

**SARKOZİN OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Berfu ENGİN
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Mayıs 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Berfu Engin’ in “Sarkozin Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması” başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 06.05.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ	
Üye : Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye : Doç. Dr. EBRU BİRLİK ÖZKÜTÜK	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Sarkozin Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Berfu ENGİN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ
2015,68 sayfa

Bu çalışmada, monomerik sarkozin oksidaz (MSOX) enziminin saflaştırılmasına yönelik sarkozin bağlı kriyojel kolonlar geliştirilmiş ve bu kolonların MSOX saflaştırılmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Sarkozin bağlı makro gözenekli kriyojellerin hazırlanmasında serbest radikal polimerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında metakrilamidohistidin (MAH) fonksiyonel monomeri ve ardından nano MAH Sarkozin ligandı sentezlenerek FT-IR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra, MAH Sarkozin, hidroksi etilmetakrilat (HEMA) monomeri ile çapraz bağlayıcı N,N' metilenbisakrilamit (MBA) varlığında polimerleştirilerek kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojel kolonların karakterizasyonu şişme testi, BET, SEM ve FT-IR analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında, sentezlenen kriyojel ayırma kolonları kullanılarak *Bacillus cereus* bakteri suşlarından elde edilen ham ekstraktan MSOX saflaştırılmıştır. Saflaştırılan MSOX' un Bradford yöntemi ile protein içeriği, UV spektrofotometrik ölçümleri ile enzim aktivitesi belirlenmiş ve enzim için kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca; saflaştırılan enzimin SDS PAGE analizi ile molekül ağırlığı ve saflık derecesi belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sarkozin Oksidaz, Kriyojeller, Afinite Kromatografisi,
Enzim Saflaştırma, Metakril amidohistidin (MAH)

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Purification of Sarcosine Oxidase Enzyme by Affinity Chromatography

Berfu ENGİN

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ

2015, 68 pages

In this study, sarcosine bound cryogel columns have been developed and the efficiency in purification of monomeric sarcosine oxidase (MSOX) has been investigated. The sarcosine bound macroporous cryogels have been synthesized by free radical polymerization. For this purpose, metharcylolamidohistidine (MAH) as the functional monomer and nano MAH-Sarcosine spheres have been synthesized and characterized by FT-IR in the first part of the study. Then, cryogel columns have been prepared by polymerization of MAH-Sarcosine and functional monomer in the presence of cross-linker N,N' Methylenebisacrylamide. Characterization of the prepared cryogel columns has been carried out by swelling tests, BET, SEM and FT-IR analysis.

In the final step of the study, purification of MSOX from crude extracts of *Bacillus cereus* bacteria has been carried out by using prepared cryogel separation columns. Protein content of the purified MSOX has been determined by Bradford technique. Enzyme activity and kinetic studies have been carried out by UV spectrophotometric analysis. Molecular weight and purity degree of the purified enzyme have also been determined by SDS-PAGE analysis.

Keywords: Sarcosine Oxidase, Cryogels, Affinity Chromatography, Enzyme Purification, Metharcylol amidohistidine (MAH)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen çok sevdiğim hocam Yard. Doç. Dr. Serpil Özkara Yavuz' a

Deneysel çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman destekleyen, tanıdığım için kendimi şanslı hissettiğim hocalarım Prof. Dr. Rıdvan Say ve Prof. Dr. Arzu Ersöz' e

Tez yazım aşamasında sabır ve tecrübesiyle istisnasız her soruma cevap veren ve zorlandığım her anda yanımda bulduğum sevgili hocam ve aynı zamanda arkadaşım Rüstem Keçili' ye

Teorik ve deneysel her konuda desteğini yanımda hissettiğim sevgili hocam Arş. Gör. Özlem Biçen Ünlüer' e;

Tanıdığım en iyi niyetli, en yardımsever, en becerikli insanlardan biri olan canım arkadaşım Yasemin Uymaz' a

İlgilerini ve desteklerini yalnızca laboratuvarında değil, hayatımın her alanında hissettiğim, ikinci ailem dediğim Biyokimya Lab. ekibine ve o ekipten olan sevgili dostlarım Ayça Bakır, Burcu Yazıcı, Derya Karaarslan, Fatma Yediyıldız, Gözde Yavuz ve Semra Özgün Köse' ye,

Geldiğim noktada çok büyük emekleri olan sevgili anneannem Muhterem Berkeh ve rahmetli dedem Cemal Berkeh' e

Eğitim hayatım boyunca aldığım her kararda, attığım her adımda yanımda olan, hayatımın her aşamasında fedakar davranan ve kendime olan güvenimin sarsılmasına asla izin vermeyen anneme ve babama

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Berfu ENGİN

Mayıs 2015

İÇİNDEKİLER

<u>ÖZET</u>	i
<u>ABSTRACT</u>	ii
<u>TEŞEKKÜR</u>	iii
<u>İÇİNDEKİLER</u>	iv
<u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u>	viii
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u>	x
<u>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</u>	xi
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Enzimlerin Spesifikliğı ve Etki Mekanizması	6
2.1.4. Enzim Aktivitesi	8
2.1.4.1. Enzim Aktivite Birimleri	8
2.1.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	8
2.1.5.1. Enzim Derişimi.....	8
2.1.5.2. Substrat Derişimi	9
2.1.5.3. pH	10
2.1.5.4. Sıcaklık	10
2.1.5.5. İnhibitörler	11
2.1.5.6. Enzim Kinetiğı.....	11
2.1.6. Flavoenzimler	14

2.1.7. Sarkozin Oksidaz	15
2.2. Enzim Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri	19
2.2.1. Kaynak Seçimi.....	20
2.2.2. Çöktürme	20
2.2.3. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon	21
2.2.4. Kromatografik Yöntemler	22
2.2.5. Afinite Kromatografisi	24
2.2.6. Afinite Kromatografisi Monolitik Destek Malzemeleri ve Kriyojeller ..	27
2.2.6.1. Organik Monolitik Polimerler	27
2.2.6.2. Silika İçeren Monolitik Kolonlar.....	28
2.2.6.3. Polimerik Jeller.....	28
2.2.6.4. Kriyojeller.....	29
2.2.7. Afinite Kromatografisi Türleri ve Kullanılan Ligandların Özellikleri	31
2.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	34
2.4. Afinite Kromatografisi ile Enzim Saflaştırmanın Önemi	35
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. MATERYAL.....	37
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.2. METOD.....	38
3.2.1. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonlarının Hazırlanması.....	38
3.2.1.1. Metakrilamidohistidin (MAH) Fonksiyonel Monomerinin Sentezi	38

3.2.1.2. MAH-Sarkozin Nanopartikül Sentezi	39
3.2.1.3. MAH-Sarkozin Nanopartikül Gömülmüş Kriyojel Sentezi	39
3.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	39
3.2.2.1. Şişme Testi	39
3.2.2.2. FT-IR Analizi	40
3.2.2.3. Yüzey Alanı Ölçümü.....	40
3.2.2.4. Yüzey Morfolojisi	40
3.2.3. Enzim Üretimi ve Ön Deriştirilmesi	40
3.2.4. Enzimin Saflaştırılması	41
3.2.5. Enzimin Protein İçeriği ve Aktivite Tayini.....	42
3.2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler ve Kinetik İncelemeler	43
3.2.7. SDS-PAGE Analizi	44
4. BULGULAR	45
4.1. MAH, MAH-Sarkozin ve Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in Karakterizasyonu	45
4.1.1. MAH, MAH-Sarkozin ve Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in FT-IR Spektrumu	45
4.1.2. MAH-Sarkozin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi	47
4.1.3. MAH-Sarkozin Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi	48
4.1.4. Yüzey Alanı Ölçümü	48
4.2. Enzim Örneklerinin Protein İçeriği ve Aktivite Tayini.....	48
4.2.1. Protein İçeriği Tayini	48
4.2.2. MSOX Aktivitesi Tayini	49
4.3. Enzim Saflaştırılması.....	50

4.3.1. FPLC Analizi.....	50
4.3.2. Saflaştırılan Enzimin Protein Miktarı ve Aktivite Tayini	52
4.3.3. MSOX Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi	53
4.3.3.1. pH Etkisi.....	53
4.3.3.2. Sıcaklık Etkisi.....	54
4.3.3.3. Enzim Derişimi Etkisi	54
4.3.3.4. Substrat Derişimi Etkisi	55
4.3.4. MSOX' un V _{max} ve K _m Değerlerinin Belirlenmesi	56
4.4. SDS-PAGE Analizi.....	56
5. SONUÇ VE YORUM.....	58
KAYNAKLAR	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	DNA kontrollü protein (enzim) sentezi	4
Şekil 2.2.	Enzim katalizli bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerine etkisi	7
Şekil 2.3.	Enzim-Substrat bağlanması ve ürün oluşumu	7
Şekil 2.4.	Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	9
Şekil 2.5.	Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	9
Şekil 2.6.	pH' ın reaksiyon hızına etkisi	10
Şekil 2.7.	Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi	11
Şekil 2.8.	Michaelis-Menten grafiğı	13
Şekil 2.9.	Lineweaver-Burk grafiğı	14
Şekil 2.10.	FMN ve FAD' ın yapısı	15
Şekil 2.11.	SOX-Sarkozin kompleksi X ışınları görünümü.....	16
Şekil 2.12.	MSOX' un FAD bölgesini içeren X ışınları görünümü.....	17
Şekil 2.13.	MSOX' un farklı substratlara etkisi.....	18
Şekil 2.14.	MSOX için önerilen farklı mekanizmalar	18
Şekil 2.15.	Kromatografik yöntemlerin dayandığı ayırma prensibi	23
Şekil 2.16.	Afinite kromatografisinin temel bileşenleri.....	25
Şekil 2.17.	Afinite Kromatografisi işlem basamakları ve örnek afinite kromatogramı	26
Şekil 2.18.	Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler	27
Şekil 2.19.	Kriyojel oluşum süreci.....	29
Şekil 2.20.	FPLC cihazı ana bileşenleri	34
Şekil 3.1.	MAH monomerinin açık yapısı	38
Şekil 3.2.	Bakteriler üremeden önce (a) ve sonra (b) besi yeri görünümü	41
Şekil 3.3.	Anadolu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı FPLC cihazı.....	41
Şekil 4.1.	MAH' ın FT-IR spektrumu.....	45

Şekil 4.2.	MAH-Sarkozin' in FT-IR spektrumu	46
Şekil 4.3.	Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in FT-IR spektrumu.....	46
Şekil 4.4.	Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in SEM görüntüleri.....	47
Şekil 4.5.	Bradford standart grafiği.....	49
Şekil 4.6.	MSOX aktivitesi sonucu oluşan pembe renkli ürün	50
Şekil 4.7.	Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojel kolonu ile MSOX saflaştırılmasına ait kromatogram	51
Şekil 4.8.	Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojel kolonuna yüklenen ticari MSOX enzimine ait kromatogram	51
Şekil 4.9.	Poli(HEMA) kriyojel kolonuna yüklenen MSOX enzimine ait kromatogram	52
Şekil 4.10.	Poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonuna yüklenen MSOX enzimine ait kromatogram.....	52
Şekil 4.11.	pH' ın enzim aktivitesi üzerine etkisi	53
Şekil 4.12.	Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	54
Şekil 4.13.	Enzim derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.14.	Substrat derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi	55
Şekil 4.15.	Lineweaver-Burk grafiği; V _{mak} ve K _m değerleri.....	56
Şekil 4.16.	SDS-PAGE görüntüsü	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. MSOX' un farklı substratlarla belirlenmiş k_{cat} ve K_m değerleri	17
Çizelge 2.2. Birbirine afinite gösteren bazı biyomoleküller	25
Çizelge 2.3. Polimerik jellerin türleri	28
Çizelge 2.4. Kriyojellerin diğer jellerden farkları.....	30
Çizelge 2.5. Biyolojik ve sentetik ligandların karşılaştırılması	33
Çizelge 4.1. MSOX' a ait saflaştırma tablosu.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
4-AAP	: 4- Aminoantipirin
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
HEMA	: Hidroksietilmetakrilat
HRP	: Horseradish (Yaban turbu) Peroksidaz
HTSOX	: Heterotetramerik Sarkozin Oksidaz
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michealis-Menten Sabiti
MAH	: Metakrilamidohistidin
MBA	: N'N, Metilenbisakrilamit
MSOX	: Monomerik Sarkozin Oksidaz
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	: Sodyum n-dodesil sülfat
TEMED	: Tetraetilmetilendiamin
U	: Enzim Ünitesi
V_{mak}	: Maksimum reaksiyon hızı

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji ve genetik gibi bilimleri, bunun yanında birçok mühendislik dalını bünyesinde toplayan geniş bir araştırma dalıdır. Uygulama alanları arasında insan sağlığına yönelik biyomoleküllerin sentezi, yapay organların geliştirilmesi, aşı üretimi ve insandaki genetik kusurların giderilmesi gibi çalışmalar yer almaktadır. Özellikle son yıllarda, enzimoloji alanında, insanı ölüme götüren kanser türü hastalıkların erken tanısına yönelik [1-3] yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Çeşitli bitkisel, hücreyel veya mikrobiyal kaynaklardan izole edilen hormon, antikor, protein, enzim gibi moleküller biyoteknolojik ilerlemeler sayesinde klinik uygulamalarda biyosensör, tanı kiti, ilaç ham maddesi ve terapi ajanı gibi uygun formlarda kullanılmaktadır [4-6].

Enzimler; protein yapısında kompleks biyomoleküller olup tıp, gıda, biyosensör gibi bir çok alanda yaygın kullanıma sahiptir. Mikrobiyal kaynaklardan pratik ve ekonomik yollarla saflaştırılabilmeleri uygulama alanlarını artırmaktadır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin çoğu bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, sarkozin oksidaz, α -amilaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir [7].

Sarkozin oksidaz (EC 1.5.3.1; sarkozin oksijen oksidoredüktaz) (SOX) sarkozinin oksidatif demetilasyonu sonucu; glisin, formaldehit ve hidrojen peroksit'e dönüşümü reaksiyonunu katalizleyen bir flavoenzimdir [8]. Etki ettiği substrat; sarkozin (N-metilglisin), memelilerde glisin N-metiltransferaz enzimi ile glisinden yola çıkılarak veya glisin betainin oksidasyonu sonucu oluşur. Sarkozin, birçok bakteri türü için karbon ve azot kaynağı, hayvanlarda ise kreatin metabolizması sonucu idrarla atılan son üründür. Şizofreni, bazı beyin hastalıkları ve sarkozin eksikliği nedeniyle doğuştan gelen bir takım bozukluklar direk olarak sarkozin metabolizmasıyla ilgilidir. Sağlıklı bir insan kanında olması gereken sarkozin miktarı 1.59 ± 1.08 mM kadardır [9]. Sarkozinin kanda veya idrarda bu değerlerin üzerine çıkması oldukça tehlikeli bir tür olan prostat kanserinin

habercisi olarak düşünülmektedir. Bu da sarkozini önemli bir prostat kanseri belirteci yapmaktadır [10].

SOX üzerine yapılan çalışmalar enzimin Monomerik Sarkozin Oksidaz (MSOX) ve Heterotetramerik Sarkozin Oksidaz (HSOX) olmak üzere iki türü olduğunu göstermektedir [11,12]. MSOX, endüstriyel ve tıbbi açıdan oldukça önemlidir. Prostat kanserli hastaların idrarında miktarı artan sarkozinin kantitatif olarak tayin edilmesinde görev alarak hastalığın erken tanısını sağlamakta, böylece insan sağlığını önemli ölçüde tehdit eden kanser hastalığı ile verilen savaşta galibiyete giden yolu aralamaktadır [13-16]. Ayrıca kreatinaz ve kreatininaz enzimleri ile birlikte önemli bir metabolit olan kreatinin enzimatik ölçümlerinin yapılmasında görev alarak [17-22] böbrek fonksiyonu bozukluklarının belirlenmesinde klinik bir tanı aracı olarak kullanılmaktadır [23,24].

Bu çalışmada *Bacillus cereus* bakteri suşlarından MSOX enziminin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen enzim sarkozin bağlı kriyojel kolonlar kullanılarak afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada saflaştırılan MSOX' un, Bradford yöntemi [25] ile protein miktarı belirlenmiş, enzimatik ölçümleri yapılarak aktivitesi tayin edilmiş, kinetik incelemeleri yapılmış ve SDS-PAGE analizi ile saflığı belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim, ilerleyen çalışmalarda biyosensör ve benzeri sistemlerde yer alarak sarkozin metabolizmasından kaynaklanan hastalıkların erken tanısında kullanılacaktır.

2. TEORİK BİLGİ

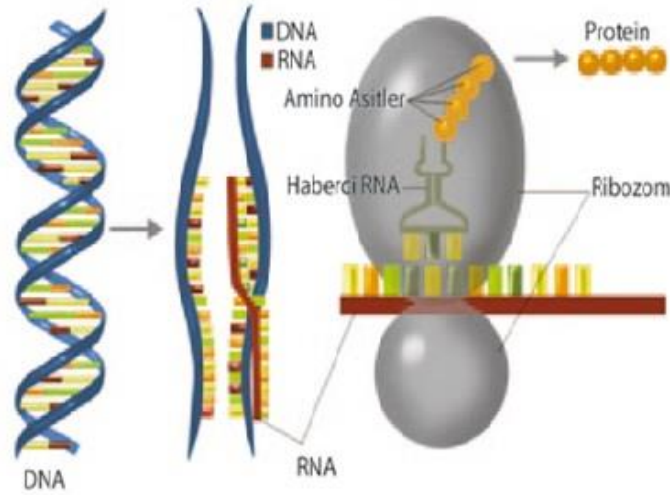
2.1. Enzimler

2.1.1. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Enzimler canlı hücrelerde sentezlenen ve vücudun canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan; büyüme, sindirim, solunum, kas kasılması gibi fiziksel ve kimyasal olayların oluşumuna katılan biyomoleküllerdir. Biyolojik katalizden sorumlu bu moleküllerin, oldukça eskiye dayanan ekmek yapımı, bira yapımı, alkol fermantasyonu gibi birçok işlemde kullanıldığı bilinmektedir.

Enzimler, yapısal olarak incelendiğinde proteinlerle aynı oldukları görülmüştür ve bu nedenle vücuttaki sentezleri de protein sentezinden farksızdır. Temel olarak amino asitlerin bir araya gelmesiyle oluşan proteinlerin sentezi, genetik bilgi deposu olan Deoksiribonükleik asit (DNA) kontrolünde iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada çift sarmal yapıya sahip olan DNA zinciri DNA helikaz enzimi ile fermuar gibi açılır ve bir zincir üzerindeki baz gruplarının dizilimine eşlenik olacak şekilde Ribonükleik asit (RNA) tek zinciri oluşturulur. RNA, DNA'da kayıtlı genetik bilginin hücre çekirdeğinden sitoplazmaya aktarılmasını sağlayan aracı bir moleküldür. Protein sentezinin ilk aşamasında, sitoplazmaya salgılanmak üzere farklı türde RNA molekülleri üretilir. Bunlar; ribozomların yapısında bulunan ribozomal RNA (rRNA), amino asitlerin ribozoma taşınmasında görevli olan taşıyıcı RNA (tRNA) ve sentezlenecek proteindeki amino asitlerin sıralanışını belirleyen haberci RNA (mRNA)'dır. RNA moleküllerinin sentezinin ardından amino asitler ribozoma taşınmak üzere tRNA ile birleşmeden hemen önce aktif hale gelir.

Sentezin ikinci aşamasında ise aktifleşen amino asitler sitoplazmada tRNA ile birleşerek ribozoma taşınır ve burada mRNA'nın üzerindeki baz gruplarıyla eşleşir. Bu baz grupları ile taşınan amino asitlere her basamakta yeni bir amino asidin bağlanmasıyla protein (enzim) sentezi tamamlanmış olur [26].



Şekil 2.1. DNA kontrollü protein (enzim) biyosentezi [27]

Sentezin ikinci aşamasında ise aktifleşen amino asitler sitoplazmada tRNA ile birleşerek ribozoma taşınır ve burada mRNA' nın üzerindeki baz gruplarıyla eşleşir. Bu baz grupları ile taşınan amino asitlere her basamakta yeni bir amino asidin bağlanmasıyla protein (enzim) sentezi tamamlanmış olur [26].

2.1.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler geleneksel olarak substratlarının sonuna “az” ekinin getirilmesiyle (örneğin; üreaz, amilaz, proteaz) ya da katalizledikleri reaksiyonu tanımlayacak şekilde (örneğin; glukoz oksidaz, laktat dehidrogenaz, adenilat siklaz) isimlendirilir. 1956 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komitesi (IUBMB-EC) enzimleri sistematik olarak adlandırma konusunda çalışmalar başlatmış ve her enzime dört rakamdan oluşan EC (Enzyme Commission) numarası vermiştir. EC numarasındaki dört rakam sırasıyla enzimin ana sınıfını, alt sınıfını, alt-alt sınıfını, alt-alt sınıfındaki seri numarasını ifade etmektedir ve bir enzimin EC kodu belirlendikten sonra geleneksel isminin kullanılmasında herhangi bir sakınca yoktur.

