

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



KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
GLUTERALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİM KAYA

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

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



**KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
GLUTERALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİM KAYA

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yeşim KAYA tarafından hazırlanan “KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE GLUTERALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Semra IŞIK



Üye

Prof.Dr. Oktay ARSLAN



Üye

Yrd.Doç.Dr. Serap BEYAZTAŞ



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onaylanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Hilmi NAMLI

.....

ÖZET

**KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
GLUTERALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
YEŞİM KAYA
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(TEZ DANIŞMANI:YRD.DOÇ.DR.SEMRA IŞIK)
BALIKESİR, AĞUSTOS-2013**

Ksantin oksidaz, pürin metabolizmasında anahtar role sahip molibden içeren bir flavoproteindir. NAD^+ 'nin rejenerasyonu, demir absorpsiyonu ve mobilizasyonu, nitratların indirgenmesi gibi biyolojik fonksiyonlara sahiptir.

Bu çalışmada ksantin oksidaz enzimi afinite kromatografisi tekniğine göre Arslan O. tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin dihidroklorür jeli ile saflaştırılmış ve gluteraldehit üzerine immobilizasyonu edilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan ksantin oksidaz enzimi %11.5 verimle ve 694.04 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve 150 kDa civarında tek bant gözlenmiştir.

Ksantin oksidaz enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) ksantin bileşiği substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir ve Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.67×10^{-4} M ve 0.56 U/ml.dak olarak bulunmuştur.

NH_4F , NH_4Cl , $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$ ve $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ bileşiklerinin ve klinikte gut hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan kolşisin, ksantin oksidaz enzimi üzerindeki *in vitro* etkileri araştırıldığında, sırasıyla 1.42×10^{-4} mg/mL, 1.25×10^{-4} mg/mL, 0.99×10^{-4} mg/mL, 1.07×10^{-4} mg/mL, kolşisinin ise 0.27×10^{-4} mg/mL IC_{50} değerleri bulunmuştur. $HgCl_2$ ve $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ bileşikleri substrat ve enzim varlığında çökelek oluşturduğundan dolayı IC_{50} değerleri saptanamamıştır.

Enzim farklı glutaraldehit yüzdelerinde immobilize edilmiş ve enzim aktivitesi en fazla % 6 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzimde gözlenmiştir. Immobilize enzimin kinetik sabitleri, ksantin bileşiği substrat olarak kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilmiştir. K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 5.18×10^{-4} M ve 0.73 U/ml.dak olarak bulunmuştur ve bu değerler, serbest enzimin katalitik etkinliğinin immobilize enzime göre daha fazla olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Ksantin Oksidaz (XO), afinite kromatografisi, inhibisyon, enzim immobilizasyonu, Glutaraldehit

ABSTRACT

XANTHINE OXIDASE PURIFICATION AND IMMOBILIZATION WITH GLUTARALDEHYDE

MSc THESIS

YEŞİM KAYA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY

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

BALIKESİR, AUGUST-2013

Xanthine oxidase, a flavoprotein containing molybdenum have a key role in the metabolism of purines. It has some biological functions such as the NAD⁺ regeneration, iron absorption, mobilization and reduction of nitrates.

In this study, the enzyme xanthine oxidase was purified by Sepharose-4B-L-tyrosine-4-aminobenzamide dihydrochloride. This gel synthesized by Arslan O. according to affinity chromatography technique. Xanthine Oxidase was purified and immobilization on glutaraldehyde was investigated.

Xanthine oxidase enzyme kinetic constants (K_M and V_{max}) were determined by using the xanthine compound as substrate. K_M and V_{max} values obtained from the Lineweaver-Burk graph were 1.67×10^{-4} M and 0.56 U/ml.min respectively.

Xanthine oxidase which was purified by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography was obtained with 11.5% yield and 643.04 degree of purification. Purity of the enzyme was checked by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and a single band was observed around 150 kDa.

In vitro effects of NH_4F , NH_4Cl , $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$ and $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ compounds and colchicine which is widely used in the clinic for treatment of gout, on xanthine oxidase enzyme were investigated and IC_{50} values were $1,42 \times 10^{-4}$ mg/mL, $1,25 \times 10^{-4}$ mg/mL, $0,99 \times 10^{-4}$ mg/mL, $1,07 \times 10^{-4}$ mg/mL, $0,27 \times 10^{-4}$ mg/mL respectively. $HgCl_2$ and $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ compounds since these produce precipitate in the presence of substrate and enzyme IC_{50} values could not be detected.

The enzyme was immobilized on different percentages of glutaraldehyde and maximum enzyme activity of the immobilized enzyme was observed in the rate of 6% glutaraldehyde. Immobilized enzyme's kinetic constants were obtained from Lineweaver-Burk graph using xanthine compound as substrate. K_M and V_{max} values were found to be 5.18×10^{-4} M and 0.73 U / mL.min respectively and free enzyme's catalytic activity was higher than immobilized enzymes.

KEYWORDS: Xanthine Oxidase (XO), affinity chromatography, inhibition, enzyme inhibition, Glutaraldehyde.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ | vi |
| ÇİZELGE LİSTESİ | vii |
| SEMBOL LİSTESİ | viii |
| ÖNSÖZ | ix |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Araştırmanın Amacı..... | 2 |
| 1.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Biyokimyası..... | 2 |
| 1.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Yapısı..... | 2 |
| 1.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Substratları..... | 5 |
| 1.2.3 Oksidoredüktaz Enziminin Dağılımı ve Fizyolojik Önemi..... | 6 |
| 1.2.4 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Etki mekanizması..... | 8 |
| 1.2.5 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi..... | 10 |
| 1.3 Enzim İmmobilizasyonu..... | 14 |
| 1.3.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihi..... | 16 |
| 1.3.2 Taşıyıcı Seçimi..... | 17 |
| 1.3.3 İmmobilizasyon Metodları..... | 20 |
| 1.3.3.1 Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları..... | 20 |
| 1.3.3.2 Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu..... | 20 |
| 1.3.3.2.1 Kovalent Bağlamanın Avantajları..... | 22 |
| 1.3.3.2.2 Kovalent Bağlamada Aktivite Kaybı..... | 22 |
| 1.3.3.3 Tutuklama İmmobilizasyonu..... | 23 |
| 1.3.3.4 Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları..... | 24 |
| 1.3.3.5 Adsorpsiyon..... | 25 |
| 1.3.3.5.1 Nonspesifik Adsorpsiyon..... | 25 |
| 1.3.3.5.2 İyonik Bağlanma..... | 25 |
| 1.3.3.5.3 Hidrofobik Adsorpsiyon..... | 26 |
| 1.3.3.5.4 Afinite Bağlanma..... | 26 |
| 1.3.4 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi..... | 27 |
| 1.3.5 Enzim Reaktörünün Seçimi..... | 28 |
| 1.3.6 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri..... | 30 |
| 2.MATERYALLER VE YÖNTEMLER | 31 |
| 2.1 Materyaller | 31 |
| 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 31 |
| 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar..... | 31 |
| 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması..... | 32 |
| 2.1.3.1 Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar..... | 32 |
| 2.1.3.1.1 0,1 M NaHCO ₃ , pH 10,0 tamponu..... | 32 |
| 2.1.3.1.2 0,2 M NaHCO ₃ , pH 8.8 tamponu..... | 32 |
| 2.1.3.1.3 0,05 M Tris-SO ₄ , pH 7.5 tamponu..... | 32 |
| 2.1.3.2 Afinite Kromatografisinin Uygulanmasında..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| Kullanılan Tamponlar | |
| 2.1.3.2.1 Dengeleme Tamponu..... | 32 |
| 2.1.3.2.2 Jel Yıkama Tamponu..... | 33 |
| 2.1.3.2.3 Elüsyon Tamponu..... | 33 |
| 2.1.3.3 Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan | 33 |
| Tamponlar | |
| 2.1.3.3.1 Aktivite Tamponu..... | 33 |
| 2.1.3.3.2 Substrat Çözeltisi..... | 33 |
| 2.1.3.4 SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan | 33 |
| Tamponlar | |
| 2.2 Yöntemler..... | 35 |
| 2.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enzim Çözeltisinin Hazırlanması..... | 35 |
| 2.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Aktivite Tayini..... | 36 |
| 2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini..... | 37 |
| 2.2.4 Enzimin Saflaştırılması..... | 37 |
| 2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi..... | 37 |
| 2.2.4.2 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması..... | 38 |
| 2.2.4.2.1 Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi..... | 38 |
| 2.2.4.2.2 L-Tirozinin bağlanması..... | 38 |
| 2.2.4.2.3 4-aminobenzamidinin Kenetlenmesi..... | 38 |
| 2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel..... | 39 |
| Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının | |
| Kontrolü | |
| 2.2.5 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi..... | 40 |
| 2.2.5.1 Ksantin Bileşiği Kullanılarak Enzimin Kinetik | 41 |
| Sabitlerinin Belirlenmesi | |
| 2.2.5.2 IC50 Değerlerinin Bulunması..... | 41 |
| 2.2.6 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı..... | 42 |
| 3.BULGULAR..... | 44 |
| 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri..... | 44 |
| 3.2 Enzimin Saflaştırılması..... | 45 |
| 3.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hazırlanması..... | 45 |
| 3.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi..... | 45 |
| 3.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Saflaştırılması..... | 45 |
| 3.3 NH ₄ F Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin | 51 |
| Araştırılması | |
| 3.4 NH ₄ Cl Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin | 52 |
| Araştırılması | |
| 3.5 CaCl ₂ Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin | 53 |
| Araştırılması | |
| 3.6 ZnCl ₂ Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin | 54 |
| Araştırılması | |
| 3.7 Kolşisin Etken Maddesinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine | 55 |
| Etkisinin Araştırılması | |
| 3.8 Enzim İmmobilizasyon Basamağı..... | 56 |
| 3.8.1 Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması..... | 56 |
| 3.8.2 Glutaraldehit ile % 6 Oranında Karıştırılarak İmmobilize | 58 |
| Edilen Enzim İçin Aktivite Tayini | |
| 3.8.3 İmmobilize Enzim İçin Km ve Vmax Değerlerinin..... | 61 |

| | |
|--------------------------|----|
| Hesaplanması | |
| 4.TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 61 |
| 5.KAYNAKLAR..... | 65 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 1.1 | :Ksantin oksidoredüktaz enziminin kristal yapısı..... | 3 |
| Şekil 1.2 | :Ksantin dehidrogenaz enziminin moleküler şekli..... | 3 |
| Şekil 1.3 | :Ksantin oksidaz enziminin moleküler şekli..... | 4 |
| Şekil 1.4 | :XDH enziminin XO enzimine dönüşmesi..... | 5 |
| Şekil 1.5 | :Pürinlerin Hidrolizi..... | 7 |
| Şekil 1.6 | :Ksantin Oksidaz Enziminin Ksantin Substratına Karşı..... Reaksiyon Mekanizması - | 9 |
| Şekil 1.7 | :Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Yaklaşımları..... | 19 |
| Şekil 1.8 | :Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Yaklaşımları..... | 20 |
| Şekil 1.9 | :Kovalent İmmobilizasyon ve Çapraz Bağlama Gösterimi..... | 22 |
| Şekil 1.10 | :Kovalent Bağıın Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri..... | 23 |
| Şekil 1.11 | :Tutuklama İmmobilizasyonunun Gösterimi..... | 24 |
| Şekil 1.12 | :Nonspesifik Adsorpsiyon İmmobilizasyon Yönteminin..... Gösterimi | 25 |
| Şekil 1.13 | :İmmobilize Enzimler İçin Reaktörler [(a-c) toplam geri..... karıştırma ile paket reaktörleri; (a) karıştırıcı tank reaktör; (b) sabit akışkan yatak reaktör (c) sıvılaştırılmış yatak reaktör. (d-f) tam geri karıştırma işlemi ile sürekli çalışan reaktörler (g-h) akış yönü yukarı olan paket tipi reaktör] | 29 |
| Şekil 2.1 | :Afinite jeli sentezinin şematik gösterimi..... | 39 |
| Şekil 2.2 | :Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi..... | 42 |
| Şekil 3.1 | :Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde..... Kullanılan standart grafik | 44 |
| Şekil 3.2 | :XOR Enziminin Sepharose 4B-L-Tirozin-Benzamidin jeli..... ile saflaştırma grafiği | 46 |
| Şekil 3.3 | :Saflaştırılmış ksantin oksidaz enziminin ksantin substratı ile..... elde Edilen Linewear-Burk grafiği | 48 |
| Şekil 3.4 | :Afinite kromatografisi ile saflaştırılan XO enziminin..... SDS PAGE görüntüsü | 50 |
| Şekil 3.5 | :Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine NH ₄ F..... bileşiğinin% aktivite-[I] grafiği | 51 |
| Şekil 3.6 | :Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine NH ₄ Cl..... bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği | 52 |
| Şekil 3.7 | :Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine CaCl ₂ bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği | 53 |
| Şekil 3.8 | :Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine ZnCl ₂ bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği | 54 |
| Şekil 3.9 | :Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Kolşisin etken..... : maddesinin % aktivite-[I] grafiği | 55 |
| Şekil 3.10 | :% 6 oranında Glutaraldehit ile immobilize edilmiş enzim..... için aktivite tayin grafiği | 60 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| ATP | : Adenozin trifosfat |
| EDTA | : Etilendiamin tetra asetik asit |
| EU | : Enzim Ünitesi |
| FAD | : Flavin adenin dinükleotid |
| GA | : Gluteraldehit |
| GMP | : Guanozin monofosfat |
| IMP | : İnozin monofosfat |
| IR | : İskemi reperfüzyon |
| Mo-co | : Molibden-kofaktörü |
| NADH | : Nikotinamid adenin dinükleotid |
| PRPP | : 5-fosforibozil 1-pirofosfat |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| SDS | : Sodyum dodesil sülfat |
| PAGE | : Poliakrilamid jel elektroforez |
| Tris | : Trihidroksi metil aminometan |
| Tris-HCl | : Tris(hidroksimetil)aminometan HCl |
| XO | : Ksantin Oksidaz |
| XDH | : Ksantin Dehidrogenaz |
| XOR | : Ksantin Oksidoredüktaz |
| ΔA | : Absorbans farkı |

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm ve bu konuyu bana yüksek lisans tezi olarak öneren hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, içten ve sıcaklığıyla yanımda olan danışmanım Yard.Doç.Dr. Semra IŞIK'a, çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Yard.Doç.Dr. Serap BEYAZTAŞ ve Yard.Doç.Dr. Nahit GENÇER'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Yard.Doç.Dr. Dudu DEMİR, Arş.Gör. Görkem-Serdar SÖNMEZ, Uzm. Esra- Feyzullah TOKAY ve biyokimya bölümü doktora öğrencilerinden Çiğdem BİLEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans yıllarımdan bu yana hep yanımda olan, bilimsel araştırma yapmam için beni her zaman destekleyen, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli eşim, hayat arkadaşım Arş.Gör. Mustafa Oğuzhan KAYA'ya müteşekkirim.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu tezimi biricik oğlum Muhammed Onurhan KAYA'ya hediye etmek isterim.

1.GİRİŞ

Ksantin oksidoredüktaz (XOR) enzimi ilk saflaştırılan flavoproteinlerden birisidir. Ayrıca söz konusu enzim molibden içeren önemli proteinler arasındadır [1-4]. XOR enzimi, ksantin oksidaz (XO; EC: 1.2.3.22) ve ksantin dehidrogenaz (XDH; EC: 1.1.3.204) olmak üzere birbirine dönüşebilen iki farklı yapıya sahiptir [4-6]. Bu yapılardan XO, elektron alıcı olarak moleküler oksijeni kullanması sonucu reaktif oksijen türleri oluşturmaktadır [6]. Bu nedenle özellikle klinik açıdan XDH formuna göre daha fazla ilgi görmektedir.

Ksantin oksidaz pürin metabolizmasında anahtar role sahiptir [3,7]. Bu enzim pürin yıkımının son iki basamağını katalizlemesinin yanı sıra hız belirleyici enzim olması da metabolizma için son derece önemlidir. Bunun yanında XO, NAD^{+} 'nın rejenerasyonu, demir absorpsiyonu ve mobilizasyonu, nitratların indirgenmesi gibi biyolojik fonksiyonlarıyla dikkat çekmektedir [8-20]. Ayrıca XOR'ın çok sayıda organik bileşiklerin hidrosilasyonunu da katalizlemesi bu enzimin biyotransformasyonda kullanma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum bu enzimin endüstriyel önemini de artırmaktadır. Ksantin oksidoredüktaz enziminin ticari olarak geniş bir kullanım alanı vardır. Ksantin, hipoksantin ve inozinin belirlenmesinde, dolayısıyla guanin ve guanozinin saptanmasında önemli bir araçtır [21-22]. Buna ilaveten, guanaz ve nükleosit fosforilaz enzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanılır [23].

Ksantin oksidaz, bakteriler de dahil olmak üzere incelenen tüm türlerde saptanmıştır [8, 13, 16]. Memeli dokularında çok geniş bir dağılım göstermekle birlikte en fazla karaciğer, ince barsak mukozasında ve böbreklerde bulunmaktadır. Ayrıca söz konusu enzim sütte bol miktarda bulunduğu için XO'nun saflaştırılmasında en çok tercih edilen kaynaktır [7, 24].

Ksantin oksidaz'ın bazı dokularda yüksek seviyede olması doku hasarı ve ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [25-26]. Çünkü sitotoksik oksijen metabolit

ürünleri (H_2O_2 , O_2^- ve OH^-), hücrelerin oksidatif hasarına neden olduğuna inanılmaktadır [25]. Buna karşın reaktif oksijen türlerinin organizmaya vereceği hasara karşı XDH'nin önemli antioksidan bir bileşik olan ürik asidin sentezinde önemli rolü bilinmektedir [27].

1.1 Araştırmanın Amacı

Araştırmamızı üç ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak yukarıda anlatıldığı gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip XO'nun daha önceden Arslan O. tarafından sentezlenen afinite jeli kullanılarak saflaştırılmasıdır. Bu şekilde immobilizasyonda kullanma potansiyeline sahip bu enzimin daha kısa sürede ve yüksek saflıkta elde edilmesinin önemli olacağını düşünmekteyiz.

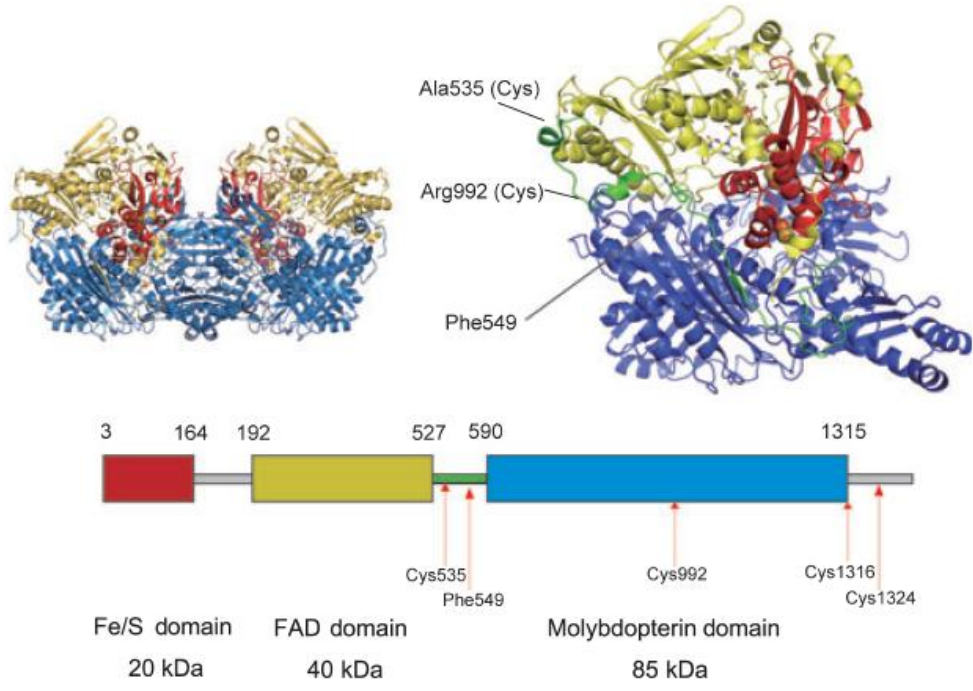
Araştırmamızın ikinci bölümünde saflaştırılan enzimin gut hastalığında yaygın olarak kullanılan kolşisin etken maddesine ve ağır metallerle karşı ilgisi araştırılacaktır. Önemli fizyolojik fonksiyona sahip bu enzimin aktivitesinin söz konusu etken madde ve ağır metallerden nasıl etkilendiği ortaya çıkarılacaktır.

Araştırmamızın son bölümünde ise, saflaştırılan enzim gluteraldehit üzerine immobilize edilecektir. Elde edilecek sonuçların endüstride ve klinik çalışmalarda önemli olabileceği düşünülmektedir.

