

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNVERTAZ ENZİMİNİN AK DUTTAN (*Morus alba*)
ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İsa ŞAHİN

Enstitü Anabilim Dalı : **KİMYA**
Enstitü Bilim Dalı : **BIYOKİMYA**
Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Semra YILMAZER
KESKİN**

Mayıs 2015

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNVERTAZ ENZİMİNİN AK DUTTAN (*Morus alba*)
ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

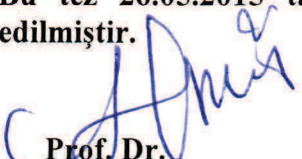
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İsa ŞAHİN

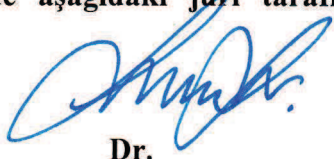
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 26.05.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
Abdil ÖZDEMİR

Jüri Başkanı


Dr.
Serdar SEZER

Üye


Yrd. Doç. Dr.
Semra YILMAZER
KESKİN

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

İsa ŞAHİN

26.05.2015

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleşmesinde her konuda daima yakın ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Semra YILMAZER KESKİN'e çok teşekkür ederim.

Başta Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Şahin DÜNDAR ve kimya bölümü öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarında yardımını ve zamanını esirgemeyen hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Can Serkan KESKİN'e ve Aygül GÜLER'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje no: 2013-50-01-028) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER	3
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.2. Enzimlerin Adlandırılması.....	6
2.3. Enzimlere Etki Eden Faktörler.....	7
2.3.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi.....	7
2.3.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi	7
2.3.3. Sıcaklığın etkisi.....	8
2.3.4. pH etkisi.....	8
2.4. İnvvertazlar ve Biyokimyası.....	8
2.4.1. İnvvertazların etki mekanizmaları.....	11
2.4.2. İnvvertazların izolasyonu ve saflaştırılması.....	12
2.4.3. İnvvertazların uygulama alanları.....	13

BÖLÜM 3.	
ÜÇLÜ FAZ SİSTEMLERİ.....	15
3.1. TPP'yi Etkileyen Parametreler.....	16
3.1.1. Tuz konsantrasyonunun etkisi.....	17
3.1.2. pH etkisi.....	17
3.1.3. Sıcaklığın etkisi.....	17
3.1.4. Hidrofobisite etkisi.....	18
3.1.5. TPP'nin uygulama alanları.....	18
BÖLÜM 4.	
MATERYAL VE METOD.....	19
4.1. Materyal.....	19
4.2. Metod.....	19
4.2.1. İnvertzın aktivite tayini.....	19
4.2.1.1. DNS reaktifi hazırlanması.....	21
4.2.2. Protein tayini (Bradford metodu).....	21
4.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini.....	23
4.2.3.1. Polimerizasyon protokolü.....	26
4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması.....	26
4.2.3.3. Protein bantlarının boyanması.....	27
4.2.4. Üçlü Faz Sistemi (TPP) İle İnvertzın Ak Duttan (<i>Morus alba</i>) İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	27
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	29
5.1. İnvertz Enziminin Ak Duttan (<i>Morus alba</i>) İzolasyonu	29
5.2. TPP ile Ak Dut İnvertzının Saflaştırılması	30
5.3. Ak Duttan İnvertzın Saflaştırılmasında, TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	31

5.4. Ak Duttan İnvvertazın Saflaştırılmasında TPP Sisteminde pH'ının Etkisi	34
5.5. Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İnvvertaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini.....	35
5.6. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İnvvertaz Enziminin Termal Kararlılığı	36
5.7. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İnvvertaz Enziminin Depo Kararlılığı.....	36
5.8. Öneriler.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Asp-23	: Aspartik Asit-23
°C	: Santigrat derece
CoA	: Koenzim A
DNS	: Dinitro salisilik asit
g	: Gram
Glu-204	: Glutamik Asit-204
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
Lit.	: Literatür
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaNO ₃	: Sodyum nitrat
pH	:Tayin edilebilen hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
rpm	: Revolutions per minute
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat, poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametilendiamin
TPP	: Three-phase partitioning

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Etkileşme sonucu uygunluk ve anahtar-kilit modellerinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.2.	İnvertaz enziminin genel reaksiyon mekanizması.....	9
Şekil 2.3.	İnvertaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	9
Şekil 2.4.	İnvertaz enziminin etki mekanizması.....	12
Şekil 4.1.	DNS yönteminin prensibi.....	20
Şekil 4.2.	Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu	21
Şekil 4.3.	Coomassie brilliant blue G-250.....	22
Şekil 5.1.	%20 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırılma katsayısına ve aktivite verimine etkisi...	31
Şekil 5.2.	%30 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırılma katsayısına ve aktivite verimine etkisi...	32
Şekil 5.3.	%40 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırılma katsayısına ve aktivite verimine etkisi...	32
Şekil 5.4.	%50 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırılma katsayısına ve aktivite verimine etkisi...	33
Şekil 5.5.	%60 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırılma katsayısına ve aktivite verimine etkisi...	33
Şekil 5.6.	Ak dut invertazının TPP sisteminde ayırımına pH'ın etkisi.....	35
Şekil 5.7.	İnvertazın termal kararlılığı (Substrat: Sukroz; İnkübasyon süresi: 30 dakika)	36

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Bazı enzimlere ait kofaktör ve koenzimler	4
Tablo 4.1.	SDS-PAGE solüsyonlarının hazırlanma protokolleri.....	24
Tablo 4.2.	Yürütme jeli yüzdelere göre ayırma boyutları aralıkları.....	25
Tablo 4.3.	Yürütme jeli (%15) hazırlama protokolü.....	25
Tablo 4.4.	Yükleme jeli (%4) hazırlama protokolü.....	25
Tablo 5.1.	Ak dut invertazının TPP ile saflaştırma sonuçları (%50 amonyum sülfat, 1:2 enzim:bütanol, pH 5).....	30

ÖZET

Anahtar kelimeler: Üçlü Faz Sistemi, invertaz, SDS-PAGE

İnvertazlar sukrozun, fruktoz ve glukozu hidrolizini katalizleyen hidrolazlar sınıfına ait bir enzimdir. İinvertazlar genellikle gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İinvertazların kullanımı ile invert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi, kondense sütlerin üretimi, sığır yemlerinin hazırlanması ve bebek gıda ürünlerinin üretimi gerçekleştirilmektedir.

Protein ve enzimlerin saflaştırılmasında tek adımda ve düşük maliyette olduğu için afiniteye dayalı teknikler ön plana çıkmaktadır. Endüstriyel bir enzim olan invertaz, düşük maliyet ve kolay uygulanabilirliği açısından TPP (three-phase partitioning) yöntemi ile ak dut bitkisinden saflaştırıldı ve karakterize edildi.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME INVERTASE FROM WHITE MULBERRY (*Morus alba*) BY USING THREE-PHASE PARTITION

SUMMARY

Keywords: Three-phase partitioning, invertase, SDS-PAGE

Invertases which catalyzing the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose are enzymes of hydrolase class. Invertases are generally used widely in the food industry. Invert sugar syrup obtained, chocolate production, the production of condensed milk, baby food preparation and production of cattle feed are carried out by use of invertase.

Techniques based on affinity has come to fore because of purification of proteins and enzymes in one step and at low cost. An industrial enzyme invertase, it was purified and from white mulberry plant with method of TPP (three-phase partitioning) in term of low cost and easy applicability.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İnvertaz (β -fruktofuranozidaz, E.C 3.2.1.26), (Sukraz), β -Dfruktofuranozidlerin indirgenmemiş β -fruktofuranozid ucundan katalizleyen hidrolazlar sınıfına ait bir glukoenzimdir. İnvertaz, hafif krem renkli, suda çözünebilen, karboksilik grupça zengin asidik bir enzimdir. Doğada bitkisel (örneğin üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun, soya fasulyesi, nohut vb.) ve mikrobiyal (örneğin; *Sacromises cerevisia*, *Aspergillus niger* vb.) kaynaklarda bulunmaktadır [1, 2].

İnvertazlar sanayide ve genellikle gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnvertazların kullanımı ile invert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi, kondense sütlerin üretimi, sığır yemlerinin hazırlanması ve bebek gıda ürünlerinin üretimi gerçekleştirilmektedir. Endüstride invert şeker şuruplarının hazırlanmasında asit hidrolizi ya da enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. Asit hidrolizi kullanımında yüksek şiddette renkli ürünler, kül ve istenmeyen birçok yan ürün oluştuğu için endüstriyel alanda enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan fruktoz kolayca kristalize olmadığı ve daha tatlı olduğu için gıda endüstrisinde sakkaroz tercih edilmektedir. Bir diğer yandan invertaz enzimi analitik amaçla sakkaroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır [3].

Günümüzde enzim saflaştırma konusunda birçok yöntem kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin çoğu çöktürme, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, ultrafiltrasyon gibi çok basamaklı aşamaları içermektedir. Saflaştırma işleminde basamak sayısının artması ürün verimini olumsuz

etkilemektedir. Diğer bir yandan da bu basamakların çokluğu zor ve pahalı yöntemler içermektedir.

Yaptığımız çalışmada ak duttan (*Morus alba*) izole edilen invertaz enzimi üçlü faz yöntemiyle (TPP) uygun tuz konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi parametrelerin etkileri incelenerek optimizasyonu sağlandı. Optimize edilen TPP yöntemi ile tek adımda saflaştırıldı.

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. 1897 de E. Buncher'in maya ekstraktı kullanarak fermantasyonla alkol elde etmesiyle başlayan ilk enzim çalışmaları 1926 yılına gelindiğinde Sumner tarafından fasulyeden üreaz enzimini kristallendirilmesiyle devam etmiştir. Günümüzde farklı kaynaklardan saflaştırılmış 2000 dolayında enzim bulunmaktadır. Bunların da 200 kadarı kristalize edilebilmiştir [4, 5].

Katalitik RNA moleküllerinin bir kısmı hariç, bütün enzimler protein yapıdadır. Enzimlerin katalitik aktivitesi protein konformasyonlarının sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzimler denatüre olur ve alt birimleri olan amino asitlere dönüşürlerse katalitik aktiviteleri yok olur. Bu sebepten dolayı protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları katalitik aktivite için esastır.

Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymazken bazıları kofaktör ve koenzim adı verilen yapılara ihtiyaç duyarlar. Tablo 2.1'de kofaktör olarak Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyonlar ve koenzim olarak tanımlanan kompleks organik ve metallorganik moleküllerin bazıları ve enzimleri gösterilmiştir. Bazı durumlarda aktivite için hem koenzim hem de kofaktör gerekebilir [6, 7].

Tablo 2.1. Bazı enzimlere ait kofaktör ve koenzimler

Enzim	Kofaktör	Enzim	Koenzim
Sitokrom oksidaz	Cu^{2+}	Pirüvat dehidrogenaz	Tiamin pirofosfat
Sitokrom oksidaz, katalaz, peroksidaz	Fe^{2+} ve Fe^{3+}	Monoamin oksidaz	Flavin adenin nükleotid
Piruvat kinaz	K^+	Laktat dehidrogenaz	NAD
Heksokinaz, glukoz 6-fosfat, piruvat kinaz	Mg^{2+}	Glikojen fosforilaz	Pridoksal fosfat
Arjinaz, ribonükleotit redüktaz	Mn^{2+}	Asetil CoA karboksilaz	Koenzim A (CoA)
Dinitrogenaz	Mo	Pirüvat karboksilaz	Biotin
Üreaz	Ni^{2+}	Metilmalanonil mutaz	5' Deoksiadenosil kobalamin
Glutasyon peroksidaz	Se	Timidilat sentaz	Tetrahidrofolat

Enzim molekülüne çok sıkı veya kovalent olarak bağlanan gruplar prostetik grup olarak adlandırılırken katalitik olarak aktif olan enzim molekülüne holoenzim adı verilir. Bu tür enzimlerin protein kısmına ise apoenzim veya apoprotein ismi verilir [6].

Prostetik gruplar enzim molekülünü sıkıca genellikle kovalent bağlarla bağlandığı için kataliz sırasında ayrılmayan karbohidrat (glikoprotein), lipid (lipoprotein) veya nükleik asit (nükleoprotein) gibi organik moleküller olabilirler [8].