Enzimlerin sınıflandırılmasında ise ilk adım 1958 yılında Malcolm Dixon ile Ewin Webb tarafından atılmış ve yaptıkları çalışma IUBMB tarafından desteklenerek geliştirilmiştir. Buna göre; enzimler katalizledikleri reaksiyon türünü ifade eden altı ana sınıfta toplanmaktadır. Bu gruplar aşağıda verilmiştir;

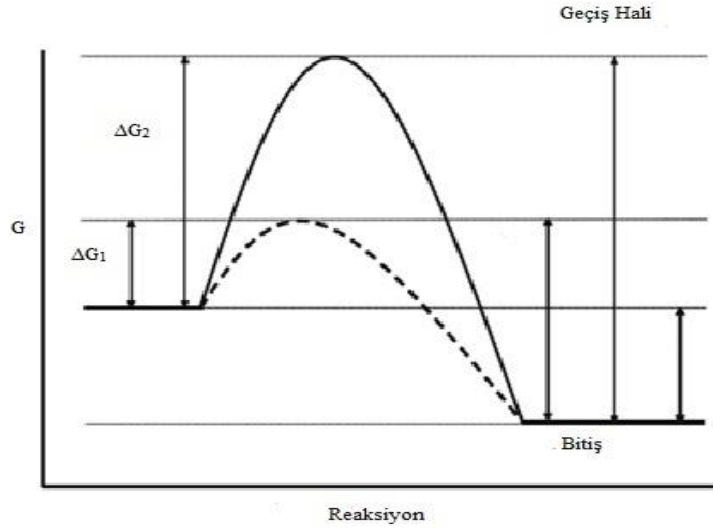
- 1. Oksidoredüktazlar:** Bu sınıfta toplanan enzimler substratlar arasında elektron veya hidrojen transferini sağlayarak oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Oksidasyon olayının gerçekleştiği her tepkimede redaksiyon da gerçekleşeceğinden oksidoredüktazlar olarak adlandırılırlar. Geleneksel olarak verici (donör) molekül-dehidrogenaz, sistematik olarak ise alıcı oksidoredüktaz şeklinde adlandırılırken aldıkları EC kodu EC 1.1.1 ile başlamakta ve enzimin seri numarasına göre devam etmektedir.
- 2. Transferazlar:** Alıcı ve verici olarak davranan iki substrat arasında $-CH_2$; $CH-OH$, $CH-NH_2$, $NADH_2-NADPH_2$ gibi belirli grupların transferini sağlayan enzimler bu sınıfta toplanmaktadır.
- 3. Hidrolazlar:** Hidrolazlar, C-O, C-N, C-C, fosforik anhidrat ve bazı diğer kimyasal bağların hidrolitik olarak kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Hidroliz olayında, bir grubun alıcı olarak davranan su (H_2O) molekülüne transfer olduğu bilindiğinden bu enzimlerin transferazlar olarak isimlendirilmesi de düşünülebilir. Ancak su molekülünün alıcı olarak davrandığı tepkimelerin keşfi daha eskilere dayandığından bu enzimler daha çok hidrolazlar olarak adlandırılmaktadır.
- 4. Liyazlar:** Bu sınıftaki enzimler moleküllerdeki C-C, C-O, C-N gibi bağların hidroliz veya oksidasyon yoluyla değil eliminasyon yoluyla yıkımını katalizlerler. Tek bir substrata etki ettiklerinde bir grubun yapıdan ayrılmasıyla çift bağların veya halkaların elimine edilmesini veya çift bağlara bazı grupların ilave edilmesini sağlarlar.
- 5. İzomerazlar:** İzomerazlar bir moleküldeki yapısal ve geometrik değişimleri katalizleyen enzimlerdir. Katalizledikleri izomerasyon türlerine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz ya da sikloizomeraz şeklinde adlandırılabilirler. Bazı durumlarda molekül içi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleseler de hem alıcı hem de verici aynı molekül olduğundan oksidoredüktaz yerine izomeraz olarak adlandırılırlar.
- 6. Ligazlar:** Bu sınıftaki enzimler, ATP (Adenozintrifosfat) veya benzeri bir trifosfat molekülündeki difosfat bağlarının hidrolizini katalizleyerek iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlar [28].

2.1.3. Enzimlerin Spesifikliği ve Etki Mekanizması

Enzimler de proteinler gibi primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıya sahiptir. Tersiyer yapılarını kazandıklarında, enzimleri kimyasal katalizörlerden farklı kılan aktif bölgeleri oluşmuş olur. Enzimler aktif bölgeleri sayesinde substrat olarak adlandırılan maddelere karşı spesifik bağlanma davranışı gösterirler. Yalnızca tek bir maddeye spesifik davranabildikleri gibi belirli bir madde grubuna karşı da afinite gösterebilirler. Bu nedenle enzimlerin spesifikliği bir kaç farklı başlık altında açıklanabilir. Bunlar;

- 1. Mutlak Spesifiklik:** Enzim yalnızca tek bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalizler.
- 2. Grup Spesifikliği:** Enzim bir molekülde bulunan fosfat, metil ve amino gibi fonksiyonel grupların her birine etki eder.
- 3. Bağ Spesifikliği:** Enzim bir moleküldeki fonksiyonel gruplar arasında bulunan bazı kimyasal bağlara (örneğin; proteinlerdeki peptid bağı, karbonhidratlardaki glikozid bağı) etki eder.
- 4. Stereokimyasal Spesifiklik:** Enzim yalnızca bir molekülün sterik ve optik izomerleri (örneğin; glukozun D veya L formu) üzerinde etkilidir [29].

Enzimlerin etki mekanizması ise “Geçiş Durumu Teorisi” temel alınarak açıklanabilir. Geçiş Durumu Teorisine göre moleküllerin çarpışması sonucu gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda; uygun çarpışmaların hemen sonrasında geçiş hali adı verilen oldukça kararsız bir kompleks meydana gelir. Bu kompleksin sahip olduğu potansiyel enerji geçiş hali süresince artarak reaksiyona giren moleküller ve oluşması beklenen ürünler arasında bir enerji bariyeri oluşturur. Reaksiyonun ürün oluşumu ile sonuçlanması için, reaktantların bu bariyeri aşacak enerjiye sahip çarpışmalar yapması gerekmektedir. Kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için aşılması gereken bu enerji engeli aktivasyon enerjisi olarak adlandırılır. Aktivasyon enerjisinin eşiği ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu eşiği aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır.



Şekil 2.2. Enzim katalizli bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerine etkisi; G serbest enerjiyi, sürekli çizgi katalizörsüz ilerleyen bir reaksiyonu, kesikli çizgi ise enzim katalizli bir reaksiyonu ifade etmektedir. ΔG_1 katalizörsüz reaksiyonun, ΔG_2 enzimatik reaksiyonun aşması gereken enerji bariyeridir [30].

Enzimler aktif bölgeleri sayesinde substrata bağlanarak anlık enzim-substrat kompleksi oluştururlar ve bunun sonucunda substrat konformasyonal değişime uğrayarak yapısını bozar. Böylece reaktantların ürünlere dönüşmesi için aşmaları gereken enerji eşiği düşerken, reaksiyon da hızlanmış olur. Enzim katalizi sayesinde hızlı bir şekilde ürüne dönüşen substratdan sonra enzim-substrat kompleksi de enzim-ürün kompleksine dönüşür ve enzimin kompleksten ayrılmasıyla ürün serbestleşir [31].



Şekil 2.3. Enzim-Substrat bağlanması ve ürün oluşumu [31]

Enzimler kimyasal reaksiyonlardan hiçbir şekilde harcanmadan ve bozulmadan çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilirler. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^{-3} - 10^{-8} kere daha hızlı ilerler. Tipik olarak her enzim molekülü saniyede 100-1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir.

2.1.4. Enzim Aktivitesi

Enzimlerin katalizör olarak etkinliğinin belirlenebilmesi için bir çözeltideki toplam miktarları yerine ürüne dönüştürdükleri substrat miktarının ölçülmesi gerekir. Optimum reaksiyon koşullarında, birim zamanda, substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı enzim aktivitesi olarak tanımlanır.

2.1.4.1. Enzim Aktivite Birimleri

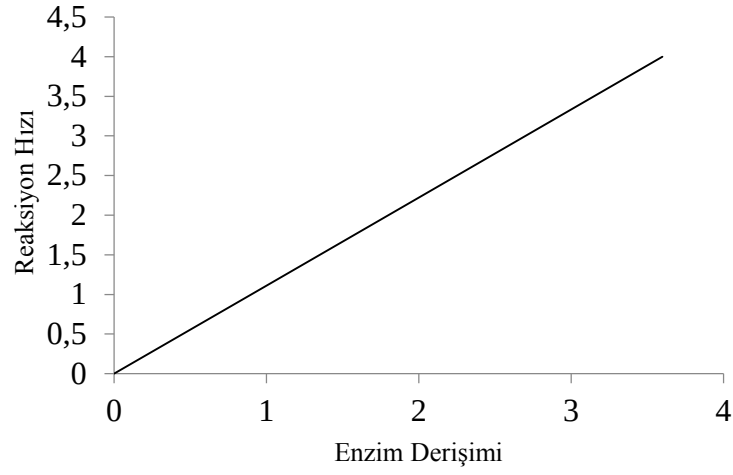
- a) Enzim Ünitesi (U):** Oda koşullarında, bir dakikada, 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarını ifade eder.
- b) Katal:** Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından belirlenen ve oldukça büyük değerleri ifade eden katal; bir saniyede 1 mol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.
- c) Spesifik Aktivite:** Enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanır ve 1 mg protein başına düşen enzim aktivitesi olarak tanımlanır.
- d) Turnover Sayısı (Moleküler Aktivite):** Optimum koşullarda, bir saniyede bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısıdır [32].

2.1.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen başlıca etmenler enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH ve inhibitörlerdir.

2.1.5.1. Enzim Derişimi

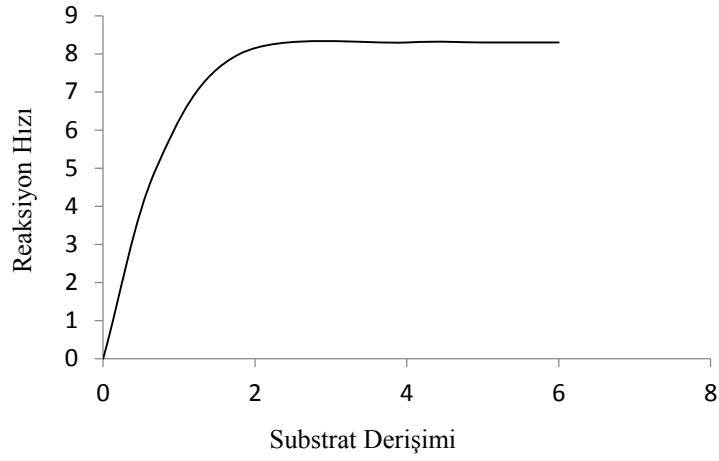
Enzim katalizli kimyasal reaksiyonların hızı reaksiyon belirli bir noktaya gelene kadar enzim miktarı ile doğru orantılı olarak artar. Ancak ortamdaki substrat tükendiğinde ürüne dönüştürülecek herhangi bir madde olmadığından enzim konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın reaksiyon sabit bir hızla devam eder.



şekil 2.4. Enzim derişiminin reaksiyonun hızına etkisi

2.1.5.2. Substrat Derişimi

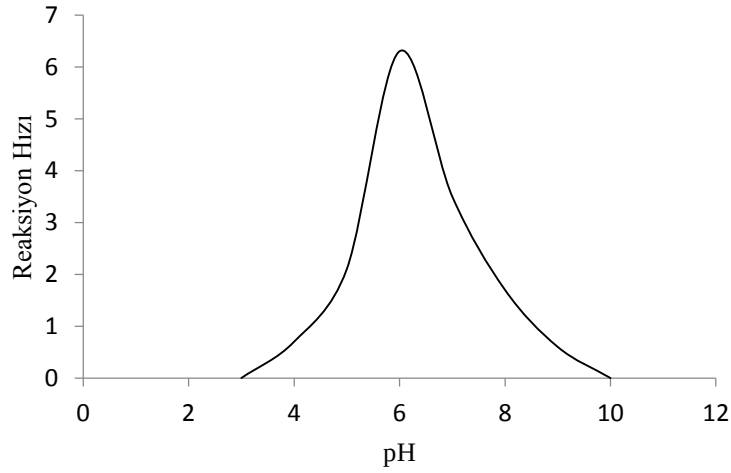
Enzim miktarı sabit tutularak substrat miktarının artırılması reaksiyonun önce belirgin bir şekilde hızlanmasını sağlar. Ancak enzimin aktif bölgeleri ortamdaki substratla doygun hale geldiğinde enzim ulaşabileceğı maksimum hıza (V_{mak}) ulaşır ve bu noktadan sonra reaksiyon sabit bir hızla devam eder.



şekil 2.5. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

2.1.5.3. pH

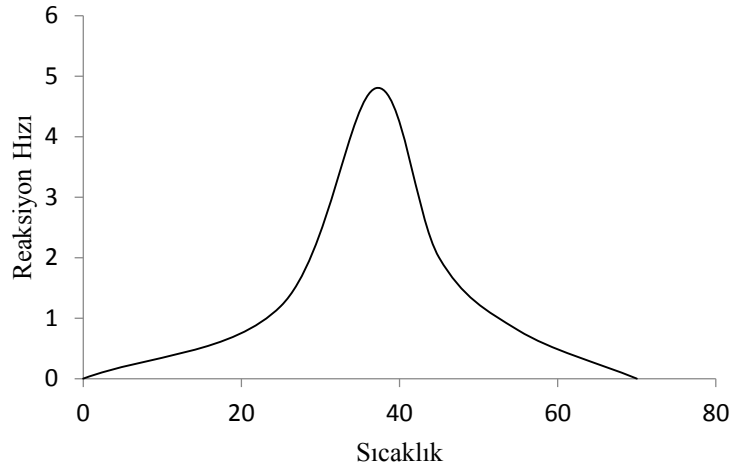
Enzimler protein yapısında maddeler olduklarından sahip oldukları amin ve karboksil grupları ortamın pH' ına göre farklı iyonlaşma dereceleri gösterir ve bu da enzimin yapısında değişikliklere neden olur. Enzimler genel olarak pH 5-9 arasında iyi çalışsalar da her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir pH değeri vardır. Bu değer o enzim için optimum pH' dır. Optimum değer altındaki veya üstündeki pH dereceleri protein yapısından dolayı enzimde denatürasyona neden olarak enzim aktivitesini azaltabilir veya tamamen durdurabilir.



Şekil 2.6. pH' ın reaksiyon hızına etkisi

2.1.5.4. Sıcaklık

Her kimyasal reaksiyonda olduğu gibi enzim katalizli reaksiyonlarda da sıcaklığın artması moleküller arasındaki etkin çarpışma sayısını artıracığından reaksiyonun da hızlanmasını sağlar. Ancak enzimlerin protein yapısında olması yüksek sıcaklık değerlerinde iç denatürasyona uğramalarına neden olduğundan reaksiyon hızında da azalma gözlenir. Her enzimin maksimum verimle çalıştığı belirli bir sıcaklık değeri vardır ve bu değer o enzim için optimum sıcaklıktır.



Şekil 2.7. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

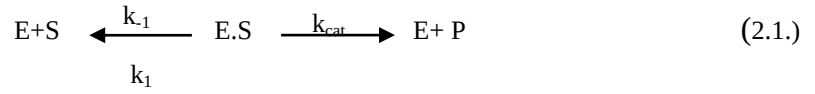
2.1.5.5. İnhibitörler

Enzimlerin aktivitesini azaltan veya tamamen durduran maddelere inhibitör, gerçekleşen olaya ise inhibisyon denir. Enzim inhibisyonu tersinir ve tersinmez olmak üzere iki şekilde meydana gelir. İnhibitör enzime kovalent bağlar ile bağlanmışsa enzim geri kazanılamaz ve geri dönüşümsüz (tersinmez) inhibisyon gerçekleşir. Geri dönüşümlü (tersinir) inhibisyonda ise inhibitör enzime tersinir bağlarla bağlanır ve böylece enzim tekrar serbest kalabilir. Tersinir inhibisyon; a) Yarışmalı İnhibisyon b) Yarışmasız İnhibisyon c) Yarı yarışmalı İnhibisyon olmak üzere üçe ayrılır. İnhibitör yapısal olarak substrata benziyorsa substratla yarışarak enzimin aktif bölgesine bağlanmaya çalışabilir. Bu durumda kompetitif (yarışmalı) inhibisyon gerçekleşir. İnhibitörün aktif bölge dışında herhangi bir yere bağlanarak, enzimin substrat ile reaksiyona girmesini engellediği durumlarda yarı yarışmalı inhibisyon ve inhibitörün enzim substrat ve kompleksine bağlanarak enzimin hızını azalttığı reaksiyonlarda yarışmasız inhibisyon meydana gelir.

2.1.5.6. Enzim Kinetiği

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aynı yoldan daha hızlı bir şekilde ilerlemesini sağlamaktadır. Bir enzimin aktifliğinin ölçüsü ve enzim aktivitesini etkileyen parametreler sayısal olarak kinetik çalışmalarla ifade edilmektedir.

Enzim kinetiği alanındaki ilk çalışmalar 1902 yılında Victor Henri, 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten isimli araştırmacılar tarafından yapılmıştır [33]. Michaelis ve Menten' in geliştirdiği teori enzimlerin bir reaksiyonu nasıl hızlandığı ile ilgili olmayıp, enzim ve substrat arasında ürün oluşumundan önce gerçekleşen enzim-substrat kompleksinin (E.S) kinetik mekanizmasını açıklamaktadır.



Denklem 2.1' de verilen enzim katalizli reaksiyonda k_1 ve k_{-1} ifadeleri sırasıyla ileri ve geri yönde ilerleyen tepkimelerin hız sabitleridir. k_{cat} ise reaksiyonun katalitik hız sabitini ifade etmektedir. Michaelis-Menten' e göre tek substratlı bir enzimatik reaksiyonda enzim (E) ve substrat (S) bir araya gelerek geçiş ürünü olan enzim-substrat kompleksini (E.S) oluşturur. Bu kompleks hem substrat ve serbest enzim hem de ürün oluşumu yönünde ilerleyebilir. Ancak geri yöndeki (substrat ve serbest enzim oluşumu yönü) tepkimenin hızı ihmal edilebilecek kadar düşüktür. Sistem dengeye geldiğinde ise kısa bir süre E.S derişimi sabit iken enzim, substrat ve ürün derişimlerinde değışiklikler meydana gelir. E.S kompleksinin oluşum ve yıkım hızlarının eşit olduğu bu denge durumuna sabit durum denir ve bu halde ölçülen reaksiyon başlangıç hızı enzimin aktivitesini belirlemeye yardımcı olur. Michaelis ve Menten bu başlangıç durum hızını belirlemeye yönelik bir eşitlik (Denklem 2.2) türetmişlerdir [34].

$$V = \frac{V_{mak}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.2.)$$

Reaksiyon ortamındaki enzim molekülleri substrat molekülleri ile tamamen doygun hale gelene kadar substrat miktarıyla reaksiyon hızı doğru orantılı olarak değışir. Enzim molekülleri bağlayabilecekleri maksimum miktarda substratı bağladığında reaksiyon da maksimum hıza (V_{mak}) erişir. Denklem 2.2' de yer alan K_m ise enzimin aktif bölgesinin yarısını doyuran başka bir deyişle V_{mak} ' ın

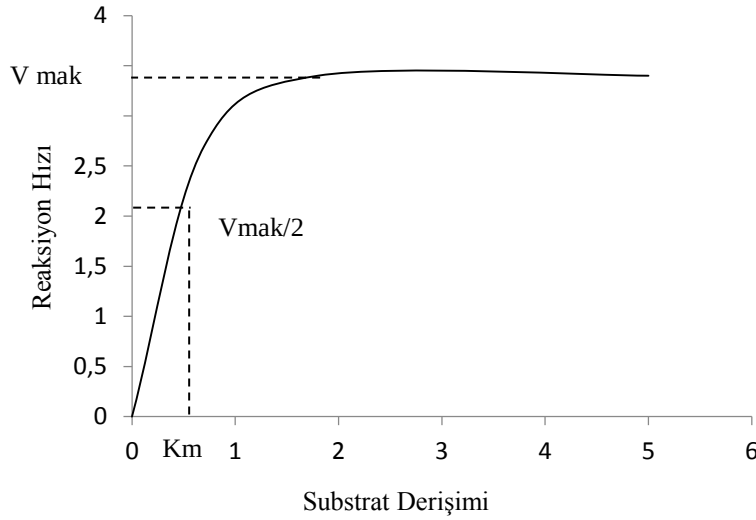
yarısına eşit olan reaksiyon hızına karşılık gelen substrat derişimini ifade eden bir sabittir [33]. Buna göre;

$$[S]=K_m \text{ ise} \quad (2.3.)$$

$$V_o=V_{\text{mak}}/2' \text{ dir.} \quad (2.4.)$$

K_m , her enzimin her substratı için sabit olan ve enzimin substratına karşı ilgisi hakkında bilgi veren bir değerdir. Bir enzim ve substratı için belirlenen K_m değeri ne kadar düşük ise o enzim o substrata o kadar fazla afinite gösterir. Başka bir deyişle, enzimler birden fazla madde ile reaksiyona girebilecek özellikte moleküllerdir ve enzim bunlardan hangisi ile maksimum aktivite hızına erişiyorsa o madde için ilgili enzimin doğal substratı olduğu söylenebilir [35].

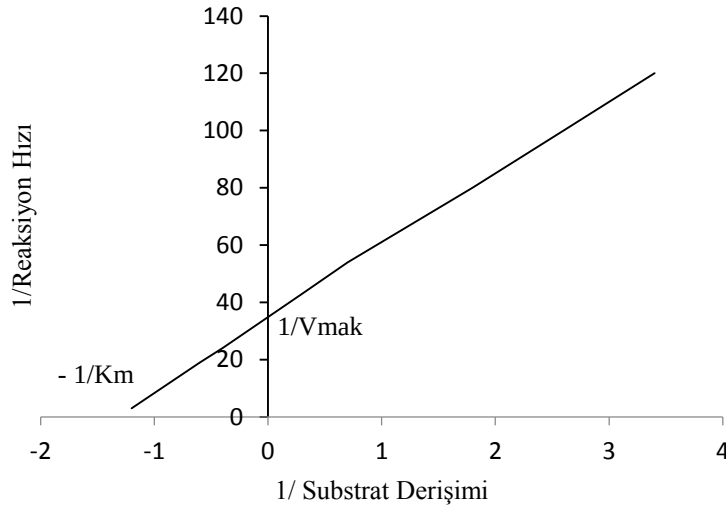
Michaelis-Menten eşitliğine göre substrat derişimi ve reaksiyon hızı doğru orantılı bir artış göstermektedir. Substrat konsantrasyonuna karşı çizilen reaksiyon hızı grafiğı artan hiperbolik eğri şeklindedir.



Şekil 2.8. Michaelis-Menten grafiğı

1934 yılında Lineweaver ve Burk Michaelis-Menten eğrisini düzenleyip, grafiğı $[S]^{-1}$ ve V^{-1} değerleriyle çizerek doğrusal hale getirmişlerdir [36]. Böylece enzim çalışmalarında V_{mak} ve K_m değerlerinin daha doğru bir şekilde belirlenmesini kolaylaştırmışlardır. Lineweaver-Burk grafiğine göre, doğrunun y

(ordinat) eksenini kestiği nokta V_{mak}^{-1} ; x (apsis) eksenini kestiği nokta ise negatif bölgede olduğundan $-K_m^{-1}$ dir.



