



Pelajik ve Bentik Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan Karbonik anhidraz Aktivitelerinin İrdelenmesi [*]

Barbaros DİNÇER* Pelin BİRİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 22.09.2019

Kabul/Accepted: 16.01.2020

Atf yapmak için: Dinçer, B. & Birinci, P. (2019). Pelajik ve bentik balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz aktivitelerinin irdelenmesi. Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi, 5(1), 4-10.

How to cite: Dinçer, B. & Birinci, P. (2019). Investigation of purified carbonic anhydrase activity from the gills of pelagic and benthic fish. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 4-10.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-5411>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5034-2154>

***Sorumlu yazarın:**

Barbaros DİNÇER
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen
Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Rize,
Türkiye.
✉: barbaros.dincer@erdogan.edu.tr
Cep telefonu : +90 (535) 667 17 66
Telefon : +90 (464) 223 61 26/1785
Faks : +90 (464) 223 40 19

Öz: Bu çalışmada, denizel ortamda bentik bölgede yaşayan Mezgit ve pelajik bölgede yaşayan Hamsi balıklarının solungaçlarından karbonik anhidraz (CA) saflaştırıldı ve karakterize edildi. Mezgit balığı solungaçından elde edilen CA enzimi, Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid afinite kolonunda 14 kat ve %19,5 verimle saflaştırıldı. Hamsi balığı solungaçından elde edilen CA enzimi ise 17 kat ve %9,5 verimle saflaştırıldı. Mezgit ve Hamsi balıklarının özgül aktiviteleri sırasıyla 126,4 EU mg protein⁻¹ ve 1000,0 EU mg protein⁻¹ olarak belirlendi. SDS-PAG Elektroforezi sonucunda her iki balığın solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidrazların altbirim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olan tek protein bantlarına sahip oldukları belirlendi. Solungaçlarından elde edilen CA'ların p-nitrofenil asetat substratı varlığında esterase aktiviteleri pH 8,0'da ve 40 °C sıcaklıkta en yüksek olduğu belirlendi. Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan CA' nın, p-nitrofenol asetat substratı varlığında *Km* ve *Vmaks* değerleri Lineweaver-Burk grafiğiyle hesaplandı ve sırasıyla *Km* değeri 0,08 mM ve 0,01 mM, *Vmaks* değeri 1x10⁷ µM dak⁻¹ ve 2,5x10⁶ µM dak⁻¹ olarak tespit edildi. Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen CA' nın sırasıyla sülfanilamid inhibitörü varlığında 6,0 µM ile 4,0 µM ve asetazolamid inhibitörü varlığında ise 2,0 µM ile 2,0 µM IC₅₀ değerlerine sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Bentik, hamsi balığı, karbonik anhidraz, mezgit balığı, pelajik.

Investigation of Purified Carbonic Anhydrase Activity from The Gills of Pelagic and Benthic Fish

Abstract: In this study, carbonic anhydrase (CA) was purified and characterized from the gills of anchovy fish living in the pelagic region and whiting living in the benthic region in marine environment. The carbonic anhydrase from the whiting gill was purified 14 fold and 19.5% yield using Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity column. Also, carbonic anhydrase from the anchovy gill was purified 17 fold and 9.5% yield using same column. The specific activity of whiting and anchovy fish were determined as 126.4 EU mg protein⁻¹ and 1 000.0 EU mg protein⁻¹, respectively. SDS-PAG Electrophoresis showed that the carbonic anhydrases purified from the gills of both fish had single protein bands with a subunit molecular mass of approximately 29 kDa. In the presence of p-nitrophenyl acetate substratum of gills, esterase activities were found to be highest at pH 8.0 and 40 °C. The values of *Km* and *Vmax* of carbonic anhydrase from the gills of whiting and anchovy fish were calculated by Lineweaver-Burk graph in the presence of p-nitrophenol acetate substrate and *Km* values were determined as 0.08 mM and 0.01 mM respectively, *Vmax* value was 1x10⁷ µM min⁻¹ and 2.5x10⁶ µM min⁻¹, respectively. It was determined that the CA obtained from the gills of whiting and anchovy fish had an IC₅₀ value of 6.0 µM to 4.0 µM against the sulfanilamide inhibitor, respectively and 2.0 µM to 2.0 µM, against the acetazolamide inhibitor.

