

Koyun Meme Doku Arjinazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri*

Mehtap ÖZÇELİK, Necmi ÖZDEMİR
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 23.05.2002

Özet: Bu çalışmada, koyun meme doku arjinaz enziminin bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmış ve arjinaz için preinkübasyon ısısının 52 °C, preinkübasyon zamanının 12 dakika, optimal pH'nin 9.7 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca koyun meme doku arjinazının çeşitli metal iyonlarına karşı duyarlılığı da tespit edilmiş ve Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Ag^{+2} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonları içinde enzim aktivitesi üzerine etkili metallerin Mn^{+2} olduğu bulunmuştur. Enzim 0,75 mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Enzim aktivasyonu için Mn^{+2} katyonlarının ve preinkübasyonun gerekli olduğu görülmüştür. Sn^{+2} , Pb^{+2} , Cr^{+2} 'nin ise hiç aktivite göstermediği saptanmıştır. Enzimin substrata olan ilgisi Michaelis-Menten grafiğine göre değerlendirilmiş ve K_m değeri 1,35 mM olarak bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Arjinaz, koyun meme dokusu, kinetik özellikleri

Some Biochemical Properties of Arginase in Sheep Mammary Tissue

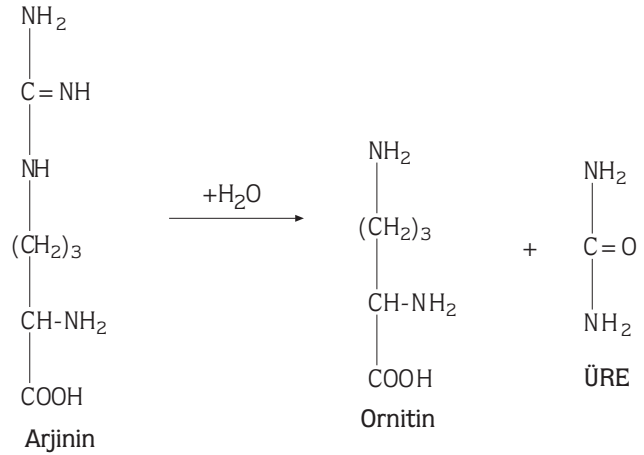
Abstract: In this study, some biochemical properties of arginase in sheep mammary tissue were examined. Preincubation temperature, preincubation period and pH were determined to be 52 °C, 12 min and 9.7, respectively. Furthermore, it was found that arginase in sheep mammary tissue was sensitive to different metal ions. It was found that the most effective was Mn^{+2} from among Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Ag^{+2} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} and Ca^{+2} metal ions. Arginase showed the highest activity in a 0.75 mM $MnCl_2$ concentration. Manganese ions and preincubation were necessary for the activation of the enzyme. Sn^{+2} , Pb^{+2} and Cr^{+2} showed no activity. The relationship with the enzyme substrata was evaluated according to Michaelis-Menten and the K_m value was 1.35 mM.

Key Words: Arginase, sheep mammary tissue, kinetic properties

Giriş

Arjinaz (L-Arjinin amidino hidrolaz, E.C. 3.5.3.1) üre döngüsünün son enzimidir. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından keşfedilen arjinaz sitoplazmik enzim olup üre döngüsünün son basamağında L-arjinini, üre ve ornitine hidrolize eden bir enzimdir (1,2).

Üre döngüsü sadece karaciğer hücrelerinde olmasına karşın, arjinaz enzimi birçok hücrede görülmektedir. Arjinaz bakımından en zengin organ karaciğer olup üre döngüsüne katılarak amonyağı toksik olmayan bileşiklere dönüştürür (3-6). Karaciğer dokusu dışında böbrek, beyin, bağırsak, tiroid bezi, tükrük bezi, eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, plasenta, testis, meme gibi birçok dokuda da düşük düzeyde bulunduğu ve üre döngüsü dışında özellikle poliamin sentezine katılmak ve protein biosentezi için gerekli olan prolinin sentezlenmesi



* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

olmak üzere özel fonksiyonlara sahip olduğu saptanmıştır (5-12).

