

Sığır Rumen Doku Arginazının Saflaştırılmasından Önce ve Saflaştırılmasından Sonra Bazı Özellikleri

Mine ERİŞİR, Sema Temizer OZAN

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 04.02.1998

Özet: Sığır rumen doku arginazının saflaştırılmasından önce ve saflaştırıldıktan sonra bazı biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldı.

Enzimin saflaştırılmasında; homojenizasyon, ısıtma, aseton ile muamele, amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, değişik santrifügasyonlar, sefadeks G-200 jel filtrasyon işlemleri kullanılmıştır.

Arginazın, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra, preinkübasyon ısısının (60 °C) ve substratı L-arginine karşı olan Km'nin (4mM) değişmediği saptanmıştır. Saflaştırılmadan önce preinkübasyon süresi 10 dakika, optimal pH 9.7 iken, saflaştırıldıktan sonra preinkübasyon süresi 5 dakika, optimal pH ise 10 olarak bulunmuştur. Yine saflaştırılmış enzim 2 mM MnCl₂ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verirken, saflaştırılmamış enzim 1 mM MnCl₂ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi vermektedir.

Neticede, enzimin aktivasyonu için Mn⁺⁺ katyonlarının ve preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Sığır Rumen Dokusu, Arginaz, Saflaştırma, Kinetik özellikler.

Some Properties of Purified and Non-purified Rumen Tissue Arginase in Cattle

Abstract: Some biochemical properties of purified and non-purified rumen tissue arginase were compared.

Homogenization, heating, treatment with acetone, precipitation with ammonium sulfate, dialysis, several centrifugations, gel filtration on sephadex G-200 processes were utilized in the purification procedure of the enzyme.

It was found that pre-incubation temperature (60 °C) of arginase and Km (4mM) to its substrate, L-arginine, did not change before and after purification. While pre-incubation period was 10 min and optimal pH 9.7 before purification, pre-incubation period was found to be 5 min and optimal pH 10 after purification. Purified enzyme achieved its highest activity at 2 mM MnCl₂ concentration, whereas non-purified enzyme gave the highest activity at 1 mM MnCl₂ concentration.

Consequently, it was determined that Mn⁺⁺ cations and preincubation were essential for the activation of the enzyme.

Key Words: Cattle Rumen Tissue, Arginase, Purification, Kinetic properties.

Giriş

Ruminant mideleri, sırası ile rumen, retikulum, omasum ve abomasum olmak üzere dört kompartmandan meydana gelmiştir (1). Ruminantlarda büyük miktarlarda amonyak ruminal mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Gerek proteinlerden gerekse protein yapısında olmayan nitrojenli maddelerden oluşan amonyağın büyük bir kısmı rumenden absorbe edilerek portal kan yolu ile karaciğere taşınmakta burada üreye dönüştürülmektedir. Sentez edilen ürenin %50'si başta tükürük bezleri yolu ile olmak üzere rumene geri

gelerek burada tekrar amonyak ve karbondioksit parçalanmaktadır. Rumen ve karaciğer arasındaki bu azot dolaşımına "Rumino-hepatik azot dolaşımı" denir (1-3).

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-arginini üre ve ornitine hidrolize eden bir enzimdir (4).

Üre döngüsü her hücrede bulunmamakla beraber, arginaz enzimi genellikle birçok hücre ve dokuda (başta karaciğer olmak üzere böbrek, bağırsak, beyin, rumen, akciğer, kalp, dalak, iskelet kası, eritrosit, fibroblast,

* Doktora Tezinin bir kısmından alınmıştır.

makrofaj, tükürük bezleri v.s.) bulunmaktadır (5-10). Karaciğer hem arginaz enzimini hem de üre döngüsünün diğer enzimlerini içerdiğinden, üre sentezinin önemli bir kısmı bu organda oluşmaktadır (11, 12).

Rumen dokusunda üre döngüsü bulunmamasına (13) rağmen, arginaz enziminin varlığı saptanmış (6,14,15) olup, bunun metabolik fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada, rumen doku argininin saflaştırılmasından önceki ve sonraki optimal koşullarının ve kinetik özelliklerinin incelenme ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma materyalleri, Elazığ Elet Tesisleri'ne kesim için gelen sığırlardan temin edilmiştir. Kesimden hemen sonra alınan rumen parçaları, musluk suyu ile iyice yıkanarak rumen muhteviyatı uzaklaştırılmış ve doku en kısa zamanda, kırılmış buz içerisinde laboratuara getirilip, tekrar %0.9'luk NaCl ile temizlenmiştir.

A-Saflaştırılmadan önceki enzim kaynağının hazırlanması;

İki süzgeç kağıdı arasında, suyu alınan rumen dokusu, tam 1 g olarak tartılıp bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve pH'sı 7.4 olan 0.01M Tris-HCl tamponu içinde 1/10 oranında (w/v) sulandırılmıştır. Daha sonra 1/10 oranında sulandırılmış materyal, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15 000 rpm'de +4°C'de 15 dakika (20 000 g) santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (12,16).

B- Siğir Rumen Doku Argininin Saflaştırılması;

a-Tamponda homojenizasyon: %0.9'luk NaCl ile yıkanan rumen doku örnekleri homojenize edilmeden önce iki süzgeç kağıdı arasında kurutulmuş 50g olarak tartılıp, bir makas ile küçük parçalar haline getirildikten sonra, ağırlığının 4 katı hacime (200 ml) homojenizasyon çözeltisi [0.05 M $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.16 M KCl, 10 mM 2-Merkaptoetanol 0.01 M'luk Tris-HCl tamponu (pH: 7.5) içinde hazırlandı.] ile tamamlanıp, kırılmış buz içerisinde homojenizatörde (Sorvall Omni Mixer) iyice homojenize edilmiş, homojenat iki defa tülbentten süzülmüştür.

b-Homojenat santrifügasyonu: Homojenat 50 ml'lik polipropilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-

5B) +2°C'de 14 000 rpm'de 20 dakika (16 000g) santrifüj edilerek homojenat süpernatantı elde edilmiştir.

c-Isı muamelesi: Süpernatantın pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra 60 °C'deki su banyosunda 20 dakika bekletilmiş ve bu zaman sürecinde birkaç defa bagetle karıştırılarak ısının eşit dağılımı sağlanmıştır. Isı işleminden sonra homojenat, kırılmış buz içerisinde 5 dakika soğutulmuştur. Isıtma sonucu denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak amacı ile, homojenat 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, süzgeç kağıdı ile süzülerek ısı fraksiyonu elde edilmiştir.

d-Aseton ile muamele: Bir önceki basamaktan elde edilen süpernatanta hacmi 2.5 misli (%60) oluncaya kadar, -25 °C'de bekletilmiş asetonla damla damla ilave edilerek, bu durumda kırılmış buz içerisinde 30 dakika karıştırılmış, karışım 14 000 rpm'de -10 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış, elde edilen peletler 35 ml homojenizasyon çözeltisi içinde cam-teflon homojenizatörde homojenize edilmiştir. Daha sonra, 0.01 M Tris-HCl tamponuna karşı 1 gece dializ edilerek, 17 000 rpm'de 20 dakika (25 000g) santrifüj edilmiştir.

