

**KALKAN BALIĞI (*Psetta maxima*) KAS
DOKUSUNDAN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tuğrul KURBANOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı

2015

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KALKAN BALIĞI (*Psetta maxima*) KAS DOKUSUNDAN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tuğrul KURBANOĞLU

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

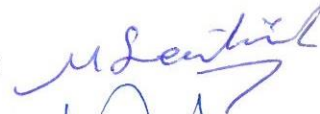


TEZ ONAY FORMU

**KALKAN BALIĞI (*Psetta maxima*)
KAS DOKUSUNDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL danışmanlığında, Tuğrul KURBANOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 17/04/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arzu UÇAR

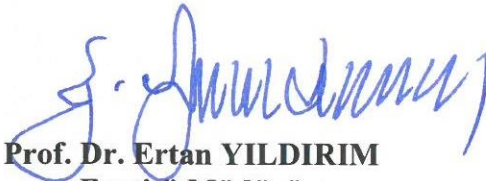
İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.05/2015 tarih ve 20 / 709 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALKAN BALIĞI (*Psetta maxima*) KAS DOKUSUNDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Tuğrul KURBANOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı
Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

Bu çalışmada, kalkan balığı (*Psetta maxima*) kas dokusundan karbonik anhidraz (CA) enzimi saflaştırılmış ve bu enzimin kinetik davranışları ve bazı özellikleri belirlenmiştir. Saflaştırma basamakları; hemolizat hazırlanması ve afinite jel kromatografisi işlemidir. CA enziminin saflaştırılmasında, enziminin spesifik aktivitesi 755.2 EU/mg protein, verim 69.05 ve saflaştırma katsayısı 50.65 olarak belirlenmiştir ve yapılan saflaştırma işlemlerinin hepsi +4°C'de gerçekleşmiştir. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılan CA enziminin molekül ağırlığı 29.7 kDa olarak belirlenmiştir. Kalkan balığının (*Psetta maxima*) kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum iyonik şiddeti 0.020 M Tris-SO₄ tamponu, optimum pH'sı 8.0, stabil pH'sı 8.0 ve optimum sıcaklığı 30°C olarak gözlenmiştir. Enzimin kinetik özellikleri içerisinde yer alan K_M değeri 0,344 mM ve V_{max} değeri de 0,253 EÜ/ml olarak belirlenmiştir.

2015, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kalkan balığı, kas dokusu, karbonik anhidraz, metal iyonu

ABSTRACT

MSc Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF KINETIC FEATURES OF CARBONIC ANHYDRASE FROM TURBOT (*Psetta maxima*) MUSCLE TISSUE

Tuğrul KURBANOĞLU

Atatürk University
Graduate School of Science and Arts Faculty
Department of Fisheries Engineering
Fisheries Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet TOPAL

In this thesis, purification of carbonic anhydrase from turbot (*Psetta maxima*) muscle tissue was done and analysis of the kinetic properties of the enzyme are described. The purification steps are hemolysate preparation and affinity gel chromatography. During the purification process, the enzyme was determined to have specific activity of 755,2 EU/mg proteins, yield of 69,05% and purification fold of 50,65. All of the purification steps were performed at +4°C. The molecular weight of the enzyme was calculated to be 29,7 kDa by means of SDS-PAGE. The optimum ionic strength was 0.02 M Tris-SO₄ buffer, both optimum and stable pH was 8.0, and the optimum temperature was 30°C. K_M and V_{max} values were determined as 0,344 mM and 0,253 EU/ml, respectively.

2015, 40 pages

Keywords: Rainbow Trout, Tissue, Carbonic Anhydrase, Inhibition

TEŞEKKÜR

Çalışmada, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL ve özellikle araştırmanın planlanması, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları ve sonuçların yorumlanmasına kadar her konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Deniz EKİNCİ'ye derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP'e ve Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğrul KURBANOĞLU

Nisan, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	13
3.1.2. Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	13
3.2. Metot	16
3.2.1. Kalkan balığı kas dokusundan CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler	16
3.2.1.a. Kalkan balığı kas dokusunun temin edilmesi ve homojenat hazırlanması	16
3.2.1.b. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması, numunelerin afinite kolonuna tatbiki ve CA'nın elüsyonu	17
3.2.1.c. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini.....	18
3.3. Protein Tayini	20
3.3.1. Kalitatif protein tayini	20
3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	21
3.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü	21
3.5. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar	23
3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması	23
3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için iyonik şiddet çalışması.....	23
3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar.....	23

3.5.4. Sıcaklığın kalkan balığı kas dokusu CA enzimi üzerindeki etkisinin incelenmesi	24
3.5.5. p-Nitrofenil asetat substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	25
4.2. Kalkan Balığı Kas Dokusu CA Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları	25
4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	26
4.4. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar	27
4.5. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enziminin Optimum İyonik Şiddetinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	29
4.6. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Stabil pH Değerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar	29
4.7. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Tespit Edilmesine Yönelik Sonuçlar	30
4.8. Enzim için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmaların Sonuçları	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	25
Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan kalkan balığı kas karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....	27
Şekil 4.3. Kalkan balığı kas CA enziminin optimum pH'sı için 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak oluşturulan aktivite ölçüm grafiği	28
Şekil 4.4. Kalkan balığı kas CA enziminin optimum pH'sı için 20mM fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm grafiği	28
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Tris-HCl Tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen Kalkan balığı kas dokusu CA enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	29
Şekil 4.6. Kalkan balığı kas CA enzimi için farklı pH'lardaki 20mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği	30
Şekil 4.7. Kalkan balığı kas CA enzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi ve değerlerin çizilen sıcaklık-aktivite grafiği	31
Şekil 4.8. Lineweaver-Burk grafiğinin Kalkan balığı kas dokusu CA enzimi için değeri	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Afinite kolonundan kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma değerleri.....	26
---	----

1. GİRİŞ

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2012 istatistiklerine göre dünyada, deniz ve içsularda mevcut türlerin toplamının yaklaşık 170.000 olduğu, bunların ancak 500 kadarının ekonomik önem taşıyan türleri oluşturduğu bilinmektedir. Dünya'da su ürünleri üretimi ve ticaretinde temel olarak 58 ülke faaliyet göstermektedir. 2010 yılında toplam su ürünleri üretimi 148 milyon ton olmakla birlikte bu üretimin 128 milyon tonu gıda olarak tüketilmiştir. 2011'de üretim miktarı 154 milyon tona çıkarken bu üretimin 131 milyon tonu gıda olarak tüketilmiştir. 2011'de üretim miktarı 154 milyon tona çıkarken bu üretimin 131 milyon tonu gıda olarak tüketilmiştir. Su ürünleri üretimindeki sürekli büyüme ve gelişen dağıtım kanalları ile birlikte kişi başına düşen su ürünleri miktarı 1960'larda 9.9kg iken 2010 istatistiklerine göre bu sayı 18,6 kg'a yükselmiştir (FAO, 2012).

TÜİK verilerine göre ülkemizde su ürünleri üretimi 2013 yılında bir önceki yıla göre %5,8 azalarak 607 515 ton olarak gerçekleşmiştir. Üretimin %48,6'sını deniz balıkları, %7,2'sini diğer deniz ürünleri, %5,8'ini içsu ürünleri ve %38,4'ünü yetiştiricilik ürünleri oluşturmaktadır. Avcılıkla yapılan üretim 374 121 ton olurken, yetiştiricilik üretimi ise 233 394 ton olarak gerçekleşmiştir. Deniz ürünleri avcılığı bir önceki yıla göre %14,5, içsu ürünleri avcılığı ise %2,9 azalmıştır. Deniz ürünleri avcılığı ile yapılan üretimde ilk sırayı %51'lik oran ile Doğu Karadeniz Bölgesi olmuştur. Bu bölgeyi %21,7 ile Batı Karadeniz, %12 ile Marmara, %9,4 ile Ege ve %5,9 ile Akdeniz Bölgesinin izlediği rapor edilmiştir (TÜİK 2013).

Son 15 yılda Avrupa'da kalkan üretimine bakıldığında 10100- 14100 ton aralığında değişmektedir. 2008 yılında üretim 71.31 milyon Euro (7.9 €/kg) fiyat ile 9000 tona yükselmiştir. İspanya'dan sonra Portekiz ve Fransa kalkan balığının toplam üretiminin %85'ini oluşturarak üretimde ileri gelen ülkeler konumuna gelmişlerdir. Kalkan balığının ağırlığı arttıkça satış fiyatı da artmaktadır.

Ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan gökkusağı alabalığı, çipura ve levrek üretimindeki artış fiyatlarda düşmeye neden olmuş ve bu durum, yetiştiricileri yeni tür arayışına itmştir. Türkiye karasularındaki doğal stoklarının gittikçe azalması ve piyasa fiyatının yüksek olması sebebiyle kalkan balığı yetiştiriciliğini cazip hale getirmiştir (Hara 2001).

Kalkan balığı yetiştiriciliği konusundaki en eski bilgi 21. yüzyılın başında sağım larva elde edildiğine ilişkindir. Fakat bu konudaki çalışmalar esas olarak ilk kez İngiltere ve Fransa'da 1970'li yıllarda yapılmıştır. İspanya'da ise ilk yetiştiricilik denemeleri 1980'li yılların başında gerçekleşmiştir. Karadeniz kalkan balığının yavru üretimi ile ilgili çalışmalar Rusya ve Ukrayna'da 1990'da başlatılmıştır, fakat günümüzde sadece devlet destekli Rusya kuluçka ünitesi ve Rusya'nın güneyinde yer alan Anapa'da bulunan özel bir tesis bu konuda çalışmaktadır. Burada yapılan çalışmalarda yalnızca doğal stokların desteklenmesi hedeflenmektedir (Aksungur 2003).

Ülkemizde ise 1997 yılında Tarım ve Köyisleri Bakanlığı ile Japon Uluslararası işbirliği Kuruluşu (JICA) arasındaki bir proje gereğince; Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde kontrollü döl alım ve büyütme çalışmaları yürütülmüş ve bu çalışmalar hala devam etmektedir. Trabzon'da Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde sürdürülen çalışmalarda kalkan balığının üretim tekniklerinin geliştirilmesi ve anaç stoku oluşturulmasına yönelik olarak sürdürülen çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır (Aksungur 2003).

Kalkan yassı balıklar takımının bir üyesidir. 14 aile ve 716 alt türden oluşmaktadır. (Munreo 2005). Kalkan balığının sistematigi hakkında farklı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak halen isimlendirilmesinde fikir birliğine varılamamıştır. Karadeniz kalkanının morfolojik olarak Atlantik kalkanından farklı olduğu fakat taksonomik olarak aynı oldukları belirtilmiştir. Amaoka *et al.* (2001) tarafından Karadeniz kalkanı *Psetta maxima* olarak adlandırılırken Froese *et al.* (2007) tarafından *Psetta maxima maeotica* şeklinde adlandırılmıştır. Karadeniz'de yer alan kalkan balığını *Psetta maxima maeotica* şeklinde tanımlanmıştır (Chanet 2003). Aynı zamanda *Scophthalmus maximus* ile

Karadeniz kalkanının aynı tür içinde düşünülmesinin uygun bir yaklaşım olduğunu vurgulamaktadır.

