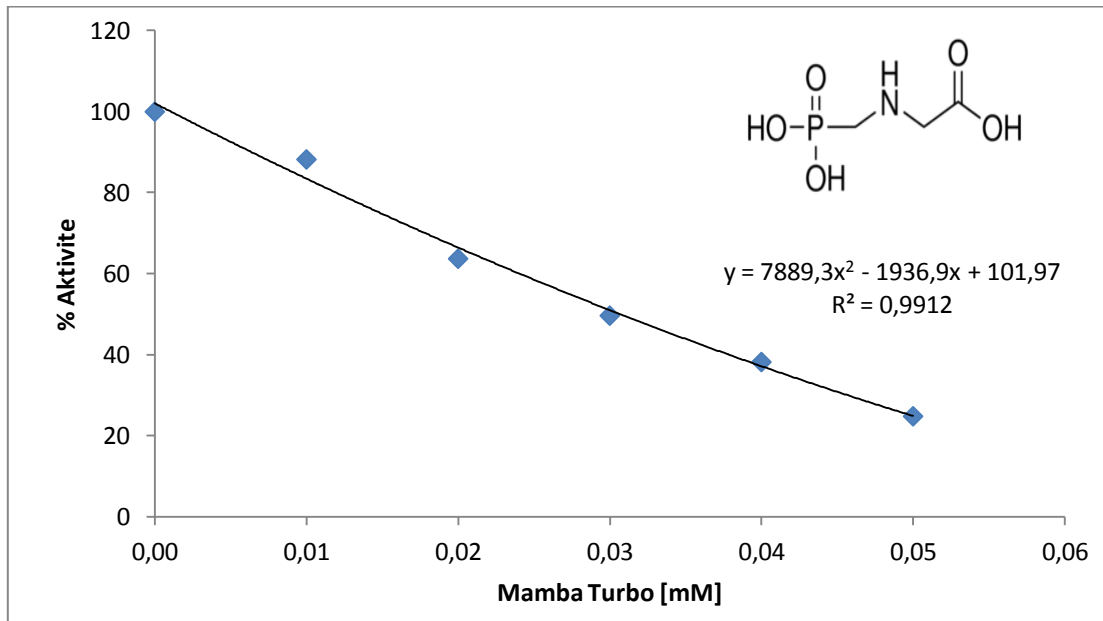
**Şekil 3.39:** Safaştırılmış LPO enzimi üzerine Rogor adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.15:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Delmetrin ve Mamba Turbo adlı pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	Pestisit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Ligand Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Delmetrin</b>	33	66	66	-	-	0.172	181.96	100
830					5	0.005	0.146	154.45	84.88
825					10	0.01	0.114	120.60	66.28
820					15	0.015	0.087	92.04	50.58
815					20	0.02	0.060	60.47	34.88
810					25	0.025	0.033	34.89	19.18
835	<b>Mamba Turbo</b>	33	66	66	-	-	0.306	323.72	100
825					10	0.01	0.270	285.63	88.23
815					20	0.02	0.195	206.29	63.72
805					30	0.03	0.152	160.80	49.67
795					40	0.04	0.117	123.77	38.23
785					50	0.05	0.076	80.40	24.84



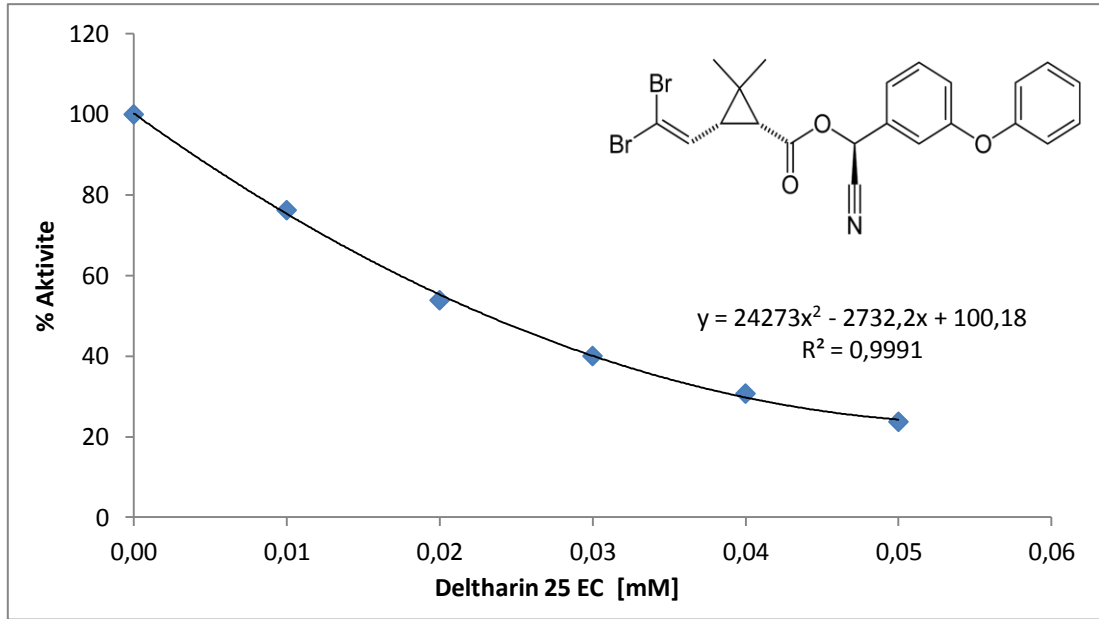
**Şekil 3.40:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Delmetrin adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.



