

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



**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI KİMYASALLARLA
İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE BEYÇİÇ

BALIKESİR, –HAZİRAN 2019

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



**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI KİMYASALLARLA
İNİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE BEYÇİÇ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU (Tez Danışmanı)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuğçe BEYÇİÇ tarafından hazırlanan “LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI KİMYASALLARLA İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.05.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU



Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Dr. Öğ. Üyesi Sema ÇARIKÇI



Üye

.....

Üye

.....

Üye

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI KİMYASALLARLA
İNİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞÇE BEYÇİÇ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SERAP UZUNOĞLU)
BALIKESİR, –HAZİRAN 2019**

Laktoperoksidaz (E.C. 1.11.1.7); moleküler ağırlığı yaklaşık 78 kDa olup, hem grubu ve % 8-10 karbohidrat içeren 612 aminoasit zincirinden ibaret, tek bir polipeptid zincirinden oluşan bir enzimdir. Bu enzim, yenidoğanların sindirim sisteminden salgılanan patojen mikroorganizmalara karşı duran, tükürükte, gözyaşında ve sütte bulunan bir oksidoredüktazdır. Bu çalışmada sığır laktoperoksidaz (LPO) enzimini Sepharose 4B-etilendiamin-4-izotiyosiyonat benzen sulfonamid jeli saflaştırıldı. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Enzimin saflaştırma derecesi 9241,44 verimi % 0,74 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda endüstride, ziraatte ve eczacılıkta sıklıkla kullanılan kimyasalların enzim üzerine *in vitro* etkisi incelenmiştir. Bu amaçla çalışılan kimyasalların IC₅₀ değerleri, K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Kimyasallar içinde katekol (benzokatekin) 5,36 µM ile en fazla inhibisyon etkisi göstermiştir. Allopurinol, guanidin, adenin, klorogenik asit, 4-aminofenil laktik asit ve lineoik asitin enzim üzerine etkisi gözlenmemiştir. Kimyasal maddeler içinde nikotinin K_i değeri 4,22x10⁻⁴ M olarak bulunmuş, inhibisyon tipi olarak grafikten nonkompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Laktoperoksidaz enzimi, afinite kromatografisi, inhibisyon, IC₅₀ değeri, K_i değeri, inhibisyon tipi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT OF LACTOPEROXIDASE ENZYME WITH SOME CHEMICALS

MSC THESIS

TUĞÇE BEYÇİÇ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSOC. DR. SERAP UZUNOĞLU)

BALIKESİR, OCTOBER 2018

Lactoperoxidase (E.C. 1.11.1.7); The molecular weight is about 78 kDa, and is an enzyme consisting of a single polypeptide chain consisting of 612 amino acid chains containing both the group and 8-10% carbohydrate. This enzyme is an oxidoreductase found in tears and milk in the saliva, which stands against pathogenic microorganisms released from the digestive system of newborns. In this study, bovine milk lactoperoxidase (LPO) enzyme was achieved to be purified by a affinity chromatography gel, prepared by using CNBr-activated Sepharose-4B as a matrix, ethylene amine as a spacer-arm and inhibitors, 4-isothiocyanate benzene sulfonamide as the ligand. The purity of the enzyme has been checked by SDS-PAGE. The purification value for lactoperoxidase has been found as 9241.44 folds with 0.74 % yield. In our study, the in vitro effects of chemicals, which are frequently used in industry, agriculture and pharmacy, on the enzyme were investigated. For this purpose, IC_{50} values, K_i values and types of inhibition were determined. Catechol showed the most inhibition with 5.36 μM IC_{50} value in studied. Allopurinol, guanidine, adenine, chlorogenic acid, 4-aminophenyl lactic acid and lineolic acid were not effective on the enzyme. Type of inhibition due to the presence of nicotine in chemical substances, noncompetitive type from the graph with 4.22×10^{-4} M K_i value.

KEYWORDS: Lactoperoxidase, affinity chromatography, inhibition, IC_{50} value, K_i value, inhibition type.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Laktoperoksidaz Enzimi	1
1.2 Enzim Kinetiği.....	3
1.3 İnhibisyon	6
1.4 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar ve Yapıları	9
1.4.1 4-metil katekol	9
1.4.2 Dietilen Amin.....	10
1.4.3 Giberallik Asit.....	10
1.4.4 Benzkatekin.....	11
1.4.5 Kumarik Asit.....	11
1.4.6 Kinetin.....	12
1.4.7 İndol Asetik Asit	12
1.4.8 Nikotin.....	13
1.4.9 Naftilamin	13
1.4.10 Pirokatekol	14
1.4.11 Benzamidin	14
1.4.12 4- nitrofenil asetik asit.....	15
1.4.13 Lineoik asit.....	15
1.4.14 Klorojenik Asit.....	16
1.4.15 Adenin	16
1.4.16 Guanidin	17
1.4.17 Allopirinol	17
1.4.18 3,4-dimetoksifenil asetik asit	18
1.4.19 2-amino 1H-purin 6 (7H)-one	18
1.4.20 4-aminofenil laktik asit	19
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	20
2.1 Materyaller	20
2.1.1 Araştırmada Kullanılan Bileşikler.....	20
2.1.2 Araştırmada Kullanılan Ekipmanlar	20
2.1.3 Araştırmada Kullanılan Çözeltiler.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2 Yöntemler	24
2.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması	24
2.2.1.1 Enzimin Tuzla Çöktürülmesi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.2.2	Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini	25
2.2.3	Kalitatif Protein Tayini	25
2.2.4	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	25
2.2.5	Afinite Jelinin Hazırlanması	26
2.2.6	SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enzimin Saflığının Kontrolü	26
2.2.7	Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	27
2.2.8	Bazı Kimyasal Maddelerin IC ₅₀ Değerlerinin Saptanması ...	28
3.	BULGULAR	29
3.1	Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması	29
3.2	Proteinlerin Kantitatif Analizi İçin Kullanılan Standart Grafik.....	30
3.3	Laktoperoksidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	31
3.4	Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi.....	32
3.5	Kullanılan Bazı Kimyasal Maddelerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	32
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	51
5.	KAYNAKLAR.....	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Laktoperoksidaz enziminin yapısı [10].	1
Şekil 1.2: Enzim-substrat ilişkisi [22].	4
Şekil 1.3: Micheal-Menten eğrisi	5
Şekil 1.4: Lineweaver-Burk grafiği	5
Şekil 1.5: Enzim-inhibitör ilişkisi [29].	6
Şekil 1.6: Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi	8
Şekil 1.7: Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi	8
Şekil 1.8: Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi	8
Şekil 1.9: Lineer Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi	8
Şekil 1.10: 4-metil katekol.	9
Şekil 1.11: Dietilen amin	10
Şekil 1.12: Giberallik asit	10
Şekil 1.13: Benzokatekin	11
Şekil 1.14: Kumarik asit	11
Şekil 1.15: Kinetin	12
Şekil 1.16: İndol asetik asit.	12
Şekil 1.17: Nikotin.	13
Şekil 1.18: Naftilamin.	13
Şekil 1.19: Pirokatekol	14
Şekil 1.20: Benzamidin.	14
Şekil 1.21: 4-nitrofenil asetik asit.	15
Şekil 1.22: Lineoik asit	15
Şekil 1.23: Klorogenik asit	16
Şekil 1.24: Adenin	16
Şekil 1.25: Guanidin	17
Şekil 1.26: Allopurinol	17
Şekil 1.27: 3,4-dimetoksifenil asetik asit.	18
Şekil 1.28: 2-amino 1H-purin 6(7H)-one	18
Şekil 1.29: 4-aminofenil laktik asit.	19
Şekil 3.1: Afinite kolonundan LPO enziminin elüsyon grafiği	29
Şekil 3.2: Coomassie Blue metodu ile enzim miktarlarının belirlenmesi için kullanılan grafik	30
Şekil 3.3: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	32
Şekil 3.4: 4-nitrofenil asetik asit için % aktivite-[I] grafiği.	34
Şekil 3.5: Pirokatekol için % aktivite-[I] grafiği	34
Şekil 3.6: Naftilamin için % aktivite-[I] grafiği	35
Şekil 3.7: Benzokatekin için % aktivite-[I] grafiği.	35
Şekil 3.8: 4-metilkatekol için % aktivite-[I] grafiği	36
Şekil 3.9: Dietilenamin için % aktivite-[I] grafiği	36
Şekil 3.10: Giberallik asit için % aktivite-[I] grafiği	37
Şekil 3.11: Nikotin için % aktivite-[I] grafiği	37
Şekil 3.12: Kinetin için % aktivite-[I] grafiği.	38
Şekil 3.13: Benzamidin için % aktivite-[I] grafiği	38
Şekil 3.14: Kumarik asit için % aktivite-[I] grafiği	39

Şekil 3.15: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve nikotin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	40
Şekil 3.16: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve dietilenamin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	41
Şekil 3.17: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 4-metil katekol ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	41
Şekil 3.18: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve indol asetik asit ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	42
Şekil 3.19: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve pirokatekol ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	42
Şekil 3.20: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve naftilamin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	43
Şekil 3.21: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve benzokatekin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	43
Şekil 3.22: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve giberallik asit ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	44
Şekil 3.23: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 4-nitrofenil asetik asit ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	44
Şekil 3.24: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve benzamidin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	45
Şekil 3.25: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve kumarik asit ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	45
Şekil 3.26: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve kinetin ile elde edilen $1/[S]-1/V$ grafiği.....	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.2: İnhibisyon çeşitleri ve özellikleri.....	7
Tablo 2.1: Elektroforezinde uygulanan jellerin konsantrasyonları ve miktarları	23
Tablo 3.1: LPO enzimi için saflaştırma tablosu.....	31
Tablo 3.2: Enzim aktivite ölçümü için kullanılan miktarlar.....	33
Tablo 3.3: IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan miktarlar.....	39
Tablo 3.4: Sütteki Laktoperoksidaz enzimi için ABTS substratı kullanılarak, kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.....	47
Tablo 3.5: Sütteki Laktoperoksidaz enzimi için ABTS substratı kullanılarak, kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.....	48
Tablo 3.6: Çalışmamızda kullanılan kimyasalların IC ₅₀ , K _i değerleri ile bu kimyasallara ait inhibisyon türleri.....	49

SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

SDS	:	Sodyum dodesil sülfat.
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
U	:	Enzim Ünitesi
IC₅₀	:	%50 İnhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
OP	:	Organo fosfat bileşiği
LPO	:	Laktoperoksidaz
S	:	Substrat
E	:	Enzim
ABTS	:	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
Tris	:	Trihidroksimetil aminometan
α	:	Alfa
β	:	Beta
°C	:	Santigrat Derece

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın ders aşamasında engin bilgilerini bizim ile paylaşan ve her zaman desteğini hissettiren kıymetli hocam; Prof. Dr. Oktay Arslan'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde desteğini her daim yanımda hissettiren, bilgilerini, emeğini, zamanını benimle paylaşan sevgili danışman hocam; Sayın Doç. Dr. Serap Beyaztaş Uzunoğluna teşekkürlerimi sunarım.

Bir telefon kadar uzağımda olan, birlikte üzüldüğüm, birlikte sevindiğim dert ortaklarım, mesafeleri kısaltan can arkadaşlarım Elif Çatar, Tuğçe Aktaş'a sonsuz teşekkür ederim. Tez dönemimin son evrelerinde tanıdığım, beni destekleyip bırakmak yok diyerek motivasyon veren Olgü Kıymaz'a gönülden minnetlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemediğim hayatımın her aşamasında yanımda olan ve aldığım her kararı destekleyen anneme ve babama gönülden minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Tezim aileme ithafımdır.

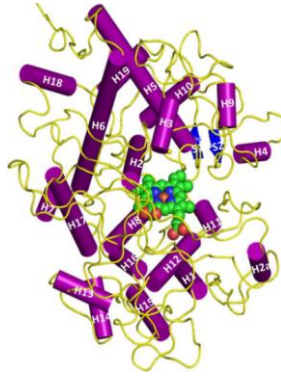
Tuğçe BEYÇİÇ

1. GİRİŞ

1.1 Laktoperoksidaz Enzimi

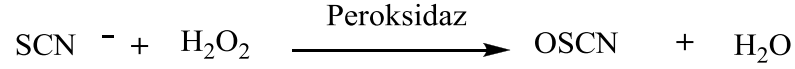
Laktoperoksidaz (E.C. 1.11.1.7); 1940'lı yıllarda sığır sütünde belirlenen, peroksidaz ailesinin bir üyesi olan enzimdir. Bu enzim, yenidoğanların sindirim sisteminden salgılanan patojen mikroorganizmalara karşı duran, tükürükte gözyaşında ve sütte bulunan bir oksidoredüktazdır [1, 2]. Laktoperoksidaz (LPO); peyniraltı proteinlerinde büyükbaş hayvanların cinsine göre 10-30 µg/ml konsantrasyonlarında bulunur [3, 4]. LPO bakterilerin büyümesinin engellenmesi ve inhibisyonunun gerçekleşmesinde önemli bir özelliği bulunduran, prostetik olarak hem grubu içeren bir glikoproteindir [5].

Laktoperoksidaz enzimi moleküler ağırlığı 78 431 Da olup, hem grubu ve % 8-10 karbonhidrat içeren 612 aminoasit zincirinden ibaret, tek bir polipeptid zincirinden oluşur [6, 7]. Yapılan çalışmalarda LPO nun sekonder yapısıyla ilgili moleküllerinin % 23 alfa yapısında, % 65 beta yapısında ve % 12 sinin düzensiz yapıda olduğu tespit edilmiştir [7]. İzoelektronik pH değeri 9,6 dır [8, 9].



Şekil 1.1: Laktoperoksidaz enziminin yapısı [10].

LPO enzimi tiyosiyanat iyonunun antibakteriyal hiposiyanata oksidasyonunu katalizler [2].

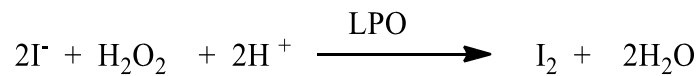


Bu sebeple hem hidrojen peroksit hemde detiyosiyanat SCN^- antimikrobiyal aktivite için son derece önemlidir. Sütte eser miktarda hidrojen peroksit bulunur, fakat bu süte bulaşan laktik asit bakterileri tarafından da üretilebilir. Bunun yanı sıra sütte serbest oksijen bulunuyorsa hidrojen peroksit, ksantin oksidaz, askorbik asit ve bakır sülfidril reaksiyonu ile oluşabilir. Çünkü H_2O_2 kararlı değildir, laktoperoksidaz gibi enzimler ile bağlanıp katalaz tarafından indirgenebilir [3].

LPO sistemi ile gerçekleşen bu reaksiyon sitoplazmik membrana etki eder. Çünkü OSCN enzimlerin serbest $-\text{SH}$ gruplarına bağlanır. Bunun sonucu olarak potasyum ve aminoasit hücreden sızabilir; pH düşüşü gözlenir, karbonhidratların, proteinlerin, aminoasitlerin ve diğer besin elementlerinin hücreye alınımı engellenir. Hücrenin DNA ve RNA sentezleri bozulur [10].

LPO sistemi tarafından gram (-) bakterileri, gram (+) bakterilerine göre parçalanmaya ve öldürmeye daha elverişlidir. Bunun sebebi; iki hücrede bulunan hücre duvarı ve kalınlık farklarıdır. Bazı gram (+) Streptokok bakteriler hipotiyosiyanata daha dirençlidir [3, 10].

LPO aynı zamanda iyodürün hidrojen peroksitle oksidasyonunu da katalizler [1, 11, 12, 6].



LPO enzimi, 10 dakika da ve 73 °C sıcaklıkta etkisini yitirmektedir. Çiğ sütte bulunan laktoperoksidaz enziminin, 76 °C sıcaklıkta 50 ppm'inin sadece 2 dakika bırakılması sonucu enzimin % 98'lik kısmının, 72 °C'de 15 saniye bırakılması ise enzimin % 34'lük kısmının aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir [9, 13]. Enzimin etkisini kaybetmesine Ca⁺² iyonlarının neden olduğu saptanmıştır [13].

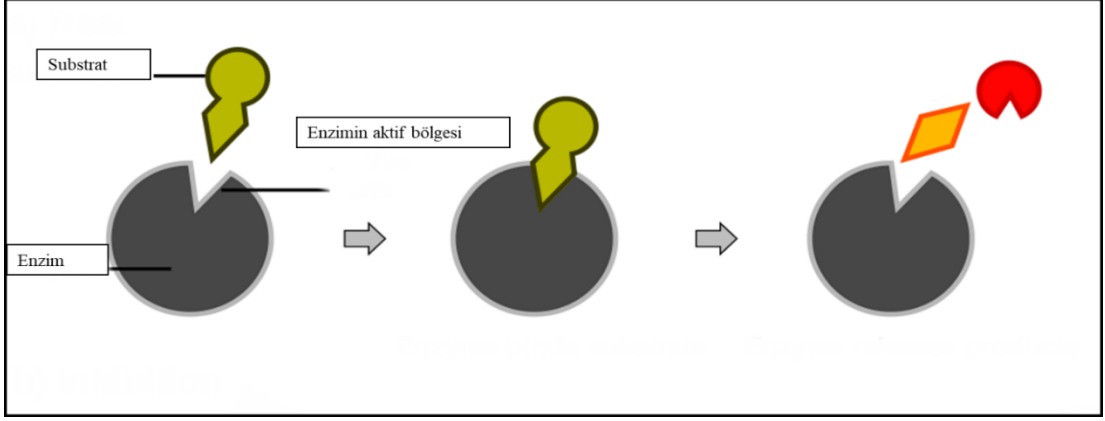
LPO, Riboflavin (Vitamin B2) varlığında ışığa karşı çok duyarlıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda sütün birkaç saat gün ışığına bırakılması sonucunda enzimin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [14].