Canlılarda protein biosentezinin en yoğun olduğu dokulardan birisi de meme dokusudur. Ancak literatür taramaları sonucunda koyun meme arjinazının kinetik niteliklerinin belirlendiği bir çalışma bulunamamış ve bu çalışmada koyun meme dokusu arjinazının niteliklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma materyalleri, Elazığ Elet Tesisleri'ne kesim için getirilen laktasyondaki koyunlardan temin edilmiştir. Bu çalışmada 1-2 yaşlarında ve aynı koşullarda yetiştirilen ve fiziksel özellikleri aynı olan 20 tane Akkaraman koyunu kullanılmıştır. Kesimden hemen sonra alınan sütlü meme dokusu % 0,9'luk soğuk NaCl çözeltisi içerisinde behere aktarılmış ve buz içerisinde olabildiğince hızlı bir şekilde laboratuara ulaştırılmıştır.

Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra $MnCl_2$ (1/5, w/v) ile sulandırılarak Potter-Elvehjem (cam-cam) homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat +4 °C'de 16000 x g'de 15 dakika Sorvall RC-5B'de santrifügasyon işleminden geçirilmiş ve örneklerin süpernatantları enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim Üre (TDMU) yöntemi (13) kullanılarak, koyun meme doku arjinazının preinkübasyon ısı ve zamanı, inkübasyon zamanı, metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi, Mn^{+2} iyonlarının varlığında ve yokluğunda preinkübasyon ısısının değişimleri, optimal pH'nın belirlenmesi ve arjinaz aktivitesinin L-arjinin konsantrasyonuna bağlı değişimi gibi bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Koyun meme doku örneklerinin her ml süpernatantına 3 ünite Jack-Bean üreaz enzimi ilave edildikten sonra 37 °C'de 15 dakika inkübe edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır (14). Dış kaynaklı üreden arındırılan ve üzerine 2 mM $MnCl_2$ ile (1 x 6) ilave edildikten sonra 52 °C'de 12 dakika metabolik su banyosunda preinkübasyon gerçekleştirilen örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimatik karışım 1 ml olup 75 mM L-arjininden (pH 9,5) 0,3 ml, 100 mM karbonat tamponundan (pH 9,5) 0,4 ml, daha sonra üzerine 0,3 ml preinkübasyona tabi tutulan enzim kaynağı eklenerek örnekler 37 °C'de sallantılı metabolik su banyosunda 15 dakika tutulmuştur. Asit karışımdan (Sülfirik Asit ve $FeCl_3$ karışımı) 3 ml ilave ederek

reaksiyon durdurulmuş ve üzerine 2 ml renk ayırıcı (Thiosemikarbazid ve Diasetil monoksim karışımı) konup 10 dakika kaynar su içerisinde bekletilmiştir. Dalga boyu 520 nm'de (UV/ Vis-Spectro-Shimadzu UV-240) örneklerin üre miktarları sıfır zaman körlerinin absorbanslarının (zero time blank) çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

Protein miktarı Biüret Yöntemi ile saptanmıştır (15).

ÜNİTE: 1mg proteinin 1 saatte oluşturduğu üre miktarının mmol cinsinden ifadesidir (μmol üre/mg protein x saat).

Bulgular

1-Preinkübasyon Isısının Tespiti: Koyun meme doku arjinaz enziminin aktivasyonu için gerekli şartlardan preinkübasyon ısı araştırılmıştır (Şekil 1). Enzim kaynağı 35 ile 65 °C'leri arasında preinkübasyon ısısına tabi tutularak en yüksek enzim aktivitesi 50-55 °C'ler arasında alınmıştır. Bu nedenle enzimin aktivasyonu için preinkübasyon ısı 52 °C olarak tespit edilmiştir.