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktar ölçümlerinin yerine aktivite ölçümleri yapılmaktadır. Enzim aktivitesi bir enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle en uygun koşullarda belirli bir sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir [9, 10]. Aşağıda enzim aktivitesini göstermek için kullanılan tanımlar verilmiştir.

Enzim Ünitesi (U): 25C° de, bir dakikada, optimum şartlarda, 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

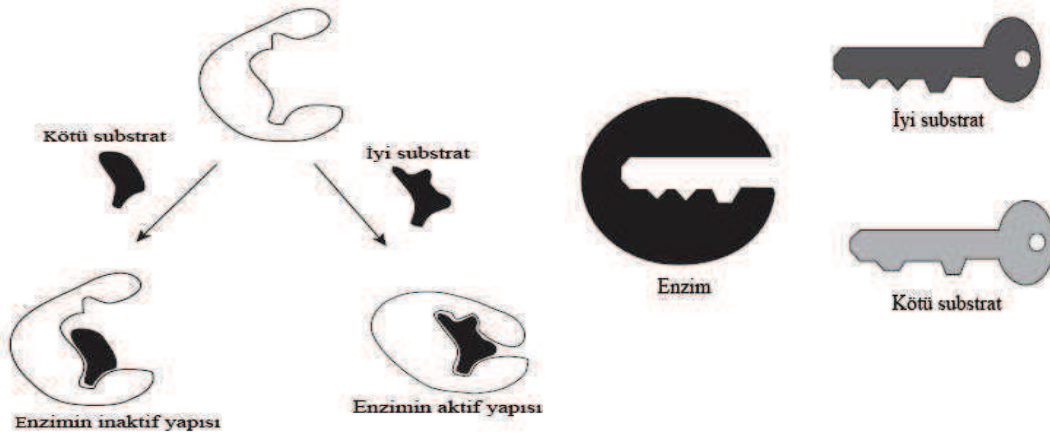
Spesifik Aktivite: 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi (U/mg protein) olarak verilir. Enzimin saflık derecesini gösterir.

Molar Aktivite (Dönüşüm Sayısı): Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısıdır.

Katal: 1 saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokan enzim miktarıdır. Enzimlerin katalitik aktivitesi hacimden bağımsız olduğu için genellikle katal kullanılır. 1 U=16,7 nkat'dır [5, 11].

Enzimlerin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapımı ile yıkımında görev alan amino asitleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı da verilir. Enzimlerin özellikleri birbirinden farklı olmasına rağmen aktif bölgelerin ortak özellikleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 1) Aktif bölge, enzimin toplam hacmi düşünüldüğünde enzim üzerinde çok küçük bir bölgeyi oluşturur.
- 2) Aktif bölge, üç boyutlu bir yapıdadır. Enzimin lineer yapısının değişik yerlerinde bulunan amino asitlerin bir araya gelerek oluşturdukları karmaşık bölgelerdir.
- 3) Substratlar enzime zayıf kuvvetle bağlanır. ES kompleksinin denge sabiti 10^{-2} - 10^{-8} arasında değişir.
- 4) Aktif bölgeler bir yarık ve girinti içinde yer alırlar ve su moleküllerinin giremediği çukur bölgelerdir. Yapısı incelenen enzimlerde bu bölgelerin substrata özgü olduğu görülmüştür. Girintinin içinde bağlanmayı ve katalizi kolaylaştıracak polar gruplar bulunmaktadır.
- 5) Aktif bölgelerin yapısı spesifik bir bağlanmayı gerektirir.
- 6) Şekil 2.1'de gösterildiği gibi substratın enzime bağlanabilmesi için özel bir yapıda olması gerekir (Anahtar-kilit modeli). Bazen ise substratın bağlanması aktif bölgenin şeklini değiştirebilir (Etkileşme sonucu uygunluk modeli) [12, 13].



Şekil 2.1. Etkileşme sonucu uygunluk ve anahtar-kilit modellerinin şematik gösterimi

2.2. Enzimlerin Adlandırılması

Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. (Enzyme Commission) harflerinden sonra artarda gelen dört rakamdan ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir.

Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup şunlardır:

- 1) Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2) Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3) Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H_2O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
- 4) Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5) İzomerazlar: Geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

- 6) Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Pankreas tarafından salgılanan proteolitik enzim tripsin olarak adlandırıldığı gibi birçok enzim katalizledikleri reaksiyonlar hakkında bilgi vermeyen özel adlara sahiptirler. Diğer enzimlerin çoğu katalizledikleri reaksiyonlar ve substratlarının sonuna -az eki getirilerek adlandırılırlar. Örneğin ATPaz ATP'yi parçalayan bir enzimken, ATPsentaz ATP sentezinde görev alan bir enzimdir [7].

2.3. Enzimlere Etki Eden Faktörler

Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar üzerine; enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortam pH'nın, zamanın, reaksiyon ürününün, koenzim ve kofaktör konsantrasyonlarının, ışık ve diğer fiziksel faktörlerin, allosterik etki, hormon ve diğer biyolojik maddelerin etkisi vardır [9].

2.3.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi

Enzim katalizli reaksiyonların hızı, enzimin substratına doymuş olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal bir şekilde artmaktadır. Bunun sebebi de her enzim molekülünün bir değerinden bağımsız olarak hareket etmesidir. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterli substrat bulunmadığı durumlarda enzim miktarı fazla olmasına rağmen, reaksiyon o derece yüksek hızda meydana gelmez [14].

2.3.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim konsantrasyonunun ve diğer bütün şartların sabit olduğu koşullarda başlangıçtaki tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun arttırılmasıyla lineer bir şekilde artarken, enzim substrat doymuşluğuna ulaştıktan sonra ise reaksiyon hızı sabit kalmaktadır [15].

2.3.3. Sıcaklığın etkisi

Bütün kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonların hızları da sıcaklıkla artmaktadır. Bu artış tipik olarak her 10 °C'lik artışa karşılık iki kat düzeyindedir. Fakat enzimler, protein yapısında oldukları için sıcaklık belirli bir seviye ulaştıktan sonra denatüre olur ve reaksiyon hızı azalmaya başlar [16].

2.3.4. pH etkisi

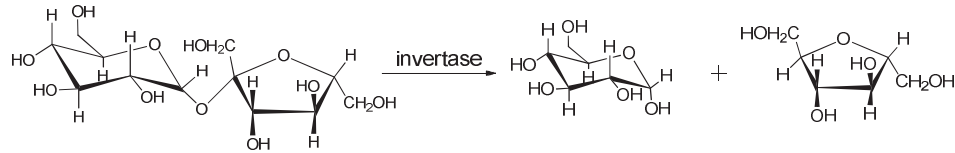
H^+ konsantrasyonu tepkime hızını çeşitli yollarla etkiler. İlk olarak, katalitik prosesler genellikle enzim ve substratın etkileşime girebilmesi için iyonlaşmış ya da iyonlaşmamış spesifik gruplara ihtiyaç duyar. Örneğin katalitik aktivite, enzimin amino grubu protonlanmış formuna ($-NH_3^+$) gereksinim duyabilir. Alkali pH'da bu grup protonlanmaz, sonuç olarak enzimin hızı düşer. İkinci olarak aşırı pH enzimin denatüre olmasına sebep olabilir. Çünkü katalitik olarak aktif protein molekülünün yapısı amino asit zincirinin iyonik karakterine bağlıdır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a ise optimum pH denir. Örneğin sindirim enzimlerinden biri olan pepsin enziminin optimum pH'ı 2'dir [17].

2.4. İnvvertazlar ve Biyokimyası

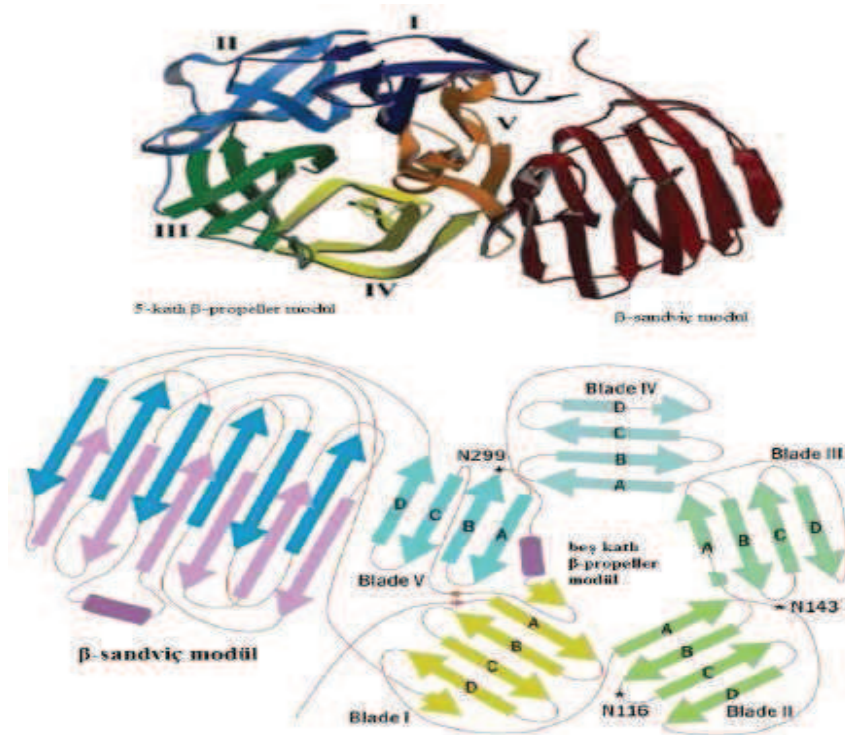
İnvvertazlar, glikozidazlar sınıfının bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdir. Glikozidazlar da glikozil bileşikleri üzerinde etkili olan oldukça geniş ve önemli bir enzim grubudur. Basit glikozidler ile kompleks oligo- ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağların hidroliz reaksiyonunu katalizlerler. Glikopiranozil grupları ile glikozidik bağların anomerik konfigürasyonlarına karşı oldukça seçici olan glikozidazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunurlar. Yaklaşık olarak 150 yıldan bu yana araştırmacılar glikozidazlarla ilgili farklı çalışmalar yapmışlardır. Uzun zamandan beri biyokimyanın en ilginç araştırma konularından birisi olmasına rağmen glikozidazların moleküler özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi edinilebilmiş ve sadece birkaçı kristalize

edilebilmiştir. Amilaz ve lizozim kristal formda elde edilen glikozidaz sınıfı ait enzimlerdendir [18].

İnvertaz (β -fruktofuranozidaz, E.C 3.2.1.26), (Sukraz), β -Dfruktofuranozidlerin indirgenmemiş β -fruktofuranozid ucundan katalizleyen hidrolazlar sınıfına ait bir glukoenzimdir. İnvertaz, hafif krem renkli, suda çözünebilen, karboksilik grupça zengin asidik bir enzimdir. Doğada bitkisel (örneğin üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun, soya fasulyesi, nohut vb.) ve mikrobiyal (örneğin; *Sacromises cerevisia*, *Aspergillus niger* vb.) kaynaklarda da bulunmaktadır [1, 2]. İnvertaz enziminin genel reaksiyonu Şekil 2.2’de üç boyutlu yapısı ise Şekil 2.3’de gösterilmiştir [19, 20].



Şekil 2.2. İnvertaz enziminin genel reaksiyon mekanizması



Şekil 2.3. İnvertaz enziminin üç boyutlu yapısı

Bitkiler çözünürlükleri, hücresel lokalizasyonları, optimum pH ve izoelektrik noktalarına göre; vakular (Inv-V) invertazlar, hücre duvarına bağlı (Inv- CW) invertazlar ve nötral (Inv-N) invertazlar olmak üzere üç çeşit invertaz izoenzimine sahiptirler.