Keywords: Anchovy, benthic, carbonic anhydrase, pelagic, whiting.

[*] Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.

GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksitin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında HCO_3^- ve H^+ oluşumunda da rol almaktadır (Wistrand, 1981; Beydemir vd., 2000; Chegwiddden vd., 2000).

İnsan eritrositlerden izole edilen ilk enzimler CA I ve II izoenzimleridir. CA' nın izolasyonunda en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntem 1970 lerde uygulanmaya başlanmış ve sonrasında bu yöntem geliştirilerek CA I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Günümüzde CA' nın 16 tane izoenzimi olduğu bilinmektedir (Supuran & Scozzafava, 2001; Supuran, 2008; 2017).

CA canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir. CA her canlı ve dokuda farklı izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahiptir. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek üzere pek çok organizma ve farklı dokularda CA' nın saflaştırılarak karakterize edildiği yüzlerce çalışma bulunmaktadır (Beydemir vd., 2000; Söyüt, 2006; Kolaylı vd., 2011; Dinçer vd., 2016). Ancak bugüne kadar mezigit ve hamsi balıklarının eritrositlerinde ve diğer dokularında CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca pelajik ve bentik bölgelerde yaşayan balık türlerinin CA aktiviteleri arasında bir farklılığın olup olmadığını ortaya koyan bir çalışma da bulunamamıştır. Mezigit denizel ortamda 30-300 m derinliklerde dip ve dibe yakın bölgelerde (Özdemir vd., 2018), hamsi ise gündüzleri 30-40 m derinlerde, geceleri yüzeye yakınlarda dolaşır (Satılmış ve Bat, 2010; Zehiroğlu, 2014). Bu iki balığın farklı derinliklerde yaşamalarından dolayı solunum sisteminin ilk temas yüzeyi olan solungaçlarındaki enzimlerin davranışları da farklılık olması beklenmektedir. Bu hipotezden yola çıkarak gerçekleştirilen bu çalışmada çok tüketilen balıklardan pelajik bir balık olan hamsi ve bentik bir balık olan mezigitin solungaçlarından sepharose-4B afinite kolon matriksi kullanılarak CA enzimleri saflaştırıldı ve karakterize edildi.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada kullanılan mezigit ve hamsi balıkları balıkçı teknesinden gününbirlik satın alınarak $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildiler.

Homojenatlarının Hazırlanması: Solungaçlar neşter yardımıyla zedelenmeden dikkatlice alınarak kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl ile 3 'er defa yıkandı. Her iki balıktan da elde edilen solungaçlar, 3,0

g mL^{-1} olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0.1 M Na_2SO_4 (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde blender ile parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar sıvı azot içinde 5 dakika bekletildikten sonra tekrar çözününceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Homojenatlar buz banyosu içinde 5'er dakika olmak üzere sonikasyona tabi tutuldular ve elde edilen süspansiyonlar 60 dakika 14500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanıldı (Pullan & Noltmann, 1985; Wistrand, 2002, Candan, 2013; Birinci, 2017).

Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması: Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi ile hazırlanır. Bu dolgu materyaline L-tirozin kovalent olarak takılmış olup sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. Bu durumda tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Sülfanilamid CA'nın spesifik bir inhibitörü olup jelin yapısına bağlanarak enzimle yüksek oranda etkileşimi sağlamakta ve enzimin saflaştırılmasında en çok kullanılan yöntem olarak da bilinmektedir (Arslan vd.,1996; Bülbül vd., 2003).

Solungaç Homojenatlarının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Elüsyonu: Hazırlanan afinite jelinin kolona tatbikini takiben jel dengeleme tamponu (25 mM Tris/0,1 M Na_2SO_4 , pH 8,7) ile elüat akış hızı yine 20 mL sa^{-1} olacak şekilde kolon dengeye getirildi. Kolon aynı tampon içinde 24 saat $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi.

Mezigit ve hamsi balıklarının solungaç homojenatları ayrı kolonlarda, aynı işlemler yapılarak, dengelenmiş kolona tatbik edildi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra sistemden yıkama tamponu (25 mM Tris/22 mM Na_2SO_4 , pH 8,7) geçirilerek homojenattan kaynaklanan ve istenmeyen bileşikler kolondan uzaklaştırıldı.

