ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Havva ERSÖZ

ALKOLDEHİDROGENAZ (ADH) ENZİMİNİN TAVUK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE FLORİSİL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOLDEHİDROGENAZ (ADH) ENZİMİNİN TAVUK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE FLORİSİL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

Havva ERSÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ...../ ...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Doç.Dr.RamazanBİLGİN	Prof.Dr.S.SeyhanTÜKEL	Doç.Dr. HaticeKORKMAZ GÜVENMEZ
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2009YL39

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALKOLDEHİDROGENAZ (ADH) ENZİMİNİN TAVUK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE FLORİSİL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

Havva ERSÖZ
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİMDALI

Danışman :Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl:2010, Sayfa: 42
Jüri :Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
:Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
:Doç.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Bu çalışmada tavuk karaciğerinden alkoldehidrogenaz enzimi kısmi saflaştırılıp, aktifleştirilmiş florosil 'e doğrudan immobilize edilmiştir. Bu amaçla homojenizasyon, ultrasantrifüjleme, % amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatoğrafisi uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda karaciğer alkoldehidrogenazı kaba homojenata göre 150.3 kez saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesi 0.631 U/mg protein olarak bulunmuştur. Florisile doğrudan immobilize edilen enzimin aktivitesi 0,034 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Alkoldehidrogenaz, Karaciğer, İyon değişim kromatografisi, Florisil

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION OF ALCOHOLDEHYDROGENASE ENZYM FROM CHİCKEN LİVER AND IMMOBILIZATION ONTO FLORISIL

Havva ERSÖZ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor :Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Year: 2010, Pages: 42
Jury :Assoc. Prof. Dr.Ramazan BİLGİN
:Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
:Assoc. Prof. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

In this study, alcoholdehydrogenase had been purified from chicken liver and direct immobilization of alcoholdehydrogenase onto activated florısıl was investigated. For this purpose; liver homogenization, ultracentrifugation, dıalys, ammonium sulphate precipitation, anion exchange chromatography were applied partially purified alcoholdehydrogenase and directly immobilizied onto florısıl. Chicken liver alcoholdehydrogenase was purified 150.3 U/mg fold in liver samples and specific activity of the enzyme in liver was found as 0.631 U/mg prot, respectively. The activity of the immobilized enzyme was found as 0,034 U/mg protein

Keywords: Alcoholdehydrogenase, Liver, Ion exchange chromatography, Florısıl

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman sayın hocam Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan hocalarım sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e ve sayın Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca beni destekleyen ve bilgilerini benimle paylaşan sayın, Dr. Özlem ALPTEKİN'e, Deniz YILDIRIM'a , Onur BALTACI'ya ve Dilek ALAGÖZ'e çok teşekkür ederim.

Benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, beni büyük bir ilgi ve sevgiyle bugünlere getiren annem Şadiye ERSÖZ'e babam Abdulgani ERSÖZ'e ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Beni her zaman destekleyen, varlığıyla bu sürecin kolaylaşmasını sağlayan, hayatımı paylaşmaya karar verdiğim sevgili nişanlım İsmail AYBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
1.GİRİŞ 1
1.1.Enzimler 1
1.2. Enzim Saflaştırmada Temel Analizler 2
1.3. Yapılacak Analizler 2
1.4. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması 3
1.5. Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri 3
1.6. Amonyum Sülfat ile Çöktürme 4
1.7. Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması 5
1.8. Protein Ayrılması 6
1.9. Protein Tayinleri 6
1.10. Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar 7
1.11. Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar 7
1.11.1. Diyaliz 7
1.11.2. Ultrasantrifüj 8
1.11.3. Kromatoğrafi 8
1.11.3.1. İyon Değişim Kromatoğrafisi 9
1.11.3.2. Moleküler Eleme Kromatoğrafisi 10
2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 11
2.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 13
2.3.Florisil 14
2.4. Alkol Dehidrogenaz (ADH) Enzimi 14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 17
3. MATERYAL ve METOD 21
3.1. Materyal 21

3.2. Metod 21
3.2.1. Örneklerin Homojenizasyonu 21
3.2.2. Örneklerin Santrifüj Edilmesi 22
3.2.3. Amonyum Sülfat ile Çöktürme 22
3.2.4. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisinin Hazırlanması 22
3.2.5. Proteinlerin DEAE-Selüloz Kolonuna Uygulanması 23
3.2.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi 23
3.2.7. Protein Tayini 23
3.2.8. Florisil Desteğinin Hazırlanması 24
3.2.9. Alkoldehidrogenazın Glutaraldehit Üzerinden Florisile Kovalent 25
İmmobilizasyonu 25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 27
4.1. Bulgular 27
4.1.1. Protein Tayini İçin Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 27
4.1.2. Karaciğer Örneklerinin Homojenize Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 27
4.1.3. Karaciğer Örneklerinin Santrifüj Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 28
4.1.4. Karaciğer Örneklerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesiyle Yapılan..... Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 29
4.1.5. $(NH_4)_2SO_4$ ile öktürme Sonucu En Yüksek Spesifik Aktiviteye Sahip % 40 lık Çözelti Fraksiyonlarının DEAE-Selüloz Anyon Değiştirici Kromatografisine Uygulanması ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 31
4.1.6. Alkol Dehidrogenazın Florisile Doğrudan İmmobilizasyonu 34
4.2. Tartışma 35
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 41
ÖZGEÇMİŞ 44

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri 12
Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, A. 1986).....13
Çizelge 2.3. ADH enziminin sınıflandırılması ve Km değerleri.....16
Çizelge 4.1. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltide kalan protein miktarı. 30
Çizelge 4.2. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunan absorbans değerleri ve 340 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 mL). 33
Çizelge 4.3. Karaciğer örneğinin kaba homojenattan başlayarak DEAE-Selüloz kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler.....34
Çizelge4.4.Alkol dehidrogenazın aktifleştirilmiş florisile doğrudan immobilizasyonunda destek miktarı ve hesaplanan aktivite değerleri 35

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1.Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997)12
Şekil 2.4.1. Alkol Dehidrogenaz. 14
Şekil 2.4.2. ADH enziminin katalizlediği reaksiyon 14
Şekil 4.1. Standartların protein miktarlarına karşı 750 nm'de okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi.....27
Şekil 4.2. Karaciğer homojenatlarında enzim aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi. 28
Şekil 4.3. Karaciğer homojenatlarının santrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi. 29
Şekil 4.4. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltide kalan protein miktarı. 30
Şekil 4.5. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfata bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı. 31
Şekil 4.6. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu spesifik aktivite değerleri. 31
Şekil 4.7. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunan absorbans değerleri (3 mL). 32
Şekil 4.8. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 340 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 mL). 32
Şekil 4.9. Florisile doğrudan immobilize edilen alkol dehidrogenazın aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi. 35

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	: Alkol dehidrogenaz
NAD^+	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş
DEAE-Selüloz	:Dietilaminoetil-Selüloz kromatografisi
g	: Gram
GA	: Glutaraldehit
3-APTES	: 3-aminopropil trietoksi silan

1.GİRİŞ

1.1.Enzimler

Enzimler, reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek substratın ürünler yönünde ilerlemesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Biyokimya tarihinin çoğu, enzim araştırmalarının tarihidir. Enzim kelimesi mayada bulunan anlamına gelir. Biyolojik kataliz, ilk olarak midenin salgıları ile etin sindirimi üzerinde yapılan çalışmalarda 1700 yılında keşfedildi ve tanımlandı. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükrük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirildi. 1850'lerde, Louis Pasteur şekerin maya ile alkole fermentlenmesinin "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Pasteur bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılmaz olduğunu ileri sürdü. Daha sonra 1897 'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole fermente ettiği, bunun da fermantasyonun hücreden uzaklaştırdığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetti. Frederic W. Kühne bu moleküllerin ENZİM olarak adlandırdı. Yeni enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması biyokimya bilimini geliştirdi (Nelson ve Cox, 2000)

Enzimlerin, teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu enzimlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmişti.

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görülmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. O halde bu enzimlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör ilavesi düşünülebilir, ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir

kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti daha da arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar.

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Klibanov , 1983).

1.2. Enzim Saflaştırmada Temel Analizler

Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeni ile yaşamı mümkün kılan biyomoleküllerdir. Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, lokalizasyonlarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını, vs…. belirlemenin en etkili yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Herhangi bir enzim için belirli bir aktivite belirleme yolu yoktur. Çünkü, bir yöntemin uygunluğu bazı faktörlere bağlıdır. Bunların başında enzimin saflığı, enzimin fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer gelmektedir. Enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonda kullanılan substratın kullanım hızı tayin edilerek ölçülür. Bir çok enzim için değişik tayin yöntemleri mevcuttur. Seçilecek tayin yöntemi, kullanılacak cihaz ve kimyasalların uygunluğuna bağlıdır.

1.3. Yapılacak Analizler

Her saflaştırma basamağından sonra ilgilenilen proteinle ilgili analizler, onun saflık derecesi ve saflaştırma işleminin veriminin bilinmesi gerekir. Bunu belirlemenin en önemli yolu her aşamada proteinlerin aktivitelerini ölçmektir. Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yöntemi yoktur; ama, ideal protein analiz yöntemi mümkün olduğunca hızlı, basit ve özgün olmalıdır. Hızlı

analizler saflaştırma basamakları arasındaki bekleme sürelerini ve dolayısıyla enzimin aktivite kaybetme olasılığını en aza indirecektir. Protein miktar tayinleri, her saflaştırma basamağının verimi ve ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesi ile ilgili bilgiler ve sonuçlar bir araya getirilerek gerekli bilgi bütünlüğü sağlanmış olur (Erarslan ve ark., 2000).

Spesifik aktivite =ilgilenilen protein (mg ya da Ünite)/total protein (mg),

Saflaştırma derecesi =ikinci basamağın spesifik aktivitesi/birinci basamağın spesifik aktivitesi,

Böylece her basamağın verimliliği ve saflık derecesi belirlenir.

1.4. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Absorbansın (A), zamana bağlı değişimi (dA/dt), molar ekstinksiyon katsayısına (ε) bölünürse absorbans değişimi izlenen maddenin derişimdeki değişim hızı saptanmış olur. Molar ekstinsiyon katsayısının değeri absorbansı veren maddenin değişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranın ifadesidir (Telefoncu,1996).

$\varepsilon = A/C$ cm^2 mol^{-1} ile formülize edilir.

