

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**GLUTATİYON –S–TRANSFERAZ ENZİMİNİN
FARKLI TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU
VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Gülseren COŞKUN

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 12.02.2007

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Figen ZİHNİOĞLU

Bornova – İZMİR

Sayın **Gülseren COŞKUN** tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan “**Glutatyon–s–transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi**” adlı bu çalışma, “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği”nin 24. madde (c) ve (d) bentleri ve Enstitü Yönergesi’nin ilgili hükümleri dikkate alınarak tarafımızdan değerlendirilmiş olup yapılan sözlü savunma sınavında aday oy ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle Gülseren COŞKUN’un sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy ile karar verilmiştir.

..... / / 2007

Jüri Başkan	;	imza.....
Raportör	;	imza.....
Üye	;	imza.....
Üye	;	imza.....
Üye	;	imza.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
 / .../ gün ve / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Süleyman BORUZANLI
 Enstitü Sekreteri

Prof. Dr.Emür HENDEN
 Enstitü Müdürü

ÖZET

GLUTATİYON –S–TRANSFERAZ ENZİMİNİN FARKLI TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

COŞKUN, Gülseren

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Şubat 2007, 118 sayfa

Glutatiyon-s-transferazlar (GST'lar) (EC 2.5.1.18) hücreSEL detoksifikasyonu ve pek çok fizyolojik ve ksenobiotik maddelerin salınımını kapsayan çok fonksiyonlu bir enzim ailesidir. Enzimler karaciğer, böbrek, bağırsak ve diğer dokuların sitozolünde bulunurlar. İndirgenmiş glutatiyonun (γ -glutamil-sisteinil-glisin) tiol grubunun, organik bileşiklerdeki elektrofilik merkezlere nükleofilik katılmayı katalizlerler. Bu transferazlar, kimyasal kanserojenler, çevresel kirleticiler ve antitümör ajanları gibi elektrofilik ksenobiotiklerin detoksifikasyonu yanı sıra oksidatif stres esnasında sekonder metabolit olarak oluşan endojen α,β -doymamış aldehytler, kinonlar, epoksitler ve hidroperoksitleri inaktive ederler. GST'lar çeşitli kaynaklardan saflaştırılmalarına, mekanizmaları ve özellikleri geniş bir biçimde çalışılmasına rağmen, bu enzimle az sayıda immobilizasyon çalışması bulunmaktadır.

Bu çalışmada, glutatiyon-s-transferaz koyun karaciğerinden hazırlandı ve adsorbsiyon, kovalent bağlama ve tutuklama gibi çeşitli

VI

tekniklerle immobilize edildi. İmmobilize enzimin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendi. Ayrıca depo, pH, termal ve operasyonel kararlılıkları da araştırıldı.

Anahtar sözcükler : Glutatiyon-s-transferaz, detoksifikasyon, immobilizasyon, kitosan, aljinat, karaciğer

ABSTRACT**IMMOBILIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
BY USING VARIOUS CARRIERS AND INVESTIGATION
OF SOME PROPERTIES**

COŞKUN, Gülseren

PhD In Biochemistry

Supervisor : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

February 2007, 118 Pages

Glutathione s-transferases (GSTs) (EC 2.5.1.18) are a family of multi-functional enzymes involved in the cellular detoxification and excretion of many physiological and xenobiotic substances. The enzymes are located in the cytosol of liver, kidney, gut and other tissues. They catalyse the nucleophilic addition of the thiol of reduced glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) to electrophilic centers in organic compounds. Besides detoxifying electrophilic xenobiotics, such as chemical carcinogens, environmental pollutants and antitumor agents, these transferases inactivate endogenous α,β -unsaturated aldehydes, quinones, epoxides and hydroperoxides formed as secondary metabolites during oxidative stress. Although GSTs purified from various sources and their mechanism and properties are widely studied, there is only a few immobilization studies with this enzyme.

In this study, glutathione s-transferase was prepared from sheep liver and immobilized by various techniques such as adsorption, covalent coupling and entrapment. Some physical and chemical properties of

VIII

immobilized enzyme have examined. Furthermore storage, pH, thermal and operational stabilities were also investigated.

Key Words: Glutathione s-transferase, detoxification, immobilization, chitosan, alginate, liver

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince yakın ilgisini esirgemeyen, kıymetli görüşlerinden yararlanma olanağı bulduğum başta değerli hocam Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU olmak üzere, Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a, Doç.Dr. Ali KILINÇ'a, bana her zaman destek olan aileme ve arkadaşlarıma, çalışmam sırasında her türlü kolaylığı gösteren 60. Yıl Anadolu Lisesi idareci, öğretmen ve öğrencilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMATİK DETOKSİFİKASYON	3
3. GLUTATİYON-S-TRANSFERAZLAR	9
4. İMMOBİLİZE ENZİMLER	19
4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	21
4.1.1. Taşıyıcıya bağlama ile immobilizasyon.....	22
4.1.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon	29
4.1.3. Tutuklama ile enzim immobilizasyonu	30
4.2. Kitosan	32
4.3. Aljinat.....	37
5. MATERYAL VE METOD	41
5.1. Materyal	41
5.2. Glutatyon-s-transferaz'ın Koyun Karaciğerinden Ekstraksiyonu	42
5.3. Glutatyon-s-transferaz Aktivite Tayini	42
5.4. Protein Tayini.....	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

5.5. Kitosan Boncuklarının Hazırlanması	46
5.6. Kitosan Boncuklarına Adsorbsiyon İle Enzim İmmobilizasyonu	47
5.7. Kitosan Boncuklara Kovalent Bağlama İle Enzim İmmobilizasyonu	47
5.7.1. CDI (1,1'-karbonildiimidazol)	48
5.7.2. EDC (1- etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid)	48
5.8. PGA (Poli galakturonik asit) Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu	49
5.9. PGA Kaplı Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-PGA)	49
5.10. Kitosan ve PEG 6000 Kaplı Aljinat Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu	49
5.11. PEG İçeren Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-PEG)	50
5.12. Aljinat Kaplı Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-Aljinat)	50
5.13. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon	50
5.13.1. İmmobilizasyon etkinliğine protein miktarının etkisi	52
5.13.2. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine pH etkisi	52
5.13.3. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine sıcaklık etkisi	53
5.13.4. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	54
5.14. Kararlılık Testleri	54
5.14.1. Termal kararlılık	54
5.14.2. pH kararlılığı	55
5.14.3. Depo kararlılığı	55
5.14.4. Operasyonel kararlılık	55

İÇİNDEKİLER (Devam)

5.15. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	56
5.16. İmmobilize GST İçin Reaktör Dizaynı	56
5.16.1. Sürekli akış kolon reaktörü	56
5.16.2. Kesikli karıştırılmalı tank reaktörü.....	57
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
6.1. Kitosan Boncuklarına Adsorbsiyon İle Enzim İmmobilizasyonu.....	59
6.2. Kitosan Boncuklara Kovalent Bağlama İle Enzim İmmobilizasyonu.....	61
6.2.1. CDI (1,1'-karbonildiimidazol) ile aktive edilmiş taşıyıcıda enzim immobilizasyonu	61
6.2.2. EDC (1- etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) ile aktive edilmiş taşıyıcıda enzim immobilizasyonu	64
6.3. Tutuklama ile Enzim İmmobilizasyonu	67
6.3.1. PGA (Poli galakturonik asit) boncuklarında enzim immobilizasyonu	67
6.3.2. PGA kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu(Kitosan-PGA)	68
6.3.3. Kitosan ve PEG 6000 kaplı aljinat boncuklarında enzim immobilizasyonu	70
6.3.4. PEG 6000 içeren kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu (Kitosan-PEG)	72
6.3.5. Aljinat kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu (Kitosan-Aljinat)	74
6.4. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon.....	77
6.4.1. İmmobilizasyon etkinliği üzerine enzim miktarının etkisi...	78
6.4.2. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine pH etkisi	80
6.4.3. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine sıcaklık etkisi.....	81

İÇİNDEKİLER (Devam)

6.4.4. Glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	85
6.5. Kararlılık Testleri	90
6.5.1. Termal kararlılık	90
6.5.2. pH kararlılığı	92
6.5.3. Depo kararlılığı	93
6.5.4. Operasyonel kararlılık	94
6.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	96
6.7. İmmobilize GST İçin Reaktör Dizaynı	98
6.7.1. Sürekli akış kolon reaktörü	98
6.7.2. Kesikli karıştırmalı tank reaktörü	101
7. SONUÇ	104
KAYNAKLAR DİZİNİ	106
ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Glutatyon (γ -glutamil sisteinil glisin).....	9
3.2 Glutatyon konjugatlarının ileri metabolizması (Faz III metabolizması). İntestinal mikroflora (safra) boşaltımı.....	14
3.3 Glutatyon konjugatlarının metabolizması.....	15
4.1 Taşıyıcıya bağlama.....	23
4.2 Çapraz bağlama.....	29
4.3 (a) Matrikste tutuklama, (b) Yarı geçirgen membranda tutuklama...	31
4.4 Kitosanın yapısı.....	33
4.5 Aljinatın yapısı (a) β -D-Mannuronik asit(M) (b) α -L-Guluronik asit (G) (c) Kopolimer bloğu.....	38
4.6 Kalsiyum-aljinat jelinin yapısı.....	39
5.1 Boncuk çaplarının hesaplanması.....	51
5.2 Sürekli akış kolon reaktör sistemi.....	57
5.3 Kesikli karıştırmalı tank reaktör sistemi.....	58
6.1 -OH grubu içeren taşıyıcıların CDI ile aktivasyon-bağlanma reaksiyonu.....	62
6.3 Karboksil grubunun EDC ile aktivasyonu ve primer aminle amid bağı oluşumu.....	65
6.4 PGA'nın CaCl_2 'e damlatılmasıyla elde edilen PGA boncukları.....	67
6.5 Poligalakturonik asit'in (PGA) yapısı.....	68
6.6 Kitosan'ın PGA içeren TPP çözeltisine damlatılmasıyla elde edilen kitosan-PGA boncukları.....	69
6.7 PEG'in (Polietilen glikol) yapısı.....	72
6.8 Kitosanın pozitif yükleri ve aljinatın negatif yükleri arasında iyonik bağ oluşumu.....	74
6.9 TPP (%2) ve NaOH:Metanol: dH_2O (1:10:10 v/v/v) kullanılarak hazırlanan kitosan boncukları.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

6.10 Kitosan boncukları.	78
6.11 Serbest ve immobilize GST aktivitesinin pH'ya bağımlı değişimi. 80	
6.12 Serbest ve immobilize GST aktivitesinin sıcaklığa bağımlı değişimi.	82
6.13 Serbest (a) ve immobilize (b) enzime ait Arrhenius diyagramları. .	84
6.14 Serbest (a) ve immobilize (b) GST enzim aktivitesi üzerine CDNB konsantrasyonunun etkisi	85
6.15 Serbest (a) ve immobilize (b) GST Lineweaver-Burk diyagramı (1mM GSH, 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 30 °C).....	86
6.16 Serbest (a) ve immobilize (b) GST enzim aktivitesi üzerine GSH konsantrasyonunun etkisi	87
6.17 Serbest (a) ve immobilize(b) GST Lineweaver-Burk diyagramı (1mM CDNB, 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 30 °C).....	88
6.18 Serbest ve immobilize GST'in termal kararlılığı.	91
6.19 Serbest ve immobilize GST'in pH kararlılığı.....	93
6.20 Serbest ve immobilize GST'in depo kararlılığı.....	94
6.21 İmmobilize GST'in operasyonel kararlılığı.	96
6.22 İmmobilize GST'in tekrar kullanılabilirliği.	97
6.23 Sürekli akış kolon reaktöründeki substrat (a) ve ürün (b) miktarları.....	99
6.24 CDNB'nin sürekli akış kolon reaktöründeki dönüşüm eğrisi.	100
6.25 Kesikli karıştırılmalı tank reaktöründeki substrat (a) ve ürün (b) miktarları.	102
6.26 CDNB'nin kesikli karıştırılmalı tank reaktöründeki dönüşüm eğrisi.	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Detoksifikasyon enzimleri.....	4
2.2 Faz I ve Faz II metabolik reaksiyonlarının sınıflandırılması.....	7
2.3 Konjugasyon reaksiyonları.....	8
3.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilen GST enzimlerinin bazı yapısal özellikleri.....	12
3.2 GST'ların bağlama ve konjugasyon fonksiyonları.....	17
4.1 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri.....	20
5.1 Aktivite ölçüm yöntemi.....	44
6.1 Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu.....	60
6.2 CDI ile aktive edilmiş taşıyıcıda kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu.....	63
6.3 EDC ile aktive edilmiş taşıyıcıda kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu	66
6.4 PGA kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu.....	69
6.5 Kitosan ve PEG kaplı aljinat boncuklarında enzim immobilizasyonu.....	70
6.6 Kitosan – PEG boncuklarında enzim immobilizasyonu.....	73
6.7 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu.....	76
6.8 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında GST immobilizasyonuna enzim miktarının etkisi.....	79
6.9 Serbest ve immobilize enzimin kinetik sabitleri.....	89
6.10 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında immobilize edilen GST'ın farklı zamanlardaki k_D değerleri.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge	Açıklama
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
k_D	Bozunma sabiti
Kısaltma	Açıklama
GST	Glutatyon-s-transferaz
GSH	Glutatyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin)
TPP	Tripoli fosfat
MeOH	Metanol
Alg	Aljinat
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poligalakturonik asit
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
EDC	1-etil-3-(3-dimetil amino propil) karbodiimid
CDI	1-1'-karbonil diimidazol
CDB	1-1'-karbonildi-1,2,3-benzotriazol
CNBr	Siyanojen bromür
TCA	Trikloro asetik asit
BSA	Sığır serum albumini

1. GİRİŞ

Glutatyon-s-transferazlar (GST; EC 2.5.1.18) elektrofilik karbon, azot veya sülfür atomu içeren nonpolar bileşiklere, indirgenmiş glutatyonun (GSH: γ -glutamil-sisteinil-glisin) nükleofilik ataklarını katalizlerler. Substratları halojen nitrobenzenler, arenoksitler, kinonlar ve α,β -doymamış karbonilleri içerir. Proteinlerin 3 büyük ailesi sitozolik, mitokondrial ve mikrozomal GST'lardır. (Hayes et al., 2005)

Glutatyon-s-transferazlar, bütün memeli türlerinde olduğu gibi bitkilerde, omurgalılarda, böceklerde, maya ve bakterilerde de bulunur. Memeli enzimleri, detoksifikasyon açısından çok önemli bir yer teşkil etmeleri nedeniyle substrat spesifiklikleri, lokalizasyonları, yapıları, izoformları yaygın olarak araştırılmıştır.

Oluşan glutatyon konjugatı, daha az toksiktir ve çözünür formda vücuttan atılır. Sonuçta bu enzim grubunun çok iyi bir şekilde mekanizmasının anlaşılması, fonksiyonel açıdan verimliliğinin maksimum düzeye ulaştırılması gerekmektedir.

GST kaynağı olarak seçilen koyun karaciğeri, kolay temin edilebilmesi, ekonomik olması ve GST miktarı ve aktivitesi açısından zengin olması nedeniyle uygun bir enzim kaynağıdır.

İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlıdır. GST ile yapılan immobilizasyon çalışmaları sınırlı sayıdadır. Bu nedenle koyun karaciğerinden elde edilen GST preparatı; adsorbsiyon, kovalent bağlama ve polimer matrikste tutuklama

yöntemleri kullanılarak kitosan tabanlı taşıyıcılarda ilk kez tarafımızdan immobilize edilmiştir. Kullanılan immobilizasyon yöntemleri ve immobilizasyon koşulları optimize edilerek kıyaslama yapıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda seçilen immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı dikkate alınarak immobilize GST'ın karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. ENZİMATİK DETOKSİFİKASYON

Hayvanlar tarafından tüketilen ksenobiotiklerin suda çözünür maddelere dönüştürüldüğü ve idrar yoluyla atıldığı hipotezi, ilk kez 18. yy'ın sonlarına doğru ortaya atılmıştır. O yıllarda bilim adamları, hayvanların idrarlarını toplamış, saflaştırmış ve çeşitli ksenobiotiklerin nasıl olup da vücuttan atıldığını anlamak için içerisinde bulunan maddeleri kimyasal olarak karakterize etmişlerdir. 1773 yılında Hippürik asit keşfedilmiştir. Bu, çalışmalar sonucu tanımlanan ilk metabolittir ve benzoik asitle glisinin konjugasyonu sonucu oluştuğu önerilmiştir. Fakat 1842'ye kadar bu hipotez resmi olarak test edilmemiştir. Bunu Keller deneyerek göstermiştir. O tarihten sonra çeşitli metabolitlerin tespiti için araştırmalar devam etmiştir. Bu zaman zarfında glukuronik asit, sülfat, glisin, glutamin, taurin, ornitin ve glutatyon konjuge edilen maddeler olarak tanımlandılar. Konjugasyon reaksiyonları çözülmesine rağmen, hala cevap bekleyen bir soru vardı. Konjugasyonun gerçekleşmesi için ksenobiotikler bir aktif merkez veya fonksiyonel gruba gerek duyuyordu. Reaktif bölgesi olmayan bileşikler bu işi nasıl başarıyorlardı? Bu sorunun cevabı 1947'de R.T. Williams tarafından "Detoksifikasyon mekanizmaları"nda açıklandı. (Liska, 1998)

İlaçlar, katkı maddeleri, çevresel kirlilik yaratan kimyasallar organizmada enzimler katalizörlüğünde kimyasal değişime uğrayarak genellikle etkinliklerini kaybederler. Bu tür metabolik değişimlere "detoksifikasyon" denir. Detoksifikasyon işlemi, uzaklaştırılmak istenen toksik maddelerin, enzimatik reaksiyon sonucu suda çözünürlülüğünün artırılarak, boşaltım yoluyla atılmasını kapsamaktadır.

Canlı organizmaların maruz kaldıkları ksenobiotikler, dört farklı akıbetten birine veya birkaçına uğrayabilirler (Caldwell, 1985).

- 1 – Enzimatik metabolizma
- 2 – Değişime uğramadan atılım
- 3 – Kendiliğinden kimyasal dönüşüm
- 4 – Yığılma (toplanma)

Üçüncü ve dördüncü ihtimallere rağmen, ksenobiotiklerin büyük çoğunluğu enzimatik metabolizmaya uğramakta veya değişmeden atılmaktadır. Çizelge 2.1’de detoksifikasyon enzimleri gösterilmektedir (Jakoby and Ziegler, 1990).

Çizelge 2.1 Detoksifikasyon enzimleri.

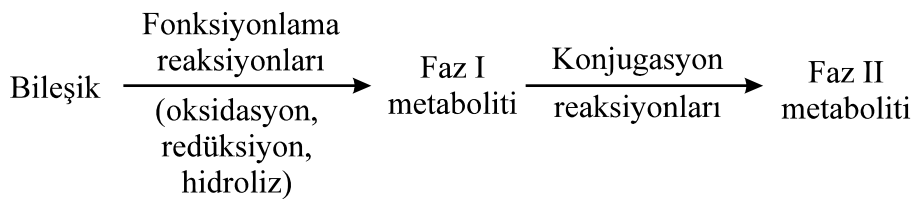
Flavin içeren monooksijenazlar	Glutatiyon transferaz
P ₄₅₀ – bağlı monooksijenazlar	UDP—glukuronil transferaz
Alkol dehidrogenaz	Fenol sülfotransferaz
Aldehit dehidrogenaz	Tirozin-ester sülfotransferaz
Karbonil redüktaz	Alkol sülfotransferaz
Dihidrodiol dehidrogenaz	Amin N–sülfotransferaz
Glutatiyon peroksidaz	Sistein N-asetiltransferaz
Monoamin oksidaz	Kateşol O-metil transferaz
Aldehit oksidaz	Amin N-metil transferaz
Ksantin oksidaz	Tiyol S-metil transferaz
Kinon redüktaz	Tiyol transferaz
Epoksit hidrolaz	Asetil transasetilaz
D-Amino asit oksidaz	Radonaz
Esterazlar / Aminidazlar	

Williams non-reaktif bileşiklerin biyotransformasyonunun 2 fazdan meydana geldiğini söylüyordu:

1. Fonksiyonlama: Oksijen kullanarak reaktif bölge oluşturma
2. Konjugasyon: Suda çözünür grupların reaktif bölgeye eklenmesi

Bu iki adım sırasıyla Faz I ve Faz II olarak adlandırıldı. Günümüzde de detoksifikasyon üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Şimdiye kadar 10'un üzerinde Faz I enzimi tanımlanmıştır ve en az 35 farklı gen içermektedir.

Faz I Sistemi: Faz I detoksifikasyon sistemi, genellikle yabancı bileşiklere karşı ilk enzimatik savunmadır. Farmasötiklerin çoğu Faz I biyotransformasyon yoluyla metabolize olurlar. Genellikle, toksik bileşik önce Faz I enzimleri ile reaksiyona girer ve Faz II enzim sistemi tarafından kabul edilen bir metabolit (substrat) oluştururlar. Bu metabolit, Faz II reaksiyonlarına girebildiği gibi, direkt olarak kendisi de dışarı atılabilir. Ayrıca, uygun fonksiyonel grup içeren toksik maddeler, Faz I reaksiyonuna girmeden direkt Faz II reaksiyonuna girebilirler. Birçok durumda kimyasal olarak reaktif fonksiyonel gruplar (-OH, -SH, -COOH vb.) Faz I reaksiyonu sonucu oluşturulurlar (Caldwell, 1985; Coughtrie, 1986; Gibson and Skett, 1986).



Faz I reaksiyonları biyotransformasyon olarak da bilinirler. Oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon, enzimatik hidroliz tepkimeleri bu grubun örnekleridir. Bu tepkimelerde yeni bir işlevsel grup oluşabileceği gibi, mevcut bir grup da değişikliğe uğrayabilir. Böylece moleküller daha polar bir hale dönüştürülerek atılımları kolaylaştırılır. Bazen aktif metabolitler de oluşabilir. Detoksifikasyonun bu adımında oluşan reaktif, molekül kaynaktan daha toksik olabilir. Eğer bu reaktif moleküller Faz II konjugasyonu ile metabolize olmazlarsa hücredeki proteinler, RNA ve DNA hasar görebilir. Çeşitli çalışmalar, Faz I ve/veya Faz II aktivitelerindeki azalmanın kanser, systemic lupus erythematosus ve parkinson hastalığı gibi hastalıkların riskini arttırdığını göstermişlerdir. Faz I aktiviteleriyle ilgili bilgilerin çoğu ilaç metabolizmasıyla ilgili yapılan çalışmalardan elde edilmiştir.

Faz II Sistemi: Faz II reaksiyonları, moleküldeki bir fonksiyonel grubun, yeni bir grubun ilavesiyle maskelendiği enzimatik sentezlerdir. İlave edilen yeni gruplar asetil, sülfat, bazı amino asitler ve glukuronik asitlerdir. Bu grupların moleküle bağlanması veya konjugasyonu, genellikle suda çözünür ürünler verir ve bunlar kolayca atılabilir. Bu sistemde yer alan enzimlerden bir tanesi de glutatyon-s-transferazdır ve aktive edilmiş substrat ile glutatyon arasındaki konjugasyon reaksiyonunu katalizler. Faz I ve Faz II metabolik reaksiyonları Çizelge 2.2’de özetlenmiştir (Gibson and Skett, 1986).

Çizelge 2.2 Faz I ve Faz II metabolik reaksiyonlarının sınıflandırılması.

Faz I	Faz II
Oksidasyon	Glukuronidasyon
Redüksiyon	Sülfatasyon
Hidratasyon	Metilasyon
Ditiyoasetilasyon	Asetilasyon
İzomerizasyon	Amino asit konjugasyonu
	Glutatyon konjugasyonu
	Yağ asidi konjugasyonu
	Kondenzasyon

Faz II metabolizması veya konjugasyonu, safra veya idrarda atılabilen suda çözünür ürünler oluşturan farklı tip bileşikler üzerinde etkili olan farklı enzim gruplarını içerir. Çizelge 2.3'te konjugasyon enzimlerinin reaksiyon verdiği ana toksik maddelerin fonksiyonel grupları gösterilmektedir (Zihnioğlu, 1992).

Faz III Sistemi: Son zamanlarda antiporter (p-glikoprotein veya çoklu ilaç direnci) aktivitesi Faz III detoksifikasyon sistemi olarak tanımlanmaktadır. Antiporter aktivitesi, farmasötiklerin ve diğer ksenobiotiklerin ilk geçiş metabolizmasında önemli bir faktördür. Antiporter, enerji bağımlı bir akış pompasıdır. Bu pompa ksenobiotikleri hücreden atar. Bu suretle, ksenobiotiklerin intrasellüler konsantrasyonu azalır (Liska, 1998). Üçüncü fazda, hidrofilik konjugatlar idrar veya feçez olarak atılırlar. İdrar dışındaki atılım yolları safra, tükürük, ter,

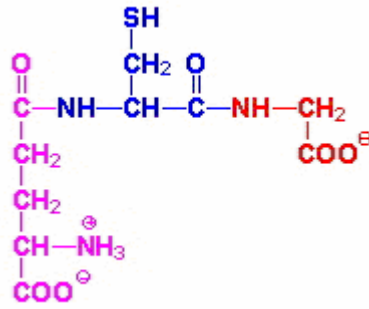
akciğerler ve anne sütüdür. Bitkilerde salgı mekanizması olmadığından, oluşan konjugat hücre vakuollerinde depolanır. (Coşkun, 1999)

Çizelge 2.3 Konjugasyon reaksiyonları.

