

itüdergisi/c

fen bilimleri

Cilt:1, Sayı:1, 3-10

Aralık 2002

Escherichia coli penisilin asilazının CMC konjugasyonu ile pH stabilizasyonu

Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK*, Altan ERARSLAN, Dilek KAZAN

İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

90 kDa mol ağırlığında karboksimetilselüloz (CMC) ile konjuge olan *Escherichia coli* Penisilin G asilaz'ının sıcaklık ve pH'ya karşı geri dönüşümsüz inaktivasyonu çalışılmıştır. Karboksimetilselüloz periodat oksidasyonu ile aktive edilmiş ve PGA'a, Schiff bazı oluşumu ile kovalent olarak bağlanmıştır. PGA ve modifiye olmuş PGA farklı zaman ve farklı pH değerlerinde (pH 4-9) inkübe edilmiştir. PGA'nın pH karşısındaki en yüksek stabilitesi, pH 8'de 4 kat olarak elde edilmiştir. CMC'un çapraz bağlanması sonucu PGA enziminin optimal pH ve k_{cat} değeri değişmemiştir. K_m ve V_m değerleri ise azalmıştır. Konjuge PGA için farklı pH değerlerinde inaktivasyonun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) PGA'ninkine göre daha yüksek bulunmuştur

Anahtar Kelimeler: Enzim stabilizasyonu, *Escherichia coli*, karboksimetilselüloz konjugasyonu, penisilin G asilaz

pH stabilization of *Escherichia coli* penicillin acylase by CMC conjugation

Abstract

The irreversible inactivation of kinetics and the stability of *Escherichia coli* penicillin G acylase (PGA) at various pH values conjugated by anionic polysaccharide carboxymethyl-cellulose (CMC) were studied. The use of ionic polysaccharides in enzyme technology have many potential advantages, such as water solubility, biocompatibility and non-toxicity. The stabilizing effect of ionic polysaccharides on enzyme molecules is well known by causing the cross links between the free amino group containing amino acid residues on protein molecule and strengthening the electrostatic interactions on enzyme after conjugation. CMC was activated by periodat oxidation to its aldehyde derivative and covalently bound to PGA via Schiff's base formation. The 46% fraction of total enzyme activity and 65% fraction of total protein in PGA solution was conjugated by CMC. The amount of CMC bound protein was 33% of the initial CMC concentration. Native and CMC conjugated PGA were incubated at 40°C and different pH values between (4-9) interval for extended times. The irreversible inactivations of the native and conjugated PGA at pH values studied were obeyed to the first order inactivation kinetics. The highest pH stability of PGA was obtained at pH 8 as four fold. Cross-linking by CMC did not affect the pH profile and the k_{cat} value of enzyme. However K_m and V_m values were decreased after cross-linking. The activation free energy of inactivation (ΔG_i) at different pH values for conjugated PGA were found to be always higher than that for native enzyme. CMC conjugation is improved the catalytic performance of enzyme by increasing the k_{cat}/K_m ratio.

Keywords: Carboxymethylcellulose conjugation, enzyme stabilization, *Escherichia coli*, penicillin G acylase.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK. cdilek@rige.gov.tr; Tel: (262) 641 23 00 dahili:4016.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi'nde tamamlanmış olan "Kimyasal modifikasyonlarla penisilin asilaz enziminin stabilizasyonu" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 27.03.2002 tarihinde dergiye ulaştırılmış, 24.09.2002 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.05.2003 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki hızlı inaktivasyonu büyük bir problem oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre stabil olmaları gerekmektedir. Operasyonel stabilite- nin uzatılması enzim yinelenmelerinin sayısını azaltacak ve böylece enzimin kullanımdaki maliyetini de düşürecektir.