A= absorbans, C= maddenin derişimini ifade eder (cm^2 mol^{-1})

Enzim ünitesi (U)=(Vf(ml) x(seyreltme faktörü)/ (ε) (cm^2/mol^{-1})x(Vs)xd)

Vf= toplam hacim (ml)

Vs= eklenen enzim hacmi (ml)

d= ışık yolu

dA/dt= dakikada gözlenen absorbans farkı

spesifik aktivite=U/protein(mg/ml)

1.5. Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri

Saflaştırmanın her basamağında protein miktarının bilinmesi faydalıdır. Eğer saflaştırma basamaklarında protein derişimini bilmek kritik bir önem taşıyorsa istenmeyen proteinlerin uzaklaştırıldığının bilinmesi gerekiyorsa, her bir fraksiyonun ve daha sonraki son ürünün spesifik aktivitesinin bilinmesi gerekiyorsa

saflaştırmanın ne ölçüde yapıldığı bilinecekse, protein miktarının belirlenmesi gerekir.

Protein tayinin de aşağıdaki yöntemler kullanılabilir:

1. Biuret-alkalen-bakır yöntemi
2. Lowry-Folin-Ciocalteau
3. 280 nm'de UV absorbsiyon (aromatik bağlar) veya 205-220 nm (peptid bağları) yöntemi
4.Boya bağlama yöntemi

1.6. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Hidrofilik ve hidrofobik grupların protein molekülünün yüzeyindeki dağılımı onun çeşitli çözgenlerdeki çözünürlüğünü tayin eder. Kulanılan çözgenler genellikle sulu çözgenlerdir. İyon şiddeti, pH, karışabilir organik çözgenlerin inert polimerlerin ilavesi veya bu derşimlerin sıcaklık farklılıkları ile birlikte gerçekleştirilmesi yoluyla proteinlerin çözünürlüğünü etkileyerek çöktürme, böylece proteinin izolasyon ve saflaştırılma yapılması mümkündür. Nötral pH'da fizyolojik iyon şiddeti genellikle 0.15-2 M civarındadır ve enzimlerin çoğu hücre sıvılarında çözünür proteinler olarak bulunur. Çözeltiler çözen ile çözünen arasındaki polar etkileşimler, mevcut tuzlarla iyonik etkileşimler ve belirli bir dereceye varmış aynı yüklü moleküller veya küçük agregatlar arası eletrostatik itme kuvvetleri sonucu gerçekleşir. Yüksek yüzey hidrofobluğuna sahip proteinler iyon şiddetinin fizyolojik değerden sıfıra doğru düşürülmesiyle ivme kuvvetlerinin yetersizliği sonucu çökerler. Enzim saflaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Tuz iyonları solvatasyona büyük ilgileri nedeniyle hidrofob gruplar etrafındaki düzenli su moleküllerini uzaklaştırırlar. Böylece bu grupların birbiri ile etkileşimi artar ve agregatlaşma gerçekleşir. Tuz çöktürmesinde çoğu kez ΔH pozitiftir. Bu nedenle yüksek sıcaklıkta daha iyi çöktürme sağlanır. Yöntemin başarısı, sınırlı bir tuz konsantrasyonu bölgesinde çökelmenin sağlanmasıdır. Çöktürmede kullanılan tuzların etkinliği anyonun yükü ile ilgilidir ve en çok sülfat, fosfat, sitrat tuzları kullanılır. Katyonun cinsi daha az etkili ise de bir değerlikli katyonların kullanılması

tercih edilir. Etkinlik sırası $NH_4 > K^+ > Na^+$ dır. En çok kullanılan tuz amonyun sülfattır. 0-30 °C aralığında çözünürlüğü çok az değişir, doygunluk derişimi 4M dır ve doygun çözeltisinin yoğunluğu (1,235 g/cm^3) aynı çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan (1,29 g/cm^3) küçük olduğundan santrifüjle ayırmaya imkan verir. Amonyum sülfat ile fraksiyonlamanın bir avantajı, proteinleri stabilize etmesidir. 2-3 M amonyum sülfat içeren bir protein çözeltisi veya kristalleri yıllarca dayanır. Yüksek tuz konsantrasyonları proteolizi ve bakteriyel etkileri de engeller. Bu yüzden ticari depolama maddesi olarak kullanılır.

1.7. Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması

Biyomoleküllerin bulundukları canlı kaynaklardan izole edilerek saflaştırılması son derece güç ve emek isteyen bir iştir. Çünkü, ayrıştırılmak istenen her maddenin yanında, benzer ya da farklı özellikte olabilen yüzlerce başka bileşik vardır. Mol kütleleri ve konsantrasyonları farklılıklar gösteren bu bileşiklerin içinden bir tanesini ayırmak, birçok duyarlı ve özel metodun bir arada kullanılmasını gerektirir. Biyokimyasal ayırmalarda karşılaşılan en önemli zorluklardan biri de, pek çok biyomolekülün dayanıksız olması; ayırma ve saflaştırma sırasında yapısal değişikliğe uğramasıdır. Örneğin, nükleik asitler çok ince uzun moleküller olduğundan karıştırma, pipetleme gibi işlemler sırasında kolaylıkla kırılabilirler.
pH' ın fizyolojik değerler dışına çıkması, sıcaklık ve bir çok kimyasal madde ise nükleik asitlerin denatüre olmasına sebep olur. Aynı etkenler başta enzim proteinleri olmak üzere diğer bazı biyomoleküllerin de, doğal yapısının bozulmasına sebep olurlar. Biyomoleküller organik çözücüde çözünmediğinden, ayırmalar genellikle sulu fazda yapılır. Hormonlar ve enzimler gibi miktarı çok az, yapısı çok kompleks olan bileşiklerin saflaştırılması ve kantitatif tayinleri, radyoizotopların da kullanıldığı özel enzimolojik teknikler kullanılmasını gerektirir. Bir maddenin saflaştırılmasında yapılacak ilk işlem; maddeyi bulunduğu ortamdan uygun bir çözücüye almaktır. İlgi duyulan maddenin bulunduğu fraksiyon seçilerek, o fraksiyon üzerinde ayırma ve saflaştırma işlemi başlatılır. Ayırma işlemlerinde belirli prensiplere dayanan metotlar kullanılır. Bu metotlar aşağıdaki gibi sınıflandırılır;

1. Ultrasantrifüj
2. Kromatoğrafi
3. Ekstraksiyon
4. Elektoforez
5. Diyaliz

1.8. Protein Ayrılması

Proteinler hem hücre dışında, hem de hücrenin farklı kompartımanlarında bulunan çok heterojik bir bileşik sınıfıdır. Saflaştırma için ; protein, bulunduğu hücre fraksiyonundan çözeltiye alınır. Stoplazmik proteinler için hücre zarı lizisle açılır. Bu amaçla hipotonik çözeltiye konan hücreler, hücre içine çözücü girmesi sonucu şişer ve zar parçalanır. Bitki ve bakteri hücrelerinde, hücre duvarı olduğundan, hücre duvarının enzimatik olarak veya organik çözücülerle muamele edilerek parçalanması gerekir. Protein bir organelde bulunuyorsa, bu organel fraksiyonunun parçalanmış hücre homojenatından ultrasantrifüjle ayrılması gerekir. Daha sonra; proteinler organelden konsantre tuz çözeltisi ile ekstrakte edilir. Bu işlemler sırasında, proteinin doğal yapısının bozulmaması için pH ve sıcaklık uygun şekilde ayarlanır.

1.9. Protein Tayinleri

Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarıldığını izlemek için, protein miktarının hassas ve spesifik olarak belirlenmesi gerekir. Protein bir enzim ise, substrat veya ürün miktarı uygun bir yöntemle tayin edilerek, buradan enzim aktifliğine geçilir. Ürünün kolaylıkla belirlenemediği durumlarda eşlenme reaksiyonlarına baş vurularak ürünün daha kolay ölçülebilen ikinci bir ürüne çevrilmesi sağlanır.

Proteinlerin izole edilmesinde onların çeşitli özelliklerinden yararlanılır. Bu özellikler:

1. Çözünürlük farkları
2. Büyüklük farkları

3. Elektriksel yük
4. Polarlık
5. Işık absorpsiyonu
6. Diğer özellikler

1.10. Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar

Proteinlerin çözünürlüğü çözücünün polarlığı, pH'ı, sıcaklığa ve çözeltinin iyon şiddetine bağlıdır. Çözeltide bulunan çözünmüş tuzlar, proteinlerin çözünürlüğünü etkiler.

Düşük iyon şiddetlerinde proteinin çözünürlüğü tuz konsantrayonu ile genellikle artar. Tuz, proteinin yükünü perdeleyerek çökmesine engel olur. İyon şiddeti arttıkça proteinlerin çözünürlüğü azalır. Çünkü, tuz hidratize olacağından, proteinin çözünürlüğü için gereken çözücü miktarı azalır. Proteinlerin çözünürlükleri çözeltinin pH'ı ile değişir. İzoelektrik noktada çözünürlük minimumdur. Çünkü, bu pH'da proteinler net bir yük taşımadıkları için, hem polarlığın azalmasına bağlı olarak çözünürlük azalır; hem de komşu moleküller arasında yüke bağlı itmeler ortadan kalkacağından moleküller bir araya gelir ve çökme başlar. Bu pH'ın altında ve üstünde ise proteinlerin çözünürlüğü artar. Proteinlerin aminoasit bileşimleri farklı olduğundan her proteinin izoelektrik pH'ı farklıdır. Bundan yararlanarak çözeltinin pH'ı çöktürülmek istenen proteinin izoelektrik noktasına ayarlanır. Böylece, diğer proteinlerin çözeltide kalması ve ayrılmak istenen proteinin çökmesi sağlanır. Sıcaklık, çözünürlüğü etkilediği için iyi bir çöktürme ancak uygun sıcaklık seçimiyle başarılabilir.

1.11. Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar

1.11.1. Diyaliz

Büyüklük farkına dayanan en basit ayırma yöntemidir. Amaç, proteini ortamda bulunan iyon ve küçük moleküllerden ayırmaktır. Yarı geçirgen diyaliz

zarları genellikle selüloz asetattan yapılmıştır ve gözenekleri 1-20 nm çapındadır. Diyaliz keseleri eşit büyüklükte bir gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal safsızlıklarını gidermek için bir ön işlemden geçirilmektedir. Çöktürmeyle ayrılan bir protein çökme sırasında ortamdaki iyonları absoplar. Bunları uzaklaştırmak için bir diyaliz torbasına konan protein çözeltisi, uygun bir tampon içerisine daldırılır. Ozmatik basınç farkından dolayı küçük molekül ve iyonlar dıştaki tampon çözeltiye geçerler. Tamponun zaman zaman yenilenmesi ile proteinin küçük molekül ve iyonlardan kurtarılması mümkün olur.

1.11.2. Ultrasantrifüj

Makromoleküllerin çökmesi için santrifüjlemek sureti ile merkezkaç kuvvetinden yararlanılarak çöktürme yapılabilir. Bir çözeltideki bir taneciğin çökme hızı;

a) Uygulanan merkezkaç kuvvetinin büyüklüğüne,

b) Taneciğin büyüklüğü, şekli ve yoğunluğuna,

c) Çözücünün yoğunluk ve vizkositesine, bağlıdır.