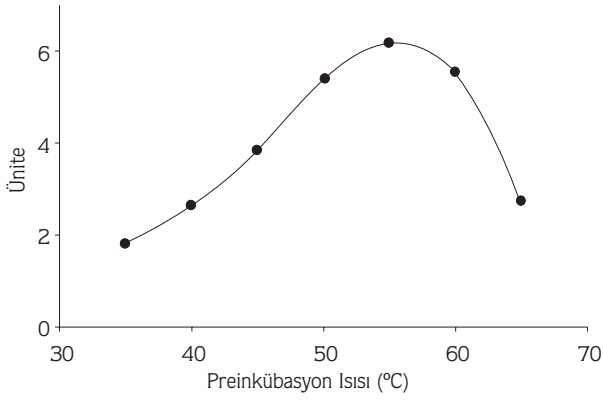
2-Preinkübasyon Zamanının Tespiti: Koyun meme doku arjinazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak değişimini $MnCl_2$ varlığında ve 52 °C'lik preinkübasyon ısısında 5-25 dakikalık zaman aralıklarında incelendiğinde maksimum aktiviteye 12 ile 15. dakikalar arasında ulaşıldığı görülmüş ve preinkübasyon zamanı 12 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 2).

3-İnkübasyon Zamanının Tespiti: Koyun meme doku arjinazı için inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynakları değişik zaman sürelerinde inkübasyona tabii tutulmuş, reaksiyon sonunda meydana gelen ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 12. dakikaya kadar doğrusallığını koruyup bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için optimal inkübasyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

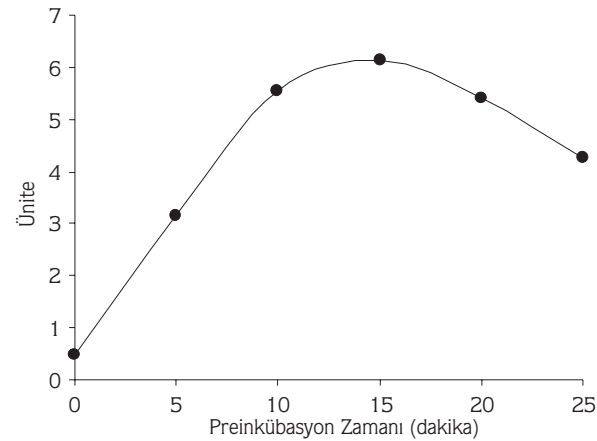
4-Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi: Metal iyonlarının etkisini araştırmak için; Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Ag^{+3} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} varlığında enzim aktivitelerine bakılmıştır. Bu metal iyonları 0,75 mM'lık konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir (Tablo 1). Mn^{+2} iyonu varlığında enzimin katalitik

aktivitesinin çok yüksek olduğu fakat diğer metal iyonlarının varlığında ise enzimin katalitik aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.

5-MnCl₂'ün Etkisi: En yüksek konsantrasyonda Mn⁺² iyonlarının arjinaz için gerekli olduğu anlaşıldıktan sonra değişik konsantrasyonlarda Mn⁺² iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Preinkübasyon ortamının Mn⁺² içermediği noktada enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn⁺² iyonları ilave edildiğinde belirgin şekilde aktivite artışı gözlenmiştir. En yüksek aktivitenin görüldüğü konsantrasyon 0,5-1 mM arasındadır. 1,5 mM MnCl₂ konsantrasyonundan sonra aktivite düşmüştür (Şekil 4). Enzim 0,75 mM'lık MnCl₂ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi göstermesinden dolayı bu molarite enzim için en uygun MnCl₂ konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.



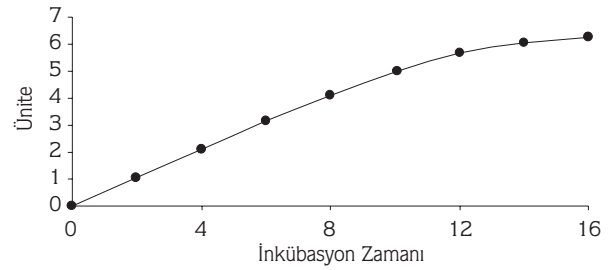
Şekil 1. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.