Reaksiyon	Enzim	Fonksiyonel Grup
GSH Konjugasyonu	Glutatyon-S-transferaz	- Organik halojenler - Epoksit
Glukuronidasyon	UDP- Glukuroniltransferaz	- OH - COOH - NH ₂ - SH
Glikozidasyon	UDP-Glikoziltransferaz	- OH - COOH - SH
Sülfatasyon	Sülfotransferaz	- NH ₂ - SO ₂ NH ₂ - OH
Metilasyon	Metiltransferaz	- OH - NH ₂
Asetilasyon	Asetiltransferaz	- NH ₂ - SO ₂ NH ₂ - OH - COOH
Yağ asidi konjugasyonu		- OH
Kondenzasyon		Çeşitli

3. GLUTATİYON-S-TRANSFERAZLAR

Glutatiyon-s-transferazlar; GSTs (EC. 2.5.1.18) birçok farklı eksojen ve endojen bileşiğin detoksifikasyonunu sağlayan multifonksiyonel enzimlerdir ve glutatiyonun (GSH) (Şekil 3.1) tiyol grubunun ikinci bir substratın elektrofilik bölgesine konjugasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Oluşan glutatiyon konjugatı daha az toksiktir ve çözünür formda vücuttan atılırlar.



Şekil 3.1 Glutatiyon (γ-glutamil sisteinil glisin).

Memeli GST' ları evrimsel sınıflandırmaya göre alfa, mu, pi, teta mikrozomal olmak üzere 5 sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflandırma substrat ve inhibitör spesifikliğı, antikor çapraz reaktifliğı ve primer yapıya göre yapılmıştır. Sitozolik GST' lar, çeşitli genler ve monomer hibridizasyonu nedeniyle hem homodimer hem de heterodimer formlarında bulunmaktadır. Sınıfın üyeleri, benzer moleküler ağırlıklar (24-28 kDa) gösterirler. Amino asit dizisi özdeşliğı % 60-80 gibi yüksek derecededir. Mikrozomal GST hariç, büyük bir ihtimalle ortak bir genden

evrimleşmişlerdir. Mikrozomal GST'lar, sitozolik enzimlerle açık bir dizi benzerliği göstermezler (Wilce and Parker, 1994).

Sitozolik enzimler, biri diğerinden bağımsız davranan, dimer başına iki aktif bölgeye sahiptirler. Aktif bölgelerin her biri en az iki ligand bağlama bölgesi içerir. GSH bağlama bölgesi glutatyon için çok spesifiktir. Fakat elektrofilik substrat için bağlama bölgesi daha az spesifiktir. Katalitik aktivitelerine ilaveten GST ların bilirubin, hem, steroidler, tiroid hormonları ve safra asitleri gibi çeşitli non-substrat hidrofobik bileşiklerin intrasellüler taşınmasında fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Bu bağlanma genellikle enzimin katalitik aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanır.

Sitozolik GST'lar insan, fare ve sıçan dokularında bol bulunduğundan, yaygın biçimde çalışılmışlardır. İnsan karaciğerinde toplam sitozolik proteinin % 5'ini GST'lar oluşturmaktadır. Farklı izoenzimler farklı doku spesifikliğine sahiptirler. Örneğin alfa sınıfı enzim, insan karaciğer ve böbreğinde en fazla bulunan izoenzimdir. Fakat pi sınıfı enzim, plasenta, eritrositler, göğüs ve prostatta daha baskındır. GST'lar, aerobik organizmalar içerisinde hemen hemen her yerde görülürler. Enzim, bitkiler, balık, böcekler, fungi, maya ve bakterilerden de saflaştırılmaktadır.

GST' larla bu kadar çok çalışma yapılmasının sebeplerinden biri, onların alkiller, aril halidler, laktonlar, epoksitler, kinonlar, esterler ve aktiflenmiş akenler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir kısmını katalizleme yeteneğine sahip olmalarıdır. GST'ların tanıdığı

substratların sayısı fazla olmasına rağmen, substratların ortak özellikleri çoğunun hidrofilik oluşu ve elektrofilik bir merkez taşımalarıdır.

GST lar hücrelerin ve organizmaların ilaçlar, pestisitler, herbisitler ve antibiyotikler için direncin geliştirilmesinde bulunurlar. Özellikle de tümörlerde antikanser ilaçları için gösterilen direncin gelişmesinde bir faktör olarak görülürler. Bu nedenle GST lar akıllı ilaç dizaynı için tıbbi hedeflerdir.

Enzimatik mekanizmayı ve substratın ayrılmasının temelini anlamak için enzimin 3 boyutlu yapısının bilinmesi gerekir. GST ların bilinen tüm dizilerinde 6 amino asit korunmaktadır. Bunlar Tyr-7, Pro-53, Asp-57, Ile-68, Gly-145 ve Asp-152 dir. Yapılan kristalografik çalışmalar, GSH bağlanma bölgesindeki ilk iki artığın anahtar rolü oynadığını göstermiştir. Diğer artıkların rolleri ise çok açık değildir. Son üç amino asit gömülmüştür ve belki de protein katlanmasına yön vermek için önemlidirler (Wilce and Parker, 1994).

Glutatiyon bağımlı enzimlerin aerobik organizmalarda evrim geçirdiği ileri sürülmüştür. Bunun sebebi de bütün dizi uzunluğundaki amino asitlerin önerilen GST ların atalardan kalma ortak genden farklı olmasıdır. Memelilerde axon, intron sınırları incelendiğinde alfa, mu ve pi sınıfları çok benzerdir. Bu da GST lardaki çeşitliliğin sebebinin evrim olabileceğini gösterir. En başarılı hipotez, teta sınıfı GST ların alfa, mu ve pi sınıfı enzimlerin evrimsel öncüsü olduğudur. Diğer GST lar, evrim sırasında çeşitli toksik streslere karşı organizmanın adaptasyonu için teta geninin duplikasyonu ile ortaya çıkmış olabilir.

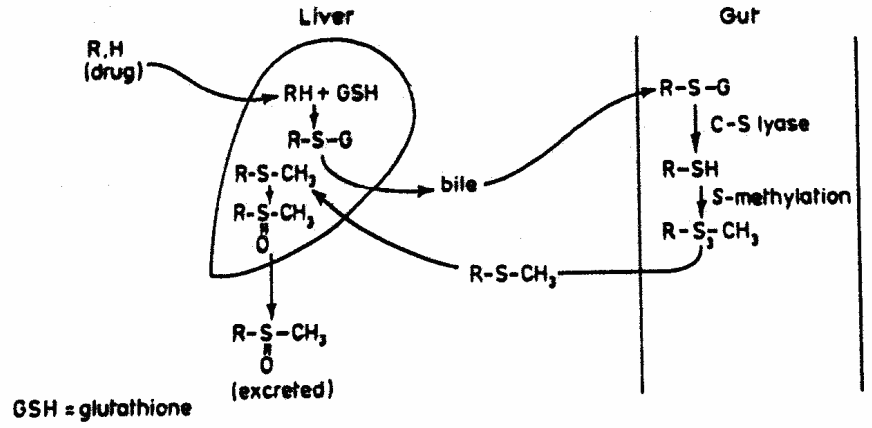
Bugüne kadar çeşitli kaynaklardan izole edilen glutatyon-s-transferaz (GST) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara ilişkin bazı deneysel veriler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilen GST enzimlerinin bazı yapısal özellikleri.

Enzim	IP	MW(Da)	Substrat	Referans
İnsan karaciğeri Sitosol enzimi				
Alfa (α)	7,8	51.000	CDNB,	Warholm et al., 1981
Mu (μ)	6,6	53.000	Trans-fenil-3-büten-2-on,	
Pi (π)	4,6	53.000	Sitiren-7,8-oksit Kumen hidroperoksit,	
Sıçan testisi GST	5,8	52.000	CDNB, Etakrinik asit, 1,2-dikloro-4-nitrobenzen, Bromosülfotalein, Trans-4-fenil-3-büten-2-on, p-nitro-benzilklorid, 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan.	Guthenberg et al., 1983
<i>Xanthomonas</i> <i>Campertris</i> GST	4,5	50,000	CDNB, Etakrinik asit, Kumen hidroperoksit, 4-nitro-quinolin-1-oksit	Di Ilio et al., 1993
Şeker kamışı yaprakları GST	4,7	50.000	CDNB, Etakrinik asit, 3,4-Dinitroklorobenzen, 4-nitropiridin-N-oksit Bromosülfotalein,	Singhal et al., 1991

Enzim	IP	MW(Da)	Substrat	Referans
Mısır				
GST I	-	29 homodimer	CDNB, Alaklor	Fuerst et al., 1993; Irzyk and Fuerst, 1993
GST II	-	27-29 heterodimer	CDNB, Alaklor	
GST III	-	26 homodimer	CDNB, Alaklor Metaloklor	
GST IV	5,75	27 homodimer	Asetoklor, Alaklor, Atrazin Metaloklor	
İnsan bağırsak mukozası				
GST (α)	7,7-9,9	25-26	CDNB, Kümenhidroperoksit,	Özer et al., 1990
GST (μ)	5,6-6,8	26,5-27,7	Etakrinikasit,	
GST (π)	4,5-4,9	22,5-24	Sülfobromoftalein, DCNB	
Kayın ağacı yaprakları				
GST I	5,5	26 homodimer	DCNB, CDNB, Alaklor	Schroder and Berkau, 1993
GST II	5,5	23 homodimer	Florodifen	
Sıçan karaciğeri				
A	8,5	45 homodimer	CDNB, DCNB P-Nitrobenzilklorid,	Habig et al., 1974
B	7,4		1,2-Epoksi-3-(p-nitrofenoksi)propan, Bromosülfofitalein	
C	7,8		Alilalkol, İyodometan,	
D	7,4		Etakrinik asit	

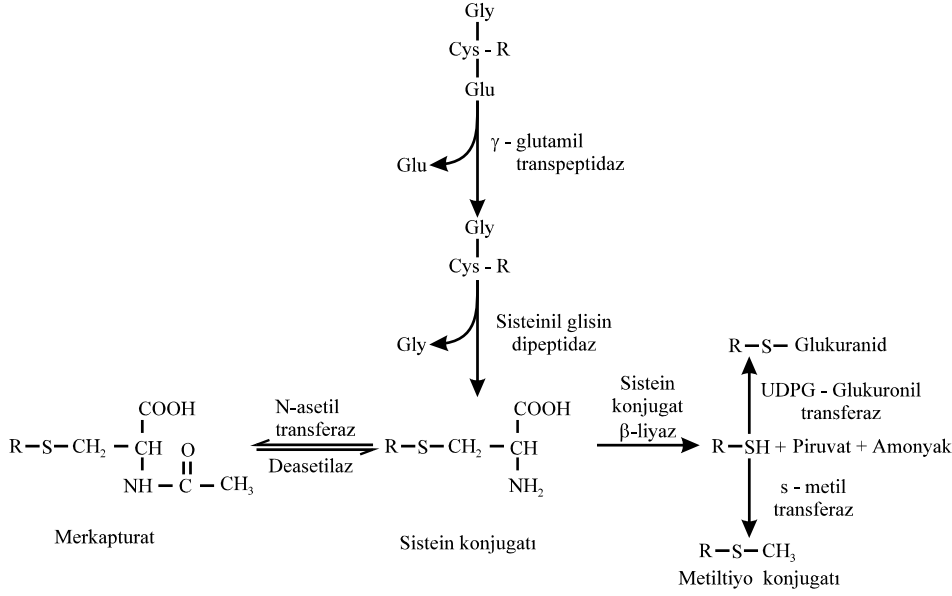
Glutatiyon konjugatlarının peptid kısmı, ileri enzimatik modifikasyonlara uğrar. Bu da yaygın olarak merkapturik asit olarak gösterilen N-asetil-sisteinin yerini alan sisteinil sülfürün safra ve idrar ile boşaltımını oluşturur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Glutatiyon konjugatlarının ileri metabolizması (Faz III metabolizması).

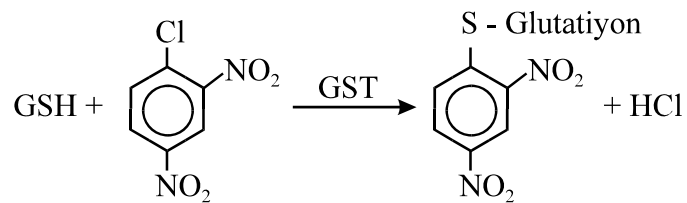
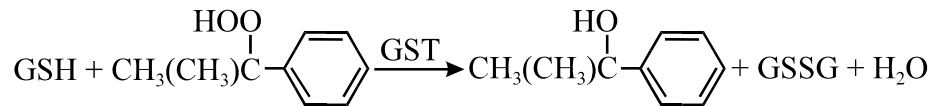
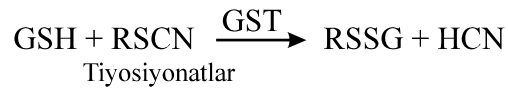
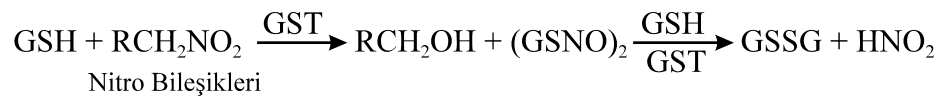
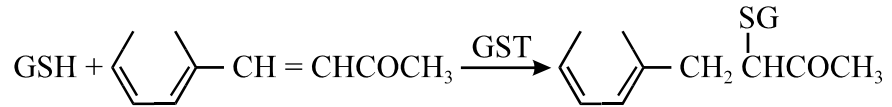
İntestinal mikroflora (safra) boşaltımı.

Aren oksit metaboliti için merkapturik asit oluşumu, glutatiyon konjugasyonu tarafından başlatılır. γ -glutamil-transpeptidaz tarafından glutamatın uzaklaştırılmasını, sisteinil-glisin-dipeptidaz tarafından glisinin ayrılması takip eder. Bu iki enzim de karaciğer ve böbrekte mevcuttur. Son adımda amino grubu N-asetil-transferaz tarafından asetillenir (Şekil 3.3) (Pickett and Lu, 1989).



Şekil 3.3 Glutatiyon konjugatlarının metabolizması.

Glutatiyon, birçok fonksiyonunun yanı sıra potansiyel olarak toksik elektrofilik bileşiklerin uzaklaştırılması için, vücut içindeki koruyucu araç olarak tanınır. Faz I reaksiyonları tarafından metabolize edilen ilaçların çoğu kuvvetli elektrofildir ve bunlar non-toksik bileşiklere oluşturmak için glutatiyonla reaksiyona girerler. Glutatiyon-s-transferaz katalizörlüğünde glutatiyonla birleşen bileşiklere epoksitler, haloalkanlar, nitroalkanlar, alkenler ve aromatik nitro bileşikler örnek olarak verilebilir. Reaksiyon örnekleri aşağıda verilmiştir (Jakoby, 1985).



2,4-dinitro-1-klorobenzen

Önceleri glutatyon-s-transferazların nükleofilik ataklarının, direkt elektrofilik karbon atomlarına olduğu düşünülüyordu. Fakat sonra, nitrat

esterlerindeki elektrofilik azotun, organik tiyosiyanatlardaki sülfür ve disülfürlerin ve organik hidroperoksitlerdeki oksijenin, alternatif hedef olarak hizmet ettikleri saptanmıştır. Glutatyon-s-transferazların bazı substratlara karşı spesifiklikleri ispatlanmıştır. Örneğin, alfa sınıfı glutatyon-s-transferazlar kümen hidroperoksitler için spesifiktir. Mu sınıfı glutatyon-s-transferazlar epoksitleri tercih ederler. Pi sınıfı glutatyon-s-transferazlar ise etakrinik aside karşı yüksek reaktivite gösterirler. Fakat bu sınıflandırma yanıltıcı olabilir. Örneğin fareden elde edilen alfa sınıfı GST alfatoksin B₁-8,9-epoksite karşı yüksek reaktivite sergiler (Wilce and Parker, 1994).

Yukarıdaki konjugasyon reaksiyonlarını katalizleme yeteneklerinin yanı sıra bazı glutatyon-s-transferazlar (örneğin GST B veya ligandin), değişik endojen ve eksojen substratları bağlama yeteneğine sahiptir (Gibson and Skett, 1986).

Çizelge 3.2 GST'ların bağlama ve konjugasyon fonksiyonları.

1) Bağlama Fonksiyonu	2) Konjugasyon Fonksiyonu
Bilurubin	Vitamin K ₃
Oestradiol	Oestradiol – 17 β
Kortizol	Parasetamol
Testosteron	Sülfobromoftalein
Testasiklin	Paratyon
Penisilin	Uretan
Etakrinik asit	1-kloro-2,4-dinitrobenzen

Bitki glutatyon-s-transferazları, daha çok toksik eksojen (ksenobiotik) veya endojen (doğal) bileşiklerin glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu katalizlemeleri açısından tartışılmışlardır. Fakat bitki

glutatyon-s-transferazlarının auksin bağlama, oksidatif streten hücrel koruma, nonenzimatik bağlama ve transport (ligandin fonksiyonu) gibi farklı fonksiyonları da vardır. Bu fonksiyonlar, bitkinin savunma sistemi için esansiyel elemanlardır.

Pek çok bitki glutatyon-s-transferazları, hücrel elemanları korumak için oksidatif strese tepki verirler. Oksidatif stres süresince hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri veya süperoksit radikalleri gibi aktif oksijen türleri, öldürmek veya hasar vermek için saldırgan patojenleri meydana getirirler. Bunların meydana gelişinin yaralanma, patojen hücumlar, ozon etilen veya ağır metaller tarafından teşvik edildiği bilinmektedir. Aktif oksijen türlerinin üretiminin en zararlı etkisi, membran lipidlerinin peroksidasyonudur. Bitkilerde, savunma mekanizması olarak H_2O_2 'lerin glutatyon-s-transferazların transkripsiyonunu teşvik ettikleri gösterilmiştir (Neuefeind et al., 1997).

Lamourreux ve Rusness'in 1993'deki makalelerinde, yüksek bitkilerin otuz üç türünde GST enzim aktivitesinin gözlemlendiği aktarılmaktadır. Son incelemeler, bu listenin fungi, yosun ve algleri de içeren alçak bitkilerin de en azından yirmi türünü içerecek şekilde genişletilebileceğini ortaya çıkarmıştır (Brighton Crop Protection Conference – Weed, 1995).

Bitkilerde, glutatyon-s-transferazların (GST) sınıflandırılması hakkındaki bilgiler yetersizdir. Ancak bitki GST' ları karakterize etmek için onların fiziksel karakterlerine ve substrat spesifikliklerine dayanan çalışmalar son yıllarda sıklıkla üzerinde durulan konulardır (Neuefeind et al., 1997)

4. İMMOBİLİZE ENZİMLER

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden, suda çözünür spesifik biyokatalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istendiği anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için ortama inhibitör katılabilir. Fakat serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün ya da ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi, reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan, enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Tüm bu sorunlardan dolayı, enzimleri endüstriyel açıdan daha çekici hale getirmek için, enzimler suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak ilave edilmesiyle, suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsülde tutuklanarak immobilize edilirler (Telefoncu, 1986; Telefoncu, 1997).

İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir. Çizelge 4.1’de immobilize enzimlerin serbest

enzimlere göre üstünlükleri verilmiştir (Telefoncu, 1997; Monsan and Combes, 1988; Shah and Shah, 1992).

Çizelge 4.1 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri.

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi söz konusu değildir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterir.
- Enzimin kendi kendisini parçalaması (otoliz) olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkan verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar; üretim kaybı azalır.

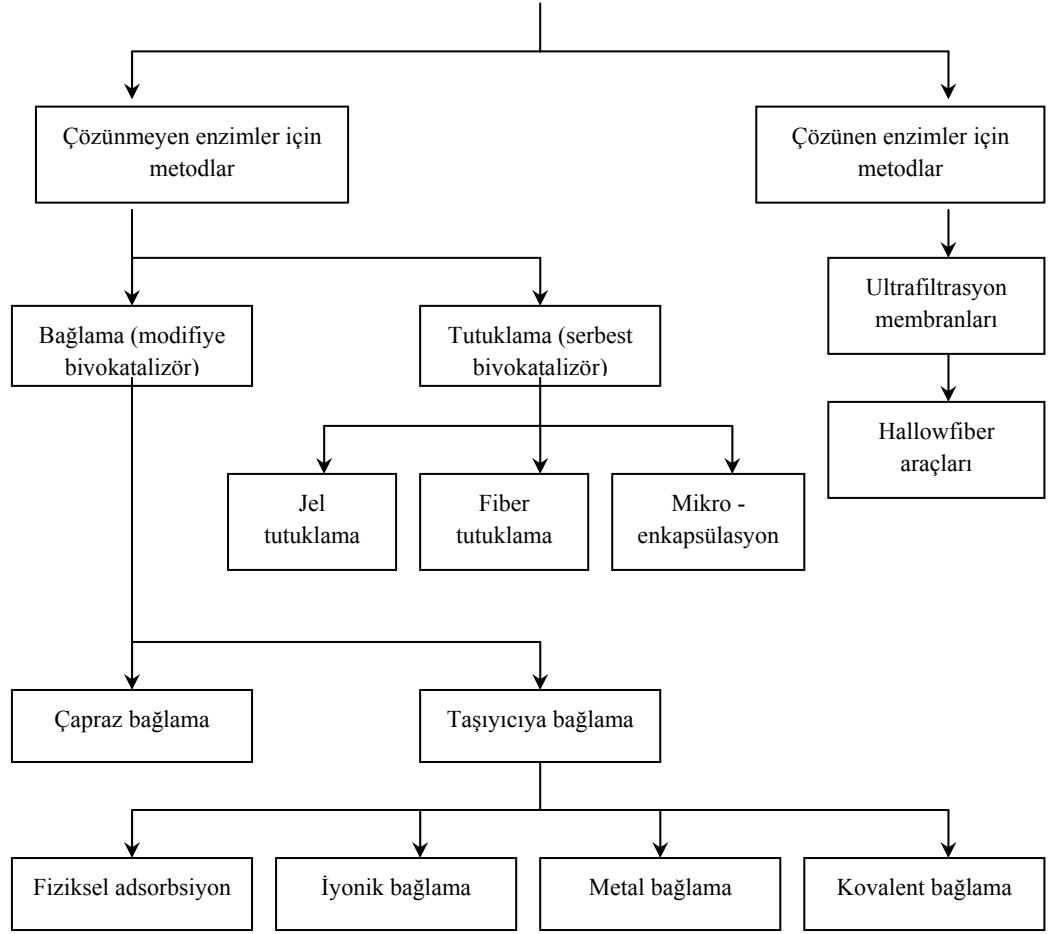
4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Bir enzimin immobilizasyonunda önemli olan bağlanma metodunun seçimidir. Bu bağlanmada, enzimin kimyasal doğasının değişimi veya enzimin bağlanma bölgesindeki reaktif grupların değişimi ile enzimin aktivite kaybetmesi önlenmelidir. Diğer bir deyişle, enzim mümkün olan en düşük hasarla bağlanmalıdır. Enzimin aktif bölgesindeki önemli bilgi, bu görevin başarılmasında yarar sağlayacaktır. Enzimin esansiyel bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyondan kaçınılması istenmektedir. Alternatif olarak, bağlanma sırasında aktif bölge enzim aktivitesini kaybetmeksizin uzaklaştırılabilecek uzun koruyucu gruplar ile korunabilir. Bazı durumlarda koruyuculuk fonksiyonu bir substrat veya enzimin bir yarışmalı inhibitörü tarafından yerine getirilebilir.

İmmobilize enzimin yüzeyi, enzim içerisindeki hidrojen bağlarında veya elektron geçiş komplekslerinin oluşumunda, yapının muhafaza edilmesinden sorumludur. Yüzeyin ve enzimin mikro çevresi yüklere sahiptir. Bu da enzimin optimum pH'dan 2 pH birimi değişebilmesini sağlar. Enzimin etkili çalışabilmesinde pH bölgesinin geniş olması büyük yarar sağlar.

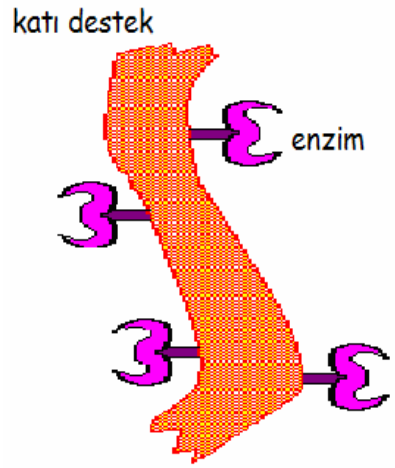
Etkileşimin ve kullanılan desteğin özellikleri esas alınarak enzim immobilizasyon metotlarının sınıflandırılması yapılmıştır (Rosevear et al, 1987).

Enzim İmmobilizasyon Metodları



4.1.1. Taşıyıcıya bağlama ile immobilizasyon

Taşıyıcıya bağlama metodu, enzimler için kullanılan en eski metottur. Bu metotta enzimin bir kısmı taşıyıcıya bağlanır ve immobilizasyon sonrası aktivite taşıyıcının doğasına bağlıdır. Şekil 4.1 de enzimin taşıyıcıya nasıl bağlandığı gösterilmektedir (Goel., 1994).



Şekil 4.1 Taşıyıcıya bağlama.

Taşıyıcının seçimi, enzimin doğasına bağlıdır. Taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır:

- Partikül büyüklüğü
- Yüzey alanı
- Hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranı
- Kimyasal kompozisyon

Genellikle, hidrofilik grupların oranındaki ve bağlı enzimlerin konsantrasyonundaki artışlar immobilize enzimin aktivitesini artırır. Çok kullanılan taşıyıcılardan bazıları sellüloz, dekstran agaroz ve poliakrilamid jel gibi polisakkaritlerdir.