Kolona tutturulmuş karbonik anhidraz enziminin afinite kolonundan elüsyonu için CA II elüsyon çözeltisi (0,1 M $\text{CH}_3\text{COOHNa}/0,5\text{ M NaClO}_4$, pH 5,6) tatbik edilmiştir (Aslan vd., 1996). 20 mL sa^{-1} akış hızında elüatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde bir fraksiyon toplayıcı yardımıyla alındı. Elüatlarda CA hidrataz aktivitesi gözlenen fraksiyonlar birleştirilerek amicon ultrafiltrasyon membranı (10.000 MWCO) kullanılarak 4.000xg'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkanarak tampon değiştirildi ve enzim çözeltisi 8,0 mL'ye kadar konsantre edildi (Dinçer vd., 2016).

Elüatların protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Lowry vd., 1951). Standart çalışma grafiği 1,0 mM stok bovine serum albümin (BSA) çözeltisi seyreltilerek hazırlandı.

Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE): Mezigit ve hamsinin solungaç homojenatlarının Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra sodyum dodesil sülfat

poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) uygulanarak enzimlerin saflaşma dereceleri kontrol edildi.

CO₂-Hidrataz Aktivitesi Tayini: Metod, substrat olarak kullanılan CO₂'ın hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH düşüşünden dolayı brom timol mavisi indikatöründe meydana gelen renk değişim süresinin ölçümüne dayanmaktadır (Maren, 1960). Ortamın pH'ının ayarlanmasında Veronal tamponu (0,25 M sodyum barbitat, pH 8,15) kullanıldı. Substrat çözeltisi olarak doygun CO₂ çözeltisi kullanıldı.

Substrat ilavesinden hemen sonra vorteksleme yapılarak ve çözeltinin renginin karıştırma anından itibaren maviden sarımsı yeşile dönmesine kadar geçen zaman kronometre ile tespit edilir. Enzim ünitesi enzimsiz reaksiyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır. Enzim aktivitesi ölçümleri 25°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Bu aktivite "Wilbur-Anderson Aktivitesi" olarak bilinir (Wilbur ve Anderson, 1948).

$EU = (t_0 - t_c) / t_c$ (t_0 : Enzimsiz denemede ölçülen süre; t_c : Enzim varlığında ölçülen süre)

Esteraz Aktivitesi Tayini: CA'nın esteraz aktivitesi, *p*-nitrofenil asetat (*p*-NFA) substratının 25°C' de 348 nm'deki absorbans değerindeki azalmayla tayin edilmektedir (Armstrong vd., 1966, Verporte vd., 1967). Esteraz aktivitesi çalışmaları, 3 mM *p*-NFA substratı varlığında 1 M Tris-SO₄ Tamponunda (pH 9) 25°C' de Shimadzu UV-1601 marka ve model spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi.

Enzim ünitesi, 25°C' de 1 dakikadaki 348 nm' de absorbansda 0,001 birimlik azalmaya sebep olan enzim miktarı olarak belirlendi.

pH Değişiminin Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi: Her iki solungaçtan izole edilen CA'ların farklı pH değerlerinde (pH 4,0-11,0) *p*-NFA substratı varlığında 348 nm' de esteraz aktivitelere

bakıldı. Ölçülen aktivite değerleri gözlenen en yüksek aktiviteye göre oranlanarak bağlı olarak hesaplanıp, grafikleri çizildi ve en yüksek aktivitenin gözlenmiş olduğu pH değeri CA'nın esteraz aktivitesi için optimal pH değeri olarak belirlendi.

Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Esteraz Aktivitesi İçin K_m , V_{maks} ve K_{kat} Değerlerinin Belirlenmesi: Solungaçlardan saflaştırılan CA'ların esteraz aktiviteleri, *p*-NFA substratının en az 5 farklı konsantrasyonunda ve üç tekrar çalışmak suretiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız grafikleri Lineweaver-Burk'e göre çizildi. Grafikten K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA'nın İnhibisyon Çalışması: CA enziminin bilinen spesifik inhibitörleri sülfanilamid ve asetazolamid ile inhibisyon çalışması yapıldı. Hidrataz aktivitesine inhibitörün etkisi yüzde olarak hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen % inhibisyon grafiğinden yararlanılarak CA'nın hidrataz aktivitesini % 50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) belirlendi (Karahalil, 2009; Dinçer vd., 2016).

