

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**SIĞIR SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MURAT SAYIN**

**Balıkesir, Ağustos-2009**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**SİĞİR SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MURAT SAYIN**

**Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Özen Özensoy GÜLER**  
**Sınav Tarihi:17.08.2009**

**Jüri Üyeleri: Yard. Doç. Dr. Özen Özensoy GÜLER**  
**Prof. Dr. Oktay ARSLAN**  
**Doç. Dr. Feray KÖCKAR**

**Balıkesir, Ağustos-2009**

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2008/03 Kodlu Proje İle desteklenmiştir.Teşekkür ederiz.”

## ÖZET

# SIĞIR SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU

**Murat SAYIN**

**Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı**

**(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Özen Özensoy GÜLER)**

**Balıkesir, 2009**

Sığır serum paraoksonaz enziminin saflaştırılması için hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 1-naftilaminin L-tirozine kenetlenmesi reaksiyonu ile sentezlenmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri ile sığır serum paraoksonaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sığır serum paraoksonaz enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 45kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

Saflaştırılan sığır serum paraoksonaz enzimi hidrofobik taşıyıcı olan Eupergit C 250 L ye immobilize edilerek immobilize enzimin bağlanma yüzdesi ortalama % 74.6 ve katalitik etkinliği ortalama % 56.1 olarak bulunmuştur. Sığır serum paraoksonaz saf ve immobilize formlarının paraokson substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile sırasıyla saf enzim için, 6.261 mM ve 169.65 U/ml dakika olarak immobilize enzim için, 2.479 mM and 149.44 U/ml dakika değerleri elde edilmiştir. Immobilize sığır serum paraoksonaz enziminin enzimatik davranışları serbest enzim ile karşılaştırıldı. Serbest ve immobilize sığır paraoksonaz

benzer optimum sıcaklıklar (25-45 °C) ve pH (7.0) değerleri göstermesine rağmen immobilize sığır serum paraoksonaz geniş pH aralıklarında daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize enzimin termal inaktivasyonu serbest enzime göre daha yavaş olduğu gözlemlendi.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Paraoksonaz (PON1), Hidrofobik etkileşim kromatografisi, İmmobilizasyon metodları, Eupergit C

## **ABSTRACT**

### **THE PURIFICATION AND IMMOBILIZATION OF BOVINE SERUM PARAOXONASE**

**Murat SAYIN**

**Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry**

**(Master Thesis / Supervisor: Assistant Professor Özen Özensoy GÜLER)**

**Balikesir, Turkey, 2009**

Because of purification of bovine serum paraoxonase, hydrophobic interaction chromatography gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 1-naphthylamine as a hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was added as an extension arm.

Bovine serum paraoxonase was purified with ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed a single band with 45 kDa.

Purified bovine serum paraoxonase was immobilized to Eupergit C 250 L using as hydrophobic carrier and after immobilization, the yield of bound enzyme was found around % 74.6 and the catalytic efficiency was approximately % 56.1. The  $K_M$  and  $V_{max}$  values were determined of soluble and immobilized enzyme by the method of Lineweaver-Burk plots, using paraoxon as a substrate. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of soluble enzyme was 6.261 mM and 169.65 U/mlmin., immobilized enzyme's  $K_m$  and  $V_{max}$  was 2.479 mM and 149.44 U/mlmin, respectively. The enzymatic properties of immobilized bovine serum paraoxonase were compared with those of the soluble enzyme. Soluble and immobilized bovine serum paraoxonase showed

similar optimum temperature (25–45 °C) and pH (7.0) values, but the pH profile of the immobilized bovine serum paraoxonase was stronger at broad pH ranges. On thermal inactivation of immobilized bovine serum paraoxonase was slower than the soluble enzyme.

**KEY WORDS:** Paraoxonase (PON1), Hydrophobic interaction chromatography, Immobilization methods, Eupergit C

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	ii
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	ix
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	x
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	xii
<b>ÖNSÖZ</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Enzimler	1
1.1.1 Enzimlerin Genel Özellikleri ve Yapısı	2
1.1.2. Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler	3
1.1.2.1 Sıcaklık	3
1.1.2.2 pH	4
1.1.2.3 Substrat Konsantrasyonu	5
1.2 Paraoksonaz Enzimi	5
1.2.1 Adlandırılması	5
1.2.2 Paraoksonaz Enziminin Genel Özellikleri ve Yapısı	5
1.2.3 Enzimin Katalitik Mekanizması	7
1.2.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	8
1.2.5 Paraoksonaz'ın Sentezlenmesi	10
1.2.6 PON1'in HDL'ye Bağlanması	10
1.3 Enzim İmmobilizasyonu	11
1.3.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihi	13



1.3.2 Taşıyıcı Seçimi	15
1.3.3 Biyokataliz Uygulamaları İçin Taşıyıcı Boncuk Eupergit ®	18
1.3.3.1 Morfolojisi	19
1.3.3.2 Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu	20
1.4.1 Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları	21
1.4.1.1 Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu	21
1.4.1.1.2 Kovalent Bağlanmanın Avantajları	22
1.4.1.1.3 Kovalent Bağlanmada Aktivite Kaybı	23
1.4.1.2 Tutuklama İmmobilizasyonu	24
1.4.2 Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları	25
1.4.2.1 Adsorpsiyon (Kovalent olmayan etkileşimler)	25
1.4.2.1.1 Nonspesifik Adsorpsiyon	25
1.4.2.1.2 İyonik Bağlanma	26
1.4.2.1.2 Hidrofobik Adsorpsiyon	27
1.4.2.1.2 Afinite Bağlanma	27
1.5 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	27
1.6 Enzim Reaktörünün Seçimi	28
1.7 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri	30
1.8 Çalışmanın Amacı	31
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Materyaller</b>	<b>32</b>
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	32
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	33
<b>2.2 Yöntemler</b>	<b>37</b>
2.2.1 Kan serumunun ayrılması	38
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini	38
2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	38
2.2.4 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi	39
2.2.5 Enzimin saflaştırılması	40
2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	40

2.2.5.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması	40
2.2.5.2.1 Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	40
2.2.5.2.2 L-tirozinin Bağlanması	41
2.2.5.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	42
2.2.5.3 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	43
2.2.6 Saflaştırılan enzimin İmmobilizasyonu	45
2.2.7 İmmobilize Enzim Aktivitesinin Sıcaklığa Bağlı Olarak Zamanla Değişimi	45
2.2.8 İmmobilize Enzim Aktivitesinin pH'ya Bağlı Olarak Değişimi	45
2.2.9 Optimum şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması	46
<b>3. BULGULAR</b>	47
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	48
3.2 Enzimin Saflaştırılması	48
3.2.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması	48
3.3 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	51
3.4 Saf Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	52
3.5 İmmobilize Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	54
3.6 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi	56
3.7 Aktivitenin Sıcaklıkla Değişimi	56
3.8 Aktivitenin pH ile Değişimi	60
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	61
<b>5. KAYNAKLAR</b>	67

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Simge</b>	<b>Adı</b>
PON1	Paraoksonaz 1 enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletilendiamin

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Enzim kataliz reaksiyonları üzerine sıcaklığın etkisi	4
Şekil 1.2	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü	6
Şekil 1.3	Paraoksonazın katalitik mekanizması	7
Şekil 1.4	Lakton hidrolizi	9
Şekil 1.5	Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yaklaşımları	17
Şekil 1.6	Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yaklaşımları	18
Şekil 1.7	Eupergit'in ışık mikrokobundaki görüntüsü	19
Şekil 1.8	Eupergit'in elektron mikroskopundaki görüntüsü	19
Şekil 1.9	Eupergit'in reaksiyon mekanizması	20
Şekil 1.10	Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlanma gösterimi	22
Şekil 1.11	Kovalent bağın enzim aktivitesi üzerine olası etkileri	24
Şekil 1.12	Tutuklama immobilizasyonunun gösterimi	24
Şekil 1.13	Nonspesifik adsorpsiyon immobilizasyonunun gösterimi	26
Şekil 1.14	İmmobilize enzimler için reaktörler	29
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	41
Şekil 2.2	L-tirozinin bağlanması	42
Şekil 2.3	1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması	43
Şekil 3.1	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	47
Şekil 3.2	Hidrofobik etkileşim kolonundan paraoksonaz enziminin elüsyon grafiği	49

Şekil 3.3	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi.	51
Şekil 3.4	Saflaştırılmış sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 3.5	İmmobilize edilmiş sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 3.6	25°C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği.	57
Şekil 3.7	45 °C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği	58
Şekil 3.8	65 °C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği	59
Şekil 3.9	Aktivite(%) - pH grafiği	60

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri	13
Çizelge 1.2	İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler	13
Çizelge 1.3	İmmobilize enzimlerin tarihsel basamakları	14
Çizelge 1.4	Taşıyıcıların Sınıflandırılması	15
Çizelge 1.5	İmmobilize yöntemlerine göre aktivitenin değişimi	28
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	37
Çizelge 3.1	Saflaştırma tablosu	50
Çizelge 3.2	Sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak, $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ .	53
Çizelge 3.3	İmmobilize edilmiş serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak, $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ .	55
Çizelge 3.4	Eupergit C 250L taşıyıcısı üzerine immobilize edilmiş serum paraoksonaz enziminin bağlanma etkisi	56

## **ÖNSÖZ**

Tez konumu veren ve çalışmalarımnda her türlü kolaylığı gösteren, bunun yanında esnek çalışma ortamı sağlayan çok kıymetli danışman hocam sayın Yard. Doç. Dr. Özen Özensoy GÜLER'e öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı takdim ederim.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız, bize her türlü desteği veren Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımnda ilgi, yardım ve manevi desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Dr. Nahit GENÇER'e, Doç. Dr. Selma SİNAN'a, Dr. Semra IŞIK'a ve çalışma arkadaşlarım Nurcan DEDEOĞLU, Ayşegül ŞAHİN, Evrim ÇELEBİ, Kemal TAŞTEMÜR, Cihan BARAK, Şakir AKGÜN ve bütün Biyokimya grubu arkadaşlarımıza sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2009**

**Murat SAYIN**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Enzimler

İnsanoğlunun enzimleri kullanmaya başlaması, medeniyetin başlangıcından daha eskidir. İkel topluluklardaki bazı yiyecek ve içeceklerin üretimi, derilerin ve tabakların cilalanması, elbiselerin parlatılması gibi pek çok uygulama her ne kadar o zamanlarda bilinmese bile enzimlerin önemli uygulamalarındandı. Biyokimya'nın 19. yüzyılda gelişmesi ve seçkin bilim adamının çalışmalarına başlamadan önce, enzimlerin doğası ve nasıl çalışmaya başladığıyla ilgili bilgiler aydınlatılamamıştı.

Fransa'da Anselme Payen ve Jean – François Persoz 1833 yılında arpa filizlerinden amilatik bileşenlerin izolasyonunu açıkladı. Kısa bir süre sonra İsveç'li Kimyager Jöns Jacob Berzelius 1835 yılında kimyasal reaksiyonları hızlandırıcı bileşenleri “*katalizör*” olarak tanımladı. Almanya'da Fizyolog Theodor Schwann sindirim enzimi olan pepsini 1836 yılında tanımlamıştır. 1877 yılında Wilhelm Kühne “*enzim*” teriminin kullanımını önerdi. Hans ve Edvard Buchner hücrede maya ekstraktında glukozun etanole dönüşümünü kimyasal katalizörler (enzimler) tarafından yürütüldüğünü 1897 yılında göstermiştir. 1870'lerde Danimarka'lı kimyager Christian Hansen peynir yapımını sonuçlandıran, ürün miktarını ve kalitesini arttıran peynir mayasını saf olarak elde etmeyi başardı. Bundan bir süre sonra peynir mayasının üretim endüstrisi kuruldu. Böylece enzim üretim endüstrisi ilk defa kurulmuş oldu [1].

Enzimlerin protein yapısında olduklarının anlaşılmasıyla birlikte, analiz ve saflaştırma tekniklerinin tasarım çalışmaları 20. yüzyılda hız kazanmıştır. Özellikle James B. Summer ve Kaj Linder Strom Lang'in çalışmaları, enzimlerin endüstriyel üretim ve kullanım yöntemlerinin gelişmesine imkan sağlamıştır [1].



### 1.1.1 Enzimlerin Genel Özellikleri ve Yapısı

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen ayrıca yan ürün oluşumuna izin vermeyen % 100' lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir.

Enzimlerin protein kısmı diğer doğal proteinlerde olduğu gibi peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış 20 amino asiden oluşur. Ancak çoğu enzimde posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan amino asitlerin R – gruplarında bazı kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bunun yanı sıra posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirine karbohidrat, lipid, çeşitli organik moleküller veya metal iyonlarının bağlanması söz konusu olabilmektedir [2].

Enzimler katalitik özellikleri olan proteinlerdir. Katalitik özellikler oldukça spesifiktir ve bu özelliği enzimlerin analizlerde kullanımına olanak sağlar. Bazı enzimler yalnız proteinlerden oluşurken çoğu enzimler ilaveten karbohidratları, lipidleri, metalleri, fosfatları ve diğer bazı organik grupları (prostetik grupları) içerirler (Proteid). Proteid yapısındaki enzime Halo-enzim, yalnız protein kısmına Apoenzim ve proteinik olmayan diğer kısma ise kofaktör adı verilir. Enzimatik reaksiyonda dönüşüme uğratan maddeye ise substrat denir.

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde üç boyutlu yapıda birbirine yakın konumda olan, fonksiyonel yan grup taşıyan belirli amino asitlerin oluşturduğu ve enzimin katalitik potansiyelinden sorumlu bir merkez vardır ki buna aktif bölge denir. Substrat ve koenzim bu merkeze hidrojen köprü bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ile bağlanır. Denatürasyon sonucu konformasyon bozulur, amino asit dizisi aynen kalmasına rağmen katalitik aktivite kaybolur.

Enzimler canlı organizmadaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda (vücut sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden spesifik katalizörlerdir. Enzimlerin büyük çoğunluğu yalnız tek bir substrata karşı aktivite gösterir ve bu substratı dönüşüme uğratar (substrat spesifikliği).

Enzimler ortamdaki maddelerden yalnız biri ile reaksiyon vermekle kalmaz teorik olarak oluşabilecek ürünlerden de sadece birinin oluşumunu katalizlerler (Etki spesifikliğı) [3].

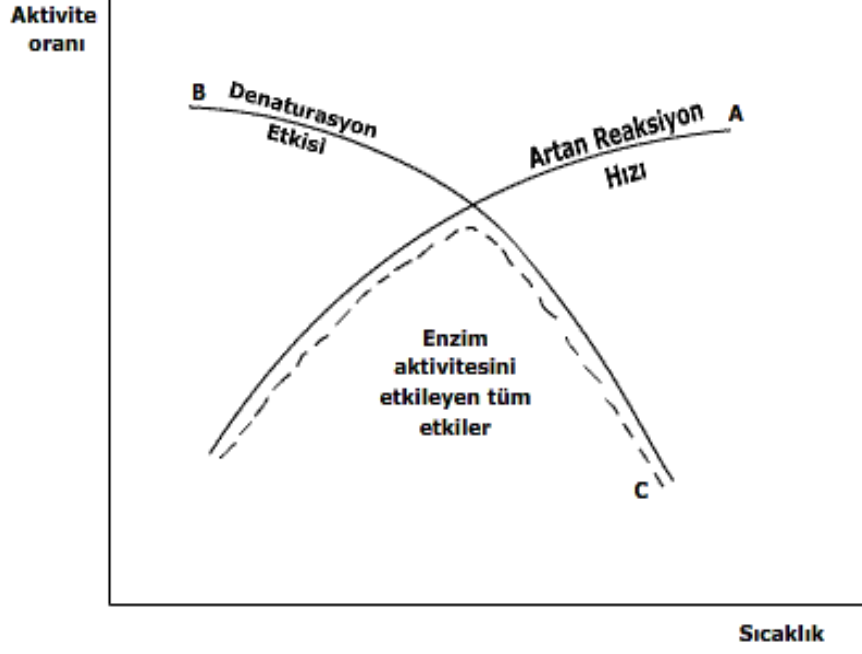
## **1.1.2.Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler**

### **1.1.2.1 Sıcaklık**

Sıcaklık artışı bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim kataliz reaksiyonlarında artırıcı etki yapmaktadır. Ancak protein yapısındaki enzimlerin sıcaklık artışı denatürasyon olasılığında arttırır [Şekil 1.1]. Sıcaklığın etkisiyle oluşan denatürasyon, saflaştırılmış enzim çözeltileri saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etki yapmaktadır.

Enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları pek çok zaman bilim adamları tarafından ifade edilmiştir ancak belirli bir enzimatik reaksiyon için en uygun sıcaklık, kısa zaman aralıklarında maksimum aktivite ve uzun zaman aralıklarında denatürasyondan dolayı aktivitenin düşmesi arasındaki uyum ile ilgilidir.

Pek çok çalışma 37°C' de yürütülür bunun birinci nedeni vücut sıcaklığının enzimlerin enzimler için optimum sıcaklığı olabileceğı ikinci nedeni ise bu sıcaklığın üzerinde enzimlerin inaktivasyon oranlarının çok fazla değışmemesi etkilidir. Uluslar arası Biyokimya Birliğı başlangıçta 25°C' de standart sıcaklık olarak tavsiye edilmiş ancak sıcak iklimlerde enzimleri düşük sıcaklıkta tutmanın zor olmasından dolayı bu sıcaklığı 30°C' ye artırmıştır. Ancak hala bile enzimlerin aktiviteleriyle alakalı sıcaklık ile ilgili çalışmalarda belli bir standardın olmadığı görülmektedir. Bunun temel nedeni enzimlerin protein yapılarının farklı olmasından dolayı kaynaklanır [4].



