

Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile Geleneksel Enzim Safılaştırma Tekniğinin Karşılaştırılması; ÜFA ile Safılaştırılan β -Galaktosidazın Termodinamik Özellikleri

Yonca DUMAN¹

ÖZET: Enzimlerin yaygın endüstriyel kullanımları mevcuttur. Ancak bu önemli biyokatalizörlerin safılaştırma maliyetleri kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar enzimlerin safılaştırma basamaklarını düşürerek maliyet ve zaman tasarrufu yapmak yönündedir. Bu amaçla Üçlü faz yöntemi (ÜFA) ile enzim safılaştırması önemli bir yöntemdir. Hedef enzim Üçlü faz yönteminde t-bütanol ve amonyum sülfat ile kullanılarak enzim çözeltisi tuzlu ara fazda çöktürülür. Metodun basitliğinin yanı sıra hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyeti endüstriyel kullanımını cazip hale getirmektedir. Bu çalışmada enzimlerin geleneksel yöntemler ile ÜFA safılaştırılma protokolleri karşılaştırılarak yöntemlerin birbiri üzerine üstünlükleri tartışıldı. Aynı zamanda ÜFA Yöntemi ile safılaştırılan β -galaktosidaz enziminin termodinamik özellikleri ve $\Delta G^\#$, 62.21 kJ mol⁻¹; $\Delta^\#_{E-T}$, -13.56 kJ mol⁻¹; $\Delta^\#_{E-S}$, 0.25 kJ mol⁻¹; $\Delta H^\#$, 26.06 kJ mol⁻¹; $\Delta S^\#$, -0.12 kJ mol⁻¹K⁻¹ olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: β -Galaktosidaz, safılaştırma, termodinamik özellikler, üçlü faz ayırma (ÜFA)



Comparison of Three Phase Partitioning (TPP) and Convantional Enzyme Purification; Thermodynamic Parameters of β -Galactosidase Purified by TPP

ABSTRACT: Enzymes have many industrial applications. Unfortunatly purification cost restricts of using area of this important biocatalyst. Recent years studies on enzyme purification is about reducing of purification cost by reducing steps and time saving. Three phase partitioning (TPP) is important purification method. TPP uses t-butanol and ammonium sulfate to precipitate enzymes and proteins from aqueous solution. The simplicity of the method combined with its rapid result make this a popular choice in large scale protein purification. In this study thermodynamic parameters of β -Galactosidase as $\Delta G^\#$, 62.21 kJ mol⁻¹; $\Delta^\#_{E-T}$, -13.56 kJ mol⁻¹; $\Delta^\#_{E-S}$, 0.25 kJ mol⁻¹; $\Delta H^\#$, 26.06 kJ mol⁻¹; $\Delta S^\#$, -0.12 kJ mol⁻¹K⁻¹ which was purified by TPP.

Keywords: β -Galactosidase, purification, thermodynamic parameters, three phase partitioning (TPP)

¹ Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya, Kocaeli, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Yonca DUMAN, yonca.avciduman@gmail.com

GİRİŞ

Enzimlerin Genel Özellikleri

Biyokimyasal katalizör olan enzimlerin reaksiyonları yüksek verimle gerçekleşir. Enzimlerin etki ettikleri maddeler tek ve belirlidir. Enzimlerle reaksiyon veren bu maddelere “substrat” denir (Tüzün, 1991). Enzimler, katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürür ve dengeye daha çabuk ulaşmasını sağladıkları gibi cansız ortamlarda da görevini yaparlar. Enzimler, bu katalizör faaliyetini gerçekleştirdiği sırada bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Bunlar; sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu ve substrat konsantrasyonu, substrat yüzeyi, ve inhibitör-aktivatörlerdir. (Uyanık, 2008).

β -Galaktosidaz (Laktaz) Enzimi

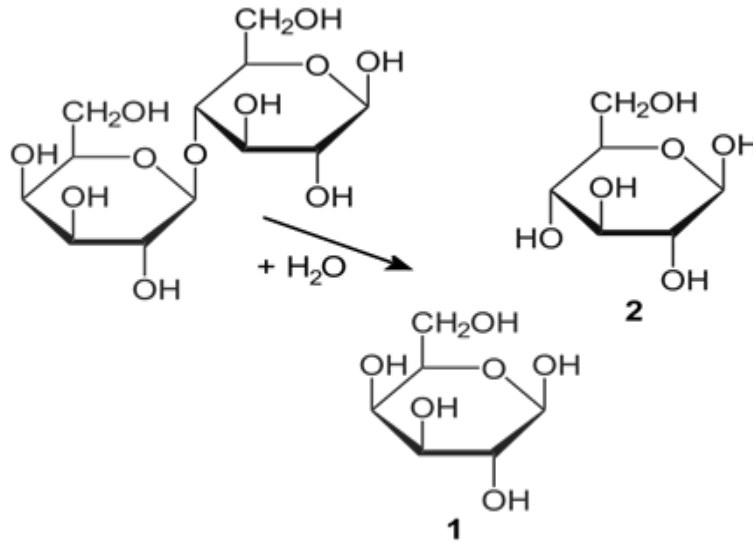
β -Galaktosidaz (E.C. 3.2.1.23), Şekil 1’de gösterildiği gibi laktozu, glikoza ve galaktoza

hidrolizleyen reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Hidrolazlar sınıfına girer. Dört eşit aminoasit zincirinden oluşan homotetramer β -galaktosidaz enzimi mevcuttur.

Doğada yaygın olarak bulunan bu enzim mikrobiyal (Puri et al., 2010; Panesar et al., 2011, Vermaa et al., 2012) bitkisel (Kang et al., 1994; Lee et al., 2003) ve hayvansal (Okada and O’Brien, 1968; Altman et al., 1997) kaynaklardan izole edilebilmektedir.

