



ŞELATAZ SAFLAŞTIRILMASI

VE UYGULAMALARI

Yüksek Lisans Tezi

Meltem OKTA

Eskişehir, 2019

ŞELATAZ SAFLAŞTIRILMASI VE UYGULAMALARI

Meltem OKTA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ağustos, 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Meltem OKTA'ın “**Şelataz Saflaştırılması Ve Uygulamaları**” başlıklı tezi/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
Üye	: Prof. Dr. Deniz HÜR
Üye	: Prof. Dr. Ebru Birlik ÖZKÜTÜK

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Şelataz Saflaştırılması ve Uygulamaları

Meltem OKTA

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos, 2019

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Yapılan bu çalışmanın amacı, klorofil sentezinin ilk basamağı olan Magnezyum protoporfirini, protoporfirin IX ve Mg^{+2} varlığında ve magnezyum şelataz enzimi katalizliğinde laboratuvar koşulları çerçevesinde sentezlemektir. Bu doğrultuda yeşil bitki yapraklarından magnezyum şelataz enzimi izole edilerek saflaştırılmıştır. Magzeyum şelataz enzimini saflaştırmak için boya afinite kromatografi tekniği ve sibakron mavisi boya olarak kullanıştır. Sentezlenen boya afinite kolonunun karakterizasyonu, kızılötesi spektroskopisi (IR), şişme testi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü gibi parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan magnezyum şelataz enzimi ve magnezyum içeren protein karışımı, Magnezyum protoporfirin sentezi için destek materyal olarak, ANADOLUCA metodu ile Poli (HEMA-ko-Magzenyum-şelataz) kolonuna immobilize edilmiştir. Sentezlenen kriyojel kolonların karakterizasyonu için şişme testleri yapılmış ve IR ve SEM görüntüleri alınmıştır. Protoporfirin IX ve Mg^{+2} iyonunu içeren çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle sentezlenen Magnezyum protoporfirin fluorimetrik yöntemle belirlenmiştir.

Anahtar Kelime: Şelataz, Saflaştırma, ANADOLUCA, Mg-Protoporfirin

ABSTRACT

Purification of Chelatase and Applications

Meltem OKTA

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, August, 2019

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

The purpose of this study is to synthesize Protoporphyrin IX, Mg^{2+} in the laboratory conditions of the resultant Magnesium Porphyrin which is the first step of chlorophyll synthesis in the catalysis of magnesium chelatase enzyme. Accordingly, enzymes of magnesium chelatase have been extracted from the green plant leaves and purification procedures have been applied. Dye affinity chromatography has been used to purify the magnesium chelatase enzyme and cibacron blue has used as a dye. The characterization of the synthesized dye affinity column has performed by using parameters such as infrared spectroscopy (IR), swelling tests and scanning electron microscopy (SEM) images. Subsequently, a protein mixture containing poly (HEMA-co-magnesium chelatase) column and magnesium chelatase enzyme according to the Aminoacid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach (ANADOLUCA) method has immobilized to provide support material for Magnesium Porphyrin synthesis. Swelling tests have performed for the characterization of the synthesized column material, IR and SEM images have been taken. Magnesium Porphyrin synthesized by passing Protoporphyrin IX and Mg^{2+} solution through the column has been determined by the fluorimetric method.

Keywords: Chelatase, Purification, ANADOLUCA, Mg-Protoporphyrin

TEŞEKKÜR

Tüm tez çalışmam boyunca bir anne sıcaklığıyla bizimle ilgilenen, her derdimizde yanımızda olan danışmanım Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Bilgi ve birikimiyle ben dahil tüm arkadaşlarıma yol gösteren Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Deneysel çalışmalarım sırasında, yardımını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER'e,

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca her zaman birlikte olduğumuz, bu yola birlikte başlayıp birlikte bitirdiğimiz buradan ne yazarsam yazayım değerini kelimelere dökemeyeceğim ve her zaman hayatımda olacak canım arkadaşım Yağmur ALEV'e

Mezun olup gitse bile arkadaşlığımız devam edecek olan ve yardım istemekten hiçbir zaman çekinmeyeceğim laboratuvar arkadaşım Halil İbrahim Akbaş'a

Tanıştığımız andan bu yana her zaman ve her konuda yardımcı olan, bizlere bir abi sıcaklığında yaklaşan, bilgisine her zaman güvendiğim canım hocam Arş. Gör. Umut ÇELİKOĞLU'a

Hergün birlikte olduğumuz, beraber çalıştığımız, beraber eğlendiğimiz araştırma laboratuvarı -I' de bulunan arkadaşlarım Didem TOKLU ve Müzeyyen YILMAZ'a

Bu zamana kadar her zaman arkamda olan, maddi manevi beni destekleyen ve benimle gurur duyan canım annem Güneyla KARAHAN'a babam Vahteddin KARAHAN'a ve kardeşim İlhan Can KARAHAN'a

Eskişehir'e adım attığım ilk andan itibaren acısıyla tatlısıyla her zaman yanımda olan, birlikte büyüdüğüm ve bundan sonra da birlikte bir hayat geçireceğim eşim Savaş OKTA'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meltem OKTA

20/08/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Meltem OKTA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler ve Yaşam Süreçleri	2
1.2 Antik Dönemdeki Enzimler	2
1.3 Enzimlerin Kimyasal Yapısı.....	3
1.4 Enzimlerin Sınıflandırılması	4
1.4.1 Oksidoredüktazlar	4
1.4.2 Transferazlar	4
1.4.3 Hidrolazlar	4
1.4.4 Liyazlar	4
1.4.5 İzomerazlar	4
1.4.6 Ligazlar	5
1.5 Mg-Şetalaz	5
1.6 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler.....	6
1.6.1 Ekstraksiyon	7

1.6.2	Çöktürme	7
1.6.3	Ultrafiltrasyon	7
1.6.4	İyon Değişim Kromatografisi	8
1.6.5	Liyofilizasyon ve Diyaliz	9
1.6.6	Kuru Formdaki Sephadex G-25 İlavesi	9
1.7	Afinite Kromatografisi	10
1.7.1	Boya-Ligand Afinite Kromatografisi	10
1.8	ANADOLUCA metodu	10
1.9	Kriyojeller	11
1.10	Amaç	12
2.	MATERYAL	13
2.1	Kimyasallar	13
2.2	Çözelti ve Tamponlar	13
2.3	Cihazlar	14
3.	METOD	15
3.1	Kloroplast İzolasyonu	15
3.1.1	İzole Edilen Kloroplastların Parçalanması	15
3.2	Protein Miktar Tayini	16
3.3	Mg-Şelataz Aktivite Tayini	16
3.4	Sibakron Mavisi Boya Ligand Afinite Kolonun Hazırlanması	17
3.4.1	Kolon karakterizasyonu	18
3.4.1.1	SEM	18
3.4.1.2	FT-IR	19
3.4.1.3	Şişme testi	19
3.5	Saflaştırma Çalışmaları	19
3.5.1	Enzim karakterizasyonu	20
3.5.1.1	Mg-şelataz aktivite tayini	20

3.5.1.2	<i>Protein miktar tayini</i>	20
3.5.1.3	<i>Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)</i>	20
3.6	Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) Kriyojel Kolon Hazırlanması	21
3.6.1	Poli (HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolon karakterizasyonu	22
3.7	Mg-Protoporfirin Sentezi	22
4.	BULGULAR	23
4.1	Kloroplast İzolasyonu ve Karakterizasyonu	23
4.1.1	Protein miktar tayini	23
4.1.2	Mg-şelataz aktivite tayini	23
4.2	Sibakron Mavisi Boya Ligand Afinite Kolon Karakterizasyonu	26
4.2.1	SEM ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	26
4.2.2	FTIR	27
4.2.3	Şişme testi	29
4.3	Saflaştırma Çalışmaları	29
4.3.1	Enzim karakterizasyonu	30
4.3.1.1	<i>Protein miktar tayini</i>	30
4.3.1.2	<i>Mg-şelataz aktivite tayini</i>	30
4.3.1.3	<i>SDS-PAGE jel elektroforezi</i>	32
4.4	Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu	33
4.4.1	SEM ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	33
4.4.2	FTIR	33
4.4.3	Şişme Testi	34
4.5	Mg-Porotoporfirin Sentezi	34
5.	Tartışma ve Sonuç	36
	KAYNAKÇA	39
	ÖZGEÇMİŞ	43

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal malzeme listesi	13
Tablo 2.2. Kullanılan çözelti ve tamponların listesi	13
Tablo 2.3. Kullanılan cihaz ve sarf malzeme listesi	14
Tablo 3.1. Mg-şelataz için kullanılan SDS-PAGE jelinin içeriği	21
Tablo 4.1. Saflaştırma Tablosu	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Peptit bağı yapısı	3
Şekil 1.2. Mg-Protoporfirin sentezi	5
Şekil 1.3. Çeşitli molekül büyüklüklerine sahip ultrafiltrasyon tüpleri	8
Şekil 1.4. İyon değişim kromatografisi	9
Şekil 1.5. Kriyojel oluşumu aşamaları	11
Şekil 4.1. BSA standart grafiği	23
Şekil 4.2. İçerisinde enzim olmayan kör numuneye ait floresans ölçümü	24
Şekil 4.3. Parçalanmış kloroplastlara ait floresans ölçümü	25
Şekil 4.4. 9870xg'den sonra alınan süpernatant çözeltisine ait floresans ölçümü.	25
Şekil 4.5. Protoporfirin IX kalibrasyon grafiği	26
Şekil 4.6. Poli(HEMA) kriyojel kolon	27
Şekil 4.7. Boya immobilize edilmiş poli(HEMA-ko-sibakron mavisi kriyojel kolon	27
Şekil 4.8. Poli (HEMA), poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) ve sibakron mavisi ait FTIR spektrumları	28
Şekil 4.9. Sibakron mavisi boyanın molekül yapısı	28
Şekil 4.10. Poli(HEMA)'nın polimerleşme reaksiyonu	29
Şekil 4.11. Mg-şelat saflaştırılmasına ait FPLC kromatogramı	30
Şekil 4.12. İçerisinde enzim olmayan kör numuneye ait floresans ölçümü	31
Şekil 4.13. Saflaştırılan enzime ait floresans spektrumu	31
Şekil 4.14. Poli (HEMA) ve Poli (HEMA-ko-Mg-şelat) kriyojel kolonların SEM görüntüleri	33

Şekil 4.15. Poli (HEMA) ve poli (HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonlarına ait FT-IR spektrumu	34
Şekil 4.16. Mg-protoporfirin dönüşümüne ait floresans spektrumları	35
Şekil 4.17. Mg-protoporfirin dönüşüm grafiği	35



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Taze yeşil yapraklar.....	15
Görsel 3.2. Parçalanmış kloroplastlar	16
Görsel 3.3. Poli(HEMA) kriyojel kolonlara boyanın immobilizasyonu.....	18
Görsel 3.4. Poli(HEMA) kriyojel kolon (beyaz kolon) Poli(HEMA-ko-sibakron mavisini) kriyojel kolon (mavi kolon	18
Görsel 3.5. FPIC cihaz	20
Görsel 3.6. Soldaki kolon poli(HEMA), Sağdaki kolon poli(HEMA-ko-Mg şelataz)	22
Görsel 4.1. SDS-PAGE jel görüntüsü	32

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	:	Santigrat
BSA	:	Bovine Serum Albumin
mg	:	Mikrogram
mL	:	Mikrolitre
L	:	Litre
mL	:	Mililitre
dak.	:	Dakika
FT-IR	:	Fourier Dönüşüm Kızılötesi
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
ANADOLUCA	:	AmiNoAsit monomer dekore edilmiş Rutenyum şelatlarının ışık etkili konjugasyon yaklaşımı
APS	:	Amonyum Persülfat
HEMA	:	Hidroksietil Metakrilat
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	:	Tetraetil Metilendiamin
SDS-PAGE elektroforez	:	Sodyumdedosilsülfat-poliakrilamidjel elektroforezi

1. GİRİŞ

İnsanlar, enzimlerin keşfedilip ortaya konmasından çok öncesine dayanan zamanlarda enzimleri çeşitli alanlarda kullanmışlardır. Başta canlılığın devam etmesi için en elzem ihtiyaçların başında enzimler gelirken diğer yandan da yoğurt ve peynir yapımı, şarap ve bira üretimi, etlerin yumuşatılması ve ekmek yapımı gibi birçok olayda enzimler görev almaktadır. Enzimlerin incelenmesi özel bir ilgi alanına girer, çünkü sadece biyolojik ve fiziksel bilimlerin buluştuğu yerde yer almaktadır. Biyolojide enzimler çok önemlidir ve spesifik enzimlerin yol açtığı karmaşık bir kimyasal reaksiyon ağına ya da enzim modelinin herhangi bir modifikasyonuna yaşam bağımlılığı canlı organizma için geniş kapsamlı sonuçlar doğurabilir. Diğer yandan katalizör olarak enzimler kimyagerlerden artan bir ilgi görmektedir (Edwin Webb, 1979).

Enzimlerin etki mekanizması, günümüzde takip edilen en derin bilimsel araştırma alanlarından biri olmakla beraber halen çözülememiş etki mekanizmaları bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar için her geçen gün etki mekanizmalarını çözmek için artan bir çalışma alanı sunmaktadır. Aslında, enzimlerin bilinen en eski referansları peynirlerin, ekmeklerin ve alkollü içeceklerin imalatı ve etlerin yumuşatılmasıyla ilgili eski metinlerdir. Günümüzde de enzimler birçok yiyecek ve içecek üretiminde kilit rolü oynamaya devam etmekle beraber çamaşır deterjanı gibi birçok sayıda kimyasal ürünün baş bileşenlerindedir. Enzimler sadece gıda ve temizlik sanayide rol oynamaz. Sağlık biliminde de temel bir öneme sahiptir. Çünkü birçok hastalık süreci enzimlerin düzensiz çalışması ya da eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle; modern farmasötik araştırmaların çoğu, bu enzimlerin güçlü ve spesifik inhibitörlerini aramaya dayanmaktadır. Enzimoloji, birçok bilim dalı ile özellikle biyokimya, moleküler biyoloji, kimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, fizyoloji ve tıp ile yakın bağları olan geniş ve hızlı gelişen bir konu haline gelmiştir. Ayrıca önemli pratik uygulamalara sahiptir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde pek çok araştırmacı enzimlerin neden olduğu sorunlara cevap aramak için çalışmaktadır. Hatta özel olarak enzim çalışmaları için enstitüler kurulmuş ve gittikçe artan sayıda dergi, konularının büyük bir kısmını enzimoloji alanlarına ayırmaktadır (Bennett, T. P. and Frieden, 1969; Robert A. Copeland, 2000).

Bu çalışmadaki amaç, biyosentetik yolların dallanma noktasında olan magnezyum şelataz enziminin saflaştırılıp adenozin 3'-trifosfat (ATP) ve protoporfirin IX varlığında klorofil (Chl) sentezinin ilk basamağı olan magnezyum-protoporfirin (Mg-protoporfirin) yapısını sentetik olarak elde etmektir.

1.1 Enzimler ve Yaşam Süreçleri

Canlı hücre, metabolizma adı verilen muazzam biyokimyasal aktivitenin bölgesidir. Bu canlı organizmada sürekli devam eden kimyasal ve fiziksel değişimleri yeni dokuların oluşması, eski dokuların değiştirilmesi, vücuda alınan gıdanın enerjiye dönüştürülmesi, atık maddelerin vücuttan atılması ve üreme kısacası yaşam olarak nitelendirilen tüm faaliyetler yer almaktadır. Bu biyokimyasal reaksiyonların çoğunluğu kendiliğinden gerçekleşmez. Kataliz olgusu, tüm yaşam süreçleri için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonların tümünü mümkün kılar. Kataliz, kimyasal bir tepkimenin kalıcı bir kimyasal değişim göstermeyen bir madde tarafından hızlandırılması olarak tanımlanır (Bennett, T. P. and Frieden, 1969; Edwin Webb, 1979; Herbert C. Friedmann).

Biyokimyasal reaksiyonların katalizörleri enzimlerdir ve canlı organizmada hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinden sorumludur. Enzimler olmadan bu reaksiyonlar metabolizma için çok yavaş bir hızda gerçekleşir. Örnek vermek gerekirse bir yağ asidinin bir deney tüpü içerisinde karbondioksit ve suya parçalanması kolay bir işlem değildir. Çok güçlü asidik maddeler, yüksek sıcaklıklar ve güçlü aşındırıcı maddeler gerektirir. Bu olay vücut içerisinde gerçekleştiğinde ise dar bir pH ve sıcaklık aralığında hızlı bir şekilde gerçekleşir.