**Şekil 1.1** Enzim kataliz reaksiyonları üzerine sıcaklığın etkisi. [(A) Kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklığın artmasıyla artar, (B) ancak proteinlerin denatürasyonlarının artmasından dolayı aktif enzim oranı azalır, (C) bu süreç bir enzimin sıcaklıkla karakteristik özelliğinin nasıl değiştiğini gösterir.] [4]

### 1.1.2.2 pH

Enzimler pH değişimlerine duyarlıdır ve kendi optimum pH aralıklarında en büyük aktivite değerini gösterirler. pH etkisi enzimlerin yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değişmesinden kaynaklanır. Yüklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir. Farklı substratlarda enzim reaksiyonlarının optimum pH'sı farklılık gösterebilir. Ancak her enzim için aynı pH'nın optimumu olması gibi bir zorunluluğun olmadığı gibi, tasarlanan enzim yöntemleride deneysel olarak belirlenebilir [4].

### **1.1.2.3 Substrat Konsantrasyonu**

Bir enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini inceleyen deneysel çalışmaların sonuçları tutarlılık gösterir. Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı artar. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı belli bir süre sonra sabitleşmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur [4].

## **1.2 Paraoksonaz Enzimi**

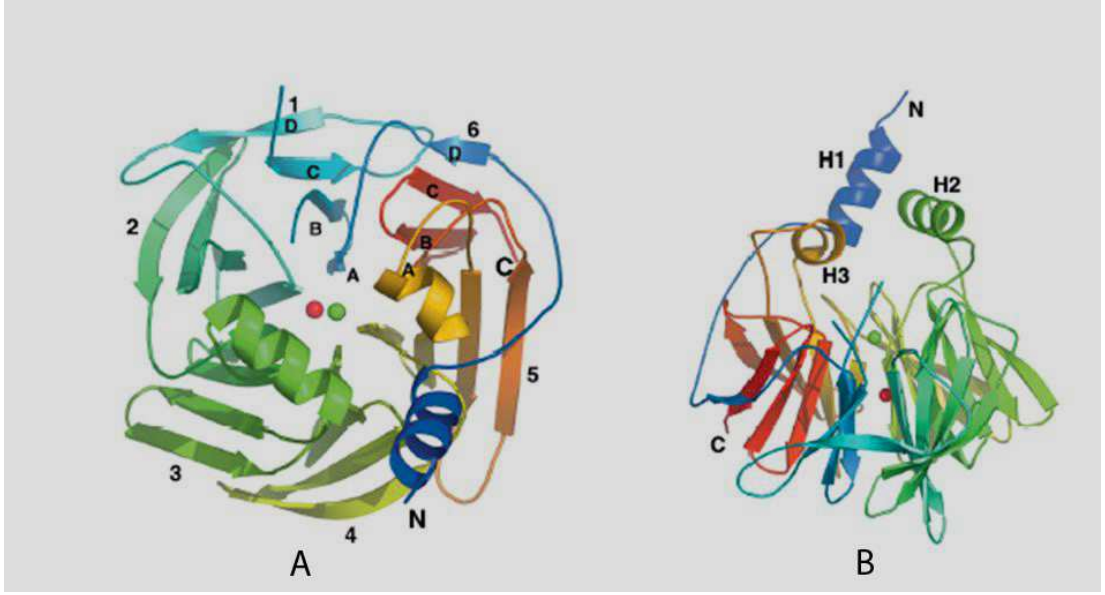
### **1.2.1 Adlandırılması**

Paraoksonaz enzimi ile ilgili yapılan ilk araştırmalara baktığımızda paraokson gibi, önemli sayıda aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolizleme özelliği olan A-esterazların grubunda yer alan ve EC 3.1.1.2 enzim koduna sahip olduğunu görürüz [5]. Ancak uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji İsimlendirme Komitesi Birliği bu sınıflandırmayı tekrar düzenlemiş ve paraoksonazın enzim kod girişi EC 3.1.8 olan fosfo triester hidrolazlar veya organofosfat hidrolazlar grubunun ilk sıradaki enzimi olarak belirlenmiştir [6]. Paraoksonaz enzimi de arildialkilfosfataz ismi ve EC 3.1.8.1 kodu ile bu grupta yer almaktadır [7]. Paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde paraokson substratı kullanıldığı için bu ismi almıştır [8].

### **1.2.2 Paraoksonaz Enziminin Genel Özellikleri ve Yapısı**

Paraoksonaz, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip, kararlılığının ve aktivitesinin ölçümü için  $Ca^{+2}$  iyonu gerekli olan bir enzimdir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. 355 aminoasit içeren paraoksonaz enzimi, yüksek oranda lösin içermesi dışında aminoasit özelliği olarak başka bir özellik göstermez [9,10]. Yapısındaki 3 sistein aminoasitin 284. sıradaki serbest iken 42. ve 353. sıradaki sistein rezidüleri tek disülfid bağı yapmıştır. Her molekül toplam ağırlığının %15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir [11].

Paraoksonaz'ın genel yapısına bakıldığında 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan oluşmuş 4 adet zincirden meydana geldiği görülür. 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanıp üç boyutlu yapısı oluşur [12]. Enzimin yapısında görülen N terminal ve C terminal uçlarının böylece kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapıya sahip enzimlerde son derece ender görülür (Şekil 1.2).

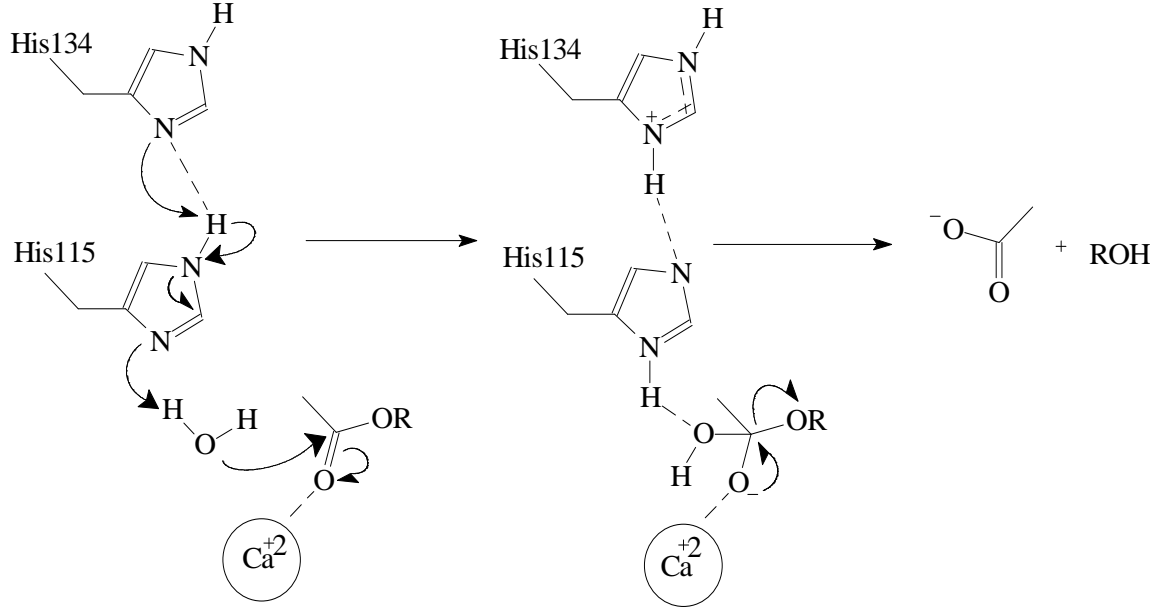


**Şekil 1.2** Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü. [ (A)  $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (B) H1, H2, H3 ile gösterilen hidrofobik bölgelerin  $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu.] [13]

Şekil 1.2 deki üç boyutlu yapıyı gösteren resimde görüldüğü gibi;  $\beta$ -kırmalı yapıların ortasında 7,4 Å aralıklarla iki tane  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bu kalsiyum iyonlarından bir tanesi yapısal olup, uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona sebep olmaktadır [14]. Diğer kalsiyum iyonu ise katalitik etkinlikle görevlidir. Ayrıca bu kalsiyum iyonu 2,1-2,5 Å mesafesinde Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu 53' den oluşan 5 adet aminoasit ile etkileşim halindedir. Bunun yanında aynı kalsiyum iyonu, fosfat iyonunun oksijeni ile bir su molekülü ile etkileşmektedir [15].

### 1.2.3 Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ve  $\text{H}_2\text{O}$  molekülü, esteraz aktivitesinde çok önemli rolü vardır.



Şekil 1.3 Paraoksonazın katalitik mekanizması [16]

Katalitik etkinlik gösteren  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü arttırmıştır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar [16].

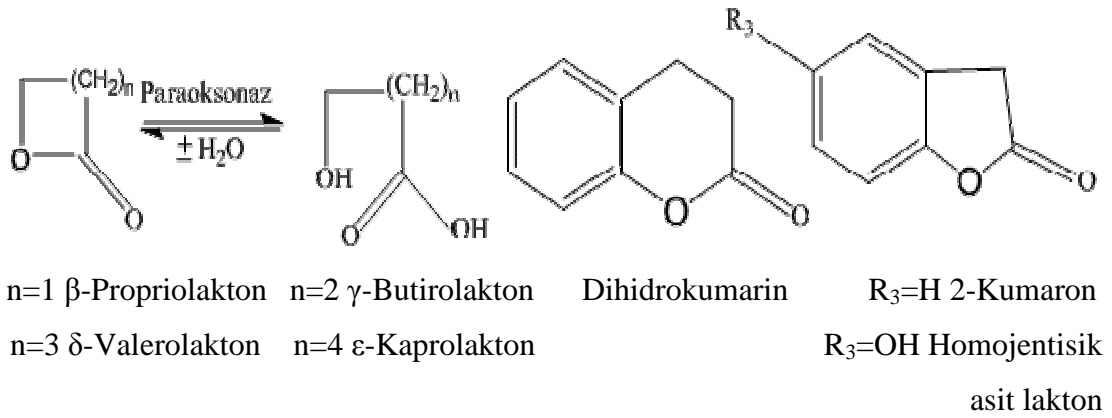
Paraoksonaz'ın mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu

substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [16].

#### 1.2.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat çeşitliliği gösterebilmesine rağmen, fizyolojik substratı halen tam olarak belirlenememiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu bulunmuştur [17]. Söz konusu aktivitelerin tümünün, ya birden fazla aktif merkezde veya tek bir aktif merkezde gerçekleştiği, ayrıca substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği halen belirlenememiştir.

Paraoksonaz'ın son yıllarda özellikle arterosiklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli derecede rol oynadığı bilinmektedir [18,19]. Paraoksonaz, sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile arterosklerozise karşı koruyuculuğunu hem LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek hemde lipit peroksitlerini metabolize ederek göstermektedir [20,21]. Bahsedilen enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası içeren en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilme özelliğine sahiptir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton (6 halkalı lakton),  $\gamma$ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan (7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. Paraoksonaz'ın aromatik laktonlar afinitesi, alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında  $\alpha$  ve  $\beta$  çift bağı olmasına rağmen paraoksonaz tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir (Şekil 1.4) [22-24].



**Şekil 1.4** Lakton hidrolizi [18]

İlk başlarda Paraoksonaz'ın yapısının ve substratlarıyla olan ilişkisinin belirlenebilmesi için yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuyla ilgili, Augustinson ve Ekedahl çift bağlı aromatik esterlerin Paraoksonaz tarafından hidrolizlendiklerini göstermişlerdir [25]. Bu reaksiyonda Paraoksonaz'ın substrat olarak kullanacağı esterin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [26]. Lakton halkasını içeren substratların, bu yapının oluşturduğu halkasal uzaysal yapı sayesinde enzimin aktif bölgesine girip enzimle etkileşmesine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Buna örnek olarak etil asetat Paraoksonaz ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren γ-bütirolakton iyi hidrolizlenmektedir [26].

Paraoksonaz'ın laktonaz aktivitesi için, 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, Paraoksonaz'ın LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; Paraoksonaz'ın sahip olduğu laktonaz aktivitesinin LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmesine karşı koruduğu düşünülmektedir [27,28]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [29]. Bunun yanında aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde oldukça gerekli olduğunu gösterilmiştir [30].



### **1.2.5 Paraoksonaz'ın Sentezlenmesi**

Paraoksonaz'ın sentezi karaciğer tarafından gerçekleştiği için, serumdaki paraoksonaz seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki paraoksonaz aktivitesi kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir [31]. Bunun nedenleri arasında peptid konsantrasyonu ve enzim aktivitesini etkileyen paraoksonaz geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir [32]. Paraoksonaz sentezinde önemli olan faktörlerden birisi karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir [33,34].

Paraoksonaz karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde bulunan mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir [35]. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de son derece önemli role sahiptir. Paraoksonaz karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [36]. Hücrenin zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL PON1'in hücreden salınmasına ve kendisine bağlanması için fosfolipit içeriği yeterli değildir [37].

### **1.2.6 Paraoksonaz'ın HDL'ye Bağlanması**

Paraoksonaz karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve paraoksonaz gibi enzimler ile LDL'nin yükseltgenmesini önler [38].

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan paraoksonaz enzimidir [39]. Paraoksonaz hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H<sub>2</sub> ve H<sub>1</sub> hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana

bağlanma yüzeyi oluşturular. Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [40].

### 1.3 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, canlı sistemlerinde kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Belirli bir düzen ile sıralanmış binlerce atomdan meydana gelmiş bu moleküller, canlı hücrelerde cereyan eden farklı kimyasal reaksiyon topluluklarının katalizlenmesini sağlarlar. Biyolojik proseslerde, hastalık ve sağlıktaki rolleri geniş bir şekilde incelenmektedir [41].

Enzimler oldukça ılıman koşullarda, yüksek derecede substrat seçiciliği ile reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptir. Böylece yan ürün oluşumunu azaltır. Katalizlenen reaksiyonlar arasında, mevcut organik kimya metodlarıyla ulaşılamayan, biyolojik makromoleküller arasında son derece fazla, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları vardır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımları için son derece önemli kılmıştır [3]. 20. yüzyılın başlarında, enzimlerin fermantasyon işlemlerinden sorumlu olduğu bulunmuş, yapıları ve kimyasal bileşenleri dikkatle inceleme altına alınmıştır. Bunun sonucunda biyolojik katalizlerin geniş kapsamlı teknolojik kullanımı tekstil, ilaç ve diğer kimya endüstrisi gibi farklı alanlara da öncülük etmiştir [1]. Ancak pekçok enzimin kararsız olması, saflaştırılması için oldukça yüksek ücret gereksinimi ve kullanıldıktan sonra reaksiyon karışımından aktif enzimin tekrar kullanımı için kurtarılması teknik olarak oldukça zordur [41].

Enzimler çözeltide tek başına, diğer bileşenleriyle kümeleşerek veya bir yüzeye bağlı olmak gibi değişik durumlarda kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler. Yüzeye bağlanma veya “immobilizasyon” özellikle teknik kullanım için üzerinde son derece yoğunlaşılan durumdur [42].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması,

bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak ifade edilebilir [43,44]. İmmobilize edilmiş enzimler genel olarak endüstriyel uygulamalarda katalitik özelliklerinin yanında, ekonomik olarak da son dere geliştirilmiş olmasının önemi bir hayli fazladır (Çizelge 1.1) [45].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Japonya'nın Tanebe Seiyaku Limited Şirketinde Chibata ve arkadaşları tarafından, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae aminoasilaz*'ın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir [46]. İmmobilize enzimlerin diğer önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak verilebilir (Çizelge 1.2). Bunun yanında bazı endüstriyel proseslerde, istenilen enzimi içeren bütün mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılabilir [47].

Endüstriyel olarak uygulamalarından başka, biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıpta kullanılan ilaçlardaki pekçok biyoteknolojik ürünlere enzim immobilizasyonunun temel teşkil ettiği görülmektedir [48].

Özellikle son 20 veya 30 yıla baktığımızda, immobilizasyon teknikleri hızla gelişmiştir ve immobilizasyon teknikleriyle ilgili tasarımlar önemli oranda artmıştır. Ancak halen mevcut işlemlerde ilerleme gerekmektedir. İmmobilize enzimlerin diğer pratik işlemlere uygulanabilirliğini artırmak için yeni metodolojilerin geliştirilmesi ve mevcut tekniklerin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

**Çizelge 1.1** İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri [45]

<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Katalizin tekrar kullanımı	Aktivitede kayıp veya azalma
Kolay reaktör kullanımı	Difüzyonel sınırlama
Kolay ürün ayrılması	İlave maliyet
Geniş oranda reaktör seçimi	

**Çizelge 1.2** İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler [47]

<b>Enzim</b>	<b>Ürün</b>
Glukoz izomeraz	Yüksek miktarda fruktoz şurup
Aminoasit amidaz	Aminoasit ürünü
Penisilin amidaz	Yarı sentetik penisilin
Nitril hidrataz	Akrilamid
$\beta$ -Galaktosidaz	Laktoz hidrolizinde

### **1.3.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihi**

İmmobilize biyokatalizörlerin gelişimini üç adımda göstermek mümkündür (Çizelge 1.3). İlk adımda, 19. Yüzyılın başlangıcında, immobilize edilmiş mikroorganizmalar pekçok deneysel çalışmalarda kullanılmışlardır. Bu çalışmalardan bazıları, sirkenin mikrobiyal ürünü ( bakterilerle oluşmuş ağaç talaşının üzerine alkol içeren solusyonların damıtılması vasıtasıyla) ve atık su arıtma filtreleri veya süzme işlemleridir [49].

Modern enzim immobilizasyonuna bakmak için 1940'ların sonlarına gitmek gerekir. Ancak o dönemde yapılan pekçok araştırma farklı sistem ve düzenlerde yayınlanan çalışmalar olduğu için pek çoğu biyokimyacılar tarafında önemsenmez. Güncel teknolojilerin temelleri 1960'larda geliştirilmeye başlanmış ve bu tarihten itibaren bu konuyla alakalı pekçok makale yayınlanmıştır. İkinci adımda, sadece immobilize edilmiş tek enzimler kullanılmış ancak 1970'lerde çok daha canlı hücreler ve kofaktör rejenerasyonu ile iki enzim reaksiyonları içeren son derece kompleks sistemler geliştirilmiştir. Son adıma örnek olarak  $\alpha$ -keto asitlerden stereoselektif aminasyon reaksiyonu ile L-aminoasit dehidrogenaz enzimi kullanılarak L-aminoasit ürünlerinden bahsedebiliriz. Bu yöntem nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve koenzimlerin rejenerasyonunun formik asidin, karbon dioksit enzimatik oksidasyonuna,  $NAD^+$  dan  $NADH$ 'a indirgeme reaksiyonu eşlik eden aminasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ikinci enzim, format dehidrogenazdır [50].