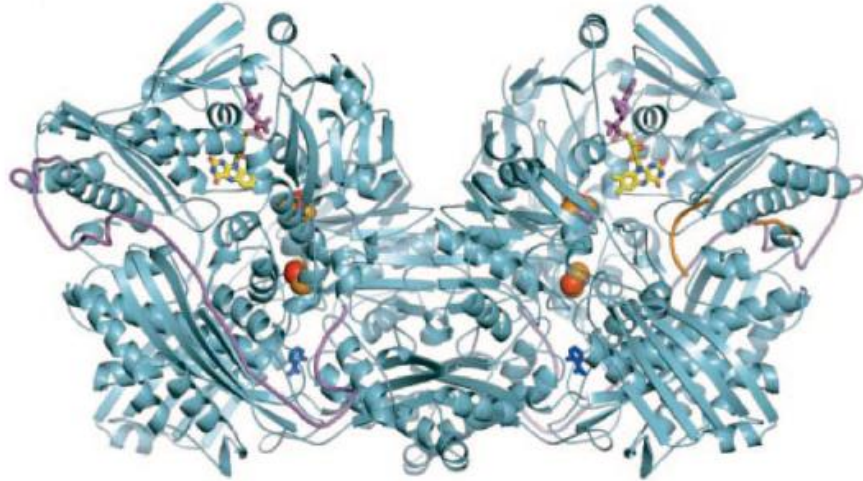
1.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Biyokimyası

1.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Yapısı

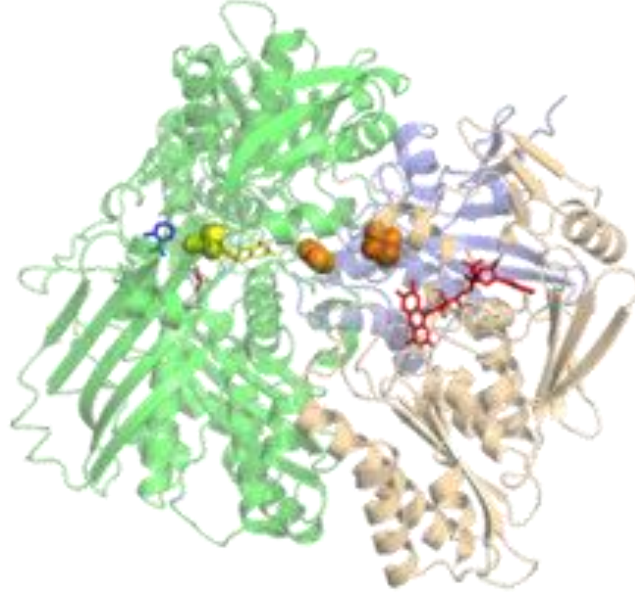
Ksantin oksidoredüktaz, hidroksilaz ailesinin bir üyesidir (Şekil 1.1) [4]. Enzim, 300 kDa ağırlığında dimerik yapıda olduğu saptanmıştır. Her bir alt birim, flavin kofaktörü bağlanma bölgesinde molibden-demir içeren 1333- 1358 amino asit rezidülerinden oluşmuş bir enzimdir [4-5]. Memelilerde XOR, birbirine dönüşebilen iki formu bulunmaktadır. Bu izoformlardan birisi, elektron alıcısı olarak NAD^+ kullanan ksantin dehidrogenaz (XDH; EC: 1.1.3.204) (Şekil 1.2) ve elektron alıcısı olarak O_2 kullanan ksantin oksidaz (XO; EC: 1.2.3.22)'dir (Şekil 1.3) [6].



Şekil 1.1: Ksantin oksidoredüktaz enziminin kristal yapısı [28]



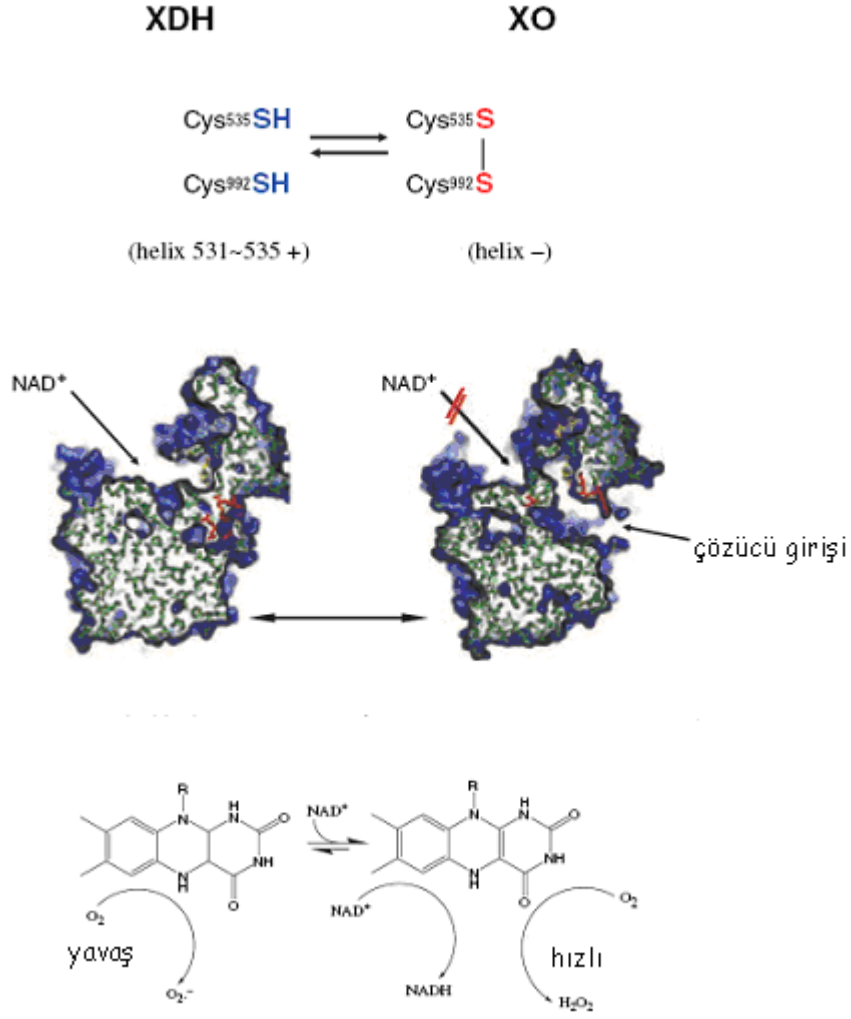
Şekil 1.2: Ksantin dehidrogenaz enziminin moleküler şekli [29]



Şekil 1.3: Ksantin oksidaz enziminin moleküler şekli [30]

XDH ve XO enzimlerinin biyolojik rollerinde farklılıklar belirlenmiştir [31]. Her iki enzim formu, geniş substrat aralığında yükseltgenme kapasitesi bakımından ve büyüklükleri, alt birim kompozisyonu ve kofaktör ihtiyacı bakımından benzerlik göstermektedir [4]. Organizmalarda yapılan çalışmalarda XDH'in birincil gen ürünü ve memeli dokularındaki bu enzimin baskın form şeklinde bulunduğu saptanmıştır [32-34].

HücreSEL mekanizmanın, XDH ve XO formlarının nispi doku seviyelerinin düzenlenmesinde XOR'ın işlevi henüz belirlenmemiştir. Sülfhidril oksidasyonunun ya da proteolitik proseslerin sonucu olarak XDH, XO'a dönüşür [4] (Şekil 1.4).



ZW1

Şekil 1.4: XDH enziminin XO enzime dönüşmesi [28]

1.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Substratları

Ksantin oksidoredüktaz çok sayıda substratın oksidasyonunu katalizler [9, 35, 36]. Bunlardan bazıları, asetaldehit, pürin, hipoksantin, ksantin, 1-metilksantin, NADH, allopurinol, pteridin, 6-tioksantin ve 2-hidroksipirimidindir. Bu substratlara karşı enzimin spesifitesini belirlemek değişik çalışmalarda farklı okside edici substratların kullanılması ve farklı pH'larda ölçümler yapılmış olması nedeniyle zordur. Ayrıca XOR'ın oksijen, metilen mavisi ve 2,6-diklorofenol indofenol gibi kimyasal boyalar, ferrisiyanid, NAD^+ , kinonlar ve çok sayıda diğer bileşiklerde söz konusu enzimin substratları arasındadır [16].

1.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

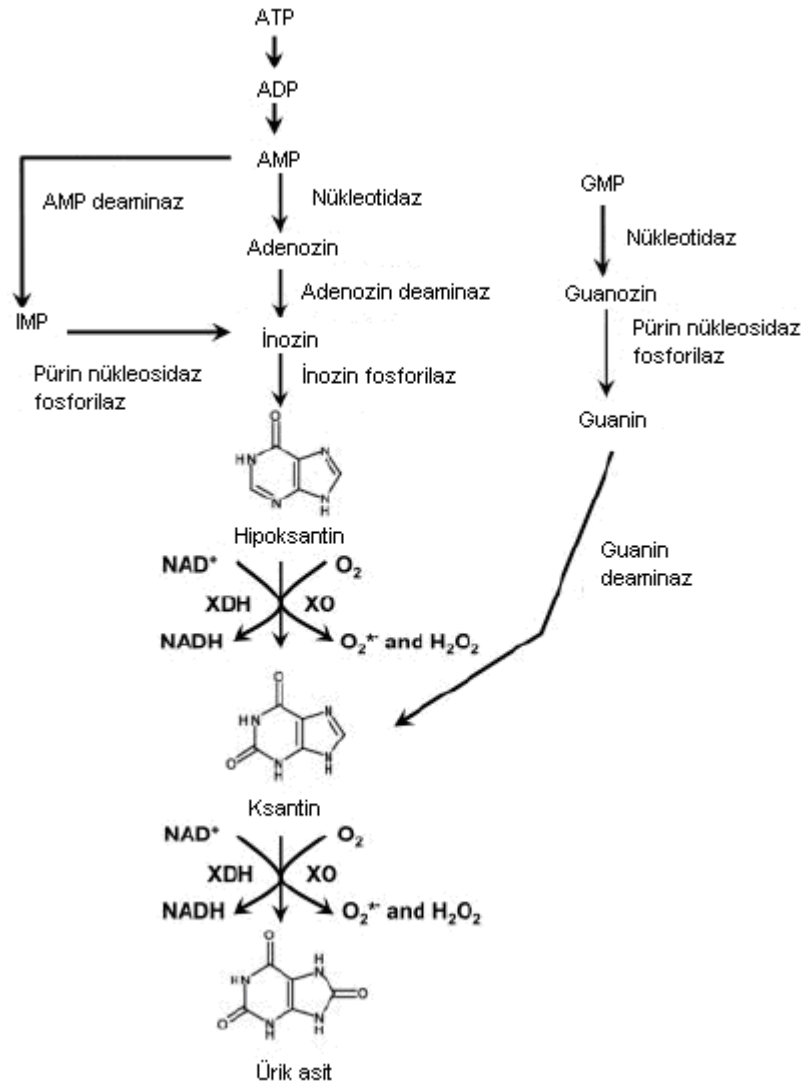
Ksantin oksidoredüktaz aktivitesi, bakterilerden insana kadar incelenen tüm türlerde saptanmıştır [8, 13, 16]. Memeli dokularında aktivite geniş bir dağılım göstermektedir [8].

İnsan dokularında yapılan immuno-histokimyasal çalışmalarda, sitozolik bir enzim olan XOR'ın karaciğerde, ince barsak mukozasında, süt salgılayan meme bezlerinde, kalp, böbrek, beyin, aort, akciğer, iskelet kası, meme bezi ve barsakların küçük damarların endotel hücrelerinde [8, 16, 37, 38, 39], anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir [40, 41]. Esas olarak sitoplazmik yerleşim gösteren enzimin peroksizomlarında da bulunduğu bildirilmiştir [16, 42].

Ksantin oksidoredüktaz enzimi, pürin metabolizmasında pürin yıkımının son iki basamağını katalizler. Pürin katabolizmasının hız kısıtlayıcı enzimidir. Hipoksantinine ksantine, ksantinün ürik aside dönüşümünü katalizlerken serbest radikallerin oluşumuna neden olur. İnsanlarda ürat oksidaz enzimi bulunmadığı için ürik asit, reaksiyonun son ürünüdür [8, 16] (Şekil 1.5).

NADH oksidaz aktivitesinde, indirgeyici substratların çoğu Molibden kofaktörü (Mo-co) bölgesi ile etkileşirken, NADH elektronlarını FAD bölgesine aktarır. Redoks merkezlerindeki hızlı dengelemeyi takiben elektronlar genelde FAD bölgesinde NAD^+ veya moleküler oksijene geçerler [1, 9, 16].

In vivo ve *in vitro* çalışmalar XOR'ın ince barsakta demir absorpsiyonu ve karaciğerde demir mobilizasyonu üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir [11, 12, 16]. Diyetle alınan demir, Fe^{+2} formunda absorblanır ve mukozal hücrelerde XO tarafından Fe^{+3} formuna yükseltgenir. Böylece XO, demirin transferrine bağlanarak mukoza hücrelerinden transsellüler transportunu düzenler. XO'ın ferooksidaz aktivitesi seruloplazminden 1000 kat daha fazladır [10,16]. Karaciğerde, XDH ferritin demirinin indirgeyici salınımını uyararak demir metabolizmasını etkiler [16].



Şekil 1.5: Pürinlerin hidrolizi [29]

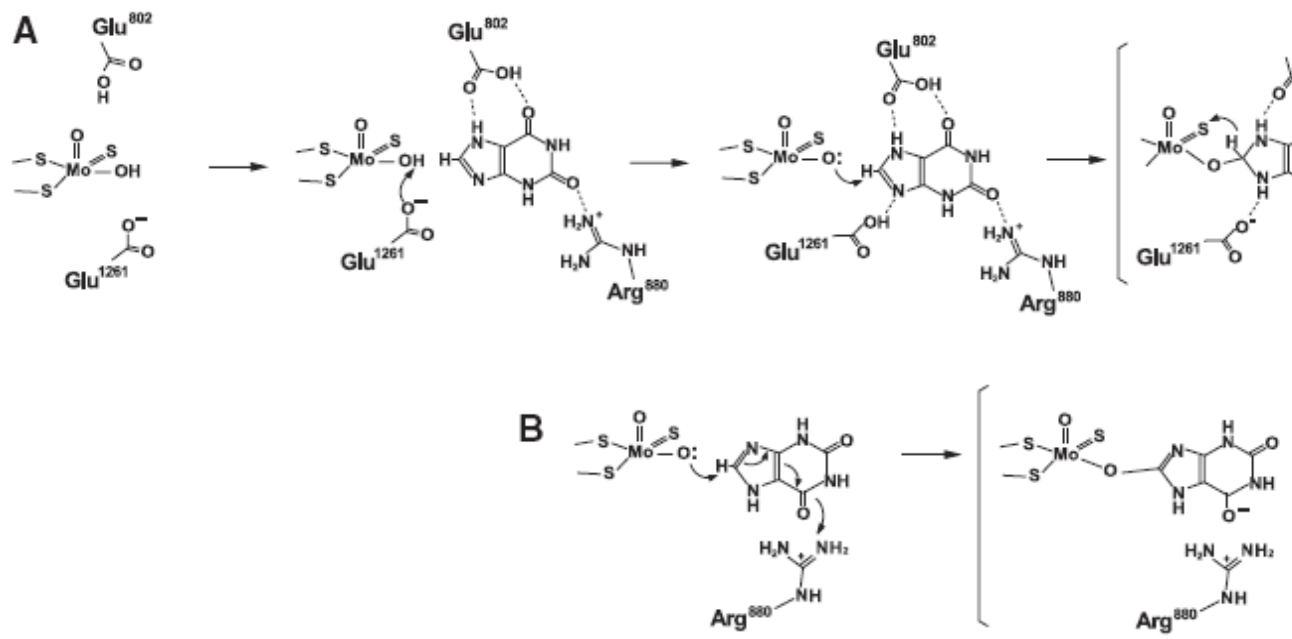
Ksantin oksidoredüktaz çok sayıda N-heterosiklik ve aldehit substratların, piridinlerin, pteridinlerin hidroksilasyonunu da katalizler [13, 16]. Ayrıca ksantin oksidoredüktazın, nitratların nitritlere ve nitrik oksite indirgenmesini katalizlediği gösterilmiştir [14]. Buna ilaveten XOR, glutatyonda olduğu gibi sülfidril gruplarının oksidasyonunu katalizler. Enzimin inorganik iyodür ile proteinlerin iyodinasyonunu katalizlediği de saptanmıştır [15, 16].

Ksantin oksidoredüktazın hipoksantin varlığında bakterisidal etkinlik gösterdiği ve *in vivo* olarak bakteriyel enfeksiyonlara cevapta aktive olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir [18, 16]. Enzimin bu işlevine serbest radikal oluşturabilme kapasitesi aracılık etmektedir. Bu etki yalnızca süperoksit için söz

konusu değildir. Nitrit varlığında XOR tarafından oluşturulabilen peroksinitrit güçlü bir bakterisidal ajandır [16, 19]. XOR'ın nitrit oksit oluşturabilme yeteneği de göz önünde bulundurulursa peroksinitrit daha da önem kazanmaktadır. Enzimin bakterisidal rolü, anne sütünde bulunmasına da bir açıklama getirmektedir. Bakterisidal etkinliği ile XOR enzimi yeni doğanın steril sindirim sistemini patojen bakterilerden koruyucu etkinliğe sahiptir [20]. Anne sütündeki bu etkinlik sindirim sistemi epitelinde bulunan XOR enzim aktivitesi ile de özdeş ve birbirini tamamlayıcıdır [16].

1.2.4 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Etki Mekanizması

XO, ksantinün ürik asite oksidasyonunu katalizlerken moleküler oksijenin eş zamanlı redüksiyonuna da neden olmaktadır. Reaksiyon sırasında, önce ksantin enzimin Mo-co bölgesine bağlanır. Ksantin hızla ürata okside olurken aynı zamanda Mo^{+6} dan Mo^{+4} 'e indirgenir. Molibdenden bir elektronun transferi ile ilgili reaksiyonlar sonrası Mo^{+6} değerlikli duruma geçerken FAD iki elektron alarak indirgenir ve $FADH_2$ bunu takiben, moleküler oksijen, $FADH_2$ 'e bağlanır ve iki elektron alarak indirgenir [1, 16]. İndirgenen moleküler oksijen serbestleşir ve böylece iki elektron alarak indirgenmiş olan enzim rejenere olarak eski haline dönüşür[43,44](Şekil1.6)



Şekil 1.6: Ksantin oksidaz enziminin ksantin substratına karşı reaksiyon mekanizması [45, 46]

1.2.5 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi

Ksantin oksidoredüktazın biyolojik işlevlerini etkileyen başlıca patolojiler kalıtsal ksantinüri, hiperürisemi, gut ve iskemi-reperfüzyon injürisidir [16].

Bunlardan kalıtsal ksantinüri, ksantin oksidoredüktaz, aldehit oksidaz (AO) ve sülfid oksidaz molibden kofaktör içeren enzimleridir. Kalıtsal ksantinüri bu enzimlerin yetersizlikleri ile kendini gösteren ve otozomal resesif geçişli kongenital bir bozukluktur. Klasik ksantinüri tip I, klasik ksantinüri tip II ve molibden kofaktör eksikliği olmak üzere üç tipi vardır [16].

Klasik ksantinüri tip I, XOR genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkar ve XOR aktivitesi yoktur. Klasik ksantinüri tip II, insan molibden kofaktör sülfüraz genindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar ve hem XOR hem de AO'ın aktiviteleri yetersizdir [47, 48]. Molibden kofaktör eksikliğinde Mo-co sentezini düzenleyen genlerin defektleri ile ortaya çıkar [16, 49].

Ksantin oksidoredüktazın, iskemi reperfüzyon (IR) hasarında anahtar role sahip olduğu bulunmuştur. Bu patolojik mekanizmanın merkezinde enzimin reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturma özelliği yatar [50- 56]. Buna göre, iskemi oluşan dokuda ATP yıkımına bağlı hücrel enerji yük azalması sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. İntrasellüler Ca^{+2} artışı, Ca^{+2} veya Ca^{+2} kalmadın bağımlı proteazları aktive eder. Bu proteazlar, kısmi proteoliz ile fizyolojik koşullarda dokularda bulunan esas XOR formu olan XDH'ın XO'a dönüşümüne neden olur [16, 57]. Aynı zamanda ATP yıkımını takiben hücrelerde hipoksantin birikir. Reperfüzyon fazında, dokularda artmış olan hipoksantin, O_2 ve XO birlikte bol miktarda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşturur. Bu oluşan serbest radikaller de doku hasarına sebep olur [57- 62].

