

# Glukoz oksidaz enzim agregatları kullanılarak $\beta$ -D-glukozun parçalanma kinetiğinin modellenmesi

[Modelling of the  $\beta$ -D-glucose destruction kinetics by using glucose oxidase enzyme aggregates]

Oğuz Akpolat,  
Fatma Ayhan,  
Hakan Ayhan

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Kimya  
Bölümü, Biyokimya&Biyomalzemeler Araştırma  
Laboratuvarı, Muğla, Türkiye.

Yazışma Adresi  
[Correspondence Address]

Prof. Dr. Hakan Ayhan

Biochemist&Bioengineer  
Biochemistry&Biomaterials Research Laboratory  
Post Box 48; 48000, Muğla, Turkey.  
E-mail. hayhan48@gmail.com;

Kayıt Tarihi: 22 Eylül 2011; Kabul Tarihi: 15 Mart 2013  
[Registered: 22 September 2011; Accepted: 15 March 2013]

## ÖZET

**Amaç:** Bu araştırmanın amacı glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile hazırlanan agregat sistemlerinin glukozu indirgemesi sırasında oluşan tepkimenin kinetik değişimlerinin zamana bağlı olarak ölçülen derişim değerlerini benzeştiren matematiksel model ile hesaplanması ve saptanan kinetik değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılmasıdır.

**Gereçler ve Yöntemler:** Araştırmanın ilk kısmında enzim uygun bir çöktürücü varlığında bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilerek agregat oluşumu sağlanmış ve GOD agregatlarının aktiviteleri  $\beta$ -D-glukozu glukonik asit'e ve  $H_2O_2$ 'ye oksitleyen enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Benzeşim için önerilen matematik model tek substrat-enzim katalizli tepkimeler için Michaelis ve Menten tarafından geliştirilmiş olan kinetik model çerçevesinde hızlı denge yaklaşımı varsayımını esas alır ve substrat derişimi, tepkime hızına bağlı olarak ifade edilen bir başlangıç değer problemidir.

**Bulgular:** Benzeştirme eğrilerinden hesaplanan sonuçların deneysel ölçüm değerlerine yaklaştırılması ise matematiksel modelin içerdiği kinetik sabitlerin optimizasyonuna dayanmakta olup, çözümleme için Euler sayısal yöntemi uygulanmıştır ve optimizasyon için seçilen kinetik parametre değerleri ile çizilen simulasyon eğrilerinde substrat etkili Michaelis-Menten kinetik reaksiyon modeli ile yapılan optimizasyonlarda daha yüksek uyumluluk gösteren çok daha etkin sonuçlar alınmıştır. Yüksek glukoz derişimlerinin optimum değerleri veren kinetik parametre bölgesinin dışında kaldığı belirlenmiştir.

**Sonuçlar:** GOD agregatlarının kinetik sabitlerinin hesaplamasında başlangıç substrat derişimi etkili Michaelis-Menten modelinin çözülmesi ile elde edilen değerlerin uyumunun Michaelis-Menten modeline göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** glukoz oksidaz, enzim agregatları, enzim kinetiği, matematiksel modelleme, benzeşim

**Çıkar Çatışması:** Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## ABSTRACT

**Aim:** The object of the study is calculation of the kinetic constants for the reduction reaction of glucose by glucose oxidase (GOD) aggregate systems by the mathematical model simulated the concentrations of the reactants or products and comparison of the calculated kinetic values with the experimental data.

**Methods:** In the first part of the study, aggregate formation was made by the treatment with a bi-functional cross-linker in the presence of an appropriate precipitator and the activity of GOD enzyme aggregates was estimated by enzyme amount which oxidase  $\beta$ -D-glucose to gluconic acid and  $H_2O_2$ . The mathematical model suggested for simulation depends on the rapid equilibrium approach of the kinetic model proposed by Michaelis and Menten for single substrate-enzyme catalyzed reactions and the substrate concentration is an initial value problem defined in terms of the reaction rate.

**Results:** The convergence of calculated results from simulated curves to experimentally measured values based on the optimization of kinetic constants present in the mathematical model and Euler numerical method was applied in the solution of the problem. More effective results with higher correlations were obtained for the optimizations achieved by the Substrate affective Michaelis and Menten model when the simulation curves drawn for the selected kinetic parameter values. It was determined that high glucose concentrations are out of the optimum kinetic parameters range.

**Conclusions:** In the calculation of kinetic constants of GOD aggregates, the consistency of the values obtained from the analysis of initial substrate concentration effective Michaelis-Menten model was higher than the Michaelis-Menten model.

**Key Words:** glucose oxidase, enzyme aggregates, enzyme kinetics, mathematical model, simulation

**Conflict of Interest:** Authors have no conflict of interest.

## Giriş

Enzim immobilizasyonunda temel amaç, enzimi sulu tepkime ortamında çözünmez duruma getirerek, taşıyıcıya bağlanmış enzimin zorlu ortam koşullarında dayanıklılığını arttırmak ve enzimin tepkime ortamından ayrılmasını kolaylaştırmaktır. Taşıyıcılı enzim sistemleri ile pek çok başarılı çalışma yapılmasına karşın, taşıyıcıdan kaynaklanan katalitik olmayan kütle nedeniyle, serbest enzime göre yaklaşık % 50 aktivite kaybı söz konusudur. Ayrıca uygun taşıyıcı seçimi vakit alan zahmetli denemeler gerektirmektedir. Bu dezavantajların giderilebilmesi için yeni yaklaşım, taşıyıcısız immobilize enzim sistemleridir. Çözünmüş enzimlerin uygun çapraz bağlayıcı madde kullanılarak enzim moleküllerini kendi üzerine bağlama yöntemleri bu sistemlerin temelini oluşturur. Bu çalışmada kullanılan glukoz oksidaz (EC 1.1.3.4) enzimi, hem diyabet hastalarının kan şekerinin klinik analizinde kullanılan hem de kontrollü ilaç salımı uygulamaları çerçevesinde tedavi amaçlı kullanımı için de çalışmaların sürdürüldüğü bir enzimdir [1-3]. Taşıyıcıdan kaynaklanan sorunların giderilmesi için de çalışmalar halen devam etmektedir. Ayrıca taşıyıcısız agregat formdaki enzimin benzer bir şekilde diyabet hastalarının yaşam kalitesinin artırılmasına yönelik bir başka araştırmada ise seçilen glukoz oksidaz enzim modelinin farklı klinik enzimlere de uygulanabileceği belirtilmektedir [4-8].

Enzim kinetiği çalışmalarına bakıldığında ise, enzimlerin kinetik davranışlarının anlaşılabilmesi için önerilen matematiksel modellerin ilki, Michaelis ve Menten tarafından tek substrat-enzim katalizli tepkimeler için geliştirilmiş olup, bu çalışmada da bu model esas alınmıştır. Ancak bu modelin doğrusallaştırılmasıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile saptanan kinetik parametreler tüm oluşum sürecine ilişkin kinetiği tam olarak gösteremeyebilir. Bu durumda kinetik parametrelerin tüm bu süreç için optimizasyonunu da içeren, zamana bağlı olarak tepkime süresince ölçülen derişimlerin benzeşim eğrileri çizilir. Simulasyon için önerilen matematik model substrat derişiminin tepkime hızına bağlı olarak ifade edildiği bir başlangıç değer problemi olup, çözümleme için uygun bir sayısal yöntem seçilir. Kinetik parametrelerin optimizasyonunda sayısal çözümleme için gerekli olan başlangıç koşulları olarak da Lineweaver-Burk grafiği ile saptanan kinetik değerler alınır. Optimizasyon fonksiyonu da gerçek zamanlı ölçülmüş olan derişim değerleri ile simulasyon sonuçları arasındaki farkın toplamını minimize edecek şekilde yazılır [9-13]. Hazırlanan çalışmanın kapsamı da, glukoz oksidaz enziminin glukozun indirgemesi sırasında oluşan tepkimenin kinetiğini incelemek ve tepkimeye ilişkin reaksiyon hız sabitlerini yani kinetik parametrelerini optimize etmektir. Bunun için önce enzimin çözünmez agregatlarını oluşturmak için çözünmüş durumdaki enzim uygun bir protein varlığında hazırlanmıştır, ardından da enzim bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilmiş ve agregat oluşumu sağlanmıştır. Bekletme zamanına