**Çizelge 1.3** Immobilize enzimlerin tarihsel basamakları [49]

Basamak	Tarih	Kullanım
<b>Birinci</b>	1815	Asetik asit ve atık su arıtma işlemleri gibi deneysel kullanım işlemleri
<b>İkinci</b>	1960 larda	Tek enzim immobilizasyonu, L-aminoasitlerin ürünü, glikozun izomerizasyonu
<b>Üçüncü</b>	1988-1998	Kofaktör rejenerasyonu içeren çoklu enzim immobilizasyonu ve hücre immobilizasyonu

Bir enzim immobilizasyon sisteminde temel bileşenler; enzim, matriks ve enzimin matrikse bağlanma yöntemidir. Katı-faz destek, taşıyıcı ve matriks eş anlamlı olarak kullanılır.

### 1.3.2 Taşıyıcı Seçimi

Matriksin niteliği, immobilize enzim sistemlerinin tasarlanmasında son derece önemlidir. İdeal bir taşıyıcıda genel olarak; basınca karşı fiziksel direnç, biyolojik uygunluk, mikrobiyal ataklara karşı direnç, hidrofilik olması, enzimin seçiciliğini artırma, ürün inhibisyonunu düşürme gibi özelliklere sahip olabilmelidir [51].

Taşıyıcılar kimyasal bileşimlerine göre organik veya anorganik olarak sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.4). Organik taşıyıcılar organik ve sentetik olarak alt gruplara ayrılırlar.

Matriksin fiziksel özellikleri (ortalama tanecik çapı, şişme davranışı, mekanik direnç ve basınç altındaki davranışı) immobilize enzimlerin performansında son derece önemlidir. Bunun yanında immobilizasyon işleminin belirlenmesi için kullanılacak reaktör türünün belirlenmesinde (karıştırma, sabit veya akışkan tank) fiziksel özelliklerin oldukça önemi vardır [52].

Özellikle toplam yüzey alanını belirlemede gözenek parametreleri ve tanecik boyutu önemlidir. Gözeneksiz taşıyıcılarda oldukça az difüzyonel sınırlandırılmalar gözlenir ancak bağlanma kapasiteleri düşüktür. Bu yüzden genellikle gözenekli taşıyıcılar tercih edilir çünkü yüksek yüzey alanı çok daha fazla enzimin bağlanmasını sağlar ve immobilize enzimi çevresel şartlardan oldukça fazla korur. Gözenekli taşıyıcılar için, akış özellikleri ve kapasiteyi optimize etmek için gözenek dağılımını kontrol altında tutmak oldukça önemlidir [53]. İnorganik taşıyıcıların pekçok avantajlarına rağmen (örneğin, fiziksel, kimyasal veya mikrobiyal indirgemelere karşı yüksek stabilite), pekçok endüstriyel uygulamalarda organik matriksler kullanılır. Bir immobilize enzimin aktivite seviyesinin belirlenmesinde hidrofilik karakterin son derece önemli bir parametre olduğu unutulmamalıdır.

#### Çizelge 1.4 Taşıyıcıların sınıflandırılması [52]

---

##### Organik

---

###### Doğal polimerler

- Polisakkaritler, selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, alginat
- Proteinler, kollogen, albumin
- Karbon

###### Sentetik Polimerler

- Polistiren
  - Diğer polimerler: poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamidler, poliamitler, vinil ve allil polimerler
- 

##### İnorganik

---

Doğal mineraller: Bentonit, silika

Cam (gözeneksiz ve kontrol edilmiş gözenekli), metaller, kontrol edilmiş gözeneklere sahip metal oksitler

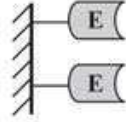
---

Yaygın olarak kullanılan en önemli taşıyıcılardan birisi agarozdur. Yüksek gözenekli yapısına ilaveten, proteinler için yüksek kapasite sağlarlar. Matriks olarak agarozu kullanmanın bazı diğer avantajları; hidrofilik karakterde olması, türevlerine dönüştürmenin kolay olması, yüklü grupların olmaması (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu engellemek için) ve ticari geçerliliğidir. Ancak diğer gözenekli yapılarda ve agarozun kullanımında yüksek maliyet önemli derecede sınırlanmaya neden olur. Bu problem, matriks rejenerasyonu ve tekrar kullanımına izin veren dönüşümlü metodların geliştirilmesiyle ancak çözülebilir [54].

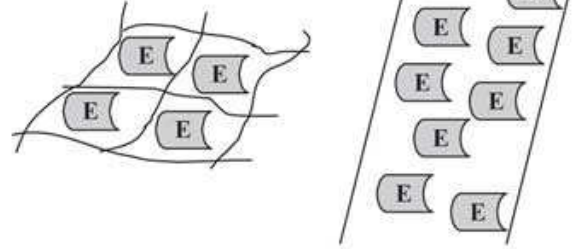
Enzimlerin taşıyıcılara bağlanması, dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağdan stabil kovalent bağa uzanan etkileşimlerle olur. İmmobilize enzimlerin

sınıflandırılmasında çeşitli yaklaşımlar vardır ve bunlardan biriside onları iki ana katagoriye ayırmaktır. Bunlar dönüşümlü ve dönüşümsüz metodlardır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın gücü genellikle geri dönüşümlü olması ile ters orantılıdır. Bu iki zıt amacı ( kararlılık ve dönüşümlü olması) aynı anda yerine getirmek oldukça güçtür. Bu metodları tasarlarken geleneksel yaklaşım geri dönüşümün bağın gücünün fazla olması yanında ihmal edilebileceği eğilimindedir yani bağın gücünün olabildiğince fazla olması tercih edilir. Dönüşümlü ve dönüşümsüz reaksiyonlar Şekil 1.5 ve 1.6’da gösterilmiştir [55].

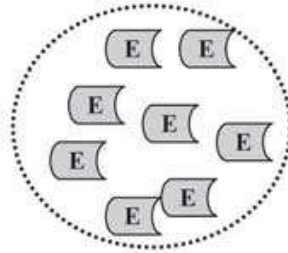
❖ Kovalent Bağlanma



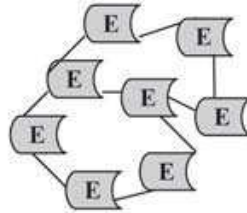
❖ Tutuklama



❖ Mikrokapsülleme

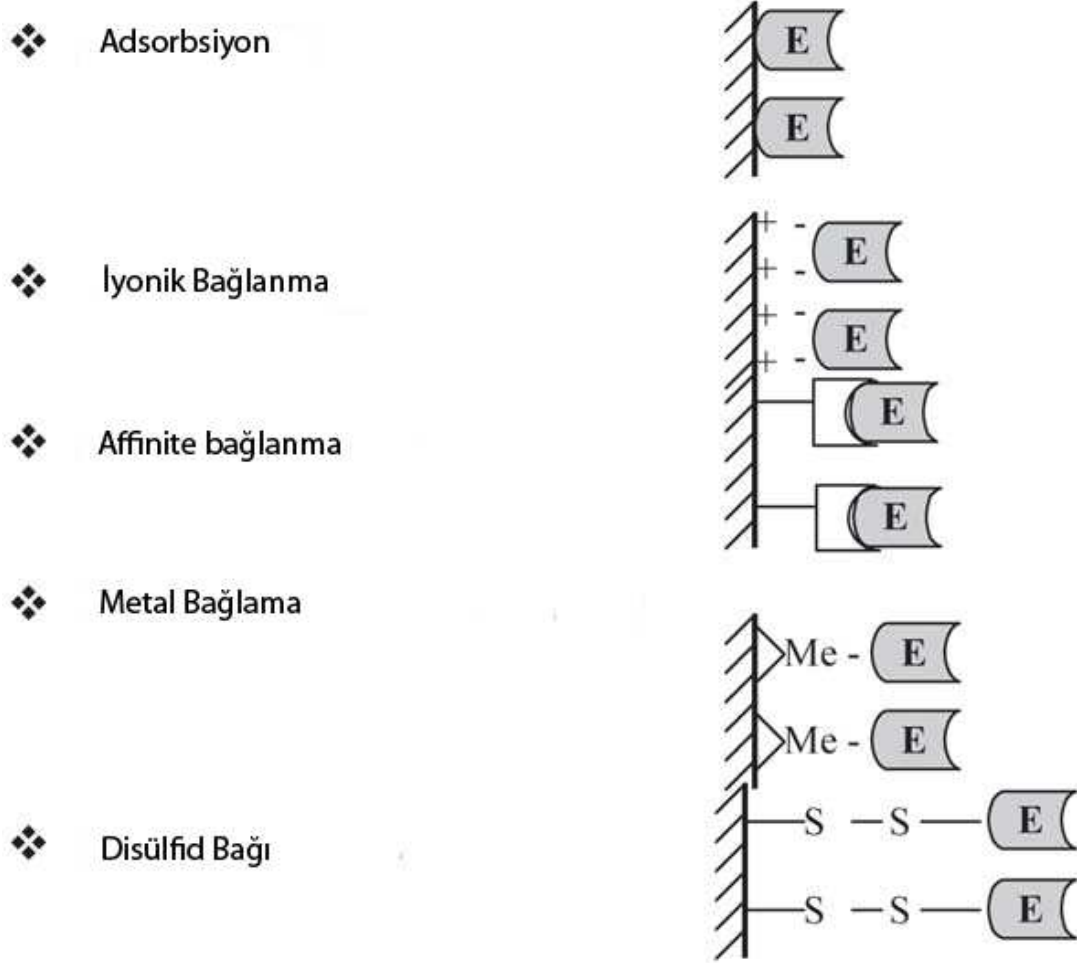


❖ Çapraz bağlama



**Şekil 1.5** Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yaklaşımları [55]





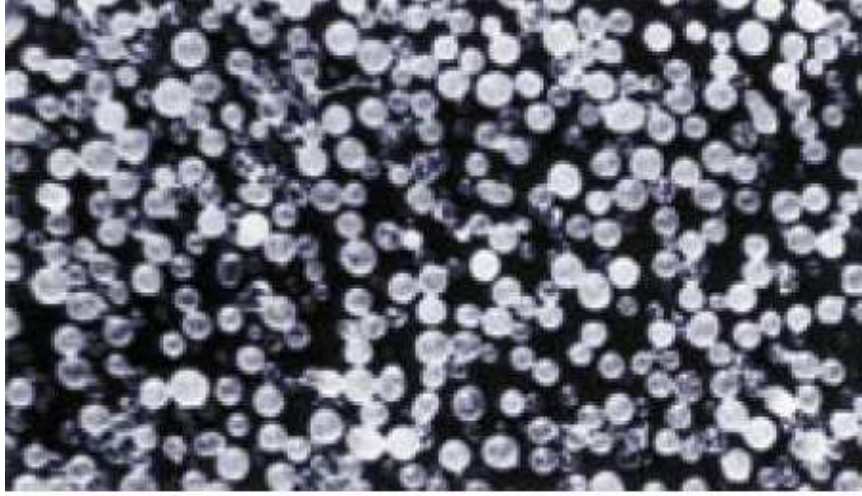
**Şekil 1.6** Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yaklaşımları [55]

### 1.3.3 Biyokataliz Uygulamaları İçin Taşıyıcı Boncuk Eupergit®

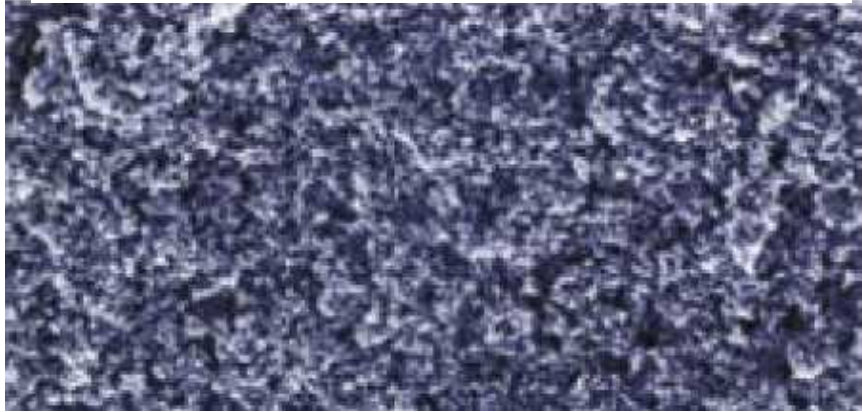
Eupergit, enzimlerin kovalent bağlanmaları için kullanılan endüstriyel taşıyıcı olarak kullanılabilen kanıtlanmış boncuk biçiminde materyaldir. Eupergit'e yapılan enzim immobilizasyonunda verim önemli ölçüde arttığı için endüstriyel biyokatalizlerin ekonomik olarak uygulanabilmesi zorunluluğu ilkeside karşılanmış olur [56].

### 1.3.3.1 Morfolojisi

Eupergit kuru boncuk şeklinde elde edilir. Bu boncuklar gözenekli yapıya sahip olduğundan enzimin bağlanması için yüzeyde önemli ölçüde bağlanma bölgeleri oluşturur. Eupergit'in gram boncuk başına 140 mg. dan fazla enzim proteinini bağlayabilir [57].



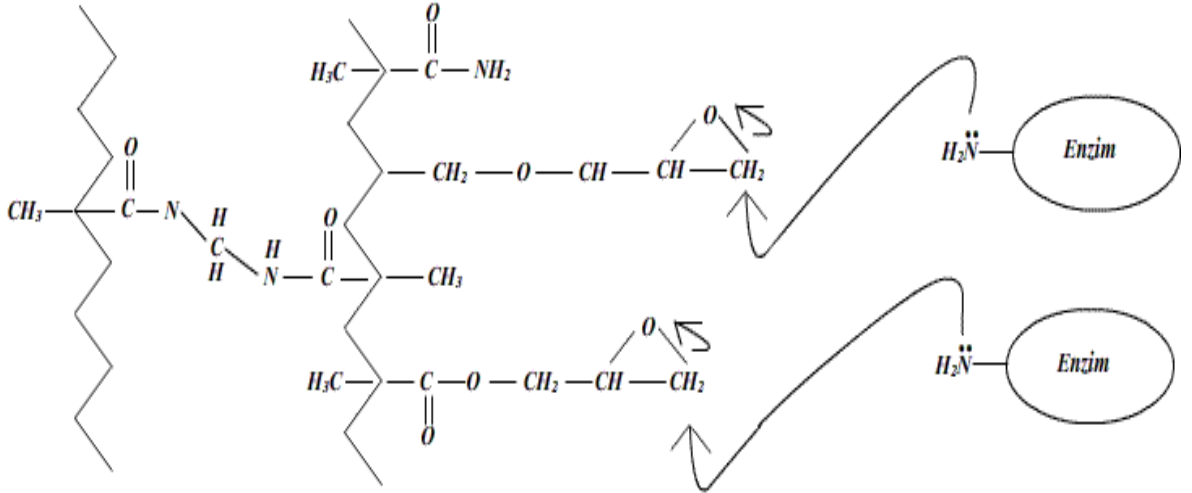
Şekil 1.7. Eupergit'in ışık mikroskopundaki görüntüsü [58]



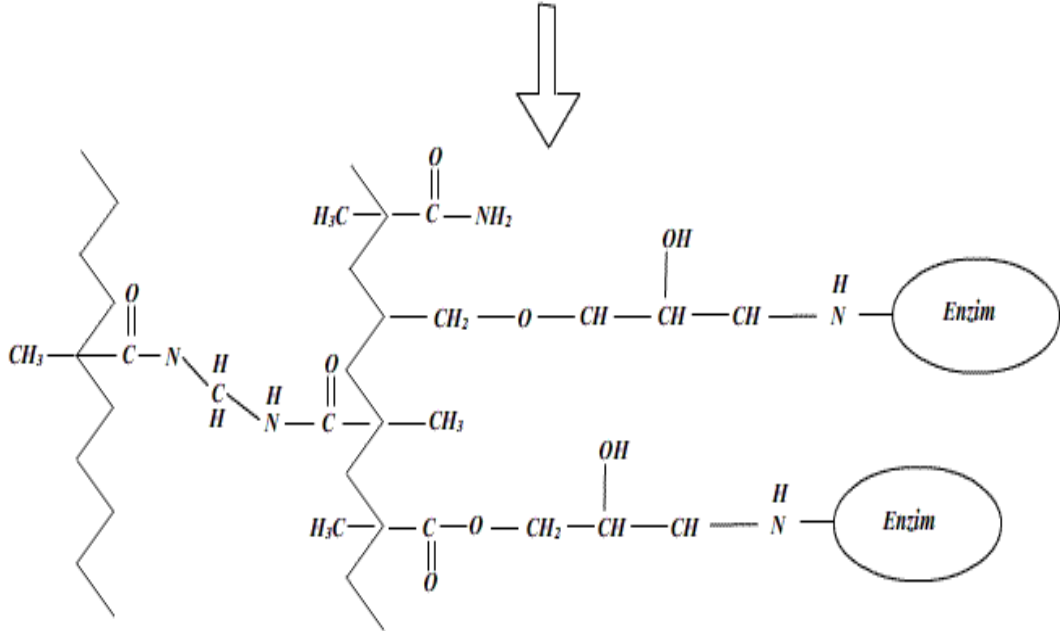
Şekil 1.8. Eupergit'in elektron mikroskopundaki görüntüsü [58]

### 1.3.3.1 Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu

Eupergit, metakrilamit, N,N-metilen-bis-(metakrilamit) ve oksiran grupları içeren iki monomerden oluşur. Oksiran grupları enzimlerin amino ve sulfidril gruplarına karşı oldukça reaktiftir [59].