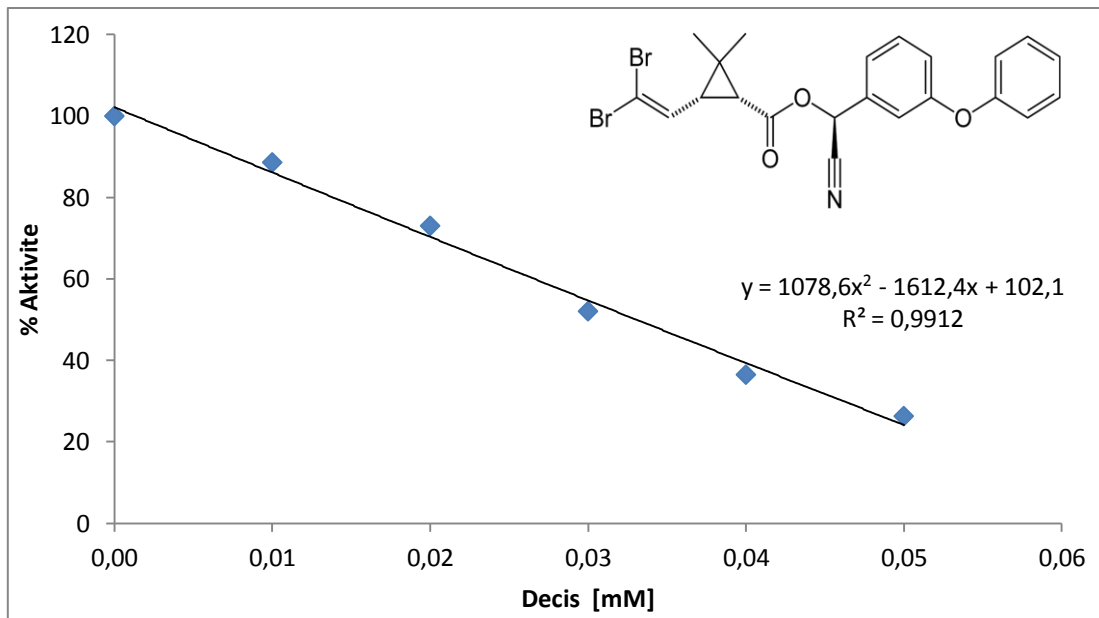
**Şekil 3.41:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Mamba Turbo adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.16:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Deltharin ve Decis adlı pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	Pestisit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Ligand Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	<b>Deltharin 25 EC</b>	33	66	66	-	-	0.282	298.32	100
825					10	0.01	0.215	227.45	76.24
815					20	0.02	0.152	160.80	53.90
805					30	0.03	0.113	119.54	40.07
795					40	0.04	0.083	92.04	30.75
785					50	0.05	0.067	70.88	23.76
835					<b>Decis</b>	33	66	66	-
825	10	0.01	0.148	156.57					88.62
815	20	0.02	0.122	129.06					73.05
805	30	0.03	0.087	92.04					52.09
795	40	0.04	0.061	64.53					36.53
785	50	0.05	0.044	46.55					26.35



**Şekil 3.42:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Deltharin 25 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.

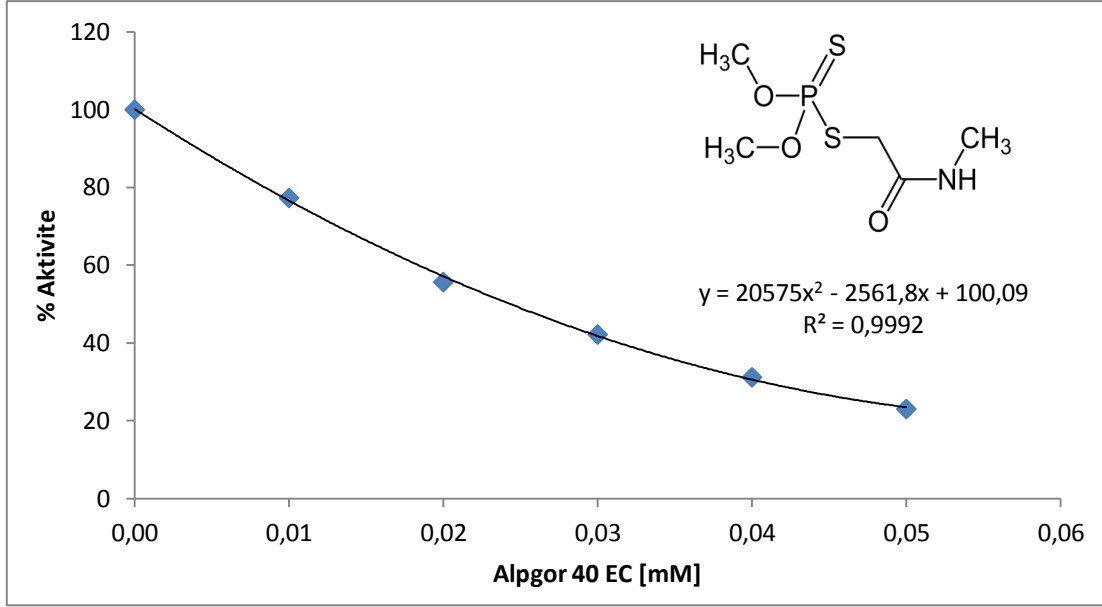


**Şekil 3.43:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Decis adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.

**Tablo 3.17:** LPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Algor 40 EC adlı pestisitın IC<sub>50</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Aktivite Fosfat tamponu (μL)	Pestisit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hacmi (μL)	Substrat ABST çözeltilisinin hacmi (μL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Ligand Kons. [I] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
835	Algor 40 EC	33	66	66	-	-	0.282	298.32	100
825					10	0.01	0.218	230.62	72.31
815					20	0.02	0.157	166.09	55.68
805					30	0.03	0.119	125.89	42.20
795					40	0.04	0.088	93.09	31.20
785					50	0.05	0.065	68.76	23.05





**Şekil 3.44:** Saflaştırılmış LPO enzimi üzerine Algor 40 EC adlı pestisitinin % Aktivite - [I] grafiği.

### 3.5 Kullanılan Veteriner İlaçları ve Pestisitlerin IC<sub>50</sub> Değerleri

Tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz veteriner ilaçları ve pestisitlerin LPO enzimine karşı olan ilgisini ifade eden IC<sub>50</sub> değerleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

**Tablo 3.18:** Çalışmamızda kullanılan Veteriner İlaçlarının IC<sub>50</sub> Değerleri.

Veteriner İlaçları	IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)	Veteriner İlaçları	IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)
Devamed	52	Advocin	9
Diüril	66	Kanovet	55
Atrol-F	89	Fostimol	31
Taylomisın	12	Flortek	21
Killoxacın	95	Gentavet	33
Geosol	12	Vetaljin	24
Flumed	56	Maboflex	16
Doksilin-LA	54	Neozid	29
Tilmivet	48	Teknomezathine	29

**Tablo 3.19:** Çalışmamızda kullanılan Pestisitlerin IC<sub>50</sub> Değerleri.

Pestisitler	IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)	Pestisitler	IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)
Petra 5 EC	34	Alpgor 40 EC	25
Mamba Turbo	31	Delmetrin	15
Deltharin 25 EC	23	Decis	33
Rogor	11		

**Tablo 3.20:** LPO enzimi için ABST substratı kullanılarak %50 inhibisyonuna sebep olan ilaç etken konsantrasyonları, 1 mL ilaca karşılık gelen etken miktarları ve sütteki maksimum kalıntı limitleri (MKL) (Tebliğ No:2011/20) [60].