Kalkan balığı için Karadeniz’de farklı iki alt türden söz edilmiştir. Ancak iki farklı türden söz edilmesine rağmen birbirlerinden ayırt etmenin kolay olmayacağı belirtilmiştir. Bu nedenle kaynaklarda geçen *Scophthalmus* ve *Psetta* cinslerinin ancak birbirlerinin sinonimleri olabilecekleri varsayılmaktadır (Polat 2011).

Kalkan Balığının Sistematikteki yeri

Sınıf : Kemikli balıklar (Osteichthyes)

Alt sınıf : Isın yüzgeçliler (Acanthoptergii)

Bölüm : Hakiki kemikli balıklar (Teleostei)

Takım : Yassı balıklar (Pleuronectiformes)

Aile : Kalkan balıkları (Scophthalmidae)

Cins : *Psetta* (*Scophthalmus*)

Tür : *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758)

Scophthalmus maximus,

Psetta maxima maeotica

Kalkan balığı yuvarlak bir vücut yapısına sahiptir. Küçük yapıda olan gözleri vücudunun sol tarafında bulunmaktadır. Göz çapından daha geniş burun genişliğine sahiptir. Gözün alt kısmına kadar uzanan ya da biraz geçen ağız uzunluğuna sahiptir. Pektoral yüzgecin hemen üstünde kavis oluşturan oldukça gelişmiş iki adet yan çizgi mevcuttur. Diğer balıklarda mevcut olan karakteristik pullar kalkan balığında bulunmamaktadır. Ancak vücudunun her iki tarafında farklı genişliklerde kemiksiz veya kemikli tüberküllu yapılar yer almaktadır. Bu yapıların büyüklüğü göz çapından geniş ya da daha küçük olabilmektedir. Pullarla kaplı olmayan anal ve dorsal yüzgeçleri mevcuttur ve bu yüzgeçlerin uç kısımlarında ayrık olarak ışınları bulunmamaktadır (Chanet 2003).

Kalkan balıklarının bir tarafında göz bulunurken diğer tarafı kör yapıdadır. Yani gözler vücudun sağ tarafına yerleşmiştir. Uzun ve basit yapılı ventral yüzgeçlerin birisi gözlü tarafta bulunurken diğeri kör tarafta bulunmaktadır. Solungaçları üzerinde yaklaşık olarak 11-12 adet dikene benzer yapılar vardır (Munreo 2005).

Yaşam alanı olarak kuzey’de İzlanda ve Baltık kıyılarından 68. enleme sahip olan İskandinavya sahilleri ve güney tarafta Fas kıyıları boyunca, Karadeniz ve Akdeniz’e kadar uzanan bölgeye yayılmaktadırlar. Yassı ve yüksek ekonomik değere sahip olan Kalkan balığı, Akdeniz ve Marmara denizinden ziyade Karadeniz’de daha yaygın olarak görülmektedir. 70-100 metre derinliklerde çamurlu ve kumlu alanlarda yaşayan kalkan balıklarının boyları yer yer 1 metreye ulaşmaktadır. Kalkan balıkları yumurta bırakmak amacıyla mart ayı ortalarından mayıs ayı ortalarına kadarki dönemi kıyı sularında geçirmek için göç ederler (Hara 2001).

Kalkan balıklarının davranışları ve yaşama dönemleri bulundukları ortama göre farklılıklar göstermektedir. Yaz boyunca yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık olarak 18-25°C sıcaklıktaki denizin açıklarında su üstünde tabakalar halinde görülürler. Bu dönemleri kapsayan ilk iki aylık dönemde yüzeyde pelajik olan zooplanktonlar ile besin ihtiyaçlarını karşılarlar. Yazın ikinci yarısında metamorfoz sonrasında larvalar bentik yaşama geçerler. Larvalar suların sıcak zamanlarında küçük krustaseler ile beslenebilmek için sığ sular olan kumlu koylarda birikirler. Suların soğumaya başladığı Eylül-Ekim aylarına kadar kıyılarda yaşayan larvalar daha sıcak yaşama alanı bulabilmek için kıyıdan 15-20 metre derinliklere doğru giderler. Bunun yanında üç yaşındaki balıkların bir bölümü ile eşeyssel olgunluğa henüz ulaşmamış bir ya da iki yaşındaki genç balıklar daha derinlere inerler ve ortalama 20-30 metre derinliklerde yaşam alanları bulurlar. Yaşamlarını sürdürebilmek için kaya balığı, gümüş balığı, hamsi gibi küçük balıklar, yavru balıklar ve bazı kabuklular ile beslenirler (Chanet 2003).

Kalkan balıklarının yumurta verimlilikleri birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Atlantik kalkanlarının ortalama yumurta sayısı erişkin bireyler için 3.5-4.2 milyon iken

Karadeniz kalkanlarının yıllık olarak toplam yumurta miktarı 9 milyon kadardır (Jones 1974; Samsun 2004).

Çalışmamızda Kalkan balığı kas dokusundan karbonik anhidraz enzimi safaştırılarak karakterize edildiği için aşağıda enzimler hakkında kısaca bilgi verilmiştir.

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyon arasında enzimler substratları kullanışlı yollara seçici olarak kanalize ederler ve böylece bütün metabolik olayları yönlendirmiş olurlar. Enzimler proteinlerin en büyük ve en özel grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere 'substrat' adı verilir. Bazı enzimler substrat adının sonuna '-az' eki getirilerek adlandırılırken, bazıları da ilk keşfedenlerin ortaya attığı isimlerle tanınmaktadır. Fakat bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğinden, Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C) belirlenmiştir (Yüreğir 1981).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken bazıları da protein yapısında olmayan 'kofaktör' adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi 'koenzim' denilen kompleks organik bileşik yapısında da olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Kofaktörlere sahip olan enzimlere 'holoenzim' denilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Lehninger 2013).

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü.) cinsinden verilir. Optimal şartlarda, 1µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına 'bir enzim ünitesi' denilmektedir. 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi

‘spesifik aktivite’ olarak tanımlanır ve bu da enzim saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger 2013).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi; katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün olmaksızın yürümelerine sebep olmaktadır. İkincisi ise, laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi oldukça zor olan bazı reaksiyonların enzimlerin varlığında hücre içi şartlarında birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlayan katalizleme güçleridir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Bütün canlı organizmalarda anahtar bir metabolit olan CO_2 ’in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO_2 , karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Karbonik anhidraz (CA) enzimi canlı organizmalarda CO_2 ’in hidratasyon ve HCO_3^- ’ın dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzim ailesidir. Buna ilaveten göz lensi, gastrik mukoza ve böbrek dokularında H^+ ve HCO_3^- birikiminde de görev yapmaktadır. CA enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında karalı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır (Supuran and Scozzafava 2001).

Bugüne kadar çeşitli memeli dokularında 16 adet karbonik anhidraz izoenzimi tespit edilmiştir. Belirlenen CA izoenzimleri arasında, 4 izoenzim sitozolik formda; 4 izoenzim membrana bağlı; 1 izoenzim mitokondriyel ve 1 izoenzim de tükürük gibi çeşitli salgılarda tespit edilmiştir (Parkkila *et al.* 1998; Mori *et al.* 1999; Ekinci *et al.* 2013).

Bitki kloroplastlarındaki CA enziminin henüz tam olarak aydınlatılmamakla beraber, fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu, kloroplast hücresinin dışında membrana bağlı CA enziminin bikarbonatın CO_2 ’e dehidratasyonunu aktivite

ederek CO₂ üretiminde artışa ve böylece hücreye CO₂ desteğinde artışa sebep olduğu düşünülmektedir (Pocker and Joan 1973; Tsuzuki and Miyachi 1989).

Kan karbondioksitinin transportu ve atılımı birçok omurgalılarda aynı basit stratejiye bağlıdır. CO₂, dokulardan eritrositlere CA enzimi tarafından bikarbonat ve protona dönüştürülerek katalizlenmesiyle konsantrasyon gradiyenti doğrultusunda difüze olur. Oluşan protonlar Hb tarafından tamponlanırlar. Bu CO₂ transport prosesinin iki önemli bileşenleri; eritrosit CA'sı ve eritrosit Cl⁻: HCO₃⁻ pompasıdır (Perry 1996; Supuran 2008).

Karbonik anhidraz izoenzimleri; doku spesifitesi, aktivitesi ve inhibitörlere karşı tepkisi açısından birbirinden farklıdır (Maren 1960; Maren 1967; Maren *et al* 1997). Birçok ilkel omurgalılarda tek bir karbonik anhidraz izoformu vardır (Maren *et al.* 1997). Fakat gelişmiş kemikli balıklar yüksek katalitik aktiviteye sahip olan karbonik anhidraz II formunu ihtiva ederler (Hall and Schraer 1983; Henry *et al.* 1988; Maren *et al.* 1997).

Balıklarda solungaç epitelinin iç yüzeyinde ve kan plazmasında karbonik anhidraz aktivitesi görülürken kemikli balıklarda bu görülmez. Bu nedenle CO₂/HCO₃⁻ hidrasyon yada dehidrasyon reaksiyonları katalize edilmemiş oranlarda meydana gelir (Rahim *et al.* 1988; Henry *et al.* 1988; Perry *et al.* 1996; Acierno *et al.* 1997; Gilmour *et al.* 1997). CA aktivitesi gerçekleşmediğinde, kaslardan kana geçiş yapan serbest haldeki protonların plazmadaki bikarbonat titrasyon hızı düşmüş olur ve meydana gelen bu asitin eritrosit hücrelerine taşınma hızı oldukça düşük olduğundan oluşan asitli ortamdan eritrositler korunmuş olur. Bununla beraber kanın pH dengesinin düzenlenmesi kolaylaşmış olur. Çünkü CA aktivitesinin azalması solungaç epitelindeki CO₂ atılımını azaltmıştır (Lessard *et al.* 1995).

Yapılan fazla miktarda egzersiz ve gerekli oksijenin alınamaması durumunda kana yüksek miktarda asit salınacağından kan pH'sı ve bununla birlikte hemoglobinin oksijen taşıma oranında azalacaktır (Root etki) ve bu azalma ile beraber dokulara dağılan oksijen miktarında düşüş olacaktır. Fakat balıklarda salgılanan katekolaminlerin

eritrosit pH'sını yükseltmesiyle bu etki en aza düşürülür (Motaïs *et al.* 1989; Nikinmaa *et al.* 1990; Wood and Munger 1994).