1.11.3. Kromatoğrafi

Kromatoğrafi kelimesi Yunanca “chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. Kromatoğrafi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Daima durağan faz (stasyonel faz) ve hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılır. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatoğrafik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne,

polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir (Telefoncu,1996).

1.11.3.1. İyon Değişim Kromatoğrafisi

Elektrostatik çekime dayanan bu adsorpsiyon kromatoğrafisinde örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştiriciler iki kısımdan oluşur:

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesi (matriks).
2. Hareketli karşı iyonlar. Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler (Boyer, 1993).

İyon değiştirici dolgu maddesi şayet pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup, bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden *anyon değiştiriciler* adını alırlar. Benzer şekilde şayet dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup, bu tür iyon değiştiriciler pozitif iyonları değiştirdiklerinden *katyon değiştiriciler* adını alırlar.

Dolgu maddesi alüminyum silikatlar, sentetik reçineler, polisakkaritler v.b. olabilir. Dolgu maddesinin tabiatı iyon değiştiricilerin mekanik kararlılığını, akış özelliğini, bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını ve kısmen de kapasitesini belirler. İlk kullanılan iyon değiştiricileri sentetik reçineler olup suyun demineralizasyonunu ve su kalitesini düzeltmede ve atıklardan iyonların kazanılmasında kullanılmıştır. Bu tür iyon değiştiriciler yüksek derecede yüklü gruplarla kovalent olarak bağlanmış hidrofobik polimer dolgu maddeleri olup biyolojik maddelerin saflaştırılmasında uygun değildir zira yüksek yük yoğunluğu ve polimerlerin hidrofobik oluşu biyolojik maddelerin denatüre olmalarına sebep olur. Biyolojik maddelerin ayrımında ilk kullanılan iyon değiştiriciler (Peterson ve Sober 1956), tarafından geliştirilen selüloz iyon değiştiricilerdir. Hidrofilik tabiatı sebebiyle

selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi çok düşüktür. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen modifiye dekstran olan "Sephadex", çapraz bağlı agaroz olan "Sepharose" ve epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak kuvvetlendirilmiş selüloz olan "Sephacel" iyon değiştiricileri, küresel tanecikli yüksek gözenekli ilk iyon değiştiricilerdir. Bu günlerde çok farklı destek maddesi vardır ancak protein fraksiyonlanması için en yaygın tercih edilen destek maddesi selülozdur (Johnstone ve Thorpe 1982).

İyon değiştiricilerin karşı iyonları absorplama kabiliyeti kantitatif olarak kapasite olarak tanımlanır. İyon değiştiricisinin total kapasitesi, o iyon değiştiricisinin kuru gramında bulunan yüklü ve potansiyel olarak yüklü grupların miktarıdır. Genel olarak miligram kuru ağırlık başına iyonlaşabilen grupların miliekivalentleri olarak ifade edilir ve deneysel olarak titrasyonla tayin edilir. İyon değiştiricisinin kapasitesi destek maddesinin gözeneğinin fonksiyonudur. İmalatçıların literatüründen protein için mevcut kapasite mikrogranüler, bilyelenmiş selüloz ve agaroz için çok benzerdir (0,11-0,15 g albumin / mL DEAE türevi iyon değiştiricisi). İyon değiştiricilerin yüksek kapasitesi çok büyük hacimlerin prosesine ve sonra konsantre şekilde eldesine imkan verir. İyon değişim kromatoğrafisi ile ayırmada temelde iki etap vardır: İlk etap örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon, ikinci etap ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılmış olarak elüe edilmeleri (Boyer, 1993).

1.11.3.2. Moleküler Eleme Kromatoğrafisi

Moleküler eleme kromatografisnin temel prensibi kürecik şeklinde olan poröz matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulması ve üzerinden örneklerin geçirilmesi esasına dayanır.

Matrikse uygulanacak örnek içerisindeki molekül boyutları durgun fazdaki matriksi gözeneklerinden daha küçük ve daha büyüktür. Matriksin gözenek büyüklüğünden daha küçük olan moleküler, matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise matriks tarafından dışarı bırakılırlar, dolayısıyla kolonu öncelikle terk ederler. Ara

büyüklükteki moleküller, matriks gözenekleri içine girebilir ancak kolon içinde küçük moleküllerinkinden daha kısa süre kalırlar. Böylelikle moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elue olurlar. Moleküler eleme yüksek ve düşük iyon konsantrayonunda, üre varlığında, 37°C de soğuk odada ve deneyin gerekli olduğu ortam şartlarında gerçekleştirilebilir. Moleküler eleme için kullanılan reçineler:

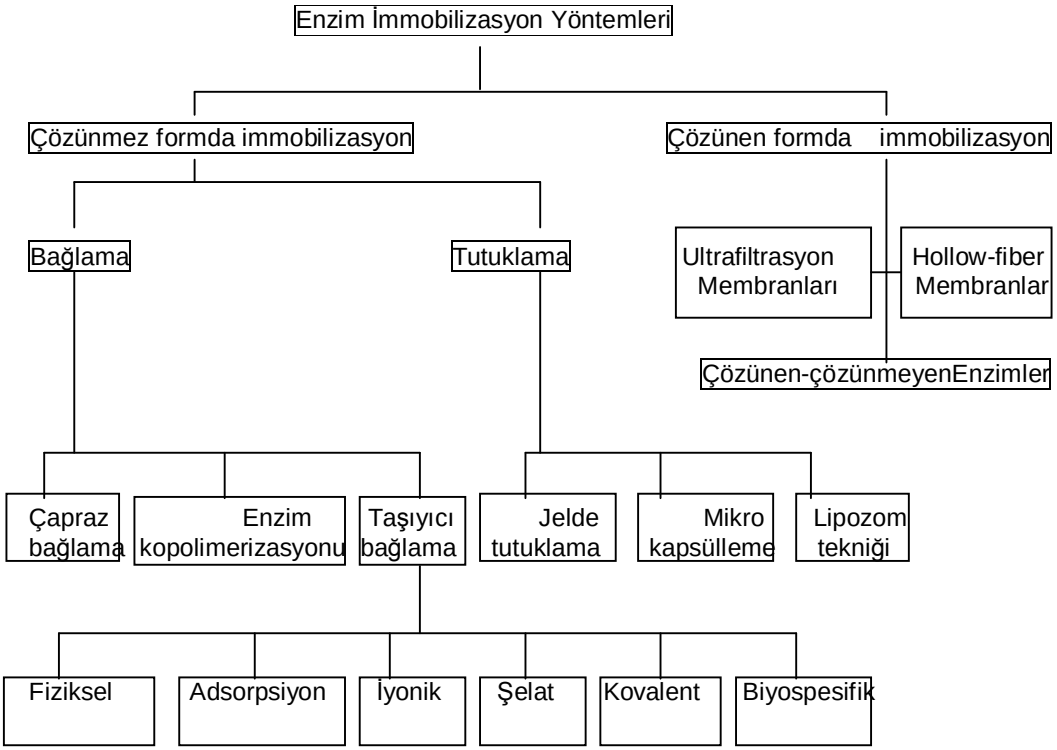
a. Sephadex
b. Sepharose
c. Sephacryl

Moleküler eleme için kullanılan reçine tipleri:

A. Sephadex G-Tipleri vardır
B. Sephacryl S-200, 30, 400, 500, 1000
C. Sepharose 2B, 4B, 6B
D. Sepharose-CL 2B, 4B, 6B

2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. Bazı araştırıcılar hatalı olarak "immobilize" terimi yerine "tutuklanmış", "çözünmez hale getirilmiş", "bağlanmış" gibi terimleri kullanmaktadır. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm diğerlerini kapsarken diğerleri yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedir. Enzim immbilizasyon yöntemlerinin sınıflandırıldığı Şekil 2.1. incelendiğinde bu farklılık kolayca anlaşılacaktır.



Şekil 2.1.Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997)

Çizelge 2.1**.** İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme , santrifüjleme v.b) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH ,sıcaklık v.s) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis , self-digestion) olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

2.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon teknikleri geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge2.2.'de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2**.** İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, A. 1986)

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	İçinde Tutma
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

2.3.Florisil

Florisil (magnezyum silikat) yüksek mekanik dayanıklılığa sahip, organik çözücülere dayanıklı, mikrobiyal saldırılara karşı dirençli inorganik desteklerdir.

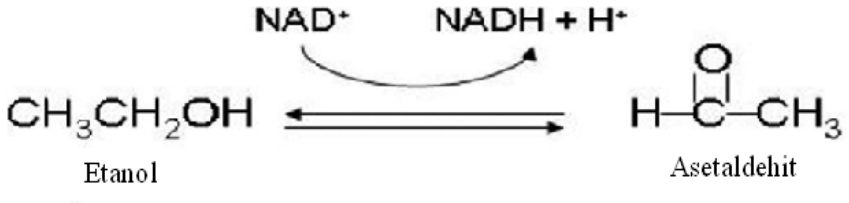
2.4. Alkol Dehidrogenaz (ADH) Enzimi

Alkol Dehidrogenaz (ADH) enzimi ilk kez 1937 yılında Saccharomyces cerevisiae (ekmek mayası)' dan saflaştırılmıştır. ADH ilk oligomerik enzimlerden biridir. Alkol Dehidrogenaz enzimi 1960'lı yılların başlarında (Drosophila melanogaster) meyve sineği ile çalışılırken keşfedilmiştir



Şekil 2.4.1. Alkol Dehidrogenaz.

Alkoldehidrogenaz (ADH) (E.C 1.1.1.1) birçok canlıda oluşan oksidoredüktaz enzim sınıfının yedi alt biriminden biridir. Alkoldehidrogenaz ;alkol, aldehit ya da ketonlar arasındaki dönüşümleri NAD^+ nın NADH'e indirgenmesi ile gerçekleştirir.



Şekil 2.4.2. ADH enziminin katalizlediği reaksiyon

İnsanlarda ve birçok hayvanda toksik özelliğe sahip olan alkolün, yıkımını sağlarken mayada ve birçok bakteride bulunan bazı alkol dehidrogenaz enzimleri

fermantasyon işleminin bir basamağı olarak ters bir reaksiyonu katalizler. Tavuk karaciğer alkol dehidrogenaz enzimi herbiri 40 kda moleküler ağırlığa sahip iki alt birimden oluşan sitozolde bulunan çinko içeren bir metalloenzimidir.