Gut hastalığı, genellikle erkeklerde görülen ve eklemler ile böbreklerin özellikle etkilendiği bu hastalıkta görülen en önemli biyokimyasal değişiklik serum urat düzeyinin artmasıdır. Özellikle eklemlerde yüksek miktarda sodyum urat kristallerinin birikmesi enflamasyon, ağrı ve artrit genişlemesine yol açmaktadır. Akut artrit atakları ile başlayan ve kronik gut artritine doğru ilerleyen hastalık, ilk

olarak genellikle ayak başparmağında ortaya çıkmakta ve zamanla diğer eklemlere yayılmaktadır. Ürat konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak böbrek tübüllerinde hasara neden olmaktadır [63, 64].

İnsanlarda pürin metabolizmasının son ürünü olan ve suda az çözünen ürik asidin pKa değeri 5.75 civarındadır. Zayıf asit olan ürik asit, fizyolojik pH değerinde (pH 7.4) % 98 oranında iyonize olmakta ve monosodyum ürata çevrilmektedir. Ürik aside göre daha fazla çözünen monosodyum üratın vücut sıvılarındaki çözünürlüğü 6,4 mg/dL kadardır. Özellikle eklemler ve kulak memesi gibi yumuşak dokularda biriken monosodyum ürat, polimorf çekirdekli lökosit ve makrofajların artışı ile şiddetli enflamasyona neden olmaktadır. Lökositlerde çoğunlukla anaerobik glikolizin kullanılması ile artan laktat konsantrasyonu, ortamın pH değerinin azalmasına yol açmaktadır. Asit ortamda üratlar, tuz olmayan ve daha fazla çözünen yapılara dönüştüklerinden ürat kristallerinin çökmesi kolaylaşmaktadır. İdrar genellikle asit olduğundan gutta gözlenen mesane taşı oluşumunda hiperürisemi önemli rol oynamaktadır [63, 64].

Sıcaklık, monosodyum üratın çözünürlüğünü etkileyen bir başka etkidir. Sıcaklığın azalması ile monosodyum üratın çözünürlüğü azalmaktadır. Bu nedenle eklem içi sıcaklığı daha düşük olan eklemler daha kolay etkileneceği için gut atakları öncelikle periferik eklemlerde (ayak başparmağında) başlamaktadır [63].

Gutta biyokimyasal mekanizma henüz anlaşılammıştır. Özellikle primer gutta üratın aşırı üretimine neden olan genetik bir kusurun rol oynadığı bildirilmektedir. Lesch-Nyhan sendromunda olduğu gibi bazı gutlu hastalarda, İnozin monofosfat (IMP) ve GMP kurtarma yolundaki hipoksantin-guanin fosforibozil transferazın kısmen eksikliğinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu enzim eksikliğinde kurtarma yolu ile IMP ve GMP sentezi azaldığı için guanin ve hipoksantin ürik aside yıkılması hiperürisemiye yol açmaktadır. Bu arada kurtarma yoluna katılmadığı için konsantrasyonu artan 5-fosforibozil 1-pirofosfat (PRPP), *de nova* pürin biyosentezini uyarmaktadır. *De nova* sentezin atması daha çok yıkım ve daha yüksek ürik asit düzeyi anlamına gelmektedir. Ancak bu hastalıkta görülen enzim eksikliği, Lesch-Nyhan sendromundaki nörolojik belirtilerin ortaya çıkmasına yol açacak kadar aşırı değildir [63].

Aktif fosforibozilpirofosfat sentetaz düzeyinin anormal şekilde yükseldiği bazı gut hastalarında, genetik İR nedene bağlı olarak enzimin allosterik kontrolünün bozulduğu gösterilmiştir. Bu durumda PRPP sentezini artması, *de nova* pürin sentezini arttırmaktadır. Sonuçta bu hastalarda pürin katabolizması artmakta damar ürik asit konsantrasyonu yükselmektedir [10].

Kalıtsal bir bozukluk olan tip I glikojen depo hastalığı (Von Gierke hastalığı), primer gut hastalığı nedenleri arasında bulunmaktadır. Glukoz 6-fosfotaz aktivitesinin bozulduğu bu hastalıkta artan Glukoz 6-fosfat düzeyi pentoz fosfat yolunun aktivitesini artırmaktadır. Bu yolun aktivitesinin artması sonucu konsantrasyonu yükselen riboz fosfat, hücrel PRPP düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Buna bağlı olarak artan *de nova* pürin nükleotid sentezi, pürin katabolizmasının hızlanmasına ve hiperürisemiye bağlı gut görülmesine neden olmaktadır [63].

Hiperürisemi oluşturarak primer guta yol açan bir diğer kalıtsal bozuklukta ise glutatyon redüktaz aktivitesinin artmasına bağlı olarak hücrel NADP⁺ düzeyi çok artmaktadır. NADP⁺ artışı ile aktivitesi artan pentoz fosfat yolunda riboz fosfat sentezi hızlanmakta ve tip I glikojen depo hastalığında olduğu gibi gut oluşmaktadır. Ayrıca Lesch-Nyhan sendromu, kanser ve kronik böbrek yetmezliği gibi başka hastalıklara bağlı olarak sekonder gut gelişebilmektedir [63].

Gut hastalığının tedavisinde nükleoprotein içeriği zengin besinlerin kısıtlanmasının yanı sıra, serum ürat düzeyinin azalmasına yol açan ilaçlar kullanılmaktadır. Ksantin oksidazı inhibe eden ve bir hipoksantin analogu olan allopürinol, tedavide yaygın şekilde kullanılmaktadır [63].

Ksantin oksidaz için önce substrat olarak davranan bu bileşik, daha sonra inhibisyon etkisi yapmaktadır. Ksantin oksidazın allopürinolu hidrosillemesi ile oluşan alloksantin, ksantin oksidazın aktif merkezine bağlanarak inhibe etmektedir. Böylece ürik asit oluşumu azalmakta, çözünürlüğü ürik aside oranla daha fazla olan hipoksantin ve ksantin serum düzeyleri artmaktadır. Serum düzeyleri artan hipoksantin ve ksantin, hiperürisemide olduğu gibi sorunlara neden olmamaktadır. Tedavide ayrıca idrarla ürat atılımını kolaylaştıran ürikozürik ilaçlar yararlı

olmaktadır. Gut ağrılarının ve ataklarının azaltılmasında bir alkaloid olan kolşisinden yararlanılmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda sitozolik mikrotübülleri depolimerize eden kolşisinin düşük konsantrasyonlarda benzer etkisi bulunmamaktadır. Düşük kolşisin konsantrasyonlarında oluşan tübülün-kolşisin kompleksi, mikrotübüllere bağlanarak büyümesini önlemektedir [63, 64].

Antioksidan etkisi bulunan ürat oldukça reaktif ve zararlı olan serbest radikallere karşı (hidroksil, süperoksit, singlet oksijen) koruyucu bir etki göstermektedir. Üratın bu antioksidan etkisinin en az askorbik asit kadar olduğu bilinmektedir [63].

Lesch-Nyhan Sendromu, X-bağılı resesif kalıtsal bir bozukluk olan bu hastalık, 2-3 yaşlarında nörolojik belirtilerle ortaya çıkmaktadır. El ve ayak parmakları ile dudaklarını ısırarak kendi kendilerine zarar veren bu çocukların saldırgan davranışları başkalarına da yönelik olabilmektedir. Bu hastalarda ayrıca zeka geriliği ve spastik kusurlar da görülmektedir [63].

Kurtarma yollarında IMP ve GMP sentezi için gerekli olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz aktivitesinin eksik olması veya bulunmaması bu hastalıktaki en önemli biyokimyasal kusurdur. Enzimin eksikliğinde guanin ve hipoksantin katabolizmasının artmasından ötürü ürik asit düzeyi yükselmektedir. Yine PRPP artışına bağlı olarak *de nova* pürin sentezi artmaktadır. Ürik asit düzeyi artan hastalarda normal yaşam devam etmekte, ileri yaşlarda gut ortaya çıkmaktadır. Bu enzimin eksikliği ile nörolojik belirtiler arasındaki ilişki henüz tam olarak anlaşılabilmiştir. Normal koşullarda beyindeki hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz düzeyi ise de daha düşüktür. Bu nedenle beyin IMP ve GMP sentezi için kurtarma yollarına daha çok bağımlıdır. Bu hastalıkta ürik asit yapımını azaltan allopürinol *de nova* pürin sentezini azaltmadığı için nörolojik sorunların ortadan kalkmasına yardımcı olamamaktadır [63, 64].

Pürin nükleozid fosforilaz eksikliği, otozomal resesif olarak kalıtılan hastalıkta T lenfositlerinde fonksiyon bozukluğu olduğu halde, B lenfositlerin fonksiyonları normaldir. Pürin nükleozid fosforilaz eksikliğine bağlı olarak pürin nükleotidlerin katabolizması yavaşladığı için ürik asit sentezi azalmış, guanozin,

deoksiguanozin, inozin ve deoksiinozin düzeyleri ise artmıştır. Eritrositlerde özellikle dGTP birikmektedir. dGTP ve ADP moleküllerinden oluşan dADP, ribonükleotid redüktazın bilinen en güçlü inhibitörü olan dATP molekülüne çevrilmektedir. UDP molekülünün indirgenerek CDP oluşturması, dGTP tarafından inhibe edilmektedir [63, 64].

Hipoürisemi, ürat sentezinin azalmasına veya atılımının artışına bağlı olarak görülen nadir bir bozukluktur. Kalıtsal ksantin oksidaz eksikliğinde, şiddetli karaciğer hastalığında ve Fanconi sendromu gibi renal tübüler bozukluklarda hipourisemi görülebilmektedir. Allopürinol ile aşırı tedavi ve ürikozürük ilaç kullanımı sonrasında hipourisemi ortaya çıkmaktadır [63].

1.3 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, canlı sistemlerinde kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Belirli bir düzen ile sıralanmış binlerce atomdan meydana gelmiş bu moleküller, canlı hücrelerde cereyan eden farklı kimyasal reaksiyon topluluklarının katalizlenmesini sağlarlar. Biyolojik proseslerde, hastalık ve sağlıktaki rolleri geniş bir şekilde incelenmektedir [66].

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 [66]. 20. yüzyılın başlarında, enzimlerin fermantasyon işlemlerinden sorumlu olduğu bulunmuş, 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 [67]. 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 [68].

Enzimler çözültide 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 yoğunlaşılabilir durumdur [69].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere bağlanmasının veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması, bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak ifade edilebilir [70,71]. İmmobilize edilmiş enzimler genel olarak endüstriyel uygulamalarda katalitik özelliklerinin yanında, ekonomik olarak da son derece geliştirilmiş olmasının önemi bir hayli fazladır (Çizelge 1.1) [72].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Japonya'nın Tanebe Seiyaku Limited şirketinde Chibata ve arkadaşları tarafından, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae* aminoasilaz'ın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir [73]. İmmobilize enzimlerin diğer önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak verilebilir (Çizelge 1.2). Bunun yanında bazı endüstriyel proseslerde, istenilen enzimi içeren bütün mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılabilir [74].

Endüstriyel olarak uygulamalarından başka, biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıpta kullanılan ilaçlardaki pekçok biyoteknolojik ürünlere enzim immobilizasyonunun temel teşkil ettiği görülmektedir [75].

Özellikle son 20 veya 30 yıla baktığımızda, immobilizasyon teknikleri hızla gelişmiştir ve immobilizasyon teknikleriyle ilgili tasarımlar önemli oranda artmıştır. Ancak halen mevcut işlemlerde ilerleme gerekmektedir. İmmobilize enzimlerin diğer pratik işlemlere uygulanabilirliğini artırmak için yeni metodolojilerin geliştirilmesi ve mevcut tekniklerin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Çizelge 1.1: İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri [72]

| Avantajları | Dezavantajları |
|-----------------------------|------------------------------|
| Katalizin tekrar kullanımı | Aktivitede kayıp veya azalma |
| Kolay reaktör kullanımı | Difüzyonel sınırlama |
| Kolay ürün ayrılması | İlave maliyet |
| Geniş oranda reaktör seçimi | |

Çizelge 1.2: İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler [74]

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

1.3.1. Enzim İmmobilizasyonunun Tarihi

İmmobilize biyokatalizörlerin gelişimini üç adımda göstermek mümkündür (Çizelge 1.3). İlk adımda, 19. Yüzyılın başlangıcında, immobilize edilmiş mikroorganizmalar pek çok deneysel çalışmalarda kullanılmışlardır. Bu çalışmalardan bazıları, sirkenin mikrobiyal ürünü (bakteri oluşmuş ağaç talaşının üzerine alkol içeren solusyonların damıtılması vasıtasıyla) ve atık su arıtma filtreleri veya süzme işlemleridir [76].

Modern enzim immobilizasyonuna bakmak için 1940'ların sonlarına gitmek gerekir. Ancak o dönemde yapılan pek çok araştırma farklı sistem ve düzenlerde yayınlanan çalışmalar olduğu için pek çoğu biyokimyacılar tarafında önemsenmez. Güncel teknolojilerin temelleri 1960'larda geliştirilmeye başlanmış ve bu tarihten itibaren bu konuyla alakalı pekçok makale yayınlanmıştır. İkinci adımda, sadece immobilize edilmiş tek enzimler kullanılmış ancak 1970'lerde çok daha canlı hücreler ve kofaktör rejenerasyonu ile iki enzim reaksiyonları içeren son derece kompleks sistemler geliştirilmiştir. Son adıma örnek olarak keto asitlerden stereoselektif aminasyon reaksiyonu ile L-aminoasit dehidrogenaz enzimi

kullanılarak L-aminoasit ürünlerinden bahsedebiliriz. Bu yöntem nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve koenzimlerin rejenerasyonunun formik asidin, karbon dioksit enzimatik oksidasyonuna, NAD^+ dan NADH'a indirgeme reaksiyonu eşlik eden aminasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ikinci enzim, format dehidrogenazdır [77].

1.3.2 Taşıyıcı Seçimi

Matriksin niteliği, immobilize enzim sistemlerinin tasarlanmasında son derece önemlidir. İdeal bir taşıyıcıda genel olarak; basınca karşı fiziksel direnç, biyolojik uygunluk, mikrobiyal ataklara karşı direnç, hidrofilik olması, enzimin seçiciliğini artırma, ürün inhibisyonunu düşürme gibi özelliklere sahip olabilmelidir [78].

Taşıyıcılar kimyasal bileşimlerine göre organik veya anorganik olarak sınıflandırılabilirler. Organik taşıyıcılar organik ve sentetik olarak alt gruplara ayrılırlar.

Matriksin fiziksel özellikleri (ortalama tanecik çapı, şişme davranışı, mekanik direnç ve basınç altındaki davranışı) immobilize enzimlerin performansında son derece önemlidir. Bunun yanında immobilizasyon işleminin belirlenmesi için kullanılacak reaktör türünün belirlenmesinde (karıştırma, sabit veya akışkan tank) fiziksel özelliklerin oldukça önemi vardır [79].

Özellikle toplam yüzey alanını belirlemede gözenek parametreleri ve tanecik boyutu önemlidir. Gözeneksiz taşıyıcılarda oldukça az difüzyonel sınırlandırılmalar gözlenir. Ancak bağlanma kapasiteleri düşüktür. Bu yüzden genellikle gözenekli taşıyıcılar tercih edilir. Çünkü yüksek yüzey alanı çok daha fazla enzimin bağlanmasını sağlar ve immobilize enzimi çevresel şartlardan oldukça fazla korur. Gözenekli taşıyıcılar için, akış özellikleri ve kapasiteyi optimize etmek için gözenek dağılımını kontrol altında tutmak oldukça önemlidir [80]. İnorganik taşıyıcıların pek çok avantajlarına rağmen (örneğin; fiziksel, kimyasal veya mikrobiyal indirgemelere karşı yüksek stabilite), pek çok endüstriyel uygulamalarda organik

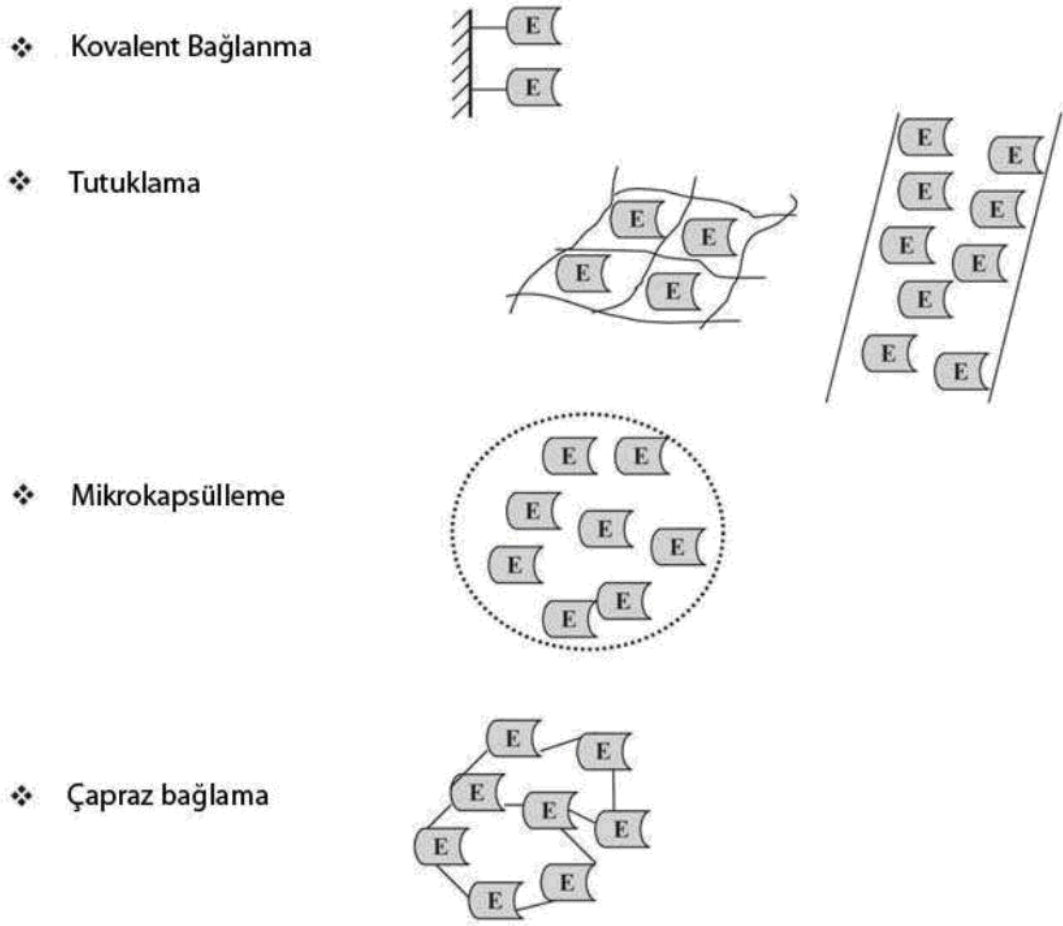
matriksler kullanılır. Bir immobilize enzimin aktivite seviyesinin belirlenmesinde hidrofilik karakterin son derece önemli bir parametre olduğu unutulmamalıdır.