e-(NH₄)₂SO₄ ile doyurma: Elde edilen süpernatanta, amonyum sülfat; kırılmış buz içerisinde %55 doygunluğa erişinceye kadar, yavaş yavaş ilave edilip 30 dakika sürekli karıştırılmıştır. 10 000 rpm'de 30 dakika (8500 g) santrifüj edilerek pelet kısmı ayrılmış, süpernatanttaki doygunluğun %85'e ulaşması için gerekli amonyum sülfat tekrar ilave edilerek, aynı işlemler tekrarlanmıştır. %55 ve %85 amonyum sülfat doygunluğu sonrası elde edilen peletler birleştirilmiş ve 20 ml 0.01 M Tris-HCl tamponunda (pH: 7.5, 10mM 2-Merkaptoetanol içerir) çözdürülmüştür. Bu fraksiyon dializ torbalarına aktarılarak, 0.01 M Tris-HCl tamponuna karşı bir gece diyaliz işlemine tabii tutulmuştur. Tampon bu süre içerisinde 3 kez değiştirilmiş, dializat 11 000 rpm'de 20 dakika (10 000g) santrifüj edilmiştir.

f-Jel Filtrasyon: % 0.9 NaCl içeren 0.01M Tris-HCl tamponu ile dengelenmiş kolona (2cm x 60cm), amonyum sülfat fraksiyonu uygulanmış ve tekrar aynı tampon kolondan geçirilerek 3 ml'lik fraksiyonlar halinde eluatlar alınmıştır. Eluatların 280nm'deki absorbansı 0.005'den küçük oluncaya (A280<0.005) kadar eluat alınımına devam edilmiştir. Absorbansları yüksek olan tüplerde enzim aktivitesine bakılarak, yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (8, 17-20).

Rumen doku arginaz aktivitesinin ölçümünde Tiyosemikarbazid Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu kullanılmış (21) ve bu metot L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin, kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

Protein miktarları Lowry (22) yöntemine göre ölçülmüştür.

Ünite: $\mu\text{mol üre/mg protein/saat}$

Bulgular

Tablo 1'de görüldüğü üzere sığır rumen doku arginazı, homojenat süpernatantında 1.16, 60 °C'de

ısıtmada 2.54, aseton ekstraksiyonunda 10.13, amonyum sülfat ile çöktürme basamağında 11.16, Sefadex G-200 jel filtrasyonda ise 18.46 misli artırılmıştır. Sığır rumen doku arginazı bu saflaştırma basamakları sonunda %4.87 verimle 18.46 misli saflaştırılmıştır. Başlangıçta spesifik aktivitesi 6.47 ünite olan arginazdan, kısmi saflaştırma sonunda, spesifik aktivitesi 18.46 misli artırılarak 119.49 ünite olan kısmen saf arginaz elde edilmiştir.

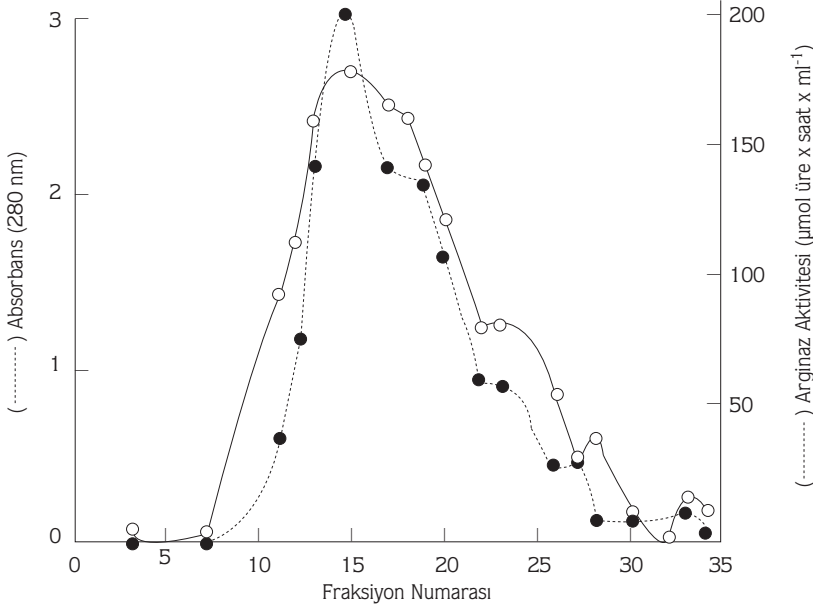
Amonyum sülfat fraksiyonundan sonra sığır rumen doku arginazının Sefadex G-200 kolonuna uygulanması ve elusyon profili Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sığır Rumen Doku Arginazının Kısmen Saflaştırılması.

Saflaştırma Basamağı	Total enzim Aktivitesi*	Total Protein (mg)	Verim %	Spesifik Aktivite**	Saflaştırma (Misli)
Homojenat	12276.8	1896	100	6.47	-
Homojenat süpernatantı	11829	1566	96.35	7.55	1.16
60 °C'de ısıtma	11774.49	714.95	95.9	16.46	2.54
Aseton ekstraksiyonu	9855.3	150.3	80.27	65.57	10.13
(NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme	7902.72	109.44	64.37	72.21	11.16
Sefadex G-200 jel filtrasyon	598.68	5.01	4.87	119.49	18.46

*Total enzim aktivitesi: $\mu\text{mol üre} \times \text{saat} \times \text{total hacim}$

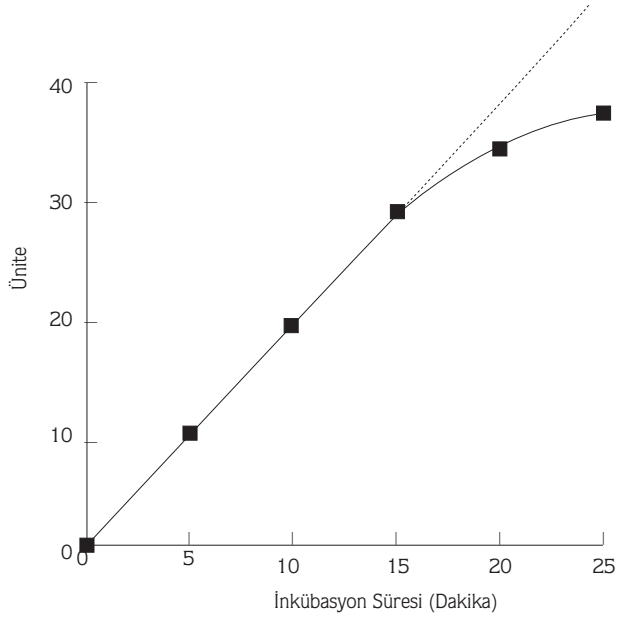
** Ünite: Total enzim aktivitesi/Total protein: Spesifik aktivite