Vakular ve hücre duvarına bağlı invertaz türleri benzer enzimatik ve biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Ayrıca yüksek derecede benzer dizi homolojileri ile birlikte iki tane korunmuş amino asit motifleri içerirler. Bu iki invertaz asidik optimum pH'a sahip olup β -fruktofuranozidaz aktivitesi gösterir. Çünkü sukrozun ve diğer β -fruktoz içeren oligosakkaritlerin fruktoz artıklarını hidrolizlerler. Sukroz için K_m değerleri düşük milimolar aralığındadır. Bunun yanında bu iki invertaz izoenzimi birer N-bağlı glikoproteindir. Molekül kütlelerinin 55 ve 70 kDa arası kısmını karbohidrat kalıntısı oluşturur. İvertazlarda bulunan sülfidril gruplarını bloke eden ajanlar (Hg^+ ve Ag^+) tarafından inhibe edilmektedir. Reaksiyon ürünleri tarafından da inhibe edilirler; glukoz yarışmasız inhibitör olarak görev alırken, fruktoz ise yarışmalı inhibitör olarak etki gösterir. İvertaz izoenzimleri küçük gen grupları (iki tane vakular invertaz gen ailesi ve altı tane hücre duvarına bağlı invertaz gen ailesi) tarafından kodlanmaktadır. Genomik organizasyon ve intronekzon yapısı monokot ve dikot invertaz genleri arasında korunmuştur. Tüm bitki, bakteri ve fungus invertaz genlerinde var olan çok önemli bir özellik; dokuz tane nükleotitten oluşan küçük bir ekzonun varlığıdır. Bu ekzon, N-DPN-G/A kutusu şeklinde üç tane amino asiti kodlamaktadır. WECP/V aminoasit motifinde ise vakular invertazlar valin artığına, hücre duvarına bağlı invertazlar ise valin yerine prolin artığına sahiptir. Bu tek aminoasitteki farklanma, hücre duvarına bağlı invertazların vakular invertazlara göre daha asidik bir pH'a ve farklı substrat spesifikliğine sahip olmasına neden olur.

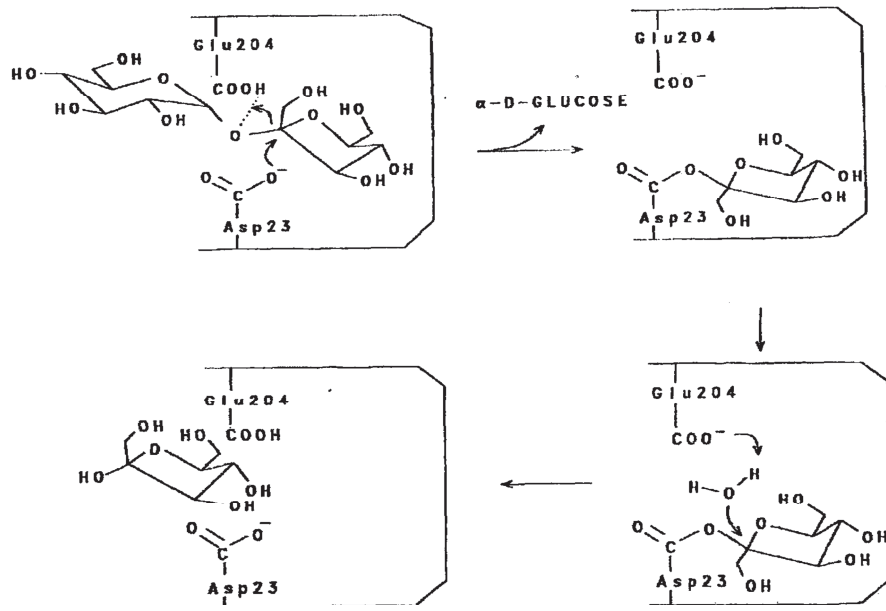
Vakular invertazlar, vakuolda lokalize olup pH 5,0-5,5 arası asidik optimum pH'a sahiptirler. Vakuolar invertazlar, çözünür asidik invertazlar olarak da adlandırılmaktadır. Vakulde depolanan sukrozun seviyesinden ve metabolik prosesler için sukrozun yeniden mobilizasyonundan sorumludurlar. Ayrıca meyve dokularında ve olgun yumrulara karbohidrat dengesinin regülasyonunda görevlidirler.

Hücre duvarına bağlı invertazlar ise ekstraselüler, apoplazmik veya periplazmik invertazlar olarak karakterize edilirler. Hücre duvarına bağlı invertazlar düşük optimum pH'a (pH 3,5-5,0) ve yüksek izoelektrik noktaya sahiptirler. Bu tip invertazlar hücre duvarına iyonik bir şekilde bağlanırlar. Sukrozun floemde hidrolizini katalizleyerek yıkım ürünlerinin hücre duvarında bulunan heksoz transporter proteinleri ile floemden stoplazmaya geçmesini sağlarlar.

Üçüncü tip invertazlar olan nötral invertazlar ise, alkali veya stoplazmik invertazlar olarak adlandırılabilirler. Alkali denmesinin sebebi optimum pH'larının pH 6,8-8,0 arasında olmasından, sitoplazmik denmesinin sebebi ise subselüler lokalizasyonun stoplazmada olmasından dolayıdır. Bu tip invertazlar düşük enzim aktivitesine sahip olup aktivitesini hızla kaybettiğinden fizyolojik fonksiyonu hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bugüne kadar ancak birkaç tane nötral invertaz klonlanıp karakterize edilmiştir. Asidik invertazlara karşı, nötral invertazlar glikozillenmemiştir ve yalnızca sukrozu hidrolizlemektedir. Bu sebeple, fruktofuranozidaz değildirler. Nötral invertazların aktivitesi yıkım ürünlerinden güçlü bir şekilde inhibe olmaktadır fakat ağır metal iyonlarından etkilenmemektedir. Nötral invertazlar sadece siyanobakteriler ve bitkilerde bulunmaktadır [18, 21].

2.4.1. İvertazların etki mekanizmaları

Asp-23, nükleofilik bir reaksiyonla sukrozun fruktoz kısmı ile kovalent bir ara ürün oluştururken sukrozun glukoz kısmı Glu-204'den bir proton alarak ayrılır. Daha sonra, su molekülünün nükleofilik reaksiyonuyla fruktoz invertaz enziminden ayrılır. İvertaz enzimi için olası bir reaksiyon mekanizması Şekil 2.4'de gösterilmiştir [22].



Şekil 2.4. İnvertzaz enzimini etki mekanizması

2.4.2. İnvertzazların izolasyonu ve saflaştırılması

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, biyokatalizörlerin diğer bir deyişle enzimlerin kullanım alanlarının artmasına neden olmuş ve yeni uygulama alanlarının da ortaya çıkması ile enzimlerin saf olarak elde edilmesi daha büyük önem kazanmıştır. Proteinlerin saf olarak eldesi kendisi için bir son nokta değildir, saflaştırılması istenen protein eldesi daha sonraki çalışmalar için gereklidir. Bu çalışmalar proteinin aktivitesi, yapısı ya da işlev ilişkileri üzerinde olabilmektedir. Bir saflaştırma tekniğinin hedefi proteini en düşük maliyet, yüksek derecede saflık ve verimle elde etmektir. Bunu başarabilmek için saflaştırma tekniğinin ve adımlarının seçimi akıllıca yapılmalı ve adım sayısını en aza indirecek şekilde sıralanmalıdır. Hedef proteinimiz için saflaştırma tekniğinin seçimi çalışmamızın amacı doğrultusunda değişmektedir. Seçilecek teknik için proteinlerin farklı yapısal özelliklerinden yararlanılmaktadır [23].

Literatürde verilen invertaz izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında bitkisel kaynaklara örnek olarak, portakal [24], şeker pancarı [25], üzüm [26], enginar [27], zambak [28], armut [29], soğan [30], papaya [31], domates [32], bambu [33], tütün [34], kavun [35], patates [36], soya fasulyesi [37] verilmektedir.

2.4.3. İnvvertazların uygulama alanları

İnvvertazlar sanayide ve genellikle gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnvvertaz enzimlerinin kullanımı ile invert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi, kondense sütlerin üretimi, sığır yemlerinin hazırlanması ve bebek gıda ürünlerinin üretimi gerçekleştirilmektedir. Endüstride invert şeker şuruplarının hazırlanmasında asit hidrolizi ya da enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. Asit hidrolizi kullanımında yüksek şiddette renkli ürünler, kül ve istenmeyen birçok yan ürün oluştuğu için endüstriyel alanda enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan fruktoz kolayca kristalize olmadığı ve daha tatlı olduğu için gıda endüstrisinde sakkaroz tercih edilmektedir. Bir diğer yandan invvertaz enzimi analitik amaçla sakkaroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır.

Sukroz polarize ışık düzlemini sağa (+66,5, dekstrorotatori), hidroliz sonucu meydana gelen şeker karışımı ise polarize ışık düzlemini sola (-33,3, levorotatori) çevirir. Bu nedenle, bu işlem *inversiyon*, hidroliz ürünü de *invert şeker* olarak adlandırılır. Sukrozun tatlılık derecesi 100 olarak kabul edildiğinde, invert şekeri oluşturan glukoz ve fruktozun tatlılık dereceleri sırasıyla 70 ve 180'dir. Bu nedenle invert şeker eşdeğer miktardaki sukrozdan daha fazla tatlılık sağlar ve şekerli ürünlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır. İnvvert şekerin diğer bir kullanım amacı da kristalizasyon kontrolüdür. Sukrozun hidrolizi sonucu oluşan invert şekerdeki glukoz ve fruktozun sudaki toplam çözünürlükleri sukrozun tek başına çözünürlüğünden daha fazladır. Kristalizasyonun azalmasında sukroz konsantrasyonunun azalması da etkilidir. Bu sebeple şekerli ürünlerde invert şeker içeriği çok önemlidir. Örneğin; lokumda invert şeker içeriğinin fazla olması lokum dilimlerinin birbirine yapışmasına ve depolama sorunlarına, yetersiz olması ise kristallenmeye ve pürüzlü yapıya neden olmaktadır. İnvversiyon çikolata kaplı sıvı veya krem dolgulu şekerlemelerin üretiminde de kullanılmaktadır. Kalıplama ve kaplama işlemleri dolgu kısım katı iken yapılır. Daha sonra dolguya verilen invvertaz enzimi sukrozu invert şekere dönüştürür ve çözünürlükteki değişimle dolguda yumuşama veya sıvılaşma görülür. Şeker endüstrisinde, kamış melasının etanole

fermantasyonu, sığır yemlerinin ve invert şeker şuruplarının hazırlanması, likör, yapay bal ve dondurulmuş tatlı ve benzeri üretimlerin yapılmasında kullanılan biyoteknolojik proseslerde invertaz enzimleri kullanılmaktadır. Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle invertazlar oldukça önemli ve değerli bir enzim grubudur [3].

BÖLÜM 3. ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMLERİ

Üçlü faz ayırma sistemleri (TPP), t-bütanol ve su karışımı içeren bir çözeltide proteinlerin tuzla çöktürülmesini içeren bir metottur [16]. TPP (Three-phase partitioning) genellikle proteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması prosesinde, ön akım ya da son akım işlemi olarak bazen de tek adımda saflaştırma amaçlı kullanılabilen uygulaması kolay bir tekniktir [2].

t-Bütanol su ile her oranda karışabilir fakat belirli miktarda amonyum sülfat katılmasıyla karışım, t-bütanolün üstte sulu fazın altta toplandığı iki faza ayrılır. Eğer başlangıç çözeltisinde protein bulunuyorsa bu iki fazın arasında proteinin yer aldığı üçüncü bir faz oluşabilir. Amonyum sülfat miktarı klasik salting out'da olduğu gibi çöktürülecek proteinin türüne ve miktarına göre belirlenir. Bunun yanı sıra klasik salting out'un aksine protein çökeleği büyük oranda dehidratize olur ve düşük tuz bileşeni içerir. Bu nedenle devam eden süreçte tuz giderme işlemlerine ihtiyaç duyulmaz [16].