Bağlanma şekillerine göre, taşıyıcıya bağlama alt gruplara ayrılır:

- Fiziksel adsorbsiyon
- İyonik bağlama
- Kovalent bağlama
- Metal bağlama

4.1.1.1. Fiziksel adsorbsiyon ile immobilizasyon

Enzim immobilizasyonu için kullanılan bu metod, suda çözünmeyen taşıyıcının yüzeyinde enzim proteininin fiziksel adsorpsiyonuna dayanır. Bu nedenle bu metodla enzimin konformasyonel değişimi veya aktif merkezinin yıkımı ya hiç gerçekleşmez ya da çok az olur. Uygun taşıyıcı bulunduğunda metod basit ve ucuzdur. Fakat bu yöntemin de bazı dezavantajları vardır. Adsorplanan enzim, enzim ve taşıyıcı arasındaki zayıf bağlar nedeniyle, kullanım sırasında taşıyıcıdan kaçabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan genel metotlardan biri olan adsorbsiyonun en büyük avantajı, aktivasyon adımlarının genellikle hiç veya sadece bir tane reaktif gerektirmesidir. Adsorbsiyon, kimyasal bağlanmaya nazaran enzimatik protein için daha az yıkıcıdır. Çünkü bağlanma hidrojen bağları, çeşitli tuz bağları ve Van der Waals kuvvetleri ile olmaktadır. Bu oranda metod, doğal biyolojik membranlardaki yapıyla büyük benzerlik gösterir (Goel, 1994).

Zayıf bağlar içerdiğinden sıcaklık, pH, iyonik şiddet değişimlerinde veya sadece substratın varlığında bile proteinin desorpsiyonu sıklıkla gözlenmiştir. Diğer bir dezavantajı nonspesifik

oluşudur. Diğer proteinlerin veya diğer maddelerin daha fazla adsorbsiyonu gerçekleşebilir. Bu da immobilize enzimin özelliklerini değiştirebilir.

Enzimin adsorbsiyonu kovalent reaksiyonları kolaylaştırmak için gerekli olabilir. Matrikste geçici olarak adsorbe edilen enzimin stabilizasyonu, enzimin çapraz bağlanması ile gerçekleştirilebilir.

4.1.1.2. İyonik bağlama ile immobilizasyon

İyonik bağlama metodu, yüklü grup içeren suda çözünmez taşıyıcıya enzim proteininin iyonik bağlanmasıdır.

İyon değişim merkezleri içeren polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılırlar. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kolaydır ve koşulları kimyasal bağlanma için gerekenden daha ılımlıdır. Bu nedenle iyonik bağlama metodu, enzimin aktif bölgesinde ve konformasyonunda daha az değişikliklere sebep olur. Bu yüzden bu metot pek çok durumda immobilize enzimlerde yüksek aktivite sağlar.

Substrat çözeltisinin yüksek iyonik şiddeti veya pH değişikliğinde enzim taşıyıcıdan ayrılabilir. Çünkü enzim proteini ve taşıyıcı arasındaki kuvvetler, kovalent bağlanmadan daha zayıftır.

İyonik bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon arasındaki ana fark, iyonik bağlanmadaki bağların kovalent bağdan zayıf, fiziksel adsorbsiyondan kuvvetli olmasıdır (Goel, 1994).

4.1.1.3. Kovalent bağlama ile immobilizasyon

İmmobilizasyon teknikleri arasında en fazla çalışılan tekniktir. İmmobilizasyon için iki şeye dikkat edilir:

1. Bağlanma reaksiyonu, enzimatik aktivitenin azalmasına sebep olmayacak şartlarda gerçekleşmelidir.
2. Enzimin aktif merkezi, kullanılan reaktiflerden etkilenmemelidir.

Kovalent bağlama metodu, enzimin suda çözünmez bir taşıyıcıya kovalent bağlarla bağlanması esasına dayanır. Bağlanmada yer alabilecek fonksiyonel gruplar aşağıda listelenmiştir:

- Amino grubu
- Karboksil grubu
- Sülfidril grubu
- Hidroksil grubu
- İmidazol grubu
- Fenolik grup
- Tiol grubu
- Treonin grubu
- İndol grubu

Bu metod, bağlanma şekillerine göre diazo, peptid ve alkilasyon metotları gibi daha ileri sınıflara ayrılabilir. Kovalent bağlama ile

immobilizasyon için koşullar, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlamaya göre daha az zarif ve daha komplikedir. Bu nedenle kovalent bağlama enzimin aktif merkezini ve konformasyonel yapısını değiştirebilir. Bunun sonucu olarak substrat değişebilir ve/ veya aktivitenin büyük bir kısmı kaybedilebilir. Fakat enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvveti oldukça güçlüdür. Substratın varlığında veya iyonik şiddeti yüksek çözeltide bile enzim ayrılmaz.

Bir desteğe kovalent bağlanma, sadece enzimin fonksiyonel gruplara sahip olmasını gerektirir –ki bu gruplar katalitik reaksiyon için esansiyel değildirler. Aktif bölgenin amino asit artıkları ile inaktivasyon reaksiyonlarının engellenmesiyle yüksek aktivite görülür. Birkaç koruyucu metot aşağıda sıralanmıştır:

- Kompetitif inhibitör veya substrat varlığında enzimin kovalent bağlanması
- Tersinir, kovalent bağlı enzim inhibitör kompleksi
- Yeni artıkların birleştirilmesiyle elde edilmiş, matrikse kovalent bağlı kimyasal olarak modifiye edilmiş çözünür enzim
- Bir zimojen prekürsör

Bu nedenle kovalent bağlanma aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Diazotizasyon : $\text{DESTEK--N=N--ENZİM}$
- Amid bağı oluşumu : $\text{DESTEK--CO-NH--ENZİM}$
- Alkilasyon ve arilasyon: $\text{DESTEK--CH}_2\text{-NH-ENZİM}$
 $\text{DESTEK--CH}_2\text{-S--ENZİM}$
- Schiff bazı oluşumu : $\text{DESTEK--CH=N--ENZİM}$
- Amidasyon reaksiyonu : $\text{DESTEK--CNH-NH--ENZİM}$
- Tiol-disülfid değişimi : $\text{DESTEK--S-S--ENZİM}$
- UGI reaksiyonu
- Civa-enzim değişimi
- Bağlanmayı teşvik eden gamma aydınlatması
- Bifonksiyonel artıklarla taşıyıcıya bağlama :



Enzimin aktif bölgesi engellenmemelidir. Enzim ve taşıyıcı arasında uzun mesafe olmalıdır (Goel, 1994).

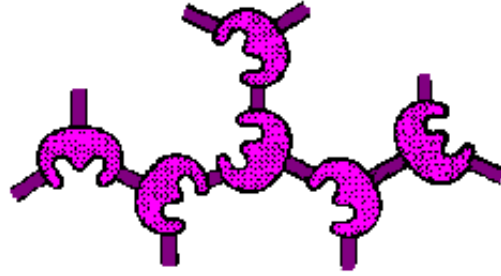
4.1.1.4. **Metal bağlama ile immobilizasyon**

Bu metod, geçiş metalleri (titanyum, zirkonyum vb.) nin şelat yapma özelliğine dayanır. Enzimatik olarak aktif türevlerin oluşumu; enzimde, metal grupları ile etkileşime girebilecek artık grupların varlığına, bu gruplar ve titanyum atomları arasında birleşmeye izin verecek sterik faktörlere, enzimin aktif bölgesine bazı grupların

yerleşimine ve enzim moleküllerinin polimer matrikse yakınlığına bağlıdır.

4.1.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Bu metot, enzim molekülleri arasında molekül içi veya moleküller arası kovalent bağ oluşturulması ile geniş çözünmez agregatlar oluşturulmasını içerir (Şekil 4.2). Bu agregatlar, glutaraldehit gibi bi veya multifonksiyonel reaktiflerin varlığında oluşturulur.



Şekil 4.2 Çapraz bağlama.

İstenmeyen aktivite kayıpları, immobilizasyon için etkileşimlerde katalitik grupların iştirakiyle artabilir. Çapraz bağlama ile immobilizasyon için optimum şartlar;

- Enzimin doğası ve konsantrasyonu
- Çapraz bağlayıcı reaktifin doğası ve konsantrasyonu
- pH
- İyonik şiddet
- Sıcaklık

- Reaksiyon süresidir.

İmmobilize enzim prosedürü basit ve hızlıdır ve sadece bi veya multifonksiyonel reaktifin varlığını gerektirir.

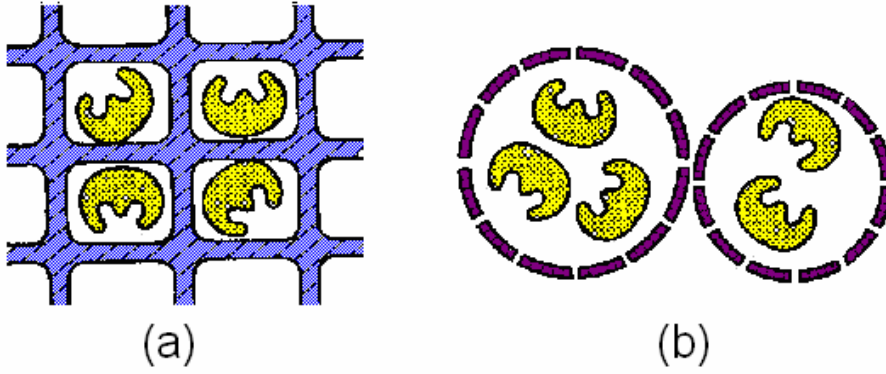
Metodun ana dezavantajları;

- Çapraz bağlama reaksiyonu kolay kontrol edilemez ve bu nedenle yüksek aktivite gösteren büyük enzim agregatları oluşturmak çok zordur.
- İmmobilize enzimin hazırlanmasında kullanılan jelin fiziksel yapısı, uygulamada büyük sınırlamalar getirir.
- Çapraz bağlama reaksiyonları sert şartlarda gerçekleştirilir. Sert koşullar enzimin aktif merkezinin konformasyonunu değiştirebilir ve bu da enzimin aktivitesinin önemli bir kısmını kaybetmesine yol açabilir.

Çapraz bağlama için kullanılan en yaygın reaktif glutaraldehittir. Bu immobilizasyon metodu, diğer metodlarla birleştirilerek de kullanılabilir.

4.1.3. Tutuklama ile enzim immobilizasyonu

Tutuklama metodu ile immobilizasyon, enzimin polimer bir matriks veya membran kafesinde lokalizasyonu temeline dayanır. Substratın içeri girmesine izin verilirken protein dışarı çıkamaz. Tutuklama, matrikste tutuklama (kafes) ve yarı geçirgen membranda tutuklama (mikrokapsül) tipleri olarak sınıflandırılabilir.



Şekil 4.3 (a) Matrikste tutuklama, (b) Yarı geçirgen membranda tutuklama.

Bu metodun kovalent bağlama ve çapraz bağlamadan farkı, enzimin jel matriksine veya membrana bağlanmayışıdır. Bu da geniş uygulama alanları açmaktadır. Kimyasal polimerizasyon reaksiyonunda kullanılan şartlar bağl olarak serttir ve enzim aktivitesinin kaybedilmesiyle sonuçlanır. Bu nedenle çeşitli enzimlerin immobilizasyonu için en uygun yöntemin seçilmesine dikkat edilmelidir.

Kafes tipi tutuklama, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerin boşluklarında enzimin tutuklanmasıdır. Poliakrilamid, polivinilalkol gibi bazı sentetik polimerler ve nişasta gibi doğal polimerler, bu teknikle immobilize enzim hazırlanmasında kullanılmaktadırlar.

Mikrokapsül tipi tutuklama, enzimin yarı geçirgen polimer membranla sarılmasıdır. Enzim mikrokapsülünün hazırlanması, çok iyi kontrol edilmiş şartlar gerektirir.

Polimer matrikste mikrokapsülasyon, son yıllarda endüstride, tarımda, tıpta, eczacılık ve biyoteknolojide artan bir şekilde kabul görmektedir. Tıpta ve eczacılıkta istenmeyen tat ve kokuların

maskelenmesi, ilaç salınımının kontrolü, gastrik sıvılar gibi saldırgan vücut sıvılarından ilaçların korunması, hücrelerin immüno izolasyonu amacıyla ve immün denemelerde kullanılmaktadır (Shu and Zhu, 2000).

4.2. Kitosan

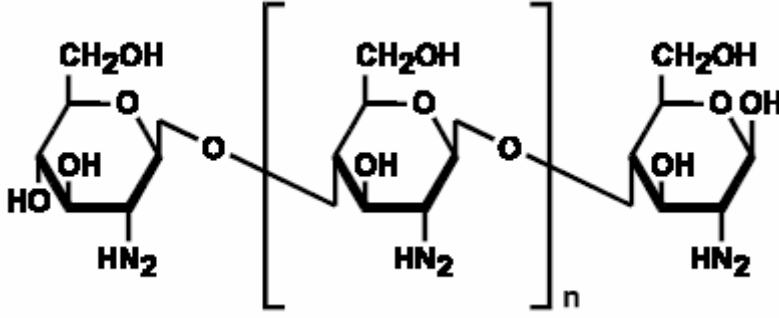


Kitin, selüloz gibi çok bulunan bir biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuğu çıkarılan kabuklularda, böceklerin üst kütikula tabakasında, ayrıca bazı fungi ve mikroorganizmaların hücre duvarlarında bulunur.

Kitin, 2-asetamido-2-deoksi-(1-4)- β -D-glukopiranoz artıklarından (N-asetil-D-glukozamin üniteleri) oluşur. Bunlar intra- ve inter- hidrojen bağları içerirler. Kitin sert, bükülmez, kristal yapısından dolayı suda çözünmez (Sugimoto et al., 1998).

Kitosan, bir $\beta(1 \rightarrow 4)$ bağlı 2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz kopolimeridir. Bu polikasyonik biyopolimer genellikle kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile elde edilir.

İnorganik asitler, kitosan için mükemmel çözgenlerdir. Fakat bu asitler degrade edicidirler ve özellikle medikal uygulamalarda tamamen uzaklaştırılmazlarsa bazı problemlere neden olabilirler.



Şekil 4.4 Kitosanın yapısı.

Kitosan günümüzde medikal ve farmasötik uygulamaları için çok dikkat çekmektedir. Bu ilginin artmasının ana sebebi, şüphesiz kitosanın doğal özellikleridir. Kitosan, aşılama ve enjeksiyon gibi güncel medikal uygulamalardaki biyoyumluluğu ile bilinmektedir. Ayrıca kitosan, lizozim gibi enzimler tarafından metabolize edilebildiklerinden biyobozunurdurlar. Fizyolojik pH daki pozitif yükleri nedeniyle, kitosan aynı zamanda biyo yapışkan (bioadhesive)dır. Yani uygulamanın olduğu bölgede alıkonmayı artırır. Kitosan ayrıca bakteristatik etkilere sahiptir ve yaranın iyileşmesini hızlandırır. Doğada bol miktarda bulunur, üretimleri düşük maliyetlidir ve ekolojik olarak ilgi çekicidirler (Berger et al., 2003).

Kitosan, atık suların işlenmesinde flokülant olarak görev yapar. Meyve suları ve şarabın işlenmesi amacıyla yiyecek endüstrisinde kullanılır. Kitosanın antifungal aktivitesi ve bitkilerde metabolik değişimi iletme yeteneği, filizlenmenin artmasını sağlayarak daha çok ürün elde edilmesine olanak verir. Kitosan mükemmel bir film oluşturma yeteneğine sahiptir. Kitosanın biyoyumlu, biyobozunur, nontoksik ve

mucoadhesive polimer oluşu, onu tıp ve eczacılık alanlarında çekici kılmaktadır. Bitkilerde ve böceklerde kitosanaz, memelilerde ise lizozim ile bozunur. Lipaz, insan gastrik ve pankreatik sıvılarında ve tükürükte bulunan bir enzimdir ve kitosanı degrade edebilir. Kitosanın enzimatik bozunma ürünleri nontoksiktir. Kitosan iyi bir haemostatik ajandır. Fakat sülfatlı türevleri antikoagülan aktivite sergiler. Kitosanın hipokolesterolemik ve hipolipidemik olduğu da bilinmektedir. Antimikrobiyal, antiviral ve antitumoral aktiviteye sahiptir. Kitosanın immunoadjuvan aktivitesi de onaylanmıştır. Bütün bu özellikler kitosan ve türevlerinin cerrahi dikiş, biyobozunur sünger ve bandajlar gibi biyomedikal alanda, ilaç salınımı için matrikslerde (mikrokürelerde, mikrokapsül ve membranlarda ve sıkıştırılmış tabletlerde), ortopedik materyallerde ve dişçilikte uygulama alanı bulmasını sağlamıştır (Rosevear et al., 1987).

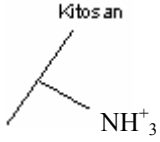
Kitosan çözeltisinin ($\text{pH} < 6$) farklı çok değerlikli toplayıcı iyonla birlikte kullanılmasıyla jel oluşur. Kitosan çözeltisi, pH 'sı 6'dan küçük çapraz bağlayıcı çözeltiye damlatıldığında iyonotropik jel oluşur. Kitosanın $-\text{NH}_2$ grupları protonlanır ve iyonik çapraz bağlar meydana gelir. 7,5'tan büyük pH 'lı çapraz bağlı çözeltide de boncuk oluşur. Ancak iyonotropik jel oluşumu başlangıçtaki gibidir. Kitosan kürelerinin pH 'sı 7,5'tan da büyük olabilir. Bu durumda çökelme oluşur. 7,5'tan büyük pH 'larda kitosan tamamen deprotonlanır ve suda çözünmez (Vorlop and Klein, 1987).

Kitin ve kitosan biyolojide ve tıpta kan kolesterol seviyesinin kontrolü, kanın koagülasyonu, yara iyileşimini hızlandırmak ve yanık

tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kontakt lens üretiminde de kullanılmaktadır. Kitosan, insan vücudu tarafından sindirilemez. Bu yüzden alınan miktar kaloriyi arttırmaz.

Kitosanın yüksek molekül kütleli toplayıcı iyonlarla çapraz bağ yapması sonucu kapsüller oluşurken, düşük molekül kütleli toplayıcı iyonlarla kürecikler oluşur. Böylece proteinler bir ağda tutuklanmış olur. Aşağıda kitosanın iyonotropik jelatasyonu için kullanılabilecek toplayıcı iyonlar tablo halinde verilmiştir (Vorlop and Klein, 1987).

Polikasyon



Polianyon

● Düşük molekül kütleli

Pirofosfat

Tripolifosfat

Tetrapolifosfat

Oktapolifosfat

Hegzametafosfat

[Fe(CN)₆]⁴⁻

[Fe(CN)₆]³⁻

● Yüksek molekül kütleli

Poli(1-hidroksi-1-sülfonat-2-propen)

Poli(aldehit karbonik asit)

Aljinat

PGA

Kitosan, mükemmel biyobozunur ve biyouyumlu karakteri olan doğal bir polisakkarittir. Katyonik karakteri, jel ve film oluşturma özellikleri nedeniyle kitosan, ilaç salınım sistemlerinin gelişmesindeki potansiyeli nedeniyle ilaç endüstrisinde geniş bir biçimde incelenmiştir. Son zamanlarda özellikle peptid ve protein ilaç salınımı için kontrollü bir ilaç serbest bırakıcı olarak kitosan boncuklarının hazırlanması için, zıt yüklü makro moleküller arasında kompleksleşmenin kullanımı dikkat çekicidir. Çünkü bu proses çok basittir ve ılımlı koşullarda gerçekleşir. Ayrıca kimyasal çapraz bağlanma yerine, elektrostatik etkileşimlerle tersinir fiziksel çapraz bağlanma reaktifi ve diğer istenmeyen etkilerin toksikliğinden sakınmak için uygulanır.

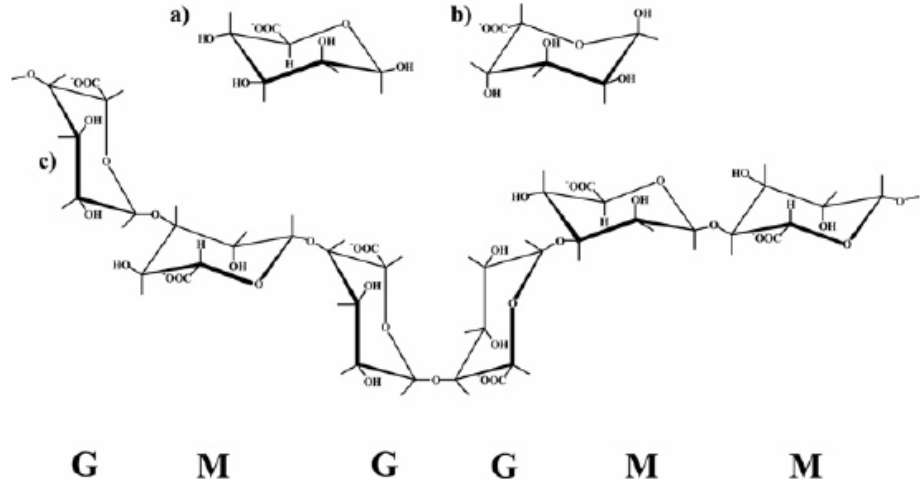
TPP bir polianyondur ve elektrostatik kuvvetlerle katyonik kitosanla etkileşebilir. 1989 yılında Bodmeir ve arkadaşlarının kitosanı TPP çözeltisine damlatarak TPP/kitosan kompleksi hazırladıklarını rapor ettiklerinden beri, pek çok araştırmacı potansiyel farmasötik kullanımını araştırmaktadır. Fakat bu kitosan boncuklarının mekanik özellikleri zayıf olduğundan, farmasötik endüstrisindeki kullanımı hala sınırlıdır. TPP/kitosan boncuklarını, boncuk yüzeyinde bir polielektrolit kompleks film oluşturarak sodyum aljinatla kaplayıp kuvvetlendirmişlerdir. [(Shu and Zhu, 2000) Aral ve Akbuğa (1998)].

4.3. Aljinat

Aljinat özellikle Kuzey Atlantik'teki kayalık kıyılarda (ABD, Norveç, İngiltere, İsveç) çok yaygın bulunan kahverengi deniz alglerinin önemli polisakkaridi olup, 1,4 bağlı β -D- mannopiranozil üronat ve α -L- gulupiranozil üronat ihtiva eder Farklı seviyelerde de olsa, bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunurlar. Aljinatın yapısı ve molekül ağırlığı kullanılan algin cinsine, yaşına, bölümlerine ve aljinatın ekstraksiyon işlemlerine göre değişir. İntrasellüler aljinat jel matriksi bitkilere mekanik kuvvet ve esneklik verir. Açık denizlerde yetişen *L. Hyperbore* alginin gövdesinde dokulara yüksek mekanik sertliği veren guluronik asit çok yüksek bir hacme sahiptir. Aynı algin su yüzeyinde duran ince uzun yaprakları daha esnek bir yapı sağlayan düşük guluronik asit içeriği ile karakterize edilen bir aljinata sahiptir.

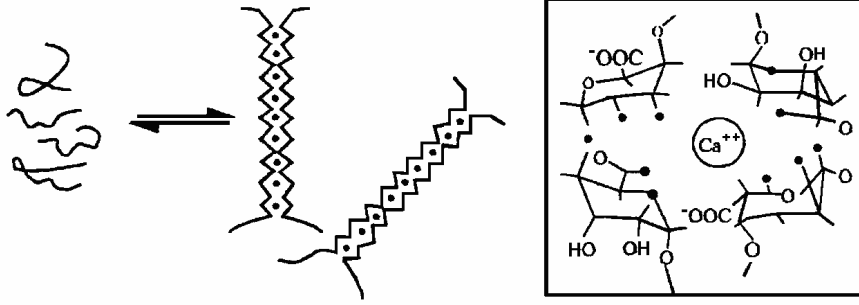
Aljinat alglerde kalsiyum tuzu şeklinde bulunur ve hücre zarında iyon değiştirici olarak etki eder. Son zamanlarda fermentatif olarak *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Azobacter vinelendi* ile aljinat üretimi gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak piyasaya daha çok sodyum-aljinat formunda sunulmaktadır. Sodyum-aljinat gıda endüstrisinde jel yapıcı, stabilizatör ve koyulaştırıcı madde olarak çok kullanılır. Aljinik asit, β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asidin 1→4 glikozid bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir kopolimerdir (Davis et al., 2003). Mannuronik asit-guluronik asit oranı türe, mevsimine ve algin yetiştiği bölgeye göre değişmektedir. Aljinatlar multiblok kopolimerler

olup $(\beta -1 \rightarrow 4)$ -L -guluronik asit (G-bloğu) ve karışık bloklardan (MG-bloğu) oluşmaktadır (Şekil 4.5)



Şekil 4.5 Aljinatın yapısı (a) β -D-Mannuronik asit (M) (b) α -L-Guluronik asit (G)
(c) Kopolimer bloğu.

Genellikle G bloğu oranı yüksek aljinatlar basınca dayanıklı fakat kırılğan jel oluştururken G bloğu oranı düşük aljinatlar basınca az dayanıklı ama esnek karakterde jel oluştururlar . Monovalent katyonların varlığında, düşük konsantrasyonlarda bile polisakkarit viskoz bir çözelti oluşturur. Tersine, divalent katyonların varlığında (özellikle kalsiyum) jelleşme olur. Jelleşme ılımlı koşullar altında gerçekleştiği için bu matriks içerisinde tutuklama, canlı hücrelerin hareketsizleştirilmesi için çok uygundur ve bu alanda geniş uygulama alanı bulmuştur Kalsiyum-aljinat jellerinin yapısı Rees ve Welsh tarafından detaylıca araştırılmıştır. Rees, kalsiyum-aljinat için yumurta kartonu yapısını önermiştir



Şekil 4.6 Kalsiyum-aljinat jelinin yapısı.