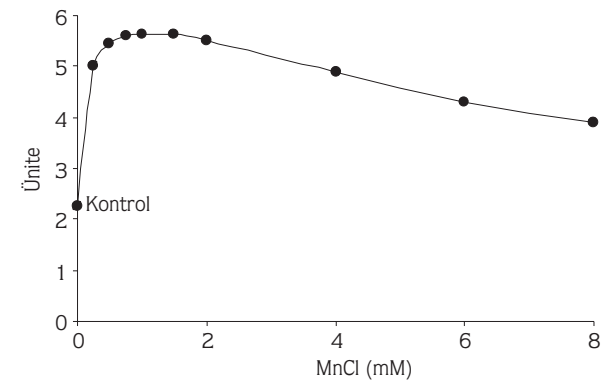
Şekil 2. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

6-Mn⁺² İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesine Etkisi: Preinkübasyon ısısının Mn⁺² iyonlarının varlığına bağlı olup olmadığını tespit etmek için +MnCl₂'lü ve -MnCl₂'süz (distile su ile) preinkübasyon işlemine sokulmuştur. Sonuçta; MnCl₂ varlığında uygulanan preinkübasyonla enzimin, çok daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. MnCl₂'süz preinkübasyon işlemine sokulan enzim kaynağından elde edilen aktivite ile MnCl₂'lü preinkübasyona sokulan enzim kaynağından elde edilen aktivitenin sadece 1/3 katı olduğu bulunmuştur (Şekil 5).

7-Optimal pH'nın Tespiti: Koyun meme doku arjinazının optimal pH'sını tespit etmek için 7,5 ile 11 arasında değişen pH'larda tampon çözeltiler çalışılmıştır (Glisin-NaOH Tamponu, Tris-HCl Tamponu, Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponu). Şekil 6'da



Şekil 3. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 4. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin MnCl₂ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

görüldüğü gibi pH grafiği tipik bir çan eğrisi (Bell shape) şeklinde olup en yüksek aktiviteyi Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponu pH 9,5'da verdiğiinden dolayı optimal pH olarak kabul edilmiştir.

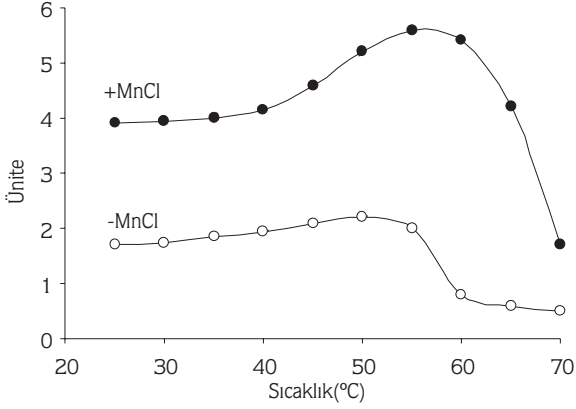
8-Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin L-Arjinin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi: Doku için bütün uygun şartlar belirlendikten sonra enzimin substratına ilgisi Michaelis-Menten grafiği ile incelenmiştir. 0-35 mM arasında değişen L-arjinin konsantrasyonları çalışılmıştır. Reaksiyon hızı başlangıçta 2 mM'a kadar lineerlik gösterirken (I. Aşama Kinetiği), daha sonra yerini hiperbolik bir görünüme (Karışık Aşama Kinetiği) bırakmış, sonunda da enzim 15 mM substrat konsantrasyonundan sonra doygunluğa (Sıfır Aşama Kinetiği) ulaşarak reaksiyon sabit hızla devam etmiştir (Şekil 7, 8). Koyun meme doku arjinazının substratı L-arjinine karşı olan K_m 'i 1,35 civarındadır. Enzim

aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk eğrisiyle değerlendirilmiştir.