TPP'de, ilk olarak protein içeren sulu çözeltiliye %20'lik bir oranda t-bütanol katılmalıdır. Bunun sonucunda proteinin çözücüsü su ve yardımcı çözücüsü t-bütanol ile dengeye geldiğine inanılmaktadır. Böylece protein karışımındaki çözücülerin bağıl dağılımlarına bağlı olarak kısmen hidratlanmakta ve kısmen de t-bütanollelenmektedir. Amonyum sülfatın ilavesi üzerine su molekülleri tuz iyonları tarafından çekilerek bu iyonların hidratlanmalarına neden olurlar. Tuz t-bütanole oranla daha yüksek su ilgisine sahiptir ve bu nedenle öncelikle su moleküllerini çeker. Protein yokluğunda bu durum çözeltinin iki faza ayrılmasına ve bir miktar suyun t-bütanol için ulaşamaz hale gelmesine neden olur. Eğer ortamda protein mevcutsa ortamdaki proteinin ulaşabileceği çözücü ve yardımcı çözücü arasında yeni

bir dengenin kurulmasını sağlar. Biraz daha amonyum sülfat ilavesinde mevcut proteini çözebilecek oranda serbest su molekül kalmaz ve proteinin bir kısmı çöker. Bu noktada proteinin büyük bir kısmı t-bütanolle çözülür. Bu durum proteinin yoğunluğunda bir azalmaya neden olur. Tuz ilave sürdürüldükçe çözeltinin yoğunluğu da artar ve proteinin yoğunluğu ile çözeltinin yoğunluğu arasındaki fark azalır. Öyle bir an gelir ki daha fazla protein çöktürmek mümkün olmaz. TPP yönteminde proteinin yoğunluğu, artan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonu ile azalır ve protein çöktürülmesinin kolaylaşır [16].

TPP bugüne kadar birçok proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Örneğin, watermelon dan α -galactosidase [38], *Bacillus notto*'dan nottokinaz [39], chick pea'den β -galactosidase [40], *Lactobacillus acidophilus*'dan β -galactosidase [41], fish viscera'dan alkalın proteaz [42], domatesten pektinaz [43], tatlı patatesten katalazın [44] saflaştırılmasında kullanılmıştır. Bu çalışmada TPP tek adımlı saflaştırma tekniği olarak kullanılmış ve ak duttan (*Morus alba*) ekstrakte edilen invertazın, amonyum sülfat konsantrasyonu, t-bütanol enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, gibi parametrelerin optimizasyonu ile maksimum verim hedeflenmiştir.

3.1. TPP'yi Etkileyen Parametreler

TPP'nin uygulanması esnasında bütün proteinlerin fazlar arasında toplanması beklenmez. Ayırmayı etkileyen ve farklılaştıran parametreler mevcuttur. Bu parametreler tuz konsantrasyonunun etkisi, pH etkisi, sıcaklığın etkisi, hidrofobisite etkisi gibi fiziksel koşullar olarak sıralanabilir.

Amonyum sülfat konsantrasyonu, ekstraktın bütanol fazına oranı, pH ve sıcaklık gibi faktörlerin değişik kombinasyonları denenerek selektif koşullar elde edilebilir. Fizikokimya esaslı TPP tekniğinin kompleks bir yapıda olduğu, iyonik kuvvet, kosmotropi, ara yüzey gerilimi, osmotik stres ve yığılma etkileşimleri gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği düşünülmektedir [45].

3.1.1. Tuz konsantrasyonunun etkisi

TPP kosolvent çöktürme, izoionik çöktürme ve salting out ilkesini içeren ve ham süspansiyonlarda da doğrudan kullanıldığından biyoayırma teknikleri arasında alternatif bir metottur. Nispeten basit ve ucuz bir teknik olduğu için TPP protein saflaştırmasında kullanılmaktadır [44]. Yüksek oranda tuz konsantrasyonuna sahip TPP sisteminde salting out etkisi büyük rol oynamaktadır. Proteinlere salting out etkisi ilk olarak sülfat konsantrasyonuna ikicisi olarak da proteinlerin net yüküne bağlıdır. Genellikle ilk olarak minimum %20 (w/v) tuz konsantrasyonu ile başlanır ve optimize edilir. Düşük konsantrasyonlardan başlanarak optimize edilmesi en kritik noktalardan birisidir [2, 46].

3.1.2. pH etkisi

pH TPP'nin çok önemli bir parametrelerinden biri olarak rapor edilmiştir. Proteinlerin yükü ve fazlar arası elektrostatik etkileşimden dolayı pH TPP sisteminde makromoleküllerin çökmesini ve dağılımını etkilemektedir [47]. Proteinler izoelektrik noktadaki pH değerinde net sıfır yüke sahiptir. İzoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde ise iyonik etkileşimler hidrofilik dağılımdan üstün gelecektir ve pozitif yüklü proteinler sulu alt faza doğru dağılacaktır [2]. Domatesten invertaz enziminin saflaştırılmasında sistemin pH'ı 4,5 [48], ekmek mayasından invertazın saflaştırıldığı bir başka çalışmada ise sistem pH'ı 6 [49] olarak rapor edilmiştir.

3.1.3. Sıcaklığın etkisi

TPP için en uygun sıcaklığın oda sıcaklığı olduğu belirtilmiştir. Fakat enzimden enzime göre farklılık göstermektedir. Çalışılan yüksek sıcaklıkların proteinin üç boyutlu yapısında oluşturduğu deformasyon ve denatürasyondan dolayı enzim aktivasyonu ve verimi olumsuz etkilenmektedir [2, 50].

3.1.4. Hidrofobisite etkisi

Saflaştırılacak enzim ekstraktı içerisinde yer alan protein yapılarının içerdiği hidrofobik ve hidrofilik yan gruplar TPP sisteminde ara yüzey fazında toplanabilmeleri üzerine etkisi, ortamın pH'ıyla ilişkilidir ve içerdikleri yan zincirlerin yükleri sistemin pH'ını da belirler. TPP de sulu alt fazın hidrofobisitesi ortama ilave edilen amonyum sülfat ile arttırılarak izoelektrik noktasına ulaştırılmış protein yapıları orta fazda toplanmaya zorlanır [2].

3.1.5. TPP'nin uygulama alanları

TPP, proteinlerin konsantre edilmesinde ve izolasyonunda kullanılır. Proteinlerin inaktif kompleks karışımlarından renatürasyonunda kullanılabilir. Metal ve organik bileşikleri içeren kompleks sistemlerin analizi ve ayırımı için umut verici bir sistemdir. Farmasotik endüstrisinde ve atık su arıtımında kullanılabilir. Proteinlerin/enzimlerin biyolojik ayırımında alt akım ve üst akım basamaklarının her biri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkisel materyallerden yağ ekstraksiyonu için uygun bir strateji olarak umut vermektedir. Ham süspansiyonların geniş hacimlerinden proteinlerin direkt olarak ayırımının iyi olduğu bir yoldur. Enzimatik reaksiyonlarının hızlarının hesaplanmasında kullanışlı bir yöntemdir. Protein gibi biyolojik moleküller genellikle çok seyreltik solüsyonlarda bulunmaktadır ve bu yüzden geri kazanımında genellikle ilk adım deriştirme işlemi olmaktadır. Özellikle rekombinant DNA uygulamalarının artması protein üretiminde geleneksel proseslere ve ürünlerin geri kazanımına yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. Geleneksel yöntemlerde saflaştırma işlemi santrifügasyon, filtrasyon ve deriştirme gibi birkaç adımdan oluşmaktadır. Çoğu zaman proses sayısının veya adımlarının artması hem zaman kaybına yol açmakta hem de ürün kaybını artırmaktadır. Sulu ikili faz sistemi, geleneksel yöntemlerdeki bu eksikliklerin üstesinden gelmektedir. Uygun bir optimizasyona sahip sulu ikili faz sistemi, berraklaştırma, deriştirme ve kısmi saflaştırma adımlarının entegre olduğu tek adımlı bir saflaştırma prosesi sağlayarak hem ürün verimini geliştirmekte hem de ürün geri kazanım maliyetini azaltmaktadır [2].

BÖLÜM 4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler, Na/K Tartarat Tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), t-Bütanol, Sodyum Klorür (NaCl), Sodyum Hidroksit (NaOH), Amonyum Sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), Sodyum Dihidro Fosfat, Metanol, Asetik Asit, Etanol, o- Fosforik Asit, SIAL markasından temin edilmiştir. 3,5-Dinitro Salisilik Asit, Bradford reaktifi, Coomassie-Brilliant Blue, Sukroz Sigma Chemical Co. (St. Louis, CA)'den temin edilmiştir.

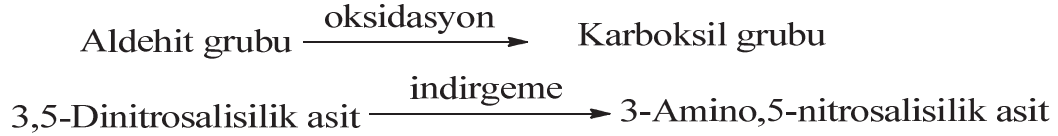
İnvertaz kaynağı olarak Sakarya'da yetiştirilmiş, ak dut (*Morus alba*) kullanılmıştır.

4.2. Metod

4.2.1. İvertazın aktivite tayini

İnvertaz enziminin aktivite tayininde esas, substrat olarak sukroz 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 asidin 3-amino,5-nitrosalisilik asit indirgenmesini içermektedir (Şekil 4.1). Reaksiyonda bir mol şeker bir mol 3,5-Dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girerek 3-

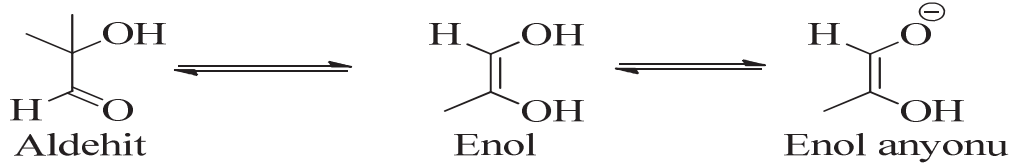
amino,5-nitrosalisilik asit oluşturmaktadır. Nitroaminosalisilik asit konsantrasyonu 546 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.



Şekil 4.1. DNS yönteminin prensibi

İnvertaz enzimi Şekil 2.2’de gösterilen reaksiyon ile sukrozun hidrolizini katalizler. Hidroliz reaksiyonu sonucunda oluşan glukoz ve fruktoz indirgen şekerler olduğu için bu monosakkarit karışımı “invert şeker” olarak adlandırılır ve açığa çıkan glukoz ile fruktoz indirgen şekerdirler ve bazik bir çözeltide aldehit ve keton oluştururlar.

Yapılarında anomerik karbon bulunan şekerler indirgen şekerlerdir. Bunlar kimyasal olarak düz zincirli olabilecekleri gibi halka yapısında da bulunabilmektedir ve bu iki yapı formu kendi aralarında dengededir. Hemi-asetal veya hemi-ketal grupları boşta olduklarında indirgen şekerler alkali koşullar altında ortamda bulunacak oksitleyici etkenler (Örneğin; Cu^{2+}) karşısında indirgeyici bir madde haline gelmektedir; şekerin karbonil grubunun oksijen molekülü ile yükseltgen arasında oluşan olan redoks tepkimesi yükseltgeni indirgemektedir. Bir şeker oksitlendiği zaman onun karbonil grupları (Örneğin; aldehit ve keton grupları) karboksil grubuna dönüşmektedir. Örneğin; glukoz kimyasal olarak sulu çözeltide glukopiranoz formu ile dengede olan aldehit formunda bir aldoheksozdur. Fizyolojik pH’da glukopiranoz yapısı üstün şekildir. Aldehit endiol dengesi, glukozun kolaylıkla indirgenmesini ve yükseltgenmesini sağlar. Yani glukozun formülü aldehit ya da kısa ömürlü reaktif tür olan enol şeklinde yazılabilir. Aşağıda Şekil 4.2’de belirtildiği gibi alkali çözeltilerde enol anyonuna dönüşüm tercih edilmektedir. Çifte bağın varlığı ve enol anyonundaki negatif yük, glukozu bakır (Cu^{2+}) ve demir (Fe^{3+}) gibi orta derecede oksitleyici etkenlerle oksitlenebilen aktif bir redükleyici madde (indirgen şeker) haline getirir. Sıcak alkali çözeltide glukoz, Cu^{2+} (küprik) iyonlarını hemen Cu^+ (küproz) iyonlarına indirger.