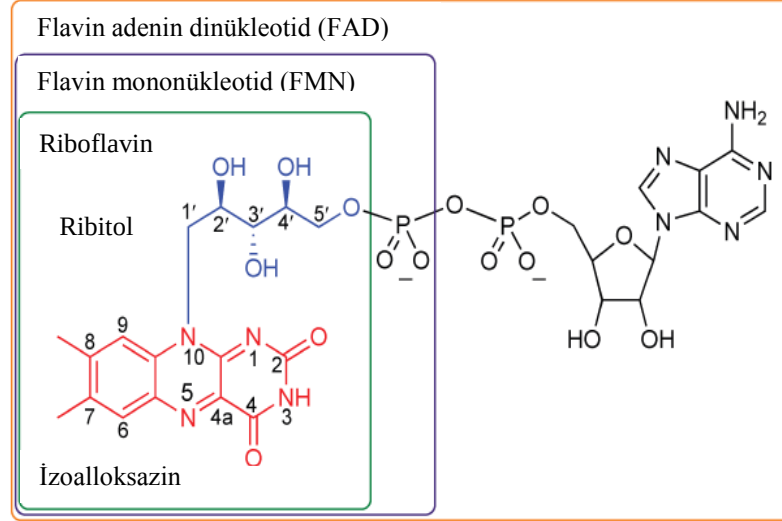
Şekil 2.9. Lineweaver-Burk grafiği

2.1.6. Flavoenzimler

Flavinler, riboflavin (B2 vitamini) türevleri olan ve birçok kimyasal dönüşümde bulunarak biyolojik tepkimelerde, enerji üretiminde, DNA onarımında, vücutta doğal ürünlerin sentezinde ve yıkımında görev alan moleküllerdir. Tüm bu olaylarda aktif olarak görev alan iki flavin türü vardır. Bunlar; yapılarında enzimatik olarak aktif davranmalarını sağlayan izoalloksazin halkası bulunduran Flavin adenin dinükleotid (FAD) ve Flavin mononükleotid (FMN)' dir. Heterosiklik izoalloksazin halkasının 10 numaralı azot atomu riboz şekerinin indirgenmesiyle oluşan ribitole bağlanır. Riboflavinin ribitol gurubunun ester bağıyla 5' C atomuna bağlanması sonucu FMN oluşur. FAD ise yapısında FMN ve FMN'ye bağlı adenilat (AMP) bulundurur [37].

Flavoenzimler yapılarında kofaktör olarak FMN veya FAD taşıyan enzimlerdir. Bu enzimler substratlarını, sulu ortamda bulunan moleküler oksijenin H_2O_2 ' ye indirgenmesiyle yükseltgeyerek ürüne dönüştürür. Enzimin aktivitesinden sorumlu flavin molekülü (FMN, FAD) apoenzime kovalent ya da non-kovalent olarak bağlanabilir. FAD' ın enzime kovalent olarak bağlanması enzimin polipeptid zincirindeki histidin (His), sistin (Cys) veya tirozin (Tyr)

bölgeleri üzerinden otokatalitik olarak gerçekleşir. Enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlı bulunan FAD, enzimin yalın formuna (apoenzim hali) göre daha kararlı hale gelmesini sağlar. Ayrıca kovalent bağlı FAD, flavin modifikasyonu ve inaktivasyonunu engelleyerek görev aldığı tepkimelerde elektron transferi ile oksijen redüksiyonunun daha kolay gerçekleşmesine yardımcı olur [38].



Şekil 2.10. FMN ve FAD' ın yapısı [37]

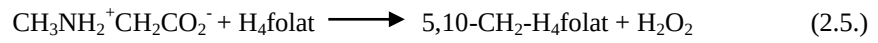
Flavoenzimler yüksek seçicilikleri, kontrol edilebilirlikleri ve kimyasal tepkimelerdeki verimlilikleri nedeniyle başta biyokataliz olmak üzere birçok süreçte aktif görev alan moleküllerdir.

2.1.7. Sarkozin Oksidaz (E.C. 1.5.3.1.)

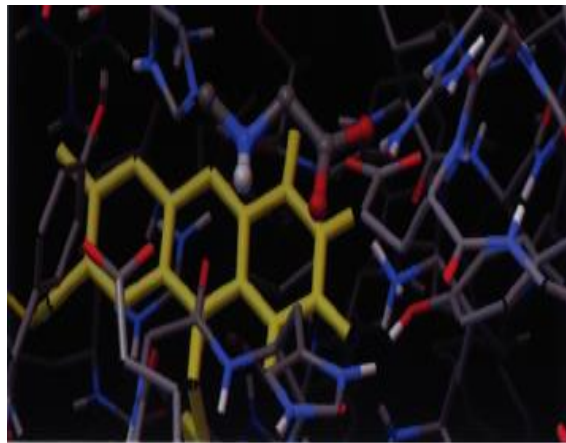
Flavoenzim ailesinin amin oksidaz sınıfından olan SOX, sarkozinin oksidatif demetilasyonu sonucu glisin, formaldehit ve H_2O_2 ' ye yıkılımını katalizleyen enzimdir. *Bacillus* [39,40], *Corynebacterium* [41], *Arthrobacter* [42], *Streptomyces* [43], *Pseudomonas* [44] gibi mikroorganizmalardan, karbon ve azot kaynağı olarak sarkozinin ilave edildiği besi ortamında üretilen bu intraselüler enzimin MSOX ve HTSOX olmak üzere iki türü bulunmaktadır.

HTSOX *Corynebacterium*, *Arthrobacter* türü mikroorganizmalardan elde edilir ve α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı alt birimden meydana gelir. Yapısında

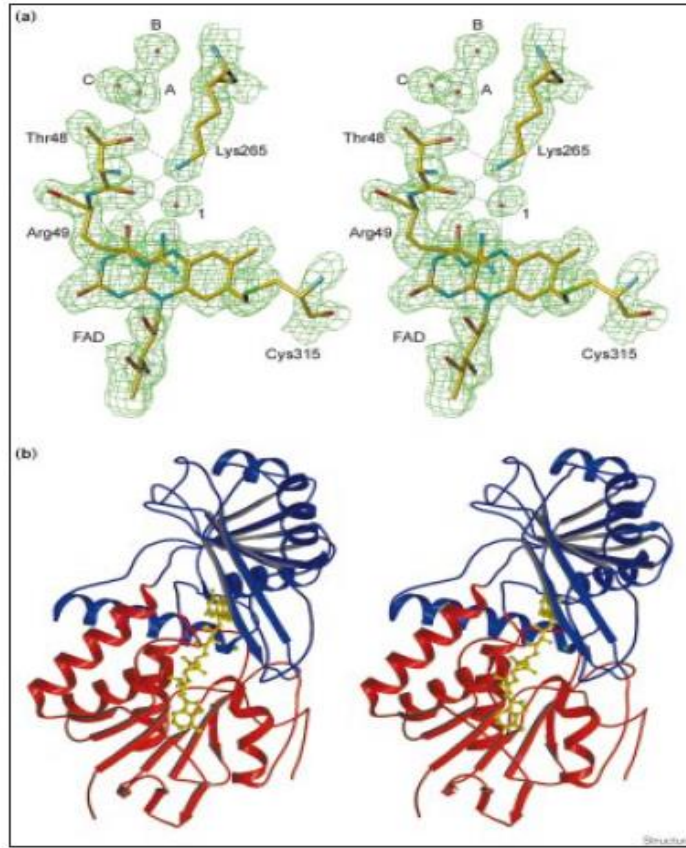
hem kovalent hem de non-kovalent FAD bulundurur. Ancak MSOX dahil bütün amin-oksidad sınıfı enzimlerden farklı olarak HTSOX' ın tek kofaktörü FAD değildir. Enzimin α alt birimi Nikotinamid adenin (NAD^+) bağlar fakat bu koenzim katalitik olarak inaktiftir, β alt birimi MSOX' dır ve yapısındaki kovalent bağlı FAD ile sarkozinden glisin, formaldehit, H_2O_2 oluşumunu katalizler, diğer iki alt birim γ ve δ ise 5,10- $\text{CH}_2\text{-H}_4$ folat (hidrojen tetrahidrofolat) varlığında sarkozinden glisin ve formaldehit yerine 5,10- CH_2 -tetrahidrofolat açığa çıkarır [45].



Klinik uygulamalarda sarkozin ve kreatin metabolizmasından kaynaklanan hastalıkların tanısında genellikle enzimin diğer türü olan MSOX ile çalışılmaktadır. MSOX yapısında yaklaşık 386 peptid zinciri bulunduran 43,8 kDa ağırlığında bir enzimdir [46]. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* türü bakteriler zengin MSOX kaynaklarıdır. Diğer amin-oksidad sınıfı enzimler gibi MSOX da aktif bölgesinde FAD koenzimini bulundurur. FAD molekülü enzime 1 mol enzim için 1 mol FAD olacak şekilde 8 α -S-sistinil uçları (Cys 315 ucu) üzerinden kovalent olarak bağlı bulunur. FAD enzimin aktif bölgesinde bulunur ve enzimin katalitik aktivitesinden sorumludur. MSOX' ın FAD bölgesini içeren X-ray görüntüleri Şekil 2.11 ve Şekil 2.12' de verilmiştir.



Şekil 2.11. SOX-Sarkozin kompleksi X ışınları görünümü; sarı renkli çubuklar FAD bölgesini, beyaz çubuklar hidrojen atomlarını, gri çubuklar karbonu, mavi çubuklar azotu ve kırmızılar oksijen atomunu ifade etmektedir [47].

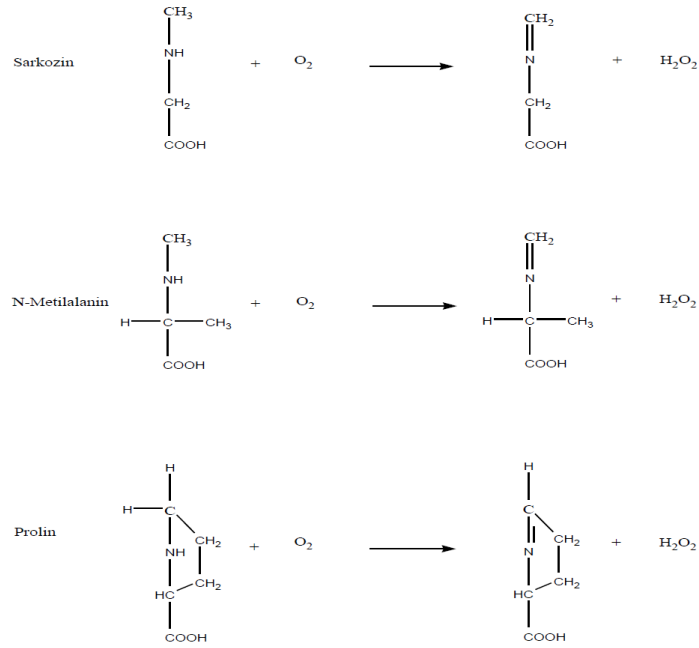


Şekil 2.12. MSOX' un FAD bölgesini içeren X ışınları görünümü [46]; a) FAD' ın apoenzime bağlandığı uçlar, b) mavi: katalitik zincir, kırmızı: FAD' la bağlanan bölge, sarı: FAD

MSOX, sarkozin (N-metil glisin), N-metil alanin, L-prolin gibi ikincil amino asitlere etki eder. Enzimin aktif bölgesinde bulunan FAD tersinir indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları ile substrattan demetilasyon ürünlerinin ve H_2O_2 ' nin oluşmasını sağlar. MSOX' un etki ettiği her bir substrata karşı ilgisi farklı ölçüdedir ve enzim en yüksek afinitiyi sarkozine karşı göstermektedir [48].

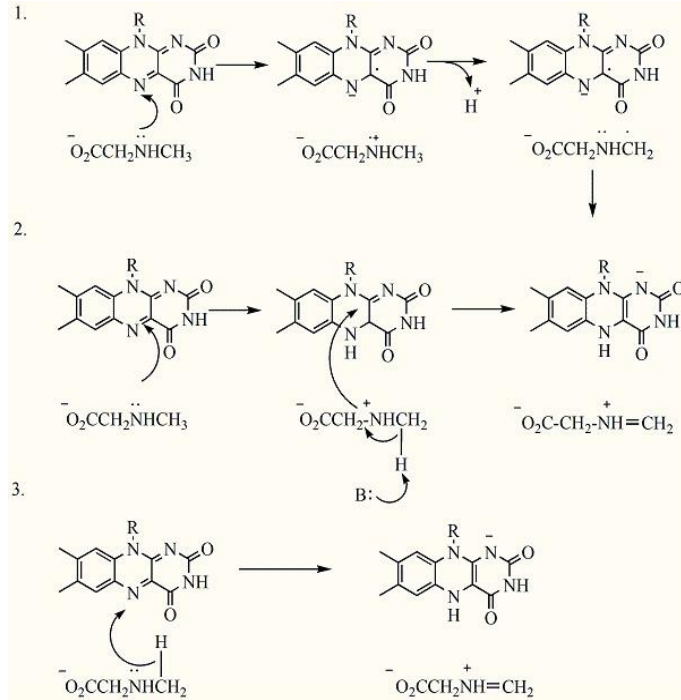
Tablo 2.1. MSOX' un farklı substratlarla belirlenmiş k_{cat} ve K_m değerleri [48]

Substrat	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Sarkozin	2730 ± 32	4.5 ± 0.1	610
N-metil alanin	710 ± 10	3.3 ± 0.2	220
Prolin	25 ± 09	130 ± 10	0.19



Şekil 2.13. MSOX' un farklı substratlara etkisi

MSOX' un sarkozine katalitik olarak etkisini açıklamak için birkaç farklı mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmalar Şekil 2.14' de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. MSOX için önerilen farklı mekanizmalar [49]

Önerilen 1 numaralı mekanizmada, sarkozinin N atomundan flavin halkasına tek bir elektron transferi gerçekleşir ve amonyum radikali oluşur. Oluşan amonyum radikali bir proton kaybederek karbonik radikali oluşturur ve bu yapıdan flavin halkasına bir elektronun daha transfer edilmesiyle reaksiyon tamamlanır. 2 numaralı mekanizmada amin gurubu azotundan flavin halkasına nükleofilik elektron saldırısı gerçekleşir ve flavine bağlı bir ara basamak ürünü oluşur. Elektron almaya hazırlanan flavin, aminin metil gurubundan bir protonun çıkışına izin verirken, bir önceki basamakta oluşan ara ürün flavin halkasından kopar. Böylece flavin indirgenirken substrat yükseltgenmiş olur ve reaksiyon sonlanır. 3. mekanizmada ise sarkozinden flavin halkasının azotuna hidrür transferinin olmasıyla reaksiyon gerçekleşir [49].

MSOX' un prostat kanseri belirteci olan sarkozinin oksidatif yıkımını katalizlediği bilinmektedir. Reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 ' nin horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile miktarının belirlenmesiyle sarkozinin de kantitatif tayini yapılabilir. Bu durum, MSOX enzimini sarkozin miktarının belirlenmesinde ve buna bağlı olarak prostat kanseri tanısında kullanılabilecek önemli bir enzim haline getirmektedir.

2.2. Enzim Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri

Enzimler ticari olarak satın alınabildikleri gibi, laboratuvar koşullarında da daha fazla miktarda ve ucuz yollarla elde edilebilirler. Bunun için enzimin seçilen bir kaynaktan izolasyonu, ön deriştirilmesi ve saflaştırılması gerekmektedir. Doğal kaynaklardan (bitki, alg, mikroorganizma) izole edilen enzim ve proteinler beraberinde istenmeyen kirlilikleri, küçük molekülleri ve başka proteinleri de taşıdıkları için bunlardan arındırılmak üzere bazı ön işlemlere tabi tutulur. Bu işlemlerdeki amaç ve prensip ilgilenilen enzimi veya istenmeyen molekülleri ham ekstraktdan uzaklaştırarak çalışılacak enzimi daha temiz ve konsantre şekilde elde etmektir. Bunun için çöktürme, filtrasyon, diyaliz, kolon kromatografisi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler aynı zamanda enzimi saflaştırmak için de uygulanabilir. Spesifik bir saflaştırma sağlamak için ise afinite kromatografisi ve türlerine başvurulmalıdır.

2.2.1. Kaynak Seçimi

Enzimin izole edileceği kaynağın ucuz ve kolay yollarla temin edilebilmesi oldukça önemlidir. Bunun dışında seçilen kaynak ilgilenilen enzimi bol miktarda bulundurmali, izolasyon koşullarına (dondurma, ısıtma, karıştırma, parçalama) dayanıklı olmalı, çabuk tükenmemeli ve çevreye herhangi bir şekilde zarar vermemelidir. Hayvansal kaynaklar karmaşık yapılarla çalışılması gerektiğinden ve bazı durumlarda bilim etiğini ihlal ettiğinden çok tercih edilmemektedir. Bitkiler bu açıdan daha avantajlı olsa da kullanılmadan önce ekilmesi, büyütülmesi gibi vakit alan süreçlere ihtiyaç vardır. Bu sebepler göz önüne alındığında, mikroorganizmalar enzim izolasyonu için tercih edilebilecek ideal kaynaklardır [50-52].

Bacillus “Bacillaceae” familyasından gelen ve yaklaşık elli çeşit türü barındıran bir bakteri grubudur. En iyi bilinen türleri *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus circulans*’ dır. Bu türlerin çoğu doğada; suda, çürüyen organik materyallerde, toz ve toprakta, yeşil sebzelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bakteri grubunun *Bacillus cereus* gibi patojenik özellik gösteren türleri olsa da insan veya hayvanda herhangi bir enfeksiyona neden olmayan birçok türü de mevcuttur. *Bacillus*’ lar kültüre kolayca alınabilmeleri, besin isteklerinin az olması, yapılarında heterojenlik olmaması ve hemen hemen bütün enzimleri üretebilmeleri gibi özelliklerinden dolayı endüstride de enzim üretim çalışmalarında çokça tercih edilmektedir [53].

2.2.2. Çöktürme

Ham ekstraktta bulunan proteinlerin bulunduğu ortamdan ayrılması için kullanılan genel yöntemlerden biri çöktürmedir. Bu işlemin dayandığı prensip; organik çözücülerin, organik polimerlerin, nötral tuzların ve ortam pH’ ının etkisiyle protein moleküllerinin çözünürlüğünün değiştirilmesidir.

Etanol ve aseton gibi polar organik çözücüler, sulu çözeltilerde su ile yer değiştirdiklerinde çözeltinin dielektrik sabitini ve buna bağlı olarak da çözme kabiliyetini düşürürler. Böylece proteinlerin çökmesini sağlarlar. Organik

çözücüler özellikle serum proteinlerinin ayrılmasında yaygın olarak kullanılan çöktürücü ajanlardır.

Organik polimerlerin proteinlerin çöktürülmesi üzerine etkisi de organik çözücülerinkine benzerdir. Çöktürücü olarak en yaygın kullanıma sahip polimer kolay ve ucuz yollarla elde edilebilme, toksik ve yanıcı olmama ayrıca nötr olma özellikleri nedeniyle molekül ağırlığı 6000-20000 arasında değişen Polietilenglikol (PEG)' dir. Proteinlerin çöktürülmesi için genellikle düşük molekül ağırlıklı PEG' ler tercih edilir.

Proteinlerin çöktürülmesi için kullanılan bir başka kolay ve ucuz yöntem ise ortamın pH' ının değiştirilmesidir. Her proteinin negatif ve pozitif yük sayısının eşit olduğu bir pH değeri vardır ve bu değer izoelektrik nokta olarak adlandırılır. Proteinler izoelektrik noktalarına ulaştıklarında nötr bir hal alırlar, çözünürlükleri azalır ve çökerler. Bu yöntem de serum proteinlerinin ayrıştırılmasında ve insülin saflaştırılmasında kullanılmaktadır.

Proteinlerin su içerisinde oldukça düşük olan çözünürlükleri ortama amonyum sülfat gibi nötral bir tuzun ilave edilmesiyle artırılabilir. Az miktarda tuz ilavesi proteinlerin yüzeyinde veya iç kısımlarında bulunan hidrofobik grupların su ile etkileşimini artırır. Bu olaya salting in denir. Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde ise proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik grupların etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır. Bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler denatüre olmaksızın çöker. Bu olay ise tuzla çöktürme anlamına gelen “salting out” şeklinde adlandırılır. Salting out (tuzla çöktürme) işlemi iyonik şiddet gittikçe artacak şekilde farklı derişimlerde tuz çözeltilerinin hazırlanmasıyla gradientli olarak uygulanır. Bunun amacı ham ekstrakt içinde bulunan proteinlerin farklı tuz derişimleri etkisiyle birbirinden ayrılmasıdır [54].

2.2.3. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

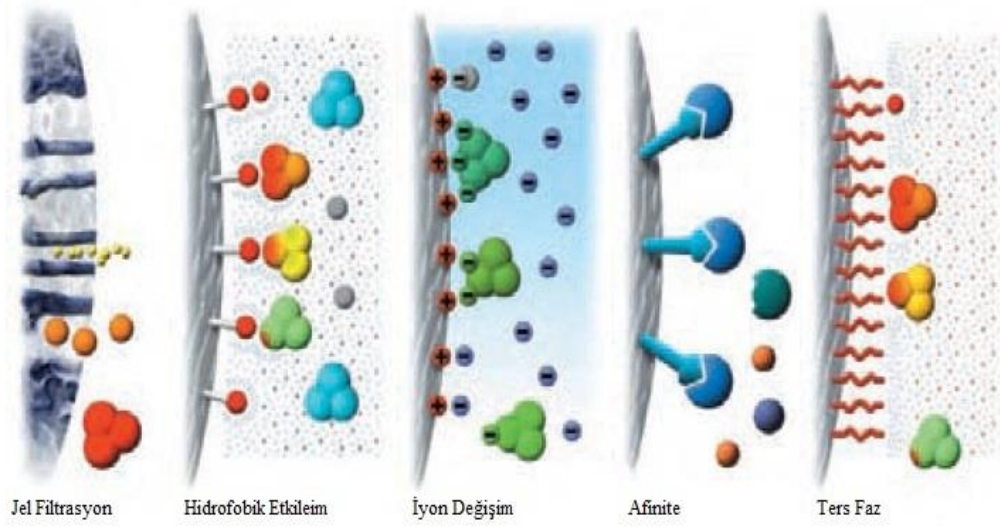
Proteinleri düşük molekül ağırlıklı tuzlardan (NaCl) ve küçük moleküllerden (glukoz) arındırmak için genellikle diyaliz yöntemi kullanılır.

Diyaliz yönteminde, yarı geçirgen bir membran içerisine yerleştirilen protein çözeltisindeki küçük moleküller, ultramikroskopik gözeneklerden membranın dışında bulunan su veya uygun tampon çözeltiye difüze olurken, proteinler bu gözeneklerden geçememektedir. Yarı geçirgen zar sayesinde istenmeyen moleküller proteinlerden uzaklaşırken dış tarafta bulunan sulu çözeltideki moleküller de membrandan geçerek proteinlere bağlanır. Bu moleküller daha sonra çeşitli kurutma yöntemleri ile uzaklaştırılır. Ortam suyunun veya tamponunun belirli aralıklarla değiştirilmesiyle küçük moleküller protein çözeltisinden ayrılmış olur.

