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

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ-I İZOENZİMİNİN ALTERNATİF BİR METOT İLE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSMAİL KÖSEOĞLU

BALIKESİR, MAYIS - 2016

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

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ-I İZOENZİMİNİN ALTERNATİF BİR METOT İLE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSMAİL KÖSEOĞLU

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Nahit GENÇER (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN

BALIKESİR, MAYIS - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

İsmail KÖSEOĞLU tarafından hazırlanan **"İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ-I İZOENZİMİNİN ALTERNATİF BİR METOT İLE İMMOBİLİZASYONU"** adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.05.2016 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. Nahit GENÇER	.....
Üye Prof. Dr. Oktay ARSLAN	.....
Üye Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN	.....
Yedek Üye Doç. Dr. Baki ÇİÇEK	.....
Yedek Üye Yrd. Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ	.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR .....

ÖZET

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ-I İZOENZİMİNİN ALTERNATİF BİR METOT İLE İMMOBİLİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
İSMAİL KÖSEOĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NAHİT GENÇER)

BALIKESİR, MAYIS - 2016

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzimi, tüm canlılarda CO_2 'in hidratlanarak HCO_3^- ve H^+ 'ya dönüşümünü terisinir olarak katalizleyen oldukça önemli bir enzimdir. Bu çalışmada, karbonik anhidraz enzimi izoenzimlerinden olan insan hCA-I izoenzimi, Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonamid yapısına sahip afinite jeli ile saflaştırılmıştır ve SDS-PAGE ile saflık derecesi kontrol edilmiştir.

Saflaştırılan CA-I izoenziminin ω-aminoheksil agaroz jeli üzerine gluteraldehit ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra serbest ve immobilize CA-I enzimi için çeşitli tayinler yapılmıştır. Serbest ve immobilize CA-I izoenziminin sırasıyla optimum pH'leri 10 ve 9.5 olarak bulunmuştur, aktivitelerini ise sırasıyla 768; 1096 saat korumuşlardır, optimum sıcaklıkları 35; 25 ^oC bulunmuştur, termal stabiliteleri 35; 50 ^oC'lerde koruduğu görülmüştür.

CA-I'in klasik inhibitörlerinden sülfonamid, asetazolamid, brinzolamid, dorzolamid ve topiramat ilaçları ile inhibisyon çalışmaları gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize CA-I izoenzimi için sırasıyla IC_{50} değerleri, sülfonamid için 19.083; 8.1059 μM, asetazolamid için 0.7922; 0.6655 μM, brinzolamid için 8.383; 9.539 μM, dorzolamid için 11.592; 16.618 μM, topiramat için 10.661; 16.575 μM olarak bulunmuştur. Brinzolamid, dorzolamid ve topiramat serbest enzimi, sülfonamid ve asetazolamid ise immobilize enzimi daha çok inhibe etmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz (CA), İmmobilizasyon, İnhibisyon, Afinite Kromatografisi, Saflaştırma.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF HUMAN CARBONİC ANHYDRASE-I ISOENZYME WITH AN ALTERNATIVE METHOD
MSC THESIS
İSMAİL KÖSEOĞLU
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY
(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NAHİT GENÇER)

BALIKESİR, MAY 2016

Carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1), which reversibly catalyses the transformation of CO_2 in all living things to HCO_3^- and H^+ by hidration, is a substantially significant enzyme. In this study, human hCA-I, which is one of the isoenzymes of CA, was purified by an affinity gel in the structure of Sephorore-4B-L-tyrosine-sulfonamide, and the purity degree is checked with SDS-PAGE.

The immobilization of the purified CA-I isoenzyme is performed on ω-aminohexyl agarose gel with glutaraldehyde. After the immobilization procedure, various analysis are made on free and immobilized CA-I enzymes. It is observed that for free and immobilized CA-I isoenzymes, optimum pH degrees are 10 and 9,5; active periods are 768h and 1096h; optimum temperatures are 35 ^oC and 25 ^oC; and thermal stabilities are 35 and 50 ^oC respectively.

Classic CA inhibitors, sulfonamide, acetazolamide, brinzolamide, dorzolamide and topiramate preparations, medicines are utilized in the study. The inhibition effects of these drugs on free and immobilized CA-I isoenzymes are investigated. For free and immobilized CA-I isoenzymes, the IC_{50} values for effective inhibition are 19.083 μM and 8.1059 μM for sulfonamide; 0.7922 μM and 0.6655 μM for acetazolamide; 8.383 μM and 9.539 μM for brinzolamide; 11.592 μM and 16.618 μM for dorzolamide; 10.661 μM and 16.575 μM for topiramate respectively. It was found that while brinzolamide, dorzolamide and topiramate inhibited the free enzyme more, sulfonamide and acetazolamide inhibited the immobilized enzyme more effectively.

KEYWORDS: Carbonic Anhydrase (CA), Immobilization, Inhibition, Affinity Chromatography, Purification.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
SEMBOL LİSTESİ VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... **ix**
ÖNSÖZ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi 1
1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Üçboyutlu Yapıları 2
1.1.2 Karbonik Anhidrazın Katalizlediği Reaksiyonlar 5
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması 6
1.1.4 Karbonik Anhidraz Enziminin İnhibitörleri 8
1.1.5 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi 13
1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayin Metodları 16
1.2.1 CO_2-Hidrataz Aktivitesi 16
1.2.2 Esteraz Aktivitesi 17
1.3 Enzim Saflaştırılmasının Önemi 18
1.4 Enzim İmmobilizasyonu 19
1.4.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihsel Gelişimi 21
1.4.2 İmmobilize Enzimlerin Genel Uygulama Alanları 22
1.4.3 İmmobilizasyon Çeşitleri ve Sınıflandırılması 24
1.4.3.1 Taşıyıcıya Bağlı İmmobilize Enzimler 25
1.4.3.2 Çapraz Bağlı İmmobilize Enzimler 29
1.4.3.3 Tutuklanmış İmmobilize Enzimler 31
1.4.4 İmmobilize Enzimin Özellikleri ve Avantajları 34
1.4.5 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonunun Önemi 35
1.5 ω-Amino-Heksil Agaroz Jelinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri 40
1.6 Çalışmamızın Amacı 41
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER **43**
2.1 Materyaller 43
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 43
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar 44
2.1.3 Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması 44
2.1.3.1 Afinite Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler 45
2.1.3.2 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler 46
2.1.3.3 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler 47
2.1.3.4 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler 49
2.1.3.5 CO_2-Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler 49
2.1.3.6 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler 50
2.1.3.7 İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler 50
2.2 Yöntemler 51

2.2.1 Afinite Jelinin Hazırlanması 51
2.2.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması.....54
2.2.2.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması....54
2.2.2.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu ..54
2.2.3 Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivite Tayini 55
2.2.3.1 CO_2-Hidrataz Aktivitesi.....55
2.2.4 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini 56
2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....
(SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü.....57
2.2.6 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin İmmobilizasyonu.....58
2.2.7 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimi İçin Tayinler 61
2.2.7.1 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Zamana Karşı
Aktivite Değişiminin Belirlenmesi.....61
2.2.7.2 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum pH
Değerinin Belirlenmesi.....62
2.2.7.3 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum .....
Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....62
2.2.7.4 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Termal
Kararlılığının Belirlenmesi.....62
2.2.7.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimleri Üzerine Bazı
İlaçların İnhibisyon Ekilerinin İncelenmesi.....63
3. BULGULAR 64
3.1 Enzimin Saflaştırılması 64
3.1.1 Afinite Kromatagrafisi İle CA-I Enziminin Saflaştırılması.....64
3.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini ve İmmobilizasyon Veriminin
Hesaplanması.....65
3.2.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri 66
3.2.2 İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması.....66
3.3 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin SDS-Poliakrilamid Jel .....
Elektroforezi.....67
3.4 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin İmmobilizasyonu.....68
3.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzonzimlerinin Zamana Karşı Aktivite
Değişiminin Bulunması.....69
3.6 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum pH Değerinin
Bulunması.....70
3.7 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum Sıcaklık .....
Değerinin Bulunması.....71
3.8 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Termal Kararlılığının
Bulunması.....72
3.9 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine Bazı İlaçların .....
İnhibisyon Değerlerinin Bulunması 74
3.9.1 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon .....
Etkisi Gösteren Sülfonamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar 74
3.9.2 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon .....
Etkisi Gösteren Asetazolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar.....75
3.9.3 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon .....
Etkisi Gösteren Brinzolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar.....76

3.9.4 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon ..... Etkisi Gösteren Dorzolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar.....77
3.9.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon ..... Etkisi Gösteren Topiramat Bileşiği İle İlgili Sonuçlar 78
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....80
5. KAYNAKLAR.....87

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon. 1

Şekil 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri 4

Şekil 1.3: BCA izoenziminin üçboyutlu yapısı. 4

Şekil 1.4: HCA-II izoenziminin üç boyutlu yapısı. 5

Şekil 1.5: Karbonik anhidraz enziminin CO_2-hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi. 7

Şekil 1.6: Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması. 9

Şekil 1.7: Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması. 10

Şekil 1.8: Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamidin açık yapıları. 11

Şekil 1.9: Enzim immobilizasyon yöntemleri 25

Şekil 1.10: Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlanma gösterimi. 28

Şekil 1.11: Gluteraldehit ile çapraz bağlama. 30

Şekil 1.12: Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu 31

Şekil 1.13: Enzimin polimerler arasında tutuklanması. 32

Şekil 1.14: Enzim mikrokapsülasyonu. 33

Şekil 1.15: CO_2 emisyonunu azaltmak için öngörülen metot 39

Şekil 1.16: ω-Aminoheksil agaroz jelinin kimyasal yapısı 40

Şekil 2.1: Afinite jelinin sentezlenme basamakları 53

Şekil 2.2: ω-Amino-heksil agaroz jelinin normal görüntüsü 59

Şekil 2.3: ω-Aminoheksil agaroz jeline gluteraldehit bağlandıktan sonraki görüntüsü. 59

Şekil 2.4: ω-Amino-Heksil agaroz jeline CA enziminin immobilizasyonu şeması 61

Şekil 3.1: Afinite kolonundan hCA-I enziminin elüsyonu 65
Şekil 3.2: Bradford yöntemiyle protein tayini için hazırlanan satandart grafik..... 66
Şekil 3.3: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü 68
Şekil 3.4: FT-IR spektrumu. 69
Şekil 3.5: Serbest ve immobilize karbonik anhidraz enzimlerinin % aktivite-zaman grafiği 70
Şekil 3.6: Serbest ve immobilize karbonik anhidraz enzimlerinin aktivite (EÜ)-pH değerleri..... 71
Şekil 3.7: Serbest ve İmmobilize Enzimin %Aktivite-Sıcaklık Değişimi 72
Şekil 3.8: 35 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği . 73
Şekil 3.9: 40 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği . 73
Şekil 3.10: 50 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği . 73
Şekil 3.11: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ..... metodu ile çalışılan 5 farklı sülfonamid konsantrasyonunda IC_{50} ..... değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[sülfonamid] grafiği.... 75
Şekil 3.12: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ..... metodu ile çalışılan 5 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC_{50} .... değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[asetazolamid] grafiği. 76
Şekil 3.13: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ..... metodu ile çalışılan 5 farklı brinzolamid konsantrasyonunda IC_{50} ..... değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[brinzolamid] grafiği .. 77
Şekil 3.14: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ..... metodu ile çalışılan 5 farklı dorzolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[dorzolamid] grafiği ... 78
Şekil 3.15: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ..... metodu ile çalışılan 5 farklı topiramat konsantrasyonunda IC_{50} ..... değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[topiramat] grafiği 79

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Karbanik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri..... 6

Çizelge 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri ve sülfonamidlere ilgisi. 12

Çizelge 1.3: İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri..... 21

Çizelge 1.4: İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler. 21

Çizelge 1.5: İmmobilize enzimlerin tarihsel basamakları. 22

Çizelge 1.6: İmmobilize enzimlerin potansiyel medikal uygulamaları. 23

Çizelge 1.7: İmmobilize enzimlerin en önemli endüstriyel uygulamaları. 23

Çizelge 1.8: ω-Aminoheksil agaroz jelinin özellikleri..... 40

Çizelge 2.1: Kullanılan alet ve cihazların markaları. 44

Çizelge 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları..... 48

Çizelge 3.1: İmmobilizasyon verimi tablosu. 67

Çizelge 3.2: İnhibitörlerin serbest (S) ve immobilize (İ) karbonik anhidraz I izoenzimleri üzerinde IC_{50} değerleri. 79

SEMBOL LİSTESİ VE KISALTMALAR LİSTESİ

CA	Karbonik anhidraz
CARP	Karbonik anhidraz ilgili protein
BCA	Sığır karbonik anhidraz (Eng:Bovine Carbonik Anyhidrase)
E.Ü	Enzim ünitesi
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
S	Substrat
Tris	Trihidroksimetil amino metan
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
hCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
ShCA-I	Serbest insan karbonik anhidraz I izoenzimi
İhCA-I	İmmobilize insan karbonik anhidraz I izoenzimi

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tezimin yönetiminde, oluşumunda, aynı zamanda tez sürecinde her türlü desteğini gördüğüm, sabır, anlayış ve yardımseverliğinden dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Nahit GENÇER'e

Çalışmalarımda her zaman desteğini bulduğum bilgi, tecrübe ve yaşam felsefesinden ders aldığım değerli hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve maddi manevi desteklerini gördüğüm Dr. Adem ERGÜN, Dr. Çiğdem BİLEN, Zübeyde SAÇKES'e ve aynı laboratuarı kullandığım diğer çalışma arkadaşlarıma,

Karşılaştığım her türlü engel ve zorluklarda hep yanımda olan, varlığıyla bu süreçte beni hep pozitif olarak destekleyen hayatımı paylaştığım biricik eşim Cansu KÖSEOĞLU'na

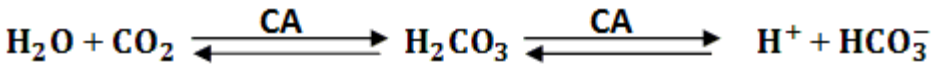
Beni Dünyaya getiren, doğumumdan bugüne kadar bana her türlü maddi manevi desteğini esirgemeyen, yanımda olmasalarda hep beni dualarıyla destekleyen değerli annem Fatma KÖSEOĞLU'na, değerli babam Recep KÖSEOĞLU'na ve hayatımdaki tüm varlıklarım olan kardeşlerime teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Balıkesir, 2016 **İsmail KÖSEOĞLU**

1. GİRİŞ

1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak 1933 yılında sığır eritrositlerinden tanımlanmıştır. Sistematik adı karbonat hidroliyaz (E.C.4.2.1.1) olarak adlandırılmıştır. CA enzimi, tüm memelilerde prokaryot, ökaryot ve arkea dokularında yaygın olarak bulunur ve yapısında Zn^{+2} iyonu bulunduran metaloenzim olarak adlandırılmıştır. Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda H^+ve HCO_3^- birikiminde rol oynamaktadır.(Şekil 1.1) Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi yer almaktadır. Bunlardan başka histokimyasal metotlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca kanıtlanmıştır[1-4].



Şekil 1.1: Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon.

Karbonik anhidraz doğada çok yaygın olup, ilk kez eritrositlerden saflaştırılmasına rağmen daha sonra hemen hemen bütün dokularda var olduğu tespit edilmiştir. Omurgalılar, omurgasızlar, bitkiler ve bakterilerden izolasyonu yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda memeli izoenzimlerinin molekül kütleleri yaklaşık 30 kDa olan monomerik proteinler olduğu bulunmuştur. Yine çalışılan tüm memeli karbonik anhidrazlarının bir çinko iyonundan ve yaklaşık 260 amino asit birimi içeren tek bir polipeptid zincirinden oluştuğu rapor edilmektedir[5].

1960'lı yıllarda insanların ve bazı hayvanların kanında bulunan karbonik anhidraz izoenzimleri A, B ve C olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra karbonik anhidraz çalışanları tarafından genetik olarak homolog izoenzimleri belirtebilmek için büyük harfler yerine izoenzimler romen rakamları ile isimlendirilmiştir[6].

Bitki karbonik anhidrazı ise ilk kez 1939 yılında yeşil bitkilerin yaprak sitoplâzmasında keşfedilmiştir. Ispanak, maydanoz, marul, mısır, soya fasulyesi gibi çok sayıda bitkiden CA saflaştırılması ve karakterilizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bitki karbonik anhidrazının molekül ağırlığı, çift çeneklilerde yaklaşık 180 kDa olup hegzamerik bir yapıya sahiptir. Her bir monomer biriminin molekül ağırlığı 30 kDa olup, bir enzim molekülünde 6 tane çinko atomu vardır. Tek çeneklilerde ise molekül ağırlığı yaklaşık 42 kDa olduğu bulunmuştur[5].

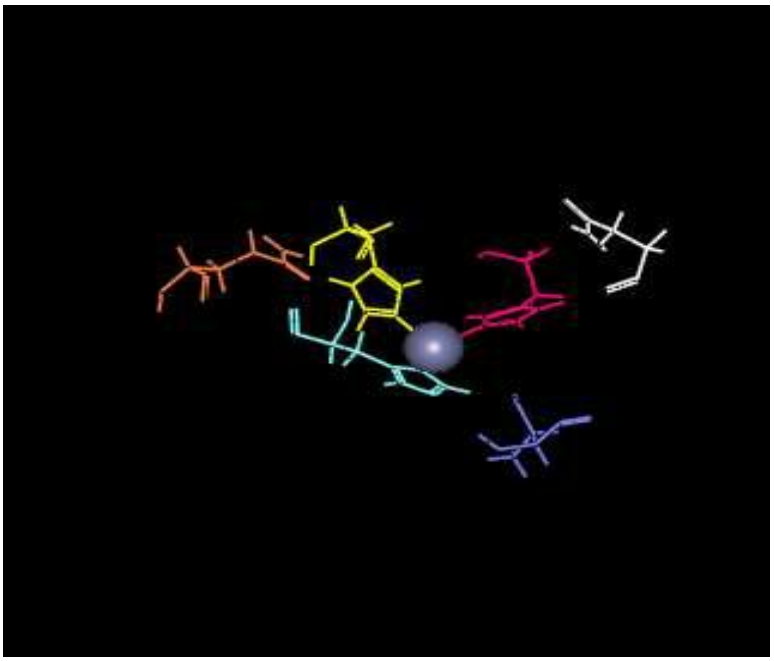
1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Üçboyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin 3 boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Özellikle, Şekil 1.3 ve Şekil 1.4'te gösterildiği üzere, BCA ve HCA-II izoenzimlerinin 3 boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına rağmen, aktif bölgelerdeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.2'te gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup,

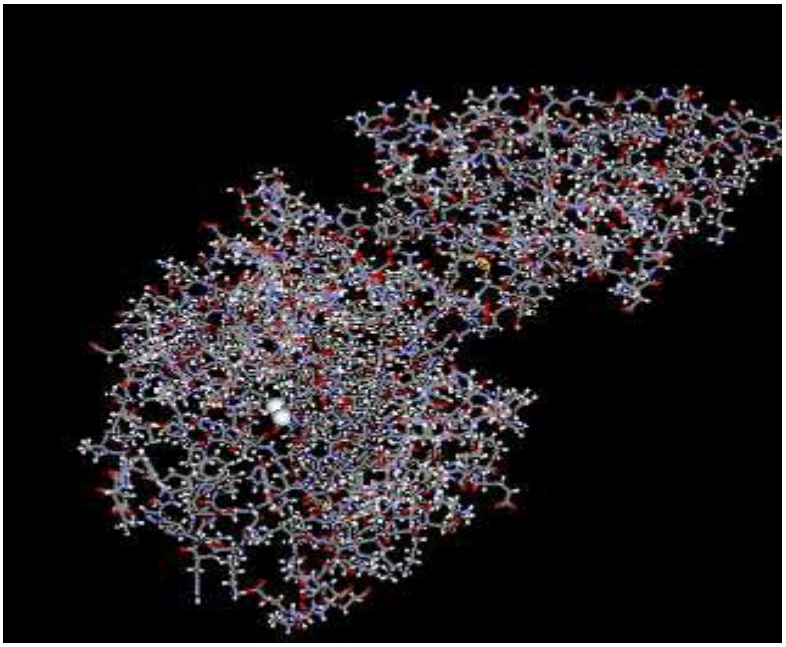
Zn^{+2} iyonunun uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, aktivitelerini kaybetmektedir[4,6-8].

İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına (hint şebeği) ait CA-I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA-III izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir[9-15].

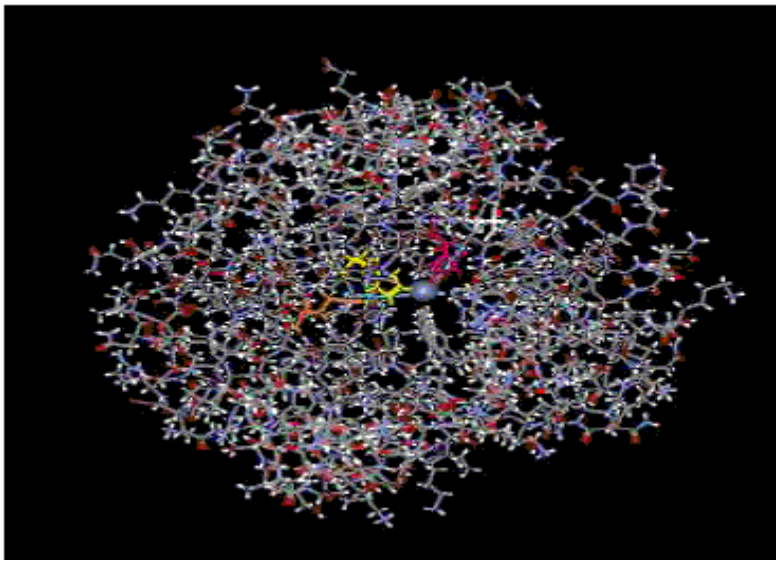
Karbonik anhidrazın bu üç izoenzimi, yapıları yönünden birbirlerine çok benzemesine rağmen, aktiviteleri çok farklıdır. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi (turnover sayısı) en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO_2-hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5'i kadardır [16,17]. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları, 28 kDa, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise 180 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66 kDa molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54 kDa molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır[11,12,18].



Şekil 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, Sarı; His 96, Pembe; His 119, Turkuaz; Gln 92, Kahverengi; Asn, 244 Beyaz)[19].



Şekil 1.3: BCA izoenziminin üç boyutlu yapısı[19].



Şekil 1.4: HCA-II izoenziminin üç boyutlu yapısı[19].

1.1.2 Karbonik Anhidrazın Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO_2 molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diole hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında (Çizelge 1.1 1. reaksiyon), aşağıdaki çizelgeden de görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik, sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir[20,21].

Karbonik Anhidraz izoenzimleri CO_2'in HCO_3^-'e (Çizelge 1.1, 1. reaksiyon), siyanatın karbamik asite, siyanamidin üreye, (Çizelge 1.1, 2. ve 3. reaksiyonlar), aldehitlerin gem-diollere hidratasyonunu (Çizelge 1.1, 4. reaksiyon), ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizini ve hidrolitik reaksiyonları geri dönüşümlü olarak katalizler (Çizelge 1.1, 5-10. reaksiyonlar)[6].

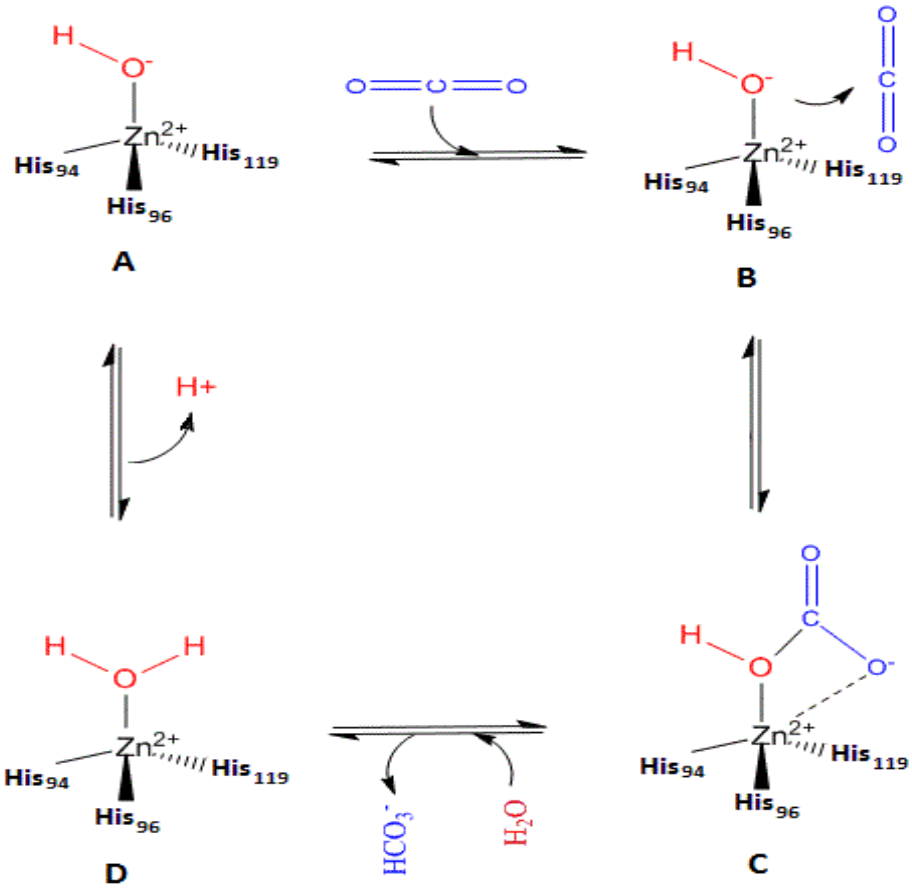
Çizelge 1.1: Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri[20].