*N,N-metilen-bis-(metakrilamit), glisidil metakrilat, alil glisidil eter ve metakrilamit kopolimeri*



**Şekil 1.9** Eupergit'in reaksiyon mekanizması [59]

Bununla beraber eupergit önceden aktifleştirilmiş hazır kullanılabilir bir üründür. Geniş pH aralıklarında sulu, alkollü, keton, eter ve hidrokarbon içeren ortamlarda oldukça stabildir [60].

## **1.4 İmmobilizasyon Metodları**

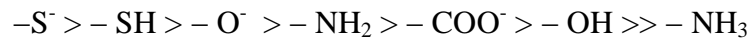
### **1.4.1 Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları**

Dönüşümsüz immobilizasyon kavramı biyokatalizlerin taşıyıcıya bağlanmasından sonra enzimin yada taşıyıcının biyolojik aktivitelerinin bozulmadan ayrılmayacağı esasına dayanır. Dönüşümsüz enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan prosedürler: kovalent bağlanma, tutuklama veya mikrokapsülleme ve çapraz bağlama olarak ifade edilebilir [61].

#### **1.4.1.1 Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu**

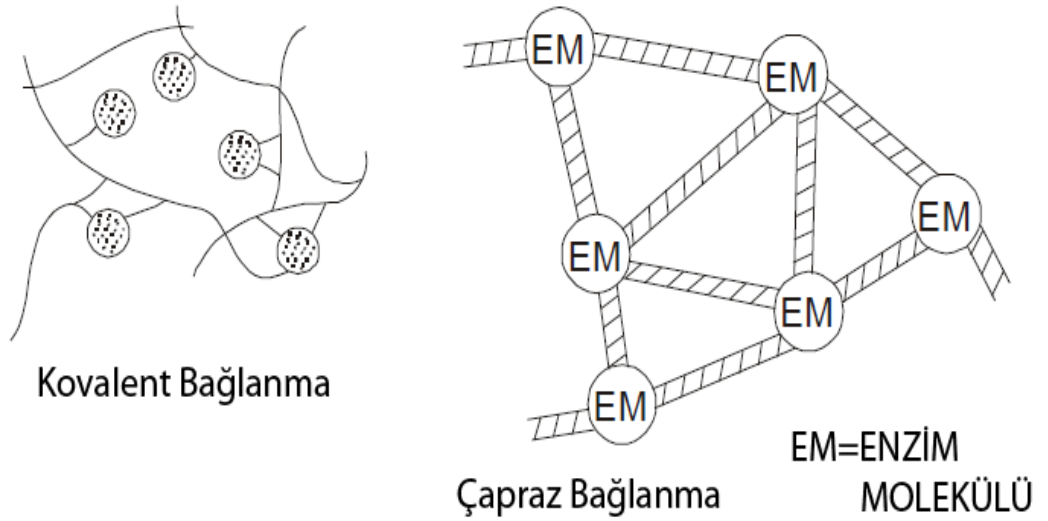
Kovalent bağlı metodlarla proteinlerin immobilizasyonu, immobilizasyon metodları içerisinde en fazla kullanılan metodlardan birisidir [62]. Bu metodu kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiliye geri kaçışı önlenmiş olmaktadır [63]. Ancak bağlanma aktivite yüzdesini artırmak için kullanılan temel amino asit rezidülerinin taşıyıcıya kovalent bağlanması engellenmelidir. Bu durum bazı durumlarda uygulamanın ne kadar zor şartlar gerektirdiğini gösterir [64].

Kovalent bağların formasyonu genellikle enzimde gösterilen aminoasitlerin yan zincirlerinde görülür. Ancak onların asıl bağ güçlerinin aktiviteleri aşağıda verilen yüklerin sıralamasıyla önemli derecede ilişkilidir:



Bunun yanında sülfid, sülfidril, oksit, amino, karboksil, hidroksil, amonyum, imino, amid, metiltiyol, guanidil ve fenol halkası gibi pekçok fonksiyonel grup içeren parçalar kimyasal bağlarda etkin olarak görev alır [65].

Bir enzimin kovalent bağlanması, ya polimerin reaktif gruplar içeren ajanlarla (etilenin kopolimerizasyonu, maleik asidin anhidridi) veya polimer ve enzimin arasında köprü vazifesi görececek iki fonksiyonlu ajanların etkileşmesiyle oluşur [66]. Bunun yanında üç boyutlu yapı düşük molekül ağırlıklı iki fonksiyonlu ajanlarla çapraz bağlı yapılar oluşturabilir. Bu durumda enzim inaktif olabilir. Çünkü reaksiyonlar enzimin aktif bölgesinde yerleşmiş olan fonksiyonel gruplarla bağ oluşturabilir. Böylece elde edilen net sonuç enzimin aktivitesinin kaybı şeklindedir [67].



**Şekil 1.10** Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlanma gösterimi [65]

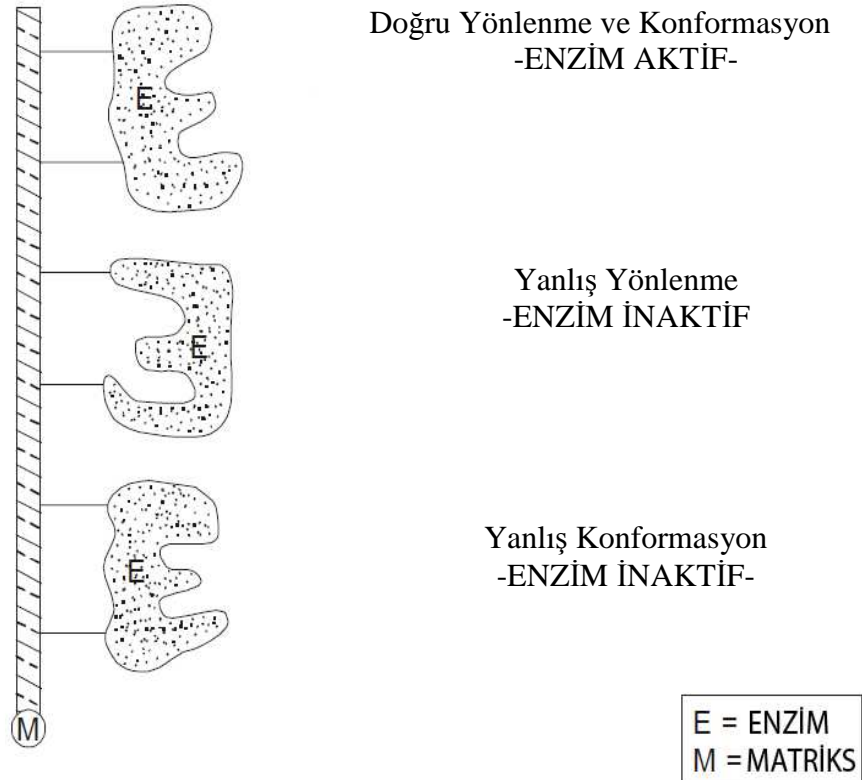
#### 1.4.1.1.2 Kovalent Bağlanmanın Avantajları

Enzim immobilizasyonunda kovalent bağlanmanın bazı önemli avantajları aşağıda sıralanmıştır:

1. Enzimlerin taşıyıcı matrikse adsorpsiyonu oldukça uygundur. Bundan dolayı yaygın şekilde kullanılması [68]
2. Geniş spektrumlarda bağlanma reaksiyonları, pekçok fonksiyonel grup içeren taşıyıcılarla sağlam bir bağın oluşumu ve bağlanmadan sonra enzim aktivitesinin devam etmesi [69],
3. Kovalent bağlı tutunma pH, iyonik şiddet ve substrat ile geriye dönüş reaksiyonunun olmaması [70].

#### 1.4.1.1.3 Kovalent Bağlanmada Aktivite Kaybı

Kovalent bağlı bir şekilde immobilizasyon gerçekleştiğinde enzimde belli dereceye kadar aktivite kaybı gözlenebilir. Bu da enzimdeki spesifik aktif bölgenin taşıyıcıyla etkileşmesi sonucunda olur [71].



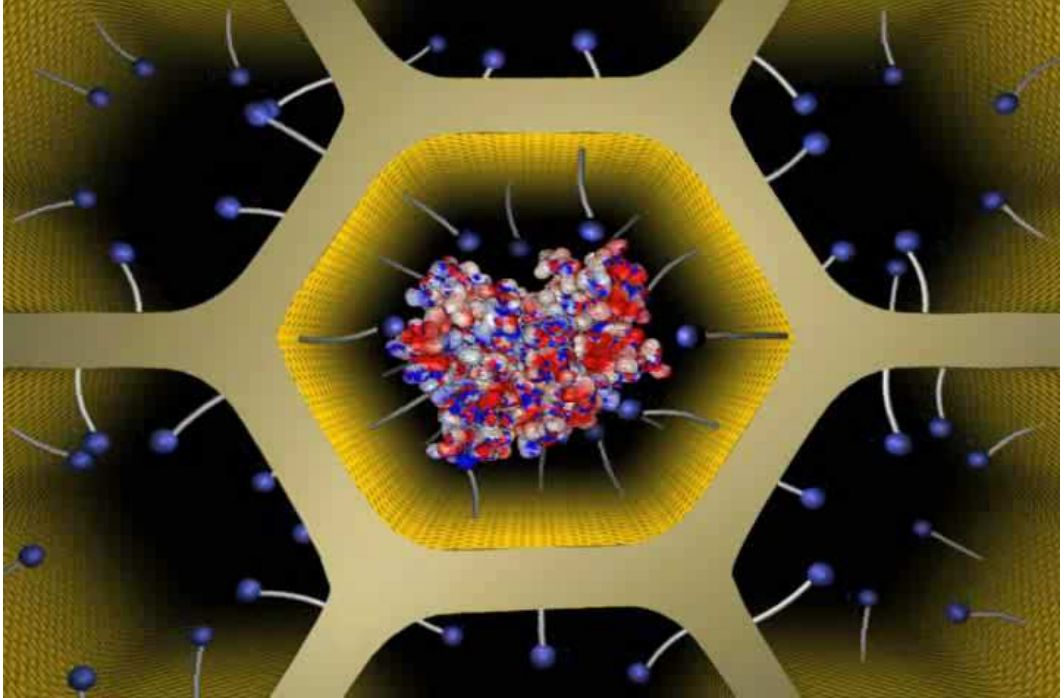
**Şekil 1.11** Kovalent bağın enzim aktivitesi üzerine olası etkileri [65]

Bir diğer önerilen düşünce tarzında ise enzim immobilizasyonundaki yönlendirme etkisiyle oluşan durumda aktif bölgenin durumu oldukça önemlidir. Bu durum enzimde aktiviteyi azaltabileceği gibi aktivitenin tamamen kaybolmasınada neden olabilir [72]. Ancak özellikle yönlendirme etkisiyle aktivite kaybını en aza indirebilmek için aşağıdaki metodlar yapılabilir:

- a) Enzim immobilizasyonu sadece doygun substrat konsantrasyonunda
- b) Yarışmalı inhibitör kullanılarak gerçekleştirilebilir [73].

#### 1.4.1.2 Tutuklama İmmobilizasyonu

Tutuklama metodu; enzimin bir polimerik ađ içerisinde yerleştirilmesi durumunda enzim ve ürünü geçirebilmesi ancak enzimi tutması prensibine dayanır [74]. Bu metod yukarıda bahsettiğimiz kovalent bağlanma metodundan farklı olarak matrikse ve membrana bağlanmasını engeller. Enzimlerin tutunmasıyla alakalı farklı yaklaşımlara örnek olarak jel veya life tutuklama ve mikro kapsülasyon örnek olarak verilebilir [75].



Şekil 1.12 Tutuklama immobilizasyonunun gösterimi [76]

## **1.4.2 Dönüştümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları**

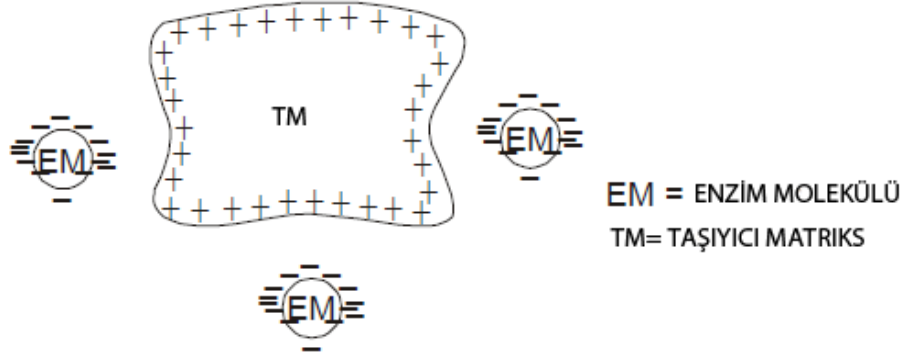
Dönüştümlü immobilize enzimler, enzim-taşıyıcı bağının türünden dolayı ılıman koşullar altında taşıyıcıdan ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için dönüştümlü metodların kullanımı ekonomik nedenlerden dolayı oldukça kullanışlıdır çünkü enzimin aktivitesi düştüğünde taşıyıcı rejenere edilip taze, kullanılmamış enzim ile tekrar bağlanabilir. Aslında, taşıyıcı masrafı bütün immobilize edilmiş katalizörlerin masraflarında genellikle sık sık dikkat edilen temel faktördür. Enzimlerin tersinir reaksiyonu biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalarda özellikle değişken enzimler için son derece önemlidir [77].

### **1.4.2.1 Adsorpsiyon (Kovalent olmayan etkileşimler)**

#### **1.4.2.1.1 Nonspesifik Adsorpsiyon**

En basit immobilizasyon yöntemi olan nonspesifik adsorpsiyon genel olarak fiziksel adsorpsiyon veya iyonik bağlanma temeline dayanan bir metoddur [78]. Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonunda hidrojen bağlanma, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler matrikse bağlanmada etkilidir. Oysaki enzimlerin iyonik bağlanmasında tuz köprüleriyle bağlantı görülür [79]. Kovalent olmayan immobilizasyonda, bağın gücünün kuvveti, reaksiyon şartlarını değiştirerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık, solvent polaritesi) değiştirebilir [80]. Adsorpsiyon ile immobilizasyon ılıman koşullarda, uygulanması kolay ve genellikle enzimin katalitik aktivitesi korunur. Bu tür metodlar bu nedenlerden dolayı ekonomik olarak ilgi çekici ancak etkileşimler nispeten zayıf olduğundan, matriksden enzim kaçıışı olabileceği problem teşkil etmektedir [81].





**Şekil 1.13** Nonspesifik adsorpsiyon immobilizasyonunun gösterimi [82]

#### 1.4.2.1.2 İyonik Bağlanma

Enzimlerin dönüşümlü immobilizasyonuna, kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşmesi prensibine dayanan yaklaşım örnek olarak verilebilir [83]. Enzimlerin dönüşümlü immobilizasyonunda kromatografik prensiplerin ilk uygulamalarından birine örnek olarak iyon değiştiricilerin kullanımı örnek olarak verilebilir. Metod basit ve dönüşümlüdür fakat genel olarak enzimlerin bağlarının güçlü olması ve tam olarak aktif oldukları koşulları bulmak oldukça zordur [84]. Özellikle son zamanlarda immobilize polimerik iyonik ligandların kullanımı, protein-matriks etkileşimlerin modülasyonu ile yapılan pek çok çalışma vardır ve böylece türevlerinin özelliklerini daha verimli hale getirebileceği görülmüştür [85]. Enzimlerin geniş çeşitlilikte polietilenimin kullanımı oldukça fazla sayıda patent olarak kayıt edilmiştir.

Ancak, ürün ve substrat yüklü aşırı yüklü olduğunda, aşırı yüklü bileşenlerin kullanımı problemleri ortaya çıkabilir. Bu nedenle, enzimin özellikleri, optimum pH ve pH stabilitesi değişebilir. Bu durum uygulamaya bağlı olarak problem gibi görünmesine rağmen enzimin daha alkali veya asidik durumlarına karşı optimal durumlarını değiştirmede yardımcı olur.

#### **1.4.2.1.2 Hidrofobik Adsorpsiyon**

Bir diğer yaklaşımda hidrofobik etkileşimlerin kullanımınıdır. Hidrofobik adsorpsiyon 30 yıldan fazla süredir kromatografik prensiplerle kullanımı gerçekleşmiştir. Önemli deneysel parametreler olan pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklıkla oldukça ilişkilidir. Etkileşimlerin gücü, protein ve adsorbentin hidrofobisitesine dayanır [87]. Adsorbentin hidrofobisitesi, hidrofobik ligand molekülünün boyutuyla ve taşıyıcının yer değiştirme derecesiyle düzenlenebilir.  $\beta$ -amilaz ve amiloglukosidaz'ın hidrofobik adsorpsiyon immobilizasyonuna örnek olarak verilebilir. Bunun yanında hidrofobik adsorbentlere dönüşümlü bağlanmanın pekçok örnekleri rapor edilmiştir [86].

#### **1.4.2.1.2 Afinite Bağlanma**

Komplementer biyomoleküller arasında afinitenin prensibi enzim immobilizasyonu ile ifade edilmektedir. Etkileşimlerin önemli oranda seçiciliği metodun önemli özelliğindedir. Ancak, metodun pahalı afinite ligandının matrikse kovalent bağlanması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır [88].

### **1.5 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi**

İmmobilizasyon metodunun başarılı olmasının derecesi enzim ile reaksiyonun yürütüleceği koşulların kararlılığı önemlidir [89]. İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde sürekli katalizör olarak kullanılacağından immobilizasyon metodunun seçilmeden önce tepkimenin yürüyeceği ortam göz önüne alınmalıdır. Bunun yanında enzim aktivite kaybının en az olacağı immobilize yönteminde seçilmesi son derece önemlidir [65].

Farklı immobilizasyon metodlarının enzim aktivite etkisini aminosiklaz enzimi üzerinde yapılan çalışmanın sonucu Çizelge 1.5 de gösterilmiştir [41].