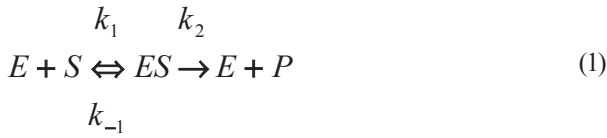
bağlı olarak tekrarlanan aktivite denemeleri ile hazırlanan Glukoz oksidaz enzim sistemlerinin  $\beta$ -D-glukozu glukonik asite ve  $H_2O_2$ 'ye oksitleyen enzim miktarı olarak aktiviteleri ölçülmüş ve kararlılıkları saptanmıştır [11]. Son olarak da, enzimin indirgenmesi sırasında oluşan tepkimenin kinetiğini incelenmiş ve tepkimeye ilişkin reaksiyon hız sabitleri yani kinetik parametreler optimize edilmiştir. Bunun için MATLAB yazılımı kullanılarak hazırlanan program algoritmasının adımları ve sonuçları, ayrıntılı olarak verilmiş ve kinetik parametrelerin optimizasyonuna ilişkin olarak hesaplanan derişim-zaman simulasyon eğrileri çizilmiş ve simulasyon sonuçları irdelenmiştir [13,17].

## Gereç ve Yöntem

Çapraz bağlı GOD (Sigma, EC 1.1.3.4, 50 kU/g solid, Tip X, *Aspergillus niger*'dan) agregatlarının hazırlanması işleminde önce 0.05 mg/ml başlangıç derişimine sahip stok glukoz oksidaz enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 80  $\mu$ l alınmış ve çözeltiye 5 mg bovin serum albumin (BSA, Sigma, 96%, MW: 66 kDa) eklenerek 100 vuru/dak çalkalama hızında proteinin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ortam 0,1 M NaOH (Sigma) ile pH 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra ortama oranı % 2 (v/v) olacak şekilde glutaraldehit (Sigma) eklenmiştir. Çözeltinin son hacmi distile su ile hazırlanmış tampon çözelti kullanılarak 1 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltiler ilk 15 dakika karıştırılarak toplam 2 saat 25°C'de bırakılmıştır. Bu işlemin ardından çözeltiler bir gece boyunca 4°C'de bırakılmıştır. Bu süre sonunda çözeltiler yine 4°C'de 7000 devir/dakika hızda 15 dakika boyunca santrifüjlenerek oluşan agregatların çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant alındıktan sonra ortamdaki fazla glutaraldehitin ve/veya proteinin uzaklaştırılması için enzim agregatları 4 defa destile su ile yıkayıp santrifüjlenerek üst faz ayrılmıştır.

Çalışmada serbest glukoz oksidaz enzimi ve agregatlarının aktivitelerinin saptanmasında kullanılan yöntemde önce 50 ml pH 7 fosfat tamponunda ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Almanya) 3 mg peroksidaz (Tip IV, EC. 1.11.1.7, Sigma Chem. Co., USA) ve 6.6 mg o-dianizidin (Sigma bülten) çözülmüştür. Bu karışımdan alınan 2.5 ml hacminde örnek 10 dakika süreyle 25°C'de inkübe edilmiştir. Uygun derişimde  $\beta$ -D-glukoz (Merck) çözeltisi ile glukoz oksidaz enzimi etkileştirilmiştir. Bu etkileştirilen çözeltiden 100  $\mu$ l alınıp, 10 dakika inkübe edilen 2.5 ml'lik çözeltiye eklenmiştir. Oluşan renk, 10 dakika sonra %30'luk sülfirik asit çözeltisinden 1.5 ml ilave edilmesiyle kararlı hale getirilmiş ve bu çözeltinin 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü yapılmıştır. GOD enzim agregatları için de aynı işlem yapılmıştır ve yukarıda verilen agregat hazırlama yöntemi sonrası elde edilen agregatlar glukoz çözeltisine daldırılarak etkileştirilmiş ve tayin sıralaması takip edilmiştir. Aktivite deneyleri sırasında gerçekleşen tepkimeler aşağıda verilmiştir.

D-glukoz + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O – GOD→ D-glukonik asit + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + o-dianizidin –POD→ o-dianizidin + H<sub>2</sub>O  
Glukoz oksidaz enziminin 1 aktivite birimi, pH 7 ve 25°C’de 1 dakika süre içinde 1µmol β-D-glukozu, D-glukonik asit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’e oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [11]. Gerçek zamanlı derişim eğrilerinin simülasyonu için önerilen matematik model öncelikle kinetik parametrelerin optimizasyonunu gerçekleştirir. Bu durumda simülasyon modelinin kinetik parametrelerin ifade edildiği kinetik modeli de içermesi söz konusudur. Bu çalışma esasında Michaelis ve Menten kinetik modeline dayanmaktadır ve bu model, kısaca bir enzimin substrata bağlanarak enzim-substrat yapısı oluşturarak tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürmesini esas alır (4). Ancak bu denge sabitini etkilemez ve bu tepkimenin aynı sıcaklıkta daha düşük aktivasyon enerjisinde daha hızlı gerçekleşmesini sağlar.



Hızlı denge yaklaşımı varsayımını esas alan Michaelis ve Menten modelinde enzim ve substrat arasında çok hızlı bir denge olduğu kabul edilir ve ayrışma sabiti K<sub>m</sub>’i aşağıdaki gibi gösterilir,

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2)$$

ve tepkime hızı da

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{V_m[S]}{K'_m + [S]} \quad (3)$$

olarak yazılır.

Burada K<sub>m</sub>’i Michaelis-Menten sabiti olarak da adlandırılır, ulaşılabilecek en yüksek tepkime hızı V<sub>m</sub>’i substrat ve ürün konsantrasyonları ise [S] ve [P] dir.

## Bulgular

Enzimatik tepkimelerde kinetik parametrelerin bulunmasında tepkime hız ifadesinin doğrusallaştırılması, işlemi basitleştirilerek en yüksek tepkime hızı ve doyunluk sabitinin bulunmasını kolaylaştırır. Çizilen Lineweaver-Burk (L-B) grafiğinden hesaplanacak olan kinetik sabitler optimizasyon işleminde başlangıç değeri olarak alınmıştır. Çalışmanın deneysel kısmında ise farklı başlangıç derişimleri ile gerçekleştirilen glukoz indirgenmesinde kalan glukoz miktarları ölçülmüş ve ölçülen bu değerlere dayanarak, kinetik parametrelerin de optimize edildiği simülasyona ilişkin matematik modellemenin çözümü için hazırlanan algoritma MATLAB programlama dilinde yazılmış ve çalışmanın sonunda

Ek olarak verilmiştir. Kinetik parametrelerin optimize edildiği simülasyonu ilişkin matematik modellemenin çözümü için hazırlanan bu algoritmaya ilişkin bilgisayar programının çıktıları aşağıdaki üç sonucu kapsamaktadır;

1. Kinetik modellemesi yapılarak simüle edilecek olan dönüşen glukoz derişimlerinin deneysel ölçüm değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Bu ölçümlere ilişkin çizilen grafikler de Şekil 1 ve 2’de sunulmuştur.

