

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

**İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN KİTOSAN ÜZERİNE
İMMOBLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UTKU ÇOLAK

Balıkesir, Temmuz-2011

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

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN KİTOSAN ÜZERİNE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UTKU ÇOLAK

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER

Sınav Tarihi: 12.07.2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER (Danışman - BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun
nolu kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Temmuz-2011

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2009/02 Kod’lu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN KİTOSAN ÜZERİNE İMMOBLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Utku ÇOLAK

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER)

Balıkesir, 2011

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 9-Aminofenantren'in L-tirozine kenetlenmesi reaksiyonu ile sentezlenmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri ile paraoksonaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan paraoksonaz enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 65 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

Saflaştırılan paraoksonaz enzimi hidrofobik taşıyıcı olan Kitosan'na immobilize edilerek immobilize enzimin bağlanma yüzdesi % 68 ve katalitik etkinliği 3,2229 olarak bulunmuştur. Paraoksonaz saf ve immobilize formlarının paraokson substratına karşı Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile sırasıyla saf enzim için, 1,067 mM ve 125 U/mldakika olarak immobilize enzim için, 1,755 mM and 181 U/mldakika değerleri elde edilmiştir.

Immobilize paraoksonaz enziminin enzimatik davranışları serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. Serbest ve immobilize paraoksonaz benzer optimum sıcaklıklar (25-45 °C) ve pH (7.0) değerleri göstermesine rağmen immobilize paraoksonazın daha uzun süre etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize enzimin termal inaktivasyonu serbest enzime göre daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Paraoksonaz (PON1), Hidrofobik etkileşim kromatografisi, İmmobilizasyon metodları, Kitosan

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF HUMAN SERUM PARAOXONASE ON CHITOSAN AND CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED PARAOXONASE

Utku ÇOLAK

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(Master Thesis / Supervisor: Assistant Professor Dr. Nahit GENÇER)

Balikesir, Turkey, 2011

Because of purification of paraoxonase, hydrophobic interaction chromatography gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 9-Aminofenantren as a hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was added as an extension arm.

Paraoxonase was purified with ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed a single band with 65 kDa.

Purified paraoxonase was immobilized to Chitosan using as hydrophobic carrier and after immobilization, the yield of bound enzyme was found around % 68 and the catalytic efficiency was approximately 3,2229. 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 1,067 mM and 125 U/mlmin. respectively, immobilized enzyme's K_m and V_{max} was 1,755 mM and 181 U/mlmin, respectively.

The enzymatic properties of immobilized paraoxonase were compared with those of the soluble enzyme. Soluble and immobilized paraoxonase showed similar optimum temperature (25–45 °C) and pH (7.0) values, but the duration of activity of the immobilized paraoxonase was longer. On thermal inactivation of immobilized paraoxonase was slower than the soluble enzyme.

KEY WORDS: Paraoxonase (PON1), Hydrophobic interaction chromatography, Immobilization methods, Chitosan

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	İii
İÇİNDEKİLER	İv
SEMBOL LİSTESİ	Vii
ŞEKİL LİSTESİ	Viii
ÇİZELGE LİSTESİ	X
ÖNSÖZ	Xi
1.GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.1.1 Enzimlerin Genel Özellikleri Ve Adlandırılması	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 Paraoksonazın Sentezlenmesi	10
1.2.6 Paraoksonazın Hdl'ye Bağlanması	10
1.3 Enzim İmmobilizasyonu	11
1.3.1 Enzim İmmobilizasyonun Tarihi	13
1.3.2 Taşıyıcı Seçimi	15
1.3.3 Taşıyıcı Materyal Kitosan	18
1.3.3.1 Kimyasal Yapısı Ve Reaksiyonu	21
1.4 İmmobilizasyon Metodları	23
1.4.1 Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları	23
1.4.1.1 Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu	23

1.4.1.1.2 Kovalent Bağlamanın Avantajları	24
1.4.1.1.3 Kovalent Bağlamada Aktivite Kaybı	25
1.4.1.2 Tutuklama İmmobilizasyonu	26
1.4.2 Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları	27
1.4.2.1 Adsorpsiyon	27
1.4.2.1.1 Nonspesifik Adsorpsiyon	27
1.4.2.1.2 İyonik Bağlama	28
1.4.2.1.3 Hidrofobik Bağlama	29
1.4.2.1.4 Afinite Bağlama	29
1.5 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	29
1.6 Enzim Reaktörünün Seçimi	30
1.7 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri	32
1.8 Çalışmanın Amacı	33
2. MATERYAL VE YÖNTEM	34
2.1 Materyaller	34
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
2.1.2 Kullanılan Alet Ve Cihazlar	34
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler Ve Hazırlanması	35
2.2 Yöntemler	39
2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması	39
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini	39
2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	39
2.2.4 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi	40
2.2.5 Enzimin Saflaştırılması	40
2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	40
2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması	41
2.2.5.2.1 Sepharose 4b'nin Aktifleştirilmesi	41
2.2.5.2.2 L-Tirozinin Bağlanması	42
2.2.5.2.3 9 Aminofenantren Bileşiğinin Bağlanması	42
2.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (Sds- Page) İle Enzim Saflığının Kontrolü	44

2.2.7 Saflaştırılan Enzimin İmmobilizasyonu	45
2.2.7.1 Kitosan Taneciklerinin Hazırlanması	45
2.2.7.2 Enzimin Kitosan Taneciklerine Bağlanması	46
2.2.8 İmmobilize Ve Serbest Enzimin Zaman, Sıcaklık Ve Ph İle Değişimleri Ve Termal Stabiliteleri	46
2.2.8.1 İmmobilize Ve Serbest Enzimin Aktivitelerinin Zamana Bağlı Olarak Değişimleri	46
2.2.8.2 İmmobilize Ve Serbest Enzimin Termal Stabiliteleri	46
2.2.8.3 İmmobilize Ve Serbest Enzimin Ph'a Bağlı Olarak Değişimleri	47
2.2.8.4 Serbest Ve İmmobilize Enzimin Sıcaklıkla Aktivitelerinin Değişimi	47
2.2.9 Optimum Şartlarda K_m Ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	47
3. BULGULAR	48
3.1 Enzimin Saflaştırılması	48
3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	48
3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması	48
3.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	49
3.3 Serum Paraoksonaz Enzimlerinin Sds Poliakrilamid Jel Elektroforezi	52
3.4 Optimum Şartlarda Serbest Enzimin K_m Ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	53
3.5 İmmobilize Enzimin K_m Ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	55
3.6 İmmobilize Ve Serbest Enzimin Zamana Bağlı Olarak Değişimi	57
3.7 İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi	58
3.8 Saf Ve İmmobilize Enzimin Termal Stabilitesi	58
3.9 Aktivitenin Ph İle Değişimi	62
3.10 Saf Ve İmmobilize Enzimin Aktivitelerinin Sıcaklıkla Değişimi	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
5. KAYNAKLAR	70

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
PON1	Paraoksonaz 1 Enzimi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N,N tetrametiletildiamin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Enzim Kataliz Reaksiyonları Üzerine Sıcaklığın Etkisi	4
Şekil 1.2	Paraoksonazın 3 boyutlu yapısı	6
Şekil 1.3	Paraoksonazın Katalitik Mekanizması	7
Şekil 1.4	lakton hidrolizi	9
Şekil 1.5	Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yaklaşımlar	17
Şekil 1.6	Geri Dönüşümlü enzim immobilizasyon yaklaşımları	18
Şekil 1.7	Toz Kitosan	20
Şekil 1.8	Kitosan Tanecikleri	20
Şekil 1.9	Kitosan'ın kimyasal yapısı	21
Şekil 1.10	Kitosan reaksiyonu	22
Şekil 1.11	Kovalent İmmobilizasyon ve çapraz bağlama gösterimi	24
Şekil 1.12	Kovalent Bağın Enzim Aktivitesi Üzerine Olan	25
Şekil 1.13	Tutuklama İmmobilizasyonunun Gösterimi	26
Şekil 1.14	Nonspesifik Adsorpsiyon İmmobilizasyon Yönteminin Gösterimi	28
Şekil 1.15	İmmobilize Enzimler İçin Reaktörler	31
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifletirilmesi	41
Şekil 2.2	L-tirozinin bağlanması	42
Şekil 2.3	9-Aminofenantren bileşiğinin bağlanması	43
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kolonundan paraoksonaz enziminin elüsyon grafiği	49
Şekil 3.2	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	50
Şekil 3.3	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS polakrilamid jel elektroforezi.	52
Şekil 3.4	Saflaştırılmış sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	53
Şekil 3.5	İmmobilize edilmiş sığır serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 3.6	İmmobilize VE Saf Enzimin Aktivite Zaman Grafiği	57

Şekil 3.7	37°C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği.	59
Şekil 3.8	45°C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği.	60
Şekil 3.9	65°C'de immobilize ve saf enzim için % rezidual aktivite- zaman grafiği.	61
Şekil 3.10	Aktivite(%) - pH grafiği	62
Şekil 3.11	Paraoxon Aktivitesi Çıkarıldıktan Sonraki Aktivite(%) - pH grafiği	62
Şekil 3.12	Saf ve İmmobilize Enzimin Sıcaklık Değişimi	63

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	16
Çizelge 1.5	İmmobilize yöntemlerine göre aktivitenin değişimi	30
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	38
Çizelge 3.1	Saflaştırma tablosu	51
Çizelge 3.2	Serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	54
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 $1/[S]$.	56
Çizelge 3.4	Kitosan tanecikleri üzerine immobilize edilmiş serum paraoksonaz enziminin bağlanma etkisi	58

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımın her safhasında desteğini aldığım, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım, çok kıymetli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER'e öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız, bana tez konumu veren hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında ilgi, yardım ve manevi desteklerini gördüğüm değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a ve Arş. Gör. Dr. Serap BEYAZTAŞ'a ve çalışma arkadaşlarım Dudu DEMİR, Adem ERGÜN, Nurcan DEDEOĞLU, Beste ŞİPAL, Başak GÖKÇE, Kadir EROL, Murat BOZDAĞ, Oğuzhan KAYA, Çiğdem BİLEN ve bütün biyokimya grubu arkadaşlarımıza teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2009/02 Kodlu Proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına teşekkür ederiz.

Balıkesir, 2011

Utku ÇOLAK

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 uygulamalarındandır. Biyokimya'nın 19. yüzyılda gelişmesi ve seçkin bilim adamının çalışmaları başlamadan önce, enzimlerin doğası ve nasıl çalışmaya başladığıyla ilgili bilgiler aydınlatılamamıştır [1].

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 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.

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

1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri ve Adlandırılması

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen ayrıca yan ürün oluşumuna izin vermeyen %100' lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir [2].

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 uğratılan maddeye ise substrat denir [3].

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 [3].

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 uğratır (substrat spesifikliği) [3].

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

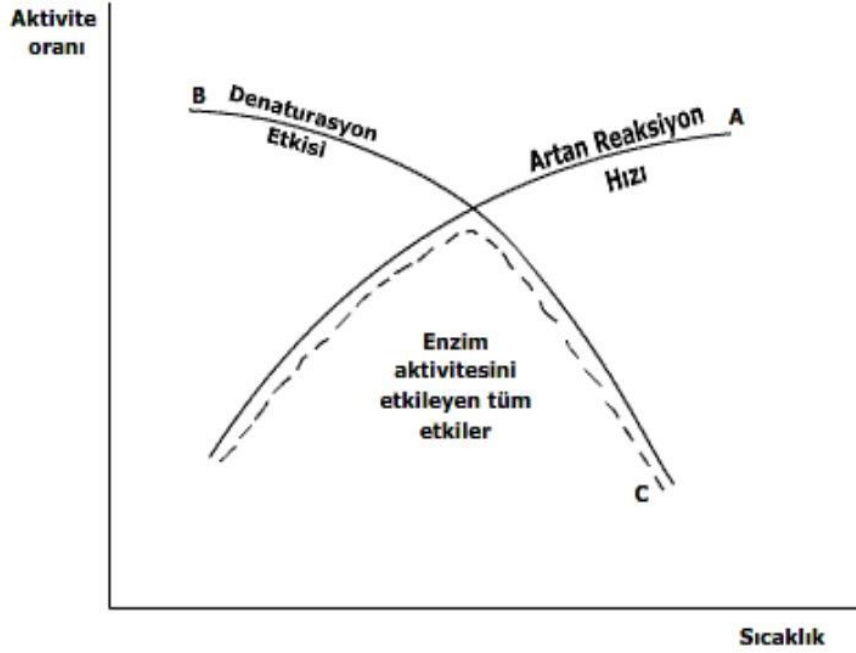
1.1.2. Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler

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 çözeltilerini saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etkilemektedir.

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 yürütölür, bunun birinci nedeni vücut sıcaklığının enzimler için optimum sıcaklığı olabileceği, ikinci nedeni ise bu sıcaklığın üzerinde enzimlerin inaktivasyon oranlarının çok fazla değişmemesi etkilidir. Uluslar arası Biyokimya Birliği başlangıçta 25°C’ de standart sıcaklık olarak tavsiye etmiş ancak sıcak iklimlerde enzimleri düşük sıcaklıkta tutmanın zor olmasından dolayı bu sıcaklığı 30°C’ ye arttırmıştır. Ancak hâlâ enzimlerin aktiviteleriyle alakalı sıcaklık ile ilgili çalışmalarda belli bir standardın olmadığı görölmektedir. Bunun temel nedeni enzimlerin protein yapılarının farklı olmasından 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 birenzimin 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 sabitlenmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur [4].

1.2. Paraoksonaz Enzimi

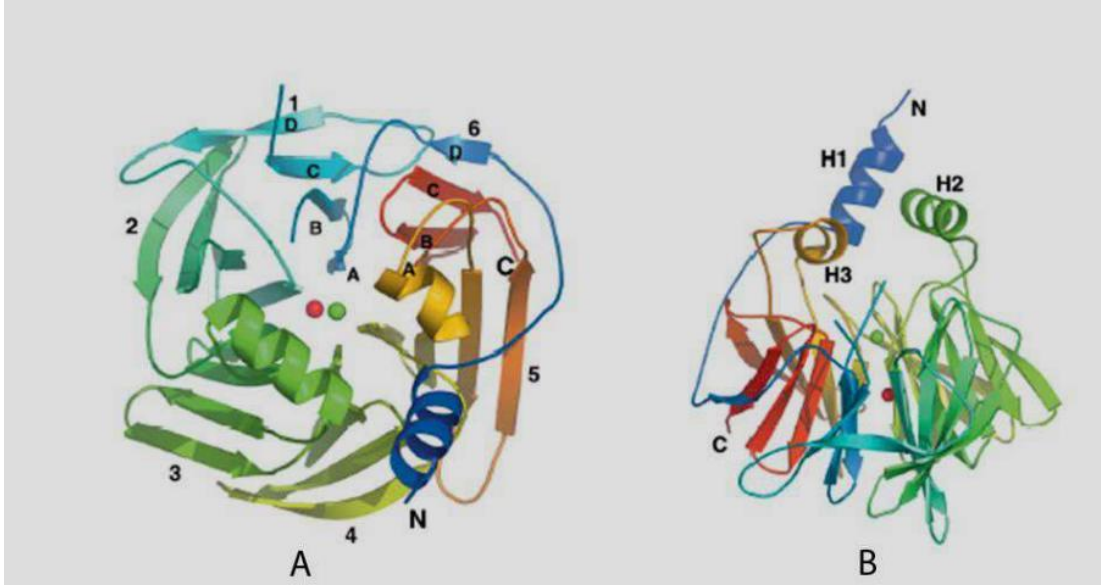
1.2.1. Adlandırılması

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 belirlemiştir [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

PON 1, 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 β -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 böyle kovalent bağlanması β -kırmalı yapıya sahip enzimlerde son derece ender görülür (Şekil 1.2).