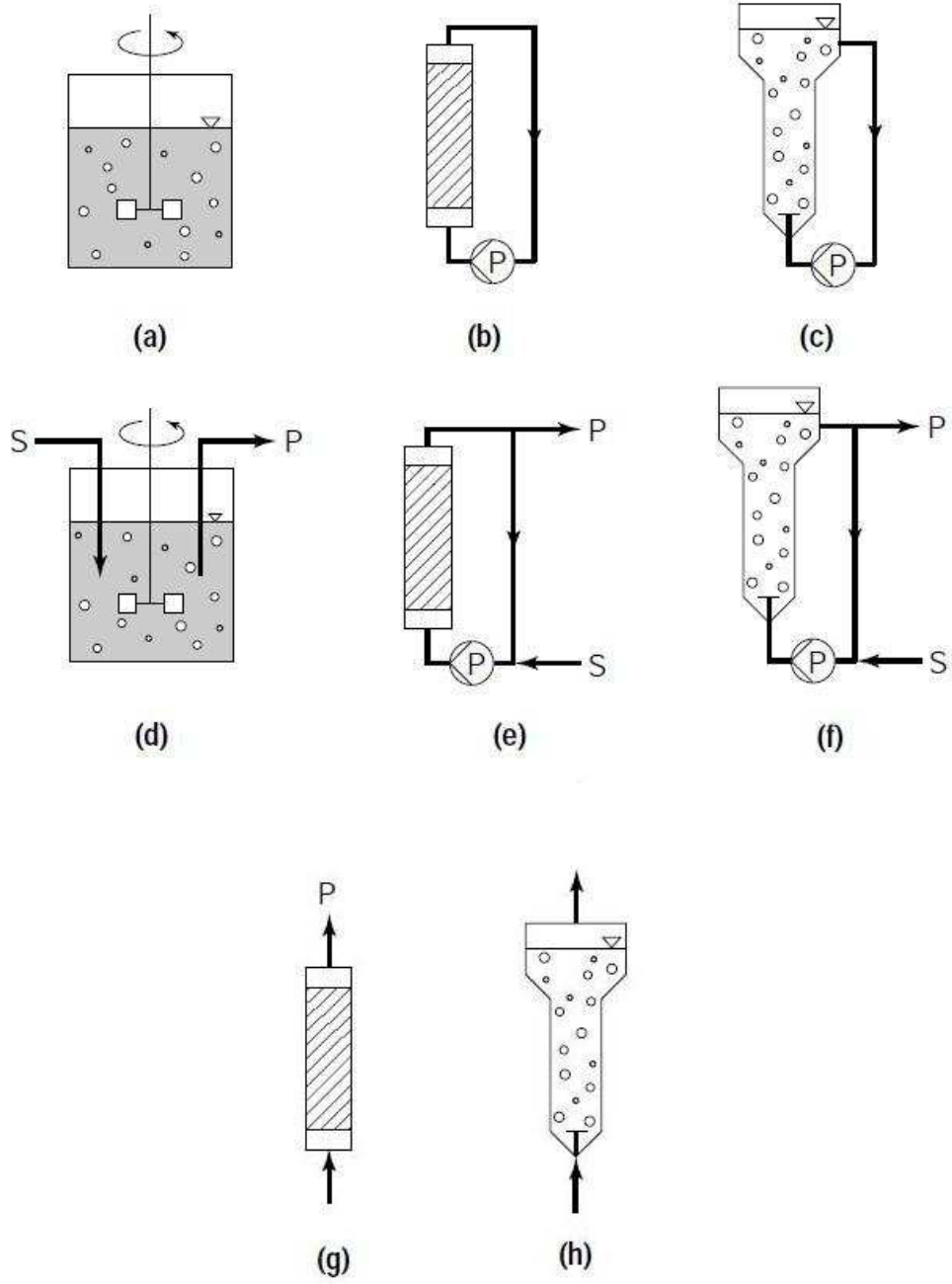
**Çizelge 1.5** İmmobilize yöntemlerine göre aktivitenin değişimi [41]

<b>Enzim</b>	<b>Taşıyıcı</b>	<b>Enzim immobilizasyon Metodu</b>	<b>Enzim Aktivitesinin devamlılığı (%)</b>
<b>Aminosiklaz</b>	AE-Selüloz	Çapraz Bağlanma	0.6
	CN-Br ile aktifleştirilmiş Sefadeks	Gluteraldehid Kovalent Bağlanma	1.0
	DEAE-Selüloz	İyonik Bağlanma	55
	Nylon	Enkapsülasyon	36
	Poliakrilamit	Tutunma	53

### **1.6 Enzim Reaktörünün Seçimi**

Enzim reaktörünün seçiminde enzimin sahip olduğu en yüksek aktivitede çalışmasının yanında bunun için uygun destek materyalinin seçimi oldukça önemlidir [90]. Dönüşümlü immobilizasyon proseslerinde reaktörde istenmeyen bir denge oluşursa en önemli problemlerden birisi bu dengenin bozulmasıdır [91].

Pekçok reaktör tipleri düşünülmüştür. Akış yönü yukarı olan paket tipi reaktör, substratın yukarıya ilerlediği asılı parçacıkların olduğu sıvı reaktör, basit karışan reaktör, tüp reaktör, membran reaktör v.s. (Şekil 1.14). Bunların pekçoğunda substratın sahip olduğu fiziksel özellikler önemli parametrelerdir. Bu sebepten dolayı ideal olarak reaktör içinde paketlenen bazı destek materyalleri basıncında etkisiyle yarı asılı sıvı yatak içinde enzimle kaplandıkları zaman kümeleşme oluştururlar. Buda yüzeyde meydana gelen azalmadan dolayı enzim aktivitesinin düşmesine neden olur [92-95].



**Şekil 1.14** İmmobilize enzimler için reaktörler. [(a-c) toplam geri karıştırma ile paket reaktörleri; (a) karıştırıcı tank reaktör; (b) sabit akışkan yatak reaktör (c) sıvılaştırılmış yatak reaktör. (d-f) tam geri karıştırma işlemi ile sürekli çalışan reaktörler (g-h) akış yönü yukarı olan paket tipi reaktör] [92-95]

## 1.7 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri

Enzim immobilizasyonunun sonucu olarak enzim molekülünün termal stabilitesi ve katalitik aktivitesi gibi bazı özellikleri, çözünebilir eşleniklerine göre değişiklik gösterebilir [96]. Özelliklerinin modifikasyonlarındaki değişimin nedeni, ya immobilize enzimin esas aktivitesindeki değişimle veya immobilize enzimle substrat arasındaki etkileşimin farklı olmasından kaynaklanır. İmmobilizasyonların katalitik özelliklerindeki gözlenen değişim proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki konformasyonlarındaki değişimle, enzim ve substrat arasındaki bağlanmayla ilgili olduğu düşünülmektedir [97].

Genel olarak enzimler immobilize edildiğinde, enzimin çalışma stabilitesi artırılır. Stabilizasyon kavramı, immobilizasyon enzimleri için son derece önemli etkileyici bir güçtür. Pekçok durumda gözlenen operasyonel stabilizasyon, enzimin bağlanma sonucuyla ilgilidir. Ancak, moleküler seviyedeki doğru stabilizasyonun gösterilmesi, proteinlerin immobilizasyonunun multipoint kovalent bağlanması ile olabilmektedir [98]. Farklı metodların kullanımı ile ilgili pekçok bilimadamı tarafından gösterilen çalışmalarda stabilizasyon ve matrikse enzimin kovalent bağlarla bağlanma sayıları ile önemli bir bağlantı olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin kullanımı ile ilgili temel problemlerden birisi, özellikle enzimlerin makromoleküler substratlarıyla gösterdiği katalitik aktivitenin kaybıdır [99].

Enzimin aktif bölgesine substratların ulaşımının sınırlanmasından dolayı, substratın sadece yüzeydeki gruplara ulaşmasının sonucu olarak aktivite düşebilir. Bu sterik sınırlama zamanla makromoleküler substratlardan türeyen ürünlerin karakteristik özelliklerini değiştirebilir. Bu sterik problemlerden uzaklaşmak için pekçok strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; izole makromoleküler zincirlerin ağlarından oluşmuş taşıyıcıların seçimi, immobilize olacak enzim rezidülerinin dikkatli seçimi ve hidrofilik ve inert uzantı kollarının kullanılmasıdır [100].

## 1.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesine sahip paraoksonaz enzimini, enzim immobilizasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan Eupergit C 250 L'ye kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirmektir.

Bu yöntem, Eupergit C 250 L'nin hem kimyasal hemde kullanılabilirlik açısından son derece kararlı olmasından dolayı endüstriye uygulanabilir özelliğe sahiptir. Eupergit C 250 L kullanılan bütün reaktörlere uyum sağladığından, özel tip biyoreaktörlere de ihtiyaç duymaması açısından enzim immobilizasyon işlemlerinde oldukça cazip olmaktadır.

Kullandığımız bu yöntemin basit olması, immobilize enzimin sıcaklığa ve pH'ya karşı kararlılığının artması ve Eupergit C 250 L'nin sahip olduğu özellikler yöntemin uygulanabilirliğini arttırmaktadır.

Paraoksonaz'ın antioksidan etkisi canlı metabolizması son derece olduğu gibi, detoksifikasyon özelliği hem canlı hemde çevre ile ilgili son dere önemli bir özelliktir.

İmmobilizasyon işlemi ile kararlılığı arttırılmış paraoksonaz'ın canlılarda eksikliğin bulunması durumunda uygun reaktörler hazırlanarak bu eksikliğin giderilmesine imkan sağlanabilir. Bunun yanında detoksifikasyon özelliği örneğin atık suların temizlenmesi, hava ile ilgili toksik özelliği olan bileşiklerin uzaklaştırılması gibi çevre ile ilgili işlemlerde yine uygun reaktörler hazırlanarak toksik özelliği bulunan bileşikler ortamdaki uzaklaştırılabilir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1. MATERYALLER

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Triton X-100 Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie Brilliant Blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merk'den, Eupergit<sup>®</sup> C 250 L Röhm GmbH & Co. KG'den sağlanmıştır.

Araştırmada, Sığır serum paraoksonaz enziminin saflaştırılması için kan numuneleri Ağır Sanayi Bölgesi Kepsut yolu üzerindeki Balıkesir Belediye Mezbahası'ndan temin edilmiştir.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor

UV-Spektrofotometre (Plaka okuyucu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Peristaltik pompa	Atta SJ1211
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Laminar Flow	Telstar Bio IIA
Mikroskop	Nikon TE 2000-S
Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Thermo-block	Eliwell FALC
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

❖ *0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.0)*; 8,401g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

❖ *0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 8.8)*; 8,401 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.



❖ *0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6.0); 1,42 g (0,01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.*

❖ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1M**  
*(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0); 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.*

❖ **Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti: 1M NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu;** 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

❖ **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

❖ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** *0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8,0); 1.211 g (0,01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.*

❖ **Substrat çözeltisi:** *2 mM paraokson çözeltisi; 10,8 µl paraokson, 1 mL asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.*

❖ **Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** 2 mM  $CaCl_2$  içeren 100 mM tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol)  $CaCl_2$  katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

❖ **Tripsin/EDTA çözeltisi (TE);** %0,05 tripsin/ %0,02 EDTA (w/v) ve  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  içeren hazır çözelti şeklinde alınmıştır.

### **İmmobilizasyon İşlemi için kullanılan tamponlar**

❖ **0.1 M  $Na_2HPO_4$  tamponu (pH 8.0);** 14,2 g (0,1 mol)  $Na_2HPO_4$  950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 8.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

❖ **1 M NaCl çözeltisi;** 5,844 g (0,1 mol) NaCl 100 mL distile suda çözüldü.

❖ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

❖ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS-	1,0 g

❖ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1’de verilmektedir.

❖ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

❖ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

**Çizelge 2.1** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	<b>Ayırma Jeli</b>	<b>Yığıma Jeli</b>
	<b>%10</b>	<b>%3</b>
<p><b><u>Akril amid/Bis</u></b></p> <p>Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16,65	2,6 mL
<p><b><u>Distile su</u></b></p>	20,1 mL	12,2 mL
<p><b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b></p> <p>Tris-HCl 11.82 g alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	12,5 mL	–
<p><b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b></p> <p>Tris-HCl 3.94 g alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	–	5 mL
<p><b><u>% 10 'luk SDS</u></b></p> <p>SDS 1g alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0,5 µL	200 µL
<p><b><u>TEMED</u></b></p>	25 µL	20 µL
<p><b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b></p> <p>Amonyum persülfat 1g alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750 µL	400 µL

## **2.2. YÖNTEMLER**

### **2.2.1 Kan serumunun ayrılması**

Taze alınmış 1L kan numunesi, 2 saat boyunca pıhtılaşmaya bırakıldı. Daha sonra pıhtılaşmayan kısım alınıp 5000 rpm'de, +4°C'de ve 15 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -20°C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **2.2.2 Enzim Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon (100 mM tris-baz pH:8,00) + substrat (2 mM paraoxon) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikte sonra 412 nm'de 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoxonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

### **2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [101]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanacak enzim çözeltilerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

#### 2.2.4 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi

İmmobilizasyon verimi, enzim ve aktivite çiftlerinin ürünleriyle değerlendirilir. Enzim bağlanma ürünü,  $\eta_{enz}(\%)$  ve aktivite bağlanma ürünü  $\eta_{act}(\%)$  aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$\eta_{enz} = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$
$$\eta_{act} = \frac{SA_2}{SA_1} \times 100$$

$P_1$  olarak ifade edilen immobilize enzimin miktarı,  $P_0$  olarak ifade edilen serbest enzimin miktarıdır.  $SA_2$  immobilize enzimin spesifik aktivitesi ve  $SA_1$  olarak ifade edilen serbest enzimin spesifik aktivitesidir.

## 2.2.5 Enzimin saflaştırılması

### 2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

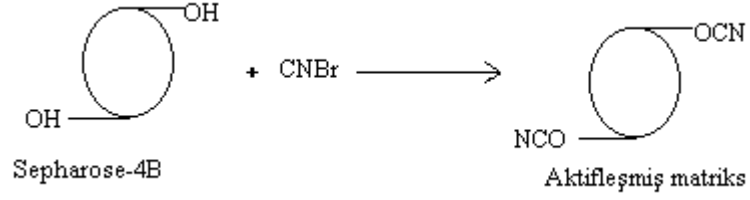
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimini saflaştırmak için % 60-80 amonyum sülfat doygunluğu aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralıkta elde edilen çökelti en ufak hacimdeki tamponda çözülerek aktivitesi ve protein miktarı tespit edildi.

### 2.2.5.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

#### 2.2.5.2.1 Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).

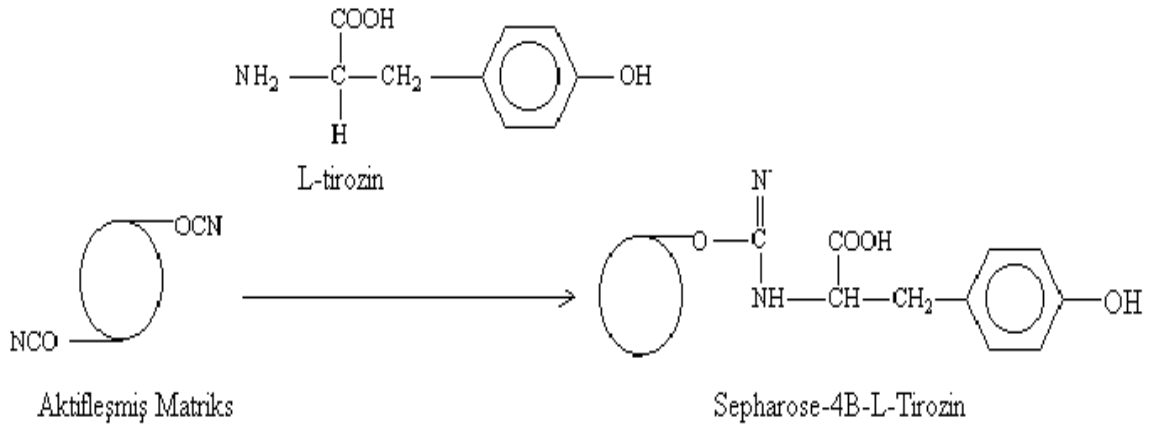


**Şekil 2.1** Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

#### **2.2.5.2.2 L-tirozinin Bağlanması**

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 2.2).