1.	$O = C = O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
2.	$O = C = NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
3.	$HN = C = NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
4.	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
5.	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
6.	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
7.	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
8.	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar=2,4 dinitrofenil)
9.	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
10.	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Enzim kinetiği hakkında insan HCA-II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-Ray kristalografisi çalışmalarında da katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır; metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 A^o derinliğindeki bir yarığın tabanında yer aldığını göstermektedir. Diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CA' nın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu

tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Şekil 1.5)[6].



Şekil 1.5: Karbonik anhidraz enziminin CO_2-hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi[6].

Zn^{+2} iyonuna OH^- iyonunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne atakta bulunur. Bu da Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasına neden olur. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçişi gerçekleşir. Bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlamaktadır[22]. Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olmaktadır[1,23].

1.1.4 Karbonik Anhidraz Enziminin İnhibitörleri

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $R-SO_2NH_2$ kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grupları, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemleridir. hCA-II için Ki sabitleri 10^{-5} ile 10^{-10} molar arasındadır.

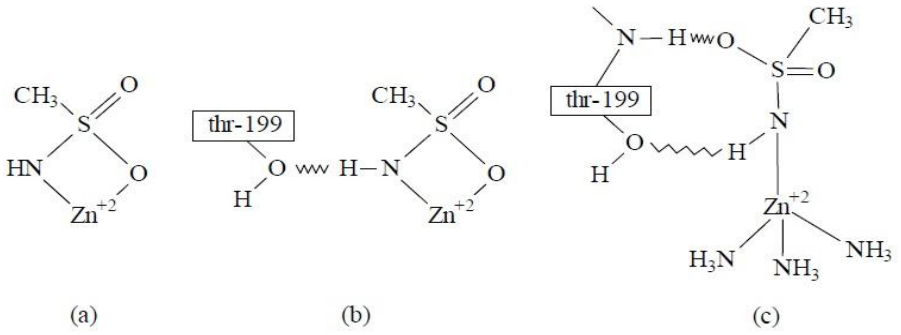
$$R-SO_2NH_2 \rightleftharpoons R-SO_2NH^- + H^+$$

Yukarıdaki rekasiyona göre sülfonamidler kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadır. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidler bu hidrofilik bölgelerine ek olarak, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgeler bulundurur. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle $R-SO_2NH^-$ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur[24,25].

Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Nitekim, sübstitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grubu taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise yalnızca hidrofilik bağlanma sonucu, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler[26].

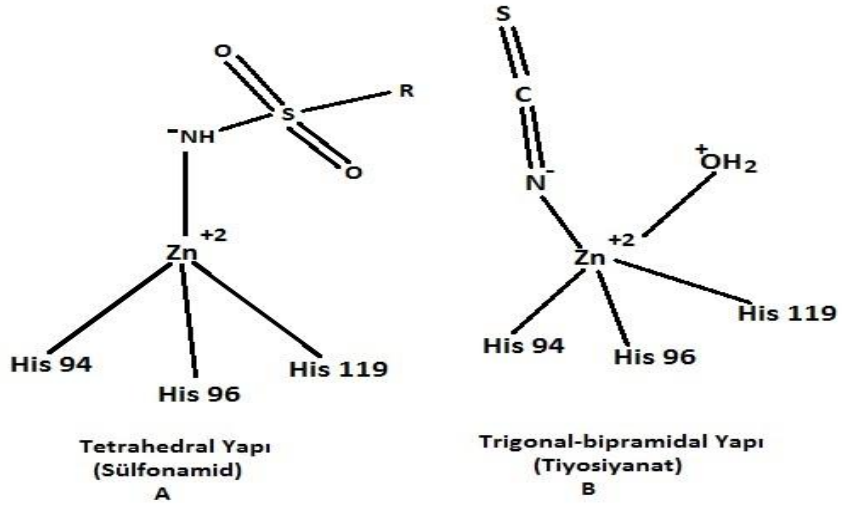
Sülfonamidlerin CA enzimine bağlanması konusundaki teorik bir çalışmada, ilk olarak Zn^{+2} tek başına düşünüldüğü zaman, metal iyonuna azot ve oksijen atomlarından koordine olduğu belirlenmiştir(Sekil 1.6a). İkinci olarak, bu bağlanmaya aktif bölgede bulunan tirozin (Thr-199)'de düşünüldüğünde sülfonamid molekülündeki –NH grubu ile Thr-199 arasında bir hidrojen bağı oluşarak daha kararlı bir yapı meydana gelmektedir (Şekil 1.6b). Son olarak, CA

enziminin aktif bölgesindeki bağlanmada rol alan Thr-199'un yanında, üç histidin grubu düşünülerek yapılan çalışmalarda, Zn-OH bağı kararsız hale geçerek, tetra koordinasyon metal kompleks bileşiği oluşur. Bunun sonucu olarak sülfonamidin oksijeni, Thr-199'un -NH grubu ile bir hidrojen bağı yaparak, en kararlı konformasyonu meydana getirmektedir (Şekil 1.6c). Bu teorik hesaplamalar, enzim-inhibitör kompleksinin (HCA-II-asetazolamid) X-ray yapı analizi ile uyum halindedir. Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koymak için, Richelds ve arkadaşları, yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde Van-der Waals etkileşmelerinden dolayı K_i değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir[19].



Şekil 1.6: Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması[19].

Zn^{+2} iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn^{+2} iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 1.6.A). Anyonlar ise Şekil 1.6.B'de görüldüğü gibi, hem metal iyonunun tetrahedral geometrisinde, hem de tiyosiyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler[19].

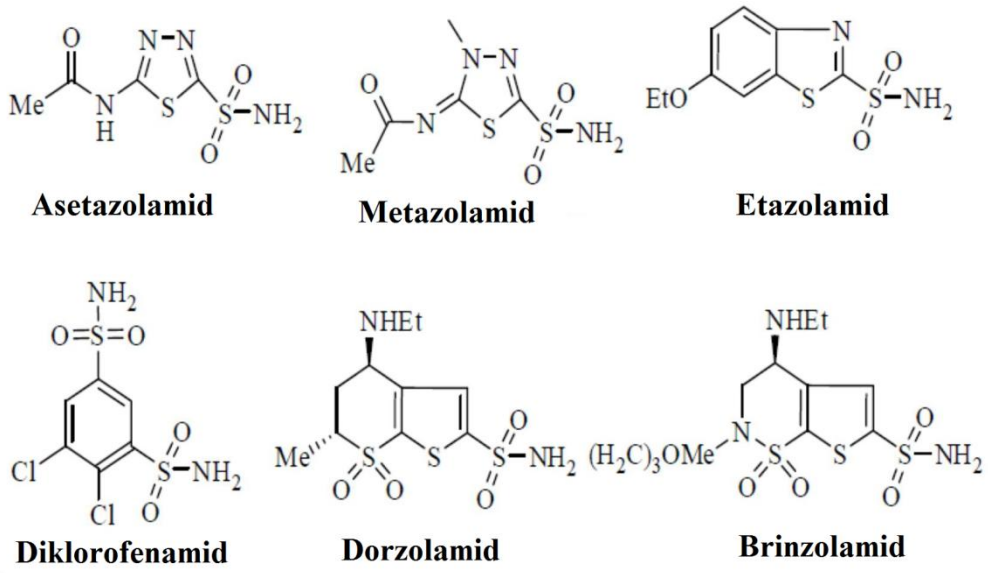


Şekil 1.7: Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından karbonik anhidraz enziminin inhibisyon mekanizması.

Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalısmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi, ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır[1].

Günümüzde bazı hastalıkların tedavisinde CA inhibitörleri etkili olarak kullanılmaktadır. Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda

bulunan hCA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır[1,27]. Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın birçok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8: Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamidin açık yapıları[28].

Karbonik anhidraz enzimi aktivitesinin bir çok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir[1,29,30]. Bu enzim birçok dokuda ilaçlar için hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçların birçoğu hayvanlarda ve insanlarda CA' nın kuvvetli inhitörü olarak bilinen sülfonamid türevleridir. Glokom gibi bazı hastalıkların tedavisinde bu enzimin inhibisyonu ile hastalığın tedavisi amaçlanmış ve hala uygulanmaktadır[31]. Karbonik anhidraz inhibitörleri iki grupta ele alınmaktadır. Birinci grup inhibitörler metallerle kompleks yapmış anyonlar ve ikinci grup inhibitörler ise enzimin Zn^{+2} iyonuna bağlanan moleküllerdir[32]. İnorganik anyon ve katyonların, CA enziminin inhibisyonu hakkında yapılan araştırmalarda, birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi

üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur[6,33,34]. Ayrıca insan eritrosit CA izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesi Pb^{+2}, Ag^{+}, Zn^{+2}, Cd^{+2} ve Cu^{+2} gibi ağır metal iyonları tarafından inhibe edilirken, Se^{+4} ve Co^{+2} iyonları tarafından da enzimin aktive edildiği belirlenmiştir[35,36].

CA izoenzimlerinin sülfonamidlere ilgisi Çizelge 1.2'de gösterilmektedir. * pH 7.4 de orta, pH 8.2 veya daha yüksek pH da yüksek ≠, ana CARP izoenzimlerinde Zn^{+2} bulunmaz, bu yüzden sülfonamid inhibitörleri için afiniteleri ölçülemez. Kısmi yönlendirilmiş mutagenez ile bu proteinlerin modifikasyonu mümkün olur ve bu şekilde CA benzeri aktivitesi olan enzimler haline dönüşmektedirler. Günümüzde bu konuyla ilgili detaylı çalışmalar yoktur. Ancak sülfonamidler tarafından bir engellenme olduğu tespit edilmiştir[1].

Çizelge 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücreiçi yerleşimleri ve sülfonamidlere ilgisi[6].

İzoenzim	**Katalitik Aktivite (CO_2 Hidrasyonu)**	**Sülfonamidlere İlgisi**	**Hücre İçi Yerleşim**
CA I	Düşük (CA II'nin %10'u)	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük (CAII'nin %0,3'ü)	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta-Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Yüksek	Salgı halinde
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP VIII	Akatalitik	≠	Sitozol
CA IX	Orta	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik	≠	Sitozol
CARP XI	Akatalitik	≠	Sitozol
CA XII	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta	Yüksek	Sitozol
CA XIV	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Yüksek	Membrana bağlı

1.1.5 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi

Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynayan CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Doku veya organlar ile akciğer arasındaki CO_2/HCO_3^-'ın solunumu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır[37-39].

CA, bitkilerde çoğunlukla kloroplastlarda ve az miktarda da sitozolde bulunur. Kloroplastlarda bulunan karbonik anhidraz, tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde bağlı CA olarak, stroma sıvısında çözünür halde bulunmaktadır. Bitki karbonik anhidraz enzimlerinin fonksiyonlarının lokalizasyonu ile yakından alakalıdır. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve elektron transport zincirine elektron vericisi olan bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarını sağlar[40,41].

Tilakoit membranlarında bağlı CA, elektron taşınmasına katılırken, stroma tilakoitlerinde bulunan bağlı CA, fotosentez sırasında CO_2 fiksasyonuna katılır. Sitoplazmik CA ise CO_2'yi transfer ederek hücrede bikarbonat havuzunu devam ettirir. CA'nın fotosenteze direk katılmasının bir ispatı fotosentez inhibitörleri Siklohegzimid'in hem fotosentezi hem de CA'yı inhibe etmesidir. Karboksilasyonu sağlayan enzimler riboloz bifosfat karboksilaz ve fosfoenol piruvat karboksilaz enzimleri ile CA'nın yakın ilişkide olması Kalvin Siklusunun önemli enzimleri olan ribuloz bifosfat karboksilaz ve oksijenaz enzimleri ile CA arasında koordineli bir artma veya azalma olması da önemli birer ispattır[42,43].

Şimdiye kadar karbonik anhidraz'ın 16 tane farklı izoenzimi bulunmuştur. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana

bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV) ve üç tanesi nonkatalitiktir (CA VIII, X, XI)[44,45]. CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümör oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir[46-48].

İnsan CA izoenzimlerinin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokuların çoğunda CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu bazı izoenzimlerin varlığı tespit edilmiştir. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri, insan eritrosit hücrelerinde bulunan izoenzimlerdir. hCA-I insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır [48]. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO_2'i, HCO_3^-'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO_3^-'ın CO_2'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2{,}5x10^5\ s^{-1}$'dir[45].

hCA-I izoenzimin fizyolojik özelliği hCA-II kadar açık değildir. hCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır[1,49,50].

Karbonik anhidrazın en çok çalışılan izoenzimi hCA-II'dir. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer hCA-I'e oranla daha azdır. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 ^oC'de $10^6 x\ s^{-1}$ olarak bulunmuştur. Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, hCA-II'nin yanı sıra hCA-IV izoenzimleri de bol miktarda bulunmaktadır[44]. Bu dokuda bulunan hCA-II izoenziminin önemi, glukoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır[51]. hCA-II izoenzimi böbrek korteksinde membrana yapışık haldedir ve Na^+ ile H_2O'nun geri emilimi sağlanmaktadır. hCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu sonucu kemiklerde kireçlenme, böbrek taşı oluşumu ve beyinde

kireçlenme meydana gelmektedir. Bu da hCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır[52].

İskelet kasında CA enzimi olarak hCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. hCA-III izoenzimi doku kapilerine CO_2 'nin difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır[53].

Bu izoenzim düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8x10^3 s^{-1}$'dir. hCA-III izoenzimi kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan dolayı, büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek miktarda bulunmaktadır. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri gibi hCA-III de *p*-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan hCA-III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır[54].

hCA-IV izoenzimi membrana bağlıdır. Böbrek membranına, bazı epitel hücrelerin membranlarına ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA-IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır. hCA-V izoenzimi de bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenezde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu izoenzim ayrıca lipogenez olayında da etkili olmaktadır. Tükrük bezinde CA enzimi olarak hCA-VI ve hCA-VII izoenzimleri vardır[55].

hCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanmaktadır. İnsan tükrüğünden saflaştırılmıştır. Tükrüğün pH dengesini hCA-VI izoenziminin

sağladığına inanılmaktadır. hCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır[56].

1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayin Metodları

1.2.1 CO_2-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO_2 molekülünün hidrasyonundan, HCO_3^- iyonunun dehidrasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir. Aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortamda ilk olarak CO_2 gazı açığa çıkmakta veya harcanmakta, diğer taraftan H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. İlk durum niceleyici olarak manomerik yöntemlerle tespit edilebilsede reaksiyon pH'sının değişken olması, CO_2 suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi nedenlerden dolayı bu yöntemin dezanavantajları da vardır[1].

$$H_2O + CO_2 \xrightleftharpoons{CA} H_2CO_3 \xrightleftharpoons{CA} H^+ + HCO_3^-$$

Ortamdaki H^+ derişiminin artması veya azalması reaksiyon pH'sını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir. Enzim saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri genellikle *Maren* ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntem kullanılarak bulunabilir. Bu yöntem, CO_2'in hidrasyonu sonucu açıga çıkan H^+ sebebiyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibine dayanır. Bu yönteme göre pH değerinin 10'den 7,4'e düşüşü için geçen süre fenol kırmızısı kullanılarak bulunmaktadır. Enzim aktivitesi, enzimsiz CO_2 hidrasyon süresi (t_o) ile, enzimli CO_2 hidrasyon süreleri (t_c)

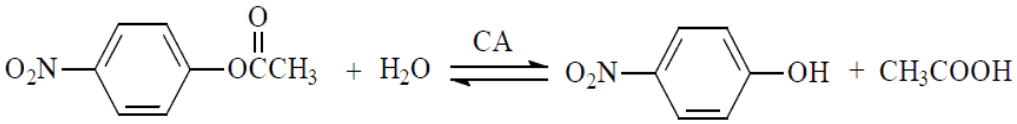
arasındaki farkın, enzimli CO_2 hidrasyon süresine (t_c) bölümüyle elde edilmektedir. Bu bağlamda;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

formülünden hesaplanabilir[57].

1.2.2 Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalısmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır[58]. Prensip olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitro fenol ve asetikasite hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi söyledir;



Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitro fenol ve asetat iyonunun izoserbestlik olduğu, yani her ikisinin de aynı absorbansı verdiği bölgedir. Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH'sına göre, değişen oranda, asetat ve H^+ iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitro fenol ve asetat iyonunun absorbansları aynı anda okunabildiği için bu durum absorbans ölçümünü etkilemez. P-nitro fenol bileşiğinin molar ekstiriksiyon katsayısı, $\epsilon_{348} = 5.4\text{x}10^{-3}\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve $\epsilon_{348} = 0.4\text{x}10^{-3}\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir[59].

1.3 Enzim Saflaştırılmasının Önemi

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden ayrı olarak keşfedilmiştir[60]. İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında ancak gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin ise CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır[61]. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir. Daha sonra CA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda tespit edilmiştir[62-66]. Enzim göz, akciğer ve merkezi sinir sistemi gibi çoğu dokuda dağılmıştır[30]. Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hâlâ bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir[67-71].

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan metod afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enzimi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından bir afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış, daha sonra 1975 yılında Whitney'in, 1976'da Chanpagnol' un, 1980 yılında Wistrand ve arkadaşlarının ve 1996'da Arslan ve arkadaşlarının, 2002' de Özensoy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda farklı afinite jelleri sentezlenmiştir[31,34,72].

Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve molekül kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992' de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış, SDS-PAGE yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve molekül kütlesi 32 kDa olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzimin doğal molekül kütlesini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31 kDa olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*' dan saflaştırılan CA'nın molekül kütlesi 32 kDa olarak belirlenmiştir. Karbonik anhidraz enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan

hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridir[31]. Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır[30,73].

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, biyokatalizörlerin diğer bir söylemle enzimlerin kullanım alanlarının artmasına neden olmuş ve yeni uygulama alanlarının da ortaya çıkması ile enzimlerin saf olarak elde edilmesi daha büyük önem kazanmıştır[74].

Proteinlerin saf olarak eldesi kendisi için son nokta değildir, saflaştırılması istenen protein eldesi daha sonraki çalışmalar için gereklidir. Bu çalışmalar proteinin aktivitesi, yapısı ya da işlev ilişkileri üzerinde olabilmektedir. Protein fonksiyonlarının anlaşılmasında ilk temel adım bize, onları gözlemleme ve kullanma kolaylığı sağlayacak olan saflaştırma işlemidir. Proteinlerin saflaştırılmasıyla proteinlerin, aminoasit dizilerini, proteinler arasındaki evrimsel ilişkileri belirleyebilir ve farklı organizmalardaki bir proteinin biyokimyasal fonksiyonlarını inceleyebilmekteyiz. Bir saflaştırma tekniğinin hedefi proteini en düşük maliyet, yüksek derecede saflık ve verimle elde etmektir. Bunu başarabilmak için saflaştırma tekniğinin ve adımlarının seçimi akıllıca yapılmalı ve adım saysını en aza indirecek sekilde sıralanmalıdır.

1.4 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, canlı sistemlerinde kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Belirli bir düzen ile sıralanmış binlerce atomdan meydana gelmiş bu moleküller, canlı hücrelerde gerçekleşen farklı kimyasal reaksiyon topluluklarının katalizlenmesini sağlarlar. Biyolojik proseslerde, hastalık ve sağlıktaki rolleri geniş bir şekilde incelenmektedir[75].

Enzimler oldukça ılıman koşullarda, yüksek derecede substrat seçiciliği ile reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptir. Böylece yan ürün oluşumunu azaltır. Katalizlenen reaksiyonlar arasında, mevcut organik kimya metodlarıyla ulaşılamayan, biyolojik makromoleküller arasında son derece fazla, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları vardır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımları için son derece önemli kılmıştır[76]. 20. yüzyılın başlarında, enzimlerin fermantasyon işlemlerinden sorumlu olduğu bulunmus, yapıları ve kimyasal bileşenleri dikkatle inceleme altına alınmıştır. Bunun sonucunda biyolojik katalizlerin geniş kapsamlı teknolojik kullanımı tekstil, ilaç ve diğer kimya endüstrisi gibi farklı alanlara da öncülük etmiştir[77]. Ancak pek çok enzimin kararsız olması, saflaştırılması için oldukça yüksek ücret gereksinimi ve kullanıldıktan sonra reaksiyon karışımından aktif enzimin tekrar kullanımı için kurtarılması teknik olarak oldukça zordur[75]. Enzimler çözeltide tek başına, diğer bileşenleriyle kümeleşerek veya bir yüzeye bağlı olmak gibi değişik durumlarda kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler. Yüzeye bağlanma veya "immobilizasyon" özellikle teknik kullanım için üzerinde son derece yoğunlaşılan durumdur[78].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalatik aktivitelerinin de korunması, bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak ifade edilebilir[79,80]. İmmobilize edilmiş enzimler genel olarak endüstriyel uygulamalarda katalatik özelliklerinin yanında, ekonomik olarak da son derece geliştirilmiş olmasının önemi bir hayli fazladır (Çizelge 1.3)[81].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Japonya'nın Tanebe Seiyaku Limited Şirketinde Chibata ve arkadasları tarafından, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae aminoasilaz*'ın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir[82]. İmmobilize enzimlerin diğer önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak verilebilir (Çizelge 1.4). Bunun yanında bazı endüstriyel proseslerde, istenilen enzimi içeren bütün mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılabilir[83].

Endüstriyel olarak uygulamalarından başka, biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıpda kullanılan ilaçlardaki pekçok biyoteknolojik ürünlere enzim immobilizasyonunun temel teşkil ettiği görülmektedir[84].

Çizelge 1.3 İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri[81].

Avantajları	**Dezavantajları**
Katalizin tekrar kullanımı	Aktivitede kayıp veya azalma
Kolay reaktör kullanımı	Difüsyonel sınırlama
Kolay ürün ayrılması	İlave maliyet
Geniş oranda reaktör seçimi	

Çizelge 1.4: İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler[83].

Enzim	**Ürün**
Glukoz izomeraz	Yüksek miktarda fruktoz şurup
Aminoasit amidaz	Aminoasit ürünü
Penisilin amidaz	Yarı sentetik penisilin
Nitril hidrataz	Akrilamid
β-Galaktosidaz	Laktoz hidrolizinde

1.4.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihsel Gelişimi

İmmobilize biyokatalizörlerin gelişimini Çizelge 1.5'te özetlendiği gibi üç basamakta göstermek mümkündür. İlk basamakta, 19. yüzyılın başlangıcında, immobilize edilmiş mikroorganizmalar pek çok deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmaların bazıları, sirkenin mikrobiyal ürününün, bakteri üremiş ağaç talaşının üzerine alkol içeren solüsyonların damlatılması ile elde edilmesi ve süzme filtrelerinin geliştirilmesi ile atık su arıtma işlemleridir[85].

Modern enzim immobilizasyonunun tarihine bakmak için 1940'ların sonlarına gitmek gerekir. Ancak o dönemde yapılan ilk çalışmaların pek çoğu diğer disiplinlerin dergilerinde basıldığı için pek çok biyokimyacı tarafından önemsenmez. Güncel teknolojilerin temelleri 1960'larda geliştirilmeye başlanmış ve bu tarihten itibaren bu konu ile alakalı pek çok çalışma yayınlanmıştır. İkinci basamakta, sadece tek enzimler immobilize edilerek kullanılmış ancak 1970'lerde canlı hücreler ve kofakör rejenerasyonu ile iki enzimli reaksiyonları içeren daha kompleks sistemler geliştirilmiştir. Son basamağa örnek olarak L-aminoasit dehidrogenaz enziminin, α-keto asitlerden, aminasyon reaksiyonu ile L-aminoasit üretimini verebiliriz. Bu yöntem nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve koenzimlerin rejenerasyonunun formik asidin, karbon diokside enzimatik oksidasyonuna, NAD^+ dan NADH'a indirgeme reaksiyonu eşlik eden aminasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ikinci enzim, format dehidrogenazdır[86].

Çizelge 1.5: İmmobilize Enzimlerin Tarihsel Basamakları[85].

Basamak	Tarih	Kullanım
Birinci	1815	Asetik asit ve su arıtma işlemleri gibi deneysel kullanım
İkinci	1960'lar	Tek enzim immobilizasyonu: L-aminoasitlerin üretimi, glikozun izomerizasyonu
Üçüncü	1985-1995	Kofaktör rejenerasyonu içeren çoklu enzim ve hücre immobilizasyonu: Membran reaktörleri içinde, keto-asitlerden, L-aminoasitlerin üretimi

1.4.2 İmmobilize Enzimlerin Genel Uygulama Alanları

İmmobilize enzimlerin mevcut ve potansiyel önemli endüstriyel uygulamaları aşağıdaki Çizelge 1.7'de ve önemli bazı medikal uygulamaları ise Çizelge 1.6'da verilmiştir[87].

Çizelge 1.6: İmmobilize enzimlerin potansiyel medikal uygulamaları.

