



ARAŞTIRMA YAZISI

SÜT SERUMU PROTEİNLERİNİN LİPOZOMLANMASI

A. Suha Yalçın¹, Murat Türkoğlu²

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye ²Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Süt serumu proteinlerinin insan sağlığı üzerine birçok yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, peynir altı suyu tozundaki süt serumu proteinlerinin jel kromatografisiyle fraksiyonlara ayrılması ve antioksidan aktivite gösteren fraksiyonların lipozomlanarak bir kozmetik formülde kullanılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Peynir altı suyundaki süt serumu proteinlerinin fraksiyonlara ayrılması için ekstraksiyon, filtrasyon, santrifüjleme ve sıvı kromatografisi yöntemleri uygulandı. Elde edilen fraksiyonlarda antioksidan aktivite ölçümü bakır indirgeme kapasitesi ile yapıldı, proteinlerin analizi jel elektroforeziyle gerçekleştirildi. Lipozom eldesi için ince tabaka hidrasyon yöntemi kullanıldı.

Bulgular ve Sonuç: Ekstraksiyon, filtrasyon ve santrifüjleme gibi ön işlemlerden sonra Sephadex G-50 jel kromatografisinden yararlanılarak majör süt serumu proteinlerini içeren bir fraksiyon ile küçük molekül ağırlıklı peptidleri içeren ikinci bir fraksiyon elde edildi. Elde edilen fraksiyonlardan birincisinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Daha sonra süt serumu proteinlerini içeren lipozomlar hazırlandı. Lipozomlarda boyut analizi yapıldı, ışık mikroskopu, elektron mikroskopu ve atomik kuvvet mikroskopu görüntüleri değerlendirildi. Son olarak, süt serumu proteinlerini içeren lipozomlar ile dermal kullanıma uygun bir jel elde edildi. Başta antioksidan aktivite olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olan süt serumu proteinlerinin lipozomlanmasının ve bu molekülleri içeren kozmetik formüllerin geliştirilmesinin dermal uygulamalar açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Antioksidan aktivite, Jel kromatografisi, Lipozom, Süt serumu proteinleri

PREPARATION OF LIPOSOMES CONTAINING WHEY PROTEINS

ABSTRACT

Aim: In recent years, it has been shown that whey and its components have a number of health-promoting effects. We aimed to isolate fractions containing whey proteins using chromatography and then to prepare antioxidant liposomes in order to obtain a gel suitable for cosmetic preparations.

Methods: Fractionation of whey proteins was achieved by extraction, filtration and centrifugation followed by liquid chromatography. The antioxidant activities of the fractions was determined by their copper ion reducing capacity. Gel electrophoresis was used to analyze the proteins. Liposomes were made by the thin film hydration method.

Results and Conclusion: Using Sephadex G-50 chromatography, two fractions were obtained. The first fraction contained major whey proteins, while the second fraction had small peptides. We have then determined the antioxidant activities of these fractions. The first fraction had the highest antioxidant activity. We prepared liposomes containing whey protein fractions and analyzed their sizes. Then, we investigated the liposome structures under a light microscope, electron microscope and atomic force microscope. Finally, we prepared a cosmetic formula from liposomes containing the whey fractions. We believe that preparing antioxidant liposomes containing whey proteins will be an important contribution to the cosmetic formulas for dermal applications.

Keywords: Antioxidant activity, Gel chromatography, Liposome, Whey proteins

İletişim Bilgileri:

Dr. A. Suha Yalçın

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

e-mail: asyalcin@marmara.edu.tr

Marmara Medical Journal 2010;23(1);22-29



GİRİŞ

Sütün bileşiminde ana besin unsurlarının yanında metabolik olaylar için gerekli olan vitaminler, mineraller, enzimler ve proteinler de bulunmaktadır¹. Sütün esas proteini olan kazein çöktürüldüğünde geriye kalan sıvı kısım peynir altı suyu, “whey” veya süt serumu adını almaktadır. Peynir üretimi sırasında yan ürün olarak elde edilen peynir altı suyu toz haline getirilerek gıda endüstrisinde değişik amaçlarla kullanılmakta ve peynir altı suyundaki çözünür proteinlerin çeşitli işlemlerle saflaştırılması sonrasında da protein içerikleri farklı olan ürünler elde edilmektedir^{2,3}.