Şekil 4.2. Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu

4.2.1.1. DNS reaktifi hazırlanması

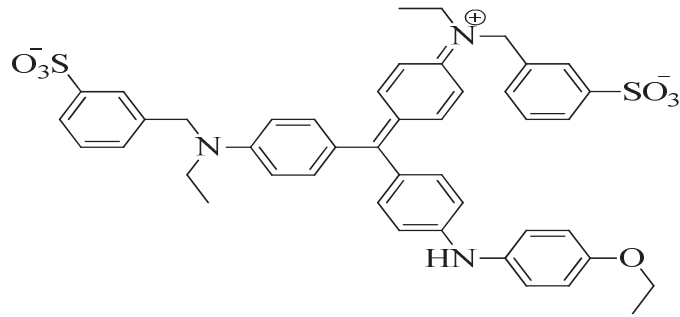
1 g DNS 20 mL 2 N NaOH çözeltisine eklenir, ısıtılarak çözülür ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır. Daha sonra üzerine 30 g Na/K tartarat ilave edilir ve karıştırılarak toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

İnvertazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,6 mL, 0,2 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0), 0,2 mL, 0,5 M sukroz (asetat tamponunda hazırlanmış) ve 0,2 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 37°C'de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamından alınan 1 mL örnek üzerine 1 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 10 mL bidestile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır ve açığa çıkan invert şeker miktarı 546 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,2 mL enzim çözeltisi yerine 0,2 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0) içerir. Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında 1–10 µmol glukoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır. Bir invertaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 µmol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (IU/mL) [36].

4.2.2. Protein tayini (Bradford metodu)

Bu yöntem Şekil 4.3'de gösterilen Coomassie brilliant 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 absorptans 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.



Şekil 4.3. Coomassie brilliant blue G-250

a) Bradford reaktifi:

40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 % 95’lik 50 mL etanolde çözülür. Üzerine 55 mL % 88’lik fosforik asit ilave edilerek son hacim distile su ile 1 L’ye tamamlanır ve filtre edilir.

b) Protein tayini:

Protein konsantrasyonu ölçülecek uygun oranlarda seyreltilmiş örnek ve standartların 100 µL’si küvetlere pipetlenir. Üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilir. 595 nm’de ölçüm alınır.

4.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini

SDS-PAGE, protein karışımlarının özelliklerinin analizlenmesi açısından önemli olan jel elektroforezinin en yaygın olarak kullanılan türüdür. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeniyle bağıl molekül kütlesi tayininde de kullanılır [3].

SDS-PAGE uygulanan protein örnekleri Thermo Electron markalı elektroforez ünitesi kullanılarak ve Laemmli [51] metoduna uygun olarak yürütüldü. Metod heterojen tampon sistemi temeline dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jele girmeden önce düzenleyici jelde, elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenerek yoğunlaştırılırlar. Proseste, 150 V potansiyel, %4 lük yükleme jeli ve %15 lik yürütme jeli kullanıldı. Solüsyonların ve jellerin hazırlanış protokolleri, Tablo 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 'de verildi [3].

Tablo 4.1. SDS-PAGE solüsyonlarının hazırlanma protokolleri

Çözeltiler	Eklenecekler	Miktar
%40 Akrilamid (37,5:1)	Akrilamid	116,8 g
	N,N'-Metilen bisakrilamid	3,2 g
	Deiyonize su	300 mL
%30 Amonyum persülfat	Amonyum persulfat	1,5 g
	Deiyonize su	5 mL
Yürütme jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 500 mL'ye tamamlanır)	Deiyonize su	300 mL
	Tris	90,75 g
	Konsantre HCl	8 mL
Yükleme jeli Tamponu (1,0 M Tris- HCl, pH 6,8, 500 mL'ye tamamlanır)	Deiyonize su	300 mL
	Tris	60,54 g
	HCl	36 mL
4x SDS-PAGE Sample Buffer	125 mM Tris-HCl, pH 6.8 1 M	5 mL
	%20 Gliserol	8 mL
	%4 SDS	8 mL
	10% β -Mercaptoethanol	4 mL
	0.5 mg/mL Bromfenol Mavisi	20 mg
	Deiyonize su	15 mL
Rezervuar tamponu 10xSDS-PAGE (1L'ye tamamlanır)	Tris	30,3 g
	Glisin	144 g
	SDS	10 g
Coomassie Boyama (stain) Solüsyonu	Etanol	150 mL
	Glasiyel asetik asit	50 mL
	Deiyonize su	300 mL
	Coomasie Brilliant Blue-R-250	1 g
Destain Solüsyonu	Etanol	1200 mL
	Glasiyel asetik asit	400 mL
	Deiyonize su	2,4 L

Tablo 4.2. Yürütme jeli yüzdelere göre ayırma boyutları aralıkları

Akrilamid Yürütme Jeli	Ayırma Boyutu (kDa)
%5	100–250
%7,5	40–200
%10	30–150
%12	20–120
%15	10–100
%18	6–50

Ak duttan (*Morus alba*) invertazın izolasyonunda SDS-PAGE' te kullanılan jellerin hazırlanışı;

Tablo 4.3. Yürütme jeli (%15) hazırlama protokolü

Eklenecekler	Miktar
Deiyonize su	2,2 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,6 mL
%40 Akrilamid	3,0 mL
%20 SDS	200 µL
%10 Amonyum persülfat	20 µL
TEMED	8 µL

Tablo 4.4. Yükleme jeli (%4) hazırlama protokolü

Eklenecekler	Miktar
Deiyonize su	3,9 mL
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	500 µL
%40 Akrilamid	500 µL
%20SDS	100 µL
%30 Amonyum persülfat	16 µL
TEMED	8 µL

4.2.3.1. Polimerizasyon protokolü

Poliakrilamid jeller akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerizasyonu sonucu hazırlanır. Poliakrilamid jeller için en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan N,N'-metilenbisakrilamid (Bis) dir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Aktif monomer, aktiflenmemiş monomer ile reaksiyon verir ve polimer zincirin uzaması başlar. Uzayan polimer zincir çapraz bağlı metilen bisakrilamid ile birlikte yapılır. Oksijen, serbest radikalleri uzaklaştırdığından ve polimerizasyonu engellediğinden tüm jel çözeltileri kullanılmadan önce vakumla oksijen uzaklaştırılmalıdır [18].

Kaliteli bir SDS-PAGE için şu faktörlere dikkat etmek gerekir: Oldukça yüksek saflıktaki reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları (yürütücü jel için %0,04 ve düzenleyici jel için %0,1), sıcaklık (polimerizasyon için genellikle 23 °C), çözeltilerin gazsızlaştırılması (oksijen polimerizasyonun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'ıdır [18].

4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması

Hücre örneklerinde; hücre ekstraktından 100 µL alınır, hücre ekstraktı 20 µL, örnek tamponu ile süspansiyon edilir. Hazırlanan tüpler kaynar su banyosunda 5 dk kaynatılır. 12,000 rpm'de 30 dk santrifüj edilir. Solüsyon örneklerinde; 5-10 µg protein içeren solüsyondan bir hacim alınır ve eşit hacimde örnek tamponu eklenir. Hazırlanan tüpler kaynar su banyosunda 5 dk kaynatılır. 2,000 rpm'de 30 dk santrifüj edilir. 50 µL örnek, 50 µL örnek tamponu ile karıştırılıp 100 °C'lik su banyosunda 5 dakika kaynatılır. Genel olarak yürütücü jelin her aralığına 20 µL örnek uygulanır. Boş aralıklar ise, elektroforez sırasında proteinlerin dağılmasını önlemek için 20 µL 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) ve ön işlem tamponu ile doldurulur. Anod ve katod rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülür. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 25 mA/jel ve yürütücü jelde 35 mA/jel akım

uygulanır. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jele ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verilir [19].

4.2.3.3. Protein bantlarının boyanması

Jellerin boyanmasında Coomassie-Brilliant Blue G-250 metodu kullanılmıştır. Bu boyama metodunda esas, boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomassie Brilliant Blue G-250 (%45 metanol / % 9 asetik asitte hazırlanmış %25'lik çözeltisi) çözeltisi ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalanır. Jelde oluşan mavi zemin, jelin %10 metanol ve %14 asetik asitten oluşan sulu çözeltisi ile gece boyunca yıkanarak boyadan temizlenir [52].

4.2.4. Üçlü Faz Sistemi (TPP) İle İnvvertazın Ak Duttan (*Morus alba*) İzolasyonu ve Saflaştırılması

Çalışmada Sakarya bölgesinde yetiştirilmiş ak dut (*Morus alba*), invertaz kaynağı olarak seçilmiştir. Kaynağın genel protein içeriğini invertaz oluşturmaktadır. Eldesi kolay ve maliyeti düşüktür.

İnvvertaz enziminin saflaştırılması oldukça zor ve masraflı bir işlemdir. Ayrıca, sonuçta elde edilen enzim genellikle yüksek aktiviteli fakat çok az miktardır. Bu nedenle, bu çalışmada daha sonraki amacımıza uygun bir enzim preparatı hazırlamak için invertaz enzimi basit ve geleneksel tekniklerle ak duttan izole edilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon ve santrifüjleme işlemleri yapılmıştır. Bu preparat üçlü faz saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Ak dut (*Morus alba*) önce musluk suyu daha sonra distile su ile yıkandı, taneleri kalacak şekilde ayıklandı ve 1 M NaCl içeren 0,2 M pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile blender yardımı ile homojenize edildi. Homojenat, kara üzümünden gelen liflerden uzaklaştırılmak amaçlı tülbent bezinden süzülerek filtre edildi. Elde edilen filtratın pH'ı 5,7-6,0 aralığına çekildi ve 4 °C'de 2 saat bekletildi. Ardından 4 °C'de 10000 rpm'de

10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet atılarak santrifüj at ayrıldı. Daha sonra santrifüjata %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak gece boyunca 4 °C'de bekletildi. 4 °C'de 10000 rpm'de 30 dk santrifüjlenen amonyum sülfatlı enzim çözeltisinden enzimatik aktivite içeren çökelek ayrıldı. Çökelek uygun miktarda 0,2 M pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile çözüldü, gece boyu tampona karşı 4 °C'de diyalizlendi. Diyaliz adımında tampon içeriği üç kez değiştirildi. Diyaliz sonrası diyalizat, sonraki aşamalarda kullanılmak üzere tüplere konuldu ve -20 °C'de depolandı.

Enzim preparatının protein miktarı, aktivite ve spesifik aktivite değerleri "Sonuçlar ve Değerlendirme" bölümünde verilmiştir.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. İvertaz Enziminin Ak Duttan (*Morus alba*) İzolasyonu

İvertaz (β -D-fruktofuranozidaz; EC 3.2.1.26) invert şeker üretmek için sukrozun dönüşümsüz hidrolizini katalizler. Reaksiyon karışımı 1:1 D-glukoz ve D-fruktozdan oluşur. Bitkilerde, sukrozun dönüşümünde rol aldığı için, invertazlar karbohidrat metabolizması için anahtar enzim olarak adlandırılırlar [53].

İvertazlar şekerleme sanayinde, kamış melasının etanole fermantasyonunda, sığır yemlerinin hazırlanmasında, transfruktolizilasyon reaksiyonlarında ve enzimatik oligosakkarit hidrolizlerinde kullanılmaktadır [54].

Bu çalışmada, invertaz enziminin yeni biyoayırma tekniklerinden biri olan üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması amaçlandı. Enzim kaynağı olarak bitkisel, eldesi kolay olan ak dut (*Morus alba*) tercih edildi.

İvertaz enzimi "Materyal ve Metod" bölümünde açıklandığı gibi geleneksel metodlar kullanılarak ak duttan izole edildi. Ardından üçlü faz sisteminde saflaştırılması amaçlandı. Ak duttan izole edilip %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hazırlanan invertaz enzim ekstraktının aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 9,92 U, 2,47 mg ve 4,01 U/mg olarak belirlendi. Hazırlanan bu enzim preparatı ile invertaz enzimi TPP sisteminde dağılımı izlendi, enzim saflaştırılması amaçlandı.

5.2. TPP ile Ak Dut İvertazının Saflaştırılması

Ak duttan izole edilen invertaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde organik çözügen olarak t-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

İvertaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak TPP sisteminin optimizasyonu ve enzimi iyi bir verim ile yüksek oranda saflaştırmak için sistemi etkileyen tuz konsantrasyonu, enzim:t-bütanol oranı, pH gibi parametreler incelenmiştir. Bunun için uygun konsantrasyonda enzim, t-bütanol ve amonyum sülfat içeren ayırma sistemleri “Materyal ve Metot” bölümünde açıklandığı gibi hazırlandı. Optimizasyon denemeleri sonucunda ak dut invertazı %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:2 enzim:t-bütanol oranı (v/v) ve pH 5’de %206,56 verimle ve 5,74 kat saflaştırıldı.