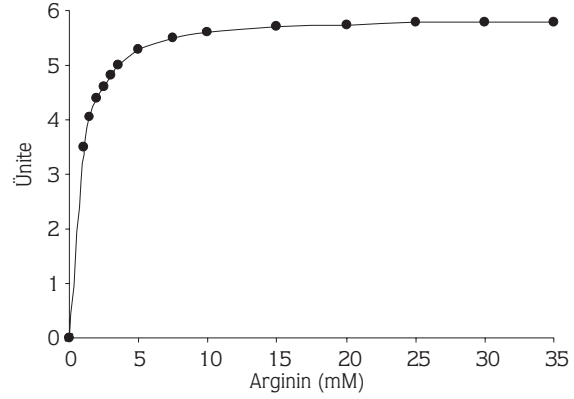
Tartışma

Meme dokusu, aktif üre döngüsünün görülmediği buna karşılık arjinaz enzim aktivitesine rastlandığı bir dokudur (2,16,17).

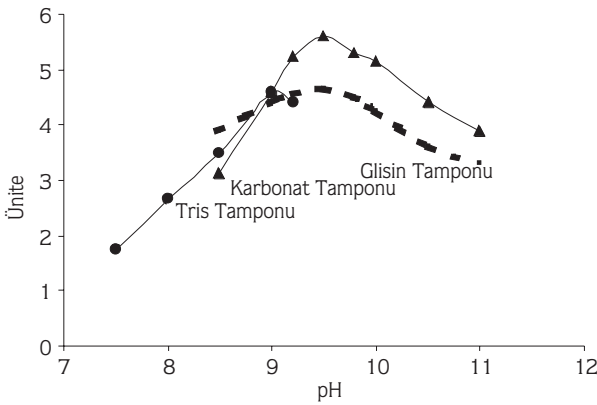
Enzimlerin genel yapısı protein kaynaklı olması nedeniyle ısıya dayanıklı değildir. Maksimum aktivite gösterdiği ısının üstüne çıkıldığı zaman enzim aktivitesi düşmektedir. Laktasyondaki koyun meme doku arjinazının preinkübasyon ısısının 52 °C, zamanı ise 12 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 1, 2). Arjinazın ölçümünde preinkübasyon işleminin ve Mn^{+2} iyonlarının gerekli olduğu önerilmektedir (18,19). Colombo ve Konarska (20), 55 °C'de 20 dakikalık bir preinkübasyonla karaciğer arjinaz aktivitesinin 4-5 kat, eritrosit arjinaz



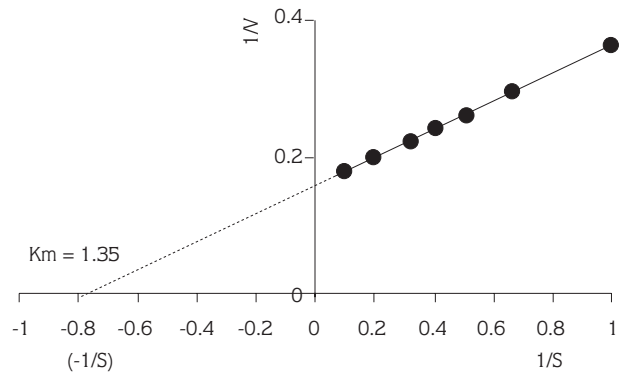
Şekil 5. Mn^{++} iyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 7. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.



Şekil 6. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesi İçin Optimal pH'nın Saptanması.



Şekil 8. Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesinin L-Arjinin Konsantrasyonuna Bağlı K_m Değerinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.

Tablo 1. Metal İyonlarının Koyun Meme Doku Arjinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

Metal iyonları	% Aktivite
Kontrol	100
MnCl ₂	2060
CdCl ₂	700
NiSO ₄	556
CaCl ₂	216
MgCl ₂	164
BaCl ₂	124
CuSO ₄	116
FeCl ₃	110
HgCl ₂	100
CoSO ₄	96
ZnSO ₄	72
AgNO ₃	44
SnCl ₂	0
Pb(NO ₃) ₂	0
CrO ₃	0

aktivitesinin ise 2-6 kat arttığını bulmuşlardır. Schimke (21), sıçan karaciğer arjinaz aktivitesi için preinkübasyon ısısını 55 °C zamanı ise 5 dakika olarak tespit etmiştir. Buna göre preinkübasyon zamanının dokulara göre farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur.

