

β -Galaktosidaz'ın Ters Misel İçerisinde Çözünürlüğü

Bekir Gökçen Mazi^{1,2,3*}, Stephanie R. Dungan^{2*}, Haluk Hamamcı¹

¹ODTÜ. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, 06531, Ankara

²Gıda Bilimi ve Teknolojisi Böl.; Kimya Müh. ve Malzeme Bil. Böl. California Üniv., Davis, California

³SDÜ. Gıda Mühendisliği Bölümü, 32200, Isparta

*bmazi@metu.edu.tr

Özet

Ticari bir β -Galaktosidaz enzim preparatının (Maxilact LX-5000, *Kluyveromyces lactis*) ters misel içerisinde çözünürlüğü faz transfer deneyi ile yapılmıştır. Faz transfer deneyi eşit hacimlerdeki su fazı ve organik ters misel fazının (izooktan içerisinde sodyum 2-etilheksil sülfosuksinat (AOT)) teması ile gerçekleştirilmiştir. β -Galaktosidaz'ın ters misel içerisindeki çözünürlüğü; iyon gücü, pH ve protein derişiminin fonksiyonu olarak analiz edilmiştir. Su fazında tuz derişiminin artmasının organik fazda çözünen protein miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Organik fazda çözünen protein miktarının su fazındaki protein derişimi ile değişimi çan eğrisi şeklinde olup en yüksek çözünürlük su fazındaki protein derişiminin 3 mg/ml olduğunda gerçekleştiği görülmüştür. Su fazının pH'sının proteinin organik fazdaki çözünürlüğüne etkisi değişik tampon çözeltileri kullanılarak pH 5.1-7.9 aralığında denenmiştir. Organik fazdaki en yüksek protein derişiminin (0.51 mg/ml) su fazının pH'sının 6.5 olduğu nokta olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Kluyveromyces lactis*; β -Galaktosidaz; Ters Misel; İki Faz Sistemi; Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Giriş

β -Galaktosidazlar β -galaktosidlerdeki bağı parçalayan enzim grubudur. β -Galaktosidazların laktozu parçalayarak daha tatlı ve suda çözünürlüğü yüksek glikoz ve galaktoza indirgeme özelliği bu enzime ticari bir önem katmaktadır. Belkide en önemlisi laktoz dayanıksızlığı çeken insanların süt ve süt ürünlerini kullanabilme potansiyelini arttırılmasıdır. Büyük miktarlarda β -galaktosidaz üretimi özellikle mikrobiyal kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Laktazın ticari olarak üretiminde temel olarak *Kluyveromyces sp.* ve *Aspergillus sp.* kullanılmaktadır [1]. β -Galaktosidaz bu maya tarafından hücre içi enzim olarak üretildiğinden enzim eldesi hücrenin kırılması, hücre atıklarının ve nükleik asitin uzaklaştırılması ve β -galaktosidazın diğer enzimlerden saflaştırılması aşamalarını içermektedir. Bu işlemler enzim üretim maliyetinin %60-90'lara varan kısmını oluşturmaktadır [2].

Ters misel olarak bilinen yağ içerisinde su mikroemülsiyonu, tek katmanlı yüzey aktif madde ile sağlamlaştırılmış nanometre boyutundaki su damlacıklarını içeren organik faza verilen addır. pH ve iyon gücü ayarlanarak su içeren mikroemülsiyon damlacıkları protein moleküllerini seçici olarak özütleye bilmektedir. Böylece mikroemülsiyonlar fermentasyon ortamında yer alan proteinin diğer bileşenlerden sıvı – sıvı ayırma yöntemi kullanılarak ayrılmasını etkileyen bir parametre olarak kullanılabilmektedir. Bu şekilde bir ekstraksiyon yöntemi enzimin sürekli bir sistemde saflaştırılmasına ve üretim işleminde gereksinim duyulan aşamaların azaltılmasına olanak sağlamaktadır [3]. Bu çalışmada yağ içerisinde su emülsiyonunun β -galaktosidaz'ı su fazından organik faza ekstrakte etme potansiyeli incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Deneylerde *Kluyveromyces lactis* den elde edilen ve ticari bir β -galaktosidaz (pI=5.0; MW= ~460-480kDa [4]) preparatı olan Maxilact LX-5000 kullanılmıştır (Gist Brocades). %99 saflıkta sodyum 2-etilheksil sülfosükinat (AOT) Sigma firmasından, izooktan ve diğer tüm tuzlar Fisher Chemical'dan (Pittsburgh, PA) temin edilmiştir. Tüm deneylerde Barnstead ultra iyon değiştirici kolondan geçirilen damıtılmış su kullanılmıştır.