β -Galaktosidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanır.

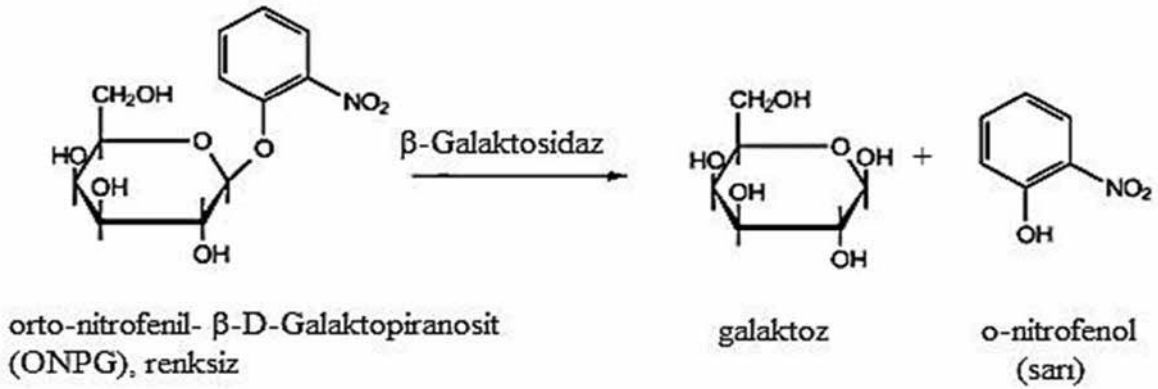
Dünyada laktoz intoleransının fazla olması sebebiyle endüstride düşük laktozlu veya laktozu hidrolizlenmiş süt ve süt ürünlerinin üretilmesi önem kazanmıştır.



Şekil 1. Laktoz molekülünün enzimatik hidrolizi

Ca²⁺, β -galaktosidazın bilinen bir inhibitörüdür (Greenberg and Mahoney, 1982). Fakat sütteki kalsiyum iyonları kazeine bağlı olduğundan, β -galaktosidazı inhibe etmez (Garman et al., 1996). β -Galaktosidaz enzimi laktozun dışında ayrıca sentetik substratlar olan orto-nitrofenil- β -D-Galaktopiranosit (ONPG) ve para-Nitrofenil- α -L-arabinopiranosit (PNPG) hidrolizini de

katalizlemektedir. β -Galaktosidaz enzimi, ONPG’nin hidrolizini katalizlediğinde substrat, galaktoz ve orto-nitrofenol (ONP) bileşenlerine ayrılmaktadır (Şekil 2). Renksiz bir bileşik olan ONPG, bu reaksiyon sonucunda oluşan ve çözeltini rengini sarı yapan ONP ile enzim aktivite tayinlerinde kullanılmaktadır (Chandler et al., 1998).



Şekil 2. ONPG'in β -galaktosidaz ile hidrolizi

β -Galaktosidazın Endüstriyel Uygulamaları

β -Galaktosidaz enzimi gıda endüstrisinde laktozun hidrolizini gerçekleştiren en önemli enzimlerden biridir. Endüstriyel uygulamalardaki teknolojik ve çevresel avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir (McBean and Miller, 1998; Jurado et al., 2002). 1. Laktoz intoleransının giderilmesiyle, laktozun enerji kaynağı olarak kullanılması, 2. Laktoz hidrolizi sırasında düşen pH'da gelişimi zor olan *Bifidobacterium* türlerine, galakto-oligosakkaritlerin substrat olarak etki göstermesi ve bağırsaktaki *Bifidobacterium* türlerinin gelişimine yardımcı olması (Macfarlane et al., 2008), 3. Süt ya da peynir altı suyundaki laktozun hidroliziyle, gıda içeriğinin teknolojik ve karakteristik özelliklerinin gelişimi: çözünürlüğü artırma, tatlandırma gücünün artışı, yoğurt gibi ürünlerin fermentasyonunu kolaylaştırma, 4. Peynir altı suyunun biyolojik parçalanabilirliğinin artışı. Düşük laktozlu süt üretiminde, pastörize edilmeden önce sütün içerisine eklenen sıvı enzim 24 saat boyunca bekletilir ve daha sonra laktoz hidrolizini durdurmak için süt pastörize edilir.

Enzim Safılaştırma Stratejisi

Bir proteinin özelliklerini ve aminoasit dizilimini tanımlayabilmek için önce o proteinin saf olarak elde edilmesi gereklidir. Hücrelerde binlerce farklı çeşit protein içeriği vardır ve bunlardan sadece birinin saflaştırılması o proteinin diğer proteinlerden farklı özelliklerinin olmasıyla gerçekleşebilir. Enzim saflaştırmanın temel stratejisi, en düşük maliyetle en yüksek saflık oranına ulaşmaktır. Safılaştırılacak enzim öncelikli olarak tespit edilmelidir. Analitik amaçlı

çalışmalarda az miktarda enzim ama mümkün olan en yüksek saflık oranı istenirken endüstriyel kullanım için ise bu durum tam tersidir. Bu strateji belirlenirken önemli hususlardan birisi de enzim kaynağının bulunabilirliğidir. Çünkü saflaştırma stratejisinde maliyet ve zaman oldukça önemlidir. Enzim saflaştırma süreci içerisinde dikkat edilmesi gereken bir husus da enzim aktivitesinin korunması ve mümkünse artmasıdır. Enzim aktivitesinin korunmasını sağlamak adına yapılan işlemler ve enzimin muhafazası her zaman +4°C'de yapılmalıdır (Bollag et al., 1994; Erarslan ve ark., 2008).