2. Başlangıç glukoz derişimine bağlı olarak doğrusallaştırılmış kinetik modelden hesaplanan maksimum hız (V<sub>m</sub>) ve Michaelis-Menten sabiti (K<sub>m</sub>) değerleri, bunlar arasındaki doğrusal ilişkiyi veren istatistiksel model katsayıları ve bu modellerden hesaplanan uyum değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Bu modellere ilişkin çizilen grafik Şekil 3a ve 3b’de farklı başlangıç glukoz derişimleri için modelden hesaplanan (V<sub>m</sub>) ve (K<sub>m</sub>) değerleri gösterilmektedir. Bu değerler daha sonra belirli katsayılarla çarpılarak optimize edilecektir.

3. Son olarak da hesaplanan kinetik parametreler daha ayrıntılı olarak optimize edilerek ve bu değerler kullanılarak da simülasyon eğrileri çizilmiştir. Bu işlem sırasında kinetik parametreleri de içeren optimizasyon fonksiyonu J’de Başlangıç Substrat Derişimi Etkili (BSDE) Michaelis-Menten kinetik reaksiyon modeli denenmiştir.

ve bu model,

$$\mu = \mu_{max} * [(S - S') / (K + (S - S'))] \quad (4)$$

şeklinde olup,

S’=S0\*Ψ etkin olmayan minimum substrat derişimini tanımlamaktadır. Ψ=0 olduğunda bu model basit Michaelis-Menten Kinetik reaksiyon modeline dönüşmekte ve bu durumda L-B grafiği çizilmekte olup, genel olarak μ<sub>max</sub>’=μ<sub>max</sub>\*σ ve K<sub>m</sub>’=K<sub>m</sub>\*ρ denkliklerinde σ ve ρ maksimum hız ve kinetik sabit için optimizasyon oranlarını göstermekte olup, bu durumda etkin olmayan minimum substrat derişimi başlangıçtaki derişiminin belirli bir katı olarak (Ψ) hesaplanmaktadır.

Seçilen 0£Ψ£1, 0.5£σ£1.5 ve 0.5£ρ£1.5 aralıklarında çizilen simülasyon eğrileri ile hesaplanan J fonksiyonu derişim zaman eğrisi uyumunu minimize eden optimizasyon fonksiyonu olup;

$$J = R = f(\Psi, \sigma, \rho) \rightarrow \min \quad (5)$$

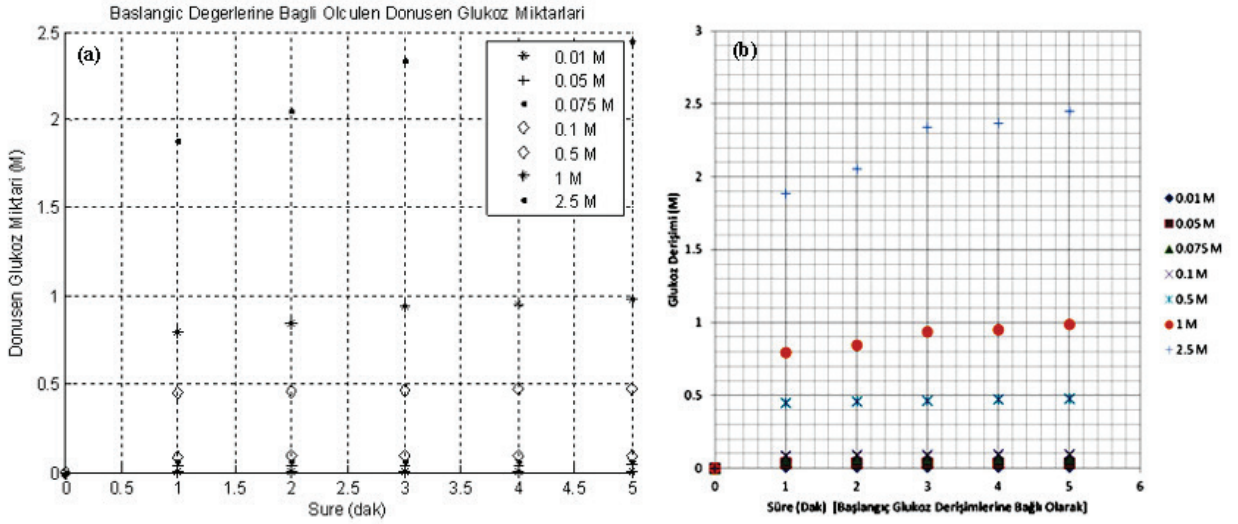
şeklinde olup ve burada optimize edilecek parametreler Ψ ile S’, σ ile μ<sub>max</sub> ve ρ ile K<sub>m</sub>’dir.

Basit bir tarama yöntemiyle yukarıda tanımlanan optimizasyon parametrelerine göre hesaplanan optimizasyon fonksiyon değerleri Tablo 3’de sunulmuştur.

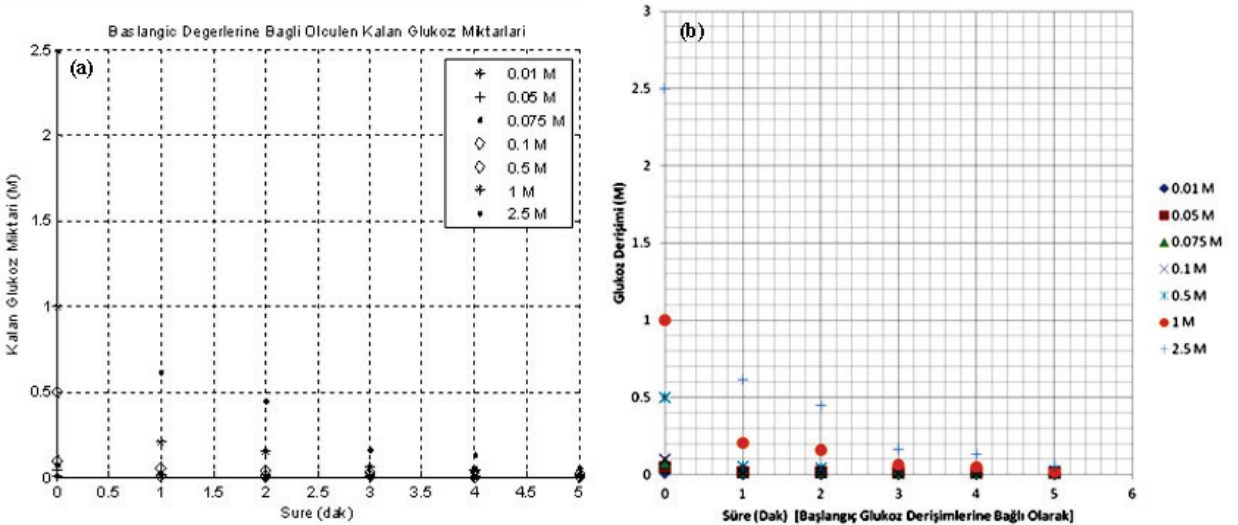
Bu tabloda verilen farklı parametrelere göre hesaplanan zamana bağlı glukoz derişim değerlerini gösteren simülasyon eğrileri Tablo 3’den de anlaşılacağı gibi Şekil 4, 5, 6, 7 ve 8’de çizilmiştir. Buradaki J optimizasyon fonksiyonunun kinetik parametreleri de içeren bir başlangıç

**Tablo 1.** Dönüşen glukoz derişimlerinin deneysel ölçüm değerleri.

Süre (Dak)	Dönüşen glukoz derişimleri (M)						
0	0.01	0.05	0.075	0.1	0.5	1	2.5
1	0.0061	0.0338	0.0592	0.0873	0.4467	0.7934	1.8853
2	0.0063	0.0348	0.0611	0.0899	0.4571	0.8421	2.0527
3	0.0064	0.0355	0.0626	0.0916	0.4637	0.9374	2.3375
4	0.0065	0.0361	0.0637	0.0932	0.4704	0.9505	2.3679
5	0.0067	0.0367	0.065	0.0946	0.4741	0.9842	2.4465



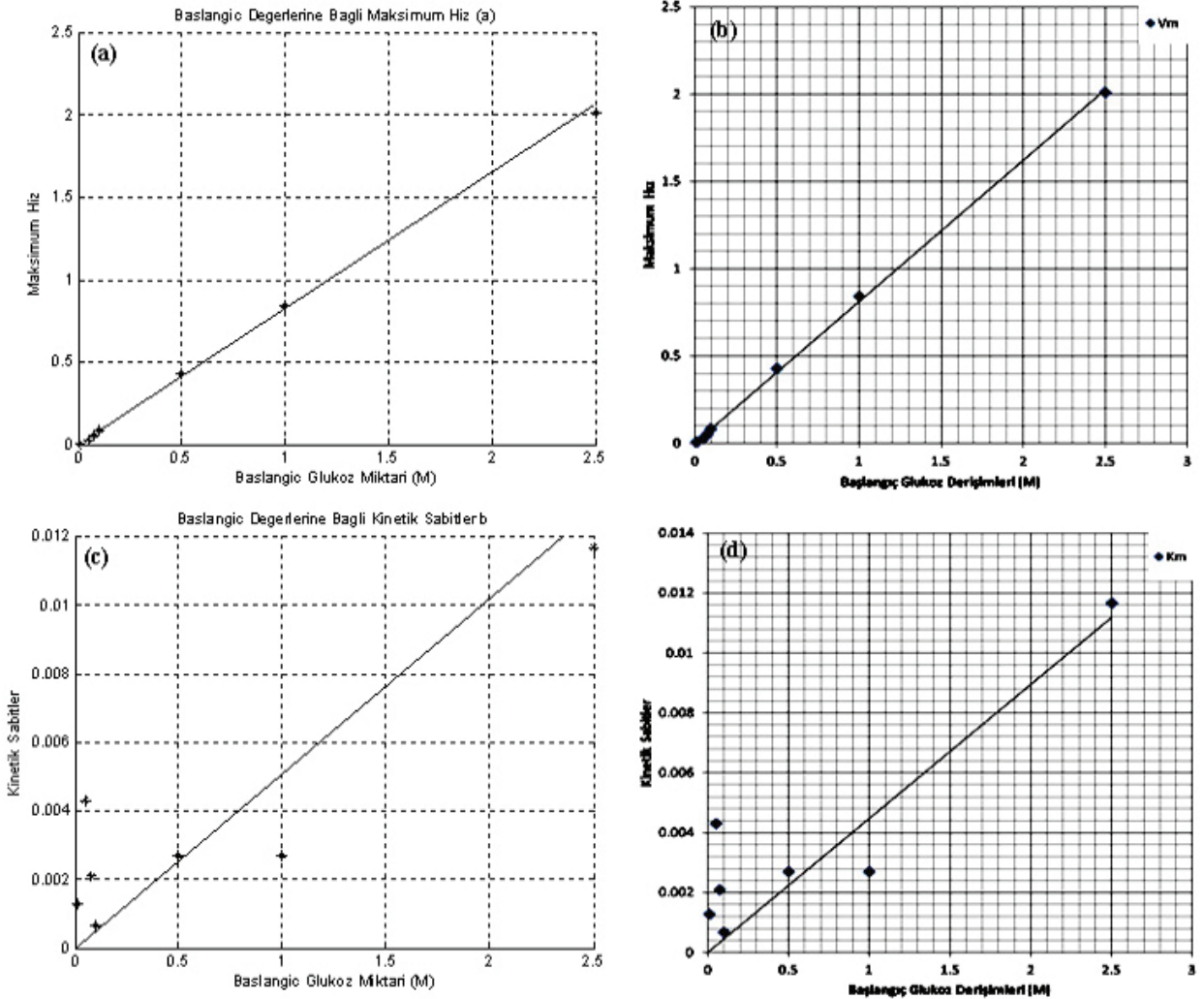
**Şekil 1.** Dönüşen glukoz derişimleri. (a) MATLAB; (b) EXCEL formu.



**Şekil 2.** Reaksiyon sonrası Kalan Glukoz derişimleri. (a) MATLAB; (b) EXCEL formu.

**Tablo 2.** Farklı başlangıç glukoz derişim değerlerine bağlı olarak glukoz derişimlerinin zamana bağlı simulasyonunun modellenmesindeki optimizasyon döngüsünün başlangıç değerleri için kinetik modelden hesaplanan maksimum hız ( $V_m$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ile farklı başlangıç glukoz derişim değerleri arasındaki doğrusal ilişkiyi veren istatistiksel model katsayıları ve uyum değerleri. (Bu değerler yalnızca optimizasyon döngüsünde başlangıç değerleri olarak kullanılacak olup, işlemin sonunda istenen yakınsama sağlanmış olacaktır.)

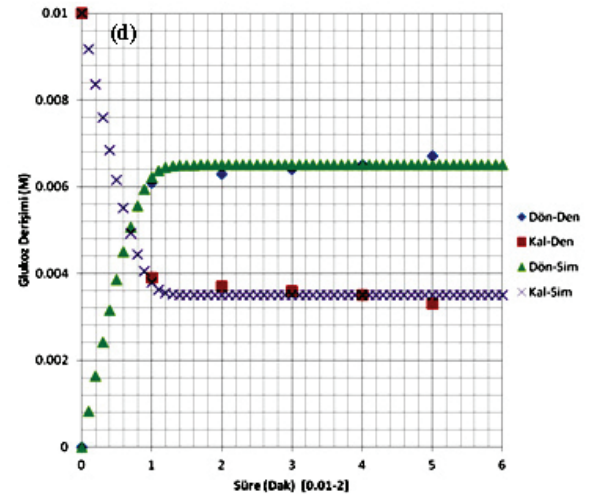
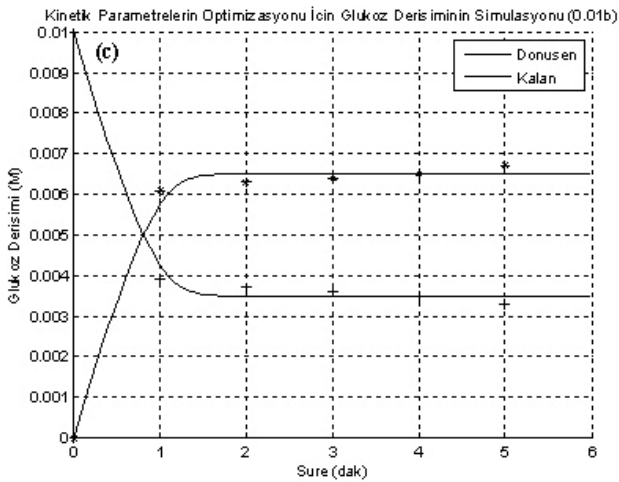
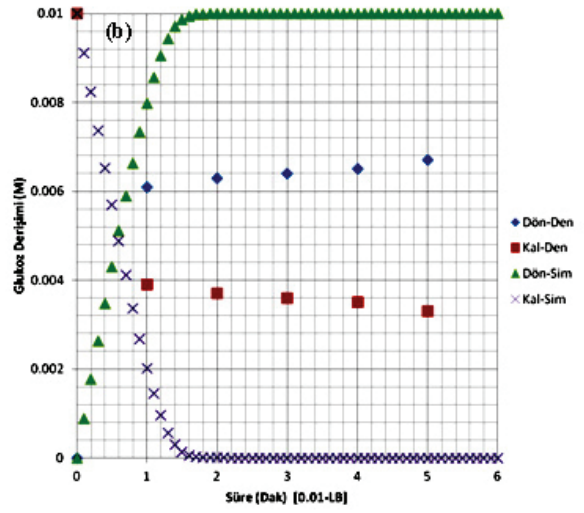
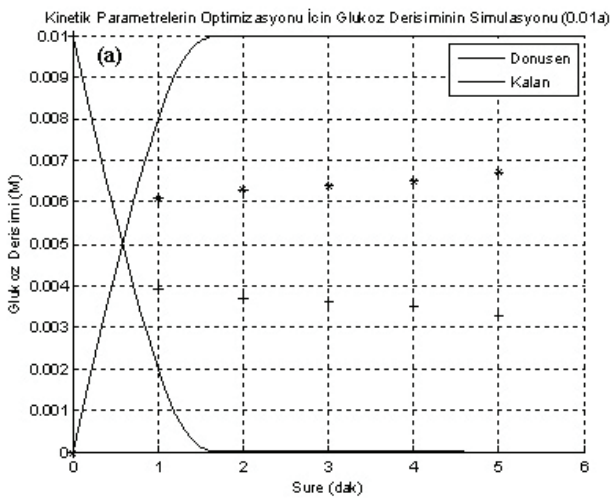
S0	0.01	0.05	0.075	0.1	0.5	1	2.5	$\alpha$	$\beta$	R <sup>2</sup>
$V_m=\alpha \cdot S_0+\beta$	0.004103	0.024872	0.051684	0.083607	0.426772	0.842167	2.010693	0.809566	0.002198	0.99
$K_m=\alpha \cdot S_0+\beta$	0.001286	0.004313	0.002099	0.000666	0.002698	0.002696	0.011653	0.003684	0.001402	0.90



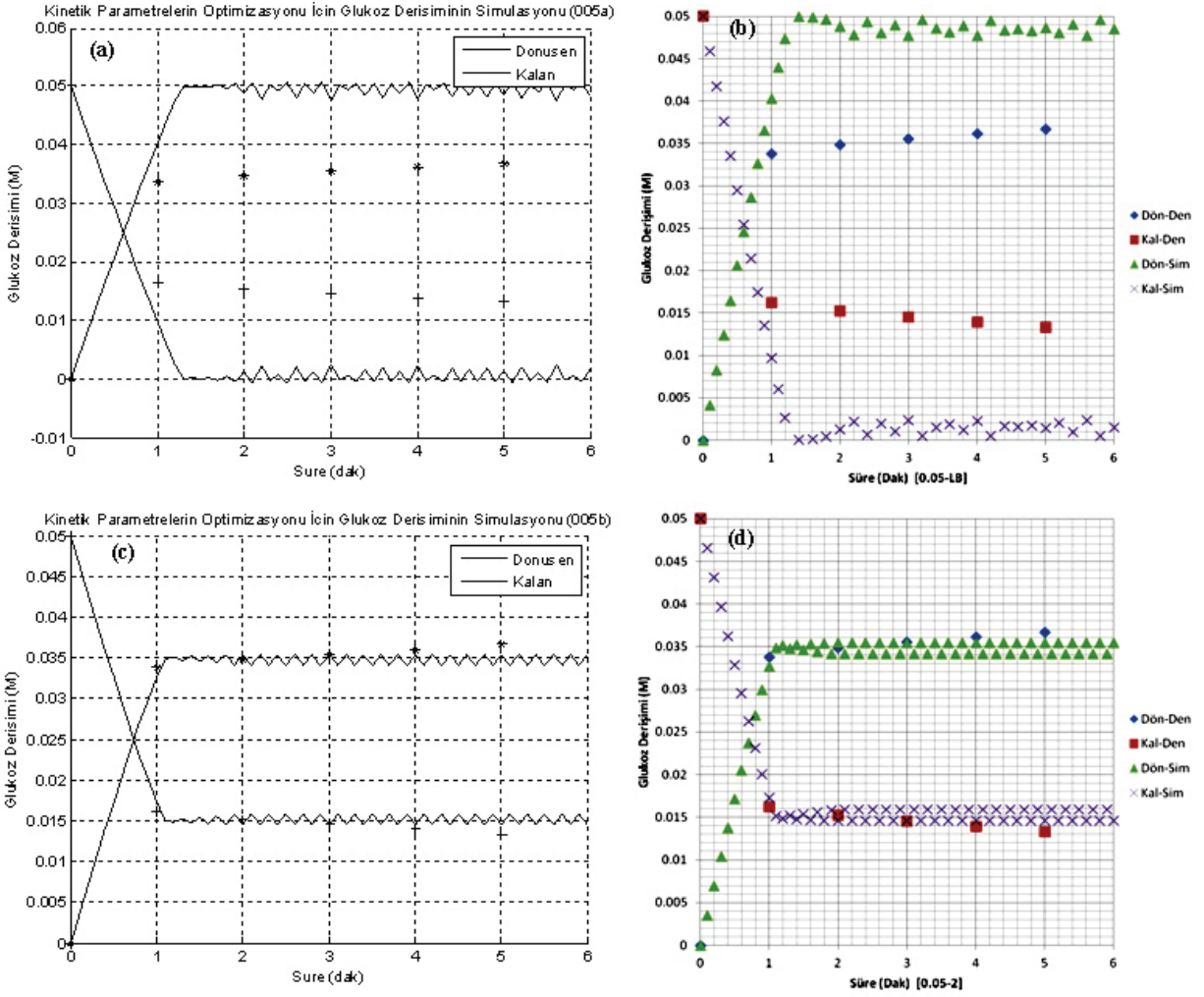
**Şekil 3.** Kinetik modelden hesaplanan. (a) ( $V_m$ ) grafiği MATLAB; (b) ( $V_m$ ) grafiği EXCEL; (c)  $K_m$  grafiği MATLAB; (d)  $K_m$  grafiği EXCEL Formu.

**Tablo 3.** Farklı başlangıç glukoz derişim değerlerine bağı olarak Başlangıç Substrat Derişimi Etkili (BSDE) Michaelis-Menten Kinetik Reaksiyon Modeline göre hesaplanan glukoz derişimlerinin zamana bağı simülasyon değerleri ve aynı değerler için hesaplanan Lineweaver-Burk (L-B) verileri.

Döngü	Hesaplanan Parametreler			J=f(Y,s,r) Simülasyon için Optimizasyon Fonksiyonu					
No	S0	Y	Smin=S0*Y	s	Vm'=Vm*s	r	Km'=Km*r	J	Şekil
L.-B.	0.01	0	0	1	0.0103	1	0.0014	0.6548	5-a
BSDE	0.01	0.35	0.0035	0.85	0.0087	1.1	0.0016	0.9816	5-b
L.-B.	0.05	0	0	1	0.0427	1	0.0016	0.7546	6-a
BSDE	0.05	0.3	0.015	0.85	0.0363	1.1	0.0017	0.9816	6-b
L.-B.	0.075	0	0	1	0.0629	1	0.0017	0.7647	7-a
BSDE	0.075	0.3	0.0225	0.85	0.0535	1.1	0.0018	0.8339	7-b
L.-B.	0.1	0	0	1	0.0832	1	0.0018	0.0+0.5773i	8-a
BSDE	0.1	0.3	0	0.85	0.0707	1.1	0.0019	0.6031	8-b
L.-B.	0.5	0	0	1	0.4070	1	0.0032	0.0+1.7876i	9-a
BSDE	0.5	0.3	0.015	0.85	0.3459	1.1	0.0036	0.0+1.5244i	9-b
L.-B.	2.5	0	0	1	0.8118	1	0.0051	0.0+1.7493i	-
L.-B.	2.5	0	0	1	2.0261	1	0.0106	0.0+1.7347i	-



**Şekil 4.** (a) J=0.6548 uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (b) J=0.6548 uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL; (c) J=0.9816 uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (d) J=0.9816 uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL formu.



**Şekil 5.** (a)  $J=0.7546$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (b)  $J=0.7546$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL; (c)  $J=0.9816$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (d)  $J=0.9816$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL formu.

değer problemi olan  $dS/dt$  diferansiyel eşitliğinin sayısal çözüm döngüsünü içerdiği ve bu hesaplamada Euler gibi basit çözüm yöntemlerinin bile çok iyi sonuçlar verdiği zaten bilinmekte olup, Euler yöntemi kısaca aşağıdaki denklikle ifade edilmektedir:

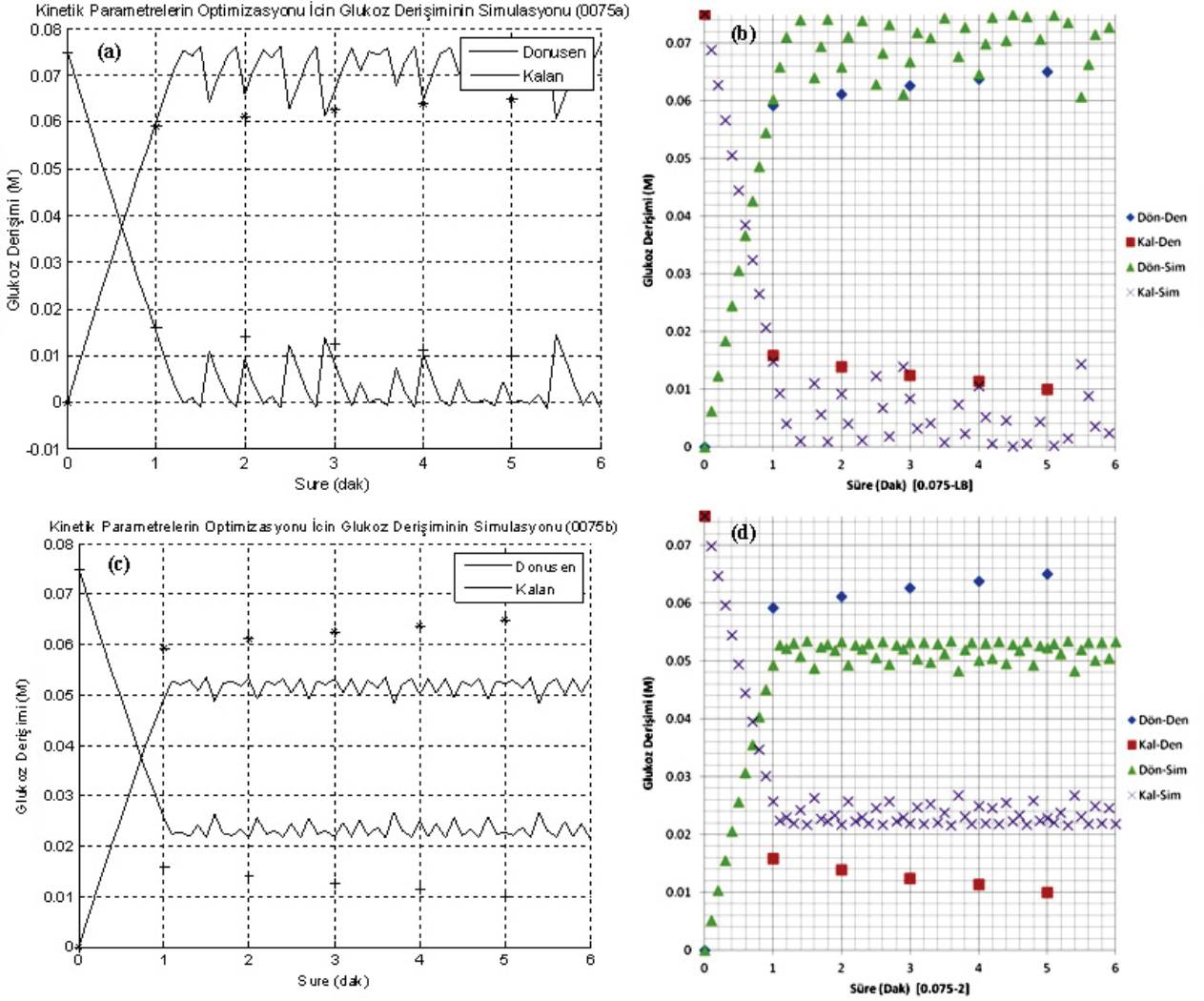
$$S_{i+1} = S_i + R_i * \Delta t \quad (6)$$

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada kullanılan glukoz oksidaz enzimi analiz ve tedavi amaçlı araştırmalarda kullanılan bir enzimdir [14-16]. İki bölümden oluşan bu çalışmanın ilk kısmında, enzimin çözünmez agregatlarını oluşturmak için çözülmüş durumdaki enzim hazırlanmış, daha sonra da uygun bir çöktürücü varlığında bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilmiş ve agregat oluşumu sağlanmıştır. Başlangıç enzim derişimi, sıcaklık

etkisi, çöktürücü etkisi ve çapraz bağlayıcı etkisi gibi hazırlanma parametreleri daha önce optimize edilmiştir [11]. Son olarak da hazırlanan enzim sistemlerinin  $\beta$ -D-glukozu glukonik asite ve  $H_2O_2$ 'ye oksitleyen enzim miktarı olarak aktiviteleri ölçülmüştür. Ardından da bu enzim sistemlerinin glukozu  $\beta$ -D-glukoza indirgememesinin kinetik araştırmasına geçilmiştir (Şekil 1 ve 2). Hızlı denge yaklaşımı varsayımını esas alan Michaelis-Menten modelinde enzim ve substrat arasında çok hızlı bir denge olduğu kabul edilir ve denge sabiti  $K_m$  ve en yüksek tepkime hızı  $V_m$  de içerecek şekilde yazılan hız denkleminin doğrusallaştırılması ile bu iki kinetik parametre yazılan bilgisayar algoritması yardımıyla hesaplanmıştır [11, 12].

Sonuçlar incelendiğinde 0.01, 0.05 ve 0.075 M başlangıç glukoz derişim değerleri en yüksek model uyumunu vermektedir (Tablo 2). Başlangıç glukoz derişim değerleri arttıkça hesaplanan uyum değerlerinde hızlı bir düşme