1.2 Antik Dönemdeki Enzimler

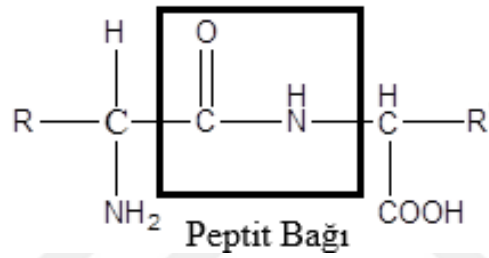
Eski dönemlerde enzimlerin kullanımına bilinen en eski referans Hammurabi kodeksindeki (Milattan önce 18. Yüzyılda yaşamış olan eski Babil Kralı Hammurabi'nin kanunnamesi) şarap yapımının tanımından gelir. Mikroorganizmaların fermantasyon için kullanılması eski insanlar arasında yaygın bir durumdur. Referans olarak Yunanistan, Roma, Çin, Mısır ve Hindistandaki eski uygarlıkların yazıtlarından da yararlanılmaktadır. Ayrıca; sirke üretimindeki alkolün asetik aside enzimatik reaksiyonu da eski metinlerde bulunmaktadır. Sirkenin birçok uygarlık için ortak bir yaşam kaynağı olduğu vurgulanmaktadır. Yiyecek için depolama ve hazırlama amaçlı

olmakla beraber sirke, tıbbi ihtiyaçlar için de kullanılıyordu (International Union of Biochemistry and Molecular Biology., 1992; Kornberg, 1989).

Eti yumuşatmak için de antik çağlardan beri kullanılan birçok enzim bazlı işlemler bulunmaktadır. Tropik bölgelerdeki halk papaya ve ananas meyvelerinin suyunu etleri yumuşatmak için çok eski dönemlerden beri kullanmaktadır. Bu meyvelerin içinde bulunan enzim bugün bile ticari olarak kullanılan çok önemli bir proteaz enzimidir (International Union of Biochemistry and Molecular Biology., 1992).

1.3 Enzimlerin Kimyasal Yapısı

Enzimler protein yapılı bileşiklerdir. Sayısız amino asidin birbirlerine peptit bağlarıyla (Şekil 1.1) bağlanarak oluşturdukları yüksek molekül ağırlıklı yapılardır.



Şekil 1.1. Peptit bağı yapısı

Enzimler çeşitli çevre koşullarından etkilenebilir ve bu çevre koşullarından dolayı denatüre olabilirler. 10.000 gramdan başlayıp 2.000.000 çıkabilen değişik molekül ağırlıklarına sahiptirler. Enzimlerde aktif bölge denilen bir bölge vardır ve enzimler bu bölgede aktivitelerini gerçekleştirirler. Bu nedenle; üç boyutlu yapılarının korunması önemlidir. Pek çok enzimin aktivitesi için başka bileşiklerin varlığı gerekmektedir. Aktivite gösterebilmek için gereksinim duydukları gruplara “kofaktör” adı verilir. Kofaktörler metal iyonu ya da kompleks organik bir bileşik olabilir. Eğer kompleks bir organik bileşik ise “koenzim” adını alır. Bazı durumlarda aktivite göstermek için iki gruba da ihtiyaç duyulabilir. Oluşan aktif kompleks “haloenzim” olarak adlandırılır. Protein kısmına ise “apoenzim” denir.

Marek'e göre (Marek, 1983) kofaktör şunlar olabilir:

1. Bir koenzim - diyaliz edilebilen, ısıl yapılabilen ve protein kısmına gevşek biçimde bağlanmış protein olmayan organik bir madde.

2. Bir proteaz grubu - protein veya apoenzim kısmına sıkıca bağlanmış, diyaliz edilebilen ve ısıl yapılabilen organik bir madde.

3. Bir metal-iyon aktivatörü - bunlar K^+ , Fe^{++} , Fe^{+++} , Cu^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} ve Mo^{+++} içeren yapılar.

1.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

1.4.1 Oksidoredüktazlar

Oksidoredüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen tüm enzimler bu sınıfa girmektedir. Hidrojen -donör olarak oksitlenmiş- substrat kabul edilir. Sistematik ismi donöre dayanmaktadır. Alıcı ise oksidoredüktazdır. Alternatif isim olarak redüktaz ve O_2 molekülünün elektron alıcı olduğu durumlar için ise oksidaz ismi kullanılır (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster).

1.4.2 Transferazlar

Bir grubu transfer eden enzimler transferaz kısmına girer. Bir bileşikten başka bir bileşiğe bir metil grubunun transfer edilmesini sağlayan enzimler bu gruba örnek olarak gösterilebilir (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster).

1.4.3 Hidrolazlar

Hidrolaz grubundaki enzim türleri C-O, C-C, C-N ve fosforik anhidrit bağları ile bazı diğer bağların hidrolitik bölünmesini katalizler. Genel olarak tüm hidrolitik enzimler transferaz olarak sınıflandırılabilir (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster).

1.4.4 Liyazlar

Liyaz grubuna giren enzimler ise C-C, C-O, C-N gibi birçok bağı elimine ederek parçalar ve substratlardan uzaklaştırır. Parçalama sonucunda hidrolizden farklı bir mekanizma kullanarak gruplara çift bağ veya halka grupları ekleyen enzim türleridir (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster.).

1.4.5 İzomerazlar

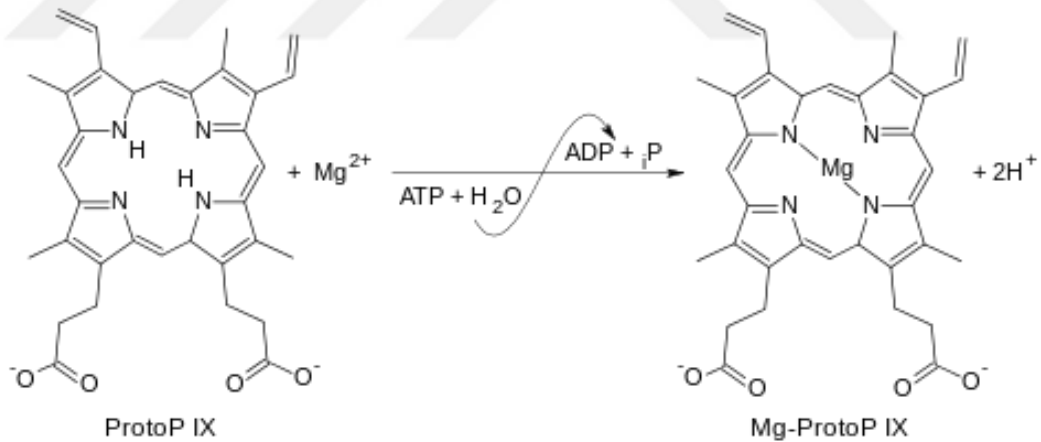
Bu gruptaki enzimler ise bir molekülün, molekül içindeki geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalize eder. İzomerizm tipine göre, rasemeraz, epimeraz, cis-trans izomeraz, tautomeraz, mutaz veya sikloizomeraz olarak adlandırılabilir (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster.).

1.4.6 Ligazlar

Ligazlar, C ile C, O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Buradaki kimyasal reaksiyonda kullanılan enerji, ATP veya guanozin-5'-trifosfat (GTP) gibi moleküllerin yüksek enerjili fosfat gruplarının hidrolizinden açığa çıkan enerjidir (Harrow, B., and Mazur, 1962; Schuster.).

1.5 Mg-Şetalaz

Biyosentetik yolların dallanma noktalarındaki enzimler her zaman biyokimyacıların ilgisini çekmektedir. Fotosentetik organizmalarda, biyosentetik çabaların büyük bir kısmı Chl veya bakteriyokloril (Bchl) sentezindedir. Demir (II) bağlı protoporfirin yapısı HEME ve Chl sentezinin dallanma noktası, metal-iyon şelatasyonu ve protoporfirin IX kullanım düzeyi ile birbirinden ayrılır. HEME sentezinde, ferroşelataz enzimi tarafından tetrapireol halkasına bir ferröz iyonu katılır. Chl sentezinde ise tetrapireol halkasına Mg-şelataz enzimi varlığında Mg^{+2} iyonu katılır (Şekil 1.2.). Bu dallanma noktasındaki farklılık HEME ve Chl/Bchl'in özellikleri ve karakterizasyonu için ışık tutmaktadır (Walker & Willows, 2015).



Şekil 1.2. Mg-Protoporfirin sentezi (Walker & Willows, 2015)

Ferroşelataz enzimi, hem fotosentetik hemde fotosentetik olmayan organizmalarda tanımlanmıştır. Yaklaşık olarak 50 kDa ağırlığındadır. Bu enzimin katalizlenmesi için substrat olarak protoporfirin IX ve Fe^{+2} iyonu gerekmektedir (Dailey & Gerdes, 2015; Walker & Willows, 2015). Mg-şelataz enzimi ise yıllarca karakterizasyon girişimlerine direnmiş bir enzim olup analizi çok zordur. Aktivite kloroplastlarda fazlaca bulunur. Fakat enzimin elde edilmiş aşamalarında enzimi elde edebilmek için eğer bitkiden elde ediliyorsa kloroplastların parçalanması, eğer

bakteriden elde edilecek ise hücrelerin parçalanması gerekmektedir. Kloroplastların ve hücrelerin parçalanması esnasında bir aktivite kaybı yaşanmaktadır ve bu kayıp yaklaşık olarak % 98'leri bulmaktadır. Her iki işlem basamağında ise aktivite yalnızca ATP varlığında gözlenmektedir (Gorchein, 1973; Pardo, Chereskin, Castelfranco, Franceschi, & Wezelman, 1980). Yapılan çalışmaların artması ile aktivite kaybındaki nedenler belirgin hale gelmektedir. Aktiviteyi korumanın anahtarı, kloroplast içeriğini seyreltmek için yüksek protein derişimlerinde kloroplastların parçalanmasıdır.

Parçalanmış homojenat eğer fraksiyonlanırsa aktivite kaybolur fakat bu iki fraksiyon tekrar bir araya getirilerek rekombinasyonu sağlanırsa aktivite tekrar gözlenmeye başlar. Yapılan çalışmalarla birlikte araştırmacılar Mg-şelatazın çok bileşenli bir enzim olduğuna kanaat getirmişlerdir (Gibson, Jensen, & Hunter, 2015; Hansson, Gough, Kannangara, & Wettstein, 1997; Willows, Hansson, Beale, Laurberg, & Al-Karadaghi, 1999).

1.6 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Enzimler protein yapılı bileşikler olduğundan aslında protein saflaştırılmasındaki dikkat edilecek hususlar burada da geçerlidir. Saflaştırma prosesleri her enzime ve proteine göre değişir. İlk olarak istenilen enzim ya da protein hangi kaynaktan elde edilecekse buna uygun bir saflaştırma prosedürü seçilir. Bu süreç, sonunda elde edilecek verimi doğrudan etkiler.

Fakat; istenilen enzim belirlenen kaynaklarda genellikle seyreltik olarak bulduklarından ilk basamak ekstraksiyon işleminden sonra deriştirme işlemidir. Homojenatları deriştirmek için pek çok yöntem bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

- Çöktürme
- Ultrafiltrasyon
- İyon değişim kromatografisi
- Diafiltrasyon
- Liyofilizasyon
- Kuru formdaki sephadex G-25 ilavesi

1.6.1 Ekstraksiyon

Saflaştırma prosedürü ne olursa olsun ilk basamak her zaman ekstraksiyon basamağıdır. Burada istenilen enzim ya da proteinin kaynaktan alınması hedeflenir. Tabi bu basamak içinde farklı yöntemler bulunmaktadır. Enzimin ya da proteinin lokalizasyonundan dolayı (ekstraselüler ya da intraselüler) farklı parçalama yöntemleri kullanılır. Bu parçalama yöntemleri için bıçakla ya da el ile homojenizasyon, sonikasyon, deterjan ya da organik çözücü ile liziz, ozmotik şok, dondurup-çözme ve cam küre ile vorteksleme gibi birçok yöntem sıralanabilir. Buradaki amaç istenilen enzimin alınarak diğer hücre ya da bitki kalıntılarında ve kirlilikten kurtulmaktır. Böylelikle nispeten daha az bir matriks ortamında olan hedef enzim için bir sonraki basamaklara geçilebilir (Tuncer, 2008).

1.6.2 Çöktürme

Ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen homojenat hacimce fazla olacağından içerisindeki hedef enzimin deriştirilmesi gerekir. Çöktürme işlemi bunlardan biridir ve homojenatın içerisinde enzim ya da proteini çöktürerek daha derişik bir numune elde etmeyi hedefler. Çöktürme işlemi tuz, organik çözücü ve yüksek moleküler kütleli polimerin ilavesi ile yapılabilir.

Genellikle protein çözeltilere az miktarlarda tuz ilavesi çözünlüğü artırır buna “salting-in” denir fakat tuz ilavesinin optimum seviyeyi aşması ise tam tersi bir etki yaparak proteinlerin çökmesine neden olmaktadır (salting-out). Laboratuvar ortamında genellikle amonyum sülfat tuzu en çok kullanılan tuzdur. Proteinlerin üzerinde denatüre edici bir etki yaratmaması, ucuz ve bol bulunabilir olması bu nötral tuzların kullanımının tercih edilmesine sebep olmuştur. Ucuz ve yüksek saflıkta bol bulunabilir olmasından dolayı bu yöntem endüstriyel alanda da oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Çöktürme işleminden sonra proteinler santrifüj işlemi ile toplanır (Tuncer, 2008).

1.6.3 Ultrafiltrasyon

Laboratuvar ve endüstri alanında sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem ise ultrafiltrasyon yöntemidir. Ultrafiltrasyon yönteminde, çeşitli gözenek boyutuna sahip filtreler kullanılır. Kirleticiler ve safsızlık olarak nitelendirdiğimiz istenilen enzimin molekül boyutuna göre daha küçük molekül ağırlıklı proteinler filtreden geçer ve

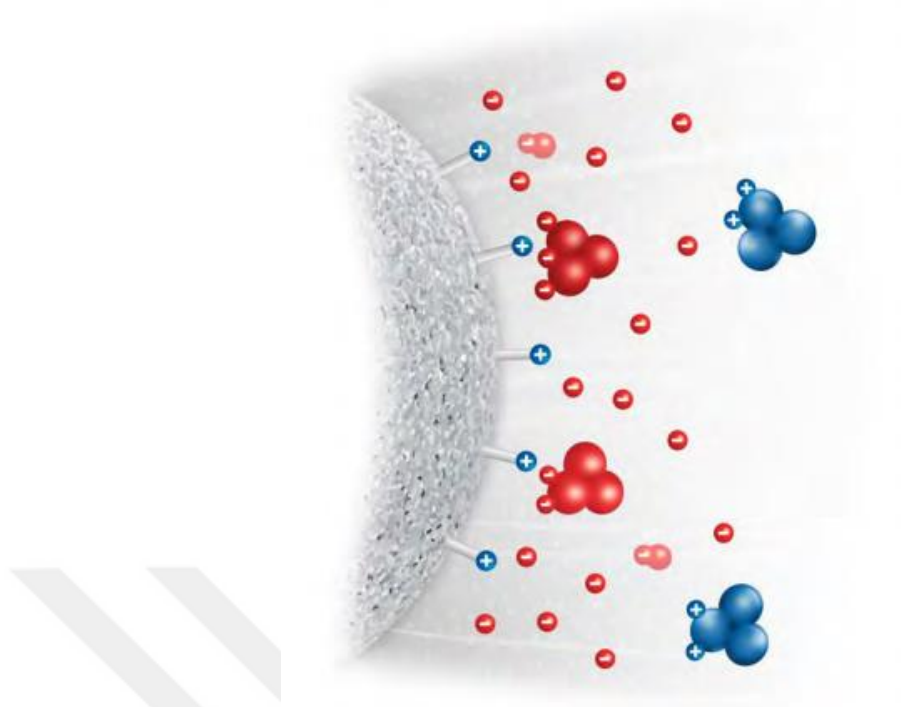
numunemizi daha derişik elde etme imkânı sunar. Kullanılan filtrelerin (Şekil 1.3.) molekül büyüklükleri ise 3, 10, 30, 50, 100 kDa'dır (Tuncer, 2008).