Ultrafiltrasyon da aynı prensiple çalışan bir ayırma ve ön deriştirme yöntemidir. Diyalizden farklı olarak bu yöntemde, küçük moleküllerin uzaklaştırılması için santrifüj kuvveti gerekmektedir. Ultrafiltrasyon diyalize göre daha hızlı ve verimli bir ayırım sağlamaktadır. Ucuz, kolay ve verimli bir yöntemdir. Ağırlıkları 1 kilodalton-300 kilodalton (kDa) arasında değişen molekülleri ayırmak için geliştirilen ultrafiltrasyon tüpleri biyokimyasal çalışmalarda oldukça tercih edilmektedir [54].

2.2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi moleküllerin bir sabit ve hareketli faz arasında fiziksel etkileşimlere dayanarak ayrılması prensibiyle çalışan ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Birçok kimyasal alanda olduğu gibi enzim saflaştırma çalışmalarında da özellikle kolon kromatografisine sıklıkla başvurulmaktadır. Jel filtrasyon dışındaki kolon kromatografisi yöntemleri adsorpsiyon mekanizmasına göre ayırım yapmaktadır. Şekil 2.15’ de farklı kromatografi türlerinin ayırma mekanizmaları görsel olarak verilmiştir.



Şekil 2.15. Kromatografik yöntemlerin dayandığı ayırma prensibi [55]

Uygun deneysel koşullar sağlandığında (sıcaklık, pH, tampon bileşimi vb.) bütün adsorpsiyon kromatografisi türleri proteinleri bulundukları ekstrakt içinde deriştirme ve yüksek verimle saflaştırma işlevine sahiptir. Ancak verimli bir saflaştırma için genellikle birden fazla kromatografik yöntem bir arada kullanılır. Bunlardan en yaygın ve geleneksel olanı İyon Değişim Kromatografisidir. Saflaştırma çalışmalarının % 67' sinde birkaç basamak halinde uygulanan bu yöntemde numunedeki uygun yük ve büyüklükteki iyonlar hareketli fazın iyonlarıyla yarışarak sabit faza bağlanır ve daha sonra ortamın iyonik şiddetinin değiştirilmesiyle kolondan elüe edilir. En çok tercih edilen kolon malzemeleri (sabit faz materyalleri) DEAE (dietilaminoetil) anyon değiştirici ve CM (karboksimetil) katyon değiştirici reçinelerdir. Jel filtrasyon kromatografisi de molekülleri boyutlarına ve şekillerine göre ayıran, % 60 oranında tercih edilen ikinci bir kromatografi türüdür. Sabit faz olarak, gözenekli yapıda malzemelerin kullanıldığı (agaroza, dekstran, poliakrilamid gibi maddeler veya bunların belirli oranlarda karışımları) bu kromatografi türünde, protein örneği kolona yüklendikten sonra küçük proteinler uygun boyut ve şekildeki porlara yerleşerek ilerlerken büyük proteinler gözeneklerle etkileşmeden, kolonu hızlıca terk eder; böylece ayırım sağlanmış olur. Jel filtrasyon kromatografisi genellikle saflaştırmanın başlangıç basamağı olarak uygulansa da bazen birkaç kez tekrarlanması gerekebilir. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi bu iki yöneme

göre daha az (çalışmaların % 18' inde) tercih edilmektedir. Bu yöntem ters faz Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile benzerlik göstermektedir. Numune, apolar bir sabit faz üzerinden polar bir çözücü ile geçirilir. Hidrofobik karakterdeki moleküller, Van Der Waals etkileşimleri ile sabit fazın yüzeyindeki hidrofobik kısımlara tutunur. Daha sonra bağlanan moleküller hareketli fazın polaritesinin düşürülmesiyle kolondan sökülerek toplanır. Spesifik bir ayırma ve verimli bir saflaştırma sağlayan afinite kromatografisi ise pahalı bir yöntem olması gerekçesiyle son yıllara kadar çok tercih edilmemiş olsa da biyoteknoloji alanında yapılan çalışmalar (alternatif afinite ligandlarının ve destek materyallerinin geliştirilmesi) afinite metodlarının da yaygınlaşmasını sağlamıştır. Afinite kromatografisi saflaştırma kat sayısını 2-10 kata kadar artıran başarılı bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir [56,57].

2.2.5. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi [58] biyomoleküllerin uygun ligandlarla adsorpsiyon mekanizmasına göre ayrılmasını sağlayan bir sıvı kromatografi türüdür. Yüksek seçicilik, spesifik ayırma, verimli saflaştırma gibi avantajları sayesinde birçok biyolojik molekülün saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Afinite sözcüğü Latince ilgi duyma anlamına gelen “affinitas” kelimesinden türemiştir. Afinite kromatografisinin çalışma prensibi de biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, karbonhidratlar vb.) moleküler tanıma ve tanınma özelliğine dayanmaktadır. Bu yöntemle göre bir hedef molekül (saflaştırılacak madde) diğer katı bir destek üzerine immobilize edilmiş bağlayıcı molekül olmak üzere iki madde birbirini yapısal olarak tanımakta ve bunun sonucu olarak da elektrostatik veya hidrofobik etkileşimlerle, Van Der Waals kuvvetleriyle ya da Hidrojen bağları ile tersinir olarak bir araya gelmektedir. Bu yöntem ile yapılan saflaştırma çalışmalarında Tablo 2.2' de verilen biyomoleküllerden ve bu moleküller arasındaki biyolojik etkileşimlerden faydalanılmaktadır.

Tablo 2.2. Birbirine afinite gösteren bazı biyomoleküller

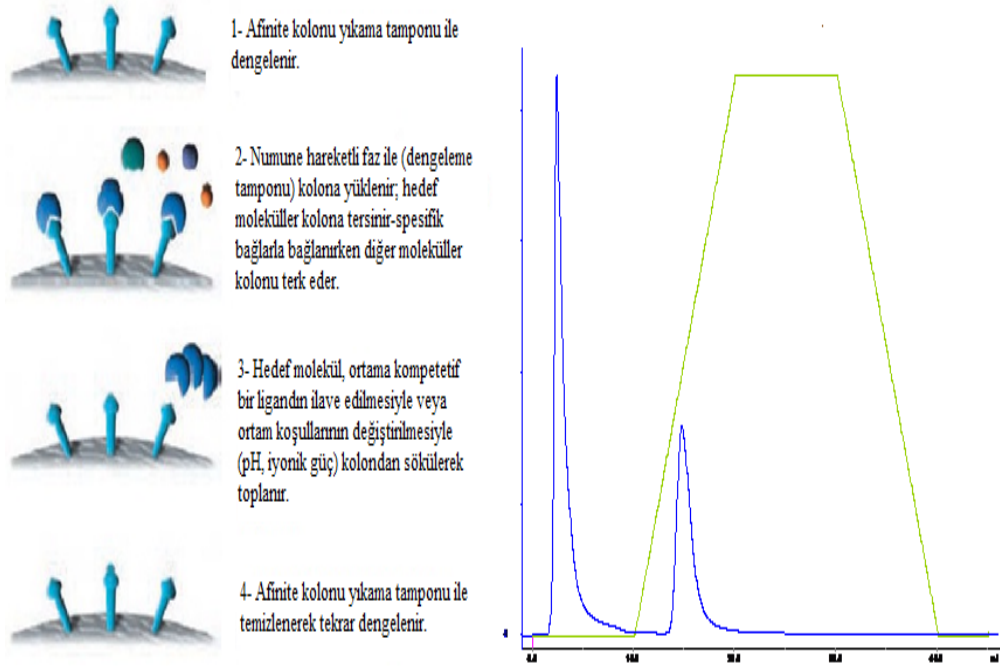
Enzim	Substrat, İnhibitör, Kofaktör
Antibadi	Antijen, virüs
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Nükleik asit	Nükleik asit polimeraz, histonlar, tamamlayıcı zincirler
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein
Glutation	GST (Glutation-S-Transferaz) füzyon protein

Afiniteye dayalı kromatografik saflaştırma sistemlerinde hedef molekülün bağlandığı madde ligand, ligandın üzerine tutturulduğu katı materyal de matriks olarak adlandırılır. Matriks kimyasal ve fiziksel olarak inert olmalı yani ligand ile herhangi bir etkileşime veya reaksiyona girmemelidir. Ligand ise saflaştırılacak moleküle spesifik davranmalı ve zayıf tersinir bağlarla bağlanmalıdır. Ligand ve hedef molekülün sterik engeller gibi bazı etkiler nedeniyle bağlanamadığı durumlarda uzatıcı kollar kullanılabilir. Uzatıcı kollar, ligand ve hedef molekülün bağlanmasını kolaylaştıran genellikle düz zincirli hidrokarbon türevleri olan küçük moleküllerdir [59].



Şekil 2.16. Afinite kromatografisinin temel bileşenleri [59]

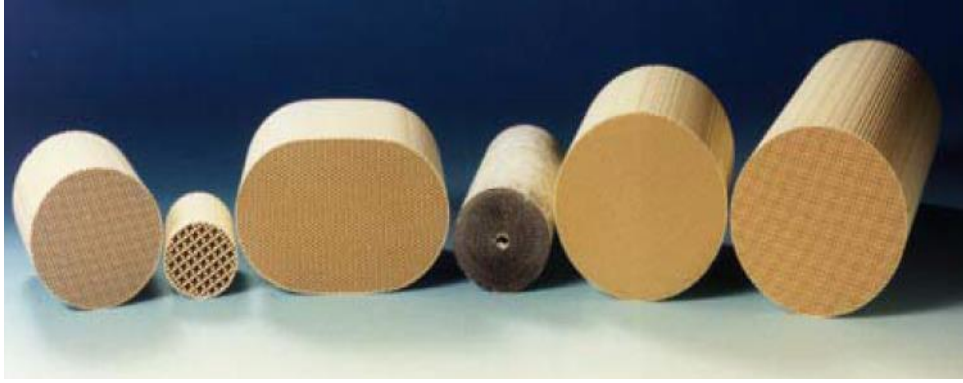
Afinite kromatografisi pratik olarak uygulandığında saflaştırma işleminin üç basamakta tamamlandığı görülür. İlk aşamada hedef molekülü içeren numune kolonun (bir matrikse immobilize edilmiş ligandan oluşan sabit faz) üzerinden uygun bir dengeleme (yıkama) tamponu ile geçirilir. İkinci aşamada hedef molekül sabit faza spesifik ve tersinir olarak bağlanırken ligand ile bağlanmayan türler kolonu terk eder. Son olarak hedef molekülün kolondan elüsyonu gerçekleştirilir. Bunun için afinite ortamına ya kompetitif başka bir ligand ilave edilir ya da hareketli fazın iyonik şiddeti, pH' ı ya da polaritesi değiştirilir [60]. Böylece kolondan desorbe edilen biyomolekül saf bir şekilde elde edilmiş olur. Aşağıda bu aşamalar ve sonucunda elde edilen örnek bir afinite kromatogramı verilmiştir [61].



Şekil 2.17. Afinite Kromatografisi işlem basamakları ve örnek afinite kromatogramı; Anadolu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı' nda yapılan MSOX enziminin saflaştırılmasına yönelik kromatogramda görülen ilk pik hedef molekülü içeren numune ortamında bulunan ve kolona tutunmadan çıkan türleri ifade etmektedir; elüsyon başladıktan sonra (yeşil çizgi sistemden geçmekte olan elüsyon çözeltisinin yüzde derişimini ifade etmektedir) alınan ikinci pik ise kolona tersinir olarak tutunan hedef moleküle aittir.

2.2.6. Afinite Kromatografisi Monolitik Destek Malzemeleri ve Kriyojeller

Monolit kelimesi eski yunan dilinde taş, kaya parçası anlamına gelmektedir. Birçok endüstriyel alanda yer alan monolitler afinite kromatografisinde de destek materyali olarak kullanılan malzemelerdir. Monolitlerde kütle aktarımına karşı direnç ve basınç düşmesi oldukça az olduğundan bu maddelerin kullanıldığı kolonlarda kütle aktarımı oldukça kolay gerçekleşir ve bu da kromatografik saflaştırma sürecinin verimini artırır. Kullanım alanına ve amacına uygun olacak şekilde disk, çubuk veya kolon olarak hazırlanan monolitler genellikle doğal polimerler ya da sentetik veya organik malzemelerdir.



Şekil 2.18. Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler

Afinite kromatografisinde saflaştırılmak istenen biyomolekölün denatüre edilmeden kolondan toplanması sistemin verimini etkileyen en önemli parametredir. Bu nedenle çalışılan sistemde meydana gelebilecek geri basınç oldukça düşük olmalıdır. Bunu sağlamak için de afinite kromatografisinde destek materyali olarak makro gözeneklere sahip monolitlerden hazırlanan kolonlar kullanılır. Büyük gözenekli, boşluklu yapıya sahip malzemeler sıvının kolon boyunca kolay bir şekilde akışına izin verir ve böylece kromatografik ayırmanın elüsyon gücü artar, verim yükselir. Afinite kromatografisinde kullanılan monolitler aşağıda özetlenmiştir. Bunlar;

2.2.6.1. Organik Monolitik Polimerler

1990' lı yıllarda Svec ve Frechet tarafından geliştirilen bu polimerler [62] büyük gözeneklere sahip, yüksek oranda çapraz bağ içeren malzemelerdir. Uygun

monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı varlığında basit polimerleştirme teknikleriyle oldukça kolay bir şekilde elde edilebilirler. Bu malzemeleri sentezlemek için metakrilat ve benzeri birçok monomer kullanılabilmekte ve bu monomerlerin çeşitliliği organik monolitik polimerleri endüstriyel alanda da kullanılabilir hale getirmektedir.

2.2.6.2. Silika İçeren Monolitik Kolonlar

Silika tabanlı monolitik kolonlar sol-jel yöntemiyle, organo-silikonyum malzemelerin polikondenzasyonu ve kısmi hidrolizi sonucu elde edilebilir. Bu malzemeler de organik polimerler gibi kolay kütle aktarımına izin verecek yüksek poroziteye sahiptir. 90' lı yıllarda geliştirilen silika kolonlar ilk olarak 2000 yılında ChromotinTM ismiyle ticari olarak sentezlenmiş ve kimya çalışmalarında yer almaya başlamıştır [63].

2.2.6.3. Polimerik Jeller

Modern polimer kimyası açısından bakıldığında jeller, makromoleküllerin oluşturduğu, kararlı bağlarla sabitlenmiş, üç boyutlu ağlardan oluşan, polimer immobilize edilmiş çözücü sistemlerdir. Jeller, fiziksel ve kimyasal olmak üzere temelde iki grupta toplanır, ancak polimerleşmeye neden olan etkilere göre farklı alt sınıflara ayrılmıştır. Kemotropik jeller, iyonotropik jeller ve termotropik jeller Tablo 2.3' de belirtilen polimerik jellerin bazılarıdır.

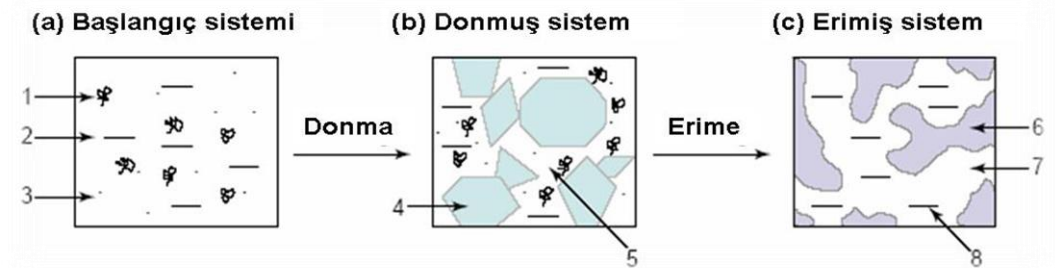
Tablo 2.3. Polimerik jellerin türleri

Polimerik Jelin Türü	Polimerleşme Türü	Örnekler
Kemotropik	Molekül içi kimyasal bağlar	Poliakrilamid, polistiren, dekstran, poliakrilat
İyonotropik	İyon-değişim reaksiyonları	Alginat-polilizin, kitosan-polifosfat
Termotropik	Sıcaklığın etkisi	Agaroz, jelatin, hidroksietil selüloz
Fizikotropik	Soğutma etkisi	
Kriyotropik	Dondurma etkisi	Poli HEMA Poli EDGMA

Polimerik jeller, kromatografi çalışlarında kolon malzemesi, elektrostatik çalışmalarda matriks, enzim immobilizasyonları için de taşıyıcı malzemeler olarak kullanılmaktadır. Biyokimyasal uygulamaların vazgeçilmezi olan bu jellerin son yıllarda en popüler olanı kriyojellerdir [64].

2.2.6.4. Kriyojeller

“Kriyo, (cryo)” kelimesi eski yunancada “soğuk, buz” anlamlarına gelmektedir. Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen birbirine bağlantılı büyük gözeneklere sahip jel matrikslerdir. Birbiri ile bağlantılı makro gözenekler ve süngerimsi morfoloji kriyojellerin en tipik özelliğidir. Bu özellikleri sayesinde difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesine ve nano veya mikro partiküllerin kütle transferine katkıda bulunurlar. Başka bir deyişle, gözenekli ve elastik yapılarıyla kromatografik sistemlerde kolon malzemesi olarak kullanıma uygundurlar, çünkü hareketli fazın kolondan geçmesiyle kolonda oluşacak geri basıncı elimine ederler. Kriyojellerin sahip olduğu bu avantaj özellikle biyomoleküllerin bozunmadan ve denatüre olmadan, kromatografik tekniklerle, verimli bir şekilde saflaştırılmasına imkan tanır. Kriyojeller geliştirildikleri tarihten günümüze dek enzim, protein, hormon, karbonhidrat [65-71], nükleik asit [72] ve antibadi [73-75] gibi moleküllerin tanınmasında ve saflaştırılmasında, ayrıca enzim immobilizasyonu [76-78] uygulamalarında yaygın kullanıma sahip olmuştur.



Şekil 2.19. Kriyojel oluşum süreci; 1) makromoleküller, 2) çözücü, 3) düşük moleküllü maddeler, 4) donmuş çözücünün polikristalleri, 5) donmamış sıvı mikrofaz, 6) kriyojelin polimerik çevresi, 7) makro gözenekler, 8) çözücü [79]

Kriyojeller Şekil 2.19’ da basamaklar halinde gösterilen kriyojelasyon süreciyle elde edilir. Kriyojelasyon, dondurma eritme şeklinde gerçekleşen bir işlemdir. Kriyojelasyon sırasında, jel oluşturacak ajanları içeren reaksiyon karışımı çözücünün kristallenme noktasının birkaç derece altındaki sıcaklıklarda dondurulur. Donmuş sistem, tek bir katı blok halinde görünmesine rağmen, aslında heterojendir ve donmuş çözücü kristalleri boyunca donmamış sıvı mikro fazı içerir. Jeli oluşturacak ajanların donmamış sıvı mikrofaz içerisinde konsantre hale gelmesiyle burada kriyokonsantrasyon oluşur. Kriyokonsantrasyon şu şekilde açıklanır: Donmamış sıvı mikro faz toplam başlangıç hacminin çok küçük bir kısmını oluşturur, jel başlatıcıların konsantrasyonu öylesine çok artar ki, bu durum jel oluşumunu tetikler. Donmuş çözücünün kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev görür ve eridiğinde, bulunduğu yerde çözücü ile dolu boşluklar, başka bir deyişle makro gözenekler bırakır. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey gerilimi ise gözeneklerin şeklini yuvarlar ve gözenek yüzeyini pürüzsüz hale getirir. Kriyojeller kullanım alanına ve amacına göre kolon veya disk şeklinde sentezlenebilir [79].

Kriyojeller oda sıcaklığında sentezlenen jellere göre bazı farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar Tablo 2.4’ de kısaca verilmiştir.

Tablo 2.4. Kriyojellerin diğer jellerden farkları

Oda Sıcaklığında Üretilen Jeller	Kriyojeller
Monofaz	Heterofaz
Transparan	Opak
Kırılgan	Süngerimsi
Çözücünün tümü polimerik ağa bağlı	Çözücü hem polimerik ağda hem de kapillerler içinde

Kriyojellerin su tutma kapasitesi (şişme davranışı), gözenek büyüklüğü, elastik yapısı gibi fiziksel özellikleri bazı etkenlere bağlı olarak farklılık gösterir.

Bu etkenler; dondurma rejimi, çapraz bağlayıcı oranı, başlangıç monomer konsantrasyonu olarak tanımlanabilir. Dondurma sıcaklığı ne kadar düşük olursa o kadar küçük boyutlu gözenekler meydana gelir. Daha küçük boyutlu kristaller oluşmasının nedeni düşük sıcaklıklarda küçük kristal oluşumunun birçok yerden başlamasıdır. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda, donmamış sıvı mikrofazın hacmi azalır ve böylece daha ince fakat daha yoğun gözenek duvarları oluşur. Dondurma sıcaklığı ne kadar yüksek ise, büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyüktür ve bunun sonucu olarak, daha geniş gözenekli kriyojeller hazırlanır. Ancak, yüksek dondurma sıcaklığı uygulanan kriyojelasyon rejimlerinde, çözeltinin donmama veya süper soğuk duruma gelme riski vardır. Bu yüzden, sıcaklık reaksiyon karışımını donduracak şekilde ayarlanmalıdır. Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmış ise, yani yapıdaki çapraz bağ oranı ne kadar az ise, kriyojelin suda şişme oranı o kadar fazladır. Polimerleştirmeden önce ortamda bulunan monomerin konsantrasyonu ne kadar yüksek ise daha yoğun ve kırılğan matriksler elde edilir, başlangıç konsantrasyonu azaltıldıkça matriksler daha elastik ve süngerimsi bir yapı göstermeye başlar [79].

Kriyojeller sahip oldukları çapraz bağlar sayesinde fiziksel açıdan dayanıklı, kimyasal açıdan da kararlıdır. Yapılarında bulunan geniş gözenekler ise kriyojelleri biyomoleküllerin ayrılmasında kullanışlı ve avantajlı hale getirmektedir. Bunun yanında kriyojellerin sahip olduğu süngerimsi, esnek yapı; buna bağlı olarak istenilen şekillerde sentezlenebilmeleri ve kolay modifiye edilebilmeleri bu maddeleri yalnız saflaştırma çalışmalarında değil; biyomedikal malzemelerin tasarlanmasında ve buna bağlı uygulamalarda da kullanışlı hale getirmektedir.