Enzimlerin pH inaktivasyon mekanizması enzim molekülünün kısmen açılması olarak açıklanmıştır. Normal şartlar altında enzimin katalitik olarak aktif doğal yapısı, hidrojen bağları, hidrofobik, iyonik ve Van der Waals etkileşimleri gibi kovalent olmayan kuvvetler ile korunmaktadır. pH'daki değişiklik ile bu kuvvetlerin etkisi azalır ve protein molekülü açılır. Bu ise enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanır (Klibanov, 1974). Bu açılmayı önlemek için temel prensip enzim molekülünün yapısını daha kararlı hale getirmektir. Enzimlerin stabilizasyonunda genel olarak dört yöntem uygulanır: 1) Doğal olarak yüksek stabiliteye sahip enzimleri üreten mikroorganizmaların taranması, 2) Bifonksiyonel reaktiflerin kullanımıyla intramoleküler molekül içi çapraz bağlama ya da açılasyon ve redüktif alkilasyon gibi reaksiyonlarla proteinlerin tersiyer yapılarındaki anahtar grupların modifiye edilmesi yoluyla enzimlerin kimyasal modifikasyonu, 3) Protein mühendisliği ve 4) Nötral tuzlar, kelat yapıcı maddeler, albüminler ve diğer proteinleri içeren stabil edici maddelerin katılması (Schmid, 1979, Klibanov, 1983, Janecek, 1993).

Enzimlerin kimyasal modifikasyonlarla rijiditesini artırmak sureti ile stabilize edilmesi, çabuk sonuç alınabilirliği, nispeten ucuz ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle en sık başvurulan stabilizasyon yöntemlerinden biridir. Penisilin G asilaz (PGA) (EC 3.5.1.11) alkali pH'da (7.5-8.5) molekülün açıl yan zincirinin hidrolitik olarak ayrılması ile sefalosporin G (Cep G) ve penisilin G (Pen G)'den 7-amino-3-deasetoksi sefalosporanik asit (7-ADCA) ve 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretiminde

kullanılmaktadır. Enzimin spesifik ve katalitik özellikleri biyokataliz uygulamaları için potansiyel oluşturmaktadır. Daha düşük nötral pH değerlerinde (4.0-9.0) enzim ayrıca ampisilin, amoksisilin ve oksasilin gibi yarı sentetik penisilinlerin üretiminde fenil asetik asit (PAA) türevleri ile 6-APA'nın N-açılasyonunu katalizler (Kazan ve Erarslan, 1996). Diğer taraftan suda çözünebilmesi, biyoyumlu olmaları, biyolojik bozunmaya uğrayabilmeleri ve toksik olmamaları iyonik yapıdaki polisakkaritlerin enzim teknolojisinde çeşitli alanlarda kullanılmasına neden olmuştur. İyonik polisakkaritlerin konjuge olduğu enzim moleküllerinde elektrostatik etkileşimlerin enzim stabilizasyonunda önemli etken olduğu bilinmekle birlikte bu tip polimerlerle enzim modifikasyonuna yönelik literatürde az sayıda çalışma vardır. PGA modifikasyonuna ilişkin çalışma ise bulunmamaktadır. Bu çalışmada iyonik yapıda bir polimer olan karbok-simetilselüloz (CMC) ile konjuge edilen PGA'nın stabilizasyonu incelenmiştir.

Materyal ve metod

Kimyasallar

Pen G ve 6-APA Unifar Kim. Ltd., (İstanbul, Türkiye), enzim saflaştırılması için kullanılan DEAE-selüloz Sigma Chemical Ltd (ABD) ve CMC Aldrich'den (USA) alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Almanya), ya da Sigma Chemical Ltd'den (ABD) sağlanmıştır.

PGA üretimi ve saflaştırılması

Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Eschericia coli* ATCC 11105 suşunun bir mutanti olup, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ile mutasyona uğratarak elde edilmiştir (Erarslan v. diğ., 1991). Mutant suş *E.coli* A.T.C.C. 11105 suşuna oranla 4 kat daha fazla penisilin G asilaz üretmektedir ve TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilmektedir. *E.coli* hücrelerinin jar fermentöre ekimi ile PGA üretimi Erarslan ve Güray'ın (1991) açıkladığı şekilde aynı ortam ve kültür şartları altında uygulanmıştır. Fermentasyon sıcaklığı 28°C, pH 7.0 ve

çözölmüş oksijen konsantrasyonu % 10'dur. PGA sentezinin indüklenmesi, kültür aşılandıktan 6 saat sonra final konsantrasyonu % 0.3 olacak şekilde indükleyici olarak fenil asetik asit çözöltisinin ortama beslenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

E. coli hücreleri tarafından üretilen PGA bir hücre içi enzim olduğundan fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek kültür ortamından ayrılmıştır. Saflaştırma işlemleri Erarslan ve diğerleri (1991) tarafından açıklanan yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir.