LPO enzimi için gerekli koşullar sağlanmasına karşın inhibitörleri tam olarak bilinmemektedir. Buna rağmen bazı çevresel kirleticiler ve ağır metaller arasındaki bazı elementlerin katalitik aktivitesi üzerine etkileri bilinmektedir [15, 16].

1.2 Enzim Kinetiği

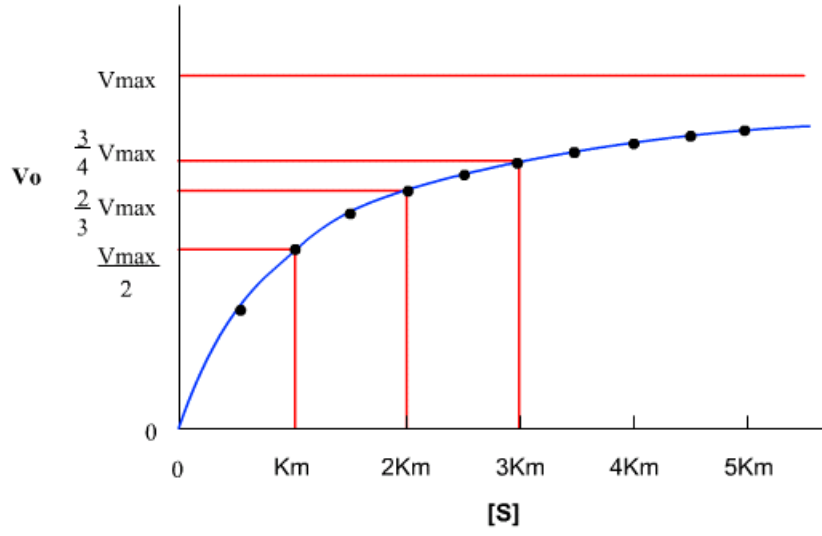
Enzimler; canlı hücrelerdeki reaksiyonları katalizleyen ve çoğu protein yapısında olan biyomoleküllerdir [17]. Büyüklükleri 20 000 - 10 0000 Da aralığında olan proteinlerdir [18]. Kimyasal tepkimelerin hızını artırır, yüzde yüz verim ile çalışır, tepkime sonunda hiç değişmeden çıkarlar [19]. Enzimsiz gerçekleşen tepkimelere oranla 10⁸ - 10¹² kat daha hızlıdır [20].

Enzimler tarafından katalizlenen kimyasal tepkimelerin hızının incelenmesi, enzim kinetiği kavramını ortaya çıkartmıştır. Enzimlerin kinetik özelliklerinin incelenmesi için Michaelis-Menten eşitliği geliştirilmiştir. Amacı, biyokimyasal tepkimeler için nitel bir hesaplama yapabilmektir. Bu tepkimelerin çoğu enzim ile katalizlenir ve enzim substratın özellikli bölgesine bağlanır [21].

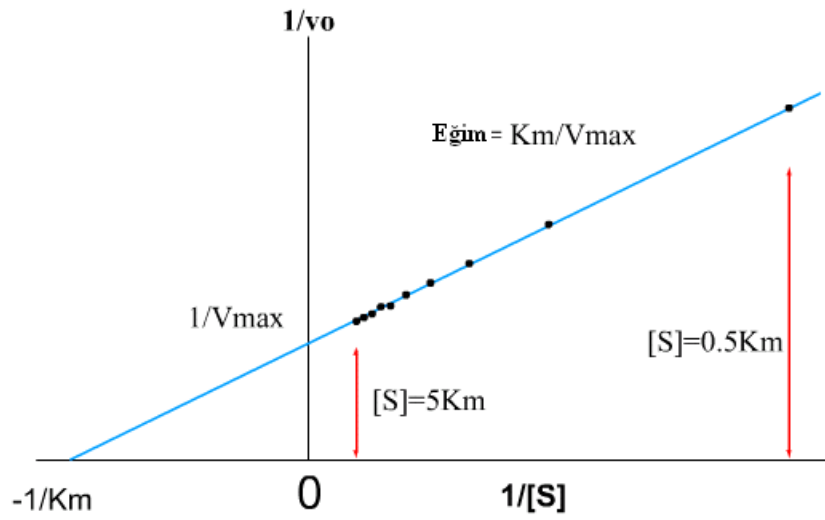


Şekil 1.2: Enzim-substrat ilişkisi [22].

Her enzimin kendisine spesifik olan bir K_m değeri (yani Michaelis-Menten sabiti) bulunur. K_m değeri enzimin substrata karşı olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Substrat konsantrasyonu S ile gösterilirken, V_0 başlangıç hızını ifade etmektedir. Michaelis-Menten eşitliğinin ters çevrilmesi ile Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir. Bu grafik ise, V_{max} ve K_m değerlerinin doğru bir şekilde belirlenmesini sağlar [23].



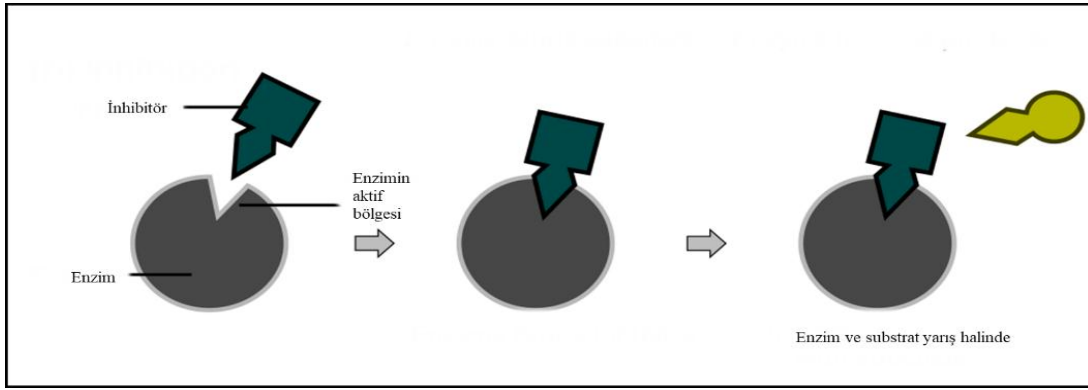
Şekil 1.3: Micheal-Menten eğrisi.



Şekil 1.4: Lineweaver-Burk grafiği.

1.3 İnhibisyon

Enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktiviteleri bazı bileşikler aracılığıyla azaltılır, yavaşlatılır hatta yok edilebilir. Buna neden olan maddelere enzim inhibitörleri, bu olaya ise enzim ihibisyonu denir. İnhibitörler, bir iyon veya küçük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. İnhibisyon çalışmaları enzim-substrat özgülüğünü (spesifikliğini), aktif merkezde bulunan fonksiyonel grupları ile fiziksel, kimyasal yapısı ve reaksiyonların kinetik mekanizmaları hakkında bilgi verir.

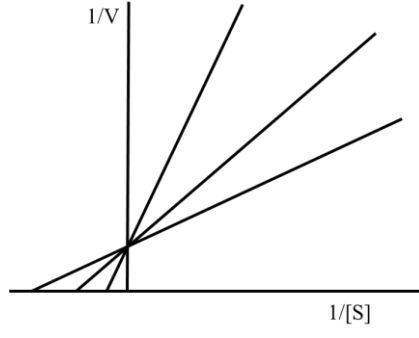


Şekil 1.5: Enzim-inhibitör ilişkisi [29].

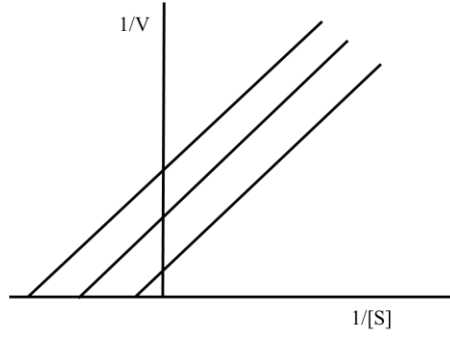
Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki tiptir. Bunlardan dönüşümsüz (tersinmez) inhibitör aktif merkeze ya kovalent bağlar ile bağlanır veya zor ayrılan bir kompleks oluşturur. Dönüşümlü (tersinir) inhibisyonda ise enzim-inhibitör kompleksi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonu bağlanan inhibitör çözünür ve enzim aktivitesi yeniden kazanılır. Dönüşümlü inhibisyon yarışmalı (kompetitif), yarı-yarışmalı (nonkompetitif), yarışmasız (unkompetitif) olmak üzere üç gruba ayrılır [24].

Tablo 1.1: İnhibisyon çeşitleri ve özellikleri.

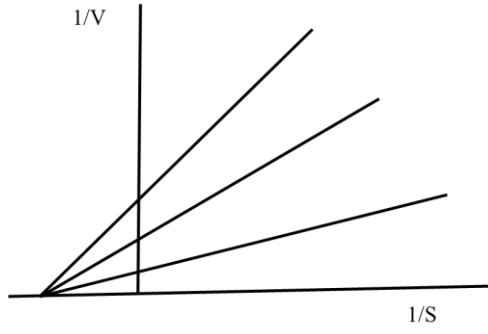
KOMPETİTİF (YARIŞMALI) İNHİBİSYON	<ul style="list-style-type: none">➤ İnhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanamaz,yarış halindedirler.➤ Bağlanma yeri ise enzimin aktif bölgesidir.
NONKOMPETİTİF (YARI-YARIŞMALI) İNHİBİSYON	<ul style="list-style-type: none">➤ İnhibitör ve substrat arasında yarış halinde değildir.➤ Her ikisinde enzime bağlanarak EIS kompleksi oluşturur.
UNKOMPETİTİF (YARIŞMASIZ) İNHİBİSYON	<ul style="list-style-type: none">➤ İnhibitör serbest enzime bağlanmaz.➤ Bağlanma yeri EI kompleksidir.
LİNEER KARIŞIK TİP İNHİBİSYON	<ul style="list-style-type: none">➤ Nonkompetitif inhibisyonun özel bir durumudur.➤ Substrat EI kompleksine, inhibitör ES kompleksine bağlanarak gerçekleşir.➤ Sonuç olarak ESI kompleksi oluşur.



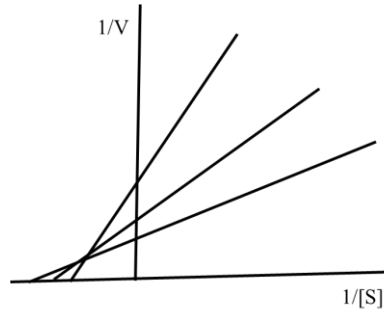
Şekil 1.6: Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 1.7: Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 1.8: Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi.

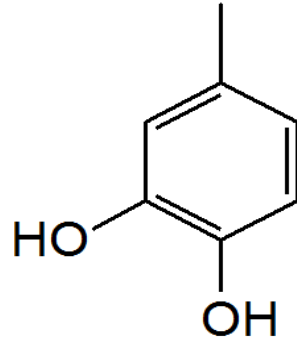


Şekil 1.9: Lineer Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi.

1.4 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar ve Yapıları

1.4.1 4-metil katekol

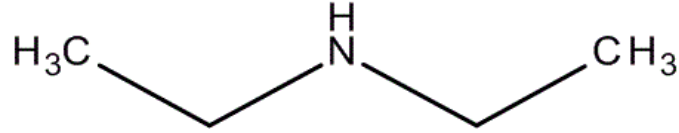
Molekül ağırlığı 124,139 g/mol olan bir homoproteo katesuik asit (3,4-dihidroksi fenil asetik asit) metabolitidir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üretimini başlattığı, uyardığı bilinmektedir. BDNF; çevresel ve merkezi sinir sisteminde nöronların yaşamasında, büyümesinde ve fonksiyonlarında görev alır [25].



Şekil 1.10: 4-metil katekol.

1.4.2 Dietilen Amin

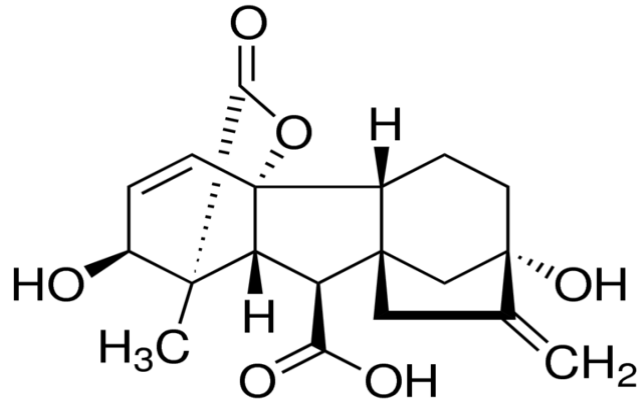
Molekül ağırlığı 73,139 g/mol olan safsızlık nedeniyle çoğu zaman kahverengi görünen renksiz bir sıvıdır. Hoş olmayan güçlü bir kokusu vardır [26].



Şekil 1.11: Dietilen amin.

1.4.3 Giberallik Asit

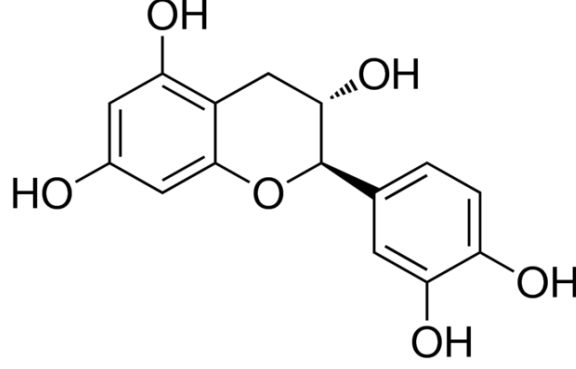
Molekül ağırlığı 346,379 g/mol olan bitkilerin doğal gelişimlerini kontrol eden güçlü bir hormondur. Hücrelerin büyümesini ve uzamasını destekler [27].



Şekil 1.12: Giberallik asit.

1.4.4 Benzcatekin

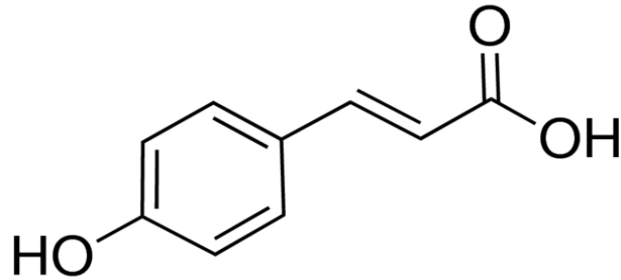
Molekül ağırlığı 290,271 g/mol olan odunsu bitkilerde ortaya çıkan bir antioksidan flavonoiddir [28]. Bir diğer adı Katekoldür.



Şekil 1.13: Benzcatekin.

1.4.5 Kumarik Asit

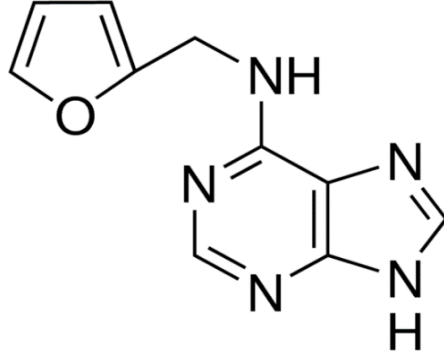
Molekül ağırlığı 164,16 g/mol olan hidroksisinamik asit türevi olan organik bileşiktir. Üç izomeri bulunur; m- kumarik asit, p- kumarik asit, o- kumarik asit. Doğada en çok bulunan p- kumarik asit formudur. Fıstık, domates, havuç ve sarımsak gibi bitkilerde bulunur [29].



Şekil 1.14: Kumarik asit.

1.4.6 Kinetin

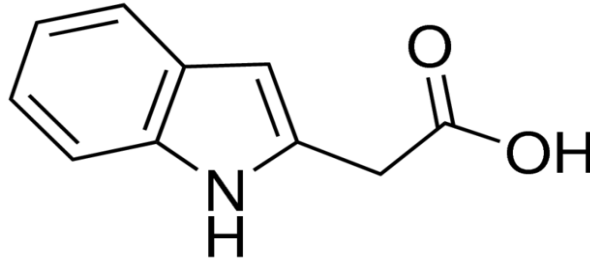
Molekül ağırlığı 215,216 g/mol olan bitkilerin büyümesini düzenleyen bir hormondur [30].



Şekil 1.15: Kinetin.

1.4.7 İndol Asetik Asit

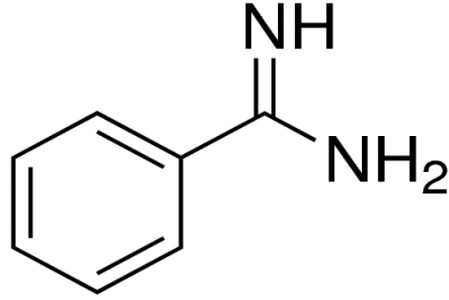
Molekül ağırlığı 175,187 g/mol olan triptofan metabolizmasının parçalanma ürünüdür. Genel olarak memelilerin bağırsaklarındaki bakterilerin etkisi ile üretilir [31].



Şekil 1.16: İndol asetik asit.