Doğal inhibitörlerin varlığından dolayı ilkel omurgalıların ekstraselüler sıvılarındaki CA aktivitesinin oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. Alabalıkların potansiyel CA inhibitörlerine sahip oldukları bilinmektedir. Buda plazmadaki CA inhibitörlerinin etkinliğinin türden türe değiştiğini göstermektedir. Alabalıkların sahip olduğu potansiyel inhibitörlerin eritrosit CA'sı ile oluşan cross-reaksiyonu filogenetik akrabalıkla ilişkilendirilmektedir. Birçok değişik fizyolojik etkilerin sonucu olarak balık plazmasında var olan CA inhibitörlerin seçimi yapılmaktadır. Eritrositlerin intraselüler pH'larının korunması, eritrositlerin kırılabilirliği ve eritrositlerin, solunumun kontrolü gibi farklı örnekler fizyolojik etkilere örnek olabilir (Henry *et al.* 1988).

Karbonik anhidraz ve proton ATPaz enzimleri tatlı su balıklarında birlikte yer alırlar. CA, Proton ATPaz enzime proton sağlar. Solungaç epitelinin bazal bölgesinde CA bulunmadığı için solungaçlardan geçerken plazma karbondioksit/bikarbonat reaksiyonları, CA olmadığından katalize edilememekte ve kanın solungaçlardan geçmesi sırasında bu reaksiyonlar eritrositlerde katalize edilmektedir (Randall and Brauner 1998).

Kıkırdaklı balıkların solungaçlarının içindeki bazal membrana bağlı CA enziminin olması onları akuatik ilkel omurgalı yapar. Solungaç membranında var olan CA enziminin asıl işlevi pH ve/veya solunum sistemindeki CO₂ hassasiyeti ile ilişkilidir. Bunun yanında CO₂ atılımının devamlılığında sağlamaktadır (Henry *et al.* 1997).

Bu çalışmanın amacı balıklarda bir çok dokuda ve organda bulunan ve solunum enzimi olarakta bilinen karbonik anhidraz (CA) enzimini kalkan balığı kas dokusundan saflaştırarak karakterize edilip kinetik özelliklerini belirlemektir. Bu enzim kalkan balığı kas dokusundan basit kromatografik yöntemlerle çok düşük maliyetle ve hızlı bir şekilde saflaştırılmış olacaktır. Çalışmadan elde edilecek veriler CA enzimi üzerinde çalışan multidisipliner araştırmacılar için önemli literatür kaynağı oluşturacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lessard *et al.* (1995), tarafından yapılan çalışmada, sığır CA enzimini gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) enjekte ederek alabalık kan değerlerini incelemişlerdir. Toplam laktat içeriği, organik fosfat, hemoglobin miktarı, katekolamid seviyeleri, O₂, CO₂, hemotokrit değerleri, eritrosit pH'sı ve plazma pH'sını üzerindeki etkilere bakmışlardır. Araştırma sonucunda elde edilen bilgiler, uygulanan CA enziminin kan oksijen oranını etkilemediği ancak, plazmadaki toplam CO₂ miktarını önemli derecede etkilediği sonucuna varılmıştır.

Gervais and Tufts (1998), yaptıkları çalışmada, *Amia calva* olarak adlandırılan ilkel balıklarda CA izoenzimlerinin solungaç ve hava kesesinden karakterize edilmesi ve hücre içindeki dağılımlarını incelemişlerdir. Solungaçlardan alınan CA enziminin, hücre içi fraksiyonları dağılımı diferansiyel santrifüj ile belirlenmiş ve büyük bir kısmının kaynağının sitoplazma olduğu bildirilmiştir. Plazma CA olarak Sülfonamid ve *Amia calva* inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmada, solungaçlarda CA II'ye benzediği görülen bir adet CA izoenziminin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Farklı olarak hava kesesinde bulunan CA'nın orjininin membrana bağlı mikrozomal olduğu, solungaçlarda gözlenen durumun tersi bir durum olduğu kaydedilmiştir. Bunun yanında SDS'ye ve CA inhibitörlerine olan hassasiyeti memelilerden elde edilen akciğer CA IV izoenzimi ile benzerlik göstermiştir.

Henry *et al.* (1997), tarafından yapılan çalışmada, CA aktivitesi, kıkırdaklı ve kemikli balıkların plazmasında ve solungaç doku fonksiyonlarındaki inhibitörlerin varlığına bakılmıştır. Solungaç ve eritrosit hücrelerindeki plazma CA aktivitesi karşılaştırılmış ve solungaç dokusu aktivitesinin eritrosit dokusu aktivitesine göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca eritrosit hemolizi ile doğrudan ilişkili olduğu ve bir yan ürün olduğu bildirilmiştir. Zengin mikrozom içerikli köpek balığı solungaçlarının CA aktivitesinin, kemikli balıkların CA aktivitesinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Lopez Mananes *et al.* (2000), yaptıkları çalışmada, yengeç (*Chasmagnathus granulata*) solungaçlarında CA enzim aktivitesinin oluşumu, yeri ve çevresel tuzluluğa karşı gösterdiği cevabını araştırmışlardır. Solungacın tüm kesimlerinde CA aktivitesinin tuzluluğa bağlı olduğu gözlenmiş ve solungaçlardaki CA aktivitesi dağılımının değişik solungaç bölgeleri arasında farklı olduğu bildirilmiştir. Ön ve son solungaçlardaki CA aktivitesi sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunmuş ve her iki enzim aktivitesinin tuzluluktan etkilendiği, sulfonamid ve asetozolamide hassas olduğu belirlenmiştir.

Mayer-Gostan *et al.* (1997), yaptıkları çalışmada, kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) ve gökkuşağı alabalığı'nın (*Oncorhynchus mykiss*) epitel hücrelerini karakterize etmişlerdir. Bu hücreler balıkların iç kulağında yer alarak iyon değişiminden sorumlu oldukları sanılmaktadır. Her iki türde de epitelyum hücrelerinin, steromikroskop ve ışık mikroskopunda belirlenen genel görünüşlerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca Na^+/K^+ -ATPaz ve karbonik anhidraz II enzimlerinin hücrelerde var olduğu tespit edilmiştir.

Zaharia *et al.* (2001), asetat, propiyonat, bütirat ve izobütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin bağırsak mukoza CA enzim aktivitesi üzerine olan etkisinin ve bağırsak Na^+ emiliminin araştırıldığı çalışmada; bu mekanizma içerisinde CA enzimi metabolizmasının ve mukozal kısa zincirli yağ asitlerinin yer almadığı aynı zamanda bağırsakta Na^+ emilimini kısa zincirli yağ asitlerinin aktive ettiği belirlenmiştir.

Tohse and Mugiya (2001), yaptıkları çalışmada salmon (*Oncorhynchus masou*) balıklarında, enzim ve anyon taşıyıcı inhibitörlerin, iç kulak sıvısı ve otolit sıvısı içerisine kalsiyum ve inorganik karbon birleşimi üzerine olan etkisi *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Ortamdaki klor iyonu artışına bağlı olarak karbon bileşiminin azaldığı, 10 mM'ına kadar kalsiyum bileşiminin klor ve bikarbonat iyon konsantrasyonunun etkilenmediği, ancak çok yüksek bikarbonat iyon konsantrasyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Karbon birleşiminin disülfonat stilbenes (DIDS ve SITS), otolitlerde asetazolamid, oubain ve tiyosiyanate tarafından iç kulak sıvısında inhibe edildiği,

bununla beraber bu inhibitörlerden kalsiyum bileşiminin etkilenmediği izlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında bikarbonat iyonlarının iç kulak sıvısına HCO_3^- ATPaz ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pompaları vasıtasıyla taşındığı, otolit kalsifikasyonu için karbonat sentezlenmesinde CA enziminin rol aldığı kanısına varılmıştır.

Invers *et al.* (1999), tarafından yapılan çalışma ile hücre dışındaki CA enziminin *P. Oceanica* ve *C. nodosa* deniz yosunlarında dolaylı olarak bikarbonat kullanımının önemi araştırılmıştır. Ve büyük önem taşıdığı görülmüştür. Ayrıca, yüksek fotosentez oranı sürdürebilen *Ulva sp.* de yüksek pH şartları altında makroalglerde bikarbonat kullanım mekanizması incelenmiş ve başka bir etkiye rastlanmamıştır. Sonuç olarak başka bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Bikarbonat kullanımının deniz yosunlarında önemli bir mekanizma eksikliği meydana getirdiği; fotosentezde meydana gelen düşüşe artan pH değerleriyle açıklık getirilebileceği ve deniz yosunlarındaki besin alınabilirliği, üretimdeki sınırlamanın ve ışıklandırma şartlarındaki inorganik karbon vasıtası ile açıklanabileceği düşünülmüştür.

Luquet *et al.* (1998), yaptıkları çalışmada, solungaç ve hava soluyan yengeçler'in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Grapsidae) beraber hava soluması durumunda oluşan fizyolojik cevap araştırılmıştır; başlangıç bulgularında, CA enziminin bikarbonatı CO_2 'ye dönüştürmesiyle meydana gelen bikarbonatın kanda artışının solungaç epitelyumundaki bazolateralde dengeyi sağladığı görülmüştür. Asetazolamid ile CA enziminin inhibisyonunda CO_2 atılımı düştüğü ve kısmi CO_2 (P_{CO_2}) oranının arttığı ve meydana gelen solunum asitlenmesinin Cl^- ve Na^+ arasındaki konsantrasyon farkının yükselmesi ile telafi edilebileceği belirtilmiştir.

Peterson *et al.* (1997), CA genininden protein üretimi ve mRNA'nın karakterize edildiği kemikli balıklarla ilgili ilk çalışmada; 29.000 Da ağırlığındaki CA enzimi zebra balıklarından (*Danio rerio*) izole edilerek iki peptid parçasının sıra analizi yapılarak CA enziminin inhibisyon kinetiğinden daha yüksek aktiviteli olduğu verisine ulaşılmıştır.

Ayrıca, 1537 çift baz karakterize edilmiştir. Bu baz çiftleri izole edilen proteinin 260 amino asit sırasını şifrelediği tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Araştırmada kullanılan kimyasallar, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametiletillen daimin (TEMED) Sepharose-4B, diyaliz torbası, standart serum albumin ve L-tirozin Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sülfanilamid, sodyum bikarbonat, sodyum sülfat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, sodyum perklorat, 2-merkaptotanol, sülfirik asit, brom timol mavisi, glisin, fosforik asit, hidroklorik asit, sodyum barbital, metanol, etanol, izoproponal, aseton, sodyum azotür, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, R-250 E. Merk AG'den, coomassie brillant blue G-250; karbondioksit gazı ve sodyum hidroksit dışarıdan temin edilmiştir.

3.1.2. Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Araştırma boyunca kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanılış yerleri aşağıda belirtilmiştir.

- 1) 0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 950 ml destile suda 16,8 g NaHCO_3 çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titrasyonu yapıldıktan sonra, toplam su hacimi destile ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- 2) 25 mM Tris-HCl / 0,1M Na_2SO_4 , pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 950 ml destile suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 , çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litre oluncaya kadar destile su ilave edilmiştir.
- 3) 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7 (hemolizat uygulamasından sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon), 950 ml destile suda 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye ulaşınca kadar destile su ilave edilmiştir..