Koyun meme doku arjinaz aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişiminde 15. dakikaya kadar lineer artışın görüldüğü, 15. dakikadan sonra lineerliğin bozulduğu görülmüştür (Şekil 3).

Enzim üzerine metal iyonlarının Mn⁺², Cu⁺², Mg⁺², Ba⁺², Fe⁺³, Ag⁺², Cr⁺³, Sn⁺², Hg⁺², Pb⁺², Co⁺², Ni⁺², Zn⁺², Ca⁺², Cd⁺² etkisi araştırıldığında maksimum aktiviteyi Mn⁺² iyonlarının verdiği saptanmıştır (Tablo 1). Koyun meme doku arjinazı metal iyonu ile preinkübe edildiğinde, Mn⁺²'nin % 2060 aktivite gösterdiği daha düşük olarak da Cd⁺²'un % 700, Ni⁺²'in % 556, Ca⁺²'un % 216, Mg⁺²'un % 164, Ba⁺²'un % 124, Cu⁺²'in % 116, Fe⁺³'in % 110, Hg⁺²'nin % 100 aktive gösterdiği saptanmıştır. Co⁺², Zn⁺², Ag⁺² gibi metaller ise çok düşük oranda aktivite gösterdiği, Sn⁺², Pb⁺², Cr⁺³ metal iyonlarının ise hiç aktivite göstermediği belirlenmiştir (Tablo 1).

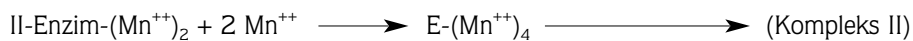
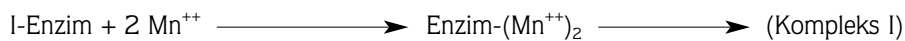
Bir doku için aktivatör olan metal iyonu diğer bir doku için inhibitör olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada boratın rat karaciğer arjinazını inhibe ettiği bulunmuştur (22). Spector ve ark. (4), yetişkin ve fetal insanın, karaciğer, eritrosit, böbrek, beyin ve gastrointestinal sistem dokularında Mn⁺² > Co⁺² > Mg⁺² iyonlarının enzimi aktive ederken, Ca⁺²'un inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada Mn⁺², Ni⁺², Cd⁺², Co⁺² iyonlarının rumen doku arjinazını aktive ederken Hg⁺², Zn⁺², Ag⁺², Sn⁺², Cu⁺², Fe⁺², Pb⁺² iyonlarının aktiviteyi tümüyle engelledikleri tespit edilmiştir (23). Carvajal ve ark. (24), insan karaciğer arjinazı üzerine metal iyonlarının esas rolü oynadığını ve en güçlü etkiyi de Mn⁺² iyonunun gösterdiğini saptamışlardır.

Bilindiği gibi Mn⁺² katyonları arjinaz aktivitesi için gerekli bir kofaktördür. Her doku için ayrı ayrı konsantrasyonlarda MnCl₂ kullanılması gerekir. Laboratuvarımızda koyun meme doku arjinaz enzimi için Mn⁺² konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre koyun meme doku arjinaz enzimi en yüksek aktiviteyi 0,75 mM MnCl₂ konsantrasyonunda vermiştir (Şekil 4). Rather (25), arjinazın Mn⁺² iyonuyla aktivasyonunu değişik bir yaklaşımla açıklamıştır. Sıçan ve siğir arjinazları dört alt birimden meydana gelmiş olup her bir alt birime bir Mn⁺² iyonu bağlanmaktadır.

Kompleks I, Kompleks II'ye oranla % 50 daha az aktiftir. Kompleks I'in Kompleks II'ye dönüşüm basamağı belki de tepkime hızının kontrol edildiği basamaktır. Preinkübasyon bu basamak için gerekli olan ısı ve zamanı sağlamaktadır.

Enzim-Mn⁺²-Arjinin kompleksinin oluşmasında, enzimi aktive eden Mn⁺² iyonları enzim-substrat arasında bir köprü oluşturmuştur (20,26).