Çizelge 1.3: Taşıyıcıların sınıflandırılması [79]

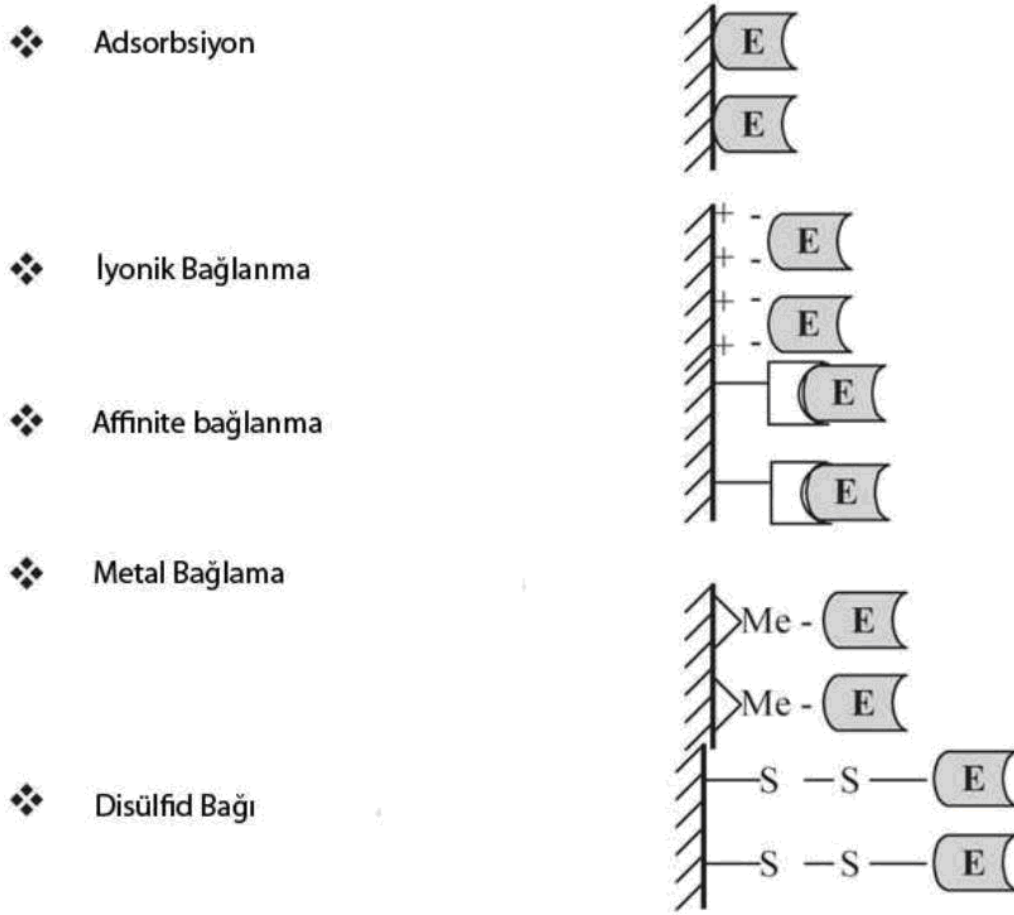
| Organik | |
|--|---------------------|
| Doğal Polimerler | Sentetik Polimerler |
| Polisakkaritler, selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, alginat, proteinler, kollogen, albumin, karbon | Polistiren |
| İnorganik | |
| Doğal mineraller: Bentonit, silika Cam (gözeneksiz ve kontrol edilmiş gözenekli), metallere, kontrol edilmiş gözeneklere sahip metal oksitler. | |

Yaygın olarak kullanılan en önemli taşıyıcılardan birisi agarozdur. Yüksek gözenekli yapısına ilaveten, proteinler için yüksek kapasite sağlar. Matriks olarak agarozu kullanmanın bazı diğer avantajları; hidrofilik karakterde olması, türevlerine dönüştürmenin kolay olması, yüklü grupların olmaması (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu engellemek için) ve ticari geçerliliğidir. Ancak diğer gözenekli yapılarda ve agarozun kullanımında yüksek maliyet önemli derecede sınırlanmaya neden olur. Bu problem, matriks rejenerasyonu ve tekrar kullanımına izin veren dönüşümlü metodların geliştirilmesiyle ancak çözülebilir [81].

Enzimlerin taşıyıcılara bağlanması, dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağdan stabil kovalent bağa uzanan etkileşimlerle olur. İmmobilize enzimlerin sınıflandırılmasında çeşitli yaklaşımlar vardır ve bunlardan birisi de onları iki ana kategoriye ayırmaktır. Bunlar dönüşümlü ve dönüşümsüz metodlardır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın gücü genellikle geri dönüşümlü olması ile ters orantılıdır. Bu iki zıt amacı (kararlılık ve dönüşümlü olması) aynı anda yerine getirmek oldukça güçtür. Bu metodları tasarlarken geleneksel yaklaşım geri dönüşümün bağın gücünün fazla olması yanında ihmal edilebileceği eğilimindedir yani bağın gücünün olabildiğince fazla olması tercih edilir. Dönüşümlü ve dönüşümsüz reaksiyonlar Şekil 1.7 ve 1.8’de gösterilmiştir [82].



Şekil 1.7: Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Yaklaşımları [55]



Şekil 1.8: Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Yaklaşımları [55]

1.3.3 İmmobilizasyon Metodları

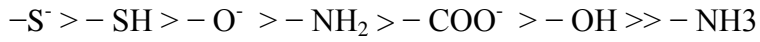
1.3.3.1 Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları

Dönüşümsüz immobilizasyon kavramı biyokatalizörlerin taşıyıcıya bağlanmasından sonra enzimin ya da taşıyıcının biyolojik aktivitelerinin bozulmadan ayrılamayacağı esasına dayanır. Dönüşümsüz enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan prosedürler: kovalent bağlanma, tutuklama veya mikrokapsülleme ve çapraz bağlama olarak ifade edilebilir [83].

1.3.3.2 Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu

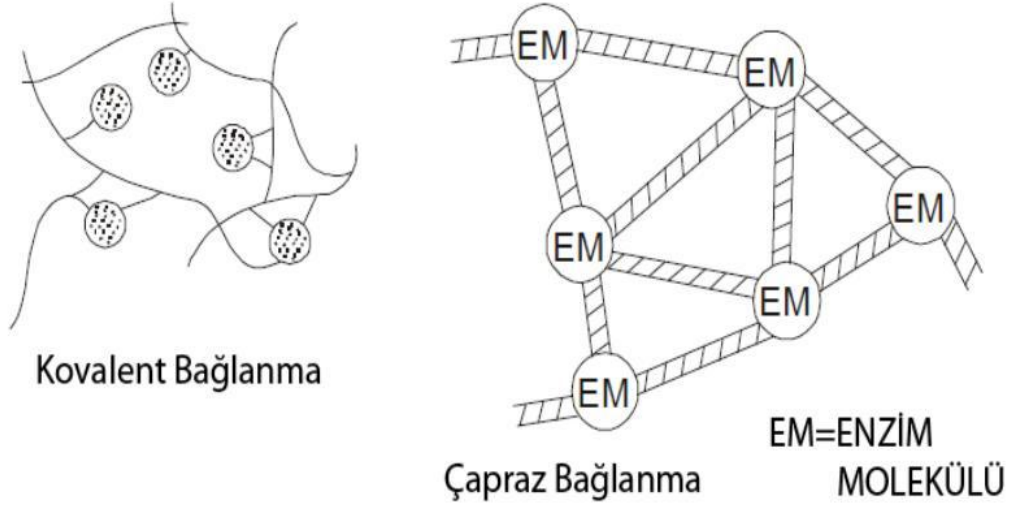
Kovalent bağlı metodlarla proteinlerin immobilizasyonu, immobilizasyon metodları içerisinde en fazla kullanılan metodlardan birisidir [84]. Bu metodu kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matris arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiliye geri kaçışı önlenmiş olmaktadır [85]. 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 [86].

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



Bunun yanında sülfid, sülfidril, oksit, amino, karboksil, hidroksil, amonyum, imino, amid, metiltiyol, guanidil ve fenol halkası gibi pek çok fonksiyonel grup içeren parçalar kimyasal bağlarda etkin olarak görev alır [87].

Bir enzimin kovalent bağlanması, polimerin reaktif gruplar içeren ajanlarla (etilenin kopolimerizasyonu, maleik asidin anhidridi) veya polimer ve enzimin arasında köprü vazifesi görececek iki fonksiyonlu ajanların etkileşmesiyle oluşur [88]. 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 fonksiyonel gruplarla bağ oluşturabilir. Böylece elde edilen net sonuç enzimin aktivitesinin kaybı şeklindedir [89].



Şekil 1.9: Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlama gösterimi [87]

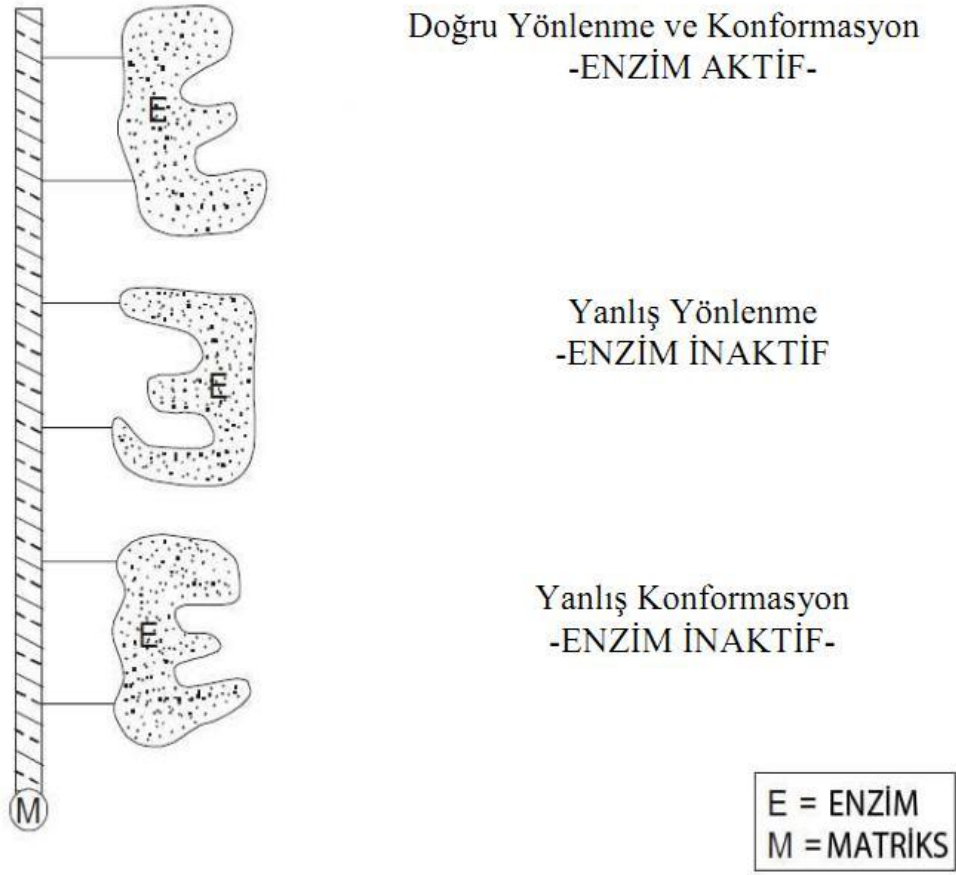
1.3.3.2.1 Kovalent Bağlamanın Avantajları

Enzim immobilizasyonunda kovalent bağlanmanın bazı önemli avantajları aşağıda sıralanmıştır:

1. Enzimlerin taşıyıcı matrikse adsorpsiyonu oldukça uygundur. Bundan dolayı yaygın şekilde kullanılması [90],
2. Geniş spektrumlarda bağlanma reaksiyonları, pek çok fonksiyonel grup içeren taşıyıcılarla sağlam bir bağın oluşumu ve bağlanmadan sonra enzim aktivitesinin devam etmesi [91],
3. Kovalent bağlı tutunma pH, iyonik şiddet ve substrat ile geriye dönüş reaksiyonunun olmamasıdır [92].

1.3.3.2.2 Kovalent Bağlamada Aktivite Kaybı

Kovalent bağlı bir şekilde immobilizasyon gerçekleştiğinde enzimde belli dereceye kadar aktivite kaybı gözlenebilir. Bu da enzimdeki spesifik aktif bölgenin taşıyıcıyla etkileşmesi sonucunda olur [93].



Şekil 1.10: Kovalent Bağı Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri [88]

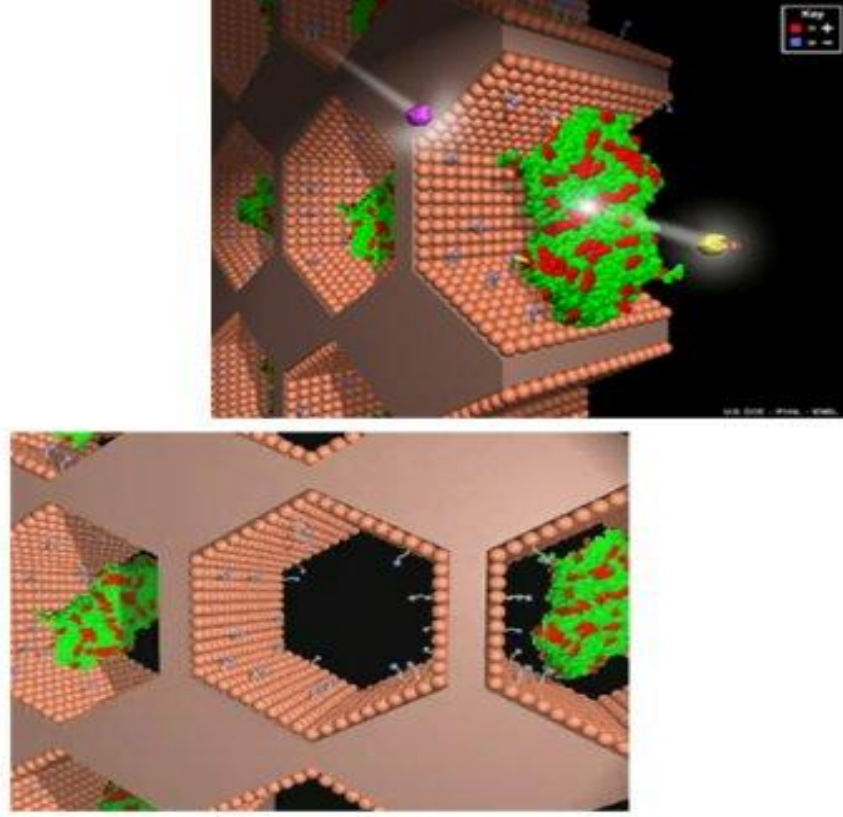
Bir diğer önerilen düşünce tarzında ise enzim immobilizasyonundaki yönlendirme etkisiyle oluşan durumda aktif bölgenin durumu oldukça önemlidir. Bu durum enzimde aktiviteyi azaltabileceği gibi aktivitenin tamamen kaybolmasında neden olabilir [94]. Ancak özellikle yönlendirme etkisiyle aktivite kaybını en aza indirebilmek için aşağıdaki metodlar yapılabilir:

- Enzim immobilizasyonu sadece doymuş substrat konsantrasyonunda
- Yarışmalı inhibitör kullanılarak gerçekleştirilebilir [95].

1.3.3.3 Tutuklama İmmobilizasyonu

Tutuklama metodu; enzimin bir polimerik ağ içerisine yerleştirilmesi bununda enzim ve ürünü geçirebilmesi ancak enzimi tutması prensibine dayanır

[96]. Bu metod yukarıda bahsettiğimiz kovalent bağlanma metodundan farklı olarak matrikse ve membrana bağlanmasını engeller. Enzimlerin tutunmasıyla alakalı farklı yaklaşımlara örnek olarak jel veya life tutuklama ve mikro kapsülasyon örnek olarak verilebilir [97].



Şekil 1.11: Tutuklama İmmobilizasyonunun Gösterimi [98]

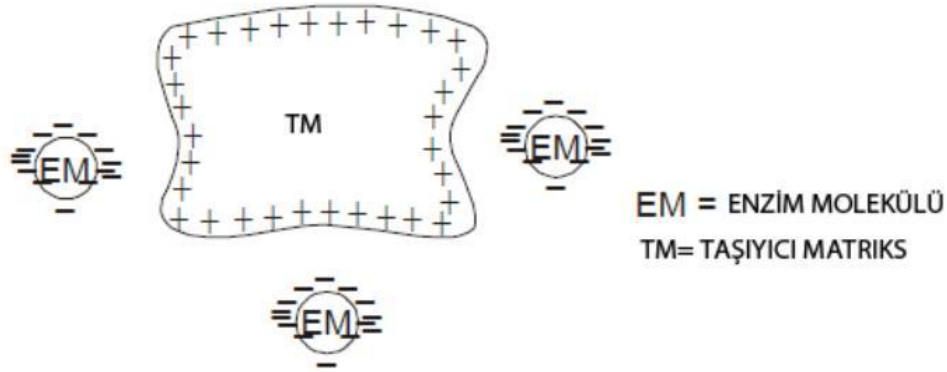
1.3.3.4 Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları

Dönüşümlü immobilize enzimler, enzim-taşıyıcı bağının türünden dolayı ılıman koşullar altında taşıyıcıdan ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için dönüşümlü metodların kullanımı ekonomik nedenlerden dolayı oldukça kullanışlıdır. Çünkü enzimin aktivitesi düştüğünde taşıyıcı rejenere edilip taze, kullanılmamış enzim ile tekrar bağlanabilir. Aslında, taşıyıcı masrafı bütün immobilize edilmiş katalizörlerin masraflarında genellikle sık sık dikkat edilen temel faktördür. Enzimlerin tersinir reaksiyonu biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalarda özellikle değişken enzimler için son derece önemlidir [99].

1.3.3.5 Adsorpsiyon

1.3.3.5.1 Nonspesifik Adsorpsiyon

En basit immobilizasyon yöntemi olan nonspesifik adsorpsiyon genel olarak fiziksel adsorpsiyon veya iyonik bağlanma temeline dayanan bir metottur [100]. Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonunda hidrojen bağlanma, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler matrikse bağlanmada etkilidir. Oysa ki enzimlerin iyonik bağlanmasında tuz köprüleriyle bağlantı görülür [101]. Kovalent olmayan immobilizasyonda, bağın gücünün kuvveti, reaksiyon şartlarını değiştirerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık, solvent polaritesi) değiştirebilir [102]. Adsorpsiyon ile immobilizasyon ılıman koşullarda, uygulanması kolay ve genellikle enzimin katalitik aktivitesi korunur. Bu tür metodlar bu nedenlerden dolayı ekonomik olarak ilgi çekici ancak etkileşimler nispeten zayıf olduğundan, matriksden enzim kaçıışı olabilmesi problem teşkil etmektedir [103].



Şekil 1.12: Nonspesifik Adsorpsiyon İmmobilizasyon Yönteminin Gösterimi [104].

1.3.3.5.2 İyonik Bağlanma

Enzimlerin dönüşümlü immobilizasyonuna, kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşmesi prensibine dayanan yaklaşım örnek olarak verilebilir [105]. Enzimlerin dönüşümlü immobilizasyonunda kromatografik prensiplerin ilk

uygulamalarından birine örnek olarak iyon değiştiricilerin kullanımı örnek olarak verilebilir. Metod basit ve dönüşümlüdür fakat genel olarak enzimlerin bağlarının güçlü olması ve tam olarak aktif oldukları koşulları bulmak oldukça zordur [106]. Özellikle son zamanlarda immobilize polimerik iyonik ligandların kullanımı, protein-matriks etkileşimlerin modülasyonu ile yapılan pek çok çalışma vardır ve böylece türevlerinin özelliklerini daha verimli hale getirebileceği görülmüştür [107]. Enzimlerin geniş çeşitlilikte polietilenimin kullanımı oldukça fazla sayıda patent olarak kayıt edilmiştir.

Ancak, ürün ve substrat aşırı yüklü olduğunda, aşırı yüklü bileşenlerin kullanımı problemleri ortaya çıkabilir. Bu nedenle, enzimin özellikleri, optimum pH ve pH stabilitesi değişebilir. Bu durum uygulamaya bağlı olarak problem gibi görünmesine rağmen enzimin daha alkali veya asidik durumlarına karşı optimal durumlarını değiştirmede yardımcı olur.

1.3.3.5.3 Hidrofobik Adsorpsiyon

Bir diğer yaklaşım da hidrofobik etkileşimlerin kullanımınıdır. Hidrofobik adsorpsiyon 30 yıldan fazla süredir kromatografik prensiplerle kullanımı gerçekleştirilmiştir. Önemli deneysel parametreler olan pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklıkla oldukça ilişkilidir. Etkileşimlerin gücü, protein ve adsorbentin hidrofobisitesine dayanır [108]. Adsorbentin hidrofobisitesi, hidrofobik ligand molekülünün boyutuyla ve taşıyıcının yer değiştirme derecesiyle düzenlenebilir. β -amilaz ve amiloglukozidaz'ın hidrofobik adsorpsiyon immobilizasyonuna örnek olarak verilebilir. Bunun yanında hidrofobik adsorbentlere dönüşümlü bağlanmanın pek çok örnekleri rapor edilmiştir [109].

1.3.3.5.4 Afinitive Bağlanma

Komplementer biyomoleküller arasında afinitenin prensibi enzim immobilizasyonu ile ifade edilmektedir. Etkileşimlerin önemli oranda seçiciliği metodun önemli özelliğindedir. Ancak, metod pahalı afinitive ligandının matrikse kovalent bağlanması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır [110].

1.3.4 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi

İmmobilizasyon metodunun başarılı olmasının derecesi enzim ile reaksiyonun yürütüleceği koşulların kararlılığı önemlidir [111]. İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde sürekli katalizör olarak kullanılacağından immobilizasyon metodunun seçilmeden önce tepkimenin yürüyeceği ortam göz önüne alınmalıdır. Bunun yanında enzim aktivite kaybının en az olacağı immobilize yönteminde seçilmesi son derece önemlidir [87].

Farklı immobilizasyon metodlarının enzim aktivite etkisini aminosiklaz enzimi üzerinde yapılan çalışmanın sonucu Çizelge 1.4 de gösterilmiştir [66].