Karboksimetilselölözün (CMC) aktive edilmesi

CMC'un aktivasyonu Villalonga, R. v. diğ. (2000) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bir gram CMC (molekül ağırlığı 90 kDa) 100 ml distile suda çözölmüş ve 1.07 g NaIO₄ eklenmiştir. 48 saat karanlıkta karıştırılarak CMC'nin aldehit türevi elde edilmiştir. 1ml etilen glikol ilave edilerek aktivasyon reaksiyonu durdurulmuştur. Reaksiyon sonunda aktive edilmiş CMC distile suya karşı dializ edilerek aşırı etilen glikol ve NaIO₄'ten arındırılmıştır.

Aktive edilmiş CMC'un PGA ile konjugasyonu

10 mM pH 7 fosfat tamponunda bulunan doğal enzim (spesifik aktivite 31.80 U/mg, protein 0.660 mg/ml) aktive edilmiş, CMC ile 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. CMC ile modifiye edilmiş PGA molekülleri reaksiyona girmemiş CMC ve enzim moleküllerinden (82 kDa mol ağı.) ultrafiltrasyon ile ayrılmıştır. Ultrafiltrasyonda Amicon Diaflo YM 100 filtre (ayırıldığı molekül ağırlığı 100 kDa) kullanılmıştır. Enzim çözöltisindeki CMC miktarı Dubois ve diğerlerinin (1956) fenol sülfat metodu ile ölçölmüştür.

PGA'nın aktivite ve proteinin ölçölməsi

Saflaştırma esnasında hidroksilamin metodu kullanılmıştır (Batchelor v. diğ., 1961). Kinetik çalışmalarda hızlı ve hassas olması sebebiyle hidroksilamin metodu yerine p-dimetilaminobenzaldehit metodu kullanılmıştır (Shewale v. diğ., 1987). Bir birim enzim aktivitesi (1 U); 50 mM pH 8.0 fosfat tamponu çözö-

tisinde hazırlanmış, 15 mM Pen G substrat çözöltisinden 40 °C'da, dakikada, 1 µmol 6-APA üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim örneklerindeki protein miktarı Coomassie Blue boyası bağlama yöntemi ile belirlenmiştir (Sedmak ve Grossberg, 1977, Spector, 1978). Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır.

Doğal ve CMC ile modifiye edilmiş PGA'nın değişik pH değerlerindeki inaktivasyon kinetiğı

Doğal ve CMC ile konjuge PGA'nın değişik pH'lardaki inaktivasyon hız sabitleri (k_i) birinci derece inaktivasyon mekanizmasına göre hesaplanmıştır (Erarslan ve Koçer, 1992). 0.050 ml doğal enzim (spesifik aktivite 31.80 U/mg, protein 0.660 mg/ml) çözöltisi 0.450 ml 50 mM farklı pH lardaki fosfat tamponu içerisinde 40°C ve değişen zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 50 mM pH 8.0 fosfat tamponu çözöltisinde hazırlanmış 30 mM Pen G substrat çözöltisinden 0.5 ml ilave edilmiş ve tekrar 3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımları ikiye ayrılmış ve PGA enzimi ve CMC-PGA'nın inaktivasyona uğramadan kalan aktivite değeri p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir.

Değişik pH değerleri için elde edilen aktivitelerin Ln (E_i/E₀) değerleri hesaplanmış, Ln (E_i/E₀) = -k_i.t denkleminin eğimlerinden enzim ve CMC ile konjuge PGA için tersinmez inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır [E_i: inaktivasyona uğrayan PGA'nın başlangıç aktivitesi, E₀: inaktivasyona uğramamış PGA'nın başlangıç aktivitesi].

pH stabilizasyonunun derecesinin tanımı

CMC ile konjuge PGA'nın pH stabilizasyon derecesi stabilizasyon faktörü (SF) olarak tanımlanır ve aşağıda gösterildiğı şekilde hesaplanır;

$$SF = [t_{1/2}]_{\text{CMC-PGA}} / [t_{1/2}]_{\text{doğal PGA}} \quad (1)$$

Bu hesaplama göre doğal PGA'nın SF değeri her zaman 1.0 olarak bulunur. Yarılanma ömrü (t_{1/2}), enzim aktivitesinin % 50 inaktivasyona

uğraması için geçen süredir ve $\ln(E_i/E_0) = -k_i \cdot t$ denkleminde $E_0=2E_i$ konulması ile hesaplanır.