Şekil 4.6'da kalsiyum-aljinat için Rees tarafından önerilen yapı verilmiştir. Bir kalsiyum iyonu dört gluronat artığı ile koordinasyon yapmaktadır. Zincirler arasında kalan boşluklar kalsiyum iyonu ve bu iyondan daha büyük diğer iki değerli iyonların koordinasyon bağı oluşturmaya imkan verir .

Kalsiyum iyonlarının bağlanması sırasında oluşan iç zincir köprülerini oluşturmada otokooperatif etkilerin önemli olduğu öne sürülmektedir. Bu köprülerin oluşumu bazı bitişik guluronatların varlığında gerçekleşmektedir. Rees, kalsiyum iyonlarının solüsyona difüzlmesi sırasında öncelikle G-bloklarının etkilendiğini sonra değişken dizilere sahip olan M-bloklarının etkilendiğini göstermiştir. Aljinatın iki değerlikli metal iyonları ile jel oluşturma eğilimi özellikle kalsiyum gibi divalent katyonlar varlığında katılaşma aşağıdaki sıraya göre azalır .

Pb>Cu>Cd> Ba> Sr>Ca>Co> Ni> Zn> Mn

Ayrıca bazı üç değerli metal iyonları (Fe, Al) da aljinat jeli oluşturmaktadır . Aljinat çözeltisi Ca^{+2} gibi polivalent metal katyonları varlığında kolayca jelleştiği için, Ca-aljinat jeli tüm mikrobiyal (Kierstan and Bucke, 1977) ve bitkisel hücrelerin immobilizasyonunda da taşıyıcı olarak sık sık kullanılır. Aljinatın ucuz ve non-toksik oluşu, boncukların ılımlı koşullar altında hızlıca hazırlanması bir avantajdır. Aljinat çözeltisinin konsantrasyonunu arttırmak ve bir noktaya kadar, CaCl_2 çözeltisinininkini artırmak daha sıkı "çapraz-bağlanmış" jellerin oluşmasına neden olur. Fakat, dikkat edilmesi gereken nokta yüksek konsantrasyonlu aljinatlar ile çalışmanın zorluğudur. Kalsiyum aljinat sistemleri kullanılırken 10 mM kalsiyum klorürün işleyen sisteme ilave edilmesi tavsiye edilir. Fosfat ve sitratlar gibi şelatlama reaktiflerinin kalsiyuma tutunarak jel yapısını bozma ihtimali olduğu için bunlardan kaçınmak gereklidir.

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Materyal

Glutatyon-s-transferaz kaynağı olarak kullanılan koyun karaciğeri Tansaş kesimhanesinden (Buca-Kaynaklar) temin edildi. Karaciğerin depolanmasında -86 °C ULT Freezer (Thermo Electrocorporation Forma-USA) kullanıldı.

Glutatyon-s-transferaz enziminin (EC 2.5.1.18) karaciğerden ekstraksiyonunda, homojenizasyon işlemi için Braun (Germany) marka blender kullanıldı. Fraksiyonlama işlemi Hettich Universal 30 RH marka soğutuculu santrifüjle gerçekleştirildi. Enzimatik aktivite ve protein tayinleri için gerekli absorbans ölçümleri Jasco V 500 UV/vıs spektrometre (Japan) ile yapıldı. İnkübasyon işlemlerinde Clifton (England) model çalkalayıcı su banyosundan yararlanıldı.

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), glutatyon (GSH), sığır serum albumini (BSA), 1-1'-karbonil diimidazol (CDI), 1-etil-3-(3-dimetil amino propil)karbodiimid (EDC), kitosan, aljinat, poli galakturonik asit (PGA), poli etilen glikol (PEG), tri poli fosfat (TPP), Tris Sigma (Chem. Co St. Louis, USA) firmasından sağlandı. Sodyum sitrat, sodyum borat, E. Merck (Darmstad, Germany) firmasından; sükroz, CaCl₂, metanol, fosforik asit Riedel-de Haën (Germany) firmasından sağlandı.

Çalışmalarda kullanılan diğer genel kimyasallar analitik saflıkta olup, lokal firmalardan temin edildi.

5.2. Glutatyon-s-transferaz'ın Koyun Karaciğerinden Ekstraksiyonu

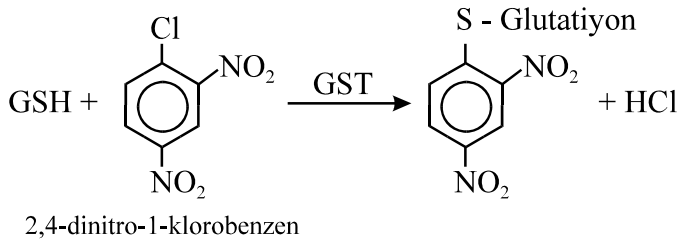
Glutatyon-s-transferaz enzimince zengin preparatın hazırlanması amacı ile koyun karaciğeri kullanıldı. Koyun karaciğeri kesim sırasında alındı ve distile su ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdı ile nemi alındı. Küçük parçalara ayrılıp, kullanılıncaya kadar -80°C 'de depolandı. Dondurulan karaciğer parçaları tartıldı. Ağırlığının 3 katı hacminde 0,25 M süktroz içeren 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu ilave edilerek önce blender, sonra homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. Homojenat 10.000 rpm 'de 20 dakika, 4°C 'de santrifüjlendi. Santrifüjat, cam pamuğundan süzülerek 8 mM'lık CaCl_2 yavaş yavaş ilave edildi. 10.000 rpm 'de 20 dakika 4°C 'de santrifüjlendi. Süpernatant (sitozol) ve pellet (mikrozom) fraksiyonlarında enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

Mikrozom (pellet), çok az miktarda 0,15 M pH 8,0 Tris-HCl tamponunda çözüldü. Hem sitozol hem de mikrozomda yapılan aktivite ve protein tayinleri sonucu sitozol kısmın spesifik aktivitesinin mikrozoma göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle immobilizasyon çalışmalarında sitozol kısmı kullanıldı. Hazırlanan preparat -20°C ' de daha sonraki immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere depolandı.

5.3. Glutatyon-s-transferaz Aktivite Tayini

Glutatyon-s-transferaz aktivite ölçümlerinde Habig yöntemi (Habig et al., 1974) kullanıldı. Yöntem 1-kloro-2,4-dinitrobenzen, GST

enzimi ve glutatyonun reaksiyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutatyon konjugatının 340 nm’de absorpsiyonunun ölçülmesine dayanır. Oluşan ürünün ekstinksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ’dir.



Aktivite tayini için gerekli olan reaktifler:

CDNB	: 30 mM CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen)
Fosfat Tamponu	: 100 mM, pH 7,0
TCA Çözeltisi	: % 33 TCA (trikloro asetik asit)
GSH Çözeltisi	: 26 mM GSH (Glutatyon) 8mg/ml (Her deneme için taze hazırlandı)

Çizelge 5.1 Aktivite ölçüm yöntemi.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Fosfat Tamponu (100 mM pH 7,0)	2,7	2,8
Enzim preparatı (0,25 mg protein)	0,1	–
CDNB (30 mM)	0,1	0,1
GSH (26 mM)	0,1	0,1
5 dakika 30 °C'lik su banyosunda inkübasyon		
TCA (% 33)	0,2	0,2
340 nm'de absorbands okunur		

Enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Aktivite } (\mu\text{mol/dak}) = \frac{\Delta\text{Absorbans}}{9,6 \times \Delta t}$$

Aktiviteler $\mu\text{mol/dak}$ cinsinden hesaplandı. 1 dakikada dönüşüme uğratılan substratın μmol cinsinden değeri $\mu\text{mol/dak}$ veya Unit olarak belirtilir.

İmmobilize enzim aktivite ölçümlerinde 0,1 ml serbest enzim yerine yaklaşık aynı protein miktarına sahip (0,25 mg) toplam 5 adet boncuk kullanıldı. TCA ilavesi ile boncuklar bozulduğundan, asit ilavesinden önce boncuklar ortamdan dekantasyon ile uzaklaştırıldı.

5.4. Protein Tayini

Enzim preparatlarının ve immobilizasyon sonrası yıkama sularının protein konsantrasyonlarının tayini Bradford yöntemi ile gerçekleştirildi. (Bradford,1976) Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır.

Protein tayini için gerekli olan reaktifler:

Standart Protein Çözeltisi	:Sığır serum albumini(BSA)0,02-0,2 mg/ml
Bradford Reaktifi	:40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml % 95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye 55 ml % 88'lik fosforik asit ilave edildi. Çözelti, dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı ve filtre edildi.

Her bir örneğin (standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri) protein miktarı aşağıdaki prosedüre göre belirlendi.

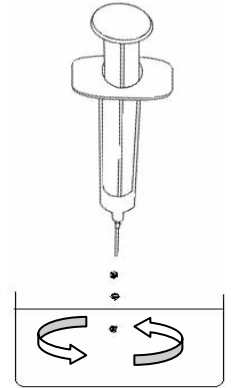
- Sığır serum albumininin (BSA), distile suda çözünmüş 10 mg/ml'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,2 mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar hazırlandı.
- 0,1 ml standart protein, bilinmeyen protein örneği ve distile su (kör için) tüplere pipetlendi.
- 2 ml Bradford reaktifi eklendi.

- Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Her bir örneğin 595 nm’de absorbansı okundu.
- Standartlara ait derişim ve absorbans değeri arasında çizilen grafik kullanılarak, protein miktarı bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonları hesaplandı.

Koyun karaciğerinden elde edilen glutatyon-s-transferaz aktivitesince zengin preparat, en uygun immobilizasyon yönteminin seçimi amacıyla kitosan, aljinat, PGA (Poligalakturonik asit) gibi taşıyıcılar kullanılarak adsorbsiyon, kovalent bağlama ve tutuklama (enkapsülasyon) yöntemleri ile immobilize edildi.

5.5. Kitosan Boncuklarının Hazırlanması

Adsorbsiyon ve kovalent bağlama ile immobilizasyonda kullanılmak üzere, enzim içermeyen boş kitosan boncukları hazırlandı. Bunun için iki farklı yöntem kullanıldı. İlk olarak NaOH-Metanol-dH₂O (1:10:10 v/v) çözeltisine % 1’lik asetik asitte hazırlanmış kitosan çözeltisi (% 1’lik) damlatılarak boncuk hazırlandı. İkinci yöntemde ise % 1’lik asetik asitte hazırlanan kitosan çözeltisi (% 1), % 2’lik TPP (tripolifosfat) çözeltisine damlatılarak boncuklar hazırlandı. 30 dakika daha karıştırılan boncuklar süzöldü ve dH₂O ile yıkandı. Her iki yöntemle hazırlanan boncuklar 1 gece deep freeze’de bekletilip liyofilize edildi.



5.6. Kitosan Boncuklarına Adsorbsiyon İle Enzim İmmobilizasyonu

Adsorbsiyon en eski ve en basit immobilizasyon yöntemidir. Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

Yöntemde taşıyıcı olarak TPP çözeltisi ile hazırlanmış ve immobilize edilmiş kitosan boncukları kullanıldı. Bu amaçla 0,5 gram kuru boncuk, farklı miktarlarda (12,4 mg/ml, 6,2 mg/ml, 2,5 mg/ml) enzim kullanılarak 50mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde orbital karıştırıcıda 2 saat 4 °C’de karıştırılıp süzüldü. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

5.7. Kitosan Boncuklara Kovalent Bağlama İle Enzim İmmobilizasyonu

Kovalent bağlama ile immobilizasyonda taşıyıcı olarak tarafımızdan hazırlanan kitosan boncukları kullanıldı (Bölüm 5.5). Taşıyıcının aktivasyonu, taşıyıcının fonksiyonel grup karakterine göre çeşitli reaktifler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bunlar CNBr, epoksit, CDI, EDC, sülfonil klorür, periyodat, triazin, diazonyum, glutaraldehit, N-hidroksisüksinimid, divinil sülfon ve nitrofenil kloroformat olarak sıralanabilir. Bu çalışmada hazırlanan kitosan boncuklarına kovalent bağlama ile immobilizasyon amacı ile CDI ve EDC kullanıldı.

5.7.1. CDI (1,1'-karbonildiimidazol)

İki farklı şekilde [TPP (% 2) ve NaOH-Metanol-dH₂O (1:10:10 v/v) çözeltilerine damlatılarak] hazırlanan ve liyofilize edilen boş kitosan boncukları, farklı oranlarda aseton-su (3:7 ve 7:3) ve son olarak da sadece aseton ile muamele edildikten sonra 1,0 mmol CDI (g kitosan başına) ilavesi ile oda sıcaklığında 3 saat orbital karıştırıcıda 400 devirle karıştırıldı. 3 saat sonunda karışım süzüldü ve kurutuldu.

CDI ile aktive edilmiş 1 g kitosana 1 ml enzim (26 mg protein) ve 19 ml 100mM pH 7,0 fosfat tamponu ilave edilip 4 °C'de 240 devirle gece boyu karıştırıldı. Karışım süzüldü ve ardından bağlanmamış enzimin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla 25 ml dH₂O, 12,5 ml 0,5 M NaCl çözeltisi ve tekrar 25 ml dH₂O ile yıkandı. Yıkama sularında ve boncuklarda aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

5.7.2. EDC (1- etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid)

50 mM pH 5,0 asetat tamponuna EDC ilavesi ile oluşan çözeltiye 25,3 mg protein içeren 1 ml enzim preparatı ilave edilerek 4 °C'de 2 saat karıştırıldı. 2 saat sonunda çözeltiye önceden hazırlanmış boş kitosan boncukları da (% 2 TPP veya NaOH-Metanol-dH₂O (1:10:10 v/v)) çözeltisine damlatılarak hazırlanmış ve liyofilizatörde kurutulmuş) ilave edilerek 4°C'de 240 devirle gece boyu karıştırıldı. Karışım süzüldü, dH₂O ile yıkandı ve boncuklarda ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimi belirlendi.

5.8. PGA (Poli galakturonik asit) Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu

PGA (Poli galakturonik asit) pH'sı 4,0 olan dH₂O'da çözüldü. Çözeltiye 23 mg protein içeren 1 ml enzim preparatı ilave edilerek, enzim içeren % 2,5'luk PGA çözeltisi hazırlandı ve % 1'lik CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. 30 dakika karıştırılan boncuklar süzülerek yıkama suları toplandı.

5.9. PGA Kaplı Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-PGA)

0,1 g kitosan tartılarak 9 ml %1'lik asetik asit çözeltisine ilave edildi ve çözününceye kadar yaklaşık 3 saat kadar karıştırıldı. Üzerine 23,2 mg protein içeren 1 ml enzim preparatı ilave edilerek 4 °C'de % 1 TPP ve % 1 TPP + % 0,5 PGA içeren çözeltilere ayrı ayrı damlatılıp 30 dakika karıştırıldı. Boncuklar filtre edilip dH₂O ile yıkandı. Yıkama sularında protein, immobilize boncuklarda ve yıkama sularında aktivite tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

5.10. Kitosan ve PEG 6000 Kaplı Aljinat Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu

%1,5' luk aljinat çözeltisine 10 mg protein içeren enzim preparatı ilave edilerek 4 °C'de % 2 CaCl₂, % 2 CaCl₂ + % 0,3 kitosan ve % 2 CaCl₂ + % 0,3 kitosan + % 0,1 PEG 6000 içeren çözeltilere damlatıldı. Oluşan boncuklar 60 dakika karıştırıldı ve boncuklar süzülerek dH₂O ile yıkandı; yıkama suları toplandı. Yıkama sularında ve

immobilize boncuklarda aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

5.11. PEG İçeren Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-PEG)

0,1 g kitosan ve 0,1 g PEG 6000 (1:1) oranında tartılıp 9 ml %1'lik asetik asit çözeltisinde çözününceye kadar karıştırıldı ve çözeltiliye 10 mg protein içeren enzim preparatı ilave edilerek 4 °C'de NaOH- Metanol-dH₂O (1:10:10 v/v) çözeltisine damlatıldı. Oluşan boncuklar 30 dakika karıştırıldıktan sonra süzülüp yıkama suları toplandı aktivite ve protein tayinleri yapıldı. 1:1 kitosan-PEG oranının dışında 6:4, 7:3, 8:2 oranları da benzer şekilde denendi.

5.12. Aljinat Kaplı Kitosan Boncuklarında Enzim İmmobilizasyonu (Kitosan-Aljinat)

10 mg protein içeren enzim preparatı % 2'lik kitosan çözeltisi, asetik asitle pH'ı 8,2'ye ayarlanan % 2 TPP + % 0,3 aljinat çözeltisine damlatılarak boncuklar elde edildi. Yıkama suları toplandı. Yıkama sularında protein, immobilize boncuklarda ve yıkama sularında aktivite tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

5.13. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

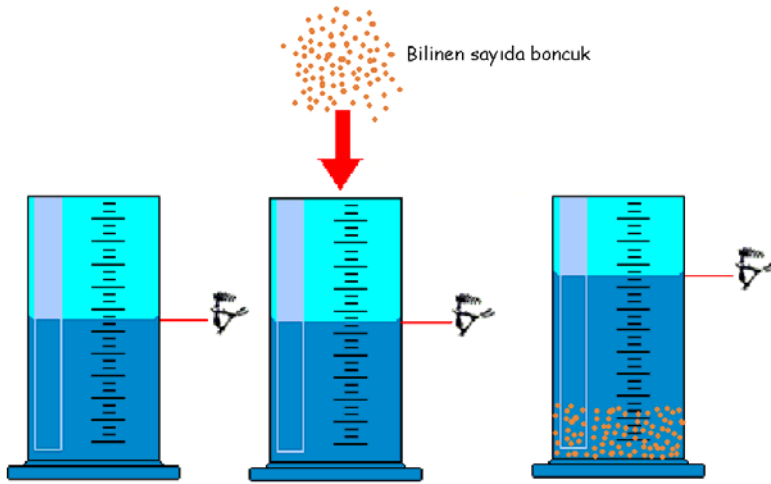
İmmobilize ve serbest enzimlerin aktivitelerinin kıyaslanabilmesi için taşıyıcıya bağlanan enzim miktarının bilinmesi gerekir. Bu amaçla immobilizasyon öncesi serbest enzimin aktivite ve protein değerleri

belirlenir. İmmobilizasyon sonrası yıkama sularında da aynı tayin yöntemler kullanılarak ölçüm yapılır. Taşıyıcıda immobilize edilmiş protein miktarı da, ilave edilen protein ile yıkama sularındaki bağlanmayan protein miktarı arasındaki fark hesaplanarak belirlenir.

Koyun karaciğerinden hazırlanan GST preparatının aktivite ve protein tayinleri, materyal ve metod bölümünde verilen yöntemler ile belirlendi. İmmobilizasyonda kullanılan serbest GST'ın aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sonuçlar ve tartışma bölümünde ilgili tablolarda verildi.

Hazırlanan boncukların çaplarını ölçmek amacıyla 5 ml lik mezüre su koyuldu. Bilinen belirli sayıda boncuk eklenerek hacimdeki artış ölçüldü. Boncukların çaplarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \text{Boncuk sayısı} = \text{Hacimdeki artış}$$



Şekil 5.1 Boncuk çaplarının hesaplanması.

Tüm immobilizasyon yöntemleri arasından enzim preparatı için en uygun yöntemi (Kitosan-Aljinat) belirledikten sonra ilgili yöntemin optimizasyon çalışmalarına geçildi.

5.13.1. İmmobilizasyon etkinliğine protein miktarının etkisi

Enzimatik olarak yürüyen bir reaksiyonun hızı, reaksiyon koşullarına bağlıdır. Bunlardan en önemlisi enzim konsantrasyonu olup, diğerleri substrat konsantrasyonu, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, aktivatör ve inhibitörlerin varlığı olarak sıralanabilir.

İmmobilizasyon etkinliğine protein miktarının etkisini incelemek amacıyla immobilizasyon için seçilen Kitosan-Aljinat yöntemi ile enzim preparatının farklı protein konsantrasyonlarında immobilizasyonu gerçekleştirildi ve boncuk yapımı için en uygun protein miktarı belirlendi.

5.13.2. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine pH etkisi

Enzimler proteinlerden oluştuğu için katalitik aktivite dikkate değer bir şekilde ortam koşullarından, özellikle de sulu ortamın pH'sından etkilenir. İnkübasyon ortamının pH'sı protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezini de etkilemektedir. Bu nedenle pH-aktivite ilişkisinin incelenmesi, enzim proteinlerinin yapı fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması açısından faydalıdır.

Optimum pH tespiti için pH 3,0 – 6,0 aralığında sitrat, 6,0 – 8,0 aralığında fosfat, 8,0 – 9,0 aralığında ise borat tamponu kullanıldı. Optimum koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH) her tampon için ayrı ayrı 30 °C’de enzim aktiviteleri ölçüldü.

5.13.3. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine sıcaklık etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağımlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla artar. Fakat bu artış sürekli olmayıp belli bir derecenin üzerinde, inkübasyon zamanına bağımlı olarak önce duraklama daha sonra da gerileme şeklinde kendini göstermektedir.

Serbest ve immobilize GST aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını incelemek amacı ile standart koşullar altında (1 mM CDNB, 1 mM GSH, pH 7,0 100mM fosfat tamponu) aktiviteleri ölçüldü. Bağlı (%) aktivitenin sıcaklık ile değişim grafikleri çizilerek optimum sıcaklık belirlendi. 0-50 °C sıcaklık aralığında (0, 10, 20, 30, 37, 40, 50 °C) çalışıldı ve her iki formun optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Ayrıca, bu değerlerden çıkılarak çizilen Arrhenius diyagramlarından ($1/T$ ’ye karşı log aktivite) aktivasyon enerjileri hesaplandı.

5.13.4. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri CDNB ve GSH kullanılarak tayin edildi. Bu amaçla hazırlanan denemede CDNB ve GSH'ın 0,1 mM - 2,5 mM konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltileri kullanılarak standart koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH, pH 7,0 100mM fosfat tamponu) aktivite tayini yapıldı. Diğer tüm denemelerde olduğu gibi bu denemede de çift çalışıldı. Sonuçlar Sigma Plot programı kullanılarak değerlendirildi.

5.14. Kararlılık Testleri

Enzim immobilizasyonunun en büyük amaçlarından biri enzimin kararlılığının gerek medikal gerekse endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirlik etkinliğinin artırılmasıdır.

5.14.1. Termal kararlılık

Enzimler protein yapısında oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybı hızlanır.

İmmobilize boncukların ve serbest enzimin termal kararlılığı, immobilize ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda (0-10-20-30-40-50-60-70-80 °C) yarım saat inkübe edildikten sonra optimum koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH, pH 7,0 100mM fosfat tamponu) aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

5.14.2. pH kararlılığı

İmmobilize boncukların serbest enzimin pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla immobilize boncuklar ve serbest enzim pH aralığı 3,0-9,0 arasında değişen tamponlarda 30 dakika bekletildi ve optimum koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH, 30 °C) aktiviteleri belirlendi.

5.14.3. Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzimlerin uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup, uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür.

Depo kararlılığını belirlemek amacıyla, 4 °C’de aynı koşullarda saklanan serbest ve immobilize enzimlerden belirli zaman aralıklarında (6 ay boyunca) örnekler alınarak standart koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH, pH 7,0 100mM fosfat tamponu, 30 °C) aktiviteleri ölçüldü.

5.14.4. Operasyonel kararlılık

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin uygulamalarında önemli bir parametredir. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı için, reaktörden çeşitli zaman aralıklarında alınan örneklerin standart koşullarda aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Operasyon zamanı ile enzim aktivitesindeki azalma arasındaki ilişki belirlenerek biyokatalizörün yarı ömrü ($t_{1/2}$) hesaplanır.

İmmobilize GST için operasyonel kararlılık denemeleri CDNB kullanılarak sürekli akış kolon reaktör sistemi kullanılarak

gerçekleştirildi. Kullanılan reaktöre 167 adet immobilize boncuk (toplam 2,3 mg protein içeren), rezervuara 93,4 ml 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 3,3 ml 30 mM CDNB (substrat), 3,3 ml 26 mM GSH (kofaktör) ilave edildi. Operasyon sıcaklığı 30 °C olarak seçildi. Sisteme uv spektrofotometre bağlanıp zamana bağımlı olarak absorbanslar ölçülerek aktiviteler hesaplandı.

5.15. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği gerek medikal gerekse endüstriyel proseslerde oldukça önemlidir. İmmobilize GST'ın tekrar kullanılabilirlik denemeleri 30 °C'de standart koşullarda (1 mM CDNB, 1 mM GSH, 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu) gerçekleştirildi. Karışım 5 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edildikten sonra immobilize enzim ortamdan uzaklaştırıldı. Oluşan konjugatın (2,4-dinitrofenil glutatyon) 340 nm'de absorbansı okunarak enzim aktivitesi hesaplandı. Aynı boncuklarla deneme tekrarlanarak, enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı.

Hazırlanan immobilize enzim boncuklarında ardışık olarak aktivite tayinleri (10 kez) optimum koşullar altında gerçekleştirildi.

5.16. İmmobilize GST İçin Reaktör Dizaynı

5.16.1. Sürekli akış kolon reaktörü

Kullanılan sistem şekil 5.2'de gösterilmiştir. Sistem üç kısımdan oluşur: immobilize enzim kolonu(140-4,6mm), rezervuar tankı ve pompa (Denememizde HPLC pompası kullanıldı). Sistemin akış hızı 2

ml/dakikaya ayarlandı. İmmobilize enzim kolona dikkatlice dolduruldu. Reaksiyon sırasında oluşan konjugat miktarının belirlenmesi amacıyla uv-vis Merck dedektör (akış hücresi 5 mm) bağlandı.