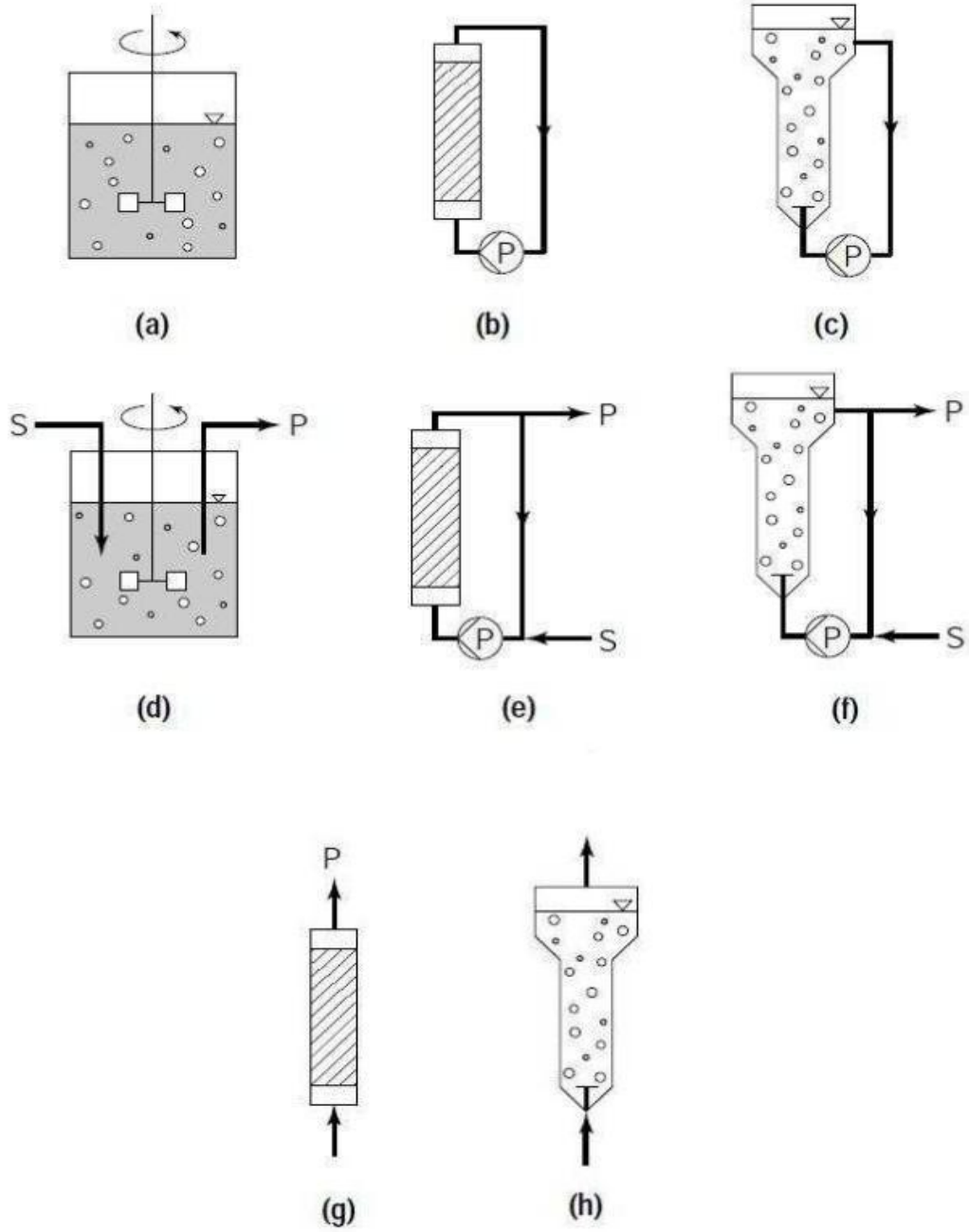
Çizelge 1.4: İmmobilize yöntemlerine göre aktivitenin değişimi [68]

| Enzim | Taşıyıcı | Enzim İmmobilizasyon Metodu | Enzim Aktivitesinin Devamı |
|--------------|---|--|---|
| Aminosiklaz | AE-Selüloz | Çapraz Bağlanma | 0.6 |
| | CN-Br ile aktifleştirilmiş Sefadeks | Gluteraldehid ile Kovalent Bağlanma | 1.0 |
| | DEAE-Selüloz | İyonik Bağlanma | 55 |
| | Nylon | Enkapsülasyon | 36 |
| | Poliakrilamit | Tutunma | 53 |

1.3.5 Enzim Reaktörünün Seçimi

Enzim reaktörünün seçiminde enzimin sahip olduğu en yüksek aktivitede çalışmasının yanında bunun için uygun destek materyalinin seçimi oldukça önemlidir [112]. Dönüşümlü immobilizasyon proseslerinde reaktörde istenmeyen bir denge oluşursa en önemli problemlerden birisi bu dengenin bozulmasıdır [113].

Pek çok reaktör tipleri düşünülmüştür. Akış yönü yukarı olan paket tipi reaktör, substratın yukarıya ilerlediği asılı parçacıkların olduğu sıvı reaktör, basit karışan reaktör, tüp reaktör, membran reaktör v.s. (Şekil 1.13). Bunların pek çoğunda substratın sahip olduğu fiziksel özellikler önemli parametrelerdir. Bu sebepten dolayı ideal olarak reaktör içinde paketlenen bazı destek materyalleri basıncında etkisiyle yarı asılı sıvı yatak içinde enzimle kaplandıkları zaman kümeleşme oluştururlar. Bu da yüzeyde meydana gelen azalmadan dolayı enzim aktivitesinin düşmesine neden olur [114-117].



Şekil 1.13: İmmobilize Enzimler İçin Reaktörler

[(a-c) toplam geri karıştırma ile paket reaktörleri,

(a) karıştırıcı tank reaktör,

(b) sabit akışkan yatak reaktör,

(c) sıvılaştırılmış yatak reaktör,

(d-f) tam geri karıştırma işlemi ile sürekli çalışan reaktörler,

(g-h) akış yönü yukarı olan paket tipi reaktör] [114-117].

1.3.6 İmmobilize Enziminlerin Özellikleri

Enzim immobilizasyonunun sonucu olarak enzim molekülünün termal stabilitesi ve katalitik aktivitesi gibi bazı özellikleri, çözünebilir eşleniklerine göre değişiklik gösterebilir [118]. Özelliklerinin modifikasyonlarındaki değişimin nedeni, immobilize enzimin esas aktivitesindeki değişimle veya immobilize enzimle substrat arasındaki etkileşimin farklı olmasından kaynaklanır. İmmobilizasyonların katalitik özelliklerindeki gözlenen değişim proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki konformasyonlarındaki değişimle, enzim ve substrat arasındaki bağlanmayla ilgili olduğu düşünülmektedir [119].

Genel olarak enzimler immobilize edildiğinde, enzimin çalışma stabilitesi artırılır. Stabilizasyon kavramı, immobilizasyon enzimleri için son derece önemli etkileyici bir güçtür. Pek çok durumda gözlenen operasyonel stabilizasyon, enzimin bağlanma sonucuyla ilgilidir. Ancak, moleküler seviyedeki doğru stabilizasyonun gösterilmesi, proteinlerin immobilizasyonunun çok noktaya kovalent bağlanması ile olabilmektedir [120]. Farklı metodların kullanımı ile ilgili pek çok bilimadamı tarafından gösterilen çalışmalarda stabilizasyon ve matrikse enzimin kovalent bağlarla bağlanma sayıları ile önemli bir bağlantı olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin kullanımı ile ilgili temel problemlerden birisi, özellikle enzimlerin makromoleküler substratlarıyla gösterdiği katalitik aktivitenin kaybıdır [121].

Enzimin aktif bölgesine substratların ulaşımının sınırlanmasından dolayı, substratın sadece yüzeydeki gruplara ulaşmasının sonucu olarak aktivite düşebilir. Bu sterik sınırlama zamanla makromoleküler substratlardan türeyen ürünlerin karakteristik özelliklerini değiştirebilir. Bu sterik problemlerden uzaklaşmak için pek çok strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; izole makromoleküler zincirlerin ağlarından oluşmuş taşıyıcıların seçimi, immobilize olacak enzim rezidülerinin dikkatli seçimi ve hidrofilik inert uzantı kollarının kullanılmasıdır [122].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B, Sülfonamit, L-trozin, p-nitrofenil asetat, diyaliz torbaları, Akrilamit, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), N,N'-metilen bisakrilamit, β -merkaptöetanol, SDS, Glisin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, Fenol red ve Brom-timol mavisi, Ksantin, Etilendiamintetra asetik asit (EDTA), tris(hidroksimetil)aminometan HCl (Tris-HCl), Allopurinol, Benzamidin, Ditioneitol Sigma Chemical Comp.'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksi metil aminometan (Tris), Sodyum sitrat dihidrat, Sitrik asit, Soydu klorür, Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, Sodyum asetat, Hidroklorik asit, Asetik asit, Sülfürik asit, Fosforik asit, Sodyum azotür, Sodyum nitrat, Sodyum tiyosiyanat ve Sodyum siyanür Merck A.G'den; Metanol, Etanol, Amonyum persülfat ve Dekstroz Riel de Haen A.G'den temin edildi.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çizelge 2.1: Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

| Kullanılan Gereç | Modeli |
|--------------------------------|--|
| Buz Makinesi | Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya |
| Buzdolabı | Profilo, Türkiye |
| Çalkalamalı İnkübatör | She-Lab, USA |
| Elektroforez | Apelex, İngiltere |
| Elektronik Tartı | Sartorius, Almanya |
| Etüv | WTB, German, Nüve, Türkiye |
| Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı | Velp Scientifica, İspanya |
| Kromatografi Kolonu | Sigma (1,5 cm çap ve 10cm uzunluk) |
| pH Metre | WTW, Almanya |
| Dijital Görüntüleme Sistemi | UVP, İngiltere |
| Saf su cihazı | Destilasyon 3.1 (Comecta Sa.) |
| MikroSantrifüj | Sigma Laborzentrifugen, Germany |
| Santrifüj | Hettich Zentrifugen, Germany |
| SDS PAGE Aparatları | Atto, Japonya |
| Çalkalayıcı | GFL, Almanya |
| Elektroforez için Güç Kaynağı | Consort, İngiltere |
| Sıcak su banyosu | Elektro-mag, Türkiye |
| Isı kontrollü Çalkalamalı etüv | GFL , Almanya |
| UV visible Spektrofotometreler | Heios α (Unicam), Metro Lab, |
| Vorteks | Elektromag, Türkiye |

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.3.1 Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar

0.1 M NaHCO₃, pH 10.0 tamponu: 8.401 g NaHCO₃ tartıldı ve 950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M NaHCO₃, pH 8.8 tamponu: 8.401 g NaHCO₃ tartıldı ve 450 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.05 M Tris-SO₄, pH 7.5 tamponu: 6.055 g Tris-base tartıldı ve 950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaSO₄ ile pH'sı 7.5'e getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.1.3.2. Afinite Kromatografisinin Uygulanmasında Kullanılan Tamponlar

Dengeleme Tamponu (0.1 M NaCl, 0.1 M Glisin, pH 9): 2.9220 g NaCl ve 3.7535 g glisin tartıldı ve 450 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Jel Yıkama Tamponu (0.1 M Glisin, pH 9): 1.8768 g glisin tartıldı ve 220 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

Elüsyon Tamponu (0.1 M NaCl, 0.1 M Glisin, 0,02 M Benzamidin dihidroklorür): 1.4610 g NaCl, 1.8768 g glisin ve 0.9788 g benzamidin dihidroklorür tartıldı ve 220 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.3 Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

Aktivite Tamponu (0.15 M pH 7.6 Tris-HCl) : 1.8126 g Tris-HCl tartıldı ve 80 mL suda çözüldü. pH'sı 7.6'ya ayarlanır ve toplam hacim 100 mL' ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi : 0.01521 g ksantin tartıldı ve 80 mL destile su ile çözülür 500 µL 4 M NaOH eklenir ve 100 mL' ye tamamlanır.

2.1.3.4 SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.2: SDS-PAGE elektrofrezinde kullanılan numune tamponu

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

Çizelge 2.3: SDS-PAGE elektrofrezinde kullanılan yürütme tamponu

| Kimyasal Madde | Miktar |
|---|---------------|
| Tris-HCl | 3.0 g |
| Glisin | 14.4 g |
| SDS | 1.0 g |
| Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır | |

Çizelge 2.4: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı

| | Ayırma Jeli | Yığma Jeli |
|---|-------------|------------|
| | % 10 | % 3 |
| <u>Akrilamid/Bis (% 30)</u> Akrilamid 15 g Bisakrilamid 0.4 g Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır. | 16.65 mL | 2.6 mL |
| Destile su | 20.1 mL | 12.2 mL |
| <u>1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)</u> Tris-HCl 11.82 g pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır. | 12.5 mL | – |
| <u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır. | – | 5 mL |
| <u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır. | 0.5 mL | 200 µL |
| <u>TEMED</u> | 25 µL | 20 µL |
| <u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır. | 750 µL | 400 µL |

Çizelge 2.5: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi

| Kimyasal Madde | Miktar |
|--------------------------------|---------------|
| Coomassie Brilliant blue R-250 | 0.66 g |
| Metanol | 120 mL |
| Glasiyal asetik asit | 24 mL |
| Destile su | 120 mL |

Çizelge 2.6: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi:
% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su

| Kimyasal Madde | Miktar |
|-----------------------|---------------|
| Metanol | 50 mL |
| Glasiyal asetik asit | 75 mL |
| Destile su | 875 mL |

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Taze, işlem görmemiş süt buzdolabında +4 °C’de bir gece bekletildi. Hacimce %3 oranında toluen ve hacimce %2 olacak şekilde 0.1 M EDTA’dan eklendi ve blender ile 30 dakika boyunca muamele edildi. Bu sürenin sonunda sıcaklık yükseldi ve sıcaklık +4 °C’ye gelinceye kadar buzdolabında bekletildi. Tekrar 30 dakika boyunca blender ile muamele edildi ve sıcaklık +4 °C’ye gelinceye kadar buzdolabında bekletildi [123]. Blender ile işlem görmüş süte %38’lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve arkasından +4 °C’de, 15000 rpm’de 45 dakika boyunca santrifüj yapılarak, süspansiyonda üste biriken yağimsı kısım atıldı. Daha sonra %50 amonyum sülfat eklendi ve +4 °C’de 45 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj yapıldı. Üsteki süpernanant atıldı ve altta kalan çökelek 0.1 M pH 7.6 Tris-HCl’ den her tüpe 1 mL olacak şekilde eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

2.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Aktivite Tayini

XOR’ın aktivitesi Massey Metoduna göre 37 °C’de ksantinün ürik asite dönüşümü esnasında 295 nm’de absorbanst artışının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi ($\epsilon_{292}=9.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [131]. Reaksiyon karışımı pH 7.6, 50 mM Tris-HCl tamponu ve 0.1 mM ksantin ve enzim içermektedir. 1 ünite XO’ın, 1 µmol ksantini 1 dakikada ürik asite dönüştüren enzim miktarıdır [131].

2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanst göstermesi esasına

dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

1mL'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Tüplerin hacimleri 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) kullanılarak 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorban değerleri okutuldu. Kör olarak 0.1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorban değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0.1' er ml 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbanları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbanına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı [125].

2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V: Blender ile işlem görmüş süt hacmi,

S₁: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu,

S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.4.2 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, L-tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra 4-amino benzamidin dihidroklorür diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi [106]. Burada afinite jelinin uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da 4-amino benzamidin dihidro klorür oluşturur. Benzamidin XOR enziminin spesifik bir inhibitörüdür.

2.2.4.2.1 Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi

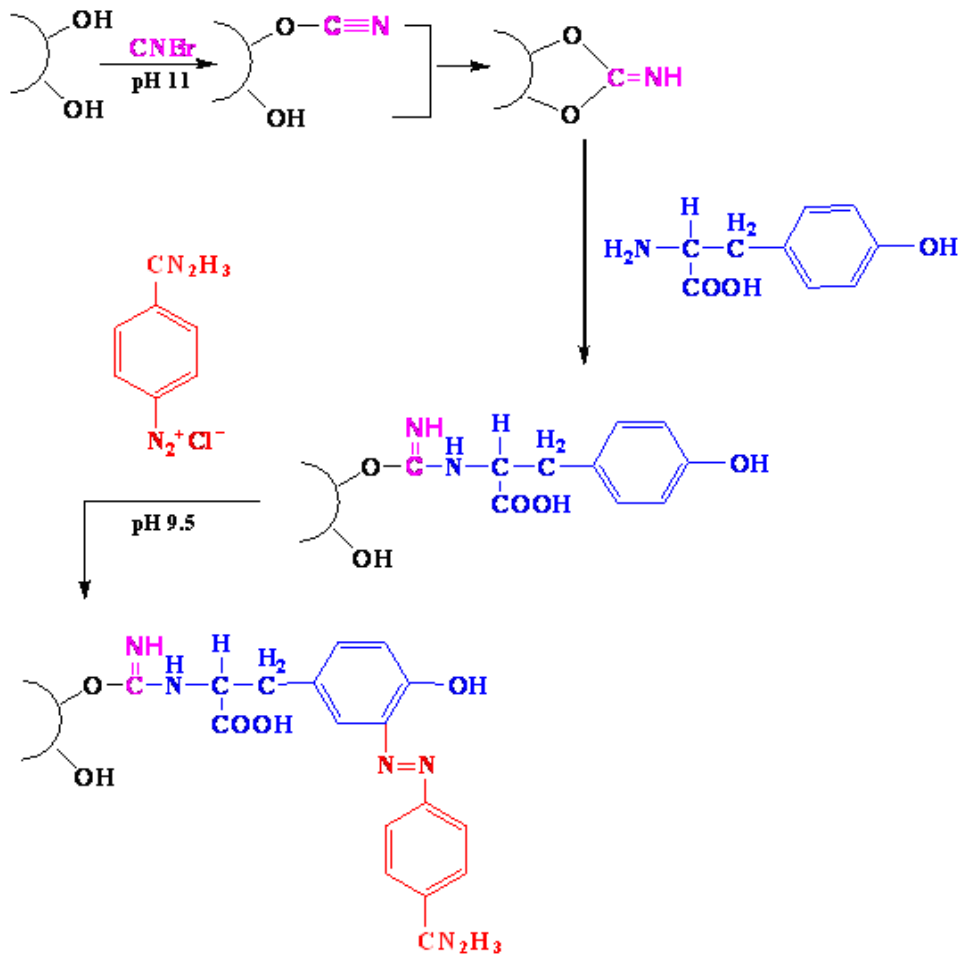
20 mL Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılmakta olan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'ı 4 M NaOH ile hemen 11 değerine çıkarılarak reaksiyon bu pH değerinde sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir Buchner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH 10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı [126].

2.2.4.2.2 L-Tirozinin bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine 20 mL'sinde 8 mg L-tirozin içeren 0.1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10) soğuk çözeltisi behere ilave edilerek yavaşça karıştırılan süspansiyon 90 dakika boyunca karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 16 saat süresince bekletildi. Bu sürecin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alındı [126].

2.2.4.2.3 4-aminobenzamidinin Kenetlenmesi

20 mg 4-aminobenzamidin dihidroklorür, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, benzamidin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan benzamidin 40 mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L destile su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Afinité jeli sentezinin şematik gösterimi

2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Bu amaçla iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofözezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntem uygulandı [127].

Bu amaçla elektroföze 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 kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Çizelge 2.4'te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol uzaklaştırıldı. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroföze tankına yerleştirildi. Elektroföze tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroföze güç kaynağına bağlanarak 80 volta ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 200 volta çıkartıldı. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel ayrıldıktan

sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1–1.5 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel, renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

2.2.5 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda XOR, ksantin substratının altı farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

Buna dayalı olarak, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi [127, 128]. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

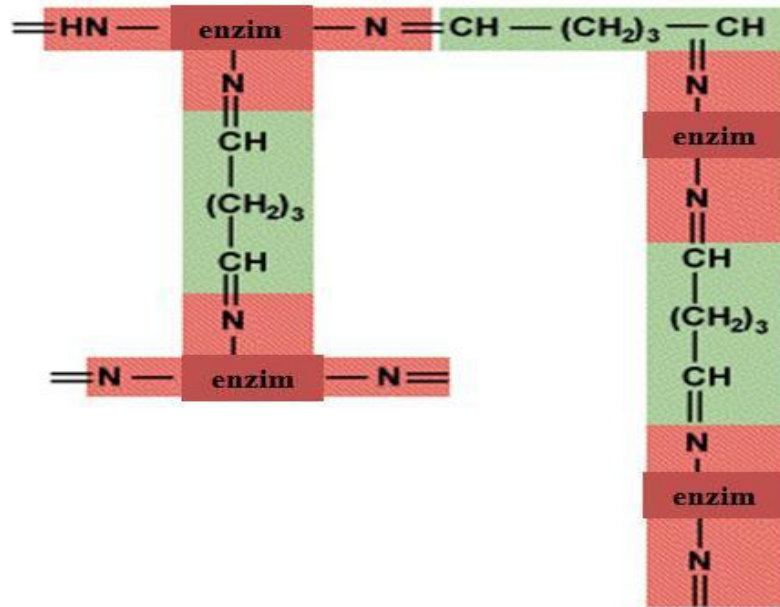
2.2.5.1 Ksantin Bileşiği Kullanılarak Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda ksantin substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 295 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dak) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri (Çizelge 3.2) bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

2.2.5.2 IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Gut hastalığı başta olmak üzere, çeşitli hastalıkların tedavisinde yardımcı olarak kullanılan Kolşisin etken maddesi, amonyum tuzlarının içerisinde en yaygın olarak kullanılan NH₄F, NH₄Cl, çeşitli enzimler üzerine etkisinin bulunduğu CaCl₂, ZnCl₂ ve en etkili ağır metallere biri olduğu bilinen cıva (Hg) bileşenli HgCl₂, Hg(NO₃)₂.H₂O bileşiklerinin ksantin oksidaz enzimi üzerine *in vitro* etkileri araştırılıp tüm bu bileşikler için IC₅₀ değerleri tespit edildi.