1.4.8 Nikotin

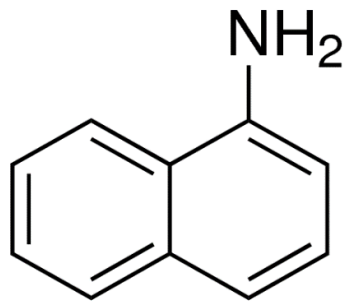
Molekül ağırlığı 162,236 g/mol olan tütün bitkisinde bulunan bir alkaloiddir [32].



Şekil 1.17: Nikotin.

1.4.9 Naftilamin

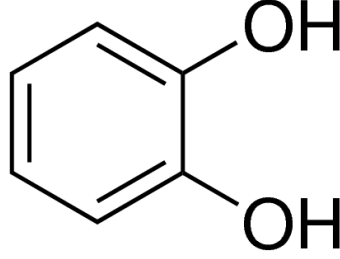
Molekül ağırlığı 143,189 g/mol olup, kanserojen etkiye sebep olan hoş kokulu bir amindir. Bazı kimyasalların yapımında kullanılır [33].



Şekil 1.18: Naftilamin.

1.4.10 Pirokatekol

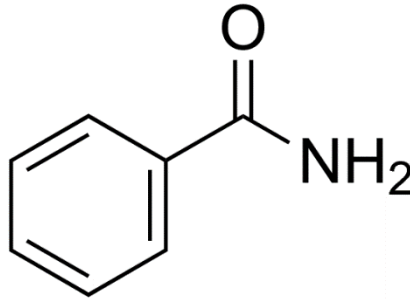
Molekül ağırlığı 110,12 g/mol olan bir benzendioldür. Eser miktarda doğal halde bulunabilen bir bileşiktir. Pestisitlerin, tatlandırıcıların ve kokuların öncüsü olarak üretilmektedir [34].



Şekil 1.19: Pirokatekol.

1.4.11 Benzamidin

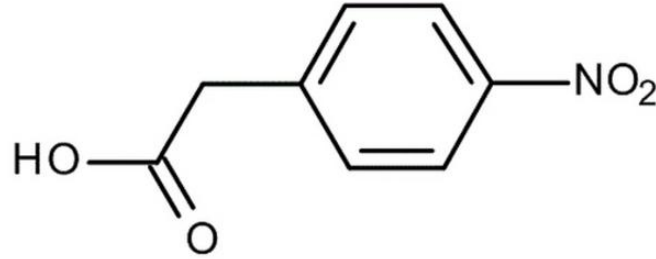
Molekül ağırlığı 120,15 g/mol olan benzenin bir amid türevidir. Proteinlerin bozulmasını önlemek için, protein kristalografisinde ligand olarak kullanılır. Bazı farmasötik ilaçlarda ana etken madde olarak kullanılır [35].



Şekil 1. 20: Benzamidin.

1.4.12 4- nitrofenil asetik asit

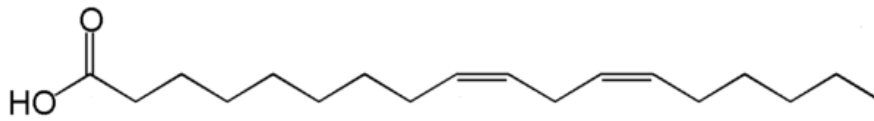
Molekül ağırlığı 181,15 g/mol olan cilt korozyonuna, göz hasarına sebep olan ve aşındırıcı etki gösteren bir kimyasaldır. Su ortamındaki canlılar için tehlikelidir [36].



Şekil 1. 21: 4-nitrofenil asetik asit.

1.4.13 Lineoik asit

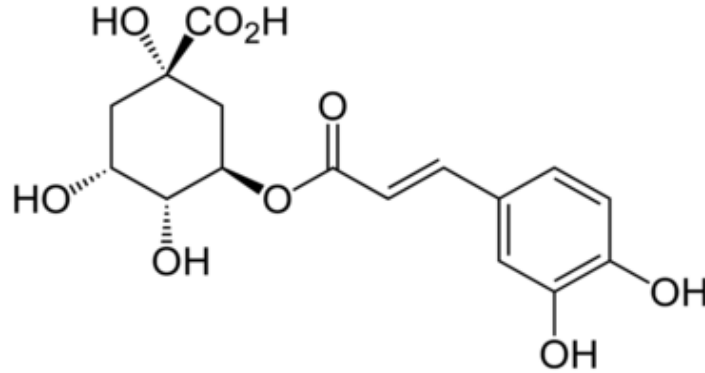
Molekül ağırlığı 280,452 g/mol olan bitki glikozitlerinde yaygın olarak bulunan doymamış bir yağ asididir. Prostaglandinlerin biyosentezinde ve hücre zarlarında kullanılır [37].



Şekil 1. 22: Lineoik asit.

1.4.14 Klorojenik Asit

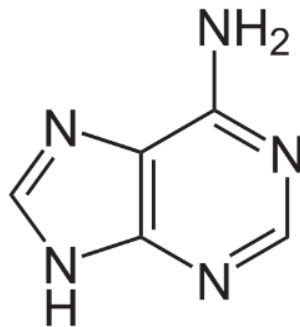
Molekül ağırlığı 354,311 g/mol olan yapraklarda ve çift çenekli bitkilerin meyvelerinde izole edilen kahve içerisindeki başlıca polifenolik bileşiktir. Kafeik asit ve kinik asit esteridir [38].



Şekil 1. 23: Klorojenik asit.

1.4.15 Adenin

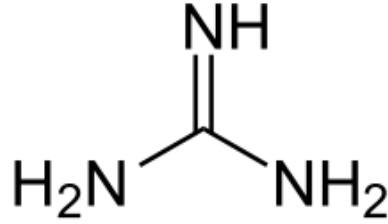
Molekül ağırlığı 135,13 g/mol olan pürin bazlarından biridir. DNA ve RNA nükleik asitlerinin nükleotidlerinde bulunur. DNA'da timine, RNA'da ise urasile hidrojen bağlarıyla bağlanarak içinde bulunduğu nükleik asidin yapısını sabitleştirir [39].



Şekil 1. 24: Adenin.

1.4.16 Guanidin

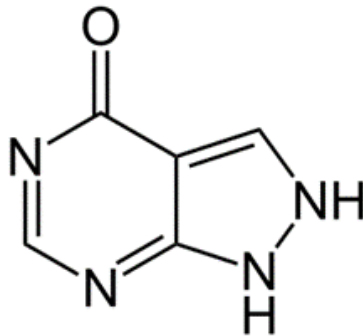
Molekül ağırlığı 59,07 g/mol olan polar solventlerde çözünen renksiz bir katıdır. Plastik ve patlayıcı üretiminde kullanılan güçlü bir bazdır. İdrarda protein metabolizmasının normal bir ürünü olarak bulunur [40].



Şekil 1. 25: Guanidin.

1.4.17 Allopurinol

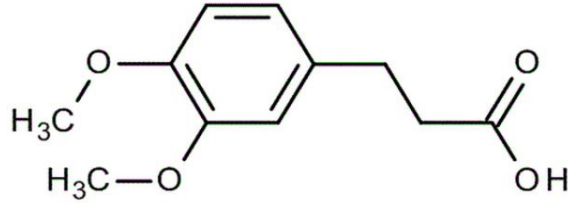
Molekül ağırlığı 136,11 g/mol olan yüksek kan ürik asit seviyelerini düşürmek için kullanılan bir ilaçtır. Özellikle gutun ve belirli tipte böbrek taşlarının önlenmesinde ayrıca kemoterapi ile ortaya çıkabilen yüksek ürik seviyeleri içinde kullanılır [41].



Şekil 1. 26: Allopurinol.

1.4.18 3,4-dimetoksifenil asetik asit

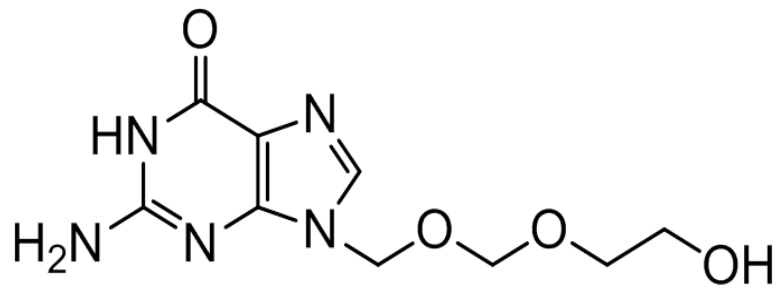
3,4-dimetoksifenil asetik asit moleküler ağırlığı 196,202 g/mol'dür. Diğer bir adıyla Homoveratrik asit olarak bilinir [42].



Şekil 1.27: 3,4-dimetoksifenil asetik asit.

1.4.19 2-amino 1H-purin 6 (7H)-on

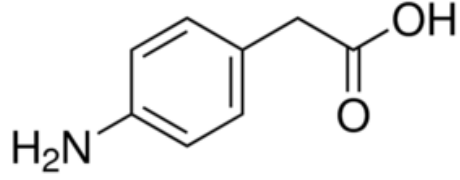
Moleküler ağırlığı 249,201 g/mol olan kimyasaldır. İçeriğinde bulunan yapılardan dolayı konformasyon oluşturmaz [43].



Şekil 1.28: 2-amino 1H-purin 6(7H)-on.

1.4.20 4-aminofenil laktik asit

Moleküler ağırlığı 151,165 g/mol olan deride, gözde ve solunum yolunda tahrişe neden olan bir kimyasaldır [44].



Şekil 1.29: 4-aminofenil laktik asit.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar; Sepharose 4-B, L-tirozin, EDTA (etilendiamintetra asetik asit), Standart serum albümin, ABTS, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilediamin), Amonyum sülfat, SDS, Sodyum asetat, Sodyum fosfat, Sodyum karbonat, Sodyum klorür, Hidrojen peroksit, Hidroklorik asit, Coomassie brilliant blue G-250, Tris-HCl, Sigma Chemical Company'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksi metil aminometan, β -merkaptoetanol, Sodyumperklorat, Brom fenol mavisi, Sülfirik asit, Glisin, Asetik asit, Metanol, Etanol, Akrilamid ve diğer kimyasallar maddeler E. Merck AG'den; 200 mL süt dışarıdan sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma sırasında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

Buz Makinesi	: Fiocchetti AF10
Elektroforez Sistemi	: Hoefer, HSI
Kromotografi 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
Otomatik Pipetler	: ISOLAB, Brand

2.1.3 Araştırmada Kullanılan Çözeltiler

0,1 M NaHCO₃ Çözeltisi; 8,401 g (0,1 mol) NaHCO₃ 950 mL saf suda çözüldü. 1 N sodyum hidroksit ile pH: 10.0'a kadar titre edildi ve son hacim saf suyla 1L' ye tamamlandı.

0,2 M NaHCO₃ Tamponu (pH 8,8); 8,401 g (0,1 mol) NaHCO₃ 450 mL distile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 8.8'e kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 500 mL' ye tamamlandı.

Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon; 1,79 g (0.01 mol) Na₂HPO₄.2H₂O, 800 mL distile suda çözüldü. 1N hidroklorik asit çözeltisi ile pH: 6.8'e getirildi ve çözeltinin son hacmi yine saf su kullanılarak 1 L getirildi.

Enzimin saflaştırılması sırasında kolonun yıkanması için uygulanan tampon; 1,77 g (0.0125 mol) Na₂HPO₄.2H₂O 400 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH: 6.8'e kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 500 mL' ye tamamlandı.

Afinite jeline tutulmuş LPO enziminin elüsyonu için kullanılan tampon; 1M NaCl / 25mM Na₂HPO₄.2H₂O pH: 6.3 (LPO enziminin elüe edilmesinde kullanıldı) 14,61 g (2,5.10⁻¹ mol) NaCl bir miktar saf suda çözüldü, üzerine 1,112 g (6,25.10⁻³ mol) Na₂HPO₄.2H₂O eklenerek son hacim distile suyla 250 mL' ye tamamlandı.

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan fosfat tampon; 17,8 g (0,1 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 950 mL distile suyla çözüldü. 1N HCl ile pH:6.0'a kadar titre edildi ve son hacim distile suyla 1L' ye tamamlandı.

Laktoperoksidaz enziminin substrat çözeltisi; 0,055 g ($1 \cdot 10^{-4}$ mol) ABTS 0,1 M 100 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH: 6.0 ile çözüldü.

Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan H_2O_2 çözeltisi; % 30'luk, 1,11 g / mL %30'luk olan H_2O_2 'den 32 μL alındı ve son hacim distile suyla 100 mL' ye getirildi.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde uygulanan numune ve tank tamponunun hazırlanmasında kullanılan miktarları;

1,25 mL	0,5 M TRİS-HCl(pH =6,8)
2,0 mL	% 10'luk SDS
1,0 mL	Gliserin
0,5 mL	2-merkaptoetanol
0,005 g	Fenol Boyası
0,25 mL	Saf Su
1,5 g	Tris-HCl
7,2 g	Glisin
0,5 g	SDS

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde uygulanan boya solüsyonu;

0,33 g Coomassie Brilliant Blue, 60 mL metil alkol içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin üzerine asetik asit ve 60 mL saf su katılarak ilgili renk reaktifi hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde uygulanan yıkama çözeltisi;

Araştırmamızda yıkama çözeltisi asetik asit, metanol ve saf su karışımından oluşmaktadır (Hacimce sırasıyla % 7,5- % 5- % 87,5).

Enzimin saflığının kontrolünde uygulanan elektroforezdeki ayırma ve yığma jellerinin hazırlanması ;

Bu amaçla kullanılan ayırma ve yığma jel karışımlarında kullanılan bileşiklerin konsantrasyonları ve hacimleri Tablo 2.1 de sunulmuştur.

Tablo 2.1: Elektroforezinde uygulanan jellerin konsantrasyonları ve miktarları

	% 10' luk Ayırma Jeli	% 3' lük Yığma Jeli
Akril amid/ Bis (%30)	2,775 mL	0,433 mL
Destile Su	3,35 mL	2,03 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,08 mL	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 µL	833 µL
% 10' luk SDS	0,1 µL	30 µL
TEMED	5 µL	4 µL
% 10' luk amonyum persülfat	150 µL	100 µL

2.2 Yöntemler

2.2.1 Laktoperoksidaz Enziminin Hazırlanması

200 mL taze sığır sütü +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün 200 mL süt, 8 mL toluen ile iyice karıştırıldı. Daha sonra blendırda toluenle iyice muamele edilen süt +4 °C’de 1 saat 14000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra altta kalan çöken kısım atıldı, üstte kalan sıvı kısım bir mezüre alınarak hacmi belirlendi. Ölçülen sıvı kısım % 60’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Ardından tekrar +4 °C’de 1 saat 14000 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısım atıldı, alttaki çöken kısım alındı. Daha sonra çöken kısım dengeleme tamponunda çözüldü.

2.2.1.1 Enzimin Tuz ile Çöktürülmesi

Bu amaçla, amonyum tuzu kullanılmıştır. Söz konusu bileşik 2 değerlikli ve çözünürlüğünün iyi olması amacıyla birçok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir. Araştırmamızda % 60’lık doygunlukta amonyum sülfat kullanılmıştır. Kullanılan miktar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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

V : Santrifüj işlemi sonrası süpernetan hacmi.

S₁ : Süpernetandaki mevcut tuz doygunluğu (1’in kesri).

S₂ : Arzu edilen tuz doygunluğu (1’in kesri).

2.2.2 Laktoperoksidaz Enziminin Aktivite Tayini

1 mL'lik spektrofotometre küvetine fosfat tamponundan 850 µL (0,1 M pH=6), ABTS çözeltisinden 67 µL (1mM), H₂O₂ çözeltisinden 33µL (3,2 Mm) konularak gerçekleştirildi. Son olarak 50 µL enzim çözeltisi ilave edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbands artışı okundu. 75 saniye süreyle her 15 saniyede bir olmak üzere değerler kaydedildi. 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 tanımlanır. Bu yöntem, H₂O₂ tarafından 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbands artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır [45].

2.2.3 Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin 280 nm de UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanır [46]. Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbandsları ölçüldü.

2.2.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları, Bradford yöntemi ile belirlenir. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, proteinler üzerindeki pozitif yüke bağlanır ve negatif yüke sahiptir. Boya çözeltisi ile kompleks oluşturma ve bu bileşiğin 595 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır [47]. Bu amaçla farklı protein tayin yöntemleri vardır. Ancak uyguladığımız yöntemin, süresinin kısa olması,

girişimde bulunabilecek faktörlerin az olması oluşan kompleksin stabil olması gibi özellikleri oldukça önemlidir. Bu yöntemin hassasiyeti 1 - 100 µg şeklinde değişmektedir.

Bu amaçla standart olarak, sığır serum albümin kullanılmıştır. Protein çözeltisi farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde 10 tüpe alındı. Herbir tüp 100 Mm pH:8 olan TRİS tamponu ile hacimleri 0,1 mL tamamlandı. Tüm tüplere 5 mL boya çözeltisi ilave edildi. Tüpler hızlı bir şekilde karıştırıldı (vorteks ile). 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm de absorbansları köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerine karşı mikrogram protein miktarları grafik halinde verildi.

Aynı işlemler enzim örnekleri içinde tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerinden, örnekteki protein miktarları standart grafik yardımıyla belirlendi.

2.2.5 Afinite Jelinin Hazırlanması

Sepharose 4-B-etilendiamin- 4-izotiyosiyonat benzen sülfonamid jeli kullanılmıştır [48].