Preinkübasyon ortamına Mn⁺² iyonları ilave edilerek yapılan çalışmanın ilave edilmeden yapılan çalışmadan daha yüksek aktivite verdiği görülmüştür. Mn⁺² iyonunun aktiviteyi yaklaşık 3 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Mn⁺² iyonu ilave edilmeden preinkübe edilen enzim kaynağı 55 °C'ye kadar çok az aktivite gösterdiği, 55 °C'den sonra düşmeye başladığı, 70 °C'de ise enzim aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. Oysa Mn⁺² iyonu ilave



edilen çalışmada 55 °C'ye kadar bariz bir artış görülmüş, 55 °C'den sonra ise düşüş gözlenmiştir (Şekil 5).

Mohammed ve ark. (14), preinkübasyon sırasında $MnCl_2$ 'ün arjinaza bağlanarak enzimin aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığını açıklamışlardır. Keza Mn^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini stabilize ettiği de ortaya konulmuştur (27).

Farklı organ ve türlerde yapılan birçok çalışmada arjinaz enzimi için optimal pH'nın 9-11 arasında değiştiği saptanmıştır (4,20,21,28,29). Bu nedenle çalışmamızda uygun tampon seçimi ve optimal pH araştırılmış ve enzim aktivitesi için karbonat tamponunun ve pH 9,5'un uygun olduğu saptanmıştır (Şekil 6).

Benzer şekilde Colombo ve Konarska ve Ozan (20) hem karaciğer hem de eritrosit arjinazı, Erişir ise (19) sığır rumen arjinazı için uygun pH'nın 9,7 dolayında olduğunu bildirilmektedirler.

Koyun meme doku arjinazının, L-arjinine karşı Km değeri Michaelis-Menten (Şekil 7) ve Lineweaver-Burk (Şekil 8) eğrileriyle araştırılmış ve yaklaşık 1,35 mM

olarak bulunmuştur. İnsanlarda karaciğer, böbrek, beyin, gastrointestinal sistemde arjinaz enziminin Km değerinin 8-18 mM olarak bulunduğu (4), sığır rumen arjinazının saflaştırılmadan önce ve sonra Km değerinin 4 mM (19), sığır karaciğer arjinazının Km değerinin 10-20 mM arasında değiştiği (1), M. benedeni arjinazının Km değerinin ise 12,5 mM olduğu ortaya konulmuştur (28). Bu çalışmalar doğrultusunda aktif üre döngüsünün görülmediği dokularda Km değerinin küçük olduğu görülmektedir.

Karaciğer haricinde üre döngüsünün bulunmadığı meme gibi birçok dokuda yada ürolitik canlılarda arjinaz enzim aktivitesinin bulunması, arjinaz enziminin amonyağın detoksifikasyonu işlemi haricinde bazı fonksiyonlarının (poliamin ve protein sentezi gibi) olabileceğini ortaya koymaktadır (5-11).

Koyun meme dokusunda aktif üre döngüsünün bulunmamasına karşın arjinazın varlığının saptanması, arjinazın süt proteinlerinin sentezinde gereksinim duyulan amino asitlerin biyosentezinde görev aldığı bir kanıtı olarak değerlendirilebilir.