Enzim Safılaştırmada Temel Yöntemler

Enzimin kaynağından enzimin izole edilmesi

Kaynak türüne göre farklı yöntemler seçilebilir. Bakteriler için sonikasyon kullanılırken bitkiler için ezme yöntemi kullanılabilir. Hücre dışında bulunan enzimlerin izole edilmesi ek bir işlem gerektirmezken, hücre içinde bulunan enzimler için hücre duvarı ve zarının yıkımı sağlanmalıdır. Bu yıkımı sağlamak için kimyasal ya da fiziksel işlemler yapılabilir (Angal and Harris, 1990).

Kimyasal işlemler: Uygun tampon çözeltiler içindeki hücre çözeltisi ile organik çözücüler, enzimler ve deterjanlarla muamele edilerek hücre duvarının yıkımı sağlanır.

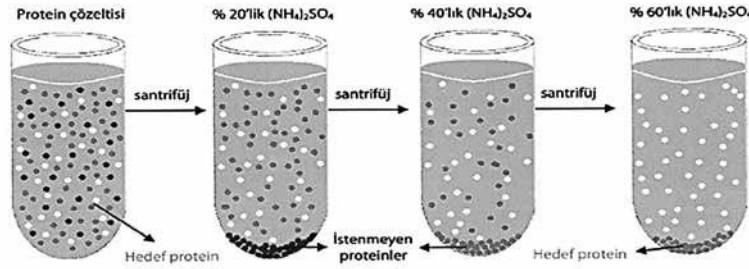
Fiziksel işlemler: Tampon çözeltisi içerisinde bulunan hücre çözeltilerine mekanik parçalama teknikleriyle yapılmasıdır. Ozmotik şok, ses dalgaları, homojenizasyon, cam bilyelerle parçalama teknikleriyle uygulanabilir (Angal and Harris, 1990).

Santrifüjleme

Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. 1. basamaktan sonra hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Bunun yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılır. Çok defa başvurulabilecek bir işlemdir. Denatürasyonu önlemek için bu işlem de +4°C'de yapılmalıdır.

Amonyum sülfat çöktürmesi

Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Şekil 3'te gösterildiği gibi çöktürme işlemlerindeki istediğimiz aralığı bulduğumuz zaman diğer proteinlerden kurtulmuş oluruz.

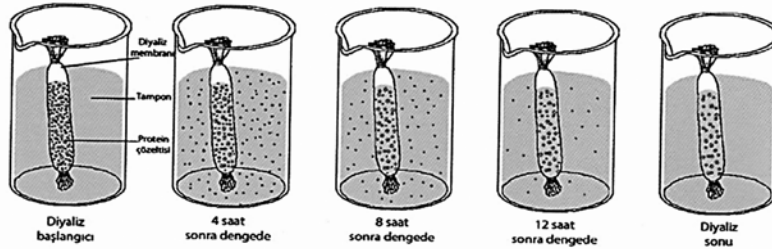


Şekil 3. Amonyum sülfat çöktürmesi (Ay ve ark., 2010)

Diyaliz

Tuz çöktürmesinden sonra enzimde bulunan tuzdan ve istenmeyen diğer küçük moleküllerden uzaklaşmak

için diyaliz işlemi yapılır. Şekil 4'te örnek diyaliz işlemi gösterilmiştir.



Şekil 4. Diyaliz uygulaması (Ay ve ark., 2010)

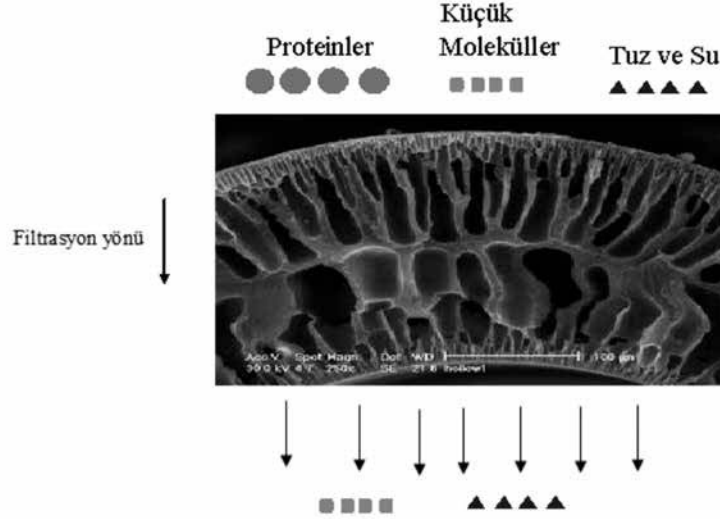
Protein çözeltisi, küçük molekülleri geçiren fakat büyük moleküllerin geçişini engelleyen yarı geçirgen bir membran olan diyaliz torbasına konur ve uygun tampon çözelti içerisine bırakılır (Erarslan ve ark., 2008).

Membranlar

Membranlar kullanılan adımda küçük moleküller yarı geçirgen bir membrandan geçerken çözelti konsantrite edilmekle birlikte, aynı zamanda düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin uzaklaştırılması için de kullanılır (Şekil 5). Bu yöntem ile yarı geçirgen membrana santrifüj ya da hidrostatik basınç uygulaması

ile seçilen membranın gözenek boyutuna bağlı olarak partiküllerin uzaklaştırılması esastır. Ultrafiltrasyon membranlarda gözenek boyutları NMWC; (Nominal Molecular Weight Cut-off) değerine göre belirlenir. Membranların gözenek büyüklükleri homojen değildir. Bu nedenle kullanılacak membranların NMWC değeri hedef proteinin molekül ağırlığından anlamlı derecede küçük olmalıdır. NMWC; membrandan geçişi mümkün olmayan küresel (globüler) protein molekülünün en düşük molekül kütleini verir. 1 kDa ile 100 kDa arasında NMWC değerine sahip ticari membranlar mevcuttur. Tuz ve su moleküllerinin uzaklaştırılmasının yanı sıra çalışılacak proteinin

molekül ağırlığına bağlı olarak seçilecek membran uygulaması sayesinde düşük molekül ağırlıklı proteinlerin uzaklaştırılarak saflaştırma işlemine katkı sağlanabilmektedir.