2.2.6 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı



Şekil 2.3: Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi [129, 130]

Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi; serbest enzim molekülleri ile glutaraldehit homo çapraz bağlayıcı reaktifi kullanılarak çapraz bağlı enzim agregasyonları oluşturulur (Şekil 2.3). Glutaraldehit reaktantının önemi, her iki ucunun da reaktif olmasıdır. Böylelikle birçok enzim molekülünün bir arada bulunmasıyla çözünür yapı çözünmez özellik kazanarak enzim molekülleri güçlü bağlanır. Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon immobilizasyonu, çapraz bağlı

immobilizasyon esidinin bir alt kumesi olarak düşnlebilir. Bu yöntemin avantajı, glutaraldehit dışında herhangi bir taşıyıcıya gerek duyulmadığından uygulanışı diğer immobilizasyon esitlerine göre daha basittir. Ayrıca uygulanışı kolay olduğu için zamandan tasarruf edilir, maliyeti de düşüktür.

%25'lik 0.265g/ml yoğunluğundaki glutaraldehit (GA), saf enzime farklı yüzdelerde ilave edildi. Glutaraldehit/ serbest enzim karışımı, 25°C de, 65-70 rpm çalkalama hızında bir gün inkübasyona bırakılarak enzim agregasyonları oluşturuldu. Serbest enzim renksiz iken immobilize enzimin rengine kahverengi bir değişim gözlendi. Bir gün sonrasında immobilize enzim (5000 rpm, 4°C, 5 dakika) santrifüj edilerek katı ve sıvı faz ayrıldı. Ksantin oksidaz enzimi, ken katı kısımda kaldığından, katı faz minimum hacimde soğuk su ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra enzim aktivitesi hem serbest hem de immobilize enzim için spektrofotometrede llerek karşılaştırma yapıldı.

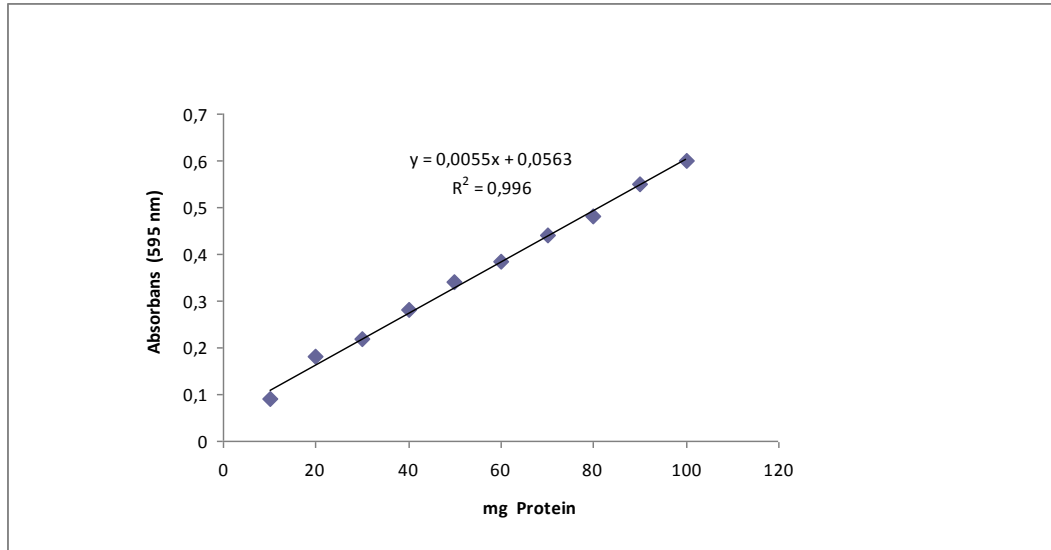
3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.5 açıklandığı gibi hazırlandı. Çeşitli basamaklardan sonra süttten elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi.

Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.



Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

3.2. Enzimin Saflaştırılması

3.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hazırlanması

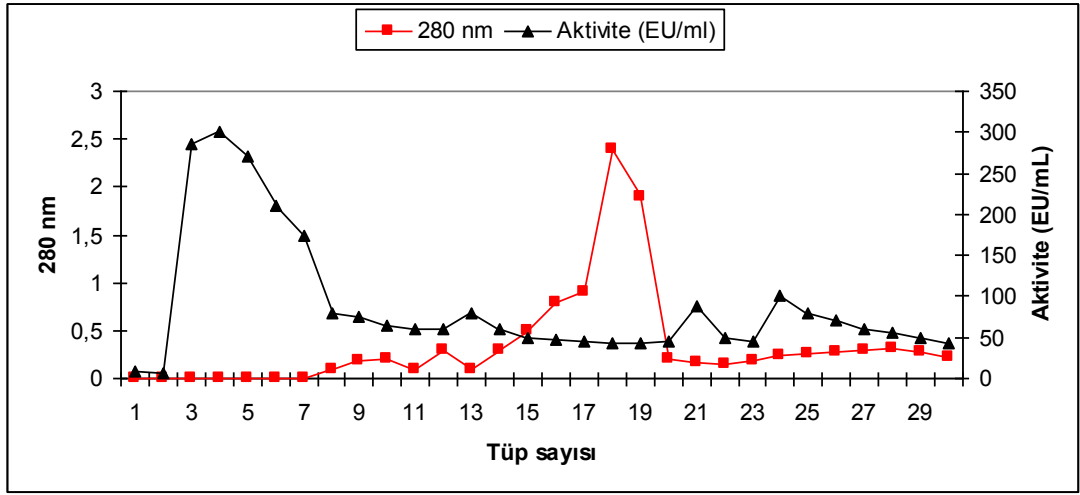
Taze, işlem görmemiş süt +4 °C'de buzdolabında bir gece bekletildi. Hacimce %3 oranında toluen ve hacimce %2 olacak şekilde 0.1 M EDTA'dan eklendi ve blender ile 30 dakika boyunca muamele edildi.

3.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Blender ile işlem görmüş süte %38'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve 45 dakika boyunca 15000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra üste biriken yağmsı kısım atıldı. Altta kalan süpernatanta %50 amonyum sülfat çöktürmesi ve 45 dakika boyunca 15000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj yapıldı. Üsteki süpernant atıldı ve altta kalan çökelek 0.1 M pH 7.6 Tris-HCl' den her tüpe 1 mL olacak şekilde eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

3.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde dengeleme tamponu olarak 0.1 M glisin/ 0.1 M NaCl pH 9.0 çözelti kullanıldı. Yıkama işlemi 0.1 M pH 9.0 glisin tamponu ile gerçekleştirildi. ve diğer proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Elüsyon tamponu olarak içerisinde 25 mM benzamidin içeren 0.1 M glisin/ 0.1 M NaCl pH 9.0 tamponu kullanıldı. Elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı her bir fraksiyona aktivite ölçümü yapıldı (Şekil 3.2).



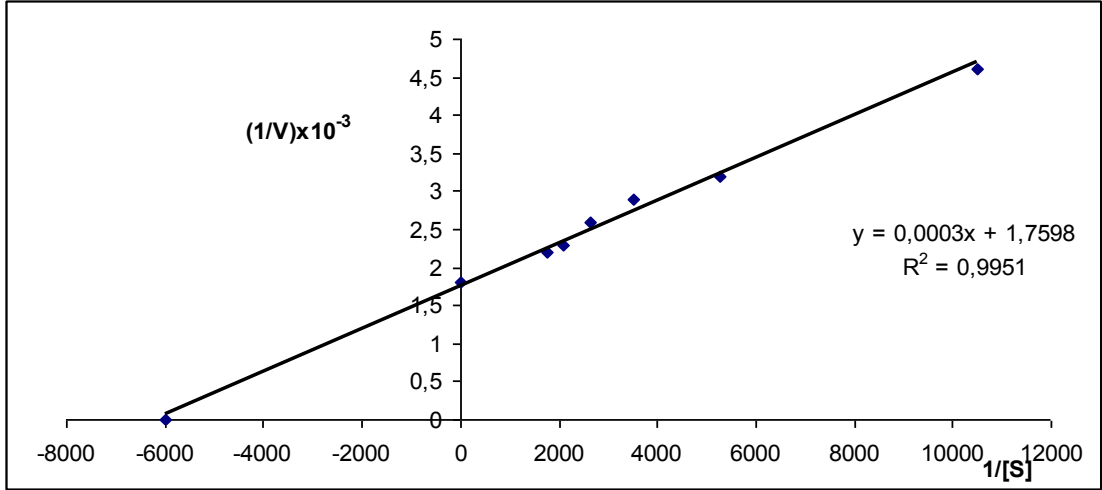
Şekil 3.2: XOR Enziminin Sepharose 4B-L-Tirozin-Benzamidin jeli ile saflaştırma grafiği

Çizelge 3.1: Saflaştırma tablosu

| Basamak | Hacim (ml) | Aktivite (U/mL) | Toplam Aktivite (U) | Protein Miktarı (mg/mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg) | % Verim | Saflaştırma Derecesi |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|--|------------------------------------|---|----------------|---------------------------------|
| Süt | 180 | 70.8 | 12742.2 | 3.19 | 574.202 | 22.2 | 100 | - |
| Amonyum Sülfat Çöktürmesi | 12 | 394.2 | 4730.4 | 3.44 | 41.311 | 114.6 | 37.1 | 5.16 |
| Afinite Kromatografisi | 2 | 736.9 | 1473.8 | 0.01 | 0.020 | 73692.1 | 11.5 | 643.04 |

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda ksantin substratının değişen konsantrasyonlarında (Çizelge 3.28) enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı ve Linewear-Burk grafikleri çizildi.

Grafikten yararlanarak K_M değeri 1.667×10^{-4} M ve V_{max} değeri 0.56 U/ml.dak olarak bulundu (Şekil 3.3).



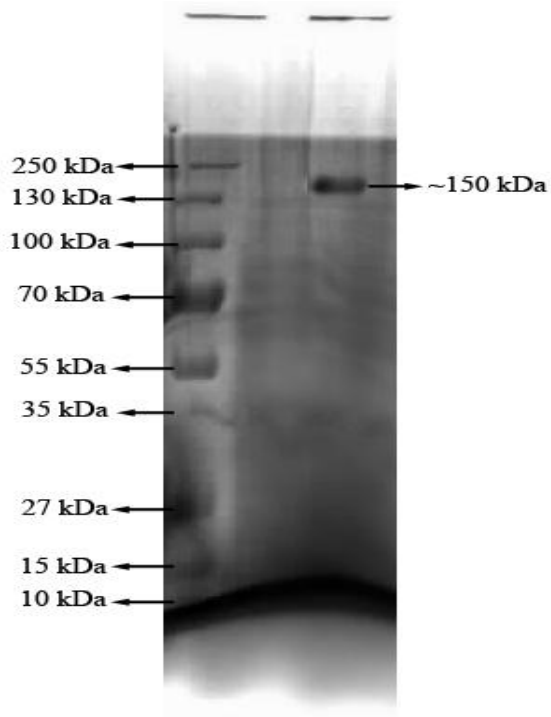
Şekil 3.3: Saflaştırılmış ksantin oksidaz enziminin ksantin substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.

Çizelge 3.2: Ksantin Oksidaz enziminin ksantin substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

| pH 7.6 50 mM Tris Tamponu (μL) | Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL) | Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL) | Küvetteki Toplam Hacim (μL) | Küvetteki Substrat Konsantrasyonu $[S] \times 10^{-3}(\text{mM})$ | ΔOD (295 nm) | Aktivite (U/ml dak) | $1/V \times 10^{-3}$ | $1/[S]$ |
|---|--|---|--|---|----------------------------|---------------------|----------------------|---------|
| 835 | 70 | 100 | 1005 | 9.95 | 0.138 | 216.92 | 4.6 | 10510 |
| 735 | | 200 | | 19.90 | 0.198 | 312.51 | 3.2 | 5255 |
| 635 | | 300 | | 29.85 | 0.218 | 344.83 | 2.9 | 3503 |
| 535 | | 400 | | 39.80 | 0.244 | 384.61 | 2.6 | 2627 |
| 435 | | 500 | | 49.75 | 0.276 | 434.78 | 2.3 | 2102 |
| 335 | | 600 | | 59.70 | 0.288 | 454.55 | 2.2 | 1767 |

3.3 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

XO enziminin saflık kontrolü, yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi ile Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapıldı (Şekil 3.4).



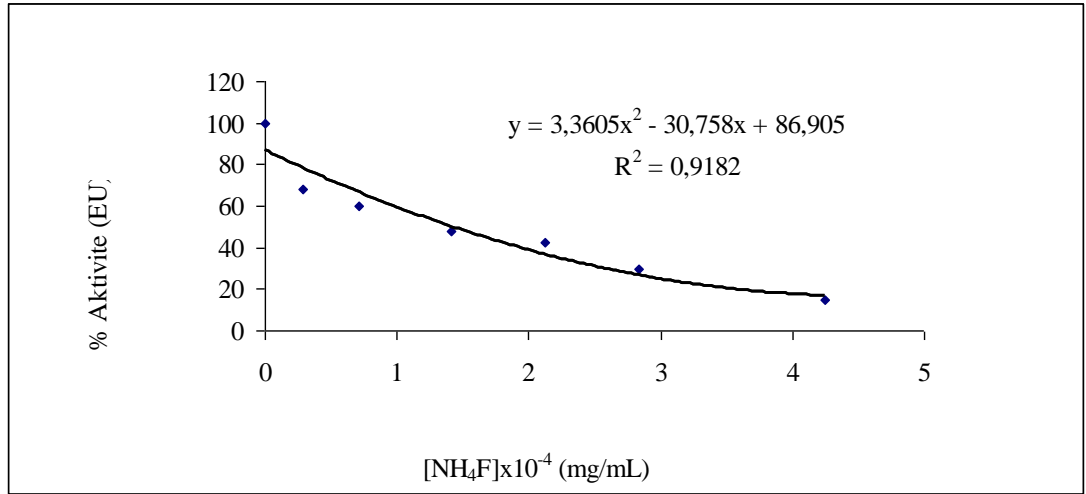
Şekil 3.4: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan XO enziminin SDS-PAGE görüntüsü

3.3 NH₄F Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10⁻³ M stok konsantrasyonuna sahip NH₄F bileşiminin ksantin oksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5)

Çizelge 3.3: NH₄F Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

| Son Konst.İnh. (mM) (10 ⁻⁵) | Absorbans Farkı A2 - A1 | Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dk) | %Aktivite |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-----------|
| 0 | 0.26 | 418.3 | 100 |
| 2.8 | 0.15 | 231.7 | 67.9 |
| 7.1 | 0.14 | 225.3 | 59.9 |
| 14.2 | 0.12 | 201.1 | 48.1 |
| 21.2 | 0.11 | 177.0 | 42.3 |
| 28.3 | 0.09 | 159.3 | 29.9 |
| 42.5 | 0.04 | 61.1 | 14.6 |



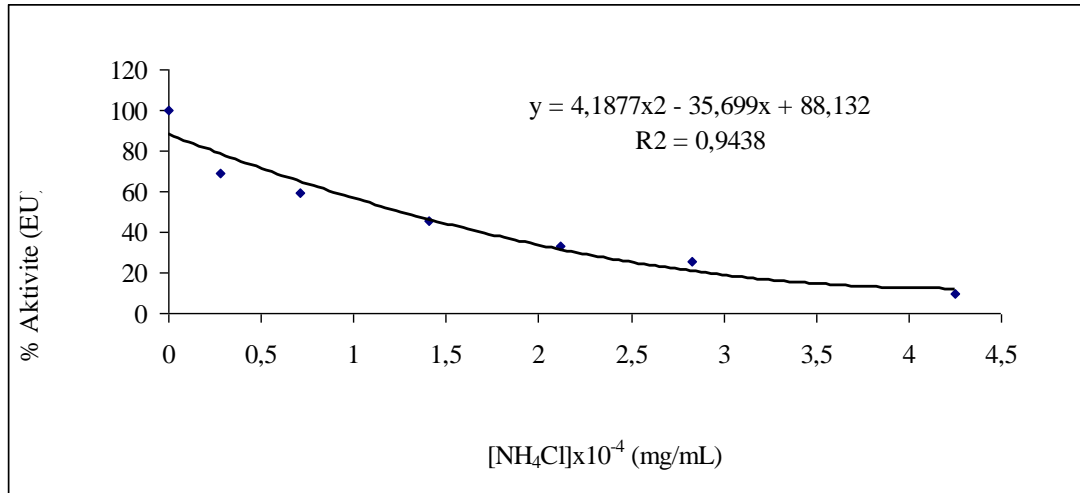
Şekil 3.5: Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine NH₄F bileşiminin % Aktivite grafiği (IC₅₀=1.42x10⁻⁴ mg/mL)

3.4 NH₄Cl Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10⁻³ M stok konsantrasyonuna sahip NH₄Cl bileşiminin ksantin oksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.6)

Çizelge 3.4: NH₄Cl Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

| Son Konst.İnh. (mM)(10 ⁻⁵) | Absorbans Farkı A2-A1 | Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dk) | %Aktivite |
|---|---------------------------|--------------------------------|-----------|
| 0 | 0.26 | 418.3 | 100 |
| 2.8 | 0.16 | 259.5 | 68.7 |
| 7.1 | 0.13 | 215.6 | 58.9 |
| 14.2 | 0.19 | 189.9 | 45.4 |
| 21.2 | 0.09 | 138.4 | 33.1 |
| 28.3 | 0.07 | 107.8 | 25.8 |
| 42.5 | 0.03 | 40.2 | 9.6 |



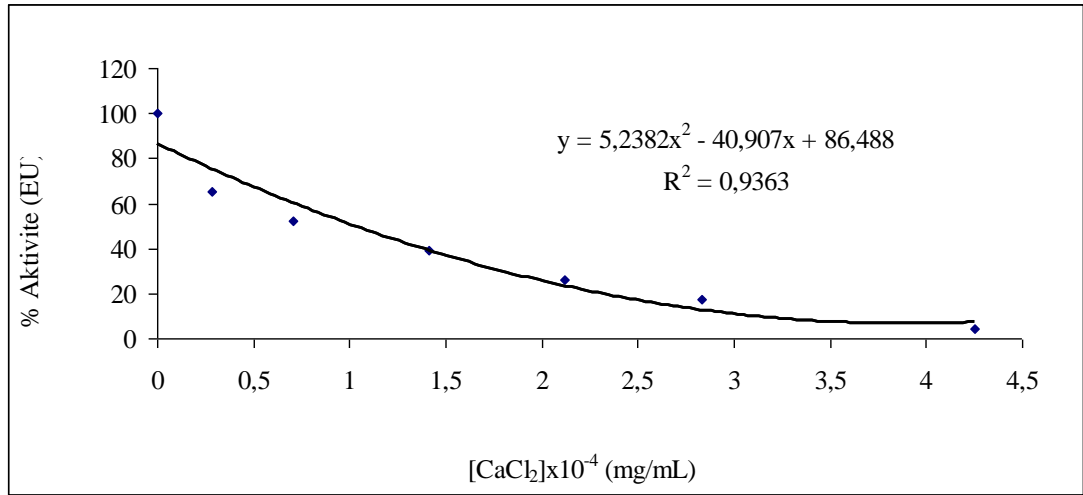
Şekil 3.6: Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine NH₄Cl bileşiminin % Aktivite grafiği (IC₅₀=1.25x10⁻⁴ mg/mL)

3.5 CaCl₂ Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10⁻³ M stok konsantrasyonuna sahip CaCl₂ bileşiminin ksantin oksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.5 ve Şekil 3.7)

Çizelge 3.5: CaCl₂ Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

| Son Konst.İnh. (mM)(10 ⁻⁵) | Absorbans Farkı A2 - A1 | Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dk) | %Aktivite |
|---|-----------------------------|--------------------------------|-----------|
| 0 | 0.26 | 418.3 | 100 |
| 2.8 | 0.12 | 191.5 | 64.9 |
| 7.1 | 0.07 | 119.1 | 44.1 |
| 14.2 | 0.08 | 131.9 | 38.9 |
| 21.2 | 0.07 | 109.4 | 26.1 |
| 28.3 | 0.05 | 74.0 | 17.7 |
| 42.5 | 0.01 | 19.3 | 4.6 |