Enzim	**Uygulama Alanı**
Asparginaz	Lösemi
Arginaz	Kanser
Üreaz	Yapay böbrek, üre rahatsızlıkları
Glukoz Oksidaz	Yapay Pankreas
Karbonat Dehidrataz + Katalaz	Yapay Akciğer
Katalaz	Akatalasemi
Glukoamilaz	Glikojen depolama rahatsızlığında
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz	Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Kusurlarında
Ksantin Oksidaz	Lesch-Nyhan rahatsızlığında
Fenilalanin Amonyak Liyaz	Fenilketonuria
Ürat Oksidaz	Hiperurikamia
Heparinaz	Ekstrakorporeal terapi süreçlerinde

Çizelge 1.7: İmmobilize enzimlerin en önemli endüstriyel uygulamaları.

Enzim	**Substrat**	**Ürün**
Glukoz İzomeraz	Glukoz	Fruktoz
β-Galaksidoz	Laktoz	Glukoz ve Galaktoz (laktozsuz süt)
Lipaz	Trigliserit	Kakao yağı eşdeğerleri
Aminoaçilaz	D,L-Aminoasitler	L-Aminoasitler (metionin, alanin, fenialanin, triptofan, valin)
Raffinaz	Rafinoz	Galaktoz ve sukroz (rafinozsuz çözeltiler)
İnvertaz	Sukroz	Glukoz/Fruktoz karışımları (invert şeker)
Aspartat Amonyak-Liyaz	Amonyak+Fumarik Asit	L-Aspartik Asit (sentetik tatlandırıcı aspartamın üretimninde kullanılır)
Termolisin	Peptidler	Aspartam
Glukoamilaz	Nişasta	D-Glukoz

Çizelge 1.7'nin devamıdır.

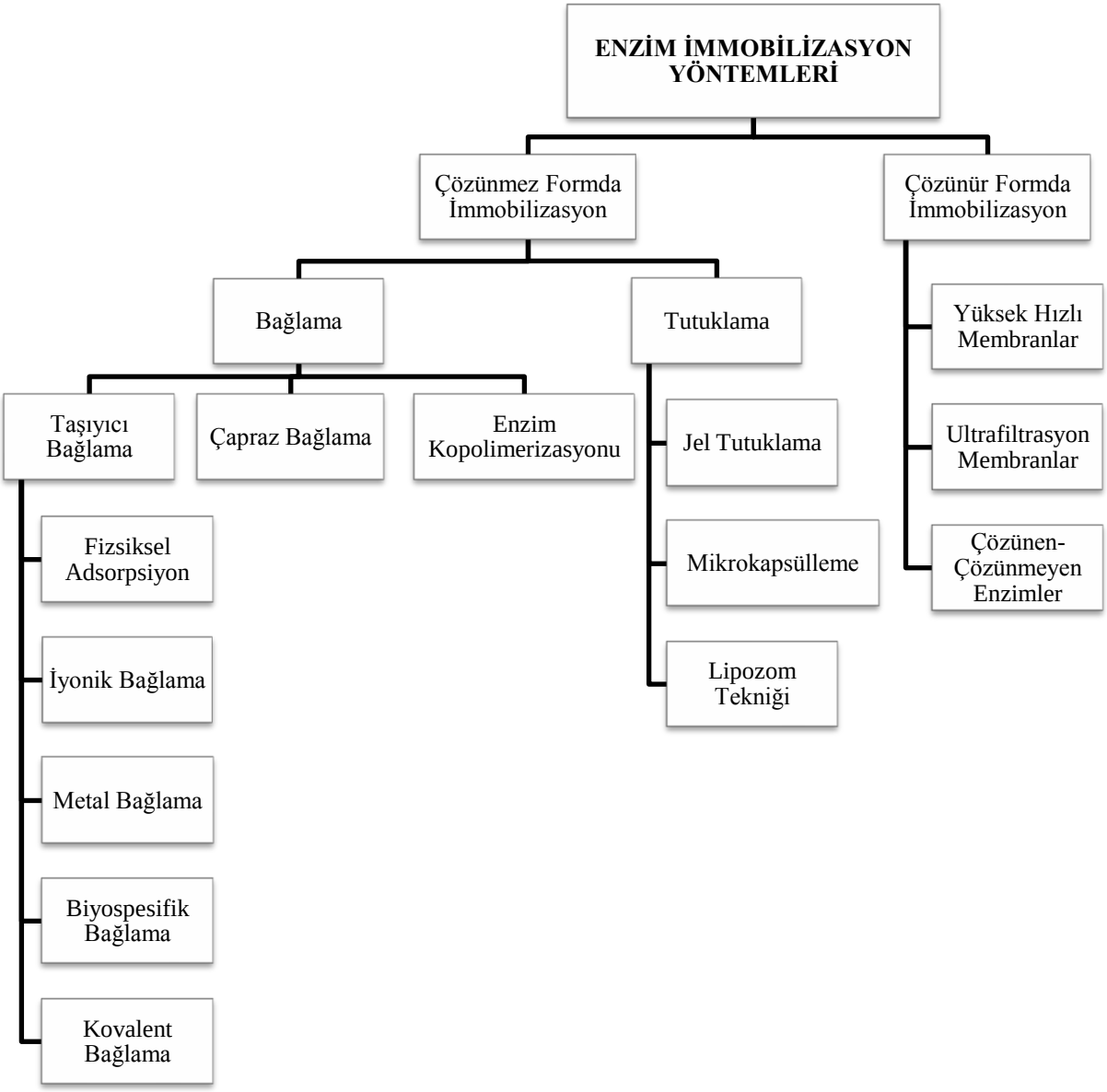
Enzim	**Substrat**	**Ürün**
Papain	Proteinler	Biradaki soğuk sisin uzaklaştırılmasında kullanılır
Hidantoinaz	D,L-Aminoasit Hidantoinler	D,L-Aminoasitler
Penisilin Amidaz	Penisilin G ve V	6-Aminopenisilanikasit
β-Tirozinaz	Pirokatekol	L-DOPA

1.4.3 İmmobilizasyon Çeşitleri ve Sınıflandırılması

Enzim immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi gerekir. Ayrıca üretim için biyokatalizör açısından optimal koşulların saptanmasında yalnız immobilizasyon yöntemi değil aynı zamanda taşıyıcı ve reaktör tipi de önemli rol oynamaktadır[88].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır[89].

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın etkileşim ve kullanılan desteğin özellikleri esas alınarak Şekil 1.9'da gösterildiği gibi bir sınıflandırma yapılabilir[90].



Şekil 1.9: Enzim immobilzasyon yöntemleri[90].

1.4.3.1 Taşıyıcıya Bağlı İmmobilize Enzimler

Taşıyıcıya bağlama uygulanan en eski immobilizasyon yöntemidir. Enzim proteinleri kimyasal aktif gruplar içeren aminoasit parçalar, iyonik gruplar ve/veya hidrofobik gruplar ile hidrofobik alanlar içermektedir. Bu gruplar, kovalent bağ, iyonik bağ ya da fiziksel adsorpsiyon yöntemleriyle enzimlerin

immobilizasyonunu sağlarlar. Taşıyıcıya bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası aktivitesi taşıyıcının doğasına bağlıdır.

Taşıyıcının seçimi enzimin yapısına bağlı olduğu kadar aşağıdaki kriterlere de bağlıdır:

- Partikül boyutu,
- Yüzey alanı,
- Hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranı,
- Kimyasal yapı.

Genel olarak hidrofilik grupların oranındaki ve bağlanan enzimin konsantrasyonundaki artış immobilize olan enzimin aktivitesinin daha yüksek olmasını sağladığı belirlenmiştir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; selüloz, dekstran, agaroz ve poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir[91]. Enzimin bağlanma türüne göre taşıyıcı bağlama yöntemi alt sınıflara ayrılabilir:

İyonik Bağlama

Bu metot uygulanmasının kolay olması, desteklerin yenilenebilir olması ve enzimlerin modifiye olmaması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kullanılan tampon, pH, iyonik kuvvetler ve sıcaklık gibi değişkenlerden etkilenmektedir.

Fiziksel Adsorpsiyon

Biyokatalizörler çoğu zaman taşıyıcılara, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, Van der Waal's kuvveti ya da bunların kombinasyonları gibi fiziksel yöntemlerle bağlanırlar. Biyokatalizörlerin herhangi bir modifikasyona uğramadan immobilize olmalarına rağmen, biyokatalizörle destek arasındaki etkileşim genellikle zayıftır ve sıcaklık ya da reaktan konsantrasyonu gibi dış etkenlerden etkilenirler. Çesitli inorganik destekler kullanılır. Sentetik reçineler ya da çitosan gibi doğal malzemeler de yüksek adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle

kullanılabilirler. Adsorpsiyonun ardından glutaraldehitle (GA) çapraz bağlama immobilize enzimin aktivitesini stabilize eder. Proteinlerle kuvvetli bağ kuran tanin de immobilizasyonun ardından uygun bir ligand olarak kullanılabilir. Uygun koşullarda destekler yeniden elde edilebilir[92].

Kovalent Bağlama

Kovalent bağlı metodlarla proteinlerin immobilizasyonu, immobilizasyon metodları içerisinde en fazla kullanılan metodlardan birisidir[93]. Bu metodu kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiye geri kaçısı önlenmiş olmaktadır[94]. Ancak bağlanma aktivite yüzdesini artırmak için kullanılan temel amino asit rezidülerinin taşıyıcıya kovalent bağlanması engellenmelidir. Bu durum bazı durumlarda uygulamanın ne kadar zor şartlar gerektirdiğini gösterir[95].

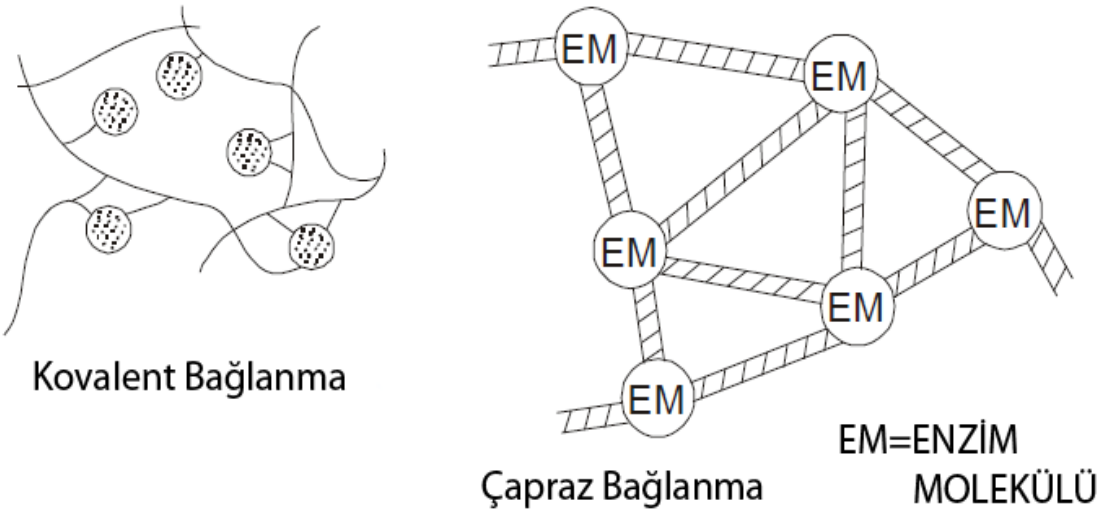
Kovalent bağların formasyonu genellikle enzimde gösterilen aminoasitlerin yan zincirlerinde görülür. Ancak onların asıl bağ güçlerinin aktiviteleri asağıda verilen yüklerin sıralamasıyla önemli derecede ilişkilidir:

$$-\mathrm{S}^{-} > -SH > -\mathrm{O}^{-} > -\mathrm{NH}_2 > -\mathrm{COO}^{-} > -OH \gg -\mathrm{NH}_3$$

Bunun yanında sülfit, sülfidril, oksit, amino, karboksil, hidroksil, amonyum, imino, amid, metiltiyol, guanidil ve fenol halkası gibi pekçok fonksiyonel grup içeren parçalar kimyasal bağlarda etkin olarak görev alır[96].

Bir enzimin kovalent bağlanması, ya polimerin reaktif gruplar içeren ajanlarla (etilenin kopolimerizasyonu, maleik asidin anhidridi) veya polimer ve enzimin arasında köprü vazifesi görecek iki fonksiyonlu ajanların etkilesmesiyle oluşur[97]. Bunun yanında üç boyutlu yapı düşük molekül ağırlıklı iki fonksiyonlu ajanlarla çapraz bağlı yapılar oluşturabilir. Bu durumda enzim inaktif olabilir. Çünkü reaksiyonlar enzimin aktif bölgesinde yerleşmiş olan fonsiyonel

gruplarla bağ oluşturabilir. Böylece elde edilen net sonuç enzimin aktivitesinin kaybı şeklindedir[98].



Şekil 1.10: Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlanma gösterimi[96].

Kovalent bağla immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

- Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşılmaz,
- İmmobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur,
- Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı-kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağın dezavantajları da vardır, bunlar ise:

- Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir,
- Enzim moleküleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açar;

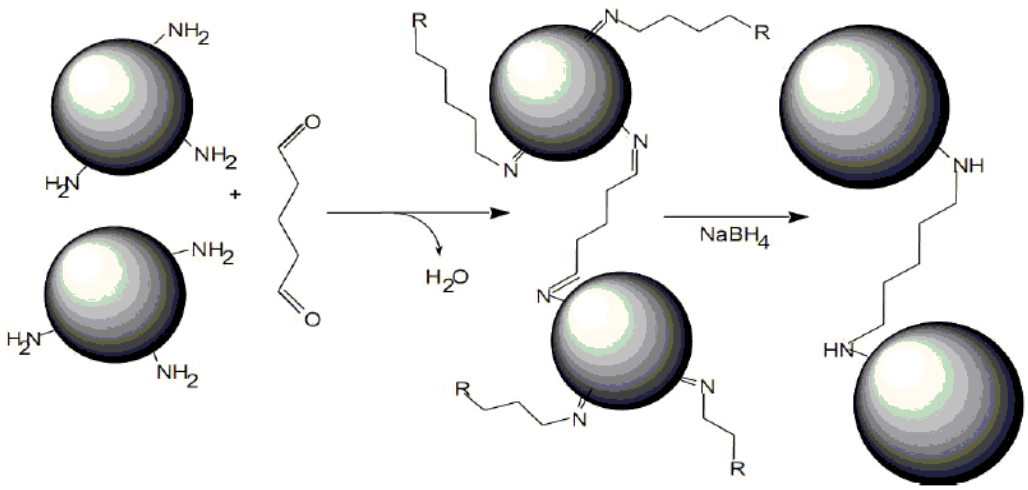
- İmmobilizasyonun optimum koşullarını bulmak zordur,
- Destekler genellikle yenilenebilir değildir. Bu nedenle bu metot daha çok kararlılığın kovalent bağlanma yöntemiyle arttığından emin olunan enzimler için uygundur.

Tüm bu dezavantajlarına rağmen, kovalent bağlanma analitik amaçlı immobilizasyonlarda kullanılır.

Yukarıda bahsedilen tüm immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse, adsorpsiyon kolay, ucuz ve efektiftir ancak çoğunlukla kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlenir. Tutuklama ve mikrokapsülleme yönteminde ise difüzyon problemleri gözlenir. Enzimin kovalent bağlanma ile bir taşıyıcıya bağlanması endüstriyel açıdan en cazip yöntem olarak öne çıkmaktadır. Çünkü kovalent bağlanma özellikle çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında efektif ve kararlıdır. Çapraz bağlama ajanı olarak da en iyi sonuçlar glutaraldehit ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Kovalent bağlanmanın uygulanacağı taşıyıcıya ait de günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Organik ya da inorganik, doğal ya da sentetik pek çok madde denenmiş ve çitin veya çitosan içlerinde en ön plana geçen iki malzeme olmuştur[87,92,99,100].

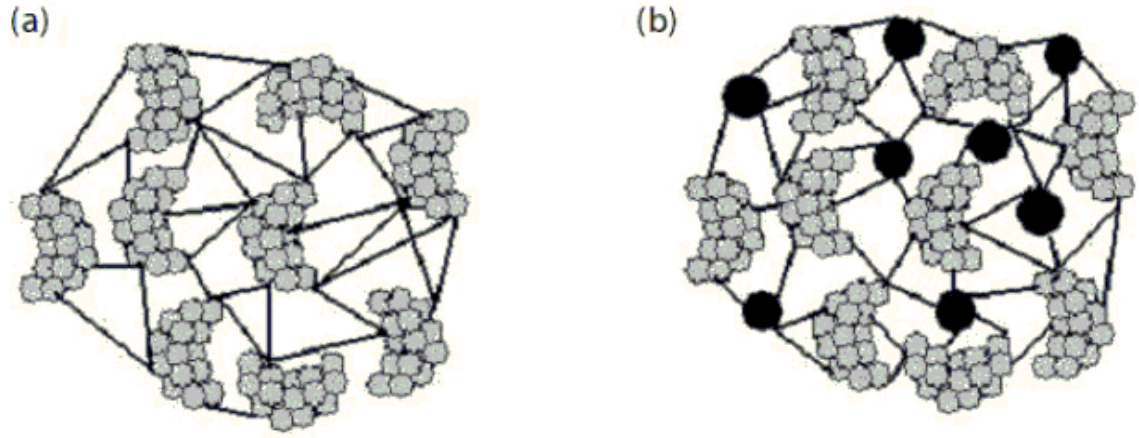
1.4.3.2 Çapraz Bağlı İmmobilize Enzimler

Çapraz bağlama yöntemi iki ya da çok fonksiyonlu reaktifler aracılığıyla enzim veya aktif molekülleri arasında kovalent bağlar oluşumuna dayanmaktadır[58,101]. Ayrıca proteinlerin çözünmeyen taşıyıcıya çapraz bağlanmasıyla immobilizasyonu, substrat çözeltisindeki enzim kaybını önlemektedir[102-104]. Bireysel biokatalitik birimleri (enzimler, organeller, tüm hücreler) iki ya da çok fonksiyonlu reaktifler (örneğin: glutardialdehid, glutaraldehid, diizosiyanat, heksametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat, vb.) yardımıyla birbirine birleştirilmiştir (Şekil 1.11)[105].



Şekil 1.11: Gluteraldehit ile çapraz bağlama[105].

Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulması zordur[106]. Enzim aktivitesi reaksiyon süresi, pH, sıcaklık, iyonik siddet, çapraz bağlayıcı madde enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Enzimin çapraz bağlanması genelde lizinin amino grupları aracılığı ile gerçekleşir. Ancak bazı durumlarda sisteinin sülfidril grupları, tirozinin fenolik hikroksil grupları veya histidinin imidazol grubu da bağlanma için kullanılabilir. Şekil 1.12'de biokatalistlerin basit bir çapraz bağlanma yöntemi ile inert moleküllerle immobilizasyonunu gösterir(Şekil 1.12.a). Ayrıca ko-çapraz bağlamada mekanik ve enzimatik immobilizasyon hazırlığını geliştirmek için yüksek polimer ağında inert moleküller birleştirilmiştir(Şekil 1.12.b)[107].



Şekil 1.12: Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu[107]. (a. İnert moleküllerle, b. ko-çapraz bağlama)

Çapraz bağlama reaksiyonu çok zor koşullarda gerçekleşir. Bu zor koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilir. Bu da bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybına yol açabilmektedir.

Bu yöntemin sahip olduğu avantajlar aşağıda verilmiştir:

- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilir.
- Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşir.
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal süreçlerden az derecede etkiler.

1.4.3.3 Tutuklanmış İmmobilize Enzimler

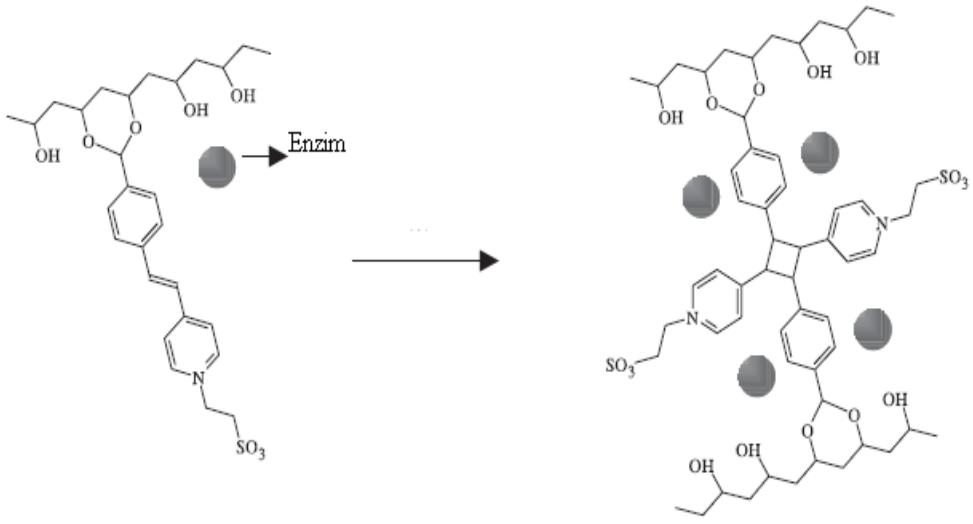
Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekanda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer

matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılır.

Jel Tutuklama Tekniği (Polimer Matrikste Tutuklama)

Yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır (Şekil 1.13). Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-Metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir[108].

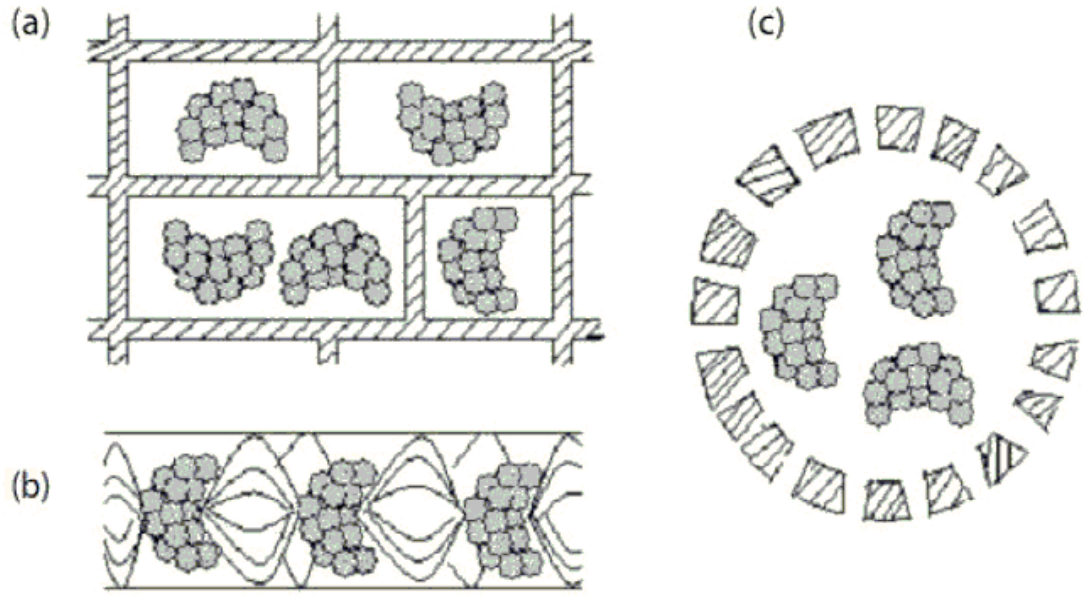
.



Şekil 1.13: Enzimin polimerler arasında tutuklanması[108].

Mikrokapsülleme Tekniği

Mikrokapsülleme yöntemi, enzim moleküllerin küresel yarı geçirgen polimer membranlar içinde hapsedilme temeline dayanır (Şekil 1.14)[107]. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır[109]. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır. Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonu olasılığını arttırır. Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir. Bu yöntemin en büyük dezavantajları mikroenkapsülasyon sırasında enzimin bazen inaktive olması ve immobilizasyon için yüksek enzim konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca, enzimi hapsetmek için, gözenek boyutunun çok düşük olması gerekir ve bu sistemler difüzyon sınırlı olma eğilimindedir[90,107].



Şekil 1.14: Enzim mikrokapsülasyonu[107]. (a. Matriks, b. Lif, c. Kapsül)

Lipozom Tekniği

Sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktif olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.

1.4.4 İmmobilize Enzimin Özellikleri ve Avantajları

İmmobilize enzimler bazı avantajlarından dolayı serbest enzimlere göre daha kullanışlı moleküllerdir[110,111].

Bu avantajları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşturmaz.
- Birden fazla kez kullanılabilirler.
- Serbest enzime kıyasla daha kararlıdırlar.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Çevre koşullarında (pH, sıcaklık gibi) daha dayanıklıdır.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Birbirini izleyen çok basamaklı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterir.
- Enzimlerin kendi kendini paraçlaması (otoliz) olasılığını azaltır.
- Mekanik çalışmalar için uygun ve otomatik işlemlere imkan verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar, üretim kaybı azalır.

İmmobilizasyonun avantajlarının yanında immobilize enzimin aktivitesinde kayıp veya azalma, difüzyonel sınırlamalar, ilave maliyet ve işlem süresinin uzaması gibi dezavantajları da vardır[81].