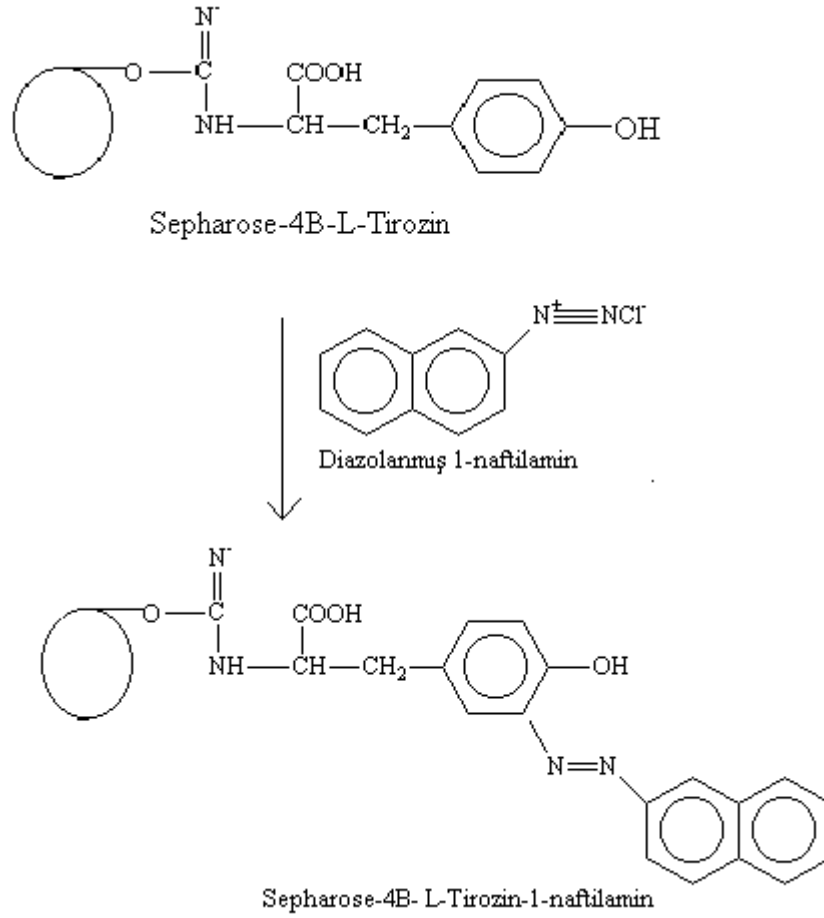




**Şekil 2.2** L-Tirozinin Bağlanması

### 2.2.5.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

25 mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, 1-naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave edilerek ısıtıldı) 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3** 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması

### 2.2.5.3 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (118.0 kDa), sığır serum albumin (79.0 kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0 kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları

belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

### **2.2.6 Saflaştırılan enzimin İmmobilizasyonu**

Enzimlerin Eupergit polimerindeki oksiran gruplarıyla bağlanmasındaki geleneksel enzim immobilizasyon metodu kullanıldı. Modifiye edilmemiş 500 mg Eupergit 15 cm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=8 tamponuyla +4 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süzüntüde bulunan ve Eupergit'e kovalent olarak bağlanmamış enzimin ayrılması için cam filtre kullanılarak süzüldü. Süzüntü kısımları Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu ve 1M NaCl ile yıkandı. (3x20 ml)

### **2.2.7 İmmobilize Enzim Aktivitesinin Sıcaklığa Bağlı Olarak Zamanla Değişimi**

Serbest paraoksonaz enziminin 38 °C'de en yüksek aktivite değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında paraoksonaz'ın 45 °C'de denature olduğu belirtilmiştir. İmmobilize edilmiş enzimle serbest enzimin aktivite değişiminin belirlenmesi için 25, 45, 65 °C sıcaklıklardaki sıcaklıklıklarda aktivitesinin 30 dakika arayla enzim aktivite ölçümü incelendi.

### **2.2.8 İmmobilize Enzim Aktivitesinin pH'ya Bağlı Olarak Değişimi**

Serbest paraoksonaz enzimi ile immobilize edilmiş enzimin farklı pH'lar ( pH= 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM tris-HCl tamponu) arasındaki enzim aktivite değişimi ölçüldü.

### 2.2.9 Optimum şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması

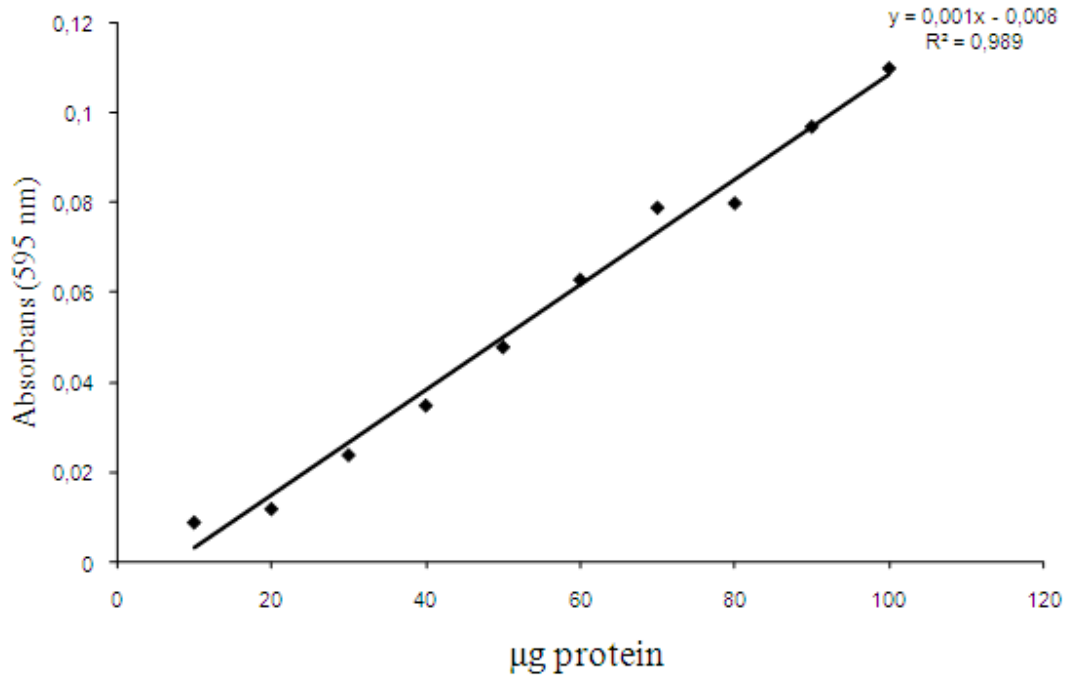
Hem serbest enzimin hemde immobilize edilmiş enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini tespit etmek amacıyla optimum şartlarda paraokson substratının yedi farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı.

$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk gafiği çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri gafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.3’de açıklandığı gibi hazırlandı. Saflaştırma basamakları sonundaki elde edilen enzim çözeltisinin ve immobilize enzimin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

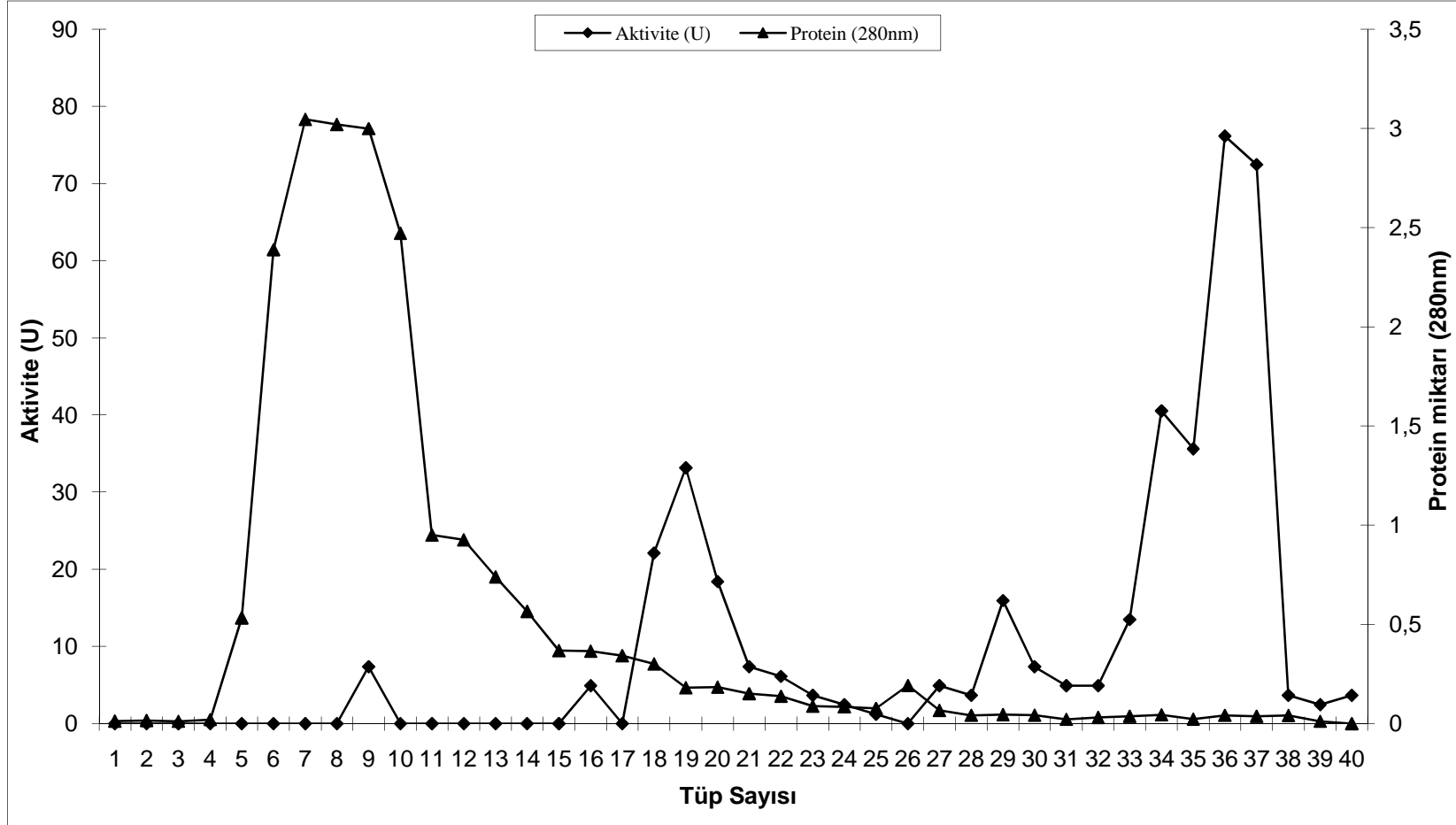


Şekil 3.1 Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

## 3.2 Enzimin Saflaştırılması

### 3.2.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

Bölüm 2.2.3.3.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Alttan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1,5 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm’deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 412 nm’de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.2). Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.1’de verildi.



Şekil 3.2 Hidrofobik etkileşim kolonundan paraoksonaz enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)

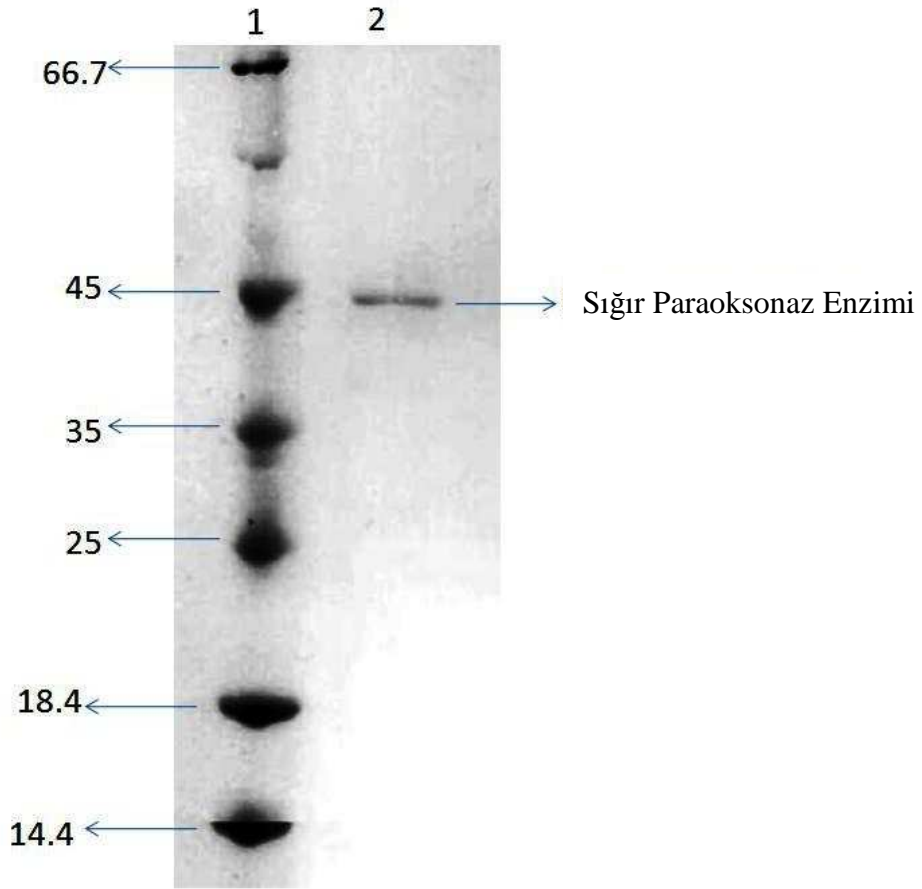


**Çizelge 3.1** Saflaştırma tablosu

<b>Basamak</b>	<b>Haci m (ml)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/ml)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	45	28.25	1271.25	287.15	12921.75	0.098	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	53	20.88	1106.64	152.24	9134.4	0.137	87.05	1.39
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	12	82.28	987.36	1,780	21.36	46.22	77,67	337.37

### 3.3 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

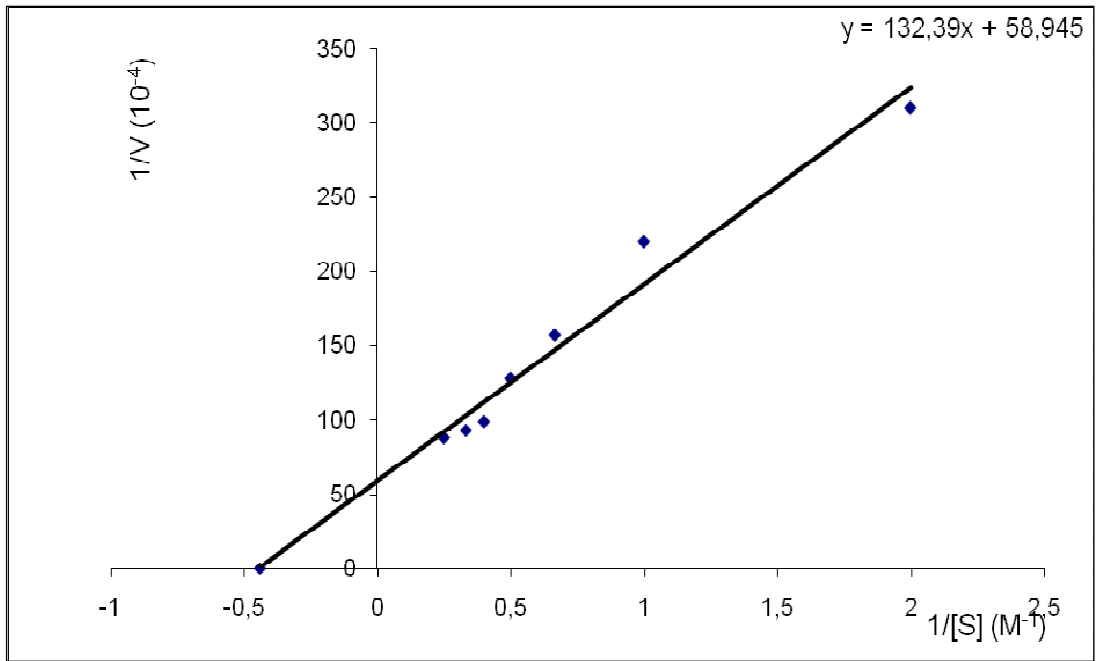
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektrofrezisi. Molekül ağırlık standartları; sığır serum albumin (66.7kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), Reaseβup98I (25.0kDa), β-laktoglobulin (18.4 kDa), lizozim (14.4kDa)

### 3.4 Serbest Enzimin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

Serbest enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm üç defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.4). Grafikten yararlanarak  $K_M$  değeri 6.261 mM ve  $V_{max}$  değeri 169.65 U/ml dakika olarak bulundu.



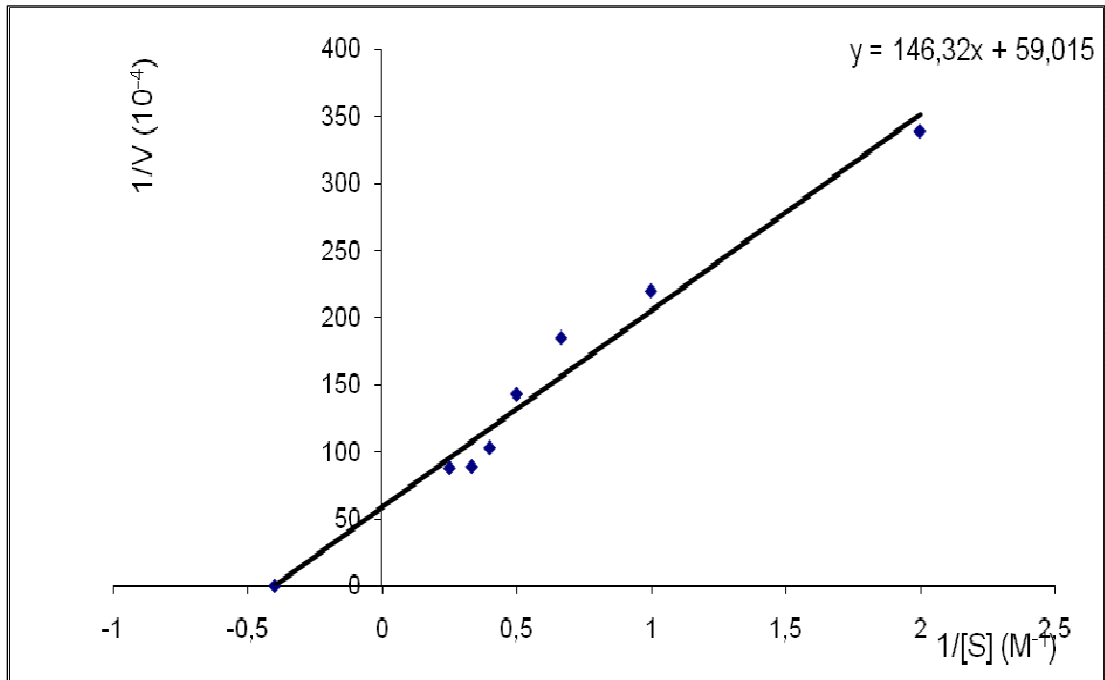
**Şekil 3.4** Saflaştırılmış sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.2** Sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$ .