Şekil 5. Ultrafiltrasyon çalışma prensibi (Erarslan ve ark., 2008)

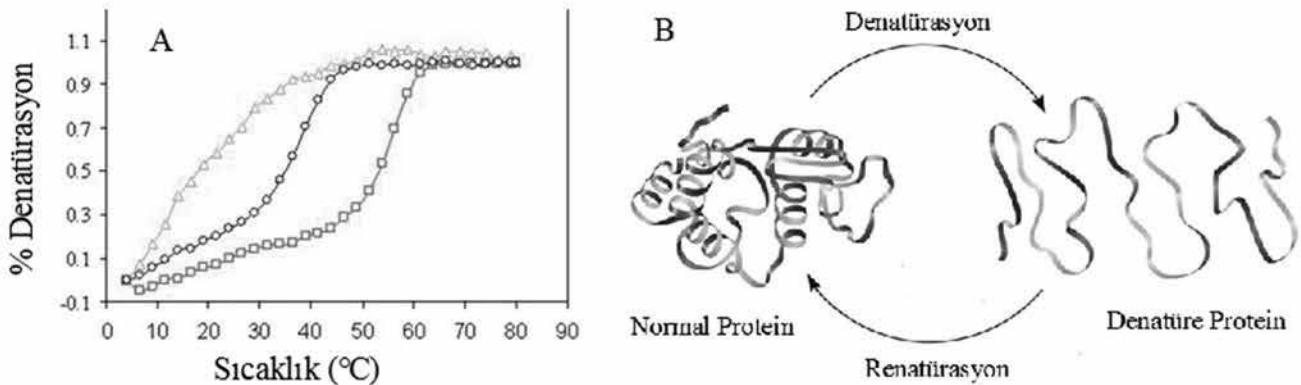
Isıtma

Proteinlerin ısıtma işlemi ile denatürasyonu, termodinamik kurallarına uygun olarak tek basamaklı hız sabitiyle tanımlanabilir. Bu durumda hız sabiti k_d 'nin sıcaklıkla ilişkisi;

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{E_{a,d}}{RT^2} \quad (1)$$

formülüyle ifade edilir. $E_{a,d}$, proteinin temel denatürasyonunun aktivasyon enerjisini; k_d , proteinin temel denatürasyon hız sabitini; R, gaz sabitini ve T ise

sıcaklığı ifade etmektedir. Formülden de anlaşıldığı gibi sıcaklık değişimi $E_{a,d}$ 'yi etkilemekte ve bu da protein denatürasyonuna sebep olmaktadır. Her proteinin farklı $E_{a,d}$ değeri olduğundan, protein denatürasyon-sıcaklık grafik eğrisi de farklı olacaktır. Aranılan proteinin özelliklerini göz önünde bulundurularak, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan proteinler olan termotolerant proteinler için yapılan 15 dakikalık ısıtma ile birlikte diğer istenmeyen proteinler denatüre edilmiş olacaktır. Şekil 6 A sıcaklık ve denatürasyon arasındaki ilişkiyi göstermekte 6 B ise sıcaklığa bağlı denatürasyonu simgelemektedir.



Şekil 6. Sıcaklık ile protein denatürasyon grafiği

Ardından yapılan buzlu soğutma ve santrifüj işlemi ile denatüre edilen proteinler çöktürülerek uzaklaştırılmaktadır (Olichon et al., 2010; Nostro and Ninham, 2012).

İzoelektrik noktasına göre çöktürme

Her proteinin net yükünün sıfır olduğu bir pH değeri vardır buna izoelektrik (pI) noktası denir. İzoelektrik noktasında net yükün sıfır olması yüklü yapıların olmadığı anlamına gelmemektedir, negatif ve pozitif yüklü yapılar yine protein yapısında bulunmaktadır. Bu pI değerinin altında protein pozitif yüklü iken, pI değerinin üzerindeki pH'larda negatif yüklüdür. Protein çözeltilisinin izoelektrik noktasına yakın ya da eşit olarak ayarlanan pH ile yapılan çöktürme işlemidir. İzoelektrik noktasında o proteinin çözünürlüğü en düşük düzeydedir, proteinin yükler arası etkileşimi ve van der Waals etkileşimleriyle çöker. İzoelektrik çöktürme, genellikle hedef proteinden çok istenmeyen proteinleri çöktürmek için kullanılmaktadır. Bunun nedeni, izoelektrik noktasına yakın değerlerde olan proteinin elektrostatik kuvvetlerle proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasıdır. Hedeflenen proteinin pI değerinden daha düşük pH ayarlanarak istenmeyen proteinlerin bir kısmını santrifüj işlemiyle çöktürerek uzaklaştırmış oluruz (Scopes, 1984).