Doğal ve CMC ile konjuge PGA'nın pH profillerinin belirlenmesi

0.05 ml nativ enzim çözeltisi (spesifik aktivite 31.80 U/mg, protein 0.660 mg/ml) ve CMC-PGA çözeltisine (spesifik aktivite 22.52 U/mg, protein 0.432 mg/ml) 0.450 ml pH 4-9 arasında hazırlanmış fosfat tamponu çözeltisi ilave edilmiş, üzerine 50 mM pH 8 tamponunda hazırlanmış 30 mM pen G çözeltisi ilave edilerek 3 dakika 40°C'de inkübe edilmiştir. Enzim ve CMC-PGA'nın aktiviteleri PDAB metoduna göre ölçülmüştür.

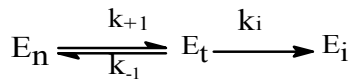
Sonuçlar

PGA ile CMC konjugasyonu

Aktive olmuş CMC, PGA ile Schiff bazı oluşturarak enzim molekülü üzerinde çapraz bağlar oluşturur. Konjugasyon reaksiyonunun sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Nativ PGA'nın toplam aktivitesinin %46'lık bir kısmı CMC ile konjuge olabilmıştır. Enzim çözeltisindeki toplam proteinin ise %65'lik kısmı konjugasyona uğramıştır. Konjugasyona katılan aktive CMC miktarı ise reaksiyon başlangıcındaki miktarın %33'üdür. Konjugasyon PGA'nın spesifik aktivitesinde düşmeye neden olmuştur.

Doğal ve CMC ile modifiye olmuş PGA'nın farklı pH değerlerindeki tersinmez inaktivasyon kinetikleri

Doğal ve CMC-PGA'nın tersinmez inaktivasyon mekanizmaları birinci derece inaktivasyon kinetiği göz önüne alınarak pH 4-9 aralığında çalışılmıştır. Bu mekanizmaya göre enzimlerin tersinmez inaktivasyon mekanizması iki aşamalı bir süreç olarak gözönüne alınabilir:



Burada E_n başlangıç, E_t geçici (transient) hal ve E_i inaktive olmuş PGA'yı temsil eder. k_i enzimin inaktivasyon hız sabitidir (dakika⁻¹). Enzimin farklı pH değerlerine ait birinci mertebeye tersinmez inaktivasyon kinetiğini ifade eden $\ln(E_i/E_0) = -k_i \cdot t$ denkleminde $\ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t (zaman) grafikleri oluşturulmuş ve sonuçlar pH inaktivasyonu için Şekil 1'de, gösterilmiştir. Her bir pH değeri için elde edilen doğru eğimlerinden doğal enzim ve CMC-PGA için tersinmez inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır. Ayrıca PGA ve CMC-PGA'nın her pH değeri için hesaplanan yarılanma ömür ve inaktivasyon hız sabitleri değerleri sırasıyla Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2'nin incelenmesinden pH 4'den 8'e doğru CMC ile konjuge olmuş PGA'nın pH stabilitesinde artış olmakta ve en yüksek stabilizasyon 4 kat ile pH 8.0'de elde edilmektedir. pH- 9'a çıktığında stabilitede azalma görülmekle birlikte yine konjuge enzim doğal enzimden 2.2 kat daha yüksek stabilite göstermiştir. Bu sonuçlar CMC ile konjugasyonun enzimin pH'ya karşı stabilizasyonunda da etkin olduğunu ortaya koymaktadır.

Doğal ve karboksimetilselüloz ile modifiye olmuş PGA'nın optimal pH değerlerinin belirlenmesi

Konjugasyonun enzimin pH profiline olan etkisi pH, 4-9 aralığında doğal ve CMC konjuge PGA'nın başlangıç hızları 40°C'da ölçülerek incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir. Şeklin incelenmesinden konjugasyonun PGA'nın optimal pH'sında değişiklik oluşturmadığı görülmüştür.