Şekil 5.2 Sürekli akış kolon reaktör sistemi.

Kolona 2,3 mg protein içeren immobilize GST, rezervuara ise 93,4 ml 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 3,3 ml 30 mM CDNB (substrat) ve 3,3 ml 26 mM GSH (kofaktör) ilave edildi. Rezervuar karışımı manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Rezervuarın dış çeperinden sürekli olarak 30 °C sıcaklıktaki su geçirilerek sıcaklık sabit tutuldu. Belirli zaman aralıklarında oluşan konjugat miktarı online olarak okundu ve ekstinksiyon katsayısı ($9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak oluşan ürün miktarı hesaplandı.

5.16.2. Kesikli karıştırılmalı tank reaktörü

Kesikli karıştırılmalı tank reaktör sistemi Şekil 5.3'de gösterilmiştir. Reaktör hacmi 50 ml'dir. Kurulan sistemde reaktöre 32,7 ml 100 mM pH

7,0 fosfat tamponu, 1,17 ml 30 mM CDNB (substrat), 1,17 ml 26 mM GSH(kofaktör) ve 0,7 mg protein içeren immobilize GST ilave edildi. Rezervuar bileşenleri manyetik karıştırıcı ile sürekli olarak karıştırıldı ve reaktörün dış çeperinden sürekli olarak 30 °C sıcaklıktaki su geçirilerek sıcaklık sabit tutuldu. Başlangıç anında ve reaksiyon süresince belirli zaman aralıklarında rezervuardan örnek alınarak CDNB'nin GSH konjugatına dönüşümü ekstinksiyon katsayısı ($9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı.



Şekil 5.3 Kesikli karıştırılmalı tank reaktör sistemi.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Glutatyon-s-transferazca zengin preparatın immobilizasyonu amacı ile adsorbsiyon, kovalent bağlama ve tutuklama teknikleri kullanıldı. Taşıyıcı matriks olarak kitosan, aljinat ve poligalakturonik asit (PGA) test edildi. Adsorbsiyon ve kovalent bağlama tekniklerinde matriks olarak tarafımızdan hazırlanan boş (enzim içermeyen) kitosan boncukları kullanıldı. Kuru kitosan boncuklarında adsorbsiyon ve kovalent bağlama için aktivasyon adımları (CDI, EDC) gerçekleştirildi. Tutuklama ise aljinat, aljinat-kitosan, aljinat-kitosan-PEG, PGA, kitosan, kitosan-PGA, kitosan-PEG ve kitosan-aljinat yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Her biri için immobilizasyon verimleri, bağlı aktivite ve protein cinsinden değerlendirildi ve sonuçlar sırasıyla verildi.

6.1. Kitosan Boncuklarına Adsorbsiyon İle Enzim Immobilizasyonu

Adsorbsiyonla enzim immobilizasyon işlemi kolay olmakla birlikte optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur. Enzim desorpsiyonu, özellikle substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen bir durumdur.

Çizelge 6.1 Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu.

GST preparatı (mg protein) ♦	Total Aktivite ($\mu\text{mol/dak}$)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dak/mg}$)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
12,4	0,002	3,9	0,0005	0,6	32
6,2	0,004	2,5	0,002	2	40
2,5	0,003	0,9	0,003	5	35

♦Serbest enzim; Total aktivite: $0,69 \mu\text{mol/dak/ml}$, Total protein: $24,7 \text{ mg/ml}$

% 1'lik kitosanın % 2'lik TPP'a damlatılmasıyla hazırlanan ve liyofilize edilen kitosan boncukları, üç farklı miktarda protein içeren ortamda adsorbsiyon sonuçları Çizelge 6.1'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, genel anlamda gerek aktivite gerekse protein cinsinden immobilizasyon etkinliğinin yüksek olmadığı görülmektedir. Genelde, adsorbsiyon yöntemlerinde zayıf bağlar ve Van de Waals kuvvetleri etkindir. Bunun yanı sıra kitosan boncuk karakteri düşünüldüğünde, amino asitlerin karboksilik asit yan grupları ile de etkileşime girmesi mümkündür. Tüm bu sebepler düşünüldüğünde, artan protein konsantrasyonuna karşı tutuklanan protein miktarı artmakla birlikte immobilizasyon verimi (aktivite ve protein) yaklaşık sabit kalmaktadır. Ancak spesifik aktiviteler incelendiğinde, protein miktarı arttıkça belirgin bir düşüş gözlenmektedir. Bunun sebebi ise enzim preparatının saf olmaması ve ortamdaki diğer proteinlerin de spesifik olmayan bağlanmalarıdır. Bu nedenle immobilizasyon etkinliği zayıftır ve hazırlanan enzim preparatı için uygun değildir.

6.2. Kitosan Boncuklara Kovalent Bağlama İle Enzim İmmobilizasyonu

Biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasında ilk adım, kimyasal olarak inert taşıyıcının aktivasyonudur. İkinci adım ise aktive edilen taşıyıcıya ligandın bağlanmasıdır. Destek materyalinin protein ve diğer polimerlerle minimum kulombik ve hidrofobik etkileşimde olduğu kabul edilir. Matriks, geçirgen bir gözenek yapısına sahip olmalı ve partiküller basınca dayanıklı olmalıdır. Uygun bir aktivasyon-bağlama şemasının oluşturulmasında rol oynayan faktörler; oluşturulan kimyasal bağın kararlılığı ve sterik etkilerdir (Önal, 2000).

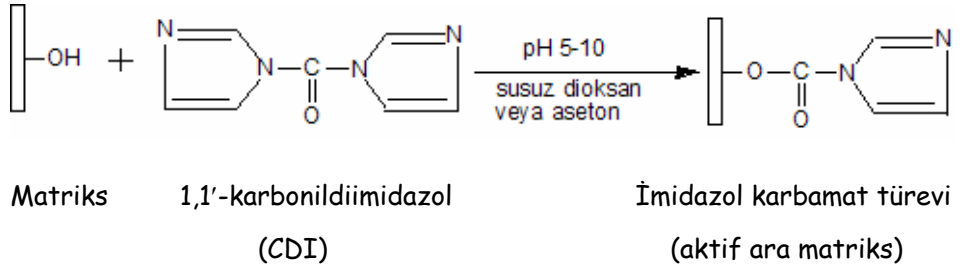
6.2.1. CDI (1,1'-karbonildiimidazol) ile aktive edilmiş taşıyıcıda enzim immobilizasyonu

Taşıyıcıya kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunda ilk adım taşıyıcının aktivasyonudur. Taşıyıcı aktivasyonu CNBr, CDI, CDT, CDB, triazin ve epoksit gibi çeşitli reaktifler vasıtasıyla gerçekleştirilir. CDI, taşıyıcı aktivasyonunda kullanılabilen önemli bir karbonilleme reaktifi olup, toksik olmaması, reaksiyonun oldukça kolay gerçekleşmesi, oluşan bağın kararlılığı ve aktif ara matriksin N-nükleofillerle ılımlı şartlarda kolaylıkla reaksiyon verebilmesi nedeniyle avantajlı bir reaktiftir. Bu çalışmada önemli avantajlara sahip olmasından dolayı CDI tercih edilmiştir. CDI, hidroksil grupları ile hızlı bir şekilde tepkime vererek hidrolize dayanıklı karbamat esterleri (bir imidazol karbamat türevi) oluşturur. İmidazol karbamat esterlerinin oluşumu oda

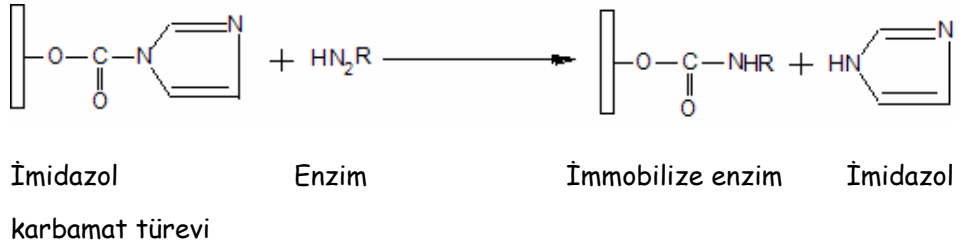
sıcaklığında ya da yüksek sıcaklıklarda gerçekleşebilmektedir. İkinci adım, ligandın aktive edilmiş taşıyıcıya bağlanmasıdır.

CDI, amino grubu içeren taşıyıcıların aktivasyonunda da kullanılabilir. Yalnız CDI ile aktivasyon reaksiyonunda en önemli koşul susuz aseton ya da dioksan kullanarak susuz ortamlarda çalışmaktır.

Taşıyıcının aktivasyonu



Enzimin bağlanması



Şekil 6.1 –OH grubu içeren taşıyıcıların CDI ile aktivasyon-bağlanma reaksiyonu.

Reaksiyon 4 °C'de oldukça geniş bir pH aralığında yürütülebilmektedir ve bağlanma için 10-18 saat yeterli olmaktadır. Genellikle polimerik jellerle pH 8,5-10,0, silika tabanlı jellerle pH 4,0-8,0 aralığı uygun bir pH aralığıdır. Şekil 6.1'de –OH grubu içeren taşıyıcıların CDI ile aktivasyonu ve enzimin bağlanma reaksiyonu verilmiştir (Hearn, 1987; Bethell et al., 1979).

Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu amacı ile kitosan boncukları iki farklı şekilde hazırlandı. Birinci sistemde % 1'lik kitosan çözeltisi % 2'lik TPP'a, ikinci sistemde ise NaOH-MeOH-dH₂O (1:10:10 v/v/v) çözeltisine damlatıldı.

TPP kullanılarak hazırlanan boncukların, NaOH-MeOH kullanılarak hazırlanan boncuklara göre daha küçük boyutta ve rijit oldukları gözlemlendi ve liyofilizasyon sonrası şekillerinde herhangi bir deformasyon görülmedi. Ancak NaOH-MeOH boncukları deforme oldu. Tampona alınan TPP'lı boncuklarda herhangi bir şişme olmazken, NaOH-MeOH'lü boncuklarda şişme gözlemlendi.

CDI ile aktivasyon sonrası enzim immobilizasyon verimleri (aktivite ve protein) hesaplandı (Çizelge 6.2).

Çizelge 6.2. CDI ile aktive edilmiş taşıyıcıda kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu.

İmmobilizasyon yöntemi ♦	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
TPP-CDI*	0,002	6,0	0,004	0,4	22,9
NaOH-MeOH-CDI**	0,005	6,2	0,008	0,9	23,6

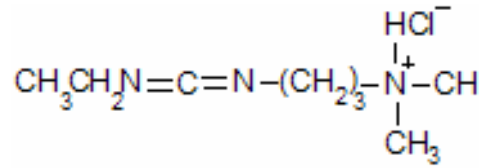
♦ Serbest enzim; Total aktivite: 0,55 μmol/dak/ml , Total protein: 26 mg/ml

* TPP çözeltisine damlatılarak hazırlanmış liyofilize kitosan boncukları

** NaOH-Metanol çözeltisine damlatılarak hazırlanmış liyofilize kitosan boncukları

Çizelge 6.2 incelendiğinde her iki sistemde de immobilizasyon etkinliğinin düşük olduğu gözlenmektedir. İki sistem kıyaslandığında ise tutuklanan protein miktarı aynı olmakla birlikte aktivite değeri CDI-NaOH-MeOH'lü yöntemde CDI-TPP'a göre iki katıdır. Bunun nedeni enzim preparatının saf olmaması ve diğer proteinlerin amino gruplarının da hazırlanan taşıyıcıya bağlanması, ayrıca NaOH-MeOH ile hazırlanan boncuklarda deformasyon oluşması ve aktivasyon sonrası sterik açıdan enzim bağlanmasının aktivite farklanmasını ortaya koyması olarak değerlendirilebilir. Genel anlamda değerlendirildiğinde, bu yöntemin GST'ca zengin olan enzim preparatı için uygun olmadığı düşünüldü.

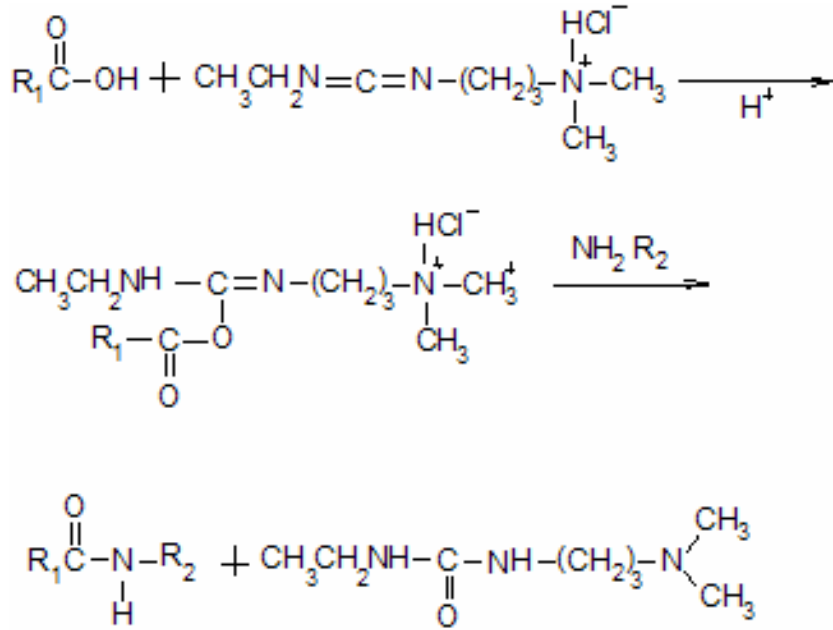
6.2.2. EDC (1- etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) ile aktive edilmiş taşıyıcıda enzim immobilizasyonu



Şekil 6.2 1-etil-3-(3-dimetilamino) propilkarbodiimid (EDC).

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), polipeptid sentezinde en yaygın kullanılan bağlama ajanlarından biridir. Karbodiimidler, karboksilatları bir O-açilüre oluşturmak için aktive ederek, karboksilik asitler ve aminler arasında amid bağlarının oluşumunu katalizlerler (Pascual et al., 2003). Yöntem Hoare ve Koshland (Hoare and Koshland, 1967) tarafından geliştirilmiştir.

Reaksiyon basittir ve sulu çözeltide oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, karbodiimidler oldukça kararsız moleküllerdir; diğer fonksiyonel gruplarla örneğin sülfidril (Carraway and Triplett, 1970) veya amino grupları (Kurzer et al., 1967), tirozin (Carraway et al., 1968), su ve diğer bileşenlerle kolayca reaksiyon verebilirler.



Şekil 6.3 Karboksil grubunun EDC ile aktivasyonu ve primer aminle amid bağı oluşumu.

Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunda EDC genelde karboksil grubu içeren taşıyıcılarda aktivasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, iki farklı şekilde hazırlanmış kitosan boncukları kullanıldı. Ancak burada izlenen yol CDI aktivasyonundan farklı olarak, öncelikle enzim preparatının EDC ile muamelesi ile enzim

preparatındaki karboksil grubu aktivasyonu ve sonrasında kitosan amino gruplarından bağlanma planlandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 6.3'te verildi.

Çizelge 6.3 EDC ile aktive edilmiş taşıyıcıda kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu.

İmmobilizasyon yöntemi ♦	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
TPP-EDC*	0,01	22,2	0,006	0,4	87,7
NaOH-MeOH-EDC**	0,003	20,7	0,001	0,1	81,8

♦ Serbest enzim; Total aktivite: 0,35 μmol/dak/ml , Total protein: 25,3 mg/ml

* TPP çözeltisine damlatılarak hazırlanmış liyofilize kitosan boncukları

** NaOH-Metanol çözeltisine damlatılarak hazırlanmış liyofilize kitosan boncukları

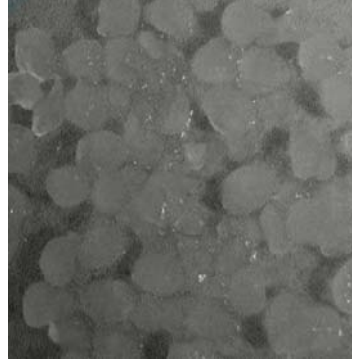
Sonuçlar incelendiğinde, protein cinsinden immobilizasyon verimlerinin yüksek ve benzer olmasına rağmen aktivite verimleri son derece düşüktür. Kovalent bağlama ile immobilizasyonda, bağlanma aktif bölge veya aktif bölge konformasyonunu değiştirecek bir bölgeden gerçekleşir ise, protein bağlanma etkinliği yüksek de olsa enzim aktivite göstermeyebilir veya çok düşük aktivite izlenebilir. Kaldı ki burada EDC'nin direkt enzim preparatı ile muamelesi sonucu enzimin reaktif uçlarından bağlanması söz konusudur ve bu nedenle aktif merkez konformasyon ve konfigürasyonunun farklanması ile enzim aktivite göstermeyebilir. Bu ise yöntemin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır.

Gerek enzim preparatının saf olmaması, gerek kovalent bağlanma sırasında enzim fonksiyonel gruplarının etkileşimi ile konformasyonel değişikliğe uğraması, kovalent bağlamanın GST immobilizasyonu için uygun olmadığını göstermektedir.

6.3. Tutuklama ile Enzim İmmobilizasyonu

Prensip olarak tutuklama, enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim, bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi, yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu,1997).

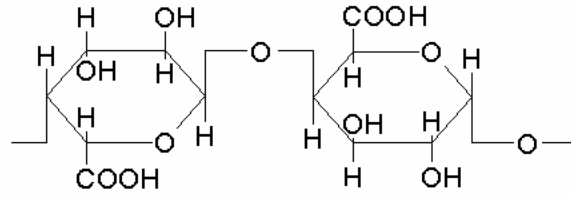
6.3.1. PGA (Poli galakturonik asit) boncuklarında enzim immobilizasyonu



Şekil 6.4 PGA'nın CaCl_2 'e damlatılmasıyla elde edilen PGA boncukları.

PGA'nın CaCl_2 'e damlatılması ile elde edilen boncuklar şekilsiz ve kolay parçalanır olduklarından PGA'nın kitosan matrisinde çapraz bağlayıcı yüksek molekül kütleli taşıyıcı iyon olarak, küçük molekül kütleli TPP ile birlikte kullanılmasına karar verildi.

6.3.2. PGA kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu(Kitosan-PGA)



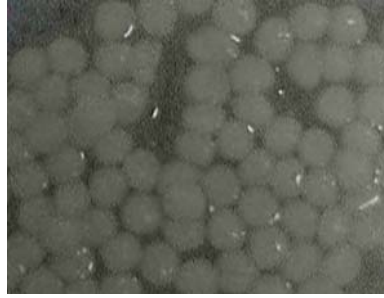
Şekil 6.5 Poligalakturonik asit'in (PGA) yapısı.

Kitosan, genelde TPP gibi düşük molekül kütleli veya aljinat, PGA gibi yüksek molekül kütleli toplayıcı iyonların varlığında kompleks bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Ancak kitosan çözeltisinin direkt aljinat veya PGA gibi yüksek molekül kütleli sistemlerdeki jelatasyonu kürecik formatında değil kapsül formundadır. Bu nedenle kitosanın PGA içeren TPP'lı ortamda kullanımı tercih edildi. Böylelikle hem küçük hem de büyük molekül kütleli toplayıcı iyonların kullanılması ile hem kürecik oluşumu hem de PGA ile daha sıkı bir kılıf oluşturulması planlandı. Kıyaslama yapabilmek amacıyla enzim preparatı içeren % 1'lik kitosan; % 1 TPP ve % 1 TPP + % 0,5 PGA çözeltilerine damlatılarak hazırlandı ve aktivite, protein tayinleri yapıldı (Çizelge 6.4).

Çizelge 6.4 PGA kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu.

İmmobilizasyon yöntemi ♦	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
% 1 Kitosan ↓ % 1 TPP	0,37	15,0	0,03	49	68
% 1 Kitosan ↓ % 1 TPP + % 0,5 PGA	0,17	12,9	0,01	22	59

♦Serbest enzim; Total aktivite: 0,8 μmol/dak/ml , Total protein: 23,2 mg/ml



Şekil 6.6 Kitosan'ın PGA içeren TPP çözeltisine damlatılmasıyla elde edilen kitosan-PGA boncukları.

Çizelge 6.4 incelendiğinde TPP ve TPP + PGA içeren sistemlerde protein cinsinden immobilizasyon verimleri birbirine yakın, ancak aktivite verimi neredeyse iki kat düşüktür. Bunun nedeni PGA ile oluşturulan ilave difüzyon bariyerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca genel tutuklama yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda elde edilen verimler son derece düşüktür.

6.3.3. Kitosan ve PEG 6000 kaplı aljinat boncuklarında enzim immobilizasyonu

Aljinat genelde gözenek çapı daha büyük olan kürecikler oluşturmaktadır (Gombotz and Wee, 1998). Bu ise aljinatın çoğunlukla büyük molekül kütleli proteinler ve mikroorganizmalar için tercih edilen

Çizelge 6.5 Kitosan ve PEG kaplı aljinat boncuklarında enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon yöntemi ♦	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
% 1,5 Aljinat ↓ % 2 CaCl ₂	0,02	8,0	0,003	18	80
% 1,5 Aljinat ↓ % 2 CaCl ₂ + % 0,3 Kitosan	0,04	8,9	0,004	29	89
% 1,5 Aljinat ↓ % 2 CaCl ₂ + % 0,3 Kitosan + % 0,1 PEG	0,04	7,3	0,005	29	73
% 1,5 Aljinat ↓ % 2 CaCl ₂ ↓ % 1 Kitosan	0,02	7,4	0,003	18	74
% 1,5 Aljinat + % 0,1 PEG ↓ % 2 CaCl ₂ ↓ % 1 Kitosan	0,03	7,8	0,004	22	78

♦Serbest enzim; Total aktivite: 0,123μmol/dak /ml , Total protein: 10 mg/ml

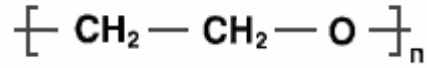
bir tutuklama polimeri olarak kullanılmasını yaygınlaştırmaktadır. Bu çalışmada enzimin saf bir preparat olmaması ve sitozol preparatındaki total içerik düşünülerek aljinat direkt CaCl_2 ve enzim kaçışını önlemek amacıyla CaCl_2 + kitosan ve CaCl_2 + kitosan + PEG çözeltilerine damlatılarak boncuklar oluşturuldu (Çizelge 6.5).

Sonuçlar incelendiğinde protein verimleri açısından denenen tüm sistemlerde protein verimleri açısından farklılık görülmemesi, toplamda enzim preparatında bulunan ve molekül kütlesi büyük olan diğer proteinlerin varlığı ile açıklanabilir. Ancak aktivite verimi açısından bakıldığında ise direkt aljinat + CaCl_2 sisteminde tutuklanan proteinler içinde GST'nin (molekül kütlesi: 24-28 kDa) diğer proteinler yanında difüzlenmesi söz konusu olabilir. Aktivite verimleri kıyaslandığında aljinat + CaCl_2 + kitosanlı ortamda bu kaçışın daha az olması sebebi ile aktivite verimi de artmıştır. Ayrıca ortama % 0,1 PEG ilave edildiğinde protein verimi çok az düşmekle birlikte aktivite verimi de artmaktadır. Bu ise, enzim kaçışı açısından kitosanın iş gördüğü ve PEG'in enzimler için bilinen bir hidrofilik stabilizör olması ile açıklanabilir (Chandy et al., 1998). PEG, enzimlerin kararlılıklarının arttırılması ve korunmasında kullanılan bir kimyasal ajan olup aynı zamanda tarafımızdan yapılan çalışmalarda kitosanlı sistemlerde farklı oranlarda kullanıldığında enzim aktivitesini arttırdığı da gözlenmiştir. Bu konuya ilişkin sonuçların bu kısımda verilmeyişinin nedeni kullanılan GST preparatının saf olmaması ve bu çalışmaların mekanistik yorumlarının saf enzim ile denenip verilmesi gerekliliğidir. Bu nedenlerden dolayı aljinat + enzim preparatı içerisine PEG ilave edilip aktivite ve stabilizasyonun arttırılması, kılıf

olarak kitosan yüzdesinin arttırılması ile de daha dayanıklı bir sistem düşünüldü. Bu amaçla, diğer sistemden farklı olarak aljinat ve aljinat + PEG ikilisi CaCl_2 'de kür işlemi sonrasında % 1 kitosan çözeltisine damlatıldı.

Sonuçlara bakıldığında gerek protein gerekse aktivite açısından az da olsa daha iyi bir verim alındığı görülmekle birlikte, diğer sistemlere kıyasla değerlerin düşük olması kür işlemi sırasında kayıpların olduğunu düşündürmektedir. Genel olarak yapılan değerlendirme aljinat temelli hazırlanan boncukların GST enzimi için uygun olmadığını göstermektedir. Her ne kadar tutuklama yöntemlerinde kimyasal bir etkileşim düşünülme de negatif yüklü olan aljinatın enzim aktivitesine substrat (CDNB) ve kosubstrat (GSH) geçişleri açısından uygun olmadığı düşünüldü.

6.3.4. PEG 6000 içeren kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu (Kitosan-PEG)



Şekil 6.7 PEG'in (Polietilen glikol) yapısı.

PEG'in enzim aktivitesini olumlu etkilediği ve aljinat yerine kitosanın daha etkin olabileceği düşünülerek farklı kitosan-PEG oranlarında NaOH-MeOH'de kür ile GST immobilizasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 6.6).