- 4)** 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 , pH=5,6 (gökkuşaağı alabalık doku CA enziminin kolona tutunmuş elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 120 ml destile su ile 2,04 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ve 9,187 g NaClO_4 çözülerek, 1 N HCl ile pH=5,6'ya getirildikten sonra hacim 150 ml'ye ulaşana kadar destile su ilave edilmiştir.
- 5)** %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için gerekli çözelti): 4,5 g NaCl alınarak 500 ml'ye ulaşınca kadar saf su ilave edilmiştir.
- 6)** 0,05 M Tris- SO_4 , pH= 7,4 (diyalizde esteraz aktivitesinde ve kullanılan tampon): 950 ml destile su içerisinde 6,055 g Tris çözülerek, 1 N H_2SO_4 ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlanmıştır.
- 7)** %0,02'lik NaN_3 çözeltisi (Bakterilerden korunması için Afinite kolonuna kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak hacmi 100 ml'oluncaya kadar saf su ilave edildi.
- 8)** 1 M Tris- SO_4 (pH= 7,2-8,9 aralığında) (stabil pH ve Optimum pH çalışması için hazırlanan tampon çözeltiler): 80 ml saf su içerisinde 12,11 g (0,1 mol) Tris çözülerek 1 M H_2SO_4 ile hedeflenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra 100 ml'ye ulaşınca kadar saf su ile ilave edildi.
- 9)** 1M Potasyum fosfat pH= 4,9-8,0 aralığında (stabil pH ve optimum pH çalışması için gerekli olan tampon çözeltiler): 80 ml saf su içerisinde 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat çözülerek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra 100 ml'ye ulaşınca kadar saf su ile dolduruldu.
- 10)** SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi 1 ml %100'lük gliserin, karıştırılarak, son hacim saf su ile 10ml'ye tamamlanması ile hazırlanmış, bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 μl numune tamponundan 50 μl olacak şekilde β -merkaptoetanol eklenmiştir.
- 11)** SDS-Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 50 ml suda 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris çözülmüş, sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS eklenerek su ile toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- 12)** Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %10 asetik asit,%50 metanol ve %40 saf su olacak şekilde gerekli miktarlarda hazırlanmıştır.
- 13)** Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti): %10 asetik asit %50 metanol, ve %40 saf su olacak şekilde gereken miktarda hazırlanmıştır.

- 14)** Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesinde kullanılan çözelti): %10 TCA, %50 izopropional, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 15)** Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (kantitatif proteinlerin tayininde kullanılan çözelti): 50 ml %95'lik etanolde çözülmüş, 100 mg coomassie brilliant blue G-250, %95'lik fosforik asit bu çözeltiye ilave edilerek toplam çözelti hacmi, 1 litreye saf su ile tamamlanmıştır.
- 16)** 0,025 M veronal tamponu; 900 ml suda 0,025 mol sodyum barbitalın çözülüp pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titre edildikten 1 litre oluncaya kadar sonra destile su ile doldurulmuştur.
- 17)** CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti) yarım saat süreyle 0°C'de CO₂ gazının saf suyu içerisinde geçirilerek hazırlanmıştır.
- 18)** %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde : 0,1 g indikatörü çözdükten sonra saf suyla hacminin 250 ml'ye kadar doldurulmasıyla hazırlanmıştır.
- 19)** 0,05 M borat tamponu, pH=9,5 (esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 950 ml destile suda 6,183 g borik asit çözülerek, 1 N NaOH ile pH=9,5'e kadar titre edilmiştir. Daha sonra 1 litre oluncaya kadar toplam hacime destile su ilave edilmiştir.
- 20)** 1 M Tris-HCl pH=8,8 : 90 ml suda 12,1 g Tris çözülüp istenen pH'ya kadar 1 M HCl ile titre edildi daha sonra 100 ml'ye kadar saf su ile dolduruldu.
- 21)** 1 M Tris-HCl pH=6,8 : 5 ml suda 2,42 g Tris çözülüp istenen pH'ya kadar 1 M HCl ile titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye dolduruldu.
- 22)** %0,8 bisakrilamid -%30'luk Akrilamid çözeltisi: 0,16 g bisakrilamid 6 g akrilamid alınarak 13,84 ml suda çözüldü.
- 23)** %10'luk SDS çözeltisi: 4,5 ml suda 0,5 g SDS çözüldü.

3.2. Metod

3.2.1. Kalkan balığı kas dokusundan CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

3.2.1.a. Kalkan balığı kas dokusunun temin edilmesi ve homojenat hazırlanması

Örnekleme için temin edilen kalkan balığı soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuara getirilip hızlı bir şekilde kas dokusu alındı.



Daha sonra %0,9'luk NaCl ile yıkanarak doku örneklerindeki kan ve diğer kirlilikler elimine edildi ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Doku homojenatını hazırlamak için neşter yardımı ile öncelikle numune küçük parçalar haline getirildi. Sonra sıvı azot içinde parçalanması sağlandı, 10 birim hacimli 25 mM Tris HCl / 0,1 M Na₂SO₄ (pH= 8,7) tampon içinde homojenize edildi. Hazırlanan süspansiyon 10.000 rpm'de 30 dakika, santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa tekrarlandı. Süpernatant analizler için kullanıldı (Pullan and Noltmann 1985; Wistrand 2002).

3.2.1.b. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması, numunelerin afinite kolonuna tatbiki ve CA'nın elüsyonu

CNBr ile afinite jeli aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline kovalent olarak tirozin takıldı. Bu işlemin ardından sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada sülfanilamid enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını tirozin ise afinite jelinin uzantı kolunu meydana getirmektedir. Karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü Sülfanilamid olup, burada enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Bu işlem afinite jelinin yapısına girerek gerçekleştirilmiştir (Arslan *et al.* 1996).

Aşağıdaki prosedüre göre Afinite jeli hazırlandı:

a. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH= 10) ile yıkanarak bir behere alındı. Aynı tamponun 20 ml'sinde çözünmüş 80 mg tirozin soğuk çözelti behere eklenerek karıştırıldı. 90 saniyeden az bir sürede yıkama işlemi tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma işlemi yapıldı ve 2 saat süreyle 4°C'de manyetik karıştırıcıda süspansiyon karıştırıldı. 4°C'de 16 saat beklemeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda bol su ile yıkandı ve yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkama işlemi devam ettirildi. Bu işlem sonunda reaksiyona girmemiş olan tirozin tamamen atılmış oldu. 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) yıkama tekrar ettirilerek aynı tamponun 40 ml'si içine tirozin takılı jel alındı.

b. Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 10 ml 1 M HCl içinde 25 mg sülfanilamid çözüldü ve sülfanilamid çözeltisine içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti damlatılarak yavaşça katıldı. Reaksiyonun 10 dakika oluşmasından sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak sabit tutulduktan sonra oda sıcaklığında çok yavaş şekilde karıştırıldı ve bu işlem 3 saat tekrarlandı. Daha sonra 200 ml 0,05 M Tris-SO₄

(pH= 7,4) tamponu ve 1 litre saf su ile yıkandı. Üzerine aynı tampondan bir miktar daha ilave edildikten sonra saklandı (Arslan *et al.* 1996).

c. Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu: pH sı 8,7'ye ayarlanmış olan kalkan balığı kas dokusu homojenatının kolona tatbik edilmesinden sonra kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisi ile yıkandı. Bu işlem sonunda karbonik anhidraz enziminin kolona tutulması ve diğer saf olmayan maddelerin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra 0,1 M NaCH₃COO.3H₂O/0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) çözeltisi kolona tatbik edilerek CA enziminin elde edilmesi sağlandı. Peristaltik pompa kullanılarak kolonun akış hızı 20 ml/saat'e sabitlendi. Fraksiyon toplayıcı kullanarak elüatlar 5'er ml halinde tüplere konularak 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı.

3.2.1.c. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini

Enzimlerin saflaştırılması tamamlandıktan sonra %3-8 SDS-PAGE uygulanarak saflaştırma işlemi yapılan enzimlerin saflık derecesi belirlendi.

Bunun için önce su ve sonra alkol ile elektroforez plakaları temizce yıkandı. İnce bir tabaka şeklinde vazelin cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) sürüldü. Birbiri üstüne konulan iki cam plaka özel naylon kaplarına konularak jel hazırlama cihazına konuldu. Sonra kısıkaçlarla aralık oluşturucu mikaların bulunduğu yerlerinden cam plaklar tutturularak sabitlendi. Enjektör kullanarak plakalar arasına hazırlanan ayırma jeli döküldü. Dikkat edilen başka bir husus ta ortamda havanın olmamasıdır. %0,1'lik SDS kullanılarak jel yüzeyinin düzgün olması sağlandı. Katılaşması için bir müddet (yaklaşık yarım saat) beklendi. Daha sonra kullanılan bir tarak yardımı ile plakaların üst kısmından tarağın üst yüzeye kadar yığma jeli ilave edildi. Sonra nemli süzgeç kağıdını tarağın üstüne koyarak bir gece beklemesi sağlandı. Bir gün sonra tarağı dikkatlice aldıktan sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirildi.

Meydana gelen boşluklar işaretlendikten sonra saf su ile jelin üstü yıkandı, daha sonra yıkama işlemi yürütme tamponu ile tekrar yapıldı. Yürütme tamponu Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yerleştirildi. Her birine 20 µg protein konulacak şekilde numuneler hazırlandı. 1/1 oranında total hacim 100 µl olacak şekilde numune tamponuna konuldu. Kaynar su banyosunda 3 dakika bekletilerek inkübe edildi. Soğutulan numuneler, ince uçlu bir enjektör yardımıyla jel kuyularına enjekte edildi. Tankın kapağını kapattıktan sonra üstten (-) kablo (katot), alttan (+) kablo (Anot), yerleştirildi. 80 voltta önce yarım saat bekletildi. Sonra 4-5 saat boyunca 150 volta akım ayarlanıp oda sıcaklığında uygulama yapıldı. Sonra akım kesilerek, jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkartıldı. Hazırlanan yürütme tamponu tekrar kullanılması için saklandı ve 15 dakika sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) bekletildi. Daha sonra özel kabına konulmak üzere sabitleştirme çözeltisinden jel çıkarıldı, jel seviyesi üzerine kadar renklendirme çözeltisi eklendi. Sonra yaklaşık 45 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde konuldu ve yıkama çözeltisine konulmak üzere renklendirme çözeltisinden çıkartıldı. Jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle bu çözelti çalkalandı.

Aktif karbon üzerinden geçirilen yıkama çözeltisi, tekrar tekrar kullanıldı. Yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jelin fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi ; %40 saf su ile %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %10 asetik asit, %50 metanol hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; %10 asetik asit, %50 metanol, %40 saf sudan oluşmaktadır. Ayırma jel şu şekilde hazırlandı; 10,66 ml %30'luk akrilamid - %0,8'lik bisakrilamid, 15 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 0,61 ml %1'lik SDS) ,11,94 ml su ve 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin karıştırıldı. Karışımın üzerine en son 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) konuldu. Kullanılan PER taze olarak hazırlandı.

Yığılma jeli hazırlanırken 1M'lik Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1ml, %1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve

7,36 ml saf sudan alındıktan sonra karıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ekleme yapıldı.