Kromatografik Yöntemler

Saflaştırma yöntemleri arasında en yüksek saflaştırma oranı veren yöntem kromatografik yöntemlerdir. Kolon içerisindeki durgun faz ile hareketli örnek bileşeni arasında yapılan bir ayırma işlemidir. Jel ayırma kromatografisi, makromolekülleri boyutlarına göre ayırır. Çapraz bağlı dekstran dolgularıyla proteinleri ayırmada ve proteinlerin molekül ağırlıklarının tayininde oldukça kullanılan bir yöntemdir. İyon değiştirme kromatografisinde, kolon dolgu materyali 0.5 M yüklü gruplar bulundurmaktadır. Proteinlerin yükleri yan zincirlerinde bulunan yüklü grupların varlığında pH ile değişir. Bu sayede nötralleşen protein çözeltilisinde, kolon materyali ile zıt yüklü olan proteinler kolona adsorblanırken, aynı yüklü proteinler kolonu çabuk terk eder. Absorbant DEAE (Dietilaminoetil) anyon değiştirici olarak, CM (karboksimetil) katyon değiştirici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

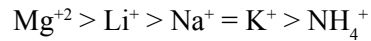
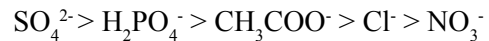
Afinite kromatografisi: Kolon içerisindeki afinite adsorbantı protein dışındaki yapılarla bağ oluşturarak spesifik proteinlerin kolon içerisinde hareket ederek ayrılmasını sağlar. (Erarslan ve ark., 2008; Olichon et al., 2010).

Elektroforez

Elektroforez, proteinlerin görüntülenmesini sağlayan analitik bir yöntemdir. Proteinlerin saflık derecesi ölçümüne, izoelektrik noktalarının tayinine ve yaklaşık molekül ağırlığı tayinine olanak sağlar. Elektroforezde proteinler genellikle çapraz bağlı polimer olan poliakrilamidden yapılmış jeller ile yapılır. Akrilamidin, N,N metilen-bis akrilamid ile polimerizasyonu sonucunda oluşturulan jelde metilen, çapraz bağlanmayı sağlar. Jeller elektroforez kaplarına dökülerek oluşturulur. Elektriksel potansiyelden (E) aldığı güç ve poliakrilamid jelin elek görevi yapması ile proteinler yük/kütle oranına göre hareketini gerçekleştirir (Bollag et al., 1994).

Üç Fazlı Ayırma (ÜFA) Yöntemi

Geleneksel protein saflaştırma yöntemlerine kıyas ile; ÜFA, saflaştırmada uygulanan hızlı ve etkili bir yöntemdir. Yöntemin temeli, ham enzim çözeltilisine yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın (0.8-2.4M) ve suda çözünürlüğü kısıtlı alifatik bir alkolün (genellikle t-bütanol) ilavesiyle yapılır. Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ve t-bütanol gibi alkoller suda çözünmelerine karşın kozmotrop tuzları çözmemektedir bu yüzden iki ayrı sıvı faz (alkol fazı üstte ve tuzlu sulu faz altta olmak üzere) oluşur. Biyolojik ve kimyasal proseslerde çözeltideki bazı iyon etkileri o iyonlara özgüdür. Bu özgün iyon etkileri Hofmeister olayı olarak adlandırılmıştır. Aşağıda Hofmeister serisi olarak tanımlanan anyon ve katyon sıralamaları verilmiştir. Sıralama proteini çöktürme kapasitelerine göre yapılmıştır (Nostro and Ninham, 2012).



Liyotropik (su çekme gücü) seride, klordan önceki anyonlar kozmotrop, klordan sonrakiler ise kaotrop olarak adlandırılır (Atav ve ark., 2009) Kozmotrop ifadesi "konumlayıcı" anlamıyla çözeltiyi dengeleme görevi yapar. Kaotrop ifadesi ise "konum bozucu" olarak proteinlerin yapısını düzleştirerek hidrofobik kısımları etkisiz hale getirir ve çözünürlüğünü artırır. Tuz içeren çözeltiler, içerdiği tuzun kozmotropik ya da kaotropik olmasına bağlı olarak; kozmotrop etki gösteren tuz, çözeltilinin iyonik kudretini yükselteceğinden oluşan hidrofobik etkileşimlerle proteinlerin sudan uzaklaşarak, kümeleşmesini sağlayıp çökmesine (salting-out) neden olur. Eğer tuz kaotrop etkiye sahip ise, iyonik kudretin

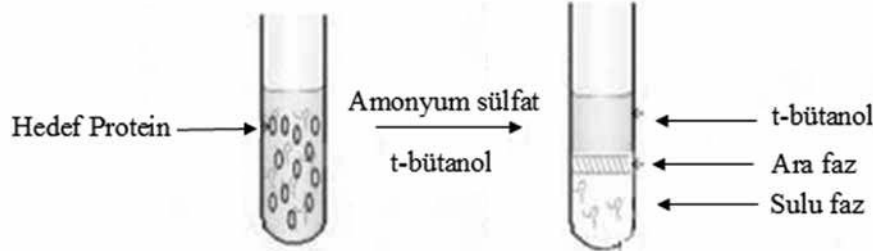
düşük olmasıyla birlikte proteinlerin hidrofobik yüzeyinin düzleşmesine ve hidrofilik etkileşime girerek çözünürlüğünü artırıcı (salting-in) etki göstermesine neden olur. Çöktürmenin (salting-out) mekanizması NaCl ve t-bütanol varlığında şu şekilde açıklanmıştır: düşük konsantrasyondaki t-bütanol moleküllerinin çevresine 20 su molekülü kafes gibi yerleşerek sıkıştırır. Bunun sonucunda t-bütanolde bulunan alkol grubu ile metil grubu arasındaki dimer yapının hidrofobik etkileşimler sonucunda gevşemesine neden olur. NaCl ilavesiyle, bütanolün alkol grupları anyona (Cl⁻) ilgi gösterir ve amfifil kümeleşme eğilimini artırır. Böylece faz ayrımı gerçekleşir.