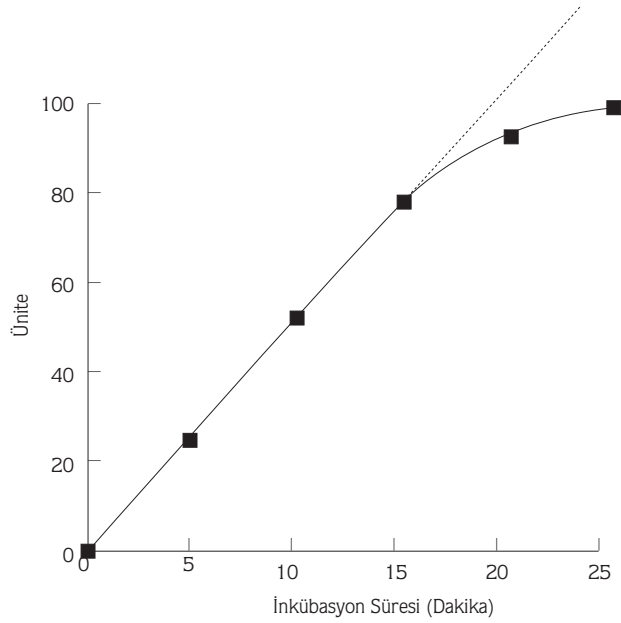
Şekil 1. Sığır Rumen Doku Arginazının Sefadex G-200 Jel Filtrasyon Elusyon Profili. Kolonun Elüsyon Hızı 12 ml/saat Olarak Düzenlenmiş ve Eluatlar 3 ml'lik Fraksiyonlar Halinde Toplanmıştır.

1-İnkübasyon Süresinin Tespiti

Enzimatik reaksiyon için gerekli olan inkübasyon süresini tespit etmek amacı ile enzim, 37 °C'de ve değişik zaman aralıklarında inkübasyona tabii tutulmuştur. Şekil 2 ve 3'de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış 15.



Şekil 2. Siğir Rumen Dokusundan Kısmen Saflaştırılan Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi.

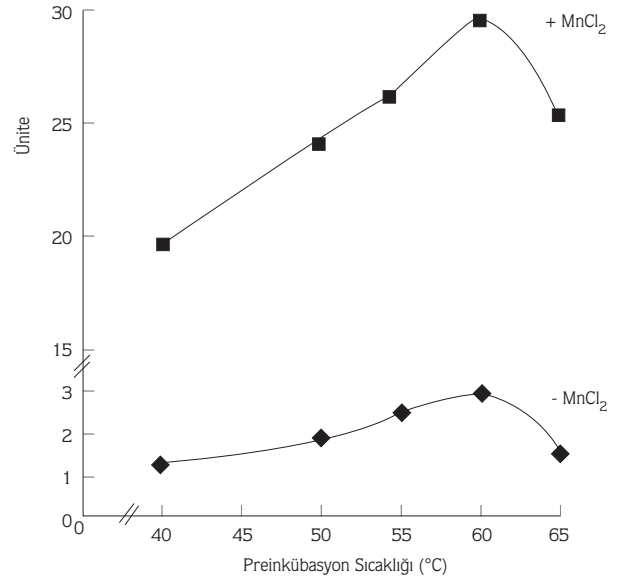


Şekil 3. Siğir Rumen Dokusundan Kısmen Saflaştırılan Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi.

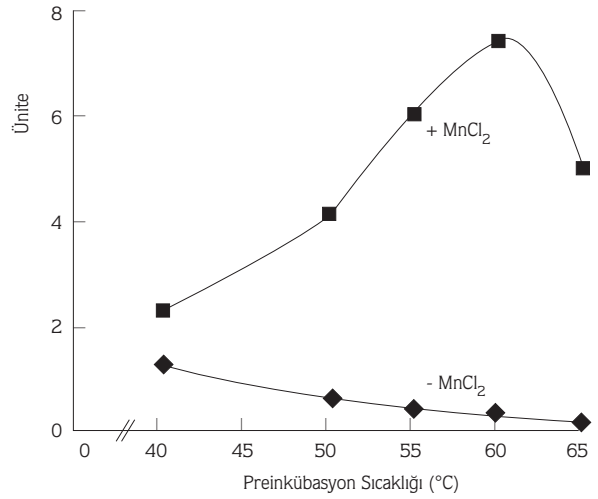
dakikaya kadar doğrusal olup, 15. dakikadan sonra doğrusallıktan sapmaktadır. İnkübasyon süresi saflaştırılmış ve saflaştırılmamış rumen doku arginazi için 13 dakika olarak tespit edilmiştir.

2-Preinkübasyon Sıcaklığının Saptanması

Preinkübasyon sıcaklığını tespit etmek ve preinkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisinin, Mn^{++} katyonlarına bağlı olup olmadığını araştırmak için; 40-65 °C'lik preinkübasyon sıcaklıklarıyla beraber Mn^{++} iyonlarının varlığında ve yokluğunda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Şekil 4 ve 5'de görüldüğü üzere enzim



Şekil 4. Saflaştırılmamış Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Sıcaklığına Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 5. Preinkübasyon Sıcaklığının Kısmen Saflaştırılmış Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

aktivitesi, $MnCl_2$ varlığında 60 °C'ye kadar artmakta, 60 °C'den itibaren düşüş göstermektedir. 60 °C'lik preinkübasyon sıcaklığı ve Mn^{++} iyonları enzimin saflaştırılmasından önce aktiviteyi yaklaşık 10 misli artırırken (Şekil 4), saflaştırıldıktan sonra 37 misli artırmıştır (Şekil 5).

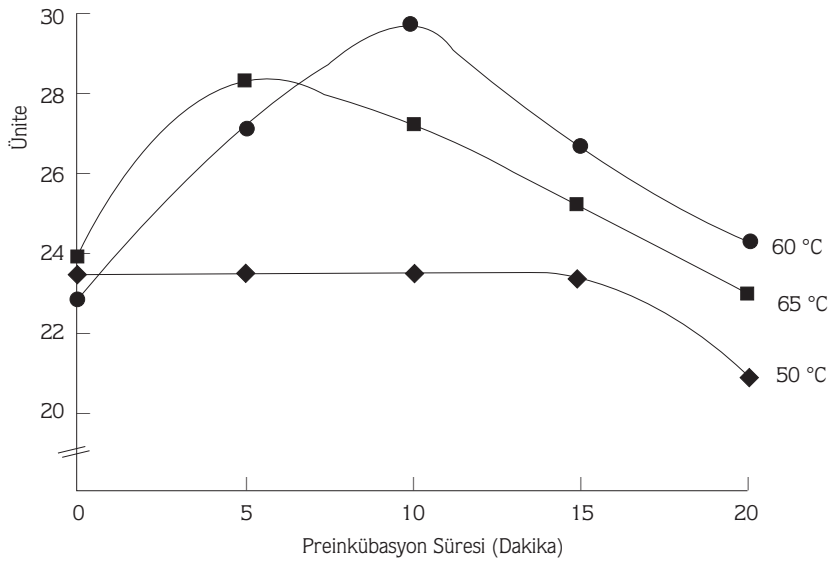
3-Preinkübasyon Süresinin Tespiti

Enzim; 50, 55, 60, 65 °C'lik preinkübasyon sıcaklıklarında ve değişik sürelerde preinkübasyona tabi tutulmuştur. En yüksek aktiviteye saflaştırılmamış enzim 60 °C'de 10 dakikada (Şekil 6), saflaştırılmış enzim ise 60°C'de 5 dakikada (Şekil 7) ulaşmaktadır. Saflaştırılmış enzimin 60 °C'de 5 dakika preinkübasyonu, enzim