2.2.6 SDS-PAGE Yöntemi ile LPO Enzimin Saflığının Kontrolü

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin saflığının kontrolü, Laemelli tarafından önerilen elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan elektroforez ortamı %3 ve %10 akrilamid olacak şekilde hazırlandı (sırasıyla yığma jeli ve ayırma jeli) [49].

Elektroforez işlemi için ilk olarak kullanılan cam plakalar iyice temizlendi. Daha sonra cam plakalar arasında kalınlık oluşturucu olacak şekilde sabitlendi. Tablo 2.1 de gösterildiği şekilde reaktifler kullanılarak ayırma jeli enjektör yardımıyla plakalar arasına döküldü. Jelin üzerine bütil alkol ilave edilerek jel yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Polimerleşme tamamlandıktan sonra ilgili tabakada belirtildiği üzere yığma jeli reaktifleri plakalar arasına ilave edildi. Son olarak elektroforez tarağı yerleştirilerek polimerleşmenin tamamlanması beklendi. Yığma

jelinin polimerleştigiinden emin olunduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Elde edilen kuyucuklar saf su ve yürütme tamponu ile iyice yıkandı. Ayırma ve yığma jelinin bulunduğu kaset tanka yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısmına uygun miktarlarda yürütme çözeltisi ilave edildi.

Afinite tekniği ile elde edilen elüantlardan yüksek proteine karşılık yüksek aktivite gösteren tüpler toplam hacim 75 µL olacak şekilde 2:1 oranında numune tamponuyla karıştırılır. Jele yüklenecek numuneler cam plakalara alındıktan sonra sıcak su banyosunda bekletilir ve numuneler soğutularak kuyucuklara yüklenir. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 180 V ayarlanır. Elektroforez işlemine ayırma jelinin altına 1 cm kalacak şekilde devam edildi. Daha sonra elektrik akımı durdurularak işlem sonlandırıldı. İlgili aparatlar sökülerek cam plakalar arasındaki jel çıkarıldı. Proteinlerin ayrıldığı jel (ayırma jeli) bantların tespiti için boyama çözeltisine alındı ve iki saat bu çözelti içerisinde çalkalandı. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için renk açma çözeltisi ile spesifik olmayan boyalar uzaklaştırıldı. Çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarılır.

2.2.7 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Kinetik sabitlerin (K_M ve V_{max}) saptanması amacı ile optimum şartlarda Laktoperoksidaz enzimi, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) substratının yirmi farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapılır. Elde edilen ölçümlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Kinetik sabitler elde edilen doğru denklemlerinden bulundu [50].

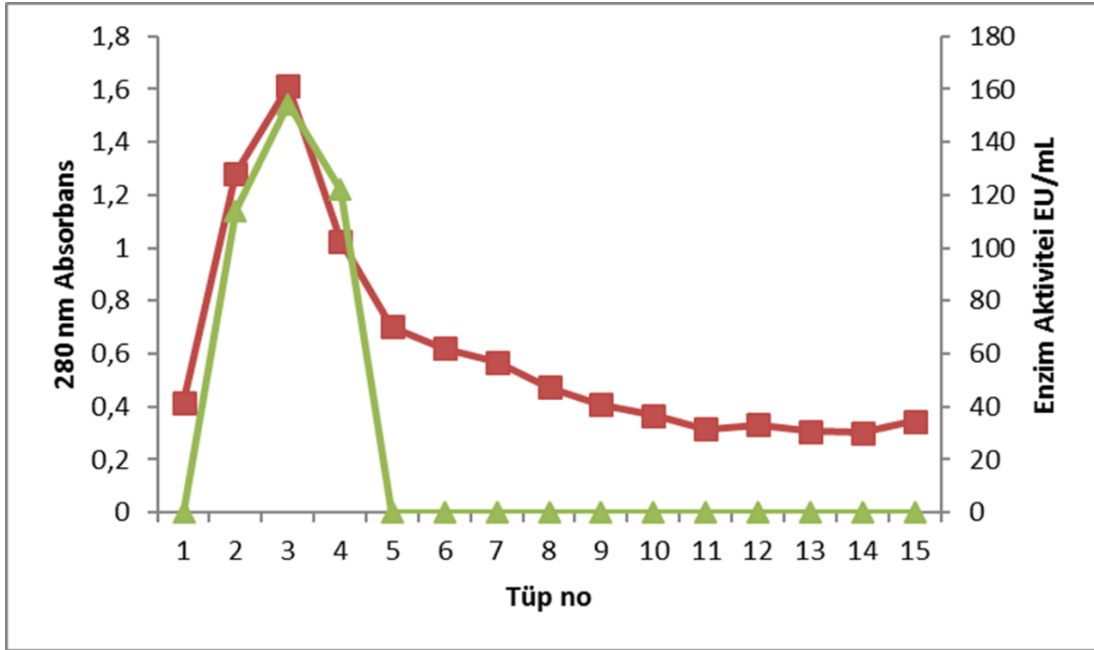
2.2.8 Bazı Kimyasal Maddelerin IC₅₀ Değerlerinin Saptanması

Araştırmamızda kullanılan bileşiklerden inhibisyona sebep olan maddelerin IC₅₀ değerleri bulundu. Bu amaçla substrat olarak ABTS kullanıldı. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamda enzim aktiviteleri hesaplanarak, inhibitör konsantrasyonuna karşı yüzde aktiviteler grafik haline getirildi. IC₅₀ değerleri bu grafiklerin denklemlerinden hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1 Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

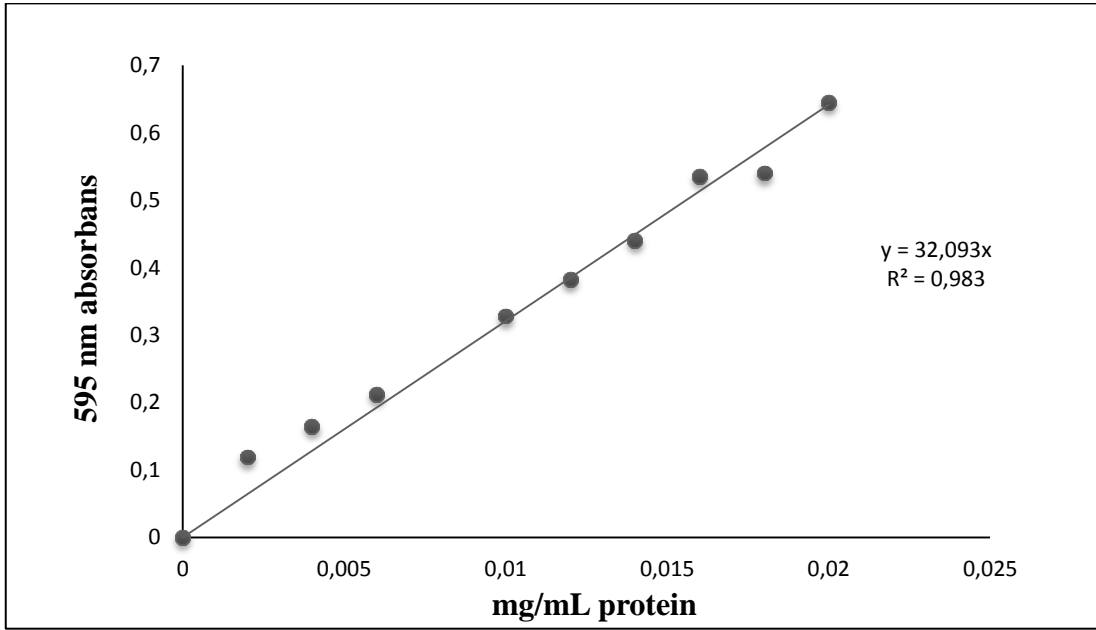
Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeleğin, dengeleme tamponunda çözünmesi ile elde edilen 50 mL homojenat 10 mM fosfat (pH: 6,8) tamponu ile dengelenen kolona yavaş yavaş ilave edildi. Numunenin ilavesinden sonra kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH: 6,8) tamponu ile yıkandı. Böylelikle enzimin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,8) elüsyon tamponu eklenerek laktoperoksidaz enzim elüe edildi ve 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.

3.2 Proteinlerin Kantitatif Analizi İçin Kullanılan Standart Grafik

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin miktarını belirlemek amacıyla Coomassie Blue metodu ile protein tayini yapıldı. Daha önceden enzim ünitesi hesaplanmış elüantların spesifik aktiviteleri belirlendi. Bu değerler kullanılarak hesaplanan saflaştırma dereceleri Tablo 3.1’de verildi. Protein tayini için standart grafik Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



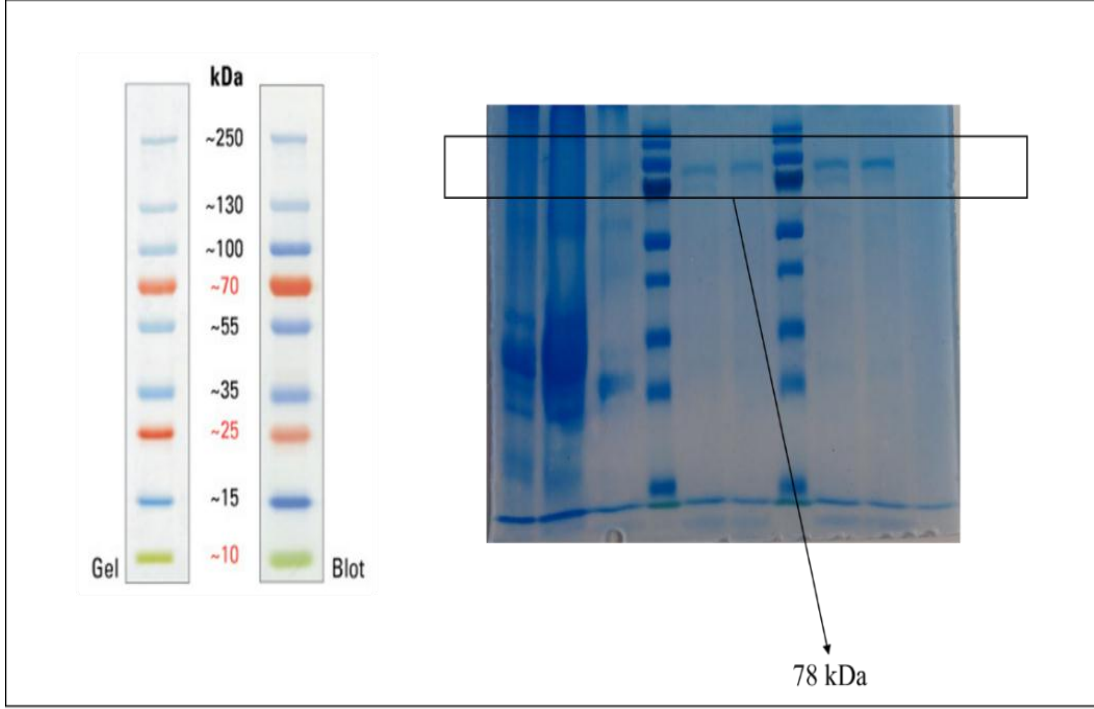
Şekil 3.2: Coomassie Blue metodu ile enzim miktarlarının belirlenmesi için kullanılan grafik.

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	200	1528	315600	125	25000	12.62	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	10	1331	13310	58	580	22,94	4,22	1.82
Afinite Kromotografisi	4	584	2336	0.002	0.008	212000	0.74	9241.44

3.3 Laktoperoksidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

Afinite tekniği ile saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin saflık derecesini belirlemek gayesiyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonucu elde edilen bantlar ve kullandığımız standartlar Şekil 3.3 gösterilmiştir..



Şekil 3.3: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.

3.4 Laktoperoksidaz Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} sabitlerinin saptanması amacıyla; 5 farklı konsantrasyonda ABTS substratı kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Spektrofotometrede 412 nm de ölçülen absorbans değerleri izlenerek aktiviteler belirlendi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Laktoperoksidaz enziminin kinetik değerlerinden K_M , 1.44 mM; V_{max} , 1000 U/mL dakika olarak bu grafiklerden belirlendi.

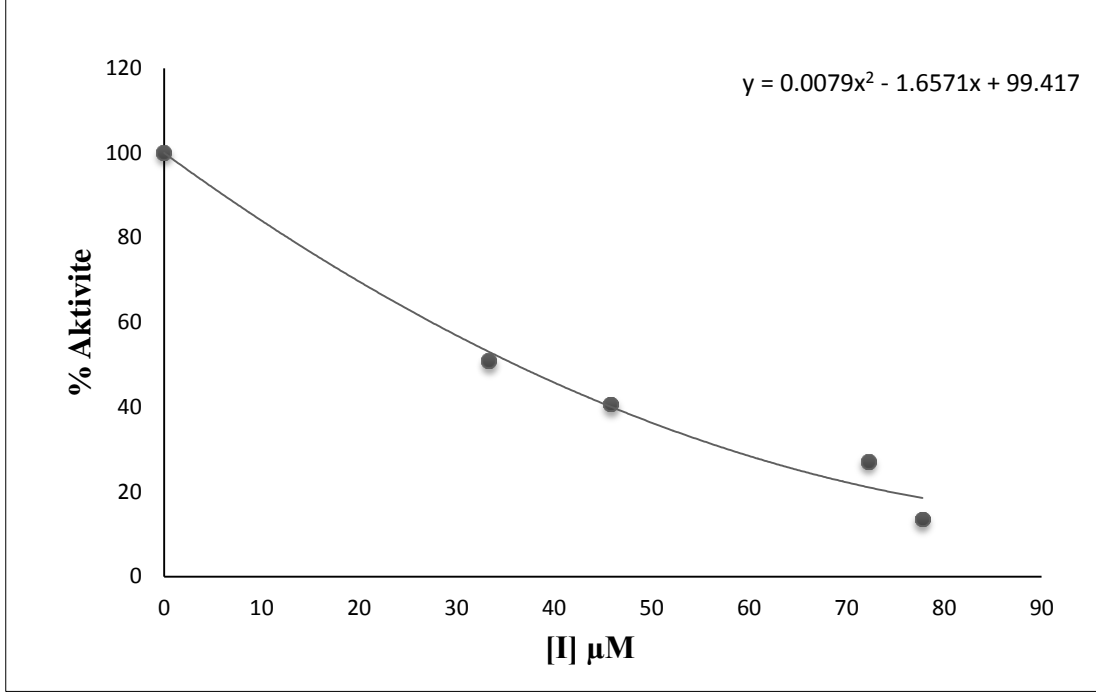
3.5 Kullanılan Bazı Kimyasal Maddelerin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız ligand, bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerine etkilerini belirlemek için, optimum şartlarda ABTS substratının sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 67 μ L ABTS alındı. Laktoperoksidaz enzimi üzerine etkisi incelenen bileşiklerin farklı

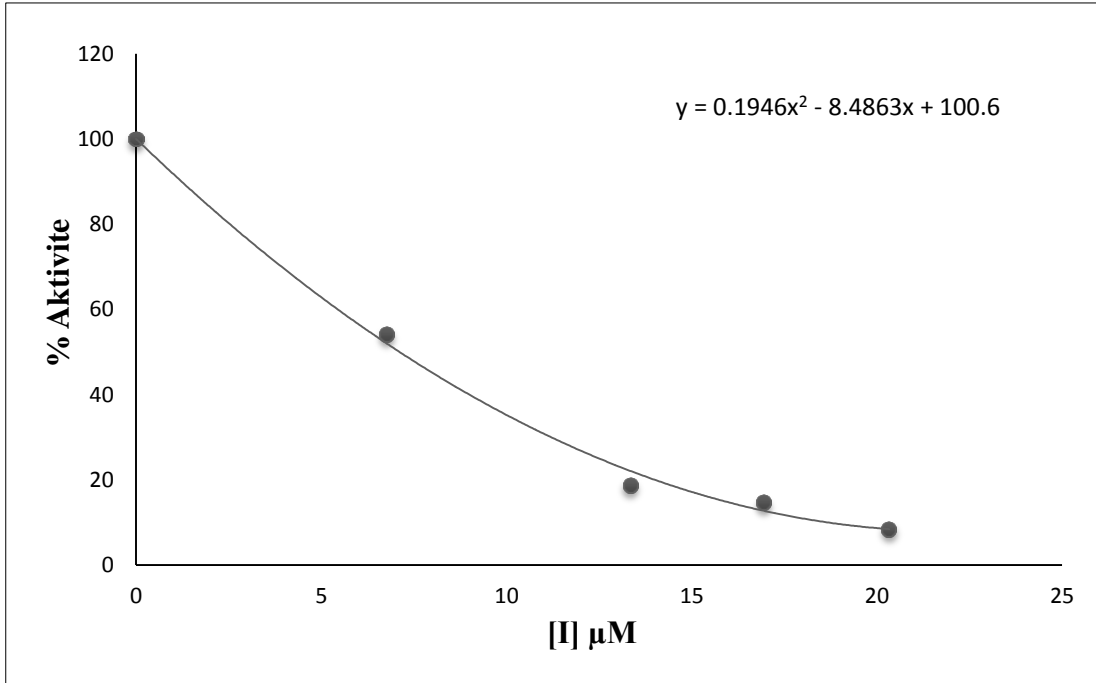
konsantrasyonlarının bulunduğu reaksiyon karışımalarında enzim aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca inhibitörsüz ortamda da ilgili enzimin aktivitesi bulundu. Ve bu değer kontrol olarak kullanıldı. % aktiviteye karşı inhibitör konsantrasyonları grafik haline getirilerek IC₅₀ değerleri saptandı.

Tablo 3.2: Enzim aktivite ölçümü için kullanılan miktarlar.