ÜFA ile t-bütanol ilişkisi şu şekilde açıklanabilir: t-bütanol, ÜFA sırasında çöken proteinlere batmama özelliği kazandırır. Ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır ve bazen bunda artış olabilir. Sülfat iyonunun yüksek konsantrasyonu, kozmotrop davrandığı gibi t-bütanol de oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda kozmotrop davranır. Fakat geleneksel yöntem olan tuzla çöktürme gibi kozmotropi de ÜFA'nin

mekanizmasının tamamını oluşturmaz. Elektrostatik kuvvetler, protein konformasyon sıkışıklığından oluşan kuvvet, protein hidrasyon kaymaları da önemli faktörlerdendir (Dennison and Lovrein, 1997).

ÜFA tekniğinin önemli bir avantajı büyük ve küçük ölçekli çalışmalara uygulanabilmesidir. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pelet (ara) faza geçer. Oluşan üst fazda genellikle organik solventlerde çözünebilir kontamine yapılar vardır. ÜFA'nin önemli olmasının bir başka sebebi, düşük molekül ağırlıklı yapıların; lipidlerin ve fenollü yapıların uzaklaştırılmasıdır.

Şekil 7'de ÜFA ile faz oluşumları gösterilmiştir. Orta faz genellikle birkaç dakikadan sonra oluşmaya başlar. Üst ve alt fazlardaki hidrasyon kaymaları, eklenen amonyum sülfat ve t-bütanol miktarlarına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle başlangıç çözeltisinin mL başına 0.2-0.5 mL t-bütanol oranı yeterli olmaktadır.



Şekil 7. ÜFA'nin uygulanmasıyla oluşan fazların gösterimi (Dennison and Lovrein, 1997)

ÜFA, maliyet açısından değerlendirilecek olursa diğer yöntemlerle kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşük olacağından ve geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır.

Uygulamanın bir önemli artışı da optimal pH ve sıcaklık gibi deneysel çalışmaları kolaylaştıran bir uygulama olmasıdır.

ÜFA uygulamasını optimize ederken denenen t-bütanol ve amonyum sülfat oranları için ara fazın haricinde alt ve üst fazlarda da analizler yapılır. Böylece hedeflenen protein, istenmeyen proteinler ve yapıların

hangi fazlara dağıldığını gözlemlemek mümkün olur (Dennison and Lovrein, 1997).

MATEYAL VE YÖNTEM

β -Galaktosidazın Ham Ekstratının Hazırlanması ve ÜFA ile Safılaştırılması

β -Galaktosidaz enziminin kaynağından ham ekstratının hazırlanması ve ÜFA ile saflaştırılması daha önce tanımlandığı gibi yapılmıştır (Duman and Kaya, 2013).

Safılaştırılmış β -galaktosidazın Termodinamik Parametrelerinin Belirlenmesi

Termodinamik parametrelerin hesaplanması;

$$\Delta G^{\#} = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} \cdot h}{k_b \cdot T} \right) \quad (\text{kJ mol}^{-1}) \quad (2)$$

$\Delta G^{\#}$: ONPG hidrolizine ilişkin aktivasyon serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-T}^{\#} = -RT \ln \left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right) \quad (\text{kJ mol}^{-1}) \quad (3)$$

$\Delta G_{E-T}^{\#}$: Tranzisyon (geçiş) hali bağlanma serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln \left(\frac{1}{K_m} \right) \quad (\text{kJ mol}^{-1}) \quad (4)$$

ΔG_{E-S} : Substrat bağlanma enerjisi,

$$\Delta H^{\#} = E_a - RT \quad (\text{kJ mol}^{-1}) \quad (5)$$

$\Delta H^{\#}$: Entalpi değişimi,

$$\Delta S^{\#} = \left(\frac{\Delta H^{\#} - \Delta G^{\#}}{T} \right) \quad (\text{kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}) \quad (6)$$

$\Delta S^{\#}$: Entropi değişimi,

formüllerini kullanarak yapıldı. Formüllerde yer alan,

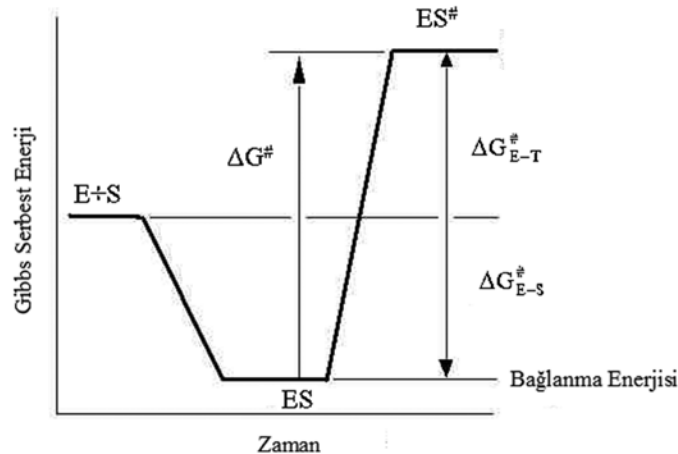
k_b , Boltzman sabitini (1.38×10^{-23}) ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$);

h , Plank sabitini (6.63×10^{-34}) ($\text{J} \cdot \text{s}$);

R , gaz sabitini ($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$);

k_{cat} , turnover katsayısını ifade etmektedir (dk^{-1}) (Duman, 2008).