Sonra hazırlanan jele kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılan enzim ve standart proteinler uygulandı. Jelin fotoğrafı deney sonunda çekildi.

Molekül kütlesi tayin bu metoda göre şu şekilde yapıldı; standart protein olarak (E.Coli β -galaktosidaz 116 kDa, tavşan fosforilaz B 97 kDa, ovalbumin 45 kDa, bovine serum albumin 66 kDa, karbonik anhidraz 29 kDa) kullanıldı. Standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak $\log MA-R_f$ standart grafiği çizildi. Bu işlem elektroforez cihazından alındıktan sonra yapıldı. Daha sonra kalkan balığı kas dokusu CA enziminin $\log MA$ 'sı belirlemek için numunenin R_f değeri hesaplandı sonra standart grafikte yerine kondu. Numunenin molekül kütlesini bulmak için bu değerin antilogaritması alındı.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = X_e / X_{boya}$$

$$X_{boya} = \text{Boyanın yürüme mesafesi} \quad X_e = \text{Proteinin yürüme mesafesi}$$

3.3. Protein Tayini

3.3.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi işlemi esasına dayanır. Kromatografi işlemlerinde elde edilen eşit hacimdeki fraksiyonlarda kalitatif protein tayini bu metod yardımıyla yapıldı.

3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Homojenattaki protein miktarları ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu metodla belirlendi. Bu metod, proteine coomassie brilliant blue G-250 boyasının bağlanması ile gerçekleşir. Meydana gelen kompleks 595 nm’de maksimum absorbens özelliğine sahiptir. Boyanın Proteine bağlanması çok hızlı olur. Uzun süre Protein-boya kompleksi çözeltilerde varlık gösterir. Bu yöntem hassasiyet taşıyıcı hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde takip edilen prosedür şu şekildedir: Deney tüplerine 1 ml’inde 1 mg protein bulunan standart sığır albümin çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Tüm tüplerin hacmi 0,1 ml’olana kadar saf su konuldu. Renklendirme reaktifi tüplerin hacmi ile 5 ml’ye getirildi ve vortex ile karıştırma işlemi yapıldı. Köre karşı absorbens değerleri 10 dakika sonra 3 ml’lik küvetlerde 595 nm’de okunması yapıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. İşlemlerde kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden meydana gelen karışım kullanılmıştır.

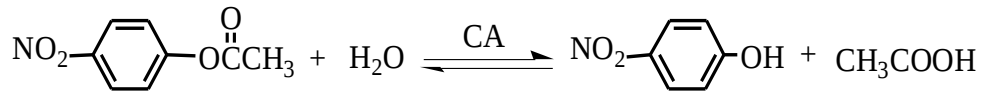
3.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü

a. Hidrataz Aktivitesi: Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen bu yöntem Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinir (Wilbur and Anderson 1948). Brom timol mavisi indikatörü ile CO₂’nin hidrasyonu sonucu salınan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişimi belirlenerek, geçen sürenin tespiti esasına dayanır.

Bu işlem için kör olarak hazırlanan tüpe 0,1 ml %0,04’lük brom timol mavisi, 1ml 0,025 M veronal tamponu (pH=8,2), 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO₂ çözeltisi eklendi. İşlem sonunda 4,2 ml toplam hacim aktivite ölçüm ortamında toplandı. Daha sonra CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH=6,3) için geçen zaman (t₀) kronometre yardımıyla belirlendi. Numune tüpünden 0,05 ml su azaltılıp aynı seviyeye kadar enzim çözeltisi eklendi ve CO₂ çözeltisi ilave

edilmesinin akabinde, bir kronometre kullanılarak indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH=6,3) için geçen süre (t_c) ölçüldü. Bu yöntemle bir enzim ünitesi (EU) enzim olarak oluşan CO_2 hidratasyonu zamanını yarıya düşüren enzim miktarı CA aktivitesi olarak tanımlanmıştır. Belirtilen formüle göre (t_0-t_c/t_c) enzimin aktivitesi hesaplanmıştır (Maren 1960). Aynı işlemler homojenat ve saf enzimin aktivite tayin edilmesinde de uygulanmıştır.

b. Esteraz Aktivitesi: Bu yöntem kinetik çalışmalar sırasında kullanıldı. Karbonik anhidrazın, esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanan bir yöntemdir. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat’ı karbonik anhidraz’ın hidrolizine dayanan bir yöntemdir. P-nitrofenolat 348 nm’de p-nitrofenol ’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir.



Fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması bu nedenle ölçüm sonuçlarını etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). p-nitrofenilasetatın absorpsiyonu bu dalga boyunda çok az gerçekleştiğinden, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin edilme işleminde uygulan prosedür: 1 ml substrat, 1,4 ml tampon, 0,5 ml H_2O , 0,1 ml enzim kuvarz küvetlere konulmasından 3 dakika geçmesinin ardından 25°C de 348 nm’de absorbans değerine bakıldı. Daha önce enzim yerine 0,1 ml tampon çözelti konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonrasındaki absorbansı ile Spektrofotometre, sıfıra ayarlandı.

p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, deneyler için günlük olarak hazırlandı: 1ml aseton içinde 27,2 mg ester çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaşça eklendi. Bu çözelti 3 mM’lıktır, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla daha derişğini hazırlamak olanaksızdır. Diğer organik çözücülerle kıyaslandığında hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olması nedeni ile aseton kullanılmıştır (Verpoorte and Mehta 1967).

3.5. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması

Optimum pH çalışması; pH'sı 7,0-9,0 aralığında ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında ve 20 mM Tris-HCl ve 20 mM potasyum fosfat (KH_2PO_4) çözeltilerinde doku CA enziminin aktivite değerleri ölçüldü. Sonuçlar aktivite-pH grafikleri haline getirildi.

3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için iyonik şiddet çalışması

CA enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi amacıyla enzimin aktivitesinin optimum düzeyde olduğu Tris-HCl ve potasyum fosfat tamponlarının pH'ları 8,0 olarak alınmıştır. CA enzimi için esterase aktivite ölçümü 10 mM ile 1000 mM arasında iyonik şiddete sahip Tris-HCl tamponunda yapıldı ve daha sonra sonuçlar grafik haline getirildi.

3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar

pH'ları 7,0-9,0 olan Tris- SO_4 tamponu enzimlerin stabil olduğu pH'yı belirlemek amaçlı kullanılmıştır. Gösterilen pH aralığında tampon çözeltilerinin 500 μl 'si ile 500 μl enzim çözeltilisine karıştırılma işlemi uygulandıktan sonra 4°C'de bekletildi. Aktivite ölçümleri 2 gün arayla yapıldı ve enzimin stabil olduğu pH değeri belirlendi. Aktivite değerlerinin inkübasyon süresine karşılık gelen değerleri grafikler halinde belirtildi.

3.5.4. Sıcaklığın kalkan balığı kas dokusu CA enzimi üzerindeki etkisinin incelenmesi

CA enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için 20°C ile 70°C arasında enzim aktiviteleri ölçülerek optimum pH'sında ve optimum iyonik şiddet değerinde optimum çalışma sıcaklığı belirlendi.

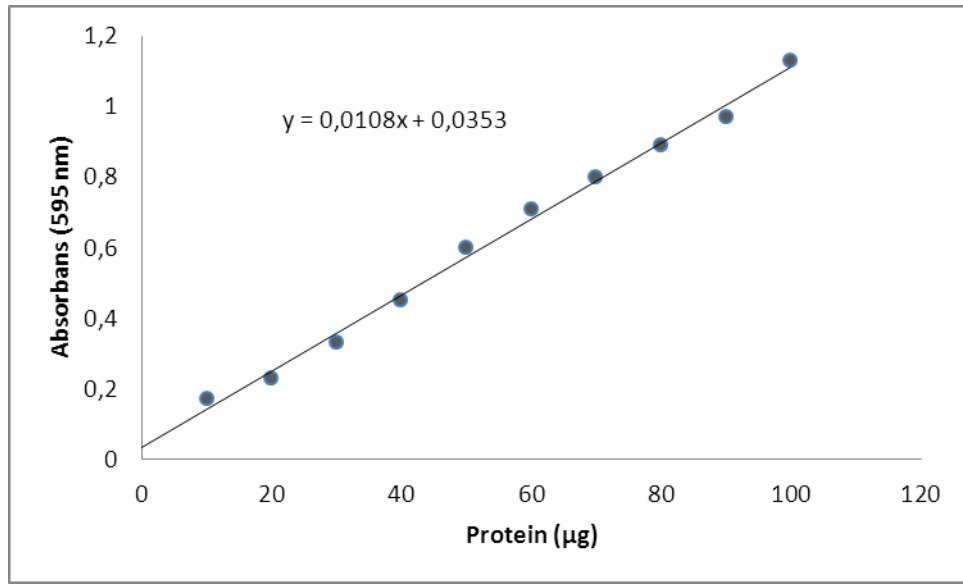
3.5.5. p-Nitrofenil asetat substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonu kullanılarak Kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimleri için farklı optimum şartlarda aktivite ölçümü yapılarak değerlendirildi. Daha sonra Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_M ve V_{max} değerlerine bakılarak hesaplamalar yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemi kullanılarak saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein değerleri ve kalkan balığı kas dokusundan elde edilen homojenatlar tayin edildi. Belirtilen standart grafikten faydalanılarak homojenatlar ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı belirlendi. Standart absorbans değerlerine bakıldı. Çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Kalkan Balığı Kas Dokusu CA Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları

Elde edilen saf enzimden ve kalkan balığı kas dokusundan elde edilen homojenattan alınan 1'er ml numune, hidrataz aktivitesi ve coomassie brilliant blue yöntemi kullanılarak protein tespiti yapılmıştır.

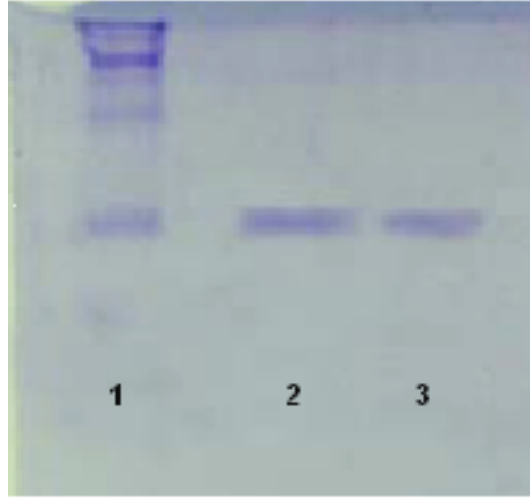
Elde edilen değerlere bakılarak hemolizatın Sepharose-4B-L-tirozin-sulfanil amid afinite kolonuna uygulanması sonucunda saflaştırma işleminin kaç kat yapıldığı kaydedildi ve sonuçlar izelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Afinite kolonundan Kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin enzim nitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma değerleri

Saflaştırma Basamakları	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	8	17.6	140.8	2100	14.91	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon kromatografisi	6	0.32	1.92	1450	755.20	69.05	50.65

4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Uygulanan kromatografik işlemlere bakıldığında kalkan balığı kas dokusundan elde edilmiş olan CA enziminin saflığına bakmak amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapılmıştır. Molekl ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanılmıştır (29 kDa sığır karbonik anhidraz; 16,5 kDa yumurta beyazı lizozimi). Kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılarak elde edilen izoenzimler SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine uygulandı. Proteinler belirgin hale geldikten sonra fotoğrafı çekildi (şekil 4.3).