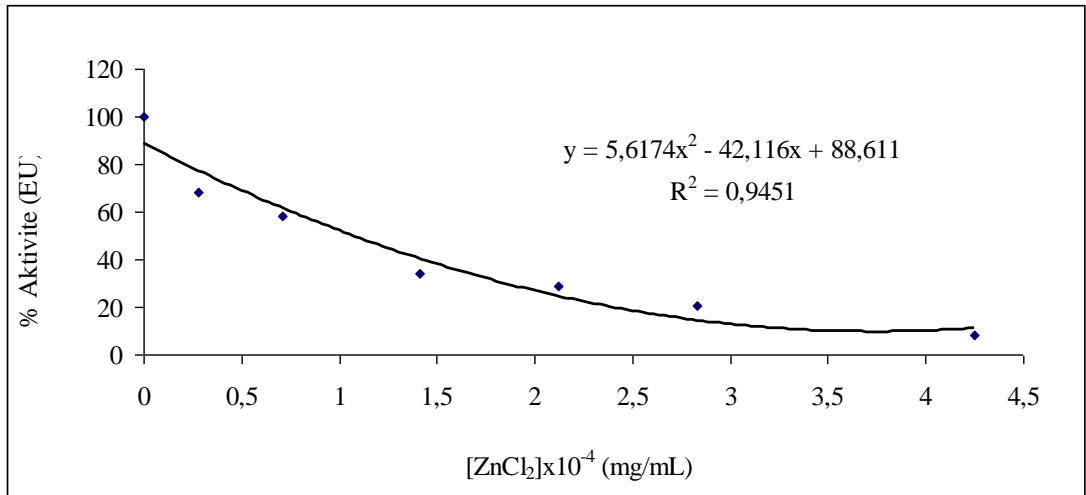
Şekil 3.7: Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine CaCl₂ bileşiminin % Aktivite grafiği (IC₅₀=0.99x10⁻⁴ mg/mL)

3.6 ZnCl₂ Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10⁻³ M stok konsantrasyonuna sahip ZnCl₂ bileşiminin ksantin oksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.8)

Çizelge 3.6: ZnCl₂ Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

| Son Konst.İnh. (mM)(10 ⁻⁵) | Absorbans Farkı A ₂ - A ₁ | Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dk) | %Aktivite |
|---|---|--------------------------------|-----------|
| 0 | 0.26 | 418.3 | 100 |
| 2.8 | 0.16 | 251.0 | 60 |
| 7.1 | 0.11 | 178.6 | 53.8 |
| 14.2 | 0.08 | 128.7 | 33.9 |
| 21.2 | 0.07 | 120.7 | 28.9 |
| 28.3 | 0.06 | 101.4 | 24.2 |
| 42.5 | 0.02 | 33.8 | 8.1 |



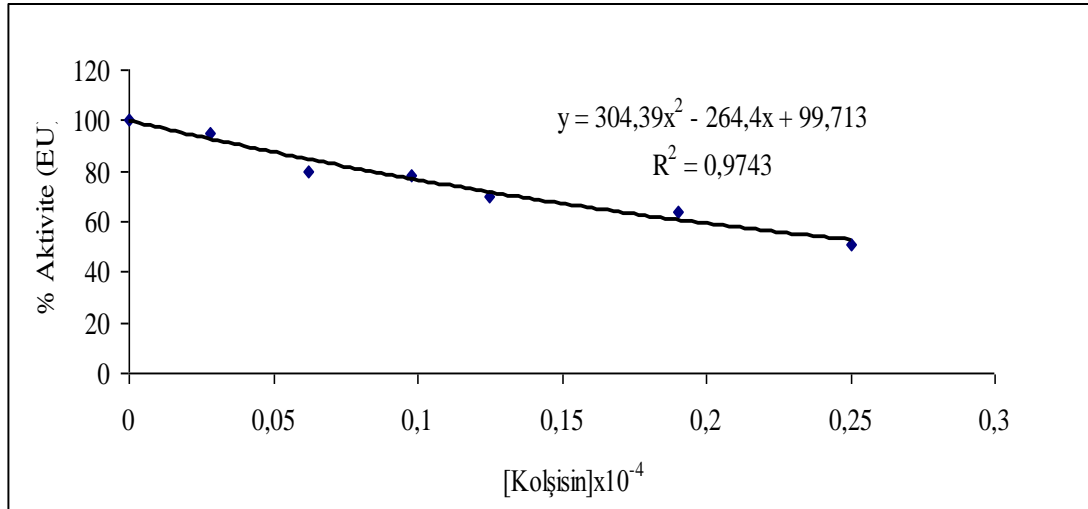
Şekil 3.8: Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine ZnCl₂ bileşiminin % aktivite grafiği (IC₅₀=1.07x10⁻⁴ mg/mL)

3.7 Kolşisin Etken Maddesinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

10^{-3} M stok konsantrasyonuna sahip kolşisin etken maddesinin ksantin oksidaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı ve bulgular aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.7 ve Şekil 3.9)

Çizelge 3.7: Kolşisin Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

| Son Konst.İnh. (mM)(10^{-5}) | Absorbans Farkı A2 - A1 | Enzim Ünitesi (EÜ) (mol/dk) | %Aktivite |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------|
| 0 | 0.26 | 418.3 | 100 |
| 2.8 | 0.24 | 397.1 | 95 |
| 7.1 | 0.20 | 334.4 | 80 |
| 14.2 | 0.20 | 326.1 | 78 |
| 21.2 | 0.18 | 292.6 | 70 |
| 28.3 | 0.16 | 267.5 | 64 |
| 42.5 | 0.13 | 213.2 | 51 |



Şekil 3.9: Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Kolşisin etken maddesinin % aktivite grafiği ($IC_{50}=0.27 \times 10^{-4}$ mg/mL)

Çizelge 3.8: İnhibisyon Çalışmasında Kullanılan Maddelerin IC₅₀ değerleri

| Bileşik | IC ₅₀ (mg/mL) |
|--------------------|--------------------------|
| NH ₄ F | 1.42x10 ⁻⁴ |
| NH ₄ Cl | 1.25x10 ⁻⁴ |
| CaCl ₂ | 0.99x10 ⁻⁴ |
| ZnCl ₂ | 1.07x10 ⁻⁴ |
| Kolşisin | 0.27x10 ⁻⁴ |

3.8 Enzim İmmobilizasyon Basamağı

3.8.1 Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması

%25'lik 0.265g/ml yoğunluğundaki glutaraldehit, farklı yüzdelerde (% 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11, 12, 13 ve 14) saf enzime ilave edilerek enzim immobilize edildi ve enzim aktivitesi en fazla %6 oranında glutaraldehit ilave edilen enzimde görüldü (Çizelge 3.8). Saf enzim çözeltisi, aktivitenin yüksek çıktığı 1 numaralı tüpteki enzim örneği kullanılarak elde edildi.

Çizelge 3.9: Serbest enzim, farklı yüzdelerdeki GA miktarları ve immobilize enzim aktiviteleri

| Glutaraldehit/Saf Enzim | Glutaraldehit | Glutaraldehit | Serbest Enzim | Absorbans Farkı (Katı Faz) | İmmobilize Enzim Aktivitesi |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| % Oran | Kütle (g) | Hacim (µL) | Kütle (g) | A2 – A1 | EU (mol/dk) |
| 1 | 0.0038 | 3.58 | 0.3793 | * | * |
| 2 | 0.0077 | 7.23 | 0.3832 | 0.021 | 32180 |
| 3 | 0.0111 | 10.46 | 0.3699 | 0.023 | 37007 |
| 4 | 0.0262 | 13.74 | 0.3641 | 0.045 | 48270 |
| 5 | 0.0192 | 18.15 | 0.3847 | 0.082 | 19308 |
| 6 | 0.0227 | 21.40 | 0.3782 | 0.153 | 127111 |
| 7 | 0.0262 | 24.68 | 0.3737 | 0.083 | 28962 |
| 8 | 0.0301 | 28.31 | 0.3771 | 0.032 | 51488 |
| 9 | 0.0333 | 31.42 | 0.3702 | 0.047 | 75623 |
| 10 | 0.0385 | 36.36 | 0.3854 | 0.006 | 9654 |
| 11 | 0.0404 | 38.04 | 0.3741 | 0.023 | 37007 |
| 12 | 0.0422 | 40.11 | 0.3718 | 0.034 | 54706 |
| 13 | 0.0456 | 43.21 | 0.3812 | 0.008 | 12872 |
| 14 | 0.0480 | 46.12 | 0.3863 | 0.002 | 3218 |

* : Çökelek Gözlenemediği İçin EU Hesabı yapılamamıştır.

Yukarıdaki çizelgede de görüldüğü gibi; immobilize enzim aktivitesi en fazla, % 6 glutaraldehit ile karıştırıldığında gözlenmiştir. Dolayısıyla sonraki deneysel basamaklarda % 6 (GA / saf enzim) oranı dikkate alınarak immobilize enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.8.2 Glutaraldehit ile % 6 Oranında Karıştırılarak İmmobilize Edilen Enzim İçin Aktivite Tayini

İmmobilize ksantin oksidaz enzimi için en yüksek aktivite % 6 oranında glutaraldehit ilavesiyle gözlemlendiğinden, yüksek aktivite gözlenen 1 numaralı tüpteki enzim çözeltisi kullanılarak, tamamı % 6 oranında immobilize edildi (Çizelge 3.8) ve bu immobilize enzim için 295 nm’de aktivite tayini yapıldı (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10: % 6 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için GA ve serbest enzim miktarları

| Glutaraldehit/Saf Enzim | Glutaraldehit | Glutaraldehit | Serbest Enzim |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| % Oran | Kütle (g) | Hacim (µL) | Kütle (g) |
| 6 | 0.0227 | 21.4 | 0.3782 |

Çizelge 3.11: İmmobilize enzim için aktivite tayin çizelgesi

| pH 7.6 Aktivite Tamponu (µL) | Substrat (Ksantin) (µL) | İmmobilize Enzim (µL) | Absorbans Farkı A2 - A1 |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 835 | 100 | 70 | 0.009 |
| 735 | 200 | | 0.121 |
| 635 | 300 | | 0.181 |
| 535 | 400 | | 0.208 |
| 435 | 500 | | 0.252 |
| 335 | 600 | | 0.273 |

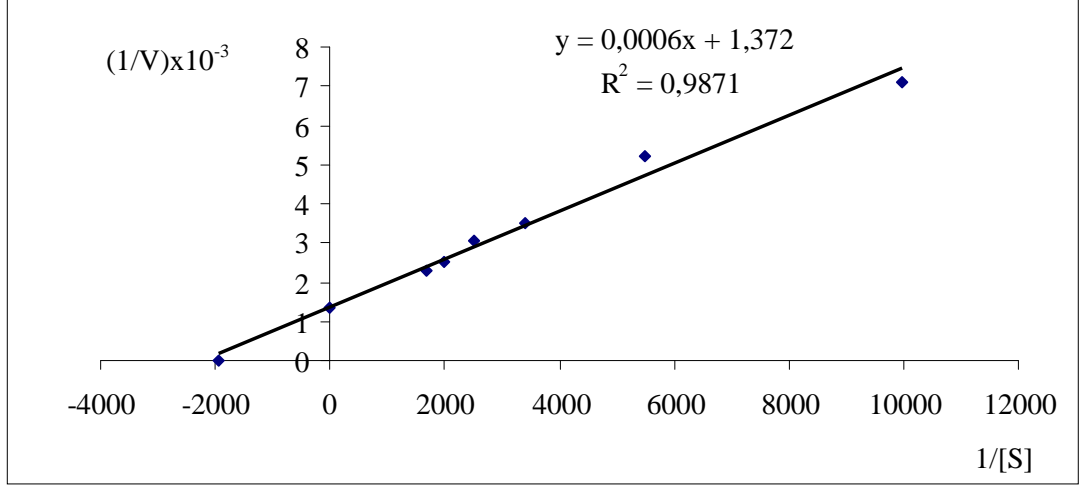
Çizelge 3.12: % 6 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için EÜ ve substrat konsantrasyon değerleri

| Absorbans Farkı A2 - A1 | Enzim Ünitesi (EU) (mol/dk.) | 1 / Vx10⁻³ | Substrat Konsantrasyonu [S] (Mx10 ⁻³) | 1 / [S] |
|------------------------------------|--|------------------------------|---|----------------|
| 0.009 | 140.8 | 7.1 | 10.01 | 9980.23 |
| 0.121 | 191.9 | 5.2 | 18.17 | 5501.12 |
| 0.180 | 284.9 | 3.5 | 29.53 | 3386.14 |
| 0.208 | 328.9 | 3.1 | 40.06 | 2496.07 |
| 0.252 | 399.4 | 2.5 | 50.04 | 1998.61 |
| 0.273 | 432.5 | 2.3 | 59.52 | 1680.12 |

İmmobilize enzim aktivitelerine ilişkin enzim ünite değerleri, ksantin oksidaz enzim aktivite tayininde belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. Substrat konsantrasyonu ise; $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülüne göre hesaplanmıştır. Reaksiyonun toplam hacmi 1005µl {435µl Tris-HCl tamponu (150mM, pH 6) + 500µl substrat çözeltisi (0,1 mM ksantin) + 70 µl enzim çözeltisi} olup farklı substrat hacimleri ve konsantrasyonları da Çizelge 3.11’ de verilmektedir.

3.8.3 İmmobilize Enzim İçin Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması

İmmobilize enzim için bulgular 3.10'da hesapladığımız enzim ünitesi ve substrat konsantrasyonlarından yola çıkılarak Km ve Vmax değerleri hesaplandı. Linawear-Burk metoduna göre, doğrunun x eksenini (-1/Km) ve y eksenini (1/Vmax) kestigi noktalardan yola çıkılarak Km ve Vmax değerleri hesaplandı. (Sekil 3.9).



Şekil 3.10: % 6 oranında Glutaraldehit ile immobilize edilmiş enzim için aktivite tayin grafiği ($K_m = 5.18 \times 10^{-4} \text{ M}$ $V_{max} = 0.73 \text{ U/ml.dak}$)

Çizelge 3.13: İmmobilize ve serbest enzim için katalitik etkinlik, V_{max} ve K_m değerlerinin karşılaştırılması

| | V_{max} (EU) | K_m (10^{-4} M) | $V_{max}/K_M (\times 10^2 \text{ EU/M})$ |
|-------------------------|----------------|-------------------------------|--|
| Serbest Enzim | 0.56 | 1.67 | 33.53 |
| İmmobilize Enzim | 0.73 | 5.18 | 14.09 |

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmaları üç ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak yukarıda anlatıldığı gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip XO'ın daha önceden Arslan O. tarafından *Sepharose 4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak saflaştırmak ve immobilizasyonda kullanma potansiyeline sahip bu enzimi glutaraldehit üzerine immobilize etmektir. Araştırmanın üçüncü bölümünde ise saflaştırılan söz konusu enzime ağır metallerin ve kolşisin etken maddesinin *in vitro* etkisi araştırılmıştır.

XO, daha ekonomik ve hızlı bir şekilde saflaştırılması gereklidir. Çünkü enzimin geniş substrat spesifikliğine sahip olması, preparatif organik kimya açısından önemlidir. XO enziminin, son yıllarda birçok organik sentezlerde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca bu enzimin endüstriyel öneminin de olması daha pratik saflaştırma metotlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [46].

XO, yapılan literatür taramasında, karaciğerde, ince barsak mukozasında, süt salgılan meme bezlerinde, kalp, böbrek, beyin, aort, akciğer, iskelet kası ve barsakların küçük damarların endotel hücrelerinde [8,16, 37, 38, 39], anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir [40, 41]. Sığır sütünde söz konusu enzim oldukça fazla bulunduğundan dolayı enzim kaynağı olarak sığır sütü tercih edilmiştir. Sığır sütüne, afinite kromatografisi tekniğinden önce ön saflaştırma tekniklerinden biri olan nötral tuzlarla çöktürme işlemi uygulanmıştır. Nötral tuz olarak amonyum sülfat tercih edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürme aralığı, XO için % 38–50 olduğu literatürde bildirilmiştir [103].

Enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE uygulanmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 150 kDa ağırlığında olduğu bulunmuş ve tahmin edilen XO enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. XO'ın molekül ağırlığını SDS-PAGE ile McManaman ve arkadaşları yaklaşık 150 kDa olarak, doğal elektroforez ile 300 kDa olarak belirlemişlerdir [113]. Çünkü enzimin yapısı homodimer yapıda olduğu deneysel çalışmalarla doğrulanmıştır [112].

Çalışmamızın bu bölümünde süttten saflaştırılan XO enzimi üzerinde gut hastalığı tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan kolşisin etken maddesi, amonyum klorür, amonyum florür, kalsiyum klorür, cıva klorür, çinko klorür ve cıva (II) nitrat monohidrat bileşiklerinin enzim üzerine *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Bazılarının ağır metal içerikli olduğu bilinen bu bileşiklerin seçilmesinin en önemli nedeni medikal alanda ve endüstride oldukça sık bir şekilde kullanılmasıdır. Giriş bölümünde ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bu enzim üzerine söz konusu bileşiklerin nasıl etkili olduğunun saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. Ayrıca kolşisin etken maddesinin XO enzimi üzerindeki etkilerin hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamış olması çalışmanın orijinalliğini daha da arttırdığı kanısındayız. İnhibisyona neden olan bu bileşiklerin inhibisyon etkisi IC_{50} değerleri bulunarak verilmiştir. Bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için IC_{50} değerini kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, yukarıdaki bileşiklerin değişik konsantrasyonlarında, yüzde aktivite belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan bileşik konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

Akut ve kronik gut (damla) hastalığı, ailevi akdeniz ateşi tedavisi (FMF) ve Behçet sendromuna yardımcı tedavi olarak kullanılan kolşisin etken maddesi ürik asit oluşumunu yavaşlattığı bildirilmektedir. Bunun yanında söz konusu etken maddenin yan etkilerinden olan yüksek dozlarda önce bulantı, kusma, sulu ve kanlı diyare, karın ağrısı gibi gastrointestinal belirtiler oluşturabilir. Bu yan etkiler göz önünde bulundurularak, diyarenin sürekli ve şiddetli oluşu halinde gereken önlemler alınmalı, yaşlı ve halsiz hastalarda, özellikle böbrek, mide, barsak veya kalp hastalığı olanlarda dikkatle kullanılmalıdır. Gebelikte kullanımında fetal zararlara yol açabildiğinden dolayı ilacın kesin kullanım gerekliliğinde yarar/zarar oranı göz önünde bulundurularak verilmelidir.

Tarafımızdandan çalışılan NH_4F , NH_4Cl , $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$, $Hg(NO_3)_2.H_2O$ ve kolşisin bileşikleri için IC_{50} değerleri sırasıyla $1,42 \times 10^{-4}$ mg/mL, $1,25 \times 10^{-4}$ mg/mL, $0,99 \times 10^{-4}$ mg/mL, $1,07 \times 10^{-4}$ mg/mL, ve $0,27 \times 10^{-4}$ mg/mL olarak bulunmuştur. $HgCl_2$ ve $Hg(NO_3)_2.H_2O$ ağır metal bileşiklerinin *in vitro* etkileri

araştırılırken yoğun miktarda beyaz renkli çökelek oluştuğu için aktivite tayini yapılamamıştır. Bu sebepten dolayı bu iki bileşik için IC₅₀ değerleri tespit edilememiştir.

Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin yapılı afinite jeli kullanılarak saflaştırılan XO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) ksantin bileşiği substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri ksantin substrat olarak kullanıldığında sırasıyla 1,667x10⁻⁴ M ve 0,56 U/ml'dak olarak bulunmuştur. Literatürde XO enzimi enziminin ksantin substratına karşı V_{max} ve K_M değerleri tarafımızdan tespit edilen V_{max} ve K_M değerleri ile benzerlik göstermektedir [35].

Ksantin oksidaz enziminin immobilize edilmesi araştırmamızın öncelikli hedefidir. Immobilize edilen söz konusu enzim %6'lık gluteraldehit oranında maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. %6'lık gluteraldehit ile immobilize edilen ksantin oksidaz enziminin Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 5,18x10⁻⁴ M ve 0,73 U/ml.dak olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Sütten XO enzimini saflaştırmak için Arslan O. tarafından sentezlenen *Sepharose 4B-L-tirozin 4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip afinite kromatografisi jeli kullanılmıştır.
- Sığır sütünden XO, yüksek verimde ve yüksek saflaştırma derecesinde saflaştırılmıştır.
- Yaygın olarak kullanılan amonyum tuzlarından NH₄F, NH₄Cl, CaCl₂ ve ZnCl₂ XO enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmış ve IC₅₀ değerleri tespit edilerek inhibe ettiği görülmüştür. Yalnız, HgCl₂ ve Hg(NO₃)₂.H₂O bileşikleri için IC₅₀ değerleri saptanamamıştır. Bunun sebebinin ise oluşan yoğun çökelekten dolayı aktivite hesabının yapılamadığı yukarıda belirtilmiştir.