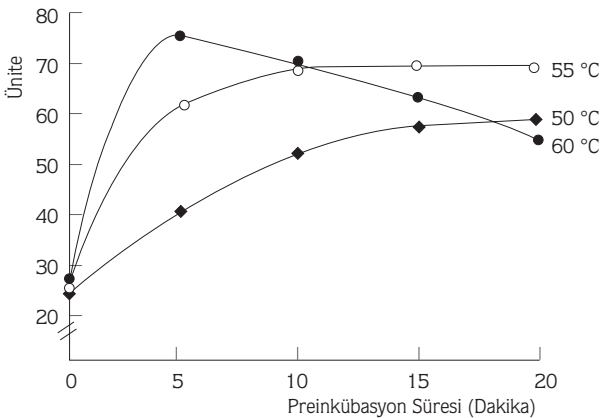
aktivitesini preinkübasyon uygulanmamışa oranla %200-225 artırırken (Şekil 7), saflaştırılmamış enzimin 60 °C'de 10 dakika preinkübasyonu, enzim aktivitesini preinkübasyon uygulanmamışa oranla %30 artırmaktadır (Şekil 6).

4-pH'nın Etkisi

Sığır rumen doku arginazının, değişik pH'larda ve çeşitli tamponlar kullanılarak aktivitesi saptanmış ve pH profili çıkarılmıştır. Şekil 8 ve 9'da görüldüğü gibi rumen doku arginaz aktivitesinin ölçümü için en uygun tampon, $NaHCO_3-Na_2CO_3$ tamponu olup, uygun pH ise, arginazın saflaştırılmasından önce 9.7 (Şekil 8), saflaştırılmasından sonra ise 10'dur (Şekil 9).



Şekil 6. Farklı Sıcaklıklarda Preinkübasyon Süresine Bağlı Olarak Saflaştırılmamış Rumen Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler.



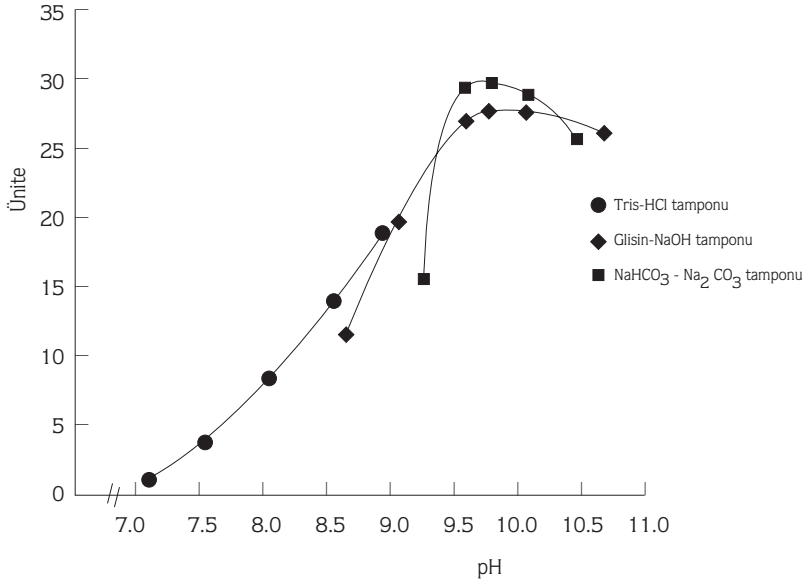
Şekil 7. Preinkübasyon Süresine Bağlı Olarak, Kısmen Saflaştırılmış Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişiklikler.

5- $MnCl_2$ 'ün etkisi

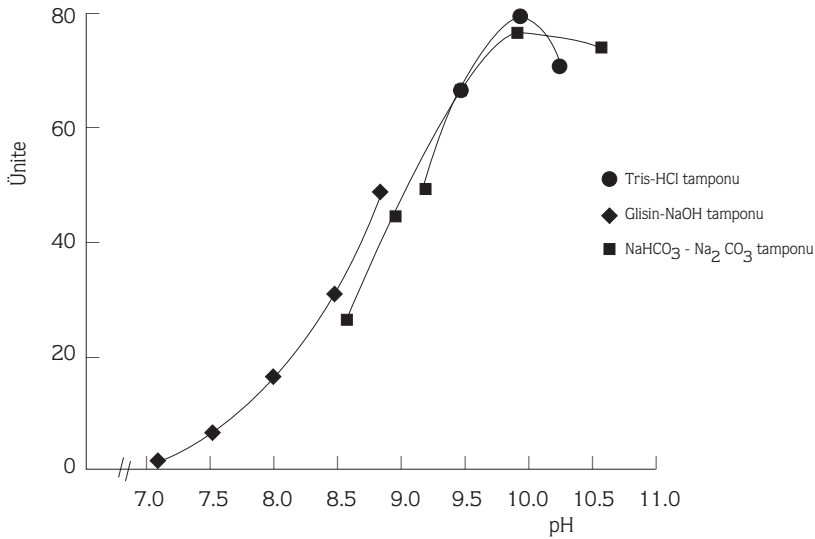
Preinkübasyon ortamına 0-5 mM konsantrasyonlarda $MnCl_2$ ilave edilmiş ve uygun $MnCl_2$ konsantrasyonu tespit edilmiştir. Şekil 10 ve 11'de görüldüğü gibi preinkübasyon ortamının Mn^{++} içermediği durumlarda enzim aktivitesi düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonlarının ilavesiyle enzim aktivitesi belirgin olarak artmaktadır. Rumen doku arginazı için optimal Mn^{++} konsantrasyonu saflaştırılmadan önce 1mM (Şekil 10), saflaştırıldıktan sonra ise 2 mM (Şekil 11) olarak saptanmıştır.

6-Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan K_m 'i

Rumen doku arginazı için optimal koşullar belirlendikten sonra arginazın substratı L-arginine karşı



Şekil 8. Saflaştırılmamış Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Göre Gösterdiği Değişiklikler.