Alkol (etanol), en sık kullanılan ve suistimal edilen kimyasal maddelerden birisidir. Kronik alkol tüketiminin, hepatik ve serebral fonksiyonlar üzerine toksik etkileri olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bunun yanısıra, fazla miktarda alkol tüketiminin, kardiyovasküler sistem üzerindeki çeşitli zararları, birçok araştırıcı tarafından saptanmıştır. (Preedy ve ark., 1994). Gastrointestinal sistemden absorbe edilen etanolün %90' karaciğerde metabolize edilir. İlk basamak, etanolün, alkol dehidrogenaz (ADH) enziminin yardımıyla asetaldehide oksidasyonudur.

Oluşan asetaldehit, aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile asetata metabolize edilir. Asetatın % 80'i ise dolaşıma salınarak kalp, iskelet kası gibi dokularda ileri metabolizmaya gider (Lieber, 1994). Alınan etanolün bir kısmı, ilk geçiş metabolizması ile metabolize edilir. Bu ilk geçiş metabolizmasının amacı, vücudu etanolün sistemik toksik etkisinden koruyan, koruyucu bir bariyer görevini görmesidir. Midedeki etanol oksidasyonunu sağlayan enzim gastrik ADH'dır . Gastrik ADH'nın aktivitesi, etanolün ilk geçiş metabolizmasının göstergesidir (Rjk. ve ark., 1985). Midede 3 farklı formda ADH gösterilmiştir:

Bunlar etanol için farklı Km değerine sahip olan γ-ADH, X-ADH ve σ-ADH formlardır (Çizelge 2.6) 16mM etanol varlığında, γ-ADH izoenzimi doymuş, σ-ADH izoenzimi kısmen doymuş ve X-ADH izoenzimi ise aktif değildir . 580 mM etanol varlığında substrat fazlalığı nedeniyle γ-ADH izoenzimi inhibe olmuş, σ-ADH izoenzimi doymuştur ve X-ADH'nın ölçülen aktiviteye küçük bir katkısı olmaktadır. Sistemin bu kompleks yapısı her enzime karşılık gelen aktiviteler arasındaki farkı ayırt etmeyi imkansız kılar (Wf ,1987, Hk ve ark., 1993). Kofaktör olarak NAD^+ 'ye ihtiyaç duyar. Etanol oksidasyonu sırasında, NAD^+, indirgenmiş formu olan NADH'a dönüşür. İnsanda diğer organlarda da bulunmasına rağmen, ADH'nın en yüksek aktivitesi karaciğerdedir ve alkol oksidasyonunun % 90'ından fazlasından sorumludur (ADH 1,2,4,6) (Tablo 2.6.) ADH insanda dimerik bir enzim olup izoenzimlerinin (σ, β_1,β_2, β_3, γ_1, γ_2, π, X, σ) çeşitliliği, 7 yapısal genin varlığına bağlıdır. Bunlar, σ, β_1,β_2, β_3, γ_1, γ_2, π, X, ve σ subünitlerini kodlar. Bunların 3'ü (σ,

β ve γ) aktif homodimerik (ÖR: σσ, ββ) veya heterodimerik (ÖR: σβ, βγ) izoenzimlerini oluşturmak için kombine olur.

Polimorfizm, 2 genden oluşur (ADH2 ve ADH3), bunlar β ve γ subünitleri kodlar. π, X ve σ subünitleri ADH4, ADH5 ve ADH7 ile kodlanır. ADH1, ADH4,5,6,7 heterodimerler meydana getirmez (SB ve ark., 1993). ADH izoenzimleri, substrat spesifitesi, kinetik özellikleri ve yapısal özellikleri açısından değerlendirildiklerinde ise 4 farklı sınıfa ayrılılarlar (Crabb ve ark., 1993) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. ADH enziminin sınıflandırılması ve Km değerleri.

Gen	Allel	Subünit	Sınıf	Km(etanol) mmol/L	Vmax
ADH1	ADH1)	σ	I	4.2 (pH 7.5)	27
ADH2	ADH21	β1	I	0.0049 (pH 7.5)	9.2
	ADH22	β2	I	0.94 (pH 7.5)	400
	ADH23	β3	I	34 (pH 7.5)	-
ADH3	ADH31	γ1	I	1 (pH 7.5)	87
	ADH32	γ2	I	0.63 (pH 7.5)	35
ADH4	ADH4	π	II	34 (pH 7.5)	20
ADH5	ADH5	X	III	-	
ADH6	ADH6	-	-		
ADH7	ADH7	σ	IV	11 (pH 10)	

Alkol dehidrogenaz enzimi;

Primer alkoller ve aldehitlerin enzimatik olarak belirlenmelerinde

Şiral bileşiklerin sentezinde

Plazmalogenaz enziminin spektrofotometrik ölçümünde

Organik çözücüler içerisinde katalizör olarak

NAD^+, NADH, $NADP^+$ ve NADPH çalışmalarında

Yakıt pilleri uygulamalarında katalizör olarak kullanılır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sofer ve ark., 1968 Alkol dehidrogenaz (alkol :NAD^+ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.1) enzimini meyve sineği (Drosophila melanogestar)'nin farklı iki türünden (Oregon- RCII ve Bethylie) saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları bu enzimin moleküler ağırlığının 44 000 Da olduğunu poliakrilamid jel elektroforezini kullanarak göstermiş ve sekonder alkoller için geniş bir seçiciliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Sineklerin kaba ekstraktlarının enzimin birçok izoformunu içerdiğini ve bu formlardan bir tanesini DEAE-Selüloz anyon değiştirici kromatografisini ve Sephadex G-200 jel filtrasyonunu kullanarak izole etmişlerdir.

Michael. ve ark., 1971 Alkol dehidrogenaz (EC 1.1.1.1) enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex anyon değiştirici kromatografisi ve jel filtrasyonunu sırasıyla kullanarak fare karaciğerinden saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin varlığı selüloz asetat ve poliakrilamid-jel disk elektroforezi ile belirlemişlerdir. Tavşan anti serumu ile Sülfoetil-Sephadex C-50 katyon değiştirici kromatografisi ve imunoelektroforez ile küçük bir bileşenin varlığını belirtmişlerdir. Fare karaciğerindeki alkol dehidrogenazın mol başına 4 mol çinko içerdiğini , moleküler ağırlığının 65000 Da olduğunu ve benzer moleküler ağırlığa sahip iki alt birime sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ağır metal iyonlarının engelleyici tiyol maddelerin, 8 M'dan daha düşük derişimlerde üre içeren çözeltilerin, düşük pH (5.5) ve şelatlayıcı ajanların enzimin aktivitesini yitirmesine neden olduğunu fakat enzimi alt birimlerine ayıramadıklarını belirtmişlerdir. Enzimin NAD^+ için oldukça spesifik ve alkoller için geniş bir seçiciliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kessler ve ark., 1973 Alkol dehidrogenaz (alkol:NAD oksidoredüktaz, EC(1.1.1.1) enzimini fare karaciğerinin süpernatant fraksiyonundan 206 kat saflaştırmışlardır. Asetaldehitten oktadekanal'a kadar değişen aralıktaki alifatik aldehitlerin bir kaçının bunun yanı sıra benzaldehit ve izobütanal'ın enzim tarafından indirgenmeye uygun olduğunu ve bu indirgenme reaksiyonlarına ait Km değerlerinin $9.9x10^{-4}$ den $2.5x10^{-6}$ M'a kadar değişkenlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Setil alkolün (1-hekzadekanol) NAD^+ varlığında enzim tarafından aldehite yavaş bir şekilde yükseltgendiğini fakat etonolün enzim tarafından

yükseltgenemediğini bildirmişlerdir. Enzimin optimum pH'nın pH 6-8 olduğunu pH 5'in altında ve pH 9'un üstünde geri dönüşümsüz olarak enzimin denatüre olduğunu bildirmişlerdir.

Louis. ve ark., 1976, Alkol dehidrogenazı insan karaciğerinden Sephadex G-200 afinite kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Sodyum dodesil sülfat disk jel elektroforezi ile moleküler ağırlığının 42000 Da olduğunu bidirmişlerdir. Emisyon spektrografisi, mikrodalga emisyonu ve atomik absorpsiyon spektrometresi ile enzimin 3.6-4.2 g çinko atomu içerdiğini tayin etmişlerdir. Enzimin aktivitite göstermesi için çinkonun gerekli olduğunu o-fenantrolin(etilendinitrilo)tetraasetik asit ve α,α'-bipiridin inhibitörlerini kullanarak kanıtlamışlardır. Enzime ait ayrıntılı kinetik analizler için primer alkollerin homolog serilerini ($CH_3(CH_2)_nOH$, n=0-5) kullanmışlar ve buna karşılık n artıkça Km değerlerinin daha küçüldüğünü bildirmişlerdir. İnsan karaciğerindeki alkol dehidrogenazın insan etanol metobolizmasını aydınlatmak için belirli genetik ve fonksiyonal çalışmalara uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Niehaus ve ark., 1977, Pseudomonas sp. NRRL B3266'nın oleik asit varlığında yetiştirilmesi, 10(R)hidroksioksadekonoatın üretilmesinden sorumlu olan oleat hidrataz enzimi ve nikotinamitadenindinükleotit (NAD^+) 'in yükseltgenmesine bağlı 10-oksodekanoat sentezlenmesinden sorumlu olan hidroksioksodekanoat dehidrogenaz enzimlerinin sentezlenmesini uyardığını bildirmişlerdir. Hidroksioksodekanoat dehidrogenaz enzimi Pseudomonas sp. NRRL B3266'dan saflaştırılmış ve enzimin her birinin 29 000 Da moleküler ağırlığa sahip polipeptit zincirlerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Enzimin geniş bir substrat seçiliğine sahip 18 C'lu hidroksi yağ asitlerinin dehidrogenasyonunu katalizlediğini, çeşitli 10 ve 12 hidroksi yağ asitlerinin dehidrogenasyonuna ait kinetik parametrelerin benzer olduğunu (Km yaklaşık olarak 5mM ve Vmax yaklaşık olarak 50- 200 mmol/dak mg protein) gözlemlemişlerdir. Enzimin aynı zamanda sübstitiye olmayan sekonder alkollerinde dehidrogenasyonunu katalizlediğini bildirmişlerdir.

Dafeldecker ve ark., 1981, Alkol dehidrogenaz enzimini (ADH) maymun karaciğerinden saflaştırmış ve afinite kromatografisini kullanarak pirazola duyarlı ve

pirazola duyarsız izoenzimlere ayrımışlardır. ADH'ın insandan başka türlerde de fonksiyon göstermesi açısından iki ayrı sınıfının olduğunun ilk kez kanıtlamışlardır.