Son yıllarda, süt serumu proteinlerinin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Örneğin, süt serumu proteinlerinden elde edilen peptidlerin kan kolesterol seviyesini düşürücü etkileri bildirilmiş, laktoferrin ve glikomakropeptidler gibi proteinlerin antimikrobiyal aktivite gösterdikleri gözlenmiştir^{1,2,4}. Yine süt serumundaki majör proteinlerden β -laktoglobulinin anti-hipertansif, anti-kanserojen, hipokolesterolemik, opioidderjik ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bildirilmiş, α -laktalbumin ve ondan elde edilen peptidlerin ise stres azaltıcı, gevşetici ve uykuyu düzenleyici etkileri gözlenmiştir^{2,4}. Minör proteinlerden laktoferrinin antiviral, antimikrobiyal, immünomodülatör, antioksidan aktivitelere sahip olduğu, laktoperoksidazın ise antibakteriyel aktiviteye gösterdiği bildirilmiştir⁵. Süt serumu proteinleri arasında yer alan büyüme faktörlerinin yararlı etkileri de ayrıca dikkat çekmektedir⁴.

Sütün içerdiği antioksidanlar ile ilgili araştırma ve yayınların sayısı günden güne artmaktadır. Süt proteinlerinin ve hidrolizatlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir⁶⁻⁸. Çalışmamızda, peynir altı suyu tozundaki süt serumu proteinlerinin jel kromatografisiyle fraksiyonlara ayrılması, antioksidan aktivite gösteren fraksiyonların belirlenerek lipozomlanması ve bir kozmetik formülde kullanılması amaçlanmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM

Peynir altı suyu tozu Süttaş A.Ş.’den, lipozom eldesinde kullanılan kimyasallardan dipalmitoilfosfatidilkolin (P5911) ve kolesterol (C3292) Sigma-Aldrich, kloroform Merck, soya lesitini (Epikuron 100 ve Epikuron 200SH) Cargill firmalarından temin edilmiştir.

Peynir Altı Suyu Tozu Çözeltisinin Eldesi

Dört adet santrifüj tüpü alındıktan ve her birinin boş ağırlığı not edildikten sonra içlerine 0.5 g peynir altı suyu tozu konuldu. Daha sonra tüplere 7.5 mL hekzan eklendi ve vorteks karıştırıcıyla yaklaşık beş dakika karıştırıldı. Tüpler 1,500 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar boş ağırlığı belirlenmiş bir kaptaki birleştirildi. Çökeltilerin üzerine tekrar hekzan eklenerek işlem 2 kez daha tekrarlandı. Süpernatantlar aynı kaptaki birleştirildi ve hekzan fazı olarak saklandı. Bu işlemlerden elde edilen çökeltiler bir süre bekletilerek hekzanın tamamen uçması sağlandı. Bütün tüplere 8 mL ultra saf su eklendi, vorteks karıştırıcıyla yaklaşık beş dakika karıştırıldıktan sonra tüpler 1,500 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada elde edilen tüm süpernatantların birleştirilmesiyle peynir altı suyu tozu çözeltisi elde edilmiş oldu.