İlaç Etkeni	İlaç Türü	Ampuldeki Miktarı (mg/mL)	Sütteki Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)	Sütteki Maksimum Kalıntı Limiti (µM)	IC <sub>50</sub> Değeri (µM)
Furosemid	Diüretik	10	----	----	66
Atropin Sülfat	Antikolinergik	2	----	----	89
Gentamisin Sülfat	Antibakteriyel	100	100	0.183	33
Metamizol Sodyum	Antibakteriyel	500	50	0.154	24
Deksametazon	Antibakteriyel	2.5	0.3	0.61x10 <sup>-3</sup>	52
Enrofloksasin	Antibakteriyel	100	100	0.286	95
Oksitetrasiklin HCl	Antibakteriyel	54	100	0.207	12
Danofloksin Mesilat	Antibakteriyel	25	30	0.068	9
Kanamisin Sülfat	Antibakteriyel	250	150	0.265	55
Marbofloksasin	Antibakteriyel	100	75	0.213	16
Tilmikosin	Antibakteriyel	300	50	0.059	48
Doksisiklin Monohidrat	Antibakteriyel	200	----	----	54
Tilozin	Antibakteriyel	200	50	0.056	12
Sülfadimidin Sodyum	Antibakteriyel	160	100	0.343	29
Florfenikol	Antibakteriyel	300	----	----	21
Neomisin Sülfat	Antibakteriyel	74	1500	1.698	29
Fluniksın Meglumin	Antibakteriyel	50	40	0.084	56

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Laktoperoksidaz (LPO) enzimi memelilerin sütünde, gözyaşında, tükürüğünde ve hava yolları yüzey sıvısında bulunan, 78 431 Da molekül ağırlığına sahip hem grubu içeren bir glikoproteindir [11, 12, 13, 14, 15]. Laktoperoksidaz enzimi bakterilerin büyümesini engelleyerek bakteri inhibisyonunu oluşmasını sağlaması gibi çok önemli bir özelliğe sahiptir [71]. LPO enzimi kimya ve süt endüstrilerinde, süt işleme gerçekleştirilen tesislerde, nakil gerçekleştirilirken sütün korunması amacıyla kullanılmaktadır [72]. Yaptığımız çalışmada patojen mikroorganizmalara karşı ve yeni doğan bebeklerin sindirim sisteminden salgılanan, savunmada önemli bir role sahip, süt içerisinde salgılanan bir oksidoredüktaz olan LPO enzimi yeni bir afinite jeli kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır [13]. LPO enzimi saflaştırılması için farklı kromatografik metodlar vardır fakat bu metodlar hem uzun hemde maliyeti uyguladığımız afinite kromatografisi yöntemine göre daha pahalıdır [73].

LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasının bazı önemli sebepleri vardır. Bunlardan en önemlisi birçok protein bu kromatografi tekniği ile bir basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılmaktadır. Bu tekniği diğer kromatografi tekniklerinden ayıran özellik ise sadece ilgili proteini bağlayan spesifik ligand bulundurması ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekir [74].

Bu çalışmada mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösteren, farklı karsinogenleri parçalayan ve hayvan hücrelerinin peroksidatif etkilerine karşı koruyarak biyolojik önem kazanan LPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması için yeni bir jel sentezlenmiştir. Sepharose-4B-etilendiamin-4-izotiyosiyonat benzen sülfonamid kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak enzimin fazla miktarda bulunduğu, temini kolay olan sığır sütünden LPO enzimi saflaştırılmış, kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

Sülfapiridin ve sülfanilamid'nin LPO inhibitörü olduğu belirlenmiştir [75]. Fakat tez çalışmamızda kullandığımız 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamidin LPO inhibitörü olduğu hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid karbonik anhidraz enziminin bir inhibitörü olduğu belirlenmiş bu enzimin saflaştırılmasında ligand olarak kullanılmıştır [76]. Yukarıda bahsedildiği gibi daha önce yapılan çalışmalarda sülfonamid türevlerinin LPO enziminin iyi bir inhibitörü olduğundan 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid kullanılarak LPO enzimi için ligandın inhibisyon çalışması yapılarak IC<sub>50</sub> değeri 14 µM olarak bulundu.

Ayrıca inhibitörün enzime nasıl bağlandığını belirlemek için farklı substrat konsantrasyonlarında çalışmalar yapıldı. Bunun sonucunda inhibitör ve substratın enzim molekülüne aynı anda bağlanma özelliği gösteren yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon türü belirlendi. K<sub>i</sub> değeri olarak 3.7x10<sup>-2</sup> mM olarak bulunmuştur. Bu inhibisyon tipinde substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Enzimin K<sub>M</sub> değeri sabit kalırken, V<sub>max</sub> değeri azalır. Bu inhibisyon tipinin çalışma için dezavantajı substrat ve inhibitörün enzime aynı anda bağlanmasıdır.

Tablo 3.1'de sığır sütünden LPO enziminin saflaştırılması basamakları gösterilmiştir. 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamidin ligand olarak kullanıldığı afinite jelinden, 150 mL sığır sütünden hazırlanan homojenattan 40 mL kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 12959.27 EU/mg olup enzim 2477.87 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 13.52 olarak bulunmuştur.