Çizelge 6.6 Kitosan-PEG 6000 boncuklarında enzim immobilizasyonu.

İmmobilizasyon yöntemi	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
% 1 Kitosan ♦ ↓ NaOH-MeOH	0,37	17,5	0,02	47	66
% 1 Kitosan ♦ + %1 PEG ↓ NaOH-MeOH	0,30	18,4	0,02	38	69
%1,2 Kitosan* + %0,8 PEG ↓ NaOH-MeOH	0,60	15,2	0,04	72	73,8
%1,4 Kitosan* + %0,6 PEG ↓ NaOH-MeOH	0,45	11,6	0,04	57	59,7
%1,6 Kitosan* + %0,4 PEG ↓ NaOH-MeOH	0,19	11,8	0,03	37	59,8

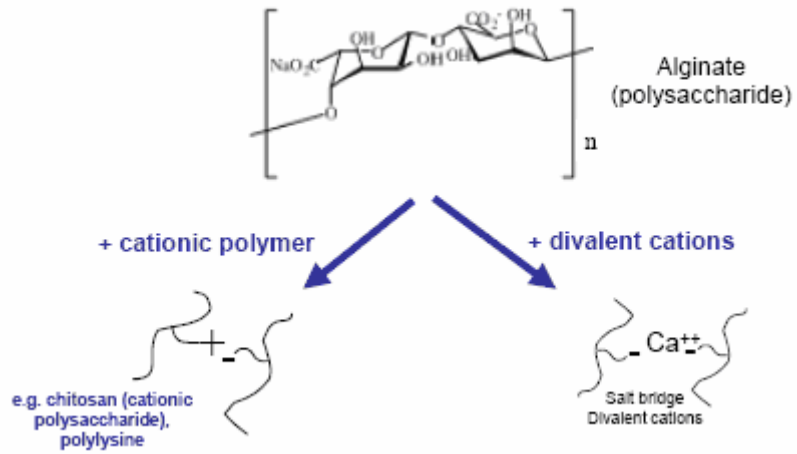
♦Serbest enzim; Total aktivite: 0,78 μmol/dak /ml , Total protein: 26,5 mg /ml

*Serbest enzim; Total aktivite: 089 μmol/dak /ml , Total protein: 22,1 mg /ml

Bu aşamada NaOH-MeOH'ün kullanılmasının nedeni genelde kitosan ve PEG'li ortamların literatürlerde (Chandy et al., 2000) tercih edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca PEG ve kitosan viskozitelerinin fazla olması nedeniyle oranlar toplamda % 2'lik oranı sağlayacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar incelendiğinde en iyi sonuç % 1,2 kitosan + % 0,8

PEG sisteminde alındığı görüldü. Bu sonuç, şimdiye kadar alınan en iyi sonuç olmakla birlikte NaOH-MeOH sisteminde (NaOH:MeOH:dH₂O 1:10:10 v/v/v) hazırlanan boncukların literatür verilerinin (Chandy et al., 2000) aksine şişmesi, kolay deforme olması ve bu nedenle enzim kaçaklarının artarak kullanılabilirlik açısından dezavantaj doğurduğu gözlenmiştir. Bu nedenle immobilizasyon sonuçları iyi olmakla birlikte bu sistem tercih edilmedi.

6.3.5. Aljinat kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu (Kitosan-Aljinat)



Şekil 6.8 Kitosanın pozitif yükleri ve aljinatın negatif yükleri arasında iyonik bağ oluşumu.

Kitosan temelli boncukların hazırlanmasında NaOH-MeOH sisteminde boncukların deforme olması nedeni ile toplayıcı iyon olarak

TPP'nin daha uygun olabileceği düşünöldü. Ayrıca kitosan-TPP-aljinat sisteminin GST immobilizasyonu için denenen tüm yöntemler içinde en iyi olabileceği kanaatine varıldı. Bu nedenle gerek boncuk boyutu ve rijiditesi gerekse kolay deforme olmaması nedeni ile TPP temel toplayıcı iyon olarak seçildi (Şekil 6.9).



Şekil 6.9 TPP (%2) ve NaOH:Metanol:dH₂O (1:10:10 v/v/v) kullanılarak hazırlanan kitosan boncukları. Solda NaOH-MeOH ile hazırlanan sağda ise TPP ile hazırlanan kitosan boncukları görölmektedir.

Bu bağlamda kitosan-TPP-aljinat sisteminde yüksek molekül kütleli toplayıcı iyon olarak TPP'li kür ortamına eklenen aljinatın farklı oranlarının etkisi enzimin immobilizasyon etkinliği açısından değeriendirildi (Çizelge 6.7).

Çizelge 6.7 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında enzim immobilizasyonu.

İmmobilizasyon yöntemi	Total Aktivite (μmol/dak)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (μmol/dak/mg)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
% 2 Kitosan♦ ↓ % 2 TPP	0,04	8,7	0,005	34	87
% 2 Kitosan* ↓ % 2 TPP + % 0,1 Aljinat	0,04	9,8	0,004	27	98
% 2 Kitosan* ↓ % 2 TPP + % 0,2 Aljinat	0,05	9,9	0,006	38	99
% 2 Kitosan* ↓ % 2 TPP + % 0,3 Aljinat	0,09	9,9	0,009	69	99
% 2 Kitosan* ↓ % 2 TPP + % 0,5 Aljinat	0,09	10	0,009	66	100

♦Serbest enzim; Total aktivite: 0,123 μmol/dak/ml , Total protein: 10 mg/ml

*Serbest enzim; Total aktivite: 0,144 μmol/dak /ml , Total protein: 10 mg/ml

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde % 2 kitosan + % 2 TPP + % 0,3 aljinat sisteminin GST immobilizasyonu için en uygun sistem olduğu düşünüldü. Protein cinsinden immobilizasyon verimi genelde tüm farklı aljinat konsantrasyonlarında yüksek ve benzer olmakla birlikte en iyi aktivite verimi % 0,3 ve üzerindeki aljinat miktarında

elde edilmiştir. % 0,5'lik oranda elde edilen sonuçlar, % 0,3'ünkilerle aynıdır. Daha fazla aljinat kullanımının immobilizasyon etkinliği açısından bir önemi yoktur. Bu nedenle GST enzim immobilizasyonu için denenen tüm yöntemler arasından % 2 kitosan + % 2 TPP ve % 0,3 aljinat içeren sistem seçildi ve bu sistemde immobilizasyon gerçekleştirilerek fiziksel ve kimyasal karakterizasyona geçildi.

6.4. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

GST enziminin immobilizasyonu için tüm denenen yöntemler arasından en iyisi olan % 2 kitosan + % 2 TPP + % 0,3 aljinat sisteminde immobilizasyon sonrası yapılan protein tayinlerinde aynı yöntemin farklı zamanlarda uygulanmasında yaklaşık % 92-99 proteinin boncuklarda tutuklandığını göstermektedir. Bu sonuçlar şimdiye kadar yapılan diğer polimerli enzim tutuklama yöntemlerine göre (Shu and Zhu, 2000; Ko, et al., 2002, Xu and Du, 2003) daha iyidir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan GST enzim preparatının saf olmaması nedeni ile değerlendirme, aktivite verimleri de dikkate alınarak yapılmıştır. Oluşturulan boncukların şekil ve partikül büyüklükleri bölüm 5.6' da belirtildiği gibi bir dereceli mezür vasıtasıyla yapıldı ve 1,2 mm olarak bulundu. Düzgün boncuk oluşumunda enjektöre uygun basınç uygulanması, kitosan-enzim solüsyonunun viskozitesi ve kitosan-enzim solüsyonunun TPP (% 2) + aljinat (% 0,3) solüsyonuna damlatma yüksekliği ve karıştırma hızı etkindir. TPP + aljinat solüsyonunun karıştırma hızı önemlidir. Çünkü düşük karıştırma hızlarında başlangıçta yüzeyde oluşan film nedeniyle boncukların kararsız olması, kolayca deforme olması ve karıştırma kabında birbirlerine yapışarak dibe çökmeleri söz konusudur. Bu

nedenlerden dolayı düzgün şekilli boncuk eldesinde koşulların optimizasyonu gereklidir.



Şekil 6.10 Kitosan boncukları. Soldan sağa % 0,3 Aljinat ve % 0,5 Aljinat kullanılarak hazırlanan kitosan boncukları görülmektedir.

Diğer önemli bir nokta da boncukların immobilizasyon prosesi sırasında büzülmesi, ancak kür ortamından sulu sisteme alındığında şişme özelliği göstermemesidir.

6.4.1. İmmobilizasyon etkinliği üzerine enzim miktarının etkisi

Enzimatik olarak kontrol edilen bir reaksiyonun hızı, reaksiyonun yürüdüğü koşullardan etkilenir. Burada en önemli faktör enzimin konsantrasyonudur. Diğer faktörler ise substrat konsantrasyonu, ortamın pH ve sıcaklığı, aktivatör ya da inhibitörlerin varlığı ve bazı durumlarda iyon şiddeti olarak sıralanabilir. Diğer tüm faktörler sabit tutulduğunda, reaksiyonun hızı enzim miktarının artışı ile orantılı olarak artar (Telefoncu,1997).

GST enzimi immobilizasyonu için denenen yöntemlerden en uygun olanı % 2 kitosan + % 2 TPP + % 0,3 aljinatlı sistemde, enzim preparatı farklı protein miktarları kullanılarak immobilizasyon etkinliği açısından değerlendirildi (Çizelge 6.8).

Çizelge 6.8 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında GST immobilizasyonuna enzim miktarının etkisi.

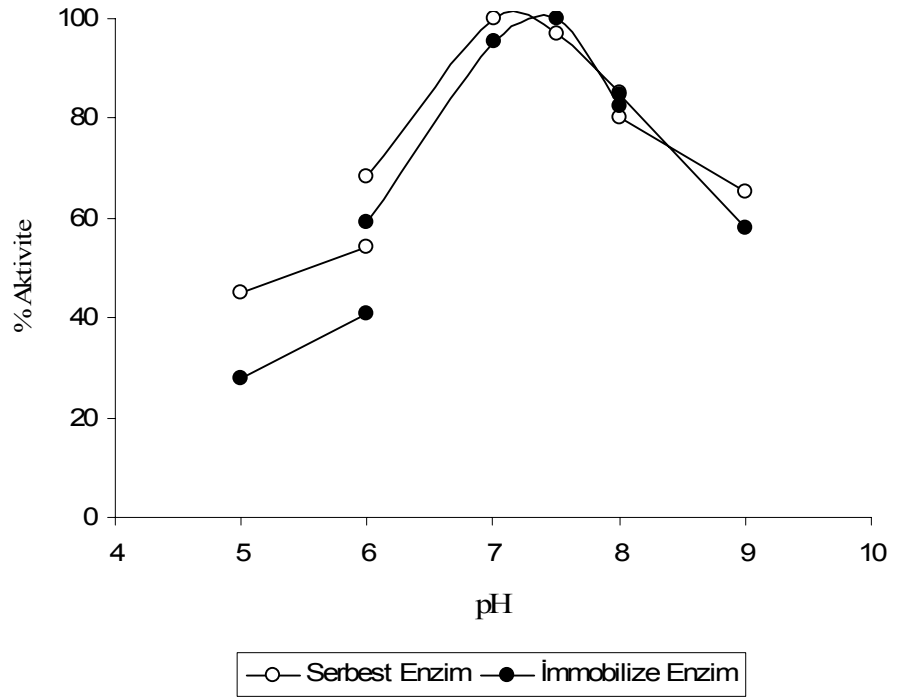
GST preparatı (mg protein) ♦	Total Aktivite ($\mu\text{mol/dak}$)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dak/mg}$)	% İmmobil. verimi (Aktivite)	% İmmobil. verimi (Protein)
1 mg	0,005	0,9	0,005	70	92
2,5 mg	0,025	2,4	0,010	69	97
5 mg	0,057	4,8	0,012	79	97
10 mg	0,09	9,9	0,009	69	99

♦Serbest enzim; Total aktivite: $0,144\mu\text{mol/dak/ml}$, Total protein: 10 mg/ml

Protein verimleri benzer olmakla birlikte, aktivite verimlerinde çok bariz olmasa da farklanmalar gözlenmektedir. Özellikle 5 mg ve 10 mg protein miktarlarındaki farklanma, tutuklanan protein miktarının yüksek olması, substrat ve kofaktör (GSH) giriş çıkışındaki sterik engellemeler ve difüzyondan dolayı enzim yanıtının gecikmesidir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda enzim için 5 mg total protein miktarı kullanıldı.

6.4.2. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine pH etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. Bir enzimin optimum pH'ı, reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağımlı bir değişkendir. Biyokimyasal reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiğinden, pH enzimin yük durumunu dolayısı ile aktivitesini çok etkiler. pH'nın immobilize ve serbest glutatyon-s-transferaz aktivitesi üzerine etkisi Şekil 6.11'de verildi.



Şekil 6.11 Serbest ve immobilize GST aktivitesinin pH'ya bağımlı değişimi. (Substrat CDNB, Sıcaklık 30 °C, Tamponlar: pH 5,0-6,0 sitrat; pH 6,0-8,0 fosfat; pH 8,0-9,0 borat)

Şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin optimum pH değeri 7,0 immobilize enzimin optimum pH değeri ise 7,5 olarak belirlendi. Literatürlerde GST'lar için optimum pH değerleri 7,0-8,5 aralığında değişmektedir (Valles et al., 2003; Yang et al., 2003). Enzimin immobilizasyonundan sonra pH değişimi üç faktör ile açıklanabilir:

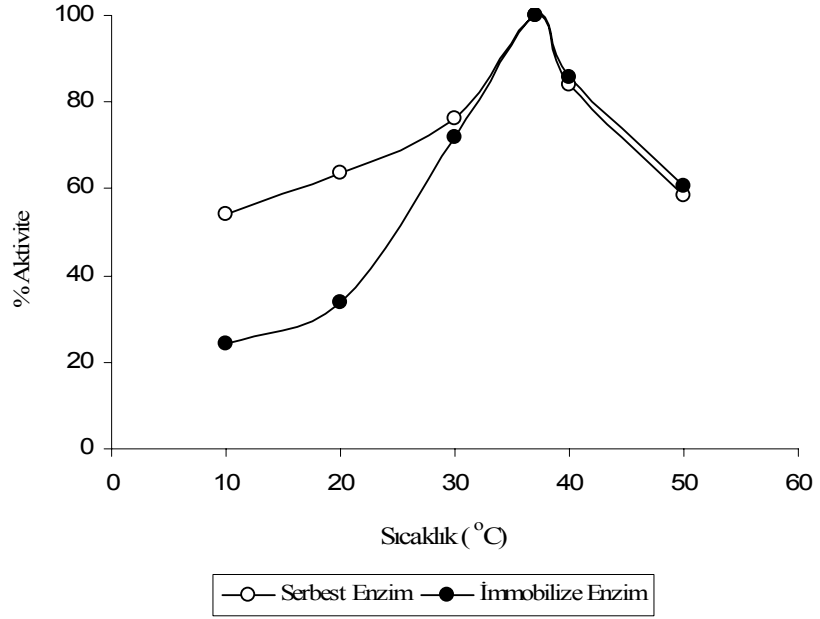
1. Destek materyalinin polianyonik veya polikatyonik karakteri
2. Enzim molekülünün immobilizasyon sırasında modifikasyonu
3. Enzimatik reaksiyon sonrası ürünlerin asidik ya da bazik olmasıdır (Zihnioğlu, 1992).

Kitosan polikatyonik, iyonotropik bir jelatasyon ajanıdır. (Kumar et al., 2004) Bu nedenle ilk faktörün etkin olduğu düşünülür. Ancak kitosanla yapılan direkt çalışmalarda, kitosanın kimyasal karakteri gereği pH'nın immobilizasyon sonrasında asidik bölgeye kayması beklenirken, 0,5 birimlik bazik bölgeye kayması söz konusudur. Bu ise ortamda diğer polianyonik polimer olan aljinatın toplayıcı iyon olarak kullanılması ile açıklanabilir.

6.4.3. İmmobilize glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesine sıcaklık etkisi

Ana yapı olarak protein olan enzimler, sıcaklıkla denatürasyona uğramakta ve üç boyutlu yapısı bozulmaktadır. Bu da enzimatik aktivitenin azalması ve giderek kaybolması sonucunu doğurmaktadır. Bu nedenle sıcaklık-aktivite ilişkisinin incelenmesi, enzim ve kimyasal katalizörlerin karşılaştırılması için faydalı bilgiler sağlayabilir.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimi grafiklerinden değerlendirildi. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşer. İmmobilizasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir (Telefoncu,1997).

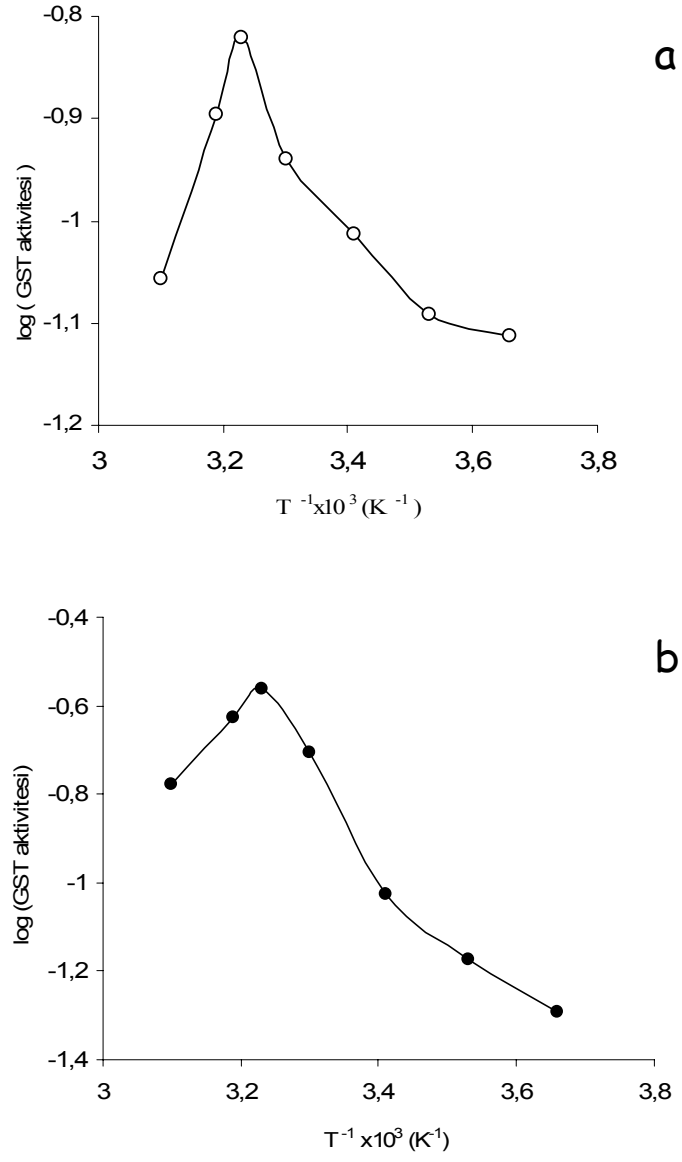


Şekil 6.12 Serbest ve immobilize GST aktivitesinin sıcaklığa bağımlı değişimi.

Şekil 6.12’de görüldüğü gibi optimum pH değerinin serbest ve immobilize enzim için 37 °C olduğu tespit edildi. Bu ise immobilizasyon işleminin GST optimum sıcaklığına bir etkisi olmadığını göstermektedir. *Atactodea striata* ile yapılan çalışmada optimum sıcaklık 38 °C olarak bulunmuştur. Enzimler, protein yapıdaki büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapısı

korunmalıdır. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat belirli sıcaklıktan sonra enzim proteininin denatürasyonundan dolayı aktivitede düşme olur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık (optimum sıcaklık) özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir.

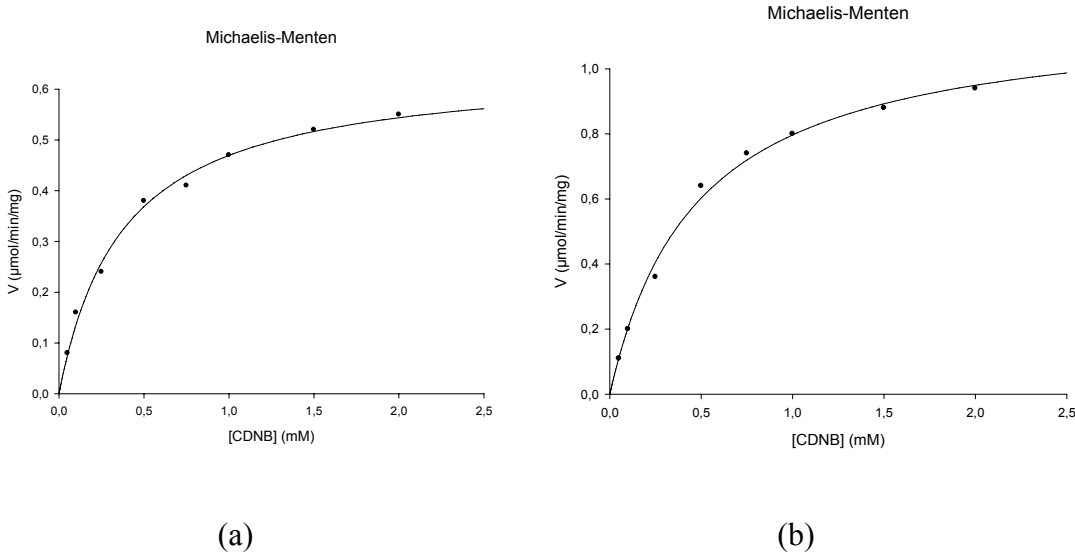
İmmobilizasyondan sonra yapılan sıcaklık etkisi ile ilgili çalışmalarda genellikle daha iyi bir yorum yapabilmek için Arrhenius diyagramları oluşturulur. Bağlı aktivitelerin logaritması ile $1/T$ arasında çizilen bu grafikten aktivasyon enerjileri (E_a) hesaplanır. E_a , bu grafiğin eğimi ve genel gaz sabiti (R) ile doğru orantılıdır ve reaktant molekülün ürüne çevrilebilmesi için sahip olması gereken minimum enerji miktarıdır. Aktivasyon enerjisi immobilizasyon sonucu artar veya azalabilir (Önal,2000). Çizilen Arrhenius diyagramlarından aktivasyon enerjisi (E_a), $E_a = \text{eğim} \times R$ ($R=8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) formülü kullanılarak hesaplanır. Serbest ve immobilize GST'lar için çizilen Arrhenius diyagramlarından (Şekil 6.7-6.8) aktivasyon enerjisi serbest enzim için $20,4 \text{ kJmol}^{-1}$ ve immobilize enzim için ise $49,4 \text{ kJmol}^{-1}$ olarak hesaplandı. Immobilize enzim için aktivasyon enerjisinin yüksek olması genellikle kullanılan enzim immobilizasyon yönteminin özellikle kovalent bağlama yöntemlerinde enzim moleküllerinin yapısında bazı değişiklikler yarattığı ve bu nedenle enzim katalizli reaksiyonun engellendiği şeklinde açıklanmaktadır (Rashid and Siddiqui, 1998; Krajewska et al., 1990). Ancak burada serbest enzime göre olan bu farklanma difüzyon etkisi olarak açıklanabilir. 37°C 'de her iki enzim optimum sıcaklığa ulaşmış ve bu sıcaklıktan yüksek sıcaklıklarda termal denatürasyona bağlı olarak enzimatik hız azalmaya başlamıştır.



Şekil 6.13 Serbest (a) ve immobilize (b) enzime ait Arrhenius diyagramları.

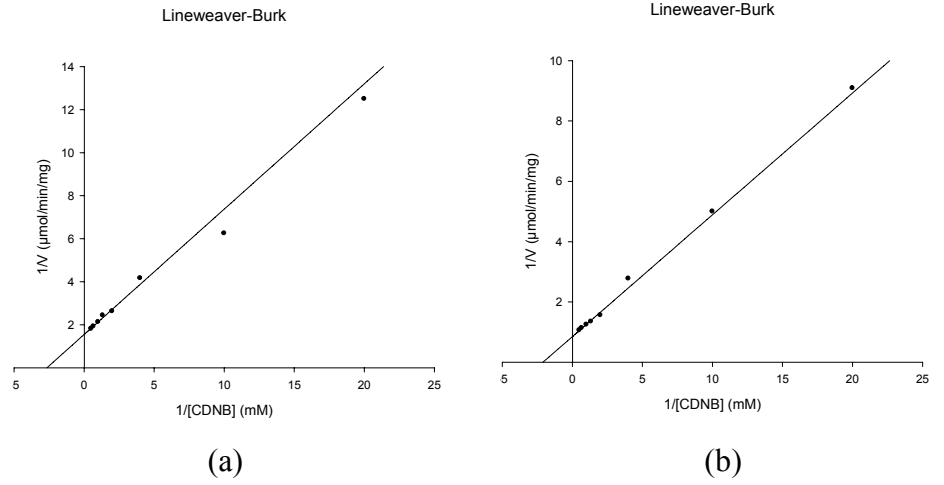
6.4.4. Glutatiyon-s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri, immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri substrat (CDNB) ve kosubstrat (GSH) kullanılarak belirlendi. CDNB konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi Şekil 6.14’de verildi.



Şekil 6.14 Serbest (a) ve immobilize (b) GST enzim aktivitesi üzerine CDNB konsantrasyonunun etkisi (Aktivite ölçümleri optimum koşullar altında 1mM GSH varlığında gerçekleştirildi.)