Özellikle son 40 yıla baktığımızda, immobilizasyon teknikleri hızla gelişmiştir ve aynı hızla devam etmektedir. Aynı zamanda immobilizasyon teknikleriyle ilgili tasarımlar önemli oranda artmıştır. Ancak hâlâ istenilen düzeyde değildir. Bu bağlamda yapılan çalışmaların katlanarak artması gerekir. İmmobilize enzimlerin diğer pratik işlemlere uygulanabilirliğini arttırmak için yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve mevcut yöntemlerin daha iyi kavranması ve geliştirilmesi için daha çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.4.5 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonunun Önemi

Karbonik anhidraz enziminin immobilizayonu ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Bu çalışmada literatürde yapılan çalışmaların dışında farklı bir metot ile karbonik anhidrazın immobilizasyonu gerçeleştirilmiştir.

$$H_2O + CO_2 \underset{}{\overset{CA}{\rightleftharpoons}} H_2CO_3 \overset{CA}{\rightleftharpoons} H^+ + HCO_3^-$$

Yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü gibi, ortamda ilk olarak CO_2 gazı açığa çıkmakta veya harcanmakta, diğer taraftan H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. İlk durum niceleyici olarak manomerik yöntemlerle tespit edilebilse de reaksiyon pH'sının değişken olması, CO_2'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi nedenlerden dolayı doğada hızla karbondioksit artışı gözlenmektedir. Artan CO_2 konsantrasyonu, atmosferik bir küresel ısınma ve iklim değişikliği ile sonuçlanmaktadır. CO_2 emisyonunu azaltmak için geliştirilmiş enerji verimliliği, düşük karbonlu yenilenebilir yakıt ve karbon yakalama veya hapsetme teknikleri geliştirilmiştir. Atmosferde bulunan serbest

CO_2 miktarını önlemek için geliştirilen yöntemlerden bazıları mineral karbonizasyon, okyanusa hapsetme, jeolojik hapsetmedir[112,113].

CO_2 küresel ısınmaya neden olan gazlardan en önemli olanıdır. Sanayi devrinin başlarında atmosfere salınan CO_2 miktarı sanayi başına yaklaşık 250 ppm'den şu anda yaklaşık 394 ppm'e yükselmiştir. Böyle fosil yakıtlı enerji santralleri, çelik üretimi gibi birçok sanayi, doğal gaz arıtma ve petrokimya endüstrisi gibi kuruluşlar CO_2 miktarını artırmaya halen devam etmektedir. Kapsamlı biyolojik araştırmalar katalizörler kullanarak karbon tutumu ile CO_2 azaltma yöntemleri üzerine çalışmalar sürdürmektedir. Bu yaklaşımda, bir biyolojik katalizörlerden olan karbonik anhidraz enzimi, CO_2 molekülünü bikarbonata dönüştürmek için kullanılır. Karbonik anhidraz enzimi, CO_2'in hidrasyon oranını hızlandıran bir biokatalizör olduğundan, sürekli olarak CO_2 oranını azaltmak için yeni metotlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır[114].

CA enzimi ile CO_2'in sudaki çözünürlüğü arttırabilir. Ancak, serbest karbonik anhidraz enzimi zamanla aktivitesini kaybedebilir. Kısa zamanlarda çözüm üretilmediğinde, serbest CA'nın tekrarlanabilir kullanımı ve CO_2 tutumu yönündeki hedefler mümkün olmayacaktır. Bununla birlikte, enzimlerin, pahalı olması, saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı immobilize edilmesi tekrar kullanım için en önemli yöntemdir. İmmobilize edilmiş CA, hidrasyonu hızlandırmak için sulu bir çözelti içinde biomimetik CO_2 tutucu olarak görev alabileceği sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda tekrarlanan yöntemlerle CA ile ilgili çalışmalarda farklı katalizörler keşfetmeye katkı sağlayacaktır[112].

Biyolojik katalizörlerin yüksek düzeyde katalitik etkinlik ve seçicilik gibi birçok avantajı vardır. Bununla birlikte, yüksek maliyeti, sınırlı kararlılık gibi çeşitli uygulama sorunları ortaya çıkar. Bu sorunların üstesinden gelmek için, biyolojik katalizör olarak görev yapan CA enziminin katı bir destek üzerinde immobilizasyonu bu sorunu ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Termal ve

çalışma kararlılığını artırmak ayrıca bu enzimi uzun süre kullanmak için CA'nın immobilizasyonu yararlı bir tekniktir[113]. Bu yaklaşım ile CA kullanarak CO_2'in azaltılabilmesi için yeni reaktörler geliştirilmesine ve çevre dostu bir sürecin başlatılmasına katkı sağlayabilir. Serbest karbonik anhidraz enziminin pahalı saflaştırma teknikleriyle saflaştırılması ve reaksiyondan sonra tekrar kullanılamaması gibi dezavantajlardan dolayı aktivitesini kaybettiği için uzun süre kullanılamaz. Enzimlerin uzun süre kullanılabilmesi için immobilizasyon iyi bir yöntemdir. Bu yöntem enzimi yeniden kullanabilmek ve aynı zamanda sürecin ticarileştirilmesi için en iyi yaklaşımlardandır[115].

CO_2 tutuklama yönteminin avantajları arasında, çevre dostu olması, ortam sıcaklığında çalışılması, sulu çözelti içinde gerçekleştirilebilir olması, özgün bir çözüm olması, düşük konsantrasyonda çalışılması vb. maddeler sıralanabilir. Karbonik anhidraz hayvan, bitki ve bakterilerde ortak bulunan bir enzimdir. Bu nedenle bu enzim, karbon dioksit ile suyun bikarbonata dönüşümünü katalize eden temel moleküldür[113].

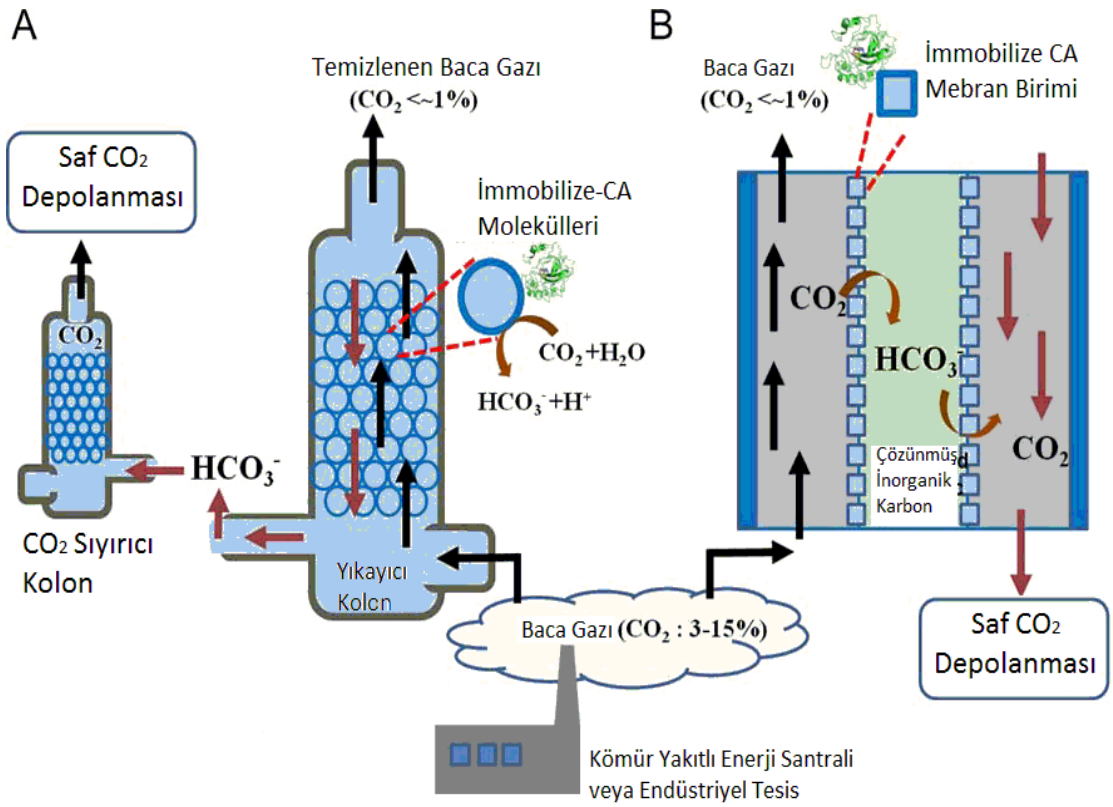
Çeşitli mikropların içinde CA'ların yeni sınıflarının açıklanması hiç süphesiz gelecekte keşfedilerek, bu enzimin yeni sınıfların bulunması sürpriz olmayacaktır. Prokaryotik sistemlerde bu enzimin önemli bir rol oynaması bunun bir göstergesidir. Ancak, CA'nın yapısı tamamen bilinen CO_2 geri dönüşümlü hidrasyonunun rolünün yanında yeni işlevlerini ortaya çıkarabilir. Bu da enzimolojinin yeniden düzenlenmesine gerek duyulabilir. $CaCO_3$ çevresel açıdan önemli bir mineral olduğundan karbonatlar halinde CO_2 tutumu için CA'nın kullanılması mükemmel bir yaklaşımdır. Bunun yanında bu işlem sistemin son derece yüksek maliyetli olmasını doğurur. CO_2'in hidrasyonunu artırmak için CA'ın kullanılması, reaksiyon ortamına protonun hızla oluşmasının bir sonucu olarak, pH'de bir azalma görülür. Asidik pH aralığında gerçekleşen reaksiyonun büyük ölçüde katı bir karbonat çökelmesine engel olabilir. Mineral karbonat içine CA odaklı CO_2 ayırmanın büyük ölçekli uygulamaya tabi tutulması, pH kontrolünün ayarlanabilmesi ve ekonomik nedenlerin iyileştirilebilmesi için halen büyük bir araştırmaya ihtiyaç vardır. CO_2 tutuklanması için CA-odaklı

çalışmalarda enzimin kaybolması sorunu ile karşılaşılır ve yeniden CA kullanılabilirliği için immobilizasyon yöntemi tercih edilmelidir. Bu tekniğin doğru seçilmesi ile ilgili gerekli ekonomik fizibilite çalışmasının yapılması yönteme olumlu yönde katkıda bulunur. Tam bakteriyel (hücre dışı, CA üretimi ile), hücrede hem serbest hem de immobilize CA, büyük bir ölçüde, ekonomik olarak CO_2 tutuklama işlemlerinin üstesinden gelebilir. Hidrasyon serbest ve immobilize formda CA, tüm hücrelerin varlığında CO_2 gazının emisyonunu doğrudan azaltma ile ilgili yaklaşımlar daha pratik ve kolay olacaktır. Ayrıca, bazı yeni yaklaşımlar araştırma bulguları ile simülasyon birlikte kullanılabilir. Bu sayede CA merkezli CO_2 tutuklama işlemleri yapılabilir ve yakın gelecekte bu konuya daha fazla ışık tutulabilir (Şekil 1.15)[116].

Biomimetik olarak CO_2 yakalama ve depolama işlemleri ticari teknoloji şirketi olan CO_2 Çözüm A.Ş. tarafından yapılmıştır. Kömür yakıtlı enerji üretimi, petrol kumları ve diğer CO_2'in yoğun üretildiği sektörlerde uygulanabilir özel bir biyoteknoloji platformu için katalizör olarak CA kullanır. CO_2 Çözüm A.Ş. tarafından çimento fabrikalarından yayılan CO_2'i yakalayarak kireçtaşına ve çimento üretimi için hammadde olarak kullanılan bikarbonat iyonlarına dönüştürür. CO_2 çözüm A.Ş., CA'yı, yataklı reaktör içerisinde paketlenmiş bir katı destek üzerinde hareketsiz olarak membrana paketlenmiş olarak kullanır. Bu gaz yakalama sistemi yükselen CO_2'i ayırır. Sulu çözelti içinde bulunan immobilize CA katı boncukları sayesinde, CO_2 molekülü HCO_3^- 'a dönüştürülür. CO_2 sıyırıcı kolonuna aktarılan bikarbonat tekrar CO_2'e dönüştürülerek saf olarak depolanır (Şekil 1.15 A)[116].

Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA), CO_2'i, bazı çözünmüş immobilize edilmiş CA içeren ince sulu filmler ile yakalayarak atmosferden arındırmak için bir yöntem geliştirdi. İki mikro gözenekli hidrofobik polipropilen zarların arasında sabit bir sulu fosfat tamponu içinde enzimatik solüsyon olarak ince bir tabaka oluşturulur. Sıvı membranın kalınlığını ve sertliğini sağlamak için ince metal ızgaralarla korunması sağlanır. Kabin atmosferindeki CO_2 kendiliğinden zarın bir yüzü üzerinden bir sıvı içinde çözünerek vakumla veya bir

taşıyıcı gaz içinde, veya sıvı zar boyunca yayılır ve ters yüzündede diğer sıvı membran üzerinden buharlaşır. Bu yöntem, uzun süre çalışma sırasında sulu filmin kurutulmasına çözüm bulamamıştır. Carbozyme A.Ş. CA'ı katalizör olarak kullanarak CO_2'i akımını likit membran geçirerek gelişmiş bir sistem tasarladı. Alkalin karbonat ve CO_2 emici kimyasal olarak dietanolamine CA ayrı ayrı immobilize edildi. İmmobilize edilen CA-karbonatın CA-dietanolaminden daha iyi bir kombinasyon olduğu görüldü. Carbozyme şirketi 85 °C'ye kadar yüksek sıcaklıklara dirençli olan β-sınıfı Myceliophthora thermophila adlı CA kullanmıştır. (Şekil 1.15 B)[116].



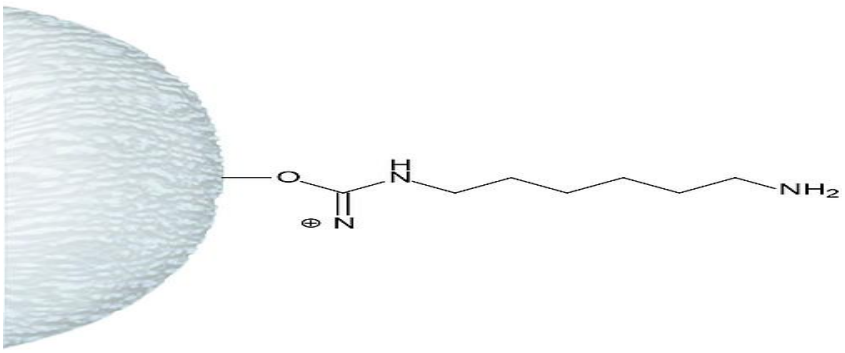
Şekil 1.15: CO_2 emisyonunu azaltmak için öngörülen metot (İmmobilize CA kullanılarak CO_2 tutuklama işlemlerinin şematik gösterimi (A) CO_2 Çözüm A.Ş. süreci, (B) Carbozyme A.Ş. süreci.)[116].

1.5 ω-Amino-Heksil Agaroz Jelinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

ω-Amino-heksil agaroz jeli ticari olarak sigma firmasından temin edilmiştir. Analitik özellikleri aşağıdaki Çizelge 1.8'de, kimyasal yapısıda Şekil 1.16'de verilmiştir.

Çizelge 1.8: ω-Aminoheksil agaroz jelinin özellikleri[117].

Kategoriler	
Fiziksel Yapısı	Tuzlu Süspansiyon
Etiketleme Ölçüsü	mL başına ≥5 μmol
Matriks	Çapraz Bağlı % 4 Boncuklu Agaroz
Matris aktivasyonu	Siyanojen Bromür
Kapasite	≥5mg/ml bağlama kapasitesi (sığır serum albümini)
Matris Boşluk	1 atom



Şekil 1.16: ω-Aminoheksil agaroz jelinin kimyasal yapısı[117].

1.6 Çalışmamızın Amacı

Bu çalışmada insan kanında bulunan eritrositlerden, karbonik anhidraz izoenzimlerinden hCA-I enziminin afinite kromatografisiyle saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin ω-aminoheksil agaroz jeli üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest karbonik anhidraz enzimi ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçülmüş ve çeşitli parametrelerine bakılarak karşılaştırma yapılmıştır.

İmmobilize enzimlerin kullanımının yaygınlaşmasına rağmen henüz evrensel olarak kabul gören enzim immobilizasyon yöntemleri geliştirilememiştir. Sağladıkları avantajlar nedeniyle taşıyıcı olarak seçilen ω-aminoheksil agaroz jeli üzerine kovalent bağlanmayla karbonik anhidraz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklık ve pH kararlılıkları, termal stabiliteleri, zamana karşı aktivite değerlerini ne kadar koruduklarına dair bir takım karakterilizasyon çalışmaları yürütülmüş ve serbest enzim ile karşılaştırma yapılmıştır.

CA enzimleri, insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuş ve bu konuda halen yeni çalışmalar devam etmektedir. Sülfonamid, asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar CA izoenzimlerinin güçlü inhibitörleridir[31]. Aynı zamanda birçok kimyasal maddeler ve atıklar bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde düşürmekte ve hatta tamamen durma seviyesine getirmektedir. Çeşitli yapılan çalışmalarda CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş olup ve bu inhibitörler göz içi basıncını azalttıklarından başta glokom hastalığı tedavisinde ilaç olarak, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda [1,30], pozitron, emisyon tomoğrafisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde, diagnostikte his materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak kliniklerde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çeşit çalışmalara son zamanlarda hız verilmiştir. Bizim bu çalışmamızda sülfonamid, asetazolamid, dorzolamid, brinzolamid ve topiramat gibi, CA'ın klasik inhibitörleri üzerinde serbest ve immobilize enzime karşı inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

İmmobilizasyon işlemi ile kararlılığı arttırılmış olan karbonik anhidraz enziminin canlılılarda eksikliğinin bulunması durumunda uygun reaktörler hazırlanarak bu eksikliğin giderilmesine imkan sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup, Merck veya Sigma firmasından temin edilen kimyasallardan oluşmaktadır. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler, alet ve cihazlar aşağıdaki alt başlıklarda sırlanmıştır.

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sepharose-4B
- Fosforik asit
- L-Tirozin
- Tris-HCl
- Etil Alkol
- Gliserol
- Glisin
- Metanol
- Poliakrilamid
- Amonyum Sülfat
- Fosforik Asit
- $NaBH_4$
- Asetik asit
- β-Merkaptoetanol
- Fenol Kırmızısı
- Hidroklorik Asit
- Sodyum Karbonat
- Sodyum Bifosfat
- Sodyum Fosfat
- Bromfenol Mavisi
- Sodyum Hidroksit
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- N,N,N,N'tetrametiletilendiamin
- Trihidroksimetil Aminometan (Tris-Base)
- Sodyum Bikarbonat
- Amonyum Persülfat
- Standart Serum Albümin
- Coomassie Brillant Blue G-250

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çizelge 2.1: Kullanılan alet ve cihazların markaları.

Cihaz	Marka-Model
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3-18K
pH Metre	Hanna İnstruments HI 221
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 25
Manyetik Karıştırıcı	Wise-Stir MSH-20A
Terazi	Precisa XB220A
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf Reserch Plus
Kromatografi Kolonu	Sigma (1cm çap)
Buzdolabı	İndesit
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Elektroforez Sistemi	BIORAD
Çalkalayıcı	Heidolph Unimax 2010
Kronometre	Hanhard Elektronisch Digital Stopuhr
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Termometre	Sigma

2.1.3 Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan kimyasal çözeltilerin hazırlanışı ve kullanıldığı yerler aşağıda sırasıyla verilmiştir.

2.1.3.1 Afinite Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

❖ ***1 M HCl 100 mL Çözeltisi:*** % 37'lik HCl asitten 8,3 mL alınır. Bir behere bir miktar saf su konur, üzerine 8,3 mL HCl asit eklenir. Çözünmesi sağlanır. Daha sonra çözelti 100 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

❖ ***1 M NaOH, 100 mL Çözeltisi:*** 4 g NaOH tartılır. Bir behere aktarılır ve saf su ile çözülür. Çözünme tamamlandıktan sonra 100 mL'lik bir balon jojeye aktarlır ve üzeri 100 mL olana kadar saf su ile tamamlanır.

❖ ***4 M NaOH, 100 mL Çözeltisi:*** 16 g NaOH tartılır. Bir behere aktarılır ve çözülür. Çözünme tamamlandıktan sonra 100 mL'lik bir balon jojeye aktarlır ve üzeri 100 mL olana kadar saf su ile tamamlanır.

❖ ***0,1 M $NaHCO_3$, pH:10 Tamponu 1000 mL:*** 8,401 g $NaHCO_3$ bir beherde 950 mL saf su ile çözülür. pH, 1 M NaOH ile 10'a ayarlanır. Daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***0,2 M $NaHCO_3$, pH 8,8 Tamponu 500 mL:*** 8,401 g $NaHCO_3$ bir beherde 450 mL saf su ile çözülür. pH 1 M NaOH ile 8,8'e ayarlanır. Hazırlanan bu çözelti 500 mL'lik balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

❖ ***0,05 M Tris-SO_4, pH:7,5 Tamponu 250 mL:*** 1,5143 g Tris-SO_4 200 mL saf suda çözülür. pH H_2SO_4 ile 7,5'a ayarlanır. Çözelti 250 mL'lik balon jojeye aktarılır son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanır.

2.1.3.2 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

❖ ***Afinite Jelini Dengeleme Tamponu pH:8,7 1000 mL:*** 25 mmol Tris-HCl, 22 mmol Na_2SO_4 derişimlerinde hazırlanır. 14,20 g Na_2SO_4 tartılır, 3,0275 g Tris-HCl tartılır, bu iki madde 950 ml saf su ile bir beherde çözülür. pH 1 M HCl asit çözeltisi ile 8,7'ye ayarlanır. Daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***Hemolizat Tatbikinden Sonra Afinite Jeli Yıkama Tamponu pH:8,7 1000 mL:*** 25 mmol Tris-HCl, 22 mmol Na_2SO_4 derişimlerinde hazırlanır. 3,124 g Na_2SO_4 tartılır, 3,0275 g Tris-HCl tartılır, bu iki madde 950 ml saf su ile bir beherde çözülür. pH 1 M HCl asit çözeltisi ile 8,7'ye ayarlanır. Daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***hCAI Elüsyon Tamponu pH:6,3 500 mL:*** 0,5 mol NaCl ve 25 mmol Na_2HPO_4 olacak şekilde hazırlanır. 3,55 g Na_2HPO_4 tartılır, 29,25 g NaCl tartılır, bu iki madde 450 ml saf su ile bir beherde çözülür. pH 1 M HCl asit çözeltisi ile 6,3'e ayarlanır. Daha sonra çözelti 500 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

2.1.3.3 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

❖ ***SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Numune Tamponu:***

0.5 M Trsi-HCl (pH:6,8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
β-Merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol Mavisi	0,01 g
Desitile Su	0,5 mL

❖ ***SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Tank Tamponu:***

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

❖ ***SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Ayırma ve Yığma Jellerinin Hazırlanışı:*** SDS-Elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve miktarları Çizelge 2.2' de verilmiştir.

❖ ***SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Renklendirme Çözeltisi:*** 0,66 g Coomassie brillant blue G-250 tartılır, 120 mL metanolde çözülür. Bu çözeltiye 24 mL asetik asit ve 120 mL desitile su ilave edilir.

❖ ***SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Renk Açma Çözeltisi:*** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol, % 87,5 desitile su içermektedir. Çözelti, 75 mL asetik asit, 50 mL methanol ve 875 mL saf su karıştırılarak hazırlanır.

Çizelge 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımarının miktarları.

	Ayırma Jeli	**Yığma Jeli**
	% 10	% 3
Akril Amid/Bis Akril Amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
Desitile Su	20,1 mL	12,2 mL
1,5 M Tris-HCl (pH:8,8) Tris-HCl 11,82 g alınarak pH:8,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH eklenir. Son hacim 50 mL oluncaya kadar desitile su ile tamamlanır.	12,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl (pH:6,8) Tris-HCl 3,94 g alınarak pH:6,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH eklenir. Son hacim 50 mL oluncaya kadar desitile su ile tamamlanır.	-	5 mL
%10'luk SDS SDS 1 g alınarak son hacim desitile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 μL	200 μL
TEMED	25 μL	20 μL
%10'luk Amonyum Persülfat Amonyum persülfattan 1 g alınarak son hacim 10 mL' ye tamamlanır.	750 μL	400 μL

2.1.3.4 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

❖ ***pH:8 1000 mL Fosfat Tamponu (Yıkama için):*** 14,2 g (0,1 mol) Na_2HPO_4 tartılır, 950 ml saf su ile bir beherde çözülür. pH 1 N HCl asit çözeltisi ile 8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***% 3'lük 25 mL Gluteraldehit Çözeltisi:*** % 25'lik Gluteraldehit çözeltisinden 4 mL alınır. 25 mL'lik balon jojeye aktarılır. Bir miktar saf suda çözülür. Daha sonra hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanır.

❖ ***pH:9 Na_2CO_3 Tamponunda Çözülmüş 10 ml $NaBH_4$ çözeltisi (1mg/mL):*** 10 mg $NaBH_4$ tartılır, bir beherde tampon çözeltisi ile çözülür. Daha sonra çözelti 10 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri tampon ile 10 mL'ye tamamlanır.

2.1.3.5 CO_2-Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler

❖ ***0,15 M Na_2CO_3 / 0,1 M $NaHCO_3$ Tamponu (CA Aktivite Tamponu pH:10 1000 mL):*** 15,9 g (0,15 mol) Na_2CO_3 ve 8,4 g (0,1 mol) $NaHCO_3$ tartılır, bir beherde 950 mL saf su ile çözülür. pH 1 M HCl asit çözeltisi ile 10'a ayarlanır. Daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***Fenol Kırmızısı Çözeltisi 1000 mL:*** 0,011256 g Fenol red ve 0,2184 g $NaHCO_3$ tartılır. Bir beherde çözülür ve daha sonra çözelti 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarılır. Üzeri saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır. Kullanılacak olan miktar kadarı için 20 ^oC'de fenol red içinden CO_2 gazı geçirilerek hazırlanır.