BULGULAR

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerindeki protein miktarları sırasıyla 7,89 mg mL⁻¹ ve 1,83 mg mL⁻¹ olarak belirlendi.

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerdeki CA'nın hidrataz aktivitesi mezgit için 71,1 EU mL⁻¹, hamsi için 105,6 EU mL⁻¹ olarak belirlendi.

Mezgit Balığı solungacı özütünden saflaştırılan CA'nın 126,4 EU mg protein⁻¹ özgül aktivite gösterdiği ve 14 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 1). Hamsi Balığı solungacı özütünden saflaştırılan CA'nın 1.000,0 EU mg protein⁻¹ özgül aktivite gösterdiği ve 17 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 2).

Tablo 1. Mezgit Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma aşamalarının verileri.

Table 1. Data of purification steps of CA enzyme purified from whiting gill.

	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	25	71,1	1775,5	7,9	197,3	9,0	100	1
Saf CA	8	13,9	111,2	0,11	0,88	126,4	19,5	14

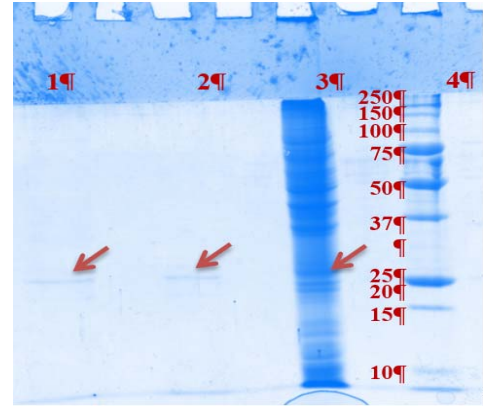
Tablo 2. Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma aşamalarının verileri,

Table 2. Data of purification steps of CA enzyme purified from anchovy gill.

	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	25	105,6	2640	1,8	45	58,7	100,0	1
Saf CA	8	10	80	0,01	0,08	1000,0	9,5	17

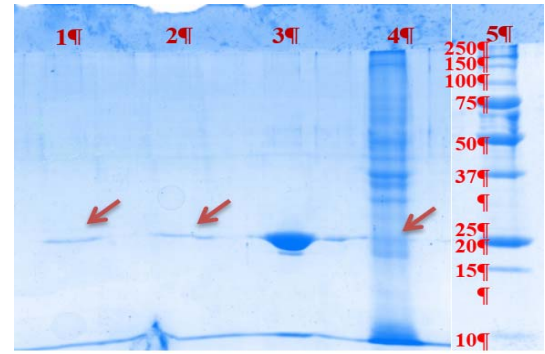
Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) eritrositlerinden CA Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla, balık kanına göre 539 kat ve %29 verimle saflaştırılmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin 26.943 EU mg protein⁻¹ olduğu tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Ayrıca bir başka çalışmada Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) solungacında CA' nın 222,2 EU/mg protein özgül aktivitesine sahip olduğu ve % 20,7 verimle ile 66 kat saflaştırıldığı belirtilmektedir (Candan, 2013; Dinçer vd., 2016). Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları CA enzimleri Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %9,1, %32,84 ve %83,6 verimlerle saflaştırılmıştır. Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 84 ve 455 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Kaya, 2011, Kaya vd., 2015). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 4318 EU mg protein⁻¹ olan, %38 verimle ve yaklaşık 2260 kat; böbrek dokusundan, spesifik aktivitesi 17 285 EU mg protein⁻¹ olan, %31,7 verimle ve yaklaşık 1800 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 2300 EU mg protein⁻¹ olan, %19 verimle ve yaklaşık 1080 kat; beyin dokusundan spesifik aktivitesi 2275 EU mg protein⁻¹ olan %22,5 verimle ve yaklaşık 1283 kat saflaştırılmıştır (Söyüt, 2006). Bir başka çalışmada gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla 422,5 EU mg protein⁻¹ spesifik aktivite, %20,9 verimle 222,4 kat saflaştırılmışlardır (Hisar vd., 2003). CA'ın aktivitesi ile saflaşma katsayısı organizma veya doku değişikçe farklılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan balıklardan elde edilen CA' ların eritrosit CA' larına göre daha düşük aktiviteye sahip oldukları fakat solungaç CA' ları ile paralellik gösterdikleri belirlendi.