Sephadex G-50 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Peynir altı suyu tozundaki süt serumu proteinlerinin ayrımı Sephadex G-50 jel filtrasyon kromatografisi ile gerçekleştirildi. Bir gram Sephadex G-50 tartıldı ve üzerine 100 ml 0.02 M fosfat tamponu, pH 8.6 eklendi. Cam bageet ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Bu şekilde şişirilen jel kolona döküldükten sonra dengelenmesi için kolon hacminin 2 katı kadar fosfat tamponu ile yıkandı. Daha sonra, yukarıda tarif edilen şekilde hazırlanan peynir altı suyu tozu çözeltisi 1.2 μ m’lik şırınga filtreden geçirildi ve kromatografi kolonuna uygulandı. Elüsyon işlemi fosfat tamponu ile yapıldı, akış hızı olarak 0.3 ml/dakika ayarlandı. Elde edilen fraksiyonların (~ 1 ml) 280 nm’deki absorbansları ölçüldükten sonra elüsyon grafiği çizildi.



Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Protein Analizi

Yükleme (% 4) ve ayırma jeli (% 18) olacak şekilde iki parçalı jel hazırlandı. Jel elektrofrez düzeneğine döküldü ve polimerize olması beklendi. Taraklar yardımı ile yüklem jeline örnek kuyucukları açıldı. Örnek olarak kromatografi işleminden elde edilen fraksiyonlar kullanıldı. Örnekler 1:1 oranında örnek tamponu ile karıştırıldı, 20 µl/ml olacak şekilde merkaptetanol eklendikten sonra 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra örnekler kaynar su banyosunda 4 dakika tutuldu ve 50'şer µl örnek jel içindeki kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez tankına 1.2 litre elektrot tamponu yerleştirildikten sonra elektrotlar bağlandı, sabit voltaj (200 V)'da 4-5 saatlik yürütme yapıldı. Sürenin sonunda yüklem ve ayırma jeli elektrofrez düzeneğinden ayrıldı, bir gece boya çözeltisinde tutularak protein bantları görünür hale getirildi. Ertesi gün, jelin boya giderme çözeltisi ile yıkanmasıyla bağlanmayan boyanın akması ve protein bantlarının belirginleşmesi sağlandı.

Antioksidan Aktivite Ölçümü

Antioksidan aktivite ölçümü bakır iyonu indirgeme kapasitesine dayanan CUPRAC yöntemine göre yapıldı⁹. Bir deney tüpüne sırasıyla 200 µl 10 mM CuCl₂ çözeltisi, 200 µl 7.5 mM neocuproine çözeltisi ve 200 µl 1 M amonyum asetat tamponu, pH 7.0 konuldu ve karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine 20-200 µl örnek konuldu ve toplam hacim 820 µl olacak şekilde ultra saf su eklendi. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'deki absorpsiyon değerleri ayıraç körüne karşı okundu. Aynı işlem standart olarak kullanılan 1 mM Trolox ile tekrarlandı ve sonuçlar mM Trolox cinsinden ifade edildi.

Süt Serumu Proteinlerinin Lipozomlanması

Sephadex G-50 jel kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar ince-film hidrasyon yöntemiyle lipozomlandı^{10,11}. Balon içine önce 50 mg fosfolipid ile 50 mg kolesterol konuldu ve 10 mL kloroform içinde çözüldü. Daha sonra çözeltideki kloroform 57-58 °C'de vakum altında rota evaporatörde uçurularak

lipit kalıntısı ince tabaka haline getirildi. Bu işlem yaklaşık 30 dakika sürdü. Elde edilen ince tabaka bir gece buzdolabında bekletilerek kloroformun tamamen uçması sağlandı. Ertesi gün lipit ince tabakası 10 mL örnek ile hidrate edildi. Lipit tabakasının tamamen çözülmesi için karıştırma işleminin elle veya vorteks karıştırıcıda yapılması, çözeltinin ultrasonik su banyosunda tutulması, karıştırma işleminde rota evaporatörden yararlanılması gibi farklı denemeler yapıldı. Lipit tabakası tamamen çözülmeye işlem sonlandırıldı. Balon bir gece buzdolabında bekletilerek hidrasyon işleminin tamamlanması sağlandı.