❖ ***0,15 mol Na_2CO_3 / 0,1 mol $NaHCO_3$ Tamponu pH:6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0 1000 mL:*** 15,9 g (0,15 mol) Na_2CO_3 ve 8,4 g (0,1 mol) $NaHCO_3$ tartılır, bir beherde 950 mL saf su ile çözülür. pH'si 1 N HCl asit çözeltisi ile her bir pH'ye ayarlanır. Daha sonra hacimler saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

❖ ***CO_2 Çözeltisi:*** 20 ^oC'de desitile su içinden CO_2 gazı geçirilerek hazırlanır.

2.1.3.6 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

❖ ***Serum Albümin Çözeltisi, 25 mL (1mg/mL):*** 25 mg serum albümin tartılır, 25 mL saf suda çözülür.

❖ ***Coomassie Brillant Blue G-250 Çözeltisi, 1000 mL:*** 100 mg Coomassie brillant blue G-250 tartılır, 50 mL etanolde çözülür. Bu çözeltiye 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edilir. Son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2.1.3.7 İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

❖ ***1 mM 50 mL Sülfonamid Çözeltisi:*** 0,0086 g sülfonamid tartıldı, bir beherde çözünür. Bu çözelti 50 mL'lik balon jojeye aktarılır. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır. ($MA_{sülfonamid}$:172,21 g/mol)

❖ ***1 mM 50 mL Asetozolamid Çözeltisi:*** 0,1111 g asetozolamid tartıldı, bir beherde çözünür. Bu çözelti 50 mL'lik balon jojeye aktarılır. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır. $MA_{asetazolamid}$:222,25 g/mol)

❖ ***1 mM 10 mL Dorzolamid Çözeltisi:*** Tomec ilacı olarak Abdiibrahim firmasından temin edilmiştir. İlacın her 1 mL'sinde 0,02 g dorzolamid var olduğu belirtilmiştir. Katı olarak 0,00324 g alınması gerekir. Sıvı alınacağı için 0,162 mL alınır ve üzeri 10 mL'ye kadar saf su ile tamamlanır.($MA_{dorzolamid}$:324,44 g/mol)

❖ ***1 mM 10 mL Brinzolamid Çözeltisi:*** Azopt ilacı olarak Alcon firmasından temin edilmiştir. İlacın her 1 mL'sinde 0,01 g brinzolamid var olduğu belirtilmiştir. Katı olarak 0,00384 g alınması gerekir. Sıvı alınacağı için 0,384 mL alınır ve üzeri 10 mL'ye kadar saf su ile tamamlanır.($MA_{brinzolamid}$:383,51 g/mol)

❖ ***1 mM 10 mL Topiramat Çözeltisi:*** Topamax ilacı olarak Janssen firmasından temin edilmiştir. 0,00334 g topiramat tartılır, bir beherde çözünür. Bu çözelti 10 mL'lik balon jojeye aktarılır ve üzeri 10 mL'ye kadar saf su ile tamamlanır. ($MA_{topiramat}$:339,36 g/mol)

2.2 Yöntemler

2.2.1 Afinite Jelinin Hazırlanması

Enzim saflaştırılmasında en çok kullanılan metot afinite kromatografisi yöntemidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir ligand bileşiğine spesifik ve tersinir olarak bağlanmasını sağlayan bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose ve

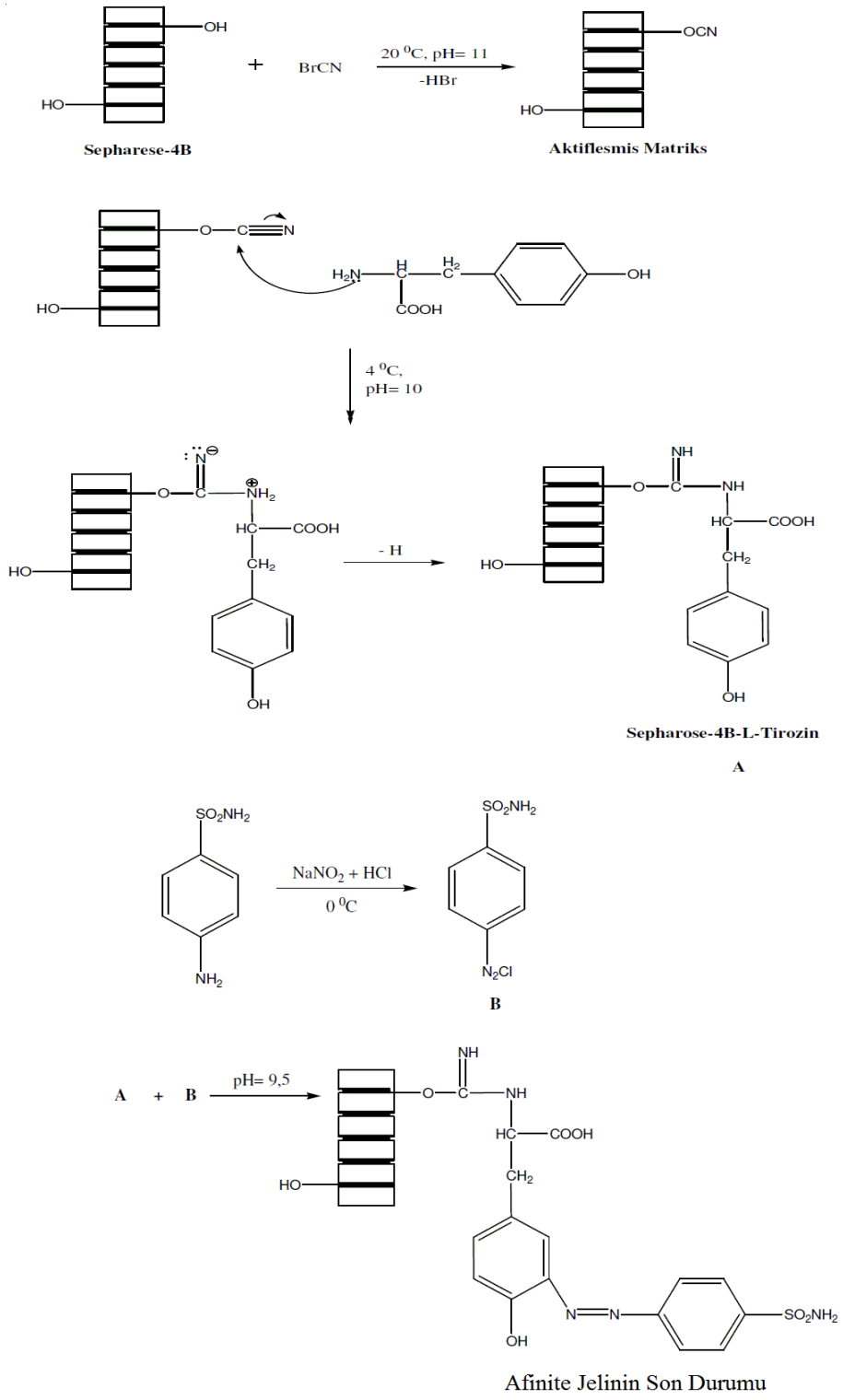
Biogel gibi çeşitli farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir olarak bağlanma özelliği olmalıdır[3].

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra yapıya tirozinin kovalent olarak bağlanması gerçekleştirildi. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendirildi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olmakla birlikte, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır[59].

Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin Kovalent Olarak Bağlanması: 10 mL Sepharose-4B, önce saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi ve eşit hacimde destile su ile birleştirildi. Buz banyosu içerisinde karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna, 4 grama tekabül eden sıvı CNBr eklendi. pH-metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11'e ayarlandı ve reaksiyon süresi boyunca bu işlem pH değişmeyinceye kadar sürdürüldü. Karışım buchner hunisine aktarılarak süzüldü. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M $NaHCO_3$ tamponu ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon +4°C'de 2 saat süreyle karıştırılmaya devam edilip ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M $NaHCO_3$ tamponu ile (pH=8,8) yapıldı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı[34,118,119].

Sülfanilamid Bağlanması: 25 mg sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözünmesi sağlandı. 75 mg $NaNO_2$ bulunduran 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada yavaşça damla damla eklendi. Diazolanmış olarak bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabitlendi. 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırılması sağlandı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M tris- SO_4 (pH:7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi[3,120].

Reaksiyonun kimyasal olarak basamaklar halinde gerçekleşmesi ve açık formülleri asağıda Şekil 2.1 de gösterilmistir:



Şekil 2.1: Afinite jelinin sentezleme basamakları[121].

2.2.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması

2.2.2.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması

Çalışmamızda insan kanı kullanıldı. Balıkesir Üniversitesi Meslek Yüksek Okulundaki Mediko-sosyal bölümünde bulunan hemşire tarafından şahsımdan yaklaşık 40 mL kan örneği alındı ve anında çalışmaya başlanıldı. Alınan taze kan teflon tüplerine konularak +4 ^{o}C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalık yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak atıldı. Altta çöken eritrositler % 0,9'luk NaCl ile 2 defa yıkandı. Bu işlemler sonucunda elde edilen eritrositler hacminin yaklaşık 3 katı kadar soğuk desitile su ile karıştırılır. Teflon tüplerin ağzı kapatıldı. Yaklaşık 10 dakkika kadar köpürtmeden teflon tüpler çalkalandı. Elde edilen hemolizat, hücre zarlarının ayrılması için 15000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, üstteki sıvı kısım alınır ve altta biriken hücre zarları atılır. Hücre zarı kalmaması için hemolizat süzgeç kağıdından yavaşça süzüldü. Bu işlem hemolizatın kolona tatbiki sırasında kalan hücre zarlarının kolonu tıkamaması her ihtimale karşın uzaklaştırmak için yapıldı. Hemolizat buz dolu kabın içine yerleştirilip pH:8,7'ye Tris-Base ile ayarlandı.

2.2.2.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan jel içinde bulunan tampon ile birlikte kolona aktarılır. Kolona paketlenen jel, jel dengeleme tamponu olan pH:8,7 Tris-HCl/Na_2SO_4 ile dengeleme işlemi yapıldı. Dengeleme işlemi 280 nm de 0,02 absarbansın altında pik verene kadar devam edildi. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanmış olan hemolizat kolona yavaş yavaş tatbik edilir. Yavaş yapılmalı çünkü CA enziminin jele bağlanması için zaman geçmesi gerekmektedir. Verimin artması için bu basamak dikkatlice yapıldı. Hemolizatın tamamı tükendikten sonra, kolon üzerinden yıkama tamponu olan pH:8,7 Tris HCl/Na_2SO_4 ile jel yıkaması yapıldı. Bu şekilde ortamdaki istenmeyen safsızlıklar uzaklaştırılmış

oldu. Bu basamak yavaş yapılmalıdır. Yıkamanın tamamlandığını anlamak için 280 nm de absorbans değeri okundu. Bu değer 0,02 nin altına düştüğünde yıkama işlemine son verilir.

hCA-I elüsyon işlemi için 21 adet 2 mL'lik tüpler hazır edildi. Bu işlem için kolona hCA-I elüsyonu için hazırlanan $NaCl/Na_2HPO_4$ pH:6,3 tamponu aktarıldı. Daha sonra kolon musluğu açıldı ve elüatlar toplandı. Her bir elüat hacminin 2 mL'yi geçmemesine dikkat edildi. Bu basamak hızlı yapıldı. Alınan elüatların 280 nm de protein miktarlarını belirlemek için absorbans değerleri okundu.

2.2.3 Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivite Tayini

2.2.3.1 CO_2-Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması esnasındaki aktivite ölçümleri, CO_2-hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları bu yöntem, CA enziminin saflaştırılması esnasında hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından uygulanmıştır. Bu yöntem, CO_2'nin hidrasyonu sonucu açıga çıkan H^+ sebebiyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düsmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibine dayanır. Burada indikatör olarak, pH=7.4'de renk değistiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponundan (0.15 M Na_2CO_3 + 0.1 M $NaHCO_3$) yararlanıldı[57].

Deney işlemleri, şu şekilde gerçekleştirilmiştir; öncelikle deneyde kullanılan indikatör çözeltisi, tampon çözeltisi, enzim, saf su ve doygun CO_2 çözeltileri içerisinde buz bulunan bir kaba yerleştirildi. Reaksiyon tüpüne önce 1,9 mL fenol kırmızısı indikatörü çözeltisi ve 1.3 mL doygun CO_2 çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, kolondan alınmış enzim çözeltisinden 0.1 mL ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0.4 mL karbonat tamponu katılarak, kırmızı

rengin sarıya dönmesi için geçen süre, kronometre ile ölçüldü (tc). Aynı işlemler, her numunenin çalısılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0.1 mL destile su konularak, yapıldı (to). Bu yönteme göre, CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO_2 hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

formülüne göre, kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplanır.

2.2.4 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Bu yöntemle, afinite kromotografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizatlardaki protein miktarları belirlendi. Bu yöntem, Coomassie brillant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanma esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması, 2 dakika gibi çok hızlı bir zamanda gerçekleşir. Bu yöntemin hassasiyeti, 1-100 µg arasındadır[120].

Burada enzimin saflaştırma aşamasındaki saf kan örneğinin, santrifüj aşamalarındaki ve serbest enzimin immobilizasyon öncesi sonrası protein miktarları belirlenmiştir. Protein miktarları tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve destile su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm dalga boyunda 3 mL'lik kuvars küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri, standart grafik

olarak elde edildi (Şekil 3.2). Oluşturulan grafikteki denklem üzerinden serbest enzimin immobilizasyon öncesi, sonrası protein değerleri mikrogram cinsinden hesaplandı. Bu değerler kullanılarak immobilizasyon verimi (Çizelge 3.1) hesaplanmıştır.

2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Karbonik Anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından geliştirilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi[119].

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına özenle dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi 30 dakika beklendi. Yükleme jeli polimerleştikten sonra kuyucukların arasının bozulmamasına özenle dikkat edilerek tarak çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

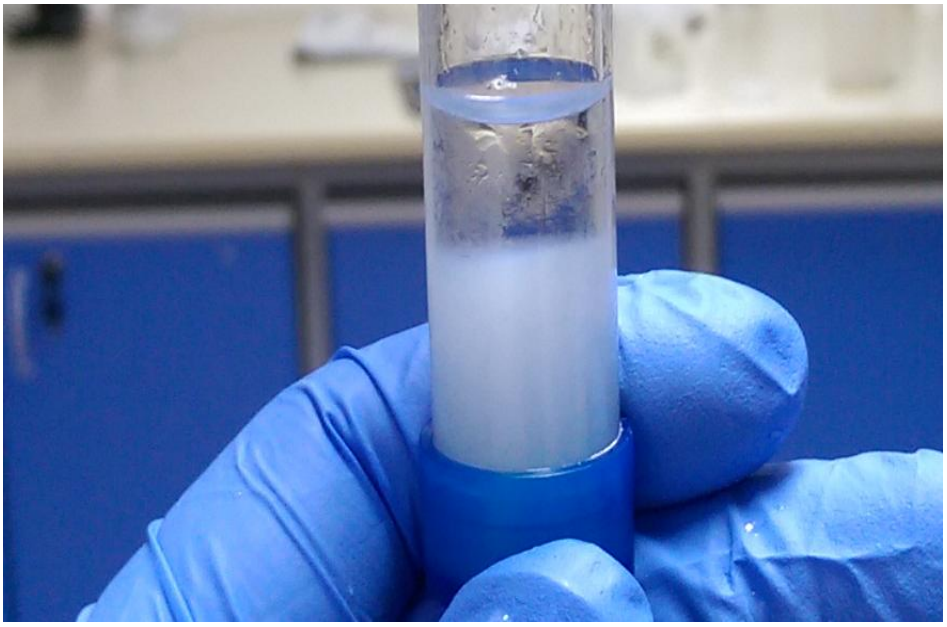
Afinite kromatogafisi sonucunda elde edilen elüatlardan 280 nm dalga boyunda yüksek absorbans değeri gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Standart protein çözeltisi içeren Marker 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 ^{o}C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara dikkatlice yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a çıkarıldı. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Bu işlem yaklaşık 1-1,5 saat sürdü. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renk açma çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

2.2.6 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin İmmobilizasyonu

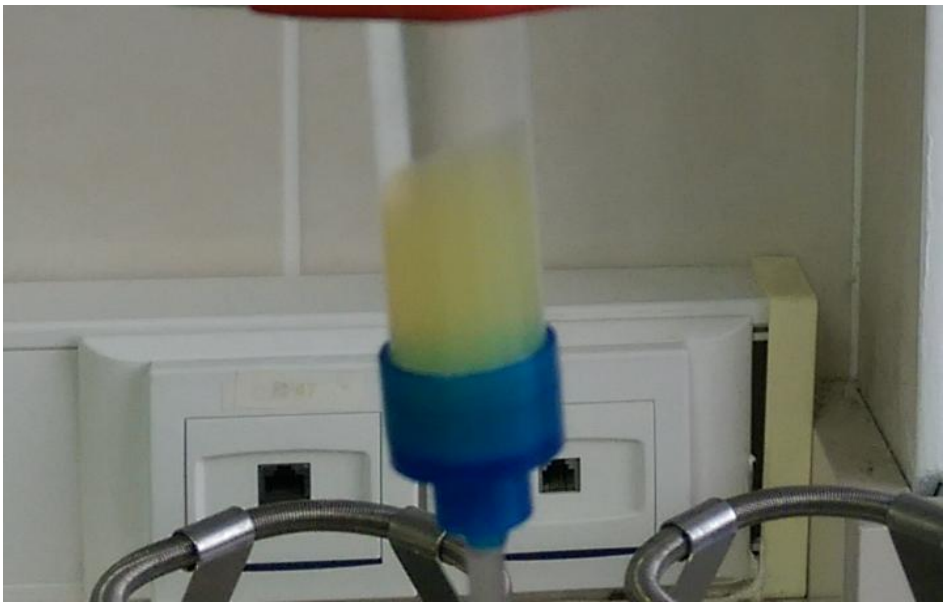
❖ **ω-Amino-Heksil Agaroz Jelinin Hazırlanması ve Gluteraldehitin Bağlanması**

ω-Amino-heksil agaroz jelinden 10 mL alındı. Kolona tatbik edildi. Jel pH:8 Na_2HPO_4 fosfat tamponu ile yıkandı[122]. Daha sonra jel bir behere alındı. Üzerine 10 mL %3'lük gluteraldehit çözeltisi ilave edildi. Beherin içine küçük bir manyetik bar kondu. Burada, karışımın 30 dk karıştırılması sağlandı. Başlangıçta jelimiz Şekil 2.2'de de görüldüğü gibi beyaz renkteydi, gluteraldehit bağlandıktan sonra Şekil 2.3'de görüldüğü gibi jelimizin rengi limon sarısı oldu. Daha sonra karışım kolona tatbik

edildi. Bağlanmayan gluteraldehit pH:7,5 olan soğuk saf su ile tamamen uzaklaştırıldı.



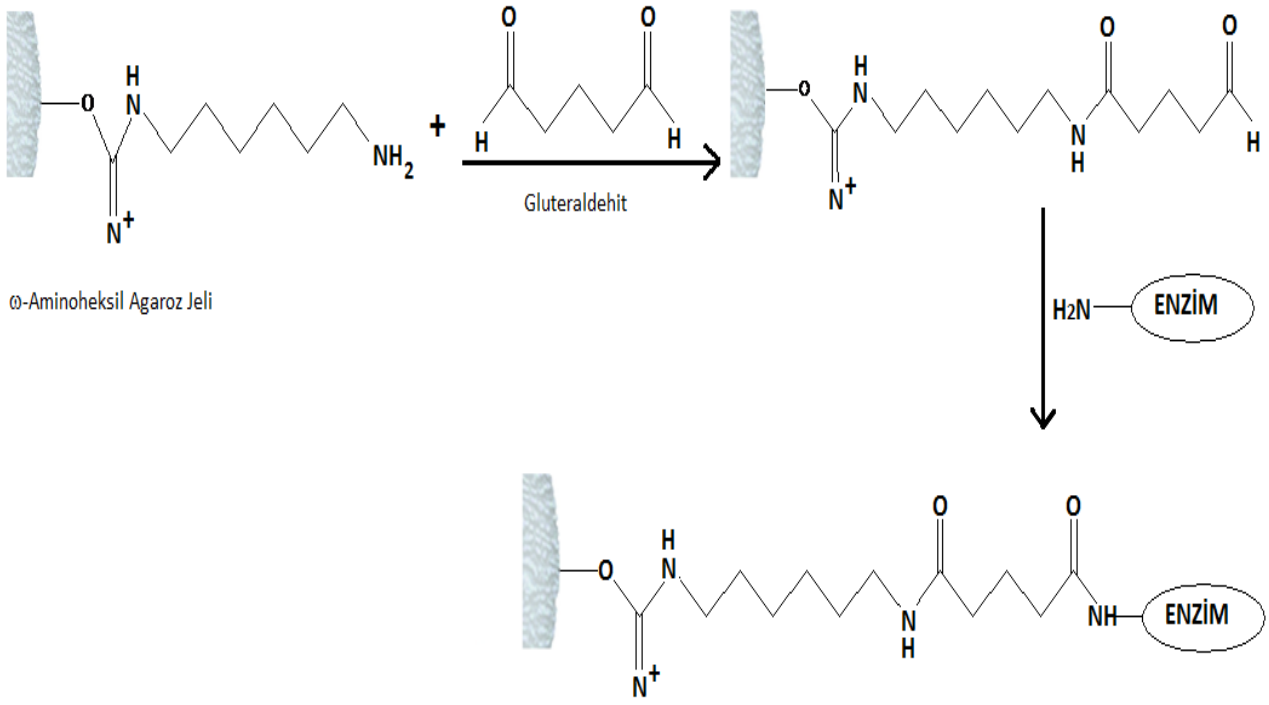
Şekil 2.2: ω-Amino-heksil agaroz jelinin normal görüntüsü.



Şekil 2.3: ω-Amino-heksil agaroz jeline gluteraldehit bağlandıktan sonraki görüntüsü.

❖ ω-Amino-Heksil Agaroz Jeline CA Enziminin İmmobilzasyonu

Kolondaki gluterladehit ile bağlanmış jel tekrar temiz kuru bir behere aktarıldı. Saflaştırma işlemlerinden sonra protein miktarı en yüksek olan karbonik anhidraz enzim çözeltileri birleştirildi. Bu enzim çözeltisinin bradford yöntemiyle protein miktarı belirlendi. Bu çözeltiden gluteraldehit bağlı jel içeren behere 10 ml ilave edildi. Küçük bir manyetik bar ile 1 saat boyunca yavaş bir şekilde karıştırılarak karbonik anhidraz enzimin gluterladehit-ω-amino-heksil agaroz jeline immobilizasyonu sağlandı. Daha sonra bu karışım tekrar kolona aktarıldı. Kolon musluğu açılarak alttan bağlanmayan enzim çözeltisi bir behere toplandı. Bağlanmayan enzimleri içeren bu enzim çözeltinin protein miktarı bradford yöntemiyle belirlendi. Bu şekilde immobilizasyonun % verimi hesaplandı. Daha sonra kolondan taze hazırlanmış olan $NaBH_4$ çözeltisinden 10 mL geçirildi. $NaBH_4$ çözeltisi bağlanma gerçekleştikten sonraki C=N çift bağının doyurulması için kullanılmıştır. Bağlanmayı gösteren immobilizasyon şeması Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4: ω-Amino-Heksil agaroz jeline CA enziminin immobilizasyonu şeması

2.2.7 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimi İçin Tayinler

2.2.7.1 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Zamana Karşı Aktivite Değişiminin Belirlenmesi

Hem immobilize hem de serbest enzimin aktivite ölçümleri 96 saatlik aralarla yapıldı. Serbest enzim için aktivite ölçümü 768. saat ve immobilize enzim için ise 1096. saate kadar sürdürüldü. Bu saatlerden sonra enzimler çok düşük aktivite vermeye başlamasından dolayı aktivite ölçümlerine son verildi.

2.2.7.2 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Serbest karbonik anhidraz enzimi ile immobilize enzimin farklı pH'larda (pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11) 0,15 M Na_2CO_3 ve 0,1 M tamponu ile aktivite değerleri ölçüldü.

2.2.7.3 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

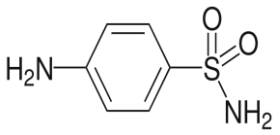
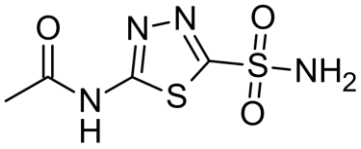
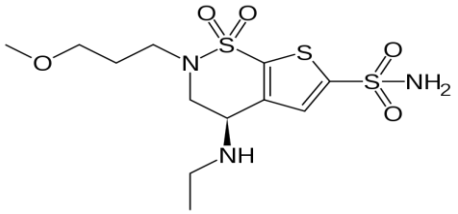
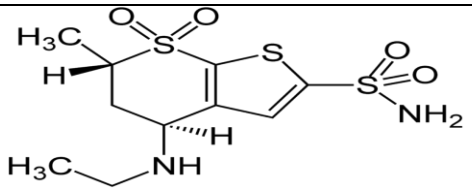
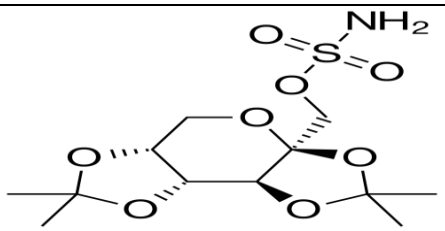
Serbest ve immobilize enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini belirlemek amacıyla her iki enziminde 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ^{o}C sıcaklıklarda ki aktivite değerleri ölçüldü.