<b>100mM Tris tamponu (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Enzim Çözeltilisinin Hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Substrat çözeltilisinin hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki toplam hacim (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)</b>	<b><math>\Delta</math>OD (412 nm)</b>	<b>Aktivite (U/ml dak)</b>	<b><math>1/V \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>1/[S]</math></b>
925		25		0.5	0.026	32.26	310	2
900		50		1	0.037	45.438	220	1
875		75		1.5	0.052	63.859	157	0.66
850	100	100	1050	2	0.063	78.12	128	0.5
825	100	125	1050	2.5	0.082	100.700	99	0.4
800		150		3	0.087	106.840	93	0.33
750		200		4	0.093	114.209	88	0.25
925		25		0.5	0.026	32.26	310	2

### 3.5 İmmobilize Enzimin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

İmmobilize enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm üç defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.5). Grafikten yararlanarak  $K_M$  değeri 2.479 mM ve  $V_{max}$  değeri 149.44 U/ml dakika olarak bulundu.



**Şekil 3.5** İmmobilize edilmiş sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.3** İmmobilize edilmiş serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$ .

<b>100mM Tris tamponu (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Enzim Çözeltilisinin Hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Substrat çözeltilisinin hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki toplam hacim (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)</b>	<b><math>\Delta</math>OD (412 nm)</b>	<b>Aktivite (U/ml dak)</b>	<b><math>1/V \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>1/[S]</math></b>
925		25		0.5	0.024	29.473	339	2
900		50		1	0.037	45.438	220	1
875		75		1.5	0.044	54.034	185	0.66
850	100	100	1050	2	0.057	69.999	143	0.5
825	100	125	1050	2.5	0.079	97.015	103	0.4
800		150		3	0.091	111.752	89	0.33
750		200		4	0.092	112.981	88	0.25
925		25		0.5	0.024	29.473	339	2

### 3.6 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi

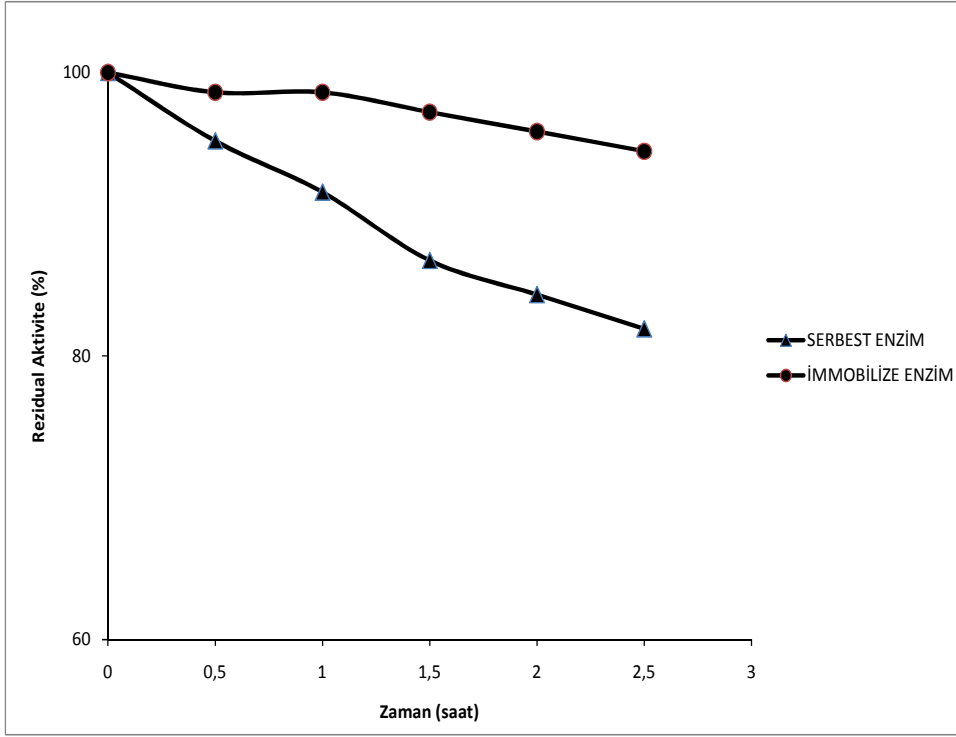
Enzim immobilizasyonunun verimin belirlemek amacıyla hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan saf paraoksonaz enziminin ve immobilize enzimin Bradford yöntemiyle protein miktarları ve spesifik aktiviteleri bölüm 2.2.4. de ifade edilen hesaplama yöntemiyle hesaplanmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 3.4** Eupergit C 250L taşıyıcısı üzerine immobilize edilmiş serum paraoksonaz enziminin bağlanma etkisi

İmmobilizasyon Taşıyıcısı	Enzim Bağlanması (mg g <sup>-1</sup> taşıyıcı)	Enzim Bağlanma Yüzdesi	Paraoksonaz Aktivitesi (IU g <sup>-1</sup> )	Spesifik Aktivite (IU mg <sup>-1</sup> )	Bağlanma Ürününün Aktivite yüzdesi
Eupergit <sup>®</sup> C250L	7.46	74.6	58.9	0.78	56.1

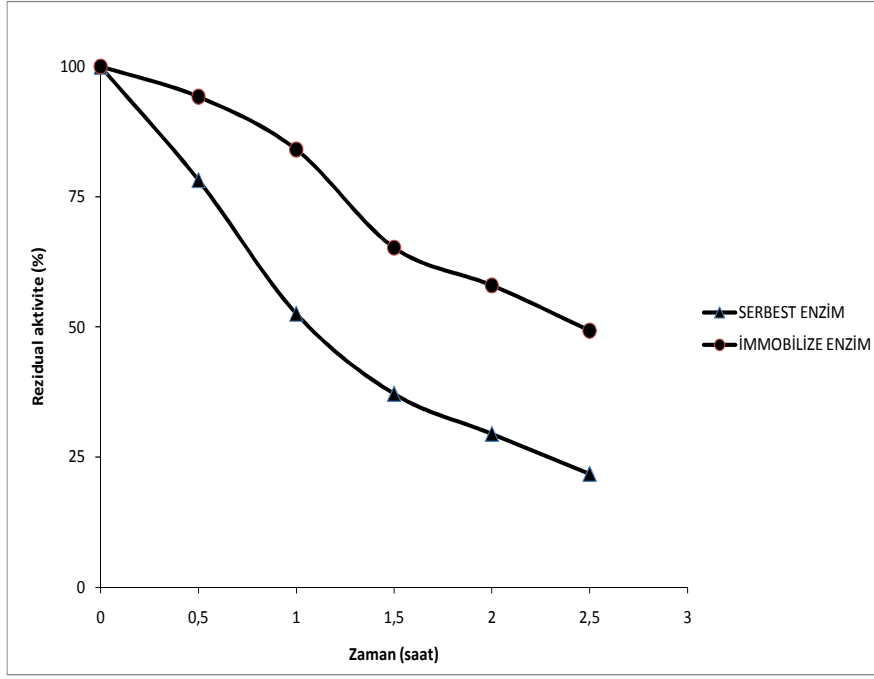
### 3.7 Aktivitenin Sıcaklıkla Değişimi

Sıcaklıkla saf enzimin ve immobilize enzimin zamanla değişimini belirlemek amacıyla bölüm 2.2.7 de anlatıldığı gibi uygulanmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

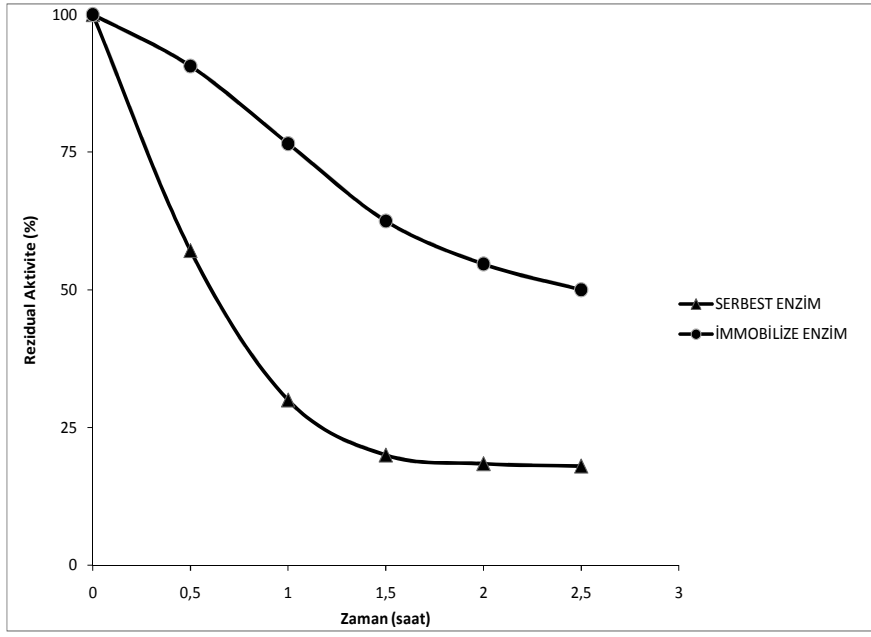


**Şekil 3.6** 25 °C’de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği





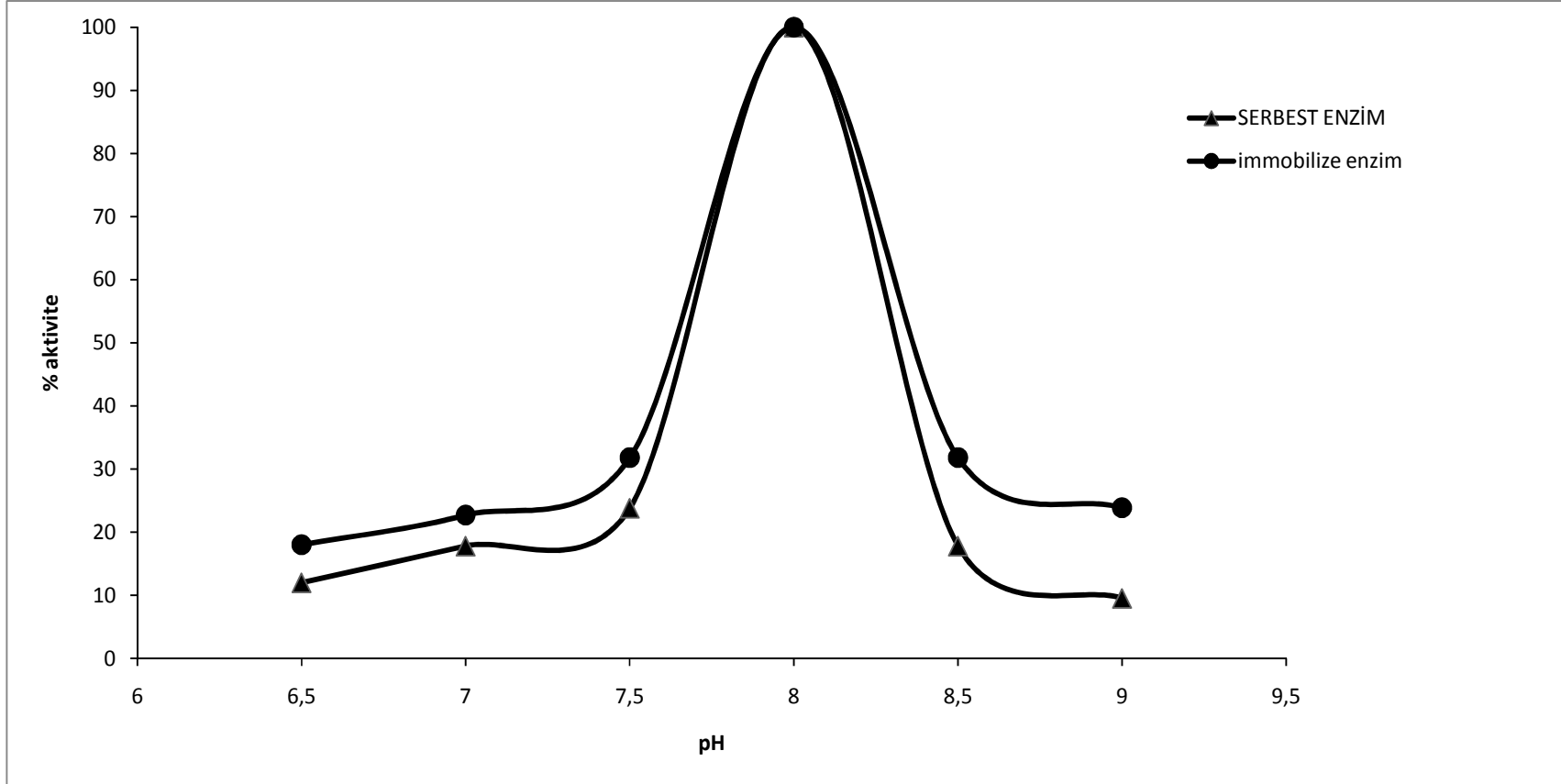
Şekil 3.7 45 °C’de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği



**Şekil 3.8** 65 °C’de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği

### 3.8 Aktivitenin pH ile Değişimi

pH’ın saf enzimin ve immobilize enzime etkisini belirlemek amacıyla bölüm 2.2.8 de anlatıldığı gibi uygulanmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.9 Aktivite(%) - pH grafiği

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, hem antioksidan hemde detoksifikasyon aktivitesine sahip olmasından dolayı metabolizmada önemli fizyolojik işleve sahip olmasının yanında özellikle detoksifikasyon aktivitesine sahip olmasından dolayı çevresel özelliklerindeki olabileceği düşünülen paraoksonaz enziminin immobilizasyonu için, hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması için jel sentezlendi. Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak sığır serumu saflaştırıldı ve daha sonra hem kimyasal hemde kullanılabilirlik açısından son derece kararlı olmasından dolayı endüstriye uygulanabilir özelliğe sahip olan Eupergit® C 250 L ile immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Paraoksonaz'ın hidrofobik özelliği bu tekniğin seçilmesinde en önemli etmenlerden birisi olmuştur. Paraoksonaz'da bulunan, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısında olan hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır [102]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca paraoksonaz'ın hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [103].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış 1-naftilamin bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Çalışmamızda CNBr ile aktifleştirme işlemi yalnızca 10 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu rapor edilmiştir. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [104].

Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [105]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [106]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. Paraoksonaz enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın ve immobilizasyon için kullanılan L-tirozinin söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaSCN}$  olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir.

Araştırmamızda paraoksonaz enzimini sığır serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi

yapılmıştır. Literatürde paraoksonaz enziminin en uygun amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak rapor edilmiştir.

Bu yöntemle sığır serumundan paraoksonaz enzimi 337 kat saflaştırılmıştır. Literatürde sığır serumundan saflaştırılma rapor edilmemiştir. Ancak sıçan ve tavşan karaciğer ve serumundan saflaştırılmıştır [105,106]. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL'ye bağlı olan paraoksonaz'ın izolasyonunda, Cibacron blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [107-109].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 45 kDa olarak tahmin edilen paraoksonaz enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. paraoksonaz'ın minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43kDa olarak belirlemişlerdir [109]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [110]. İçerdiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün paraoksonaz'ın çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [111]. Paraoksonaz'ın molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan, tavşan, sıçan ve koyunun paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı hemen hemen benzerlik göstermektedir [109].

Eupergit desteğe immobilizasyonunda Hernaiz ve Crout [115] ile Guisan ve ark. [116] tarafından belirlenen ve birçok araştırmacı tarafından da kullanılan standart yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre saflaştırılan enzimin Eupergit taşıyıcısına bağlanması alkali ve nötral ortamda gerçekleşmektedir. Eupergit taşıyıcısına herhangi bir modifikasyon uygulanmamaktadır.

Çalışmamızda taşıyıcı materyal olarak Eupergit® C 250 L kullanılmıştır. Enzimlerin Eupergite immobilizasyonu hem laboratuvar koşullarında hem de endüstriyel uygulamalarda kolay ve hızlıdır. Özel ekipman ve kimyasal madde

gerektirmemektedir. Standart yönteme göre tampon veya suda zlm enzim ile Eupergit boncuklar etkiletirilir ve oda sıcaklığında veya +4°C'de 12-72 saat bekletilir [116]. Eupergit, ucuz ve toksik etkisi görülmediğinden dolayı yiyecek ve ilaç sanayisinde kullanılan enzimlerin kovalent immobilizasyonunu sağlayan ve büyük ilgi gören bir destek materyalidir. 1000 L'den daha geniş substrat ve reaktör tanklarında 650 kullanımdan sonra dahi Eupergit taneciklerinde önemli bir aşınma gözlenmemektedir [117].

Literatürde Eupergit taıyıcıyla ilgili pekçok çalışma değişik enzimlere uygulanmıştır ancak sığır serum paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflatırılıp immobilize edilmesi bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız bu çalışma paraoksonaz enzim immobilizasyonu çalışması yapacaklar için orjinal olması açısından son derece önemlidir. Yapılan alımalar sonucunda enzimin taşıyıcıya bağlanma yüzdesi % 74.6 olarak bulunmuş bunun yanında bağlanma ürününün aktiviteside % 56.1 olarak bulunmuştur. Eupergit taşıyıcısı kullanılarak elde bağlanma yüzdesi pekçok enzim için farklılık göstermektedir. Bağlanma yüzdesinin önemli oranda olması Eupergit C 250 L taşıyıcısının gözenekli yapıya sahip olmasından dolayı çok sayıda enzim moleküllerini bağlayabilme özelliği, enzimin hidrofobik özelliğinin bulunması ve de Eupergit C 250 L taıyıcısında hidrofobik özelliğe sahip olmasında önemli etkiye sahiptir.

Literatürde paraoksonaz'ın immobilizasyonu ile ilgili taşıyıcıya bağlı immobilizasyon çalışması bulunmamaktadır. Çeşitli reçineler kullanılarak paraoksonaz'ın adsorbif immobilizasyon işlemi denemesi yapılmıştır [114]. Bu çalışmalarda en önemli problem enzimin kararlılığının sağlanamamasıdır. Enzimin aktivitesinin ve kararlılığının saflatırıldığı kaynak ve immobilize edildiği desteğin türüne ve kullanılan immobilizasyon metoduna göre farklılıklar görülmesi beklenen bir durumdur [118]. Bunun yanında sıcaklık ve pH aralıklarındaki değişim ve aktivite değeri kovalent immobilizasyondaki gibi kararlı değildir. Çalışmamızda immobilize paraoksonaz'ın kararlılığının farklı sıcaklık ve pH değerlerinde serbest paraoksonaz'a oranla daha kararlı olduğunu göstermektedir. Buda yaptığımız çalışmanın önemini ayrıca göstermektedir.