2.2.7. Afinite Kromatografisi Türleri ve Kullanılan Ligandların Özellikleri

Afinite kromatografisi spesifik ayırma, tek basamakta saflaştırma, yüksek verim ve geri kazanım gibi avantajlarının yanı sıra pahalı bir yöntem olması gerekçesiyle günümüze dek özellikle büyük ölçekli proseslerde ve endüstriyel alanda sınırlı kullanıma sahip olmuştur. Bu dezavantaja neden olan da bu

dezavantajın giderilmesini sağlayan da afinite kromatografisinin en önemli bileşeni olan ligandlardır.

Afinite ligandları biyolojik ve sentetik ligandlar olmak üzere iki grupta toplanmıştır. Biyolojik ligandlar canlı organizmalardan izole edilen protein, peptid, oligosakkarit, oligonükleotid gibi biyomoleküllerdir. Bu tür ligandlar biyoyoumlu olmakla birlikte spesifiteleri sayesinde hedef molekülün yüksek verimle saflaştırılmasını sağlamaktadır.

a) İmmunoafinite Kromatografisi (IAK): Afinite yöntemlerinin bir türü olan IAK’ de kullanılan ligandlar (antibadiler) biyolojik ligand sınıfına girmektedir. Özellikle serum ve plazma proteinleri ile ilgili uygulamalarda ve buna bağlı olarak klinik alanda tercih edilen bir yöntem olan IAK’ de [80-83] saflaştırma işlemi, biyolojik bir numuneden ayrılmak istenen antijenin katı bir desteğe immobilize edilmiş uygun antibadi ile mükemmel bir uyum sonucu bağlanması prensibine dayanmaktadır. Biyolojik ligandlar avantajlarına karşılık; zor ve pahalı yollarla sentezlendiklerinden, in vitro ortamda kararlı halde kalmaları oldukça zor olduğundan ve kusursuz bir bağlanma yapmalarına rağmen düşük bağlanma kapasitesine sahip olduklarından her durumda tercih edilmemektedir.

Sentetik ligandlar ise bu problemlerin giderilmesini sağlamaktadır. Bu tür ligandlar, pürin ve primidin türevleri gibi birçok doğal biyomolekülün yeniden sentezlenmesi veya modifikasyonu ile elde edilir. Bazı tekstil boyaları ve metal şelat iyonları afinite kromatografisinde en çok kullanılan sentetik ligandlara örnektir.

b) Boya Afinite Kromatografisi: Boya afinite kromatografisi olarak adlandırılan kromatografi türünde kullanılan ligandlar sentetik boyalardır. Bu konuda yapılan ilk çalışmada ligand olarak Sephadex G-200 materyali üzerine kovalent bağlarla immobilize edilmiş Cibacron Blue F3GA boyası kullanılmış ve mayadan piruvat kinaz enzimi saflaştırılmıştır [84]. Bu tür boyalar sentetik olmalarına rağmen protein ve enzimlerin substratlarının, kofaktörlerinin ya da bağlanmadan sorumlu bölgelerinin yapısını taklit ederek birçok enzim veya

protein ile etkileşebildiğinden afinite ligandları olarak tanımlanmıştır [85]. Ticari tekstil ürünleri olan bu boyalar suda çözünebilen moleküller olup, boyaya rengini veren kromofor gruplar bulundurmakla birlikte sahip oldukları triazin halkalarıyla yapısında –OH taşıyan agaroz, selüloz, poliakrilat gibi birçok matrikse kovalent olarak kolayca immobilize edilebilmektedir [86]. Boya ligandları ucuz ve kolay bulunabilme, kararlı olma ve afinite destek malzemelerine kolayca immobilize edilebilme gibi avantajları nedeniyle enzim ve protein saflaştırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [87-90].

c) İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (İMAK): İMAK’ da ligand olarak katı destek materyaline immobilize edilmiş metal iyonları kullanılır. Genellikle Lewis asidi olarak tanımlanan ve elektron çifti kabul eden Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(II) gibi metaller tercih edilir. Protein saflaştırma çalışmalarında da hedef biyomolekölün seçilen metal ligandına karşı gösterdiği afiniteden yararlanılır. Metal ligand katı desteğe iminodiasetik asit (IDA) gibi şelatlayıcı ajanlar yardımıyla tutturulur ve proteinin katı desteğe adsorpsiyonu protein yüzeyindeki elektron verici gruplar ile immobilize metal iyonu arasındaki koordinasyon oluşumuna dayanır. İMAK uygun metallerin makro gözenekli kriyojel destek malzemelerine immobilize edilmesiyle birçok protein ve enzim saflaştırma çalışmasında [91-94] başarılı bir afinite tekniği olarak kullanılmaktadır.

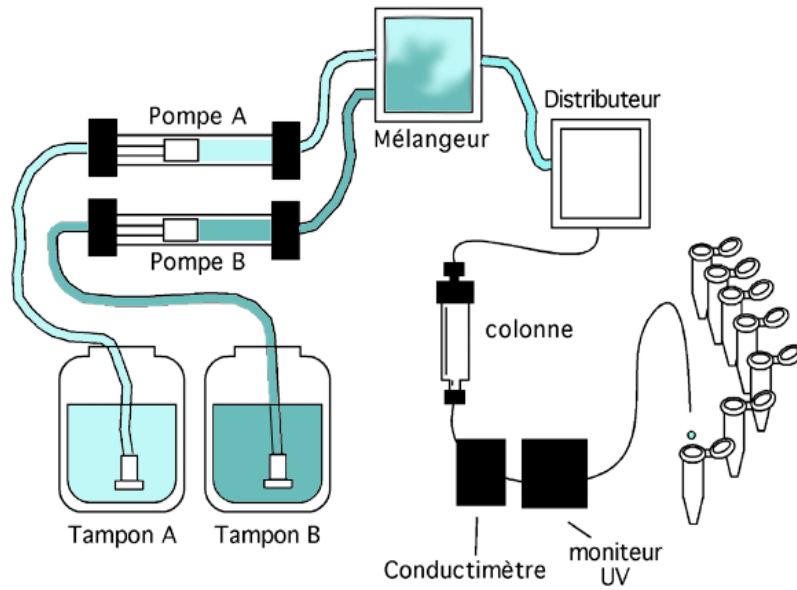
Sentetik ligandların ekonomik avantajlarına karşılık biyolojik ligandlara göre seçicilikleri daha düşüktür ve bazıları toksik etkiye sahiptir. Tablo 2.5’ de biyolojik ve sentetik afinite ligandları karşılaştırılmıştır [95].

Tablo 2.5. Biyolojik ve sentetik ligandların karşılaştırılması

Ligand Türü	Seçicilik	Kararlılık	Kapasite	Maliyet	Toksosite
Biyolojik	Çok yüksek	Orta-Düşük	Yüksek	Yüksek	Çok düşük
Sentetik	Orta	Yüksek	Orta-Düşük	Orta-Düşük	Orta

2.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)

FPLC, proteinlerin ayrıştırılması, saflaştırılması, nicel olarak belirlenmesi ve nitelendirilmesi, peptid vb. ayrımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla geliştirilmiş bir sıvı ve kolon kromatografisi modelidir. Özellikle membran proteinleri başta olmak üzere, proteinlerin tek bir adımda saflaştırılmasını sağlaması nedeni ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistemin temeli basit bir kromatografik ayırma dayanmaktadır. Saflaştırılmak istenen enzim veya protein, uygun bir hareketli faz ile (tampon çözelti), hazırlanan kolonun üzerinden geçirilir; kolona tutunmayan türler kolonu hemen terk ederken; kolona tersinir olarak tutunan numune elüsyon çözeltisi ile kolondan saf bir şekilde toplanır.



Şekil 2.20. FPLC cihazı ana bileşenleri

Şekil 2.20’ de görüldüğü gibi FPLC cihazı temel olarak; çözücü kabı, pompalar, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör, fraksiyon toplama ünitesi ve bir de veri kaydediciden (bilgisayar) oluşmaktadır. Çözücü kaplarında kolonu şartlandırma çözeltisiyle, tutunan numuneyi kolondan sökme amaçlı elüsyon çözeltisi bulunur. Pompalar bu çözeltileri cihaza verilen komuta bağlı olarak önce enjeksiyon

ünitesinden, ardından cihaza yüklenen numuneyi de alarak, belirli bir hızda kolondan geçirir. Kolonu sırayla terk eden türler dedektöre ulaşır ve belirli fraksiyonlarda örnek toplama ünitesindeki tüplerde toplanır. Bilgisayar ise dedektörden gelen sinyallere bağlı olarak oluşan piklerin kromatogram halinde görüntülenmesini sağlar.

Bir FPLC kromatogramında gözlenen ilk pik kolona tutunmadan kolonu terk eden türlere aittir. Bu türler şartlandırma çözeltisiyle birlikte kolondan ayrılır. Kolon malzemesine afinite, hidrofobik etkileşim, iyonik yük ve büyüklük gibi çeşitli etkenlerle ve zayıf bağlarla bağlanan hedef molekül ise, sistemden elüsyon çözeltisinin (uygulamaya göre değişir ancak enzim saflaştırma çalışmalarında genellikle 1 M NaCl içeren tampon çözelti kullanılır) geçirilmesiyle kolondan sökülür ve dedektöre ulaşır. Böylece kromatogramda bir pik daha oluşur ve bu pik cihaz ile tek basamakta saflaştırılan biyomoleküle aittir. Örnek bir FPLC kromatogramı Şekil 2.17’ de verilmiştir.

2.4. Afinite Kromatografisi ile Enzim Saflaştırmanın Önemi

Enzimler, günümüzde birçok hastalığın tanısında, tedavisinde ve bu hastalıklara yönelik ilaç sentezinde uygulama alanına sahip biyomoleküllerdir. Bu nedenle basit ve ekonomik yollarla elde edilebilmeleri oldukça önemlidir. Bitkisel, hayvansal veya bakteriyel kaynaklardan izolasyonu sağlanan enzimin yüksek konsantrasyonlarda saf bir şekilde elde edilebilmesi için çeşitli saflaştırma tekniklerine ihtiyaç vardır. Enzim saflaştırma uygulamalarında genel olarak kromatografik yöntemlere başvurulmaktadır. Çalışmanın amacına göre uygun kromatografik tekniği seçmek saflaştırma işleminin en önemli basamağıdır.

Öncelikle hedef enzime uygulanacak saflaştırma yöntemi yüksek verimle ve enzimin kararlılığını bozmadan çalışmalıdır. Bir başka önemli parametre ise yöntemin düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Seçilen teknikte kullanılacak saflaştırma bileşenleri tekrarlanabilir analizlere uygun tasarlanmalıdır ve çok düşük derişimlerde numunelerle dahi çalışılabilmelidir.

Afinite kromatografisi, biyomoleküllerin tek basamakta, spesifik ve verimli bir şekilde saflaştırılmasını sağlamaktadır. Temelinde pahalı olarak bilinen afinite kromatografisi saflaştırılacak enzimin afinite gösterdiği herhangi

bir molekülün (metal, boya, organik sentez molekülleri) ligand olarak kullanılmasıyla ucuz bir yöntem haline getirilebilmektedir. İyon değişim, jel filtrasyon gibi yük ve boyuta göre ayırım yapan kromatografik yöntemler ne kadar seçici olurlarsa olsunlar spesifik bir ayırmadan çok grup ayırma gerçekleştirmektedir. Bu nedenle, aynı numunede bulunan sarkozin oksidaz ve β -glukoz oksidaz gibi benzer yapı, yük ve boyuttaki iki enzimi bahsedilen yöntemlerle birbirinden ayırmak zor olabilmektedir. Afinite kromatografisi ise enzimler ve substratları arasındaki moleküler tanımayla ve bunun sonucu olarak spesifik bağlanmalara dayalı ayırım gerçekleştirdiğinden yalnızca istenen enzimin, bulunduğu protein havuzundan ayrılmasını sağlamaktadır. Ayrılmak istenen enzimin bulunduğu ortamda miktarı oldukça düşük olsa bile verimli bir saflaştırma gerçekleşmektedir.

Enzimler hastalıkların tanı ve tedavisinde, bu hastalıklara yönelik ilaç ham maddelerinin sentezinde, genetik kusurların giderilmesinde ve buna benzer birçok alanda kullanılan moleküllerdir. Bu nedenle en verimli şekilde elde edilebilmeleri oldukça önemlidir. Afinite kromatografisi sahip olduğu spesifiklik, verimlilik, tekrarlanabilirlik, kolay uygulanabilirlik gibi avantajları nedeniyle enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılabilecek ve yeni ligandlarla yeni kolon sistemlerinin geliştirilmesiyle daha da başarılı hale gelecek bir yöntemdir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada enzim üretimi için gerekli Nutrient Broth besi yeri Acumedia Neogen firmasından, bakteri suşları (*Bacillus Cereus*) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden, Sarkozin Alfa Aesar' dan, Proteaz İnhibitörü Sigma' dan temin edilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında kullanılan 4-Aminoantipirin (4-AAP), Fenol, ticari Monomerik Sarkozin Oksidaz (MSOX) ve ticari Horseradishperoxidase (HRP) enzimleri Sigma' dan; enzim örneklerinin protein içeriğinin belirlenmesinde faydalanılan Bradford Belirteci Amresco'dan, Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma' dan alınmıştır. Jel elektroforez ve kriyojel kolon sentezleme işlemlerinde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar' dan, N,N' Metilenbisakrilamid (MBA) Sigma Aldrich' den, Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros' dan, Amonyum persülfat (APS) ve Tetraetilmetilendiamin (TEMED) Sigma' dan, Coomassie Blue Appli Chem' den, Akrilamid Merck' den temin edilmiştir. Çalışmaların kalan kısmında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup farklı firmalardan alınmıştır. Asetik asit (CH_3COOH) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen firmasından, Metanol (CH_3OH), Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Sodyum fosfat monobasic, Potasyum fosfat dibasic Sigma' dan, Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Panreac' dan, Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan' dan, Tris(hidroksimetil)aminometan ve Hidroklorik asit (HCl) Merck'den, Metakriloil klorür, L-Histidin, Sodyum nitrit (NaNO_2), Potasyum karbonat (K_2CO_3) Sigma-Aldrich' den alınarak uygun koşullarda saklanmıştır. Saf su Thermo Scientific firmasından alınan saf su cihazından elde edilmiş olup iletkenliği $18 \text{ megaohmcm}^{-1}$ dir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometresi, yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve polimerlerin yüzey alanının belirlenmesinde Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır. Bakterilerin çoğaltılması

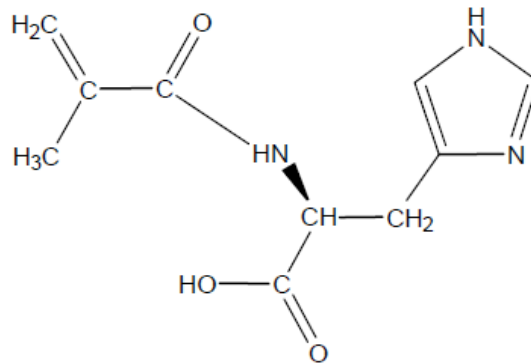
için hazırlanan besi yerinin sterilizasyonu JSR JSAC-40 model otoklav ile sağlanmıştır. Bakteriler Thermo Formo Orbital Shaker' da çoğaltılmış, Bandelin marka sonikatör kullanılarak ses dalgaları ile parçalanmıştır. Enzim saflaştırma işlemi AKTA P-920 UPC-900 model FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) cihazı ile yapılmış, enzimin protein içeriği ve aktivitesi BioTek Synergy H1 ELISA Reader ile yapılan UV absorbans ölçümleri ile tayin edilmiştir. SDS PAGE analizi ise Thermo Scientific elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince hazırlanan tampon çözeltilerin pH' ları HANNA H1 2211 pH/ORP metre ile ölçülmüştür.

3.2. Metod

3.2.1. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonlarının Hazırlanması

3.2.1.1. Metakrilamidohistidin (MAH) Fonksiyonel Monomerinin Sentezi

MAH monomerinin (Şekil 3.1) sentezi [96] için uygulanan prosedürde 5 g histidin ve 0.2 g NaNO₂ 30 mL K₂CO₃ (%5 v/v) çözeltisi içinde çözülmüş ve bu çözelti 0 °C' ye kadar soğutulmuştur. 4.0 mL metakriloil klorür azot atmosferi altında bu çözeltiye yavaşça eklenmiştir. Daha sonra bu çözelti oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon süresinin sonunda bu çözeltinin pH' ı 7' ye ayarlanmış ve reaksiyon karışımı etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH) etanol ve etil asetat ile kristallendirilmiştir.



Şekil 3.1. MAH monomerinin açık yapısı

3.2.1.2. MAH-Sarkozin Nanopartikül Sentezi

MAH-Sarkozin nanopartiküller literatürde yer alan Belmont ve ark. yapmış oldukları miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır [97]. Öncelikle 0,5 mmol sarkozinin 1mL' lik çözeltisi üzerine 1,72 mmol metakrilamidohistidin (MAH), 6,9 mmol etilenglikoldimetakrilat (EDMA), 80 µL hegzadekan ve 30 mg 2,2' azobisisobütironitril (AIBN) eklenerek organik faz hazırlanmıştır. Daha sonra organik faz; 18 mL su içerisinde hazırlanmış 38,5 mg SDS içeren sulu faza eklenerek kalıp molekülün çözünmesine yardımcı olmak için 1 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Ardından hazırlanmış polimer karışımı polimerizasyonun gerçekleşmesi için 18 saat boyunca 65 °C' de su banyosunda bekletilmiştir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra sudan SDS' yi uzaklaştırmak için 3 kez 5 saat boyunca diyaliz edilmiştir.

3.2.1.3. MAH-Sarkozin Nanopartikül Gömülmüş Kriyojel Sentezi

260 µL HEMA monomeri ve 56,6 mg çapraz bağlayıcı MBA suda çözülerek 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından daha önce sentezlenen MAH-Sarkozin 2000 ppm olacak şekilde çözeltiye ilave edilerek 5 dakika sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hazırlanan süspansiyon 5 mL' lik şırınga içine alınarak bir süre buz banyosunda soğutulduktan sonra reaksiyon başlatıcı ajanlar; APS ve TEMED karışıma ilave edilmiştir. Polimerleşme başlayana kadar buz banyosunda tutulan karışım daha sonra -20 °C' de 16 saat bekletilmiş böylece polimerleşme tamamlanmıştır. Hazırlanan kolon 16 saat sonunda +4 dereceye alınarak kullanıma kadar etil alkol içerisinde saklanmıştır.

3.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Şişme Testi

Bir önceki aşamada sentezlenen kriyojel kolonun [poli(HEMA- MAH Sarkozin)] şişme kapasitesi aşağıdaki yöntem izlenerek belirlenmiştir.

Kuru polimer ± 0.0001 duyarlılıkla tartılmış ve 24 saat boyunca, oda sıcaklığında, 50 mL saf su içerisinde bekletilmiştir. Bir gün sonunda sudan çıkarılan polimerin yüzeyindeki su süzgeç kağıdı yardımı ile alındıktan sonra polimer tekrar tartılmıştır. Polimerin ilk ağırlığı (W_i) ile son ağırlığı (W_s) kaydedilerek ve Denklem 3.1 kullanılarak poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in yüzde su tutma kapasitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \left[\frac{W_s - W_i}{W_i} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

3.2.2.2. FT-IR Analizi

MAH, MAH-Sarkozin ve poli(HEMA-MAH-Sarkozin) numunelerinden ayrı ayrı yaklaşık 0.1-0.2 g kadar tartılmış, FT-IR cihazının bir modu ve parçası olan ATR başlığı ile her bir numunenin spektrumu alınmıştır.

3.2.2.3.Yüzey Alanı Ölçümü

Poli(HEMA-MAH-sarkozin) monolitinin spesifik yüzey alanı BET cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

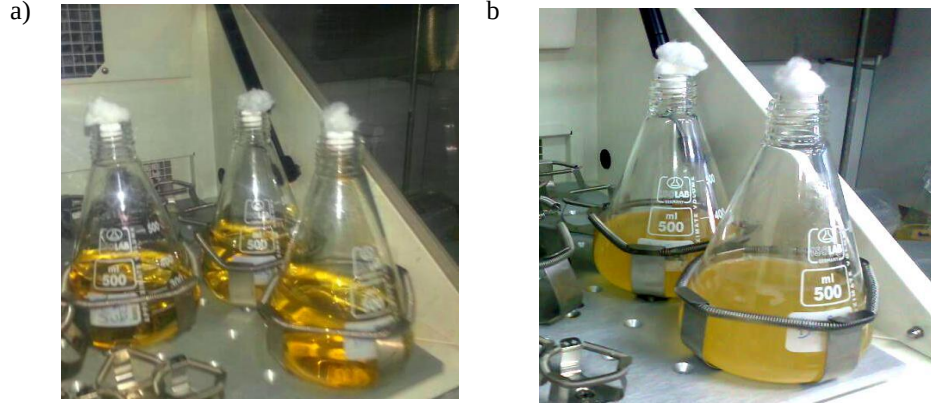
3.2.2.4.Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-MAH-sarkozin) monolitinden alınan bir kesit oda sıcaklığında kurutularak SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilmiş ve vakum altında altın tabakası ile kaplanmıştır. Ardından taramalı elektron mikroskobu ile polimerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

3.2.3. Enzim Üretimi ve Ön Deriştirilmesi

Bacillus cereus bakteri suşları, Nutrient Broth besi yerinde, 37 °C, 150 rpm' de 18-24 saat boyunca çoğaltılmıştır (Şekil 3.2). Besi yerine karbon ve enerji kaynağı olarak sarkozin ilave edilmiştir. Çoğaltılan bakteriler, 4 °C' de 12000 rpm devirle 10 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüş daha sonra ses dalgaları

ile parçalanmıştır. Lizatın içerdği proteinler % 55-70 aralığında amonyum sülfat ile gradientli olarak çöktürülerek ortamdan ayrılmıştır.



Şekil 3.2. a) Bakteriler üremeden önce, b) bakteriler üredikten sonra besi yeri görünümü

3.2.4. Enzim Saflaştırılması

Bakterilerden izole edilen MSOX poli(HEMA-MAH-Sarkozin) bağlı kriyojel kolonu üzerinden Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.3). Kolonu yıkama, şartlandırma ve numuneyi kolona yükleme çözeltisi olarak 50 mM pH 7,8 fosfat tamponu, enzimin kolondan desorpsiyonunu sağlamak için ise 1M NaCl içeren 50 mM pH 7,8 fosfat tamponu kullanılmıştır.