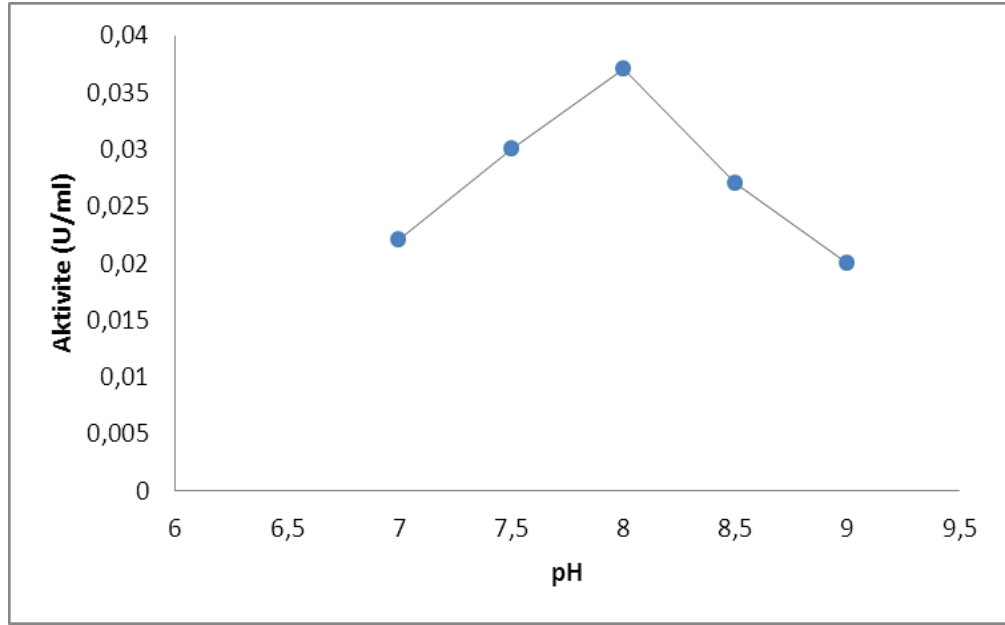


Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan kalkan balığı kas karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

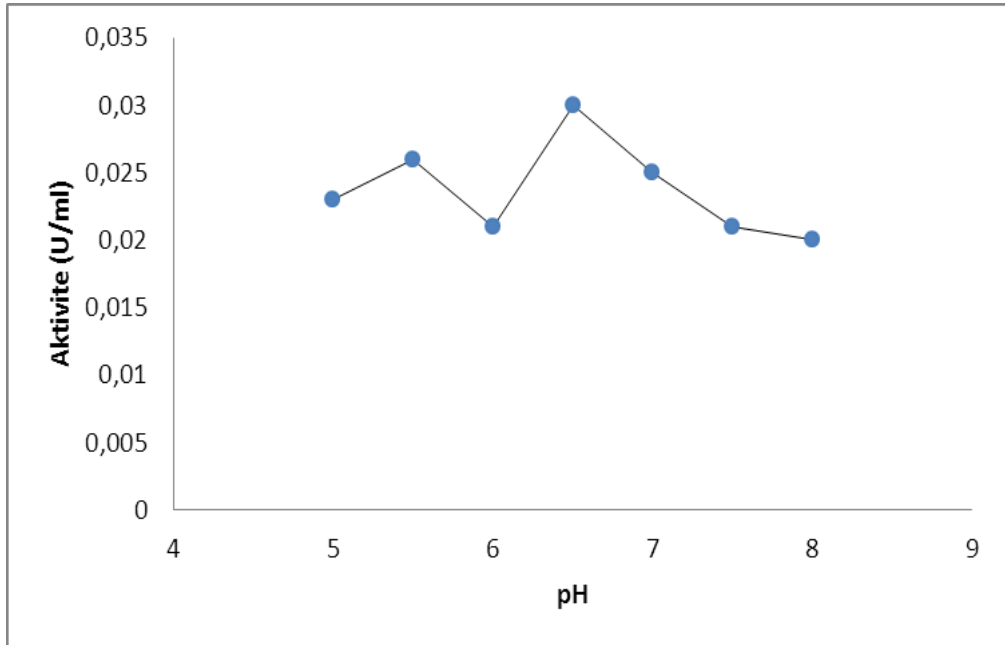
*(1) standart proteinler (E.coli β -galaktosidaz 116 kDa, tavşan fosforilaz B 97 kDa, sığır serum albumin 66 kDa ve sığır eritrosit CA 29 kDa), (2) ve (3) Kas CA)

4.4. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

Kalkan balığı kas CA enzimi optimum pH'sı 7,0-9,0 aralığında 20 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 20 mM potasyum fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltileri uygulaması yapılarak spektrofotometrik olarak enzimin gösterdiği aktiviteler değerleri oluşturuldu (Şekil 4.4-4.5). Optimum pH, 20 mM Tris-HCl pH=8,0 tampon değeri kalkan balığı kas CA enzimi için belirlendi.



Şekil 4.3. Kalkan balığı kas CA enziminin optimum pH'sı için 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak oluşturulan aktivite ölçüm grafiği

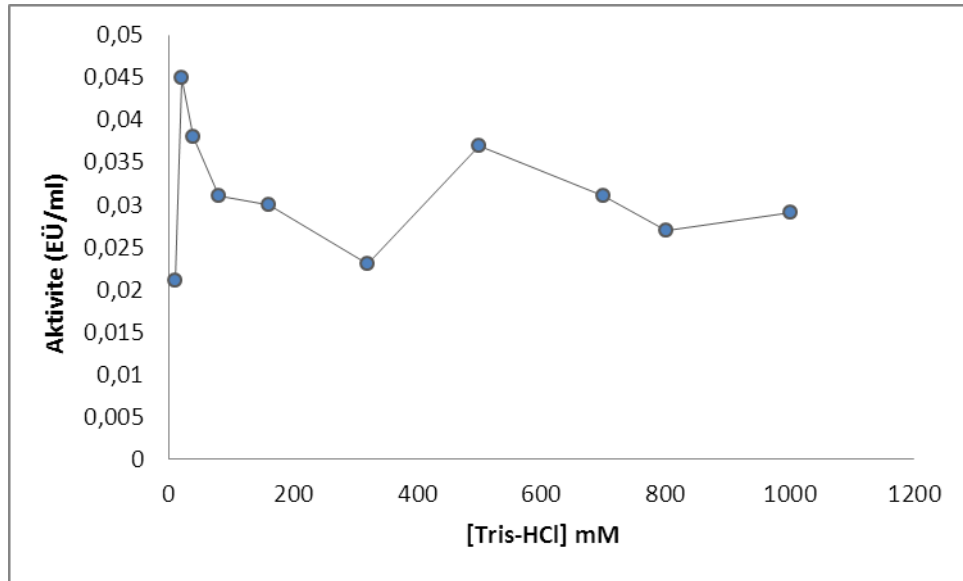


Şekil 4.4. Kalkan balığı kas CA enziminin optimum pH'sı için 20mM fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm grafiği

4.5. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enziminin Optimum İyonik Şiddetinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

En uygun iyonik şiddeti belirlemek için kalkan balığı kas dokusundan elde edilen CA enzim aktivitesinin yapılan çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris-HCl tamponunun pH'daki farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

Aktivite ölçümleri elde edilen farklı Tris-HCl konsantrasyonlarında, aktivite değerleri ve Tris-HCl konsantrasyonu ile elde edilen grafik hazırlandı. Elde edilen bulguların neticesinde kalkan balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için en iyi iyonik şiddetin 20 mM Tris-HCl tamponu olduğu görüldü (Şekil 4.6).

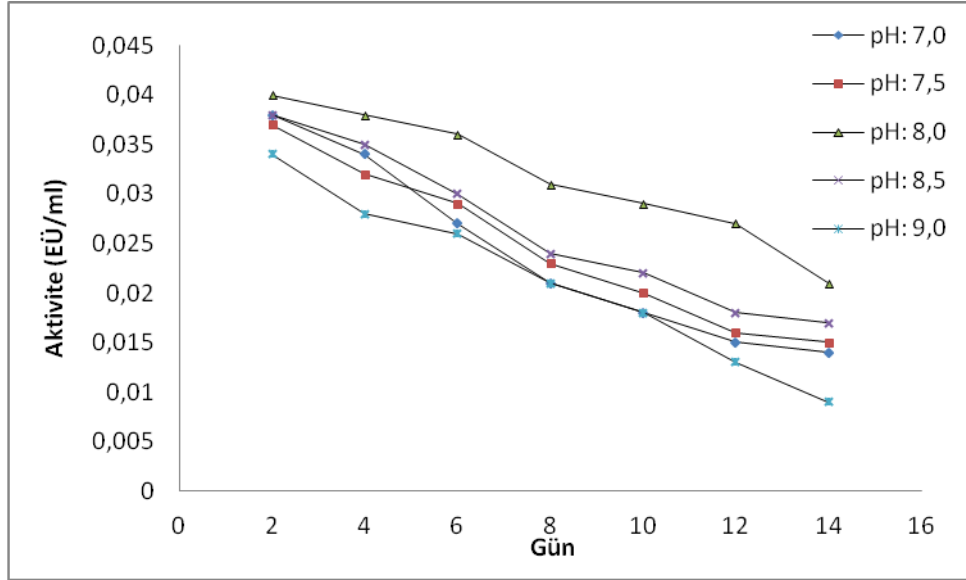


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Tris-HCl Tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen Kalkan balığı kas dokusu CA enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.6. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Stabil pH Değerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

Kalkan balığı kas CA enzimi optimum pH değerleri; 7,5, 8,0, 8,5, ve 9,0 aralığında olduğu ve 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi hazırlanarak elde edilen aktivite değerleri

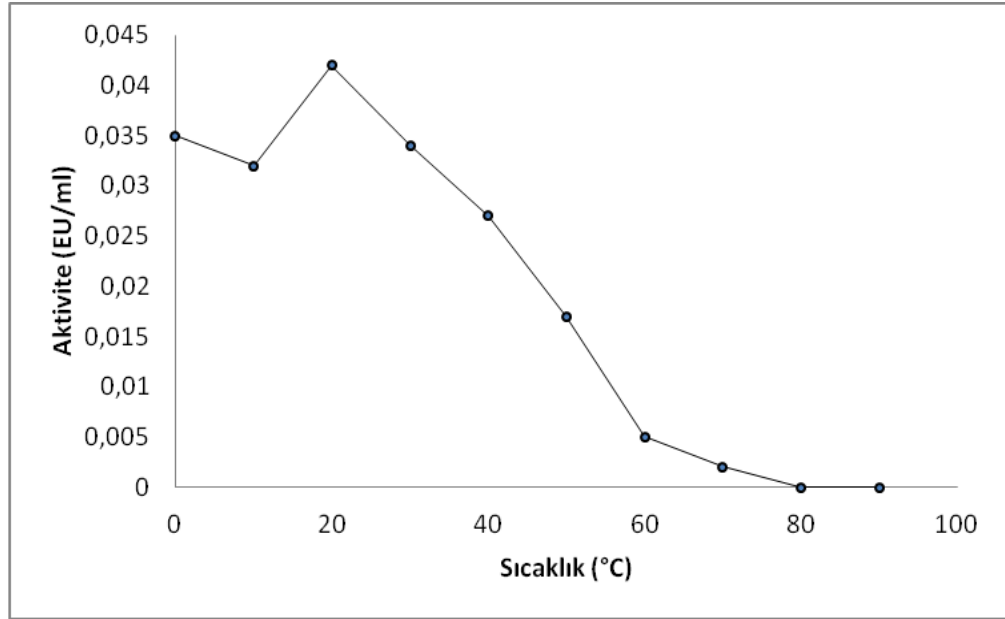
spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.7). Stabil pH, 20 mM Tris-HCl tamponu pH =8,0 değerleri Kalkan balığı kas CA enzimi için elde edildi.