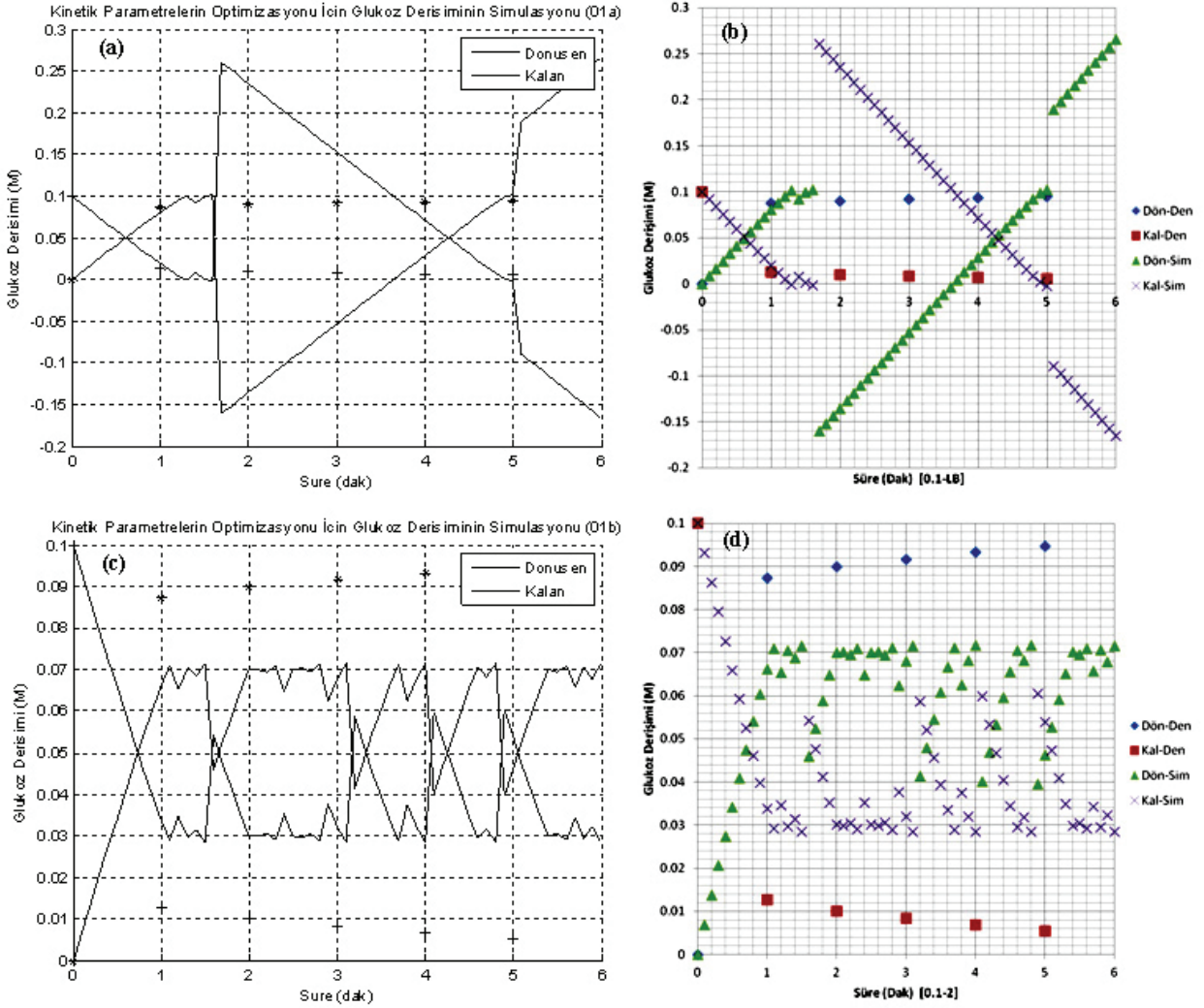


Şekil 6. (a)  $J=0.7647$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (b)  $J=0.7647$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL; (c)  $J=0.8339$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (d)  $J=0.8339$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL formu.

görülmektedir. Bu durum Şekil 2’de görülen ve 0.75 M derişime kadar gerçekleşen Michaelis-Menten kinetik reaksiyon modeli ifadesinin de temeli olan dönüşümdeki doğrusal derişime karşılık gelmektedir. Daha yüksek başlangıç glukoz derişimlerinde doğrusallıktan büyük sapmalar gerçekleşmektedir. Hesaplanan  $V_m$  ve  $K_m$  değerleri grafiğe geçirildiğinde artan substrat derişimi ile  $V_m$  değerlerinde de doğrusal bir derişim gözlenmiş (Şekil 3a), buna karşılık  $K_m$  değerlerinde düzensiz bir dağılım bulunmuştur (Şekil 3b). Literatürde yapılan benzer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir [18-20]. Çalışmanın son aşamasında başlangıç substrat derişimi etkili (BSDE) Michaelis-Menten kinetik reaksiyon modeli kullanılarak  $V_m$  ve  $K_m$  değerleri hesaplanmıştır. Her iki model için de bulunan en yüksek uyum değerini veren  $V_m$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.0427, 0.0363 ve 0.016,

0.017 olarak bulunmuştur. Bu uyumun göstergesi olan  $J$  optimizasyon fonksiyonu değerleri de aynı tabloda verilmiştir. Her uyum değerine karşılık gelen simülasyon eğrileri doğrusallaştırılmış başlangıç substrat derişimi etkisinin olmadığı Michaelis-Menten Modelinin (L-B) ve başlangıç substrat etkili Michaelis-Menten kinetik modelinin simülasyon eğrileri karşılaştırmalı olarak çizilmiştir. Farklı başlangıç glukoz derişim değerlerine göre hesaplanan zamana bağlı glukoz derişimlerinin simülasyon sonuçları Tablo 3’de verilmiştir. Doğrusallaştırılmış kinetik modeli gösteren Lineweaver-Burk (L-B) grafiği sonuçları ile doğrusal olmayan kinetik modelin simülasyon sonuçları karşılaştırıldığında denge sabiti  $K_m$  ve en yüksek tepkime hızı  $V_m$  değerlerinin birbirine yakın olduğu sonucu modelin uygulanabilirliğini gösterirken, denge sabitinin artması ise substrata olan ilginin





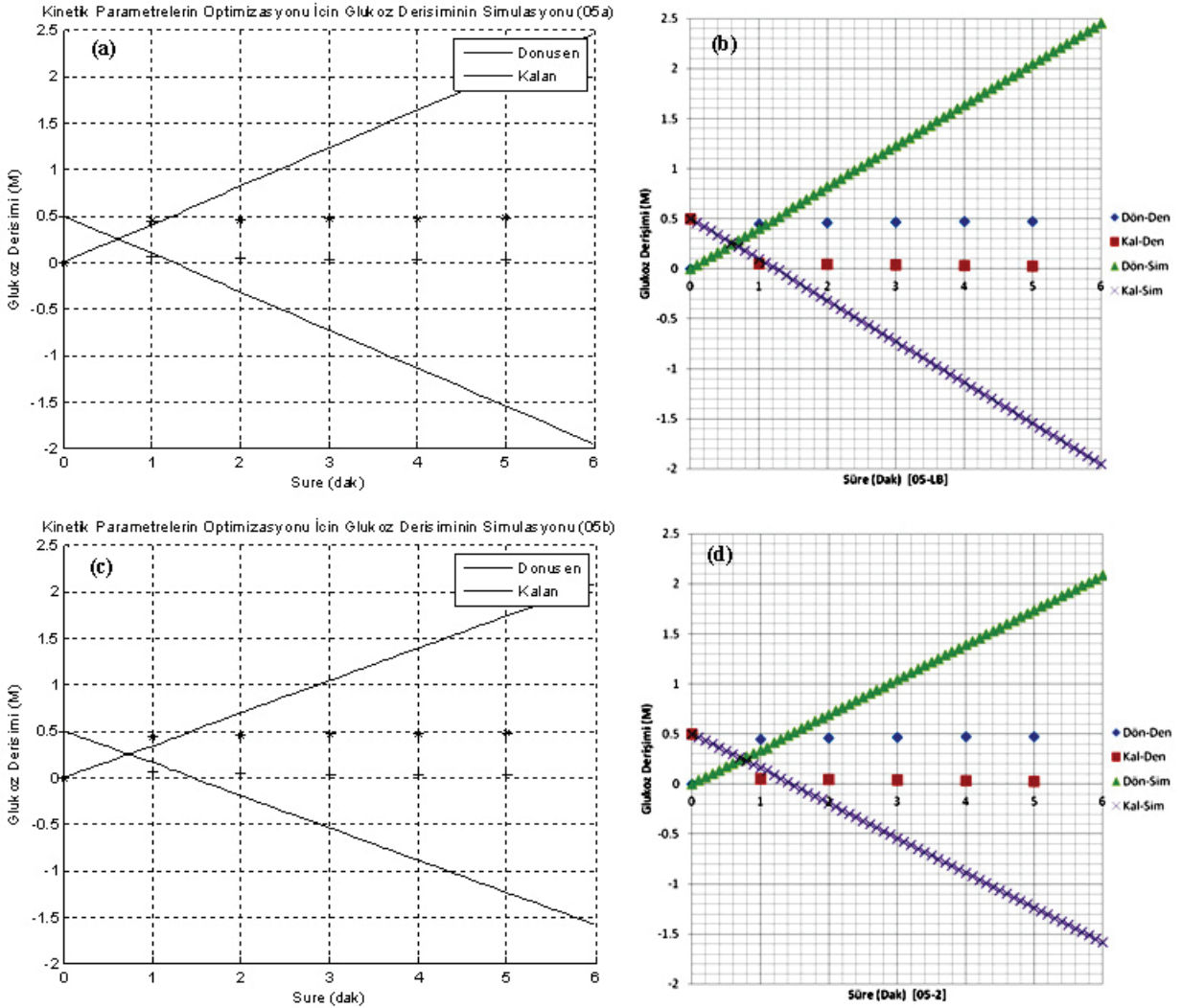
**Şekil 7.** (a)  $J=0.0+0.5773i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (b)  $J=0.0+0.5773i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL; (c)  $J=0.6031$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (d)  $J=0.6031$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCELformu.

