



Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi

Büşra Kat^{1*}, Semra Yılmaz Keskin¹

¹Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Sakarya

10.05.2013 Geliş/Received, 16.07.2013 Kabul/Accepted

ÖZET

İnvertaz enzimi (β -fruktofuranosidaz, EC 3.2.1.26) sükrözün fruktoz ve glukoza hidrolizini katalizleyen, endüstriyel alanda geniş uygulama alanına sahip, hidrolaz sınıfı enzimlerdendir. Günümüzde birçok enzim saflaştırma tekniği bulunmaktadır. Fakat bu yöntemler genellikle uzun ve çok sayıda işlem basamakları içermektedir. TPP (three-phase partitioning) yöntemi ise tek adımda, kısa işlem sonrası diğer tekniklere yakın oranda saflaştırma gerçekleştirebilmektedir. Endüstriyel proseslerde kullanılan enzim preparatlarının tercih edilmesinde önemli kriterlerden birisi bu preparatların kararlılığıdır. Enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasında termik, mikrobiyal yıkım, pH, kimyasal inaktivasyon gibi faktörler etkilidir. Bu çalışmada kokulu kara üzümünden (*Vitis labrusca*) izole edilen invertaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırılması sonrası termal kararlılığı incelendi. Saflaştırılan enzim 4-50 °C sıcaklık aralığında stabilitesini korudu.

Anahtar Kelimeler: TPP (three-phase partitioning), invertaz, termal kararlılık

Purification of invertase by three-phase partitioning systems and determination of thermal stability

ABSTRACT

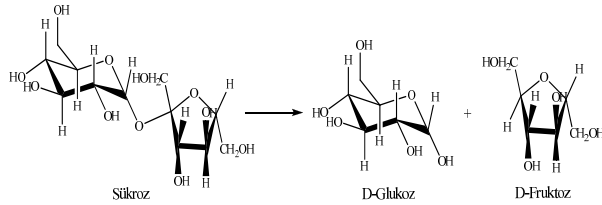
The enzyme invertase (β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) is class of the hydrolase that catalyzes the hydrolysis of sucrose into glucose and fructose. The invertase has been used in a wide range of industrial applications. In spite of various methods have been developed for the separation and purification of enzymes, most of them involved a number of steps and furthermore the scale up of these methods is difficult and also expensive to produce in large scale. Therefore, the process called as three-phase partitioning (TPP) is a simple, more efficient and economical method for separation and purification of target proteins. One of the important criteria to be preferred enzyme preparations used in industrial processes, the stability of these preparations. Factors such as thermal, microbial destruction, pH, chemical inactivation are effective in maintaining the enzyme activity with time. In this work, the thermal stability of invertase that purified from *Vitis labrusca* by TPP process was investigated. Purified enzyme is also very stable in the temperature range from 4 to 50 °C.

Keywords: TPP (three phase partitation), invertase, thermal stability

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

İnvertazlar (β -fruktofuranozidaz, Sükraz, E.C 3.2.1.26) β -D-fruktofuranozidlerin terminal indirgen olmayan β -fruktofuranozid artıklarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan bu enzim pek çok mikrobiyal ve bitkisel kaynaktan izole edilerek saflaştırılmıştır. İntvertaz enzimi, kimliği ilk belirlenen proteinler arasında bulunmaktadır ve enzim kinetiğinin prensiplerinin çıkarılmasında model enzim olarak kullanılmıştır [1]. İntvertazlar endüstride ve genellikle gıda sanayinde geniş bir uygulama alanına sahip olan enzimlerdir. İntvert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi, şekerlemelerde kullanımı, kondense sütlerin üretimi, bebek gıda ürünlerinde tercih edilmesi ve sığır yemlerinin hazırlanmasında kullanımı örnek olarak verilebilir. Gıda sanayinde invert şeker şuruplarının hazırlanmasında ya asit hidrolizi ya da enzimatik olarak sükrozun invertaz ile hidrolizi gerçekleştirilmektedir. Asit hidrolizi oldukça yüksek şiddette renkli ürünler, kül ve istenmeyen pek çok yan ürün oluşturduğu için endüstriyel alanda enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Hidroliz sonucu oluşan fruktoz, kolay kolay kristalize olmadığı ve daha tatlı olduğu için gıda sanayinde sükroza tercih edilmektedir. Ayrıca invertaz enzimi, analitik alanda sükroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır [2]. Şekil 1'de invertaz enziminin reaksiyon mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 1. İntvertaz enziminin genel reaksiyon mekanizması (The overall reaction mechanism of the enzyme invertase)

Günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından invertazın saflaştırılması konusunda çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Fakat bu tekniklerin çoğu, çöktürme, ion-exchange kromatografi, jel filitasyon kromatografi, ultrafiltrasyon gibi çok adımlı aşamaları içermektedir. Bu aşamadaki basamak sayılarının artması, ürün verimini olumsuz etkilemektedir. Daha da önemlisi bu basamakların çoğu, uygulaması zor ve pahalı yöntemler içermektedir [3]. Yaptığımız çalışmada koku kara üzümünden (*Vitis labrusca*) izole edilen invertaz enzimi üçlü faz yöntemiyle (TPP) tek adımda saflaştırılmıştır.

Üçlü faz sistemleri, son zamanlarda geliştirilmiş, protein çökmesinin kolektif birçok basamağını kapsayan bir biyoayırım tekniğidir. TPP genellikle proteinlerin

ekstraksiyonu ve saflaştırılması prosesinde ön ya da son işlem olarak bazen de tek adımda saflaştırma amaçlı kullanılabilen, uygulaması kolay bir tekniktir [4-8]. TPP (Three-phase partitioning), iki ya da daha fazla bileşiğin ya da grubun, tek basamaklı ekstraksiyon ile ayırımını gerçekleştirir. Üç sıvı fazın farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, bu sistemler tek bir ekstraksiyonla iki ya da daha fazla bileşiğin ayırımının yeni olasılıklarını sunmaktadırlar. Konveksiyonel bir biçimde "salting out", proteinleri izoionik çöktürme, yardımcı çözenle çöktürme, osmotik ve kozmotropik çöktürme gibi pek çok tekniği içeren prensipleri ortaklaşa çalıştıran bir biyoayırım tekniğidir. Üçlü faz sistemleri (TPP) biyolojik moleküllerin (örneğin; protein, hücre, organel ve biyolojik membranlar) ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan seçimli ve etkin bir metottur [9].

Enzimlerin içerdiği protein yapılar, yükselen sıcaklık ile denatürasyona uğrayarak aktivitede kayıplara sebep olur. Enzimlerin sıcaklık, inkübasyon gibi termal etkenlere karşı hassas olmaları, endüstriyel ve analitik alandaki uygulamalarını da birinci derecede etkiler. Bu nedenle enzimlerin stabil oldukları sıcaklık aralıkları proseslerde tercih edilir. Protein yapıları 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Üç boyutlu yapısında değişiklik olan enzimin aktivitesinde denatürasyona bağlı düşüş gözlenir. Endüstriyel proseslerde kullanılacak enzim preparatlarının aktivitelerindeki bu kayıp, enzimlerin saflaştırıldıkları kaynağa göre farklılık gösterebilmektedir [10].

Yaptığımız çalışmada TPP yöntemiyle *Vitis labrusca*'dan saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığı incelenmiştir. Termal kararlılık enzimin sıcaklığa karşı göstermiş olduğu zamana bağımlı bir tolerans ve başlangıç aktivitesini koruyabilme yeteneğidir.

2. MATERYAL VE METOD (METARIAL AND METHOD)

2.1. Materyal (Metarial)

Kullanılan kimyasal maddeler, Na/K tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), t-butanol, amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), asetik asit, o-fosforik asit, 3,5-dinitro salisilik asit, coomasie-brilliant blue, sükroz, Sigma Chemical Co. (St. Louis, CA)'den temin edilmiştir.