Şekil 4.6. Kalkan balığı kas CA enzimi için farklı pH'lardaki 20mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği

4.7. Kalkan Balığı Kas Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Tespit Edilmesine Yönelik Sonuçlar

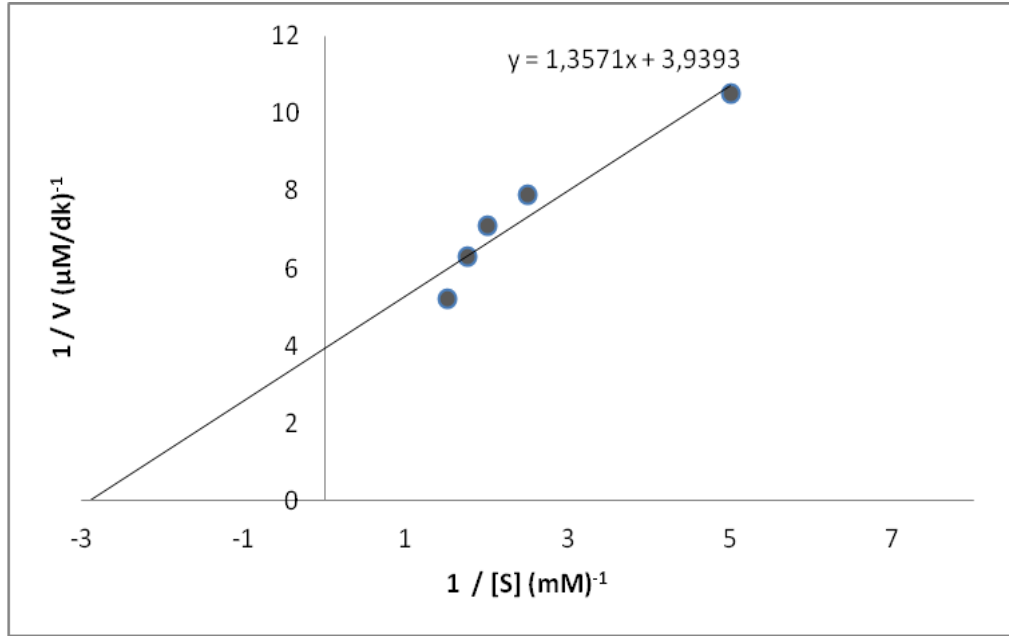
Optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip tampon çözeltisinde kalkan balığı kas CA enziminin optimum sıcaklığını tespit etmek için 0°C ile 90°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere aktivite değerleri ölçüldü eğriler halinde gösterildi (Şekil 4.7). Çalışmalar neticesinde optimum sıcaklığın 20°C olduğu görüldü.



Şekil 4.7. Kalkan balığı kas CA enzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi ve değerlerin çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.8. Enzim için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmaların Sonuçları

Kalkan balığı kas dokusundan elde edilen CA enziminin K_m ve V_{max} sonuçlarının belirlenmesi amacıyla en az 5 ayrı substrat konsantrasyonu çalışılıp optimum şartlarda aktivite değerlerine bakılmıştır. K_m ve V_{max} değerlerini hesaplamak amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.2). K_m değeri 0,344 mM olduğu görüldü. V_{max} değerleri 0,253 EÜ/ml olduğu tespit edildi.



Şekil 4.8. Lineweaver-Burk grafiğinin Kalkan balığı kas dokusu CA enzimi için değeri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzim araştırmaları biyolojik çalışmaların büyük bir çoğunluğunu teşkil etmektedir. (Lehninger 2005). Canlı metabolizmalarındaki kimyasal tepkimeleri hızlandıran, %100 oranında verim sağlayarak hiçbir yan ürün oluşturmeyen aynı zamanda hücreler tarafından sentezlenen biyolojik katalizörler enzimlerdir. Örneğin, karbonik asitin oluşması için karbondioksit (CO_2) ve suyun reaksiyona girmesi gerekir. Ayrıca bikarbonat iyonuna dönüşen karbonik asitin bir kısmı fizyolojik pH'da meydana geldiği belirlenmiş ve iyonizasyon sürecinin asit özelliğine bağlı olduğu enzim gerektirmediği görülmüştür. Canlı organizmadada karbonik anhidraz enziminin katalizörlüğünde bikarbonat iyonu oluştuğu görülmüştür. Enzimlerin tamamı protein yapısındadır. Ancak katalitik RNA moleküllerinin küçük bir bölümü haricinde yapı bu şekildedir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Enzimlerin saflaştırılması işlemi çok zor bir süreçtir. Büyük bir bölümü protein yapısında olan enzimler değişen şartlarda yüksek hassasiyet gösterirler. Bu nedenden dolayı bir çözeltide enzimin olması, etki edilen substrat molekülü yada reaksiyon sonucunda oluşan ürünün veya enzimatik reaksiyona destek olan diğer parametreler üzerinden değerlendirilir. Substrat konsantrasyonu, pH, enzim konsantrasyonu, iyonik şiddet, sıcaklık, hormonlar, allosterik etkiler, inhibitör veya aktivatörler enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörlerdir. Aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri her enzim için mevcuttur (Lehninger 2005).

Her canlı ve dokuda karbonik anhidraz enzimi birçok izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahiptir. İzoenzimler CA'nın ihtiyacına ve bulunduğu ortamın şartlarına göre değişirler. Memelilerde bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır ve sürekli yeni izoenzimler ortaya çıkartılmaktadır. İyon transportu, asit-baz transportu kemik resorpsiyonu kalsifikasyon ve farklı metabolik prosesleri içeren birçok CA izoenzimleri bulunmakta olup çoğu farklı dokulardadır. Ancak en yaygın olarak bulunan ve üzerinde en fazla çalışma yapılan izoenzimleri CA I ve CAII'dir. Enzimin canlı organizmanın hangi şekilde, neresinde bulunduğunu ve fonksiyonunu nasıl gösterdiğini tespit etmek

amacıyla bir çok doku canlı türünde karbonik anhidraz enziminin saflaştırma ve karakterize edilmesi şeklinde yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur (Söyüt *et al.* 2008).

Karbonik anhidraz enziminin üzerinde çok çalışıldığı ve en önemli görevlerinden bir tanesi solunum gazlarının vücut içindeki taşınmasıdır. Karbonik anhidraz enzimi tüm omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da, metabolizma sonrasında meydana gelen CO₂ gazının taşınması ve organizmadan atılmasında çok kritik öneme sahiptir. Omurgalıların birçoğunda kandaki karbondioksit aşağı yukarı aynı yollarla taşınır ve vücuttan atılır. Canlı dokudan konsantrasyon gradientine göre difüze edilen CO₂ eritrositlere geçer ve oradan CA sayesinde HCO₃⁻ ve H⁺'ya dönüşür. Hemoglobin tarafından meydana gelen protonların büyük çoğunluğu tamponlanır. Plazmadaki klorür iyonları vasıtasıyla pasif transport şeklinde meydana gelen bikarbonat anyonlarının çoğu hücre dışına taşınır. Dönüşümlü olarak dokulardan organlara taşınan CO₂'in büyük kısmı plazmadan HCO₃⁻ şeklinde taşınır (Esbaugh and Tufts 2006).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Ekinci *et al.* 2007). Gökkuşaağı alabalığı solungacı (Ceyhun *et al.* 2010) ve gökkuşaağı alabalığı karaciğeri (Söyüt and Beydemir 2008), levrek karaciğeri (Ceyhun *et al.* 2011) gibi çeşitli kaynaklardan saflaştırıldı.

CA enzimi şüana kadar birçok dokudan saflaştırılmıştır. CA enziminin molekül kütlesi canlıdan canlıya, dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Örneğin CA II izoenzimi insan eritrositlerindeki molekül kütlesini 30 kDa olarak bulunmuştur (Ekinci *et al.* 2007). Söyüt vd 2008 yılında gökkuşaağı alabalığı beyninden saflaştırdıkları CA nın molekül kütlesini SDS PAGE ile 29 kDa olarak bulmuşlardır. Söyüt ve Beydemir 2008 yılında gökkuşaağı alabalığının karaciğerinden CA enziminin molekül kütlesini 29,4 kDa olarak ve 2011 yılında aynı canlı üzerinde farklı bir organ üzerinde yaptıkları çalışmada ise gökkuşaağı alabalığının böbreğinden CA enzimini saflaştırmışlardır ve enzimin

moleköl kütlesini 28,7 kDa olarak bulmuşlardır. Ceyhun vd 2011 yılında yaptıkları çalışmada levrek balığının karaciğerinden CA enzimini izole ederek moleköl kütlesini 30 kDa olarak bulmuştur.

Kalkan balığı kas CA enzimi için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Kalkan balığı kas CA enzimi için en iyi aktivite gösterdiği iyonik şiddet konsantrasyonu 20 mM Tris-HCl olarak belirlendi. Benzer şekilde koyun böbreği CA IV izoenzimi için en iyi aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddet 20 mM Tris-HCl tampon olarak belirlenmiştir (Demirdağ 2012).

Kalkan balığı kas CA enzimi için optimum pH çalışmasında optimum pH: 8 olarak bulundu. Benzer şekilde koyun böbrek CA II izoenzimi için en iyi aktivite görülen pH değeri pH: 8.0, aynı çalışmada CA IV izoenzimi için optimum pH: 7.5 olarak tesbit edildi (Demirdağ 2012). Kalkan balığı kas CA enzimi için yapılan stabil pH çalışmasında stabil olduğu en iyi pH değeri pH: 8,0 Tris-HCl tamponu olarak belirlendi. Kalkan balığı kas CA enzimi için aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık 20°C olarak buldular. Benzer şekilde Hisar ve arkadaşları gökkuşığı alabalığı eritrositlerinde yaptıkları çalışmada CA enziminin optimum sıcaklığını 25°C olarak buldular (Hisar *et al.* 2005) Beydemir ve arkadaşları yılında gökkuşığı alabalığının lens karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 22,5°C olarak buldular. Ayrıca gökkuşığı alabalığı CA enziminin optimum sıcaklık değeri 40°C olarak tesbit edilmiştir (Beydemir *et al.* 2006; Söyüt ve Beydemir 2008).