Lipozomlarda Yapılan İncelemeler

Lipozomlarda şekil ve boyut değerlendirmesi başlangıçta Beckman Coulter HmX kan sayım cihazı ile yapıldı. Lipozomlarda tane boyut dağılımı tayini ile mikroskopik incelemeler TÜBİTAK-MAM Malzeme Enstitüsü'nde yaptırıldı. Elektron mikroskopisi ve atomik kuvvet mikroskopisi ile elde edilen görüntüler boyut analizi sonuçları ile karşılaştırıldı. Sephadex G-50 jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar lipozomlandıktan sonra, yüklem işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesinde jel filtrasyon kromatografisi ve poliakrilamid jel elektrofrezinden yararlanıldı.

Jel Eldesi

Önce 0.5 g Carbopol Ultrez (Lot: EC 521212291) tartıldı ve yaklaşık 80 mL su içinde mekanik karıştırıcı yardımıyla (1,000 devir/dakika) dağıtıldı. Daha sonra süt serumu proteinlerini içeren lipozom çözeltisi (10 ml) eklendi. Son olarak, pH metre altında % 20'lik NaOH'den damla damla eklenerek pH 5.5-6 arasına getirilerek jel elde edildi.

BULGULAR

Sephadex G-50 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Şekil 1'de peynir altı suyu çözeltisinin ön işlemlerden sonra Sephadex G-50 kolonuna uygulanmasıyla elde edilen fraksiyonlar gösterilmiştir. Bu deneylerden elde edilen fraksiyonlar elektrofrez ile incelendiğinde, birinci fraksiyonun ağırlıklı olarak immünoglobülinler (Ig), serum albümin

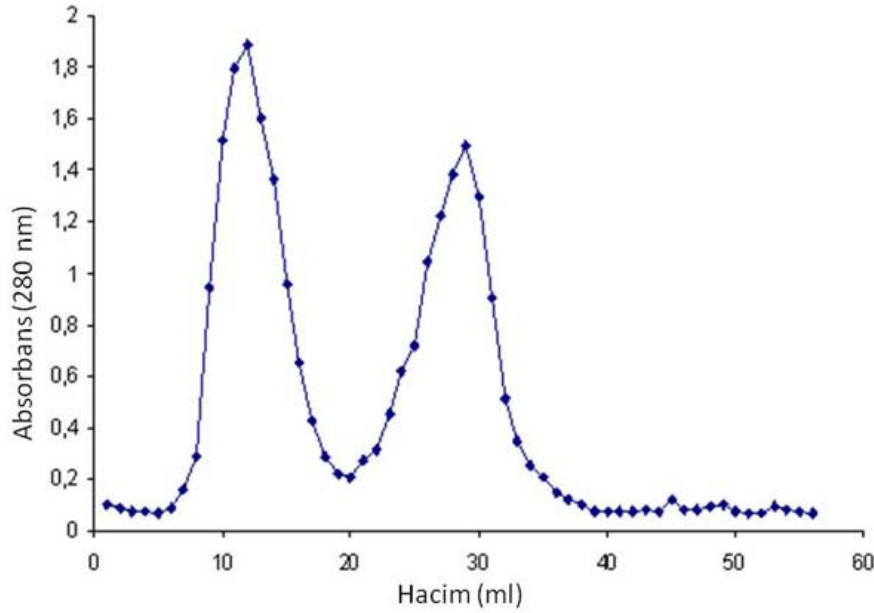


(BSA), β -laktoglobulin (β -Lg) ve α -laktalbumin (α -La) içerdiği, ikinci fraksiyonda ise birinciden bir miktar karışmanın yanında küçük molekül ağırlıklı peptidlerin yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 2).