2.2.7.4 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest karbonik anhidraz enziminin 36 ^{o}C'de en yüksek aktivite değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında karbonik anhidrazın 42 ^{o}C'de denatüre olduğu belirtilmiştir. İmmobilize edilmiş enzimle serbest enzimin termal stabilitelerinin belirlenmesi için 35 ^{o}C, 40 ^{o}C, 50 ^{o}C sıcaklıklardaki aktivitelerinin 40 dakika aralıklarla ölçümü gerçekleştirildi.

2.2.7.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların İnhibisyon Ekilerinin İncelenmesi

Bu çalışmada karbonik anhidrazın spesifik inhibitörleri olan beş farklı inhibitör kullanıldı. Bunlardan sülfonamid ve asetazolamid analitik olarak kutudan kullanıldı. Diğerleri brinzolamid, dorzolamid ve topiramat ise ilaç olarak temin edildi. İnhibitör çalışmasıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Bu inhibitörlerin % Aktivite-[I] grafikleri çizildi, çizilen eğrinin denkleminden IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu işlem hem serbest hemde immobilize enzime ayrı ayrı uygulanarak hesaplandı. Aşağıda kullanılan inhibitörlerin açık kimyasal yapıları verilmiştir.

İnhibitör Adı	**Açık Yapısı**
Sülfonamid	
Asetazolamid	
Brinzolamid	
Dorzolamid	
Topiramat	

3. BULGULAR

3.1 Enzimin Saflaştırılması

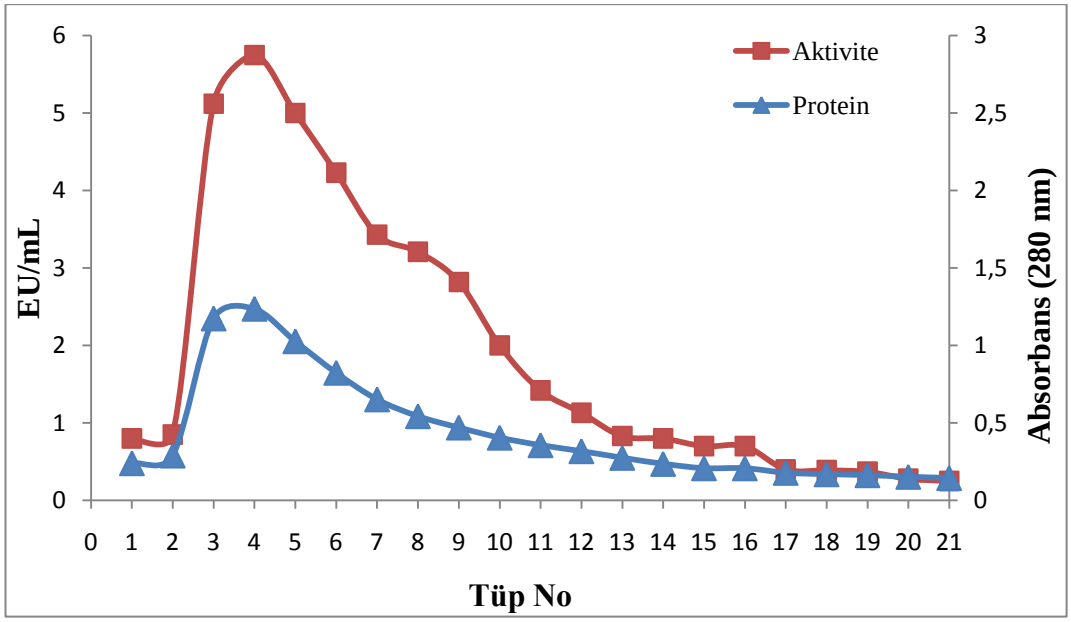
3.1.1 Afinite Kromatagrafisi İle CA-I Enziminin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.2.2 de de belirtildiği gibi hazırlanan jel kolana tatbik edildi. Kolona paketlenen jel, jel dengeleme tamponu olan pH:8,7 Tris-HCl/Na_2SO_4 ile dengeleme işlemi yapıldı. Dengeleme işlemi 280 nm de 0,02 absarbansın altında pik verene kadar devam edildi. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanmış olan hemolizat kolona yavaş yavaş tatbik edildi. Verimin artması için bu basamak dikkatlice yapıldı. Hemolizatın tamamı tükendikten sonra, kolon üzerinden yıkama tamponu olan pH:8,7 Tris-HCl/Na_2SO_4ile jel yıkaması yapıldı.

Bu şekilde ortamdaki istenmeyen safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Bu basamak yavaş yapıldı. Yıkamanın tamamlandığını anlamak için 280 nm de absorbans değeri okundu. Bu değer 0,02 nin altına düştüğünde yıkama işlemine son verildi.

HCA-I elüsyon işlemi için 21 adet 2 mL'lik tüp hazır edildi. Bu işlem için kolona hCA-I elüsyonu için hazırlanan $NaCl/Na_2HPO_4$ pH:6,3 tamponu aktarıldı. Ve hemen kolon musluğu açıldı ve elüatlar toplandı. Her bir elüatın hacminin 2 mL'yi geçmemesine dikkat edildi. Bu basamak hızlı yapılmalıdır. Alınan elüatların 280 nm de protein miktarlarını belirlemek için absorbans değerleri okundu. Bu değerler hangi tüpte enzimin protein miktarının daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca her bir tüpte aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı ve aktivite grafiği çizildi (Şekil

3.1). Grafikten de görüldüğü gibi protein miktarı ve aktivitesi en yüksek olan 5 tüp birleştirildi.

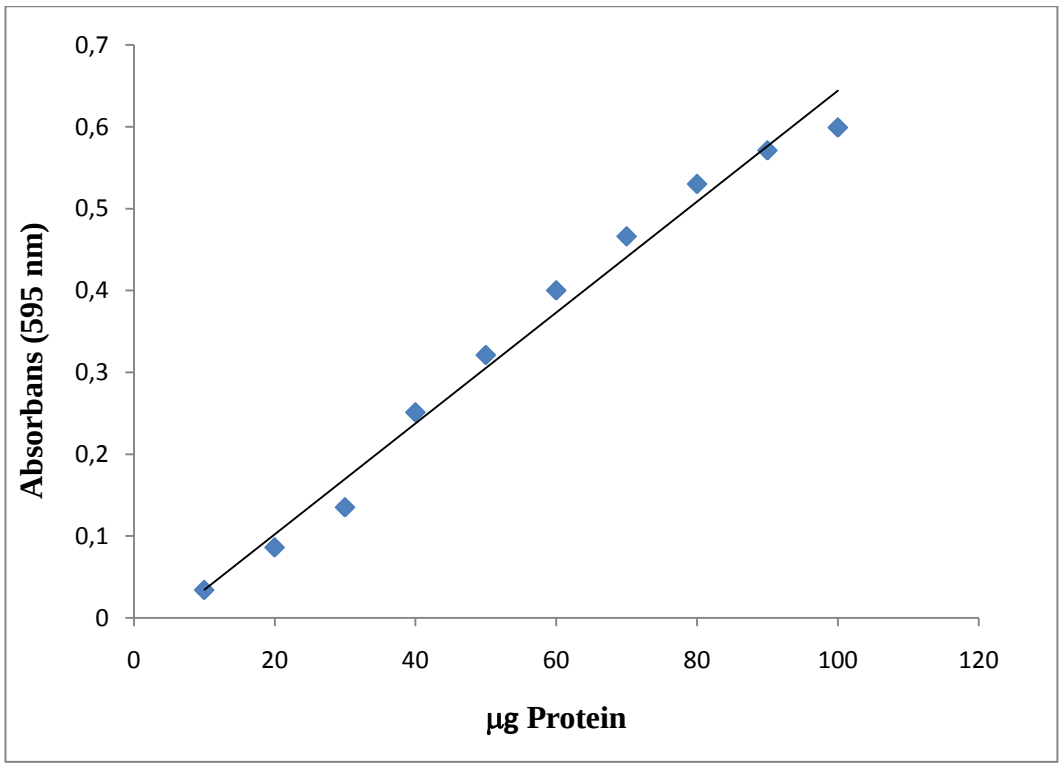


Şekil 3.1: Afinite kolonundan hCA-I enziminin elüsyonu. Fraksiyon hacmi 2 mL, kolon boyutu 1.5x10 cm, kolon yatak hacmi 18 mL, jel yüksekligi 6 cm, akış hızı 7 mL/dk.

3.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini ve İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması

Karbonik anhidraz enziminin protein tayini Bradford yöntemiyle gerçekleştirildi[119]. Yapılan deneysel işlemler bölüm 2.2.4'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için ilk önce standart bir eğri çizildi. Hemolizatta ve enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri, Şekil 3.2'de belirtilmiştir.

3.2.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri



Şekil 3.2: Bradford yöntemiyle protein tayini için hazırlanan standart grafik.

3.2.2 İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması

İmmobilizasyon veriminin hesaplanması için, bradford yöntemiyle hazırlanan standart grafikten elde edilen y=0,0068x-0,0333 denkleminden yararlanıldı.

$$x = \frac{y + 0{,}0333}{0{,}0068}$$

Bu denklemde y yerine, serbest ve immobilize enzimin absorbans değerleri yazılarak x değeri bulunur. Burada bulunan x değeri serbest ve immobilize enzim için protein miktarını verir. Protein miktarları aşağıdaki denklemde yerine yazılarak % verim hesaplanır(Çizelge 3.1).

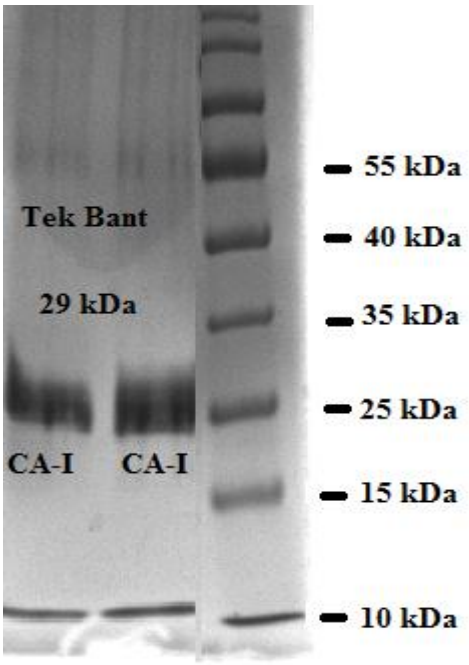
$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Bağlanan Protein Miktarı}}{\text{İmmobilizasyon Öncesi Protein Miktarı}} \text{x} 100$$

Çizelge 3.1: İmmobilizasyon verimi tablosu.

İmmobilizasyon Öncesi Protein Miktarı(μg) X	İmmobilizasyon Sonrası Protein Miktarı(μg) Y	Bağlanan Protein Miktarı (μg) X-Y	Verim (%)
26,81	14,60	12,21	45,54

3.3 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

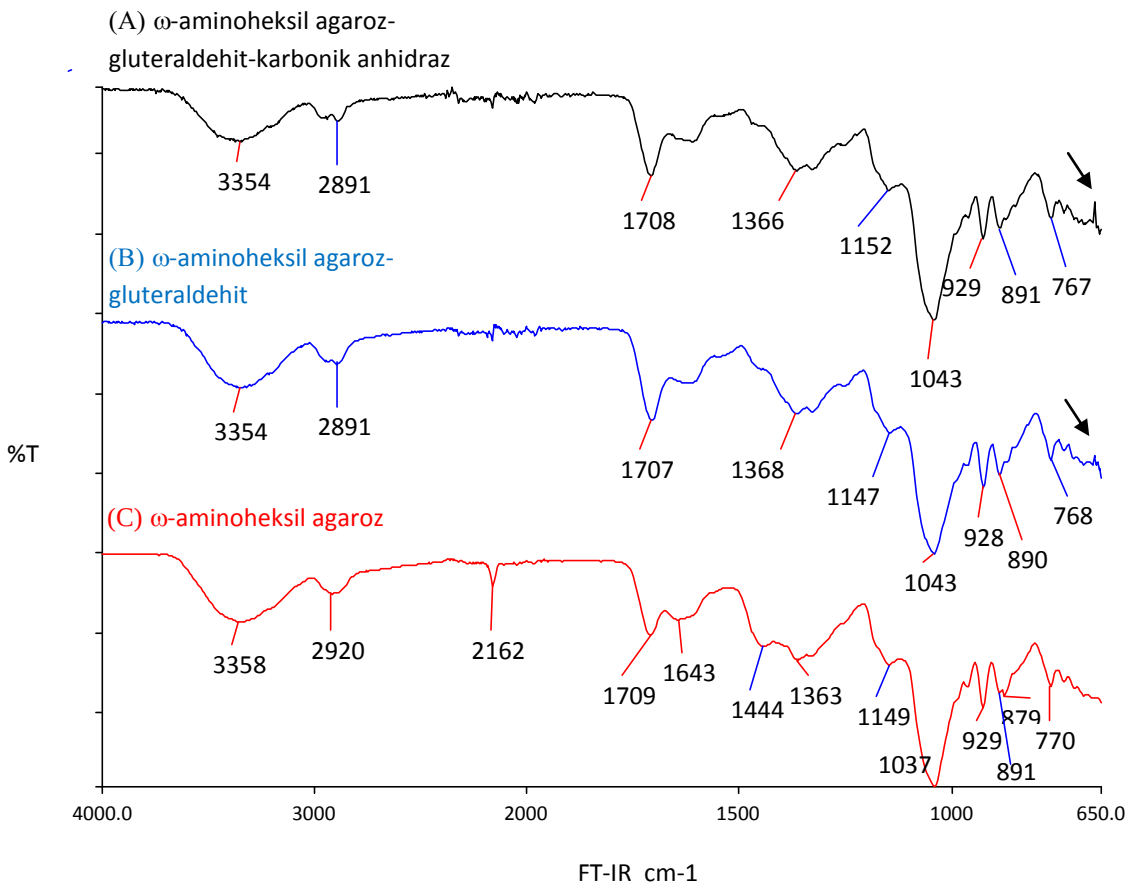
Afinite kolonundan elüe edilen karbonik anhidraz enzimi saflığını kontrol etmek için, bölüm 2.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan jel SDS-PAGE elektroforesi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzim numunelerinin protein bantları tek bant olarak elde edilmiştir. Elde edilen protein bantlarının görüntüleri jel görüntüleme sistemi (UVP) ile bilgisayara aktarıldı. Bu bantlar asağıda Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere CAI enziminin molekül kütlesi 29 kDa olarak bulunmuştur. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidrazın normal molekül kütlesi ise 30 kDa olarak, literatürde belirtilmiştir[5].



Şekil 3.3: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü (İki hCA-I enzimi numunesi yüklenmiştir).

3.4 Karbonik Anhidraz I İzoenziminin İmmobilizasyonu

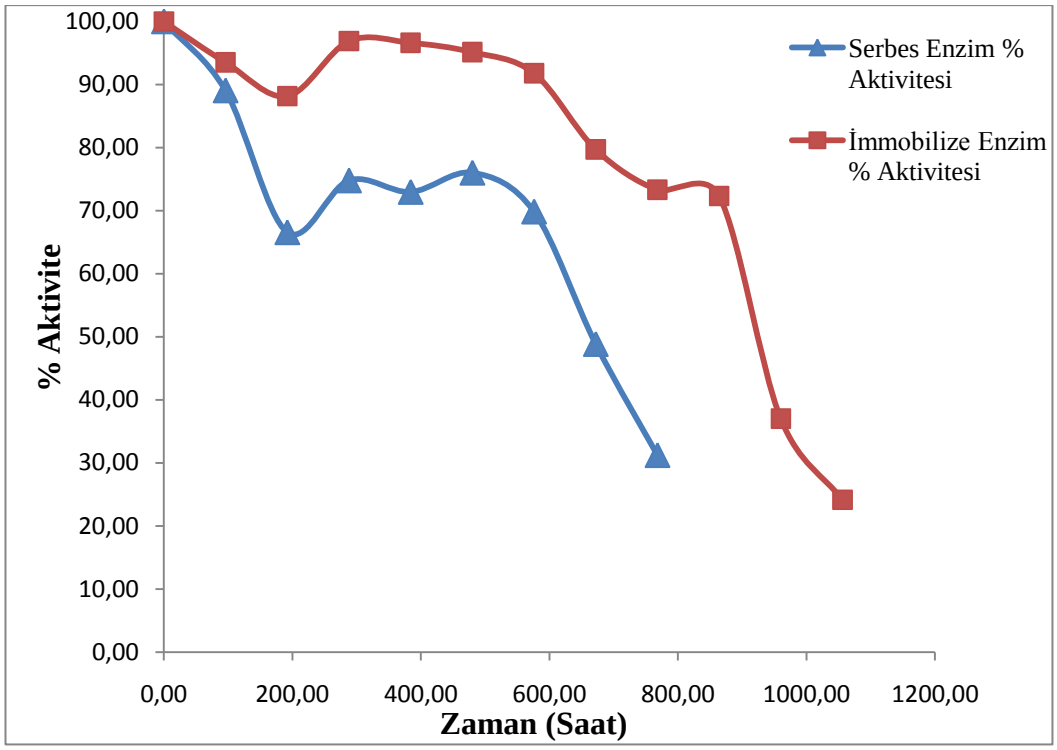
İmmobilize enzimin karakterilizasyonu için FT-IR spekturum çalışması yapıldı. Bu amaçla ω-aminoheksil agaroz jeli, ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit ve ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit-CA immobilize edilmiş yapılarının FT-IR spektrumları Şekil 3.4'te gösterildiği gibi bulunmuştur.



Şekil 3.4: FT-IR spektrumu (A: ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit-karbonik anhidraz, B: ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit, C: ω-aminoheksil agaroz).

3.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzonzimlerinin Zamana Karşı Aktivite Değişiminin Bulunması

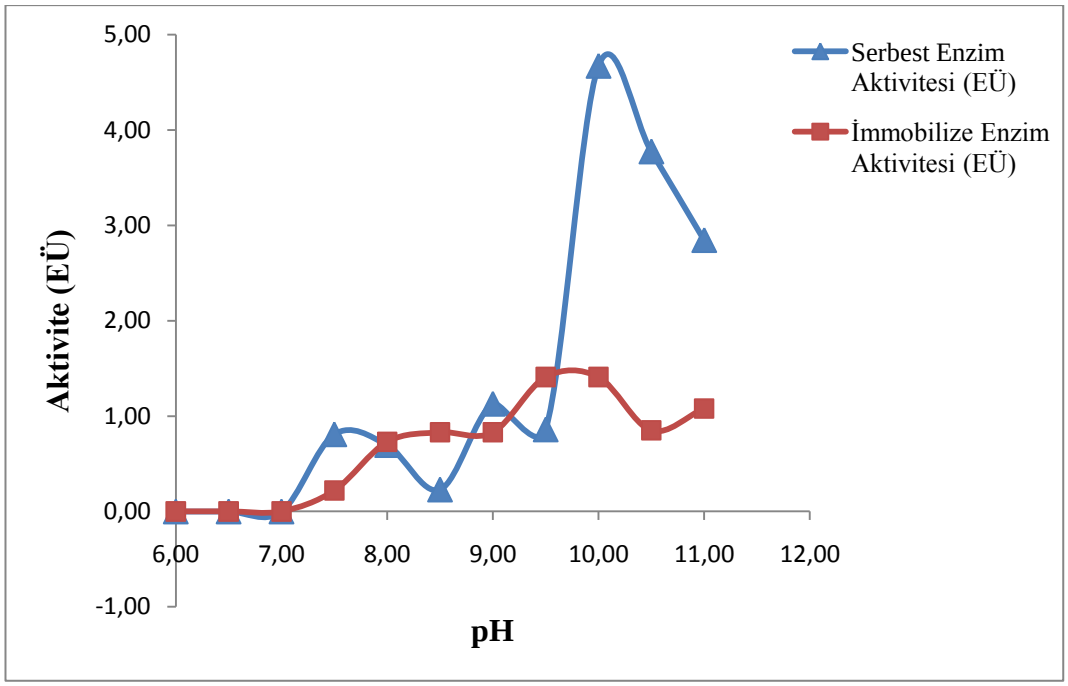
Hem immobilize hem de serbest enzimin aktivite ölçümleri +4 ^{o}C'de 96 saatlik aralarla yapıldı. Saf enzim için aktivite ölçümü 768. saate kadar sürdürüldü. İmmobilize enzimin aktivite ölçümleri ise 1096. saate kadar sürdürüldü bu saatlerden sonra enzimler çok düşük aktivite vermeye başlamasından dolayı aktivite ölçümlerine son verildi. Ölçülen aktivite değerleri ile % aktivite-zaman (saat) grafiği çizildi (Şekil 3.5). Serbest enzim aktivitesini 768 saat koruyabildi, immobilize enzim ise aktivitesini 1096 saat korudu.



Şekil 3.5: Serbest ve immobilize karbonik anhidraz enzimlerinin % aktivite-zaman grafiği.

3.6 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum pH Değerinin Bulunması

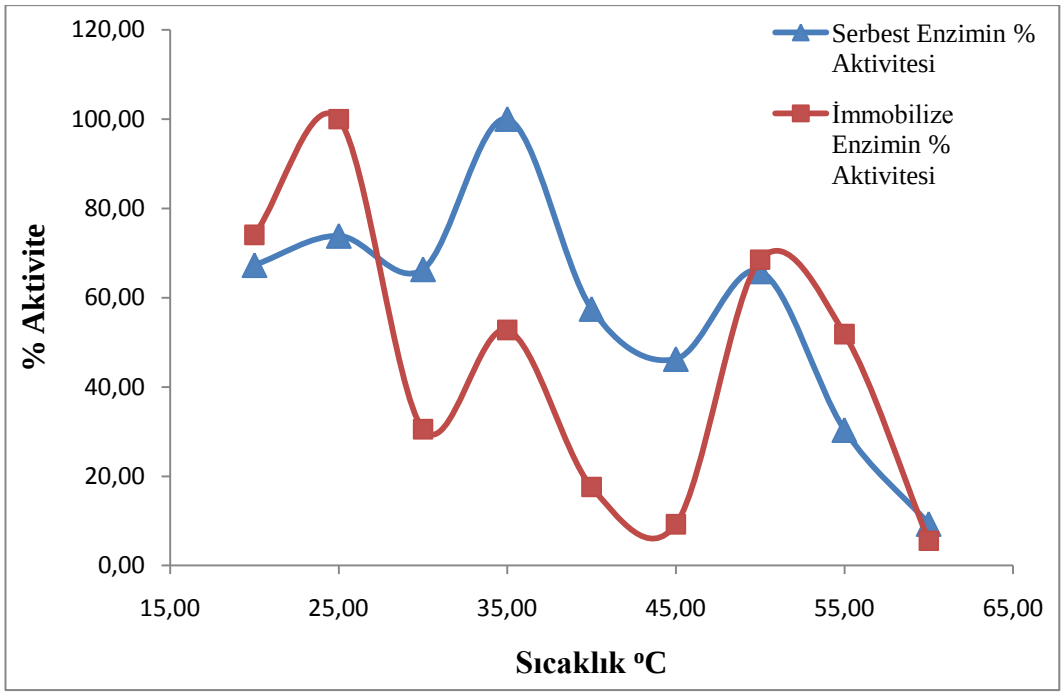
pH'nın serbest ve immobilize enzime etkisini göstermek için bölüm 2.2.6.2' de anlatıldığı gibi uygulanmış olup aktivite (EÜ)-pH değerlerine karşın grafik çizilmiştir(Şekil 3.6). Serbest enzim pH:10'da, immobilize enzim ise pH:9.5'da maksimum aktivite göstermiştir.



Şekil 3.6: Serbest ve immobilize karbonik anhidraz enzimlerinin aktivite (EÜ)-pH değerleri.

3.7 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

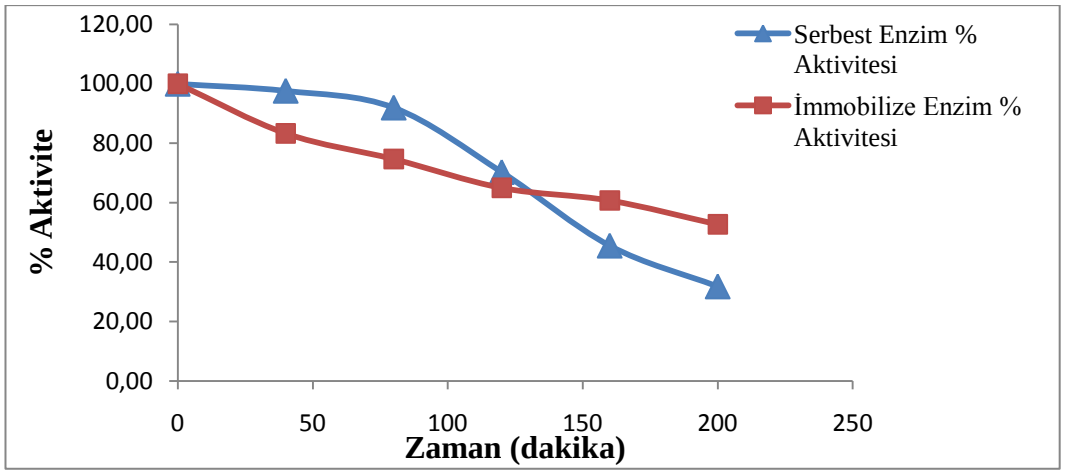
Serbest ve immobilize enzimin bölüm 2.2.6.3'de de anlatıldığı gibi 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ^{o}C sıcaklardaki aktiviteleri ölçüldü. Serbest ve immobilize enzimlerin % aktivite-sıcaklık değişimi Şekil 3.7'te gösterilmiştir. Serbest enzim 35 ^{o}C'de, immobilize enzim ise 25 ^{o}C'de maksimum aktivite göstermiştir.



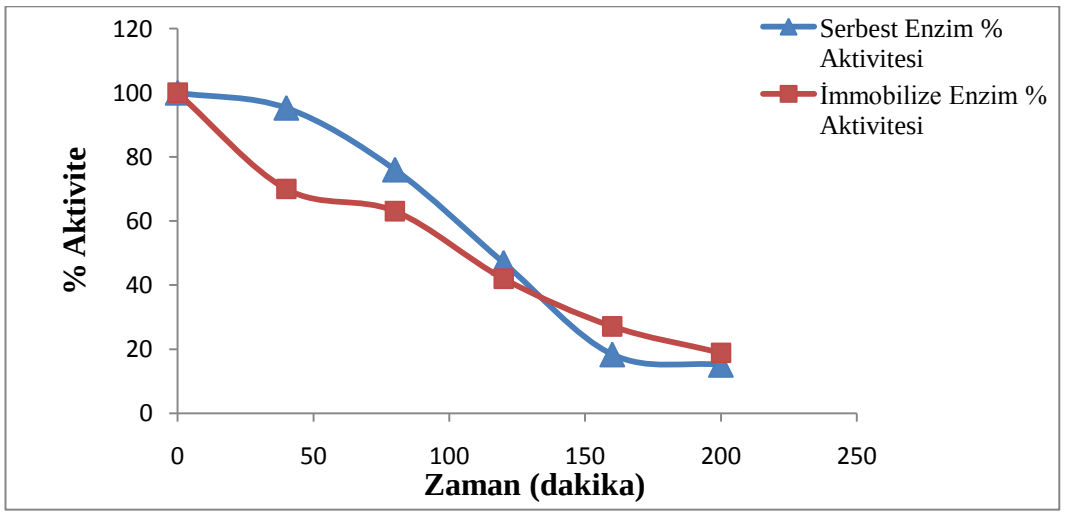
Şekil 3.7 Serbest ve immobilize enzimin % aktivite-sıcaklık değişimi.

3.8 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenzimlerinin Termal Kararlılığının Bulunması

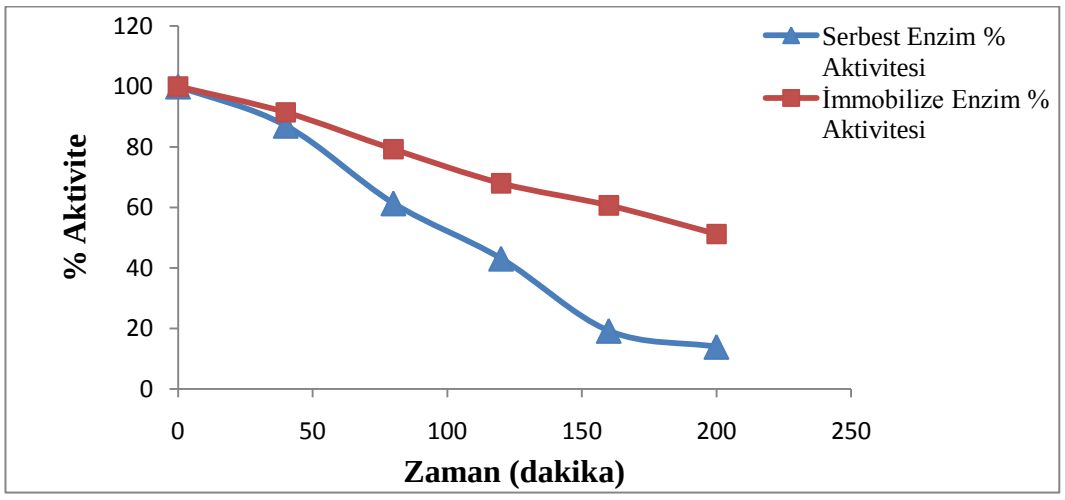
İmmobilize enzimle serbest enzimin termal stabilitelerinin belirlenmesi için 35 ^{o}C, 40 ^{o}C, 50 ^{o}C sıcaklıklarda 50 dakika aralıklarla aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Bu sıcaklıklardaki serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafikleri çizildi. Yapılan aktivite ölçümlerinde 200 dakika sonunda, 35 ^{o}C'de serbest enzim aktivitesini % 30 oranında, immobilize enzim ise % 60 oranında korumuştur. 40 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzim aktivitesini yaklaşık % 20 oranında korumuştur. 50 ^{o}C'de serbest enzim aktivitesini % 20 oranında, immobilize enzim ise % 60 oranında korumuştur. (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.8: 35 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği.



Şekil 3.9: 40 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği.



Şekil 3.10: 50 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafiği.

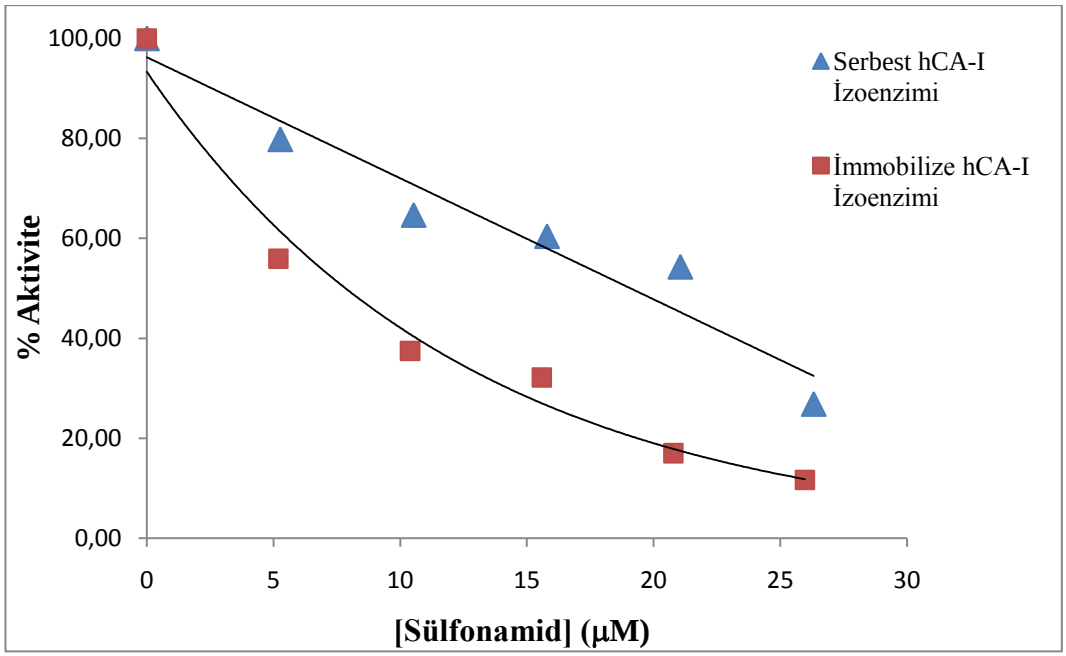
3.9 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine Bazı İlaçların İnhibisyon Değerlerinin Bulunması

Yöntemler bölüm 2.2.7.5'te de anlatıldığı gibi, karbonik anhidrazın spesifik inhibitörleri olan beş farklı inhibitör kullanıldı. Bunlardan sülfonamid ve asetozolamid analitik olarak stok şişeden kullanıldı. Diğerleri brinzolamid, dorzolamid ve topiramat ise ilaç olarak temin edildi. İnhibitör çalışmasıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonun da aktivite ölçümü yapıldı. Bu işlem hem serbest hemde immobilize enzime ayrı ayrı uygulandı. Bu inhibitörlerin % Aktivite-[I] grafikleri çizildi, çizilen eğrinin denkleminden IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.9.1 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfonamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda serbest ve immobilze hCA-I izoenzimi için Sülfonamid bileşiğinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Sülfonamid bileşiği için % aktivite-[sülfonamid] grafikleri, serbest ve immobilize hCA-I izoenzimleri için çizildi. (Şekil 3.11) Bu grafikten elde edilen denklemlerden % 50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı. (Çizelge 3.2)

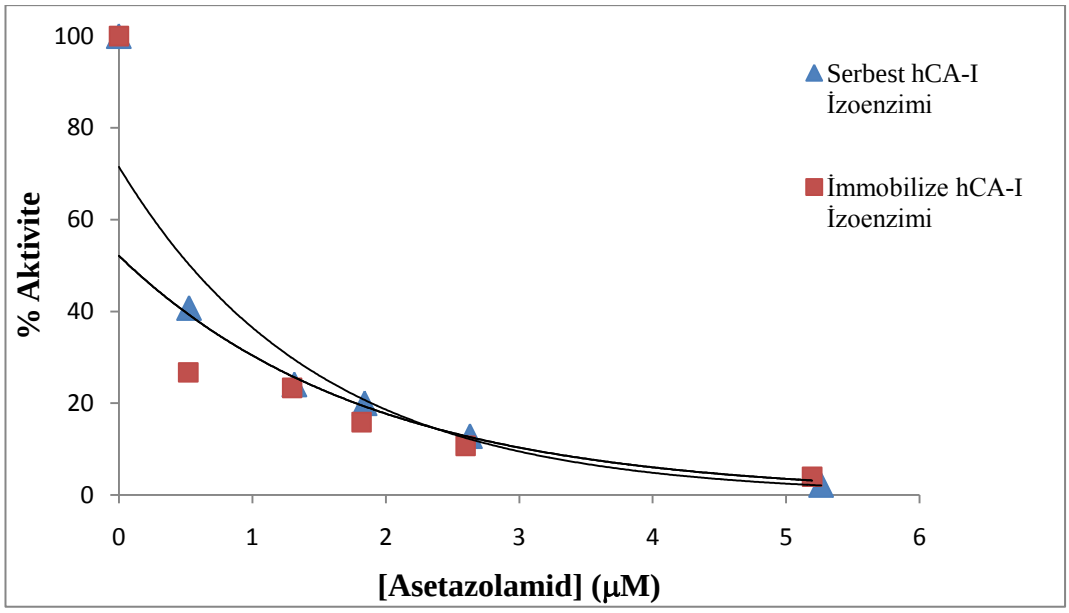


Şekil 3.11: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı sülfonamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[sülfonamid] grafiği.

3.9.2 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda serbest ve immobilze hCA-I izoenzimi için asetazolamid bileşiğinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Asetazolamid bileşiği için % aktivite-[astazolamid] grafikleri, serbest ve immobilize hCA-I izoenzimleri için çizildi. (Şekil 3.12) Bu grafikten elde edilen denklemlerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı. (Çizelge 3.2)

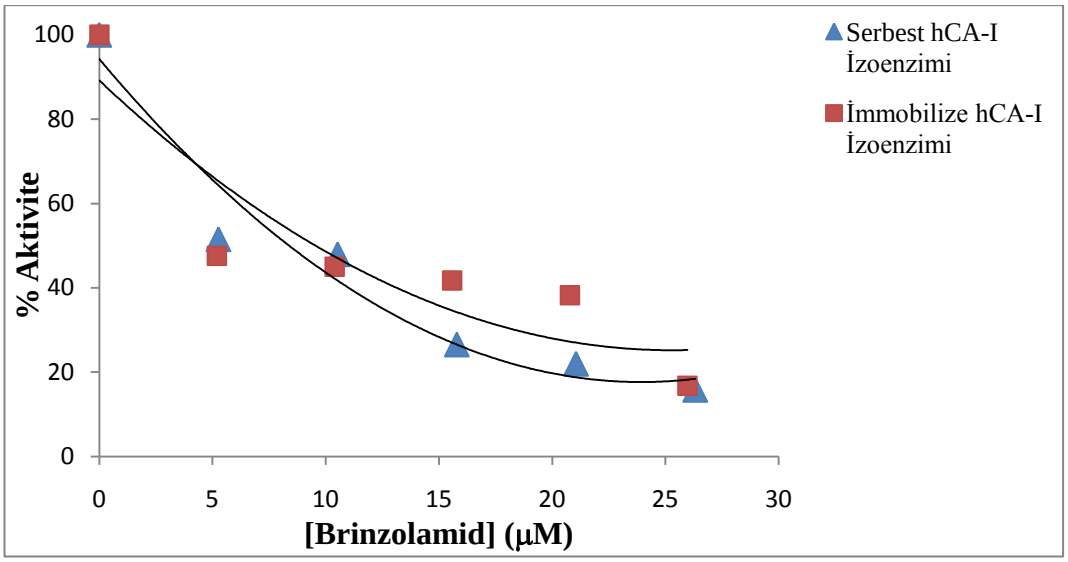


Şekil 3.12: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[asetazolamid] grafiği.

3.9.3 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Brinzolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda serbest ve immobilze hCA-I izoenzimi için brinzolamid bileşiğinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Brinzolamid bileşiği için % aktivite-[brinzolamid] grafikleri, serbest ve immobilize hCA-I izoenzimleri için çizildi. (Şekil 3.13) Bu grafikten elde edilen denklemlerden % 50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı. (Çizelge 3.2)

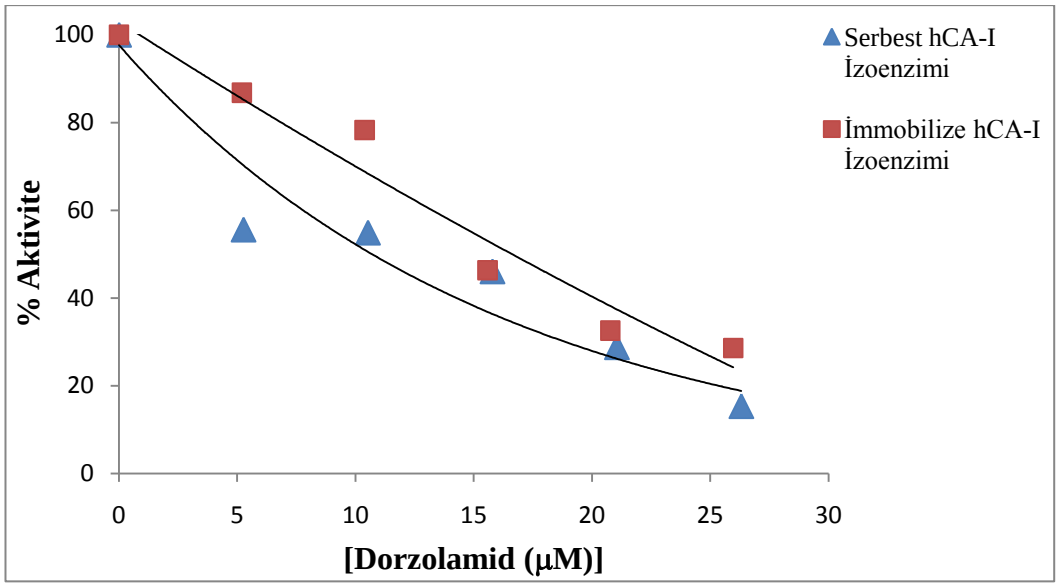


Şekil 3.13: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerininin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı brinzolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[brinzolamid] grafiği.

3.9.4 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Dorzolamid Bileşiği İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda serbest ve immobilize hCA-I izoenzimi için dorzolamid bileşiğinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Dorzolamid bileşiği için % aktivite-[dorzolamid] grafikleri, serbest ve immobilize hCA-I izoenzimleri için çizildi. (Şekil 3.14) Bu grafikten elde edilen denklemlerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı.(Çizelge 3.2)

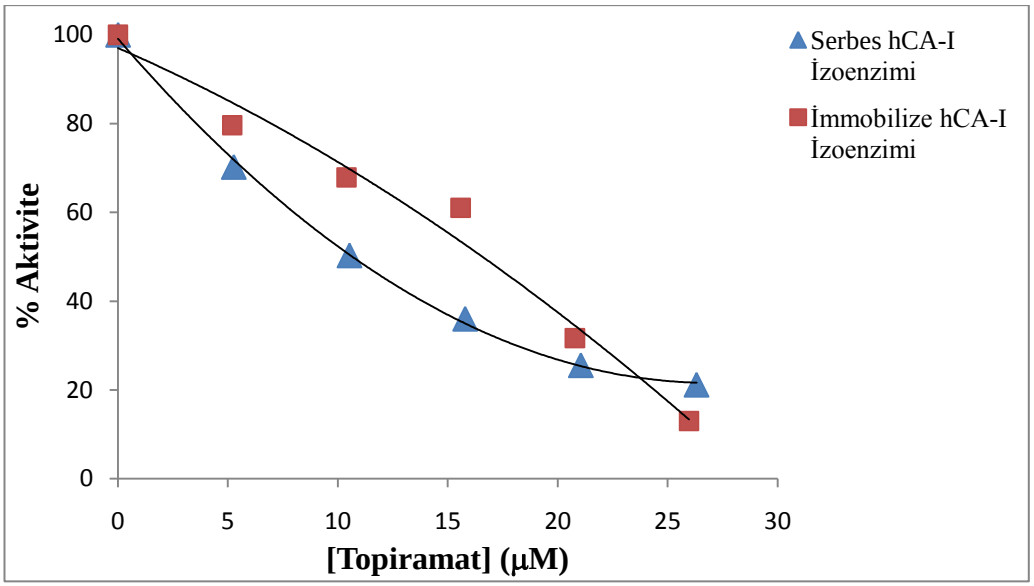


Şekil 3.14: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı dorzolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[dorzolamid] grafiği.

3.9.5 Serbest ve İmmobilize hCA-I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Topiramat Bileşiği İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda serbest ve immobilze hCA-I izoenzimi için topiramat bileşiğinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Topiramat bileşiği için % aktivite-[topiramat] grafikleri, serbest ve immobilize hCA-I izoenzimleri için çizildi. (Şekil 3.15) Bu grafikten elde edilen denklemlerden % 50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı. (Çizelge 3.2)



Şekil 3.15: Serbest ve immobilize hCA-I izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı topiramat konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % aktivite-[topiramat] grafiği.

Çizelge 3.2: İnhibitörlerin serbest (S) ve immobilize (İ) karbonik anhidraz I izoenzimleri üzerinde IC_{50} değerleri.

İnhibitörler	**ShCA-I için IC_{50} (µM)**	**İhCA-I için IC_{50} (µM)**
Sülfonamid	19,083	8,1059
Asetazolamid	0,7922	0,6655
Brinzolamid	8,383	9,539
Dorzolamid	11,592	16,618
Topiramat	10,661	16,575

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karbonik anhidrazın saflaştırılabilmesi için, Arslan ve arkadaşlarının [34] sentezlediği bir afinite jeli sentezlenmiştir. Afinite jeli, sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinin ardından, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlenmesi gerçekleştirildi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olduğu için, afinite jelinin yapısına girerek karbonik anhidraz enziminin yüksek oranda saflaştırılmasını sağlamaktadır[34]. Enzim saflaştırma yöntemleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı mümkün kılan afinite kromatografisi tekniği, biyoteknoloji, biyokimya ve tıp alanında saf enzim elde etmek için tercih edilen önemli bir uygulama alanı olmuştur. Bu konuda halen çeşitli çalışmalar hızla devam etmektedir.

Jel sentezi gerçekleştirildikten sonra insan eritrositlerinden karbonik anhidraz elüsyonu için hazırlanan NaCl/Na_2HPO_4 pH:6,3 tamponu ile hCA-I elüe edildi. Saflaştırılan hCA-I izoenziminin her bir tüpteki 280 nm'deki protein ve aktivite miktarlarına bakıldı. Protein ve aktivite miktarı büyük olan tüpler immobilizasyon ve inhibisyon çalışmaları için birleştirildi.

Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli [119] tarafından geliştirilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesine bakıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı. Burada karbonik

anhidraz enzimin molekül ağırlığı 29 kDa olarak bulundu ve tek bant olarak gözlendi(Şekil 3.3).

Karbonik anhidraz enziminin immobilizasyonu deneysel kısımda anlatıldığı üzere gluteraldehit varlığında ω-aminoheksil agaroz üzerine gerçekleştirildi. İmmobilzasyon öncesi ve sonrası enzim çözeltisininde protein miktarı bradford yöntemiyle belirlendi. Bu şekilde immobilizasyonun % verimi hesaplandı. Yeni oluşan C=N çift bağının indirgenmesini sağlamak için kolondan taze hazırlanmış olan $NaBH_4$ çözeltisinden geçirildi. Yaptığımız immobilizasyon işleminde bağlanma verimi % 45,54 olarak hesaplandı. (Çizelge 3.1). Burada bizim uyguladığımız immobilizasyon yöntemi gluteraldehit ile önce jelimizde bulunan $–NH_2$ gruplarını aktif hale getirip, daha sonra ortama enzimi ilave ettiğimizde enzimin üzerinde bulunan 18 adet lisin gruplarında bulunan $–NH_2$ gruplarına gluteraldehit ile kovalent bağlanmasını sağlama yöntemine dayanmaktadır[122].

Çalışmamızda, kantitatif protein tayini için, Bradford yöntemi kullanılmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde bu yöntemin seçilmesinin sebebi, laboratuarımızda rutin olarak yapılan ve uygulanabilirliğinin daha kolay oluşundan kaynaklanmaktadır. Bu metodun esası, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-25 boyası ile kompleks yapma prensibine dayanmaktadır. Kullanılan boya, negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinleri bağlayarak boya kırmızı renkli formdan (Amax= 465 nm), mavi renkli forma (Amax=595 nm) dönüşür. Çözelti içerisindeki boya, daha çok kırmızı renge hakimdir fakat boyanın negatif uçları proteinin pozitif gruplarına baglandıkça bu renk maviye döner ve reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşir. Reaksiyon boyunca, söz konusu olan renk 1 saat kadar kararlı haldedir ve oluşan renk şiddeti ise pH' ye bağlı olarak değişmektedir. Kullanılan bu metodun diğer metotlardan üstün tarafı ise, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Ancak bu yöntemde, standart eğriyi elde etmek biraz zordur, bunun da sebebi geniş bir konsantrasyon aralığında lineer olmamasından kaynaklanmaktadır[123]. Burada immobilizasyon öncesi ve sonrası enzim

çözeltilerinin protein miktarları bulundu. Bulunan bu protein miktarlarından immobilizasyon işleminde ne kadar enzimin ω-aminoheksil agaroz jeline bağlandığı belirlenmiş oldu.

İmmobilize ve serbest enzimin aktivite ölçümleri 96 saatlik aralarla, 25 ^{o}C'de sıcaklıkta gerçekleştirildi. Serbest enzim için aktivite ölçümü 768. saate kadar sürdürüldü. İmmobilize enzimin ise 1096. saate kadar sürdürüldü (Şekil 3.5). Bu saatlerden sonra enzimler çok düşük aktivite vermeye başlamasından dolayı aktivite ölçümlerine son verildi. Bu çalışma sonucunda immobilize edilen enzimin aktivitesini daha uzun süre koruduğu gözlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada karbonik anhidraz enziminin poliüretan köpük üzerine immobilize edilmiş ve 24 saat aralıklarla immobilize enzimin aktivitesi ölçülmüştür. 45 gün (1080 saat) aktivitesini koruduğu gözlenmiştir[124]. Bu değer bizim çalışmamızda ki bulduğumuz sonuca benzemektedir.

Serbest karbonik anhidraz enzimi ile immobilize enzimin farklı pH'lerde (pH: 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0) 0,15 M Na_2CO_3 ve 0,1 M $NaHCO_3$ tamponu ile aktivite değerleri ölçüldü. Literatürde gözenekli olmayan silika nanopartiküller üzerine immobilize edilen karbonik anhidrazın optimum pH değerinin 10.5 olduğu bildirilmektedir[125]. Bizim çalışmamızda ise immobilize karbonik anhidraz enziminin +4 ^{o}C'de yapılan hidrataz aktivite ölçümlerinde maksimum aktivite verdiği pH değerini 9.5 olarak, serbest enzimin ise pH değerini 10 olarak bulunmuştur (Şekil 3.6). Bu sonuçlar litratür ile uyumludur.

Serbest ve immobilize enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini belirlemek amacıyla her iki enziminde 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ^{o}C sıcaklıklarda ki aktivite değerleri ölçüldü. Literatürde gözenekli olmayan silika nanopartiküller üzerine immobilize edilen karbonik anhidrazın optimum sıcaklığının 50 ^{o}C olduğu bildirilmektedir[125]. Yaptığımız deneysel çalışmalarda serbest ve immobilize enzimin sırasıyla sıcaklık değerlerinin 35;25 ^{o}C olduğu

görülmüştür (Şekil 3.7). Bu sonuç immobilize enzimin daha düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdiğini belirtmektedir.