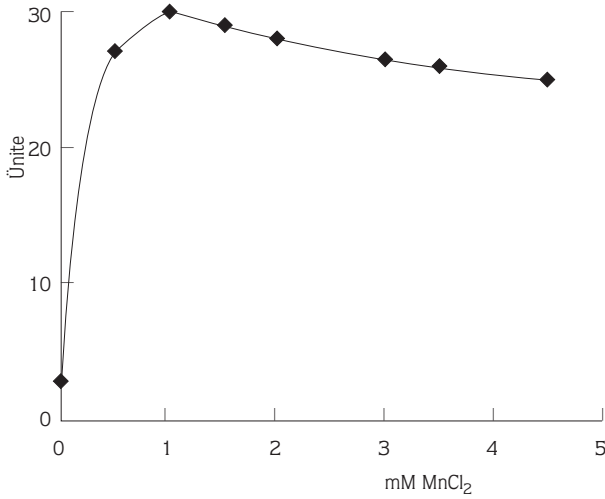


Şekil 9. Kismen Saflaştırılan Siğir Rumen Doku Arginazının Optimal pH'sının Saptanması.

olan K_m 'i Michaelis-Menten eşitliği ile incelenmiştir (Şekil 12, 13). Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu artırılarak arginaz aktivitesine bakılmıştır. Başlangıçta, reaksiyon hızında görülen lineer artış daha sonra yerini hiperbolik bir görünüme bırakmakta ve sonuçta reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymuş hale gelmektedir. Aktivitede, 2.5 mM L-arginin konsantrasyonuna kadar olan doğrusal artış, bu konsantrasyondan itibaren doğrusallığını kaybedip, hiperbolik görünüm almaktadır. Substrat konsantrasyonu

20 mM'a ulaştığı zaman, enzimin aktivitesi maksimum düzeye varmakta ve bu konsantrasyondan itibaren L-arginin miktarının artması enzimatik reaksiyonun hızını artıramamaktadır.

Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk eğrisiyle de değerlendirilmiştir (Şekil 14, 15). Bütün değerlendirmeler sonunda görülmüştür ki; saflaştırılmamış ve saflaştırılmış siğir rumen doku arginazının, substratı L-arginine karşı olan K_m 'i 4 mM civarındadır.



Şekil 10. Safleştirilmemiş Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin MnCl₂ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

Tartışma

Sığır rumen doku arginazı %4.87 verimle 18.46 misli saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 119.49 ünite olan kısmen saf arginaz elde edilmiştir (Tablo 1). Homojenizasyon basamağında; 2-merkaptöetanol ve MnCl₂ içeren 0.01 M'lık Tris-HCl tamponu ile (pH: 7.5) hazırlanmış homojenizasyon çözeltisi kullanılmıştır. 2-merkaptöetanol (23,24), MnCl₂ ve nötrale yakın pH (24) enzim aktivitesinin kaybını önler.

Rat meme arginazı soğuk asetonla muamele edildiğinde denatüre olarak aktivitesinin çoğu kaybolur,

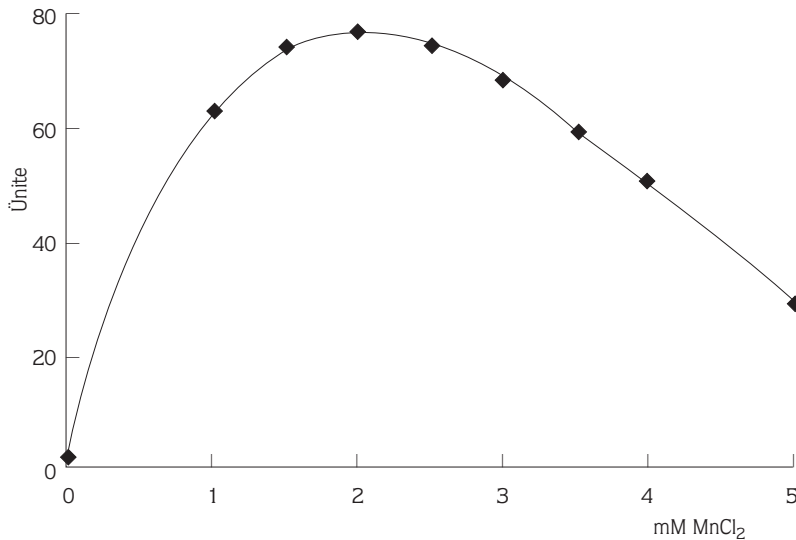
bu nedenle rat meme arginazının saflaştırılmasında bu basamaktan sakınılmıştır (24). Rat meme arginazının aksine, rumen doku arginazı rat karaciğer arginazı (25) gibi soğuk asetonla muamele ile denatüre olmaz.

Sığır rumen doku arginazının, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra bazı optimal şartları belirlenmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Arginazın aktivasyonu için iki temel faktör gereklidir. Bu faktörler; preinkübasyon ile enzimin kofaktörü olarak kabul edilen Mn⁺⁺ katyonlarıdır.

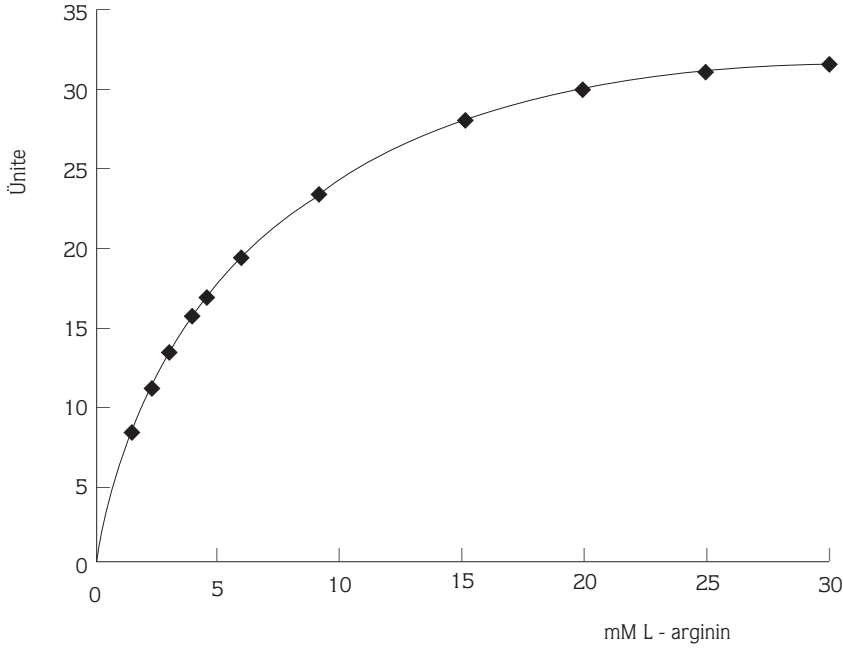
Daha önce birçok dokuda çalışılan arginazların optimal preinkübasyon sıcaklıkları 55 °C civarında bulunmuştur (24, 26, 27). Rumen doku arginazının optimal preinkübasyon sıcaklığı saflaştırılmadan önce (Şekil 4) ve saflaştırıldıktan sonra (Şekil 5) 60 °C olarak bulunmuştur. Sığır rumen doku arginazının preinkübasyon sıcaklığının (60 °C) diğer arginazlardan yüksek olması rumen doku arginazının diğer arginazlardan sıcaklığa karşı daha stabil olduğunu göstermektedir.