Şekil 1.3. Çeşitli molekül büyüklüklerine sahip ultrafiltrasyon tüpleri

1.6.4 İyon Değişim Kromatografisi

İlk olarak 1960 yıllarında ortaya atılan bu teknik ile biyomoleküllerin yüzey yüklerine göre ayrılıp saflaştırılmasına olanak sağlandı. İlk günden bugüne hala kullanılan bu yöntem aynı zamanda saflaştırma basamağında önemli rol oynamaktadır. Öne sürülen bu teknik, mikro ölçekli laboratuvar ortamından kilogram ölçekli endüstri şartlarına kadar tüm alanlarda kullanılır. Saflaştırmanın yanı sıra homojenatların deriştirilmesinde de kullanılan bir yöntem olduğundan bu başlık altında ele alınabilir. Amino asitler, peptitler, nükleotitler gibi biyolojik materyallerin farklı pH'lardaki net yüzey yükleri negatif, pozitif ya da sıfır olabilir. Bu yöntem ile belirli bir pH'da net elektriksel yüke bağlı olarak uygun bir sabit faz (iyon-değişirici matriks) seçilir (Şekil 1.4.). Bu yöntem ile homojenatlar iyon değiştirici matrikse bağlanmayan birçok safsızlıktan ve kirleticiden uzaklaştırılmış olur. Daha sonra uygun bir elüent yardımıyla bağlanan hedef materyaller toplanabilir (GE Healthcare; Tuncer, 2008).



Şekil 1.4. İyon değişim kromatografisi (GE Healthcare.)

1.6.5 Liyofilizasyon ve Diyaliz

Liyofilizasyon yöntemi, örnek içerisindeki suyun katı formdan gaz formuna geçirerek uzaklaştırılmasını sağlar. Bu yöntem ile büyük hacimli örnekler içerisindeki su uzaklaştırılır ve daha yoğun protein miktarına sahip örnekler elde edilir.

Diyaliz ise genellikle tampon değiştirilmesi ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gibi yöntemlerin yanı sıra deriştirme basamağı olarak da kullanılır. Fakat bu basamak yerine ultrafiltrasyon yöntemi tercih edilir. Diyaliz basamağı hem çok uzun sürdüğünden zaman kaybına yol açar hem de denatürasyon oranı diğer yöntemlere göre fazladır (Tuncer, 2008).

1.6.6 Kuru Formdaki Sephadex G-25 İlavesi

Kuru formdaki sephadex G-25 ilavesi ile örneklerin fazla suyu gel gözeneklerine dolar fakat protein yapılı biyomoleküller fazla büyük olduğundan onlar bu gözeneklerden giremez. Böylelikle ortamdaki fazla su uzaklaştırılarak örneğin yoğunlaştırılması hedeflenmektedir. Bu yöntemde kullanılan sephadex pahalı bir materyal olduğundan küçük ölçekli çalışmalar için uygundur (Tuncer, 2008).

1.7 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, kromatografik yöntemler arasındaki en seçici olan yöntemdir. Bu yöntemin temeli, hedef molekülün kromatografik matrikse bağlanmış bir ligand ile arasındaki geri dönüşümlü etkileşimine dayanır. Buradaki geri dönüşümlü etkileşimler, zayıf moleküler arası etkileşimler, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ya da biyolojik etkileşim türü olabilir. Hedef molekül katı matriks ile etkileşeceğinden etkileşmeden çıkan kirlilik ve safsızlıktan arındırılmış olur. Hedef molekülün ayrılması ise ortamın pH'ını, iyonik kuvvetini ya da polaritesini değiştirmek gerekir. Afinite yöntemi, çoklu matriks ortamından hedef molekülün tek bir adımda saflaştırılmasını hedeflemektedir. Böylece afinite kromatografisi yüksek seçiciliğinden dolayı ard arda birçok kromatografik yöntem kullanılarak yapılacak saflaştırma yöntemini tek basamakta gerçekleştirerek zamandan tasarruf sağlar (Celikoglu, 2015; Ge Healthcare, 2007; Narayanan & Crane, 1990).

1.7.1 Boya-Ligand Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisinde oldukça spesifik ligandlar kullanılmasına rağmen yüksek maliyetli oldukları için kapsamlı çalışmalar için fazla tercih edilmemektedir. Ayrıca; kullanılan materyallerin destek matrisi içindeki aktivitesini korumak zordur. Bu dezavantajlar nedeniyle boya ligantların kullanım alanları artmıştır. Boya ligantlarının özellikle enzimleri bağlama kapasiteleri yüksektir. Ticari olarak kolay temin edilebildikleri gibi ucuzdur ve hidroksil grupları taşıyan matrislerle kolayca hareketsiz hale getirilebilir. Boyalar doğada sentetik olarak bulunur ve bağlayıcı ajanların yapısını taklit ederek birçok proteinin aktif bölgeleriyle etkileşime girerler. Denizli ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada sibakron mavisi kullanılmıştır. Kriyojel kolonlara immobilize edilen boya ile Mg-şelataz enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır (Denizli & Pişkin, 2001; Kaya, 2012).

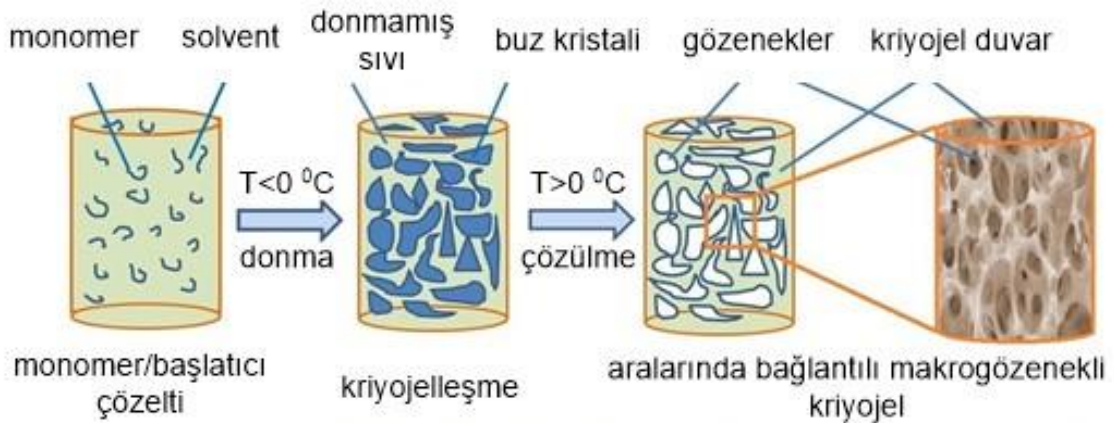
1.8 ANADOLUCA metodu

Anadoluca metodu "Aminoasit Dekore Edilmiş Işık Destekli Konjugasyon Yaklaşımı (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach)'nın kısaltmasıdır. R. Say ve arkadaşları (Say et al., 2011) tarafından geliştirilen bu metod ile nano-enzim ve nano-protein gibi tekrar kullanılabilen, tampon ve sulu fazda çözünmeyen ve kararlı polimerler sentezlenmektedir. Sentezlenen maddelerin çok işlevli, biyoyumlu ve stabil olması yöntemin avantajlarından birkaçıdır.

Bu çalışmada; ANADOLUCA metodu kullanılarak poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) polimerik malzemesi geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu polimerik malzeme geliştirilirken Mg-şelataz enzimi ek bir basamağa ihtiyaç duyulmadan fotosensitif ve kovalent olarak kolona bağlanmıştır. Bağlanma sırasında Mg-şelataz enzimi herhangi bir konformasyon ve aktivite kaybına uğramamıştır.

1.9 Kriyojeller

Kriyojeller, Yunancadaki don ve buz anlamına gelen krios (kryos) kelimesinden gelmektedir. Kriyojeller, çeşitli araştırma alanlarından uygulamalara sahip, sıfır derecenin altındaki sıcaklıklarda hazırlanan birbirine bağlı gözenekli jellerdir. Kriyojelleşme işlemi, buz kristali oluşumu, çapraz bağlama ve polimerizasyon basamaklarından oluşur. Benzer bir yaklaşımla kriyojeller, sulu bir çözelti içinde çözünen bir maddenin öncü çözeltisinin sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurularak sentezlenir. Zamanla çözücü donmaya başlar ve donmuş faz ve donamamış faz olmak üzere iki faz oluşur. Çözünen parçacıklar, donmamış sıvı faz ile sınırlı kalır ve etkileşerek polimerleşir. Daha sonra buz kristallerinin çözünmesinin ardından birbirine bağlı makro gözenekli yapılar meydana gelir (Şekil 1.5). Kriyojel kolonlar mekanik, kimyasal ve ozmotik zorluklara uyum sağladığından tercih edilmektedir. Bu nedenle biyoteknolojik alanlarda özelliklerinden dolayı diğer jel türlerinden daha fazla kullanılmaktadır (Kumar, Mishra, Reinwald, & Bhat, 2010).



Şekil 1.5. Kriyojel oluşumu aşamaları (<http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/kriyojel-cryogel.html>)

Kriyojellerin karakterizasyon işlemleri için Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FITR) ve şişme testi gibi işlemler uygulanmaktadır. SEM görüntüleri alınan kriyojellerdeki por gözeneklerinin çapı, por gözeneklerinin dağılımı ve yapıyı meydana getiren gözeneklerin örgüsü belirlenir.

Bunlar akışın oluşması için önemli parametreler arasındadır. FITR cihazı ile analizlerde kriyojellerin fonksiyonel grupları belirlenir. Böylelikle immobilize edilmek istenilen biyomolekülün immobilize edilip edilmediğine bakılır. Kriyojel kolonların şişme testi ise süngerimsi yapıya sahip olup olmadığının kanıtıdır. Kriyojel kolonlarda su tutma kapasitesi önemli bir kriterdir çünkü su tutarak hacimce büyüyen kolonlar biyomoleküllerin rahatça geçeceği gözenekleri oluşturur. Böylelikle gözeneklere zarar görmez ve tekrar kullanılabilirler.

1.10 Amaç

Bitkilerde, Mg^{++} iyonu, bitkinin canlılığını sağlaması açısından çok önemlidir ve proteinlerin çoğu yaprak hücrelerinde bulunmaktadır. Bu nedenle; Mg^{++} iyonu yokluğunda kloroplastların yapısı, fonksiyonu ve miktarı önemli oranda etkilenir. Mg^{++} iyonu, Mg-şelataz enzimi katalizliğinde Chl yapısına katıldığından bitkilerin yeşil ve canlı olması için önemli bir iyondur. Bitkiler yaşlandıkça proteinler parçalanılarak daha genç olan yapraklara taşınır.

Chl biyosentezinde ki ilk aşama; Mg-şelataz enzimi katalizörlüğünde Mg^{++} iyonunun porfirin yapısına katılmasıdır Ticari önemine bakıldığında ise; laboratuvar ortamında bitki hücrelerinden saflaştırılan Mg-şelataz enzimi protoporfirin-IX yapısına ATP varlığında Mg^{++} iyonu bağlanmasını katalizleyerek klorofil biyosentezindeki ilk basamağın oluşumunu bu da yapay bir Chl yapısının oluşmasını gerçekleştirir.

Bu doğrultuda, tez çalışmamda yeşil bitki yapraklarından Mg-şelataz enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırma için birçok enzim ve protein saflaştırılması için kolaylıkla kullanılan boya ligand afinite kromatografisi kullanılmıştır. Saflaştırılmak istenilen Mg-şelataz enzimine afinitesi olan sibakron mavisi boya olarak kullanılmıştır. Saflaştırılan enzim ANADOLUCA metoduna göre kriyojel kolona immobilize edilecek ve Mg-protoporfirin dönüşümünü gerçekleştirerek yapay bir klorofil oluşturmak için ilk basamak gerçekleşmiş olacaktır. Laboratuvar koşullarında yapay bir klorofil elde ederek yapay oksijen üretici sistemler üretilmesi hedeflenmektedir. Yapay oksijen üretici bir sistemin, Dünya'nın en büyük sorunlarından biri olan sera gazlarının artması sonucu olan küresel ısınma problemine karşı yapılacak çalışmalar için bir basamak olduğu düşünülmektedir.

2. MATERYAL

2.1 Kimyasallar

Çalışma boyunca kullanılan kimyasallar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal malzeme listesi

Kimyasalın Adı	Firma, Ülke
Adenozin 5'-trifosfat disodyum tuzu hidrat	Sigma Aldrich, Amerika
Amonyum peroksidisülfat (APS)	Alfa Aesar, Amerika
Aseton	Arıkim Lab, Türkiye
Etilendiamintetra asetik asit disodyum 2 H ₂ O (EDTA)	Panreac, Almanya
4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit, (HEPES)	Sigma Aldrich, Amerika
2-Hidroksietil metakrilat % 96 (HEMA)	Acros Organics Belçika
Magnezyum Klorür	Sigma Aldrich, Amerika
Mangan (II) Klorür %99	Sigma Aldrich, Amerika
N’N’- Metilenbisakrilamid %99	Sigma Aldrich, Amerika
Potasyum Hidroksit Pellet	Tekkim, Türkiye
Sibakron Mavisi	Anonim
Sükroz	Sigma Aldrich, Amerika
Sodyum Hidroksit Boncuk	Tekkim, Türkiye
N,N,N’, N’-Tetrametilenetilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Amerika
Trisin	Sigma Aldrich, Amerika

2.2 Çözelti ve Tamponlar

Çalışma boyunca kullandığım çözelti ve tamponların hazırlanışı Tablo 2.2’de verilmektedir.

Tablo 2.2. Kullanılan çözelti ve tamponların listesi

Çözelti ve Tamponlar	Hazırlanışı
A tamponu ve homojenizasyon tamponu: 50 mM HEPES-KOH (1mM MnCl ₂ , 1mM MgCl ₂ , 2 mM EDTA,0,5 M sükroz) pH:8.0	11,91 gr HEPES tartılır KOH çözeltisi ile pH:8’e ayarlanır. 95 mg MgCl ₂ , 125 mg MnCl ₂ , 744,48 mg EDTA, 171.15 g sükroz eklenir 1L’ye tamamlanır.
100 mM Tricine-NaOH pH: 8.0	17,9 g Tricine tartılır. NaOH ile ph:8’e ayarlanır. 1L’ye tamamlanır.
10 mM MgCl ₂ çözeltisi	95,21 mg MgCl ₂ tartılır 100 mL saf suda çözünür.
Mg-ATP çözeltisi	22,0456 mg tartılıp 1mL saf suda çözünür

Protoporfirin IX çözeltisi	2,5308 mg tartılır 1 mL DMSO'da çözünür.
----------------------------	--

2.3 Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihaz bilgileri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Kullanılan cihaz ve sarf malzeme listesi

Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	Firma, Ülke
+4 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
-20 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
Çalkalayıcı	Thermo, Amerika
Mikroplaka Okuyucu	BioTek Synergy H1, Amerika
Etüv	Innovens, Jouan, Amerika
FT-IR Spektrofotometre (Spectrum 100)	PerkinElmer,
Küçük Santrifüj	Hettich, Almanya
Liyofilizatör	Labconco, Freezone, Amerika
Manyetik Karıştırıcı	Jeio Tech, Lab Companion, Amerika
Mikropipet Uçları	Isolab, Almanya
Santrifüj	Sigma, Amerika
pH Metre (HI 2211 pH/ORP)	Hanna, Amerika
Pipetör	Brand, Transferpette, Almanya
Hassas Terazi	Ohaus, Pioneer, Amerika
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss Ultra Plus, Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	Lab Companion, Amerika
Vorteks	Stuart, İngiltere

3. METOD

3.1 Kloroplast İzolasyonu

Kloroplast izolasyonu için temin edilen yeşil ve canlı bitki yaprakları (Görsel 3.1.) küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra tartılarak üzerine ağırlığının yaklaşık 12,5 katı kadar soğuk 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA, 0,5 M sükröz içeren 50 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit – potasyum hidroksit (HEPES-KOH) pH:8.0 kloroplast tamponu eklenerek parçalanmıştır. Oluşan homojenat peynir süzme bezinden süzülerek, süzüntü 200 x g'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar toplanarak 9870 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj 9870 x g'ye geldiğinde durdurulmuştur. Toplanan pelet kloroplast tamponu ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Tüm prosedür +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Her basamaktan örnek ayrılarak aktivite ve miktar tayinleri yapılmıştır (Chu, Hsiu-An & Chang, Ing-Feng & Shen, C.-H & Chen, Y.-T & Wang, H.-T & Huang, Li-Chun & Yeh, 2012).