2.2. Metod (Method)

2.2.1. TPP Sistemlerinin Hazırlanma Prosedürü (Preparation Procedure of TPP Systems)

Üçlü faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, genellikle tuz olarak amonyum sülfat ve bir organik

çözgen olarak butanol eklenmesiyle oluşur. Uygun koşullar altında üç faz oluşur. Butanolce zengin üst faz (non-polar bileşikleri içerir), polar bileşikleri içeren sulu fazdan ara yüzey protein çökeltisi ile ayrılır. Saflaştırılmış protein dağılımı, üstteki organik çözgen fazı ile alttaki sulu fazın arasındaki çözünmeyen ara yüzeyde görünür [11]. Çalışmada, 2mL enzim ekstraktı, farklı amonyum sülfat doyumluklarına (%20, %30, %40, %50 ve %60) getirildi ve farklı enzim/t-butanol oranları (1,0:1,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) sağlanacak şekilde t-butanol eklendi. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 4,000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek faz ayrımı gözlemlendi. Üst faz dikkatlice pipetlenerek ortamdan uzaklaştırıldı. Orta ve alt faz toplanarak aktivite ve protein değerleri tespit edildi. Amonyum sülfat konsantrasyonu, ekstraktın butanol fazına oranı, pH ve sıcaklık faktörlerinin değişik kombinleri denenerek selektif koşullar elde edilmiştir.

2.2.2. İvertazın Aktivite Tayini (Determination of Intertase Activity)

İvertaz enziminin aktivite tayininde esas, substrat olarak şükroz kullanılarak enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan invert şekerin miktarının dinitrosalisilik (DNS) asit metodu ile belirlenmesidir. Aktivite tayininde inkübasyonlar Stuart Scientific çalkalamalı su banyosunda (SBS-35), spektrofotometrik ölçümler ise Perkin Elmer marka cihazla gerçekleştirilmiştir. DNS metodunun esası indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının (C=O) varlığını test etmektir. Bununla birlikte glukozdaki fonksiyonel aldehit grubu ile fruktozun fonksiyonel keton gruplarının oksidasyonunu ve aynı anda alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asitin 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir. Reaksiyonda bir mol şeker bir mol 3,5-dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girerek 3-amino,5-nitrosalisilik asit oluşturmaktadır. Nitroaminosalisilik asit konsantrasyonu 546 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir [11].

2.2.3. İvertazın Protein Tayini (Bradford Metodu) (Determination of Invertase Protein)

Bu yöntem Coomassie blue G-250 (organik) boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Duyarlılık sınırları, total reaksiyon karışımında 5-100 µg protein/mL olan bu yöntemde asidik boya proteine bağlanır ve 595 nm'de maksimum absorbans verir. Bu deneyde standart protein olarak genellikle boya bağlama kapasitesi yüksek olan BSA (sığır serum albümini)

kullanılır. Sığır serum albümininin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/mL'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,25 mg/mL konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplandı. Cam küvet kullanımı boyanın cama absorplanmasına neden olduğundan polistiren küvetlerde ölçüm alınır [11].

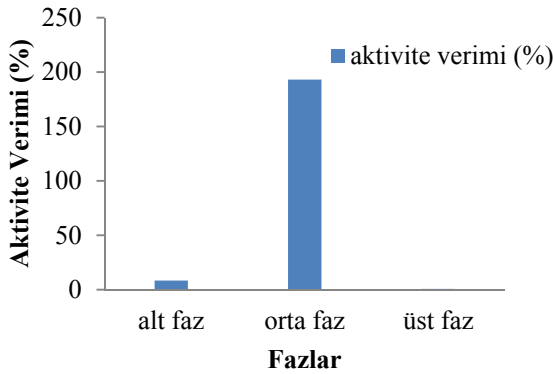
2.2.4. Termal Profili Ve Kararlılığı (Thermal Profile and Stability)

TPP sisteminin orta fazından toplanan invertaz enziminin protein tayini yapıldı. Aynı protein konsantrasyonlarına sahip enzim solüsyonları öncelikle 0-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında DNS aktivite tayin yöntemi kullanılarak aktiviteleri tayin edildi. Bağlı aktiviteleri hesaplanarak karşılaştırması yapıldı.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. İvertaz Enziminin TPP Sistemi İle Saflaştırılması (Purification of The Enzyme Invertase TPP System)

Yaptığımız çalışmada kokulu kara üzümünden elde edilen enzim ekstraktı TPP sistemi ile tek adımda saflaştırıldı. Farklı enzim/t-butanol oranları (1,0:1,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) ve farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50 ve %60) kullanılarak faz sistemi optimize edildi. Enzim ağırlıklı olarak orta fazda toplandı ve gösterdiği yüksek aktivite verimi Şekil 2’de verildi.