Shin ve arkadaşları farklı teknikler kullanarak saflaştırılan LPO enzimi için % 64 verim ve 31 kat saflaştırma katsayısı bulmuşlardır [79]. Başka bir çalışmada Nandini ve arkadaşları yine farklı saflaştırma teknikleri kullanarak saflaştırılan LPO enzimi için % 45 verim ve 10 kat saflaştırma katsayısı bulmuşlardır [80].

Şişecioğlu ve arkadaşları Amberlite CG-50 H<sup>+</sup> reçinesi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak LPO enzimini saflaştırmışlardır. % 21.6 verim ve 14.7 kat saflaştırma katsayısı bulmuşlardır [81].

Atasever ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Amberlite CG-50 H<sup>+</sup> reçinesi ve karbonik anhidraz saflaştırılmasında kullanılan Sepharose-4B-L-Tirozin-Sülfenilamid afinite jeli kullanılarak iki basamak ile % 61.3 verim ve 409 kat saflaştırma katsayısı ile LPO enzimini saflaştırmışlardır [77].

Yapılan çalışmalar ile kıyasladığımızda sentezlenen Sepharose-4B-etilendiamin-4izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapılı afinite jelinden saflaştırılan LPO enziminin veriminin düşük olmasına rağmen spesifik aktivitesi ve saflaştırma katsayısı diğer çalışmalardan çok daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Saflaştırılan LPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.6'da anlatıldığı gibi SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. LPO enzimi tek bant olarak literatürde de bahsedildiği gibi 80 kDa moleköl ağırlığına sahip olduğu tespit edildi [78].

Sepharose-4B-etilendiamin-4izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapılı afinite jelinden saflaştırılan LPO enziminin ABTS substratı kullanılarak kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) belirlenmiştir. Lineweaver- Burk grafiğinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1.4 mM ve 1000 U/mL.dak bulunmuştur.

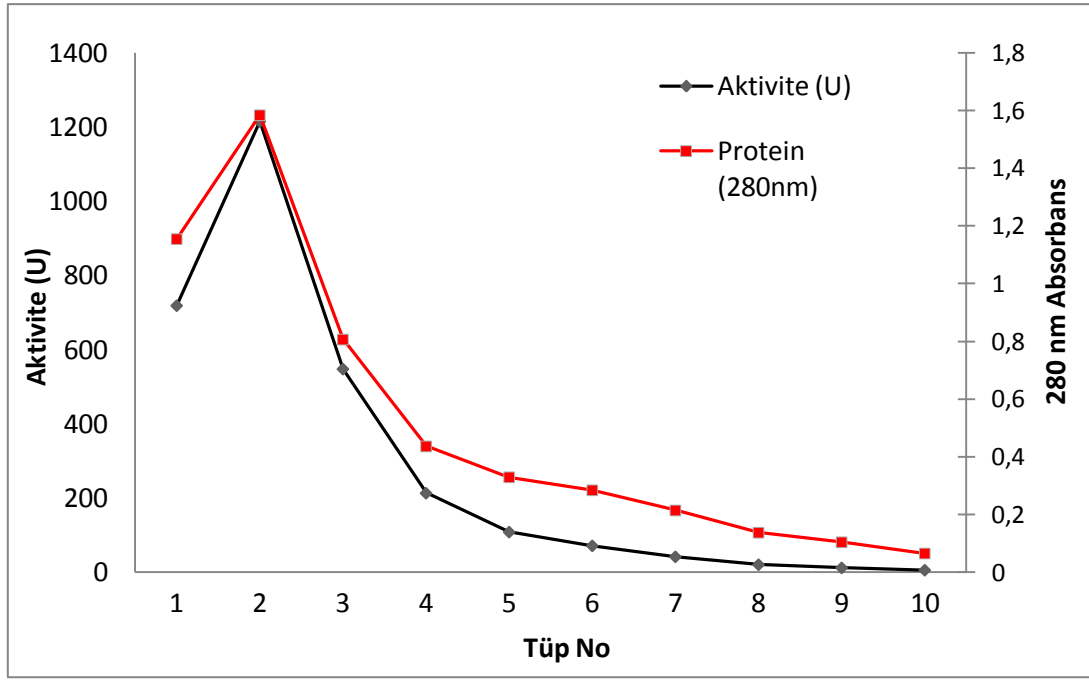
Atasever ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, Sepharose-4B-L-Tirozin-Sülfenilamid afinite jeli kullanarak saflaştırdıkları LPO enziminin kinetik sabitleri olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 0.14 mM ve 0.55  $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$  olarak bulmuşlardır [77].

Şisecioğlu ve arkadaşlarının farklı saflaştırma teknikleri kullanarak saflaştırdıkları LPO enziminin kinetik sabitleri olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 0.411 mM ve 13.6  $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$  olarak bulmuşlardır [82]. Şisecioğlu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada yine çeşitli saflaştırma teknikleri kullanarak saflaştırdıkları LPO enziminin kinetik sabitleri olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 0.25 mM ve 7.95  $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$  olarak bulmuşlardır [83].

Usanmaz'ın yaptığı doktora çalışmasında 2-kloro-4-sülfamoyilanilin kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için kinetik sabitleri olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 0.13 mM ve 0.55 EU/mL.dk olarak bulmuştur [84].

Yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında bulunan  $K_M$  değeri daha önce farklı yöntemlerle saflaştırılan LPO enzimi için literatürle uygunluk içerisindedir.

Çalışmamızda 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid ligandı kullanılarak hazırlanan LPO afinite jeli için farklı sıcaklık, pH ve iyonik şiddetlerde çalışmalar yapılarak laktoperoksidaz enziminin bu şartlarda nasıl tutunduğu belirlendi. Optimum şartların belirlenmesinden sonra bulunan optimum koşullarda saflaştırma yapılmıştır ve bulunan sonuçlar Şekil 4.1' da görüldüğü gibi bulunmuştur.



**Şekil 4.1:** Dengeleme ve yıkama tamponunda Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içermeyen pH: 6 tamponu ve 25°C’deki şartlarda yapılan saflaştırma grafiği.