Preinkübasyon sıcaklığının Mn⁺⁺ katyonları ile ilgisi araştırılmış ve Mn⁺⁺ katyonlarının preinkübasyon için gerekli olduğu saptanmıştır. Şekil 4 ve Şekil 5'de görüldüğü gibi preinkübasyon ortamına MnCl₂ ilavesi ve 60 °C'lik preinkübasyon; saflaştırılmadan önce arginaz aktivitesini yaklaşık 10 misli artırırken, saflaştırıldıktan sonra aktiviteyi 37 misli artırmaktadır.

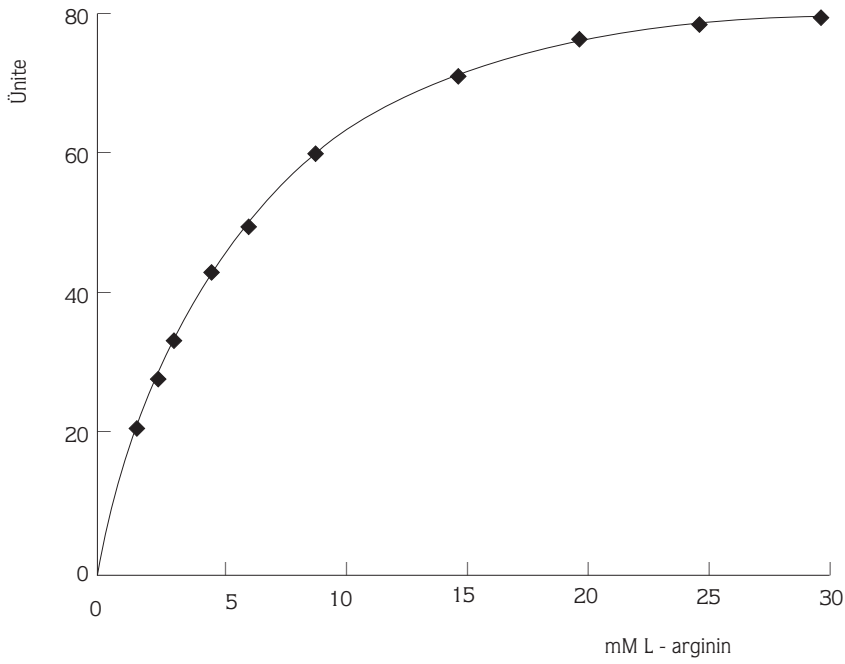
Saflaştırma safhaları esnasında, örneğin jel filtrasyon ve diyalizle metal iyonlarının bir kısmı ortamdaki uzaklaşır (8). Bu nedenle saflaştırılmış enzimin aktivitesinin, MnCl₂



Şekil 11. Kısmen Safleştirilen Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine MnCl₂'ün Değişik Konsantrasyonlarının Etkisi.



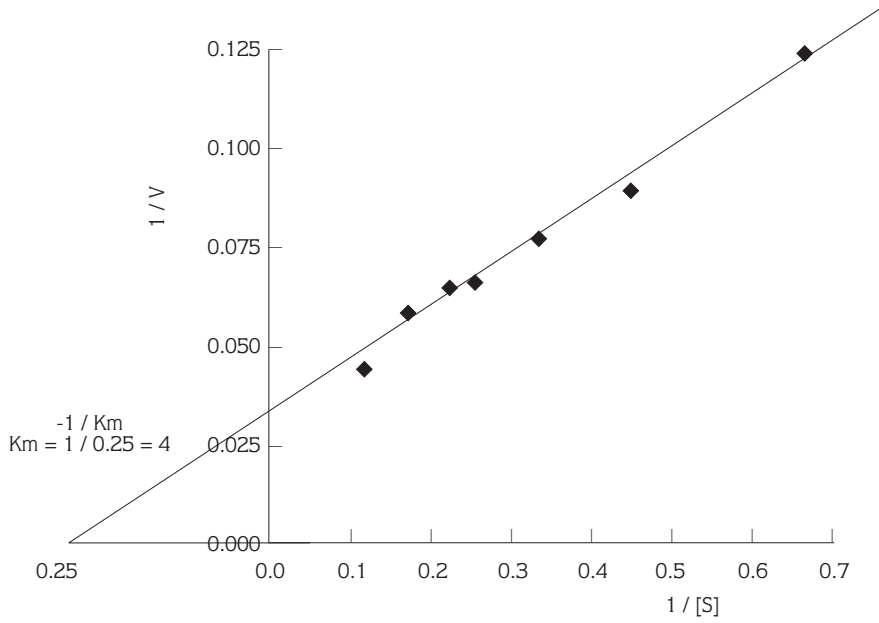
Şekil 12. Saflaştırılmamış Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Konsantrasyonu Bağlı Olarak Değişimi.



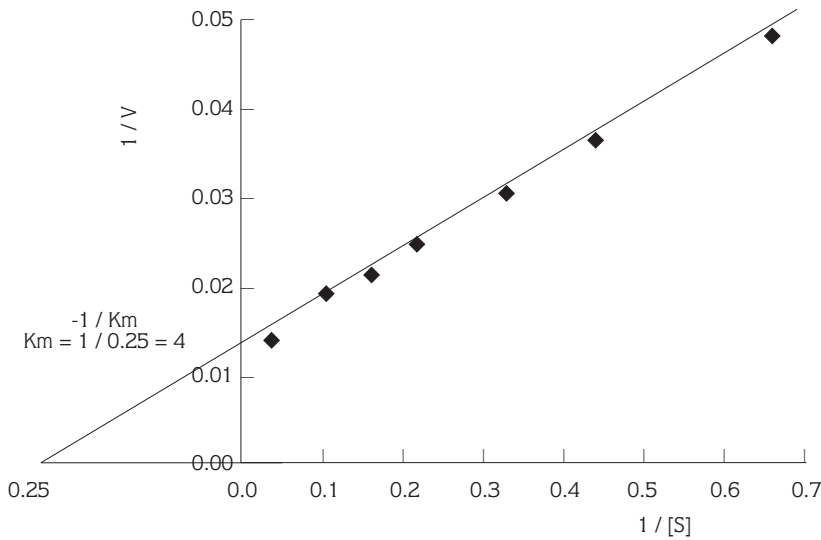
Şekil 13. Kısmen Saflaştırılmış Rumen Doku Arginaz Aktivitesinde L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimler.

yokluğunda ve preinkübasyon sıcaklığına bağlı olarak değişim grafiği (Şekil 5) yukarıda bahsettiğimiz saflaştırma basamakları esnasında ortamdan Mn^{++} iyonlarının tamamen uzaklaştırılması nedeniyle saflaştırılmamış enzimin grafiğinden (Şekil 4) tamamen

farklıdır. $MnCl_2$ yokluğunda preinkübasyon sıcaklığına bağlı olarak enzim aktivitesinin değişimine bakacak olursak saflaştırılmış enzimin aktivitesinin 40 °C'den itibaren giderek azalmakta 65 °C'de tamamen sıfır olduğunu görmekteyiz (Şekil 5). Saflaştırılmamış enzimin



Şekil 14. Saflaştırılmamış Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan Km'nin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.