Serbest karbonik anhidraz enziminin 36 ^{o}C'de en yüksek aktivite değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında karbonik anhidrazın 42 ^{o}C'de denatüre olduğu belirtilmiştir[125]. İmmobilize enzimle serbest enzimin termal stabilitelerinin belirlenmesi için 35 ^{o}C, 40 ^{o}C, 50 ^{o}C sıcaklıklardaki aktivitelerinin 50 dakika aralıklarla aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Bu sıcaklıklardaki serbest ve immobilize enzimin % aktivite-zaman grafikleri çizildi. Bu sıcaklıklarda yapılan aktivite ölçümlerinde 200 dakika sonunda, 35 ^{o}C'de serbest enzim aktivitesini % 30 oranında, immobilize enzim ise % 60 oranında korumuştur. 40 ^{o}C'de serbest ve immobilize enzim aktivitesini yaklaşık % 20 oranında korumuştur. 50 ^{o}C'de serbest enzim aktivitesini % 20 oranında, immobilize enzim ise % 60 oranında korumuştur. (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10). Dolayısıyla immobilize CA enziminin sıcaklığa karşı ciddi derecede dirençli hale geldiği söylenebilir.

İmmobilize enzimin karakterilizasyonu için FT-IR spekturum çalışması yapıldı. Bu amaçla ω-aminoheksil agaroz jeli, ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit ve ω-aminoheksil agaroz-gluteraldehit-CA immobilize edilmiş yapılarının FT-IR spektrumları Şekil 3.4'de gösterildiği gibi bulunmuştur. Burada jel üzerine immobilize edilmiş karbonik anhidraz enziminden kaynaklanan modifikasyonlar belirlendi. B spektrumunda 665 cm^{-1} de yeni oluşan C-N bağının (jele bağlı gluteraldehit bağı) piki görülmektedir. A spekturumunda ise bu pikin frekansının arttığı (enzim ile gluterladehit arasındaki C-N bağı) tespit edilmiştir. 2920 cm^{-1} de C-H alifatik gerilme pikleri, 1640 cm^{-1} lerde C=C veya C=N bağlarının, 1044 cm^{-1} de alifatik amin C-N gerilme hareketlerinden kaynaklanan piklerin karbonik anhidraz immobilize edildikten sonra bu bantların kaybolduğundan bahsedebiliriz. Buda immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Yeni bantların oluşumu 665 cm^{-1} (δ C-H)'de asimetrik ve simetrik grupların germe hareketlerinden kaynaklanmaktadır.

Ayrıca bu çalışmamızda, karbonik anhidraz enzimi sağlık sektöründe büyük öneme sahip olduğundan, sülfonamid, asetazolamid, brinzolamid, dorzolamid ve topiramatın serbest ve immobilize enzim üzerindeki inhibisyon etkileri çalışılmıştır. İnhibitör çalışmasıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonun da aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu inhibitörlerin her birinin % Aktivite-[I] grafikleri çizildi, çizilen eğrinin denkleminden IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Literatürde serbest enzime sülfonamid, asetazolamid, brinzolamid, dorzolamid ve topiramatın inhibisyon değerleri üzerine birçok çalışma vardır. İmmobilize enzime ise bu konuda çalışma yoktur. Serbest ve immobilize enzime inhibitörlerin etkilerinin ne yönde olduğu aşağıda sıralanmıştır;

- Çalışmamızda sülfonamidin karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla serbest ve immobilize enzimi (Şekil 3.11) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir. Sülfonamid, inhibisyon etkisini immobilize enzimde (8,1059 μM) serbest enzime (19,083 μM) göre daha güçlü göstermektedir. İnhibitör konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivite en son sıfıra kadar düşmüştür. Dolayısıyla, sülfonamitten kaynaklanan inhibisyon etkisinden immobilize enzim daha fazla etkilenmiştir. Serbest enzim sülfonamide daha fazla direnç göstermiştir.

- Asetazolamidin karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla serbest ve immobilize enzimi (Şekil 3.12) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir. Asetazolamid, inhibisyon etkisini immobilize enzimde (0,6555 μM) serbest enzime (0,7922 μM) göre daha güçlü göstermektedir. İnhibitör konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivite en son sıfıra kadar düşmüstür. Dolayısıyla asetazolamitten kaynaklanan inhibisyon etkisinden immobilize enzim daha fazla etkilenmiştir. Serbest enzim asetazolamide daha fazla direnç göstermiştir.

- Brinzolamidin karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla serbest ve immobilize enzimi (Şekil 3.13) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir. Brinzolamid, inhibisyon etkisini serbest enzimde (8,383 μM) immobilize enzime (9,539 μM) göre daha güçlü göstermektedir. İnhibitör konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivite en son sıfıra kadar düşmüştür. Dolayısıyla brinzolamitten kaynaklanan inhibisyon etkisinden serbest enzim daha fazla etkilenmiştir. İmmobilize enzim brinzolamide daha fazla direnç göstermiştir.

- Dorzolamidin karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla serbest ve immobilize enzimi (Şekil 3.14) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir. Dorzolamid, inhibisyon etkisini serbest enzimde (11,592 μM) immobilize enzime (16,618 μM) göre daha güçlü göstermektedir. İnhibitör konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivite en son sıfıra kadar düşmüstür. Dolayısıyla dorzolamitten kaynaklanan inhibisyon etkisinden serbest enzim daha fazla etkilenmiştir. İmmobilize enzim dorzolamide daha fazla direnç göstermiştir.

- Topiramatın karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla serbest ve immobilize enzimi (Şekil 3.15) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir. Topiramatın, inhibisyon etkisini serbest enzimde (10,661 μM) immobilize enzime (16,575 μM) göre daha güçlü göstermektedir. İnhibitör konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivite en son sıfıra kadar düşmüstür. Dolayısıyla topiramattan kaynaklanan inhibisyon etkisinden serbest enzim daha fazla etkilenmiştir. İmmobilize enzim topiramata daha fazla direnç göstermiştir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- İnsan eritrositlerinden hCA-I izoenzimini saflaştırmak amacıyla Sepharose-4B-Ltirozin-Sülfonamid kimyasal yapısındaki afinite kromatografi jeli sentezlenmiştir. Hazırlanan bu jel kullanılarak karbonik anhidraz enzimi saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile saflığı control edilmiştir.

- Saflaştırılan hCA-I izoenzimi, ω-aminoheksil agaroz jeli üzerine gluteraldehit varlığında immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

- İmmobilzasyon işleminden sonra serbest ve immobilize hCA-I izoenziminin protein miktarları Bradford Yöntemiyle belirlenmiş olup, yapılan immobilizasyonun verimi hesaplanmıştır.

- Serbest ve immobilize hCA-I izoenziminin optimum pH değerleri sırasıyla 10; 9.5 olarak belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize hCA-I izoenziminin optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 35; 25 ^{o}C olarak bulunmuştur.

- Serbest ve immobilize hCA-I izoenziminin termal stabilitelerine bakıldığında, serbest enzimin 35 ^{o}C'de aktivitesini daha iyi koruduğu, immobilize enzimin ise 50 ^{o}C'de aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize hCA-I izoenziminin sülfonamid, astazolamid, brinzolamid, dorzolamid ve topiramata karaşı inhibisyon değerlerine bakılmıştır. Serbest enzimde güçlü inihisyon etkisi olan inhibitörler; brinzolamid, dorolamid ve topiramat oldukları bulunmuştur. İmmobilize enzimde güçlü inihisyon etkisi olan inhibitörler ise; sülfonamid ve asetazolamid oldukları bulunmuştur.

5. KAYNAKLAR

[1] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., (2001). *Carbonic Anhydrase Inhibitors*,Curr. Med.Chem., 1, 61-97.

[2] Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., "In the Carbonic Anhydrase New horizons", Birkhauser Verlag, Basel, 343-363, (2000).

[3] Keha, E. E., "Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromotografisi metodu", Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).

[4] Wistrand, P. J., "The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO_2 by the human erythrocyte", *Acta Physiol. Scand*., 343-363, (1981).

[5] Graham D., Reed M. L., Patterson B.D., Hockley D. G., Dwyer M., "Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases", *Ann. NY Acad. Sci.* 429, 222-237, (1984).

[6] Lindskog, S., "Structure and mechanism of Carbonic anhydrase", *Pharmacol. Ther*., 74, 1-20, (1997).

[7] Schcer, A., and Dietsch, P., "A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase", *Annals New York Acad.Sci*., 429, 241, (1984).

[8] Armstrong, J., Myers, Mc D., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., "Purification and properties of human erythrocyte Carbonic anhydrase", J. *Biol. Chem.*, 214, 5137, (1966).

[9] Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., "On the evolution and genetics of Carbonic anhydrase I, II and III Isozymes: Current topics in Biological and Medical Research", Volume 7: *Molecular Structure and Regulation*, 79-100, (1983).

[10] Andresson, B., Hymen, P. O., and Strid, L., "Aminoacid sequence of human erythrocyte CA", *B. Biochem. Biophys. Res. Commun*., 48, 670, (1972).

[11] Lin, K. T. D., and Deutsch, H. F., "Human Carbonic anhydrase XII, the 174 complete structure of the C isoenzyme", *J. Biol. Chem.*, 249, 2329, (1974).

[12] Giraud, N., Merria, C., and Laurent, T.G., "Structure primaire de I anhydrase carbonic erythrocyte hermaine III. Sequences des fragment I CNBr et III CNBr.", *J. Biochem.*, 56, 1033, (1974).

[13] Henderson, L. E., Henriksson, P., and Hymann, P. O., "Amino acid sequence human erythrocyte Carbonic anhydrase C", *Biochem. Biophys. Res*. Commun.,52, 1388, (1973).

[14] Wendroff, K. M., Nishita, T., Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "The sequence of equine muscle Carbonic anhydrase", J. *Biol. Chem*., 260, 6129, (1989).

[15] Deutsch, H. F., "Carbonic anhydrase", Int. J. *Biochem.*, 19, 100, (1987).

[16] Wistrand, P. J., "Solubilization and preliminary characterization of membranebound Carbonic anhydrase", *J. Med. Sci*., 85, 75, (1980).

[17] Ryon, U. S., Whitney, P. L., and Ryen, J. W., "Localization of Carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture", *J. Appl. Physiol.*, 53, 91, (1982).

[18] Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., and Hopkinson, D.A.,"Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle",*Biochem. Genetics*, 17, 837, (1979).

[19] Özensoy, Ö., (2006). "Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin Expresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlgisinin Araştırılması" Doktora Tezi, Balıkesir Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstütisi, Kimya Anabilimdalı, Balıkesir.

[20] Kaiser, E. T., and Lo, K. W., "The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane", *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912, (1969).

[21] Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat", *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170, (1989).

[22] Stams T., Chen Y., Boriack-Sjodin P. A., Hurt J. D., Liao J., May J. A., Dean T., Laipis P., Silverman D. N., Christianson D. W., "Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide". Molecular basis o isozyme-drug discrimination, *Protein Sience*, 7556-563, (1988).

[23] Lindskog S., Silverman D. W., In the Carbonic Anhydrase-New Horizons, *Basel*, 175-196, (2000).

[24] Maren, T.H., "Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research", *Drug dev. Res*., 10, 255, (1987).

[25] Arslan, O., "Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds", *Turk J. Med. Sci*., 66 (9), 982, (2001).

[26] Maren, T. H., Jankowska, L., Sanyal, G., and Edelhauser, H. F., "The transcorneal permeability of sulfonamide Carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion", *Exp. Eye. Res*., 36, 457, (1983).

[27] Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi M., 2002. "Bile acid derivatives of 5-amino-1.3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Syntesis and investigation of inhibition effects." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2561.

[28] Kılınç N., (2011). "Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin koyun midesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

[29] Beydemir Ş., Çiftçi M., Özmen İ., Büyükokuroğlu M. E., Özdemir H., Küfrevioğlu Ö. İ., "Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, Pharmacol. Res.", 42, 187-191, (2000).

[30] Beydemir Ş., Gülçin İ., Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197, (2004).

[31] Bülbül M., Hisar O., Beydemir Ş., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö. İ., The in vitro and in vivo Inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) erythrocyte carbonic anhydrase activity, *Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry*,18, 371-375, (2003).

[32] Esposito E. X., Baran K., Kelly K., Madura J. D., Docking of sulfonamides to carbonic anhydrase II and IV, *J. Mol. Graph. Model*., 18, 283-289, (2000).

[33] Schcer A., Dietsch P., A 54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes, *Annals New York Acad. Sci*., 429, 241-242, (1984).

[34] Arslan O., Nalbantoğlu B., Demir N., Özdemir H., Küfrevioğlu Ö.İ. A "New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Choromatography." *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166,(1996).

[35] Roughton F. J. W., Booth V. H.The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 40(2), 319–330, (1946).

[36] Murakami H., Sly W. S. "Purification and characterization human salivary carbonic anhydrase." *J.Biol. Chem*., 262, 1382-1388, (1987).

[37] Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N. "The Carbonic anhydrase-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D.)" *8th Edition*, 2165-2204, *McGraw-Hill*, Inc., Newyork. (2000).

[38] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M. and Banciu, M.D. "Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-thiophene- and pyrrole- carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering porperties as aqueous suspensions." *Biororganic and Medicinal Chemistry*, 8, 2145-2155, (2000).

[39] Gülçin, İ., Beydemir, Ş. "Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrse isoenzymes inhibitors". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, (2012).

[40] Patterson, B.D., Atkins, C.A., Graham, D., Wills, R.B.H. Carbonic anhydrase. Analytical Biocemistry, 44, 388-391, (1971).

[41] Vaklinova, S.G., Goushtina, L.M., Lazova, G.N. "Carbonic anhydrase activity in chloroplasts an chloroplast fragments. Comtes Rendus de I'*Acedemic Bulgare des Sciences*, 37, 677-680, (1982).

[42] Sültemeyer, D., Schmidt, C., Fock. H.P., Carbonic anhydrases in higher plants and aquatic microorganisms. Physiologia Plantarum., 88, 79-180, (1993).

[43] Majeau, N. and Coleman, J.R. "Correlation of carbonic anhydrase and ribulose 1.5 bishphosphate carboxilase/oxygenase expression in pea". *Plant Physiology*, 104, 1393-1399, (1994).

[44] Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. In carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators (Supuran, C.T. *et al.*, eds), CRC Press. 1-23.

[45] Nar, M."Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I VE hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi". Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, (2011).

[46] Nishimoiri, I. Acatalytic CAs, carbonic anhydrase relatedproteins, in carbonic anhydrase, its inhibitors and activators (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) 24-43, CRC *Press*, *Boca Raton*, FL, (2004).

[47] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S. "Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase". *Biochemical Journal*, 392, 83-92, (2005).

[48] Öztürk Sarıkaya, S.B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, I. Supuran, C.T., In vitro inhibiton of α-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5, 4259-62, (2011).

[49] Ren, X.L., Lindskog, S., Buffer dependence of CO_2 hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 81-86, (1992).

[50] Sly, S.W., Hu, Y.P. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies, Annual Reviews, 64, 375-401, (1995).

[51] Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors, topical sulfonamide antiglaucoma agents ıncorporating secondary amine moieties. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 10, 673-676, (2000).

[52] Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 280, 98-104, (1997).

[53] Cabiscol, E., Levine, R.L. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 4170-4174, (1996).

[54] Endo, Y., Usuki, R., Kareda, T. Antioxidant effects on chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark II. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, 1387-1390, (1985).

[55] Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10, 481-490, (1996).

[56] Lakkis, M.M., Bergenhem, N.C.H., Tashian, R.E. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in e-coli and demonstration of its CO_2 hydrase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 268-272, (1996).

[57] Maren, C. H., "A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors", *J. Pharmac. Exp. Ther*., 26, 130, (1960).

[58] Eldin, M.S.M. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles, *J. Mol. Catal. B-Enzym*., Vol.10; pp.445, (2000).

[59] Kohn, J. and Wilchek, M. A., Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophy. Res. Com*., 7, 14, (1978).

[60] Meldrum N. N., Roughton F. J. W. Carbonic anhydrase: its preparation and properties, *Nature*, 80, 113-142, (1933).

[61] Keilin D., Mann T. Activity of purified carbonic anhydrase, *Nature*, 153, 107-108, (1944).

[62] Yu Z., Xie L., Lee S., Zhang R. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (Pinctada fucata). *Comparative biochemistry and physiology, Part B., Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 190-194, (2006).

[63] Krungkrai S. R., Suraveratum N., Rochanakij S., Krungkrai J. Characterization of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparium. *Int. J. Parasitol*., 31, 661-668, (2001).

[64] Burt E., Darlington M. V., Graf G., Meyer H. J. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291, (1992).

[65] Bottcher K., Waheed A., Sly W. S. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: purification, characterization and comparison with mammalian CAs, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435, (1994).

[66] Beydemir Ş., Hisar O., Gülçin I., Küfrevioğlu Ö. İ., Supuran C. T. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo, Journal of Enzyme Inhibition. *Medicinal Chemistry*, 20, 35-39, (2005).

[67] Christie K. N., Thomson C., Xue L. Z., Lucocq J. M., Hopwood D. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 35-40,(1997).

[68] Lonnerholm G., Selking O., Wistrand P. J. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract, *Gastroenterrology*, 88, 1151-1161, (1985).

[69] Okuyama T., Waheed A., Kusomoto W., Zhu X. L., Sly W. S. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphoshatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 315-322, (1995).

[70] Parkkila S., Parkkila A. K. Carbonic anhydrase in the elementary tract-roles of the different isoenzymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal, *Scandinavian Journal of Biological Gastroenterology*, 31, 305-317,(1996).

[71] Raisanen S. R., Lehenkari P., Tasanen M., Rahkila P., Harkonen P. L., Vaananen H. K. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide induced apoptosis, *FASEB Journal*, 13, 513-522, (1999).

[72] Özensoy, Ö., "Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması" Yüksek LisansTezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri, Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, (2002).

[73] Casini A., Antel J., Abbate F., Scozzafava A., David S., Waldeck H., Schafer S., Supuran C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV, *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 841-845, (2003).

[74] Erarslan,A., Kazan,B., Denizci, A. A., Karahan,N., "Enzim Saflaştırılmasında Temel yöntemler",Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Ens., Kocaeli, (2001).

[75] Mikkelsen, S.R., Corto'n, E., "Bioanalytical Chemistry" *Wiley-Interscience*, New Jersey, p.16, (2004).

[76] Stryer, L., Berg, J.M., Tymocyzko, J.L., "Biochemistry", New York, p. 190, (2005).

[77] Polaina, J., MacCabe, A.P., "Industrial Enzymes" Springer**,** The Netherlands, p.9 (2007).

[78] Dekker, M., "Protein immobilization: fundamentals and applications" Taylor, New York, p.85, (2000).

[79] Cabral, J.M.S., Kennedy J.F., "Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes. In: Gupta MN (Ed.) Thermostability of enzymes", Springer, Berlin, p.163, (2000).

[80] Bakker, M., "Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions" PhD Thesis, Technical University Delft, The Netherlands, (2000).

[81] Clark, D.S., " Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?" *Trends Biotechnol*., 12, 439–443, (1994).

[82] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matuo, Y., "Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp.: Fermentation Technology Today" p. 383–389, (1972).

[83] Schulze, B, Wubbolts, M.G., “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 609–615, (1999).

[84] Tischer, W., Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers” *Trends Biotechnol.*, 17, 326–335, (1999).

[85] Hartmeier, W., *Immobilized Biocatalysts*, Berlin: Springer Verlag, (1988).

[86] Fessner, W. D. and Anthonsen, T., Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions, *Berlin: Wiley-VCH*, (2008).

[87] Krajewska, B. Applicaiton of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immoblization: a Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35 , 126-139, (2003).

[88] Cao, L., “Immobilised enzymes: science or art?”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217-226, (2005).

[89] Chase, H. A. and Yang, Y., “Immobilization of α-amilase on poly(vinylalchol)-coated perluoro polymer supports for use in enzyme reactors”, *Biotechnology and Biochemistry*, 28, 145-154, (1998).

[90] Rosevear, A., Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S., *Immobilised enzymes and cells*, Bristol: Adam Hilger, (1987).

[91]http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/IMMOB/whatis.htm

[92] Aehle, W. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley, Weinheim, (2004).

[93] Rosell, C.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. “Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment” *Biocatal. Biotransform.* 12, 67-76, (1995).

[94] Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., "Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilisation of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage" *Biomacromolecules* 1, 739-745, (2000).

[95] Lopez-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisán, J.M., Fernandez-Lafuente, R., "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports" *J. Biotechnol.* (2005) 116, 1–10

[96] Kar, A., Sambamurthy K., (2006), " Pharmaceutical Biotechnology" New Age, New Delhi.

[97] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guizan, J.M., "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment" *Enzyme Microb. Technol.* 26, 509-515, (2000).

[98] Varian, A.R., Sansen, W., "Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads" *Biosens. Bioelectron.* 11, 443-448, (1996).

[99] Uhlig, H., Industrial Enzymes and Their Applications, pp.147-179, 202-222, John Wiley & Sons, Canada, (1998).

[100] Petri, A., Gambicorti, T. and Salvadori, P. Covalent Immobilization of Chloroperoxidase on Silica Gel and Properties of The Immobilized Catalyst, *Journal of Molecular Catalysis* B: Enzymatic , 27,103,106, (2003).

[101] Albayrak, N. and Yang, S.T. Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose, Biotechnol. Prog., Vol.18; pp.240, (2002).

[102] Subramanian, A., Kennel, S.J., Oden, P.I., Jacobson, K.B., Woodward, J. and Doktycz, M.J. Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports - Effect of cross-linker chain length on enzyme activity. Enzyme Microb Technol., Vol.24(1); pp.26-34, (1999).

[103] Honda, T., Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H. Immobilization of enzymes on microchannel surface through cross-linking polymerization AIChE Spring National Meeting, Orlando, FL, USA, (2006).

[104] Wang, A.M., Liu, M.Q., Wang, H., Zhou, C., Du, Z.Q., Zhu, S.M., Shen, S.B. and Ouyang, P.K. Improving enzyme immobilization in mesocellular siliceous foams by microwave irradiation. J. Biosci, Bioeng., Vol.106; pp. 286-291, (2008).

[105] Sheldon, R.A. Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) as Industrial Biocatalysts. Biocatalysis Challenges for Pharmaceuticals and Fine Chemicals. SCI HQ, London. Delft University of Technology CLEA Technologies B.V., Vol. 2; pp.1831-2000, (2010).

[106] Jansen, E.F., Tomımatsu, Y., Olsan, A. C. ‘‘Cross-linking of W-chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde’’. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol.144; pp.394-400, (1979).

[107] Costa, S.A., Azevedo, H.S. and Reis, R.L. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. 1936-C017. Fm Page., Vol.17; pp.301–324, (2004).

[108] Cao, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co. Kgaa, Weinheim, pp.174, (2005)

[109] Chang, T.M.S. “Microencapsulation of enzymes and biological methods in enzymology”, Academis Press Inc., New York, Vol.44; pp.201-218, (1976).

[110] Telefoncu, A., *immobilize enzimler*, (ed: A. Telefoncu), Enzimoloji (Yaz Okulu), 193, (1997).

[111] Monsan, P. and Combes, D., *Methods in enzymology*, New York: Academic press, 137-584, (1988).

[112] Özdemir E. Biomimetic CO_2 Sequestration: 1. Immobilization of Carbonic Anhydrase within Polyurethane Foam., *Energy&Fuel Article*, 2009

[113] Wanjari, S., Prabhu, C., Yadav, R., Satyanarayana, T., Labhsetwar, N.,Rayalu, S., "Immobilization of carbonic anhydrase on chitosan beads for enhanced carbonation reaction" *Process Biochemistry*, India, (2011).

[114] Wanjari, S., Prabhu, C., Labhsetwar, N., Rayalu, S., "Biomimetic carbon dioxide sequestration using immobilized bio-composite materials" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, India, (2013).

[115] Yadav, R., R., Mudliar, S., N., Shekh, A., Y., Fulke, A., B., Devi, S., S., Krishnamurthi, K., Juwarkar A., Chakrabarti, T., "Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO_2 to calcite" *Process Biochemistry*, İndia, (2012).

[116] Kanth, B.K., Lee, J., Pil, S., Pack. (2013). Carbonic anhydrase: Its biocatalytic mechanisms and functional properties for efficient CO_2 capture process development. *Engineering in Life Sciences*.

[117]http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6017?lang=en&region=TR, (2016).

[118] Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., "Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors". *Bioorg. Med. Chem.,* 5, 515-518 p., (1997).

[119] Laemmli, D. K., "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.*, 227, 680 p., (1970).

[120] Cuatracases, P., "Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads". *J. Biol. Chem.*, 245, 3059, (1970).

[121] Vural S., 2007, "5-Amino-1,3,4-Tiyodiazol türevlerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,Kütahya.

[122] Saini, A.S.,Tripathi, A. and Melo, J.S. (2015). Oncolumn enzymatic synthesis of melanin nanoparticles using cryogenic poly(AAM*co*AGE) monolith and its free radical scavenging and electrocatalytic properties. *Royal Society of Chemistry*. İndia

[123] Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).

[124] Özdemir, E., Kanbar, B. (2010). Thermal stability of carbonic anhydrase immobilized within polyurethane foam. *Biotechnology Progress*.

[125] Zhang, S., Lu, Y., Ye, X.(2013). Catalytic behavior of carbonic anhydrase enzyme immobilized onto nonporous silica nanoparticles for enhancing CO_2 absorption into a carbonate solution. *International Journal Of Greenhouse Gas Control Volume.* Page:17-25.