LPO afinite kolonundan farklı pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0, 7.5), saflaştırılan enzimin ABTS substratı için gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412 nm’de ölçüldü ve Aktivite-pH grafikleri çizildi. Şekil 3.13’de görüldüğü gibi en iyi bağlanma pH: 6’da gerçekleştiği gözlenmiştir. Daha önce sülfanilamidi ligand olarak kullanıp afinite jeli sentezleyen ve bu jelden sığır sütünü kullanarak LPO enzimini saflaştıran Özdemir ve grubu da optimum bağlanmayı pH: 6 olarak belirlemişlerdir [77].

Afinite kolonundan saflaştırılan LPO enzimi için 5 °C, 15 °C, 25 °C ve 35 °C sıcaklık aralıklarında saflaştırmalar yapıldı ve Aktivite -sıcaklık grafikleri çizildi. Grafikler incelendiğinde 5 °C, 15 °C ve 25 °C’de benzer bağlanma ve elüsyon grafikleri gözlenmiştir fakat 35 °C’deki grafik incelendiğinde pik genişlemesi gözlenmektedir. Bu sıcaklıkta enzim daha zor elüe edilmiş ve protein daha fazla tüpe yayılmış durumdadır. Sıcaklıkların karşılaştırılması sonucunda LPO enzimi için optimum bağlanma ve elüsyon sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir.



Özdemir ve grubu sülfanilamidi ligand olarak kullanıp sentezledikleri afinite jeli ile yaptıkları çalışmada optimum bağlanma sıcaklığını 4 °C olarak bulmuşlardır [77].

LPO enziminin saflaştırılması için 0.05 M, 1 M, 0.15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında farklı iyonik şiddetlerdeki dengeleme ve yıkama tamponları ile bağlanma dereceleri belirlendi. Yapılan bu deneyler sonucunda LPO enziminin iyonik şiddete karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.13'te görüldüğü gibi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içermeyen tampon çözeltileri ile yapılan saflaştırmada en iyi bağlanma tespit edilmiştir. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmeye başlandığında enzimin kolona tutunmasında önemli derecede düşüş meydana geldiği ve piklerde genişlemenin arttığı gözlenmiştir. Özdemir ve grubunun yaptığı çalışmada ise iyonik şiddetin artışı ile bağlanmanın arttığı gözlenmiş. Optimum bağlanmanın 0.25 M iyonik şiddette olduğunu bildirmişler [77]. Ligand olarak kullandıkları sülfanilamid LPO enziminin yarışmalı (kompetitif) inhibitörü olduğunu bulmuşlar ve iyonik şiddetin bu kolonda enzimin bağlanmasında önemli derecede etkisi olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan afinite jelinin ligandı olan 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid bileşiği LPO enziminin yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibitörüdür ve bu kolon üzerinde iyonik şiddetin etkisi çok daha farklıdır. İyonik şiddetin artışı ile bağlanma azalmakta ve elüsyonda da pik genişlemeleri artmaktadır.

Çalışmamızın ikinci kısmında yeni afinite jelinden saflaştırılan LPO enzimine karşı bazı veteriner ilaçlarının ve pestisitlerin etkisi araştırılmıştır. Veteriner ilaçları, son yıllarda hayvanlarda hastalıkları tedavi etmek, hastalıklardan korumak, tanı koymak, fizyolojik fonksiyonları düzeltmek veya değiştirmek amacıyla kullanılmaktadır.

Pestisitler, insan ve hayvan vücudu ile bitki ve cansız cisimlerin çevresinde bulunan veya yaşayan; ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerlerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları (böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, toprak kurdu vb.) ortadan kaldırmak için kullanılan aktif kimyasallardır [66]. Yararlı olan bu bileşikler bilinçsizce tüketildiğinde zararlı etkiler göstermektedir.

Bu bileşiklerin bilinçsiz kullanılması kullanıldığı yere etki ettiği gibi insana kadar ulaştığı için insanda da kanserojen etki gösterebilir.

Bütün bu önemli özellikler dikkate alınarak çalışmamızda bazı veteriner ilaçları ve pestisitler kullanıldı. Sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimine karşı bu bileşiklerin *in vitro* etkileri incelenmiştir. Bu etki substrat (ABTS) konsantrasyonları sabit tutularak bileşiklerin değişik konsantrasyonlarında yüzde aktiviteler belirlenip % Aktivite-[I] grafiği çizilerek % 50 inhibisyona sebep olan bileşik konsantrasyonları belirlendi.

Veteriner ilaçları ve pestisitlerin LPO enzimine karşı ilgisini ifade eden  $IC_{50}$  değerleri çizilen grafikten belirlenmiş ve bir sonraki sayfada gösterilmiştir.

<b>Veteriner İlaçları</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (µM)</b>	<b>Veteriner İlaçları</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (µM)</b>
Devamed	52	Advocin	9
Diüril	66	Kanovet	55
Atrol-F	89	Fostimol	31
Taylomisin	12	Flortek	21
Killoxacin	95	Gentavet	33
Geosol	12	Vetaljin	24
Flumed	56	Maboflex	16
Doksilin-LA	54	Neozid	29
Tilmivet	48	Teknomezathine	29

<b>Pestisitler</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (µM)</b>	<b>Pestisitler</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (µM)</b>
Petra 5 EC	34	Alpgor 40 EC	25
Mamba Turbo	31	Delmetrin	15
Deltharin 25 EC	23	Decis	33
Rogor	11		

Grafikler çizilerek veteriner ilaçlarının belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında, bütün veteriner ilaçlarının güçlü inhibitör özelliği gösterdiği gözlenmiştir. Kullanılan veteriner ilaçlarının enzim üzerindeki inhibisyon etkileri yakın değerlerdedir (9-95 µM) ve bunların içerisinde Advocin 9 µM IC<sub>50</sub> değeri ile en güçlü inhibitör olarak belirlenmiştir.

Veteriner ilaçlarının LPO enzimi üzerine inhibitör etkileri belirlendikten sonra Tablo 3.20'de belirtildiği gibi bu ilaçların sütteki MKL değerlerine Türk Gıda Kodeksinden bakılarak karşılaştırmalar yapılmıştır [85].

Bu karşılaştırmalar sonucunda, % enzim aktivitesini yarıya düşeren ilaç konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) maksimum kalıntı limitinin üstünde olduğu tespit edilmiştir. Bu veteriner ilaçlarının süte geçen kalıntı miktarlarına bakıldığında, önerilen dozlarda kullanıldıklarında LPO enziminin aktivitesi üzerine önemli inhibisyon etkilerine sahip olmadıkları söylenebilir.