Tablo 5.1. Ak dut invertazının TPP ile saflaştırma sonuçları (%50 amonyum sülfat, 1:2 enzim:t-bütanol, pH 5)

Enzim Çözeltisi	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katı (fold)	Aktivite Verimi (%)
Ham Enzim Ekstraktı %85 A.S. Çöktürmesi	9,92	2,47	4,01	1	100
TPP-orta faz	20,5	0,88	23,05	5,74	206,56

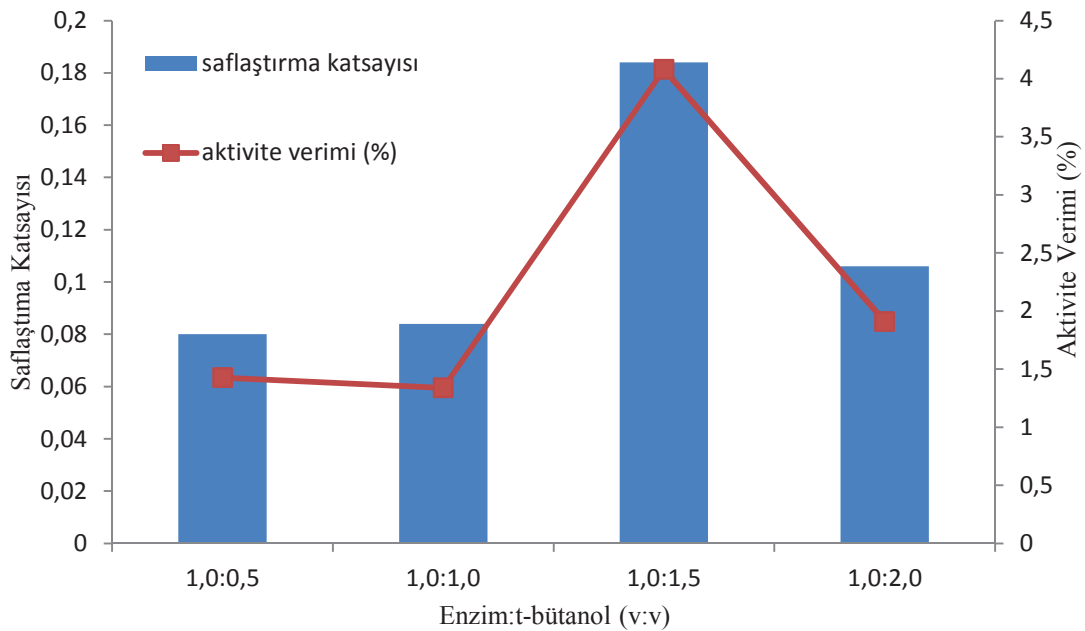
Tüm optimizasyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. TPP sistemleri konformasyonel sıkıştırmayı ve protein hidrasyonundaki değişimleri de içeren çoklu etkinin bir arada olduğu koşullarda gerçekleşmektedir. Sıcaklık bu değişimlere etki eden en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle genellikle saflaştırma sistemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir [2].

Literatürde TPP sistemleri kullanılarak *Calotropis procera* latex proteazı %132 verimle 6,92 kat [55], *Aspergillus niger* inulinazı %88 verimle 10,2 kat [56], *A. sojae* ekzo-poligalakturonazı %25,5 verimle 6,7 kat [57], havuç fosfolipazı %72 verimle 13 kat [50], *A. oryzae* α -galaktozidazı ve invertazı sırasıyla %50 verimle 15 kat ve %54 verimle 12 kat [58] saflaştırıldığı rapor edilmiştir.

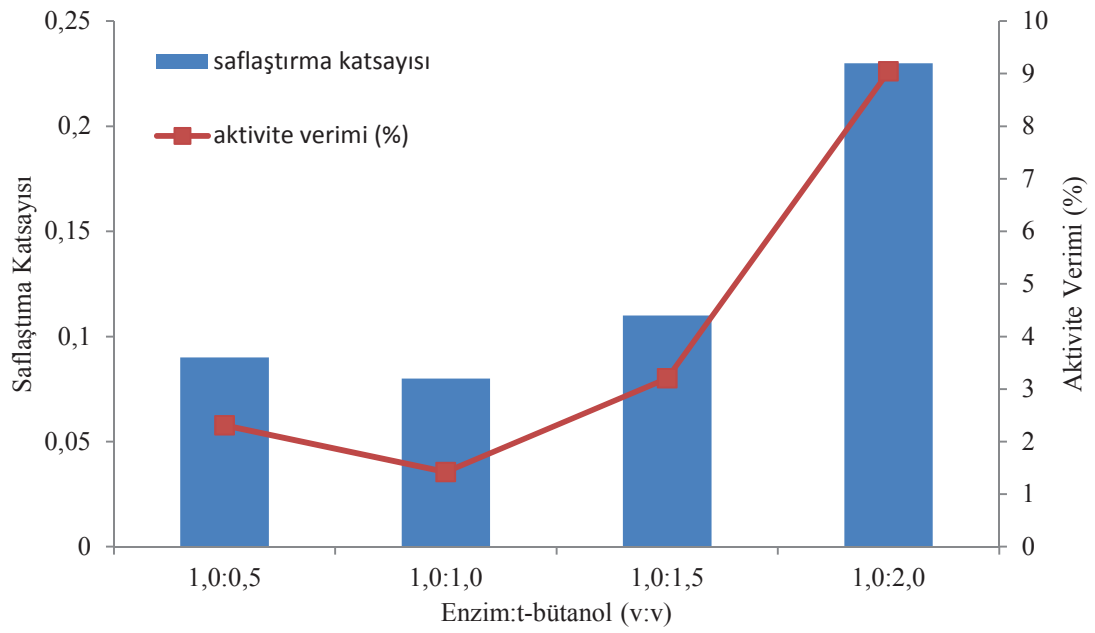
5.3. Ak Duttan İvertazın Saflaştırılmasında, TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

İvertaz enziminin TPP ile saflaştırılmasında optimizasyonu sağlamak ve uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu en uygun enzim:t-bütanol oranını belirlemek için farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50 ve %60) ve farklı enzim:t-bütanol oranları (1:0,5, 1:1, 1:1,5 ve 1:2) kullanılarak üçlü faz sistemleri hazırlanmıştır. Bunun için 2 mL enzim (9,92 U/mg) %20-60 amonyum sülfat (w/v) doyumluğuna getirildi ve farklı miktarda enzim:t-bütanol (v/v) (1:0,5, 1:1, 1:1,5 ve 1:2) eklenerek oda sıcaklığında faz ayrımı gerçekleştirildi. Bu sistemlerden ak dut invertazı için elde edilen sonuçlar Şekil 5.1-5' de gösterilmiştir.

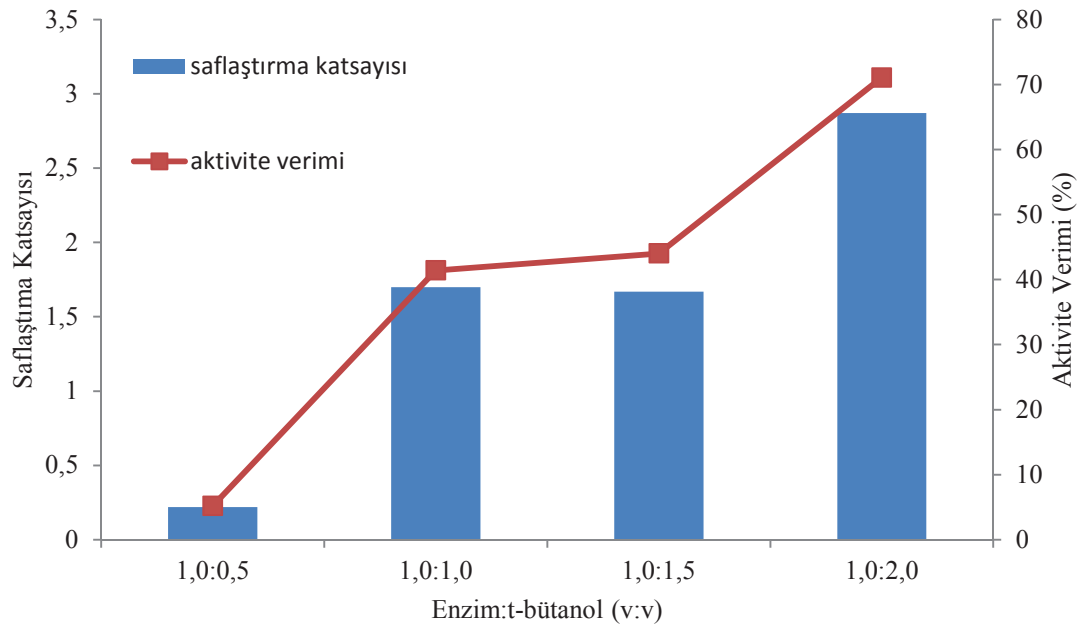
TPP sistemlerinde sulu fazdan enzim ve proteinleri çöktürmek için t-bütanol ve amonyum sülfat kullanılır. Enzim:t-bütanol oranı saflaştırma işleminde son derece önemlidir. Eğer bütanol miktarı düşük ise bütanol tuz ile yeterince etkileşime girememekte, yüksek ise protein denatürasyonuna yol açmaktadır [2, 59].



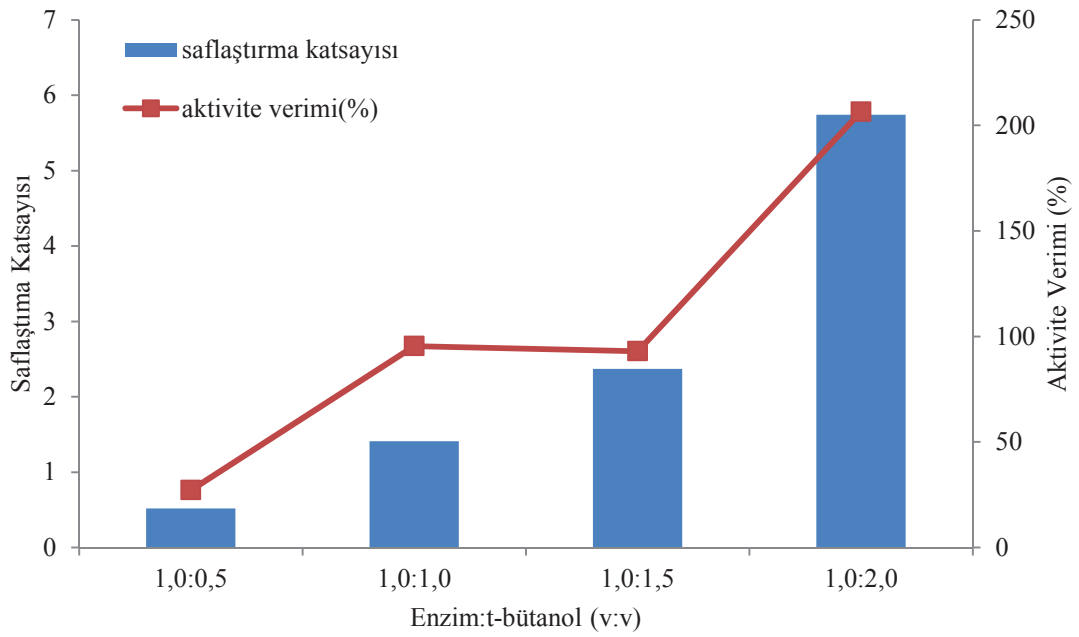
Şekil 5.1. %20 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