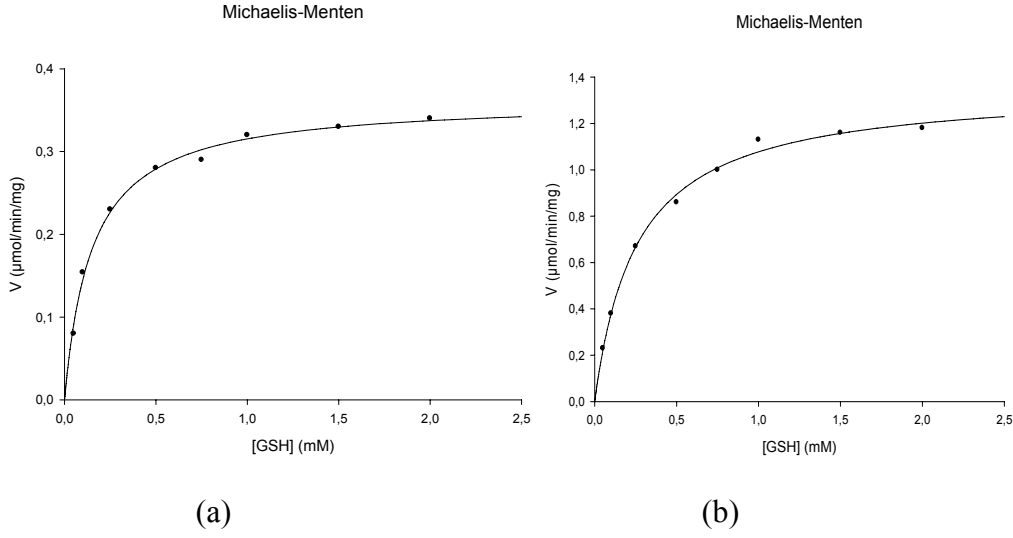
Glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesinin (serbest ve immobilize) CDNB konsantrasyonuna bağımlılığı grafikten değerlendirildiğinde hem serbest hem de immobilize enzim için 1 mM olarak bulundu. Bu substrat konsantrasyonu üzerinde belirgin bir artış gözlenmedi.



Şekil 6.15 Serbest (a) ve immobilize (b) GST Lineweaver-Burk diyagramı (1mM GSH, 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 30 °C)

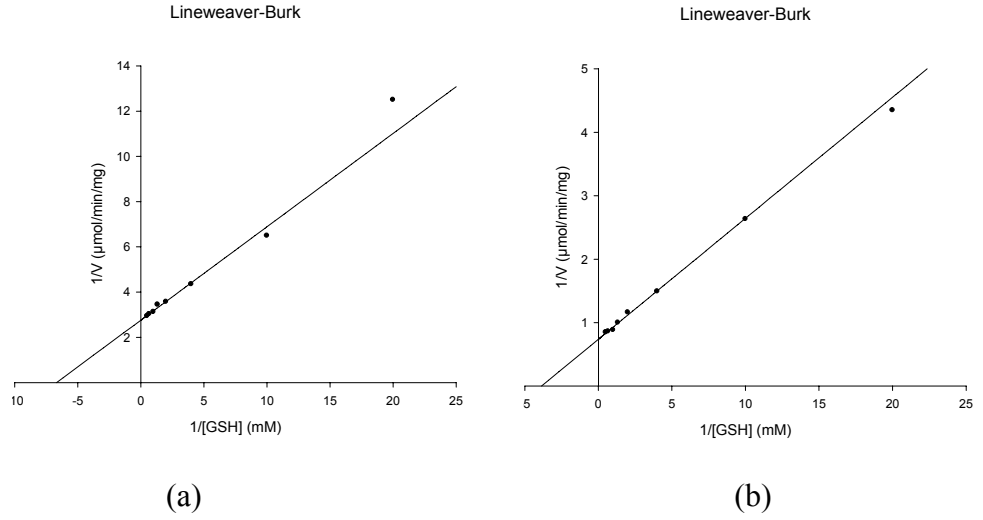
CDNB'nin Lineweaver-Burk diyagramları ($1/V$ 'ye karşı $1/S$) Şekil 6.15'te verildi. Kinetik parametreler bilgisayarda Sigma Plot programı kullanılarak hesaplandı.

GSH konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi Şekil 6.16'da verildi.



Şekil 6.16 Serbest (a) ve immobilize (b) GST enzim aktivitesi üzerine GSH konsantrasyonunun etkisi (Aktivite ölçümleri optimum koşullar altında 1mM CDNB varlığında gerçekleştirildi.)

Glutatiyon-s-transferaz (GST) aktivitesinin (serbest ve immobilize) GSH konsantrasyonuna bağımlılığı grafikten değerlendirildiğinde hem serbest hem de immobilize enzim için 1 mM olarak bulundu. Bu substrat konsantrasyonu üzerinde belirgin bir artış gözlenmedi.



Şekil 6.17 Serbest (a) ve immobilize(b) GST Lineweaver-Burk diyagramı (1mM CDNB, 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 30 °C)

GSH'ın Lineweaver-Burk diyagramları ($1/V$ 'ye karşı $1/S$) Şekil 6.17'te verildi. Kinetik parametreler bilgisayarda Sigma Plot programı kullanılarak hesaplandı.

Bilindiği gibi K_m (Michaelis sabiti) bir enzimatik reaksiyonda, reaksiyon hızının max hızın yarısına ulaştığı andaki substrat konsantrasyonunu ifade eder ve substratın enzime olan ilgisinin ölçüsüdür. Yüksek bir Michaelis sabiti, yarı doyumluğa ulaşabilmek için yüksek bir substrat konsantrasyonu gerektiğini ve enzimin adı geçen substrata ilgisinin yüksek olmadığını gösterir. Çizelge 6.9'da her iki sisteme ait kinetik parametreler özetlendi.

Çizelge 6.9 Serbest ve immobilize enzimin kinetik sabitleri.

Substrat	Serbest Enzim		İmmobilize Enzim	
	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dak/mg}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dak/mg}$)
CDNB	0,38	0,65	0,47	1,17
GSH	0,15	0,36	0,26	1,36

Çizelge 6.9’da görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimlerin K_m değerleri arasında mertebe açısından önemli bir değişiklik yoktur. Ancak immobilize GST preparatında K_m değeri biraz daha fazladır. Bu ise tutuklama yöntemi ile immobilize edilen diğer enzimlerde de görüldüğü gibi difüzyondan kaynaklanmaktadır. Ancak enzimin reaksiyon mekanizması göz önüne alındığında enzim, ikincil bir substrat gibi davranan GSH’a kofaktör olarak gerek duyar. Bu nedenle bu tip sistemlerde bi substrat kinetiklerinin de hesaplanması gereklidir.

Glutatyon-s-transferaz (E.C 2.5.1.18) enzim aktivitesi üzerinde, substrat konsantrasyonunun etkisi bitkilerde ve memelilerde geniş bir biçimde incelenmiştir. İnsan karaciğerinde yapılan çalışmada K_m değeri GSH için 0,37 mM, CDNB için ise 1 mM olarak bulunmuştur. (Singhal et al, 1990) Aynı çalışmada V_{max} değeri 3,3 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak belirtilmiştir. Sığır karaciğeri ile yapılan başka bir çalışmada K_m değeri GSH için 3,33 mM, V_{max} değeri 2,5 $\mu\text{mol/dak/mg}$ olarak tespit edilmiştir. (Tin, 2001) Ateş karıncası ile yapılan çalışmada ise K_m değeri GSH için 0,84 mM, CDNB için 0,13 mM olduğu ve

V_{max} değerinin GSH için 87,4 $\mu\text{mol/dak/mg}$ olduğu ifade edilmiştir. (Valles et al., 2003) *Atactodea striata* kullanılarak gerçekleştirilen tayinlerde K_m değeri GSH için 0,19 mM, CDNB için 0,43 mM olduğu ve V_{max} değerinin GSH için 0,00017 $\mu\text{mol/dak/mg}$ ve CDNB için 0,00024 $\mu\text{mol/dak/mg}$ olduğu rapor edilmiştir. (Yang., et al., 2003)

Literatür verilerine bakıldığında mertebe olarak farklanma olmamasına rağmen orijine bağlı olarak K_m değerleri farklılıklar göstermektedir. Ancak koyun karaciğer GST'ı için her hangi bir literatür verisi yoktur.

6.5. Kararlılık Testleri

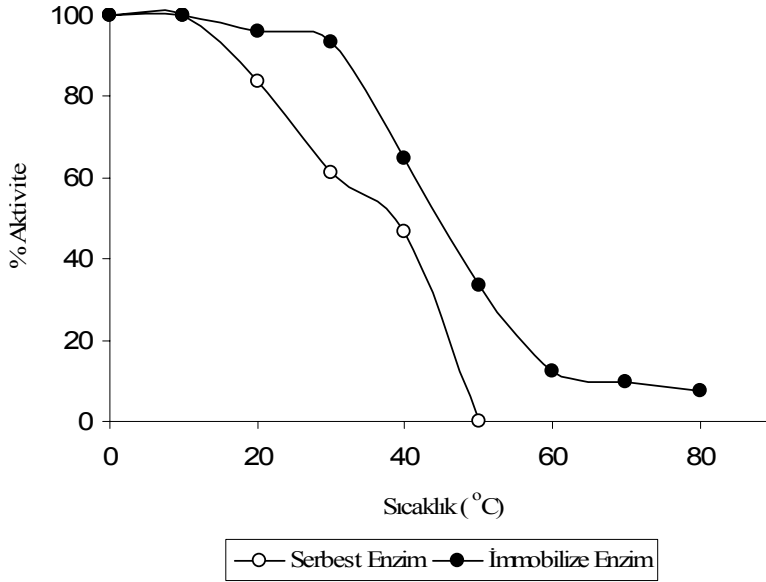
İmmobilize enzimin stabilitesinden anlaşılan, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzim aktivite kaybı değişik nedenlere dayanır (pH veya kimyasal inaktivasyon vb.) Bunun dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzim kaçışı da aktivite kaybına neden olur (Telefoncu,1997).

6.5.1. Termal kararlılık

Enzimlerin kararlılığına etki eden parametrelerden birisi sıcaklıktır. Genellikle enzimler dışuk sıcaklıklarda daha kararlı olurken, yüksek sıcaklıklarda hızla termal denatürasyon gerçekleşir. Serbest ve immobilize GST'ların termal kararlılıkları bölüm 5.7.1'de açıklandığı gibi belirlendi. Bunun için, serbest ve immobilize enzimler önce farklı

sıcaklıklarda (0 - 80 °C) inkübe edildikten sonra optimum koşullarda aktiviteleri ölçüldü.

30 °C sıcaklıkta immobilize enzim aktivitesinin % 93'ünü korurken, serbest enzim % 61'ini koruyabilmiştir. Termal kararlılık denemeleri immobilize enzimin yüksek sıcaklıklarda bile aktivite göstermeye devam ettiğini, serbest enzimin ise 50 °C ve üzerinde denatüre olarak aktivitesini tamamen yitirdiğini gösterdi. Bu sıcaklıkta immobilize enzimin aktivitesini % 33 oranında koruduğu görülmüştür.



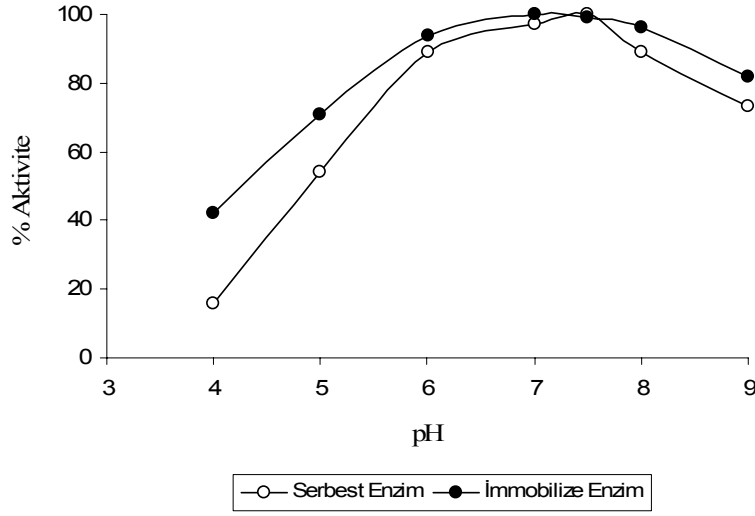
Şekil 6.18 Serbest ve immobilize GST'ın termal kararlılığı.

İmmobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir ya da hiç değişmez. Fakat genellikle immobilizasyon işlemi enzimin termal kararlılığını arttırmaktadır. İmmobilize enzimlerin termal kararlılığı, uygulamalar açısından en önemli kriterlerden birisidir. Yüksek sıcaklıklarda kararlı kalabilen enzimlerin, özellikle yüksek sıcaklık gerektiren birçok endüstriyel proseste kullanım imkânı söz konusudur.

Burada immobilize GST'ın özellikle medikal ve biyoyumluluk açısından uygulaması düşünüldüğünden, 30 °C sıcaklıkta aktivitesinin % 93'ünü koruması büyük bir avantaj olarak yorumlanabilir.

6.5.2. pH kararlılığı

Enzimler protein olduklarından, kararlılıklarına etki eden her faktör, proteinin sekonder, tersiyer ve/veya kuarter yapılarını etkiler. Çoğu enzim, aşırı asidik ya da bazik koşullarda tersinmez denatürasyona uğrar. Bir enzimin pH kararlılığı inkübasyon koşulları, inkübasyon süresi, sıcaklık, tampon türü ve konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi birçok faktör ile modifiye edilebilir. Serbest ve immobilize GST'ların pH kararlılığı, bölüm 5.7.2'de açıklandığı gibi belirlendi.



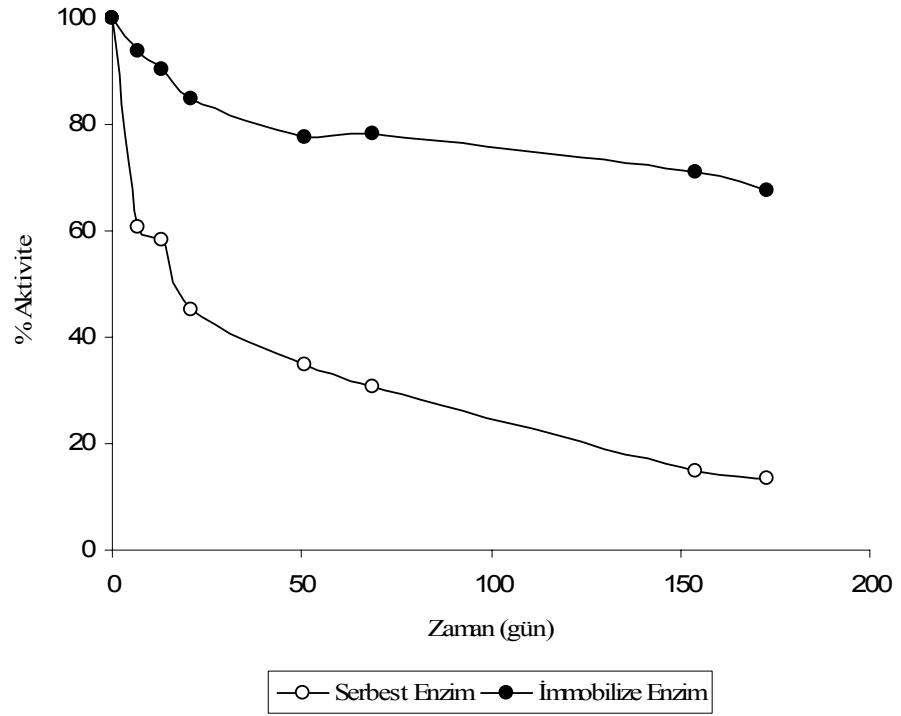
Şekil 6.19 Serbest ve immobilize GST'ın pH kararlılığı.

Şekil 6.19'da görüldüğü gibi hem serbest hem de immobilize GST'lar oldukça geniş bir pH aralığına sahiptirler. Özellikle immobilize enzimin pH 5,0-8,0 aralığında stabilitesinin % 71-96' ini koruduğu görülmektedir.

6.5.3. Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, özellikle immobilize enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Depo kararlılığı, enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle, suda çözünmez enzim preparatları ya liyofilize edilerek ya da süspansiyon şeklinde 4-5 °C'de saklanabilirler.

Serbest ve immobilize GST'ların depo kararlılıkları bölüm 5.7.3'de anlatıldığı gibi belirlendi (Şekil 6.20) Grafikten de görüldüğü gibi immobilize GST, 6 ay sonunda aktivitesinin hâlâ % 68'ini korumuştur.



Şekil 6.20 Serbest ve immobilize GST'in depo kararlılığı.

6.5.4. Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık, enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir ve operasyon süresi ve operasyon sıcaklığına bağlı olarak değişir. Ayrıca bir enzimin katalitik potansiyeli operasyonel kararlılığı ile orantılıdır. Operasyonel kararlılığın ölçüsü,

enzimin reaktördeki yarı ömrüdür ve $t_{1/2}$ ile ifade edilir. Daha doğru bir tanımlama ile, enzim aktivitesinin yarısının yitirilmesi için geçen zamandır ve şu eşitlikle hesaplanır:

$$t_{1/2} = 0,693 / k_D \quad k_D = 2,303 / t \cdot \log(A_0 / A)$$

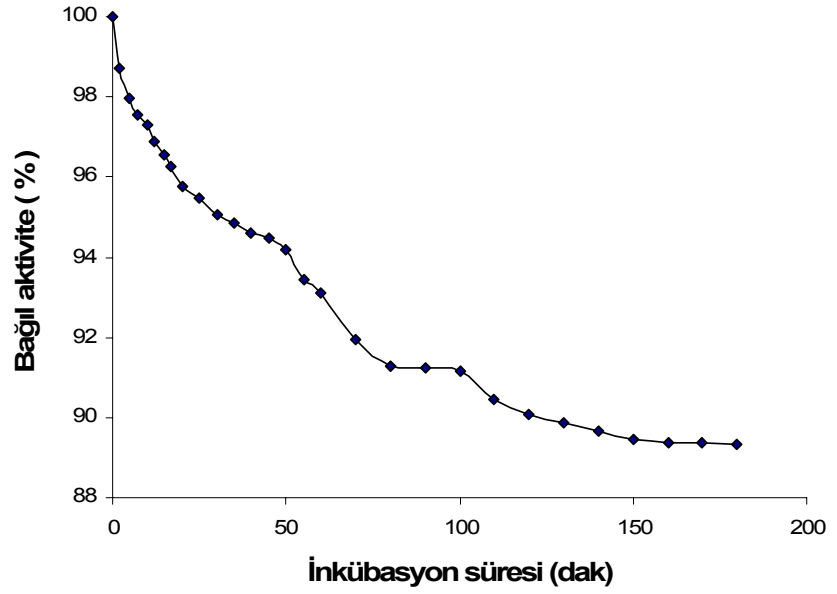
t operasyon süresini, k_D bozunma katsayısını, A_0 ve A ise sırasıyla başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir (Telefoncu,1997).

Bozunma katsayıları (k_D) yukarıdaki gibi formül kullanılarak hesaplandı ve Çizelge 6.10'da hesaplanan k_D değerleri verildi.

Çizelge 6.10 Aljinat kaplı kitosan boncuklarında immobilize edilen GST'ın farklı zamanlardaki k_D değerleri

<u>Operasyon süresi (dak)</u>	<u>k_D</u>
30	0,049
60	0,036
90	0,029
120	0,024
180	0,018
250	0,015
290	0,013

Yapılan hesaplamalar sonucu k_D değerinin ortalaması olarak 0,0315 olarak hesaplanmıştır. Bu değer dikkate alınarak enzimin yarı ömrü ($t_{1/2}$) yukarıdaki formülden yaklaşık 22 dakika olarak hesaplandı.



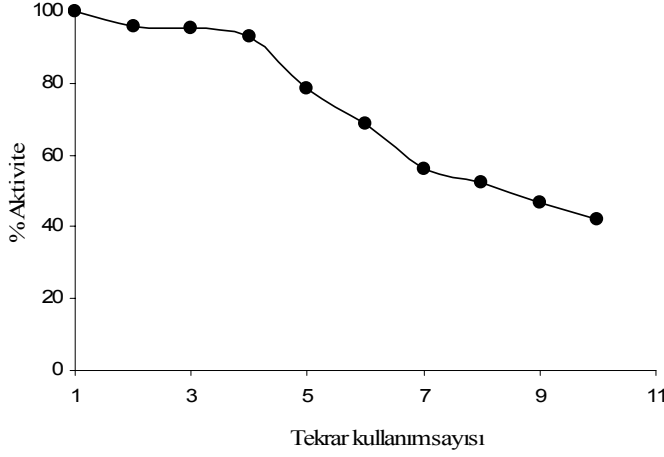
Şekil 6.21 İmmobilize GST'in operasyonel kararlılığı.

İmmobilize enzimin yarı ömrü (22 dakika) göz önüne alındığında operasyonel kararlılık açısından stabilitenin çok iyi olmadığı söylenebilir. Ancak enzim preparatının karakteri ve kullanım alanı düşünüldüğünde, uygulama açısından tekrar kullanılabilirliğin daha önemli bir kriter olduğu açıktır.

6.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin endüstriyel açıdan değerlerini etkileyen bir parametre de bu preparatların birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesidir. Bu amaçla bölüm 5.8' de açıklandığı gibi yapılan

denemeler ile immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği test edildi. (Şekil 6.21)



Şekil 6.22 İmmobilize GST'in tekrar kullanılabilirliği.

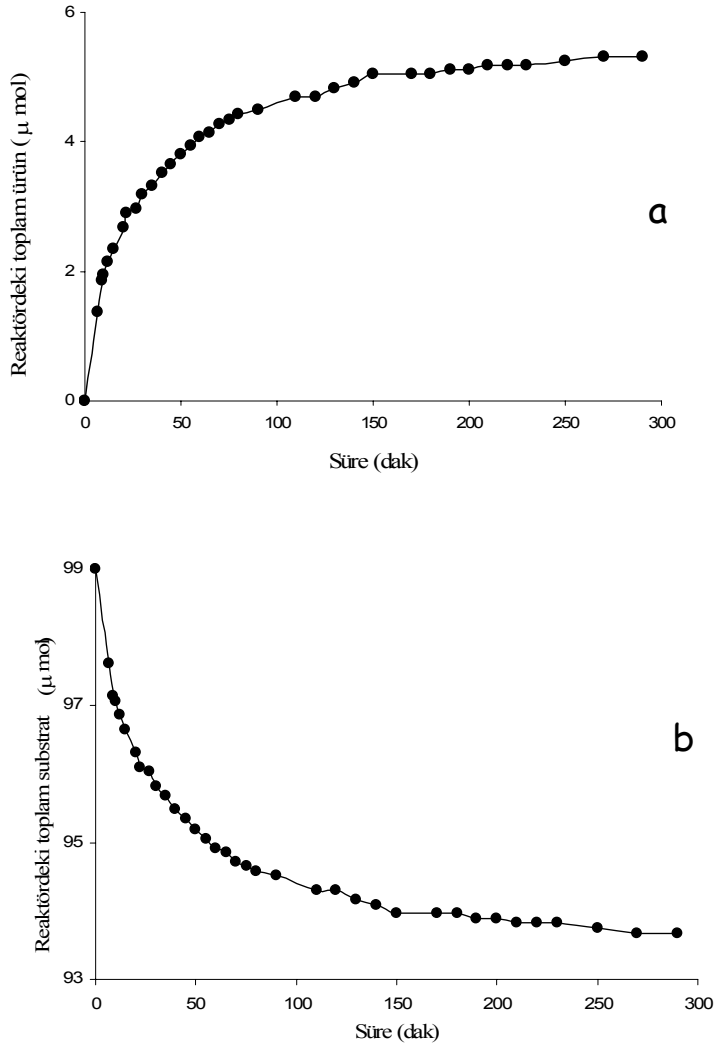
Şekilde görüldüğü gibi, 4 kez kullanım sonrası aktivitesinin yaklaşık % 93'ü korunurken 5. kullanımdan sonra yavaş yavaş düşmektedir; immobilize enzim 10 kez kullanıldığında ise aktivitesinin % 42'sini hâlâ korumaktadır. Beşinci kullanımdan sonra aktivite düşüşü, aynı immobilize GST boncuklarının yeni ortama alınarak aktivite ölçümü sırasında enzim kaçışının söz konusu olması ya da 5 dakika gibi kısa bir inkübasyon süresinde oluşan ürün çıkışlarının sınırlanması olarak düşünülebilir. Ancak, böyle saf olmayan bir GST preparatı için bu sonuçlar enzimin bazı ksenobiotiklerin detoksifikasyonu için uygun olabileceğini gösterir.

6.7. İmmobilize GST İçin Reaktör Dizaynı

6.7.1. Sürekli akış kolon reaktörü

İmmobilize enzimler için medikal ve endüstriyel amaçla en çok kullanılan reaktör sistemi sürekli akış kolon reaktörleridir. İmmobilize enzimlerin uygulamalarında substrat çözeltisinin kolondaki akış yönü oldukça önemlidir. Substrat kolona ya alttan yukarıya doğru veya yukarıdan aşağıya doğru verilir. Ya da substrat alttan verilir ve üstten alınan ürün tekrar sirküle ettirilir. Bazı durumlarda substratın kolona üstten verilmesi, kolonda enzimin sıkışmasına neden olduğu için substratın kolona alttan verilmesi tercih edilir. Sürekli (Continuous) metotlar, kesikli (batch) metotlarla kıyaslandığında önemli avantajları olan sistemlerdir. Bunlar: otomatik kontrol operasyon kolaylığı, operasyon koşullarının stabilizasyonu ve ürünün kolaylıkla kontrolü olarak sıralanabilir. Sürekli metotlarda seçilen kolonun boyutlarına ve işlem sırasında kolonun akış hızına dikkat edilmelidir(Chibata, 1978).