Şekil 15. Kısmen Saflaştırılmış Siğir Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan Km'nin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.

aktivitesinin, $MnCl_2$ yokluğunda ve preinkübasyon sıcaklığına bağlı olarak değişim grafiği, $MnCl_2$ varlığındakine paralellik göstermektedir (Şekil 4). Bu da siğir rumen dokusunun çok düşük derişimlerde Mn^{++} katyonu ihtiva ettiğinin göstergesidir. Şekil 5 incelendiğinde bir yorum daha ortaya çıkarkı bu; Mn^{++} iyonlarının preinkübasyon ortamına ilavesi arginazı hem sıcaklığa dayanıklı hale getirmekte hemde enzimi aktive etmektedir (12,28).

Preinkübasyon ortamına ilave edilen Mn^{++} iyonlarının enzim-substrat arasında bir metal köprü kurduğu ve

Enzim-Mn-arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiği bildirilmektedir (29, 30).

Tüm bu verilerimize ve diğer literatürlere (7, 12, 26, 28, 31, 32) dayanarak diyebiliriz ki Mn^{++} iyonları preinkübasyon için gereklidir ve Mn ilavesi tüm dokulardaki arginazlar gibi rumen doku arginazını da sıcaklığa dayanıklı hale getirir ve aktive eder.

Arginazın tam aktivite gösterebilmesi, subunitlerine dissosiyeye olmaması ve quaterner yapısının şekillenmesi için her subunitinin bir mol Mn^{++} içermesi gerekir (31,

33, 34). Şekil 10'da görüldüğü üzere, rumen doku arginazı saflaştırılmadan önce en yüksek aktiviteyi 1mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda vermektedir. Saflaştırıldıktan sonra ise en yüksek aktivitenin alındığı $MnCl_2$ konsantrasyonu 2mM'dır ve 2mM'ı aşan $MnCl_2$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi belirgin olarak düşmektedir (Şekil 11). Saflaştırma işleminden sonra aktivite için ihtiyaç duyulan $MnCl_2$ konsantrasyonunun artmasının sebebi; daha önce belirttiğimiz gibi jel filtrasyon ve diyaliz aşamalarında metal iyolarının ortamdaki uzaklaşmasıdır.

Enzim saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra en yüksek aktiviteyi 60 °C'de vermekte fakat preinkübasyon süresi değişmektedir. Saflaştırılmadan önce en yüksek aktiviteyi 10 dakikada verirken (Şekil 6), saflaştırıldıktan sonra 5 dakikada vermektedir (Şekil 7). Bunun nedeni; saflaştırma esnasında protein miktarının giderek azalması ve bu nedenle preinkübasyonda uygulanan sıcaklığın, diğer proteinler tarafından maskelenmeyip, direk arginaz proteini tarafından alınması olabilir. 60 °C'de 10 dakika preinkübe edilmiş enzim, Mn^{++} ilave edilmiş fakat preinkübasyon uygulanmamış enzimden, %30 oranında daha fazla aktivite artışı göstermektedir (Şekil 6), fakat saflaştırılmış enzim (Şekil 7) 60°C'de 5 dakika preinkübe edilirse aktivitesi %200-225 artış göstermektedir. Böylece diyebiliriz ki; enzim saflaştırıldıktan sonra, saflaştırılmamışa oranla daha kısa bir preinkübasyon süresi ile daha fazla aktive olabilmektedir.

İnkübasyon süresine bağlı olarak enzim aktivitesindeki lineer artışın 15. dakikadan sonra lineerlikten sapması (Şekil 2,3) reaksiyon sonucu oluşan ornitin, enzimin inhibisyonuna (product inhibisyonu) neden olmasından kaynaklanabilir (29).

Arginazın optimal pH'sı birçok doku türünde çalışılmış ve argininin arginaz ile hidrolizi için gerekli optimal pH'nın doku türüne göre değiştiği ve bu pH'nın 9.3-11 arasındaki bazı pH sınırları içinde olduğu bildirilmektedir (5, 7, 12, 23, 28, 35-37). Şekil 8 ve 9'da da görüldüğü gibi rumen doku arginazı için de optimal pH alkali sınırlar içindedir.

Rumen doku arginazının, L-arginine karşı olan K_m 'i Michaelis-Menten (Şekil 12, 13) ve Lineweaver-Burk

(Şekil 14, 15) eğrileri ile araştırıldığında K_m 'inin 4mM civarında olduğu saptanmıştır. Enzimin, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra substratına olan ilgisi değişmemiştir.

Rumen dokusunun kinetiği ile ilgili literatür bulamadığımızdan karşılaştırma yapamamaktayız. Ancak farklı dokulardaki arginazların, saflaştırıldıktan sonra K_m 'inin değişmediğini gösteren literatür bilgileri mevcuttur. Mesela; İnsan karaciğer arginazının saflaştırılmadan önceki K_m 'i 10.14mM (12), saflaştırıldıktan sonraki K_m 'i yine 10.5mM'dır (23). İnsan eritrosit arginazının saflaştırılmadan önce L-arginine karşı olan K_m 'i 1.5mM (38), saflaştırıldıktan sonraki K_m 'i 1.6mM'dır (8).

Alınan sonuçlar; Diğer doku arginazlarında olduğu gibi rumen doku arginazının da aktivasyonu için preinkübasyon ve Mn^{++} katyonlarının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Rumen doku arginazı için gereken preinkübasyon ısısının diğer doku arginazlarından yüksek olması bu dokudaki arginaz proteininin sıcaklığa karşı daha stabil olduğunun göstergesidir.

Rumen dokusunda Krebs-Henseleit üre döngüsü bulunmayıp (13), sadece döngünün iki enzimi olan Arginaz ve Ornitin transkarbamilaz bulunduğuna göre rumende bulunan bu enzimlerin; amonyağın detoksifikasyonundan ziyade nitrojenli bileşiklerin, rumen içeriği ile rumen veni arasında resirkülasyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (14,15).

Üre sentezi olmayan rumen gibi karaciğer dışındaki birçok dokuda ve üreotelik olmayan bazı canlılarda aktif arginaz enziminin bulunması, arginaz enziminin amonyağın detoksifikasyonu işlemi dışında da bazı görevleri (Argininin arginaz ile hidrolizinden oluşan ornitin; poliamin, prolin ve glutamat biyosentezi için bir prekürsördür) olabileceği düşüncesini gündemde tutmaktadır (6, 9, 24, 39-42).