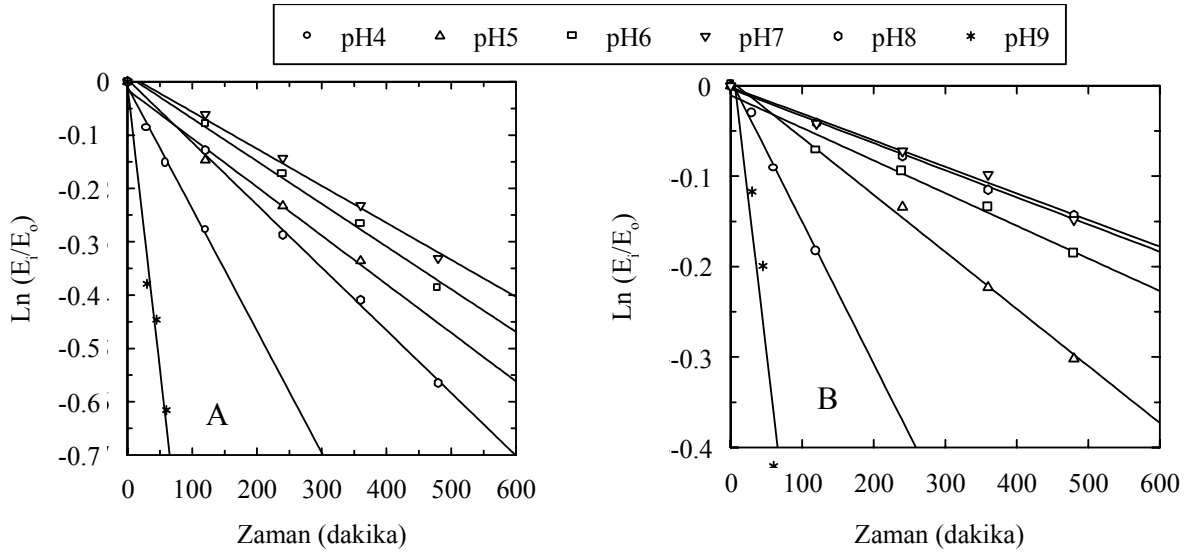
Doğal ve karboksimetilselüloz ile modifiye olmuş PGA'nın V_m , K_m ve k_{cat} değerlerinin belirlenmesi

Doğal ve CMC ile modifiye olmuş PGA'nın V_m ve K_m değerleri Lineweaver-Burk diyagramından hesaplanmıştır (Şekil 3).

Tablo 1. PGA'nın çapraz bağlanması reaksiyonu üzerine CMC'un etkisi

Örnek adı	Konjuge olan % Aktivite	Konjuge olan % Protein	% CMC miktarı	Spesifik aktivite (U/mg)
PGA	100	100	-	31.80
CMC-PGA	46	65	33	21.52

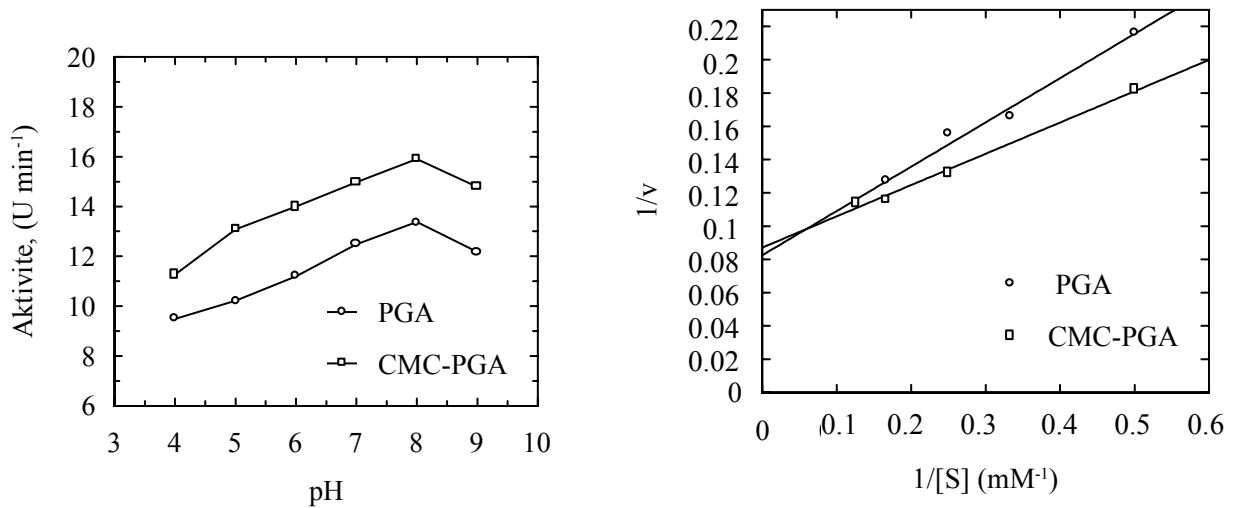
Penisilin asilazının stabilizasyonu



Şekil 1. Doğal PGA (A) ve CMC-PGA (B)'nin değişik pH değerlerindeki tersinmez inaktivasyonu. (Her bir pH'ya ait inaktivasyon hız sabitleri bu doğruların eğimlerinden hesaplanmıştır. Bütün r değerleri 0.97'den büyüktür.)