Kaynaklar

1. Garganta, C.L., Bond, J.S.: Assay and Kinetics of Arginase. *Anal. Biochem.* 1986; 154: 388-394.
2. King, J.: Arginase. *Practical Clinical Enzymology*. D. Van Nostrand Company, London, 220-225, 1965.
3. Moreno-Vivian, C., Soler, G., Castillo, F.: Arginine Catabolism in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter Capsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem.* 1992; 204: 531-537.
4. Spector, E.B., Rice, S.C.H., Moedjono, S., Bernard, B., Cederbaum, S.D.: Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochem. Med.* 1982; 28: 165-175.
5. Fuentes, J.M., Campo, M.L., Soler, G.: Kinetics and Inhibition by Some Aminoacids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochimie Biophysique.* 1994; 102: 255-258.
6. Ber, E., Muszynska, G.: Chemical Modification of Rat Liver Arginase. *Acta Biochim. Polonica.* 1979; 26: 103-114.
7. Konarska, L., Tomaszewski, L.: Studies on L-Arginase of Small Intestine. *Biochem. Med.* 1975; 14: 250-262.
8. Konarska, L., Tomaszewski, L., Rolczyk, U.: Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 1986; 35: 170-178.
9. Nadolska-Lutyk, J., Grabon, W., Poremska, Z.: Arginase in Bull Testis. *Acta Biochim. Polonica.* 1990; 37: 377-384.
10. Nakamura, H., Saheki, T., Nakagawa, S.: Differential Cellular Localization of Enzymes of L-Arginine Metabolism in the Rat Brain. *Brain Res.* 1990; 530: 108-112.
11. Özdemir, N., Gürsu, F., Ozan, S., Gülen, Ş.: Kıvrık ve Düz Saçlı Erkek ve Kız Öğrencilerin Eritrositlerinde ve Tükürüklerindeki Arjinaz Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *F. Ü. Sağlık Bil. Derg.* 1993; 7: 84-90.
12. Hirsch-Kolb, H., Heine, J.P., Kolb, H.J., Greenberg, D.M.: Comparative Physical-Chemical Studies of Mammalian Arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970; 37: 345-359.
13. Geyer, J.W., Dabich, D.: Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.* 1971; 39: 412-417.
14. Mohammed, S.M., Greenberg, D.M.: Liver Arginase I. Preparation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, Inhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1945; 8: 349-357.
15. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M.: Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 1975; 177: 751
16. Basch, J.J., Wickham, E.D., Farrell, H. M.: Arginase in Lactating Bovine Mammary Glands: Implications in Proline Synthesis. *J. Dairy Sci.* 1997; 80: 3241-3248.

17. Yip, M.C.M, Knox, W.E.: Function of Arginase in Lactating Mammary Gland. *Biochem. J.* 1972; 127: 893-899.
18. Carvajal, N, Cederbaum, S.D.: Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Proline and Branched-Chain Amino Acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986; 870: 181-184.
19. Erişir, M., Ozan, S.T.: Sığır Doku Rumen Arjinazının Saflaştırılmasından Önce ve Saflaştırılmasından Sonra Bazı Özellikler. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 1999; 23: 597-608.
20. Colombo, J.P, Konarska, L.: Arginase. In: Bergmayer, H.O. Ed: *Methods of Enzymatic Analysis.* 3rd. ed. Weinheim: Vertag Chemic. 285-294, 1984.
21. Schimke, R.T.: Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 459-467.
22. Reczkowski, R.S, Ash, D.E.: Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism, Alternate Substrates and Inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 312: 31-37.
23. Erişir, M., Ozan, S.T.: Sığır Rumen Doku Arjinazında -SH Gruplarının Varlığı ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonları ile Guanidino Bileşiklerinin Etkisi. *Biyokim. Derg.* 1998; 23: 24-31.
24. Carvajal, N., Torres, C., Uribe, E, Salas, M.: Interaction of Arginase with Metal Ions: Studies of the Enzyme from Human Liver and Comparison with Other Arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995; 112B: 153-159.
25. Rather, S.: Enzymatic Synthesis of Arginine. 359-364 (Condensing and Splitting Enzymes). In *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. Vol 2, 1955.
26. Rather, S.: Farnohian and Clearge on C-N bonds in Arginine and Urea Biosynthesis. 227-233: In: Horecker, B.L., Cornudella, *Reflections on Biochemistry*, Pergamon Press, New York, 1976.
27. Rüegg, U.T, Russell, A.S.: A Rapid and Sensitive Assay for Arginase. *Analyt. Biochem.* 1980; 102: 206-212.
28. Özdemir, N.: M. Benedeni Arjinazının Bazı Özellikleri. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 1990.
29. Hosoyama Y.: The Reversible Inactivation of Rat-Liver Arginase at Low pH. *Eur. J. Biochem.* 1972; 27: 48-52.