Literatürde paraoksonaz serbest paraoksonaz enzimi için optimum pH değeri 8, denatürasyon sıcaklığı 45 derece olarak bildirilmiştir [10]. Saflaştırma işlemi sonucunda Eupergit taşıyıcısına yaptığımız immobilizasyon işlemi ile ilgili çalışmamızda serbest enzim ile immobilize enzimin optimum pH değerinin yine 8 olduğu bulunmuş ancak 45 derece ve üzerinde immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlarda immobilize enzimin özellikle reaktörler için uygun olabileceği düşüncemizi pekiştirmektedir.

Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapıları kullanılarak saflaştırılan sığır serum paraoksonaz enziminin serbest ve immobilize formlarının kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) optimum pH ve sıcaklıkta [112] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla serbest enzim için 6,26mM ve 169.65 U/ml'dak, immobilize enzim için ise 2.47mM ve 149.44 U/ml'dak olarak bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen paraoksonaz'ın paraokson substratı için farklı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri rapor edilmiştir. Sıçanlarda  $K_M$  değeri 1,690 mM ve 7,5mM arasında değişmektedir [113]. Eupergit'in hidrofobik yapıda olması ayrıca enzimin aktif bölgesinde fonksiyonel grupların hidrofobik yapıda olmasından dolayı eupergit matriksinin enzimle etkileşmesinden sonra kinetik parametrelerin düşmesi aktif bölgedeki gruplarla matriksin etkileşmiş olabileceği yorumunun yapılmasına neden olmaktadır. Yani substrat bağlanma bölgesindeki üç boyutlu yapının immobilizasyondan sonra kısmen değişmiş olması muhtemeldir. Kovalent bağlanan enzim molekülünün hareketinin kısıtlanmış olabileceği de söz konusu olabilmektedir. Bunun dışında destek çevresinde proteinlerin üst üste birikerek difüzyon probleminin oluşmuş olabileceği de söylenebilir.

Enzim aktivitesine etki eden kritik parametrelerden olan sıcaklık ve pH ile ilgili için sıcaklık olarak 25, 45, 65 °C sıcaklıklar ve pH 6.5 – 9 'a değişen aralıklarda ölçüm yapılmıştır.



Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- Sığır serum paraoksonaz enzimini saflaştırmak için Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak sığır serumundan paraoksonaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda 337 kat saf enzim elde edilmiştir.
- Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan sığır serum paraoksonaz enziminin SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 45 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir. Buda enzimimizin saflaştırma işleminin doğru olduğunu göstermektedir.
- Biyoteknolojik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan taşıyıcı matriks olan Eupergit'e elde edilen serbest paraoksonaz enzimi immobilize edilmiştir. Enzimin taşıyıcıya bağlanma yüzdesi % 74.6, bağlanma ürününün aktiviteside % 56.1 olarak bulunmuştur.
- Farklı substrat konsantrasyonlarında serbest ve immobilize enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla değerleri sırasıyla serbest enzim için 6,26mM ve 169,65 U/ml'dak, immobilize enzim için ise 2,47mM ve 149,44 U/ml'dak olarak bulunmuştur.
- İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklık ile değişimi belirlenmiştir. Buna göre immobilize enzimin serbest enzime göre farklı sıcaklıklarda kararlılığı daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.
- İmmobilize ve serbest enzimin pH ile değişimi belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonucuna göre farklı pH aralıklarında immobilize enzimin aktivite değerinin serbest enzimin aktivite değerinden daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Polaina, J., MacCabe, A.P., "Industrial Enzymes" Springer, The Netherlands, (2007) p. 9.
- [2] Nelson, D.L., Cox, M.M., "Lehninger - Principles of Biochemistry", (2004) p. 193.
- [3] Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., "Biochemistry", New York, (2005) p. 190.
- [4] Holme, D.J., Peck H. "Analytical Biochemistry" Prentice Hall, England, (2005) p. 259-261.
- [5] Aldridge, W.N., Reiner, E, "Enzyme inhibitors as substrates: interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acid", (1975) 176-189, American Elsevier, New York.
- [6] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature. Recommendation 1984 Suppl. 2, correction and additions. *European Journal of Biochemistry* (1989) 489-533.
- [7] Mackness, M.I., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Walker, C.H., "Distinction between A-esterase and arylesterase. *Biochemistry Journal* (1987) **245**, 293-296.
- [8] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78.
- [9] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) **35**, 1126.
- [10] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991) **19**, 100.

- [11] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Curr. Opin. Lipidol.*, (1996) **7**, 69.
- [12] Jawad, Z. and Paoli, M., "Novel sequences propel familiar folds", *Structure (Camb)*, (2002) **10(4)**, 447. Review.
- [13] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [14] Kuo, C.L. and La Du, B.N., "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, 653.
- [15] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzsche, G., Lücke, C. and Rüterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*", *Structure*, (2001) **9**, 493.
- [16] Bastos, C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Lima, J.A.F. and Bastos, J.C., "Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* valenciennes (Siluridae)", *Revta bras. Zool.*, (1998) **15(3)**, 665.
- [17] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [18] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78.
- [19] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) **21**, 1451.
- [20] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of

Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, (2003) **66**, 887.

- [21] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and James, R.W., "Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism", *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 4301.
- [22] Mackness, M.I., (1989b) Possible medical significance of human serum 'A' esterases In: Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood, Chichester, 202-213.
- [23] Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation", *J. Biol. Chem.*, (2000) **275**, 3957.
- [24] Kearny, A.S, Crawford, L.F., Mehta, S.C. and Radebaugh, G.W., "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981", *Pharm. Res.*, (1993) **10**, 1461.
- [25] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968) 299-311.
- [26] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) **28(11)**, 1335
- [27] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R", *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.*, (1998) **18**, 1617.
- [28] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for

paraoxonase”, *J. Clin. Invest.*, (1998) **101(81)**, 1581.

- [29] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., “Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) **92**, 7187.
- [30] Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., “Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase”, *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 235.
- [31] Blatter, G, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M., Durrington, P.N., Pometta, D. and James, R.W., “Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations”, *Biochem. J.*, (1994) **304**, 549.
- [32] Leviev, I. and James, R.W., “Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2000) **20**, 516.
- [33] Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Nayak, D.P., Hama, S., Navab, M. and Fogelman, A.M., “HDL loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection”, *Circulation*, (2001) **103**, 2283.
- [34] Jawad, Z. and Paoli, M., “Novel sequences propel familiar folds”, *Structure (Camb)*, (2002) **10(4)**, 447. Review.
- [35] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, “Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes”, *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [36] Kuo, C.L. and La Du, B.N., “Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity”, *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, 653.
- [37] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzsche, G., Lücke, C. and Rüterjans, H., “Crystal

structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*”, *Structure*, (2001) **9**, 493.

- [38] Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. and Philips, M.C., “High density lipoprotein structure”, *Front. Biosci.*, (2003) **8**, D1044.
- [39] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and James, R.W., “Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism”, *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 4301.
- [40] James, R. W., Blatter Garin, M. C., Calabresi, L. et al. “Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states”. *Atherosclerosis* (1998) **139**, 77–82
- [41] Mikkelsen, S.R., Corto’n, E., “Bioanalytical Chemistry” Wiley-Interscience, New Jersey, (2004) p.16
- [42] Dekker, M., “Protein immobilization: fundamentals and applications” Taylor, New York, (2000) p.85
- [43] Cabral, J.M.S., Kennedy J.F., “Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes. In: Gupta MN (Ed.) Thermostability of enzymes”, Springer, Berlin, (2000) p.163
- [44] Bakker, M., “Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions” PhD Thesis, Technical University Delft, The Netherlands, (2000).
- [45] Clark, D.S., “ Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?” *Trends Biotechnol.*, (1994) **12**, 439–443
- [46] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matuo, Y., “*Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp.: Fermentation Technology Today*” (1972) p. 383–389.
- [47] Schulze, B, Wubbolts, M.G., “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. Biotechnol.* (1999) **10**, 609–615
- [48] Tischer, W., Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers”

*Trends Biotechnol.*, (1999) **17**, 326–335

- [49] Hartmeier, W., *Immobilized Biocatalysts*, Springer-Verlag, Berlin, (1988)
- [50] Fessner, W.D., Anthonsen, T., “Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions” Wiley-VCH, Berlin, (2008)
- [51] Sandwick, R.K., Schray, K.J., “Conformational states of enzymes bound to surfaces” *J. Colloid Interface Sci.*, (1988) **121**, 1–12
- [52] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15811808>
- [53] Afaq, S., Iqbal, J., “Immobilisation and stabilisation of papain on chelating Sepharose: a metal chelate regenerable carrier” *E.J.B. Electron J. Biotechnol.* (2001) **4**, 1–5
- [54] Chernukhin, I.V., Klenova, E.M., “A method of immobilisation on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity” *Anal. Biochem.* (2000) **280**, 178–181
- [55] Guisan., J.M., "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press, Madrid, (2006)
- [56] Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D.M., “Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential” *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, (2000) **10**, 157–176
- [57] Hernaiz, M.J., Crout, D.H.G., “Immobilisation/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*” *Enzym. Microb. Technol.* (2000) **27**, 26–32.
- [58] [www.pharma-polymers.com/brochures/eupergit.pdf](http://www.pharma-polymers.com/brochures/eupergit.pdf)
- [59] Martin, M.T., Plou, F.J., Alcade, M., Ballesteros, A.M., “Immobilisation on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilised biocatalyst” *J Mol Catal B: Enzymatic* (2003) **21**, 299–308

- [60] Boller, T., Meier, C., Menzler, S., “Eupergit oxirane acrylic beads: how to make the enzyme fit for biocatalysts” *Org. Process. Res. Dev.* (2002) **6**, 509–519
- [61] Schulze, B., Wubbolts, M.G., “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. Biotechnol.* (1999) **10**, 609–615
- [62] Rosell, C.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. “Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment” *Biocatal. Biotransform.* (1995) **12**, 67–76
- [63] Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilisation of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage” *Biomacromolecules* (2000) **1**, 739–745
- [64] López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., “Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports” *J. Biotechnol.* (2005) **116**, 1–10
- [65] Kar, A., Sambamurthy K., “ Pharmaceutical Biotechnology” New Age, New Delhi, (2006)
- [66] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guizan, J.M., “Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment” *Enzyme Microb. Technol.* (2000) **26**, 509–515
- [67] Varian, A.R., Sansen, W., “Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads” *Biosens. Bioelectron.* (1996) **11**, 443–448
- [68] Guisan, J.M., Alvaro, G., Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Garcia, J.L., Tagliani, A., “Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*” *Biotechnol. Bioeng.* (1993) **42**, 455–64



- [69] Martin, M.T., Plou, F.J., Alcade, M., Ballesteros, A., “Covalent immobilisation of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose” *Indian J. Biochem. Biophys.* (2002) **39**, 229–234
- [70] Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres- Guzman, R., De la Mata, I., Castillon, M.P., Acebal, C., “Stabilization of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae* by covalent immobilisation” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2001) **76**, 525–528
- [71] Suh, C.W., Choi, G.S., Lee, E.K., “Enzymic cleavage of fusion protein using immobilised urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose” *Biotechnol Appl Biochem* (2003) **37**, 149–155
- [72] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl Polym. Sci.* (2001) **82**, 1299–1305
- [73] Rosell, C.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment” *Biocatal. Biotransform.* (1995) **12**, 67–76
- [74] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl. Polym. Sci.* (2001) **82**, 1299–1305
- [75] Baran, T., Arica, M.Y., Denizli, A., Hasirci, V., “Comparison of  $\beta$ -galactosidase immobilisation by entrapment in and adsorption on poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes” *Polym. Int.* (1997) **44**, 530–536
- [76] [http://videlectures.net/mit560s08\\_bawendi\\_lec35/](http://videlectures.net/mit560s08_bawendi_lec35/)
- [77] Gemeiner, P., ”Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) Enzyme engineering” Ellis Horwood, New York, (1992) pp.13–119
- [78] Akova, A., Ustun, G., “Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values” *Biotechnol. Lett.* (2000), **22**, 355–359

- [79] Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P., “Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum” *Biotechnol. Lett.* (2000) **22**, 1571–1575
- [80] Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilisation of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage” *Biomacromolecules* (2000) **1**, 739–745
- [81] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites” *Biotechnol. Bioeng.* (2000) **68**, 98–105
- [82] Okubo, M., Ahmad, H., “Adsorption of enzymes on to submicron-sized temperature-sensitive composite polymer particles and its activity” *Physicochem. Eng. Aspect.* (1999) **153**, 429–433
- [83] Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., Affinity chromatography. *Methods Enzymol.* (1984) **104**, 3–56.
- [84] Roy, I., Gupta, M.N., “Selectivity in affinity chromatography. In: Isolation and Purification of Proteins” Marcel Dekker, (2003) New York, NY, pp. 57–94.
- [85] Turkova, J., “Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function” *J. Chromatography. B.*, (1999) **722**, 11–31
- [86] Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., “Immobilisation of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports” *Chem. Phys.*, (1998) **93**, 185–197
- [87] Labrou, N.E., “Design and selection of ligands for affinity chromatography” *J. Chromatogr. B.*, (2003) **790**, 67–78.
- [88] Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., and Deckwer, W.D., “Expanded bed chromatography in primary protein purification” *J. Chromatogr. A.*, (1999) **865**, 129–144.

- [89] Goncalves, A.P.V., Lopes, J.M., Lemos, F., Ribeiro, F.R., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., “Effect of the immobilisation support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*” *Enzyme Microb Technol.*, (1997) **20**, 93–101
- [90] Yang, Y.G., Chase, H.A., “Immobilisation of  $\alpha$ -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors” *Biotechno. Appl Biochem* (1998) **2**, 145–154
- [91] Indlekofer, M., Brotz, F., Bauer, A., Reuss, M., “Stereoselective bioconversions in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization” *Biotechnol Bioeng* (1996) **52**, 459–471
- [92] Mohapatra, S.C., Hsu, J.T. “Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin for use in batch and continuous reactors” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2000) **75**, 519–525
- [93] Ganapathi, S., Butterfield, D.A., Bhattacharyya, D., “Flat-sheet and hollow fibre membrane bioreactors: a study of the kinetics and active site conformational changes of immobilised papain including sorption studies of reaction constituents” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (1995) **64**, 157–164
- [94] Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., Denizli, A., “Immobilisation of glucoamylase on to spacer-arm attached magnetic poly-(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor” *J. Mol. Catal. B.: Enzymatic* (2000) **11**, 127–138
- [95] El Sherif, H., Di Martino, S., Travascio, P., De Maio, A., Portaccio, M., Durante, D., Rossi, S., Canciglia, P., Mita, D.G., “Advantages of using non-isothermal bioreactors in agricultural waste water treatment by means of immobilised urease. Study on the influence of spacer length and immobilisation method” *J. Agric. Food Chem.*, (2002) **50**, 2802–2811
- [96] Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature* (London), (2001) **409**, 258–268.
- [97] Knowles, J.R., “Enzyme catalysis: not different, just better” *Nature* (1991)

350, 121–124.

- [98] Rozzell, J. D., “Biocatalysis at commercial scale: myths and realities” *Chimica Oggi* (1999) (6/7), 42–47.
- [99] Zaks, A., “Industrial biocatalysis Curr. Opin.” *Chem. Biol.* (2001) **5**, 130–136.
- [100] Murza, A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Essential role of the concentration of immobilised ligands in affinity chromatography: purification of guanidinobenzoatase on an ionized ligand” *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2000), **740**, 211–218
- [101] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248–251
- [102] Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., “Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase” *Chem. Biol. Interact.* (1999) **119-120**, 243-249.
- [103] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, “Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes”, *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [104] Robyt, JF., White, BJ., “Biochemical Techniques Theory and Practice”, (1990), Waveland Pres, Inc.p:98.
- [105] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. “Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography”. *Braz J Med Biol Res*, May (1999), **32(5)** 545-550.
- [106] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, (1974).

- [107] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., “Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver”, *Biochem. J.*, (1997) **321**, 595
- [108] Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F. and Pla, A., “Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase”, *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **263**, 119-120
- [109] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., “Purification of human serum paraoxonase/arylesterase”, *Drug Metab. Dispos.*, (1991) **19**, 100
- [110] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., “Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase”, *Biochemistry*, (1991) **30**, 10133.
- [111] Aharoni, A., “Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) **101**, 482.
- [112] Gülcü, F., Gürsu, MF., “Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu”, *Turkish Journal of Biochemistry*, (2003), **28(2)** 45-49.
- [113] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., “Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity”, *Neurotoxicol Teratol* (1990) **12**, 611-614
- [114] Simonian, A.L., DiSioudi, B.D., Wild, J.R., “An enzyme based biosensor for the direct determination of diisopropyl fluorophosphates”, *Analytica Chimica Acta* (1999) **389**, 189-196
- [115] Karboune, S., Neufeld, R., Kermasha, S., “Immobilization and biocatalysis of chlorophyllase in selected organic solvent systems”, *Journal of Biotechnology* (2005) **120**, 273–283
- [116] Bolivar, J., M., Rocha-Martin, J., Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Vega, D., Fernandez-Lafuente, R., “Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports” *Journal of Biotechnology* (2005) **116**, 1–10

- [117] Tan, S.S., Li, D.Y., Jiang, Z.Q., Zhu, Y.P., Shi, B., Li, L.T., “Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritima* xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C” *Bioresource Technology* (2008) **99**, 200–204
- [118] Martin, M.T., Plou, F.J., Alcalde, M., Ballesteros, A., “Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst” *Journal of Molecular Catalysis* (2003) **21**, 299–308
- [119] Cao, L., “Immobilised enzymes: science or art?” *Current Opinion in Chemical Biology* (2005) , 217–226