Zararlı kontrolünde yaygın olarak kullanılan pestisitler çok spesifik olmadıkları için insan ve hayvanlar üzerinde zehirleyici etkileri bulunmaktadır. Pestisitlerin bilinçsiz ve yaygın bir şekilde kullanılması sonucu besin zincirinde nihai tüketici olan insana kadar her kademedeki gittikçe yoğunlaşarak kronik zehirlenme riskini arttırmaktadır. Çalışmamızda kullanılan pestisitler tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlarla ilgili yapılan inhibisyon çalışmalarında LPO enzimini mikromolar düzeyinde inhibe ettikleri bulunmuştur. Pestisitler için çizilen grafiklerden belirlenen  $IC_{50}$  değerlerine bakıldığında 11-34  $\mu M$  arasında oldukları gözlenmiştir. Aralarında en güçlü inhibitör  $IC_{50}$  değeri 11  $\mu M$  olan Rogor olduğu belirlenmiştir.

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

1. Sığır sütünden Laktoperoksidaz (LPO) enzimini saflaştırmak için Sepharose 4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid kimyasal yapısına sahip bir afinite kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
2. Sepharose 4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapısına sahip afinite jelinden LPO enzimi saflaştırılmıştır.
3. Enzimin literatürde mevcut saflaştırma yöntemlerine göre üstünlüğü ortaya konularak hazırlanan kolonun çok uzun süre kullanılabilirdiği ve daha ekonomik olduğu çalışmamız sonucu tespit edilmiştir.
4. Yeni sentezlenen afinite jeli kullanılarak sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 80 kDa molekül ağırlığında tek bant olarak elde edilmiştir.
5. Sepharose-4B-etilendiamin-4 izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapılı afinite jelinden saflaştırılan LPO enziminin ABTS substratı kullanılarak kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) belirlenmiştir. Lineweaver- Burk grafiğinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1.4 mM ve 1000 U/mL'de bulunmuştur.

6. Sepharose-4B-etilendiamin-4 izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapılı afinite jeli için farklı iyonik şiddet, pH ve sıcaklıklarda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda optimum şartlar şu şekilde belirlenmiştir; iyonik şiddet için dengeleme ve yıkama tamponunda Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içermeyen, bağlanmanın en iyi olduğu pH:6 ve sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.

7. Çalışmamızda kullanılan veteriner ilaçları ve pestisitlerin yeni sentezlenen afinite jeli kullanılarak sığır sütünden saflaştırılan LPO enziminin aktivitesine farklı düzeylerde *in vitro* etki gösterdiği belirlenmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır. Bu bileşiklerin LPO enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Hussain, S., Slikker, W., Ali, S.F., “Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different region of Mouse brain”, *Int.J. Devl. Neuroscience*, 13, 811-817, (1995).
- [2] Pütter, J. and Becker, R., *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*, 286, New York: Bergmeyer, (1987).
- [3] V.Huystee, R.B., , “Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies”, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 38, 205, (1987).
- [4] Doumonted, C., and Rousset, B., “Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk”, *J. Biological Chem.*, 258, 14166-14172, (1983).
- [5] Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G. and Victor, W.R., *Harper'in Biyokimyası*, 141, İstanbul: Barış Kitabevi, (1993).
- [6] Halliwell, B., “Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance”, *Medical Biology*, 62, 71-77, (1984).
- [7] Harris, E.D., “Regulation of Antioxidant Enzymes”, *Faseb Journal*, 6, 2675-2683, (1992).
- [8] Fric, F., “Oxidative Enzymes”, (eds: Pirson, A. and Zimmerman, M.H.), *Encyclophedia of Plant Physiology*, 4, New York, 6-17, (1976).
- [9] Pakkanen, R., Aalto, J., “Growth Factors and Antimicrobial Factors Ofbovine colostrum”, *Int Dairy*, 7, 285-97, (1997).
- [10] Scammel, A.W., “Production and Uses of Colostrum”, *Journal of Dairy Technology*, 56, 74-82, (2001).

- [11] Prince, A. and Ratner, A.J., "Lactoperoxidase", *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.*, 22, 642-644, (2000).
- [12] Fonteh, F.A., Grandison, A.S. and Lewis, M.J., "Variations of Lactoperoxidase Activity and thiocyanate content in cows and goats milk throughout lactation", *Journal Dairy Res.*, 69, 401-409,(2002).
- [13] Kumar, R., Bhatla, K.L., "Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk", *Acta Cryst.*, 51, 1094-1096, (1995).
- [14] Elagamy, E. and Ruppanner, R., "Antibacterial and Antiviral Activity of Camel Milk Protective Proteins", *Journal of Daory Research*, 59 (2), 169-175, (1992).
- [15] Amornkul, Y. and Henning, D.R., "Utilization of Microfiltration or Lactoperoxidase system or Both for Manufacture of Cheddar Cheese from Raw milk" *J. Dairy. Sci.*, 90, 4988-5000, (2007).
- [16] Anonymous, K., "Lactoferrin and lactoperoxidase bio-active milk proteins", *Food Technology Europe*, 1996, 39-43, (1955).
- [17] Cals, M.M., Maillart, P., Brignon, G., Anglade, P. and Dumas, B.R., "Primary atructure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family", *European Journal Biochemistry*, 198, 733-739, (1991).
- [18] Wit, J.N. and Hooydonk, V., "Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems", *Netherland Milk and Dairy Journal*, 50, 227-244, (1996).
- [19] Sievers, G., "Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy", *Biochemica et Biophysics Acta*, 624, 249-259, (1980).