Tablo 2. Doğal PGA ve CMC-PGA'ın farklı pH değerlerindeki inaktivasyon hız sabitleri (k_i), yarı ömür zamanları (HL) ve stabilizasyon faktör (SF) değerleri

Enzi	pH 4		pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)	$k_i \cdot 10^{-2}$ (dak) ⁻¹	$t_{1/2}$ (dak)
PGA	2.3	301.	0.9	770	0.8	866	0.7	990	1.2	577	1.06	65
CMC-PGA	1.6	433	0.8	1155	0.36	1925	0.29	2389	0.3	2310	4.8	144



Şekil 2 CMC-PGA ve PGA için pH-aktivite profili

Şekil 3. PGA ve CMC-PGA için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (nativ PGA ve CMC-PGA için r değerleri sırasıyla 0.9935 ve 0.9963'tür).

Doğal ve konjuge enzime ait turn-over sayıları ya da katalitik hız sabitleri $V_m = k_{cat} \cdot [E]_t$ bağıntısından hesaplanmıştır. Reaksiyondaki toplam enzim konsantrasyonu $[E]_t$ 0.4024 μmol olarak belirlenmiştir. K_m , V_m , k_{cat} değerleri toplu olarak Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3 Doğal ve CMC konjuge PGA'nın kinetik parametreleri

Örnek adı	K_m (mM PenG)	V_m ($U_{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
PGA	3.23	12.135	30.15	9.33
CMC-PGA	2.157	11.48	28.52	13.22

Tablo 3'ün incelenmesinden enzimin kinetik önem taşıyan parametrelerinden K_m değerinin CMC ile konjugasyondan sonra azalmakta olduğu, k_{cat} değerinde konjugasyondan sonra önemli bir değişiklik olmazken katalitik performansı ifade eden k_{cat}/K_m oranının artmakta olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgular konjugasyonun enzimin katalitik performansında iyileşmeye neden olduğunu göstermektedir.

CMC-PGA ve PGA'nın farklı pH değerlerinde inkübasyonun karşı inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

PGA ve CMC konjuge PGA'nın her bir pH değerindeki inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi $\Delta G_i = -RT \ln(k_i h / k_B T)$ (2) eşitliğine göre hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. R, gaz sabiti, 1.987 cal/mol.K; k_i , inaktivasyon hız sabiti, (min^{-1}), h=Planck sabiti, $2.64 \cdot 10^{-36}$ kal min, k_B : Boltzman sabiti, $3.30 \cdot 10^{-24}$ cal/K'dir.

Tablo 4. PGA ve CMC-PGA'nın her bir pH değeri için inaktivasyonun aktivasyon serbest enerji (ΔG_i) sonuçları.

pH	ΔG_i (kcal.mol ⁻¹)	
	PGA	CMC-PGA
4	24.675	24.900
5	25.258	25.510
6	25.332	25.828
7	25.415	25.963
8	25.079	25.942
9	23.748	24.217

Tablonun incelenmesinden çalışılan her pH'da konjuge enzimin ΔG_i değeri doğal enziminkinden daha büyük bulunmuştur. Bu da enzimin konjugasyonla stabilize olduğunun önemli bir göstergesidir.