Ruminantların ön midelerinde hiçbir sindirim fermenti salgılanmadığı halde sindirim olaylarının en önemli bölümü ön midelerde cereyan etmektedir. Bu nedenle yukarıda belirttiğimiz fonksiyonlar, fizyolojik olarak çok aktif rumen dokusu için gerekli olup diğer extrahepatik dokular gibi rumen doku arginazının önemide glutamat, prolin ve poliaminlerin biyosentezi için gerekli öncül molekül olan ornitini üretmek olabilir.

Kaynaklar

1. Breazile J. E. The Ruminant Stomach. 385-394. In: "Textbook of Veterinary Physiology". Lea-Febiger, Philadelphia, USA, 1971.
2. Church D.C. and Fontenot J.P. Nitrogen Metabolism and Requirements. 25-55. Ed. D.C. Church. In: "Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants". 2 nd ed., Vol. 2. Nutrition, Corvallis, Oregon 97330, USA, 1971.
3. Özgen H. Sindirim ve Emilme. 117-129. "Hayvan Besleme". Üçüncü baskı, Yükseköğretim Kurulu Matbaası, Ankara, 1986.
4. Webster P.D. and Zieve E. Arginase. J. Med. 1962, 267, 604-607.
5. Nikumb S.K., Santhanam K., Rama K. and Rao M.V. Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamylase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. Ann. Nut. Metab. 1987, 31, 387-394.
6. Aminlari M. and Vaseghi T. Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. Comp. Biochem. Physiol. 1992, Vol. 103 B, N. 2, pp. 385-389.
7. Chen P.C. and Broome J.D. Mouse Macrophage Arginase. Analyt. Biochem. 1980, 163, 354-359.
8. Ikemoto M., Tabata M., Murachi T. and Totani M. Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. Ann Clin Biochem. 1989, 26; 547-553.
9. Konarska L. and Tomaszewski L. Studies on L-arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, Biochem. Med. and Met. Biol. 1986, 35, 156-169.
10. Ruegg U.T. and Russell A.S. A Rapid and Sensitive Assay for Arginase. Analyt. Biochem. 1980, 102, 206-212.
11. Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. Amino Acid Oxidation and the Production of Urea. 506-538. In: "Principles of Biochemistry". 2 nd ed., Worth Publishers, New York, 1993.
12. Spector E.B., Rice S.C.H., Moedjono S., Bernard B. and Cederbaum S.D. Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. Biochem. Med. 1982, 28, 165-175.
13. Martincic T. and Kravica S. Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Rumenal Mucosa of Cattle. Vet. Arch. Zagreb, 1964, svezak 3-4, pp. 90-93.
14. Harmeyer J., Kurelec B. und Hill H. Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 2. Mitteilung: Ornithin-Transcarbamylase funktion. Zbl. Vet. Med. 1968, Reihe A, Bd. 15, Heft 6, 510-516.
15. Kurelec B., Harmeyer J. und Hill H. Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 1. Mitteilung: Arginase-und Urease funktion. Zbl. Vet. Med. 1968, reihe A, Bd. 15, Heft 5, 460-469.
16. Colombo J. and Konarska L. Arginase. 285-294. Ed. Bergmeyer H.U. In: "Methods of Enzymatic Analysis". 3rd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 1984.
17. Brusdeilins M., Kühner R. and Schumacher K. Purification, Affinity to Anti-Human Arginase Immunoglobulin-Sepharose 4B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. Biochim. Et Biophys. 1985, Acta 840, 79-90.
18. Ozan, S., Gürsu M.F. ve Gülen Ş. Kismen Arıtılmış Moniezia expansa Arginazının Bazı Özellikleri. Doğa-Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 1993, 17, 245-250.
19. Reyer C. and Dorner F. Purification of Arginases from Human-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of Their Physicochemical and Kinetic Properties. Eur. J. Biochem. 1975, 56, 137-147.
20. Skrzypek-Osiecka I., Robin Y. and Poremska Z. Purification of Rat Kidney Arginases A1 and A4 and Their Subcellular Distribution, 1983, Vol. 30, No. 1, Acta Biochim. Polon., 83-92.
21. Geyer J.W. and Dabich D. Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. Analy. Biochem. 1971, 39, 412-417.
22. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
23. Berüter J., Colombo J.P. and Bachmann C. Purification and Properties of Arginase from Human Liver and Erythrocytes. Biochem. J. 1978, 175, 449-454.
24. Jenkinson C.P. and Grigor M.R. Rat Mammary Arginase: Isolation and Characterization. Biochem. Med. and Met. Biol. 1994, 51, 156-165.
25. Schimke R.T. Arginase (rat liver). Methods Enzymol A. 1970, 17: 313-317.
26. Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 1993.
27. Schimke R.T. Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. J. Biol. Chem. 1982; Vol. 237, No. 2, 459-468.
28. Kuhn N.J., Talbot J. and Ward S. pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentrations. Archs. Biochem. and Biophys. 1991, Vol. 286, No. 1, pp. 217-221.
29. Gürsu M.F. Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 1993.
30. İlhan N. İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 1992.
31. Muszynska G. and Wojtczak M. Influence of Immobilization on Conformation of rat liver Arginase. Int. J. Biochem. 1979, Vol. 10, pp. 665-668.
32. Van Elsen A.F. and Leroy J.G. Arginase Isoenzymes in Human Diploid Fibroblasts. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975; Vol. 62, No. 2, 191-198.

33. Hirsch-Kolb H., Kolb H.J. and Greenberg D.M. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Manganese Binding of Rat Liver Arginase. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 395-401.
34. Powers G.S. and Meister T. Urea Synthesis and ammonia Metabolism. 251-263. Edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz. In: "The liver: Biology and Pathobiology". Raven Press, New York. 1982.
35. Colombo J. and Konarska L. Arginase. 285-294. Ed. Bergmeyer H.U. In: "Methods of Enzymatic Analysis". 3rd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 1984.
36. Konarska L., Tomaszewski L., Colombo J.P. and Terheggen H.G. Human Salivary Arginase ad Its Deficiency in Argininaemia. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985, Vol. 23, pp. 337-342.
37. Schimke R.T. Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* 1982, Vol. 237, No. 2, 459-468.
38. Sondaç Ü. Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 1991.
39. Carvajal N. and Cederbaum S.D. Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Prolin and Branched-Chain Amino Acids. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1986, 870, 181-184.
40. Konarska L., Tomaszewski L. and Rolczyk U. Studies on L-arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochem. Med. and Met. Biol.* 1984, 35, 170-178.
41. Remesar X., Arola Ll., Palou A. and Alemany M. Activities of Amino Acid Metabolising Enzymes in the Stomach and Small Intestine of Developing Rats. *Reprod. Nutr. Develop.* 1985, 25 (5), 861-866.
42. Yip M.C. and Knox W.E. Function of Arginase in Lactating Mammary Gland. *Biochem. J.* 1972, 127, 893.