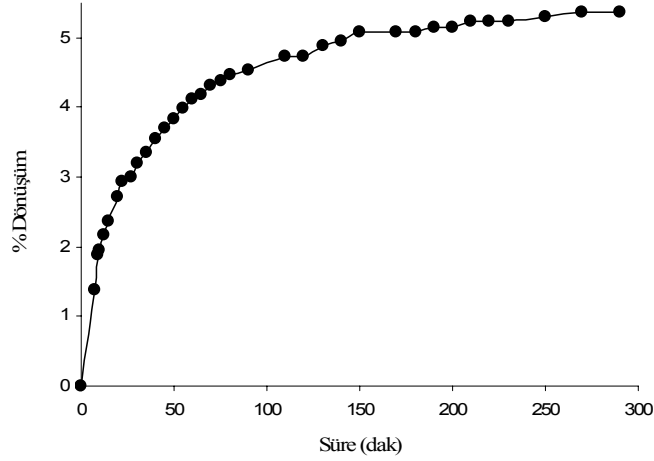
Bölüm 5.9.1’de şekil Şekil 5.2’de gösterilen sürekli akış kolon reaktörü kullanılarak substratın GSH konjugatına dönüşümü başlangıç anında ve reaksiyon süresince farklı zamanlarda periyodik olarak absorbans (oluşan ürüne ait) okundu. Oluşan ürün miktarı hesaplandı ve ürün miktarı ile zaman arasında çizilen grafikte ürün oluşumu gösterildi. Harcanan substrat derişimini bulmak için -ürün ve substrat tepkimde bire bir oranında bulunduğundan- oluşan ürün (2,4-dinitrofenil glutatyon) miktarı kullanıldı (Şekil 6.23).



Şekil 6.23 Sürekli akış kolon reaktöründeki substrat (a) ve ürün (b) miktarları.

Substrat dönüşümü, başlangıç anındaki substrat konsantrasyonundan ve t anındaki substrat konsantrasyonu çıkarılarak ($X = S_0 - S_t$) bulundu. Farklı zamanlardaki X değerleri hesaplanarak, % X ile zaman arasında çizilen grafikten % dönüşüm miktarı belirlendi.

Şekil 6.24’de görüldüğü gibi 6 saat içerisinde substratın yaklaşık % 5,4’ünü dönüştürme uğratmıştır.



Şekil 6.24 CDNB'nin sürekli akış kolon reaktöründeki dönüşüm eğrisi.

İmmobilize enzimlerin sürekli akış kolon reaktör sistemleri düşünüldüğünde, elde edilen dönüşüm oranının düşük olduğu söylenebilir. Bunun sebebi, enzimin daha uzun süre stabil kalmasına rağmen kofaktör olarak kullanılan GSH'ın zaman içerisinde karıştırılmalı sistemde gerek kimyasal konjugasyonu (kör deneme ile izlendi) gerekse GSH'ın GSSG'ye yükseltgenmesi ile kofaktör kaybı sonucu verimin düşmesi olarak açıklanabilir. Bu sorunun çözümü amacıyla, sürekli sistemlerde kofaktörün rezervuar tankına belirli bir süreç sonra eklenmesi ile iyileştirilebilir. Bu ise uygulama maliyetini arttıran bir faktördür. Bir diğer çözüm ise kofaktör ve enzimin birlikte immobilize edileceği bir sistemin tasarlanması olabilir.

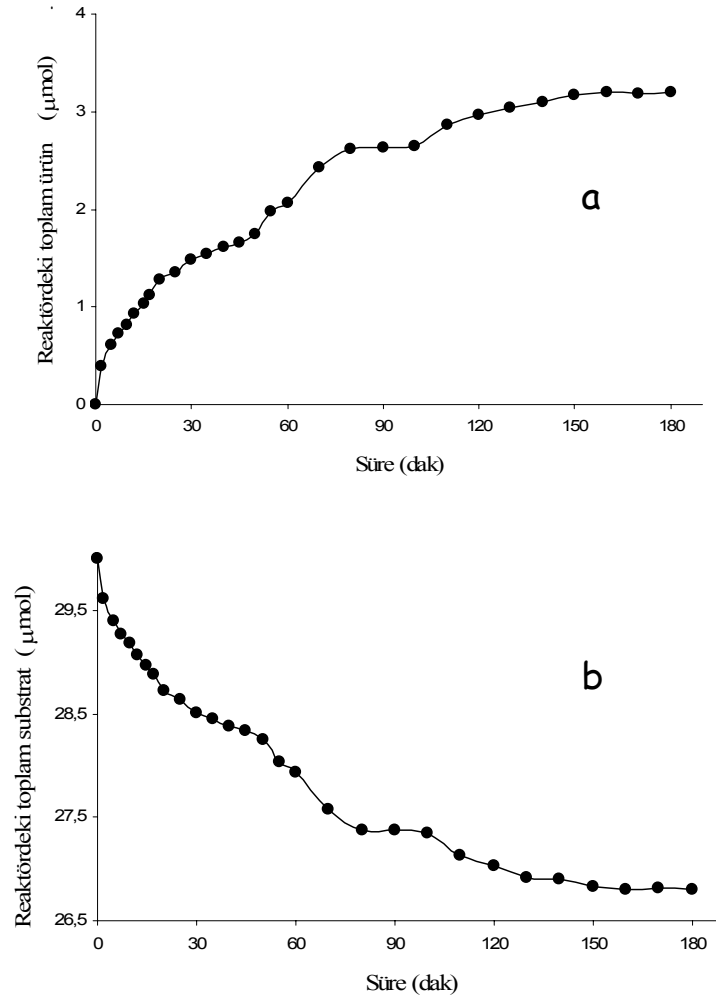
Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan sistem düşünüldüğünde her ne kadar düşük oranlı bir dönüşüm gözlemlense de GST için substrat olarak davranan birçok ksenobiotiğin bazıları için toksikolojik sınırlar altında yeterli olabileceği düşünülmektedir.

6.7.2. Kesikli karıştırmalı tank reaktörü

Kesikli karıştırmalı tank reaktörler en basit reaktör tipleri olup, bir reaktör ve karıştırıcıdan oluşmuş sistemlerdir. Reaktör genellikle çeketli kaplardır. Bu tip reaktörler, özellikle yüksek viskoziteli substrat çözeltileri ile düşük aktiviteli immobilize enzimler ve küçük miktardaki üretim için uygun sistemlerdir. Tek sakıncası, fiziksel karıştırma sırasında enzimin öğütülmesidir ki bunun için de karıştırma hızı genellikle düşük tutulur.

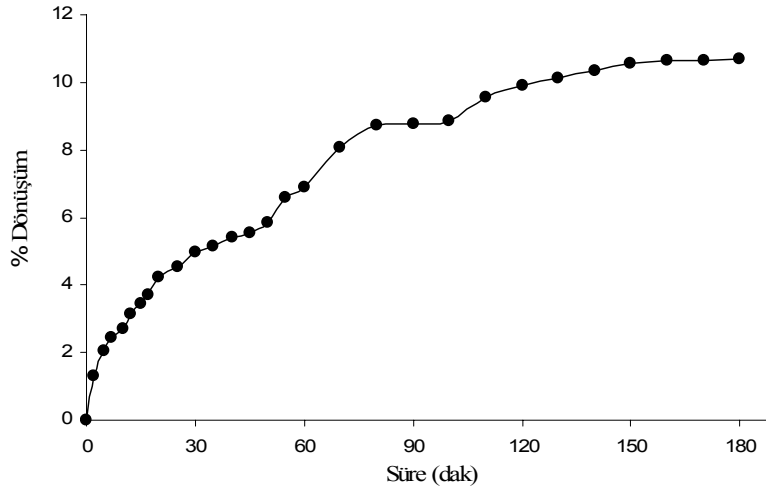
Bölüm 5.9.2 Şekil 5.3'te gösterilen karıştırmalı tank reaktörü kullanılarak glutatyon-s-transferazın CDNB'yi GSH konjugatına dönüşüm reaksiyonu izlendi. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürün (2,4-dinitrofenil glutatyon), farklı zamanlarda rezervuardan alınan örneklerde oluşan ürünün miktarı ekstinksiyon katsayısı kullanılarak 340 nm'de benzer koşullarda işleme tâbi tutulan immobilize enzim preparatı içermeyen köre karşı absorbanları ölçülerek belirlendi. Buradan harcanan substrat miktarı tespit edildi. Bulunan değerler grafiğe geçirildi.

Kesikli karıştırmalı tank sistemindeki substrat ve ürün (2,4-dinitrofenil glutatyon) miktarları Şekil 6.25'de verildi.



Şekil 6.25 Kesikli karıştırmalı tank reaktöründeki substrat (a) ve ürün (b) miktarları.

Substrat dönüşümü, başlangıç anındaki substrat konsantrasyonundan ve t anındaki substrat konsantrasyonu çıkarılarak ($X = S_0 - S_t$) bulundu. Farklı zamanlardaki X değerleri hesaplanarak, % X ile zaman arasında çizilen grafikten % dönüşüm miktarı belirlendi.



Şekil 6.26 CDNB'nin kesikli karıştırılmalı tank reaktöründeki dönüşüm eğrisi.

Şekil 6.26'da görüldüğü gibi üç saat içerisinde substratın yaklaşık % 11'ini dönüşüme uğratmıştır. Karıştırılmalı tank reaktör sisteminde alınan sonuçlara bakıldığında sürekli akış kolon sistemine göre dönüşüm oranı yaklaşık 2 katı olarak izlenmektedir. Bunun sebebi, karıştırılmalı sistemde difüzyonun daha kolay aşılması ile reaksiyon sonucu oluşan ürün oluşumunun daha hızlı olması ile açıklanabilir. Şekiller kıyaslandığında karıştırılmalı tank reaktörde daha hızlı bir şekilde substrat tüketilmektedir. Bu ise gerek enzimatik reaksiyon sonucu oluşan konjugat miktarının (kimyasala karşı) gerekse GSH oksitlenme sürecinin kısılması ile GSH'ın kullanılabilirliğinin artması ile açıklanabilir. Ancak kolon ile benzer reaksiyon süresine yaklaşıldığında, benzer şekilde dönüşüm sabitlenmektedir. Kısa sürede daha yüksek verime ulaşılması açısından bu sistem avantajlı görülmektedir. Sistem seçimi için, düşünülen uygulamanın türüne ve dönüşüme uğratılacak substrat konsantrasyonuna göre tercih yapılması gereklidir.

7. SONUÇ

Bu çalışmada GST'in çeşitli polimerlerde immobilizasyonu amaçlandı. Koyun karaciğerinden ekstrakte edilen glutatyon-s-transferazın immobilizasyonu adsorbsiyon, kovalent bağlama ve matrikste tutuklama yöntemleri kullanılarak, kitosan, aljinat, PGA'le gerçekleştirildi. Kullanılan yöntemler arasından aljinatla kaplı kitosan boncuklarında (% 2 kitosan, % 0,3 aljinat ve % 2 TPP) immobilizasyon verimleri çok daha iyi olduğundan bu yöntemle çalışılmasına karar verildi. Immobilizasyonda kullanılacak enzim miktarı 5 mg olarak tespit edildi.

Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon işlemlerinde CDNB substrat olarak kullanıldı. Aljinat kaplı kitosan boncuklarının çapları 1,2 mm olarak hesaplandı. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH sırasıyla 7,0 ve 7,5 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık ise hem serbest enzim hem de immobilize enzimde 37 °C olarak ölçüldü. Serbest ve immobilize enzim için kinetik parametreler (K_m ve V_{max}) Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla hesaplandı.

İmmobilize enzimin termal, pH ve depo kararlılığının serbest enzime kıyasla daha iyi olduğu bulundu. Operasyonel kararlılık testleri sonucu yarılanma ömrü 22 dakika olarak tesbit edildi. İmmobilize enzimim 10 kez arka arkaya yapılan ölçümlerde aktivitesinin % 42'sini koruduğu gözlemlendi.

Çalışmanın son aşamasında ise GST'ların detoksifikasyon ünitesi olarak ilaç metabolizma çalışmalarında medikal kullanımı amacıyla reaktör tasarımı yapıldı. Kesikli karıştırmalı tank reaktör sisteminde

sürekli akış kolon sistemine göre dönüşüm oranı yaklaşık 2 kat olarak izlendi. Sistem seçimi için düşünülen uygulamanın türüne ve dönüşüme uğratılacak substrat konsantrasyonuna göre tercih yapılması gerektiği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Albarghouthi, M., Fara, D. A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., Badwan, A.,** 2000, Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 206: 23-34
- Angelova, N., Hunkeler, D.,** 2002, Permeability and stability of chitosan-based capsules: effect of preparation, *International Journal of Pharmaceutics*, 242: 229-232
- Aral, C., Akbuğa, J.,** 1998, Alternative approach to the preparation of chitosan beads, *Int. J.Pharm.*, 168: 9-15
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R.,** 2004, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 35-52
- Bethell, G.S., Ayers, J.S., Hancock, W.S.,** 1979, A novel method of activation of cross-linked agaroses with 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups, *The Journal of Biological Chemistry*, 254(8): 2572-2574
- Boadi, D.K.; Neufeld, R.J.,** 2001, Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 590-595
- Caldwell, J.,** 1985, Glucuronic acid conjugation in the context of the metabolic conjugation of xenobiotics, *Advances in glucuronide conjugation, Falk Symposium 40, Matern, Bock, Gerok (Eds.), MTP Pres*, 7-19

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Cao, L., 2005, Immobilised enzymes: science or art?, *Current Opinion In Chemical Biology*, 9: 217-226

Cao, L., Van Langen, L., Sheldon, R.A., 2003, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free, *Current Opinion In Biotechnology*, 14: 387-394

Carraway, K.L., Koshland, D.E.J., 1968, Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents, *Biochim. Biophys. Acta.*, 200: 564-566

Carraway, K.L., Triplett, R.B., 1970, Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents, *Biochim. Biophys. Acta.*, 160. 272-274

Castellenos, I.J., Crespo, R., Griebenow, K., 2003, Poly (ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres, *Journal of Controlled Release*, 88: 135-145

Chandra, R., Rustgi, R., 1998, Biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.*, 23: 1273-1335

Chandy, T., Rao, G.H.R., 2000, Evaluation of heparin immobilized chitosan-PEG microbeads for charcoal encapsulation and endotoxin removal, *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech.*, 28: 65-77

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chandy, T., Moradian, D.L., Rao, G.H.R.,** 1999, Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation, *Artificial organs*, 23(10): 894-903
- Chandy, T., Moradian, D.L., Rao, G.H.R.,** 1998, Chitosan/polyethylene glycol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin, *Journal of Applied Polymer Science*, 70: 2143-2153
- Chibata, I.,** 1978, Immobilized Enzymes, edited by Chibata, I., Halsted Pres, 1-44 p.
- Chirachanchai, S., Lertworasirikul, A., Tachaboonyakiat, W.,** 2001, Carbaryl insecticide conjugation onto chitosan via iodo-chitosan and chitosan carbonyl imidazolidine precursors, *Carbohydrate Polymers*, 46: 19-27
- Chung, T.W., Yang, J., Akaike, T., Cho, K.Y., Nah, J.U., Kim, S.I., Cho, C.S.,** 2001, Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment, *Biomaterials*,
- Coşkun, G.,** 1999, Bitkilerden glutatyon-s-transferazın kısmi saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 61 s.
- Coughtrie, M.W.H.,** 1986, Molecular analysis of biological variations in UDPGT activities, PhD Thesis, *Biochemical Medicine*, Dundee.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cruz, M.C.P., Ravagnani, S.P., Brogna, F.M.S., Campana, S.P., Triviño, G.C., Lisboa, A.C.L., Mei, L.H.I., 2004,** Evaluation of the diffusion coefficient for controlled release of oxytetracycline from alginate/chitosan/poly(ethylene glycol) microbeads in simulated gastrointestinal environments, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 40: 243-253
- Çetinus, Ş.A., Öztop, H.N., 2003,** Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 889-894
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., 2003,** A review of biochemistry of heavy metal biosorption by Brown algae, *Water Research*, 37: 4311-4330
- De Campos, A.M., Sánchez, A., Gref, R., Calvo, P., Alonso, M.J., 2003,** The effect of a PEG versusu a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20: 73-81
- Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Piccolomini, R., Bucciarelli, T., Dragani, B., Faraone, A., Sacchetta, P., R., Federici, G., 1993,** Characterization of Glutathione transferase from *Xanthomonas campestris*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305: 110-114
- Fuerst, E.P., Irzyk, G.P., Miller, K.D., 1993,** Partial characterization of Glutathione-s-transferase isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize, *Plant Physiol.*, 102: 795-802

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gåserød, O., Jolliffe, I.G., Hampson, F.C., Dettmar, P.W., Skjåk-Bræk, G.,** 1998, The enhancement of bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan, *International Journal of Pharmaceutics*, 175: 237-246
- Gibson, G.G., Skett, P.,** 1986, Introduction to drug metabolism, Chapman and Hall Press, London 293 p.
- Gombotz, W.R., Wee, S.F.,** 1998, Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 31: 267-285
- Gupta, K.C., Kumar, M.N.V.R.,** 2001, pH dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly(ethylene glycol) polymer network microspheres, *Journal of Materials Science: Materials In Medicine*, 12: 753-759
- Guthenberg, C., Astrand, L.M., Alin, P., Mannervik, B.,** 1983, Glutathione transferase from rat testis, *Acta. Chem. Scand.*, Ser. B, 37,261 p.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.,** 1974, Glutathione s-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249(2): 7130-7139
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R.,** 2005, Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51-88

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Hearn, M.T.W., 1987, 1-1'-Carbonyldiimidazole mediated immobilization of enzymes and affinity ligands, *Methods in Enzymology*, edited by Mosbach, K., Academic Pres, New York, 135: 120 p.

Hoare, D.G., Koshland, D.E.J., 1967, A method for quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins, *J. Biol. Chem.*, 242: 2447-2453

Hung, T-C., Giridhar, R., Chiou, S-H., Wu, W-T., 2003, Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26: 69-78

Irzyk, G.P., Fuerst, E.P., 1993, Purification and characterization of a Glutathione-s-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*), *Plant Physiol.*, 102: 803-810

Jaguar-Grodzinski, J., 1999, Biomedical application of functional polymers, *Reactive & Functional Polymers*, 39: 99-138

Jakoby, W.B., 1985, Glutathione transferases: an overview, *Met. In Enzym.*, 113:495-510

Jakoby, W.B., Ziegler, D.M., 1990, The enzymes of detoxication, *The journal of biological chemistry*, 265: 20715-20718

Jiang, W.H., Han, S.J., 1999, The interaction of chitosan poly (ethylene glycol) in the presence of added salt in water: viscosity effect, *European Polymer Journal*, 35: 2079-2085

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kierstan, M., Bucke, C.,** 1997, immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 387-398
- Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P.,** 1999, Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction A review, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82: 171-184
- Ko, J.A., Park, H.J., Hwang, S.J., Lee, J.S.,** 2002, Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *Internal Journal of Pharmaceutics*, 249(1-2): 165-174
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A.,** 2004, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology*, 21: 377-397
- Kötz, j., Kosmella, S., Beitz, T.;** 2001, Self-assembled polyelectrolyte systems, *Prog. Polym. Sci.*, 26: 1199-1232
- Krajevska, B., Leszko, M., Zaborska, W.,** 1990, Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 23: 661-667
- Krajewska, B.,** 2004, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 126-139

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Sashiwa, H., Domb, A.J.,** 2004, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem. Rev.*, 104: 6017-6084
- Kurita, Keisuke.,** 1998, Chemistry and application of chitin and chitosan, *Polimer Degradation and Stability*, 59: 117-120
- Kurzer, F., Dauraghi-Zadeh, K.,** 1967, Advanced in the chemistry of carbodiimides, *Chem. Rev.*, 67: 107-152
- Liska, D.J.,** 1998, The detoxification enzyme systems, *Alternative Medicine Review*, 3(3): 187-198
- Menek,A.,**1999, Glutatyon-s-transferaz enziminin immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi,yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 69 s.
- Mi, F-L., Sung, H-W., Shyu, S-S.,** 2002, Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occuring cross-linking agent, *Carbohydrate Polymers*, 48: 61-72
- Monsan, P., Combes, D.,** 1988, Enzyme stabilization by immobilization, *Methods Enzymol.*, 137: 584-598
- Neuefeind, T., Reinemer, P., Bieseler, B.,** 1997, Plant Glutathione S-transferases and herbicide detoxication, *Biol. Chem.*, 378: 199-205
- Oakley, A.J.,** 2005, Glutathione transferses: new functions, *Current opinion in structural biology*, 15: 716-723

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Önal,S.Ç.**, 2000, Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190 s.
- Özer, N., Erdemli, Ö., Sayek, İ., Özer,İ.**, 1990, Resolution and kinetic characterization of Glutathione s-transferases from human jejunal mucosa, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 44: 142-150
- Pascual, S., Haddleton, D.M., Heywood, D.M., Khoshdel, E.**, 2003, Investigation of the effect of various Parameters on the synthesis of oligopeptides in aqueous solution, *European Polymer Journal*, 39(8): 1559-1565
- Peniche, C., Argüeles-Monal, W., Peniche, H., Acosto, N.**, 2003, Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation, *Macromol. Biosci.*, 3: 511-520
- Pickett, C.B., Lu, A.Y.H.**, 1989, Glutathione s-transferases: gene structure, regulation, and biological function, *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 743-764
- Prade, L., Hof, P., Bieseler, B.**, 1997, Dimer interface of Glutathione s-transferase from *Arabidopsis thaliana*: influence of G-site Architecture on the dimer interface and implications for classification, *Biol. Chem.*, 378. 317-320
- Riberio, A.J., Neufeld, R.J., Arnaud, P., Chaumeil, J.C.**, 1999, microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 187: 115-123

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rosevear, A., Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S.,** 1987, Immobilised enzymes and cells, Adam Hilger, Bristol.
- Schönhoff, M.,** 2003, Self-assembled polyelectrolyte multilayers, *Current Opinion In Colloid and Interface Science*, 8: 86-95
- Schröder, P., Berkau C.,** 1993, Characterization of cytosolic Glutathione s-transferase in spruce needles, Part I: GST-Isozymes of Healthy Trees, *Bot. Acta*, 106: 301-306
- Shah, Y., Shah, D.,** 1992, Immobilized enzymes: industrial biocatalyst, *The Industrial Journal of Hospital Pharmacy*, 29(2): 51-58
- Shu, X.Z., Zhu, K.J.,** 2000, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 201: 51-58
- Shu, X.Z., Zhu, K.J.,** 2002, Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure, *International Journal of Pharmaceutics*, 233: 217-255
- Singhal, S.S., Gupta, S., Ahmad, H., Sharma, R., Awasthi, Y.C.,** 1990, Characterization of a novel α -class anionic Glutathione S-transferase isozyme from human liver, *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 279(1): 45-53
- Singhal, S.S., Twar, N.K., Ahmad, H., Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C.,** 1991, Purification and characterization of Glutathione-s-transferase from sugarcane leaves, *Phytochemistry*, 30(5): 1409-1414

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushic, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S.,** 2004, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274: 1-33
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Casarini, D., Pifferi, P.G.,** 2001, A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 427-438
- Sugimoto, M., Morimoto, M., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y.,** 1998, Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives, *Carbohydrate Polimers*, 36(1): 49-59
- Uludağ, H., De Vos, P., Tresco, P.A.,** 2000, Technology of mammalian cell encapsulation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 42: 29-64
- Valles, S.M., Omaththage, P.P., Strong, C.A.,** 2003, Purification biochemical characterization and cDNA cloning of a Glutathione S-transferase from the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10): 981-988
- Vorlop, K.D., Klein, J.,** 1987, Entrapment of microbial cells in chitosan, *Methods in Enzymology*, 135: 259-268
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., Welf, M.,** 2003, Croslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers, *Biomaterials*, 24: 3213-3220

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Warholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B., Von Bahr, C.,** 1981, Glutathione transferases from human liver, *Biochem. Biophys. Commun.*, 98, 512
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W.,** 1994, Structure and function of Glutathione s-transferases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205: 1-18
- Xu, Y., Du, Y.,** 2003, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1): 215-226
- Yang, H., Zeng, Q., Li, L., Zhu, S., Zhou, X.,** 2003, Purification and characterization of a novel Glutathione S-transferase from *Atactodea striata*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(3): 626-631
- Zeng, M., Fang, Z., Xu, C.,** 2004, Effect of compatibility on the structure of the microporous membrane prepared by selective dissolution of chitosan/synthetic polymer blend membrane, *Journal of Membrane Science*, 230: 175-181
- Zhang, M., Li, X.H., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F.,** 2002, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, *Biomaterials*, 23: 2641-2648
- Zihnioğlu, F.,** 1992, Isolation, purification and immobilization of UDP-glucuronyl transferase, PhD Thesis, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 169 s.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Gülseren Coşkun

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi

Biyokimya Bölümü

35100 Bornova/İZMİR

TLF:0-232-3884000 / 1774

email: coskungulseren@gmail.com

Adres:

Evka-3 Mah. 119/9 Sok.

Hilal Sitesi No:3/3 D:5

35050 Bornova/İZMİR

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi : 29.03.1973

Akademik Geçmiş

<u>Akademik Kariyer</u>	<u>Branş</u>	<u>Üniversite</u>	<u>Periyod</u>
Lisans	Kimya	Ege Üniv.	1990-1994
Yüksek Lisans	Biyokimya	Ege Üniv.	1996- 1999
Doktora	Biyokimya	Ege Üniv.	2000-2007