Mezgit ve Hamsi özütlerinden elde edilen CA SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Elde edilen elektroforez jeli taranarak elektronik ortama aktarıldı. Yapılan SDS-PAGE elektroforezleri sonucunda her iki enzim içinde tek protein bandı gözlemlendi. Elektroforez kromatogramlarından hesaplanan Rf değerlerinden mezgit ve hamsi solungaçlarından saflaştırılan her iki CA'nın alt birim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olarak hesaplandı (Şekil 1, Şekil 2). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından izole edilen CA enzimlerinin sırasıyla alt birim molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 29,4 kDa, 28,7 kDa, 30,3 kDa ve 29 kDa olduğu belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Mersin Balığı eritrositi (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011) ve solungacındaki (Dinçer vd., 2016) CA'nın molekül kütlelerinin yaklaşık 29 kDa olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Mezgit solungacından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Solungaç özütü; 4- protein standardı kDa cinsinden).

Figure 1. SDS-PAGE image of obtained proteins from whiting gill (1 and 2- purified CA; 3- Gill extract; 4- protein standard as kDa).



Şekil 2. Hamsi solungacından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Saf CA standardı; 4- Solungaç özütü; 5- protein standardı kDa cinsinden).

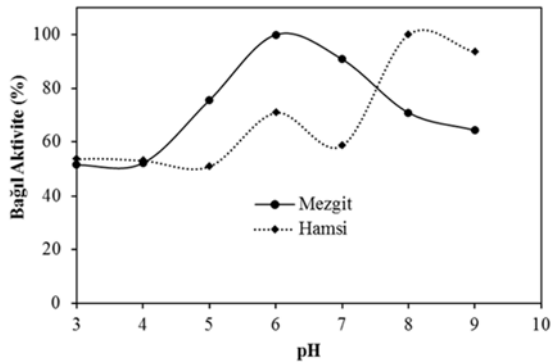
Figure 2. SDS-PAGE image of obtained proteins from anchovy gill (1 and 2- purified CA; 3- Gill extract; 4- protein standard as kDa).

Her iki balığın Solungaç dokularından izole edilen CA'nın esteraz aktivitesini pNFA substratı varlığında en yüksek pH 8,0 ve 40°C' de gösterdiği belirlendi (Şekil 3). Mezgit balığı solungacından saflaştırılan CA' nın p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri $1,0 \times 10^7 \mu\text{M dak}^{-1}$, K_m değeri 0,08 mM, k_{kat} $3,3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, k_{kat}/K_m $4,2 \times 10^8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 4, Tablo 3). Hamsi balığı solungacından saflaştırılan CA ile yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri $2,5 \times 10^6 \mu\text{M dak}^{-1}$, K_m değeri 0,01 mM, k_{kat} $1,2 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$, k_{kat}/K_m $12,0 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 5, Tablo 3).

Mersin Balığı eritrositinde saflaştırılan CA esteraz aktivitesine göre pH 9,0' da 30°C sıcaklıkta en yüksek esteraz aktivitesini gösterdiği belirtilmiştir. Enzimin K_m ve V_{maks} kinetik değerleri p-NFA substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla K_m 4 mM ve V_{maks} 20 000 mM dak⁻¹, k_{cat} değeri $20,8 \text{ s}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Karaca Mersini balığı solungacından saflaştırılan CA'nın en yüksek esteraz aktivitesini pH 6,0' da ve 40°C' de gösterdiği, kinetik çalışmalar sonucunda