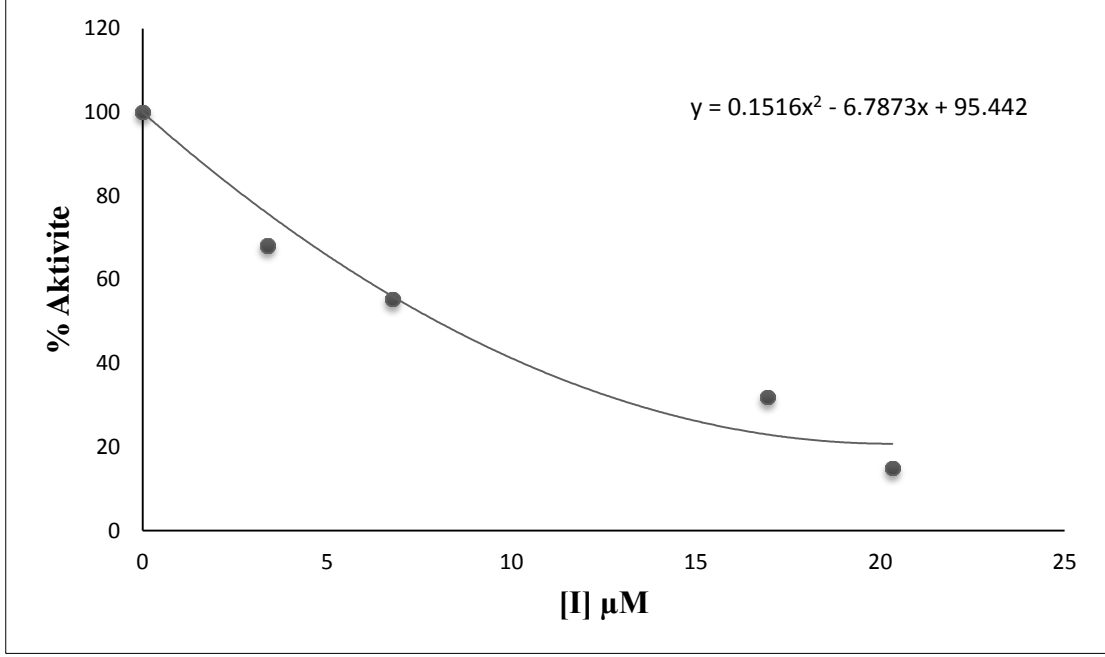
	Tampon Çözelti	Substrat (ABTS)	H₂O₂ Çözeltisi	Enzim (Laktoperoksidaz)
Kör	850 µL + 50µL	67µL	33µL	-
Numune	850 µL	67µL	33µL	50µL



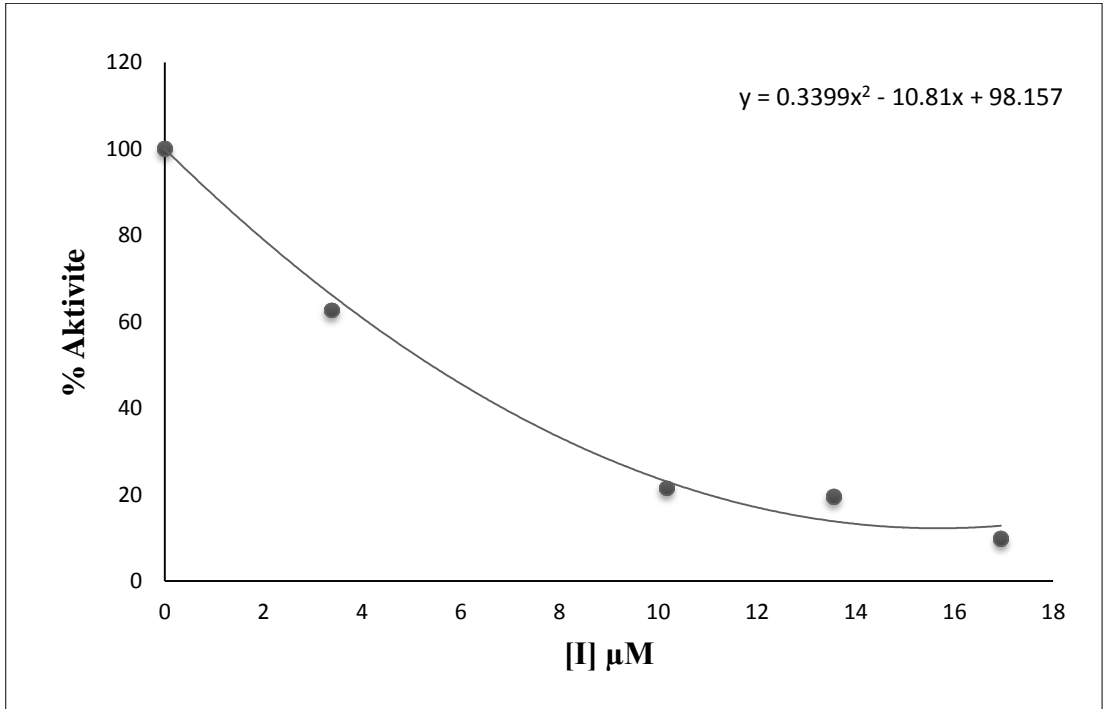
Şekil 3.4: 4-nitrofenil asetik asit için % aktivite-[I] grafiği.



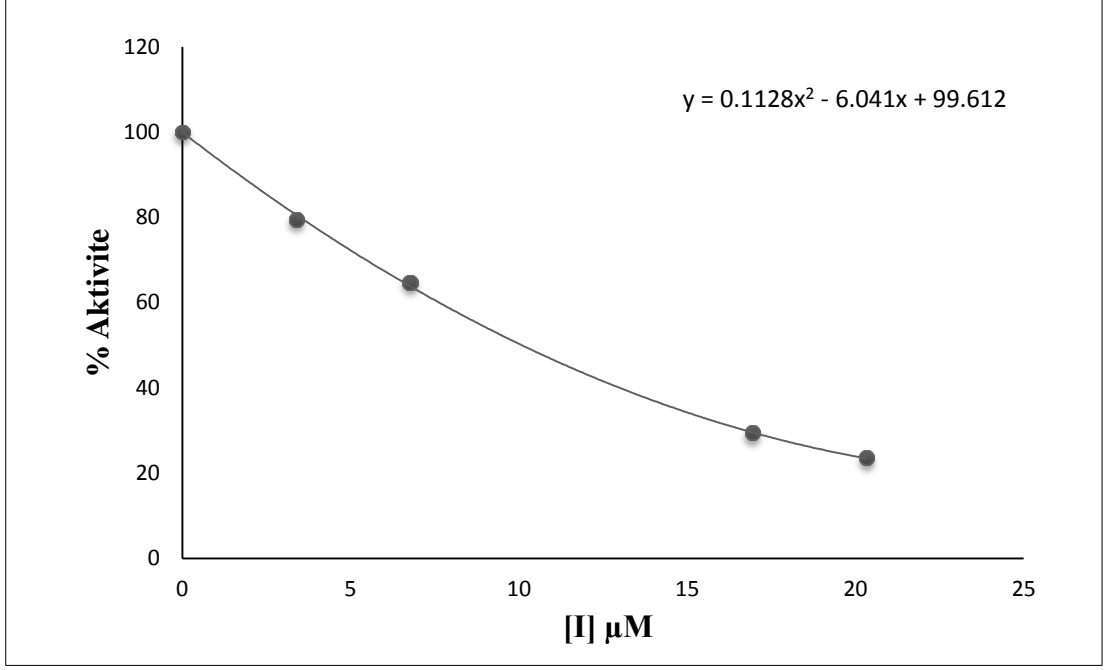
Şekil 3.5: Pirokatekol için % aktivite-[I] grafiği.



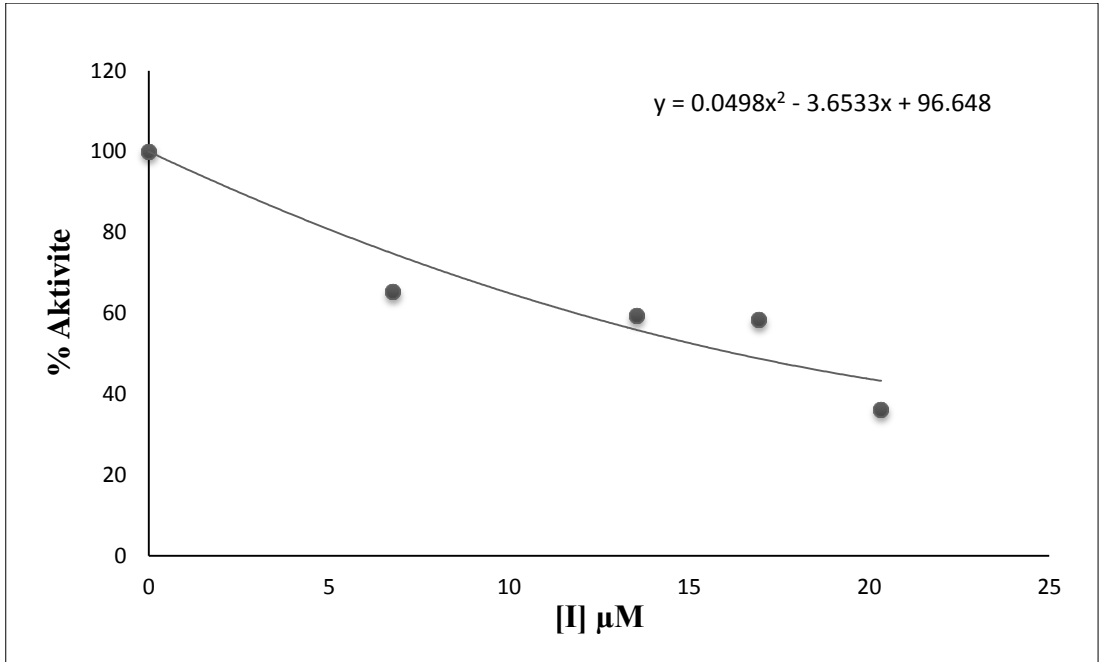
Şekil 3.6: Naftilamin için % aktivite-[I] grafiği.



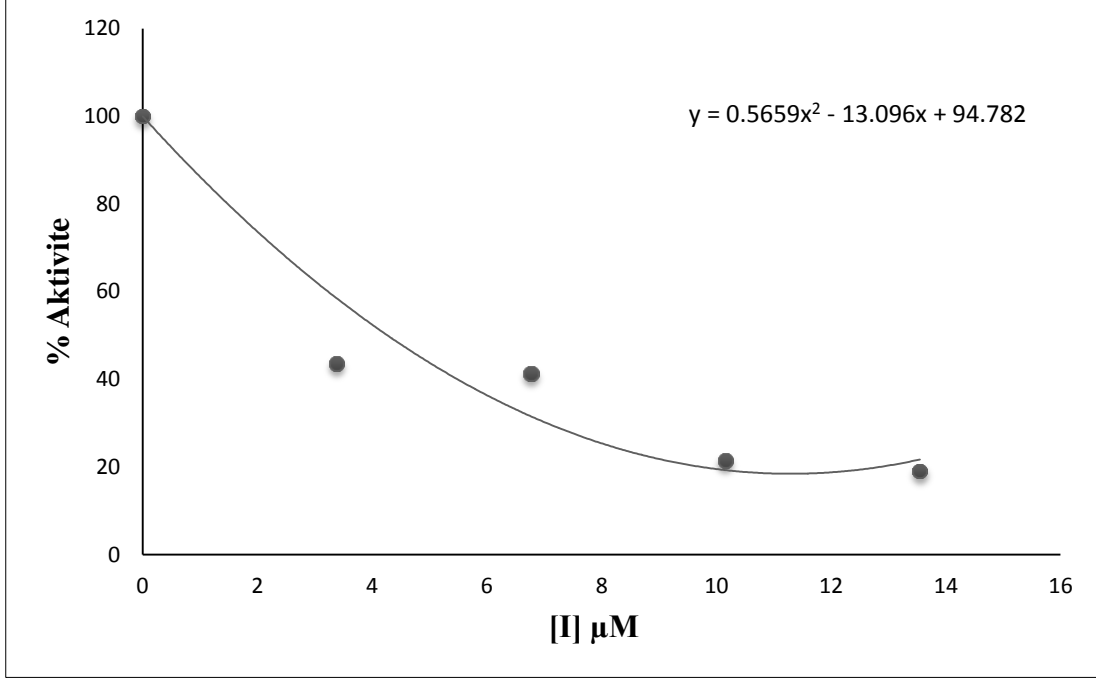
Şekil 3.7: Benzcatekin için % aktivite-[I] grafiği.



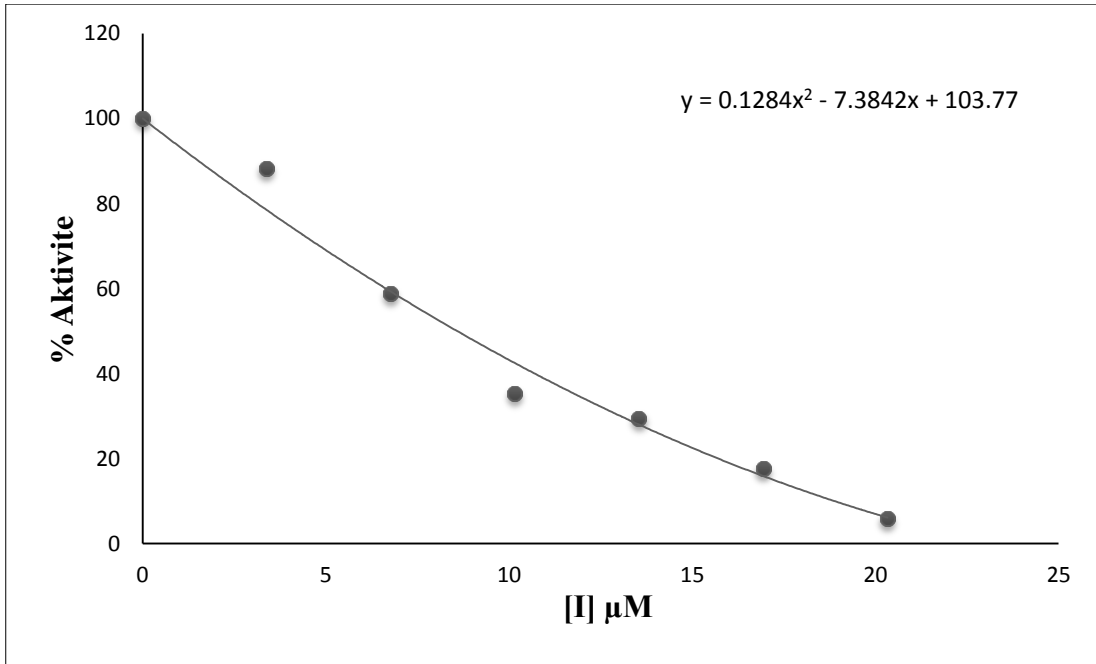
Şekil 3.8: 4-metilkatekol için % aktivite-[I] grafiği.



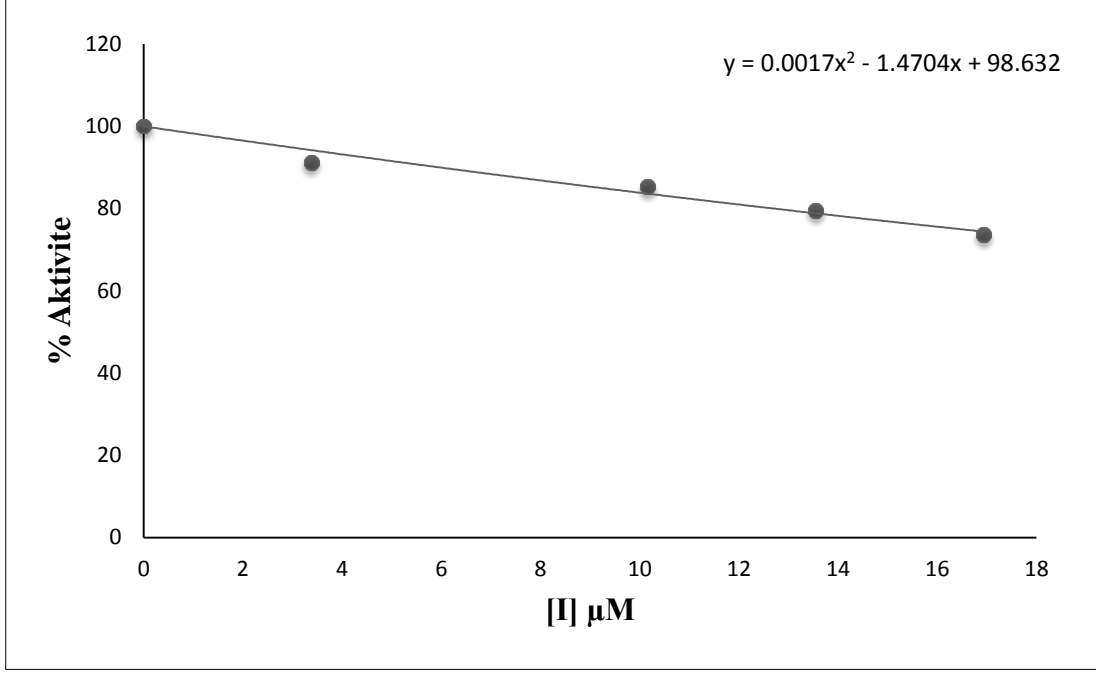
Şekil 3.9: Dietilenamin için % aktivite-[I] grafiği.