Görsel 3.1. Taze yeşil yapraklar

3.1.1 İzole Edilen Kloroplastların Parçalanması

Tekrar süspansiyon edilen pelet -80 °C'de 2 kere dondurulup çözündürülmüştür. Dondurulup çözündürmedeki amaç şok uygulayarak kloroplastları parçalamaktır (Görsel 3.2) (Walker & Weinstein, 1991).



Görsel 3.2. Parçalanmış kloroplastlar

3.2 Protein Miktar Tayini.

Toplam protein miktar tayini Bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre yapılmıştır ve sığır serum albümini (BSA) referans olarak kullanılmıştır. BCA yönteminde alkali bir ortamda Cu^{+2} iyonları peptit bağlarındaki sistin, sistein, triptofan ve tirozin aminoasitlerine bağlanarak Cu^{+1} 'e indirgenmiş ve mor renk oluşmuştur. Oluşan mor renk 562 nm'de ölçülmüştür. Oluşan kompleksin kararlı olması ve kolay kullanılabilir olmasından dolayı laboratuvar şartlarından tercih edilen bir yöntemdir (Smith et al., 1985).

Kalibrasyon grafiği oluşturmak amacıyla farklı derişimlerde (200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm) BSA çözeltileri hazırlanmıştır. 25 uL protein çözeltisinin üzerine 200 uL BCA reaksiyon karışımından eklenerek 60 °C 15 dak. inkübasyona bırakılmıştır. 15 dak. sonunda oluşan mor renkli çözelti 562 nm'de absorbansı ölçülerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Total protein miktarı,

$$y = 0,0012 + 0,1278 (R^2 = 0,9928) \quad (3.1.)$$

eşitliği yardımıyla hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1).

3.3 Mg-Şelataz Aktivite Tayini

Mg-şelataz aktivite tayini Walker ve Weinstein (Walker & Weinstein, 1991) metoduna göre yapılmıştır. Son derişimleri 1 mM MgCl_2 , 4 mM ATP, 9 μM protoporfirin IX içeren 50 mM Trisin- HCl pH:8.0 aktivite çözeltisine enzim ($5 \text{ mg L}^{-1} - 1 \text{ mg L}^{-1}$) eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından

üzerine 1800 µL aseton/su/NH₃ (80:20:1) karışımı eklenerek 15000 x g'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Kuartz küvete alınan süpernatantın floresans ölçümleri yapılmıştır, (Ex:420nm Em: 550-650nm). Aktivite işlemi kloroplast izolasyonunun her basamağında toplanan örnekler için tekrarlanmıştır.

Aktivite ortamındaki harcanan protoporfirin IX'u belirlemek için aktivite çözeltili içerisinde protoporfirinin IX'un farklı derişimleri (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM) hazırlanarak aktivite prosedürü uygulanmıştır. Elde edilen veriler ile derişime karşı emisyon piklerinin değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Aktivite,

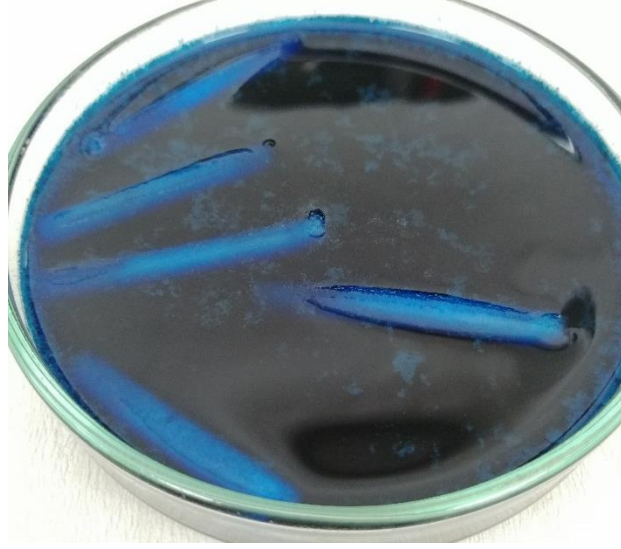
$$y = 8,028x \text{ (R}^2=0,9963\text{)} \quad (3.2)$$

eşitliğine göre hesaplanmıştır (Eşitlik 3.2).

3.4 Sibakron Mavisi Boya Ligand Afinite Kolonun Hazırlanması

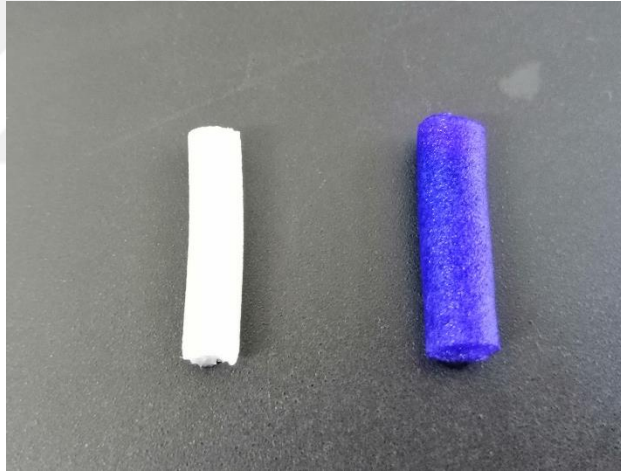
Boya ligand afinite kolonu hazırlamak için öncelikle poli(HEMA) kolonlar ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Poli(HEMA) kolon sentezi için 1045 µL deionize su içerisinde 21,225 mg N,N-metilen-bis-akrilamid ve 112,5 µL HEMA çözülüp stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 1 mL'lik kolon hazırlamak için stok çözeltilerden 760 µL alınıp 221,54 µL saf su ve 30,75 µL bis(2,2'-bipiridil) MATrp-MATrp rutenyum (II) (MAT-Ru-MATry) eklenerek 2 sa. N₂ gazı altında karıştırılmıştır. Karıştırılan çözeltiliye polimerizasyon başlatıcı olarak 10 µL amonyum persülfat (APS) ve katalizör olarak 1µL N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) konularak plastik bir şırıngaya doldurulmuştur. Hazırlanan kolon -20 °C 1 gece boyunca polimerleşmesi için bırakılmıştır. Polimerleşen kriyojel kolon dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra 40 mL saf su ile polimerleşmeden kalan maddeleri uzaklaştırmak için yıkanmıştır.

Poli(HEMA) kolonlara boya immobilizasyonu için öncelikle sibakron mavisi derişimi 5 mgmL⁻¹ olacak şekilde 50 mL suda çözülmüştür. Hazırlanan boya çözeltili, 50 mL su içerisinde bulunan kriyojel kolonlara ilave edilmiş v daha sonra 5 g NaOH tartılarak çözeltili içerisine eklenmiştir. Kolonların da içinde bulunduğu hazırlanan karışım 80 °C'de 125 rpm'de 4 sa boyunca karışmaya bırakılarak boyanın kolona bağlanması sağlanmıştır (Görsel 3.3) (Doğan, Özkara, Sarı, Uzun, & Denizli, 2012).



Görsel 3.3. *Poli(HEMA) kriyojel kolonlara boyanın immobilizasyonu*

4 saatin sonunda hazırlanan kolonlar bağlanmayan fazla boyanın uzaklaştırılması için su ve etanol ile yıkanmıştır (Görsel 3.4).



Görsel 3.4. *Poli(HEMA) kriyojel kolon (beyaz kolon) Poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolon (mavi kolon)*

3.4.1 Kolon karakterizasyonu

Hazırlanan sibakron mavisi boya afinite kolonun karakterizasyonu SEM, FT-IR, ve şişme testi ile yapılmıştır.

3.4.1.1 SEM

Kolondan alınan 5 mm kalınlığındaki kesitler, 60 °C'deki etüvde kurutularak iletkenliğin sağlanması için vakum altında 1 dak. boyunca 50 mA'lık akımla altın kaplanmıştır. Altın kaplanan numunelerin SEM ile görüntüleri alınmıştır.

3.4.1.2 FT-IR

FTIR analizleri için kolondan alınan kesit kurutulmuştur. Kurutulan kesit nemi uzaklaştırılan KBr ile homojen olana kadar dövülmüş ve pellet haline getirilmiştir. Hazırlanan pelletin FT-IR cihazı ile analizleri yapılmıştır.

3.4.1.3 Şişme testi

Hazırlanan sibakron mavisi boya afinite kolonundan küçük bir kesit alınıp 1 gece boyunca 60 °C'de kurutulmuştur. Kurutulan kesit tartılarak not edilmiştir. Daha sonra üzerine yavaş bir şekilde damla damla su eklenerek kolon şişirilmiştir. Şişirilen kolon tekrar tartılarak aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.3) yardımıyla şişme oranı hesaplanmıştır.

$$SD = \frac{(W_s - W_k)}{W_k} \quad (3.3)$$

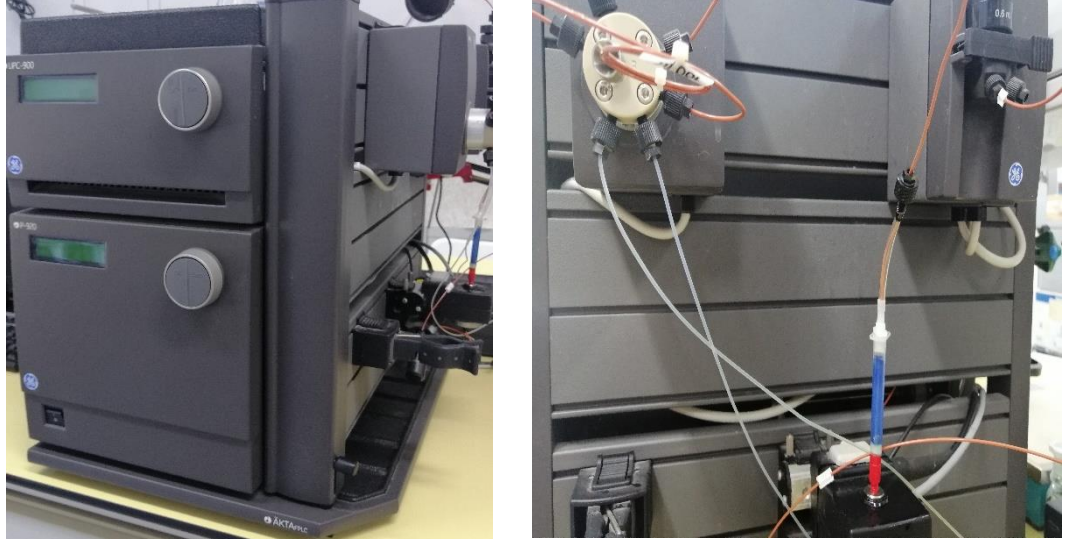
W_k= Kuru polimerin ağırlığı

W_s: Şişirilmiş polimerin ağırlığı

SD: Şişme Derecesi

3.5 Saflaştırma Çalışmaları

Magnezyum-şelataz saflaştırılması için hazırlanan sibakron mavisi boya immobilize edilmiş afinite kolonu, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) cihazına entegre edilmiştir (Görsel 3.5). Kolon 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA, 0,5 M sükröz içeren 50 mM HEPES-KOH pH:8.0 (A tamponu) ile dengelenmiştir. Dengelenen kolona 1 mL akış hızında 100 µL numune enjeksiyonu yapılmıştır. Elüent olarak A tamponu kullanılmıştır. Kolona bağlanmadan çıkan safsızlıkların ardından kolonun tekrar dengeye gelmesi beklenmiştir. Dengelenen kolona, bağlanan - istediğimiz- numuneyi sökmek için 1 M NaCl içeren A tamponu (B tamponu) geçirilmiştir. Tuz molekülleri protein/enzimin etrafını sararak su molekülleri ve afinite kolonu ile bağlantısını keserek çözünürlüğünü azaltır ve kolondan koparır. Böylelikle saflaştırılmak istenilen numune elde edilmiş olmaktadır. Analiz spektrofotometrik olarak 280 nm'de takip edilmiştir.



Görsel 3.5. FPLC cihazı

3.5.1 Enzim karakterizasyonu

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu Mg-şelataz aktivite tayini, protein miktar tayini, sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapılarak belirlenmiş ve spesifik aktivitesi ve saflaştırma katsayısı hesaplanmıştır.

3.5.1.1 Mg-şelataz aktivite tayini

Saflaştırılan Mg-şelataz enziminin aktivite tayini bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.5.1.2 Protein miktar tayini

Saflaştırılan Mg-şelataz enziminin miktar tayini bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.5.1.3 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Yeşil yapraklardan elde edilen Mg-şelataz enziminin saflığının belirlenmesi için Laemmli metodu (Laemmli, 1970) kullanılmıştır. Hazırlanan jelde % 10’luk ayırma jeli ve % 5’lik yükleme jeli kullanılmıştır. Tablo 3.1’de jellerin içerikleri verilmektedir. 10 µL örnek 10 µL 4x SDS-PAGE yükleme boyası ilave edilerek 100 °C’de 5 dak boyunca denatüre edilmiştir. Hazırlanan karışımdan 8 µL alınarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme jeline sistemden 8 mA akım geçirilmiş, ayırma jeline geldikten sonra akım 16 mA’ye yükseltilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır.

Tablo 3.1. Mg-şelataz için kullanılan SDS-PAGE jelinin içeriği

%10 Ayırma Jeli	
Bileşen	Miktar
H ₂ O	11.925 mL
Akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v)	9.975 mL
1,5 M Tris(pH=8,8)	7.5 mL
%10 (w/v) SDS	0.3 mL
%10 (w/v) amonyumpersülfat (APS)	300 µL
Tetrametiletilediamin (TEMED)	15 µL
%5 Yükleme Jeli	
Bileşen	Miktar
H ₂ O	5.63 mL
Akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v)	1.6 mL
0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)	2.5 mL
% 10 (w/v) SDS	0.1 mL
%10 APS	100 µL
TEMED	5 µL

3.6 Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) Kriyojel Kolon Hazırlanması

Poli(HEMA) ve Mg-şelataz immobilize poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolonlar ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kolon sentezi için 1045 µL deionize su içerisinde 21,225 mg N,N-metilen-bis-akrilamid ve 112,5 µL HEMA çözündürülüp stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 1 mL'lik kolon hazırlamak için stok çözülden 760 µL alınıp 221,54 µL saflaştırılan enzim ve 30,75 µL bis(2,2'-bipiridil) MATrp-MATrp rutenyum (II) (MAT-Ru-MATry) eklenerek 2 sa. N₂ gazı altında karıştırılmıştır. Karıştırılan çözüteye polimerizasyon başlatıcı olarak 10 µL amonyum persülfat (APS) ve katalizör olarak 1µL N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) konularak plastik bir şırıngaya doldurulmuştur. Hazırlanan kolon -20 °C 1 gece boyunca polimerleşmesi için bırakılmıştır. Polimerleşen kriyojel kolon dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra 40 mL saf su ile polimerleşmeden kalan maddeleri uzaklaştırmak için yıkanmıştır (Görsel 3. 6).



Görsel 3.6. Soldaki kolon poli (HEMA), sağdaki kolon poli(HEMA-ko-Mg-şelataz)

3.6.1 Poli (HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolon karakterizasyonu

Poli (HEMA) ve poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonların karakterizasyonu da Bölüm 3.4.1’de anlatılan analizler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

3.7 Mg-Protoporfirin Sentezi

Mg-şelataz enzimini içeren protein karışımının immobilize edildiği poli(hema-co-Mg-şelataz) kolonu peristaltik pompa düzeneğine yerleştirilip kolonun dengelenmesi için öncelikle Trisin-NaOH (pH:8.0) tamponu kolondan geçirilmiştir. Protoporfirin IX ve ATP içeren tampon karışımının başlangıç floresansı kaydedilmiştir. Her 15 dakikada bir floresans spektrumundaki değişim incelenmiş ve her ölçüm sonrasında protoporfirin IX ve ATP çözeltilisinin floresans değeri kaydedilmiştir. Spektrumdaki düşmeden kaynaklı enzimin aktif olduğu ve Mg-protoporfirin dönüşümünün tamamlandığı varsayılmıştır.

4. BULGULAR

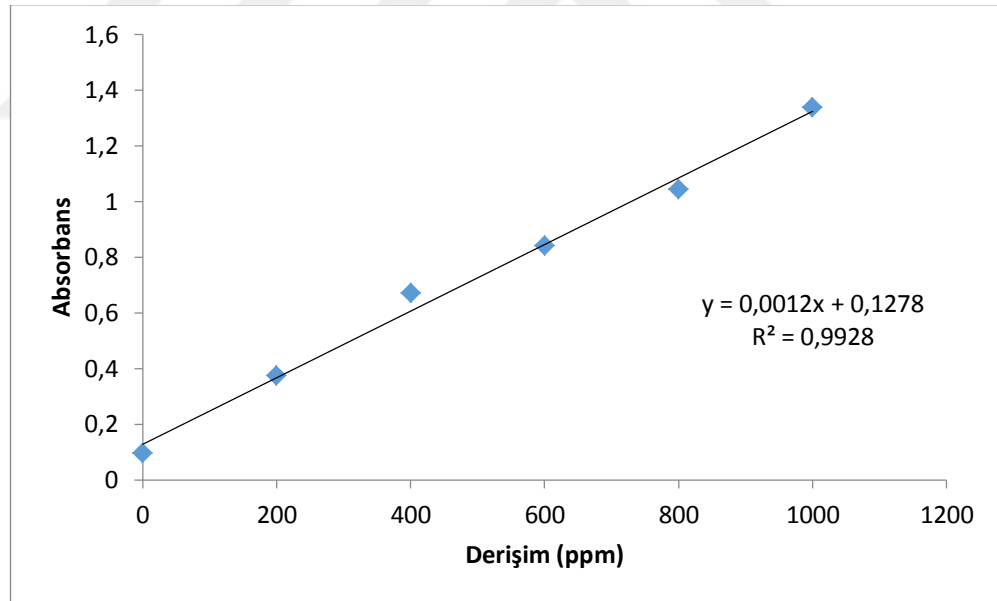
4.1 Kloroplast İzolasyonu ve Karakterizasyonu

120 mL bitki homojenat çözeltisi ile çalışmaya başlanmış olup her bir santrifüj basamağında numune ayrılmıştır. Son olarak izole edilen kloroplastlar 1 mL kloroplast tamponu ile resüspanse edilmiştir.

İzole edilen kloroplastlar şok etkisiyle parçalandıktan sonra tekrar santrifüj edilerek süpernatant kısmı toplanmıştır. Toplanan süpernatantın karakterizasyonu için miktar tayini ve Mg-şelataz enzim aktivitesine bakılmıştır.

4.1.1 Protein miktar tayini

İzolasyon aşamasında her santrifüj basamağından ayrılan numunelerin miktar tayini için BSA standart olarak kullanılarak Şekil 4.1'deki kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak ilk homojenatta 2050 ppm 200xg'den sonra 1443 ppm ve 9870xg'den sonra ise 4,8 ppm protein olduğu hesaplanmıştır.

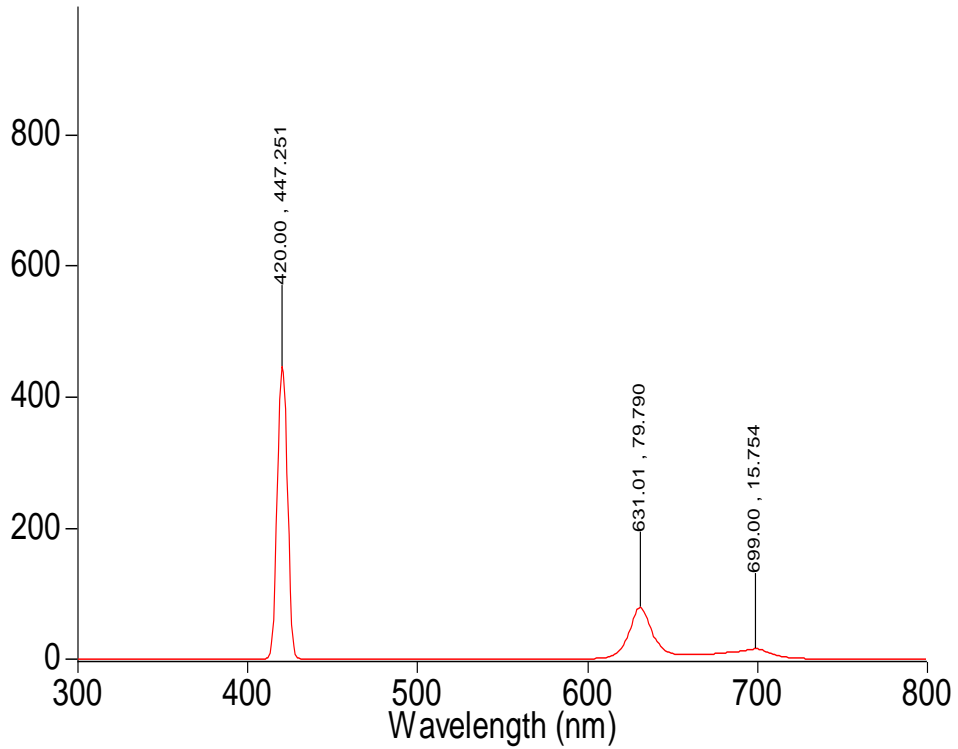


Şekil 4.1. BSA standart grafiği

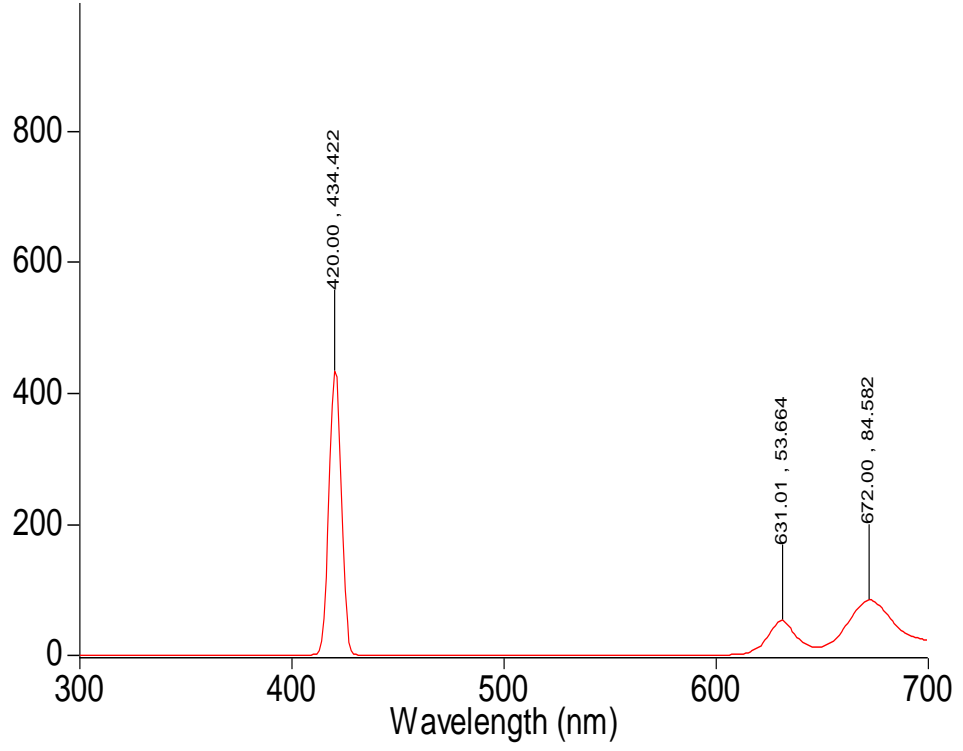
4.1.2 Mg-şelataz aktivite tayini

Enzim aktivitesi, başlangıçtaki substrat (protoporfirin IX) miktarına göre elde edilen floresans şiddetinin Mg-porfirin oluştuğu sönümlenmesiyle oluşan farka göre belirlenmiştir. Şekil 4.2'de verilen spektrum, içerisinde enzim olmayan ve kör numune adı verilen çözeltiliye, Şekil 4.3'de verilen spektrum kloroplastlara ve Şekil.4.4'de

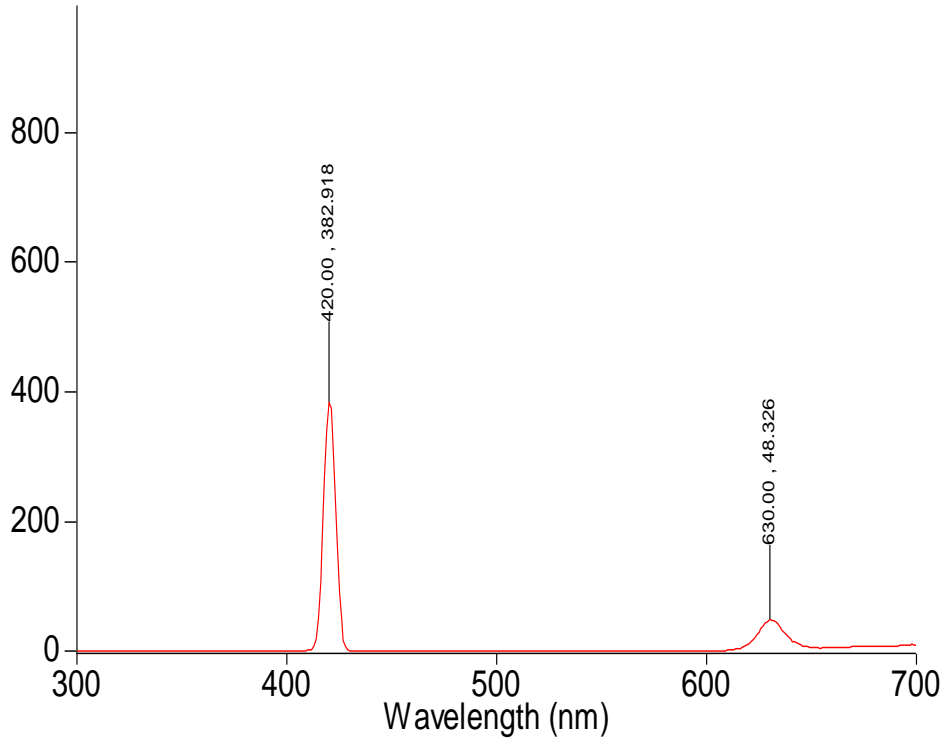
verilen spekturum ise 9870 x g'den sonra alınan süpernatanta aittir. Çözeltiler 420 nm'de uyarılmış ve uyarılan aktivite çözeltisi 631 nm'de emisyon piki vermiştir. Sırasıyla kör numuneye ait emisyon piki 79,790 parçalanmış kloroplastlara ait emisyon piki 53,664 ve 9870 x g'den sonra alınan süpernatant çözeltisine ait emisyon piki ise 48,326 olarak bulunmuştur. Spekturumlardan da görüldüğü gibi kör numuneye karşı diğer iki spekturumun emisyon piklerinde bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu da bize enzimin protoporfirin IX'u kullanarak Mg-protoporfirin oluşturduğunu göstermektedir. Şekil 4.4'e bakıldığında 9870 x g'den sonra alınan süpernatant çözeltisinde daha fazla düşüş gözlenmiştir. Parçalama koşullarının sert olmasından dolayı kloroplastların da parçalanarak enzimin süpernatanta geçtiği düşünülmektedir. 699 nm'de gelen pikin ise örneklerdeki kloroplastlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.2. İçerisinde enzim olmayan kör numuneye ait floresans ölçümü

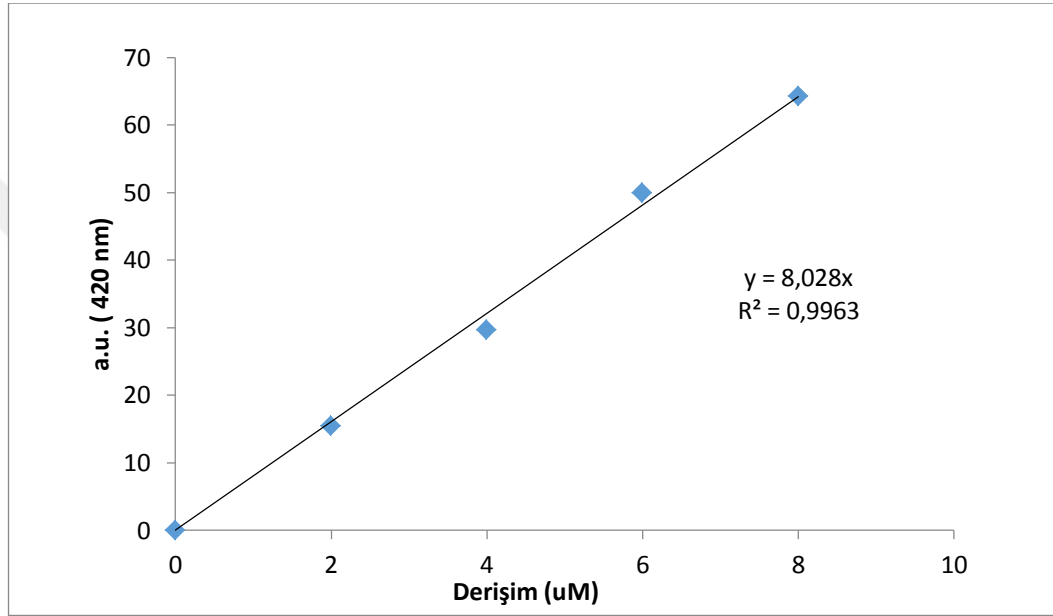


Şekil 4.3. Parçalanmış kloroplastlara ait floresans ölçümü



Şekil 4.4. 9870 x g'den sonra alınan süpernatant çözeltisine ait floresans ölçümü

Harcanan substrat miktarını belirlemek için farklı derişimlerde (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 μM) hazırlanan protoporfirin IX ile çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Çizilen kalibrasyon grafiğinden harcanan protoporfirin miktarı hesaplanmıştır. 10 μM kırılma noktası olduğundan grafiğe alınmamıştır. Parçalanmış kloroplastlar başlangıç miktarına göre yaklaşık olarak 3,26 μg protoporfirin IX, 9870 x g'den alınan süpernatant çözeltisinde ise yaklaşık olarak 3,93 μg protoporfirin IX harcanmıştır.



Şekil 4.5. Protoporfirin IX kalibrasyon grafiği

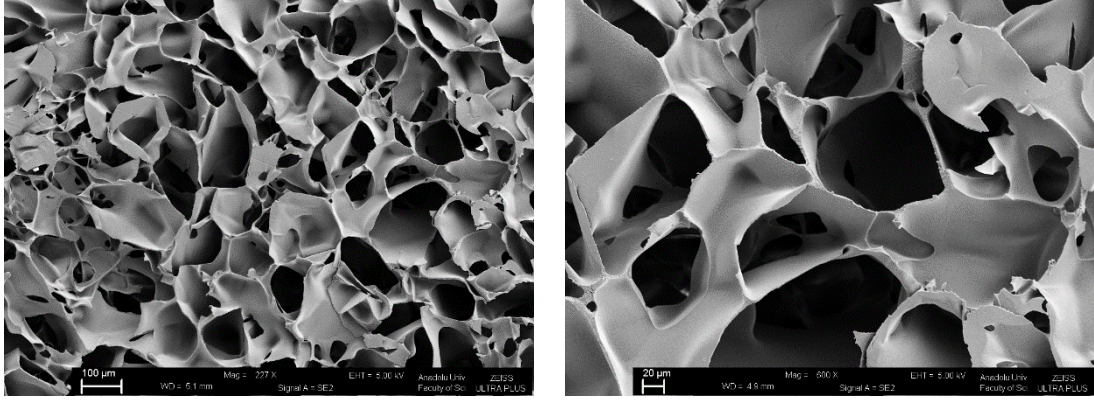
4.2 Sibakron Mavisi Boya Ligand Afinité Kolon Karakterizasyonu

Bölüm 3.5'de anlatıldığı üzere hazırlanan Poli(HEMA) ve sibakron mavisi immobilize edilen Poli(HEMA-ko-Sibakron mavisi) kriyojel kolonların karakterizasyonu için SEM, FTIR, ve şişme derecesi hesaplanmıştır.

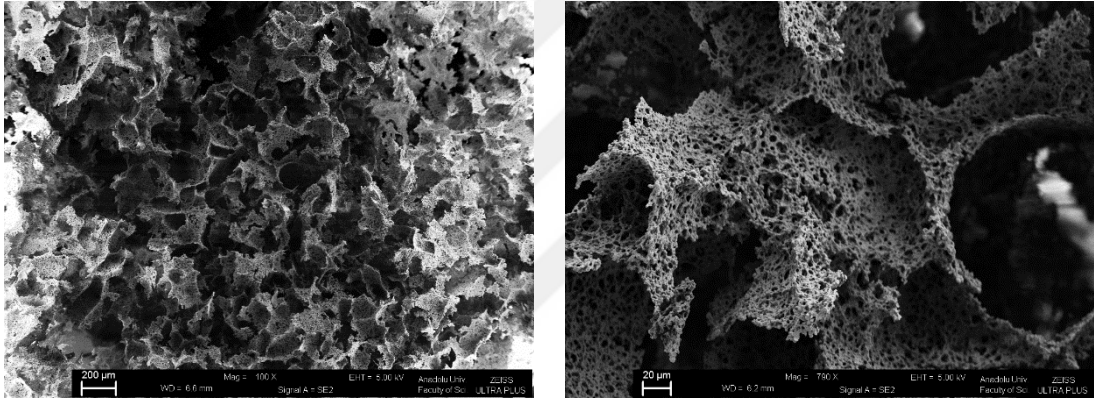
4.2.1 SEM ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Poli(HEMA) ve boya immobilize edilmiş Poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kolonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Şekillerde de görüldüğü makro gözeneklere sahip birbiriyle bağlantılı düzgün bir ađ örgüsü bulunmaktadır. Gözenek boyutu yaklaşık olarak poli(HEMA) kriyojel kolon için 20-100 μm , boya immobilize poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolon için 20-200 μm arasındadır. Boya bağlama aşamasında yüksek sıcaklıklara çıkıldığından çeperlerde

tahrip gözlenmektedir. Fakat ağ örgüsü bozulmadığından kolonun tutma kapasitesinde değişiklik gözlenmemektedir.



Şekil 4.6. Poli(HEMA) kriyojel kolon



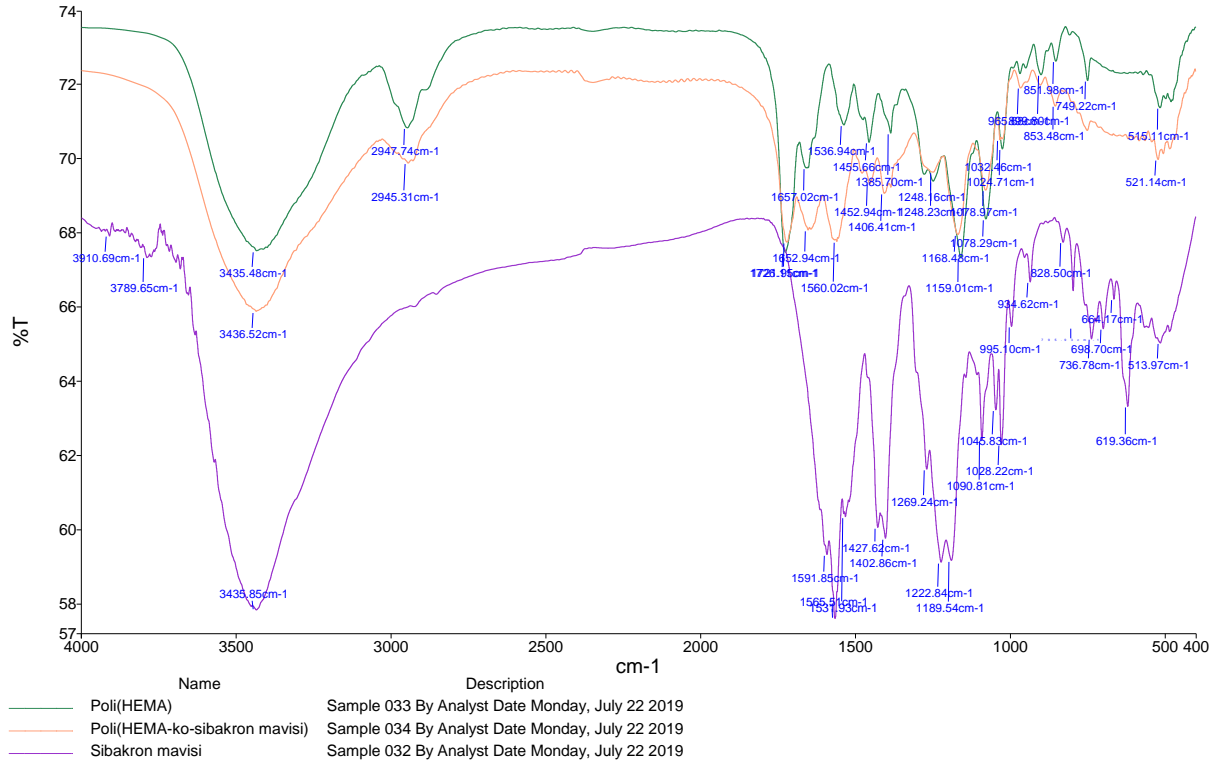
Şekil 4.7. Boya immobilize edilmiş poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolon

4.2.2 FTIR

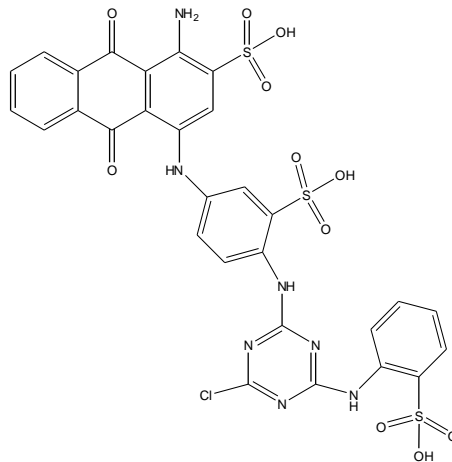
Poli(HEMA), poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) ve sibakron mavisi boyasına ait FTIR spektrumları Şekil 4.8’de ve sibakron mavisi boyasının yapısı Şekil 4.9’da gösterilmektedir. Yapı göz önüne alındığında FT-IR analizi sonucunda 1090.81 cm^{-1} ’de (C-Cl gerilmesi), 1045.83 cm^{-1} ve 1028.22 cm^{-1} ’de (S-O gerilme titreşimleri), 3435.85 cm^{-1} ’de (O-H gerilmesi), 3789.65 cm^{-1} ’de (N-H gerilme frekansları) pikler elde edilmiştir. Bu pik aralıkları sibakron mavisi boyasına ait karakteristik piklerdir.

HEMA ve bis akrilamid’e ait polimerleşme reaksiyonu Şekil 4.10’da verilmektedir. Poli(HEMA) kriyojeline ait FT-IR analizleri sonucunda, C=O keskin piki 1726.11 cm^{-1} ’de, C-O (ester) titreşim gerilimleri 1248.23 cm^{-1} ve 1159 cm^{-1} ’de, hidroksil gruplarının titreşim gerilimleri 3435.85 cm^{-1} ’de gözlemlenmiştir. Bu pikler yapı ile karşılaştırıldığında poli(HEMA)’ya ait karakteristik piklerdir.

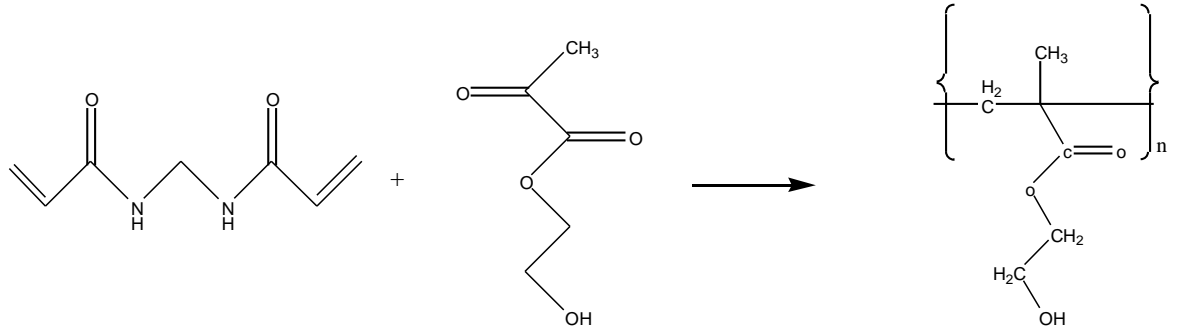
Poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolonunda boya immobilizasyonundan dolayı ilave bantlar bulunur. 1248.16 cm^{-1} 'deki bant, boya molekülünün sülfonik asit gruplarından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, 965.68 cm^{-1} ve 853.48 cm^{-1} 'deki bantlar, boya moleküllerinin birincil ve ikincil amin gruplarının sallama titreşiminden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, bu FT-IR analizi sonucunda sibakron mavisi'nin poli(HEMA) üzerine başarılı bir şekilde bağlandığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.8. Poli(HEMA), poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) ve sibakron mavisi ait FTIR spektrumları



Şekil 4.9. Sibakron mavisi boyanın molekül yapısı



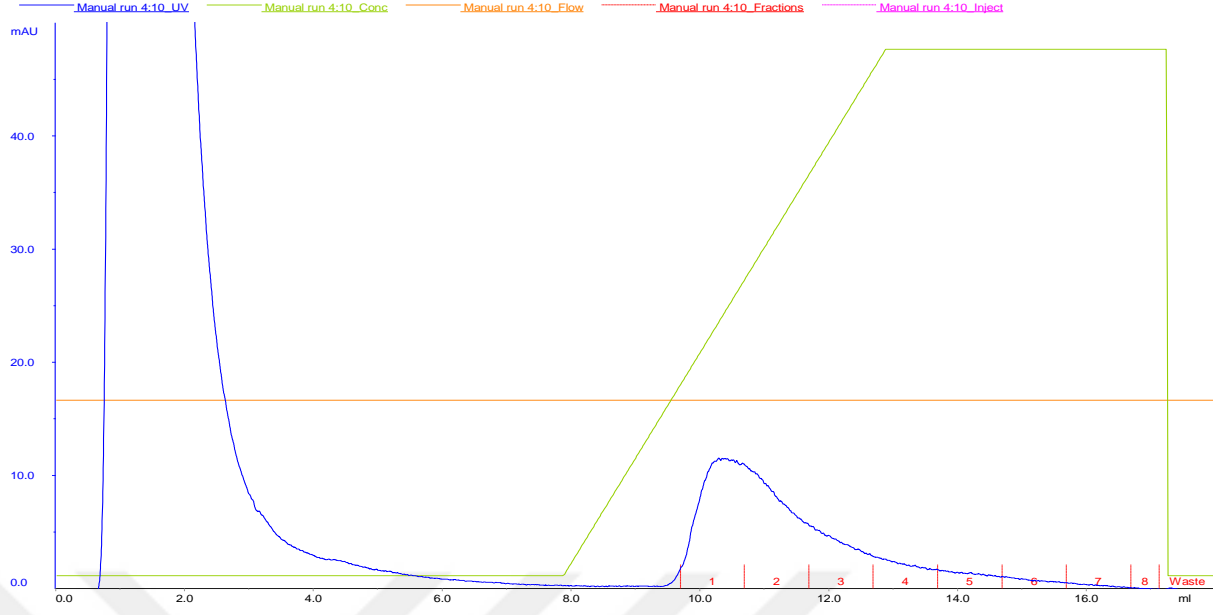
Şekil 4.10. Poli(HEMA)'nın polimerleşme reaksiyonu

4.2.3 Şişme testi

Mg-şelataz enziminin saflaştırılması için hazırlanan boya immobilize edilen Poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolonu ve kontrol grubu için hazırlanan Poli(HEMA) kolonundan alınan kesit 1 gece boyunca etüvde kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından alınan kesitin kuru ağırlığı $W_k(\text{poli(HEMA)})$ 24.8 mg olarak ve şişirildikten sonra ki ağırlığı ise $W_s(\text{poli(HEMA)})$ 314.7 mg olarak tartılmıştır. Şişme derecesi denklem 3'e göre % 1.169 olarak hesaplanmıştır. Poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kolonundan alınan kesitin kuru ağırlığı $W_k(\text{poli(HEMA-ko-sibakron mavisi)})$ 46.6 mg olarak ve şişirildikten sonra ki ağırlığı ise $W_s(\text{poli(HEMA-ko-sibakron mavisi)})$ 1.079 mg olarak tartılmıştır. Şişme derecesi denklem 3'e göre % 2.215 olarak hesaplanmıştır. Yüksek şişme kapasitesine sahip kriyojeller büyük porlara sahiptir ve çapraz bağları daha kuvvetlidirler.

4.3 Saflaştırma Çalışmaları

Saflaştırılan Mg-şelataz'a ait FPLC kromatogramı Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Mavi bant absorbansı, yeşil bant ise tuz derişimini ifade etmektedir. İlk pik kolona bağlanmadan çıkan safsızlıkları ve ikinci pik ise saf Mg-şelataz enzimini ifade etmektedir. Mg-şelataz enzimi yeşil salatalık yapraklarından boya ligand afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Tuz derişiminin artmasıyla, sibakron mavisi immobilize edilmiş boya ligand afinite kolonuna bağlanan Mg-şelataz enzimi kolondan sökülerek fraksiyon toplayıcı ile tüplere 1'er mL olacak şekilde toplanmıştır.



Şekil 4.11. Mg-şelataz saflaştırılmasına ait FPLC kromatogramı

4.3.1 Enzim karakterizasyonu

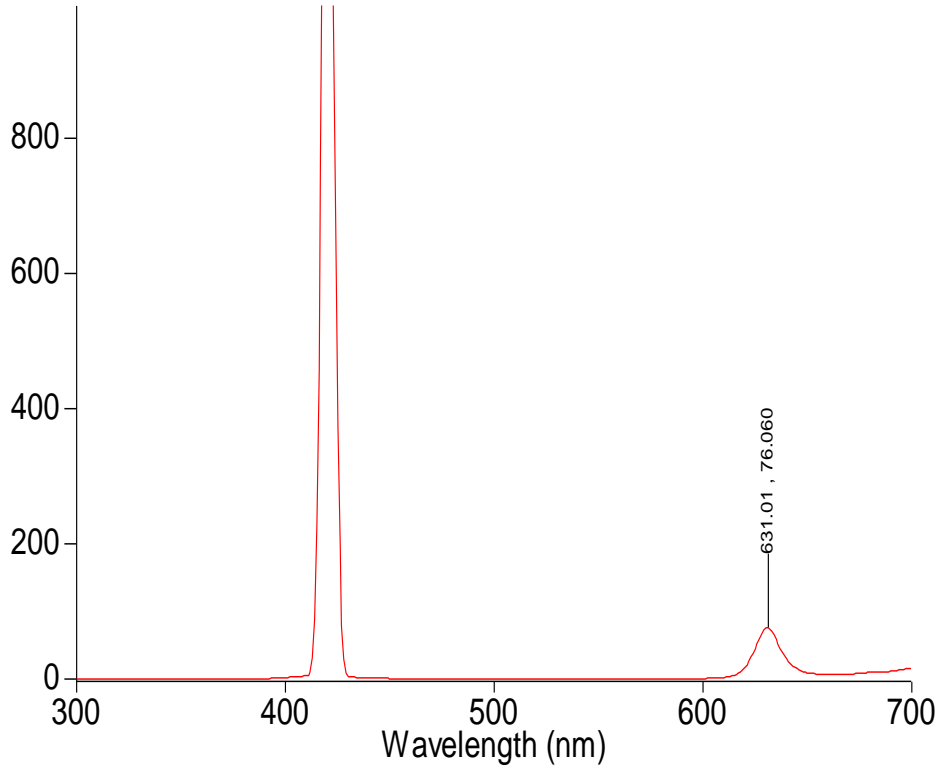
Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu için gerçekleştirilen miktar tayini, Mg-şelataz aktivite tayini ve saflığı hakkında bilgi sahibi olabilmek için yapılan SDS-PAGE jel elektroforezi sonuçları aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

4.3.1.1 Protein miktar tayini

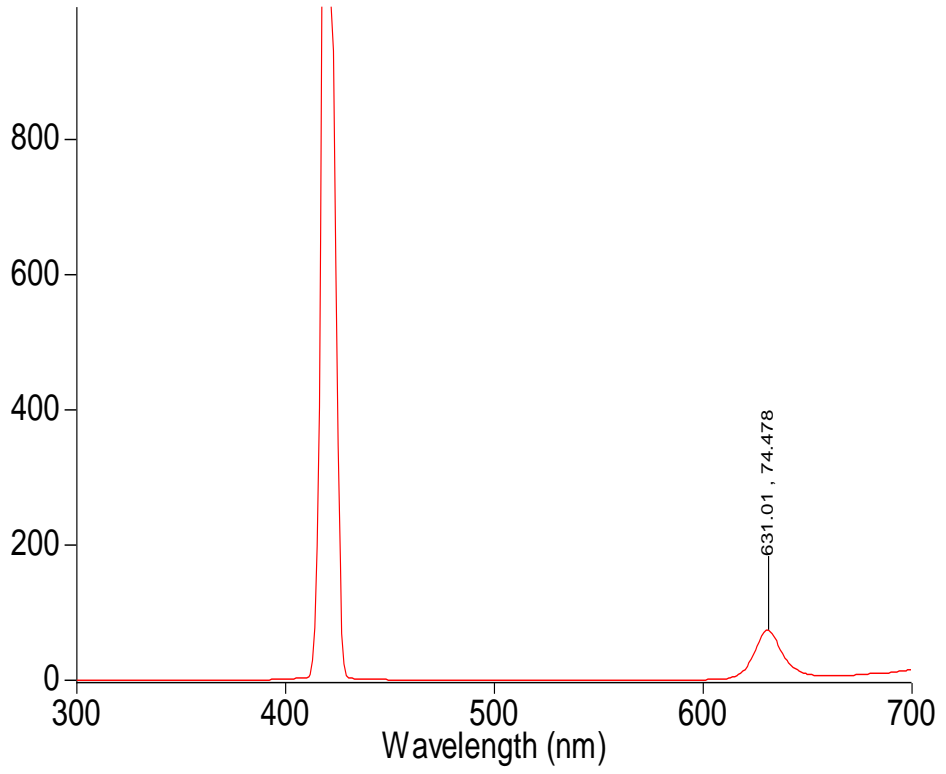
Eşitlik 3.1'den yararlanılarak hesaplanan saf Mg-şelatazın miktarı 1 ppm bulunmuştur. Yapılan ölçümler üçlü tekrar yapılmıştır. Spesifik aktivite hesaplanırken protein miktarının düşük, aktivitenin ise yüksek olması beklenmektedir.

4.3.1.2. Mg-şelataz aktivite tayini

Saflaştırılan enzimin aktivite tayini Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şekil 4.12 içerisinde enzim olmayan kör numuneye ait floresans spektrumunu göstermektedir. Şekil. 4.13 ise saflaştırılan Mg-şelataz enzimine ait floresans spektrumuna aittir. Emisyon pikindeki düşüş saflaştırılan enzimin aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.



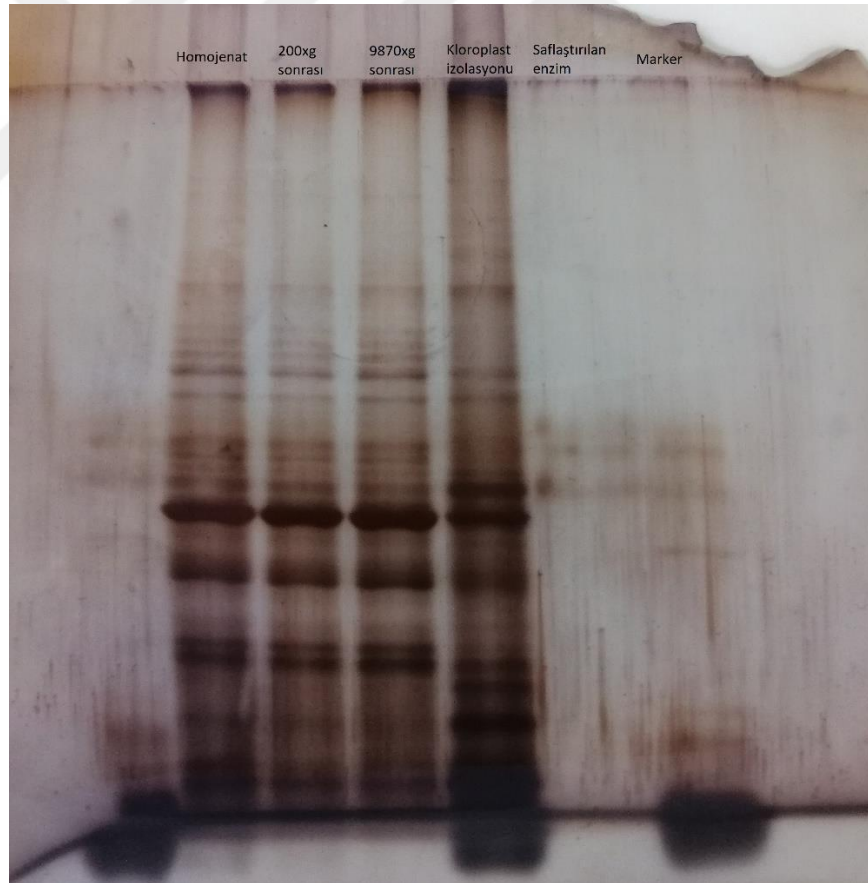
Şekil 4.12. İçerisinde enzim olmayan kör numuneye ait floresans ölçümü



Şekil 4.13. Saflaştırılan enzime ait floresans spektrumu

4.3.1.3 SDS-PAGE jel elektroforezi

Salatalık yapraklarından saflaştırılan enzime ait jel görüntüsü Görsel 4.1’de verilmektedir. Jelde markera ait bantta problem yaşanmıştır. Jel daha hassas bir yöntem olan gümüş boyama yöntemiyle boyanmıştır. Gümüş, proteindeki sülfidril ve karboksil gruplarına bağlanarak boyama yapar. Gümüş boyama, saptama sınırları protein başına 3-5 ng’a kadar düşen hassas bir yöntemdir. Her basamaktan alınan örnek bantları ve saflaştırılan enzimin bantları karşılaştırıldığında, saf Mg-şelataz enziminin 2 bant verdiği görülmektedir. Kolondan alınan saf numune diğer basamaklarda karşılaşılan safsızlık bantlarından başarılı bir şekilde elenmiştir. Bu da bize sibakron mavisi boya immobilize afinite kolonunun başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Elimizde ticari enzim bulunmadığından kolondan alınan numunenin karşılaştırılması yapılamamıştır fakat kolondan alınan numune Mg-şelataza ait aktivite gösterdiğinden elde edilen piklerin enzime ait olduğu düşünülmektedir.



Görsel 4.1. SDS-PAGE jel görüntüsü

Saflaştırılan enzime ait spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve % verim hesaplanarak Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Mg-şelataz saflaştırma karşılaştırması

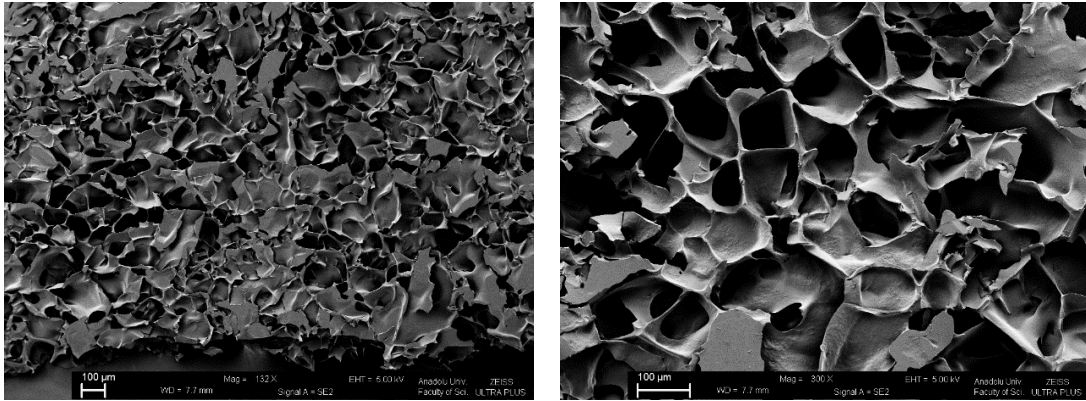
	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (UmL ⁻¹)	Miktar (mgmL ⁻¹)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg ⁻¹)	Saflaştırma Derecesi	% Verim
9870 x g sonrası alınan süpernatant	61	0,016	1,233	0,976	0,0129	1	100
Saflaştırılan enzim	1	0,001	0,001	0,001	1	77,5	6.25

4.4 Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

Bölüm 3.7’de bahsedildiği gibi hazırlanan Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) kriyojel kolonların karakterizasyon sonuçları aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

4.4.1 SEM ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-ko-Mg-Şelataz) kolonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.14’de gösterilmektedir. Şekillerde de görüldüğü gibi makro gözeneklere sahip birbirleriyle bağlantılı düzgün bir ağ örgüsü bulunmaktadır. Gözenek boyutu yaklaşık olarak 20-100 µm arasındadır.

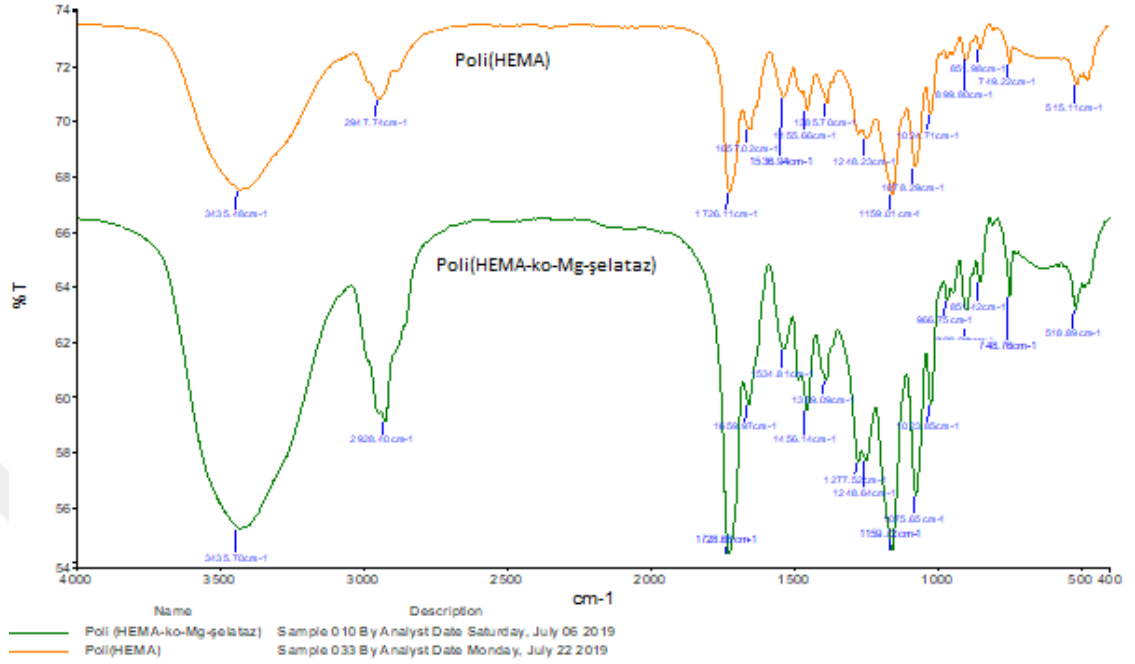


Şekil 4.14. Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonların SEM görüntüleri

4.4.2 FTIR

Aşağıda verilen FT-IR spektrumları (Şekil.4.15) poli(HEMA) ve poli (HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonlarına aittir. Spektrumlara bakıldığında karakteristik pikler: 3435 cm⁻¹’de (-OH gerilme), 2928 cm⁻¹’de (CH₂ gerilme) 1724 cm⁻¹’de (C=O) ve 1250-849 cm⁻¹ aralığında (C-O ve C-O-C gerilme frekansları) gözlemlenmiştir. Bu

pik aralıkları poli(HEMA)'ya ait karakteristik piklerdir ve HEMA'nın varlığını göstermektedir.



Şekil 4.15. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonlarına ait FT-IR spekturumu

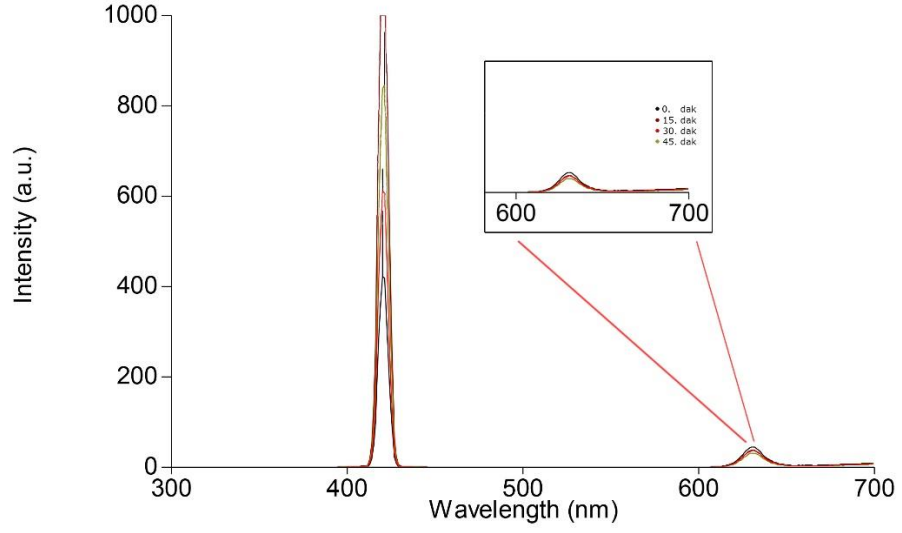
4.4.3 Şişme Testi

Mg-protoporfirin dönüşümü için hazırlanan poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonu ve kontrol grubu olarak kullanılan poli(HEMA) kolon etüvde 1 gece boyunca kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından ağırlıkları tartılmıştır. $W_k(\text{poli-HEMA})$ kriyojel kolonun ağırlığı 0,011 gram ve $W_k(\text{poli(HEMA-ko-Mg-şelataz)})$ kriyojel kolonun ağırlığı ise 0,010 gram bulunmuştur. Su ile şişirilen kolonlar tekrardan ölçülmüş, $W_ş(\text{poli-HEMA})$ 1.006 g ve $W_ş(\text{poli(HEMA-ko-Mg-şelataz)})$ ise 1.199 gram olarak bulunmuştur. 3 no'lu eşitlik kullanılarak yüzde şişme kapasiteleri bulunmuştur Buna göre poli(HEMA) kriyojel kolonun şişme derecesi %1149, poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonun şişme kapasitesi ise %798 olarak hesaplanmıştır.

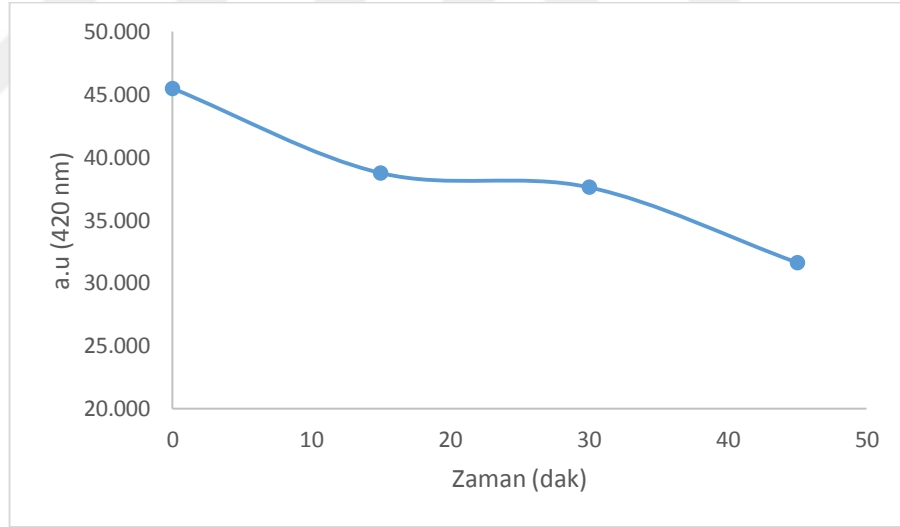
4.5 Mg-Porotoporfirin Sentezi

Mg-protoporfirin sentezi için, Mg-şelataz enzimi immobilize edilen poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolonu ATP, protoporfirin IX ve $MgCl_2$ içeren çözelti içerisinde 30 °C'de inkübe edilmiştir. Her 15 dakikada örnek alınarak florimetrik olarak ölçüm yapılmış (Şekil 4.16) ve elde edilen emisyon pik değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.17). Emisyondaki düşüş, zamanla enzimin, ortamdaki Mg

iyonlarını protoporfirin halkasına katarak Mg-protoporfirine dönüştüğünü göstermektedir.



Şekil 4.16. Mg-protoporfirin dönüşümüne ait floresans spektrumları



Şekil 4.17. Mg-protoporfirin dönüşüm grafiği

5. Tartışma ve Sonuç

Mg-şelataz, klorofil biyosentezinde görev alan bir enzimdir. Mg iyonlarını ATP varlığında protoporfirin halkasına bağlayarak Mg-protoporfirine dönüştürür. Bu da klorofil eldesinin ilk basamağıdır. Mg şelataz çalışılması zor bir enzim olduğundan literatürde çok fazla kaynak bulunmamaktadır. Mg-şelataz enzimi genellikle bitki kaynaklı elde edilse de bakteri kaynaklı da elde edilebilir (Gorchein, 1997). Fakat her iki yöntemde de parçalama esnasında aktivitelerinin yaklaşık % 95'ini yitirmektedir (Walker & Willows, 2015). Yapılan çalışmada Mg-şelataz saflaştırılmasından elde edilen verim 6,25 olarak hesaplanmıştır.

Mg-şelataz saflaştırılması için boya ligand afinite kromatografisi kullanılmıştır. Literatür araştırması yapıldığında çoğunlukla ticari bir madde olan mavi agaroz kullanıldığı görülmektedir (Guo, Luo, & Weinstein, 1998), fakat bu çalışmada ticari bir madde yerine laboratuvar koşullarında rahatlıkla yapılabilecek ucuz ve kolay bir yöntem seçilmiştir. Literatürde Mg-şelatazın sibakron mavisi immobilize edilmiş boya ligand afinite kolonu ile saflaştırıldığına rastlanmamıştır. Bu nedenle saflaştırma verimi karşılaştırılamamıştır. Saflaştırma işlemi tek basamakta gerçekleştirilerek % 6,25 verim elde edilmiştir. Tek basamakta gerçekleştirilmesi enzim için artı bir özelliktir, çünkü Mg-şelataz enzimi stabil olmayan ve çok çabuk denatüre olan bir enzimdir (Guo et al., 1998). Hatta bazı kaynaklarda enzim ortamından ayrıldığında çalışmadığı gözlenmiştir. Bu şartlar altında saflaştırma işlemi tek basamakta gerçekleştirerek hem zamandan tasarruf edilmiştir hem de ara basamaklarda oluşabilecek aktivite kaybı önlenmiştir.

Hazırlanan poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kriyojel kolonun SEM görüntüleri incelendiğinde NaOH derişiminden kaynaklı bir tahribat gözlenmektedir. Fakat bu tahribat kolonun ağ örgüsünü bozmamıştır ve bağlanma kapasitesinde bir farklılık göstermemiştir.

Hazırlanan kolonun FTIR spekturumlarına bakıldığında 1248.16 cm^{-1} 'deki pik, boya molekülünün sülfonik asit gruplarından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, 965.68 cm^{-1} ve 853.48 cm^{-1} 'deki bantlar, boya moleküllerinin birincil ve ikincil amin gruplarının sallama titreşiminden kaynaklanmaktadır. Literatürdeki FTIR spekturumları (Doğan et al., 2012) ile kıyaslandığında boyanın başarılı bir şekilde poli(HEMA) kolona bağlandığı görülmektedir.

Kolon karakterizasyon basamaklarından bir diğeri ise şişme derecesidir. Poli(HEMA) kriyojel kolonlarda şişme dereceleri oldukça önemlidir; çünkü kolon ne kadar su tutar ise o kadar şişer ve gözenekleri büyür. Bu da çok düşük basınçlarda çalışma olanağı sağlar. Poli(HEMA) kolona ait şişme derecesi % 1079 poli(HEMA-ko-sibakron mavisini) kriyojel kolona ait şişme derecesi ise % 2215 olarak hesaplanmıştır. Şişme dereceleri, kolon hazırlama prosedürü referans alınan makale ile karşılaştırılmıştır (Doğan et al., 2012). Bu durum ortamda bulunan hidrofilik grup sayısındaki artış ile doğru orantılıdır.

Saflaştırılan enzimin saflığı hakkında bilgi sahibi olmak için SDS-PAGE jel elektroforezi ile numuneler yürütülmüştür. Jel hassas bir yöntem olan gümüş boyama ile boyanmıştır. (Chevallet, Luche, & Rabilloud, 2006) Ticari bir marker olmamasından kaynaklı kıyaslama yapılamasa da saflaştırılan enzim Mg-şelataza ait spesifik aktivite göstermektedir. Bu neden elde edilen bantların enzime ait olduğu düşünülmektedir

Mg-protoporfirin klorofil sentezinin ilk basamağı olduğundan büyük önem taşımaktadır. Laboratuvar koşullarında Mg-protoporfirin sentezini gerçekleştirmek yapay klorofil sentezi çalışmaları için öncü bir çalışmadır. Mg-protoporfirin dönüşümü için saflaştırılan Mg-şelataz enzimi ANADOLUCA metodu ile kriyojel kolon üzerine immobilize edilmiştir. Daha sonra kolon ATP ve Mg iyonları varlığında 30 °C'de inkübe edilerek enzimin katalizliğinde Mg-protoporfirin sentezi gerçekleştirilmiştir. Literatürde poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolonuna ve Mg-protoporfirin sentezine ait bilgiye rastlanmadığı için Mg-protoporfirin için bir kıyaslama yapılamamıştır.

Mg-protoporfirin sentezi için hazırlanan mg-şelataz immobilize poli(HEMA-ko-Mg-şelataz) kriyojel kolonlarının karakterizasyonu için SEM-FTIR ve şişme derecesi hesaplanmıştır. SEM görüntülerine bakıldığında düzgün bir ağ örgüsüne sahip olduğu görülmektedir. 100 µm'ye kadar birbiriyle düzgün bir ağ örgüsüne sahip makro gözenekli yapılar, farklı boyutlardaki maddelerin matriksin tıkanma riski olmadan saflaştırılmasını sağlar.

Hazırlanan poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolonların FTIR spektrumlarına bakıldığında 3435 cm⁻¹'de (-OH gerilme), 2928 cm⁻¹'de (CH₂ gerilme) 1724 cm⁻¹'de (C=O) ve 1250-849 cm⁻¹ aralığında (C-O ve C-O-C gerilme frekansları)

gözlemlenmiştir. Bu pik aralıkları poli(HEMA)'ya ait karakteristik piklerdir ve HEMA'nın varlığını göstermektedir.

Hazırlanan enzim immobilize poli(HEMA-ko-mg-şelataz) kriyojel kolonun şişme derecesi % 798 olarak bulunmuştur. Hazırlanan kolon literatürde yeni bir kolon olduğundan şişme derecesini kıyaslayacak bir yayın bulunmamaktadır. Fakat bulunan değer literatürdeki farklı kriyojel kolonların şişme dereceleri ile karşılaştırıldığında iyi bir değerdir (Verissimo et al., 2017).

Sonuç olarak yapılan çalışmada; ilk olarak, Mg-şelataz enzimi saflaştırılması için ilk defa poli(HEMA-ko-sibakron mavisi) kolon kullanılmış olup tek basamakta saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel görüntülerine bakıldığında tek basamakta birçok safsızlığın elendiği açıkça gözlenmektedir. Mg-şelataz saflaştırılması için kolay ve ucuz olan bu yöntem literatüre kazandırılmıştır. İkinci olarak ise elde edilen saf numune kriyojel kolona immobilize edilerek klorofil sentezinin ilk basamağı olan Mg-protoporfirin sentezi için kullanılmıştır. Mg-protoporfirin sentezi yapay klorofil sentezinden yapay oksijen üretici sistemlere kadar birçok alanda kullanılabilir. Bu çalışma ile ilerideki birçok çalışmanın temelini atılması hedeflenmektedir. Ayrıca literatüre yeni bir metod olarak Mg-protoporfirin sentezi kazandırılmıştır.

KAYNAKÇA

- Bennett, T. P. and Frieden, E. (1969). *Modern Topics in Biochemistry*. Macmillan, London: MacMillan Pub Co (May 1966).
- Besergil, B. (n.d.). Kriyojel. Retrieved from <http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/kriyojel-cryogel.html>
- Celikoglu, U. (2015). *No Title*. Anadolu University.
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, *1*(4), 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Chu, Hsiu-An & Chang, Ing-Feng & Shen, C.-H & Chen, Y.-T & Wang, H.-T & Huang, Li-Chun & Yeh, K.-W. (2012). Photosynthetic properties and photosystem stoichiometry of in vitro-grown juvenile, adult, and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Botanical Studies.*, *53*, 223-227.
- Dailey, H. A., & Gerdes, S. (2015). HemQ: An iron-coproporphyrin oxidative decarboxylase for protoheme synthesis in Firmicutes and Actinobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.017>
- Denizli, A., & Pişkin, E. (2001). Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *49*(1–3), 391–416. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00209-3)
- Doğan, A., Özkara, S., Sarı, M. M., Uzun, L., & Denizli, A. (2012). Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. *Journal of Chromatography B*, *893–894*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.036>
- Edwin Webb, M. D. (1979). *Enzymes* (Third Edit). New York San Francisco: Elsevier Science & Technology Books.
- GE Healthcare. (n.d.). *Ion Exchange Chromatography Principles and Methods*. Retrieved from

<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13101>

- GE Healthcare. (2007). *Affinity Chromatography Principles and Methods*. Sweden: General Electric Company.
- GIBSON, L. C. D., JENSEN, P. E., & HUNTER, C. N. (2015). Magnesium chelatase from *Rhodobacter sphaeroides*: initial characterization of the enzyme using purified subunits and evidence for a BchI–BchD complex. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj3370243>
- Gorchein, A. (1973). Control of magnesium–protoporphyrin chelatase activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Role of light, oxygen, and electron and energy transfer. *Biochemical Journal*, 134(4), 833–845. <https://doi.org/10.1042/bj1340833d>
- GORCHEIN, A. (1997). Cell-free activity of magnesium chelatase in *Rhodobacter spheroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemical Society Transactions*, 25(1), 82S–82S. <https://doi.org/10.1042/bst025082s>
- Guo, R., Luo, M., & Weinstein, J. D. (1998). Magnesium-Chelatase from Developing Pea Leaves: Characterization of a Soluble Extract from Chloroplasts and Resolution into Three Required Protein Fractions. *Plant Physiology*, 116(2), 605–615. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.605>
- Hansson, M., Gough, S., Kannangara, C., & Wettstein, D. Von. (1997). Analysis of RNA and enzymes of potential importance for regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in the protochlorophyllide accumulating barley mutant *tigrina-d12*. *Plant Physiology { & } Biochemistry (Paris)*.
- Harrow, B., and Mazur, A. (1962). Textbook of biochemistry. Benjamin Harrow, Abraham Mazur, W. B Saunders Company, West Washington Square, Philadelphia 5, Pa., 1962. vi + 651pp. 15.5 × 23cm. Price \$7.75. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(10), 1016. <https://doi.org/10.1002/jps.2600511042>
- Herbert C. Friedmann. (n.d.). *Enzymes*. Van Nostrand Reinhold (June 1, 1981).
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (1992). Enzyme

nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes.

- Kaya, N. (2012). *Manyetik Boya-Ligand Afinite Nanoyapılarını Kullanarak Saccharomyces cerevisiae'den Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması*. Adnan Menderes Üniversitesi.
- Kornberg, A. (1989). *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
- Kumar, A., Mishra, R., Reinwald, Y., & Bhat, S. (2010). Cryogels: Freezing unveiled by thawing. *Materials Today*, 13(11), 42–44. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70202-9](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70202-9)
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Marek, L. R. (1983). Elements of General and Biological Chemistry (Holum, John R.). *Journal of Chemical Education*, 60(7), 613. <https://doi.org/10.1021/ed060p613.2>
- NARAYANAN, S., & CRANE, L. (1990). Affinity chromatography supports: a look at performance requirements. *Trends in Biotechnology*, 8, 12–16. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90124-G](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90124-G)
- Pardo, A. D., Chereskin, B. M., Castelfranco, P. A., Franceschi, V. R., & Wezelman, B. E. (1980). ATP Requirement for Mg Chelatase in Developing Chloroplasts. *PLANT PHYSIOLOGY*, 65(5), 956–960. <https://doi.org/10.1104/pp.65.5.956>
- Robert A. Copeland. (2000). *Enzymes A Partical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Second Edi). Canada.
- Say, R., Kiliç, G. A., Özcan, A. A., Hür, D., Yılmaz, F., Kutlu, M., Ersöz, A. (2011). Investigation of photosensitively bioconjugated targeted quantum dots for the labeling of Cu/Zn superoxide dismutase in fixed cells and tissue sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 135(5), 523–530. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0801-7>

- Schuster, S. and. (n.d.). *Physics and chemistry of life A Scientific American Book*. Forgotten Books.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Tuncer, M. (2008). *Protein Saflaştırma - 1 Kromatografik Teknikler*. Mersin: Cab Matbacılık.
- Veríssimo, L. A. A., Paganoto, F. S., Mol, P. C. G., Ilhéu Fontan, R. da C., Minim, V. P. R., & Minim, L. A. (2017). Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. *Separation Science and Technology*, 52(12), 1973–1982. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1318921>
- Walker, C. J., & Weinstein, J. D. (1991). In vitro assay of the chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-chelatase: resolution of the activity into soluble and membrane-bound fractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5789–5793. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5789>
- WALKER, J. C., & WILLOWS, D. R. (2015). Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj3270321>
- Willows, R. D., Hansson, M., Beale, S. I., Laurberg, M., & Al-Karadaghi, S. (1999). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Rhodobacter capsulatus magnesium chelatase BchI subunit. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 55(3), 689–690. <https://doi.org/10.1107/S09074444998014759>

ÖZGEÇMİŞ

Meltem OKTA

Doğum Yeri ve Yılı : ŞAVŞAT/1992

E-posta : mltmkarahan@gmail.com

: meltemkarahan@eskisehir.edu.tr

Eğitim : Eskişehir Teknik Üniversitesi – Eskişehir

Biyokimya – Yüksek Lisans

Ağustos, 2016 – 2019

Tez: Şelataz Saflaştırılması ve Uygulaması

: Anadolu Üniversitesi – Eskişehir

Kimya – Lisans

Eylül 2010- Haziran 2016

Tez: Ananas Kabuğundan Bromelain Saflaştırılması ve Selülit Giderimi için Teknik Çorap Üretiminde Kullanımı

İş Denevimi : ANADOLU ÜNİVERSİTESİ -2015-2016

Kısmi Zamanlı Öğrenci İşçi

ATLAS CRO MEDİKAL – Ağustos 2019

Klinik Araştırma Saha Koordinatörü

Yetkinlikler

Denatüre Edici Page (SDS PAGE), Mikroplaka Okuyucusu (ELISA), Floresans Spektrofotometresi, UV- VIS Spektrofotometresi, Zetasizer, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon değişim Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Gaz Spektroskopisi (GC)

Sertifika Bilgileri:

- Pedagojik Formasyon Sertifikası - Anadolu Üniversitesi (2016)

- Sertifikalı ve Uygulamalı HPLC&GC Eğitimi - Selçuk Üniversitesi (2017)

Projeler

- 2209-A Tübitak, Ananas Kabuğundan Bromelain Saflaştırılması ve Selülit Giderimi için Teknik Çorap Üretiminde Kullanımı Yürütücü 2015 - 2016
- Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Tavuk Göğüs Kıkırdağından Kolajen Tip 2 Saflaştırılması Araştırmacı 2016 - 2018
- 3001 Tübitak, Heme Sentezi İçin Tekrar Kullanılabilir Yarı Sentetik Ferroşelat Platformları Geliştirilmesi Araştırmacı 2018 - 2019

Bildiriler

- Sözlü Sunum - ICANAS 2nd International Conference On Advances In Natural And Applied Sciences, Antalya, Turkey - Development of Chromatographic Material for Bromelain Purification
- Poster Sunumu - ICANAS 2nd International Conference On Advances In Natural And Applied Sciences, Antalya, Turkey - Purification of Magnesium Chelatase Enzyme from Plant Leaves
- Poster Sunumu – 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi Kuşadası, Türkiye - Tirozinaz Enziminin Saflaştırılması İçin Kriyojel Tabanlı Kromatografik Materyal Geliştirilmesi