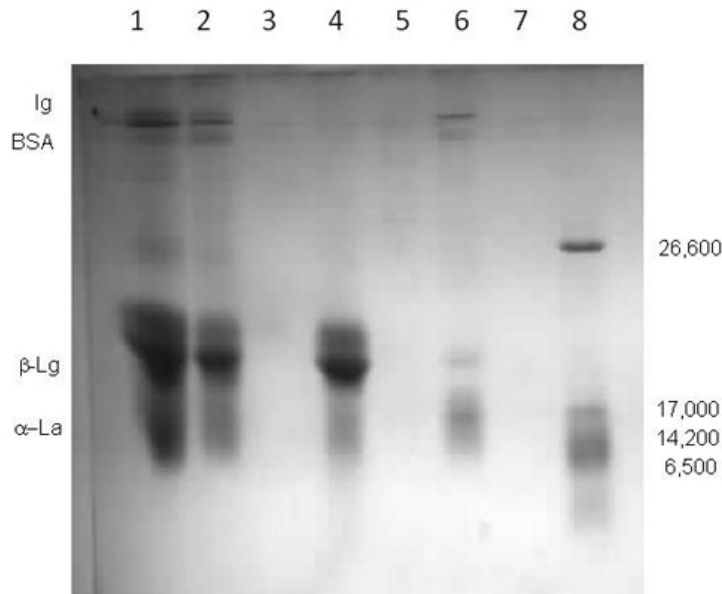
Antioksidan Aktivite Ölçümü

Sephadex G-50 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarda yapılan

antioksidan aktivite sonuçları Tablo I'de yer almaktadır. Protein miktarlarına göre düzeltme yapıldıktan sonra fraksiyonların aktiviteleri karşılaştırıldığında, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip fraksiyonun F-1 olduğu (640 mmol TR/mg protein) belirlenmiştir.



Şekil 1: Peynir altı suyundan Sephadex G-50 jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar. Kolon boyutları: 2 x 26 cm; Örnek hacmi: 7-8 ml; Elüsyon: 0.02 M Fosfat tamponu, pH 8.6; Akış hızı: 1 ml/dakika



Şekil 2: Peynir altı suyundan elde edilen fraksiyonlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılan protein analizi sonuçları.

1. F-1 fraksiyonu; 2. F-2 fraksiyonu; 3. Lipozomlanmış F-1 fraksiyonu (süpernatan);
4. Lipozomlanmış F-1 fraksiyonu (çökelti); 5. Lipozomlanmış F-2 fraksiyonu (süpernatan);
6. Lipozomlanmış F-2 fraksiyonu (çökelti); 7. Boş lipozom, 8. Molekül ağırlığı belirteçleri



Tablo I: Peynir altı suyundan elde edilen fraksiyonlarda antioksidan aktivite tayini

	Protein	Antioksidan aktivite	
	(mg/ml)	(mM TR/ml)	(mmol TR/mg protein)
Filtrat	5.02	1.47	290
F-1	0.91	0.58	640
F-2	1.33	0.30	230

Sonuçlar üç deneyin ortalaması olup antioksidan aktivite Trolox eşdeğeri (TR) olarak ifade edilmiştir.