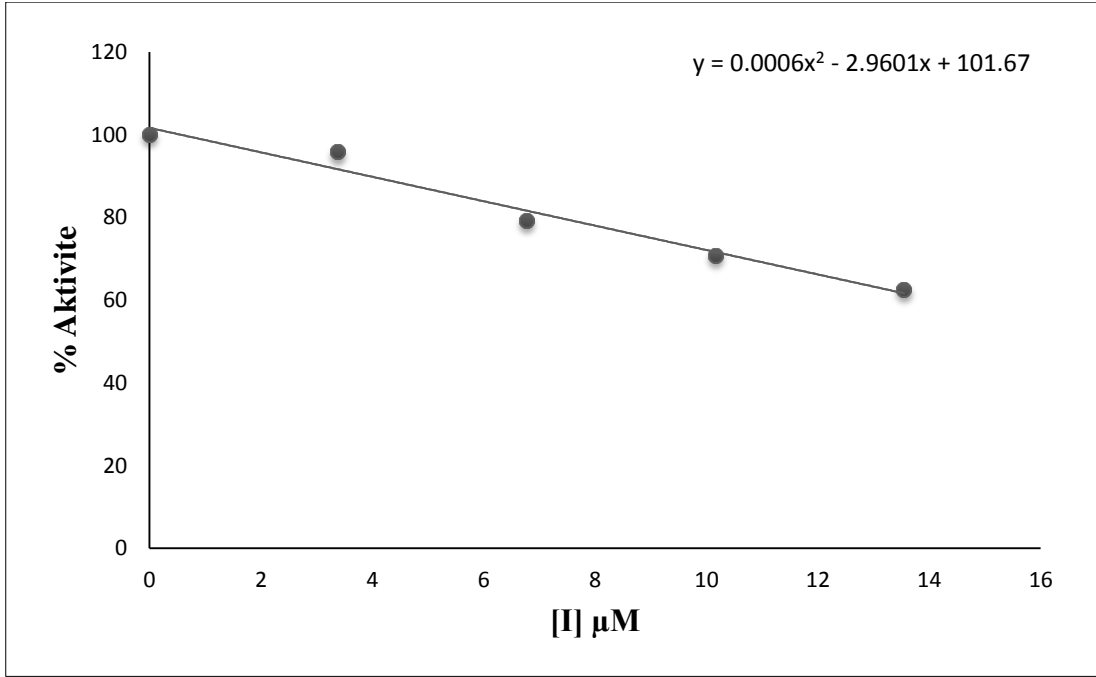
Şekil 3.10: Giberallik asit için % aktivite-[I] grafiği.



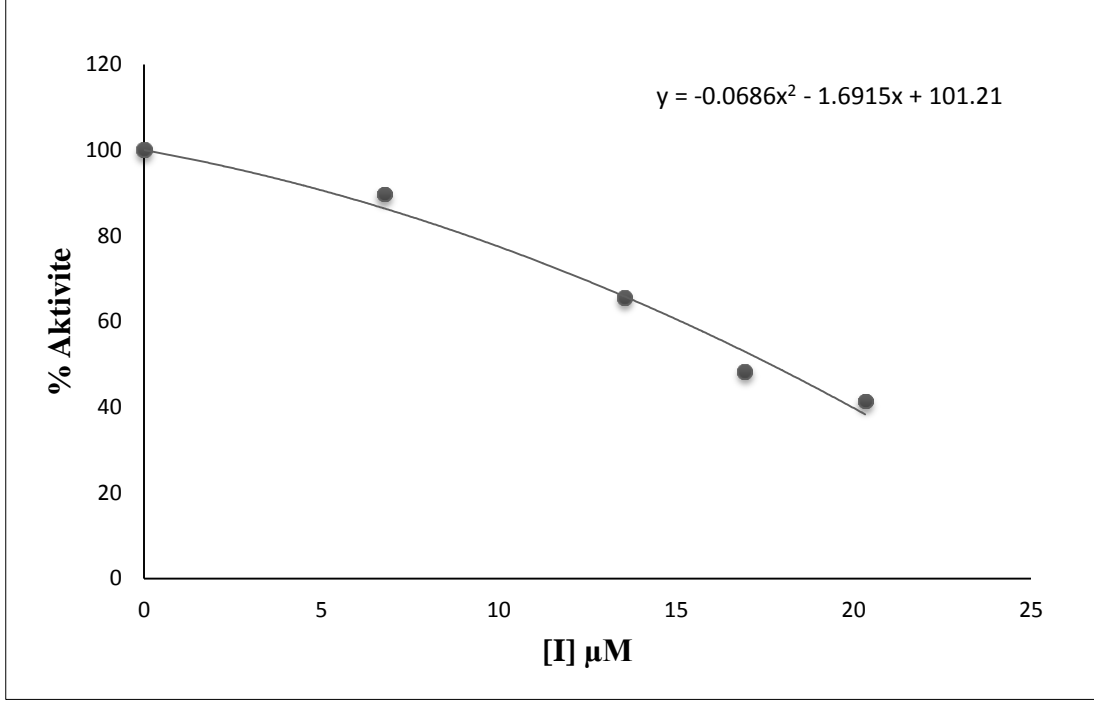
Şekil 3.11: Nikotin için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.12: Kinetin için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.13: Benzamidin için % aktivite-[I] grafiği.

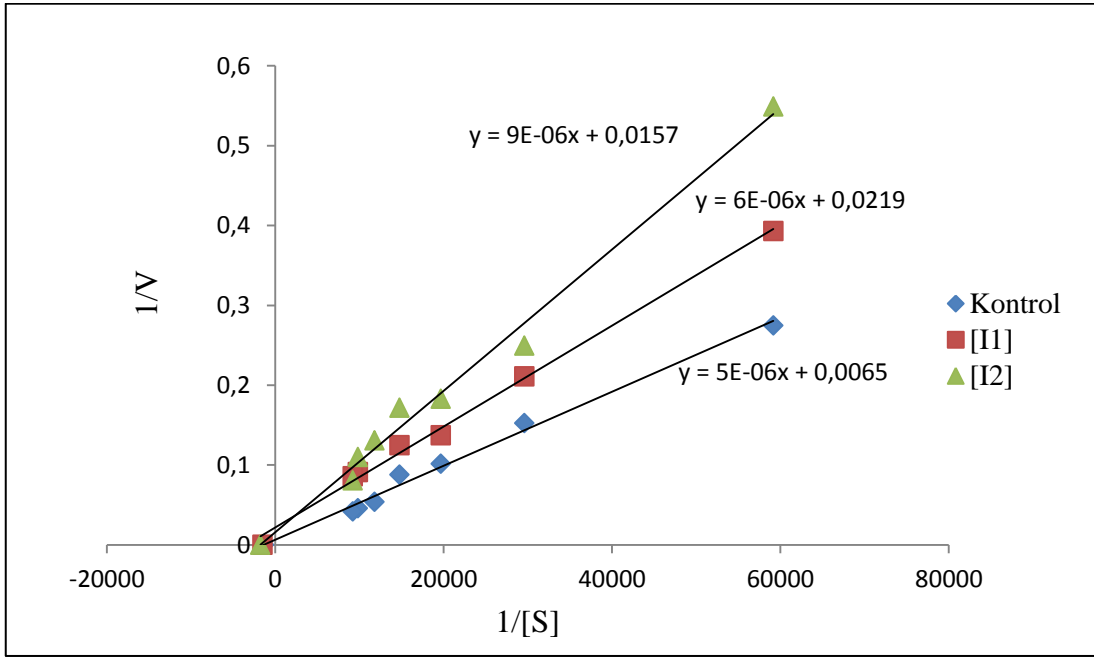


Şekil 3.14: Kumarik asit için % aktivite-[I] grafiği.

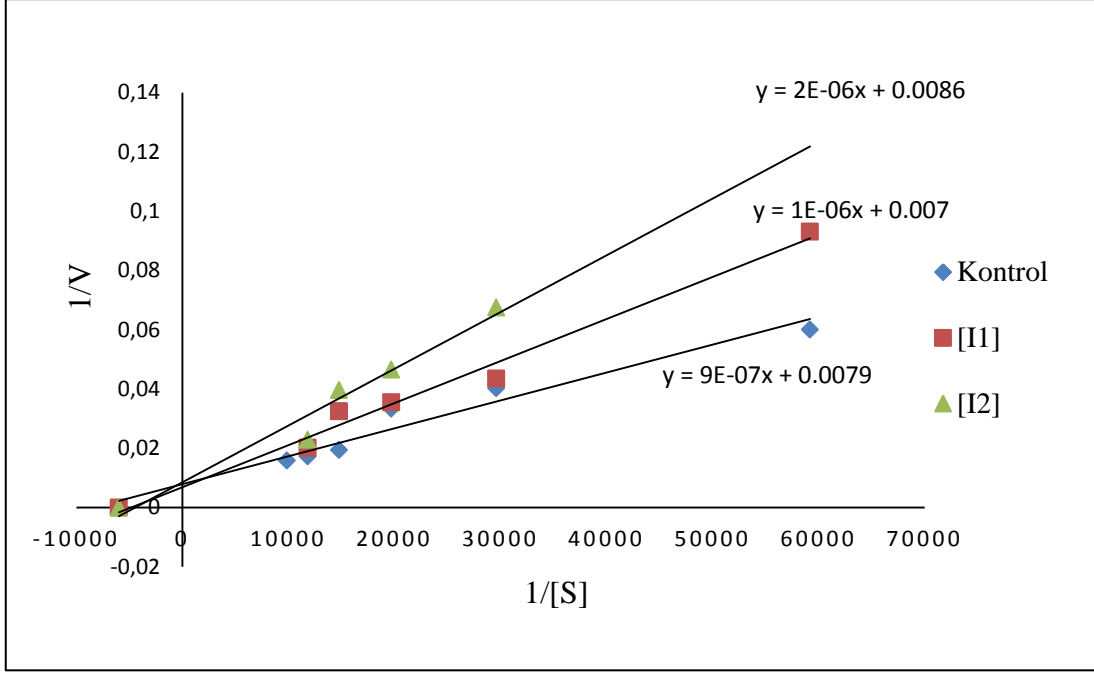
Tablo 3.3: IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan miktarlar.

İnhibitör	Tampon	Substrat (ABTS)	H ₂ O ₂	Enzim
Kör	900μL	67μL	33μL	-
0 μL	850μL	67μL	33μL	50μL
2 μL	848μL	67μL	33μL	50μL
4 μL	846μL	67μL	33μL	50μL
6 μL	844μL	67μL	33μL	50μL
8 μL	842μL	67μL	33μL	50μL
10 μL	840μL	67μL	33μL	50μL
12 μL	838μL	67μL	33μL	50μL
15 μL	835μL	67μL	33μL	50μL

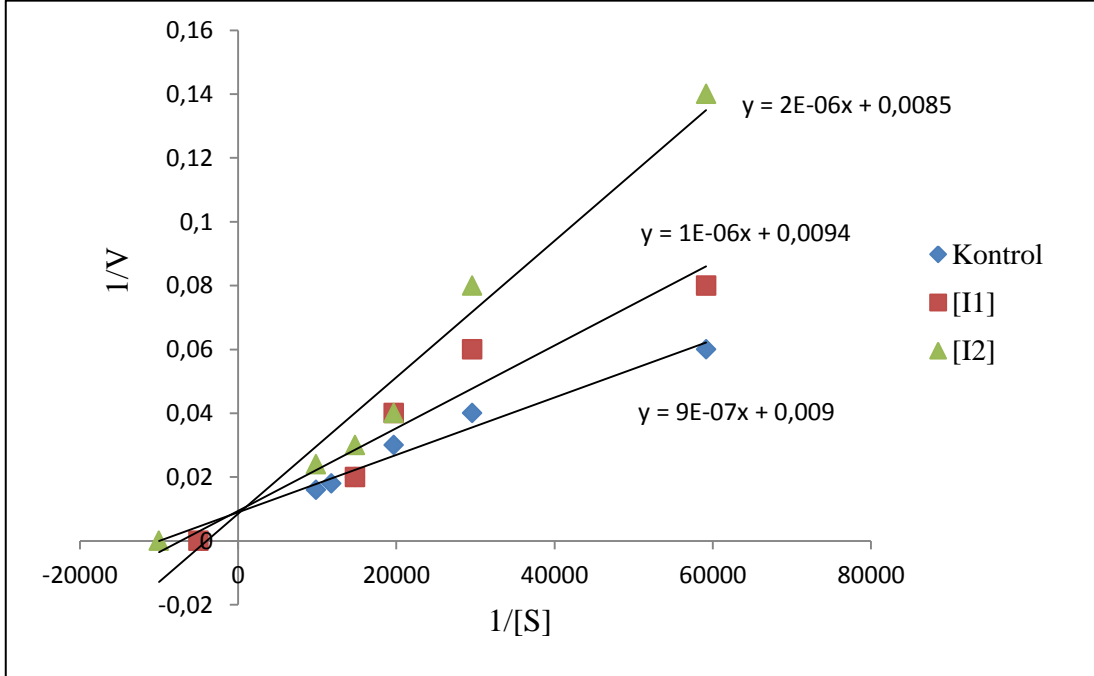
Daha sonra çalışmada kullanılan ligand için 2 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, ABTS substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak, Lineweaver–Burk grafikleri elde edildi. Bu grafikler kullanılarak K_i değeri ve inhibisyon türleri belirlendi.



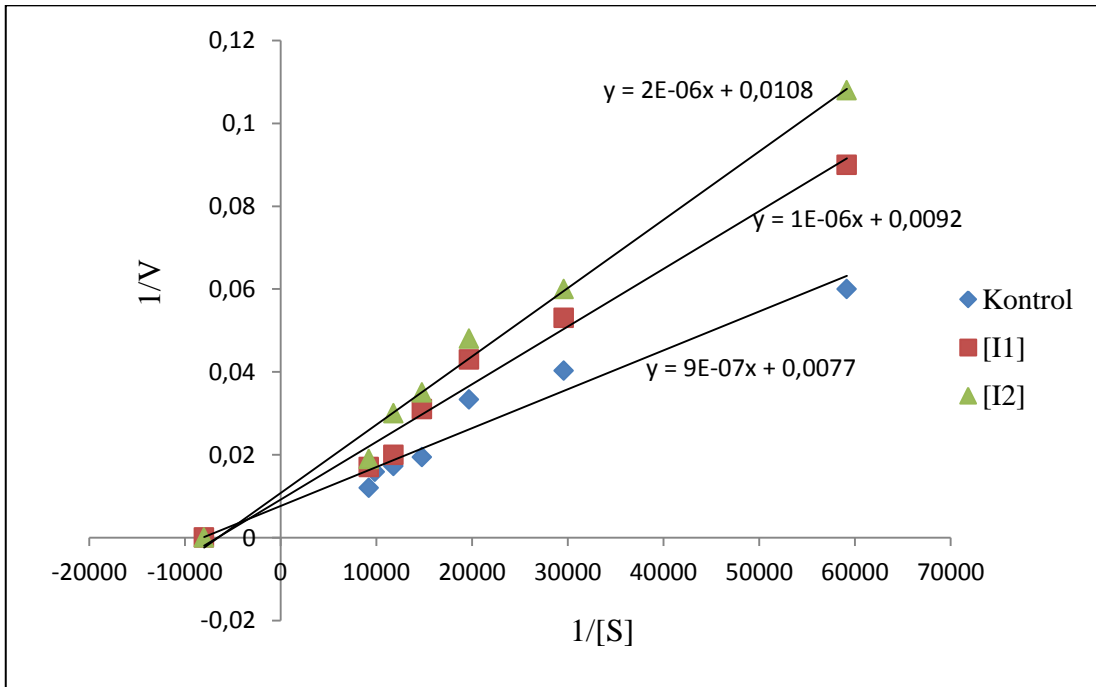
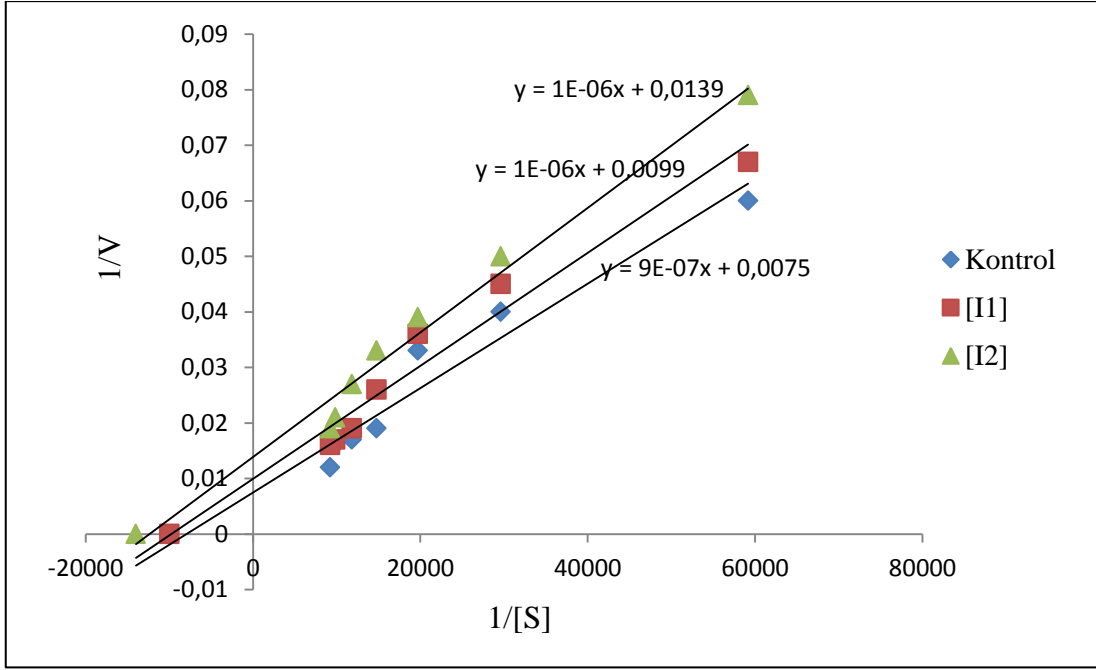
Şekil 3.15: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve nikotin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.