Tartışma

CMC gibi elektrik yüklü gruplar içeren polisakkaritlerle konjugasyon yapılarak enzimlerin stabilize edilmesine ilişkin çok az çalışma yayınlanmıştır (Villalonga v. diğ., 1999 ve 2000). PGA'nın bu çeşit polimerlerle konjugasyonu ilgili çalışmaya ise rastlanmamıştır. CMC negatif yüklü karboksil grupları içeren bir glikoz polimerdir. Dekstran moleküllerinden farkı bu negatif yüklü gruplardan ileri gelir. Konjuge polisakkaritlerin enzimlerle pH'ya karşı stabilizasyon sağlayıcı etkileri protein molekülünde molekül içi çapraz bağlar oluşturarak strüktürel stabiliteyi arttırmak şeklinde açıklanabilir. Buna ek olarak polimer molekülünün enzimin mikro çevresinde hidrofobik ortam yaratması ve polimer üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının protein molekülündeki pozitif yüklü gruplarla elektrostatik bağlar oluşturarak stabilite artışına katkıda bulunması düşünülebilir (Kazan v. diğ., 1997, Villalonga v. diğ., 1999 ve 2000, Ertan v. diğ., 1997). Ancak nötral polimer olan dekstranla PGA konjugasyonu CMC'ninkinden daha yüksek pH stabilizasyonu sağlamıştır. (Ertan v. diğ., 1997). Bunun nedeni olarak CMC'un molekül büyüklüğünün çok yüksek olmasının yanı sıra protein molekülü üzerindeki pozitif elektrik yüklü gruplarının sayısının azlığı olabilir.

CMC üzerindeki negatif yüklü karboksil grupları ile protein molekülünün negatif yüklü grupları arasındaki elektriksel itme konjugasyonla çapraz bağ oluşumu düzeyinin azalmasına neden olabilir, bu da rijiditesindeki ve dolayısıyla stabilizasyonundaki azalma ile sonuçlanır. Bu çalışmada her bir pH için PGA ve CMC-PGA'nın k_i değerleri hesaplanmıştır. Modifiye olmuş enzimin inaktivasyon hız sabitleri doğal PGA'ya göre daha düşük, yarılanma ömürleri ise daha yüksek değerler almıştır. Bu ise yüksek pH'larda CMC'nin PGA üzerindeki stabilize etkisini göstermektedir.

PGA enziminin CMC ile modifikasyonunun bir sonucu olarak spesifik aktivitesi azalmıştır. Bunun nedeni PGA enziminin aktif merkezi veya yakınlarında yer alan amino asit residülerinin bir kısmının CMC ile modifikasyonu sonucu enzim aktif bölgesine substrat bağlanmasının güçleşmesi olabilir.

CMC-PGA için K_m ve V_m ve k_{cat} değerleri doğal PGA'ya göre daha düşük olarak elde edilmiştir. Diğer taraftan CMC ile konjugasyona uğramış PGA'nın k_{cat}/K_m oranında bir artma belirlenmiştir. Bu oran enzimin katalitik performansını gösterir. Konjugasyon PGA'nın katalitik performansında gelişmeye neden olmuştur. CMC ile konjugasyon sonucu protein molekülü üzerinde karboksil grupları ile yaratılan negatif yük k_{cat} değerini önemli derecede etkilemezken K_m değerinde azalmaya neden olmuştur. Söz konusu negatif yük muhtemelen enzim yüzeyindeki pozitif yüklerin kısmi nötralizasyonuna neden olarak enzimin substratı olan Pen G'nin aktif bölgeye bağlanma afinitesini arttırmaktadır. K_m değerindeki azalma, bir enzimin substratı için affinitesinde bir artışı V_m değerindeki gözlenmiş olan azalma ise enzim molekülünün CMC molekülü ile bağlanmasının enzimin aktif merkezine yakın bir bölgede olduğunu göstermektedir (Kazan ve Erarslan, 1997).

PGA ve CMC-PGA pH 4-9 aralığında 40°C'de değişik zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonucunda CMC-PGA için 480 dakika sonunda pH 8 civarında ve PGA enziminin dört katı kadar bir stabilizasyon elde edilmiştir.

Dimetiladipimidat (DMA) çapraz bağlanan PGA ile de pH'ya karşı benzer mertebede stabilizasyon sağlamıştır (Kazan v. diğ., 1996). Ancak nötral bir polimer olan dekstranla konjuge edilen PGA'nın aynı koşullarda pH'ya karşı daha yüksek stabilite gösterdiği rapor edilmiştir (Ertan v. diğ., 1997).

CMC-PGA için elde edilen pH profilinden konjuge enzimin optimal pH değerinde değişme olmadığı görülmektedir. Benzer sonuçlar

dekstran konjuge PGA ile de alınmıştır (Ertan v. diğ.1997).