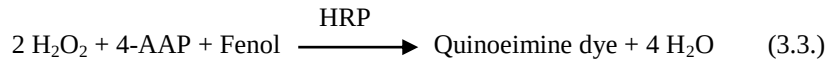
Şekil 3.3. Anadolu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı FPLC cihazı

3.2.5. Enzimin Protein İçeriği ve Aktivite Tayini

Bakteri suşlarından izole edilen ham ekstrakt ve tuzla çöktürme sonrası deriştirilen örneklerin protein içeriği Bradford yöntemi [98] kullanılarak aşağıda özetlenen prosedüre göre belirlenmiştir.

Bu amaçla; Bradford belirteci ile 1:10 oranında, 10 dakika boyunca etkileştirilen numunelerin 595 nm’ de UV absorbans ölçümleri yapılmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA (Bovine Serum Albumin) standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin denkleminde ($y=mx+n$) yola çıkılarak absorbansı bilinen numunelerin (y) içerdikleri protein miktarı (x) belirlenmiştir.

MSOX aktivitesi ise sarkozinin enzimatik yıkımı sonucu açığa çıkan H_2O_2 ’ nin kantitatif olarak tayin edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. H_2O_2 , HRP enzimi varlığında 4-Aminoantipirin (4-AAP) ve fenolü pembe renkli quinoneimine dye bileşiğine yükseltgemektedir.



Sarkozin, MSOX, 4-AAP, Fenol ve HRP içeren reaksiyon karışımı 37 °C de 10 dakika boyunca inkübe edilmiş, reaksiyon sonucu oluşan pembe renkli ürünün (quinoneimine dye) 495 nm’ de UV absorbansı ölçülmüştür. Yalnızca enzim katalizi sonucu açığa çıkan H_2O_2 ’ nin tayin edilebilmesi için reaksiyon karışımıyla aynı bileşenleri içeren, ancak içinde MSOX enzimi bulunmayan bir şahit (kör) numune hazırlanmıştır. On dakika boyunca gerçekleştirilen reaksiyonda enzim aktivitesini durdurmak için ortama % 0.3’ lük SDS çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak Denklem 3.4 [98-101] yardımı ile MSOX aktivitesi hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta, 1 dakikada, 1 μmol H_2O_2 üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{Enzim Ünitesi} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{(A_u - A_0) \times 0,3 \times dF}{15,5 \times \frac{1}{2} \times 0,05 \times 10} \quad (3.4.)$$

Aü: Ürünün absorbansı

Ao: Kör örneğin absorbansı

0,3: Karışımın toplam hacmi (mL)

df: Seyreltme Faktörü

15,5: Ürünün Ekstinksiyon Katsayısı

½: Düzeltme faktörü (1 mol H₂O₂'den 1 mol quinoneimine dye oluşmaktadır)

0,05: Karışımdaki enzim hacmi (mL)

10: Reaksiyon süresi (dakika)

3.2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler ve Kinetik İncelemeler

Saflaştırılan MSOX' un aktivitesi, farklı pH (a) ve sıcaklık (b) aralıkları ile farklı enzim (c) ve substrat (d) derişimlerinde bölüm 3.2.5' de açıklanan yöntemle ölçülmüştür.

- a) pH' ın enzimatik reaksiyonun hızına etkisinin incelenmesi için pH 3-9 aralığında hazırlanan tampon çözeltilerle MSOX aktivitesi tayin edilmiştir.
- b) Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisinin incelenmesi için 25-60 °C sıcaklık aralığında enzim aktivitesi ölçülmüştür.
- c) Saflaştırılan enzimin protein derişimi Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra enzim örneği tayin sınırları içerisinde belirli oranlarda seyreltilmiş (2-50 kat) ve enzimin farklı konsantrasyonlarının reaksiyon hızı üzerine etkisi incelenmiştir.
- d) Sabit sıcaklık, pH ve enzim konsantrasyonunda, substrat (sarkozin) derişimi gittikçe artırılarak çözeltiler hazırlanmış ve farklı substrat konsantrasyonlarına (2-50 mM) karşı enzimin aktivitesi ölçülerek reaksiyon hızındaki değişimler belirlenmiştir.

Enzim kinetiği çalışmaları dahilinde ise enzime ait V_{mak} ve K_m değerleri belirlenmiştir. Bunun için substrat derişimine karşı çizilen enzim aktivitesi grafiklerinden yararlanılmıştır (Michaelis Menten ve Lineweaver Burk). Bu grafiklere göre; enzimin maksimum aktivite gösterdiği değer MSOX enziminin

maksimum hızını (V_{mak}); enzimin maksimum hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimi de K_m değeri vermektedir. K_m ; Menten sabiti olup enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsüdür.

3.2.7. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi için öncelikle 29:1 oranında akrilamid-bis monomerleri ile, TEMED, APS, SDS ve pH 8.8 Tris tamponu kullanılarak % 10' luk poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Analizi yapılacak numunelerden 15' er μL alınarak her biri 15 μL Coomassie Blue G boyası ile karıştırılmış, karışımın homojen bir şekilde gerçekleşmesi için numuneler bir süre ısıtılmıştır. Ardından tanka dökülen jelde uygun bir tarak ile eşit hacimde kuyucuklar açılmış, tank tampon çözelti ile doldurulmuş, numuneler açılan kuyucuklar üzerinden jele yüklenmiştir. Enzim örneklerinin jelde ilerlemesi için 25-35 mA akım kullanılmıştır. Analiz sonunda tanktan çıkarılan jel önce Coomassie Blue boya çözeltisi içinde bekletilmiş daha sonra proteinlere ait bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla yıkama çözeltisi (35 mL asetik asit + 25 mL metanol) ile yıkanmıştır. Saflaştırılan MSOX' un saflığı ve molekül ağırlığı bu örneğe ait bant ile ticari MSOX' a ait bandın karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

4. BULGULAR

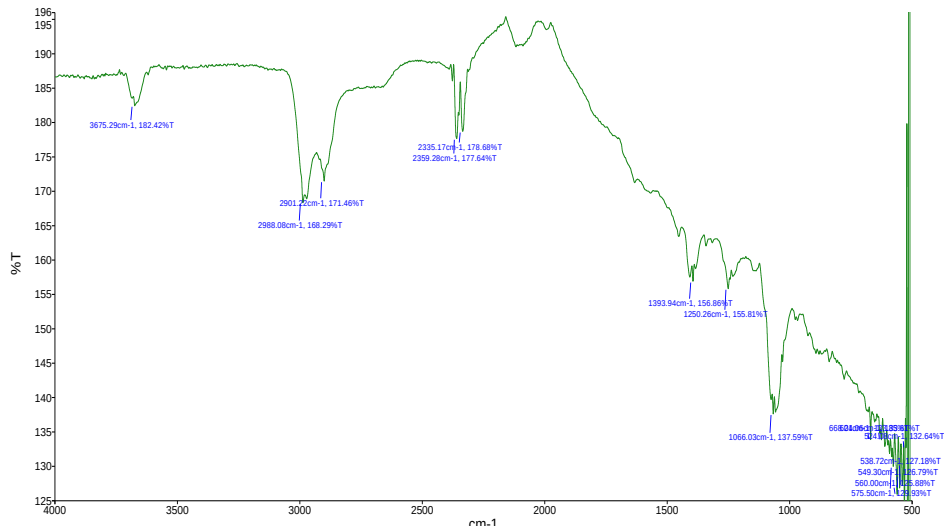
4.1. MAH, MAH-Sarkozin ve Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in

Karakterizasyonu

4.1.1. MAH, MAH-Sarkozin ve Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in

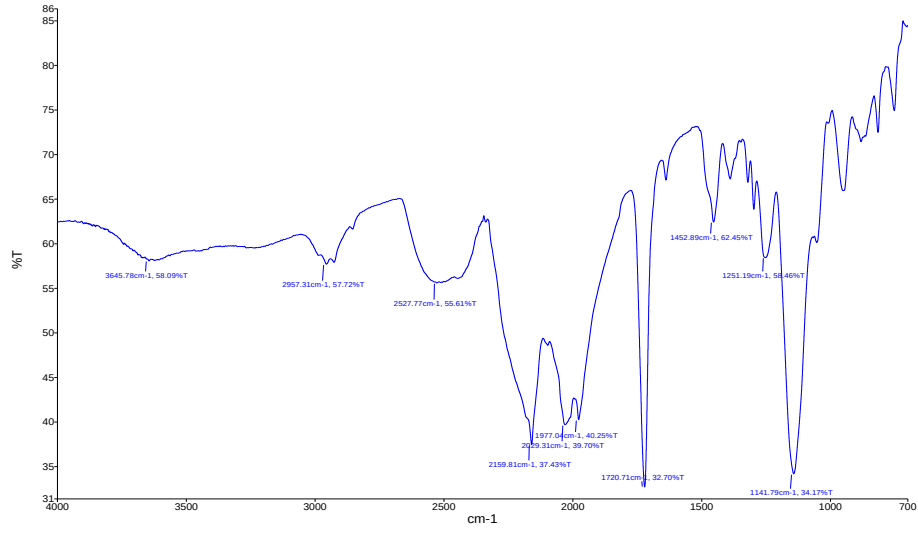
FT-IR Spektrumu

MAH monomerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.1) MAH yapısına ait belirgin bantlar görülmektedir. 3675 cm^{-1} ' de yapıdaki karboksilik asidin $-\text{OH}$ bandı, 2988 ve 2901 cm^{-1} ' de yapıda bulunan $-\text{C-H}$ bağlarının gerilme titreşimleri 1250 cm^{-1} ' de ise simetrik $-\text{C-H}$ eğilme titreşimleri gözlenmektedir. 1066 cm^{-1} ' de görülen bant yine karboksilik asidin $-\text{C-O}$ bağına aittir. MAH yapısında ayrıca bulunan $-\text{CH-NH-CH}$ (ikincil amin) grubuna ait bantlar ise 2335 ve 2359 cm^{-1} frekanslarına denk gelen bölgede yer almaktadır.



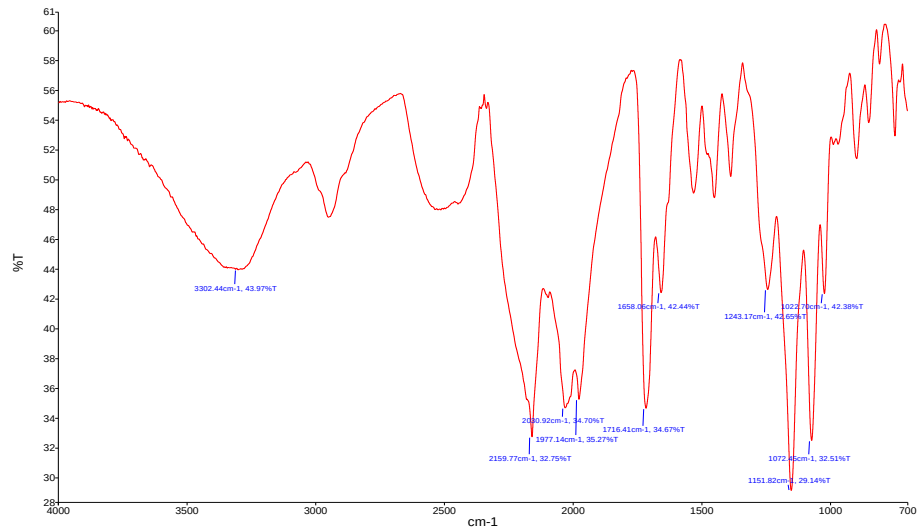
Şekil 4.1. MAH' ın FT-IR spektrumu

MAH-Sarkozin' in FT-IR spektrumu (Şekil 4.2) incelendiğinde 3645 cm^{-1} ' de yapıdaki MAH ve sarkozinde bulunan karboksilik aside ait $-\text{OH}$ esneme titreşiminin bandı görülmektedir. 2957 cm^{-1} ' de $-\text{C-H}$ gerilmesini, 1720 cm^{-1} ' de karbonil ($-\text{C=O}$) grubunu ifade eden karakteristik bantlar yer almaktadır. 1452 ve 1251 cm^{-1} ' de asimetrik ve simetrik $-\text{C-H}$ eğilme titreşimleri gözlenmektedir. 1141 cm^{-1} ' deki bant sarkozin ve MAH yapısında bulunan karboksilik asidin $-\text{C-O}$ gerilmesine aittir.



Şekil 4.2. MAH-Sarkozin'in FT-IR spektrumu

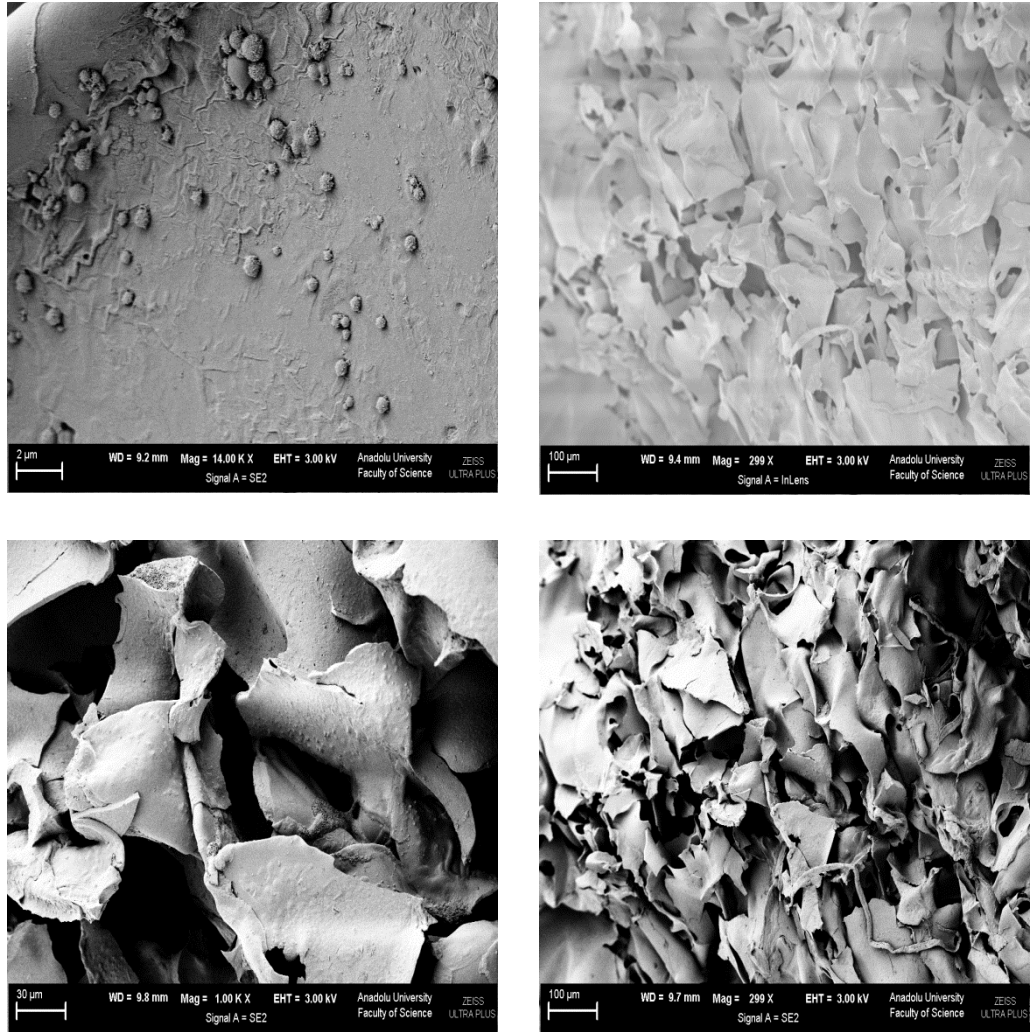
Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojelinde (Şekil 4.3) 3302 cm^{-1} (-OH) ve 1151 cm^{-1} (-CO-O-C) frekanslarında HEMA' daki fonksiyonel gruplara ait pikler görülmektedir. Bu pikler dışında 1658 cm^{-1} de sarkozindeki amit 1 (-H-N-C=O) titreşimine ait karakteristik bant gözlenmektedir. Bunun dışında gözlenen bantlar MAH ve sarkozin yapısına ait olup (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) bu maddenin kriyojele başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)' in FT-IR spektrumu

4.1.2. MAH-Sarkozin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) monolitinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.4’ de SEM görüntüleri verilen çapraz bağlı polimerik yapı oldukça geniş gözeneklere ve bu gözenekler nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir.



Şekil 4.4. Poli(HEMA-MAH-Sarkozin)’ in SEM görüntüleri

Sentezlenen kriyojel kolonun sahip olduğu poröz yapı çözelti geçişi esnasında difüzyon direncini azaltmakta ve böylece düşük basınçlarda çalışılmasına izin vererek, hedef biyomolekülün denatüre olmadan saflaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca kolon, yüksek iç yüzey alanı ile enzim

moleküllerinin kütle transferini de kolaylaştırarak adsorpsiyon kapasitesini artırmaktadır.

4.1.3. MAH-Sarkozin Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi

Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) monoliti hidrofilik özellik gösteren ve çapraz bağlar içeren bir polimerdir. Polimerik yapıda olması nedeniyle yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve suda çözünmez. Ancak çapraz bağ derecesi ile hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alır ve şişme özelliği gösterir. Bu çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun su tutma kapasitesi % 730 olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. MAH-Sarkozin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü

Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojel kolonunun BET cihazı ile 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu kolonun spesifik yüzey alanı $82 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ polimer bulunmuştur.

4.2. Enzim Örneklerinin Protein İçeriği ve Aktivite Tayini

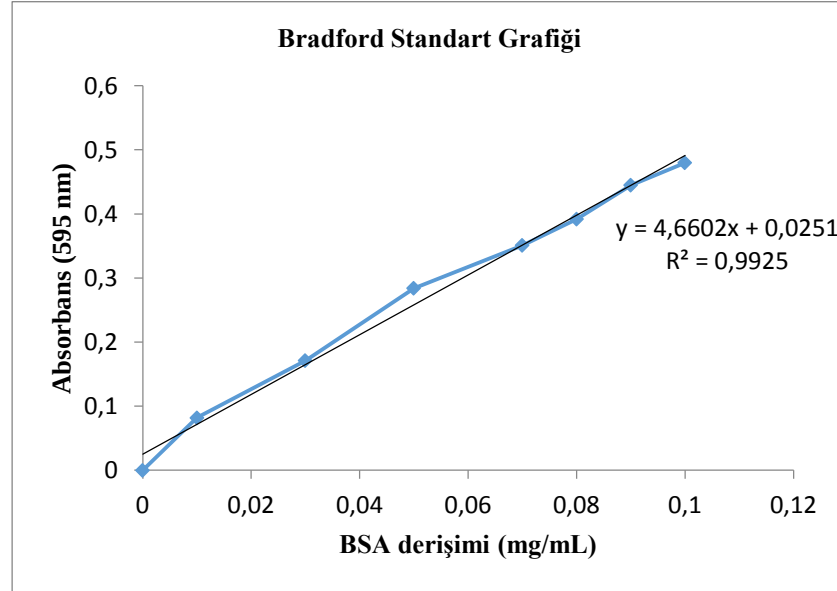
4.2.1. Protein İçeriği Tayini

Bacillus cereus bakteri suşlarının uygun koşullarda çoğaltılıp parçalanmasıyla üretilen ve MSOX içeren ham ekstrakt ile % 55 ve % 70 oranında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış örneklerin Bradford yöntemiyle içerdikleri protein miktarı belirlenmiştir.

Bradford metodu herhangi bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bradford ayracı olarak Commassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı bu yöntemde, maksimum absorpsiyon dalga boyu 465 nm (kırmızı) olan boya, proteinlerle bağlanarak maksimum absorpsiyonunu 595 nm' ye (mavi) kaydırmaktadır. Bu yöntemde enzim örneklerine boya belirteci eklendikten 2 dakika sonra renk oluşumu tamamlanır ve oluşan renk 1 saat kararlıdır.

Bu çalışmada, Bradford metoduna göre, pH 7,7 fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (bovin serum albumin) içeren örnekler hazırlanmıştır ve bu örnekler Bradford belirteci ile 1:10 oranında reaksiyona sokularak maksimum dalga boyunda (595 nm) absorbans değerleri ölçülmüştür.

Bu veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş (şekil 4.5) ve numunelerin protein içerikleri bu grafiğe göre belirlenmiştir; alınan sonuçlar Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

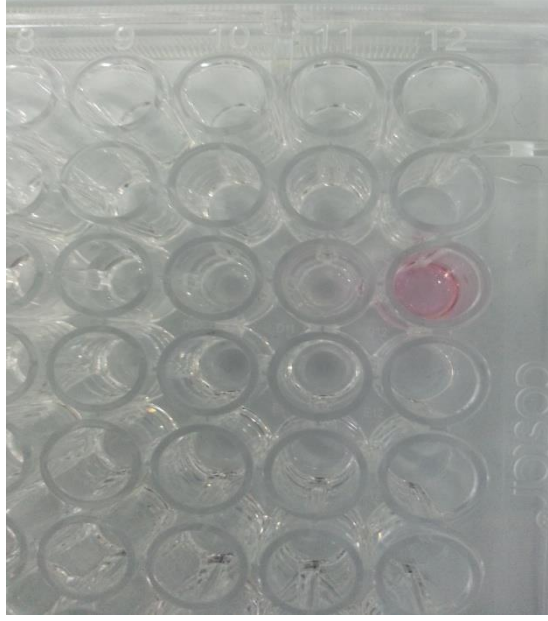


şekil 4.5. Bradford standart grafiği

4.2.2. MSOX Aktivitesi Tayini

MSOX enzimi, sarkozinin oksidatif yıkılımı sonucu glisin, formaldehit ve H_2O_2 ’ ye dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 , ortama HRP enzimi ve bu enzimin substratlarından olan 4-AAP ile fenol’ n ilavesiyle tayin edilebilir. HRP, H_2O_2 varlığında 4-AAP ve fenol pembe renkli Quinoneimine bileşiğine yükseltger (şekil 4.6).

Bu alışmada MSOX aktivitesi, enzimin aktivite zeltisi (4-AAP, fenol, HRP, sarkozin) ile 37 $^{\circ}C$ ’de 10 dakika (dk) boyunca inkübe edilmesi sonucu belirlenmiştir. 10 dakika sonunda reaksiyon % 0.3’ lk SDS zeltisi ile durdurulmuş ve oluşan ürünün maksimum dalga boyunda (495 nm) absorbansının ölçülmesiyle enzim aktivitesi, enzim nitesi ($U mL^{-1}$) cinsinden hesaplanmıştır. Bir enzim nitesi 37 $^{\circ}C$ sıcaklıkta, 1 dakikada, 1 μmol H_2O_2 üreten enzim miktarını ifade etmektedir. Bakteri suşlarından ekstrakte edilen ve n deriştirilen örneklerdeki MSOX aktivitesi Tablo 4.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.6. MSOX aktivitesi sonucu oluşan pembe renkli ürün (3. Sıra 12 numaralı kuyucuk)

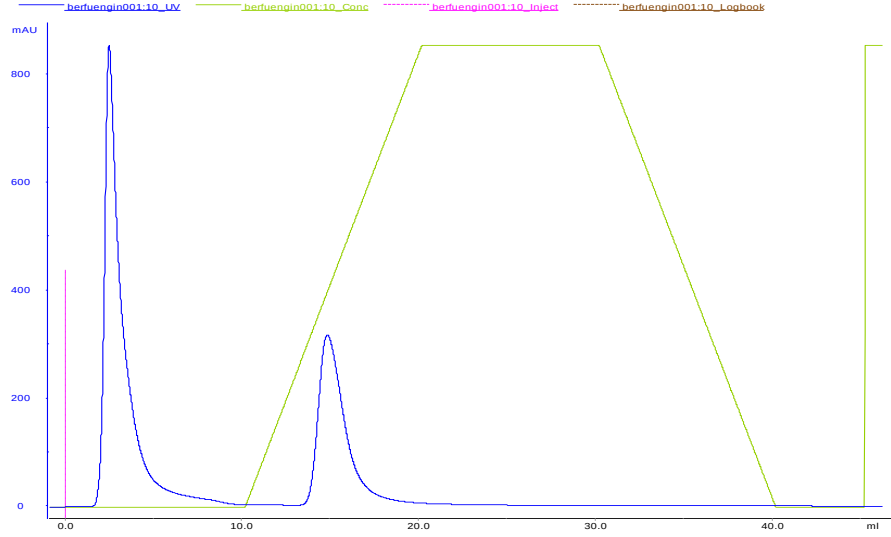
4.3. Enzim Saflaştırılması

4.3.1. FPLC Analizi

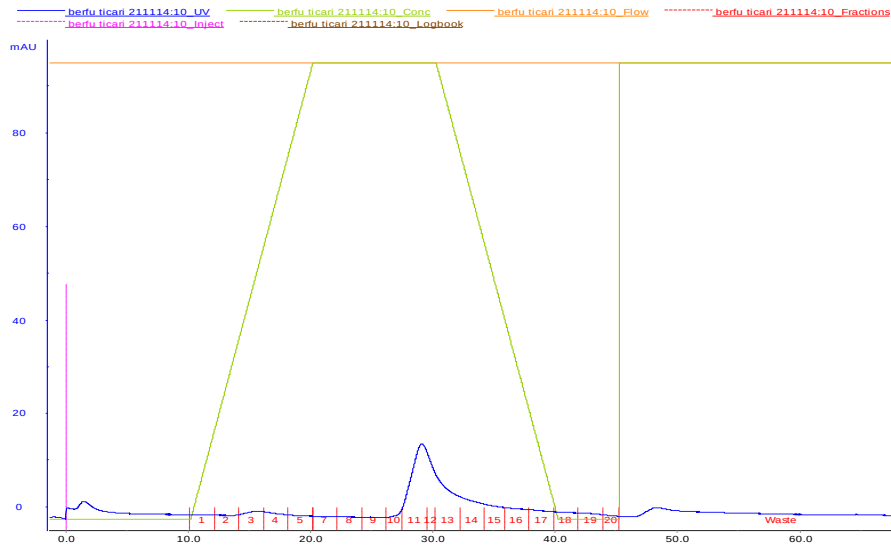
Bakteri suşlarından izole edilen MSOX afinite kromatografisi ile FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde, saflaştırılmak istenen (hedef) enzimin spesifik olarak ilgi gösterdiği uygun bir molekül ligand olarak matrikse tutturulur ve enzimi bulunduran numune bu kolon üzerinden uygun pH’ da hazırlanmış tampon çözelti ile geçirilir. Bu çalışmada MSOX enziminin substratı olan sarkozin bağlı kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. MSOX enzimi sarkozine karşı gösterdiği afinite ve moleküler tanıma sonucu kolona tutunur.

Şekil 4.7’ deki kromatogramda görülen ilk pik kolona tutunmadan çıkan türleri ifade eder. Elüsyon çözeltisi gradientli olarak kolondan geçirilmeye başlandıktan sonra ise (yeşil çizgi kolondan geçen elüsyon çözeltisinin derişimini ifade etmektedir); kolona tersinir ve zayıf bağlarla tutunmuş olan MSOX enzimi kolondan ayrılır. Kromatogramda görülen ikinci pik; saflaştırılan MSOX enzimine aittir. Aynı kolona ticari MSOX örneği yüklendiğinde Şekil 4.8’ de verilen kromatogram elde edilmiştir. Aynı işlem sarkozin içermeyen poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonları ile de tekrarlanmış, bu kolonların MSOX

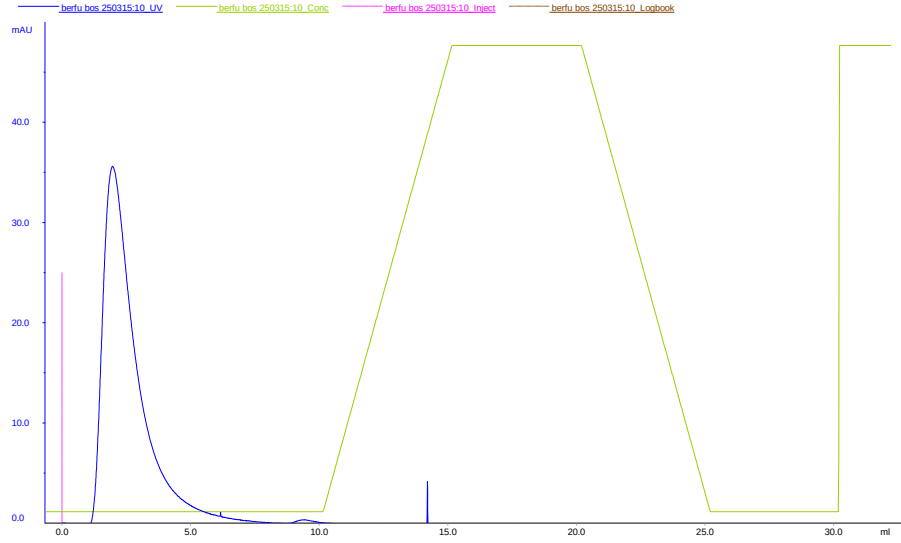
saflaştırmadaki etkinliği incelenmiştir. Bu ayırma işlemlerine ait FPLC kromatogramları Şekil 4.9 ve 4.10’ da verilmiştir.



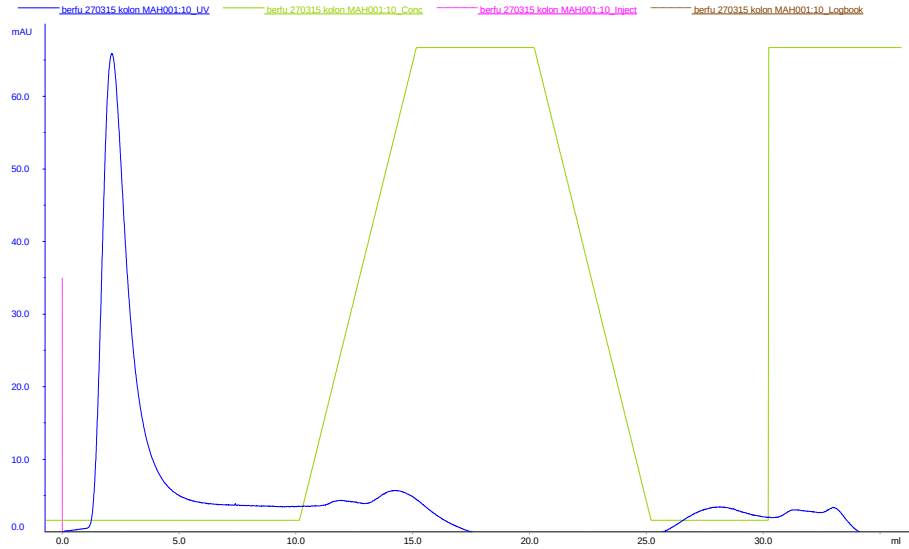
Şekil 4.7. Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojel kolonu ile MSOX saflaştırılmasına ait kromatogram



Şekil 4.8. Poli(HEMA-MAH-Sarkozin) kriyojel kolonuna yüklenen ticari MSOX enzimine ait kromatogram



Şekil 4.9. Poli(HEMA) kriyojel kolonuna yüklenen MSOX enzimine ait kromatogram



Şekil 4.10. Poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonuna yüklenen MSOX enzimine ait kromatogram

4.3.2. Saflaştırılan Enzimin Protein Miktarı ve Aktivite Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan MSOX enziminin protein içeriği ve aktivitesi bölüm 3.2’ de bahsedilen şekilde tayin edilmiştir. Saflaştırma sonrası MSOX ortamda bulunan diğer protein moleküllerinden başarılı bir şekilde ayrıldığı için FPLC’ den toplanan numunenin protein içeriği ham ekstrakt ve tuz ile çöktürülmüş örneklerle göre daha düşük, aktivitesi ise bu örneklerle göre daha yüksektir. Afinite kromatografisi ile saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesinde (Tablo 4.1) belirgin bir artış gözlenmiştir.

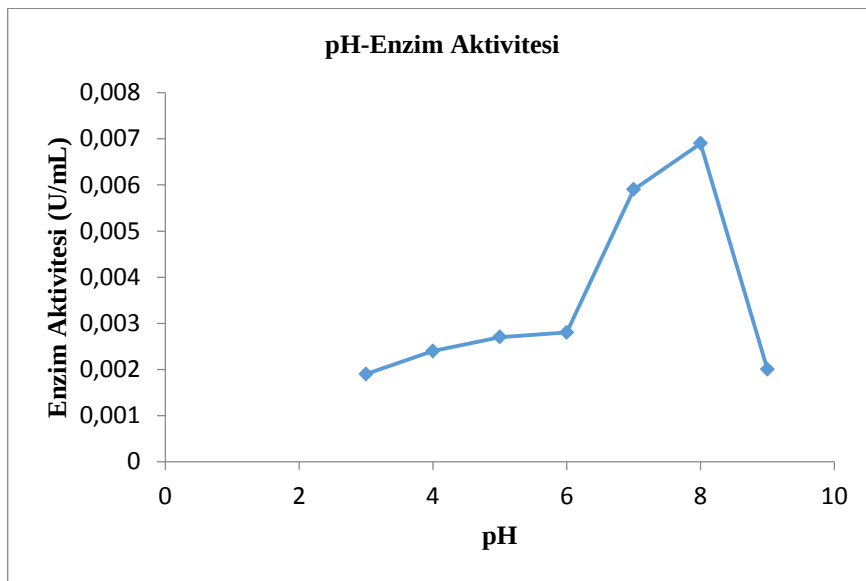
Tablo 4.1. MSOX' a ait saflaştırma tablosu

Numune	Toplam Protein (µg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg ⁻¹)	Saflaştırma Kat Sayısı	% Verim
Ham Ekstrakt	1230	24.2×10 ⁻³	0.020	1	100
%55 A.S Çök. Sonrası	196	4.46×10 ⁻³	0.023	1.2	18
Afinite Sonrası MSOX	3	3.45×10 ⁻³	1.150	50	77
Poli(HEMA-MAH) kriyojeli ile saflaştırma sonrası	21	0.87×10 ⁻³	0.041	1.8	20
Poli(HEMA) kriyojeli ile saflaştırma sonrası	-	-	-	-	-

4.3.3. MSOX Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi

4.3.3.1. pH Etkisi

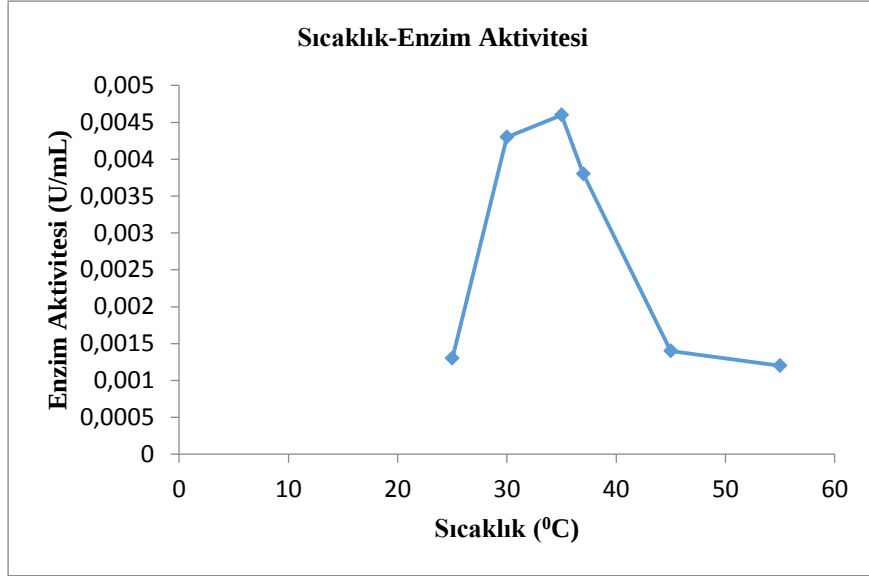
Saflaştırılan MSOX enziminin aktivitesi farklı pH' larda ölçülmüştür (Şekil 4.11). pH 3-9 arası tampon çözeltiler kullanılarak yapılan analizlerde, enzimin her bir pH değerinde farklı aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri o enzim için optimum pH' dır. MSOX enzimi pH 7 ve 8 aralığında iyi çalışmakta, pH 8' de ise maksimum aktiviteye ulaşmaktadır.



Şekil 4.11. pH' ın enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.3.3.2. Sıcaklık Etkisi

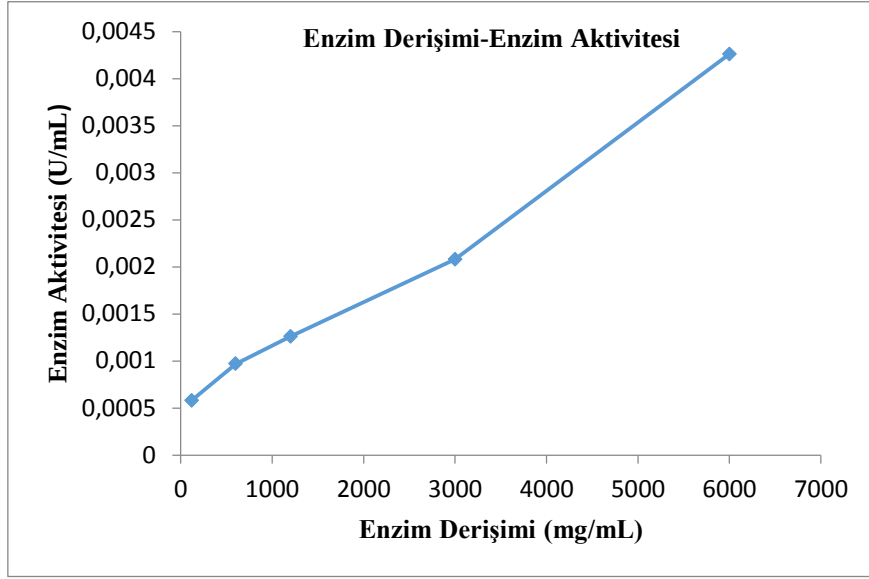
Enzimler biyomoleküller olduklarından genellikle vücut sıcaklığında (37 °C) aktif olarak çalışmaktadırlar, ancak her enzimin maksimum verimle çalıştığı bir optimum sıcaklık değeri vardır. Saflaştırılan MSOX enziminin 25-30-35-37 45-55 °C aralığında aktivitesi ölçülmüş; enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.3.3.3. Enzim Derişimi Etkisi

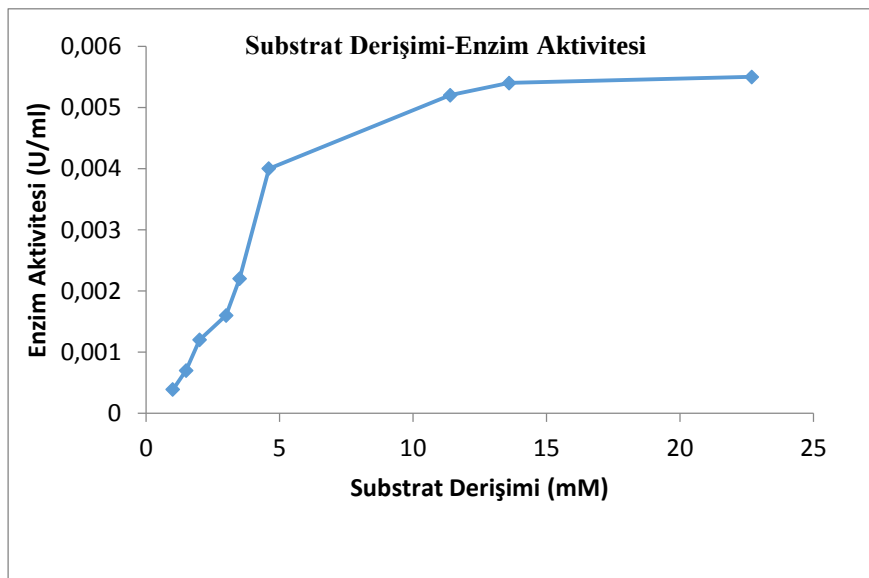
Enzim-substrat reaksiyonlarında enzim aktivitesi ve reaksiyonun hızı enzim derişiminin artırılmasıyla doğru orantılı olarak artış gösterir. Ortamdaki enzim miktarı ne kadar fazla olursa, birim zamanda enzimin ürüne dönüşecek substrat miktarı da o kadar fazla olacaktır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Enzim derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.3.3.4. Substrat Derişimi Etkisi

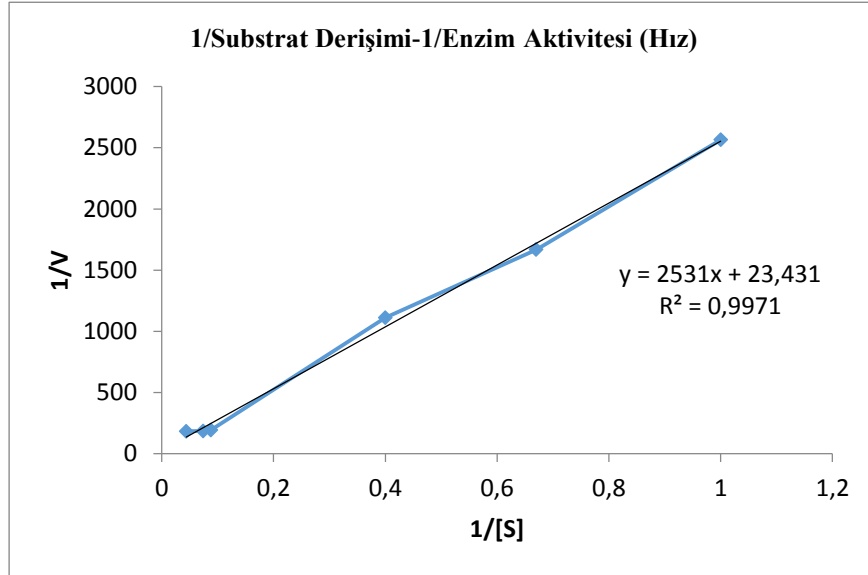
Düşük substrat derişimlerinde reaksiyon ortamındaki substrat miktarı arttıkça enzim daha fazla substrat bağlayabilecek ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi artış gösterecektir. Ancak yüksek substrat derişimlerinde, enzimin aktif bölgesi substrat molekülleriyle tamamen doygunluğa erişmiş olacağından substrat miktarındaki artış enzim aktivitesine etki etmez ve reaksiyon sabit bir hızla ilerlemeye devam eder (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Substrat derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.3.4. MSOX' un V_{mak} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi

MSOX enziminin farklı substrat derişimlerine karşı aktivitesi belirlenmiştir. Enzim bağlayabileceği maksimum miktarda substratı bağladığında reaksiyon maksimum hıza ulaşır ve ulaşılan değer MSOX enzimi için V_{mak} değeridir. V_{mak}/2' ye karşılık gelen substrat derişimi ise K_m olarak ifade edilir. Bu değerler; substrat derişimine karşı çizilen enzim aktivitesi veya reaksiyon hızı grafiği (Michaelis-Menten) parabolik özellikte olduğundan Lineweaver-Burk grafiği çizilerek belirlenebilir (Şekil 4.15). Lineweaver-Burk grafiği 1/[S]' e karşı 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Sarkozine karşı aktivitesi belirlenen MSOX enziminin V_{mak} değeri 0.043, K_m değeri ise 108.11 olarak bulunmuştur.

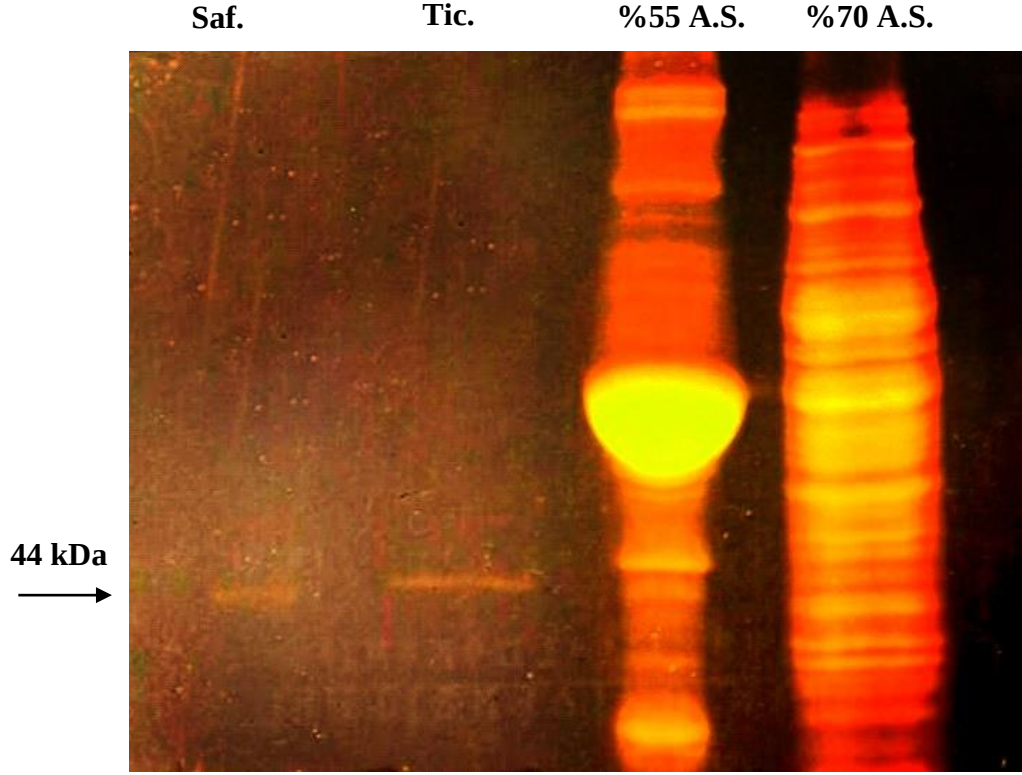


Şekil 4.15. Lineweaver-Burk grafiği; V_{mak} ve K_m değerleri

4.4. SDS-PAGE Analizi

Bakterilerden izole edilen enzim örneklerinin MSOX içeriği ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan MSOX' un saflığı SDS-PAGE analizi yapılarak belirlenmiştir. Ön deriştirilmiş örnekler %10' luk poliakrilamid jelde, denatüre edici ajan SDS varlığında yürütölmüş ve bu numunelere ait birçok bant gözlenmiştir. Bunun nedeni, bakterilerin parçalanmasıyla elde edilen bu örneklerin fazla sayıda protein içermesidir. Afinite kromatografisi sonrası elde

edilen MSOX enzimi jelde yürütüldüğünde ise tek bir bant gözlenmiş ve bu bant ticari MSOX enzime ait bant ile aynı yerde gelmiştir. Buradan, saflaştırılan MSOX enziminin -44 kDa ağırlığı olduğunda sonucuna varılabilir.



Şekil 4.16. SDS-PAGE görüntüsü

5. YORUM VE SONUÇ

Afinite kromatografisi biyomoleküllerin uygun ligandlarla, tek basamakta, verimli bir şekilde saflaştırılmasını sağlamaktadır. Ligand olarak biyomolekülün aktif bölgesine, moleküler tanıma sonucu, spesifik ve tersinir bağlarla bağlanabilecek moleküller tercih edilir ve seçilen ligand uygun bir matrikse tutturulur. Matriks seçimi ise çalışmaya göre değişmekle birlikte büyük gözenekli polimerik malzemeler enzim, protein gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılır.

Bu çalışmada MSOX enziminin saflaştırılmasına yönelik kriyojel tabanlı afinite kolonu geliştirilmiş ve bu kolonun enzimin saflaştırılmasındaki etkinliği incelenmiştir. Ligand olarak enzimin substratı olan sarkozin molekülü seçilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında sarkozin, uygun bir fonksiyonel monomer olan MAH ile poli(EDMA) varlığında nano küreler şeklinde sentezlenmiştir. Böylece sarkozin, normalde yapısında bulunmayan, polimerleşebilecek uçlara sahip olmuştur. Sentezlenen MAH-Sarkozin' in, çapraz bağlayıcı MBA varlığında HEMA monomeri ile buzda polimerleştirilmesiyle kriyojel afinite kolonu hazırlanmıştır. Kriyojel kolonlar boşluklu yapıya ve geniş gözeneklere sahip olduklarından, kromatografik sistemlerde düşük basınçlarda çalışmaya izin vererek enzimin bozunmadan saflaştırılmasını sağlamaktadır. Poli(HEMA-MAH Sarkozin) kriyojel kolonunun SEM görüntüleri incelendiğinde birbiriyle bağlantılı makro gözenekler ve bu gözeneklere gömülmüş MAH-Sarkozin nano küreleri açıkça görülmektedir. Kriyojelin BET cihazı ile yapılan spesifik yüzey alanı ölçümleri polimerin yüzey alanının $82 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ polimer olduğunu göstermiştir. Kolonun FT-IR analizi ise kriyojele immobilize edilmiş MAH-Sarkozin' e ait karakteristik pikler göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında *Bacillus cereus* bakteri suşlarından MSOX enzimi izole edilmiştir. Bakterilerin mekanik olarak parçalanması sonucu açığa çıkan ham ekstrakta ön deriştirme amaçlı % 55 ve % 70' lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve her bir numunedeki protein içeriği ile MSOX aktivitesi belirlenmiştir. Ham ekstraktın protein içeriği bakımından bir hayli zengin olduğu görülmüştür; ancak birçok protein bir arada bulunduğundan MSOX enzimi oldukça seyreltik durumdadır ve bu nedenle, bu numune çok düşük MSOX

aktivitesi göstermiştir. Tuzla çöktürme sonrası ön deriştirilen numunelerde en fazla enzim aktivitesi % 55' lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış örnekte gözlenmiştir. Bu nedenle bu örnek, hazırlanan afinite kolonuna yüklenmiştir. FPLC ile yapılan kromatografik saflaştırma sonucu MSOX enzimi belirli fraksiyonlarda toplanmıştır. Elde edilen enzim örneğinin saflığı, aktivite ölçümleri ve SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir. Bradford metoduna göre saflaştırma işlemi sonucu 3 µg MSOX elde edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 1.15 Umg⁻¹ olarak hesaplanmış ve enzimin % 77 verimle 50 kat saflaştırıldığı görülmüştür. SDS-PAGE analizi sonucu jelde gözlenen ve ticari örneğe ait bant ile yaklaşık olarak aynı yerde gelen, tek bant MSOX enziminin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını ifade etmektedir. Saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığı yaklaşık 44 kDa olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında; enzim aktivitesini etkileyen faktörler incelenmiş, enzime ait V_{mak} ve K_m değerleri bulunmuştur. MSOX enzimi maksimum aktiviteyi 35 °C sıcaklıkta, pH 8 ortamında göstermiştir. Enzim için Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan V_{mak} değeri 0.043 iken K_m değeri 108.11' dir. K_m değeri enzimin maksimum hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimini ifade etmekte ve bir enzimin substratına olan ilgisini göstermektedir; K_m değeri düşük ise enzimin o substrata ilgisi yüksek, K_m yüksek ise enzimin o substrata ilgisi düşüktür.

MSOX enzimi daha önce çeşitli bakteri suşlarından 5-formiltetrahidrofolat [100] ve 4-aminopirol-2-karboksilik asit' den [101] hazırlanmış afinite kolonları ile saflaştırılmıştır. Bu çalışmada literatürden farklı olarak enzimin substratını içeren oldukça spesifik kriyojel saflaştırma kolonu tasarlanmıştır. MSOX enzimi klinik uygulamalar açısından oldukça önemli bir enzimdir. Etki etmiş olduğu substrat; sarkozin, prostat kanserli hastaların kanında miktarı artan bir bileşiktir. MSOX enzimi sarkozin'in yüksek seçicilik ve duyarlılıkla tayin edilmesini sağlar. Bu durum, MSOX enzimini sarkozin tayinine yönelik biyosensör ve tanı kiti gibi uygulamalarda [102,103] kullanılır hale getirir.

KAYNAKÇA

- [1] Takemura, K., Kawachi, H., Eishi, Y., Kitagaki, K., Negi, M., Kobayashi, M., Board, P. G. (2014). γ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Human Pathology*, 45(2), 331–341.
- [2] Yan, X., Lin, Y., Liu, S., Aziz, F., & Yan, Q. (2015). Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 1–6.
- [3] Furjelová, M., Kovalská, M., Jurková, K., Horáček, J., Carbolová, T., & Adamkov, M. (2014). Carbonic anhydrase IX: A promising diagnostic and prognostic biomarker in breast carcinoma. *Acta Histochemica*, 116(1), 89–93.
- [4] Bruggink, A., Roos, E. C., & de Vroom, E. (1998). Penicillin acylase in the industrial production of beta-lactam antibiotics. *Org. Proc. Res. Dev.*, 2(2), 128–133.
- [5] Khademi, F., Hamzehee, K., Mostafaie, A., & Hajihossaini, R. (2009). Purification of three major forms of β -HCG from urine and production of polyclonal antibodies against them. *Clinical Biochemistry*, 42(13-14), 1476-1482.
- [6] Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N. G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., Lambin, P. (2011). Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), 424–431.
- [7] Gözükar, F., Arıkan, B. (2012). *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 27, 5.
- [8] Nishiya, Y., & Imanaka, T. (1994). Alteration of substrate specificity and optimum pH of sarcosine oxidase by random and site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 4213–4215.
- [9] Pundir, C. S., Chauhan, N., & Kumari, G. (2011). Immobilization of *Arthrobacter* sarcosine oxidase onto alkylamine and arylamine glass and its application in serum sarcosine determination, 10(April), 219–223.

- [10] Sreekumar, A., Poisson, L.M., Rajendiran, T.M., Khan, A.P., Cao, Qi., Yu, J., Laxman, B., Mehra, R., Lonigro, R.J., Li, Y., Nyati, M.K., Ahsan, A., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Cao, X., Byun, J., Omenn, G.S., Ghosh, D., Pennathur, S., Alexander, D.C., Berger, A., Shuster, J.R., Wei, T.J., Varambally, S., Beecher, C., Chinnaiyan, A.M. (2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 457, 910-914.
- [11] Trickey, P., Wagner, M.A., Jorns, M.S., Mathews, F.S. (1999). Structure of a covalently flavinylated amine oxidizing enzyme. *Structure*, 7, 331-345.
- [12] Ida, K., Moriguchi, T., Suzuki, H. (2005). Crystal structure of heterotetrameric sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96, *Biochem Biophys Res. Commun.*, 333, 359-366.
- [13] Burton, C., Gamagedara, S., & Ma, Y. (2012). A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples. *Analytical Methods*, 4(1), 141.
- [14] Rebelo, T. S. C. R., Pereira, C. M., Sales, M. G. F., Noronha, J. P., Costa Rodrigues, J., Silva, F., & Fernandes, M. H. (2014). Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 850, 26–32.
- [15] Riedel, M., Göbel, G., Abdelmonem, A. M., Parak, W. J., Listad, F. (2013). Photoelectrochemical sensor based on quantum dots and sarcosine oxidase. *ChemPhysChem*, 14(10), 2338-2342.
- [16] Lan, J., Xu, W., Wan, Q., Zhang, X., Lin, J., Chen, J., & Chen, J. (2014). Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 825, 63–68.
- [17] Berberich, J. A., Yang, L. W., Madura, J., Bahar, I., & Russell, A. J. (2005). A stable three-enzyme creatinine biosensor. 1. Impact of structure, function and environment on PEGylated and immobilized sarcosine oxidase. *Acta Biomaterialia*, 1(2), 173–181.
- [18] Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R. M., & Chemnitz, G. C. (2001). Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. *Clinica Chimica Acta*, 312(1-2), 129–134.
- [19] Yadav, S., Devi, R., Bhar, P., Singhla, S., & Pundir, C. S. (2012). Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(4-5), 247–254.

- [20] Kinoshita, H., Torimura, M., Kano, K., & Ikeda, T. (1997). Peroxidase-based amperometric sensor of hydrogen peroxide generated in oxidase reaction: Application to creatinine and creatine assay. *Electroanalysis (New York)*, 9(16), 1234–1238.
- [21] Suzuki, H. (1994). Sarcosine oxidase: structure, function, and the application to creatinine determination. *Amino Acids*, 7(1), 27–43.
- [22] Altuğ, Ç. (2007). *Kreatin ve kreatinin tayinlerine yönelik enzim temelli hibrit biyosensörlerin geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [23] Nishiya, Y., Toda, A., Imanaka, T. (1998). Gene cluster for creatinine degradation in *Arthrobacter* sp. TE1826. *Mol. Gen. Genet.*, 257, 581-586.
- [24] Tsuru, D. (1977). On the catabolism of creatinine and the related enzymes in microorganisms. *Nucleic Acids Amino Acids*, 35, 31-37.
- [25] Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248–254.
- [26] Ası, T., (1999). “Protein Metabolizması,” *Tablolarla Biyokimya, Cilt No 2*, 202-205, Ankara.
- [27] Karaçay, B. (2009). *Bilim ve Teknik Dergisi, Ağustos*, 62-67.
- [28] Ako, H., & Nip, W. K. (2007). Enzyme Classification and Nomenclature. *Food Biochemistry and Food Processing*, 135–154.
- [29] Bayındırlı, A. (2010). Introduction to enzymes. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing*, 1-18.
- [30] Rogers, A., & Gibon, Y. (2009). *Plant Metabolic Networks. Plant Metabolic Networks*.
- [31] Ritter, H. (1997). Functionalized polymers via enzymic synthesis. *American Chemical Society Washington*, 103-113.
- [32] Özler, A. (2009). *Malatya kayısısından (prunus armeniaca l.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [33] Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). *Biochem. Z.*, 49, 333.
- [34] Xie, X. S. (2013). Enzyme kinetics, past and present. *Science*, 342, 1457.

- [35] Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A., Arda, N. (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- [36] Lineweaver, H., Burk, D. (1934). *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658.
- [37] Fagan, R. L., Palfey, B. A., Medical, M., & Arbor, A. (2010). 7.03 Flavin Dependent Enzymes, 37–40.
- [38] Joosten, V., & Van Berkel, W. J. (2007). Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), 195–202.
- [39] Koyama, Y., Yamamoto-Otake, H., Suzuki, M., Nakano, E. (1991). *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1259-1263.
- [40] Guo, K. P., Ma, X. H., Sun, G. Q., Zhao, Y. H., Li, X., Zhao, W. F., Kal, L. (2006). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 559-566.
- [41] Suzuki, M. J. (1991). *Biochem.*, 89, 599-607.
- [42] Suzuki, K., Ogishima, M., Sugiyama, M., Inouye, Y., Nakamura, S., Imamura, S. (1992). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 432-436.
- [43] Nishiya, Y., Imanaka, T. (1993). *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 239-244.
- [44] Hassan-Abdallah, A., Zhao, G. H., Eschenbrenner, M., Chen, Z. W., Mathews, F. S., Jorns, M. S. (2005). *Protein Expr. Purif.*, 43, 33-43.
- [45] Joosten, V., & van Berkel, W. J. (2007). Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), 195–202.
- [46] Wagner, M. A., & Schuman Jorns, M. (1997). Folate utilization by monomeric versus heterotetrameric sarcosine oxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342(1), 176–181.
- [47] Nishiya, Y., Nakano, S., Kawamura, K., & Abe, Y. (2012). Monomeric sarcosine oxidase acts on both L- and D-substrates. *Journal of Analytical Bio-Science*, 35(5), 426-430.
- [48] Wagner, M. A., & Jorns, M. S. (2000). Monomeric sarcosine oxidase: 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry*, 39(30), 8825–8829.
- [49] Fitzpatrick, P. F. (2010). Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 493(1), 13–25.

- [50] Kılıç, Y., Yüksekdağ, Z. N., & Yüksekdağ, H. (2014). Lactobacillus ve Bifidobacterium cinsi bakterilerin beta galaktosidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi. *Gıda*, 39 (4), 211-218.
- [51] Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing Bacillus sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 720–724.
- [52] Van Dyk, J. S., Sakka, M., Sakka, K., & Pletschke, B. I. (2010). Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of Bacillus licheniformis SVD1. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(3), 112–118.
- [53] Sarı, E. (2011). *Bacillus Circulans M34’ den proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [54] Şengel, B. Ş. (2007). *Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşullarının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [55] Cutler, P. (1996). *Affinity chromatography. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 59).
- [56] Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1–18.
- [57] Ward, W., & Swiatek, G. (2009). Protein Purification. *Current Analytical Chemistry*, 5(2), 85–105.
- [58] Wilchek, M., & Miron, T. (1999). Thirty years of affinity chromatography. *Reactive and Functional Polymers*, 41(1), 263–268.
- [59] Magdeldin, S., Moser, A. (2012). “Affinity Chromatography: Principles and Applications,” *Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.)*, ISBN: 978-953-51-0325-7, 3-28.
- [60] Svec, F., Frechet, J. M. J. (1992). *Anal. Chem.*, 64, 820-822.
- [61] Cabrera, K. (2004). *J. Sep. Sci.*, 27, 843-852.
- [62] Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., & Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445–451.

- [63] Bakhshpour, M., Bereli, N., & Şenel, S. (2013). Preparation and characterization of thiophilic cryogels with 2-mercapto ethanol as the ligand for IgG purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 261–268.
- [64] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I. Y., & Denizli, A. (2008). Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 18–26.
- [65] Andaç, M., Galaev, I. Y., & Denizli, A. (2013). Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 259–265.
- [66] Sun, S., Tang, Y., Fu, Q., Liu, X., Guo, L., Zhao, Y., & Chang, C. (2012). Monolithic cryogels made of agarose-chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 1002–1007.
- [67] Perçin, I., Aksöz, E. (2012). PHEMA Based Cryogel For Lectin Purification From Soybean Flour, *Hacettepe J. Biol. & Chem* 40(3), 303–308.
- [68] Çavuş, A., Baysal, Z., & Alkan, H. (2013). Preparation of poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogels containing l-histidine for insulin recognition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 84–89.
- [69] Biçen, Ö. (2009). *Moleküler Baskılanmış Polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [70] Üzek, R., Uzun, L., Şenel, S., & Denizli, A. (2013). Nanospines incorporation into the structure of the hydrophobic cryogels via novel cryogelation method: An alternative sorbent for plasmid DNA purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 243–250.
- [71] Dainiak, M. B., Kumar, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2004). Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 93–98.
- [72] Aslıyuce, S., Uzun, L., Yousefi Rad, A., Unal, S., Say, R., & Denizli, A. (2012). Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 889-890, 95–102.
- [73] Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Pişkin, E., & Denizli, A. (2006). Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive and Functional Polymers*, 66(11), 1263–1271.

- [74] Johnson, W., Makame, Y. M. M., & Mkayula, L. L. (2014). Catalytic Efficiency of Trypsin Immobilized onto Macroporous Poly (Epoxy Acrylamide) Cryogels Department of Science and Management, 20(3), 396–403.
- [75] Altunbaş, C., Uygun, M., Uygun, D. A., Akgöl, S., & Denizli, A. (2013). Immobilization of inulinase on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(8), 1909–1921.
- [76] Tüzmen, N., Kalburcu, T., & Denizli, A. (2012). Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, 47(1), 26–33.
- [77] Bölgen, N. (2008). *HEMA-LAKTAT-DEKSTRAN kriyojellerin üretimi ve doku mühendisliğinde uygulamaları*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [78] Henriksen, M. L., Madsen, K. L., Skjoedt, K., & Hansen, S. (2014). Calcium-sensitive immunoaffinity chromatography: Gentle and highly specific retrieval of a scarce plasma antigen. *Journal of Immunological Methods*.
- [79] Peoples, M. C., Phillips, T. M., & Karnes, H. T. (2007). A capillary-based microfluidic instrument suitable for immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(2), 200–207.
- [80] Mortezaei, N., Wagener, C., & Buck, F. (2012). Combining lectin affinity chromatography and immunodepletion - A novel method for the enrichment of disease-specific glycoproteins in human plasma. *Methods*, 56(2), 254–259.
- [81] Dekker, L. J., Bosman, J., Burgers, P. C., van Rijswijk, A., Freije, R., Luider, T., & Bischoff, R. (2007). Depletion of high-abundance proteins from serum by immunoaffinity chromatography: A MALDI-FT-MS study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 847(1), 65–69.
- [82] Roschlou, P., Hess, B. (1972). Affinity chromatography of yeast pyruvate kinase with Cibacron blue bound to Sephadex G-200. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 353, 441-443.
- [83] Denizli, A., Pişkin, E. (2001). Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 391-416.
- [84] Mondal, K., & Gupta, M. N. (2006). The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomolecular Engineering*, 23(2-3), 59–76.

- [85] Başar, N., Uzun, L., Güner, A., & Denizli, A. (2007). Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(3), 234–242.
- [86] Shibusawa, Y., Fujiwara, T., Shindo, H., & Ito, Y. (2004). Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye-ligand affinity counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 799(2), 239–244.
- [87] Shentu, J., Wu, J., Song, W., & Jia, Z. (2005). Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(1-2), 42–46.
- [88] Arica, M. Y., & Bayramölu, G. (2005). Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1433–1442.
- [89] Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986(2), 275–290.
- [90] Akduman, B., Uygun, M., Aktaşygun, D., Akgöl, S., & Denizli, A. (2013). Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. *Materials Science and Engineering C*, 33(8), 4842–4848.
- [91] Çimen, D., & Denizli, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 29–35.
- [92] Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., & Yao, S. J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 237–242.
- [93] Clonis, Y. D. (2006). Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *Journal of Chromatography A*, 1101(1-2), 1–24.
- [94] Say, R., Garipcan, B., Emir, S., Patır, S., Denizli, A. (2002). Preparation of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylamidohistidine) beads and its design as a affinity adsorbent for Cu(II) removal from aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 196, 199–207.
- [95] Belmont, A. S., Jaeger, S., Knopp, D., Niessner, R., Gauglitz, G., Haupt, K. (2007). Molecularly imprinted polymer films for refractometric interference spectroscopic sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3267-3272.

- [96] Suzuki, M. (1979). *Medical Technology*, 7, 945-950.
- [97] Suzuki, M., Yoshida M. (1984). *Clin. Chim. Acta*, 140, 289-294.
- [98] Suzuki, M., Yoshida M. (1984). *Clin. Chim. Acta*, 143, 147-155.
- [99] Koyama, Y., et. al. (1991). *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1259-1263.
- [100] Kvalnes-Krick, K., & Jorns, M. S. (1987). Interaction of tetrahydrofolate and other folate derivatives with bacterial sarcosine oxidase. *Biochemistry*, 26(23), 7391–7395.
- [101] Tong, Y., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Tao, X., Xu, H., & Wang, W. (2013). Novel affinity purification of monomeric sarcosine oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Separation Science*, 36(18), 3086– 3092.
- [102] Pundir, C. S., Chauhan, N., Kumari, G., Vandana (2010). Immobilization of arthrobacter sarcosine oxidase onto alkylamine and arylamine glass and its application in serum sarcosine determination. *Indian Journal of Biotechnology*, 10, 219-223.
- [103] Zhou, Y., Yin, H., Meng, X., Xu, Z., Fu, Y., & Ai, S. (2012). Direct electrochemistry of sarcosine oxidase on graphene, chitosan and silver nanoparticles modified glassy carbon electrode and its biosensing for hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 71, 294–301.