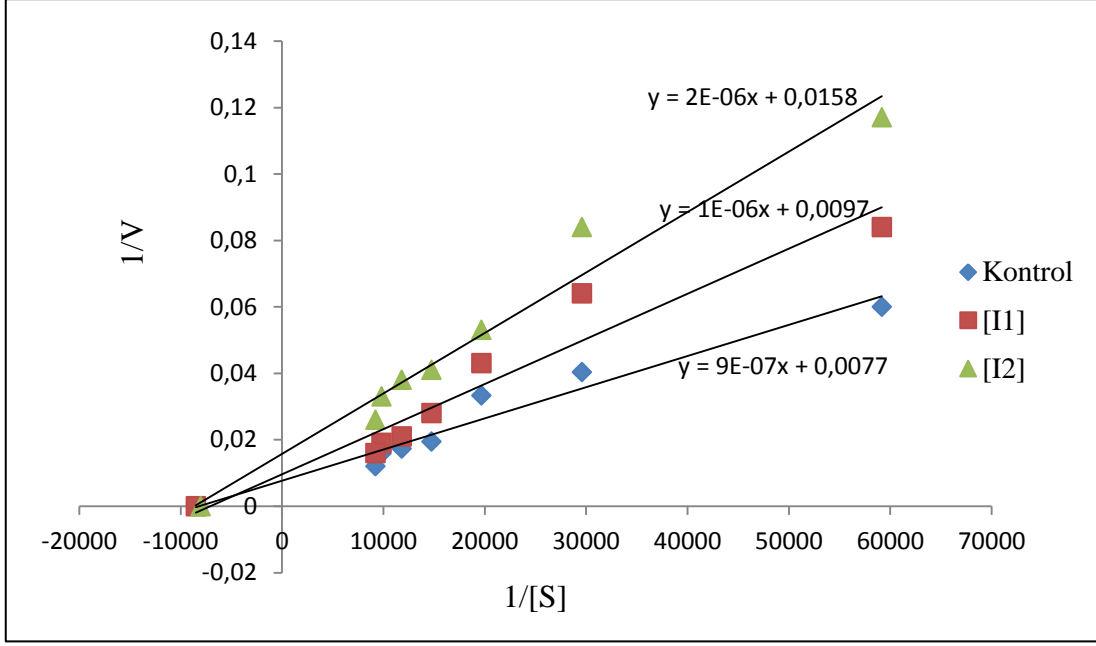


Şekil 3.16: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve dietilenamin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.

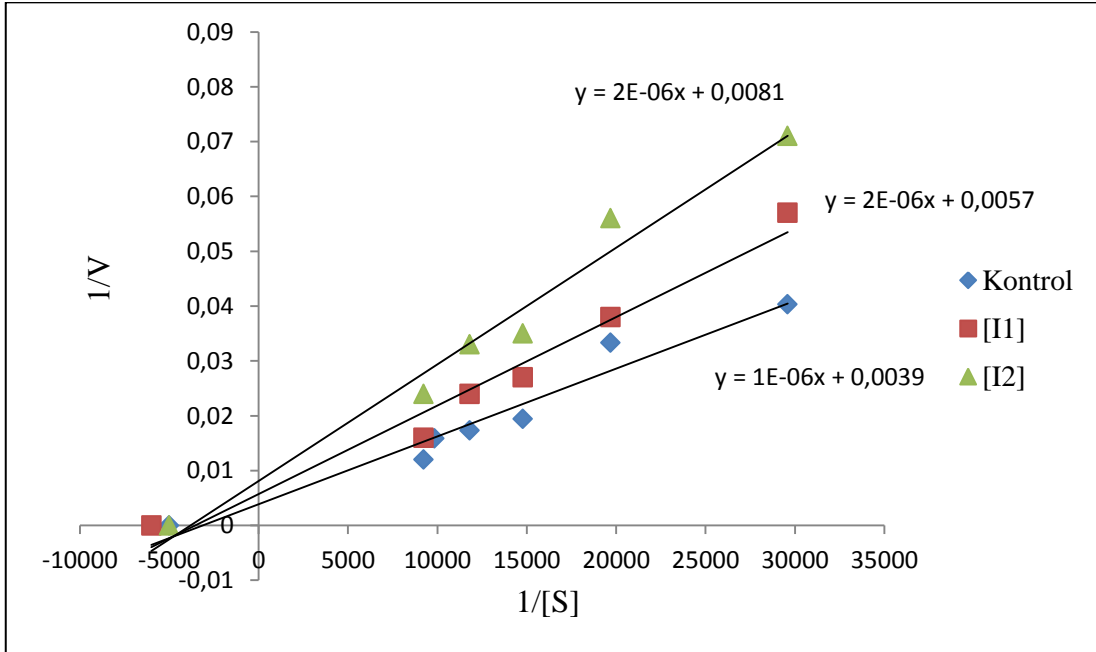


Şekil 3.17: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 4-metil katekol ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.

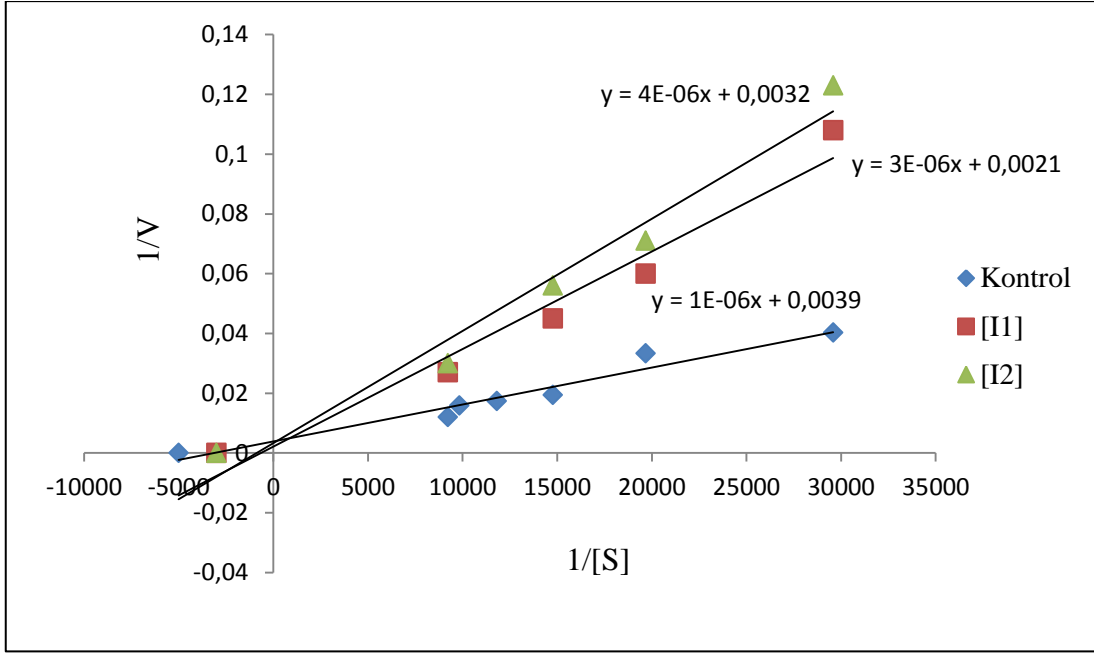




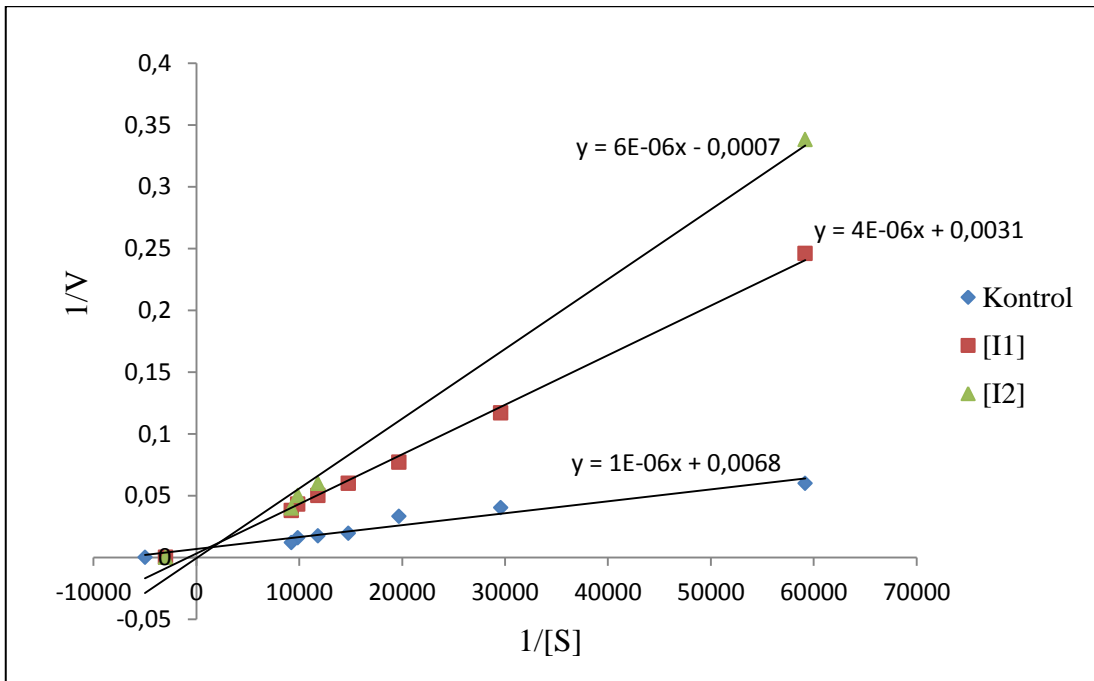
Şekil 3.20: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve naftilamin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



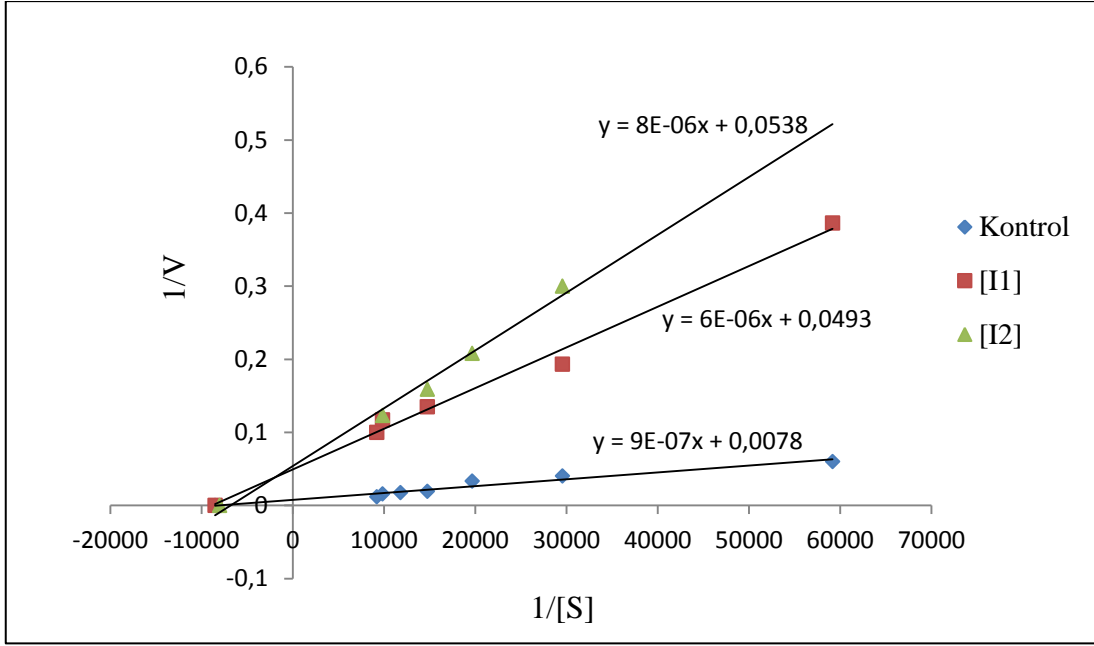
Şekil 3.21: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve benzokatekin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



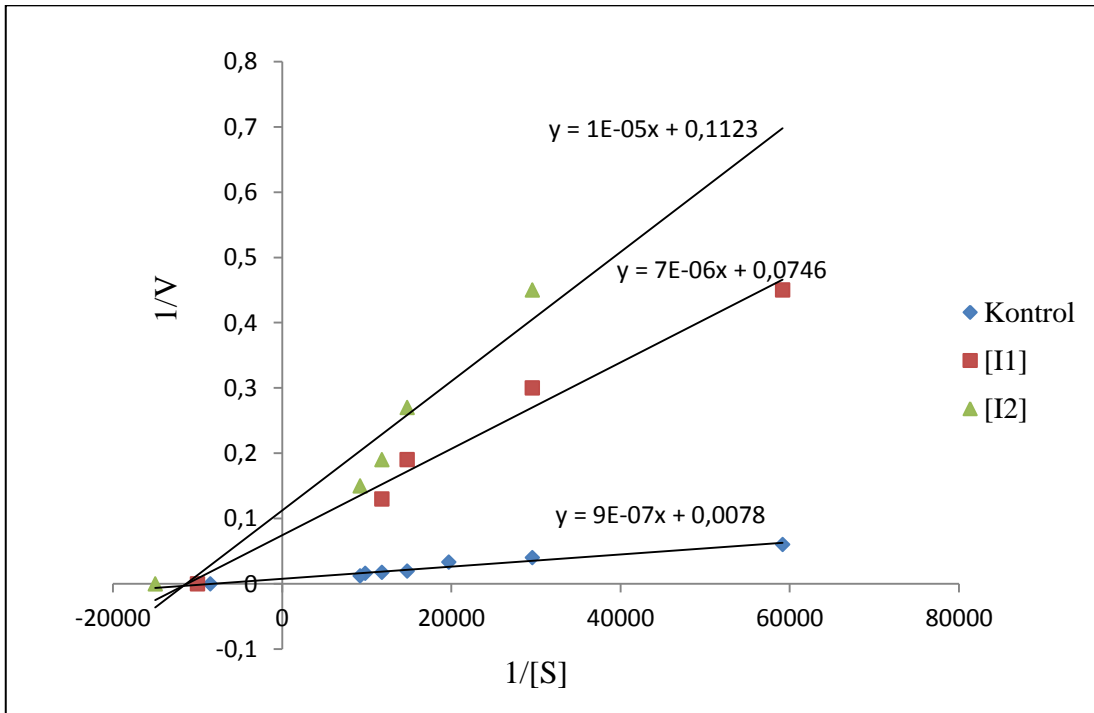
Şekil 3.22: Safaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve giberallik asit ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



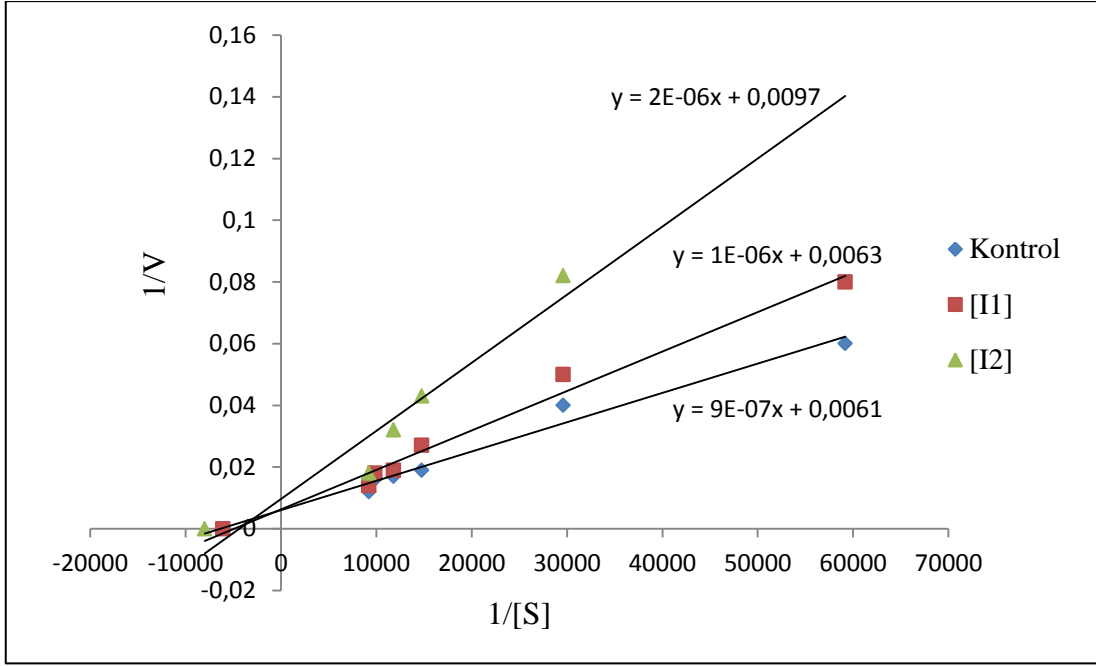
Şekil 3.23: Safaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve 4-nitrofenil asetik asit ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.