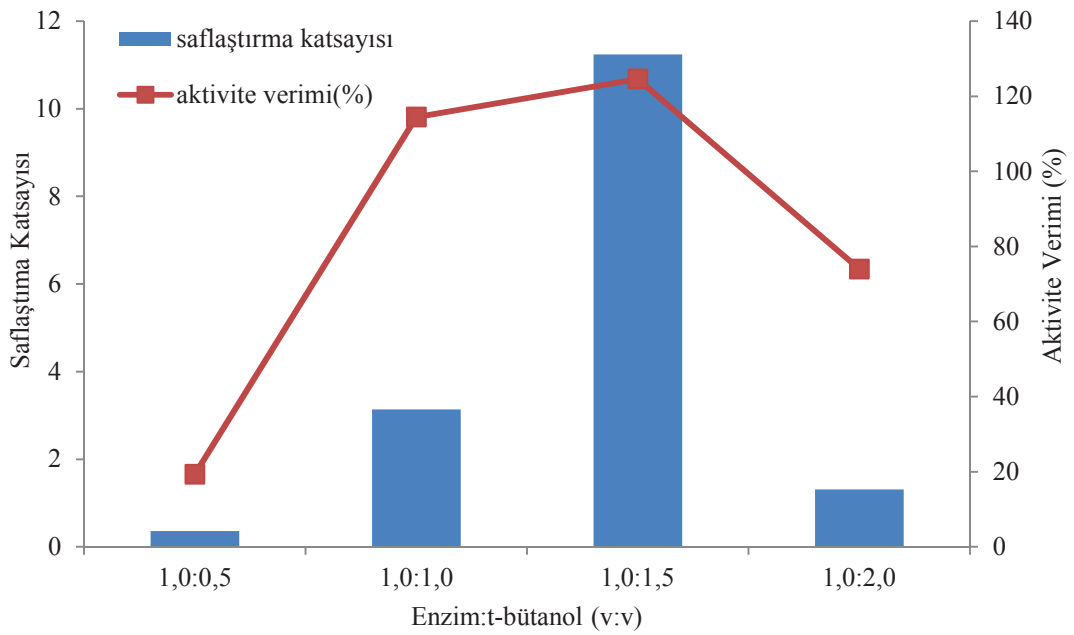
Şekil 5.2. %30 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.3. %40 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.4. %50 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.5. %60 Amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranının ak dut invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi

Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de görüldüğü gibi *Morus alba* invertazı için hazırlanan üçlü faz ayırma sistemlerinde amonyum sülfat konsantrasyonu %20 ve %30 iken enzim

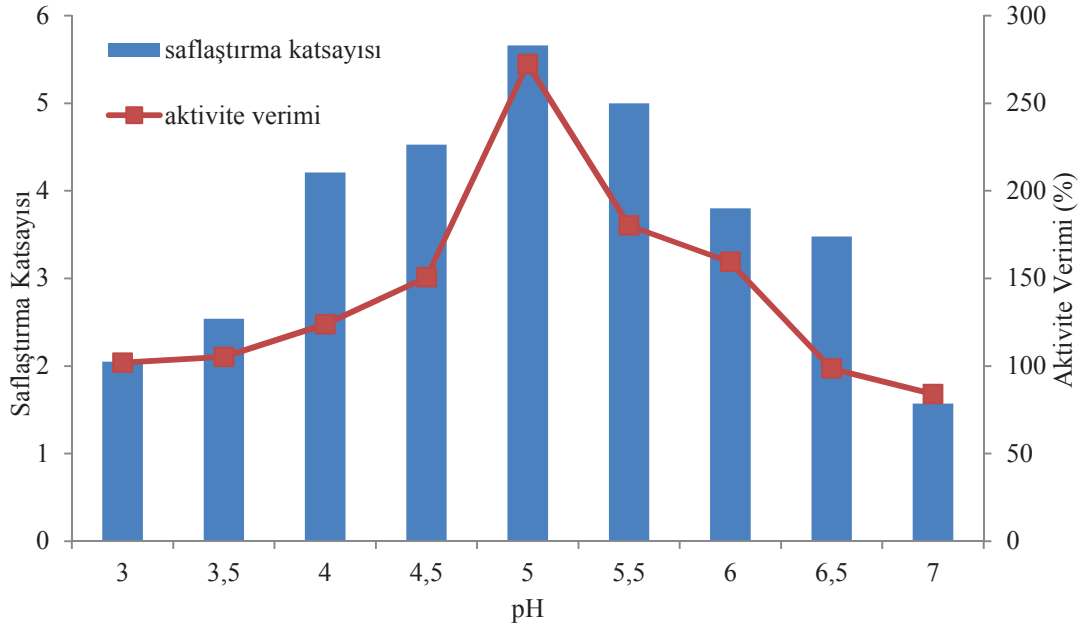
aktivite verimi ve saflaştırma katsayısı düşüktür. Şekil 5.3’de ise %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ile birlikte enzim saflaştırma katsayısında ve aktivite veriminde artış gözlenmeye başlandı. %50 doyumlukta ve 1:2 enzim:t-bütanol oranı ile hazırlanan sistemde ise Şekil 5.4’de görüldüğü gibi enzim %206,56 maksimum verimle, 5,74 kat saflaştırıldı. Şekil 5.5’de ise %60’lık doyumlukta sistemde enzim enzim dışındaki diğer safsızlık proteinleri de üst faza çektiğinden aktivite verimi ve saflaştırma kat sayısı düşmüştür. Ayrıca, enzimler yüksek tuz konsantrasyonunun “salting-out” etkisi ile denatüre olduklarından aktiviteleri ve geri kazanımları düşmektedir.

5.4. Ak Duttan İvertazın Saflaştırılmasında TPP Sisteminde pH’ının Etkisi

Üçlü faz ayırma sistemlerinde önemli bir parametre sistemin pH’ı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH’ı ayrımı gerçekleştirecek preparat içerisindeki biyomoleküllerin dağılımını önemli ve etkin bir biçimde değiştirmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminantların yüzey karakteristiğine pH etki eder ve fazlar arasında dağılımın farklılaşmasına sebep olur [60]. Bu nedenle, sistem pH’ının optimize edilmesi gerekir. Protein ayırma çalışmalarında, eğer hedef proteinin izoelektrik noktası biliniyorsa öncelikle proteinin izoelektrik nokta değerinden 2-4 pH birimi altındaki pH’larda sistem hazırlanır. Birbirinden farklı izoelektrik noktalarına sahip proteinleri içeren bir ekstrakt durumunda genellikle pH 3-7 aralığında sistemler hazırlanır. İzoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde proteinler pozitif yüklüdür ve TPP sistemleri ile çöktürülürler. Fakat izoelektrik nokta değerinin üzerindeki pH’larda protein negatif yüklüdür ve çökmez. Bu nedenle TPP sistemlerinin davranışları çoğu kez protein izoelektrik noktası civarında keskin bir değişim gösterir. Yani proteinin sülfat anyonlarına bağlanmasına ya da onları itmesine neden olur. Bunun sebebi sülfat anyonunun katyonik proteinlere bağlandığında reaksiyondaki elektrostatik komponentlerin varlığıdır [61].

2 mL enzim %50 amonyum sülfat (w/v) doyumluğuna getirildi. Ardından sistemin pH’ı 3-7 arasına ayarlanarak enzim:t-bütanol oranı 1:2 olarak ayarlandı ve oda

sıcaklığında faz ayrımı gerçekleştirildi. TPP sistemlerinde invertaz enziminin ayırımında sistem pH'ının aktivite verimi ve saflaştırma katına etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 5.6'da verildi.



Şekil 5.6. Ak dut invertazının TPP sisteminde ayırımına pH'ın etkisi

5.5. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ile TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini

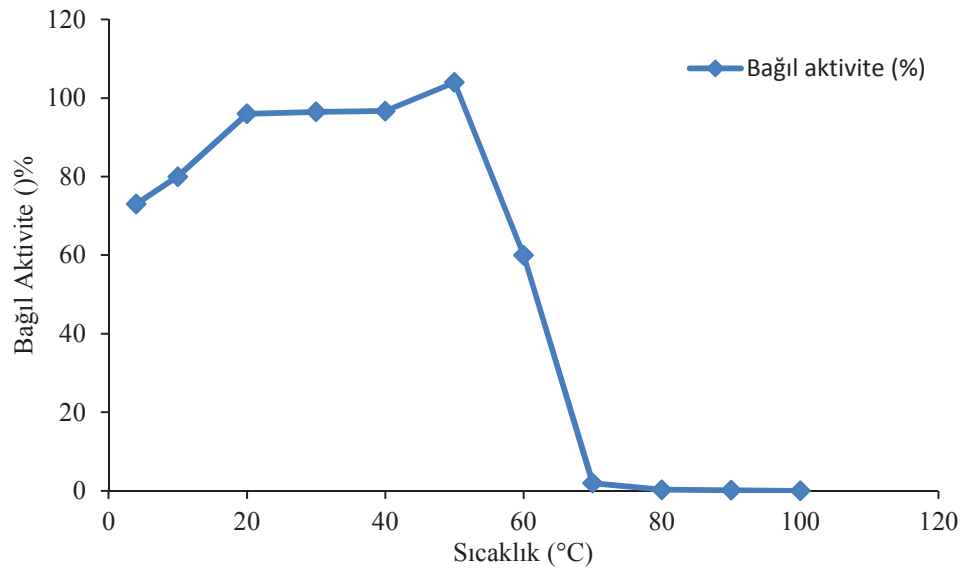
TPP ile saflaştırılan invertaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek için SDS-PAGE analizi "Materyal ve Metod" kısmında belirtildiği gibi %15' lik jel ile yapıldı. İvertaz enzimi santrifüjate kıyasla, 1:2 (enzim:t-bütanol) oranı ve %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ile optimize edilen sistemde 5,74 kat saflaştırıldı.

İvertazların moleküler kütleleri ve yapıları kaynaktan kaynağa ve kullanılan yöntemle bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin; maya invertazının molekül kütlesi kütle spektrometresi ile 60,64 kDa olarak [62], mango invertazının molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 68 kDa, SDS-PAGE ile 65,5 kDa olarak bulunmuştur [63]. Şeker kamışı invertazının molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 28 kDa olduğu belirtilmiştir [64].

SDS-PAGE yöntemiyle saflaştırılan invertaz enziminin molekül ağırlığı tayini molekül kütlesi 18,5 kDa olarak hesaplandı.

5.6. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Termal Kararlılığı

Enzimler genellikle düşük sıcaklıklarda daha kararlı iken yüksek sıcaklıklarda hızla termal denatürasyona uğramaktadırlar [19]. Ak dut invertazının termal kararlılığı için aktivite tayini “Materyal ve Metod” kısmında açıklandığı gibi belirlendi. Bunun için enzim önce farklı sıcaklıklarda (4-100 °C) inkübe edildikten sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen grafik Şekil 5.8’de verilmiştir.



Şekil 5.7. İvertazın termal kararlılığı (Substrat: Sukroz; İnkübasyon süresi: 30 dakika)

5.7. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Depo Kararlılığı

Enzimin kararlılığı, belirli çalışma şartlarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak stabil kalmasıdır. Bu süreçte enzim aktivite kaybı çeşitli nedenlere dayanır. Bunlar mikrobiyal yıkım ve termik, pH veya kimyasal inaktivasyon olarak sıralanabilir. Depo kararlılığı enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Enzimin saklanma koşullarına bağlı bir parametredir [2]. TPP sistemi ile

saflaştırılan ak dut invertazının depo kararlılığı iyi olup enzim 120 gün sonunda, +4 °C’ de depolanan invertaz, başlangıç aktivitesinin %80’ini korumaktadır.

5.8. Öneriler

Günümüzde geliştirilmiş birçok saflaştırma tekniği bulunmaktadır, fakat TPP yöntemi basit oluşu, uygulanabilirliğinin kolaylığı, maliyetinin düşük olması ve büyük ölçekli çalışmaya yatkınlığı ile kromatografik çalışmalar içeren çok adımlı yöntemlere kıyasla endüstriyel uygulamalara daha uygundur.

İçecek endüstrisinde invertaz enziminin geniş bir uygulama alanı vardır. İvertaz enzimi, üzüm orjinli içeceklerin ana proteinini oluşturur. Şampanya, şarap gibi içeceklerdeki invertaz enzimi, sukrozun fruktoz ve glukozu hidrolizini katalizleyerek, içeceklerin stabilitelerinin, berraklık ve aroma kalitelerinin azalmasına neden olur. Şarap ve şampanya gibi üzüm kaynaklı içeceklerdeki invertazın ortamdaki uzaklaştırılması ve istenilen konsantrasyonlarda tutulabilmesi, bu amaca uygun üretilmiş biyosensörleri gerektirmektedir.

Bu çalışmada ak duttan (*Morus alba*) pH 5’de %206,56 verimde 5,74 kat saflaştırma katsayısıyla yüksek oranda saflaştırıldı. Ayrıca farklı bitki kaynakları ile daha önemli sonuçlar ve daha yüksek verimli sonuçlar gerçekleştirmeye yönelik araştırmalarımız sürecektir.