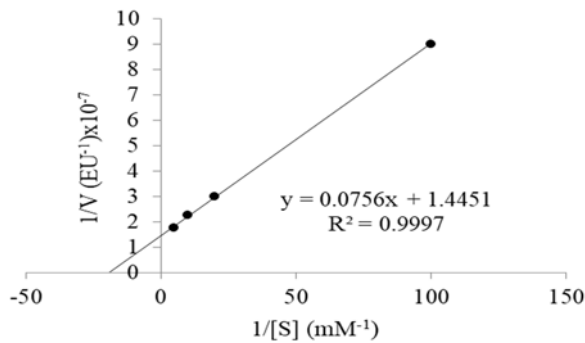
2,5 mM K_m , $5 \times 10^6 \mu\text{M} \text{dak}^{-1}$ V_{maks} ve $144\,408,6 \text{ s}^{-1}$ k_{kat} değerine sahip olduğu belirtilmiştir (Candan, 2013; Dinçer vd., 2016). Gökkuşluğu alabalık CA esteraz aktivitesi optimal pH karaciğer dokusu için pH 8,5 olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için pH 9,0 olarak bulunduğu ve tüm dokularda 40°C 'de en yüksek aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-NFA için K_m , V_{maks} , k_{kat} ve özgülük sabiti (V_0) değerleri belirlenmiştir. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin K_m değerleri sırasıyla 0,66, 0,40, 1,29 ve 0,92 mM olarak, V_{maks} değerleri sırasıyla 0,126, 0,097, 0,173, 0,207 $\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{dak}^{-1}$, k_{kat} değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8, 43,6 s^{-1} ve özgülük sabitleri sırasıyla 5×10^4 , 4×10^4 , $2,2 \times 10^4$ ve $4,7 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ olarak belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Hamsi balığı solungacının CA enzimi mezgit balığı solungacı CA'na göre hidrataz ve esteraz aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Literatürlerde yer alan diğer CA'lara göre iki CA nında oldukça hızlı katalizleme yeteneğinin olduğu görülmektedir.



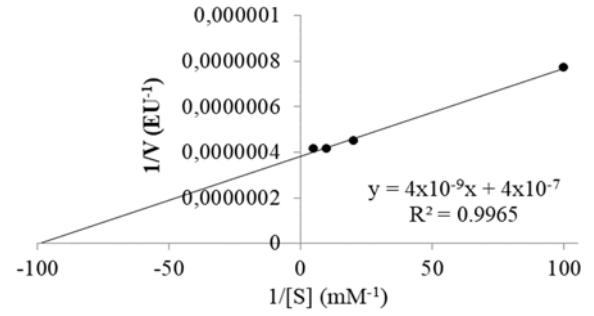
Şekil 3. Balıkların solungaçlarından saflaştırılan CA'ların pH ile aktivitelerinin değişimi.

Figure 3. Activity changing of CAs purified from the fish gills with pH.



Şekil 4. Mezgit solungacından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.

Figure 4. Lineweaver-Burk plot of CA purified from whiting gill in the presence of p-NFA substrate.



Şekil 5. Hamsi solungacından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.

Figure 5. Lineweaver-Burk plot of CA purified from anchovy gill in the presence of p-NFA substrate.

Tablo 3. Saflaştırılan CA'ların p-NFA substratı varlığındaki kinetik verileri.

Table 3. Kinetic data of purified the CAs in the presence of p-NFA substrate.

Balık Türü	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak}$)	K_m (mM)	k_{kat} (s^{-1})	k_{kat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Mezgit	$1,0 \times 10^7$	0,08	$3,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
Hamsi	$2,5 \times 10^6$	0,01	$1,2 \times 10^{11}$	$12,0 \times 10^{12}$

CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sülfanilamid etkisi incelendi. Elde edilen inhibisyon grafiklerine göre Mezgit balığı için asetazolamid IC_{50} değeri 2,0 μM , sülfonamid için 4,0 μM ; Hamsi balığı için asetazolamid IC_{50} değeri 2,0 μM , sülfonamid için 6,0 μM olarak belirlendi. Mersin Balığı eritrositinden saflaştırılan CA'nın sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4,0 μM ve 0,1 μM gibi oldukça düşük IC_{50} değerlerine (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011), solungacından elde edilen CA'nın ise sırasıyla 13,0 μM ve 0,1 μM IC_{50} değerlerine sahip olduğu belirtilmiştir (Dinçer vd., 2016). Her iki balığa ait solungaçlardan izole edilen CA'ların CA'nın bilinen inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi. İnhibisyon davranışları yönünden her iki balığın solungaçlarından izole edilen karbonik anhidrazların CA-II ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir.