Enzimin aktif merkezinde yer alan prototrofik gruplar değişen iyonizasyonlar karşısında aktif bölgenin dolayısıyla enzimin konformasyonel yapısının kararlılığını sağlarlar.

Bu grupların yüksek pH değerlerindeki iyonizasyonlarının değişimi sonucunda enzimin konformasyonel yapısı ve kataliz mekanizması kısmen veya tamamen bozulabilir. Bu ise enzimin aktif bölgesinin tahribatına neden olur. En yüksek inaktivasyon hız sabitleri pH 4 ve 9'da görülmüştür. Protein yapısındaki disülfid değişimleri enzimin pH 8 üzerindeki mümkün olan inaktivasyon mekanizmalarında göz önüne alınabilir. Bu çeşit inaktivasyon genellikle nötral hale yakın alkali koşullarda olur. Protein yapısındaki amino asit residülerindeki karboksil gruplarının protonizasyonu pH 4'ün altındaki inaktivasyon için olası bir sebep olabilir (Kazan v. diğ., 1996, Ertan v. diğ., 1997).

pH'ya karşı inaktivasyonun aktivasyon serbest enerjisi değerleri CMC-PGA için doğal PGA'ya nazaran daha yüksek bulunmuştur. Her ikisi içinde pH 7'de en yüksek değeri vermiştir. Bulunan bütün bu bulgular CMC-PGA'nın pH karşısındaki stabilizasyonunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Batchelor, F. R., Chain, E. B., Hardy, T. L., Mansford, K. R. L., Rolinson, G. N., (1961). 6-Aminopenicillanic Acid. III. Isolation and Purification., Proc. Roy. Soc., B, **154**, 498-508.
- Dubois M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances., Anal. Chem., **28**, 350-356.
- Erarslan, A. ve Güray, A., (1991). Fermentation of Penicillin G Acylase by a Mutant Strain of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Doğa-Tr. J. Biology*, **15**, 167-174.
- Erarslan, A., Koçer, H., (1992). Thermal inactivation kinetics of penicillin G acylase obtained from a mutant derivative of *Escherichia coli* ATCC 11105, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 55-79.
- Erarslan, A., Terzi, İ., Güray, A., Bermek, E., (1991). Purification and Kinetics of Penicillin G

- Acylases from a Mutant Strain of *Escherichia coli* ATCC 11105. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **51**, 27-40.
- Ertan, H., Kazan, D., Erarslan, A., (1997). Cross-linked stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G acylase against pH by dextran-dialdehyde polymers, *Biotechnol. Techniques*, **11**, 225-229.
- Janecek, S., (1993). Strategies for obtaining stable enzymes, *Process Biochem.*, **28**, 435-45.
- Kazan, D., Erarslan, A., (1996). Influence of Polyhydric Compounds on the pH Stability of Penicillin G acylase Obtained from a Mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105, *Process Biochem.* Vol. 31, 691-697.
- Kazan, D., Ertan, H., Erarslan, A., (1997). Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 191-197.
- Kazan, D., Ertan, H., Erarslan, A., (1996). Stabilization of penicillin G acylase against pH by chemical cross-linking, *Process Biochem.*, **31**, 135-140.
- Kazan, D., Erarslan, A., (1997). Penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **62**, 1-13.
- Klibanov, A. M., (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 1-28.
- Klibanov, A.M., (1974). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. In *Advances in Applied Microbiology*, ed. A.I. Laskin. Academic Press, New York, **29**, 1-28.
- Schmid, R. D., (1979). Stabilized soluble enzymes. *Adv. Biochem. Eng.*, **12**, 41-127.
- Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E., (1977). A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for the Protein Using Coomassie Blue G-250. *Anal. Biochem.*, **79**, 544-552.
- Shewale, G. J., Kumar, K. K., Ambekar, G. R., (1987). Evaluation and Determination of 6-Aminopenicillanic Acid by p-dimethylaminobenzaldehyde. *Biotechnol. Techniques*, **1**, 69-72.
- Spector, T., (1978). Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. *Anal. Biochem.*, **86**, 142-146.
- Villalonga, R., Gomez, L., Ramirez, H. L., Villalonga M. L., (1999). Stabilization of α -amilase by chemical modification with carboxymethylcellulose, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**, 635-638.
- Villalonga, R., Villalonga, M. L., Gomez L., (2000). Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose, *J. Molec. Catal. B:Enzymatic*, **10**, 483-490.