Pirazol-duyarsız formun substrat seçicilik özelliğinin daha sınırlı olduğunu, etanol (4 mM pH 5'de) ve asetaldehit (11 mM pH 7'de) için Km değerinin pirazol-duyarlı izoenziminkinden daha yülsek olduğunu bildirmişlerdir. Fizikokimyasal ve komposizyonal karekteristiklerinin (moleküler ağırlıkları, çinko içerikleri, dimerik yapıları) şimdiye kadar çalışılmış olan bütün memelilerden saflaştırılan alkol dehidrogenazlar ile benzer olduğunu belirtmişlerdir. Her iki izoformunda enzimatik aktivitesi için çinkonun gerekli olduğunu şelatlayıcı ajanlar kullanılarak gösterilmiştir.

Algar ve ark., 1983, Alkol dehidrogenaz izoenzimleri fare karaciğerinden (A_2 ve B_2) ve mide (C_2) dokularından triazine-dye afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırmışlardır. Enzimlerin benzer olmaları sebebiyle dimer olduğunu fakat SDS/poliakrilamid gel elektroforezi ile farklı alt sınıflara (A, 43 000 ; B , 39 000 ve C , 47 000) ayrıldığını belirtmişlerdir. Çinko analizleri ve 1,10 fenantrolin inhibisyon çalışmaları A ve C alt sınıflarının her biri en az katalitik olan 2 çinko atomunu içerirken , B alt sınıfının muhtemelen katalitik olmayan tek bir çinko atomunu içerdiğini gözlemlemişlerdir. İzoenzimlerin farklı kinetik özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. A_2 formunun etanol için Km değerinin 0.15 mM olduğunu, C_2 formunun da etanol için Km değerinin 232 mM olduğunu belirlemişlerdir. İmmunolojik çalışmalar ile A_2, B_2 ve C_2 izoenzimlerinin farklı immunolojik özelliğe sahip olduğunu bulmuşlardır.

Hoshino ve ark., 1985, Alkol dehidrogenaz (EC 1.1.1.1) enzimini su ekstraksiyonu, DEAE-Selüloz anyon değiştirici kromatografisi, 5-AMP-Sefaroz ilgi kromatoğrafisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyonunu sırasıyla kullanarak tavşan karaciğerinden saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığının 72 000 Da olduğunu ve her birinin moleküler ağırlığı 36 000 Da olan iki alt birime sahip olduğunu belirlemişlerdir. 1 mol enzim başına 4 g-atom çinko ve 18 süfhidril grubu içerdiğini ve enzimin pH 10,8 ve 7,5'te maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Etanol ve NAD^+ 'nin pH 10.8'deki Km değerlerinin 0,45 µM ve 53,19 µM, pH 7,5'deki Km değerlerinin ise 3,33 mM ve 6,94 µM olduğunu

göstermişlerdir. Enzimin alifatik alkoller içerisinde en hızlı etanolü indirgediği ve düşük bir substrat seçiçiliğine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Steroid alkoller içerisinde 5β-androstan-3β-ol-17-on'u subsrat olarak kullanmışlar ve pirazol, 4-metilpirazol, sülfhidril reaktifleri, ağır metal iyonları ve metal-şelatlayıcı ajanların enzimin aktive göstermesini engellediğini belirlemişlerdir.

Moreno ve Pares, 1990, insana ait alkol dehidrogenaz enzimini üç kromatografik adımda (DEAE-Selüloz, AMP-Sefaroz, CapGapp Sefaroz kromatoğrafileri) mide mukozasından saflaştırmışlar ve ADH'ın 3 farklı formunun bulunduğunu jel elektroforezi ile belirlemişlerdir. Bu formlar; Anodik $_{x}$-ADH (sınıf 3), katodik $_{\gamma}$-ADH (sınıf 1) ve önceden tanımlanmamış yavaş katodik hareketliliğe sahip yeni bir formu olarak belirlenmiştir. $_{\sigma}$-ADH olarak adlandırılan bu alkol dehidrogenazın fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemişler ve yapılan kinetik çalışmalar sonucunda etanol için pH 7.5'deki Km değerinin (41 mM) yüksek olduğunu bulmuşlardır. Aldehitlerin alkollerden daha iyi bir substrat olduğunu, aldehitler arasında m-nitrobenzaldehitin en iyi substrat olduğunu bildirmişlerdir. İnsanda alkol alımından sonra midedeki yüksek konsantrasyonlarındaki etanolün metabolize edilmesinde $_{\sigma}$-ADH'ın en büyük katkıyı sağlayan ADH formu olduğunu belirlemişlerdir.

Negoro ve ark., 2003, Alkol dehidrogenaz enzimini sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, p-hidroksiasetofenonu afinite kromatografisi ve iyon değiştirici kromatografisini kulanarak fare karaciğerinden saflaştırmışlar ve moleküler ağırlığının 30 kDa olduğunu SDS-PAGE'ile belirlemişlerdir. Saflaştırılan ADH, etanol substratı için Kcat'ın dk başına 62.4 ve Km'nin 1.3 mmol/l olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma St. Louis, MO firmasından sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak tavuk karaciğeri kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan kimyasallar; Nikotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş formu (NADH), glisin, DEAE-Selüloz, etanol, Amonyum sülfat ($(NH4)_2SO_4$) , tavuk karaciğeri, NaCl , diyaliz membranı, fosforik asit, sodyum karbonat, sodyum hidroksit (NaOH), bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, sığır serum albumini, potasyum dihidrojen fosfat, nitrik asit, aseton, glutaraldehit (GA), 3-aminopropil trietoksisilan (3-APTES), Alkoldehidrogenazın immobilizasyonunda destek materyali olarak florisil kullanılmıştır.

Araç ve gereçler; Bu çalışmada pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, otomatik pipetler, santrifüj, termometre, UV-Vis pektrofotometre (ATI UNICAM), analitik terazi, manyetik karıştırıcı ve cam kolonlar kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin Homojenizasyonu

Homojenat hazırlanmasında Lındström ve ark., (1978), diğer aşamalarda ise Kessler ve ark., (1974) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Günlük olarak kesilen taze tavuk karaciğeri -19 ºC'de bir gece bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra kesilen tavuk karaciğerinden 50 g alınarak homojenizasyon tamponu içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Homojenizasyon için 110 ml 0,1 M fosfat tamponundan (pH: 7.5 , 4 °C), oluşan çözelti kullanılmıştır. Karaciğer 4-5 dakika boyunca blender ile homojenize edilmiştir.

3.2.2. Örneklerin Santrifüj Edilmesi

Homojenat işleminden sonra örnekler süzülmüş ve süzüntü 12000x *g*'de 60 dakika boyunca santrifüj edilmiş, santrifüj sonucu supernatant ayrılarak bir araya getirilmiştir

3.2.3. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Enzim ekstraktları beher içine alınarak 4°C'e soğutulmuş, uygun % doygunluk için gerekli amonyum sülfat miktarı hesaplanmış ve tartılmıştır. Amonyum sülfat enzim çözeltisine ilave edilmiştir. Daha sonra karıştırmaya 4ºC'de 30 dakika devam edilmiştir. Çözelti 12000x *g*'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti uzaklaştırılmıştır. Sonra supernatanta ilave edilecek daha yüksek % doygunluk için yeniden amonyum sülfat tartılmış ve çöktürme işlemi yukarıda belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır.

3.2.4. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisinin Hazırlanması

25 g DEAE-selüloz tartılıp, 400 mL 1,5 mM pH=6.8 fosfat tamponunda dengeye getirilmiştir. Trompta süzülüp, yine aynı tampon ile yıkanmıştır. DEAE-selüloz, 400 ml 1,5 mM pH=6.8 fosfat tamponu'unda tekrar dengeye getirilip, toplanan süpernatanlar (98 ml hemolizat) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat magnetik karıştırıcıda karıştırılıp, 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Bu süre içerisinde enzim örneği, DEAE-selüloz üzerine adsorbe olmuştur. DEAE-selüloz-enzim çökeleği 2,6×10,5 cm'lik kolona doldurulmuştur. Yani 56,2 mL'lik çökelek elde edilmiştir. Kolon başlangıç tamponu ile yıkanarak, hemoglobinin çoğu uzaklaştırılmıştır. Alkol dehidrogenaz , DEAE-selüloz'dan 20 mM pH=6.8 fosfat tamponu kullanılarak elüe edilmiştir. 3,1 ml/dakika'lık akış hızı ile 10 mL'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar biraraya toplanmıştır (Asano ve ark., 1986).

3.2.5. Proteinlerin DEAE-Selüloz Kolonuna Uygulanması

Alkoldehidrogenaz (ADH) içeren 8 mL enzim ekstraktı kolona uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması pH:6.8 de, 0.01 M fosfat tamponu ile yapılmıştır, protein örnekleri 3 mL hacminde tüplere toplanmıştır. Toplanan örneklrde protein derişimi ve alkoldehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Alkoldehidrogenaz aktivitesi ölçümünde Vallee ve ark., (1955) ; Kessler ve ark., (1974) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Enzim aktivitesi Nikotinami adadenin dinükleotidin indirgenmiş formunun (NADH) enzim ile etkileşmesi sonucu ve asetaldehitin indirgenmesiyle 340 nm'de azalan absorbansı 3-4 dakika boyunca izlenerek ölçülmüştür. Yöntemde derişimi 0.25 mM olacak şekilde NADH çözeltisi hazırlanmıştır. Kör olarak 1.5 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH=7) içerisine 0.5 ml 0.4 mM asetaldehit, 1 ml NADH çözeltisi eklenip hazırlanmıştır. Bu çözelti içerisine 25ºC 'de 100 µl enzim çözeltisi ilave edilerek 340 nm de azalan absorbans 3-4 dakika boyunca kaydedilmiştir.
Enzim aktivitesinin IU/mL cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$Akt = (\Delta A_{340nm} .Vt / \varepsilon.t.Ve)$
Vt: toplam reaksiyon hacmi
Ve: kullanılan enzim çözeltisinin hacmi(ml)
E: Milimolar ekstinsiyon katsayısı (6.22)
t: reaksiyon zamanı (dk)

3.2.7. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, O.H ve ark. tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (1951). Bunun için A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A : Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. Çözelti B: 0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamalanarak hazırlanmıştır.
3. Çözelti C: 50 ml A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. Folin-Ciocalteau çözeltisi saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5. Standart protein çözeltisi:100 mL'de 14 mg sığır albümini olacak şekilde % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.
6. Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0, 50,0 100,0 , 125,0 , 250.0, 500.0, 750.0, 1000.0 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisinden ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. Florisil Desteğinin Hazırlanması

Alkoldehidrogenazın immobilizasyonunda önce florisil destek yüzeyinin aktifleştirilmesi gerekmektedir (Tükel ve Alptekin, 2004). Bu nedenle 3-aminopropiltrietoksisilan (3-APTES) kullanılarak desteğin alkilamin türevi oluşturulmuştur. Alkilamin türevinin hazırlanmasında (silanlama) Weetall, H.H. (1976) tarafından literatürde bildirilen yöntem kullanılmıştır. Destek materyali %5 (v/v)'lik nitrik asit ile 80-90 ºC'de dakika yıkanmış ve takiben su ile yıkanıp 120 ºC'de kurutulmuştur. Kurutulmuş desteğin 1 gramı hacimce %4'lük 3-aminopropiltrietoksisilanın aseton içerisindeki çözeltisine eklenerek 45°C'de 24 saat bekletilmiştir. Saf su ile yıkanarak 115°C'de etüvde 1 gece kurutulmuştur. 1 g silanlanmış desteğe 25 ml % 2,5 (v/v)`luk glutaraldehitin 50 mM pH 7,0 fosfat tamponundaki çözeltisi eklenmiş 120 dakika beklendikten sonra, reaksiyona

girmemiş glutaraldehit (GA) saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve 60 ºC'de 1 saat kurutulmuştur. Bu basamaktan sonra enzim destek üzerine doğrudan immobilize edilmeye çalışılmıştır (Costa ve ark.,2001).