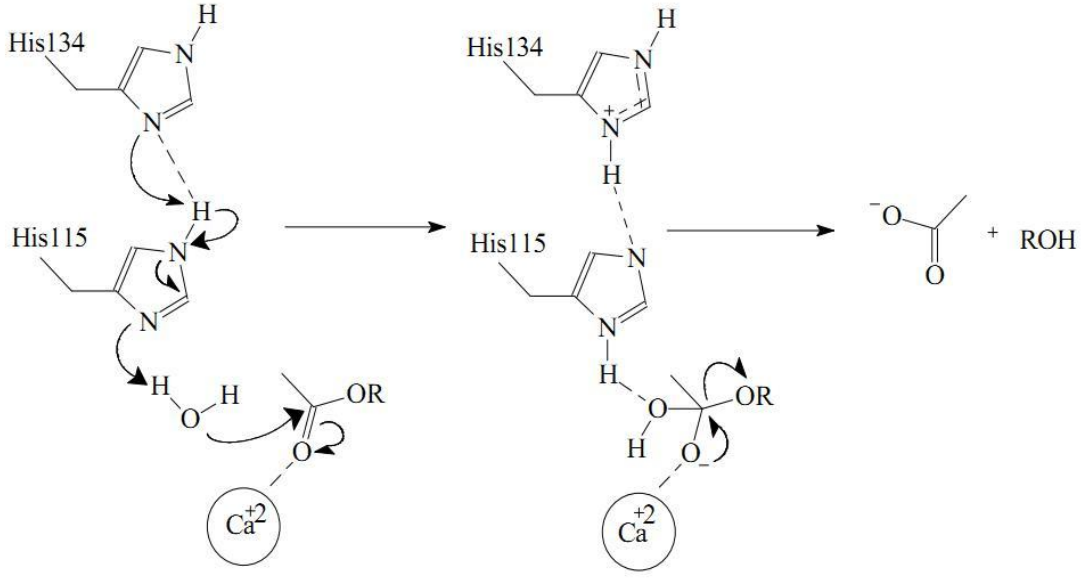


Şekil 1.2 Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü. [(A) β -kırmalı tabakalar ve (B) H1, H2, H3 ile gösterilen hidrofobik bölgelerin β -kırmalı tabakalara göre durumu.] [13]

Şekil 1.2 deki üç boyutlu yapıyı gösteren resimde de görüldüğü gibi; β -kırmalı yapıların ortasında 7,4 Å aralıklarla iki tane 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 ve bir su molekülü ile etkileşmektedir [15].

1.2.3. Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, Ca^{+2} iyonu ve H_2O molekülünün, esteraz aktivitesinde çok önemli rolü vardır.



Şekil 1.3 Paraoksonazın katalitik mekanizması [16]

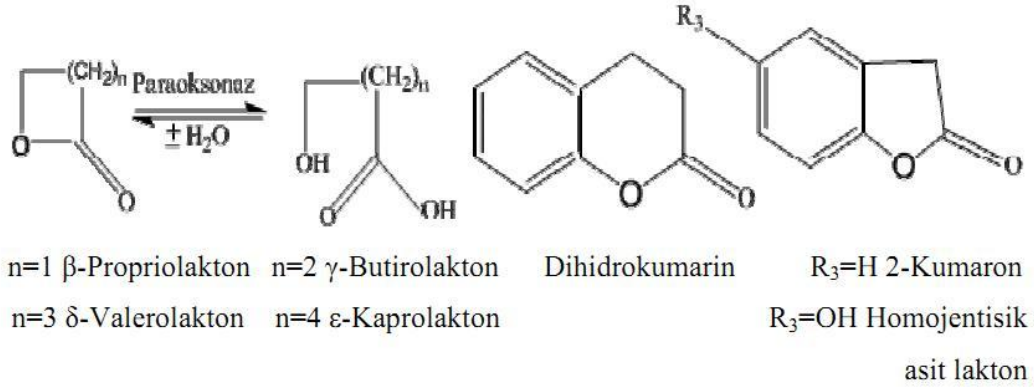
Katalitik etkinlik gösteren Ca^{+2} iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü arttırmıştır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca^{+2} iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki 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 paraokson 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 [22-24].

Paraoksonaz'ın son yıllarda özellikle arterosklerozisin 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 δ -valerolakton (6 halkalı lakton), γ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve ϵ -kaprolaktondan (7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. Paraoksonaz'ın aromatik laktonlara afinitesi, alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiminin lakton halkasında α ve β 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 esterlerin 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 enzime etkileşmesine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Buna örnek olarak etil asetat Paraoksonaz ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren γ-bütürolakton 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 promotor bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir [32]. Paraoksonaz sentezinde önemli olan faktörlerden birisi karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir [33,34].

Paraoksonazın 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]. Hücre zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır [37].

1.2.6. Paraoksonaz'ın HDL'ye Bağlanması

Paraoksonaz karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferel hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlar 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, H2 ve H1 hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluşturular. Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği sayesinde 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 derece 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]

Avantajları	Dezavantajları
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]

Enzim	Ürün
Glukoz izomeraz	Yüksek miktarda fruktoz şurup
Aminoasit amidaz	Aminoasit ürünü
Penisilin amidaz	Yarı sentetik penisilin
Nitril hidrataz	Akrilamid
β -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 pek çok 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 α -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, karbondioksit enzimatik oksidasyonuna, NAD⁺dan NADH'a indirgeme reaksiyonu eşlik eden aminasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ikinci enzim, format dehidrogenazdır [50].

Çizelge 1.3 İmmobilize enzimlerin tarihsel basamakları [49]

Basamak	Tarih	Kullanım
Birinci	1815	Asetik asit ve atık su arıtma işlemleri gibi deneysel kullanım işlemleri
İkinci	1960 larda	Tek enzim immobilizasyonu, L-aminoasitlerin ürünü, glikozun izomerizasyonu
Üçüncü	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 arttırma, ürün inhibisyonunu düşürme gibi özelliklere sahip olabilmelidir [51].

Taşıyıcılar kimyasal bileşimlerine göre organik veya anorganik olarak sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.4). Organik taşıyıcılar doğal 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 pek çok avantajlarına rağmen (örneğin, fiziksel, kimyasal veya mikrobiyal indirgemelere karşı yüksek stabilite), pek çok 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

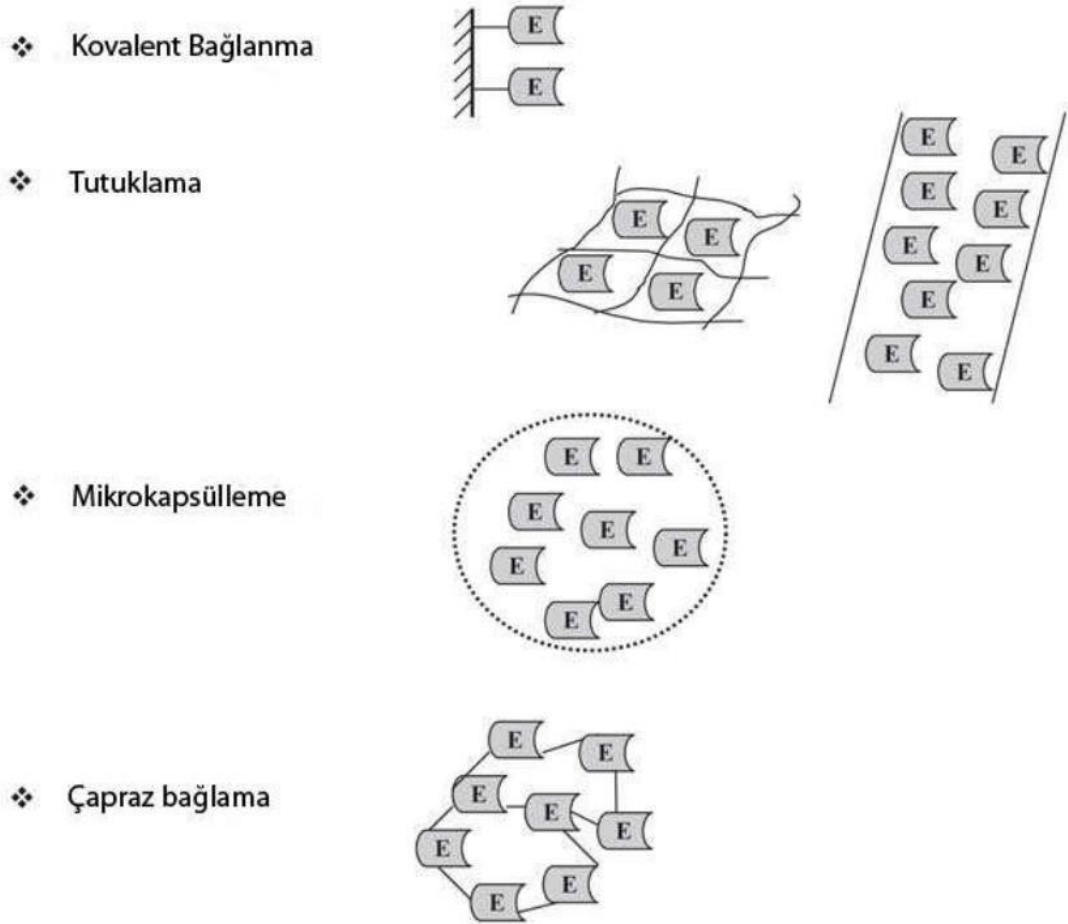
Doğal mineraller: Bentonit, silika

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

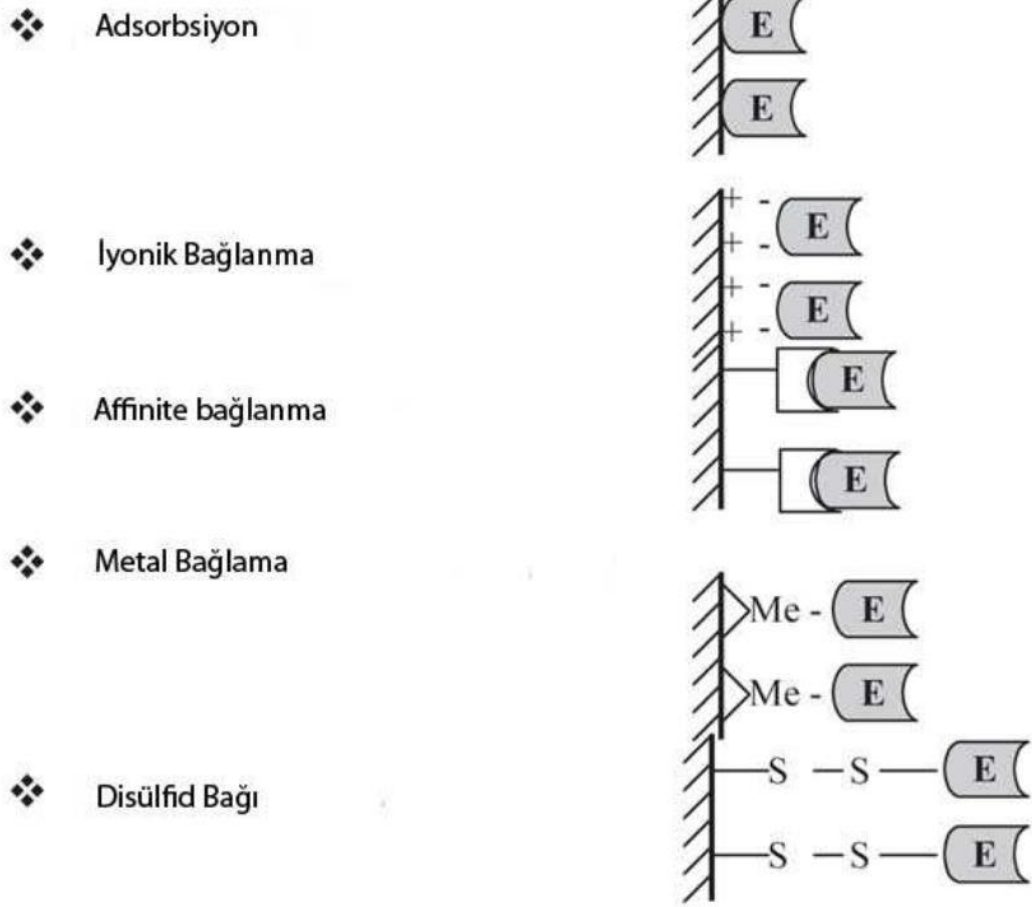
Yaygın olarak kullanılan en önemli taşıyıcılardan birisi agarozdur. Yüksek gözenekli yapısına ilaveten, proteinler için yüksek kapasite sağlarlar. Matriks olarak agarozu kullanmanın bazı diğer avantajları; hidrofilik karakterde olması, türevlerine dönüştürmenin kolay olması, yüklü grupların olmaması (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 birisi de onları iki ana kategoriye 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 dönüşsüz reaksiyonlar Şekil 1.5 ve 1.6’da gösterilmiştir [55].



Şekil 1.5 Geri dönüşsüz enzim immobilizasyon yaklaşımları [55]



Şekil 1.6 Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yaklaşımları [55]

1.3.3. Taçiyıcı Materyal Kitosan

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb bulunan doğal bir polisakkarit olan kitin'den kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen ve doğada selulozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir [56, 57].

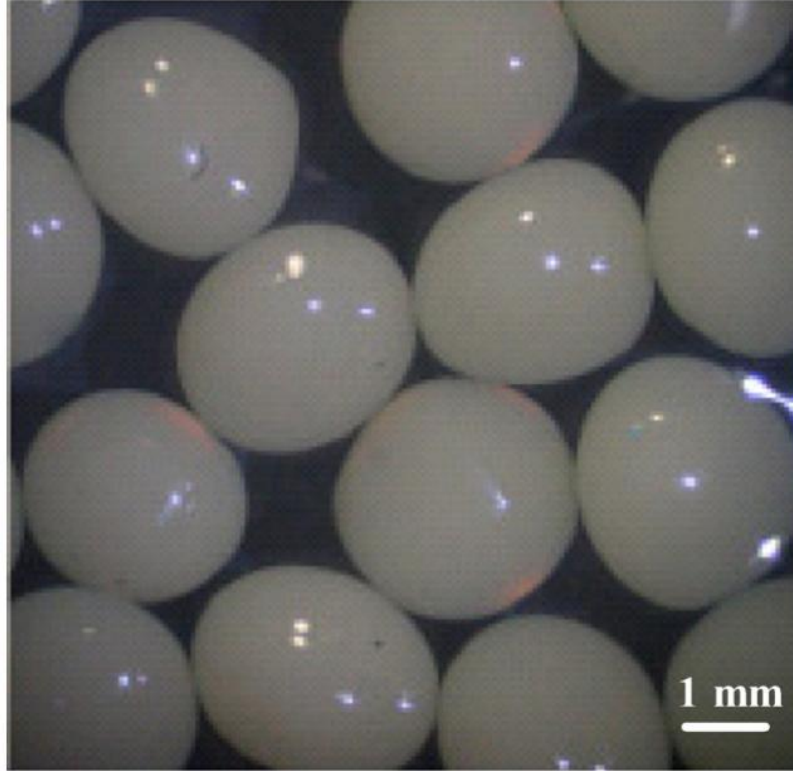
Beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olan kitosan sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Buna karşın bazı bakteriler tarafından parçalanır. Suda çözünmez. Sadece asidik çözücülerde (<6.0 pH) çözünür. Çözündürmek için asetik asit , formik asit, laktik asit gibi organik asitler

kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir [58].

Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik, tıp, tarım gibi çeşitli endüstrilerde sınırsız kullanım alanlarına sahiptir. Kitosan bu fonksiyonlarında pozitif iyonik tabiata sahip olmasının önemli bir rolü vardır. Benzer fonksiyonları nedeniyle gıda endüstrisinde de kitosandan yararlanılmaktadır. Kitosan son yıllarda adından sıkça bahsedilen diyetetik yardımcı maddeler arasında yer almaktadır. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği vb nedenlerle bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir ve canlı organizmada benzer etkiler oluşturmaktadır. Bağırsak hareketlerinin ve sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesi, bağırsak mikroflorasının (bifidobakterilerin) desteklenmesi, kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi (LDL kolestrolündüşürülmesi, HDL kolestrolün artırılması), kanbasıncının düşürülmesi, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi fonksiyonel etkilerinin yanı sıra sindirim yoluyla alındığında ya da emilimini azaltarak (pozitif yüklü bir bileşik olmasından dolayı negatif yüklü olan yağ asitlerine bağlanarak) kilo kaybını desteklemesi oldukça ilgi çekmiştir [59, 63].



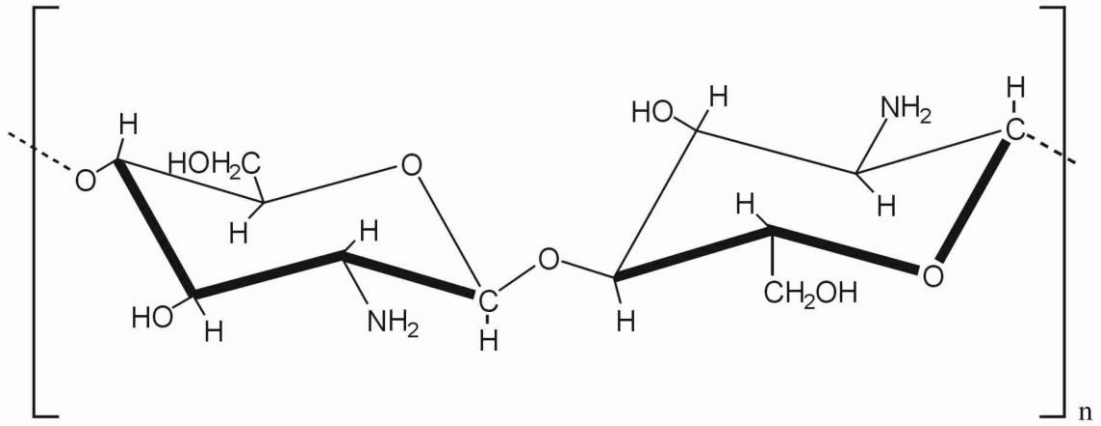
Şekil 1.7. Toz Kitosan



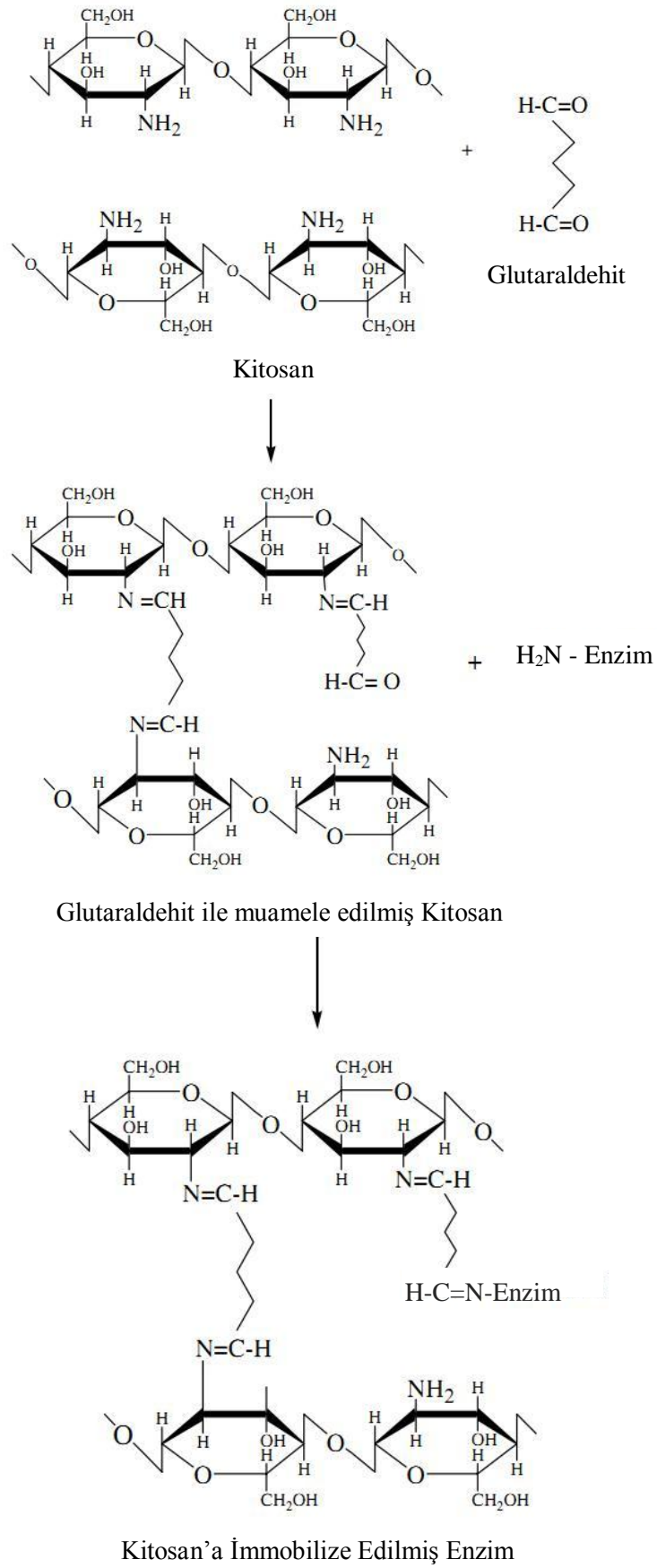
Şekil 1.8.Shao-Hua Chiu ve arkadaşlarının yöntemi ile hazırlanmış kitosan tanecikleri

1.3.3.1. Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu

Bir polisakkarit olan kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz (N-asetil glukozamin)'dan oluşmaktadır. Kitin'in düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan ise (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin)olarak bilinmektedir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-3, C-6 pozisyonunda birer hidroksil ve C-2 pozisyonunda ise bir amino grubu bulunmaktadır [57].



Şekil 1.9. Kitosan'ın Kimyasal Yapısı



Şekil 1.10. Enzimin Glutaraldehyt ile Kitosan'ın Amin Gruplarına Bağlanması

1.4. İmmobilizasyon Metodları

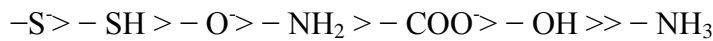
1.4.1. Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Metodları

Dönüşümsüz immobilizasyon kavramı biyokatalizlerin taşıyıcıya bağlanmasından sonra enzimin ya da taşıyıcının biyolojik aktivitelerinin bozulmadan ayrılamayacağı esasına dayanır. Dönüşümsüz enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan prosedürler: kovalent bağlanma, tutuklama veya mikrokapsülleme ve çapraz bağlama olarak ifade edilebilir [64].

1.4.1.1. Kovalent Bağlı Enzim İmmobilizasyonu

Kovalent bağlı metodlarla proteinlerin immobilizasyonu, immobilizasyon metodları içerisinde en fazla kullanılan metodlardan birisidir [65]. Bu metodu kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiye geri kaçışı önlenmiş olmaktadır [66]. 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 [67].

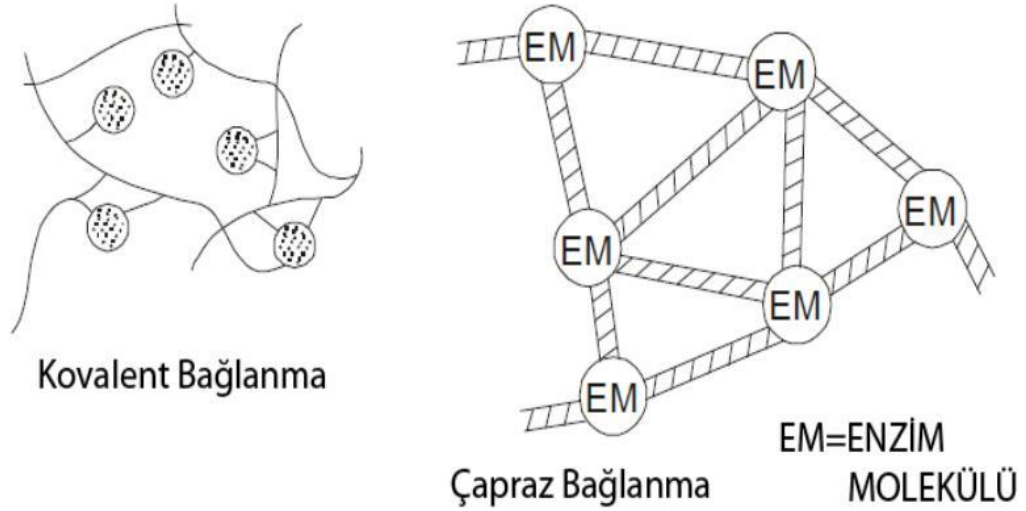
Kovalent bağların formasyonu genellikle enzimde gösterilen aminoasitlerin yan zincirlerinde görülür. Ancak onların asıl bağ güçlerinin aktiviteleri aşağıda verilen yüklerin sıralamasıyla önemli derecede ilişkilidir:



Bunun yanında 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 [68].

Bir enzimin kovalent bağlanması, polimerin reaktif gruplar içeren ajanlarla (etilenin kopolimerizasyonu, maleik asidin anhidridi) veya polimer ve enzimin arasında köprü vazifesi görececek iki fonksiyonlu ajanların etkileşmesiyle oluşur [69].

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 [70].



Şekil 1.11. Kovalent immobilizasyon ve çapraz bağlama gösterimi [68]

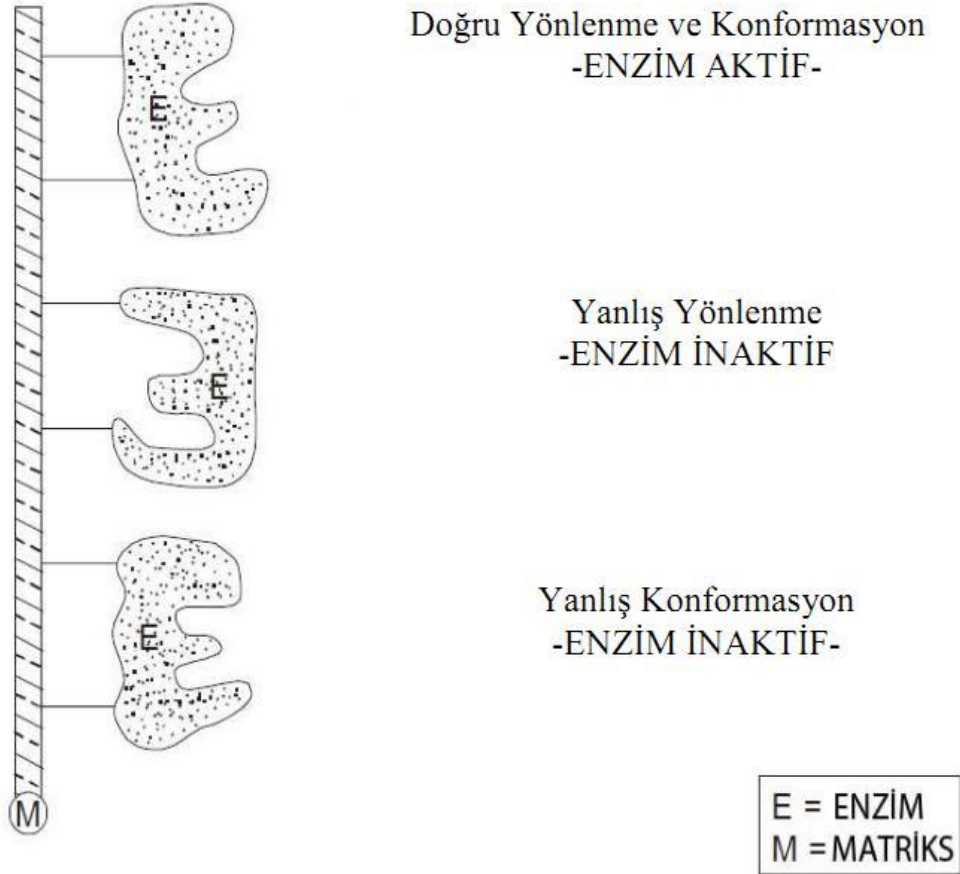
1.4.1.1.2. Kovalent Bağlamanın Avantajları

Enzim immobilizasyonunda kovalent bağlamanın bazı önemli avantajları aşağıda sıralanmıştır:

1. Enzimlerin taşıyıcı matrikse adsorpsiyonu oldukça uygundur. Bundan dolayı yaygın şekilde kullanılması [71],
2. Geniş spektrumlarda bağlanma reaksiyonları, pekçok fonksiyonel grup içeren taşıyıcılarla sağlam bir bağın oluşumu ve bağlanmadan sonra enzim aktivitesinin devam etmesi [72],
3. Kovalent bağlı tutunma pH, iyonik şiddet ve substrat ile geriye dönüş reaksiyonunun olmaması [73].

1.4.1.1.3. Kovalent Bağlamada 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 [74].



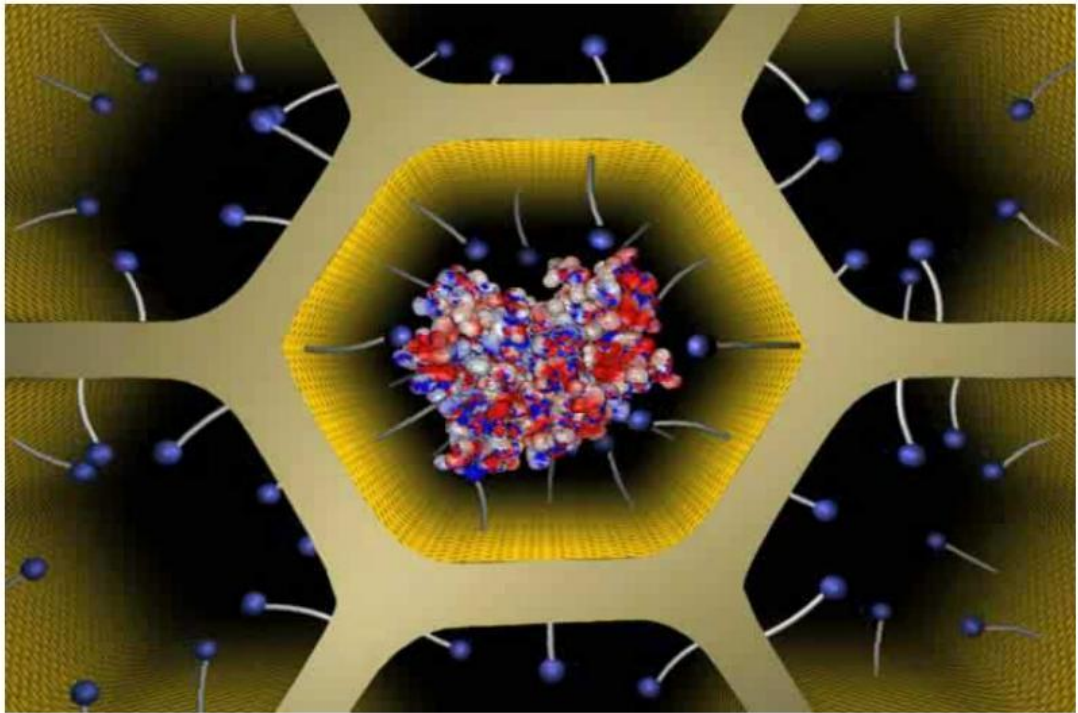
Şekil 1.12. Kovalent Bağın Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri [69]

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 kaybolmasında neden olabilir [75]. Ancak özellikle yönlendirme etkisiyle aktivite kaybını en aza indirebilmek için aşağıdaki metodlar yapılabilir:

- a) Enzim immobilizasyonu sadece doğgun substrat konsantrasyonunda
- b) Yarışmalı inhibisyon kullanılarak gerçekleştirilebilir [76].