- Gut hastalığı ve bunun tedavisinde kullanılan kolşisin etken maddesinin XO üzerinde inhibisyonu araştırılmış ve beklendiği gibi inhibe ettiği görülmüştür. ($IC_{50}=0,27 \times 10^{-4}$ mg/mL).
- Araştırmanın asıl amacının XO'nun, immobilize edilmesi olduğu yukarıda belirtilmiştir. Enzim farklı glutaraldehit oranlarında (% 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11,12,13 ve 14) immobilize edilmiş, en yüksek aktivite hangi oranda olduğu araştırılmış ve % 6 immobilize edilen enzimde gözlenmiştir. (Çizelge 3.8)
- % 6 oranında glutaraldehit ile immobilize edilen enzimin aktivitesi 2 ay boyunca düzenli olarak ölçülmüş ve sonunda aktivitesini % 50 kaybettiği gözlenmiştir.
- % 6 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzim için enzim ünitesi ve substrat konsantrasyon değerleri hesaplanarak buradan katalitik etkinlik, K_m ve V_{max} değerleri elde edilmiştir. Aynı işlemler serbest enzim için de denenmiş ve katalitik etkinliğin serbest enzimde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Immobilize enzimin K_M değeri artsa da defalarca kullanılarak yüksek konsantrasyonda çalışılabilir. Bu da immobilize enzimin avantajı olarak yorumlanabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Pritsos, C.A., “Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system”. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 195-208, (2000).
- [2] Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., (2000). *Biyokimya*. Erzurum.. Aktif Yayınevi.
- [3] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W., (2004). *Harper Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri.
- [4] Bray, R.C. The Enzymes, NewYork, *AcademicPress*, 12(3), 299-419, (1975).
- [5] Hart, L.J., McGartoll, M.A., Chapman, H.R. and Bray, R.C. “The composition of milk xanthine oxidase”. *Biochem J.*, 116, 851–64, (1970).
- [6] Nelson, C.A and Handler, P. “Preparation of bovine xanthine oxidase and the subunit structures of some iron flavoproteins”. *J.Biol Chem.*, 243, 5368–73, (1968).
- [7] MasseyV, Brumby P.E. and Komai H. “Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and kinetic properties”. *J.Biol Chem.*, 244, 1682–91, (1969).
- [8] Parks, D.A. and Granger, D.N., “Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology”. *Acta Physiol. Scand.*, 548, 87-99, (1986).
- [9] Bray, R.C., “Molybdenum iron-sulphure flavin hydroxylases and related enzyme. In the Enzymes”, Ed.: P.D. Boyer, *New Academic Pres.*, 12, 299-417, (1975).
- [10] Topham, R.W., Jackson, M.R., Joslin, S.A. and Walker, M.C., “Studies of the ferroxidase activity of native and chemically modified xanthine oxidoreductase”. *Biochem. J.*, 235, 39-44, (1986).

- [11] Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch M.P. and Jackson, M.R., “Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron”. *Biochemistry*, 21, 4529-4535, (1982).
- [12] Topham, R.W., Walker, M.C. and Calisch M.P., “Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization”. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 109, 1240-1246, (1982).
- [13] Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.C. and Wang, P., “A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49, 687-703, (1974).
- [14] Godber, B.L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R. and Harrison, R., “Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase”. *J. Biol. Chem.*, 275, 7757-7763, (2000).
- [15] Fried, R., Fried, L.V. and Babin, D.R., “Biologic role of xanthine oxidase and tetrazolium reductase inhibitor”. *Eur. J. Biochem.*, 33, 439-445, (1973).
- [16] Metinyurt G., “Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Plazma Ksantin Oksidaz Aktivitesi Ölçümü ve Hipogonadizmi Hastalarda Ksantin oksidaz Düzeylerinin Belirlenmesi”, Uzmanlık Tezi, *Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı*, Ankara, (2003).
- [17] Green, D.R. and Pauli, R., “The antibacterial action of the xanthine oxidase system”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54, 148-150, (1943).
- [18] Tubaro, E., Lotti, B., Santiangelli, C. and Cavallo, G., “Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations”. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1945-1948, (1980).
- [19] Brunelli, L., Crow, J.P. and Beckman, J.S., “The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*”. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316, 327-334, (1995).

- [20] Kenan, T.W. and Patton, S., “The structure of milk: implications for sampling and storage. The milk globule membran. In Handbook of Milk Composition”, Ed.: Jensen, R.G., New York, *Academic Pres*, 5-50, (1995).
- [21] Coddington A. In: Bergmeyer HU, “Methoden der Enzymatischen Analyse”, *Verlag Chemie*, Weinheim, , 1862-66, (1970).
- [22] Mcmanaman J. L., Neville M. C. and Wright R. M., “Mouse mammary gland Xanthine oxidoreductase purification, characterization and regulation” *Archives of Bioch. and Biophy.* 371(2), 308-316, (1999).
- [23] Price V.E., Otey C. and Plesner P. “Preparation of nucleoside phosphorylase from calf spleen”. In: Colowick SP, Kaplan NO, *Methods in enzymology*, *Academic Press*, New York, 2, 448–53, (1955).
- [24] Murray R. K., Granner D.K., Mayes P. A. and Rodwell V. W., *Harper Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri* (2004).
- [25] Cross, C. E. *Ann. Internal Med.* 107, 526–545, (1987).
- [26] Southorn, P. A., and Powis, G. *Mayo Clin. Proc.* 63, 390–408, (1988).
- [27] Hilliker A. J., Duyf, B., Evans, D., and Phillips, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4343–4347, (1992).
- [28] Nishino T., Okamoto K., Bryan T., Emil F. and Nishino T., “Mammalian Xanthine Oxidoreductase – Mechanism Of Transition From Xanthine Dehydrogenase To Xanthine Oxidase”, *The Febs Journal*, Review Article, Nisan (2008).
- [29] Nishino, T., Okamoto K., Kawaguchi Y., Horish H., Matsumura, T., Bryan T., Emil F. Pai, and Nishino T., Mechanism of the “Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase:Identification of the Two Cysteine Disulfide

Bonds And Crystal Structure of A Non-Convertible Rat Liver Xanthine Dehydrogenase Mutants”, *JBC Papers in Press*, (2005).

[30] Kenan, T.W. and Patton, S., “The structure of milk: implications for sampling and storage. The milk globule membran. In Handbook of Milk Composition”, Ed.: Jensen, R.G., New York, *Academic Pres*, 5-50, (1995).

[31] Horecker, B.L. and Heppel LA. “Xanthine oxidase from milk”. In: Colowick, S.P. and Kaplan N.O., *Methods in enzymology*, *Academic Press*, New York, 2, 482–5. (1955).

[32] Waud, W. R., and Rajagopalan, K. V., *Arch. Biochem. Biophys*, 172, 365–79, (1976).

[33] Krenitsky, T. A., and Tuttle, J. V. “A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase.” *Arch. Biochem. Biophys*. 185, 370–375. (1978).

[34] Waud W.R., Brady F.O., Wiley R.D. and Rajagopalan K.V. “Effect of proteolysis on the subunit structure”. *Arch Biochem Biophys.*, 169, 695–701, (1975).

[35] McCord, J.M. and Fridovich, I., “The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase ”., *J. Biol. Chem.*, 243, 5753-60, (1968).

[36] Morita, M., Feller, D.R. and Gilette, J.R., “Reduction of niridazole by rat liver xanthine oxidase”. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 217-26, (1971).

[37] Fridovich, I., “Competitive inhibition of xanthine oxidase by urea and guanidinium ion”., *J. Biol. Chem.*, 239, 3519-21, (1964).

[38] Schoutsen, B., De Jong, J.W., Harmsen, E., De Tombe, P.P. and Achterberg, P.W., “Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase”. *Biochemica et Biophysica Acta*, 762, 519-24, (1983).

- [39] Werns, S.W. and Lucchesi, B.R., "Free radical and ischemic tissue injury". *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 161-66, (1990).
- [40] Linder, N., Rapola., J. and Raivio, K.O., "Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues". *Lab. Invest.*, 79, 967-74, (1999).
- [41] Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Agdebana, O.E., Hda, T. and Higashino, K., "Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase". *Biochem. Biophys. Acta.*, 1164, 327-30, (1993).
- [42] Argermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H. and Fahimi, H.D., "Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study". *Eur. J. Cell Biol.*, 45, 137-144, (1987).
- [43] Della Corte, E. and Stirpe, F., "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme". *Biochem. J.*, 126, 739-45, (1972).
- [44] Hile, R. and Nishino, T., "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine oxidoreductase". *FASEB J.*, 9, 995-1003, (1995).
- [45] Yamaguchi Y, Matsumura T, Ichida K, Okamoto K and Nishino T "Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate". *J. Biochem.*, 141, 513–24, Tokyo, (2007)
- [46] Pauff, J.M., Hemann, C.F., Junemann, N., Leimkuhler, S. and Hile, R. "The role of arginine 310 in catalysis and substrate specificity in xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*". *J. Biol Chem* 282, 12785–790, (2007).

- [47] Ichida, K., Amaya, Y., Kamatani, N., Nishino, T., Hosoya, T. and Sakai, O., "Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria". *J. Clin. Invest.* 99, 2391-97, (1997).
- [48] Ichida, K., Matsumura, t., Sakuma, R., Hosoya, T. and Nishino, T., "Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria II". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1194-1200, (2001).
- [49] Reiss, J., "Genetics of molybdenum cofactor deficiency". *Hum. Genet.* 106, 157-63, (2000).
- [50] Packer, L. and Glazer, A.N., "Oxygen Radicals in Biological Systems Part B, Oxygen Radicals and Antioxidants", *Academic Press Methods in Enzymology*, 186, 651-6, (1990)
- [51] Laycock, S.K., McMurray, J., Kane, K.A. and Parratt, J.R., "Effect of xanthine oxidase system on cardiac function in anaesthetised rats." *Free Radic Bio*, 15, 249-55, (1993).
- [52] Dhalla NJ, Elmoselhi AF3, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 47, 446-56. (2000).
- [53] Ostadal, B., Ostadalova, I. and Dhalla, N.S. "Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects." *Physiol Rev*, 79, 635-59, (1999).
- [54] Manning, A., Bernier, M., Crome, R., Little S. and Hearse D. "Reperfusion-induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart." *J Mol Celi Cardiol*, 20, 35-45, (1988).
- [55] Downey, J.M., Miura, T. and Eddy, L.J., "Xanthine oxidase is not a source of free radical in the ischemic rabbit heart." *J Mol Celi Cardiol* , 19, 1053- 60, (1987).

- [56] Bray, R.C., "Xanthine oxidase." In: Boyer, P.D., Lardy, H.A. and Myrback, K., editors, second ed, *The enzymes*, Academic Press, New York, 7, 533–55, (1963).
- [57] Granger, D.R., Hollwarth, M.E. and Parks, D.A., "Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals." *Acta Physiol. Scand.*, 548, 47-63, (1986).
- [58] McCord, J.M., "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." *N.Engl. J. Med.*, 312, 159-63, (1985).
- [59] Fadiloglu, E., Ozyurt, H., Erdogan, H. "Xanthine oxidase activities and malondialdehyde in heart tissue after myocardial ischemia-reperfusion on rats with hypertension induced by L-NAME" *Ege tip dergisi* 40, 2, 75-81, (2004).
- [60] Xia, Y. and Zweier, J.L. "Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart", *JBC.*, 270, 18797- 803, (1995).
- [61] Netticadan, T., Temsah, R., Osada, M. and Dhalla, NS. "Status of Ca⁺²/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol (Celi physiol)*", 277, C384-C391, (1999).
- [62] Coetzee, WA., Owen, P., Dennis, SC., Saman, S. and Opie, LH., "Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias", *Cardiovasc Res*, 24,156-64, (1990).
- [63] Onat, T., Emerk, K. and Sözmen, E.Y., *İnsan Biyokimyası*, Ankara.. Palme Yayıncılık, (2006).
- [64] Terada, LS., Radisavljevic, Z., Mahr, NN. and Jacobson, ED., "Xanthine oxidase decreases production of gut wall nitric oxide." *Proc Soc Exp Bio. Med*, 216 (3), 40-413. (1997).
- [65] Beyaztas, S. "Ksantin Oksidaz (XO) Enziminin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi, Saflaştırılan Enzim İle Tiyosemikarbazon Türevlerinin Biotransformasyonu Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin

Araştırılması” , Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, (2010).

[66] Mikkelsen, S.R. and Corto'n, E., “Bioanalytical Chemistry” *Wiley-Interscience*, New Jersey, 16, (2004).

[67] Stryer, L., Berg, J.M. Tymoczko, J.L., “*Biochemistry*”, New York, 190, (2005).

[68] Polaina, J., MacCabe, A.P., “Industrial Enzymes” *Springer*, The Netherlands, 9, 2007).

[69] Mikkelsen, S.R., Corto'n, E., “Bioanalytical Chemistry” *Wiley-Interscience*, New Jersey, 16, (2004).

[70] Dekker, M., “Protein immobilization: fundamentals and applications” *Taylor*, New York, 85, (2000).

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

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

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

[74] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matuo, Y., “Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp.: Fermentation Technology Today”,83–389, (1972).

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

- [76] Tischer, W., Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers” 72 *Trends Biotechnol.*, 17, 326–335, (1999).
- [77] Hartmeier, W., “Immobilized Biocatalysts”, *Springer-Verlag*, Berlin, (1988).
- [78] Fessner, W.D., Anthonsen, T., “Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions” *Wiley-VCH*, Berlin, (2008).
- [79] Sandwick, R.K., Schray, K.J., “Conformational states of enzymes bound to surfaces” *J. Colloid Interface Sci.*, 121, 1–12,(1988).
- [80] Cao, L., “Immobilised enzymes: science or art?” (15 March 2009), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15811808>, (2005).
- [81] Afaq, S., Iqbal, J., “Immobilisation and stabilisation of papain on chelating Sepharose: a metal chelate regenerable carrier” *E.J.B. Electron J. Biotechnol.* 4, 1–5, (2001).
- [82] Chernukhin, I.V., Klenova, E.M., “A method of immobilisation on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity” *Anal. Biochem.* 280, 178–181, (2000).
- [83] Guisan., J.M., "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press, Madrid, (2006) Schulze, B., Wubbolts, M.G., “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. [83] Biotechnol.* 10, 609–615, (1999).
- [84] 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).
- [85] 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).

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

[87] Kar, A., Sambamurthy K., “ Pharmaceutical Biotechnology” *New Age*, New Delhi, (2006).

[88] 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).

[89] Varian, A.R., Sansen, W., “Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads” *Biosens. Bioelectron.* 11, 443–448,(1996).

[90] Guisan, J.M., Alvaro, G., Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Garcia, J.L., Tagliani, A., “Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*” *Biotechnol. Bioeng.* 42, 455–64, (1993).

[91] Martin, M.T., Plou, F.J., Alcade, M., Ballesteros, A., “Covalent immobilisation of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose” *Indian J. Biochem. Biophys.* 39, 229–234, (2002).

[92] Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres- Guzman, R., De la Mata, I., Castillon, M.P., Acebal, C., “Stabilization of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae* by covalent immobilisation” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 525–528, (2001).

- [93] Suh, C.W., Choi, G.S., Lee, E.K., “Enzymic cleavage of fusion protein using immobilised urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose” *Biotechnol Appl Biochem* 37, 149–155, (2003).
- [94] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl Polym.* 82, 1299–1305, (2001).
- [95] 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).
- [96] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl. Polym.* 82, 1299–1305, (2001).
- [97] Baran, T., Arica, M.Y., Denizli, A., Hasirci, V., “Comparison of β -galactosidase immobilisation by entrapment in and adsorption on poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes” *Polym. Int.* 44, 530–536, (1997).
- [98] Mounji, G.B., “Lecture 35: Enzyme catalysis” (15 April 2010), http://videlectures.net/mit560s08_bawendi_lec35/, (2008).
- [99] Gemeiner, P., “Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) Enzyme engineering” *Ellis Horwood*, New York, pp.13–119, (1992).
- [100] Akova, A., Ustun, G., “Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values” *Biotechnol. Lett.*, 22, 355–359, (2000).
- [101] Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P., “Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum” *Biotechnol. Lett.* 22, 1571–1575, (2000).

- [102] 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).
- [103] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites” *Biotechnol. Bioeng.* 68, 98–10, (2000).
- [104] Okubo, M., Ahmad, H., “Adsorption of enzymes on to submicron-sized temperature-sensitive composite polymer particles and its activity” *Physicochem. Eng. Aspect.* 153, 429–433, (1999).
- [105] Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., Affinity chromatography. “Methods Enzymol.” 104, 3–56, (1984).
- [106] Roy, I., Gupta, M.N., “Selectivity in affinity chromatography. In: Isolation and Purification of Proteins” *Marcel Dekker*, New York, NY, 57–94,(2003).
- [107] Turkova, J., “Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function” *J. Chromatography. B.*, 722, 11–31, (1999).
- [108] Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., “Immobilisation of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports” *Chem. Phys.*, 93, 185–197, (1998).
- [109] Labrou, N.E., “Design and selection of ligands for affinity chromatography” *J. Chromatogr. B.*, 790, 67–78, (2003).
- [110] Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., and Deckwer, W.D., “Expanded bed chromatography in primary protein purification” *J. Chromatogr. A.*, 865, 129–144, (1999).

- [111] Goncalves, A.P.V., Lopes, J.M., Lemos, F., Ribeiro, F.R., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., “Effect of the immobilisation support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*” *Enzyme Microb Technol.*, 20, 93–101, (1997).
- [112] Yang, Y.G., Chase, H.A., “Immobilisation of α -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors” *Biotechnol. Appl Biochem* 2,145–154, (1998).
- [113] Indlekofer, M., Brotz, F., Bauer, A., Reuss, M., “Stereoselective bioconversions in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization” *Biotechnol Bioeng* 52, 459–471, (1996).
- [114] Mohapatra, S.C., Hsu, J.T. “Immobilization of α -chymotrypsin for use in batch and continuous reactors” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75, 519–525, (2000).
- [115] Ganapathi, S., Butterfield, D.A., Bhattacharyya, D., “Flat-sheet and hollow fibre membrane bioreactors: a study of the kinetics and active site conformational changes of immobilised papain including sorption studies of reaction constituents” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 64, 157–164, (1995).
- [116] Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., Denizli, A., “Immobilisation of glucoamylase on to spacerarm attached magnetic poly-(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor” *J. Mol. Catal. B., Enzymatic* 11, 127–138, (2000).
- [117] El Sherif, H., Di Martino, S., Travascio, P., De Maio, A., Portaccio, M., Durante, D., Rossi, S., Canciglia, P., Mita, D.G., “Advantages of using non-isothermal bioreactors in agricultural waste water treatment by means of immobilised urease. Study on the influence of spacer length and immobilisation method” *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2802–2811, (2002).
- [118] Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature*, London, 409, 258–268, (2001).

- [119] Knowles, J.R., “Enzyme catalysis: not different, just better” *Nature* 350, 121–124, (1991).
- [120] Rozzell, J. D., “Biocatalysis at commercial scale: myths and realities” *Chimica Oggi* (6/7), 42–47, (1999).
- [121] Zaks, A., “Industrial biocatalysis Curr. Opin.” *Chem. Biol.* 5, 130–136, (2001).
- [122] Murza, A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Essential role of the concentration of immobilised ligands in affinity chromatography: purification of guanidinobenzoate on an ionized ligand” *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 740, 211–218, (2000).
- [123] Ozer N., Muftuoglu M., Ataman D., Ercan A., Ogus I.H., “Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk” *J. Biochem. Biophys. Methods* 39, 152- 159, (1999).
- [124] Massey V., Brumby P.E., “Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and kinetic properties.” *J. Biol. Chem.*, 244, 1682- 91, (1969).
- [125] Bradford, M. M., , “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).
- [126] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Küfrevioğlu, İ. Ö., “A New Method for the Purification of Carbonic anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography”, *Turk J. Med Sci.*, 26, 163-166. (1995).
- [127] Laemmli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, London, , 227-680. (1970).

[128] Arslan, O., “Inhibition of bovine carbonic anyhdrase by new sulfonamide compounds.”, *Biochemistry* , Moscow 66, 9, 1206-1208, (2001).

[129] Arslan, O., Çakır, Ü. and Uğraş, H.İ. “Synthesis of New Sulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase” *Biochemistry (Moscow)*, 67, 9, 1273-1276, (2002).

[130] Linder, N., Rapola., J. and Raivio, K.O., “Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues”. *Lab. Invest.*, 79, 967-74, (1999).

[131] Massey, V., Brumby P.E. and Komai H. “Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and kinetic properties”. *J.Biol Chem.*, 244, 1682–91, (1969).