3.2.9. Alkoldehidrogenazın Glutaraldehit Üzerinden Florisile Kovalent İmmobilizasyonu

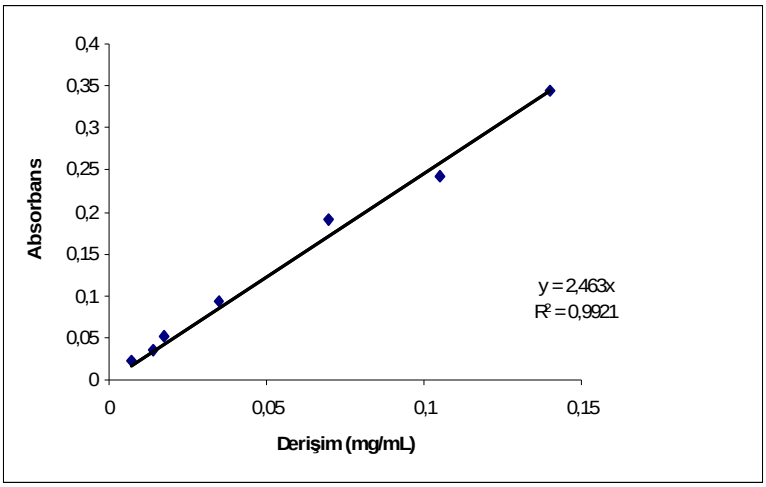
Alkoldehidrogenazın florisile glutaraldehit üzerinden kovalent immobilizasyonunda, literatürde alkoldehidrogenazın aluminyum oksit üzerine kovalent immobilizasyonu için bildirilen yöntem esas alınmıştır (Costa ve ark.,2001). Alkoldehidrogenazın florisile immobilizasyonunda 1,0 g desteğe derişimi 1,0 mg/mL olacak şekilde pH 7.0 , 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanan alkoldehidrogenaz çözeltisinin 4,0 ml'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. İmmobilizasyon sonunda immobilize alkoldehidrogenaz örneği tampon ile iyice yıkanarak serbest alkoldehidrogenaz ortamdan uzaklaştırılmıştır. Serbest alkoldehidrogenaz tamamen uzaklaştığı süzüntünün 280 nm'deki absorbansının takip edilmesiyle belirlenmiştir. Daha sonra süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve ark. (1951) önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Süzüntüdeki protein miktarından immobilizasyonun başlangıcında ortama konulan alkoldehidrogenaz miktarı çıkartılarak 1,0 g destek başına bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra immobilize enzim için aktivite tayini Vallee ve ark., (1955) önerdiği yönteme göre yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Tayini İçin Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Enzim aktivitesi tayinindeki enzim miktarını belirlemek amacıyla protein tayini yapılmıştır. sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sığır serum albumini (BSA) kullanılarak standart protein eğrisi çizilmiştir.

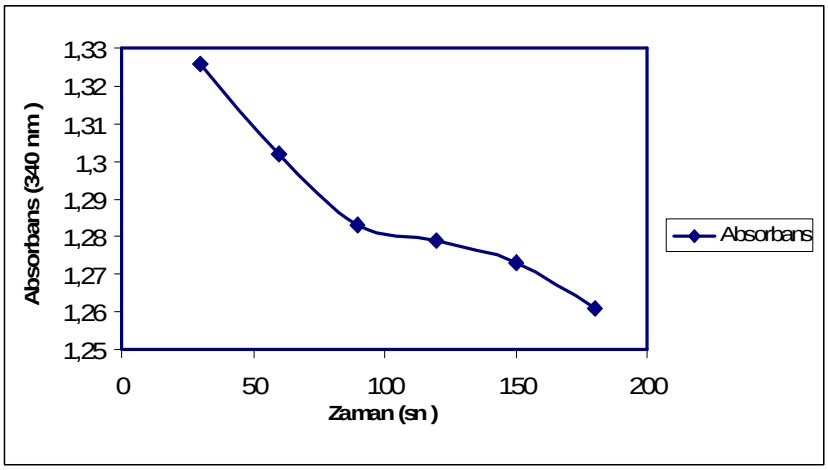


Şekil 4.1. Standartların protein miktarlarına karşı 750 nm'de okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi

4.1.2. Karaciğer Örneklerinin Homojenize Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Blender'de homojenize edilen karaciğer örnekleri 12000x *g*'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu çökelti atılarak supernatantlar bir araya getirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.2'de verilmiştir, 50 g tavuk karaciğeri alınarak karaciğer hacminin 2 katı hacmindeki homojenizasyon tamponu içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Homojenizasyon tamponu olarak kullanılan çözelti 100 ml

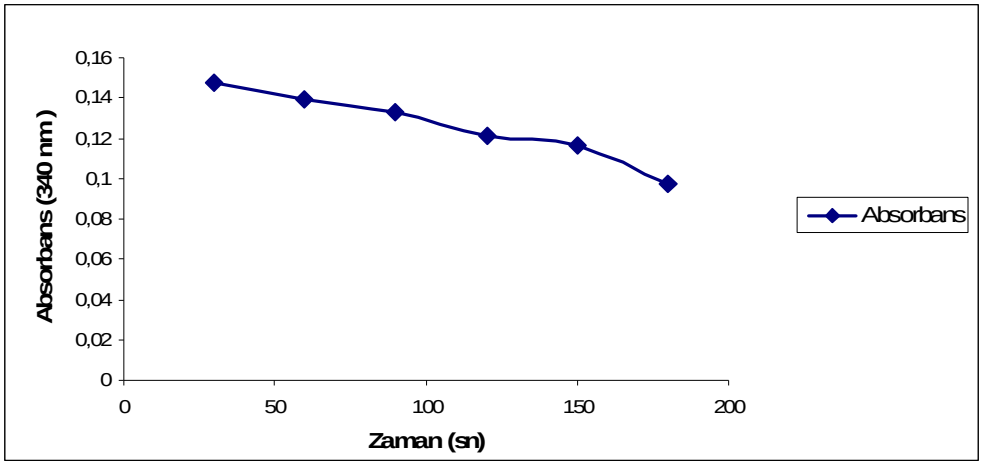
0,1 M fosfat tamponu (pH: 7.5 , 4ºC), kullanılmıştır. Tampon içinde bekletilen karaciğerler 4-5 dakika boyunca blender ile homojenize edilmiştir.



Şekil 4.2. Karaciğer homojenatlarında enzim aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

4.1.3. Karaciğer Örneklerinin Santrifüj Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

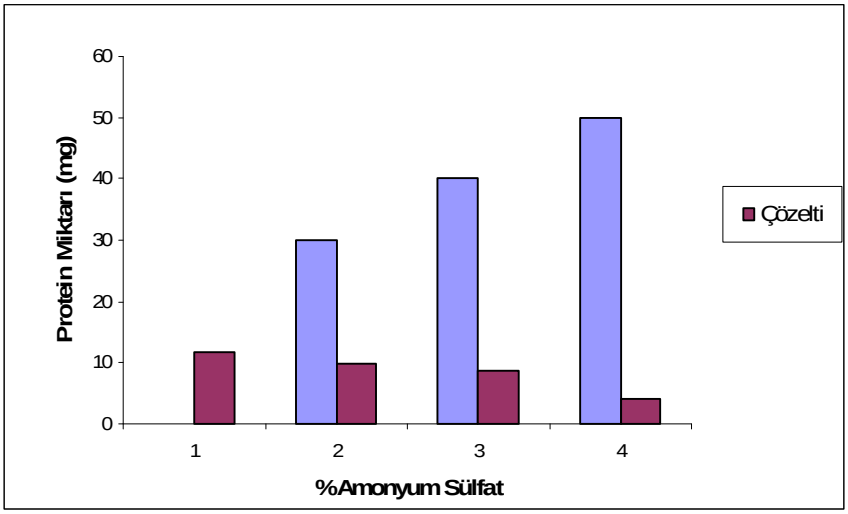
Blender'de homojenize edilen karaciğer örnekleri 12000x g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu çökelti atılarak supernatantlar bir araya getirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Karaciğer homojenatlarının santrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

4.1.4. Karaciğer Örneklerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesiyle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat ile çöktürmede ultrasantrifüj sonucu elde edilen supernatant bir beher içine alınarak 4ºC ye soğutulmuştur. İstenilen % $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu için gerekli amonyum sülfat yavaşça enzim ekstraktına karıştırılarak ilave edilmiştir. Çözelti 12000x *g*'de 60 dakika santrifüj edilmiş ve çökelti uzaklaştırılmıştır. Daha sonra daha yüksek % $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu için yeniden amonyum sülfat tartılmış ve çöktürme işlemi yukarıda belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır. Yapılan çöktürme işleminde %20, %30, %40, %50 Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimi karaciğer için çözeltide kalan protein miktarı Şekil 4.4'de verilmiştir.