SONUÇ

Yapılan bu çalışmada mezgit ve hamsi balıklarının yaşama alanlarının denizde farklı olması münasebetiyle solungaçlardan izole edilen CA'ları da davranış olarak farklılık arz ettiği belirlendi. Solungaçlardan elde edilen CA'ların sülfanilamid inhibitörü bağlı sepharose 4B afinite kolonundan birbirlerine yakın saflaşma katsayısına sahip olmalarına rağmen CA'nın, fizyolojik substratı CO_2 ve p-NFA karşı ilgilerinin birbirinden farklı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, Her iki enziminde hidrataz ve esteraz aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu, bununla birlikte hamsi CA'sının mezgit CA'sına göre daha hızlı çalıştığı görüldü. Ayrıca enzimin bilinen inhibitörleri olan

sülfanilamid ile asetazolamid karşı her iki CA'nında oldukça duyarlı olduğu tespit edildi.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi destekleriyle gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. & Edsall, J.T. (1966).** Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5137-5145.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (1996).** New method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Science*, **26**(2), 163-166.
- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Özmen, I., Okuroğlu, M.E., Özdemir, H. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (2000).** Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacological Research*, **42**, 187-19.
- Birinci, P. (2017).** *Pelajik ve bentik balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonikanhidraz aktivitelerinin irdelenmesi*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Rize, Türkiye, 75s.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, B., Çiftçi, M. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (2003).** The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **18**(4), 371-375.
- Candan, G. (2013).** *Karaca mersini (Acipenser gueldenstaedtii) solungacından karbonik anhidrazın karakterizasyonu*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Rize, Türkiye, 70s.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. & Spencer, I.M. (2000).** In the carbonic anhydrase new horizons. *Chemistry Medicinal Research Reviews*, **23**, 146-189.
- Dinçer, B., Ekinci, A.P., Akyüz, G. and Kurtoğlu, I.Z. (2016).** Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of russian sturgeon fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **31**(6), 1662-1665.
- Hisar, O., Hisar, Ş., Yanık, T. & Aras, M. (2003).** Balık kan karbondioksitinin taşınması ve atılmasında karbonik anhidraz izoenzimlerinin fonksiyonları. *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, **34**(4), 387-393.
- Karahalil, F. (2009).** *Mersin Balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Trabzon, Türkiye, 88s.
- Kaya, E.D. (2011).** *Çipura (Sparus aurata) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, Türkiye, 173s.
- Kaya, E.D., Söyüt, H. & Beydemir, Ş. (2015).** The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **39**(2), 825-832.
- Kolaylı, S., Karahalil, F., Şahin, H., Dinçer, B. & Supuran, C.T. (2011).** Characterization and inhibition studies of an α carbonic anhydrase from the endangered sturgeon species *Acipenser gueldenstaedtii*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **26**(6), 895-900.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Maren, T.H. (1960).** A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **130**(1), 26-29.
- Özdemir, S., Söyleyici, H., Özdemir Birinci, Z., Özsandıkçı, U. & Büyükdeveci F. (2018).** Karadeniz (Sinop-Samsun) kıyılarında avlanan mezgit (*Merlangius merlangus euxinus*) balığının aylık olarak boy-ağırlık ilişkileri ve boy kompozisyonunun tespiti. *Aquatic Research*, **1**(1), 26-37.
- Pullan, L.M. & Noltmann, E.A. (1985).** Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **839**(2), 147-154.
- Satılmış, H. & Bat, L. (2010).** Planktondaki hamsi. *Yunus Araştırma Bülteni*, **10**(2), 1-3.
- Söyüt, H. (2006).** *Gökkuşluğu alabalık dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin*

- incelenmesi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, Türkiye. 201s.
- Supuran, C.T. (2008).** Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and Activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168-181.
- Supuran, C.T. (2017).** Bortezomib inhibits mammalian carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 64-67.
- Supuran, C.T. & Scozzafava, A. (2001).** Carbonic anhydrase inhibitors, current medicinal chemistry-immunology. *Endocrine & Metabolic Agents*, 1, 61-97.
- Verporte, J.A., Mehta, S.T. & Edsall, J. (1967).** Esterase activities of human carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Wilbur, K. & Anderson, N. (1948).** Elektrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wistrand, P.J. (1981).** The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte., *Acta Physiologica*, 113(4), 417-426.
- Wistrand, P.J. (2002).** Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 107(2), 77-88.
- Zehiroğlu, A.M. (2014).** Hamsi etimolojisi. www.academia.edu/9331292 (12 Eylül 2019).