Lipozom Eldesi ve Yapılan İncelemeler

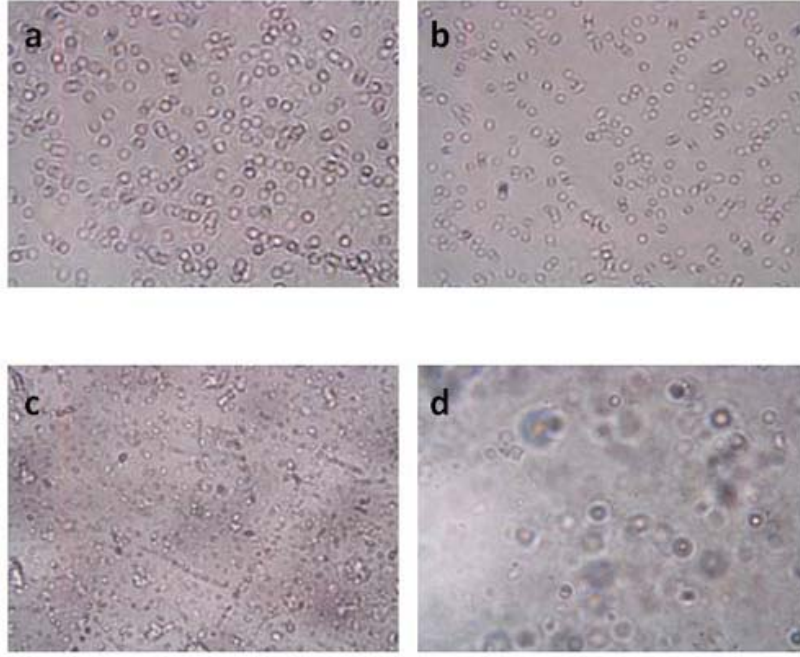
Yapılan yirmiden fazla ön denemeden sonra lipozom eldesi için standart bir yöntem oluşturuldu. Önce, rota evaporatörde kullanılacak balonun boyutları göz önüne alınarak dipalmitoilfosfatidilkolin veya soya lesitini (50-100 mg) ile kolesterol (50-100 mg) tartılarak kloroform (5-10 ml) içinde çözüldü. Balon içindeki çözelti rota evaporatörde (vakum altında ve 57°C sıcaklıkta) 30 dakika tutularak kloroformun uzaklaştırılması ve balonun duvarında ince bir lipid tabakasının oluşması sağlandı. Kalıntı kloroformun tamamen uzaklaşmasını temin etmek için balon bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi gün aktif maddeyi içeren sulu faz ile, elde veya vorteks karıştırıcıda çalkalama ve sonikasyon şeklinde hidrasyon işlemi gerçekleştirildi. İşlemin oda sıcaklığında yapılmasının verimi arttırdığı gözlemlendi.

Boyut dağılımı öncelikle hücre sayarı ile değerlendirildi. Lipozomların eldesi için kullanılan yöntemlerin boyut dağılımına etkisini incelemek üzere farklı por genişliğindeki (0.45 µm, 1.2 µm ve 5 µm) membran filtrelerden yararlanıldı. Filtrasyon sonrasında lipozom boyutlarının küçülerek

homojen hale geldiği görüldü. Sonikasyon sonrasında da benzer bulgular elde edildi. Şekil 3'de çeşitli işlemlerden sonra ışık mikroskopuyla elde edilen lipozom görüntüleri yer almaktadır.

Lipozom boyutları mikroskopik olarak değerlendirildiğinde lipozom boyutlarının 1-10 µm arasında değiştiği gözlemlendi. Lipozom yapımında kullanılan fosfolipitlerin yapısal farklılıklarının boyut dağılımına etkisi değerlendirildiğinde ise fosfolipit yapısının boyut dağılımını belirgin şekilde etkilediği gözlemlendi. En homojen dağılımın dipalmitoilfosfatidilkolin kullanılarak elde edildiği belirlendi.

Süt serumu proteinlerinden elde edilen fraksiyonların lipozomlanmasından sonra fraksiyonların antioksidan aktivitelerini koruyup korumadıklarını belirlemek amacıyla lipozomlarda antioksidan aktivite ölçümleri yapıldı. Ancak lipozom yapısında yer alan fosfolipitlerin deney sistemiyle etkileşmesi nedeniyle olumlu sonuç elde edilemedi. Bu sorunun giderilebilmesi için başka antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinin denenmesi gerektiği sonucuna varıldı.



Şekil 3: Çeşitli işlemler görmüş lipozomların ışık mikroskobu görüntüleri.