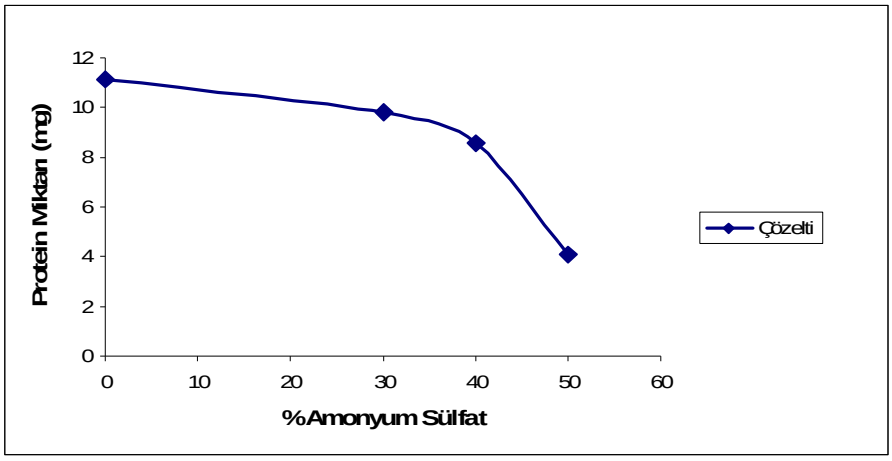


Şekil 4.4. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltide kalan protein miktarı.

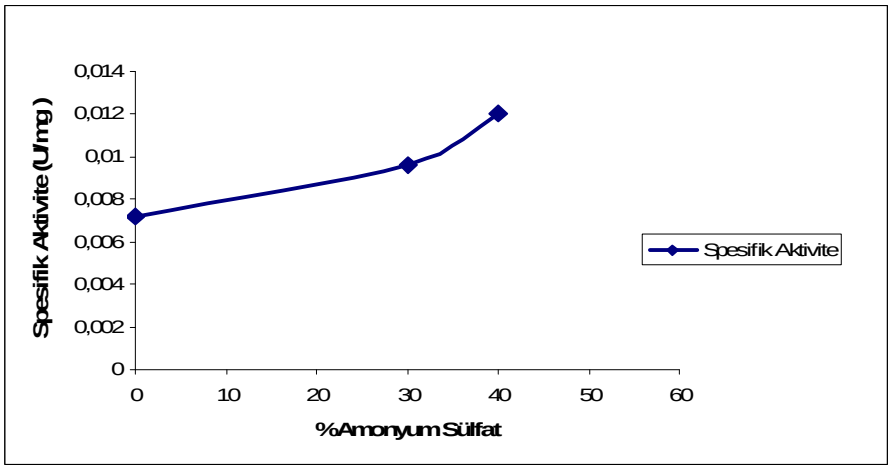
Çizelge 4.1**.** Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltide kalan protein miktarı.

% $(NH_4)_2$ SO_4	Çözelti (mg protein)
0	11.16
30	9.8
40	8.6
50	4.12

Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Şekil 4.5'de ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfata bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı.

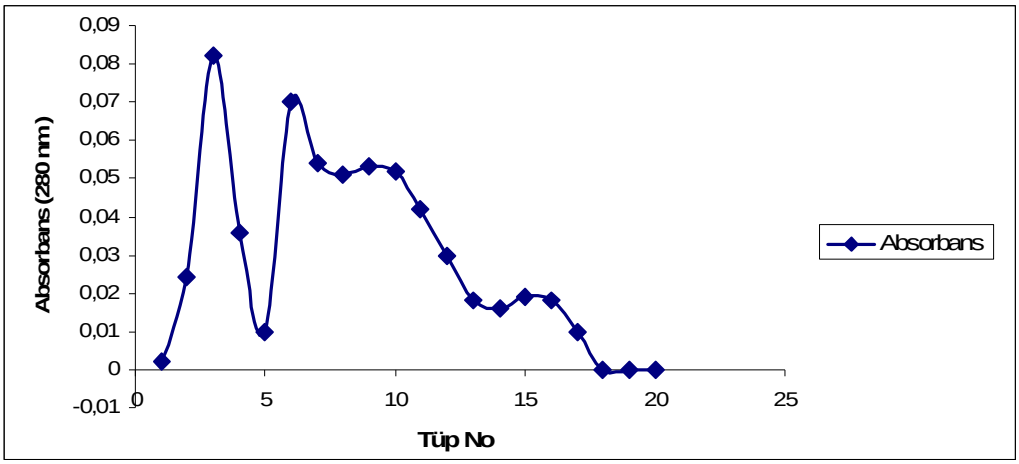


Şekil 4.6. Karaciğer örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu spesifik aktivite değerleri.

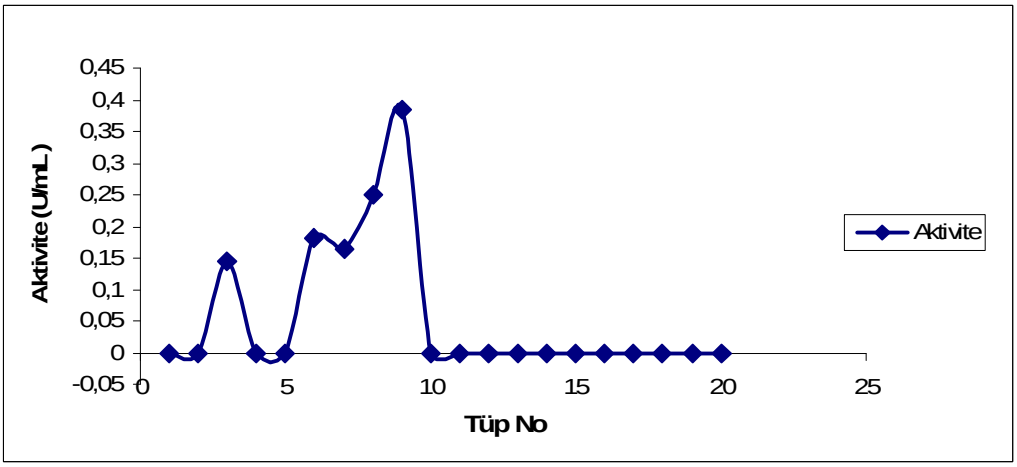
4.1.5. $(NH_4)_2SO_4$ ile öktürme Sonucu En Yüksek Spesifik Aktiviteye Sahip % 40 lık Çözelti Fraksiyonlarının DEAE-Selüloz Anyon Değiştirici Kromatografisine Uygulanması ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu en fazla spesifik aktiviteye sahip olan % 40 lık fraksiyonları diyaliz yapılmış ve bu çözeltiden 8 mL alınmış ve 1.5 x29 cm

çapındaki DEAE kolonuna uygulanmıştır. Kolon daha önce fosfat (pH=6.8 , 4ºC) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Örneklerin kolondan alınması gradiyent tuz (NaCl) çözeltisi ile yapılmıştır. Kolondan alınan örnekler 3'er mL hacimde toplanmıştır. Karaciğer için protein içeriklerini saptamak amacıyla 280 nm'de okunan absorbans değerleri sırasıyla Şekil 4.7'da ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunan absorbans değerleri (3 mL).



Şekil 4.8. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 340 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 mL).

Çizelge 4.2. Karaciğer örneği için DEAE-Selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunan absorbans değerleri ve 340 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 mL).

Tüp No	280 nm deki Absorbans Değerleri	340 nm de Ölçülen Aktivite Değerleri
1	0.002	0.00
2	0.024	0.00
3	0.082	0.144
4	0.036	0.00
5	0.010	0.00
6	0.070	0.182
7	0.054	0.165
8	0.051	0.249
9	0.053	0.383
10	0.052	0.00
11	0.042	0.00
12	0.030	0.00
13	0.018	0.00
14	0.016	0.00
15	0.019	0.00
16	0.018	0.00
17	0.010	0.00
18	0.00	0.00
19	0.00	0.00
20	0.00	0.00

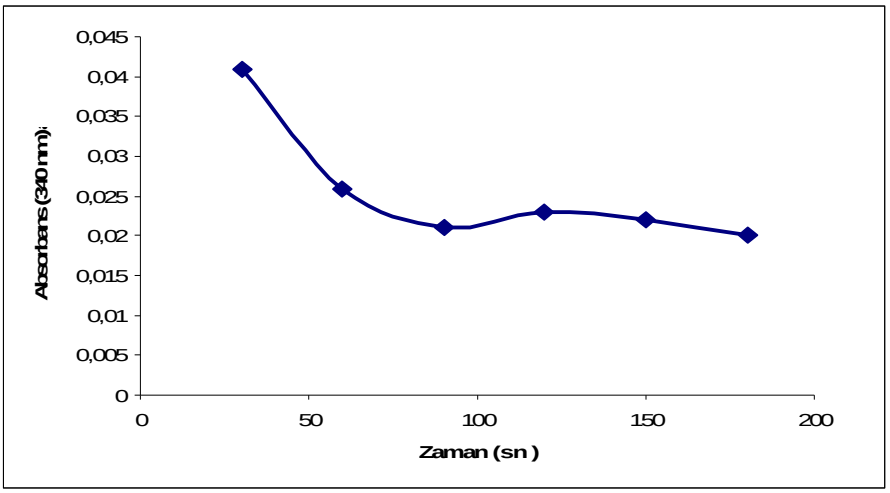
Karaciğerin kaba homojenattan başlayarak DEAE-Selüloz kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Karaciğer örneğinin kaba homojenattan başlayarak DEAE-Selüloz kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler

Saflaştırma Basamağı	Vt (ml)	C Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/ml)	At (U) (VtxU/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
Kaba Homojenat	160	20.39	3263.4	0.0852	13.6	0.0042	1
Santrifüj	84	11.16	937.44	0.082	6.72	0.0073	1.74
% 40 $(NH4)_2SO_4$ ile Çöktürme	75	3.39	254.25	0.0401	3.0075	0.012	2.9
DEAE Kromatografisi	3	0.076	0.228	0.066	0.198	0.631	150.3

4.1.6. Alkol Dehidrogenazın Florisile Doğrudan İmmobilizasyonu

Alkol dehidrogenazın florisile doğrudan immobilizasyonunda florisil önce HNO_3 ile yıkanmış ardından 3-APTES ile silanlanmıştır. Silanlanan florisil glutaraldehit ile muamele edilmiştir. Glutaraldehit muamelesinden sonra destek, yıkama çözeltisinde glutaraldehit gelmeyinceye kadar yıkanmıştır. Glutaraldehit tamamen uzaklaştırıldıktan sonra destek kurutulmuştur. Alkol dehidrogenazı florisile doğrudan immobilizasyonunda (pH=7.0) 50mM olan fosfat tamponu kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır. 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış 4,0 mL alkol dehidrogenaz çözeltisi kullanılarak 25ºC'de 2 saat süreyle immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilize alkol dehidrogenaz örneğinin aktivitesi ise 25ºC'de, 0.1 M pH 7.0 fosfat tamponunda, 0.025 mM NADH varlığında ölçülmüştür.