azaldığını belirtmektedir [21-24]. Simülasyon eğrileri incelendiğinde ise, substrat etkili Michaelis-Menten kinetik reaksiyon modeli ile yapılan optimizasyonlarda daha yüksek uyumluluk gösteren çok daha etkin sonuçlar alındığı derişim zaman eğrilerinin yaklaşarak sabit değerlerle ilerlemesi ile Şekil 4b ve 5b'de açık olarak görülmektedir. Bu iki simülasyonda eğrilerin uyumu %65-75'lerden %98'ler gibi mükemmel değerlere ulaşmaktadır. Şekil 6'da yer alan 0.075 M başlangıç değeri substrat etkisiz model uyumu bir önceki başlangıç derişimi ile hemen hemen aynı olarak bulunmuştur. Ancak başlangıç substrat derişimi etkili model uyumunun derişim zaman eğrisinde bozulma gözlenmektedir ve Şekil 7 ve 8'de başlangıç glukoz derişiminin artmasıyla beklenildiği gibi uyum hızla düşmekte ve yok olmaktadır. Buradan da anlaşılacağı gibi, yüksek glukoz derişimleri

optimum çalışma parametreleri bölgesinin dışında kalmaktadır.

Sonuç olarak 1) glukoz oksidaz enzimi agregatları ile yapılacak aktivite deneylerinde Michaelis-Menten sabitlerinin hesaplanmasında başlangıç substrat derişimine karşı aktivitenin doğrusal değişim gösterdiği 0.075 M başlangıç glukoz derişim değerine kadar doğru sonuçlar elde edilmektedir. 2) başlangıç substrat derişimi etkili Michaelis-Menten modelinin kullanılması ise uyumu daha yüksek kinetik değerlerin elde edilmesini sağlamaktadır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.



**Şekil 8.** (a)  $J=0.0+1.7876i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (b)  $J=0.0+1.7876i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL; (c)  $J=0.0+1.5244i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri MATLAB; (d)  $J=0.0+1.5244i$  uyum değerine sahip simülasyon eğrileri EXCEL formu.

## Kaynaklar

- [1] Willie G, Alejandro C, Marta I, Toxicity and delivery methods for the linamarase/linamarin/glucose oxidase system, when used against human glioma tumors implanted in the brain of nude rats. *Cancer Letters* 2011; 313; 99–107.
- [2] Izquierdo M, Giraldo W, Gil J, Gargini R, Preclinical studies using the linamarase/linamarin/glucose oxidase gene therapy system against human glioma tumors in nude mice and rats. Universidad Autonoma de Madrid. 2011; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, ASCO Annual Meeting.
- [3] Adler I, Bazerque PM, Crivelli MR, Aguas S, Quarracino C, Effect of a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase on recurrent aphthous ulcers. *Acta Odontol Latinoam* 1993; 7; 33-38.
- [4] Li T, Yao Z, Ding L, Development of an amperometric biosensors based on glucose oxidase immobilized through silica Sol-Gel film onto Prussian Blue Modified Electrode, *Sens Act B Chem* 2004; 101; 155-162.
- [5] Chu L Y, Liang Y J, Chen WM, Ju X J, Wang, HD, Preparation of glucose-sensitive microcapsules with a porous membrane and functional gates. *Colloid Surf B* 2004; 37: 9-15.
- [6] Jingjing L, Ruo Y, Yaqin C, Xin C, Fabrication of a novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010; 66; 8-14.
- [7] Zuchao M, Jianbin Z, Qinglin S, Xiaohui Z, In situ synthesis of thulium (III) hexacyanoferrate (II) nanoparticles and its application for glucose detection. *Analytica Chimica Acta* 2011; 689; 47-51.
- [8] Caramori SS, Fernandes KF, Covalent immobilization of horse radish peroxidase onto poly (ethylene terephthalate)-poly (aniline) composite, *Process Biochem* 2004; 39; 883-888.
- [9] Fernandes KF, Lima CS, Lapes M, Collins CH, Properties of horse radish peroxidase immobilised onto polyaniline, *Process Biochem* 2004; 39; 957-962.
- [10] Tyagi R, Batra R, Gupta N, Amorphous enzyme aggregate: Sta-

- bility toward heat and aqueous-organic cosolvent mixtures. *Enzyme and Microbial Tech* 1999; 24; 348-354.
- [11] İspirli Y, Ayhan H, Taşıyıcısız immobilizasyon yöntemiyle glukoz oksidaz (GOD) enzim agregatlarının ve kristallerinin sentezi ve karakterizasyonu, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [12] Ayhan, F, İspirli Doğaç Y, Ayhan H, Cross-linked glucose oxidase aggregates: Synthesis and characterization, *Hacettepe J. Biol Chem* 2011; 39; 241-251.
- [13] Bailey JE, Ollis DF, *Biochemical Engineering Fundamentals* 1986; McGraw-Hill Int. Edition.
- [14] Jenson VG, Jeffreys GV, *Mathematical Methods in Chemical Engineering*, Sec. Ed, 1977; Academic Press.
- [15] Arifoğlu U, MATLAB 7.04, SIMULINK ve MÜHENDİSLİK UYGULAMALARI 2005; Alfa Basım Yayın Ltd. Şti.
- [16] Kieran P, Beroviç M, (Ed.), *Bioprocess Engineering Course Notes*, The European Federation of Biotechnology, 2001.
- [17] Lübbert A, Simutis R, Volk N, Galvanuskas V, *Biochemical process optimization and control. Hands-on Course 2000*; Martin Luther Universität-Germany.
- [18] Hamilton SD, Pardue HL., Kinetic method having a linear range for substrate concentration that exceed Michaelis-Menten constants. *Clin Chem* 1982; 28; 2359-2365.
- [19] Liao F, Tian KC, Yang X, Zhou QX, Zeng ZC, Zuo YP, Kinetic substrate quantification by nonlinear fitting the enzyme reaction curve to the integrated Michaelis-Menten equation. *Anal Bioanal Chem* 2003; 375; 756-762.
- [20] Liao F, Liu WL, Zhou QX, Zeng ZC, Zuo YP., Assay of serum arylesterase activity by fitting reaction curve to an integrated rate equation. *Clin Chim Acta* 2001; 314; 67- 76.
- [21] Liao F, Li JC, Kang GF, Zeng ZC, Zuo YP, Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method. *J Med Coll PLA* 2003; 18; 295-300.
- [22] Meyer-Almes FJ, Auer M, Enzyme inhibition assay using fluorescence correlation spectroscopy: a new algorithm for the derivation of  $K(\text{cat})/K(\text{M})$  and  $K(i)$  values at substrate concentration much lower than the Michaelis constant. *Biochemistry* 2000; 39; 13261-13268.
- [23] Kahn K, Tipton PA, Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase. *Biochemistry* 1997; 36; 4731-4738.
- [24] Fei L, Xiao-Yun Z, Yong-Mei W, Yu-Ping Z, The comparison of the estimation of enzyme kinetic parameters by fitting reaction curve to the integrated Michaelis-Menten rate equations of different predictor variables. *J Biochem Biophys Methods* 2005; 62; 13-24.