KAYNAKLAR

- [1] HEPOKUR, C., İnvertzın Değişik Desteklere İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2007.
- [2] KAT, B., İnvertz Enziminin Üçlü Faz Sistemi İle Saflaştırılması ve Demir-Tanin Kompoziti Üzerine İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Entitüsü, Sakarya, 2013.
- [3] TELEFONCU, A., Enzimolojiye Genel Bakış: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, E.Ü. Yayınları, İzmir, 1986.
- [4] DÜZCAN, B., Karahindiba (*Taraxacum officinale*) Bitkisinden Süperoksit Dismutaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2010.
- [5] PAMUK, F., Biyokimya, Gazi Kitapevi, Ankara, 2010.
- [6] NELSON, L.D., COX, M.M., Lehninger Biyokimya İlkeleri, Palme Yayınları, İstanbul, 2005.
- [7] BERG, M.J., TYMOCZKO, L.J., STRYER, L., Biochemistry, W.H. Freeman and Company, Newyork, 2002.
- [8] ILLANES, A., Enzyme Biocatalysis Principles and Applications, Springer, 2008.
- [9] ÖZATA, A., KUTLU, M., Enzimoloji Ders Notları, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Eskişehir, 2000.
- [10] GÜNGÖR, K., Çaęla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2008.
- [11] KOOLMAN, J., ROEHM, H.K., Color Atlas of Biochemistry, Thieme, Stuttgart, 2005.
- [12] KEHA, E., KÜFREVİOğLU, Ö.İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, Ankara, 2011.
- [13] GILBERT, F.H., Basic concepts in bichemistry, a student's survival guide, McGraw Hill, USA, 2000.

- [14] GÖZÜKARA, M.E., Biyokimya 2, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1997.
- [15] NALBANTOĞLU, S., Azol Türevi Moleküllerin Proteaz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2013.
- [16] DENNISON, C., Protein Saflaştırma Rehberi, Aktif Yayınları, Ankara, 2007.
- [17] HARVEY, R., FERRIER, D., Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2011.
- [18] YÜCEKAN, İ., İnvertaz Enziminin Afiniteye Dayalı Teknikler ile Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2008.
- [19] KARKAŞ, T., İnvertaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması için Sulu İkili-Faz Afinite Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009.
- [20] LAMMENS, W., LE ROY, K., VAN LAERE, A., RABIJNS, A., VAN DEN ENDE, W., Crystal Structure of *Arabidopsis thaliana* Cell-Wall Invertase Mutants in Complex with Sucrose, Journal of Molecular Biology, 377, 378-385, 2008.
- [21] ROITSCH, T., GONZÁLEZ, M.C., Function and Regulation of Plant Invertases: Sweet Sensations, Trends Plant Science, 12, 606-613, 2004.
- [22] DOĞAN, Ş., İmmobilize İnvertaz Kullanarak İnvert Şeker Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 2000.
- [23] ŞAHİN, A., Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulaması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2008.
- [24] SCHAFFER, A.A., Invertases in Young and Mature Leaves of *Citrus sinensis*, Phytochemistry, 25, 2275-2277, 1986.
- [25] LEIGH, R.A., REES, T., FULLER, W.A., BANFIELD, J., The Location of Acid Invertase Activity and Sucrose in the Vacuoles of Storage Roots of Beetroot (*Beta vulgaris*), Journal of Biochemistry, 178, 539-547, 1979.
- [26] DREIER, L.P., HUNTER, J.J., RUFFNER, H.P., Invertase Activity, Grape Berry Development and Cell Compartmentation, Plant Physiology and Biochemistry, 36, 865-872, 1998.

- [27] GOUPIL, P., CROISILLE, Y., CROISILLE, F., LEDOIGT, G., Jerusalem Artichoke Invertases: Immunocharacterization of a Soluble form and Its Putative Precursor, *Plant Science*, 54, 45-54, 1988.
- [28] SINGH, M.B., KNOX, R.B., Invertases of Liliun Pollen, *Plant Physiology*, 74, 510-515, 1984.
- [29] HASHIZUME, H., TANASE, K., SHIRATAKE, K., MORI, H., YAMAKI, S., Purification and Characterization of Two Soluble Acid Invertase Isozymes from Japanes Pear Fruit, *Phytochemistry*, 63, 129-129, 2003.
- [30] BENKEBLIA, N., ONODERA, S., YOSHIIHARA, T., KOSAKA, S., SHIOMI, N., Effect of Temperature on Soluble Invertase Activity and Glucose, Fructose and Sucrose Status of Onion Bulbs (*Allium cepa*) in Store, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55, 325-331, 2004.
- [31] LOPEZ, M.E., VATTUONE, M.A., SAMPIETRO, A.R., Partial Purification and Properties of Invertase from *Carica papaya* Fruits, *Phytochemistry*, 27, 3077-3081, 1988.
- [32] NAKAGAWA, H., KAWASAKI, Y., OGURA, N., TAKEHANA, H., Purification and Some Properties of Two Types of Beta-Fructofuranosidase from Tomato Fruit, *Agricultural Biology and Chemistry*, 36, 18-26, 1971.
- [33] LIU, C.C., HUANG, L.C., CHANG, C.T., SUNG, H.Y., Purification and Characterization of Soluble Invertases from Suspension-Cultured Bamboo (*Bambusa edulis*) Cells, *Food Chemistry*, 96, 621-631, 2006.
- [34] ROJO, H.P., QUIROGA, E.N., VATTUONE, M.A., SAMPIETRO, A.R., Nicotiana Glauca Invertase: Characterization and Effects of Endogenous Alkaloids, *Phytochemistry*, 49, 965-969, 1998.
- [35] LINGLE, S.E., DUNLAP, J.R., Sucrose Metabolism in Netted Muskmelon Fruit During Development, *Plant Physiology*, 84, 386-389, 1987.
- [36] ISLA, M.I., VATTUONE, M.A., ORDÓÑEZ, R.M., SAMPIETRO, A.R., Invertase Activity Associated with the Walls of *Solanum tuberosum* Tubers, *Phytochemistry*, 50, 525-534, 1999.
- [37] MORELL, M., COPELAND, L., Enzymes of Sucrose Breakdown in Soybean Nodules, *Plant Physiology*, 74, 1030-1034, 1984.
- [38] BAYRAKTAR, H., ÖNAL, S., Concentration and Purification of A-Galactosidase from Watermelon (*Citrillus vulgaris*) by Three Phase Partitioning, Separation and Purification Technology, 118, 835-841, 2013.

- [39] GARG, R., THORAT, B.N., Nattokinase Purification by Three Phase Partitioning and Impact of T-Butanol on Freeze Drying, Separation and Purification Technology, 131, 19-26, 2014.
- [40] DUMAN, A.Y., KAYA, E., Purification, Recovery, and Characterization of Chick Pea (*Cicer arietinum*) B-Galactosidase in Single Step by Three Phase Partitioning as a Rapid and Easy Technique, Protein Expression and Purification, 91, 155-160, 2013.
- [41] CHOONIA, S.H., LELE, S.S., Three Phase Partitioning of B-Galactosidase Produced by an Indigenous *Lactobacillus acidophilus* Isolate, Separation and Purification Technology, 110, 44-50, 2013.
- [42] KETNAWA, S., BENJAKUL, S., ALVAREZ, M.O., RAWDKUEN, S., Three-Phase Partitioning and Proteins Hydrolysis Patterns of Alkaline Proteases Derived from Fish Viscera, Separation and Purification Technology, 132, 174-181, 2014.
- [43] SHARMA A., GUPTA M.N., Purification of Pectinases by Three-Phase Partitioning, Biotechnol. Lett., 23, 1625–1627, 2001.
- [44] DUMAN, A.Y., KAYA, E., 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, 2013.
- [45] BAYRAKTAR, H., A-Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, 2011.
- [46] ŞEN, A., ERYILMAZ, M., BAYRAKTAR, H., ÖNAL, S., Purification of A-Galactosidase from Pepino (*Solanum muricatum*) by Three-Phase Partitioning, Separation and Purification Technology, 83, 130-136, 2011.
- [47] GAGAOUA, M., BOUCHERBA, N., DARENFED, B.A., ZIANE, F., RABAH, N.S., HAFID, K., BOUDECHICHAR.H., Three-Phase Partitioning as an Efficient Method for the Purification and Recovery of Ficin from Mediterranean Fig (*Ficus carica l.*) Latex, Separation and Purification Technology, 132, 461-467, 2014.
- [48] ÖZER, B., AKARDERE, E., ÇELEM, B.E., ÖNAL, S. Three-Phase Partitioning as a Rapid and Efficient Method for Purification of Invertase from Tomato, Biochemical Engineering Journal, 50, 110-115, 2010.
- [49] AKARDERE, E., ÖZER, B., BIÇAK ÇELEM, E., ÖNAL, S., Three-Phase Partitioning of Invertase from Baker's Yeast, Separation and Purification Technology, 72, 335-339, 2010.

- [50] SHARMA, A., GUPTA, M.N., Purification of Phospholipase D Form *Dacus carota* by TPP, Protein Expression and Purification, 21, 310-316, 2001.
- [51] LAEMMLI, U.K., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage, 227, 680-685, 1970.
- [52] BIORAD, BioRad Readygel, Application Guide, 161, 9-46.
- [53] HOSSAIN M., PERVIN, F., ABSAR, N., Purification, Characterization and N-Terminal Sequence Analysis of Betel Leaf (*Piper betle*) Invertase, Journal of the Chinese Chemical Society, 58, 389-397, 2011.
- [54] SALDAMLI, İ., Gıda Kimyası, Hacettepe Yayınevi, Ankara, 2005.
- [55] RAWDKUENA, S., CHAIWUTB, P., PINTATHONGB, P., BENJAKULC, S., Three-Phase Partitioning of Protease from *Calotropis procera* latex, Biochemical Engineering Journal, 50, 145-149, 2010.
- [56] KUMAR, V.V., PREMKUMAR, P.M., SATHYASELVABALA, K.V., DINESHKIRUPHA, S., NANDAGOPAL, J., SIVANESAN, A., *Aspergillus niger* Exo-Inulinase Purification by Three Phase Partitioning, Eng. Life Sci., 6, 607-614, 2011.
- [57] DOGAN, N., TARI, C., Characterization of Three-Phase Partitioned Exo-Polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with Unique Properties, Biochemical Engineering Journal, 39, 43-50, 2008.
- [58] DHANANJAY, K.S., MULIMANI, H.V., Purification of A-Galactosidase and Invertase by Three-Phase Partitioning from Crude Extract of *Aspergillus oryzae*, Biotechnol Lett., 30, 1565-1569, 2008.
- [59] DENNISON C., LOURIEN R., Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins, Protein Expression Purification, 11, 149-161, 1997.
- [60] GAUTAM, S., SIMON, L., Partitioning of B-Glucosidase from *Trichoderma Reesei* in Poly (Ethylene Glycol) and Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase Systems: Influence of pH and Temperature, Biochemical Engineering Journal, 30, 104-108, 2006.
- [61] DENNISON, C., LOVRIEN, R., TPP: Concentration and Purification of Proteins, 11, 149-161, 1997.
- [62] REDDY, V.A., MALEY, F., Identification of an Active-Site Residue in Yeast Invertase by Affinity Labeling and Site-Directed Mutagenesis, The Journal of Biological Chemistry, 265, 10817-10820, 1990.

- [63] RAHMAN, M.H., AKAND, A., YAESMİN, T., UDİN, M.S., RAHMAN, M., Purification and Properties of Invertase from Mango Fruit, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 1271-1274, 2001.
- [64] MASUDA, H., SUGAWARA, S., Purification and Some Properties of Cell Wall-Bound Invertases from Sugar Beet Seedlings and Aged Slices of Mature Roots, *Plant Physiology*, 66, 93-96, 1980.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Malatya'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Tarsus'ta tamamladı. 2007 eğitim öğretim yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne kayıt yaptırdı. 2010-2011 öğretim yılını Erasmus Programı çerçevesinde İspanya'da okudu. 2010 Haziran-Ağustos aylarında 30 günlük zorunlu stajını ÇİMSA Çimento A.Ş. de yaptı. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü bitirdi. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Biyokimya alanında yüksek lisans öğrenimine başladı.