- [20] Claesson, O. and Björck, L., “Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *E. coli*”, *Journal of Dairy Science*, 63, 919-922, (1980).
- [21] Walstra, D. and Jenness, R., *Dairy Chemistry and Physics*, Newyork: A Wiley-Interscience Publication John Wiley and Sons, 467, (1984).
- [22] Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., “Steady-state kinetics of Lactoperoxidase With ABTS as Chromogen”, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 67, 1307-1312, (1975).
- [23] Metodiewa, D., Reszka, K. and Dunfurd, H.B., “Oxidation of the Substituted Catechols Dihydroxyphenylalanine Methyl Ester and Trihydroxyphenylalanine by Lactoperoxidase and its Compounds”, *Arch Biochem. Biophys*, 274, 601. (1989).
- [24] Daniel, R., Rao, L.D. and Mona, I.C., “Identification of Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases”, *Analytical Biochemistry*, 250, 10, (1997).
- [25] Doerge, D.R., “Mechanism-Based Inhibition of Lactoperoxidase by Thiocarbamide Goitrogens”, *Biochemistry*, 25, 4724-4728, (1986).
- [26] Özdemir, H., Aygül, G. and Küfrevioğlu, Ö.G., “Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties”, *Prep. Biochem and Biotech*, 31(2), 125-134, (2001).
- [27] Herrandez, C.M.M., Markwijk, B.W. and Vreeman, H.J., “Isolation and Properties of Lactoperoxidase from Bovine Milk”, *Netherland Milk and Dairy Journal*, 44, 213-231, (1990).
- [28] Reiter, B. and Harnulv, B.G., “Lactoperoxidase, antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications”, *Journal Food Protection*, 47 (9), 724-732, (1984).
- [29] Anonymous, “Code Of Practice For The Preservation Of Raw Milk By The Lactoperoxidase System”, *IDF Bulletin*, 234, 15, (1988).

- [30] Wolfson, L.M. and Sumner, S.S., "Antibacterial activity of the lactoperoxidase system. A review", *Journal Food Protection*, 56 (10), 887-992, (1993).
- [31] Sarkar, S. and Misra, A.K., "Utilization of milk preserved by LP system for manufacture of cultured milk products", *Dairy Sci. Abstr.*, 55, 3910, (1993).
- [32] Oram, J.D. and Reiter, B., "The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide", *Biochemistry. Journal*, 100, 373-381, (1996).
- [33] Pruitt, K.M. and Tenovuo, J., "Kinetics of hypothiocyanate production during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate", *Biochemica et Biophysica Acta*, 704, 204-214, (1982).
- [34] Modi, S., Deodhar, S.S., Behere, D.V. and Mitra, S., "Lactoperoxidase catalyzed oxidation of thiocyanate by hydrogen peroxide: <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance and optical spectral studies", *Biochemistry*, 30, 118-124, (1991).
- [35] Reiter, B. and Harnulv, G., "Lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide-a natural antibacterial system", *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 34 (1), 50-53, (1982).
- [36] Aune, T.M. and Thomas, E.L., "Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion", *Biochemistry*, 17 (6), 1005-1010, (1978).
- [37] Basaga, H. and Dik, T., "Effect of the lactoperoxidase system on the activity of starter cultures for yoghurt production", *Milchwissenschaft*, 49 (3), 144-146, (1994).
- [38] Thomas, E.L., "Lactoperoxidase-catalyzed oxidation forms of thiocyanate: Equilibria between oxidized forms of thiocyanate", *Biochemistry*, 20, 3273-3280, (1981).

- [39] Adamson, M. And Pruitt, K.M., “Lactoperoxidase catalyzed inactivation of hexokinase”, *Biochemica et Biophysica Acta*, 658, 238-247, (1981).
- [40] Dionysius, D.A., Grieve, P.A. and Vos, A.C., “Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antibacterial activity using two methods for hydrogen peroxide generation”, *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 146-153, (1992).
- [41] Marshall, V.M., “In vitro and in vivo studies on the effect of the lactoperoxidase/thiocyanat/hydrogen peroxide system on *Escherichia coli*” Ph.D Thesis, *University of Reading*, UK., (1978).
- [42] Marshall, V.M., Cole, W.M. and Bramley, J., “Influence of the lactoperoxidase system on susceptibility of the udder to *Streptococcus uberis* infection”, *Journal of Dairy Research*, 53, 507-517, (1986).
- [43] Mickelson, M.N., “Effect of lactoperoxidase and thiocyanate on the growth of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium”, *FIL-IDF Bulletin*, 191, 11-19, (1966).
- [44] Mickelson, M.N., “Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide”, *FIL-IDF Bulletin*, 191, 11-19, (1977).
- [45] Mickelson, M.N., “Antibacterial action of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide on *Streptococcus agalactiae*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 821-826, (1979).
- [46] Anonymous, “The lactoperoxidase system: Protective Proteins In Milk-Biological Significance and Exploitation. Lysozyme, Lactoferrin, Lactoperoxidase, Xanthineoxidase”, *FIL-IDF Bulletin*, 191, 11-19, (1985).
- [47] Anonymous, “Preservation of milk by chemical means”, *FIL-IDF Bulletin*, Dairy Development in East Africa, 221, 57-61, (1987).

- [48] Guirguis, N. and Hickey, M.W., “ Factors effecting the performance of thermophilic starters. 2-Sensitivity to the lactoperoxidase system’’, *Australian Journal of Dairy Technology*, 14, (1987).
- [49] Pruitt, K.M. and Kamau, D.N., “Quantitive analysis of bovine lactoperoxidase system components and the effects of the activated system on bacterial growth and survival’’, *Proceedings of the IDF seminar. Indigenous Antimicrobial Agents of Milk. Recent Developments*, Brussels-Belgium, B-1040, (1993).
- [50] Reiter, B. and Harnuly, G., “The preservation of refrigerated and uncooled milk by its natural lactoperoxidase system’’, *Dairy Industries International*, 47, 13-19, (1982).
- [51] Demet, Ö., “Türkiye’de veteriner ilaçlarının tüketim boyutları ve güvenli kullanımı yönünden değerlendirilmesi’’, *Türkiye’de veteriner ilaçları üretimi, pazarlanması, güvenli kullanımı ve kalıntı sorunları sempozyumu*, Ankara, Şafak matbaacılık, 27-32, (1994).
- [52] T.C.Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı, “İlaç Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu’’, *Dokuzuncu Kalkınma Planı, Ankara*, Rapor No: DPT: 2747, (2007).
- [53] Şanlı, Y., “Türkiye’de veteriner ilaçlarının tüketim boyutları ve güvenli kullanımı yönünden değerlendirilmesi’’, *Türkiye’de veteriner ilaçları üretimi, pazarlanması, güvenli kullanımı ve kalıntı sorunları sempozyumu*, Ankara , Şafak matbaacılık, 5-13, (1994).
- [54] Topçu, S., “Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları’’, 207, Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın Ders Kitapları, (2008).
- [55] Çağlarırnak, N., “Gıda güvenliğinin çevre kirliliği yönünden irdelenmesi’’, *7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi*, İzmir, 781-785, (24-27 Ekim 2007).

- [56] Dilek C.C., "İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (Eylül-2007).
- [57] Buchel, K.H., "*Chemistry of Pesticides*", New York: John Wiley & Sons, (1983).
- [58] Palüzar, H., "Pestisitlerin Vücut Savunma Sistemi Enzimleri Üzerine Etkilerinin in Vitro İncelenmesi", Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Edirne, (2013).
- [59] Şanlı, Y. and Kaya, S., "*Veteriner Klinik Toksikoloji*", 5, Ankara: Medisan Yayınevi, 204-205, (1992).
- [60] Bilen, Ç., "Alkalen Fosfataz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlalara Karşı Afinitesinin Araştırılması", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2015).
- [61] Agrobest Grup (Company), "Ürün Propektüsü [online]", (11 Mayıs 2016), [www.agrobestgrup.com/ilac.php?dilkod=&ilacid=131&kat=petra-5-ec](http://www.agrobestgrup.com/ilac.php?dilkod=&ilacid=131&kat=petra-5-ec), (2015).
- [62] Agri Nova Türkiye, "Ürün Etiketi [online]", (11 Mayıs 2016), [www.agrinova.com.tr/images/files/etiket/ragor.pdf](http://www.agrinova.com.tr/images/files/etiket/ragor.pdf), (2012).
- [63] Tarkim San.Tic.A.Ş., "Ürün Propektüsü [online]", (11 Mayıs 2016), [www.tarkimbk.com.tr/tr/urunler-detay/efdal-delmetrin-25-ec](http://www.tarkimbk.com.tr/tr/urunler-detay/efdal-delmetrin-25-ec), (2011).
- [64] The Dow Chem. Com., "Ürün Propektüsü [online]", (11 Mayıs 2016), [www.dowagro.com/tr-tr/turkiye/products/herbisitler/mamba-turbo](http://www.dowagro.com/tr-tr/turkiye/products/herbisitler/mamba-turbo), (2012).
- [65] Hektaş Ticaret A.Ş., "Ürün Etiketi [online]", (11 Mayıs 2016), [www.hektascom.tr/uploads/urundosyalar/1097525795.pdf](http://www.hektascom.tr/uploads/urundosyalar/1097525795.pdf), (1998).

- [66] Şipal, B., “Koyun Serum Paraoksanaz Enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin İlgisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).
- [67] Agrobest Grup, “Ürün Propektüsü [online]”, (11 Mayıs 2016), [www.agrobestgrup.com/ilac.php?dilkod=&ilacid=108&kat=alpgor-40-ec](http://www.agrobestgrup.com/ilac.php?dilkod=&ilacid=108&kat=alpgor-40-ec), (2014).
- [68] Segel, I.H., “*Biochemical Calculations*”, 403, New York: John Wiley and Sons, (1968).
- [69] Bradford, M.M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, 248-251, (1976).
- [70] Laemmli, D. K., “Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature”, *London*, 227, 680, (1970).
- [71] Shah, N.P., “Effects of Milk-Derived Bioactives an Overview”, *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10, (2000).
- [72] Uğuz, M.T., Özdemir, H., “Purification of Bovine Milk Lactoperoxidase and Investigation of Antibacterial Properties at Different Thiocyanate Mediated”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 349-353, (2005).
- [73] Özdemir, H., Aygül, İ. And Küfrevioğlu, Ö.İ., “Purification of Lactoperoxidase From Bovine Milk and Investigation of Kinetic Properties”, *Prep Biochem and Biotech.*, 31, 125-134. (2001).
- [74] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., *Biyokimya*, 6. Baskı, İstanbul: Aktif yayımevi, (2009).
- [75] Doerge, D.R. and Decker, C.J., “Inhibition of Peroxidase-Catalyzed Reactions by Arylamines: Mechanism for the Anti-Thyroid Action of Sulfamethazine” *Chemical Research in Toxicology*, 7, 164-169, (1994).

- [76] Bozdağ, M., Işık, S., Beyaztaş, S., Arslan, O. and Supuran, C.T., “Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 30(2), 1-5, (2014).
- [77] Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., Kufrevioglu, I., “One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography”, *Food Chem.*, 136, 864-870, (2013).
- [78] Çankaya, M., Şişecioğlu, M., Yörük, Ö., Özdemir, H., “In Vitro Effects of Some Antibiotic Drugs on Bovine Lactoperoxidase Enzyme”, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306, (2006).
- [79] Shin, K., Hayasawa, H. and Lönnerdal, B., “Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immuno adsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase”, *American Journal of Clinical Nutrition* , 73, 984-989, (2001).
- [80] Nandini, K.E. and Rastogi, N.K., “Single step purification from whey involving reverse Micelles-assisted extraction and its comeration reverse micellar extraction”, *Biotechnology Progress*, 26, 763-771, (2010).
- [81] Şişecioğlu, M., Cankaya, M., Gülçin, I., Ozdemir, H., “The inhibitory effect of propofol on bovine lactoperoxidase”, *Protein Pept. Lett.*, 16, 46-9, (2009).
- [82] Şişecioğlu, M., Cankaya, M., Gülçin, I., Ozdemir, H., “L-Adrenalin ve L-Noradrenalin Hormonlarının Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”, *24.Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak, BS-15, (2010).
- [83] Şişecioğlu, M., Kirecci, E., Cankaya, M., Gulcin, I., Ozdemir, H. and Atasever, A., “The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(9), 671-677, (2010).

- [84] Usanmaz, H., ‘‘Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniği İle Saflaştırılması’’, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2010).
- [85] Türk Gıda Kodeksi, Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Veteriner İlaçlarına ait Farmakolojik Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2011/20, (2011).