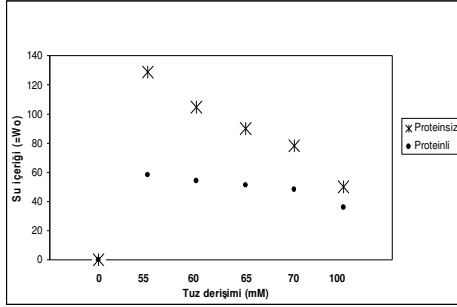
Faz transferi işleminde eşit volumdeki (~4 ml) her iki faz manyetik karıştırıcı kullanılarak 25 dk temas ettirilmiş [5, 6], elde edilen karışım 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Organik faz izooktan içerisinde 200 mM AOT den su fazı ise 10 mM tampon çözelti ve 1 mg/ml – 2.5 mg/ml proteinden meydana gelmektedir. Su fazının pH ve iyon gücü tampon çözelti kullanılarak ve sodyum klorür eklemek sureti ile ayarlanmıştır. pH 5.1- 5,7 aralığında sodyum asetat tampon çözeltisi, pH 5.8- 7.9 aralığında fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Ticari enzim preparatındaki toplam protein derişimi Bradford metodu kullanılarak belirlenmiştir [7]. Organik ve su fazındaki protein derişimi ultraviyole absorpsiyon yöntemi ile 280 nm de UV-visible spektroskopi kullanılarak tesbit edilmiştir (Shimadzu UV 160U, Kyoto, Japan). Okumalar örneklerin 310 nm deki absorpsiyonları çıkartılarak düzeltilmiştir [8].

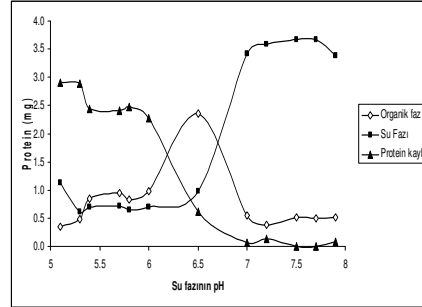
Organik fazın su içeriği Karl Fisher titrator DL18 kullanılarak belirlenmiştir (Mettler, Hightstown, NJ).

Bulgular ve Tartışma

Su fazındaki tuz derişimindeki artışın organik fazın su içeriğine etkisi şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Su fazının tuz derişimindeki artışın organik fazın su içeriğine etkisi

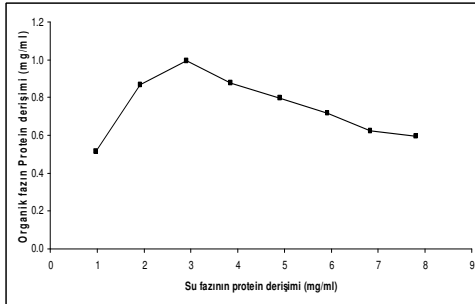


Şekil 2. β-galaktosidazın iki faz içerisinde çözünürlüğü üzerine pH'nın etkisi

Su fazının tuz derişimindeki artışın organik fazda çözünen protein miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Organik fazda çözünen protein miktarının tuz derişimine bağı olarak toplam proteinin %26'sından %18'ine düştüğü bulunmuştur.

Organik fazdaki en yüksek protein derişiminin (0.51 mg/ml) su fazının pH'sının 6.5 olduğunda gerçekleştiği şekil 2'de görülmektedir. Su içeriğindeki değişim ters misel damlacığının çapını değiştireceğinden, çalışmanın bu kısmında su fazının iyon gücü 10 mM tampon çözeltisine eklenen NaCl miktarı ile net sodyum derişimi 100 mM olacak şekilde sabitlenmiştir. Organik fazın su içeriğinin tüm pH değerleri için ~45 olduğu bulunmuştur.

Organik fazda çözünen protein miktarının su fazının protein derişiminin 3 mg/ml olduğu noktada en yüksek değere ulaştığı Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 3. Su fazının protein derişiminin β-galaktosidazın organik fazdaki çözünürlüğüne etkisi

Su fazının protein derişimindeki artışın organik fazın su içeriğini 50 den 23 kadar düşürdüğü belirlenmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Su fazının tuz ve protein derişimi arttıkça organik fazın su içeriği düşmekte buna bağlı olarak nano boyuttaki mikroemülsiyon su damlacıklarının çapı azalmaktadır. Bunun da organik fazda çözünen protein miktarını azalttığı belirlenmiştir. β -galaktosidazın ters misel içinde çözünlüğünün su fazının pH'sına bağlı olarak önemli bir şekilde değiştii bulunmuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda faz transferi işlemleri enjeksiyon yöntemini takiben enzimlerin organik fazdan su fazına ekstraksiyonunda kullanılabilmeğine karar verilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışmaya verdiği destekten dolayı TÜBİTAK-BİDEB'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- 1.Panesar PS, Panesar R, Singh RS, et al. 2006. Microbial production immobilization and application of beta-D-galactosidase. J. Chem. Techno. Biotech., 81: 530-543
- 2.Banik RM, Santhiagu A, Kanari B, et al. 2003. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. World J. Biotech., 19: 337-348.
- 3.Giovenco S, Verbeegen F, Laane C. 1987. Purification of intracellular enzymes from whole bacterial cells using reversed micelles. Enzyme Microb. Techno., 9: 470-473
- 4.Becerra M, Cerdan E, Siso MIG. 1998. Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric form are active. Biotech. Techno., 12: 253-256.
- 5.Matzeke SF, Creagh AL, Haynes CA, et al. 1992. Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles. Biotech. Bioeng., 40: 91- 102.
- 6.Kawakami LE, Dungan SR. 1996. Solubilization properties of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in AOT-isooctane reversed micelles. Langmuir, 12: 4073- 4083.
- 7.Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- 8.Rahaman RS, Hatton TA. 1991. Structural characterization of α -chymotrypsin containing AOT reversed micelles. J. Phys. Chem., 95: 1799-1811.