1.4.1.2. Tutuklama İmmobilizasyonu

Tutuklama metodu; enzimin bir polimerik ađ içerisinde yerleştirilmesi durumunda enzim ve ürünü geçirebilmesi ancak enzimi tutması prensibine dayanır [77]. 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 [78].



Şekil 1.13. Tutuklama İmmobilizasyonunun Gösterimi [79]

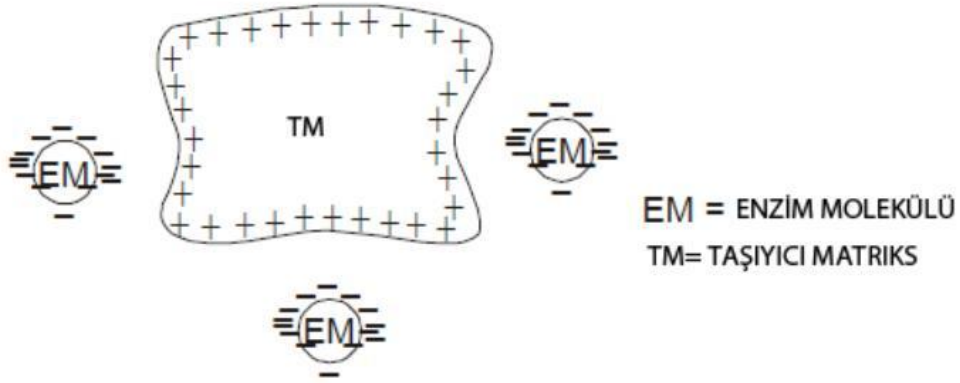
1.4.2. Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Metodları

Dönüşümlü immobilize enzimler, enzim-taşıyıcı bağının türünden dolayı ılıman koşullar altında taşıyıcıdan ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için dönüşümlü 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 [80].

1.4.2.1. Adsorpsiyon

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 [81]. Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonunda hidrojen bağı, Van der waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler matrikse bağlanmada etkilidir. Oysa ki enzimlerin iyonik bağlanmasında tuz köprüleriyle bağlantı görülür [82]. Kovalent olmayan immobilizasyonda, bağın gücünün kuvveti, reaksiyon şartları ayarlanarak (pH, iyonik şiddet, sıcaklık) değiştirilebilir [83]. 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 olabilmesi problem teşkil etmektedir [84].



Şekil 1.14 Nonspesifik Adsorpsiyon İmmobilizasyon Yönteminin Gösterimi [85].

1.4.2.1.2. İyonik Bağlanma

Enzimlerin dönüşümlü immobilizasyonuna, kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşmesi prensibine dayanan yaklaşım örnek olarak verilebilir [86]. Bu prensibin en eski uygulaması iyon değıştiricilerin reçinelerin kullanıldığı kromatografi yöntemleridir. Metod basit ve dönüşümlüdür fakat genel olarak enzimlerin bağlarının güçlü olması ve tam olarak aktif oldukları koşulları bulmak oldukça zordur [87]. Özellikle son zamanlarda immobilize polimerik iyonik ligandların kullanımı, protein-matriks etkileşimlerin modülasyonu ile yapılan pekçok çalışma vardır ve böylece türevlerinin özelliklerini daha verimli hale getirebileceği görülmüştür [88].

1.4.2.1.3. Hidrofobik Adsorpsiyon

Bir diğer yaklaşım da hidrofobik etkileşimlerin kullanımıdır. Hidrofobik adsorpsiyon 30 yıldan fazla sũredir kromatografik prensiplerle kullanımı gerçekleşmiştir. ˆnemli deneysel parametreler olan pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklıkla oldukça ilişkilidir. Etkileşimlerin gũcũ, protein ve absorbentin hidrofobitesine dayanır [90]. Absorbentin hidrofobitesi, hidrofobik ligand molekũlũnũn boyutuyla ve taşıyıcının yer değiştirme derecesiyle dũzenlenebilir. β -amilaz ve amiloglukosidaz'ın hidrofobik adsorpsiyonu, bu immobilizasyona ˆrnek olarak verilebilir. Bunun yanında hidrofobik adsorbentlere dˆnũřümlũ bağlanmanın pek çok ˆrnekleri rapor edilmiştir [89].

1.4.2.1.4. Afinite Bağlanma

Komplementer biyomolekũller arasında afinitenin prensibi enzim immobilizasyonu ile ifade edilmektedir. Etkileşimlerin ˆnemli oranda seçiciliği metodun ˆnemli ˆzellięindedir. Ancak, metod pahalı afinite ligandının matrikse kovalent bağlanması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır [91].

1.5. İmmobilizasyon Metodunun Seçimi

İmmobilizasyon metodunun başarılı olmasının derecesi enzim ile reaksiyonun yũrũtũleceęi koşulların kararlılığı ˆnemlidir [92]. İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde sũrekli katalizˆr olarak kullanılacağından immobilizasyon metodunun seçilmeden ˆnce tepkimenin yũrũyeceęi ortam gˆz ˆnũne alınmalıdır. Bunun yanında enzim aktivite kaybının en az olacağı immobilize yˆnteminde seçilmesi son derece ˆnemlidir [68].

Farklı immobilizasyon metodlarının enzim aktivite etkisini aminosiklaz enzimi ˆzerinde yapılan çalışmanın sonucu izelge 1.5 de gˆsterilmiřtir [41].

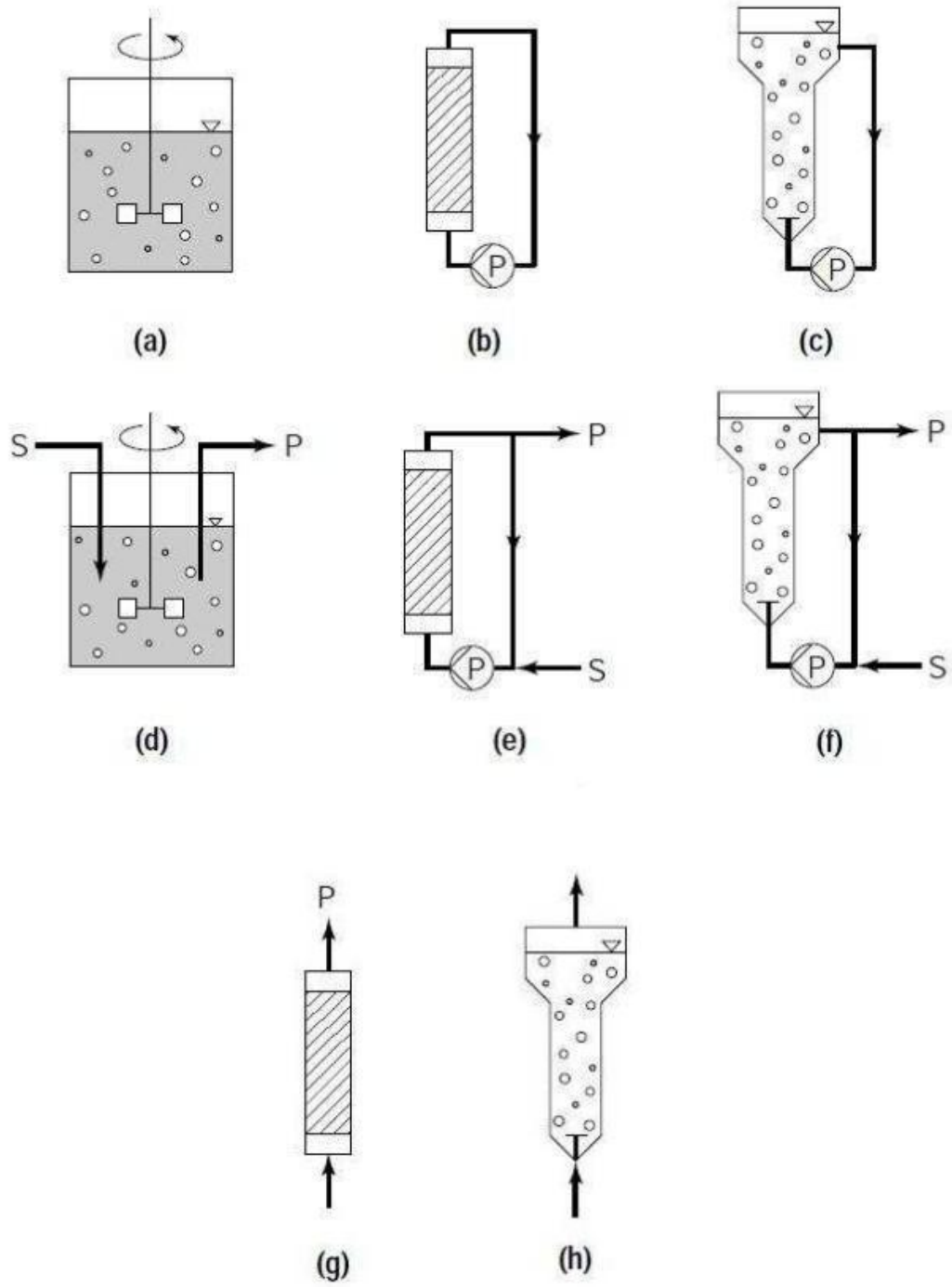
Çizelge 1.5 İmmobilize yöntemlerine göre aktivitenin değişimi [41]

Enzim	Taşıyıcı	Enzim İmmobilizasyon Metodu	Enzim Aktivitesinin Devamı (U/ml dak)
Aminosiklaz	AE-Selüloz	Çapraz Bağlanma	0.6
	CN-Br ile aktifleştirilmiş Sefadeks	Gluteraldehid ile 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 [93]. Dönüşümlü immobilizasyon proseslerinde reaktörde istenmeyen bir denge oluşursa en önemli problemlerden birisi bu dengenin bozulmasıdır [94].

Pek çok 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 1.15). Bunların pek çoğunda 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 [95-98].



Şekil 1.15. İmmobilize Enzimler İçin Reaktörler [(a-c) toplam geri karıştırmaile 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] [95-98]

1.7. İmmobilize Enziminlerin Özellikleri

Enzim immobilizasyonunun sonucu olarak enzim molekülünün termal stabilitesi ve katalitik aktivitesi gibi bazı özellikleri, çözünebilir eşleniklerine göre değişiklik gösterebilir [99]. Özelliklerinin modifikasyonlarındaki değişimin nedeni, 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 [100].

Genel olarak enzimler immobilize edildiğinde, enzimin çalışma stabilitesi artırılır. Stabilizasyon kavramı, immobilizasyon enzimleri için son derece önemli ve etkileyici bir güçtür. Pek çok durumda gözlenen operasyonel stabilizasyon, enzimin bağlanma sonucuyla ilgilidir. Ancak, moleküler seviyedeki doğru stabilizasyonun gösterilmesi, proteinlerin immobilizasyonunun çok noktadan kovalent bağlanması ile olabilmektedir [101]. Farklı metodların kullanımıyla ilgili pek çok bilimadamı tarafından yapılan çalışmalarda, stabilizasyon ve matrikse enzimin kovalent bağlarla bağlanma sayıları arasında önemli bir bağlantı olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin kullanımı ile ilgili temel problemlerden birisi, özellikle enzimlerin makromoleküler substratlarıyla gösterdiği katalitik aktivitenin kaybıdır [102].

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 pek çok strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; izole makromoleküler zincirlerin ağlarından oluşmuş taşıyıcıların seçimi, immobilize olacak enzim rezidülerinin dikkatli seçimi ve hidrofilik veya inert uzantı kollarının kullanılmasıdır [103].

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesine sahip paraoksonaz enzimini, enzim immobilizasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan Kitosan'a kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirmektir.

Bu yöntem, Kitosan'ın kimyasal açısından son derece kararlı olması ve biyoyumlu bir materyal olmasından dolayı endüstriye uygulanabilir özelliğe sahiptir. Kitosan, 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 kararlı olup, ömrünün artması ve Kitosan'ın sahip olduğu özellikler yöntemin uygulanabilirliğini arttırmaktadır.

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

İmmobilizasyon işlemi ile kararlılığı arttırılmış paraoksonaz'ın canlılarda eksikliğinin 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.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan Sepharose-4B, 9-Aminofenantren, L-Tirozin, standart serum albumin, sodyumbikarbonat, TEMED, Tris-HCL, Triton X-100, paraoxon, Chitosan powder Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie Brillant Blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merck A.G.'den sağlandı.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

pH metre	(Orion-model 920A)
UV-Spektrofotometre VARIAN)	(CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-
Manyetik Karıştırıcı	(IKA Combimag RCO)
Kronometre	(Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr)
Terazi	(libror, AEG-220 (Shimadzu)
Otomatik Pipetler	(fischer)
Homojenize Edici	(Ev tipi blender)
Derin Dondurucu	(Sanio Medical Freezer)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

0.1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10.0); 8,401g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8);8,401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 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 Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.0);1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ 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 (NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0);* 14,2g (0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 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 (NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu;* 14,2g (0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 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) Na₂HPO₄ 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 brillant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %85'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 CaCl₂ 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) CaCl₂ katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.*

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
β -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

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

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1.Kan serumunun ayrılması

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4°C'de ve 10 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aynı gün deneysel çalışmalarda 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 (1 mM paraoksan) + koenzim (2 mM CaCl₂) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikte sonra 412 nm'de 37 °C'de 1 dakikadaki absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 Unite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün µmol'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, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [104]. 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 3.2).

Enzim örneklerinden 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, η_{enz} (%) ve aktivite bağlanma ürünü η_{act} (%) aşağıdaki gibi hesaplandı :

$$\eta_{enz} = P_1/P_0 \times 100$$

$$\eta_{act} = SA_2/SA_1 \times 100$$

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. Bu amaçla literatürden bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [100] aşağıda verilen formülle belirlendi;

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

V : Serum hacmi

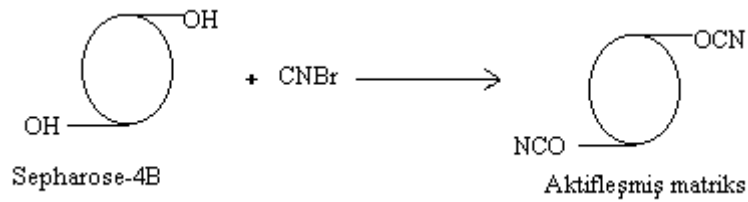
S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatogafisi ile Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.2.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

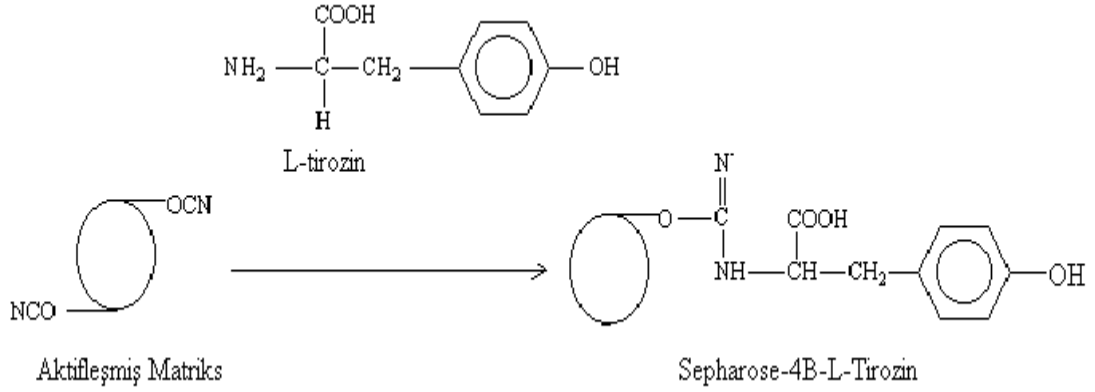
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Üzerine eşit hacimde distile su eklendi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona 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 Na₂HCO₃ tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

2.2.5.2.2. L-tirozinin Bağlanması

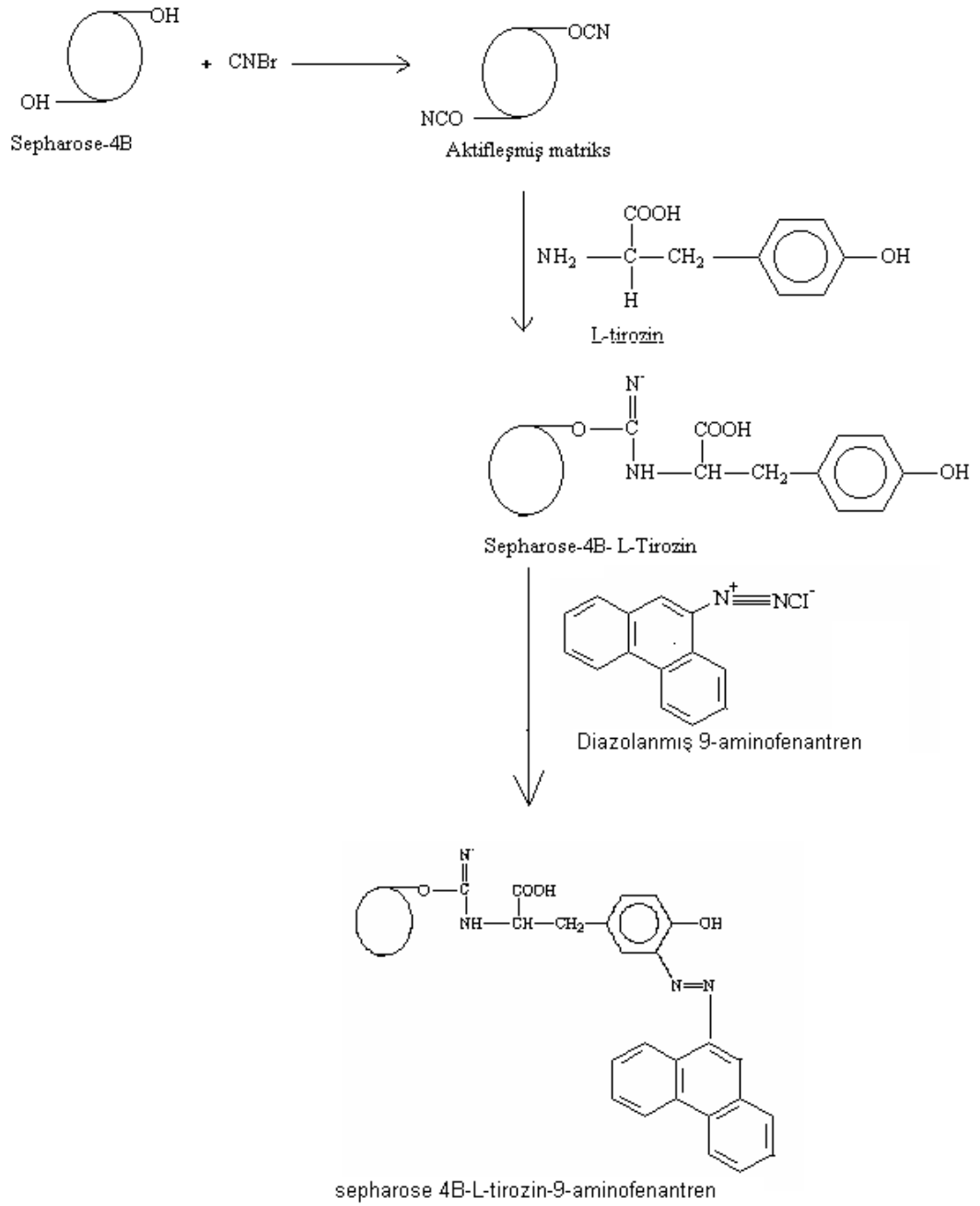
CNBr ile aktive edilmiş matriks üzerine, 20 mL’inde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ 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. 9-Aminofenantren Bileşiğinin Bağlanması

25 mg 9-Aminofenantren 0 °C civarında 10 mL THF içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C’deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 9-Aminofenantren çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 9-Aminofenantren, 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 Na₂HPO₄ (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.3). Bu süre sonunda renksiz olan çıkış maddelerinden bordo renkli bir jel elde edildi.



Şekil 2.3. 9-Aminofenantren bileşiğinin bağlanması

2.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofözezi (SDS-PAGE) Laemmli [101] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofözeze 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 elektrofözezin 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 yığıma 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 elektrofözeze tankına yerleştirildi. Elektrofözeze 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 (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (25.0 kDa), β-laktoglobulin (18,4 kDa) ve Lizozim (14,4 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 120 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.

2.2.7. Saflaştırılan Enzimin İmmobilizasyonu

2.2.7.1. Kitosan Taneciklerinin Hazırlanması

Kitosan taneciklerinin hazırlanmasında Shao-Hua Chiu ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı [117]. 0,5 ml asetik asit 50 ml distile suya eklendi (1 v/v%). 1,5 gr Kitosan tozu 50 ml suya eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı (3 w/v%). Daha sonra kitosan solusyonu sulu asetik asit solüsyonuna eklenerek oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı.

Shao-Hua Chiu ve arkadaşlarının yöntemine göre ikinci basamakta gereken koagülasyon çözeltisi şu şekilde hazırlandı :

26 ml etil alkol 100 ml distile suyla karıştırıldı (%26 v/v). 4 gr sodyum hidroksit 100 ml distile suda çözüldü (1 N NaOH). Etil alkol çözeltisiyle sodyum hidroksit çözeltisi birleştirildi.

Kitosan solusyonu oda sıcaklığında koagülasyon çözeltisine mikropipet yardımıyla 3 saat damla damla eklenerek Kitosan tanecikleri oluşturuldu. Distile su

ile vakum altında süzülerek yıkanan tanecikler 0,05 M fosfat tamponunda saklandı (pH=7).

2.2.7.2.Enzimin Kitosan Taneciklerine Bağlanması

Enzimlerin Kitosan polimerindeki amin gruplarıyla bağlanmasında geleneksel glutaraldehit ile bağlanma metodu kullanıldı. %5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlanan kitosan taneciklerinin bulunduğu çözeltiliye eklendi. Çalkalayıcıda 4 saat +4°C'de karıştırıldı. Son olarak bağlanmayan glutaraldehitler distile suyla vakum altında yıkanarak uzaklaştırıldı.

2.2.8. İmmobilize ve Serbest Enzimin Zaman, Sıcaklık ve pH ile Değişimleri ve termal stabiliteleri

2.2.8.1. İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivitelerinin Zamana Bağlı Olarak Değişimleri

Hem immobilize hem de serbest enzimin aktivite ölçümleri 48 saatlik aralarla 624. saate kadar sürdürüldü. 624. saatten sonra kitosan taneciklerinin parçalanmaya başlaması nedeniyle ölçüm bitirildi.

2.2.8.2. İmmobilize ve Serbest Enzimin Termal Stabiliteleri

Serbest paraoksanaz enziminin 38°C'de en yüksek aktivite değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında paraoksonaz'ın 45°C 'de denatüre olduğu belirtilmiştir. İmmobilize edilmiş enzimle serbest enzimin termal stabilitelerinin belirlenmesi için 37°C, 45°C, 65°C sıcaklıklardaki aktivitesinin 30 dakika arayla enzim aktivite ölçümü incelendi.

2.2.8.3. İmmobilize ve Serbest Enzimin pH'a Bağlı Olarak Değişimleri

Serbest paraoksanaz enzimi ile immobilize enzimin farklı pH'larda (pH = 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0 (2 Mm CaCl₂ içeren 10 Mm tris-HCl tamponu) arasındaki enzim aktivite değişimi ölçüldü.

2.2.8.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Sıcaklıkla Aktivitelerinin Değişimi

Serbest ve immobilize enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini gözlemek amacıyla her ikisinin de 20°C ile 70°C arasındaki aktivite değerleri incelendi.

2.2.9. Optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda (37°C'de ve 0,1 M pH:8 tris-base tamponunda) hem serbest hem de immobilize enzimin paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

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

3. BULGULAR

3.1. Enzimin Saflaştırılması

3.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [100] aşağıda verilen formülle tespit yapıldı:

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

V : Serum hacmi

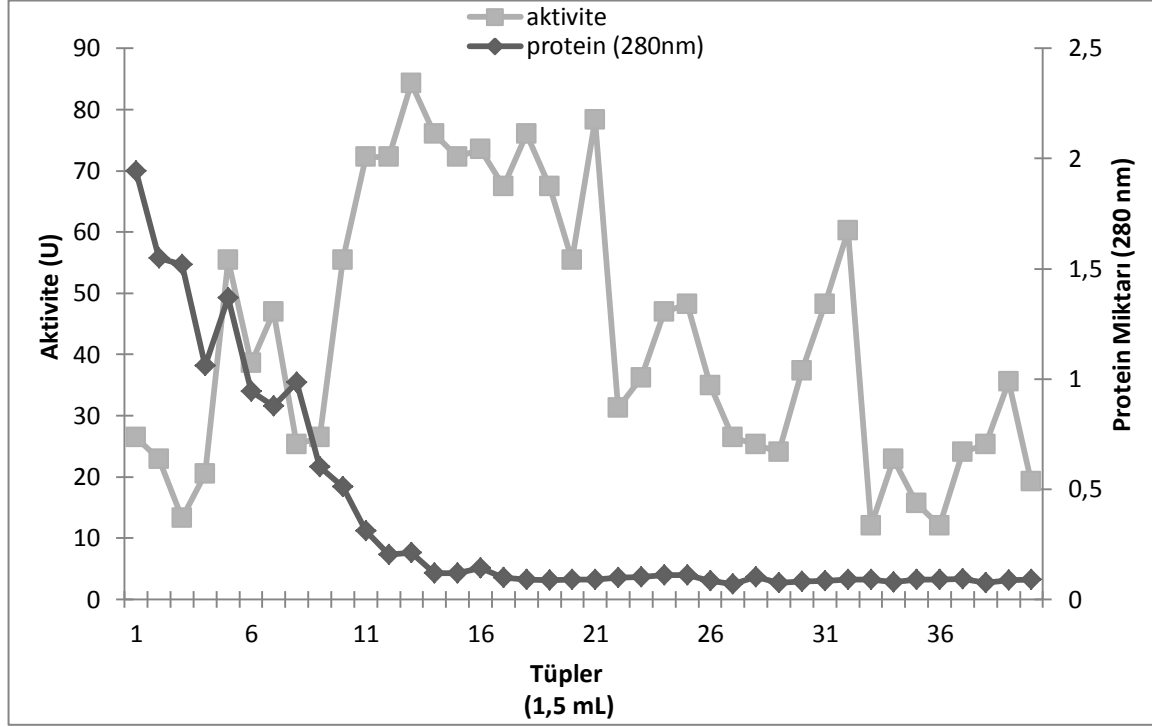
S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.2.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Na₂HPO₄ 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 (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Na₂HPO₄ pH:8,0 tamponu ve 0,1 M Na₂HPO₄ pH:8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Altan 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 3.1).

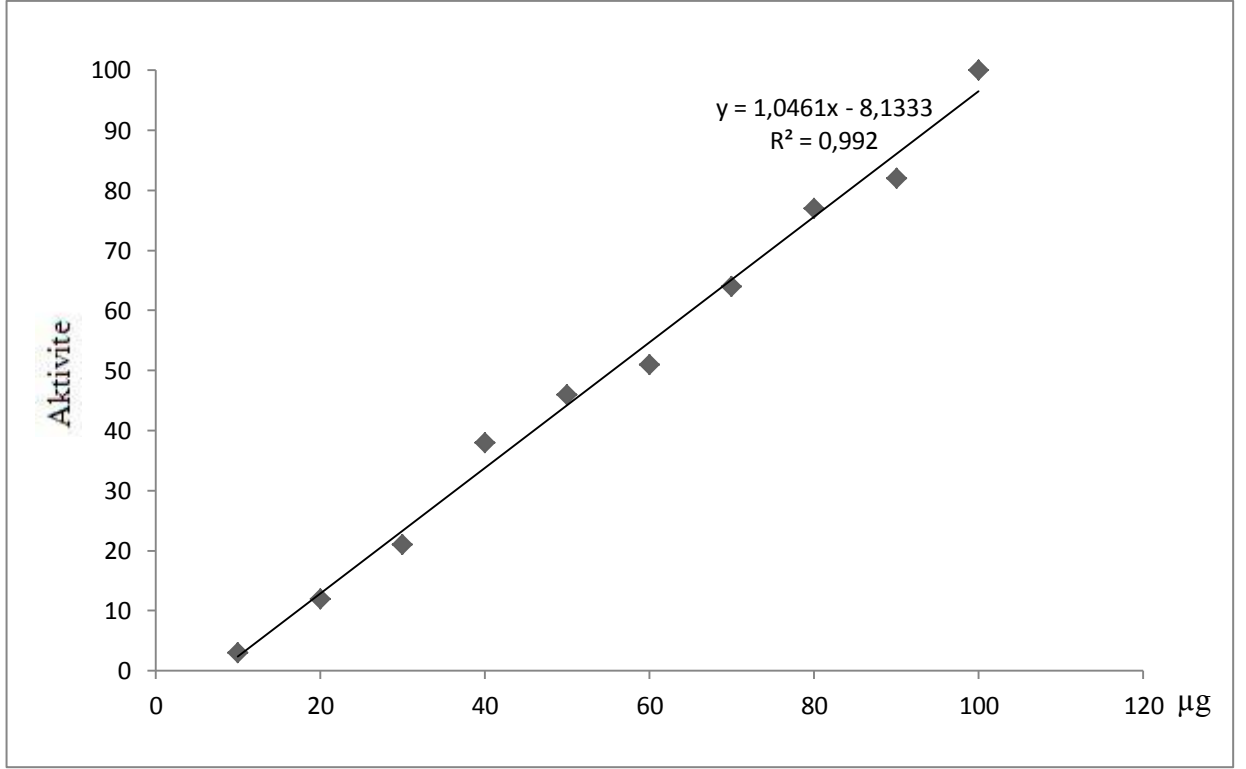


Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 7 cm ve çap 1 cm)

3.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.2’de verildi.

Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



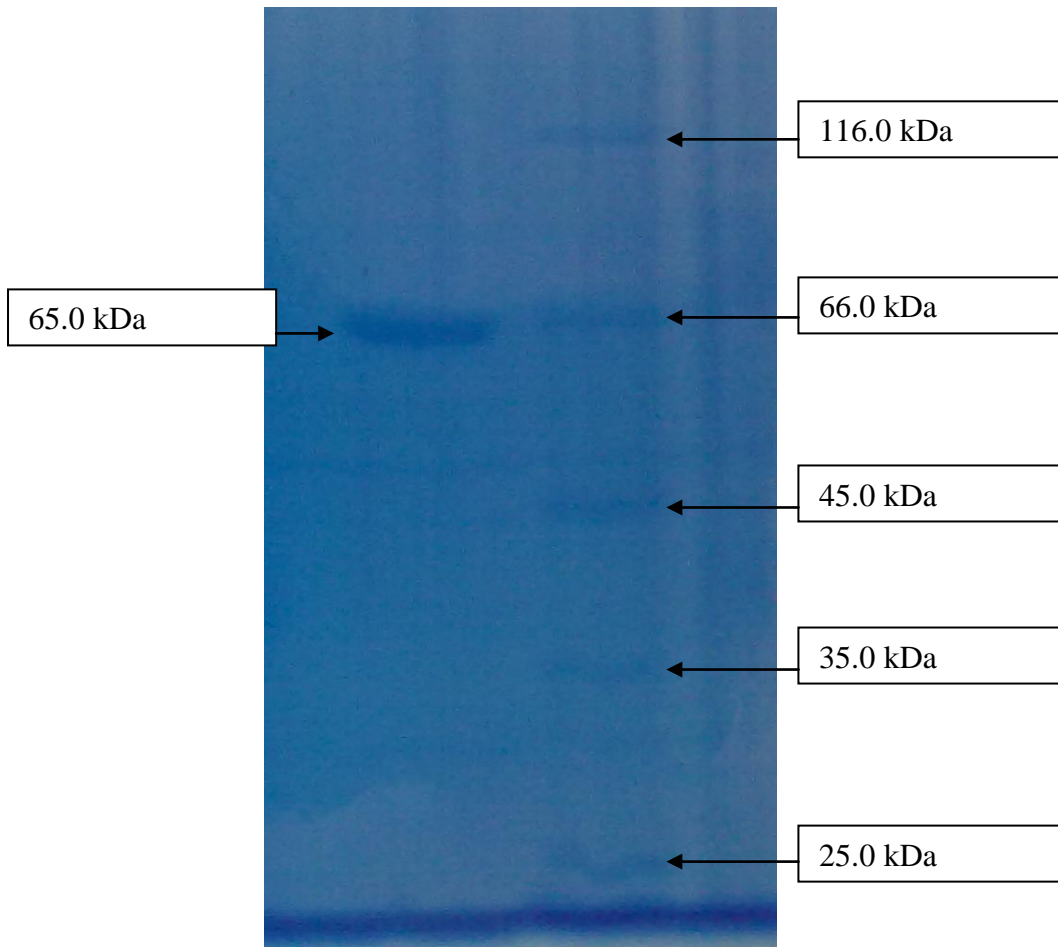
Şekil 3.2 Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

Çizelge 3.1 Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (unit)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (unit/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Derecesi
Serum	55	743,3	317,7	2,34	100	-
(NH₄)SO₄Çöktürmesi	34	493,9	201,9	2,44	66,44	1,04
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1,5	109,6	0,089	1231	14,74	526

3.3. Serum Paraoksonaz Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

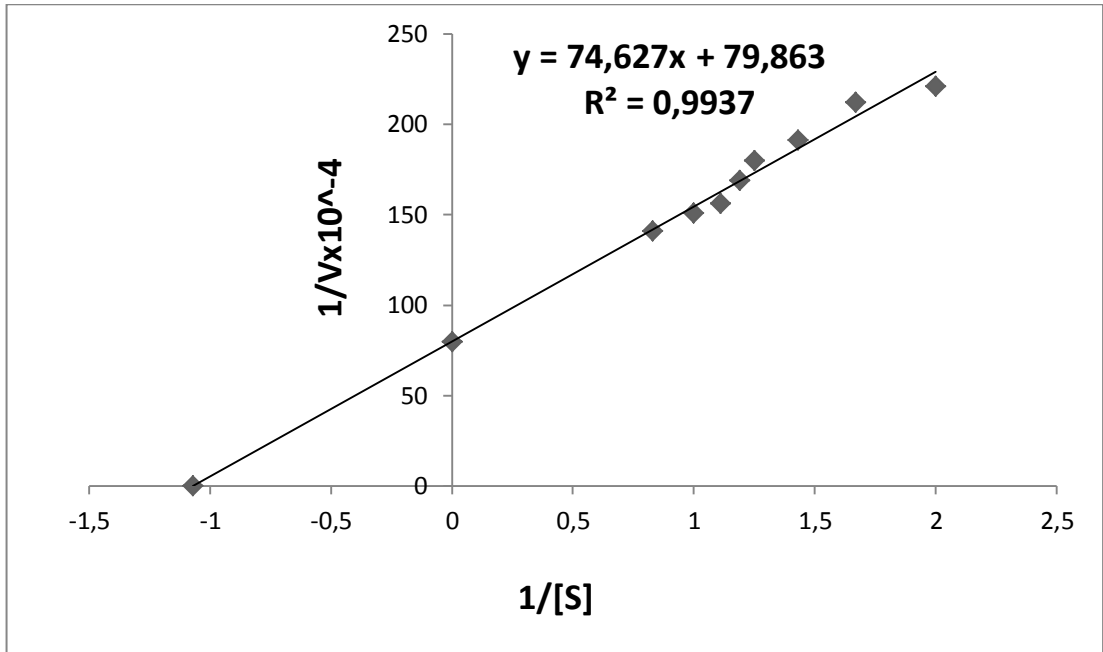
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.6.'da anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.0 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18,4 kDa), Lizozim (14,4 kDa)

3.4. Optimum Şartlarda 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 1,067 ve V_{max} değeri 125 U/ml dakika olarak bulundu.



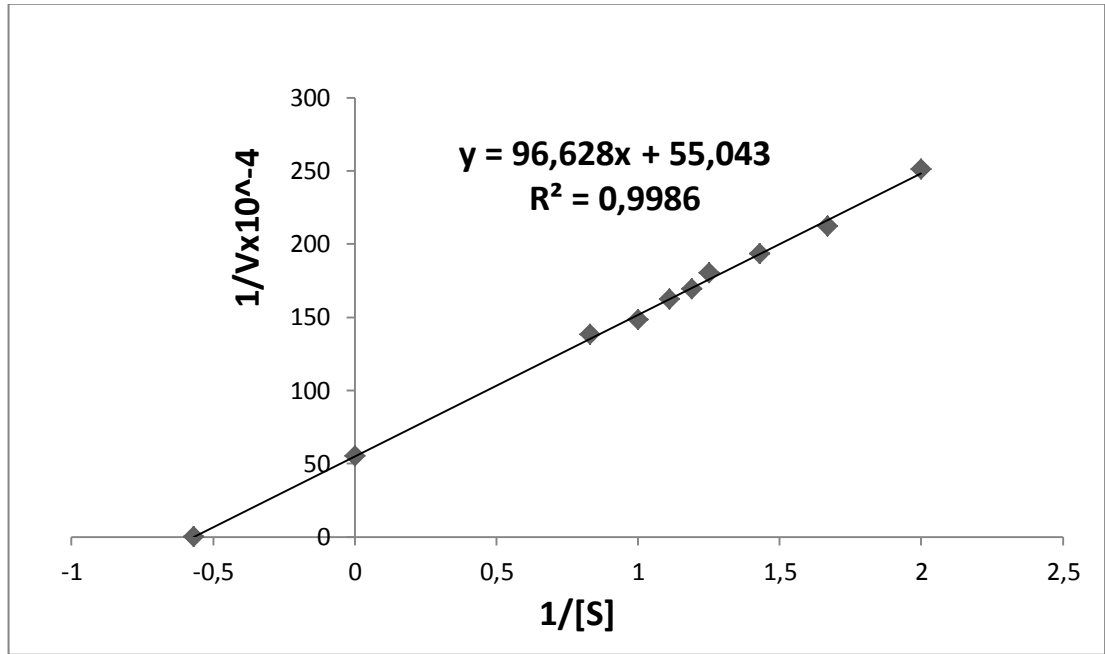
Şekil 3.4. Saflaştırılmış insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 3.2. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

100 Mm Tris Tamponu (µl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
990	50	10	1050	0,2	0,037	44,57	224	2
980		20		0,4	0,039	46,98	213	1,67
975		25		0,5	0,043	52,34	191	1,43
970		30		0,6	0,046	55,42	180	1,25
965		35		0,7	0,049	59,03	169	1,19
960		40		0,8	0,053	63,85	156	1,11
950		50		1	0,055	66,26	151	1
940		60		1,2	0,059	71,08	141	0,83

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 3.4). Grafikten yararlanarak K_m değeri 1,755 ve V_{max} değeri 181 U/ml dakika olarak bulundu.



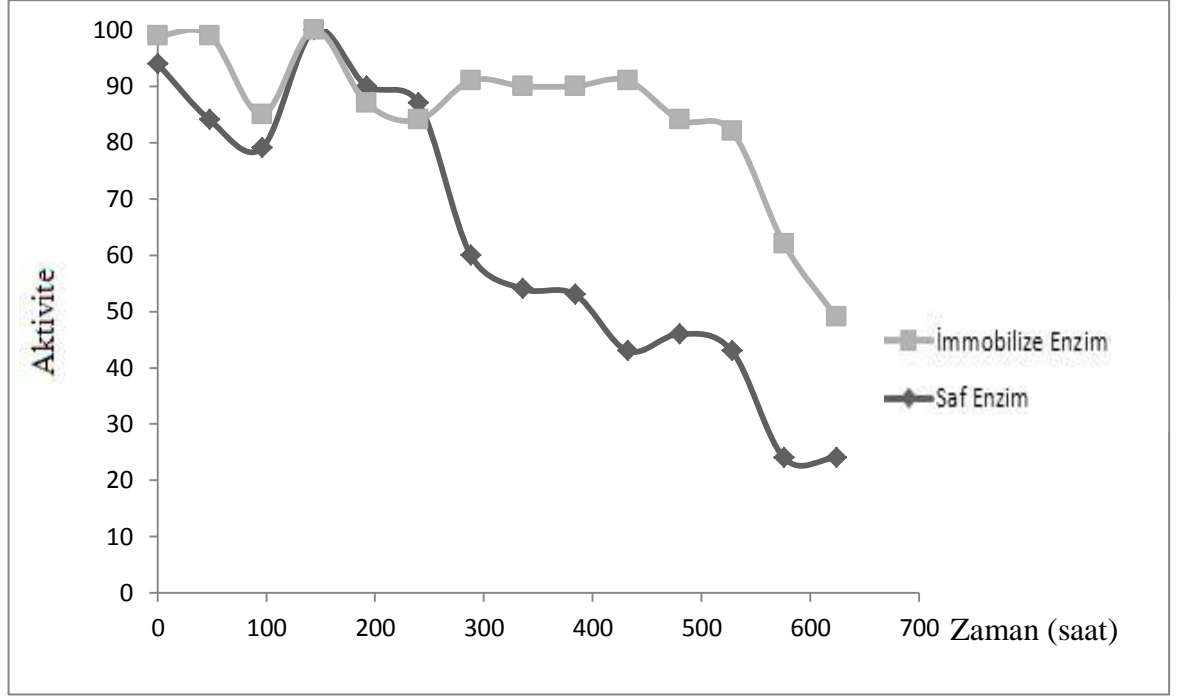
Şekil 3.5. İmmobilize edilmiş insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 3.3. İmmobilize edilmiş İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratı kullanılarak, Km ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.

100 Mm Tris Tamponu (µl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V x 10 ⁻⁴	1/[S]
990	50	10	1050	0,2	0,033	39,75	251	2
980		20		0,4	0,039	46,98	212	1,67
975		25		0,5	0,043	51,80	193	1,43
970		30		0,6	0,046	55,41	180	1,25
965		35		0,7	0,049	59,03	169	1,19
960		40		0,8	0,051	61,49	162	1,11
950		50		1	0,056	67,46	148	1
940		60		1,2	0,060	72,28	138	0,83

3.6. İmmobilize ve Serbest Enzimin Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Hem immobilize hem de serbest enzimin +4°C 'de aktivite ölçümleri 48 saatlik aralarla 624. saate kadar sürdürüldü. 624. saatten sonra kitosan taneciklerinin parçalanmaya başlaması nedeniyle ölçüm bitirildi.



Şekil 3.6. İmmobilize ve Saf Enzimin Aktivite Zaman Grafiği

3.7. İmmobilizasyon Ürünlerinin Aktivitesi

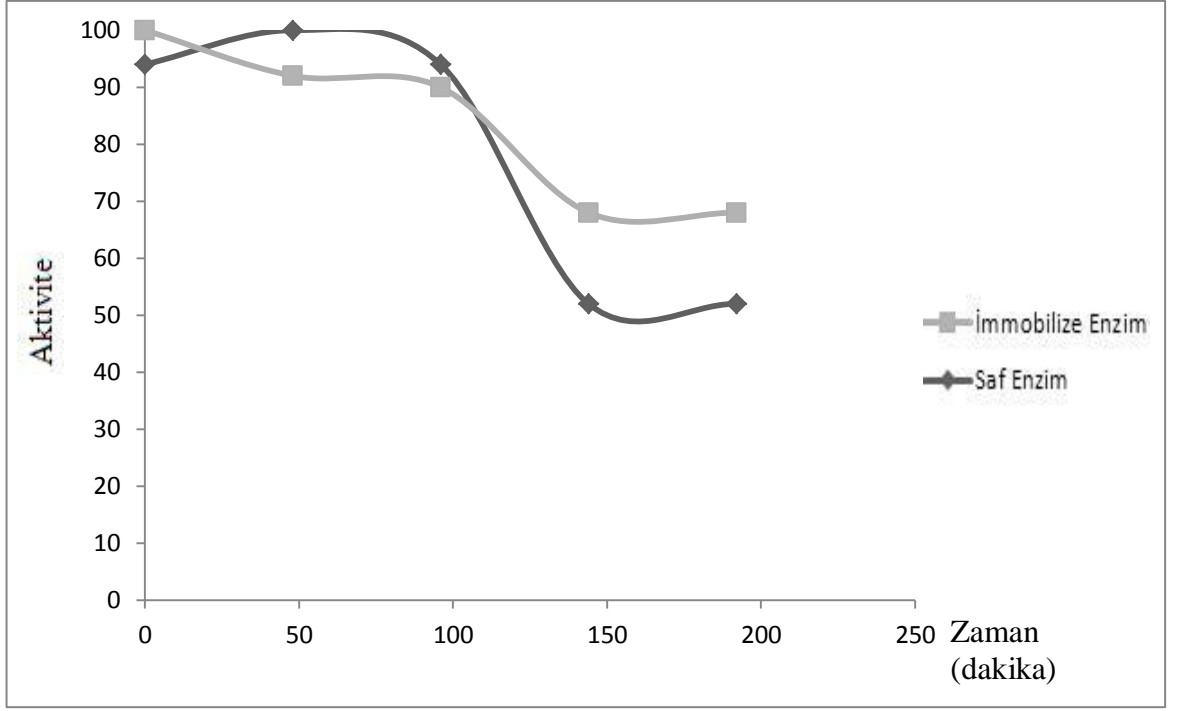
Enzim immobilizasyonun verimini belirlemek amacıyla hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan saf paraoksonaz enziminin ve immobilize enzimin Bradford yöntemiyle protein miktarları ve spesifik aktiviteleri bölüm 2.2.4 'de ifade edilen hesaplama yöntemiyle hesaplanmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.4. Kitosan tanecikleri üzerine immobilize edilmiş insan serum PON1 enziminin bağlanma etkisi.

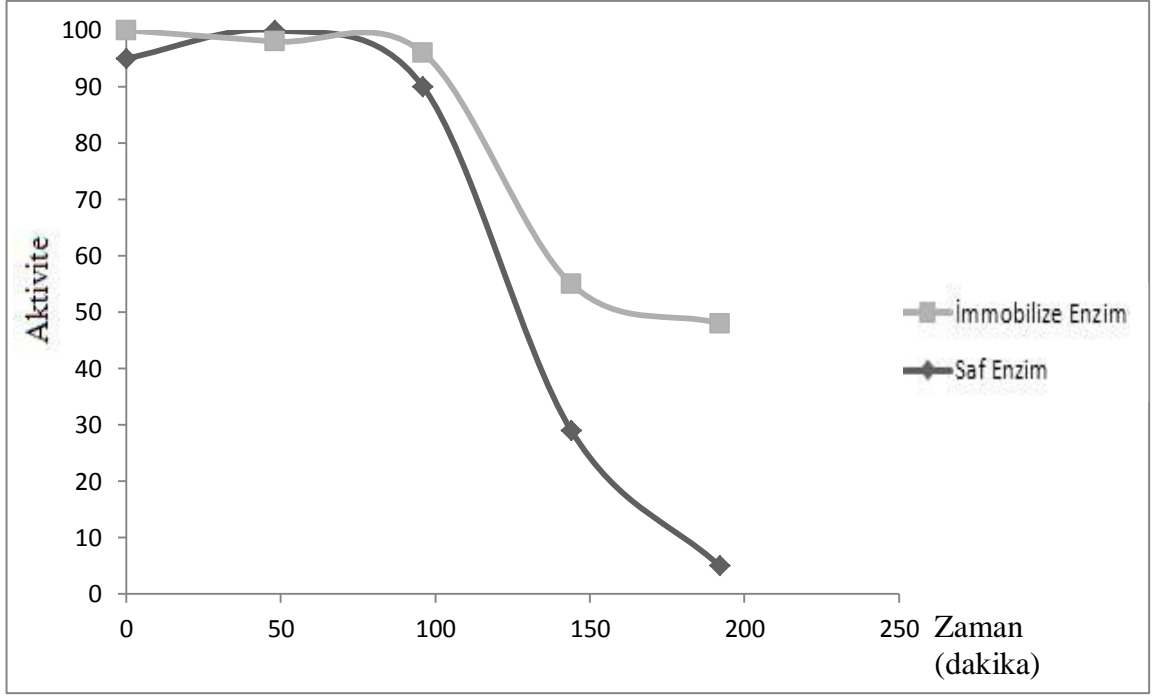
Serbest Enzim		İmmobilize Enzim				
Protein (µg/10 kitosan taneciği)	Spesifik Aktivite(unit/µg)	Yıkanan Proteinler (µg)	Bağlanan Proteinler (µg)	Toplam Aktivite (unit)	Spesifik Aktivite (unit/µg)	Verim (%)
47	2,34	15	32	93,97	2,93	68

3.8. Saf ve İmmobilize Enzimin Termal Stabilitesi

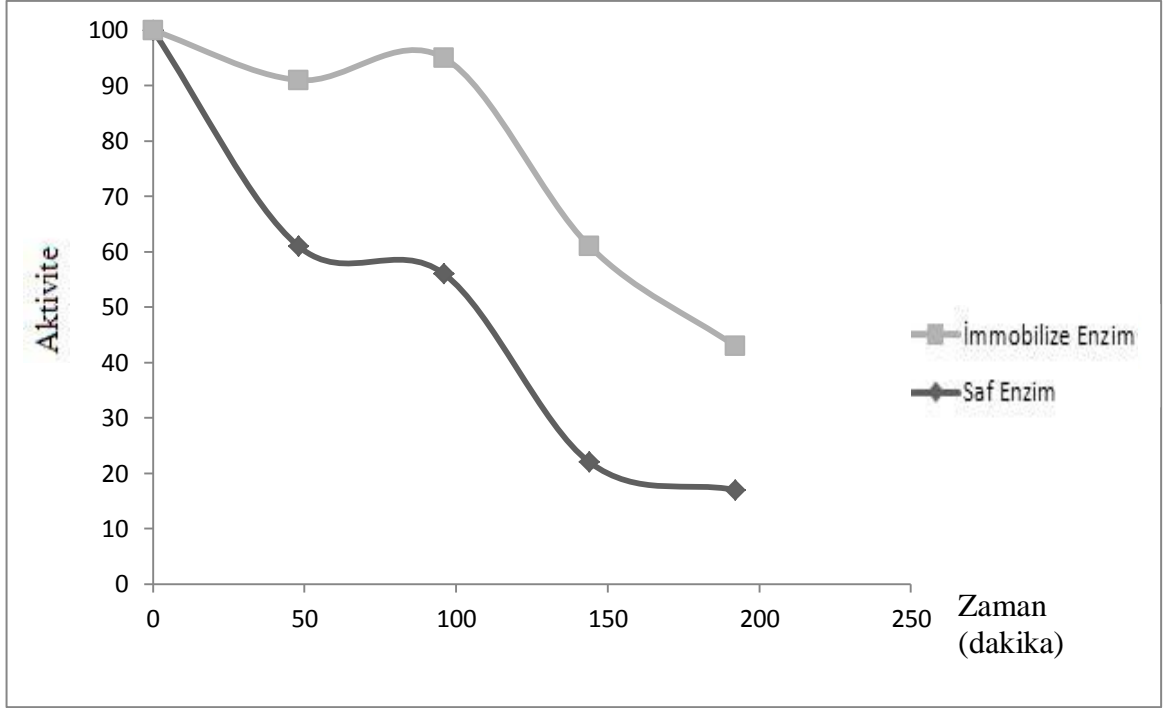
Saf enzimin ve immobilize enzimin termal stabilitesini belirlemek amacıyla bölüm 2.2.8.2'de anlatıldığı gibi uygulanmış ve Şekil 3.7., Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.'daki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.7. 37°C’de immobilize ve saf enzimin % rezidual aktivite-zaman grafiği



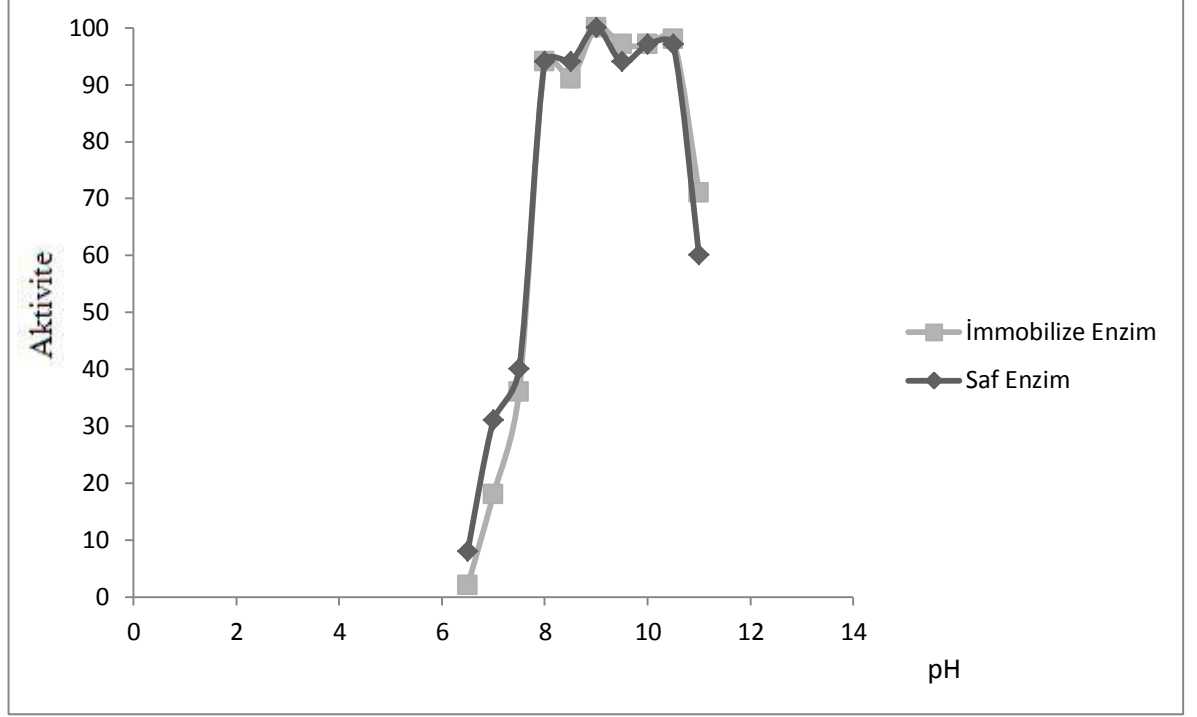
Şekil 3.8. 45°C’de immobilize ve saf enzimin % rezidual aktivite-zaman grafiği



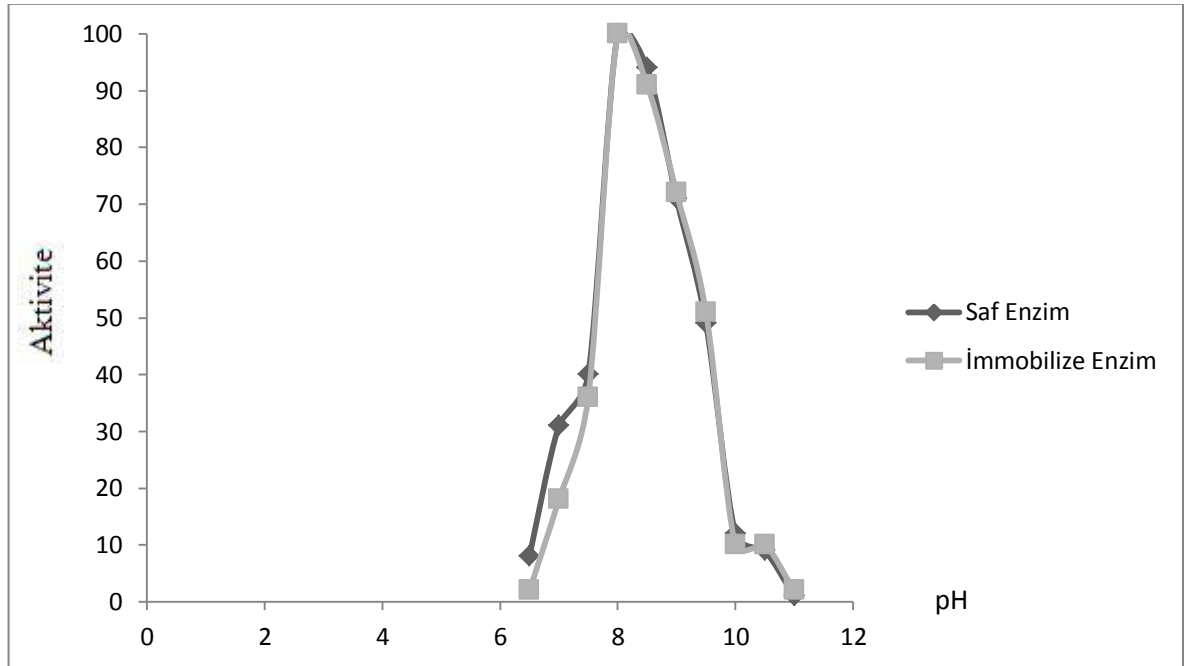
Şekil 3.9. 65°C’de immobilize ve saf enzimin % rezidual aktivite-zaman grafiği

3.9. Aktivitenin pH İle Değişimi

pH'ın saf enzime ve immobilize enzime etkisini belirlemek amacıyla bölüm 2.2.8.'de anlatıldığı gibi uygulanmış ve Şekil 3.10.'da ki sonuçlar elde edilmiştir.



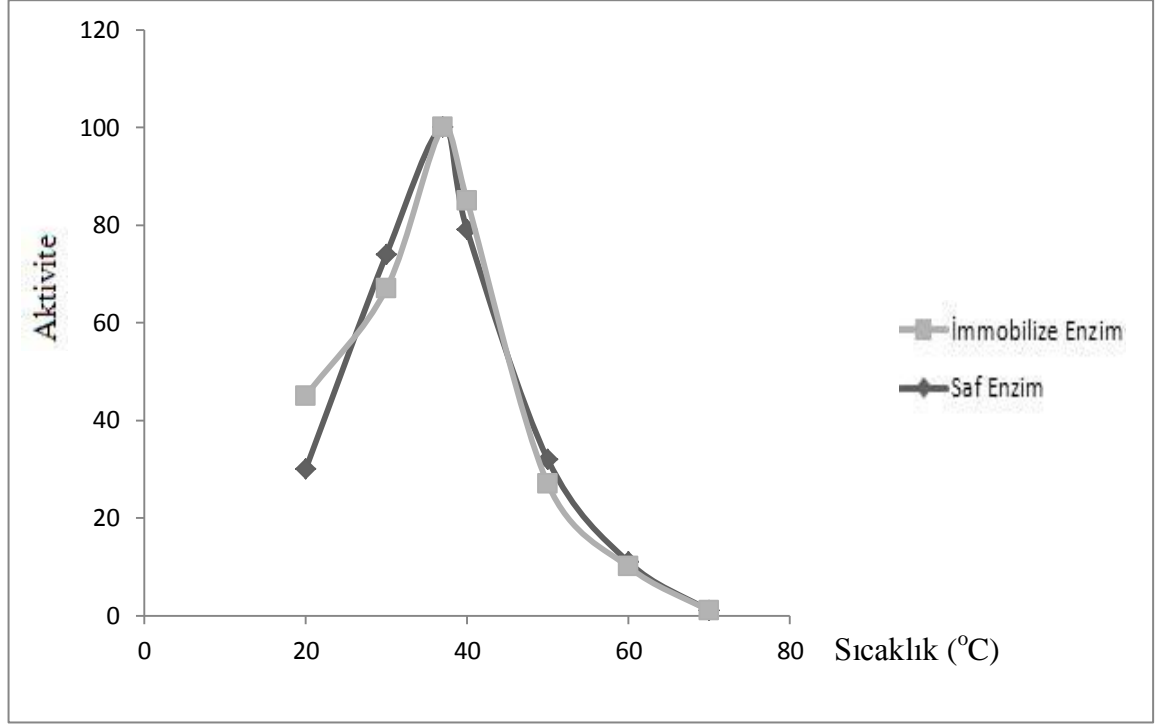
Şekil 3.10. Aktivite (%) – pH grafiği



Şekil 3.11. Paraoxon aktivitesi çıkarıldıktan sonraki Aktivite(%) – pH Grafiği

3.10 Saf ve İmmobilize Enzimin Aktivitelerinin Sıcaklıkla Değişimi

Bölüm 2.2.8.4’te açıklandığı üzere serbest ve immobilize enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini gözlemek amacıyla her ikisinin de 20°C ile 70°C arasındaki aktivite değerleri incelendi ve Şekil 3.11.’deki bulgular elde edildi.



Şekil 3.12. İmmobilize ve saf enzimin sıcaklık değişimiyle aktivitelerindeki değişim.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, hem antioksidan hem de detoksifikasyon aktivitesine sahip olmasından dolayı, metabolizmada önemli fizyolojik işlevlere sahip paraoksonaz enziminin immobilizasyonu için, hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlendi. Sepharose-4B-L-tirozin-9-Aminofenantren kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak insan serumları saflaştırıldı. Sonra hem kimyasal açısından kararlı ve biyouyumlu olmasından dolayı endüstriye uygulanabilir özelliğe sahip Kitosan üzerine saflaştırılmış paraoksonaz enziminin immobilizasyonu işlemi gerçekleştirildi.

Paraoksonaz, N terminal bölgesinde bulunan ve H1 ve H2 heliks yapısında olan hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır [105]. 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 [106].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamaktasentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, 9-Aminofenantren 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.

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (9-Aminofenantren) L-tirozin bileşiği aracılığı ile bağlanmıştır. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [109] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli

olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca ligantın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör molekül olduğu L-tirozinin bir başka kullanım sebebidir.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşmedir. Bu etkileşmenin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu rapor edilmiştir. Kullanılacak ligantın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolonda 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 [107]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [108]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görölmektedir [109]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 9-aminofenantren bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca yapılan bir çalışmada hidrofobik karaktere sahip Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılmış ve 227 kat saflaştırma elde edilmiştir [110]. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan 1-naftilamin bileşiğinin hidrofobik karakteri bizim çalışmamızda kullandığımız 9-aminofenantren bileşiğinden daha zayıftır. Bu sebeple bizim saflaştırma oranımız daha fazla bulunmuştur.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan

tuzlar Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , NaSCN olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir.

Araştırmamızda paraoksonaz enzimini insan 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 [110].

Bu yöntemle insan paraoksonaz enzimi 526 kat saflaştırılmıştır. 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 [111-113].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 65 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 43 kDa olarak belirlemişlerdir [113]. Fakat enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [114]. 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 [115]. Paraoksonaz'ın molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan, tavşan, sıçan ve koyunun paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı hemen hemen benzerlik göstermektedir [113].

Çalışmamızda taşıyıcı materyal olarak kitosan kullanılmıştır. Enzimlerin Kitosan'a immobilizasyonu hem laboratuvar koşullarında hem de endüstriyel uygulamalarda kolay ve hızlıdır. Immobilizasyon yöntemi olarak Chiu ve arkadaşlarının yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntemle göre öncelikle toz halindeki

Kitosan'ın immobilizasyona uygun tanecik yapısına getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kitosan öncelikle Asetik asit (%2 w/v) solusyonunda çözülür. Daha sonra 1 N sodyum hidroksit ve %26 v/v etil alkol kullanılarak koagulasyon sıvısı hazırlanır ve kitosan çözeltisi koagulasyon sıvısına damla damla katılarak boncuk şeklindeki kitosan taneciklerinin oluşumu sağlanır. Daha sonra ortama %5 v/v glutaraldehit ve saflaştırılmış enzim katılarak immobilizasyon gerçekleştirilir. [117]

Literatürde Kitosan taşıyıcısıyla ilgili pek çok çalışma değişik enzimlere uygulanmıştır ancak paraoksonaz enziminin immobilizasyonu bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin taşıyıcıya bağlanma yüzdesi % 68 olarak bulunmuştur. Kitosan taşıyıcısı kullanılarak yapılan çalışmalarda bağlanma yüzdesi pek çok enzim için farklılık göstermektedir.

Literatürde paraoksonaz'ın immobilizasyonu ile ilgili kitosan'a 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 saflaştırıldığı kaynak ve immobilize edildiği desteğin türüne ve kullanılan immobilizasyon metoduna göre farklılıklar görülmesi beklenen bir durumdur [116]. 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, termal stabilitesinin daha iyi ve de en önemlisi aktivite ömrünün daha uzun olduğunu göstermektedir. Bu da yaptığımız çalışmanın önemini ayrıca göstermektedir.

Literatürde serbest paraoksonaz enzimi için optimum pH değeri 8, denatürasyon sıcaklığı 45°C olarak bildirilmiştir [10]. Bu çalışmada serbest enzim ile immobilize enzimin optimum pH değerinin de 8 olduğu bulunmuş, ancak 45°C ve üzerinde immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda immobilize enzimin özellikle reaktörler için uygun olabileceği düşüncemizi pekiştirmektedir.

Sepharose-4B-L-tirozin-9-Aminofenantren yapılı jel kullanılarak saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin serbest ve immobilize formlarının kinetik sabitleri (K_m ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla serbest enzim için 1,067 mM ve 125 U/ml'dak, immobilize enzim için ise 1,755 mM ve 181 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 [116].

Enzim aktivitesine etki eden kritik parametrelerden olan sıcaklık ve pH için 37, 45, 65 °C sıcaklıklarında ve pH : 6.5 – 11 arası değişen aralıklarda ölçüm yapılmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- Serum paraoksonaz enzimini saflastırmak için Sepharose 4BL-tirozin-9-aminofenantren kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- Sepharose 4BL-tirozin-9-aminofenantren yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak insan serumundan paraoksonaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda 526 kat saf enzim elde edilmiştir.
- Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 65 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir. Bu da enzimimizin saflaştırma işleminin doğru olduğunu göstermektedir.
- Biyoteknolojik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan taşıyıcı matriks olan Kitosan'a elde edilen serbest paraoksonaz enzimi immobilize edilmiştir. Enzimin taşıyıcıya bağlanma yüzdesi % 68 olarak bulunmuştur.

- Farklı substrat konsantrasyonlarında serbest ve immobilize enzimin Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla serbest enzim için 1,067 mM ve 125 U/ml'dak, immobilize enzim için ise 1,755 mM ve 181 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.
- İmmobilize ve serbest enzimin aktivite süreleri lmştr. Buna göre serbest enzimin akitivitesinin 300. saatte yarılındığı gözlenirken immobilize enzim ile bu sürenin 624. saate kadar uzadığı tespit edilmiştir.

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", American Elseiver, New York., (1975), 176-189,
- [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 arylerase. Biochemistry Journal 245, (1987), 293-296.
- [8] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 369, (2004), 78
- [9] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylerase polymorphism", Am. J. Hum. Genet., 35, (1983), 1126.
- [10] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylerase", Drug Metab. Dispos., 19, (1991),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., 7, (1996), 69.
- [12] Jawad, Z. and Paoli, M., "Novel sequences propel familiar folds", Structure (Camb), 10(4), (2002), 447.
- [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., 11, (2004), 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., 26, (1998), 653.

- [15] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritsch, G., Lücke, C. and Rüterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*", *Structure*, 9, (2001), 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.*, 15(3), (1998), 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.*, 11, (2004), 412.
- [18] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 369, (2004), 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", *Arteroscler Thromb. Vasc. Biol.*, 21, (2001), 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*, 66, (2003), 887.
- [21] Deakin, S., Leviev, I., Gomaschi, 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.*, 277, (2002), 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.*, 275, (2000), 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.*, 10, (1993), 1461.
- [25] Augustinsson, K.B., *Homologous enzymes and biochemical evolution*, (eds) In: Van ThoaiN., 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.*, 28(11), (2000), 1335
- [27] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Eroglu, 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.*, 18, (1998), 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 70paraoxonase", *J. Clin. Invest.*, 101(81), (1998), 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*, 92, (1995), 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*, 119-120, (1999), 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.*, 304, (1994), 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.*, 20, (2000), 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*, 103, (2001), 2283.
- [34] Jawad, Z. and Paoli, M., "Novel sequences propel familiar folds", *Structure (Camb)*, 10(4), (2002), 447.
- [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.*, 11,

- (2004), 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.*, 26, (1998), 653.
- [37] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzsche, G., Lücke, C. and Rüterjans, H., “Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*”, *Structure*, 9, (2001), 493.
- [38] Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. and Philips, M.C., “High density lipoprotein structure”, *Front. Biosci.*, 8, (2003), 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.*, 277, (2002), 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*, 139, (1998), 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.*, 12, (1994), 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.*, 10, (1999), 609–615
- [48] Tischer, W., Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers” *Trends Biotechnol.*, 17, (1999), 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.*, 121, (1988), 1–12
- [52] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15811808>(06.2011)
- [53] Afaq, S., Iqbal, J., "Immobilisation and stabilisation of papain on chelating Sepharose: a metal chelate regenerable carrier" *E.J.B. Electron J. Biotechnol.*, 4, (2001), 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.*, 280, (2000), 178–181
- [55] Guisan., J.M., "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press, Madrid, (2006)
- [56] Shepherd R, Reader S, Falshaw A. "Chitosan functional properties" *Glycoconjugate Journal*, 14, (1997), 535-542.
- [57] Terbojevich M, Muzarelli RA A. "Chitosan" Cambridge:Woodhead Publishing Ltd. Press., 2000.
- [58] No HK, Kim SH, Lee SH, Park NY, Lee SH, Prinyawiwatku W. "Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time" *Carbonhy Polym*, 65, (2006), 174-178
- [59] Han LK, Kimura Y, Okuda H. "Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet" *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23, (1999), 174-179
- [60] Lee JK, Kim SU, Kim JH. "Modification of chitosan to improve its hypocholesterolemic capacity" *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, (1999), 833-839.
- [61] Pittler MH, Abbot NC, Harkness EF, Ernst E. "Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction" *Eur J Clin Nutr*, 53, (1999), 379-381.
- [62] Razdan A, Pettersson D. "Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens" *Br J Nutr* 72, (1994), 277-288.
- [63] Wuolijoki E, Hirvela T, Ylitalo P. "Decrease in LDL-cholesterol with microcrystalline chitosan" *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 21, (1999), 357-361
- [64] Schulze, B., Wubbolts, M.G., "Biocatalysis for industrial production of fine chemicals" *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, (1999), 609–615
- [65] 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.*, 12, (1995), 67–76
- [66] 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*, 1, (2000), 739–745
- [67] 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.*, 116, (2005), 1–10
- [68] Kar, A., Sambamurthy K., “Pharmaceutical Biotechnology” New Age, New Delhi, (2006)
- [69] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment” *Enzyme Microb. Technol.*, 26, (2000), 509–515
- [70] Varian, A.R., Sansen, W., “Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads” *Biosens. Bioelectron.*, 11, (1996), 443–448
- [71] 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.*, 42, (1993), 455–64
- [72] 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.*, 39, (2002), 229–234
- [73] 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.*, 76, (2001), 525–528
- [74] 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*, 37, (2003), 149–155
- [75] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl Polym. Sci.*, 82, (2001), 1299–1305
- [76] 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.*, 12, (1995), 67–76
- [77] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl. Polym. Sci.*, 82, (2001), 1299–1305

- [78] Baran, T., Arica, M.Y., Denizli, A., Hasirci, V., "Comparison of β -galactosidase immobilisation by entrapment in and adsorption on poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes" *Polym. Int.*, 44, (1997), 530–536
- [79] http://videlectures.net/mit560s08_bawendi_lec35/ (Son Erişim 06.2011)
- [80] Gemeiner, P., "Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) *Enzyme engineering*" Ellis Horwood, New York, (1992) pp.13–119
- [81] Akova, A., Ustun, G., "Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values" *Biotechnol. Lett.*, 22, 355–359
- [82] Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P., "Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum" *Biotechnol. Lett.*, 22, (2000), 1571–1575
- [83] 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*, 1, (2000), 739–745
- [84] 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.* 68, (2000), 98–105
- [85] Okubo, M., Ahmad, H., "Adsorption of enzymes on to submicron-sized temperature-sensitive composite polymer particles and its activity" *Phys*
- [86] Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., *Affinity chromatography. Methods Enzymol.* 104, (1984), 3–56
- [87] Roy, I., Gupta, M.N., "Selectivity in affinity chromatography. In: *Isolation and Purification of Proteins*" Marcel Dekker, (2003) New York, NY, pp. 57–94
- [88] Turkova, J., "Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function" *J. Chromatography. B.*, 722, (1999), 11–31
- [89] Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., "Immobilisation of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports" *Chem. Phys.*, 93, (1998), 185–197
- [90] Labrou, N.E., "Design and selection of ligands for affinity chromatography" *J. Chromatogr. B.*, 790, (2003), 67–78.
- [91] Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., and Deckwer, W.D., "Expanded bed chromatography in primary protein purification" *J. Chromatogr. A.*, 865, (1999), 129–144.

- [92] 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.*, 20, (1997), 93–101
- [93] Yang, Y.G., Chase, H.A., "Immobilisation of α -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors" *Biotechnol. Appl Biochem*, 2, (1998), 145–154
- [94] Indlekofer, M., Brotz, F., Bauer, A., Reuss, M., "Stereoselective bioconversions in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization" *Biotechnol Bioeng* 52, (1996), 459–471
- [95] Mohapatra, S.C., Hsu, J.T. "Immobilization of α -chymotrypsin for use in batch and continuous reactors" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75, (2000), 519–525
- [96] 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.*, 64, (1995), 157–164
- [97] Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., Denizli, A., "Immobilisation of glucoamylase on to spacerarm attached magnetic poly-(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor" *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11, (2000), 127–138
- [98] 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 nonisothermal 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.*, 50, (2002), 2802–2811
- [99] Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., "Industrial biocatalysis today and tomorrow", *Nature (London)*, 409, (2001), 258–268.
- [100] Knowles, J.R., "Enzyme catalysis: not different, just better" *Nature* 350, (1991), 121–124.
- [101] Rozzell, J. D., "Biocatalysis at commercial scale: myths and realities" *Chimica Oggi*, (6/7), (1999), 42–47.
- [102] Zaks, A., "Industrial biocatalysis *Curr. Opin.*" *Chem. Biol.* 5, (2001), 130–136.
- [103] 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* 740,

- (2000), 211–218
- [104] 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.*, 72, (1976), 248–251
- [105] 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.* 119-120, (1999), 243-249.
- [106] 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.* 11, (2004), 412.
- [107] Robyt, JF., White, BJ., “Biochemical Techniques Theory and Practice”, (1990), Waveland Pres, Inc.p:98.
- [108] 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 32(5), (1999), 545-550.
- [109] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, (1974).
- [110] Selma Sinan, Feray Kockar, Oktay Arslan." Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 5, (2006), 565-574
- [111] 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.*, 321, (1997), 595
- [112] 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.*, 263, (1999), 119-120
- [113] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., “Purification of human serum paraoxonase/arylesterase”, *Drug Metab. Dispos.*, 19, (1991),100
- [114] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., “Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase”, *Biochemistry*, 30, (1991), 10133.
- [115] Aharoni, A., “Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482.

- [116] 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* 21, (2003),299–308
- [117] Chiu S-H, Chung T-W, Giridhar R, Wu W-T. “Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk.” *Food Res Int* 37, (2004), 217–231