- a. Hiçbir işlem görmemiş lipozomlar (40 x); b. Membran filtreden (0.45 µm) süzülmuş lipozomlar (40 x); c. Sonikasyon işleminden sonraki lipozom görüntüsü (40 x);
d. Jel içindeki lipozom görüntüsü (100 x)

TARTIŞMA

Peynir altı suyu tozu, peynir üretimi sırasında süttten ayrılan sıvının toz haline getirilmiş şeklidir. Yüksek oranda çözünür protein içeren bu ürünün elde ediliş yöntemine ve kaynağına göre asit, tatlı, demineralize gibi çeşitleri ve farklı endüstriyel kullanım alanları vardır^{2,12}. Peynir altı suyundaki süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla çöktürme, diyaliz, kromatografi, membran filtrasyonu, ultrafiltrasyon gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır^{3,13}. Kromatografi, peynir altı suyundaki süt serumu proteinlerini ayırmada sıkça kullanılan bir yöntemdir. Peynir altı suyundan katyon ve anyon değiştirici iyon değişim kromatografisi ile laktoperoksidaz, laktoferrin, α -laktalbümin, β -laktoglobulin B ve β -laktoglobulin A ayrı ayrı elde edilebilmiştir¹⁴. Çalışmamızda ekstraksiyon, filtrasyon ve santrifüjleme gibi ön işlemlerin ardından Sephadex G-50 jel kromatografisinden yararlanılarak, peynir altı

suyundan iki ayrı fraksiyon elde edildi. Bunlardan birincisinin majör süt serumu proteinlerini, ikincisinin de küçük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği gözlemlendi.

Majör süt serumu proteinlerinden β -laktoglobulin, gıda işlevselliği açısından değerli ve etkili bir proteindir. Uzun yıllar önemli bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu özelliğinin yanında antihipertansif, hipokolesterolemik, opioiderjik ve antimikrobiyal etkiler gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir^{15,16}. Sığır α -laktalbümini ise insan α -laktalbümini ile yüksek derecede aminoasit benzerliği göstermesi nedeniyle özellikle bebeklerin beslenmesine katkı sağlamaktadır^{15,16}. Sığır α -laktalbümini ve ondan elde edilen peptidlerin biyolojik fonksiyonları arasında stres azaltıcı ve uyku düzenini iyileştirici etkiler yer almaktadır^{12,16}. Son yıllarda yapılan araştırmalarda süt serumu proteinlerinin bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi,



desteklenmesi ve antioksidan savunma gibi etkilerinin ön plana çıktığı belirlenmiştir^{2,6,8,12,16}.

Öte yandan, lipozomların kozmetik amaçlı kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Lipozomların taşıyıcı olarak sağladığı başlıca avantaj lipitlerin hidrate yapısının deride yaşlanmayla ortaya çıkan kuruluğu gidermesidir. Bunun yanında, lipozomlar aracılığıyla linolenik asit gibi bazı lipitlerin eksikliğini giderilmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca, lipozom yapımında doğal lipitlere ek olarak sentetik lipitlerin kullanılabilmesi stabilite avantajı sağlamaktadır. Non-iyonik surfaktanların kullanımıyla lipozomların hem yüksek miktarlarda hem de çok ucuza üretilebilmeleri sözkonusu olmuştur¹⁷.

Son birkaç yılda ortaya çıkmış olan antioksidan lipozom tanımı, suda ve/veya yağda çözünen küçük moleküller ile antioksidan özellikteki enzim ve proteinleri içeren lipozomlar için kullanılmaktadır¹⁸. Antioksidan lipozomların oksidatif stres ile ilişkilendirilen pek çok hastalık ve durumun tedavisinde yararlı olabileceğine yönelik bulgular elde edilmiştir¹⁹⁻²¹. Yapılan araştırmalar antioksidan moleküllerin hardal gazının neden olduğu deri hasarlarına karşı da koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir²⁰.