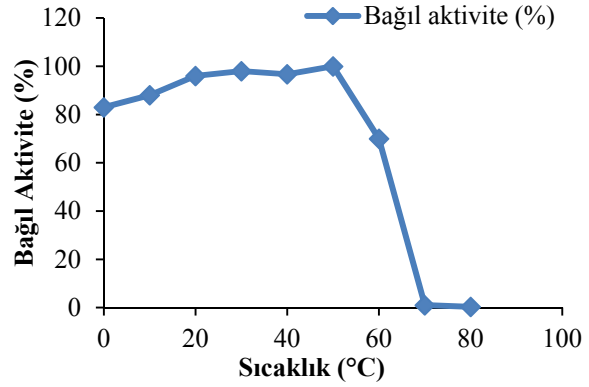
Şekil 2. TPP sisteminde invertaz enziminin fazlar arasında dağılımı (%50 amonyum sülfat doygunluğu, 1,0:1,0 enzim/t-butanol) (The distribution system of the phases of the enzyme invertase TPP (50% ammonium sulfate saturation, 1,0:1,0 enzyme / t-butanol))

TPP sisteminde enzim hangi fazda toplanacağı enzimin içerdiği amino asitlerin karakteristiğine ve izoelektrik noktalarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu nedenle aynı enzimin farklı kaynaklardan elde edilen ekstraktlarında da fazlar arası dağılımları değişiklik gösterebilmektedir [11]. TPP sistemi diğer çok adımlı, maliyeti yüksek kromatografik saflaştırma tekniklerine kıyasla uygulaması basit, maliyeti düşük, geniş hacimlerde kullanılabilir ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen bir biyoayırım tekniğidir.

3.2. Saflaştırılan İvertaz Enziminin Termal Kararlılığı (Thermal Stability of the Purified Enzyme Invertase)

İvertazın katalitik aktivitesine 0-80 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinin etkisi incelendi. Enzim belirtilen sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edildi ve sonrasında aktivite tayinleri yapıldı. Şekil 3’te görüldüğü gibi enzim 50 °C’de maksimum aktivite gösterdi ve bu sıcaklık sonrasında kademeli olarak aktivitesini kaybetmeye başladı. 4-50 °C aralığında enzim başlangıç aktivitesinin

%95’ini korurken, 60-80 °C aralığında aktivitesini hızla kaybederek 80 °C’de bu değer %0,1’e düşmüştür.



Şekil 3. TPP sistemi ile saflaştırılmış invertaz enziminin 30 dk inkübasyonu sonucunda 0-80 °C aralığındaki bağıl aktivite değerleri (Relative activity values as a result of incubation of 30 min of purified with TPP system invertase enzyme between 0-80 C)

Sıcaklığın yükselmesi ya da inkübasyon süresinin uzaması gibi termal etkenler protein yapıdaki enzimin üç boyutlu yapısında denatürasyona sebep olarak, enzim-substrat ilişkisinin sağlanamaması, aktif merkezin yapısal olarak bozulması ve fonksiyon göstermemesi gibi sonuçlara yol açarak aktivitede kayıplara sebep olmaktadır. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda çalışılan enzimin kararlılığını koruyabildiği sıcaklık aralıkları tercih edilmekte ve bu aralığın belirlenmesi önem taşımaktadır. Enzimin kararlılık derecesi yani zamana bağlı aktivitesini koruyabilme yeteneği, proseslerde uygulanabilirliği arttırmakta ve maliyeti önemli oranda etkilemektedir [1].

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Karkaş, T., İkili-faz ayırma sistemlerinin geliştirilmesi, Bornova İzmir, 61, 2009.
- [2] Telefoncu, A., Enzimolojiye Genel Bakış, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 1986.
- [3] Wiseman A., Handbook of Enzyme Biotechnology, TJ Pres Ltd., Cornwall, UK, 465-466, 1995.
- [4] Roy, I., Gupta, M.N., Three-phase affinity partitioning of proteins, Anal. Biochem., 300, 11–14, 2002.
- [5] Dhananjay, S.K., Mulimani, V.H., Three-phase partitioning of galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, 123–128, 2009.
- [6] Narayan, A.V., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase