



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihan Kübra BELLİGÜN

Stevia rebaudiana ve *Momordica charantia*'DAN
İNVERTAZ ENZİMİNİN TPP YÖNTEMİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2015

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Stevia rebaudiana* ve *Momordica charantia*'DAN
İNVERTAZ ENZİMİNİN TPP YÖNTEMİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI**

Nihan Kübra BELLİGÜN

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
EYLÜL-2015**

TEZ ONAYI

Stevia rebaudiana ve *Momordica charantia*'DAN İNVERTAZ ENZİMİNİN TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Nihan Kübra BELLİGÜN tarafından Öğr. Gör. Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Öğr. Gör. Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR
Kimya Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN
Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. A. Ali GÜRTEN
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Bu Çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: OKÜBAP-2014-PT3-024

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

İmza

Nihan Kübra BELLİGÜN

ÖZET

Stevia rebaudiana ve *Momordica charantia*'DAN İNVERTAZ ENZİMİNİN TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Nihan Kübra BELLİGÜN

Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Öğr. Gör. Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR

Eylül 2015, 56 sayfa

Bu çalışmada daha önce TPP yöntemi ile herhangi bir enzimin saflaştırılmasında kullanılmayan fitoterapik bir bitki olan *Momordica charantia*'dan özellikle gıda sanayinde oldukça yaygın kullanım alanı olan invertaz enziminin TPP yöntemi ile tek basamakta saflaştırılması için yöntem geliştirilmesi ve saf enzimin karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. TPP yöntemi ile invertazın bu kaynaktan saflaştırılması için gerekli optimum şartlar belirlenmiş, sonuç olarak, %70 amonyum sülfat doygunluğu, 1:0,5 t-bütanol oranı, ve 30 dakikalık inkübasyon süresi kullanılarak %20,28 verimle 10,48 kat kısmi saflaştırılmıştır. TPP sonrası toplam protein kaba homojenatta 34,86 mg'dan 0,675 mg'a azalmış, kaba homojenatta 21,672 U/mg protein olan spesifik aktivite değeri, TPP sonrasında 227,022 U/mg protein olarak artmıştır. Sonuç olarak optimize edilen TPP yöntemiyle, literatürde bulunan birçok saflaştırma basamağına göre iyi bir saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: TPP yöntemi, invertaz enzimi, *Momordica charantia*, *Stevia rebaudiana*, enzim saflaştırma

ABSTRACT

PURIFICATION OF INVERTASE ENZYME FROM *Stevia rebaudiana* and *Momordica charantia* BY TPP METHOD

Nihan Kübra BELLİGÜN
M.Sc., Department of Chemistry
Supervisor: Lecturer Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR

September 2015, 56 pages

This study was aimed to purify a widespread used enzyme particularly in the food industry invertase from an unused phytotherapy plant *Momordica charantia* via developing a single step TPP method and to identify the characterization of the pure enzyme. Optimum conditions for TPP method was determined for the purification of Invertase, as a result, 70% ammonium sulfate saturation, 1: 0.5 t-butanol ratio, and a 30 minute incubation time lead to 20.28% efficiency and 10.48 fold partially purification. After TPP, total protein was decreased from 34.86 mg to 0.675 mg in the homogenate, and the specific activity value was increased from 21.672 U/ mg protein to 227.022 U/ mg protein. In conclusion, the optimized single step TPP method revealed a better purification comparing to several purification methods in the literature.

Key Words: TPP method, invertase enzyme, *Momordica charantia*, *Stevia rebudiana*, purification of enzyme

Biricik aileme ve emeği geçen herkese...

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bana sevgi ve anlayıőla yaklaşan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili danışman hocam Öğr. Gör. Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR'e, yardımlarıyla çalıőmalarımı kolaylaőtıran değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a, teknik desteklerinden dolayı değerli hocam Arő. Gör. Murat FARSAK'a ve bana destek olan, emeği geçen tüm arkadaşlarıma ve hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca sabırla, sevgiyle ve anlayıőla yanımda olan, bana maddi manevi destek olan biricik annem ve babam Elmas BELLİĞÜN'e ve Mehmet Nihat BELLİĞÜN'e; sevgili kardeşlerim Hakan BELLİĞÜN, Tuba BELLİĞÜN ve Fatma BELLİĞÜN'e de sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler.....	1
1.2.İnvertazlar ve Kullanım Alanları.....	2
1.3.Enzim Saflaştırmada Temel Analizler.....	3
1.4.Yapılacak Analizler.....	4
1.5.Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	4
1.6.Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri.....	5
1.7.Amonyum Sülfat İle Çöktürme.....	5
1.8.Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması.....	6
1.9.Protein Ayrılması.....	7
1.10.Protein Tayinleri.....	8
1.11.Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar.....	8
1.12.Büyüklik Farkına Dayanan Ayırmalar.....	9
1.12.1.Diyaliz.....	9
1.12.2.Ultrasantrifüj.....	9
1.12.3.Kromatografi.....	10
1.12.3.1.İyon Değişim Kromatografisi.....	10
1.12.3.2.Moleküler Eleme Kromatografisi.....	11
1.13.TPP: Three Phase Partitioning (Üç Fazlı Bölümleme).....	12
1.13.1.Hofmeister Serisi.....	14
1.13.2.TPP'nin Avantajları.....	15
1.14. <i>Momordica charantia</i>	16
1.15. <i>Stevia rebaudiana</i>	19
1.16.Çalışmanın Amacı.....	20

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	21
3.MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1.Materyal	27
3.2.Yöntem.....	27
3.2.1.Kaba Ekstraktın Hazırlanması ve TPP Yöntemi	27
3.2.2.Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Optimizasyonu	28
3.2.3.Tersiyer bütanol Miktarının Optimizasyonu	29
3.2.4.İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	30
3.2.5.İnvertaz Aktivite Tayini	31
3.2.6.Lowry Protein Tayini	32
3.2.7. <i>Momordica charantia</i> Meyvesinden Saflaştırılan İvertaz Enziminin Karakterizasyonu.....	33
3.2.7.1.Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	33
3.2.7.2.Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	33
3.2.7.3.Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi	34
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. <i>Stevia rebaudiana</i> yapraklarında İvertaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	35
4.2. <i>Momordica charantia</i> Çekirdekleri ve Meyvesinde İvertaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	35
4.3.TPP Yönteminin Optimizasyonu.....	36
4.3.1.Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Optimizasyonu	36
4.3.2.Tersiyer bütanol Miktarının Optimizasyonu	37
4.3.3.İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	38
4.4.Lowry Protein Tayini	39
4.5.İvertaz Enziminin Optimum Koşullarda TPP Yöntemi İle Saflaştırma Değerleri.....	40
4.6.Saflaştırılan İvertazın SDS-PAGE Elektroforez İle Saflık Kontrolü.....	42
4.7.TPP Yöntemi İle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Optimum Parametreleri	43
4.7.1. <i>Momordica charantia</i> İvertazının Optimum pH'sı	43
4.7.2. <i>Momordica charantia</i> İvertazının Optimum Tampon Derişimi	44
4.7.3. <i>Momordica charantia</i> İvertazının Optimum Sıcaklığı	45
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İvertaz enziminin optimum koşullarda TPP yöntemi ile saflaştırma değerleri.....	42
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnvvertaz enziminin genel tepkime mekanizması.....	3
Şekil 1.2. TPP için genel metod.....	13
Şekil 1.3. <i>Momordica charantia</i>	16
Şekil 1.4. <i>Stevia rebaudiana</i>	19
Şekil 3.1. Dondurulmuş <i>Momordica charantia</i> Meyvesi.....	27
Şekil 3.2. %40; %50; %60 ve %70 amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiş örnekler.....	28
Şekil 3.3. t-bütanol eklenmiş örnek.....	29
Şekil 3.4. Santrifüjlenmiş örnekler.....	30
Şekil 3.5. Diyaliz kesesi içerisine alınmiş örnek.....	31
Şekil 3.6. Diyaliz kesesi içerisindeki örneğin uygun tampon içerisine alınması.....	31
Şekil 4.1. Amonyum sülfat doygunluğuna göre invvertaz aktivitesinin değişimi.....	37
Şekil 4.2. t-bütanol oranına göre invvertaz aktivitesindeki değişim.....	38
Şekil 4.3. İnkübasyon süresine bağlı olarak invvertaz aktivitesindeki değişim.....	39
Şekil 4.4. Lowry 1951 yöntemi ile BSA standart protein grafiği.....	40
Şekil 4.5. a) Kaba homojenat, amonyum sülfat presipitatu ve TPP ile kısmen saflaştırılmış enzimin %15'lik elektroforez jeline yüklenmiş ve 45mA, 200 V da yürütölüyorken görüntüsü. b) Elektroforez sonrası jelin gümüş boyama ile boyanmasıyla protein bantlarının elde edilmiş hali. (I: Protein marker, II: Kaba homojenat, III: TPP sonrası).....	42
Şekil 4.6. <i>Momordica charantia</i> invvertazının farklı pH'larda gösterdiği aktiviteler..	44
Şekil 4.7. <i>Momordica charantia</i> invvertazının farklı tampon derişimlerinde gösterdiği aktiviteler.....	45
Şekil 4.8. <i>Momordica charantia</i> invvertazının farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktiviteler.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Absorbans	
C	Konsantrasyon	
dk	dakika	
g	gram	
L	litre	
M	Molarite	
MA	Moleküler ağırlık	
mg	miligram	
mL	mililitre	
mM	milimolar	
nm	nanometre	
pH	Power of Hydrogen	
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	
TPP	Three Phase Partitioning	
t-bütanol	tersiyer bütanol	
U	Ünite	
ϵ	Molar ekstinksiyon katsayısı	($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
μmol	mikromol	
μL	mikrolitre	

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Biyolojik katalizörler olan enzimler; tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürür ve substratın ürünler tarafında ilerlemesini sağlarlar. Biyokimya tarihi genel olarak enzim araştırmaları ile ilgilidir. Enzim kelimesi, *mayada bulunan* anlamına gelmektedir. İlk olarak biyolojik kataliz, 1700 yılında keşfedilmiş ve mide salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılmış çalışmalarda tanımlanmıştır. Daha sonra, 1800'lerde çeşitli bitki özütleri ve tükürkle nişastanın şekere dönüşümü çalışmaları ile devam etmiştir. Louis Pasteur 1850'lerde, maya ile şekerin alkole fermentlenmesinin katalizinin fermentler tarafından gerçekleştiği sonucuna varmıştır. Pasteur, bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılmadığını savunmuştur. Eduard Buchner ise 1897'de şekerin alkole fermentesinin maya özütleriyle sağlandığını; bu durumun da fermentasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevini sürdüren moleküller tarafından gerçekleştirildiğini keşfetmiştir. Bu molekülleri Frederic W. Kühne *enzim* olarak adlandırmıştır. Farklı enzimlerin özelliklerinin ve izolasyonunun araştırılması, biyokimya biliminin gelişimini sağlamıştır (Nelson ve Cox, 2000).

Enzimlerin biyoteknolojide ve teknik kimyada türlü amaçlarla kullanılmaya başlanmış olması, bilim insanlarını, bu enzimlerin daha kullanışlı ve daha ekonomik duruma getirilme imkanlarının araştırılmasına yönlendirmiştir.

Mikrobiyal kaynaklar sayesinde, enzim üretiminde hammadde sorunu, ileri derecede çözölmüş haldedir. Bunun yanında, mikrobiyal kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve izolasyonu oldukça masraflıdır. Böylesi bir durumda, bu enzimlerin potansiyellerinden mümkün olduğunca faydalanmak gerekmektedir. Bilindiği üzere enzimler, suda çözünebilen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamalar, genellikle sulu çözelti ortamında gerçekleştirildiği için, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivite kaybetmeden geri kazanımı imkansızdır. Tepkime ortamından serbest enzim, istenilen zamanda uzaklaştırılmaz ve tepkimenin kontrol edilmesi zor olur. Tepkimenin istenilen zamanda durdurulabilmesi için, inhibitör

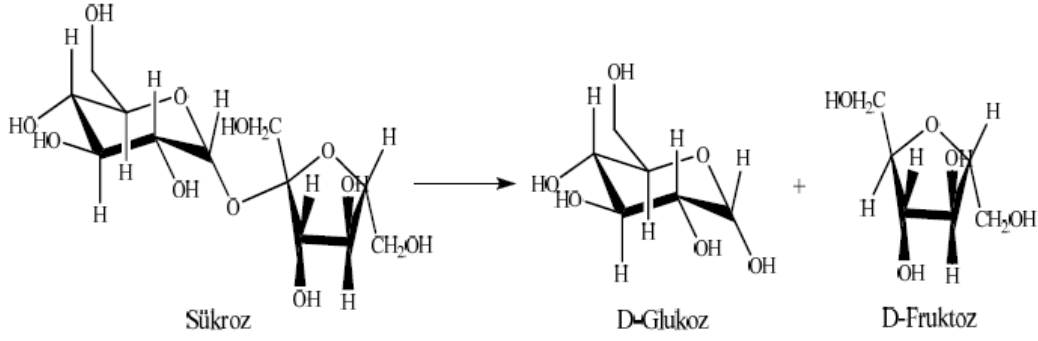
eklenmesi düşünülebilir, fakat tepkime ortamına böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olur. Ürünün ya da ürünlerin kirlilik unsurlarından arındırılması, maliyeti bir hayli yükseltmektedir. Katalizör görevindeki serbest enzimi, aktivitesini yitirmeden tepkime ortamından uzaklaştırmak mümkün olmadığından enzimin tekrar kullanılabilmesi de imkan dışıdır. Bu durum, enzimlerin çok spesifik ve bir o kadar da pahalı katalizörler olmaları sebebiyle maliyeti yükselten önemli etmenlerdendir.

Suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kimyasal veya fiziksel olarak bağlanan enzimler, enzim molekülünün, monomer olarak suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde veya suda çözünmeyen bir matriksde tutularak immobilize edilebilirler (Klibanov, 1983).

1.2. İnvvertazlar ve Kullanım Alanları

İnvvertazlar; (β -fruktofuranozidaz, Sükraz, E.C 3.2.1.26) β -D-fruktofuranozidlerin terminal indirgen olmayan β -fruktofuranozid artıklarının hidrolizini katalizleyen, hidrolaz sınıfı enzimlerdendir (Kat ve Keskin, 2013). İnvvertazlar; kozmetik, içecek, kağıt ve ilaç endüstrilerinde ve genellikle gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan enzimlerdir (Kotwal ve Shankar, 2009; Bhatti ve ark., 2006; David ve ark., 2006). Çikolata üretimi, invert şeker şuruplarının eldesi, şekerlemelerde kullanımı, bebek gıda ürünlerinde tercih edilmesi, sığır yemlerinin hazırlanması ve kondense sütlerin üretiminde kullanımı buna örnek gösterilebilir. Gıda sanayinde, invert şeker şurupları hazırlanması amacıyla, ya enzimatik olarak sükrozun invertaz ile hidrolizi ya da asit hidrolizi gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel alanda enzimatik hidroliz tercih edilmesinin sebebi; asit hidrolizinin ve külün, oldukça yüksek şiddette renkli ürünler ve istenmeyen pek çok yan ürün oluşturması dolayısıyladır. Hidroliz sonucu oluşan fruktoz, daha tatlı olduğu ve kolay kristalize olmadığı için gıda sanayinde sükroza tercih edilmektedir. Ayrıca, invertaz enzimi, sükroz konsantrasyonu tayininde, analitik alanda, biyosensörlerde kullanılmaktadır (Telefoncu, 1986). İnvvertaz enzimi, kristal şekeri (sükroz veya sakkarozu) glikoz ve fruktoz sıvı şekerlerine çevirir ve E1103 kodu ile tanımlanmış bir gıda katkı maddesidir.

Şekil 1’de invertaz enziminin tepkime mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 1.1. İnvvertaz enziminin genel tepkime mekanizması (Kat ve Keskin, 2013)

İnvvertaz enzimi, enzim kinetiği prensiplerinin çıkarılmasında model enzim olarak kullanılmıştır ve kimliği ilk belirlenen proteinler arasında bulunmaktadır (Karkaş, 2009).

İnvvertaz; bitkilerde, belirli hayvan dokularında, ve mikroorganizmalarda bulunan bir enzimdir. İnvvertaz enzimi günümüze kadar farklı kaynaklardan, çeşitli geleneksel saflaştırma prosesleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Fakat bu proseslerin çoğu, çöktürme, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, ultrafiltrasyon gibi çok adımlı aşamaları içermektedir. Bu aşamadaki basamak sayılarının artması da ürün verimini olumsuz yönde etkilemektedir. Daha da önemlisi bu basamakların çoğu uygulaması zor ve maliyetlidir. (Wiseman, 1995).

1.3. Enzim Saflaştırmada Temel Analizler

Biyolojik katalizör olmaları sebebi ile enzimler, yaşamı mümkün hale getiren biyomoleküllerdir. Enzimlerin etkinliklerini, varlıklarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını, lokalizasyonlarını, vb. belirlemekte en etkili yol, enzimlerin aktivitelerini ölçmektir. Enzimler için belli bir aktivite belirleme yöntemi yoktur. Bunun nedeni bir yöntemin uygunluğunun değişik etkenlere bağlı olmasıdır. Bu etkenlerin başında enzimin katalizlediği tepkime tipi, saflığı, lokalize olduğu yer ve fizikokimyasal özellikleri gelmektedir. Enzimin katalizlediği tepkimede kullanılan substratın kullanım hızı tayin edilerek, enzim aktivitesi ölçülür. Enzimler için farklı

tain yöntemleri bulunmaktadır. Seçilecek tain yöntemi, kullanılacak kimyasallar ve cihazların uygun oluşuna bağı olarak değişir (Ersöz, 2010).

1.4. Yapılacak Analizler

Her saflaştırma basamağının ardından, , enzimin saflık derecesi, saflaştırma verimi ve ilgilenilen proteinle ilgili analizlerin bilinmesi gerekir. Bu durumda, her aşama için proteinlerin aktivitelerini ölçmek gerekmektedir. Enzimler için ideal bir aktivite belirleme yöntemi yoktur. İdeal protein analiz yöntemi ise mümkün mertebe basit, özgün ve hızlı olmalıdır. Hızla yapılan analizler, enzimin aktivite kaybetme olasılığını, saflaştırma basamakları arasındaki bekleme sürelerini kısaltarak minimuma indirecektir. Her saflaştırma basamağının verimi, ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesi, protein miktar tainleri ile ilgili bilgiler ve sonuçlar bir araya getirilir ve böylece, gerekli bilgi bütünlüğü sağlanır (Ersöz, 2010).

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{ilgilenilen protein (mg ya da Ünite)}}{\text{total protein (mg)}} \quad (1.1)$$

$$\text{Saflaştırma derecesi} = \frac{\text{ikinci basamağın spesifik aktivitesi}}{\text{birinci basamağın spesifik aktivitesi}} \quad (1.2)$$

1.5. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Absorbansın (A) zamana bağı değişimi (dA/dt), molar ekstinksiyon katsayısına (ε) bölünerek, absorbans değişimi izlenen maddenin, derişimdeki değişim hızı saptanmış olur. Molar ekstinksiyon katsayısının değeri, absorbansı veren maddenin değişimini ve absorbansı arasındaki sabit oranı ifade eder (Telefoncu, 1996).

$$\varepsilon = \frac{A}{C} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1} \quad (1.3)$$

ile formülize edilir.

A= absorbans, C= maddenin derişimini ifade eder (cm² mol⁻¹)

$$\text{Enzim ünitesi} = \frac{V_f \times \text{seyreltme faktörü}}{\epsilon \times V_s \times d} \quad (1.4)$$

d= ışık yolu

dA/dt= dakikada gözlenen absorbans farkı

Vf= toplam hacim (mL)

Vs= eklenen enzim hacmi (mL)

1.6. Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri

Protein miktarının bilinmesi, her saflaştırma basamağında gereklidir. Eğer istenmeyen proteinlerin uzaklaştırıldığı biliniyor, her saflaştırma basamağında protein derişimini bilmek büyük önem arz ediyorsa, her bir fraksiyonun ve sonra oluşacak son ürünün spesifik aktivitesinin bilinmesi gereklidir ve saflaştırmanın hangi ölçüde yapıldığı görülecekse, protein miktarının belirlenmesi gerekmektedir.

Protein tayininde aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır:

1. Lowry-Folin-Ciocalteu yöntemi,
2. Biuret-alkalen-bakır yöntemi,
3. Boya bağlama yöntemi,
4. 280 nm'de UV absorpsiyon (aromatik bağlar) veya 205-220 nm (peptid bağları) yöntemi (Ersöz, 2010).

1.7. Amonyum Sülfat İle Çöktürme

Hidrofobik ve hidrofilik grupların protein molekülünün yüzeyindeki dağılımı, onun çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğünü belirler. Genellikle sulu çözücüler kullanılmaktadır. pH, karışabilir organik çözücülerin inert polimerlerin ilavesi, iyon şiddeti veya bu derişimlerin sıcaklık farklılıkları ile birlikte gerçekleştirilmesiyle proteinlerin çözünürlüğü etkilenir ve protein çöktürülür. Böylece protein saflaştırılması ve izolasyonu mümkün olur. pH'nın nötral olmasıyla, fizyolojik iyon

şiddeti genel olarak 0.15-2 M aralığındadır. Bir çok enzim hücre sıvılarında çözünür proteinler olarak bulunur. Çözünen ile çözücü arasındaki polar etkileşimler, belirli bir dereceye varmış aynı yüklü moleküller, mevcut tuzlarla iyonik etkileşimler veya küçük agregatlar arası elektrostatik itme kuvvetleri sonucunda gerçekleşir. Proteinler, ileri derece yüzey hidrofobluğuna sahipken, iyon şiddetinin fizyolojik değerden sıfıra doğru düşürülmesiyle, itme kuvvetlerinin yetersizliğinden dolayı çökerler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürme enzim saflaştırmak için sık kullanılan yöntemlerden biridir. Tuz iyonları, hidrofob gruplar etrafındaki su moleküllerini solvatasyona büyük ilgileri sebebiyle uzaklaştırırlar. Bu sayede, bu grupların birbiriyle etkileşiminin artmasıyla, agregatlaşma gerçekleşir. Tuz çöktürmesinde çoğunlukla ΔH pozitifdir. Bu sebeple, daha iyi çöktürme için yüksek sıcaklık gerekir. Çökeltmenin sınırlı bir tuz konsantrasyonu bölgesinde sağlanması yöntemin başarısıdır. Çöktürmede kullanılan tuzların etkinliği, anyonun yüküyle ilgilidir. En sık kullanılan tuzlar sülfat, fosfat ve sitrattır. Katyonun cinsi daha az etkili olsa da kullanılması tercih edilen katyonlar bir değerlikli katyonlardır. Etkinlik sırası $NH_4^+ > K^+ > Na^+$ 'dir. Amonyum sülfat, en sık kullanılan tuzdur. Doygunluk derişimi 4 M'dır, doymun çözeltisinin yoğunluğu ($1,235 \text{ g/cm}^3$) aynı çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan ($1,29 \text{ g/cm}^3$) küçük olduğundan santrifüjle ayırmaya olanak verir ve çözünürlüğü $0-30^\circ\text{C}$ aralığında fazla değişmez. Proteinleri stabilize etmesi, amonyum sülfat ile fraksiyonlamanın avantajıdır. Amonyum sülfat içeriği 2-3 M bir protein çözeltisi veya kristalleri yıllarca dayanabilir. Yüksek tuz konsantrasyonları, proteolizi ve bakteriyel kontaminasyonu da engeller. Bu sebeple ticari depolama maddesi olarak kullanılabilir (Ersöz, 2010).

1.8. Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması

Buldukları canlı kaynaklardan, biyomoleküllerin izole edilerek saflaştırılması, oldukça emek isteyen ve güç bir iştir. Bunun neden, saflaştırılmak istenen maddenin yanında, farklı ya da benzer özellikleri olan yüzlerce farklı bileşik bulunmasıdır. Konsantrasyonları ve mol kütleleri farklılıklar gösteren bu bileşiklerin, içinden birini ayırmak, bir çok özel ve duyarlı metodun birlikte kullanılmasını gerektirir. Biyokimyasal ayırmalar için karşılaşılan en önemli zorluklardan biri de, pek çok biyomolekülün dayanıksız olması; saflaştırma ve ayırma sırasında yapısının

değişmesidir. Nükleik asitlerin çok ince ve uzun moleküller olması sebebiyle, pipetleme, karıştırma, gibi işlemler sırasında kolayca kırılabilmesi buna örnektir. Sıcaklık, pH'nın fizyolojik değerler dışında olması ve birçok kimyasal madde, nükleik asitlerin denatürasyonuna sebep olur. Aynı etkenler, başta enzim proteinleri olmak üzere, bazı biyomoleküllerin de, doğal yapısının değişmesine sebeptirler. Biyomoleküller, organik çözücüde çözünmediği için, ayırmalar genel olarak sulu fazda yapılır. Enzimler ve hormonlar gibi, yapısı çok kompleks, miktarı çok az olan bileşiklerin kantitatif tayinleri ve saflaştırılması, özel enzimolojik teknikler kullanılmasını gerektirir. Bir maddenin saflaştırılması sırasında yapılması gereken ilk işlem; maddeyi bulunduğu ortamdan uygun bir çözücüye almaktır. İlgi duyulan maddenin bulunduğu fraksiyon seçilip, o fraksiyon üzerinde saflaştırma ve ayırma işlemi başlatılır. Ayırma işlemlerinde, belirli prensiplere dayanan yöntemler kullanılır. Bu yöntemler aşağıda sınıflandırılmıştır:

1. Diyaliz,
2. Ultrasantrifüj,
3. Kromatografi,
4. Ekstraksiyon,
5. Elektforez (Ersöz, 2010).

1.9. Protein Ayrılması

Proteinler, hem hücre dışında, hem de hücrenin farklı bölgelerinde bulunan heterojik bir bileşik sınıfıdır. Saflaştırma amacıyla, protein, bulunduğu hücre fraksiyonundan çözeltiliye alınır. Stoplazmik proteinler için hücre zarı, lizisle açılır. Bu sebepten hipotonik çözeltiliye konan hücreler, hücre içine çözücü girmesi sonucu şişer ve sonra zar parçalanır. Bakteri ve bitki hücrelerinde hücre duvarı olması sebebiyle, hücre duvarının organik çözücülerle veya enzimatik olarak muamele edilerek parçalanması gerekir. Eğer protein bir organelde bulunuyorsa, organel, ultrasantrifüjle fraksiyonunun parçalanmış hücre homojenatından ayrılmalıdır. Sonrasında, konsantre tuz çözeltisi ile proteinler organelden ekstrakte edilir. Proteinin doğal yapısını bozmamak amacıyla, bu işlemler sırasında, sıcaklık ve pH uygun hale getirilmelidir (Ersöz, 2010).

1.10. Protein Tayinleri

Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarılı olduğunu görebilmek için, protein miktarının spesifik ve hassas olarak belirlenmelidir. Protein bir enzim ise, substrat veya ürün miktarı uygun bir yöntemle tayin edilir. Bu işlem sonrasında da enzim aktifliğine bakılır. Ürünün kolaylıkla belirlenemediği durumlarda, eşlenme tepkimelerine başvurulur, ürünün daha kolay ölçülebilen ikinci bir ürüne çevrilmesi sağlanır.

Proteinlerin izole edilmesi için, proteinlerin türlü özelliklerinden faydalanılır. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Çözünürlük farkları,
2. Büyüklük farkları,
3. Polarlık,
4. Işık absorpsiyonu,
5. Elektriksel yük,
6. Diğer özellikler (Ersöz, 2010).

1.11. Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar

Proteinlerin çözünürlüğü, çözücünün pH'sına, polarlığına, çözeltilinin iyon şiddetine ve sıcaklığa bağlıdır. Proteinlerin çözünürlüğünü, çözeltilide bulunan çözülmüş tuzlar etkiler.

Proteinin çözünürlüğü, düşük iyon şiddetlerinde genellikle tuz konsantrasyonu ile artar. Tuz, proteinin çökmesini, proteinin yükünü perdeleyerek engeller. Proteinlerin çözünürlüğü, iyon şiddeti arttıkça azalır. Bunun sebebi, tuzun hidratize olması ve proteinin çözünürlüğü için gerekli çözücü miktarının azalmasıdır. Çözeltilinin pH'sı ile, proteinlerin çözünürlükleri değişir. Çözünürlük izoelektrik noktada minimumdur. Çünkü bu pH'da proteinler net bir yüke sahip olmadıklarından, hem polarlığın azalmasıyla birlikte çözünürlük azalır, hem de komşu moleküller arasında yüke bağlı itmeler ortadan kalkacağı için moleküller bir araya gelir ve çökme başlar. Bu pH'nın

üstünde ve altında ise proteinlerin çözünürlüğü artar. Proteinlerin, aminoasit bileşimleri farklı olduğu için, her proteinin farklı izoelektrik pH'sı vardır. Bu sebeple, çöktürülmek istenen proteinin izoelektrik noktasına çözeltinin pH'sı ayarlanır ve böylece, ayrılmak istenen proteinin çökmesi ve diğer proteinlerin de çözeltide kalması sağlanır. Sıcaklık, çözünürlüğü etkilediğinden dolayı, iyi bir çöktürme için uygun sıcaklık seçimi sağlanmalıdır (Ersöz, 2010).

1.12. Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar

1.12.1. Diyaliz

Büyüklük farkına dayanan en basit ayırma yöntemi diyalizdir. Amaç; proteini küçük moleküllerden ve ortamda bulunan iyonlardan ayırmaktır. Genellikle yarı geçirgen diyaliz zarları, selüloz asetattan yapılmıştır. Gözenekleri 1-20 nm çapındadır. Diyaliz keseleri, ağır metal safsızlıklarını gidermek ve eşit büyüklükte gözenek büyüklüğü sağlamak için ön işlemden geçirilmelidir. Çöktürmeyle ayrılan proteinler, çökme sırasında ortamdaki iyonları absorblar. Bunları uzaklaştırmak amacıyla, diyaliz kesesine konan protein çözeltisi, uygun bir tampon içerisine daldırılır. Osmotik basınç farkından dolayı, iyonlar ve küçük moleküller dıştaki tampon çözeltiliye geçerler. Tamponun aralıklarla yenilenmesiyle de proteinin küçük molekül ve iyonlardan kurtarılması sağlanır (Ersöz, 2010).

1.12.2. Ultrasantrifüj

Makromoleküllerin çökmesi için, santrifüjlemek suretiyle, merkezkaç kuvvetinden faydalanılarak çöktürme yapılabilir. Çözeltideki bir taneciğin çökme hızı aşağıdaki sebeplere bağlıdır:

- a) Taneciğin şekli, büyüklüğü ve yoğunluğu,
- b) Çözücünün yoğunluğu ve vizkositesi,
- c) Uygulanan merkezkaç kuvvetinin büyüklüğü (Ersöz, 2010).

1.12.3. Kromatografi

Kromatografi kelimesi, Yunanca “chroma” (renk) ve “Graphein” (yazmak) kelimelerinden oluşmuştur. İlk kez, görünür renkli bitki pigmentlerin ayrılmasında yirminci yüzyılın başlarında kullanılmış bir tekniktir. Kromatografi; farklı bileşiklerin farklı fazlarda değişken şekilde dağılmasına dayanır. Her daim hareketli faz (mobil faz) ve durağan faz (stasyonel faz) vardır. Hareketli faz, durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri, farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi az olan bileşenler daha çabuk, etkileşimi fazla olan bileşenlerse daha ağır hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılırlar. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, bileşenler ile durağan faz arasındaki etkileşimin tabiatına göre, geliştirilmiş farklı kromatografik yöntemler mevcuttur. Bu etkileşim, spesifik bağlanma özelliklerine, molekül büyüklüğüne, polariteye ya da elektrostatik çekim gücüne bağlıdır (Telefoncu,1996).

1.12.3.1. İyon Değişim Kromatografisi

Bu adsorpsiyon kromatografisi elektrostatik çekime dayanır. Örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılmaktadırlar. İyon değiştiriciler, iki kısımdan oluşmaktadır:

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış, çözünür olmayan dolgu maddesi (matriks).
2. Hareketli karşı iyonlar. Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde, herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler (Boyer, 1993).

İyon değiştirici dolgu maddesi, eğer pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmış ise, karşı iyonlar negatif olur. Bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdikleri için *anyon değiştiriciler* adını alırlar. Benzer şekilde, eğer dolgu maddesi negatif

gruplarla kimyasal olarak bağlanmış ise, karşı iyonlar pozitif olur. Bu tür iyon değiştiriciler pozitif iyonları değiştirdikleri için *katyon değiştiriciler* adını alırlar.

Dolgu maddesi; polisakkaritler, sentetik reçineler, alüminyum silikatlar, vb. olabilir. Dolgu maddesinin tabiatı, iyon değiştiricilerin bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını, mekanik kararlılığını, akış özelliğini ve kısmen de kapasitesini belirler. Sentetik reçineler ilk kullanılan iyon değiştiricileridir. Bunlar, atıklardan iyonların kazanılmasında, suyun demineralizasyonunu ve su kalitesini düzeltmede kullanılmıştır. İyon değiştiricilerin bu türleri, yüksek derecede yüklü gruplarla kovalent olarak bağlanmış hidrofobik polimer dolgu maddeleridir ve biyolojik maddelerin saflaştırılmasında uygun değildir. Zira polimerlerin hidrofobik oluşu ve yüksek yük yoğunluğu biyolojik maddelerin denatüre olmalarına sebep olur. Biyolojik maddelerin ayrımı için kullanılan ilk iyon değiştiriciler, Peterson ve Sober tarafından 1956'da geliştirilen selüloz iyon değiştiricilerdir. Hidrofilik tabiatından dolayı, selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi çok düşüktür. Günümüzde çok farklı destek maddeleri kullanılmaktadır; ancak en yaygın tercih edilen destek maddesi protein fraksiyonlanması için selülozdur (Ersöz, 2010).

İyon değiştiricilerin yüksek kapasitesi, çok büyük hacimlerin prosesine ve konsantre şekilde eldesine imkan verir. İyon değişim kromatografisi ile ayırmada esasen iki etap mevcuttur: İlk etap örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon. İkinci etap ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılmış olarak elüe edilmeleri (Boyer, 1993).

1.12.3.2. Moleküler Eleme Kromatografisi

Moleküler eleme kromatografisinin temel prensibi, kürecik şeklinde olan poröz matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulup, üzerinden örneklerin geğirilmesidir.

Matrikse uygulanacak örnek içerisindeki moleköl boyutları, durgun fazdaki matriks gözeneklerine göre daha küçük ve daha büyük haldedir. Matriksin gözenek

büyükliğüne göre daha küçük olan moleküler, matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğüne göre daha büyük olan moleküllerse, matriks tarafından dışarı bırakılırlar ve dolayısıyla kolonu öncelikle terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller, matriks gözenekleri içine girebilirler; fakat kolon içinde küçük moleküllere göre daha kısa süre kalırlar. Böylece, moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elüe olurlar. Moleküler eleme, üre varlığında, yüksek ve düşük iyon konsantrasyonunda, 37°C’de soğuk odada ve deneyin gerekli olduğu ortam şartlarında gerçekleştirilebilir. Moleküler eleme için kullanılan reçineler şunlardır:

- a. Sepharose,
- b. Sephacryl,
- c. Sephadex.

Moleküler eleme için kullanılan reçine tipleri ise şunlardır:

- A. Sepharose 2B, 4B, 6B,
- B. Sepharose-CL 2B, 4B, 6B,
- C. Sephacryl S-200, 30, 400, 500, 1000,
- D. Sephadex G-Tipleri (Ersöz, 2010).

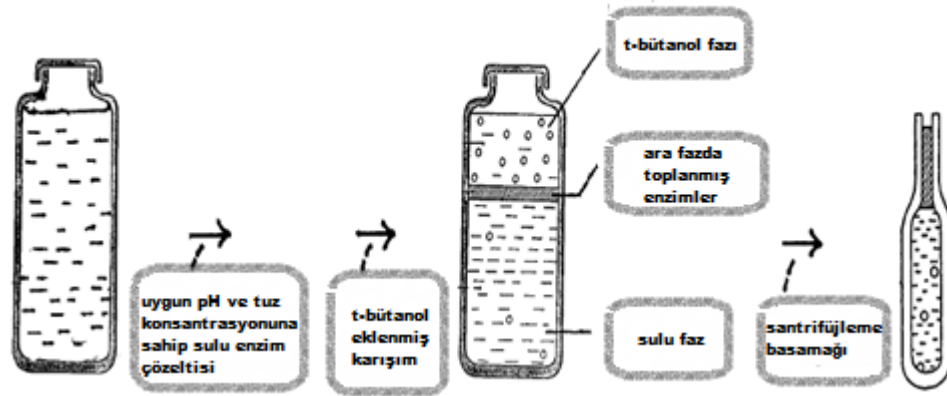
1.13. TPP: Three Phase Partitioning (Üç Fazlı Bölümleme)

Sulu çözeltilerden protein ve enzimleri çöktürmek için t-bütanol ve amonyum sülfatın kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem hem başlangıç düzeyinde hem de ileri düzeyde saflaştırma için faydalıdır. TPP çalışmalarının gelişimi 1972’lere (Tan ve Lovrien, 1972) dayanmaktadır. Bu güne kadar TPP yöntemi kullanılarak 25 civarında enzim ve protein izole edilmiştir.

TPP ile çöktürülen proteinler t-bütanol ile birlikte çökmektedir. Bu yöntemde; protein-t-bütanol ikilisi lipoprotein davranışı gibi tuzlu su çözeltisinin yüzeyinde bulunurlar. Yani; t-bütanol proteinin yüzeyde kalmasını sağlamış olur. Yüksek konsantrasyonlardaki sülfat iyonlarının kozmotropik etkisi nedeniyle çöktüğü düşünülmektedir.

Elektrostatik kuvvetler proteinlerin konformasyonunu sıkıştırır ve ayrıca protein hidrasyonunun yönünü değiştirmeye katkıda bulunur. Hem TPP hem klasik tuzla çöktürmede, protein-tuz, protein-protein (sıkı konformasyon) etkileşimi pH'ya bağlıdır. Sülfat konsantrasyonu 0,5-3 M aralığında olduğunda aşırı derecede hidrate olmuş sülfat anyonları birikme eğiliminde olur ve proteinleri dışlar.

Tersiyer bütanol normalde suyla tamamen karışır fakat ortama (amonyum sülfat gibi) yeterli miktarda tuz eklendiğinde çözelti, altta su fazı ve üstte t-bütanol fazı olmak üzere iki faza ayrılır. Eğer sulu fazda protein mevcutsa, konsantrasyona bağlı olarak amonyum sülfat eklendiğinde, alt ve üst faz arasında üçüncü bir faz oluşur. “Üç fazlı bölümlenme” ya da TPP olarak adlandırılan bu temel yöntem, proteinlerin izolasyonunda ve konsantre edilmesinde yardımcıdır.



Şekil 1.2. TPP için genel metod (Dennison, C., and Lovrien, R. (1997))

Tersiyer bütanol de bir yükleme ajanı (Z_{H^+}) olarak sülfatın kozmotropik etkisi gibi oda sıcaklığı ve üzerindeki sıcaklıklarda etkindir, ancak etanol gibi zayıf kozmotrop etkiye sahip çözücüler bu etkiyi yalnız sıfır ve altındaki sıcaklıklarda gösterirler; oda sıcaklığında etkin değildirler. Birçok enzim ve protein kosolvent-su karışımlarında aktivitelerini ve fonksiyonlarını kaybederken, bazı enzimler ise t-bütanol-su içerisinde aktiftir. Bu nedenle bu konudaki bütün çalışmalar t-bütanol ile yapılmaktadır.

Tersiyer bütanol-su istenmeyen proteinlerin eliminasyonu konusunda da faydalı olabilir (Eritrosit enzimlerinden TPP aracılığıyla hemoglobinin ayrılması) (Pol ve ark., 1990). TPP'de sadece t-bütanol değil, diğer kosolventler de kullanılabilir. Ancak metanol ve etanol gibi kosolventlerin TPP için yaygın olarak kullanımları uygun değildir (Lovrien ve ark., 1994).

1.13.1. Hofmeister Serisi

Anyonlar: $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{asetat}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$

Katyonlar: $\text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ = \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$

Sülfat kozmotrop (von Hippel ve Schleich, 1969) ve anyonik olarak Hofmeister serisinin başında yer alır (Collins ve Washabaugh, 1985). Sülfat bir anyon ve t-bütanol nötral bir molekül olduğu halde yeterince yüksek konsantrasyonlarda buna benzer bileşik çiftleri kullanıldığında ve esas çözücü su olduğunda bu bileşik çiftlerinin fizikokimyasal davranışları bakımından birbirlerini güçlendirdikleri açıktır.

TPP'de pH müdahalesi, farklı sülfat konsantrasyonları ve protein molekülünün yüküne (Z_{H^+}) bağlı olarak aşağıdaki beş etken önemlidir;

- İyonik kuvvet etkileri
- Kozmotropi
- Çukur yüzey gerilimini arttırma
- Osmotik stres (dehidrasyon)
- Harici yükleme ajanı

Proteinler net pozitif yüke (Z_{H^+}) sahip olduğunda, iki değerlikli sülfat anyonları (SO_4^{2-}) proteinle etkileşme eğilimindedir. Protein molekülleri fark edilecek derecede net pozitif yükle yüklendiğinde (Z_{H^+}) genişmiş formdan sıkıştırılmış konformasyona geçtiği görülmektedir (Matulis ve Lovrien, 1996).

Sülfatın salting out gücünün mekanizması ya da sülfat iyonunun işlevinin kuvvetli pH bağımlılığının temel nedeni; sülfat anyonlarının protein moleküllerine bağlanmış olması, artan makromoleküler büzülme (daralma) ve konfomasyonel büzülme davranışdır.

Hofmeister serisinde iyi kozmotrop özelliğe sahip diğer inorganik anyonlar, özellikle de fosfat anyonları, tahmin edilebileceği gibi sülfata benzer şekilde davranır ve bazen gerçekten aynı etkiyi yapar (Collins ve Washabaugh, 1985). İnorganik anyonun bağlı olduğu protein molekülü prosesin bir parçası olduğunda, sülfat ve fosfat arasında bu ayırma prosesinin pH bağımlılığı açısından büyük, belirgin farklılıkları vardır.

TPP için genel olarak şu adımlar izlenir;

1. Protein özelliklerinin analizi
2. TPP'nin optimizasyonu
 - pH
 - Sıcaklık
3. Total protein ve biyoaktivite (enzim, hormon, vs.) ölçümleri

1.13.2. TPP'nin Avantajları

1. TPP genellikle klasik tuzla çöktürmeden daha az amonyum sülfat gerektirdiğinden maliyeti klasik tuzla çöktürmeden daha azdır.
2. Proteinlerin konsantre edilmesi ve bölümlere ayrılması, TPP'nin faydalı ve önemli bir özelliğidir. Bir TPP döngüsü içerisinde bazen 100 kat konsantrasyon etkenine ulaşılır.

TPP bir derişimleme ya da su giderme aşamasıdır. Ham proteinden ekstrakte edilmiş %0.2-1 kadar yarı katı proteinin mL'si başına 2-10 mg istenen protein elde edilebilir.

3. Kirleticiler; örneğin; lipidler, tercihen organik çözücülerle çözünürler. Bunlar t-bütanol tabakasından uzaklaştırılır. Bu özellik sayesinde bazen düşük

molekül ağırlıklı bileşikler; örneğin; lipidler, fenolik bileşikler ve bazı deterjanlar ayrılmış olur (Dennison ve Lovrien, 1997).

1.14. *Momordica charantia*



Şekil 1.3. *Momordica charantia*

Momordica charantia L. kabakgiller familyasına ait, ülkemizde kudret narı adıyla bilinen ve ekonomik açıdan önemli tıbbi bir bitkidir (Paul ve Raychaudhuri, 2010). Latince adı *Momordica* “ısırmak” anlamına gelir (Taylor, 2002). Dünya ülkelerinde bilinen diğer adları; papailla, melao de sao caetano, sorosi, a'jayib al maasi, assorossie, balsam elması, chin li chih, ejinrin gule khandan, fu-kua, k'u kua kurela, kor-kuey, ku gua, lai p'u t'ao, pava-aki, salsamino, acı kabak, sorci, sorossi, sorossie, sorossies, pare, peria laut, peria (Taylor, 2002), acı kavun, acı hıyar (Rangahau, 2002), armut balsamı, karela (Brown, 1995)'dır. Tek yıllık olan bitkinin, filizleri sarılıcı ince ve uzun, yaprakları 5-7 loblu ve 5-10 cm genişliğindedir (Brown, 1995). Yaprakların koltuk altlarında tek olarak sarı renkli erkek ve dişi çiçeklere sahiptir (Taylor, 2002). Meyveleri siğile benzer yoğun çıkıntılı, küt veya sivri, uzun veya kısa boylarda olabilmektedir (Rangahau, 2002). Zümrüt yeşili renkli genç meyve, olgunlaştıkça sarı-turuncu renk alır, uç noktalarından üç parçaya ayrılarak geriye doğru kıvrılır (Brown, 1995; Taylor, 2002) ve parlak kırmızı renkte etli olan tohumlar açığa çıkar (Rangahau, 2002).

Minimum sıcaklık isteği 15-18°C'dir (Brown, 1995). Diğer kabakgiller familyasındaki bitkiler gibi yetiştirilmektedir. Üretim, fidelerle erken ilkbaharda yapılır. Çiçeklenmeden sonra meyveler 10-15 gün içinde olgunlaşırlar ve 10-15 cm büyüklüğe ulaşınca hasat edilirler. İlk hasat, dikimden 70-80 gün sonra yapılmaktadır. Meyve verimi 5-6 ton/ha civarındadır (Rangahau, 2002).

Kökeninin Çin ve Hindistan olduğu bilinmektedir (Rangahau, 2002). Afrika ve Asya, Amazonlarda dahil olmak üzere Karayipler ve Güney Amerika boyunca tropik bölgelerde doğal olarak yetişir (Brown, 1995). *Momordica* cinsi içerisinde *Momordica chinensis*, *M. elegans*, *M. indica*, *M. operculata*, *M. sinensis*, *M. charantia* ve *Sicyos fauriei* türleri yer almaktadır (Taylor, 2002). Hindistan'da Kudret Narının birçok türü bulunmakla birlikte (Behera, 2004), yaygın olarak *Momordica charantia* var. *charantia* büyük meyveli ve *Momordica charantia* var. *muricata* küçük ve yuvarlak meyveli olan iki türü yetiştirilmektedir (Chakravarty, 1990).

Günümüzde kudret narı tarımı Hindistan, Çin (Behera ve ark., 2008), Malezya, Afrika ve Güney Amerika'da ekonomik olarak yapılmaktadır (Raj ve ark., 1993). Ayrıca Japonya, Tayvan, Tayland, ABD ve nadiren Avustralya'da da yetiştirilmektedir (Rangahau, 2002). Ülkemizde Bursa ve Yalova civarlarında bahçe tarımı şeklinde küçük alanlarda üretilmektedir.

Yaygın olarak yetiştirildiği ölkelerde yapraklar ve sürgünlerde acılığı gidermek için tuzlu suda haşlama veya ıslatılma yapılmak sureti ile sebze olarak değerlendirilmektedir (Brown, 1995). Tohumlar müshil etkisi nedeni ile yemek için tavsiye edilmez. Olgun meyveler morodicine adlı bir alkaloid nedeni ile acı bir tada sahiptir ve bu nedenle olgunlaşmamış meyvesi yenir (Rangahau, 2002), sebze olarak tüketilir (Paul ve Raychaudhuri, 2010; Yuan ve ark., 2008). Ayrıca çiğ halde, pişirilerek ve kızartılarak tüketilebilir (Brown, 1995) veya içecek hazırlanmasında kullanılabilir (Yuan ve ark., 2008).

Kudret narının halk arasında tıbbi tedaviyi destekleyici olarak kullanımının uzun bir geçmişi vardır. Taylor (2002)'un bildirdiğine göre; yapraklarından yapılan çayları

şeker hastalığında, kolit tedavisinde gaz giderici, yaralarda ve sancılarda dahili ve harici olarak, solucan ve parazitleri düşürmede kullanılmaktadır. Ayrıca kızamık, hepatit ve ateşli durumlar için antiviral olduğu belirtilmektedir (Grover ve Yadav, 2004). Brezilya halk tıbbında tümör, yara, romatizma, sıtma, adet ağrıları, şeker hastalığı, ateş, kürtaşı indüklemek ve afrodisyak olarak, ayrıca cilt problemleri, vajinit, hemoroit, uyuz, kaşıntılı döküntü, egzama ve cüzam hastalıklarına karşı (Koller, 2008), Meksika'da tüm bitki diyabet ve dizanteriye karşı, kökler ise afrodisyak olarak, Peru'da bitkinin yaprak veya diğer toprak üstü kısımları kızamık ve her türlü iltihap tedavisinde (Kumar ve Bhowmik, 2010), Hindistan, Çin ve Amerika'da geleneksel diabet tedavisinde sağlıkla ilgili şikayetlerin giderilmesinde (Yeh ve ark., 2003), Filipinler'de (Reyes ve ark., 2006), Asya, Doğu ve Latin Amerika ülkelerinde antidiyabetik ve antihiperglisemik olarak kullanılmaktadır (Ahmed ve ark., 2001). *Momordica charantia* L.'nin olgun meyveleri çok eskiden beri Türk halk hekimliğinde, yaraların hızlı iyileşmesi için harici ve peptik ülser tedavisi için dahili olarak kullanılmaktadır (Gürbüz ve ark., 2000).

Tüm bitkideki etkili maddeler; momorcharins, momordenol, momordicilin, momordicins, momordicinin, momordin, momordolol, charantin, charine, cryptoxanthin, cucurbitins, cucurbitacins, cucurbitanes, cycloartenols, diosgenin, elaeostearic acids, erythrodiol, galacturonic acids, gentisic acid, goyaglycosides, goyasaponins ve multiflorenol'dur (Murakami ve ark., 2001; Parkash ve ark., 2002). Genel kimyasal bileşimi olgunlaşmamış meyvelerde diğer kabakgillere benzerdir (Behera, 2004). Meyvelerinde; polypeptide- p insulin, ascorbigen (Lolitkar ve Rao, 1966), amino acids – aspartic acid, serine, glutamic acid, threonine, alanine, g-amino butyric acid ve pipercolic acid ve luteolin (Yuwai ve ark., 1991) bulunur. Ayrıca demir, Vitamin A ve C için iyi bir kaynaktır (Behera, 2004; Rangahau, 2002). Tohumlarında, galaktoz, lektin (Wang ve Ng, 1998), primidin nükleozid vicine (Khanna ve Mohan, 1973), peptid (Panagariya ve Dixit, 2004), fenolik asitler; gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin ve antioksidantlar içerdiği bildirilmiştir (Horax ve ark., 2005).

Deneylele ispatlanmış klinik çalışmalarda ise hipoglisemik (Jayasooriya ve ark., 2000; Panagariya ve Dixit, 2004), anti-hiperglisemik (Ahmed ve ark., 2001; Grover

ve ark., 2002), antiülser (Gürbüz ve ark., 2000), antioksidan (Horax ve ark., 2005; Kubola ve Siriamornpun, 2008; Liu ve ark., 2010; Wua ve Ng, 2008), antidiabetik (Krawinkel ve Güdrün, 2006; Reyes ve ark., 2006), hipolipidemik (Ahmed ve ark., 2001; Nerurkar ve ark., 2006), antikanserojen, hipokolestrolemik (Ahmed ve ark., 2001), antivirüs (Nerurkar ve ark., 2006), antibakteriyel (Braca ve ark., 2008; Roopashree ve ark., 2008), böcek öldürücü (Cheng ve ark., 2004), trigliserit düşürücü (Senanayake ve ark., 2004), antimutagenik (Sumanth ve Chowdary., 2010), immünoestimulan, antitümör, antibiyotik, antiinflamatuvar (Taylor, 2002), antimikrobiyal, abortisid, antifertility ve antihelminetik (Paul ve Raychaudhuri, 2010) olduğu belirlenmiştir.

1.15. *Stevia rebaudiana*



Şekil 1.4. *Stevia rebaudiana* (Erişim

Adresi:http://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_3009.aspx Erişim Tarihi: 25.05.2014)

Stevia rebaudiana; Paraguay ve Brezilya'da yetişen chrysanthemum ailesinden, yabani ve küçük bir çalı türüdür. 60-90 cm boyunda, ortalama 25°C'de ve bazı türleri 2300-2900 m yüksekliklerde yetişebilen, nemli ortamları seven, bir bitki türüdür (Cortes ve ark., 2007). Anavatanı Güney Amerika'dır. Paraguay, Brezilya, Kolombiya, Meksiko, Uruguay, Guatemala, Peru, Japonya ve Güney Kore'de yetiştirilmektedir; ayrıca Kaliforniya ve İngiltere'de de yetiştirilmektedir. Kuzey Amerika'da tespit edilebilen 80'in üzerinde çeşidi, Güney Amerika'da ise 200'ün üzerinde yerli türü olduğu tahmin edilmektedir (Nunes ve ark., 2007; Tadhani ve ark., 2007; Richard, 2009).

1.16. Çalışmanın Amacı

Daha önce invertaz enziminin saflaştırılmadığı bir kaynak olan *Stevia rebaudiana* bitkisinden ve *Momordica charantia* meyvesinden invertaz enzimini tek basamakta saflaştırmak için TPP yöntemini optimize etmek ve saflaştırılan enzimin optimum parametrelerini belirlemek.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sharma ve Gupta, 2001. TPP yöntemiyle, havuçtan (*Dacus carrota*) fosfolipaz D saflaştırılmıştır. TPP'nin tek adımlık işlemi sonrası 13 kat saflaştırma ve %72 geri kazanım aktivitesi elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonrasında yaklaşık olarak 60 kDa minimum moleküler ağırlığına denk gelen tek bir çizgi görülmüştür. Saflaştırılmış enzimin, optimum pH aralığının 6,0-6,5 olduğu ve enzimin 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda stabil olmadığı anlaşılmıştır. Kinetik çalışmalar sonucu $K_m=9,5$ mM ve $V_{max}=0,35$ mL/dk olduğu görülmüştür. TPP ile saflaştırılan enzimin DEAE-selüloz kolonunda iki izoenzime ayrıştığı bulunmuştur.

Gaur ve ark., 2007. Protein saflaştırılmasında kullanılan TPP'nin üç çeşit bitki kaynağından (Mango çekirdeği, soya fasulyesi ve pirinç kepeği) yağ ekstraksiyonunda kullanılması araştırılmıştır. Optimize edilmiş koşullarda proteinlerin, üstte bulunan yağ içerikli t-bütanol ve alttaki sulu faz arasında ara çökelti olarak bulunduğu gözlenmiştir. Preparatların ticari olarak satılan bir protein karışımı olan Protizyme™ ile ön işleme alınması sonucunda sırasıyla %98 , %86 ve %79 (w/w) oranlarında yağın artışına neden olduğu görülmüştür (soya fasulyesi, pirinç kepeği, mango çekirdeği). Bu yöntemin etkinliği, klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ile karşılaştırılmış; daha az zaman gerektirdiği ve t-bütanolün klasik çözücü ekstraksiyon yönteminde kullanılan n-hekzan çözücüsünden daha güvenli olduğu anlaşılmıştır.

Saxena ve ark., 2007. TPP yöntemi, rahi (parmak darısı) (*Eleusine coracana*)'nin çift fonksiyonlu amilaz/proteaz inhibitörünün saflaştırılmasında kullanılmıştır. Proteinlerin etkili saflaştırılması için gerekli olan çeşitli şartlar optimize edilmiştir. Birinci basamakta %30 amonyum sülfat doygunluğu ile 1:1 (v/v) oranında kaba ekstrakt/t-bütanol eklenmesi sonucu sırasıyla 8,9 ve 8,65 kat saflaştırma ile %83 ve %80 amilaz ve tripsin inhibitörlerin verimi hesaplanmıştır. İkinci basamakta ise %60 amonyum sülfat doygunluğu ve 1:2 (v/v) oranında sulu faza t-bütanol eklenmesi ile sırasıyla 20,1 ve 16 kat saflaştırma ile %39,5 ile %32 verimle amilaz ve tripsin inhibitörleri elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda bu inhibitör proteinin yeterli saflıkta elde edildiği ve moleküler ağırlığının 14 kDa olduğu anlaşılmıştır.

Dhananjay ve Mulimani, 2008. α -galaktosidaz ve invertazın üç fazlı ayırıştırma sisteminde, değişik koşullar altında (amonyum sülfat, t-bütanol/kaba ekstrakt oranı, sıcaklık ve pH) kolayca ayırt edilebilen orta fazda biriktiği görülmüştür. α -galaktosidaz ve invertaz sırasıyla 15 ve 12 kat saflaştırılmış ve %50 ile %54 aktivite geri kazanımı sağlanmıştır. TPP ile elde edilen ara fazdaki çökelti SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Her iki saflaştırılmış çökelti de SDS-PAGE'de elektroforetik homojenite göstermiştir.

Narayan ve ark., 2008. Ipomoea palmata yapraklarından TPP kullanılarak peroksidaz saflaştırılmıştır. Birinci TPP döngüsünde, su fazına kaba ekstrakt/t-bütanol oranı 1:1 iken ve %30 amonyum sülfat doygunluğunda, 37°C'de %160 aktivite geri kazanımı ve 2 kat saflaştırma elde edilmiştir. Sıvı fazın ikinci TPP döngüsünde 18 kat saflaştırma ve %81 aktivite geri kazanımı elde edilmiştir. SDS-PAGE analizinde yeterli saflaştırma bulunmuş ve peroksidazın molekül ağırlığının 20,1 kDa olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, şu anki literatür değerlerine göre birincil saflaştırma tekniği olarak daha yüksek bir saflaştırma ve aktivite geri kazanımını sağlamıştır. Bu yüzden peroksidazın saflaştırılmasında TPP'nin ilgi çekici bir ilave işlem basamağı olduğu düşünülmüştür.

Hussain ve ark., 2009. Bu çalışmada, ilk olarak tuza dayanıklı bölgesel CP77-400 (CP-77) varyasyonu şeker kamışının (Saccharum officinarum L.) çözünebilir asit invertazının (Ç.A.I.) kinetik ve termodinamik özellikleri araştırılmıştır. Ç.A.I., FPLC yöntemi kullanılarak belirgin bir şekilde homojen olarak saflaştırılmıştır. Kaba enzim yaklaşık 13 kat saflaştırılmış ve %35 geri kazanım sağlanmıştır. Doğada monomer halinde bulunan bu invertazın, jel filtrasyonundaki moleküler ağırlığı ve SDS-PAGE'deki alt ünite ağırlığının 28 kDa olduğu bulunmuştur. Ç.A.I. yüksek derecede asidik özellik göstermiştir ki pH'sı 2,0'dan az bulunmuştur. Asidik karakterin olmadığı durumlarda kataliz sırasında proton transferinin pKa = 2,4 karboksil gruplarının bazik karakterde gerçekleştiği anlaşılmıştır. Ç.A.I. tarafından sükroz hidrolizi için kinetik sabitlerinin $K_m = 55$ mg/mL; $K_{cat} = 21$ s⁻¹; $K_{cat}/K_m = 0,38$ olduğu ve termodinamik parametrelerin $\Delta H^* = 52,6$ kJ/mol; $\Delta G^* = 71,2$ kJ/mol; $\Delta S^* = -57$ J/mol.K; $\Delta G^*_{E-S} = 10,8$ kJ/mol ve $\Delta G^*_{E-T} = 2,6$ kJ/mol olduğu bulunmuştur. Ayrıca geri dönüşümsüz termodinamik asitasyonun kinetik ve termodinamik özellikleri çeşitli

ısılarında (53 – 63°C) belirlenmiştir. Ç.A.I.'nin yarı ömrü 53°C ve 63°C'da sırasıyla 112 ve 10 dk olarak ölçülmüştür. 55°C'de yarı ömür süresinin beklenmedik bir şekilde 53°C'dekinin iki katı olduğu görülmüştür. 55°C'de Ç.A.I.'nin geri dönüşümsüz termal stabilitesinin ΔG^* - ΔH^* - ΔS^* değerleri sırasıyla 107,7 kJ/mol, 276,04 kJ/mol ve 513 J/mol.K olduğu görülmüştür.

Chaiwut ve ark., 2010. Kurumuş papaya yaprakları, taze meyve kabuklarına üstün bir proteolitik aktivite sergilemiştir. Proteazlar, pH:7,0'da fosfat tampon solüsyonu ile ekstraksiyonları sonrasında suya oranla proteolitik aktivitelerini korumuştur. SDS-PAGE analizi sonucu; kuru papaya kabukları ekstraktlarının geniş bir protein bandı içerdiği görülmüştür. TPP ile papaya kabukları proteazlarının izolasyonunun optimizasyonu için belirli bir t-bütanol/kaba ekstrakt oranı, amonyum sülfat doygunluğu ve TPP döngüleri gerekmiştir. Kaba ekstraktın t-bütanole oranının 1:0,5 (v/v) olduğu, %20'lik amonyum sülfat doygunluğunda alt fazda en yüksek proteolitik geri kazanımı (%253,5) ve 15,8 kat saflaştırma görülmüştür. Daha sonra TPP %55 doygunluktaki amonyum sülfat solüsyonu birinci basamaktaki alt faza eklenerek optimize edilmiştir. Sonuçta 10,1 kat saflaştırma ve %89,4 geri kazanım sağlanmıştır. Bu çalışma, TPP yönteminin papaya kabuklarında proteazların ekstrasyonunda etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Akardere ve ark., 2010. TPP yöntemi, hamur mayasında (*Saccharomyces cerevisiae*) tek adımda invertazı saflaştırmada kullanılmıştır. Amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstraktın t-bütanole oranı ve pH gibi çeşitli parametrelerin invertazın eldesine etkileri, saflaştırma katsayısı ve geri kazanım aktivitesini belirlemek için araştırılmıştır. Optimize koşullarda (%50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:0,5 kaba ekstrakt/t-butanol oranı ve pH:4,0) enzimin 15 kat saflaştırıldığı ve %363 aktivite ile geri kazanımı belirlenmiştir. TPP ile elde edilen enzimin SDS-PAGE'de kayda değer bir saflıkta olduğu görülüp, moleküler ağırlığının 52 kDa olduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 60°C ve 6,0 olduğu bulunmuştur. Saflaştırılmış enzimin ayrıca 4,0 ve 6,5 pH aralığında ve 4-50°C sıcaklık aralığında oldukça stabil olduğu gözlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri: Lineweaver-Burk eğrisine göre sırasıyla 0,19 M ve 29,8 U olarak bulunmuştur.

Özer ve ark., 2010. Protein saflaştırmada kullanılan; üç fazlı bir ayırıştırma tekniği olan TPP, domatesten invertaz enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır. İvertazın saflaştırılmasında en yüksek saflık ve verimi elde etmek için amonyum sülfat doyunluğu, t-bütanol/kaba ekstrakt oranı ve pH gibi çeşitli parametreler belirlenmiştir. Görülmüştür ki pH: 4,5'te, %50 amonyum sülfat doyunluğunda, 1:1 (v/v) t-bütanol/kaba enzim oranı ile birlikte tek basamakta %190 invertaz aktivitesi geri kazanımı ve 8,6 kata varan saflık elde edilmiştir. Son olarak enzim karakterize edilmiş ve genel biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Enzimin SDS-PAGE analizi sonucu kaydadeğer miktarda enzim saflaştırıldığı bulunmuş ve enzimin yaklaşık 20 kDa olduğu görülmüştür. Bu çalışma göstermiştir ki; invertazın saflaştırılmasında TPP, basit, hızlı ve ekonomik bir tekniktir.

Rajeeva ve Lele, 2011. Etkili bir biyoseperasyon tekniği olan TPP *Ganoderma sp. WR-1* türünün fermantasyon kültürlerinden lakkazın saflaştırılmasında kullanılmıştır. İki adımlık prosedürde, lakkaz seperasyonu için amonyum sülfatın fizyokimyasal parametreleri, sulu fazın t-bütanol'e oranı, sıcaklık ve pH optimize edilmiştir. Birinci basamakta %20 amonyum sülfat ile 1/0,5 (v/v) sulu faz/t-bütanol oranında pH:7,0'da lakkazın çoğunun alt sulu fazda olduğu görülmüştür. İkinci basamakta amonyum sülfat oranı %90'a çıkarılmış ve birinci basamaktaki diğer parametrelerin aynı kalmasıyla, lakkaz konsantrasyonunun ara fazda olduğu görülmüştür. Bu iki basamaklı TPP sonunda lakkazın %60 geri kazanımı ve 13,2 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Çalışma sonucu, bu yöntemin lakkazın saflaştırılması ve yoğunlaştırılmasında hızlı, basit ve son derece etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Şen ve ark., 2011. Bu çalışmada, pepinodan (*Solanum muricotum*) α -galaktosidaz enzimi TPP yöntemi ile saflaştırılmıştır. Çeşitli parametrelerin (amonyum sülfat doyunluğu, kaba ekstraktın t-bütanole oranı, pH) α -galaktosidaz eldesine etkileri, en yüksek saflık katı ve verimini elde etmek için araştırılmıştır. Sonuçlara göre, pH:5,25'te %50 amonyum sülfat doyunluğu (w/v) , 1:1,5 (v/v) kaba ekstrakt/t-bütanol oranı ile α -galaktosidazın 6,2 kat saflaştırıldığı ve %127 aktivite geri kazanımı bulunmuştur. Elde edilen α -galaktosidazın karakterizasyonu ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. SDS-PAGE analizi sonucu; enzimin yeterli miktarda saflaştırıldığı görülmüş ve molekül ağırlığının 38 kDa

olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesine ve stabilitesine etki eden çeşitli parametreler (sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu) de çalışılmıştır. Optimum sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 50°C ve 5,5 olduğu görülmüştür. Enzimin 37°C ve 45°C sıcaklık aralığında ve ayrıca 4,5 ve 7,0 pH aralığında oldukça stabil olduğu görülmüştür. Kinetik sabitlerin: K_m ve V_{max} sırasıyla 0,37 mM ve 0,46 U olduğu bulunmuştur. Bu çalışma göstermiştir ki; pepinodan α -galaktosidazın saflaştırılmasında TPP tekniği oldukça ilgi çekici bir yöntemdir ve ayrıca TPP ile elde edilen enzimin karakteristik özellikleri enzimi endüstriyel kullanımında iyi bir aday haline getirmektedir.

Harde ve Singhal, 2012. Hidrofilik bileşenleri, proteinleri ve hidrofobik bileşenleri; su, amonyum sülfat ve organik çözücüde ayrıştıran bir yöntem olan TPP tekniği, *Coleus forskohlii* köklerinden bir diterpen olan forskolinin eldesinde kullanılmıştır. Sulu karışıma t-bütanol ve amonyum sülfatın eş zamanlı eklenmesine dayanan bu yöntem, amonyum sülfat miktarı ve t-bütanol oranlarına göre optimize edilmiştir. Bu optimize koşullarda maksimum %30,83 forskolin geri kazanımı elde edilmiştir. TPP sonrasında ticari enzim preparatları olan Stargen 002 ve Akselaraz 1500 kullanılması ve ultrasonları sonucunda sırasıyla %79,95 ve %83,85 geri kazanım ürünleri elde edilmiştir. Ayrıca bu işlemin 12 saat süren Soxhlet ekstraksiyonuna göre daha kısa sürede (4 saat) tamamlandığı görülmüştür. Her iki enzimin beraber kullanıldığı durumda verimin ciddi oranda arttığı görülmüştür. Bu yüzden, TPP sonrası enzim eklenmesinin (forskolin ekstraksiyonunda) kullanılması tavsiye edilmiştir.

Vetal ve ark., 2014. Bu çalışmada, *Ocimum sanctum* yapraklarından ultrasonla kombine edilmiş TPP yöntemi ile, ursolik asit (UO) ve oleanolik asitin (OA) ekstraksiyonu sağlanmış ve bu yöntem maksimum geri kazanım için optimize edilmiştir. TPP tekniği *O. sanctum* yapraklarından ursolik asit (UO) ve oleanolik asitin (OA) ekstraksiyonunda kullanılmasının mümkün olup olmadığı araştırılmıştır. En yüksek verimi elde edebilmek için ekstraksiyon verimine etki eden çeşitli parametrelerin (pH, amonyum sülfat doygunluğu, kaba ekstrakt/t-bütanol oranı, zaman ve substrat yoğunluğu) etkileri araştırılmıştır. Optimize edilmiş şartların şu şekilde olduğu bulunmuştur: zaman: 120 dk, pH:7,0, amonyum sülfat doygunluğu: %50 (w/v), kaba ekstrakt/t-bütanol oranı 1:1 (v/v), substrat miktarı %75. Optimize edilmiş şartlarda TPP yöntemi ile elde edilen en yüksek verimin ursolik asit (UO) ve

oleanolik asit (OA) için sırasıyla %79,48 ve %80,67 olduğu görülmüştür. Ancak 40 kHz ve 180 W güçteki UATPP ile bu verimin daha yüksek olduğu (%83,36 ve %85,58), ayrıca gerekli zamanın da sadece 14 dk olduğu görülmüştür. Son olarak, klasik çözücü ekstraksiyonu ve TPP-ultrasound ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmış ve TPP-Ultrasound yönteminin O. Sanctum yapraklarından ursolik asit (UA) ve oleanolik asit (OA) eldesi için oldukça ilgi çekici bir yöntem olduğu görülmüştür.

Avhad ve ark., 2014. Bu çalışma, Bacillus sphaericus MTCC 3672 suşundan fibrinolitik enzimin UATPP yöntemi ile elde edilmesini amaçlamıştır. Fibrinolitik enzimin UATPP işlemi, amonyum sülfat konsantrasyonu, pH, t-bütanolün besiyerine oranı, sıcaklık, ultrason frekansı, ultrason çıkış gücü ve işlem döngüsü gibi parametreler değiştirilerek çalışılmıştır. %65 geri dönüşüme sahip ve en fazla 16,15 kat saflığı elde edilmesini sağlayan optimum parametrelerin : %80 amonyum sülfat doygunluğu, pH:9,0, 30°C, 0,5 (v/v) t-bütanol/kültür oranı, 25 kHz frekans ve 150 W ultrason çıkış gücü, 5 dk'lık %40 işlem döngüsü ile elde edildiği anlaşılmıştır. Elde edilmiş enzimin SDS-PAGE analizi sonucunda, kısmi saflaştırma sonunda moleküler ağırlığının 55-70 kDa aralığında olduğu bulunmuştur. UATPP'nin arttırılmış kütle transferi sonucunda klasik TPP'ye göre daha yüksek kat saflaştırılmış fibrinolitik enzim elde edildiği ve işlemin 1 saatten 5 dk'ya indirildiği görülmüştür. Bulgularımız UATPP'nin etkili bir biyoaraştırma tekniği olduğunu vurgulamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler; potasyum sodyum tartarat, t-bütanol, sodyum hidroksit, amonyum sülfat, şükroz, 3,5-dinitro salisilik asit (DNS), sodyum karbonat, bakır (II) sülfat pentahidrat, Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi, fosforik asit, trisodyum sitrat, diyaliz kesesi, sığır albümini, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve diğer kimyasal ve sarf malzemeler, kimyasal malzeme satan firmalar aracılığı ile temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan cihazlar; vorteks cihazı (Dragon Lab MX-F), elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto), santrifüj cihazı (Hettich), etüv (elektro-mag), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Ika C-Mag HS 7), UV-visible spektrofotometre (Pharmacia), pH metre (Hanna). Kullanılan cihazlar Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya ve Biyoloji bölümleri laboratuvarından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kaba Ekstraktın Hazırlanması ve TPP Yöntemi



Şekil 3.1. Dondurulmuş *Momordica charantia* meyvesi

Momordica charantia meyvesi, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Dondurulmuş *Momordica charantia* meyvesi, mutfak robotunda hacmin 10 katı kadar fosfat

tamponu (0,2 M pH:5,0) içerisinde homojenize edilmiş ve sonrasında süzülerek süzütünün hacmi ölçülmüştür. (Sıcaklık çalışma boyunca 4°C civarında tutulmuştur).

3.2.2. Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Optimizasyonu



Şekil 3.2. %40; %50; %60 ve %70 amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiş örnekler

Ölçülen hacim 4'e bölünerek beherlere alınmıştır. Hacme göre birinci beherdeki örnek %40; ikinci beherdeki örnek %50; üçüncü beherdeki örnek %60 ve dördüncü beherdeki örnek %70 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek, düşük devirde manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Karışımlara 1:1 (v/v) oranında t-bütanol eklenerek 1 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Ortada oluşan katı faz, alt ve üst fazdan ayrılarak fosfat tamponu (0,2 M; pH:5,0) içerisinde çözdürülmüştür. Her biri için invertaz aktivite tayini yapılmış ve aktivitenin en yüksek olduğu amonyum sülfat doygunluğu oranı belirlenerek bundan sonraki işlemlerde bu doygunluk oranı kullanılmıştır.

3.2.3. Tersiyer bütanol Miktarının Optimizasyonu



Şekil 3.3. t-bütanol eklenmiş örnek

Optimum amonyum sülfat doygunluğuna getirilen örneğin hacmi ölçülerek 4'e bölünmüş ve beherlere alınmıştır. Hacme göre birinci beherdeki örneğe 1:0,5 (v/v); ikinci beherdeki örneğe 1:1 (v/v); üçüncü beherdeki örneğe 1:1,5 (v/v) ve dördüncü beherdeki örneğe 1:2 (v/v) oranında t-bütanol ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Ortada oluşan katı faz, alt ve üst fazdan ayrılarak fosfat tamponu (0,2 M; pH:5,0) içerisinde çözdürülmüştür. Her bir örnek için invertaz aktivite tayini yapıldıktan sonra en yüksek aktiviteye sahip olan t-bütanol oranı belirlenmiştir.

3.2.4. İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu



Şekil 3.4. Santrifüjlenmiş örnekler

Optimum t-bütanol ilavesine sahip örneğin hacmi ölçülerek hacim 3'e bölünmüş ve beherlere alınmıştır. Birinci beherdeki örnek 15 dk; ikinci beherdeki örnek 30 dk; üçüncü beherdeki örnek ise 60 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Ortada oluşan katı faz, alt ve üst fazdan ayrılarak fosfat tamponu (0,2 M; pH:5,0) içerisinde çözdürülmüştür. Her biri için invertaz aktivite tayini yapılmış ve aktivitenin en yüksek olduğu bekleme süresi belirlenmiştir.

Optimizasyonlar belirlendikten sonra, dondurulmuş *Momordica charantia* meyvesi mutfak robotunda hacmin 10 katı kadar fosfat tamponu (0,2 M pH:5,0) içerisinde homojenize edilerek süzümüştür (sıcaklık çalışma boyunca 4°C civarında tutulmuştur). Süzüntü hacmi ölçülmüş ve hacme göre optimum amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiştir. Hacme göre optimum oranda t-bütanol eklenmiş ve optimum bekleme süresinde bekletilmiştir. Örnek 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz atılmıştır. Alt ve orta faz 0,2 M; pH:5,0 fosfat tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Örnek diyaliz kesesine alınarak 0,2 M; pH:5,0 fosfat tamponu içerisinde (bir gece) diyaliz edilmiştir. Diyaliz süresince tampon 1 defa değiştirilmiştir. Diyalizden çıkan örnek için invertaz aktivite tayini ve

protein tayininde Vetel ve Rathod 2015’de verilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Diyaliz kesesi içerisinde alınmış örnek



Şekil 3.6. Diyaliz kesesi içerisindeki örneğin uygun tampon içerisine alınması

3.2.5. İnvvertaz Aktivite Tayini

Kör tüpü: 200 μ L 0,5 M sükröz
800 μ L 0,2 M (pH:5,0) fosfat tamponu

Örnek tüpü: 200 μ L 0,5 M sükröz
600 μ L 0,2 M (pH:5,0) fosfat tamponu
200 μ L enzim çözeltisi

Her bir tüpe yukarıdaki çözeltilerden belirtilen miktarlarda her biri için 3’er paralel olmak üzere eklenerek vortekslenmiş ve 37°C’de 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. Her tüpe 1 mL DNS reaktifi eklenerek 10 dk kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve UV-visible spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Yöntem Özer ve ark., 2010’da verilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.

DNS reaktifinin hazırlanması: Enzim aktivitesini durdurmak ve indirgen şeker miktarını saptamak amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL saf suda çözüldükten

sonra, 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH ilave edilerek, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Aira ve ark., 1983).

3.2.6. Lowry Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarını belirleyebilmek için protein standart çalışması yapmak gerekmektedir. Bu çalışma için Lowry ve ark., 1951'e göre protein tayini yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır.

A çözeltisi hazırlanması: 20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH karıştırılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

B çözeltisi hazırlanması: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ %1'lik trisodyum sitrat çözeltisi içerisinde çözülmüştür.

C çözeltisi hazırlanması: 50 mL A ve 1 mL B çözeltileri kullanılarak taze hazırlanmıştır.

Folin çözeltisi hazırlanması: 2:1 (v/v) oranında sırasıyla su ve folin eklenerek hazırlanmıştır.

Standart protein çözeltisi hazırlanması: 100 mL destile suda 50 mg sığır albümini olacak şekilde stok çözelti hazırlanmıştır.

Standart protein eğrisinin çizimi: 9 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 40, 80, 160, 240, 320, 560 ve 680 μL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur.

Kör tüpü: 1 mL su
5 mL C çözeltisi

Örnek tüpü: 50 μL örnek çözeltisi
950 μL su
5 mL C çözeltisi

Yukarıdaki çözeltilerden kör tüpü için 1, örnek tüpü için 4 paralel olmak üzere, belirtilen miktarlarda eklendikten sonra vortekslenerek 10 dk süreyle bekletilmiştir.

Her bir tüpe 500 µL folin eklenerek vorteksleme işlemi yapılmış ve tüpler yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. UV-visible spektrofotometre cihazında 660 nm dalgaboyunda absorbans okunmuştur.

3.2.7. *Momordica charantia* Meyvesinden Saflaştırılan İvertaz Enziminin Karakterizasyonu

3.2.7.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Enzimin çalıştığı en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla invertaz aktivite tayin yönteminde olduğu gibi, her bir tüpe 200 µL 0,5 M sükröz, 600 µL 0,2 M (pH:5,0) fosfat tamponu ve 200 µL enzim çözeltisi her bir tüp için 3'er paralel olmak üzere eklenerek vortekslenmiş ve farklı sıcaklıklarda (25, 37, ve 50°C'de) 30 dk süreyle inkübe edildikten sonra 1 mL DNS reaktifi eklenerek 10 dk süreyle kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve UV-visible spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda yöntemde belirtilen köre karşı absorbans ölçülmüş ve sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.2.7.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH'yı tespit etmek amacıyla invertaz aktivite tayin yönteminde kullanılan tampon çözeltide pH değişikliği yapılmıştır. Yöntemde kullanılan pH:5,0 tampon çözeltisinin yanında farklı pH'larda (pH: 4,0; 6,0; 7,0; ve 9,0'da) tampon çözeltiler kullanılmıştır. Her bir tüpe 200 µL 0,5 M sükröz, 600 µL 0,2 M belirtilen pH'larda fosfat tamponu ve 200 µL enzim çözeltisi her bir tüp için 3'er paralel olmak üzere eklenerek vortekslenmiş ve 37°C'de 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklere 1 mL DNS reaktifi eklenerek 10 dk süreyle kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve UV-visible spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda yöntemde belirtilen köre karşı absorbanları ölçülmüş ve sonrasında sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.2.7.3. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum tampon derişimini tespit etmek amacıyla invertaz aktivite tayin yönteminde kullanılan tampon çözeltinin derişiminde değişiklik yapılmıştır. Yöntemde kullanılan 0,2 M fosfat tamponunun yanında 0,3; 0,5; 0,7 M derişimlerde tampon çözeltiler kullanılmıştır. Her bir tüpe 200 µL 0,5 M sükröz, 600 µL (pH:5,0) belirtilen derişimde fosfat tamponu ve 200 µL enzim çözeltisi her bir tüp için 3'er paralel olmak üzere eklenerek vortekslenmiş ve 37°C'de 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. Örneklere 1 mL DNS reaktifi eklenerek 10 dk süreyle kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve UV-visible spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda yöntemde belirtilen köre karşı absorbansları ölçülmüştür. Sonrasında sonuçlar kıyaslanmıştır.

Glukozun ekstinksiyon katsayısı denklem (1.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Stevia rebaudiana* Yapraklarında İvertaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Stevia rebaudiana yapraklarından hazırlanan kaba homojenatta bakılan invertaz enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuş (0,227 U/mL, 3,182 U/mg prot) ve TPP işlem basamaklarında bu düşük aktivitedeki enzimin de çeşitli nedenlerle kaybedilebileceği göz önünde bulundurularak, *Stevia rebaudiana*'nın TPP yöntemi ile invertaz enziminin saflaştırılması için iyi bir kaynak olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.2. *Momordica charantia* Çekirdekleri ve Meyvesinde İvertaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Momordica charantia peroksidaz enzimiyle yapılan bir çalışmada *Momordica charantia* peroksidazının karaturp peroksidazına göre fitoterapik ve çevresel araştırmalarda, ayrıca biyoteknolojik uygulamalarda daha iyi bir alternatif olduğu bildirilmiştir (Fatima ve ark., 2007). Bu da, *Momordica charantia*'nın fitoterapik açıdan iyi bir enzim kaynağı olduğunu düşündürmüştür.

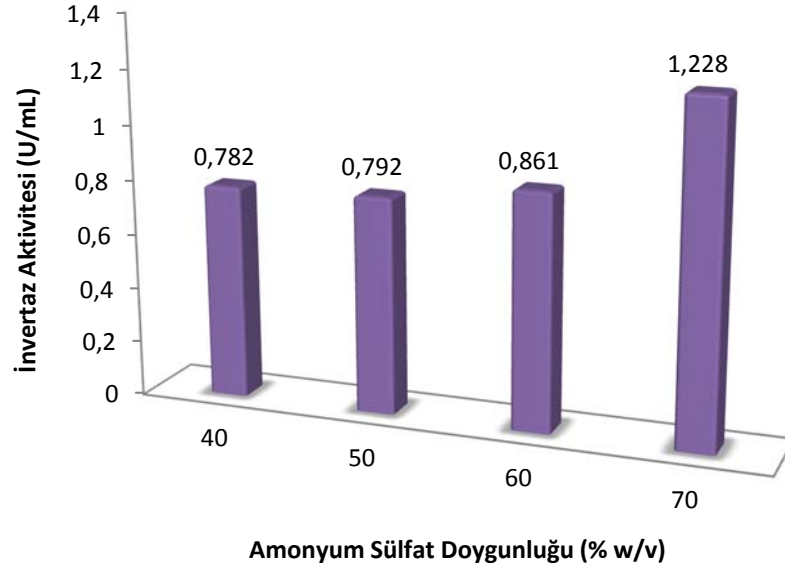
Yapılan çalışmada *Momordica charantia* bitkisinin olgun kırmızı çekirdeklerinin kaba homojenatında invertaz enzimi aktivitesi 7,897 U/mL olarak bulunmuşken, sarı olgun meyve kısmından hazırlanan kaba homojenatta 7,555 U/mL olarak bulunmuştur. Çekirdeklerde meyvesine nazaran daha yüksek invertaz aktivitesi bulunmasına rağmen, fitoterapik amaçlı yaygın olarak kullanılan yerinin meyvesi olması ve enzim kaynağı temini açısından miktar olarak daha uygun oluşundan dolayı, enzim kaynağı olarak tüm çalışmada meyve kısmı kullanılmıştır.

4.3. TPP Yönteminin Optimizasyonu

4.3.1. Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Optimizasyonu

TPP yönteminin amonyum sülfat ile proteinlerin çöktürülmesi basamağında, invertaz aktivitesinin en yüksek olduğu amonyum sülfat doygunluğu %70 olarak belirlenmiştir. Bu doygunlukta invertaz aktivitesi 1,228 U/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1). Amonyum sülfat konsantrasyonu protein-protein etkileşimi ve dolayısıyla proteinlerin hidrofobik etkileşimler sonucu çökmesi (salting out) ile yakından ilgilidir. Proteinlerin çözünürlüğü, buldukları çözeltilerdeki tuz konsantrasyonuna göre farklılık göstermektedir. %70 amonyum sülfat doygunluğunda üst fazdaki invertaz aktivitesi düşmüş ve buna karşılık orta ve alt fazda en yüksek aktivitenin elde edildiği bölümlere gerçekleşmiştir. %70'den düşük konsantrasyonlardaki amonyum sülfat, invertazın hidrofobik yüzeyinde yeterli değişim yapmamış olabilir. Bu nedenle orta ve alt fazda invertaz aktivitesi daha düşük gözlenmiştir. Bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında bu amonyum sülfat oranı kullanılmıştır.

Literatürde, optimum amonyum sülfat doygunluğu hamur mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) saflaştırılan invertaz enzimi için %50 (Akardere ve ark., 2010), *Aspergillus oryzae* kaba ekstraktından saflaştırılan enzim için %30 (Dhananjay ve Mulimani, 2008) olarak bulunmuş ve domatesten saflaştırılan enzim için %50 amonyum sülfat doygunluğu (Özer ve ark., 2010) tercih edilmiştir. Farklı kaynaklardan saflaştırılan invertaz enzimi için optimum amonyum sülfat doygunluğunun %30-70 aralığında farklılık gösterdiği görülmektedir.

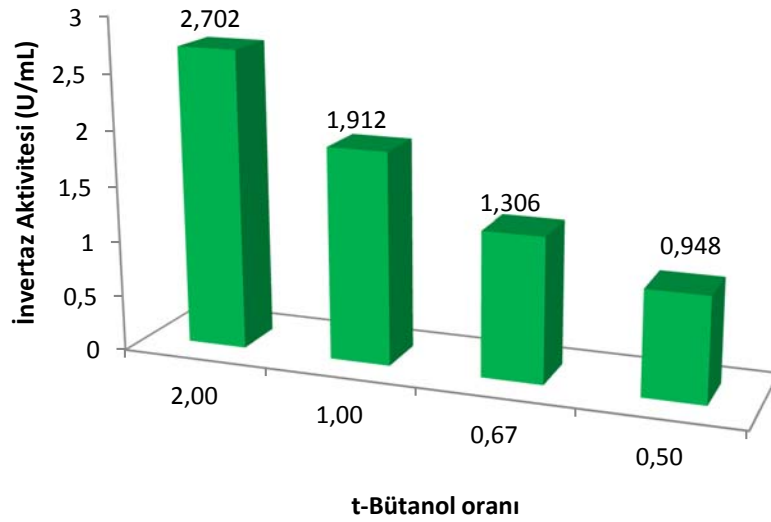


Şekil 4.1. Amonyum sülfat doygunluğuna göre invertaz aktivitesinin değişimi

4.3.2. Tersiyer bütanol Miktarının Optimizasyonu

Tersiyer bütanolün *Momordica charantia* invertazının üç fazlı bölümlemeyle saflaştırılmasındaki etkisi araştırılmıştır. Organik çözücü olarak t-bütanolün tercih edilme nedeni diğer çözücülere göre birçok avantajının olması ve benzer çalışmalarda da kullanılıyor olmasıdır (Dennison ve Lovrien, 1997). Değişen t-bütanol oranlarına karşılık yapılan aktivite ölçümleri sonucu en iyi invertaz aktivitesi 2,702 U/mL ile 1/0,5 kaba ekstrakt/t-bütanol oranında gözlenmiştir (Şekil 4.2). Tersiyer bütanolün amonyum sülfatın varlığında eklenmesi, proteinleri solüsyondan en alttaki sıvı katmanla üstteki organik katman arasında oluşan bir ara çökelme katmanına itmektedir (Saxena ve ark., 2007). Tersiyer bütanol kirleticileri uzaklaştırarak (Dennison ve Lovrien, 1997) üçlü fazın oluşmasını sağlamaktadır ve 1/0,5 (v/v) oranında bunu en iyi yapmıştır. Tersiyer bütanol oranı azaldıkça enzimin aktivite kazanımı düşmüştür. Yüksek t-bütanol oranlarında sulu fazdan t-bütanol fazına daha fazla su geçmiş ve böylece sulu fazın tuz konsantrasyonu artmış olabilir. Böylece daha yüksek aktivite elde edilmiş olunabilir. Tersiyer bütanol oranı 2 (1:0,5) iken, enzimin katlanmış üç boyutlu yapısının içine girememiş ve bu nedenle enzim denatüre olmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, optimizasyon çalışması sonucu

bulunan en iyi tersiyer bütanol oranı (1/0,5), kullanılmıştır. Literatürde TPP yöntemi ile hamur mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) invertaz enzimi saflaştırılması için optimum t-bütanol oranı, benzer şekilde 1:0,5 bulunmuştur (Akardere ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada ise *Aspergillus oryzae* kaba ekstraktından invertaz enzimi saflaştırılması için optimum t-bütanol oranı 1:1 olarak bulunmuştur (Dhananjay ve Mulimani, 2008). Enzimin saflaştırıldığı kaynağa göre t-bütanol oranı farklılık gösterebildiğinden, t-bütanol için optimizasyon çalışması yapmanın, TPP yöntemi ile çalışırken önem arz ettiği ortadadır.

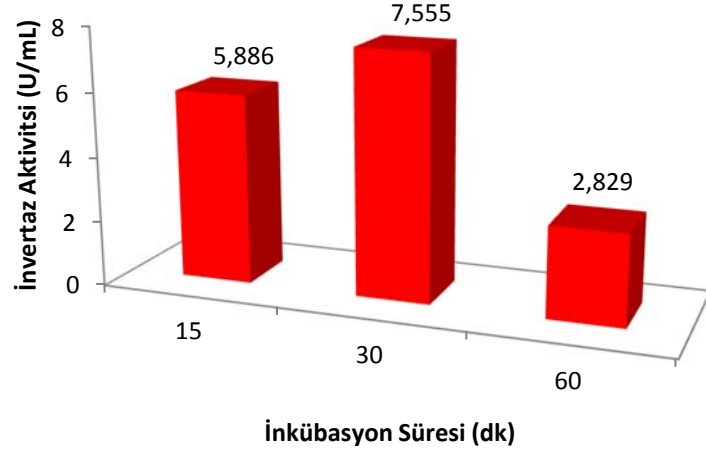


Şekil 4.2. t-bütanol oranına göre invertaz aktivitesindeki değişim

4.3.3. İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Literatürler incelendiğinde, TPP yönteminin optimizasyonunda inkübasyon süresinin sıklıkla çalışılan bir parametre olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada, *Momordica charantia*'dan invertaz enziminin TPP yöntemi ile saflaştırılması için üç farklı inkübasyon süresi denenmiş (15, 30, 60 dk) , en iyi invertaz aktivitesi (7,555 U/mL) gözlenen süre, 30 dk olarak bulunmuştur. 60 dk'lık inkübasyon süresinde aktivitede %63 oranında bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu durum bu süre zarfında enzimin bir miktar inhibe olduğunu göstermektedir. 15 dk'lık inkübasyon süresinde ise tam bölümlene gerçekleşmemiştir ki aktivite 30 dk'lık sürede gözlenen aktivitenin altında kalmıştır (5,886 U/mL). Enzim aktivitesinin bu denli

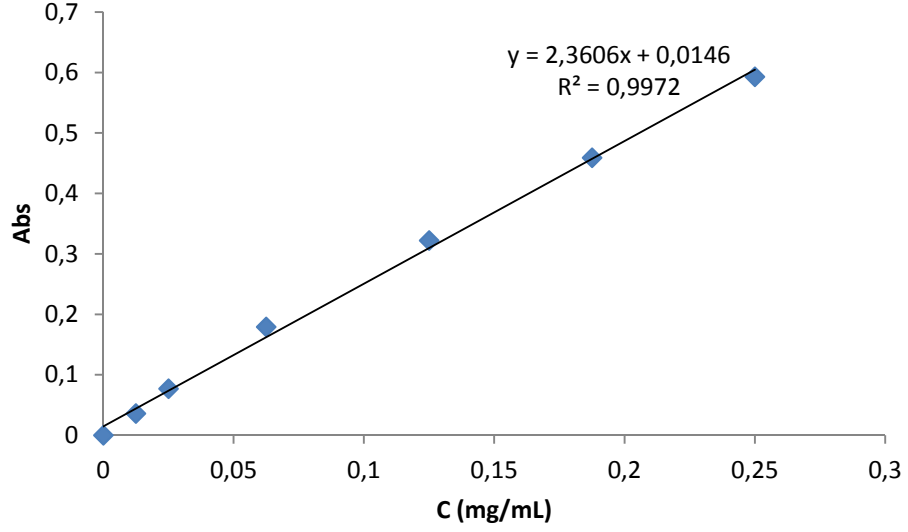
süreye bağımlılığı, inkübasyon süresinin, yöntemin hassasiyetinde önemli parametrelerden biri olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.3. İnkübasyon süresine bağlı olarak invertaz aktivitesindeki değişim

4.4. Lowry Protein Tayini

Lowry yöntemine göre yapılan standart protein tayini çalışması sonucu Şekil 4.4'deki grafik elde edilmiştir. Hazırlanan standart BSA'ların artan konsantrasyonuna karşılık UV- visible spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri artış göstererek doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Grafiğin R^2 değeri 0,9972, doğrunun denklemi ise $y=2,3606x + 0,0146$ olarak bulunmuştur. Çalışmadaki proteinle ilgili tüm hesaplamalar bu denkleme göre yapılmıştır.



Şekil 4.4. Lowry 1951 yöntemi ile BSA standart protein grafiği

4.5. İvertaz Enziminin Optimum Koşullarda TPP Yöntemi İle Saflaştırma Değerleri

Momordica charantia'dan invertaz enziminin TPP yöntemi ile saflaştırılması sonucunda elde edilen aktivite değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Toplam protein kaba homojenatta 34,86 mg iken TPP sonrası 0,675 mg olarak bulunmuştur. Toplam proteinde kaba homojenatla TPP sonrası fark olması işlem sonrası proteinlerin çoğunun elimine edildiğinin bir göstergesidir. 1 mg protein başına aktivite değerleri dikkati çeken diğer parametrelerdendir. Kaba homojenatta 21,672 U/mg protein olan spesifik aktivite değeri, TPP sonrasında 227,022 U/mg protein olarak artmıştır. Buradan invertazın 10,48 kat saflaştırıldığı açıkça görülmektedir.

Havuçtan (*Dacus carrota*) TPP yöntemi kullanılarak saflaştırılan fosfolipaz-D 13 kat saflaştırılmıştır (Sharma ve Gupta, 2001). Yine TPP yöntemi ile papaya kabukları proteazları 15.8 kat izole edilmiş (Chaiwut ve ark., 2010), bir diğer çalışmada, pepinodan (*Solanum muricotum*) α -galaktosidaz enzimi 6,2 kat saflaştırılmıştır (Şen ve ark., 2011). Ganoderma sp. WR-1 türünün fermentasyon kültürlerinden lakkaz enzimi TPP yöntemi ile 13,2 kat saflaştırılmıştır (Rajeeva ve Lele, 2011). *Momordica charantia*'dan invertaz enziminin TPP yöntemi ile saflaştırıldığı bu

çalışmada ise 10,48 kat saflaştırma yapılmış ve literatürdeki ortalama saflaştırma katı elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, *Aspergillus oryzae* kaba ekstraktından TPP yöntemiyle saflaştırılan invertaz enzimi toplam proteininin kaba homojenatta 13,5 mg iken TPP sonrası sulu fazda 6,0 mg, ara (orta) fazda 0,6 mg; spesifik aktivitesinin kaba homojenatta 0.44 U/mg, TPP sonrası ise sulu fazda 0,7 U/mg, ara fazda 5,2 U/mg; saflaştırma katının sulu fazda 61, ara fazda 12; veriminin ise sulu fazda %1,4, ara fazda %54 olduğu (Dhananjay ve Mulimani, 2008); domatesten TPP yöntemiyle saflaştırılan invertaz enzimi toplam proteininin kaba homojenatta 1,9 mg iken TPP sonrası sulu fazda 0,23 mg, ara fazda 0,42 mg; spesifik aktivitesinin kaba homojenatta 60,5 U/mg, TPP sonrası ise sulu fazda 0,01 U/mg, ara fazda 519 U/mg; saflaştırma katının ara fazda 8,6; veriminin ise sulu fazda %0,002, ara fazda %190 olduğu (Özer ve ark., 2010); hamur mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) TPP yöntemiyle saflaştırılan invertaz enzimi toplam proteininin kaba homojenatta 1,56 mg iken TPP sonrası sulu fazda 0,38 mg, ara fazda 0,23 mg; spesifik aktivitesinin kaba homojenatta 175 U/mg, TPP sonrası ise sulu fazda 2608 U/mg, ara fazda 78 U/mg; saflaştırma katının sulu fazda 15, ara fazda 0,5; veriminin ise sulu fazda %363, ara fazda %6,6 olduğu (Akardere ve ark., 2010) bildirilmiştir. Literatür bulgularına bakıldığında bu çalışmada invertaz enziminin spesifik aktivitesi ortalama bir değerdedir (227,022 U/mg protein). Kaba homojenattaki 34,86 mg proteini TPP işlemi sonrası 0,675 mg proteine inmiştir (Çizelge 4.1). İstenmeyen proteinlerin eliminasyonu tek basamağa göre idealdir.

TPP yöntemi ile tek basamakta saflaştırma işleminde verimin yüksek olması istenmektedir. Az basamak kullanılması enzim kaybına ve denatürasyona mani olmaktadır. Literatürde ara faz ve sulu fazlardaki saflaştırma katının farklılık gösterdiği görülmektedir. Dhananjay ve Mulimani'nin 2008'de yaptığı çalışmada sulu fazda 61, ara fazda ise 12 kat; Özer ve arkadaşlarının 2010'da yaptığı çalışmada ara fazda 8,6 kat; Akardere ve arkadaşlarının 2010'da yaptığı çalışmada ise sulu fazda 15, ara fazda ise 0,5 kat olarak bulunmuştur. Saflaştırma katı genel olarak sulu faza göre ara fazda daha yüksektir (Özer ve ark., 2010; Dhananjay ve Mulimani, 2008); fakat sulu fazda yüksek olmasının da mümkün olduğu literatürde (Akardere

ve ark., 2010) görülmektedir. Proteinin bir kısmı sulu faza geçmiş olabilir. Bu sebeple orta ve alt fazın birlikte olduğu kısımda çalışmak daha faydalı olacağı düşüncesiyle çalışmada birleştirilerek kullanılmıştır. Görüldüğü üzere literatürlerde TPP yöntemi ile invertaz enziminin saflaştırılmasında geniş yelpazelerde verim elde edilmiş ve *Momordica charantia* invertazının da bu aralıkta bir verimle (%20,28) kısmi saflaştırılması başarılmıştır.

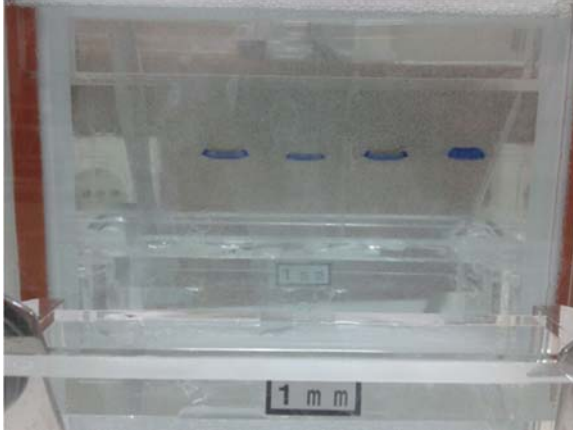
Çizelge 4.1. İvertaz enziminin optimum koşullarda TPP yöntemi ile saflaştırma değerleri

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Toplam Aktivite (U)	Verim (%)	Saflaştırma katı
Kaba Homojenat	100	7.555	0.3486	34.86	21.672	755.5	100	1
TPP sonrası	30	5.108	0.0225	0.675	227.022	153.24	20.28	10.48

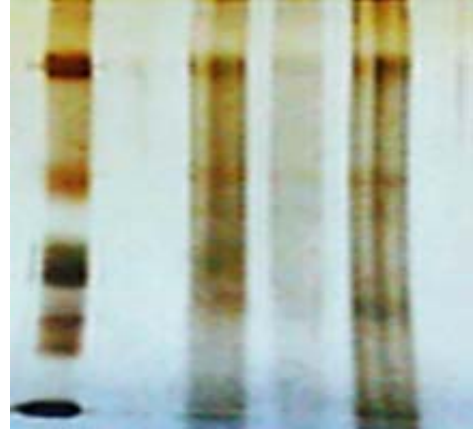
4.6. Saflaştırılan İvertazın SDS-PAGE Elektrofrez İle Saflık Kontrolü

Çalışmada, invertaz enziminin TPP yöntemi ile tek başına mı yoksa kısmen mi saflaştırıldığını anlamak için (saflık kontrolü) örnekler SDS-PAGE elektroforeze yüklenmiştir (Şekil 4.5.a.). Bant sayısının TPP sonrası, kaba homojenata göre azalması invertazın kısmen saflaştırıldığının bir kanıtı olmuştur. Kaba homojenatta bant sayısı fazla iken, TPP sonrası keskin 4 bant seçilmektedir (Şekil 4.5.b.). Ancak görüntüleme tekniğinin hassas olmayışı ve elektrofrez bantlarının dağınık olması nedeniyle bant sayısı ve dolayısıyla TPP öncesi ve sonrası protein türü sayısı hakkında net bir bilgi elde edilememiştir.

a)



b)



I

II

III

Şekil 4.5. a) Kaba homojenat, amonyum sülfat presipitatu ve TPP ile kısmen saflaştırılmış enzimin %15'lik elektroforez jeline yüklenmiş ve 45mA, 200 V da yürütülüyorken görüntüsü. b) Elektroforez sonrası jelin gümüş boyama ile boyanmasıyla görüntülenen protein bantları. (I: Protein marker, II: Kaba homojenat, III: TPP sonrası)

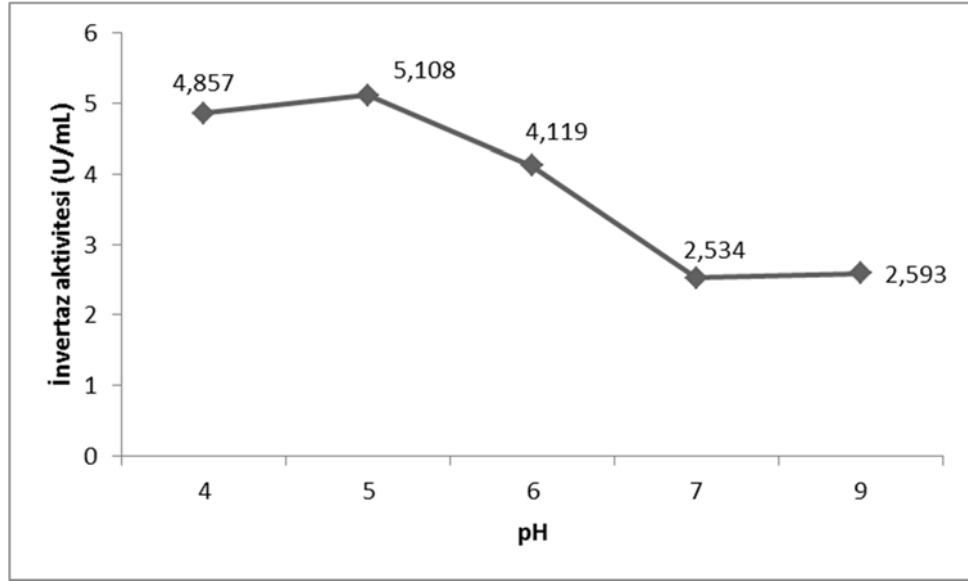
4.7. TPP Yöntemi İle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Optimum Parametreleri

Momordica charantia bitkisinden TPP yöntemi ile tek basamakta yapılan saflaştırma işleminden sonra kısmi olarak saflaşan enzimin çalıştığı üç parametre (pH, sıcaklık ve tampon derişimi) karakterize edilmiştir. Bulunan değerler *Momordica charantia* invertazı ile yapılacak başka çalışmalara ışık tutmaktadır.

4.7.1. *Momordica charantia* İvertazının Optimum pH'sı

pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ve 9,0 için denenen aktivite ölçümlerinde, en yüksek invertaz aktivitesi 5,108 U/mL ile pH 5,0'da gözlenmiştir (Şekil 4.6). Saflaştırılan invertaz asit invertazıdır. Literatürde *Aspergillus oryzae* kaba ekstraktından saflaştırılan invertaz enzimi için optimum pH'nın 5,0 olması (Dhananjay ve Mulimani, 2008) bulgumuzu desteklemektedir. Diğer bir çalışmada hamur mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) saflaştırılan invertaz enziminin optimum pH'sı 4,0 olarak bulunmuştur (Akardere ve ark., 2010). Özer ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada ise, domatesten saflaştırılan invertaz enziminin optimum pH'sı 4,5 olarak bulunmuştur. Anlaşılacağı üzere bitkisel kaynaklardan saflaştırılan

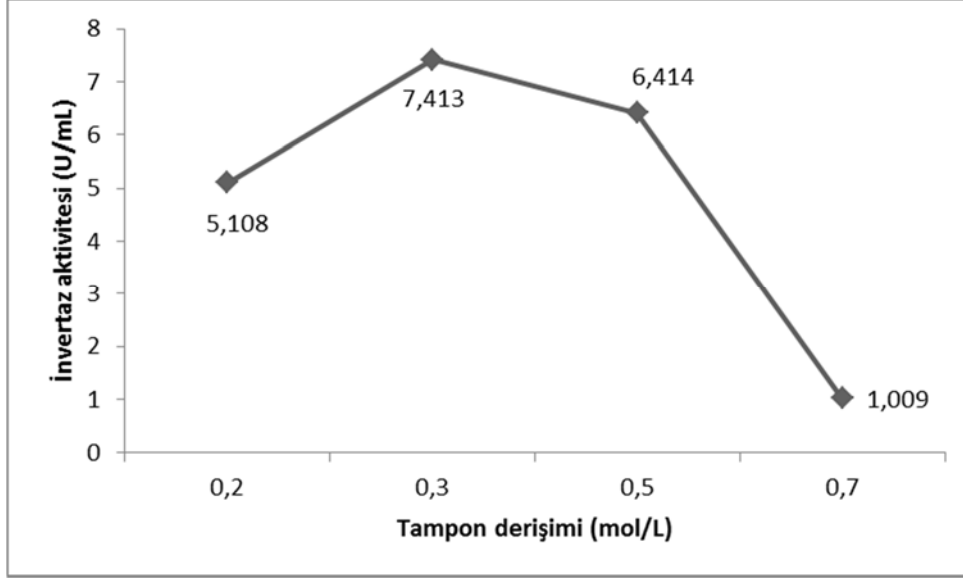
invertaz enzimi pH:4,0-5,0 aralığında (asidik bölgede) maksimum aktivite göstermektedir.



Şekil 4.6. *Momordica charantia* invertazının farklı pH'larda gösterdiği aktiviteler

4.7.2. *Momordica charantia* İvertazının Optimum Tampon Derişimi

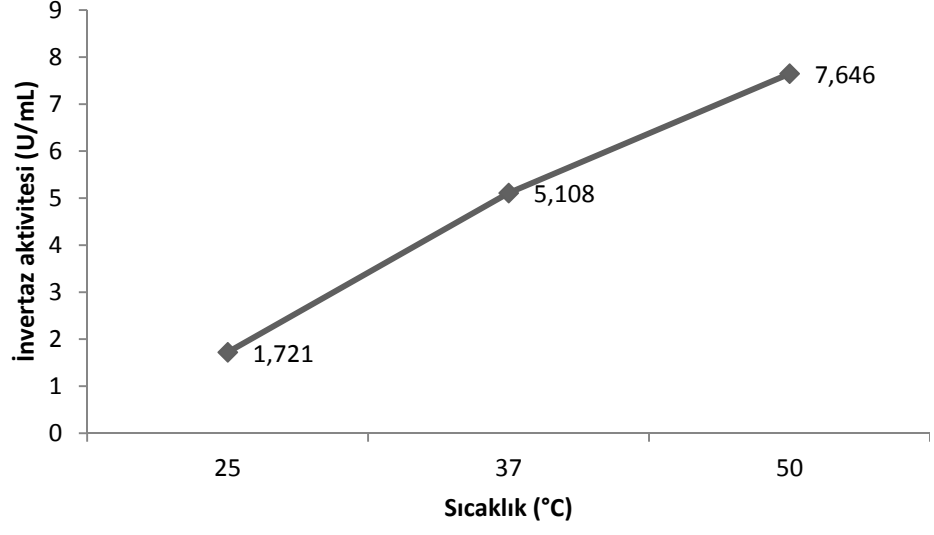
Kısmen saflaştırılan invertaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği tampon derişimini test etmek amaçlı dört farklı tampon çözelti kullanılarak aktivite ölçülmüştür. Sonuç olarak en yüksek aktivite, 0,3 M, pH:5,0 tampon çözeltisi kullanıldığında 7,413 U/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Literatürler incelendiğinde optimum tampon derişimi ile ilgili çalışmaların sıklıkla yapılmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.7. *Momordica charantia* invertazının farklı tampon derişimlerinde gösterdiği aktiviteler

4.7.3. *Momordica charantia* İnvertazının Optimum Sıcaklığı

Enzim konfigrasyonunu ve kararlılığını etkileyen en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Çalışmada kısmi saflaştırılan invertaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıktaki enzim aktivitesi 7,646 U/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8). Enzimin yüksek sıcaklıklarda çalışıyor olması, termofilik bir enzim olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde Akardere ve ark., (2010)'nın yılında yaptıkları çalışmada hamur mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) saflaştırılan invertaz enziminin optimum sıcaklığının 60°C olması invertaz enziminin yüksek sıcaklıkta daha iyi çalıştığını gösteren bir başka bulgudur.



Şekil 4.8. *Momordica charantia* invertazının farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktiviteler

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma invertaz enziminin daha önce hiç saflaştırılmadığı bir kaynak olan *Momordica charantia* bitkisinden TPP yöntemiyle invertazın kısmi saflaştırılması için ideal bir çalışma olarak kabul edilebilir. Çalışma bulguları ve invertazın daha önce TPP yöntemi ile başka kaynaklardan saflaştırılmış olduğu çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlara rastlanmıştır, hatta enzimin spesifik aktivitesi, saflaştırma katı ve saflaştırma verimi bakımından bazı çalışmalara göre üstünlük sağladığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak bu çalışmayla, TPP yöntemi kullanılarak daha önce hiç bu alanda çalışılmamış bir kaynak olan, *Momordica charantia* bitkisinden iyi verimle kısa zamanda saflaştırma yapılabileceği görülmüş ve optimizasyon bulguları ile bu alanda literatüre katkı sağlanmıştır. Literatürden, yine TPP içeren, daha kısa zamanda uygulanabilecek bir yöntem olduğu anlaşılan UATPP yönteminin de daha sonraki çalışmalarda kullanılabileceği öngörülebilir. (Avhad ve ark., 2014; Vetal ve ark., 2014). Bundan sonraki çalışmalarda TPP yöntemine ek bir yöntem daha eklenerek *Momordica charantia* invertazının tek başına (yüksek saflıkta) saflaştırılabileceği umulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett M., John, A., Raza, H., Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes Res Clin Pract* 51(3), 155–61, 2001.
- Aira, S., Kılal, K., Imanaka, A., Cloning and Expression of Thermostable α -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1059-1065, 1983.
- Akardere, E., Özer, B., Çelem, E.B., Önal, S., Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast, *Separation and Purification Technology*, 72, 335-339, 2010.
- Avhad, D.N., Sonali, S.N., Rathod, V.K., Ultrasound assisted three phase partitioning of a fibrinolytic enzyme, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 628-633, 2014.
- Behera, T.K., Gaikward, A.B., Singh, A.K., Staub, J.E., Short Communication Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.), *Journal of the Science of Food and Agriculture J. Sci Food Agric*, 88, 733–737, 2008.
- Behera, T.K., Heterosis in bitter gourd, In: Singh, P.K., Dasgupta, S.K., Tripathi, S.K. (Eds.), *Hybrid Vegetable Development*, The Haworth Press, New York, USA, 217–221, 2004.
- Bhatti, H.N., Asgher, M., Abbas, A., Nawaz, R., Sheikh, M.A., Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*, *J. Agric. Food Chem*, 54, 4617–4623, 2006.
- Boyer, R.F., *Modern Experimental Biochemistry*, 2nd Ed, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California, 75-80, 1993.
- Braca, A., Siciliano, T., D'Arrigo, M., Germanò, M.P., Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil, *Fitoterapia*, 79, 123–125, 2008.

- Brown, D., The Royal Horticultural Society, Encyclopaedia of Herbs and Their Uses
Fist Education, London, First Edition Pablished in Greal Britain in 1995.
- Chaiwut, P., Pintathong, P., Rawdkuen, S., Extraction and three-phase partitioning
behavior of proteases from papaya peels, *Process Biochemistry*, 45, 1172-
1175, 2010.
- Chakravarty, H.L., Cucurbits of India and their role in the development of vegetable
crops, in *Biology and Utilization of Cucurbitaceae*, (ed. by Bates, D.M.,
Robinson, R.W., and Jeffrey, C.) Cornell University Press, Ithaca, NY, 325–
334, 1990.
- Cheng, L.Y., Tang, L., Yan, F., Wang, S., Chen, F., The effects of the total saponin
extract from the shoots of *Momordica charantia* L. on anti-virus HSV-II
activity, *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)* 41(3), 641–3, 2004.
- Collins, K.D., Washabaugh, M.W., The Hofmeister effect and the behavior of water
at interfaces, *Quart. Rev. Biophys*, 18, 323–422, 1985.
- Cortes, R., Hernandez-Ceruelos, A., Torres-Valencia, J.M., Gonzalez-Avila, M.,
Arriaga-Alba, M., Mmadrigal-Bujaidar, E., Antimutagenicity of stevia pilosa
and stevia eupatoria evaluated with the ames test. *Toxicology in vitro*. 21(4):
691-697, 2007.
- David, A.E., Wang, N.S., Yang, V.C., Yang, A.J., Chemically surface modified gel
(CSMG): an excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes,
J. Biotechnol, 125, 395–407, 2006.
- Dennison, C., Lovrien, R., Three Phase Partitioning: Concentration and Purification
of Proteins, *Protein Expression and Purification*, 11, 149–161, 1997.
- Dhananjay, S.K., Mulimani, V.H., Purification of α -galactosidase and invertase by
three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol
Lett*, 30, 1565–1569, 2008.
- Ersöz, H., Alkoldehidrogenaz (ADH) Enziminin Tavuk Karaciğerinden
Saflaştırılması ve Florisil Üzerine İmmobilizasyonu, Çukurova Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2010.
- Fatima, A., Husain, Q., Khan, R.H., A peroxidase from bitter gourd (*Momordica
charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A

- comparison with horseradish peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47, 66-71, 2007.
- Gaur, R., Sharma, A., Khare, S.K., Gupta, M.N., A novel process for extraction of edible oils Enzyme assisted three phase partitioning (EATPP), *Bioresource Technology*, 98, 696-699, 2007.
- Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, *J. Ethnopharmacol*, 81, 81–100, 2002.
- Grover, J.K., Yadav, S.P., Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review, *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 123–132, 2004.
- Gürbüz, I., Akyüz, C., Yesilada, E., Sener, B., Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 7, 77–82, 2000.
- Harde, S.M., Singhal, R.S., Extraction of forskolin from *Coleus forskohlii* roots using three phase partitioning, *Separation and Purification Technology*, 96, 20-25, 2012.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Islam, S., Total Phenolic Contents and Phenolic Acid Constituents in 4 Varieties of Bitter Melons (*Momordica charantia*) and Antioxidant Activities of their Extracts, *Journal of Food Science*, 70, 4, 2005.
- Hussain, A., Rashid, M.H., Perveen, R., Ashraf, M., Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 188-194, 2009.
- Jayasooriya, A.P., Sakono, M., Yukizaki, C., Kawano, M., Yamamoto, K., Fukuda, N., Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol – free and cholesterol – enriched diets, *J. Ethnopharmacol*, 72, 331–6, 2000.
- Karkaş, T., İkili-faz ayırma sistemlerinin geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bornova, İzmir, 2009.
- Kat, B., Keskin, S.Y., Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 17, 2, 291-294, 2013.

- Khanna, P., Mohan, S., Isolation and identification of diosgenin and sterols from fruits and in vitro cultures of *Momordica charantia* Linn, Indian Journal of Experimental Biology, 11, 58-60, 1973.
- Klibanov, A.M., Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts, Science, 219, 722-727, 1983.
- Koller, E., Javanese medicinal plants used in rural communities, Diplomarbeit (Yüksek Lisans Tezi). Durchgeführt am Department für Pharmakognosie Universität Wien, 206, 2008.
- Kotwal, S.M., Shankar, V., Immobilized invertase, Biotechnol. Adv., 27, 311–322, 2009.
- Krawinkel, M.B., MD., Güdrün, B.K., MSc agr, Bitter Gourd (*Momordica charantia*): A Dietary Approach to Hyperglycemia, Special Article, (I)331–337, 2006.
- Kubola, J., Siriamornpun, S., Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro, Food Chemistry, 110, 881–890, 2008.
- Kumar, K.P.S., Bhowmik, D., Traditional Medicinal Uses and Therapeutic Benefits of *Momordica charantia* L., International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 4, (3), 23-28, 2010.
- Liu, C.H., Yen, M.H., Tsang, S.F., Gan, K.H., Hsu, H.Y., Lin, C.N., Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*, Food Chemistry, 118, 751–756, 2010.
- Lolitkar, M.M., Rao, M.R.R., Pharmacology of a hypoglycaemic principle isolated from the fruits of *Momordica charantia* L., Indian Journal of Pharmacy, 28, 129-133, 1966.
- Lovrien, R.E., Conroy, M.J., Richardson, T.I., Molecular basis for protein separations in “Protein–Solvent Interactions” (Gregory, R. B., Ed.), Dekker, New York, 521–553, 1994.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Rondall, R.J., Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- Matulis, D., Lovrien, R., Coprecipitation of proteins with matrix ligands: Scaleable protein isolation, J. Mol. Recognition, 9, 433–443, 1996.

- Murakami, T., Emoto, A., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Medicinal foodstuffs, Part XXI, Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides, goyaglycosides-a. -b. -c. -d. -e. -f. -g. and -h. and new oleanane-type triterpene saponins, goyasaponins I. II.III. from the fresh fruit of Japanese *Momordica charantia* L. Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 49, 54–63, 2001.
- Narayan, A.V., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., Extraction and Purification of *Ipomoea* Peroxidase Employing Three-phase Partitioning, Appl Biochem Biotechnol, 151, 263-272, 2008.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, 243-244, 2000.
- Nerurkar, P.V., Lee, Y.K., Linden, E.H., Lim, S., Pearson, L., Frank, J., Nerurkar, V.R., Lipid lowering effects of *Momordica charantia* (Bitter Melon) in HIV-1 protease inhibitor-treated human hepatoma cells. HepG2., British Journal of Pharmacology, 148, 1156–1164, 2006.
- Nunes, A.P.M., Ferreira-Machado, S.C., Nunes, R.M., Nantas, F.J.S., de Mattas, J.C.P., Caldeira-de-Araujo, A., Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. Food and Chem Toxicol. 45:662-666, 2007.
- 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.
- Panagariya, A., Dixit, V.P., Hypoglycemic Activity of Polypeptide-P From A Plant Source, Laboratory Of Plant Physiologp and Biochemistry, Departniient Of Botany, Cnieersity Of Ralasthan, India, 2004.
- Parkash, A., Ng T.B., Tso, W.W., Purification and characterization of charantin a napin-like ribosome-inactivating peptide from bittergourd (*Momordica charantia*) seeds, Journal of Peptide Research, 59, 197–202, 2002.
- Paul, A., Raychaudhuri, S.S., Medicinal Uses and Molecular Identification of Two *Momordica charantia* Varieties – a review, Electronic Journal of Biology, 6(2), 43-51, 2010.
- Peterson, E.A., Sober, H.A., Chromatography of Proteins, I. Cellulose Ion-exchange Adsorbents, J. Am. Chem. Soc, 78 (4), 751–755, 1956.

- Pol, M.C., Deutsch, H.F., Visser, L., Purification of soluble enzymes from erythrocyte hemolysates by three phase partitioning, *Int. J. Biochem*, 22, 179–185, 1990.
- Raj, M., Prasanna, N.K.P., Peter, K.V., Bitter gourd *Momordica ssp.* In: Kalloo. G.. Berg. B.O. (Eds.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, Pergmon Press, Oxford, UK, 239–246, 1993.
- Rajeeva, S., Lele, S.S., Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp. WR-1*, *Biochemical Engineering Journal*, 54, 103-110, 2011.
- Rangahau, M.K., *Balsam pear*, Crop & Food Number 102, New Zealand, 2002.
- Reyes, B.A.S., Bautista, N.D., Tanquilut, N.C., Anunciado, R.V., Leung, A.B., Sanchez, G.C., Magtoto, R.L., Castronuevo, P., Tsukamura, H., Maeda, K.I., Anti-diabetic potentials of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and their effects on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 196–200, 2006.
- Richard, D., (2009). Questions and answers about stevia www.stevia.com/SteviaArticle.asp?Id=2269 Erişim tarihi 25.01.2009.
- Roopashree, T.S., Dang, R., RH, S.R., C, N., Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*, *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(3), 20-28, 2008.
- Saxena, L., Iyer B.K., Ananthanarayan, L., Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor, *Process Biochemistry*, 42, 491-495, 2007.
- Senanayake, G.V.K., Maruyama, M., Shibuya, K., Sakono, M., Fukuda, N., Morishita, T., Yukizaki, C., Kawano, M., Ohta, H., The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 257–262, 2004.
- Sharma, S., Gupta M.N., Purification of Phospholipase D from *Dacus carota* by Three-Phase Partitioning and Its Characterization, *Protein Expression and Purification*, 21, 310-316, 2001.

- Steviarebaudiana*.Erişimadresini: http://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_3009.aspx Erişim Tarihi: 25.05.2014.
- Sumanth, M., Chowdary, G. N., Antimutagenic activity of aqueous extract of *Momordica charantia*, International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research, 1(4), 42-46, 2010.
- şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H., Önal, S., Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, Separation and Purification Technology, 83, 130-136, 2011.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R., In vitro antioxidant activities of stevia rebaudiana leaves and callus. J Food Compos Anal. 20:323-329, 2007.
- Tan, K.H., Lovrien, R., Enzymology in aqueous–organic cosolvent mixtures, J. Biol. Chem, 247, 3278–3285, 1972.
- Taylor, L., Technical Data Report for Bitter Melon (*Momordica charantia*), Preprinted from Herbal Secrets of the Rainforest, 2nd edition, Austin, 2002.
- Telefoncu, A., Enzimolojiye Genel Bakış, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 1986. Erişimadresini: <http://www.hammaddeler.com/index.php?option=comcontent&view=article&id=131&Itemid=150> Erişim Tarihi: 07.08.2014.
- Telefoncu, A., Protein Saflaştırma ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir-Türkiye, 272, 1996.
- Vetal, M.D., Rathod, V.K., Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*), Food and Bioproducts Processing, 94, 284-289, 2015.
- Vetal, M.D., Shirpurkar, N.D., Rathod, V.K., Three phase partitioning coupled with ultrasound for the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum*, Food and Bioproducts Processing, 92, 402-408, 2014.
- von Hippel, P.H., Schleich, T., The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution in “Structure and Stability of Biological Macromolecules” (Timasheff, S. N., and Fasman, G. D., Eds.), Dekker, New York, 417– 574, 1969.
- Wang, H., Ng, T.B., Ribosome Inactivating Protein and Lectin from Bitter Melon (*Momordica charantia*) Seeds: Sequence Comparison with Related Proteins,

- Biochemical and Biophysical Research Communications, 253, 143–146, 1998.
- Wiseman, A. Handbook of Enzyme Biotechnology, TJ Pres Ltd., Cornwall, UK, 465-466, 1995.
- Wua, S.J., Ng, L.T., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan, Science Direct, LWT 41, 323–330, 2008.
- Yeh, G.Y., Eisenber, D.M., Kaptchuk, T.J., Phillips, R.S., Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes, Diabetes Care 26, 1277–1294, 2003.
- Yuan, X., Gu, X., Tang, J., Optimization of the production of *Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase, Food Chemistry, 111, 340–344, 2008.
- Yuwai, K.E., Rao, K.S., Kaluwin, C., Jones, G.P., Rivett, D.E., Chemical composition of *Momordica charantia* L. fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1762-1763, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Nihan Kübra BELLİGÜN
2. Doğum Tarihi : 16.07.1990
3. Ünvanı : Kimyager
4. Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Kimya	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Kimya	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2015

5. Akademik Ünvanlar :

Görevi	Bölümü	Kurumu	Yıl
-	-	-	-

6. İş Tecrübesi :

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Amfi Görevlisi	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2011