Nohut granüllerinden saflaştırılan β -galaktosidazla katalizlenen ONPG hidrolizi reaksiyonunun, termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzeyi diyagramı Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. β -Galaktosidaz ile ONPG hidroliz reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı (Duman, 2008)

BULGULAR VE TARTIŞMA

Enzim saflaştırma yöntemi olarak ÜFA'nın kullanılması yüksek aktivite kazancının yanında hızlı, ucuz ve tek basamakta yapılabilir olması bu sürecin potansiyelini endüstriyel ölçekteki enzim saflaştırma uygulamaları için yüksek tutmaktadır. Grubumuz tarafından ÜFA yöntemi ile β -galaktosidaz (Duman and Kaya, 2013a) enziminin yanı sıra invertaz (Duman and Kaya, 2014) ve katalaz (Duman and Kaya, 2013b) enzimi de başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Literatürde β -galaktosidaz enziminin geleneksel kromatografi yöntemlerine göre saflaştırılması çalışması rapor edilmiştir (Kishore and Kayastha, 2012). Bu çalışmada hedef enzim 7 basamaklı süreçte %12'lik verim ile saflaştırılmıştır. Safaştırılma sürecinde enzim asit ve tuz muamelesi ile çöktürülmüş ve ardından 4 farklı kromatografik adım ile saflaştırılmıştır. Literatürde rapor edilen β -galaktosidazın ÜFA ile saflaştırılması çalışmasında ise (Duman and Kaya, 2013b) hedef enzim tek basamakta %133 verim ile saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin detaylı kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kinetik analizler sonucunda elde edilen bulgular ile geleneksel yöntemler ile saflaştırılan enzimin (Duman and Kaya, 2013a) kinetik analiz sonuçları birbirine uyumlu çıkmıştır. Safaştırma basamak sayısının az olması ve verimin anlamlı derecede artması endüstriyel amaçlı çalışmalarda enzimlerin ÜFA ile saflaştırmasını geleneksel yöntemler ile saflaştırmaya üstün kılmaktadır.

Safaştırılmış β -galaktosidazın termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Kurutulmuş nohut granüllerinden β -galaktosidaz enziminin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri daha önce rapor edilmiştir

(Duman and Kaya 2013b). Kurutulmuş nohut granüllerinden saflaştırılan β -galaktosidaz ile ONPG hidrolizi için bulunan termodinamik parametreler ($\Delta G^\#, \Delta H^\#, \Delta S^\#, \Delta G_{E-S}^\#, \Delta G_{E-T}^\#$), (2-5) numaralı eşitliklerden yararlanılarak hesaplanmış ve Çizelge 1'de gösterilmiştir. Hoyoux ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudoalteromonas haloplanktis* ve *Escherichia coli*'den saflaştırılan β -galaktosidazın ONPG substratı kullanarak yapılan termodinamik parametreleri *P. haloplanktis* için E_a 20.8 kJ mol⁻¹, $\Delta G^\#$ 58.7 kJ mol⁻¹, $\Delta H^\#$ 18.3 kJ mol⁻¹, $\Delta S^\#$ -0.14 kJ mol⁻¹.K⁻¹; *E. coli* için E_a 26 kJ mol⁻¹, $\Delta G^\#$ 60.5 kJ mol⁻¹, $\Delta H^\#$ 23.6 kJ mol⁻¹, $\Delta S^\#$ -0.13 kJ mol⁻¹.K⁻¹ olarak bulunmuştur (Hoyoux et al., 2001). Çizelge 1'de belirtilen sonuçlarla, her iki bakteriden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında sonuçların benzerlik gösterdiği görülmektedir. Pal ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, bademden geleneksel yöntemlerle saflaştırılan β -galaktosidazın ONPG substratı kullanarak bulunan termodinamik parametreleri; E_a 42.86 kJ mol⁻¹, $\Delta G^\#$ 104.96 kJ mol⁻¹, $\Delta H^\#$ 121.93 kJ mol⁻¹, $\Delta S^\#$ 0.05 kJ mol⁻¹.K⁻¹ olarak bulunmuştur (Pal et al., 2013). Daha yüksek $\Delta G^\#$ değeri stabilize ES[#] kompleksinin ifade etmektedir ki; stabilize ES[#] kompleksi durumunda hidrolitik reaksiyonun aktivasyon enerjisi artmaktadır (Duman, 2008). Aynı zamanda bu çalışmada hesaplanan daha düşük $\Delta H^\#$ değeri ONPG'nin hidrolitik katalizi için gerekli olan enerjinin daha az olduğunu göstermektedir. Bu durum hesaplanan $\Delta S^\#$ değeri ile de desteklenmektedir. Yüksek $\Delta S^\#$ değerlerinin kataliz reaksiyonları üzerindeki etkisi negatif yöndedir (Pal et al., 2013). Daha düşük $\Delta S^\#$ değerinin nohut granüllerinden saflaştırılan β -galaktosidaz enziminin ONPG substratını katalizleme yeteneğinin daha fazla olduğunun termodinamik göstergesidir.

Çizelge 1. Nohuttan saflaştırılan β -galaktosidazla 37°C ve pH 2.8'de ONPG hidrolizi için elde edilen termodinamik parametreler

Parametreler	Sonuç	Birim
$\Delta G^\#$	62.21	kJ mol ⁻¹
$\Delta H^\#$	26.06	kJ mol ⁻¹
$\Delta S^\#$	-0.12	kJ mol ⁻¹ K ⁻¹
$\Delta G_{E-S}^\#$	0.25	kJ mol ⁻¹
$\Delta G_{E-T}^\#$	-13.56	kJ mol ⁻¹