Bu tez kapsamında; yüksek besin değerleri ile beslenmemizde önemli bir yer teşkil eden ve ülkemizdeki balık üretiminin azımsanmayacak bir kısmını teşkil eden kalkan balığının kas dokusundan CA (Karbonik anhidraz) enzimi saflaştırılıp kinetik özellikleri incelenmiştir.

Tez kapsamında sonuç olarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

1. Kalkan balığı kas dokusundan CA enziminin homojenatının hazırlanması ve Sepharose 4B-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi yöntemleri yardımı ile spesifik aktivitesi 755,2 EÜ/mg protein olan enzim %50,65 verimle 69,05 kat saflaştırılmıştır.
2. Ezimin stabil olduğu pH = 8,0, optimum iyonik şiddet 20 mM Tris-HCl, optimum pH =8,0 ve aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 20°C olduğu tespit edilmiştir.
3. pH=8,0'de V_{max} değeri 0,253 EÜ/ml, K_M değeri p-nitrofenil asetat için 0,344 mM, olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Acierno, R., Maffia, M., Rollo, M. and Storelli, C., 1997. Buffer capacity in the blood of the hemoglobinless Antarctic fish *chionadraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol*, 118, 989-992.
- Aksungur, N. 2003. Karadeniz’de kalkan balığı (*Psetta maxima*) yetiştiriciliğinin araştırılması. SÜMAE, Yunus Arastırma Bülteni, 3:3
- Amaoka, K., Yoseda, K., Sahin, T., Üstündag, C., Çiftçi, Y. 2001. Flatfishes (Order Pleuronectiformes) Found in Black Sea and Its Adjacent Waters. Special publication No.1, Central Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Trabzon, Turkey, 27, Pp
- Armstrong, JM., Myers, D.V., Verpoorte, JA., Edsall, JT., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 51375149.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Beydemir, S., Bulbul, M., Hisar, O., Soyut, H., Yanık, T., 2006. Carbonic Anhydrase: Affinity Purification and Kinetic Properties from Rainbow Trout Lens *International Journal of Applied Chemistry ISSN 0973-1792 Vol.2 No.1 pp. 45-55.*
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Ceyhun, S.B., Senturk, M., Erdogan, O., Kufrevioglu, O.I., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pestic. Biochem. Phys.* 97, 177-181.
- Ceyhun, S.B., Senturk, M., Yerlikaya, E., Erdogan, O., Kufrevioglu, O.I., Ekinci, D. 2011. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. *Environmental toxicology and pharmacology*. 32, 69-74.
- Chanet, B., 2003. Interrelationships of Scopthamid fishes Pleuronectiformes: Chereguini, O., Garcia de la Banda, I., Rasines, I., Fernandez, A., 1999. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquaculture Research*, 30, 319-324.
- Demirdağ, R., Yerlikaya, E., Aksakal, E., Küfrevioğlu, O.I., Ekinci, D., 2012. Influence of pesticides on the pH regulatory enzyme, carbonic anhydrase, from European Seabass liver and bovine erythrocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 218-222.
- Ekinci, D., Beydemir, S. and Küfrevioglu, O.I. 2007. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemsitry*. 22, 745-750.

- Ekinci, D., Karagoz, L., Ekinci, D., Senturk, M., Supuran, C.T. 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: *in vitro* inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoid. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28, 283-288.
- Esbaugh, A. and Tufts, B. L. (2006). The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 185-198.
- FAO, 2012. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2012. <http://www.fao.org/3/a-i3740t/index.html>
- Gervais, MR; Tufts, BL. 1998. Evidence for membrane-bound carbonic anhydrase in the air bladder of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. *Journal of Experimental Biology* Volume: 201 Issue: 14 Pages: 2205-2212
- Gilmour, K.M., Henry, R.P., Wood, C.M. and Perry, S.F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase and acid-base disequilibrium in the blood of the dog fish *Squalus acanthias*. *J. Exp. Biol*, 200, 173-183.
- Hall, GE., Schraer, R., 1983.Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *salmo gairdneri*. *Comparative. Biochemistry and. Physiology-B*,75, 81-92.
- Hara, S., 2001. Karadeniz kalkan balığından (*Psetta maxima*) döllenmiş yumurta ve larva elde edilmesi. *SÜMAE, Yunus Arastırma Bülteni*, 1:1.
- Henry, R.P., Smatresk, N.J. and Cameron, J.N., 1988. The distribution of brachial carbonic anhydrase and the effect of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Exp. Biol*, 134, 201-218.
- Henry, RP; Wang, YX, Wood, 1997, CM Carbonic anhydrase facilitates CO₂ and NH₃ transport across the sarcolemma of trout white muscle. *American Journal Of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* Volume: 272 Issue: 6 Pages: R1754-R1761.
- Hisar, O., Beydemir, S., Gulcin, I., Kufrevioglu, O.I., Supuran, C.T., 2005. Effect of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol.20, No.1,Pages 35-39.
- Invers, O; Perez, M; Romero, J., 1999. Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology* Volume: 235 Issue: 1 Pages: 125-133.
- Jones, A. 1974. Sexual Maturity, Fecundity and Growth of the Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *J. Mar. Biol. Ass.* 54, 109–125. UK.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya*, ISBN: 975-6755-20-02, Bölüm 6 Erzurum.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya*. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Lehninger A. L. 2013. *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth ,Publishers Inc,
- Lehninger, A.L., 2005. *Principles of biochemistry*. Worth Publishers Inc, Newyork.
- Lessard, J., Val, A.L., Aota, S. and Randall, D.J., 1995. Why is there no carbonic anhydrase activity available to fish plasma? *The Journal of Experimental Biology*, 198, 31-38.

- Luquet, CM; Cervino, CO; Ansaldo, M; Pereyra, VC; Kocmur, S; Dezi, RE. 1998. Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comparative Biochemistry And Physiology A-Molecular And Integrative Physiology*, Volume: 121 Issue: 4 Pages: 385-393.
- Maren, TH., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126-130.
- Maren, TH., Conroy, CW., Wynns, GC., Godman, DF., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 98-104.
- Mayer-Gostan, N; Boeuf, G; Payan, P. 1997. Effects of growth hormone and cortisol treatment on the saccular endolymph composition in trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances In Comparative Endocrinology*, Tomes 1 And 2 Pages: 937-941.
- Memis, D., 2010. Deniz Balıkları Yetistiriciligi. Filiz Kitabevi, İstanbul, 152-172.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I. and Nakao, K., 1999. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 15701-15705.
- Motais, R., Fievet, B., Garcia-Romeo, F. and Thomas, S., 1989. Na⁺/H⁺ Exchange and pH regulation in red blood cells: role of uncatalyzed H₂CO₃ dehydration. *Am. J. Physiol*, 256, 728-735.
- Munroe, T.A. 2005. Systematic Diversity of the Pleuronectiformes in: *Flatfishes Biology and Exploitation*, Gibson, R.N., Blackwell Science, UK, 391s.
- Nikinmaa, M., Tithonen, K. and Paajaste, M., 1990. Adrenergic control of red cell pH in salmonid fish: roles of the sodium/proton Exchange, Jacobs-Stewart cycle and membrane potential. *J. Exp. Biol*, 154, 257-271.
- Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A. and Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24620-24623.
- Perry, S.F., Wood, C.M., Walsh, P.J. and Thomas, S., 1996. Fish red blood cell carbon dioxide excretion in vitro: a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol*, 113, 121-130.
- Peterson, R.E., Tu, CK. and Linser, P.J., 1997. Isolation and Characterization of a Carbonic Anhydrase Homologue from the Zebrafish (*Danio rerio* *Journal Of Molecular Evolution* Volume: 44 Issue: 4 Pages: 432-439.
- Pocker, Y., Joan, SY., 1973. Plant carbonic anhydrase. Properties and carbondioxide hydration kinetics. *Biochemical Journal*, 12, 5127-5134.
- Polat, H., 2011. Farkli sıcaklık ve tuzlulukta inkübe edilen Karadeniz kalkan balığı (*Psetta maxima* Linnaeus, 1758) yumurtalarının embriyonik gelişimi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 85s.
- Pullan, L.M. and Noltmann, E.A., 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochimica et Biophysica Acta*, 839, 147-54.

- Rahim, S.M., Deaungy, J.P. and Laurent, P., 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in the teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. *Histochemistry*, 89, 451-459.
- Randall, D.J. and Brauner, C., 1998. Interaction Between Ion and Gas Transfer in Freshwater Teleost Fish. *Comp. Biochem. Physiol*, 119, 3-8.
- Samsun, N., 2004. Sinop yöresinde avlanan kalkan (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) balıklarının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 171s., Samsun.
- Söyüt, H., Beydemir, S., Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biol Trace Elem Res*, 123:179-190.
- Söyüt H and Beydemir S., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition. *Protein Peptide Lett.* 15, 528-535.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Review Drug Discovery*. 2008, 7, 168-181.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97.
- Tohse, H. and Mugiya, Y., 2001. Effects of enzyme and anion transport inhibitors on in vitro incorporation of inorganic carbon and calcium into endolymph and otoliths in salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128, 177-184.
- Tsuzuki, M. and Miyachi S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot.* 34, 85-104.
- TÜİK, 2013. 2013 Yılı su ürünleri istatistikleri. (Erisim Tarihi: 26.06.2014) <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15933>
- Verpoorte, J.A., Mehta S., Edsall JT, 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wistrand, P.J. 2002. Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. *Upsala Journal Of Medical Sciences*, Volume: 107 Issue: 2 Pages: 77-88
- Wood, C.M. and Munger, S., 1994. Carbonic anhydrase injection provides evidence for the role of blood acid-base status in stimulating ventilation after exhaustive exercise in rainbow trout. *J. Exp. Biol*, 94, 247-270.
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim Kinetikleri. *Temel Biyokimya*, Kemal Matbaası, 1. cilt, s. 148-167, Adana.
- Zaharia, V., Varzescu, M., Djavadi, I., Newman, E., Egnor, R.W.; Alexander-Chacko, J.; Charney, A.N., 2001. Effects of short chain fatty acids on colonic Na⁺ absorption and enzyme activity. *Comparative Biochemistry And Physiology A-Molecular And Integrative Physiology* Volume: 128, Issue: 2 Pages: 335-347 Published: FEB.

ÖZGEÇMİŞ

1979 Yılında Kars'ta doğdu. İlkokulu Selim'de tamamladıktan sonra Ortaokul ve Lise öğrenimini Erzurumda tamamladı. 1999 yılında kazandığı Atatürk üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümünden 2003 yılında mezun oldu. 2005-2013 yılları arasında özel ilaç firmalarında yöneticilik yaptı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2015 yılı Nisan ayında tezini tamamladı.