Şekil 3.24: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve benzamidin ile elde edilen 1/[S]-1/V grafiği.



Şekil 3.25: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve kumarik asit ile elde edilen 1/[S]-1/V grafiği.



Şekil 3.26: Saflaştırılan LPO enzimi için ABTS substratı ve kinetin ile elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ grafiği.

Tablo 3.4: Sütteki Laktoperoksidaz enzimi için ABTS substratı kullanılarak, kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Aktivite	H₂O₂	Enzim	Substrat	İnhibitör	Kuvetteki
Fosfat tamponu	Hacmi	Çözeltisinin	ABST çözeltisinin Hacmi	Çözeltisinin Hacmi	Toplam Hacim
(µL)	(µL)	Hacmi (µL)	(µL)	(µL)	(µL)
257	10	25	5	3	300
252			10	3	
247			15	3	
242			20	3	
237			25	3	
232			30	3	
227			35	3	

Tablo 3.5: Sütteki Laktoperoksidaz enzimi için ABTS substratı kullanılarak, kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Aktivite Fosfat tamponu (µL)	H₂O₂ Hacmi (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat ABST çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Kuvetteki Toplam Hacim (µL)
255	10	25	5	5	300
250			10	5	
245			15	5	
240			20	5	
235			25	5	
230			30	5	
225			35	5	

Tablo 3.6: Çalışmamızda kullanılan kimyasalların IC₅₀, K_i değerleri ile bu kimyasallara ait inhibisyon türleri.

	IC₅₀ (μM)	K_i (μM)	İnhibisyon Tipi
<i>Benzamidin</i>	25	14,46x10 ⁻⁶	<i>Lineer karışık</i>
<i>Kinetin</i>	34,28	20,34x10 ⁻⁴	<i>Lineer karışık</i>
<i>orto-kumarik asit</i>	17,62	403	<i>Nonkompetitif</i>
<i>Nikotin</i>	8,58	4,22x10 ⁻⁴	<i>Nonkompetitif</i>
<i>4-nitrofenil asetik asit</i>	44,20	8,73x10 ⁻⁶	<i>Kompetitif</i>
<i>Pirokatekol</i>	7,28	34,2x10 ⁻⁶	<i>Nonkompetitif</i>
<i>İndol asetik asit</i>	15,83	20,84x10 ⁻⁶	<i>Unkompetitif</i>
<i>Naftilamin</i>	8,26	810,92x10 ⁻⁶	<i>Nonkompetitif</i>
<i>Benzkatekin</i>	5,36	6,72x10 ⁻⁶	<i>Nonkompetitif</i>
<i>4-metil katekol</i>	10,03	1,04x10 ⁻⁴	<i>Kompetitif</i>

<i>Dietilen amin</i>	16,47	$17,53 \times 10^{-5}$	Lineer karışık
<i>Giberallik asit</i>	5,98	$7,41 \times 10^{-7}$	<i>Kompetitif</i>
<i>Allopirinol</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>3,4-dimetoksifenil asetik asit</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>Guanidin</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>Adenin</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>2-amino 1H-purin 6(7H)-one</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>Klorojenik asit</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>4-aminofenil laktik asit</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		
<i>Lineoik asit</i>	<i>Belirgin bir etki gözlenmemiştir.</i>		

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bilim insanları LPO enzimi üzerine farklı kimyasalların inhibisyonunu araştırmış ve saflaştırma için birçok kromatografik yöntem denemiştir. Çalışmamızda LPO saflaştırılması için afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Afinite kromatografisi proteinlerin ayrılması için kullanılır ve spesifik ligand esasına dayanır [51]. Bradford metodu ile kantitatif protein tayini yapılmış ve hemolizattaki protein miktarları bulunmuştur. Bu metod proteine Coomassie Brilliant Blue G-250 bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Protein ile boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşir. Bu kompleks çözeltilerde uzun süre kalır. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [47]. LPO enziminin aktivitesi, Bardsley ve Shindler yönteminin belirlenen prosedürüne göre yapıldı. Bu yöntem ABTS kromojenik substratın H₂O₂ tarafından yükseltgenmesine aynı zamanda oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm’de izlenmesi esasına dayanır. LPO enziminin aktivitesi belirlenirken bu yöntemin belirlenmesinin sebebi; enzimin literatürde en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının verilmiş olmasıdır ($\epsilon_{412}=32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi 20°C’de 1 dakikada 1 µmol ABTS’nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. 20 °C ve optimum pH da ABTS substratı için Km ve Vmax değerleri en az yedi farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. 1/V ve 1/[S] değerleri kullanılarak Lineweaver – Burk grafiği çizildi [51].

LPO enziminin saflaştırılması ile ilgili literatürde birçok yöntem kullanılmaktadır. Atasever ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-Sülfanilamid jel ile saflaştırmayı gerçekleştirerek kolonun uzun süre kullanılabilirdiğini ve daha ekonomik olduğunu tespit etmiştir. Sülfanilamid için IC₅₀ değeri $0,848 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve K_i değeri $3,57 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak bulmuşlardır. Saflaştırdıkları LPO enzimi için kinetik sabitleri K_M ve V_{max} değerlerini sırası ile 0,14 mM ve 0,55 µmol/min mL olarak bulunmuşlardır [12].

Usanmaz’ın çalışmasında; 2-kloro-4-sülfamoyilanilin, 5-amino-1-naftalin sülfonilamid, 4-amino-3-metil benzensülfonilamid ve 3-amino-4-kloro

benzensülfonilamid LPO enzimini inhibe ettiğini gözlemiş ve bu moleküllerin herbiri için sığır sütü LPO enziminin saflaştırılması için ligand olarak afinite jellerini hazırlamıştır. Aynı zamanda herbir molekül için kinetik parametreleri IC_{50} , K_i ve inhibisyon tiplerini belirleyerek LPO enzimi için yeni inhibitörler tespit etmiştir. Hazırladığı jellerden sığır sütü LPO enzimi ilk kez tek aşamada saflaştırılmış ve en iyi sonuç 2-kloro-4-sülfamoyilanilin molekülü ile elde edilmiştir. Aynı zamanda koyun LPO enzimi içinde ilk defa tek basamakta saflaştırılma gerçekleştirilmiştir [1].

Köksal'ın [ref] çalışmaları sonucunda LPO enzimi üzerine 11 adet sülfanilamid türevi olan moleküllerin kinetik çalışmaları yapılmıştır. Çalıştığı maddelerin LPO enzime etkili inhibitör olduğu ve ligand olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca sadece sığır sütü LPO enzimi değil; manda, koyun ve keçi sütleride 11 molekülden hazırlanan afinite kolonlarından tek basamakta saflaştırılmıştır. En etkili ligand olarakta 5-amino-2-metilbenzen sülfonamid molekülü tespit edilmiş ve LPO enzimi 1059,37 kat saflaştırılmıştır. Bunun yanında tek kademede ve ucuz maliyette LPO saflaştırılması yapabilebilen 5-amino-2-metilbenzen sülfanomid molekülü literatüre geçmiştir [11].

Şişecioğlu ve arkadaşları sığır sütünde elde ettikleri Laktoperoksidaz enzimini 3 adımda saflaştırmışlardır. Sırasıyla Amberlite CG-50 reçinesi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisidir. Profolün LPO enzimi üzerindeki etkisini substrat olarak ABTS kullanılarak belirlemişlerdir. Profolün IC_{50} değeri 15.97 μ M olarak, K_i değeride 3.72 μ M bulunmuştur [50].

Erol 'un [ref] yapmış olduğu yüksek lisans çalışmasında keçi sütünden elde edilen LPO enzimi için yapılan kinetik çalışmada 6 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı konsantrasyonda Sefotak ilaının aktivite ölçümü yapılmıştır. 0,2 M Sefotak için IC_{50} değeri 0,93 M, K_i değeri 0,015 M olarak bulunmuş ve inhibisyon tipi de yarışmalı olarak tespit edilmiştir.

Şipal'in [ref] yapmış olduğu doktora çalışmasında sığır sütünden LPO enzimini saflaştırmak için Sepharose 4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid yapısına sahip jel sentezlenmiştir. Hazırlanan bu kolonun diğer saflaştırma metodlarıyla karşılaştırıldığında daha ekonomik ve çok uzun süre kullanılabildiği tespit edilmiştir. Sepharose-4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzene sülfonamid yapılı afinite jel için farklı sıcaklıklarda, farklı iyonik şiddet ve

pH çalışmaları yapmıştır. Bunun sonucunda dengeleme ve yıkama tamponunda Na_2SO_4 içermeyen bağlanmanın en iyi olduğu pH:6 ve sıcaklık $25\text{ }^\circ\text{C}$ bulmuştur. Çalışmasında veteriner ilaçları ve pestisitlerin LPO enzimi üzerine farklı oranlarda *in vitro* etki gösterdiğini tespit ederek IC_{50} değerlerini belirlemiştir. Sonuç olarakta bu bileşiklerin, laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiğini belirlemiştir. Çalışmada kullanılan veteriner ilaçlarından en güçlü inhibitör olarak IC_{50} değeri $9\text{ }\mu\text{M}$ olan Advocin olarak bulmuştur. Bunun yanı sıra değerlere bakıldığında çalışmadaki bütün veteriner ilaçlarının güçlü inhibitör özelliği gösterdiğini belirlemiştir. Çalışmasında kullandığı bir diğer kimyasal olan pestisitler içerisinde en güçlü inhibitörü $11\text{ }\mu\text{M}$ olan Ragor olarak bulmuştur [15].

Çalışmamda Sepharose-4B-L-etilendiamin-4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak piyasadan kolay bulunabilen ve maliyetinin az olduğu sığır sütünden LPO enzimi saflaştırılmıştır. LPO enziminin saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 212.000 EU/mg olarak, yüzde verim ise $0,74$ olarak bulunmuştur. Daha sonra afinite jelinden saflaştırılan LPO enzimine karşı bazı kimyasal maddelerin *in vitro* etkilerine bakılmıştır. Kullanılan bu kimyasal maddelerin IC_{50} değerlerini bulmak için ABTS substratında çalışılarak % aktivite hesaplanarak, % aktivite - [I] grafikleri çizildi. K_M ve V_{\max} değerlerinin bulunması için 7 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 20 farklı kimyasal bileşik konsantrasyonunda enzim aktivite ölçümü yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türünü belirleyip K_i değerleri bulundu.

Çalışmada kullanılan kimyasal bileşikler; 4-nitrofenil asetik asit, nikotin, allopurinol, guanidin, adenin, benzamidin, kumarik asit, 2-amino 1H-purin 6 (7H)-on, klorogenik asit, 4-aminofenil laktik asit, lineoik asit, indol asetik asit, pirokatekol, naftilamin, benzokatekin (katekol), 4-metil katekol, kinetin, giberallik asit, dietilen amin, 3,4-dimetoksifenil asetik asit şeklindedir.

Sonuç olarak; çalışılan bileşiklerden benzokatekin en iyi şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. IC_{50} değeri $5,36$ inhibisyon tipi nonkompetitif, K_i değeri $6,72 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur. İnhibisyonu en iyi olan bileşiklerden bir diğeri Giberallik asittir, IC_{50} değeri $5,98$ inhibisyon tipi kompetitif, K_i değeri $7,41 \times 10^{-7}$ olarak bulunmuştur.

Benzamidin, kinetin ve dietilen amin için IC_{50} değerleri sırasıyla; 25, 34,28 ve 16,47 inhibisyon tipleri lineer karışık tip, K_i değerleri sırasıyla $14,46 \times 10^{-6}$, $20,34 \times 10^{-4}$ ve $17,53 \times 10^{-5}$ olarak bulunmuştur.

Q-kumarik asit, nikotin, pirokatekol, naftilamin için IC_{50} değerleri sırasıyla; 17,62; 8,58 ve 8,26 inhibisyon tipleri Nonkompetitif tip, K_i değerleri sırasıyla 403, $4,22 \times 10^{-4}$, $34,2 \times 10^{-6}$, $810,92 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur.

4-nitrofenil asetik asit, 4-metil katekol için IC_{50} değerleri sırasıyla; 44,20 ve 10,03 inhibisyon tipi kompetitif tip K_i değerleri sırasıyla $8,73 \times 10^{-6}$ ve $1,04 \times 10^{-4}$ olarak bulunmuştur.

İndol Asetik asit için IC_{50} değeri 15,83 inhibisyon tipi unkompetitif tip K_i değeri ise $20,84 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur.

Allopirinol, guanidin, adenin, 2-amino 1H-purin 6 (7H)-bir, klorojenik asit, 4-aminofenil laktik asit, lineoik asit, 3,4-dimetoksifenil asetik asitin LPO enzimi üzerine aktivite etkisi gözlenmemiştir. Yapılan bu çalışmalar sayesinde ilerleyen dönemlerde biyosensör alanında, savunma sanayinde, eczacılıkta, tarımda, endüstride, tıp alanındaki çalışmalarda yenilik oluşturması amacıyla kullanılacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Usanmaz, H., “Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2014).
- [2] Kumar, R., and Bhatla, K.L., “Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk”, *Acta Cryst.*, (51), 1094-1096, (1995).
- [3] Vasavada P., and Cousin M., ‘Dairy Science and Technology ‘, Handbook, Volumes 13. John Wiley & Sons, 978-1-56081-078-0. Edited by: Hui, Y.H, (2005).
- [4] Yılmaz, B. ve Tosun, H., “Sütte bulunan doğal antimikrobiyal sistemler ve bunların gıda sanayinde kullanımı”, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 11-20, (2014).
- [5] Jacob, B.M., Monoj N.K., and Haridas, M., Antibacterial Property of Goat Milk Lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology*, (31), 808, (1998).
- [6] Bayse, G. S., Michaels, A. W., and Morrison, M., “Lactoperoxidase-catalyzed iodination of tyrosine peptides”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 284(1), 30-33, (1972).
- [7] Sievers, G., “Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy”, *Biochemica et Biophysica Acta*, 624, 249-259, (1980).
- [8] Anonymous, K., “Lactoferrin and lactoperoxidase bio-active milk proteins”, *Food Technology Europe*, 1996, 39-43, (1995).

- [9] 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).
- [10] Sharma, S., Singh, A. K., Kaushik, S., Sinha, M., Singh, R. P., et al., “Lactoperoxidase structural insights into the function, ligand binding and inhibition” *International journal of biochemistry and molecular biology*, 4(3), 108, (2013).
- [11] Köksal, Z., “Sülfanilamid Türevleri Kullanılarak Memeli Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2015).
- [12] Atasever, A., “Laktoperoksidaz Enziminin Sığır Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniği İle Saflaştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2010).
- [13] 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).
- [14] 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).
- [15] Şipal, B., “Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2016).
- [16] Özdemir, H., Aygöl, 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).
- [17] Arslan, O., *Biyomoleküller teori ve uygulamaları*, Balıkesir, 81, (2008).
- [18] Bugg, T. D., *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Blackwell, Publishing, 19-30, (2004).

- [19] Nelson, D., Cox, M. and Kılınç, N., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Ankara, 975-8982- 18-4, Palme Yayıncılık, 244-269, (2005).
- [20] Beyaztaş, S. “Ksantin oksidaz (XO) enziminin saflaştırılması için yeni bir affinite jelinin sentezi, saflaştırılan enzim ile tiyosemikarbazon türevlerinin biyotransformasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması”, Doktora tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).
- [21] Sel, S., “Bazı sülfonil üre grubu herbisit etken maddelerinin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve enzim inhibisyon mekanizmasının kare dalga voltametri ve floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Ankara, (2014).
- [22] www.enzimler.gen.tr (28 Mart 2018).
- [23] Sorensen R. and Novak N., *The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Pysiology Teaching Laboratories. Biochemical Education*, 0307-4412, (1995).
- [24] Voet, D., and Voet, J.G., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. US, (2003).
- [25] “4-metil katekol [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [26] “Dietilen amin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [27] “Giberallik asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [28] “Brenz katekin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [29] “o-kumarik asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [30] “Kinetin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- [31] “İndol asetik asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [32] “Nikotin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com

- [33] “Naftilamin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [34] “Pirokatekol [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [35] “Benzamidin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [36] “4-nitrofenil asetik asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [37] Stedman, “Stedmans Medical Dictionary 26th Edition”, (1926).
- [38] Higdon, J. V. and Frei, B.. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46:101–123 (2006).
- [39] “Adenin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [40] “Guanidin [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [41] “Allopirinol [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [42] “3,4-dimetoksifenil asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [43] “2-amino 1H-purin 6 (7H)-one [online]”, (30 Mayıs 2018), www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- [44] “4-aminofenil laktik asit [online]”, (30 Mayıs 2018), www.sigmaaldrich.com
- [45] 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).
- [46] Segel, I.H., “*Biochemical Calculations*”, 403, New York: John Wiley and Sons, (1968).
- [47] Bradford, M. A. “Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* (72), 248-254, (1976).

- [48] Bozdag, M., Isik, S., Beyaztas, S., Arslan, O., and Supuran, C. T. "Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases". *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30(2), 240-244, (2015).
- [49] Laemmli, D. K., "Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. Nature", *London*, 227, 680, (1970).
- [50] Sisecioglu, M., Çankaya, M., Gulcin, I., and Ozdemir, H. The inhibitory effect of propofol on bovine lactoperoxidase. *Protein and peptide letters*, 16(1), 46-49, (2009).
- [51] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., *Biyokimya*, 6. Baskı, İstanbul: Aktif yayınevi, (2009).