SONUÇ

Geleneksel kromatografik saflaştırma yöntemleri ve ÜFA ile enzim saflaştırma protokolleri incelendi. β -galaktosidaz enziminin geleneksel kromatografik yöntemler ile saflaştırma işlemi cihaz ve maliyet gerektiren pahalı bir yöntem olmasına karşın ÜFA ile saflaştırma işlemi ucuz, tek adımda ve kolaylıkla gerçekleştirilen metottur. ÜFA ile enzim saflaştırma işlemi yüksek verim ve aktivite kazancı ile sonlanmaktadır. Bu durum bu çalışmada termodinamik olarak da gözlenmiştir. Yöntemin β -galaktosidazın hidrolitik aktivitesini arttırdığı; katalizin termodinamik parametreleri hesaplanarak gözlenmiştir. Saflaştırma sürecinin, özellikle yüksek aktivite kazancının yanında hızlı, ucuz ve tek basamakta yapılabilir olması bu sürecin potansiyelini endüstriyel ölçekteki enzim saflaştırma uygulamaları için yüksek tutmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya 2012/57 numaralı proje ile maddi kaynak sağlayan Kocaeli Üniversitesine ve deneysel çalışmalara katkı sağlayan Erdem Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- Altman S, Groseclose C, Ma JX, Hamamdzc D, Vrinda vanam NS., Middaugh LD., Parratto NP, Salle FR, 1997. Expression of beta-galactosidase in mouse brain: utilization of a novel nonreplicative Sindbis virus vector as a neuronal gene delivery system. *Gene Therapy*, 4: 815-822.
- Angal S, Harris E, 1990. *Protein Purification Applications*, Second Edition, IRL Pres at Oxford University Pres, UK. 317p.
- Atav R, Yurdakul A, Arabacı A, 2009. Tekstil boyacılığında kullanılan tuzların özellikleri ve kullanım amaçları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 71-80.
- Ay T, Bingöl G, Binici MS, Diler SB, Cansaran A, Demirağ MK, Dere E, Doğan N, Doğan B, Ekici N, Gülnaz O, Kanlı A, Olguner E, Polat F, Sözbilen M, Şimşekli Y, Yıldırım C, 2010. *Biyolojide Özel Konular, Üçüncü Basım, Pegem Akademi, TÜRKİYE*, 376s.
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ, *Protein Methods*, 1994. Second Edition, Wiley-Liss, New York, 415p.
- Chandler V, Donovan S, Goodwin W, Sprague S, Stiefbold F, 1998. Enzyme kinetics. *Proceeding of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 19: 81-97.
- Dennison C, Lovrein R, 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Exp. Purif.*, 11: 149-161.

- Duman YA, 2008. *Bacillus clausii* alkalen proteazının su ile karışabilen organik çözücüler varlığında kinetik ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmış), Doktora Tezi, 308s.
- Duman YA, Kaya E, 2013a. Three-Phase Partitioning as a Rapid and Easy Method for the Purification and Recovery of Catalase from Sweet Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). *Appl Biochem Biotechnol*, 170:1119–1126.
- Duman YA, Kaya E, 2014. Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 39(4): 443–448.
- Duman YD, Kaya E, 2013b. Purification, recovery, and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) β -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein Expression and Purification*, 91: 155-160.
- Erarslan A, Kazan D, Denizci AA, Öztürk DC, Karahan N, 2008. *Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler VIII. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı*, 175s.
- Garman J, Coolbear T, Smart J, 1996. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46: 22-37.
- Greenberg NA., Mahoney RR, 1982. Production and characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci*, 47: 1824-1828.
- Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, Genicot S, Dubail F, François JM, Baise E, Feller G, Gerday C, 2001. Cold-Adapted β -Galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 1529-1535.
- Jurado E, Camacho F, Luzon G, Vicaria JM, 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. 31: 300-309.
- Kang I K, Suh SG, Gross KC, Byun JK, 1994. N – terminal amino acid sequence of persimmon fruit beta-Galactosidase. *Plant Physiol*, 105: 975-979.
- Kishore D, Kayastha AM, 2012. A β -galactosidase from chick pea (*Cicer Arietinum*) seeds: its purification, biochemical properties and industrial applications. *Food Chem*, 134: 1113-1122.
- Lee D H, Kang SG., Suh SG, Byun J K, 2003. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*). *Molecules and Cells*, 15: 68-74.
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S, 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiology*, 104: 305-344.
- McBean LD, Miller GD, 1998. Allaying fears and fallacies about lactose intolerance. *Journal of the American Dietetic Association*, 98: 671-676.
- Nostro PL, Ninham BW, 2012. Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology. *Chem. Rev*, 112: 2286-2322.

- Okada S, O'Brien JS, 1968. Generalized gangliosidosis: Beta - galactosidase deficiency. Science, 160: 1002-1004.
- Olichon A, Schweizer D, Muyltermans S, Marco A, 2010. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. BMC Biotechnol, DOI: 10.1186/1472-6750-7-7.
- Pal A, Lobo M, Khanum F, 2013. Extraction, Purification and thermodynamic characterization of almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase for the preparation of delactosed milk. Food Technol. Biotechnol, 51: 53-61.
- Panesar R, Panesar PS, Singh RS, Kennedy JF, Puri M, 2011. Hydrolysis of milk lactose in a packed bed reactor system using immobilised yeast cells. J. Chem. Technol. Biotechnol. 86: 42-46.
- Puri M, Gupta S, Pahuja P, Kaur A, Kanwar J E, Kennedy J F, 2010. Cell Disruption Optimization and Covalent Immobilization of β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for Lactose Hydrolysis in Milk. Appl. Biochem. Biotechnol, 160: 98-108.
- Scopes RK, 1984. Protein Purification, Second Edition, Springer-Verlag, New York, 345s.
- Tüzün C, 1991. Biyokimya, Birinci Basım, Palme Yayınevi, Ankara, 486s.
- Uyanık A, 2008. Beta - galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmış), Yüksek Lisans Tezi, 72s.
- Vermaa ML, Barrowa C J., Kennedy J K, Puri M, 2012. Immobilization of β -D- galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalised silicon dioxide nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. Int. J. Biol. Macromol, 50: 432-437.