Süt serumu proteinlerinin yüksek sülfidril grubu içerikleri nedeniyle hem antioksidan aktivite gösterdikleri hem de başlıca endojen antioksidan molekül olan glutatyonun hücrel sentezini arttırdıkları bilinmektedir^{8,16}. Bizim peynir altı suyu tozundan elde ettiğimiz birinci fraksiyon esas olarak α -laktalbümin ve β -laktoglobülininden oluştuğuna göre, bu fraksiyonu içeren lipozomların hücrel glutatyon sentezini arttırmada etkili olacağı düşünülebilir. Gerçekten de sığanlarda yapılan deneysel çalışmalarda süt serumu proteinlerinin glutatyon sentezini ve yara iyileşmesini arttırdığı gözlenmiştir^{22,23}.

Sonuç olarak, süt serumu proteinlerinin fraksiyonlara ayrılarak lipozomlanmasının hem kozmetik formüllerin geliştirilmesi hem de topikal ve transdermal uygulamaların

etkinliği açısından önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-YLS-14067-0109 no.lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Jensen RG. Handbook of Milk Composition. San Diego, CA, Academic Press: 1995.
2. Etzel MR. Manufacture and use of dairy protein fractions. J Nutr 2004; 134: 996S-1002S.
3. Burr R. Protein purification from milk. In: Roe S, ed. Protein Purification Applications. Vol. 2. New York, Oxford University Press: 2001: 87-115.
4. Fox PF, Flynn A. Biological properties of milk proteins. In: Fox PF, ed. Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1. London, Elsevier: 1992: 255-284.
5. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol Immunol 2003; 40: 395-405.
6. Bayram T, Pekmez M, Arda N, Yalçın AS. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. Talanta 2008; 75: 705-709.
7. Lindmark-Mannson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. Br J Nutr 2000; 84: 103-110.
8. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. Int Dairy J 2006; 16: 1306-1314.
9. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE, Erçağ E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. Int J Food Sci Nutr 2006; 57: 292-304.
10. Gürsoy A, Akbuğa J. Stability of indomethacin-containing liposomes on long-term storage. J Controlled Release 1988; 8: 127-131.
11. Mura P, Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. Eur J Pharmaceut Bioharmaceut 2007; 67: 86-95.
12. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. Altern Med Review 2004; 9:136-156,
13. Zydney AL. Protein separation using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. Int Dairy J 1998; 8: 243-250.
14. Ye X, Yoshida S, Ng TB. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. Int J Biochem Cell Biol 2000; 32: 1143-1150.
15. Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin- Technological implications for processing. Int Dairy J 2006; 16: 1229-1240.
16. Yalçın AS. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. Curr Pharm Des 2006; 12: 1637-1643.



17. Lasic DD. Applications of liposomes. In: Lipowsky R, Sackmann E, eds. Handbook of Biological Physics. Vol. 1. Elsevier Science BV. 1995: 491-519.
18. Stone WL, Smith M. Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Molec Biotech* 2004; 27: 217-230.
19. Hoesel LM, Flierl MA, Niederbichler AD, et al. Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *Antiox Redox Sign* 2008; 10: 973-981.
20. Paromov V, Suntres Z, Smith M, Stone WL. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure- role of oxidative stress and antioxidant therapy. *J Burns Wounds* 2007; 7: 60-85.
21. Sinha J, Das N, Basu MK. Liposomal antioxidants in combating ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 264-271.
22. Velioglu-Ögünç A, Manukyan M, Cingi A, Aktan Ö, Yalçın AS. Süt serumu proteinleriyle beslenmenin sıçanlarda yara iyileşmesine etkisi, *Kocatepe Tıp Dergisi, Ek Sayı*: 2004; 51-54.
23. Manukyan MN, Yavuz Y, Erbarut İ, et al. Sıçanlarda whey proteini ile oluşturulan glutatyon önkoşullandırmasının karaciğer sıcak iskemi-reperfüzyon hasarında hem oksijenaz 1 sistemi üzerine etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2008; 24: 137-144.