Şekil 4.9. Florisile doğrudan immobilize edilen alkol dehidrogenazın aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Çizelge4.4.Alkol dehidrogenazın aktifleştirilmiş florisile doğrudan immobilizasyonunda destek miktarı ve hesaplanan aktivite değerleri

Destek miktarı (mg)	Aktivite değerleri (U/mL)
25	$3{,}22.10^{-3}$
50	$1{,}45.10^{-2}$
100	$3{,}69.10^{-2}$

4.2. Tartışma

Bu çalışmada alkoldehidrogenaz enzimi tavuk karaciğerinden Kessler ve ark (1974), Von Bahr ve ark (1978)'nın önerdikleri metod esas alınarak kısmi saflaştırılmıştır ve aktifleştirilmiş florisil üzerine doğrudan immobilize edilmeye çalışılmıştır. Saflaştırma basamakları sırasıyla; karaciğerin homojenizasyonu, santrifüj, %40 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, ve DEAE-Selüloz kromatoğrafisi kullanılarak saflaştırılmış ve aktivite tayinleri yapılmıştır. Doğrudan, aktifleştirilmiş florisil üzerine yapılan immobilize enzim içinde aktivite tayini yapılmıştır. Çalışma için tavuk karaciğerinin seçilmesinin amacı pek çok canlıda bulunan alkoldehidrogenazın daha önceden tavuktan sınırlı sayıda saflaştırılmış olması ve florisil üzerine doğrudan immobilizasyonunun yapılmamış olması bu anlamda literatürde sınırlı sayıda çalışma

olması ve alkoldehidrogenazın kullanım alanlarının sınırlı sayıda olmasıdır. Alkoldehidrogenaz saflaştırma çalışmasında örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 0.0042 U/mg protein olarak bulunmuştur. Von Bahr ve ark (1978)' nin karaciğerle yaptıkları çalışmada örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 0.010 U/mg protein olarak rapor edilmiştir. Kessler ve ark (1974)'nın karaciğerle yaptıkları çalışmada örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 0.058 U/mg protein olarak bulunmuştur. Elde edilen ilk homojenat 60 dakika 12000 g'de santrifüj edilmiş elde edilen supernatant da yapılan alkoldehidrogenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 0.0073 U/mg protein olarak bulunmuş, örnek 1.74 kez saflaştırılmıştır.

Elde edilen supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda çözeltide yapılan alkoldehidrogenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 0.012 U/mg protein olarak bulunmuş örnek 2.9 kez saflaştırılmıştır. Kessler ve ark (1974)'nın karaciğer ile yaptıkları çalışmada supernatant da yapılan alkoldehidrogenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değerini 0.25 U/mg protein olarak bulmuşlardır. Karaciğer için farklı amonyum sülfatla yapılan çöktürme işleminde 20, 30, 40, 50, % derşiminde amonyum sülfat kullanılmış sonuç olarak en yüksek spesifik aktiviteye sahip olan çözelti derişimi % 40'lık amonyum sülfat olarak bulunmuş ve diğer basamaklarda bu % 40 derişime sahip örnekler kullanılmıştır. Kessler ve ark (1974)'nın karaciğer ile yaptıkları çalışmada supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda çözeltide yapılan alkoldehidrogenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 1.2 U/mg protein olarak bulunmuştur. Kessler ve ark (1974)'nın karaciğer için farklı amonyum sülfatla yapılan çöktürme işleminde en fazla spesifik aktiviteye sahip olan çözelti derişimi %50'lik amonyum sülfat olarak bulunmuştur.

Alkoldehidrogenazla yapılan çalışmada supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda en yüksek spesifik aktivite gösteren %40'lık çözelti DEAE-Selüloz anyon değiştirici kolonuna uygulanmıştır. Kolondan alınan eluatlarda yapılan alkoldehidrogenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 0.631 U/mg protein olarak bulunmuş örnek 150.3 kez saflaştırılmıştır. Literatürde alkol dehidrogenazın aktifleştirilmiş florisile doğrudan immobilize edildiği bir başka

çalışmaya rastlanmamıştır. Alkol dehidrogenaz 25, 50, 100 mg olmak üzere üç farklı miktardaki aktifleştirilmiş florisil üzerine doğrudan immobilize edilmiş ve aktiviteleri ölçülerek kıyaslanmıştır. Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite değeri 100 mg aktifleştirilmiş florisil üzerine doğrudan immobilizasyon sonucunda elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Tavuk karaciğeri alkol dehidrogenazı için kaba homojenatta elde edilen spesifik aktivite değeri 0.0042 U/mg protein olarak bulunmuştur.
2. Santrifüj sonucu elde edilen supernatantla yapılan çalışma sonucu alkol dehidrogenaz enziminin spesifik aktivite değeri 0.0072 U/mg olarak bulunmuş, 1.02 kez saflaştırılmıştır.
3. Karaciğer için amonyum sülfat ile yapılan çöktürme işlemleri sonucunda elde edilen süpernatantlar incelendiğinde en yüksek aktivite değeri %40'lık amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sonucu elde edilmiştir ve bu örneğe ait spesifik aktivite değeri 0.012 U/mg protein olarak bulunmuş, örnek ise 2.9 kez saflaştırılmıştır.
4. DEAE-Selüloz kromatoğrafisi ile yapılan bir sonraki saflaştırma basamağında alkol dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesi 0.631 U/mg protein olarak bulunmuş, 150.3 kez saflaştırılmıştır.
5. Yapılan saflaştırma işleminde, amonyum sülfatla çöktürme aşamasında protein miktarında azalma gözlenmiştir.
6. ADH başka kaynaklardan saflaştırılabilir.
7. Saflaştırılan ve doğrudan immobilize edilen karaciğer alkol dehidrogenazı için aktivite ölçümü işlemi NAD^+ ve etanol ile tekrarlanabilir.
8. Florisil destek kullanılarak yapılan immobilizasyon işleminin ortam koşulları değiştirilerek (pH gibi) immobilizasyon işlemi tekrarlanabilir.
9. ADH enzimi başka destekler üzerine immobilize edilip denenebilir.

KAYNAKLAR

ALGAR, E-M., ASEEALEY, T-A., AND HOLMES, A-S., (1983) Eur.J.Bıochem. 137,139-147.

ARSLANIAN, J- M., PASCOE, E., AND REINHOLD, J-G., (1971) Bıochem.J 125, 1039-1047.

BOSRON WF, LİT:Catalytic Properties of Human Liver Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes. Enzyme 1987;37:19-28

CRABB DW, DİPLE KM, THOMASSON HR: 1993 Alcohol sensivity , alcohol metabolism, risk of alcoholism, and the role of alcohol and aldehyde dehydrgenase genotypes. J ab Clin Med ;122:234-4

HOSHINO, T., ISHIGURO, I., AND OHTA, Y., (1985) Department of Biocmestry, Fujita-Gauken Health University School of Medicine Toyoake, Aichi 470-11

JULKUNEN RJK, PADOVA CD, Lieber CS (1985) First pass metabolism of ethanol. Life sci ;37:567-573.

KESSLER, R-J., FERRELL, WILLIAM J., Int. J. Bıochem., 1974, Vol. 5, pp. 365 to 374. Pergamon Press. Printed in Great Britain.

LİEBER CS: Alcohol and the Liver. Gastroenterology 1994; 106:1085-1105.

LOUİS,G., Arthur, L., Sytkowski, J., and Bert, L., V, 1976.

MORENO, A., AND PARES, X., (1991) The Journal of Bıologıcal Chemıstry ,Vol. 266, No. 2, Issue of January 15, pp. 1128-1133,.

M, NEGORO., and I, WAKABAYASHI, (2004) Department of Hygiene and Preventive Medicine, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan, Alcohol-Alcoholısm Vol. 39, No.3, pp. 178-182.

NIEHAUS, JR, W-G., FRIELLE, T., and KINGSLEY JR, Eugene A., (1978) Journal of Bacterıology, Apr., p.177-183 Vol. 134, No.1.

PREEDY VR, RİCHARDSON PJ: Ethanol induced cardiovascular disease. Br Council 1994; 50(1):152-163.

ROSALKİ SB: The Clinical Biochemistry of Alcohol. Biochemistry in Clinical Practise, Williams DL, Marks V:2nd Ed., London:The Livery House Press, 1993:471-477.

SEİTZ HK, EGERER G, SİMANOWSKİ UA, WALDHERR R, ECKEY R, AGARWAL DP, GOEDDE HW, WARTBURG JP: Human gastric alcohol dehydrogenase activity:effect of age, sex , and alcoholism . Gut 1993; 34:1433-1437.

DE SMİDT, O., DU PREEZ, JAMES C., AND ALBERTYN, J., AND ALBERTYN, J., FEMS YEAST RES 8 (2008) 967-978 Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing Ltd.

SOFER ,W., URSPRIUNG, HEINRICH., (1968) From the Department of Bıology, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218 The Journal of Bıologıcal Chemıstry Vol. 243, No.11, Issue of June 10, pp. 3110-3115,.

SOFER W, MARTIN PF (1987)."Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in Drosophila". Annual Review of Genetics 21: 203–25.

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 sayfa.

VON BAHR-LINDSTRÖM, H., ANDERSON, LARS., MOSBACH, KLAUS., AND JÖRNVALL, HANS., (1978) Department of Chemistry, Karolınska Instıtutet, S-104 01 Stockholm 60 and Biochemical Division, Chemical Center, University of Lund, PO Box 740,S-220 07 Lund 7, Sweden ,.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

WERNER, P., DAFELDECKER., PARES, X., L, VALLEE., WİLLİAM, F.,

BOSRON, AND Lİ, T-K., 1981 Bıochemistry, 20, 856-861.

ASANO, M.M., ITO K., IKEDA H., SEKIGUCHI, S., 1986. Purification Of Copper-Zinc-Superoxide Dismutase And Catalase From Human Erythrocytes By Copper-Chelate Affinity Chromatography. Journal Of Chromatography A, 370: 501-507.

TELEFONCU, A.,1996. Protein Saflaştırma Ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir-Türkiye, 272s.

LOWRY O.H, ROSEBROUGH N.J, FARR A.L., RONDALL, R.J., 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 261-275.

TÜKEL, S.S., ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate, Process Biochemistry, 39(12): 2149-2155.

BOYER, R.F., 1993. Modern Experimental Biochemistry, 2nd Ed, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California., pp 75-80.

HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., SMITH, P.K., 1992. Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, London. p: 283-284.

SPERINDE, J.J., GRIFFITH, L.G., 1997. Synthesis and Characterization of Enzymatically-crosslinked Poly(ethyleneglycol) Hydrogels. Macromolecules, 30:5255–5264

DAVİD L. NELSON, MİCHAEL M. COX., 2000. Lehninger Princeples of Biochemistry , 243-244.

COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GÜBITZ, G.M., PAULO, A.C., 2001. Immobilization of *Bacillus SF* on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. Enzyme and Microbial Technology, 28:815-819.

KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. Science, 219:722-727.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Bingöl'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini burada tamamladı. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünü kazandı. 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı.