

29496

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİMATİK PEPTİD SENTEZLERİNİN
İNCELENMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU

T.Ü. FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ

KİMYA BÖLÜMÜ

Yüksek Lisans Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

1993 EDİRNE

Yönetici: Yrd.Doç.Dr. Ayten SAĞIROĞLU

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİMATİK PEPTİD SENTEZLERİNİN İNCELENMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

Yönetici: Yrd.Doç.Dr. AYTEN SAĞIROĞLU

1993
EDİRNE

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİMATİK PEPTİD SENTEZLERİNİN İNCELENMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 18.05.1993 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

L. Oyma
Üye

Prof. Dr. Ülkü OYMAN *A. S.*

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ayten

M. L. M.
Üye

Prof. Dr. Mehmet İSÇAN

S. S.
SAGIROĞLU



ÖZET

Doğal peptidlerin tıbbi ve farmakolojik bakımdan antibiyotik, hormon, zehir gibi biyolojik aktif özellikleri sebebiyle son yıllarda peptidlerin çeşitli yollarla sentezlerine olan ilgi artarak devam etmektedir. Dolayısıyla peptidlerin aktivitelerini kaybetmeden ılımlı reaksiyon şartlarında ekonomik olarak sentezine imkan sağlayan enzimatik peptid sentezleri geniş ve yoğun bir çalışma alanı bulmuştur. Bizde serbest tripsin enzimi katalizatörlüğünde korunmamış amino asitler arasındaki peptid sentezlerini gerçekleştirerek bu alandaki çalışmalara katkıda bulunmayı amaçladık.

Çalışmamızda homojen ve bifazik reaksiyon sistemlerinde glisin amino asidi ile prolin, tirozin, histidin ve triptofan amino asitleri arasında tripsin enzimi katalizatörlüğünde peptid sentezleri denenmiştir. Bu reaksiyonlarda çözücü ve reaksiyon ortamı olarak kullanılan izo amilalkol, izo propanol, etil metil keton, n-benzol ve izo oktan'ın peptidlerin sentezine etkilerini araştırdık. Çözücülerdeki kısmi polaritenin peptid sentezini bir dereceye kadar artırdığını bulduk. Ayrıca reaksiyon ortamındaki su

miktarının peptid oluşumu üzerine etkisini inceledik. Bunun için %5, %10, %15, %20 fosfat tamponu (0.1 M, pH:8) içeren izo amilalkol, izo propanol ve etil metil keton çözücülü reaksiyonlar gerçekleştirildi. En yüksek peptid verimi %10-15 tampon içeren izo amilalkollü reaksiyon karışımlarında gerçekleşti. Tamponla doymuş reaksiyon karışımlarının inkübasyondan sonraki analiz sonuçlarına göre n-benzollü ve izo oktanlı karışımlarda ürüne rastlanmadı. Diğerlerinde peptidler değişik oranlarda sentezlendi.

Reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonunda kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır.

SUMMARY

Owing to the active biologic characteristics of natural peptides, such as poison, hormone, antibiotic in terms of medicine and pharmacology, the interest for the synthesis of peptides in various ways has gradually been on the increase for the last couple of years. That's the reason why enzymatic peptide synthesis, which make it possible to synthesize peptides economically without making them lose their activity in moderate reaction conditions, have found quite a dense area of operation.

We make it our goal to contribute to the studies made so far in this area by realising the peptide synthesis between unprotected amino acids in free trypsin catalyzer.

In our experiment, we tried, in homogen and biphasic reaction systems, peptide synthesis in the catalyzer of trypsin enzyme among prolin, tyrosin, histidin, tryptophan and glycin amino acids. Isoamyl alcohol, iso propanol, ethylmethyl keton, n-benzol an iso octan, which are used as the solvent and the reaction compost, have been observed in terms of their ef-

fects on peptide synthesis. It was found out that the partial polarity in solvents increased the peptide synthesis to some degree. Moreover, the amount of water in the reaction compost was observed in terms of its effects peptide production. To attain this result, the reactions with iso amyralcohol, iso propanol and ethylmethyketon solvents which 5%, 10%, 15% and 20% of phosphate buffer, were realised. The highest peptide production took place in reaction mixtures which had 10-15% buffer.

According to the results of analysis of mixtures of buffer reactions after the incubation, no product was found in the mixtures of n-bensol and iso octan. In others, the peptides were synthesized in various proportions.

Paper, Thin-Layer and Gas Chromatography have been used, for characterization of products reaction.

TEŞEKKÜR

Bana kendisi ile böyle bir çalışma imkanı tanıyan ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük yardımı ve rehberliğini esirgemeyen Sayın Hocam Yrd.Doç. Dr. Ayten Sağıroğlu'na en içten saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımı her zaman destekleyen Bölüm Başkanımız Sayın Hocam Prof.Dr.Ülkü Oyman'a teşekkür ederim.

Gaz kromatografisi çekimlerinde kendi imkanlarını kullanmama izin verdikleri için Trakya Birlik Entegre Tesisleri sorumlu ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Daima yakın desteklerini gördüğüm aileme ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ	III
1- GİRİŞ	1
2- KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAKLAR ARAŞTIRMASI	3
2.1- AMINO ASİTLER VE PEPTİDLER	3
2.1.1- Peptidleşme Reaksiyonları	5
2.1.2- Kimyasal Katalizatörlerle Peptidleşme Reaksiyonları	7
2.1.3- Enzimatik Peptidleşme Reaksiyonları	9
2.1.3.1- Proteaz Enzimleri	14
2.1.3.1.1- Spesifikliği Yüksek Proteazlar, Tripsin....	22
2.1.3.2- Lipaz Enzimleri	25
2.2. ESTERİFİKASYON.....	29
2.2.1. Esterleşme Reaksiyonları	29
2.2.2. Kimyasal Katalizatörlerle Esterleşme Reaksiyonları	31
2.2.3- Enzimatik Esterleşme Reaksiyonları	32
3- MATERYAL VE METOD	35
3.1- KULLANILAN MADDELER	35
3.2- KULLANILAN ALETLER	35
3.3- ÇÖZELTİLER	36
3.4- YÖNTEM	37

3.4.1-	Çözücü Cinsinin Peptid Sentezine Etkisi	37
3.4.2-	Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanışı	37
3.4.3-	Peptidlerin Sentezlenmesi	40
3.4.4-	Ürünlerin Analizi	40
3.4.4.1-	Kağıt Kromatografisi Uygulamaları (KC)	40
3.4.4.2-	Ince Tabaka Kromatografisi Uygulamaları(TLC)	41
3.4.4.3-	Gaz Kromatografisi Uygulamaları (GC)	43
3.4.5-	Değişen Su İçerikli Reaksiyon Karışımlarının hazırlanışı	44
3.4.5.1-	Reaksiyonların Gerçekleştirilmesi	49
3.4.5.2-	Reaksiyon Karışımlarının Kağıt, Ince Tabaka Ve Gaz Kromatografileri İle Analizi	50
4-	DENEYLER VE BULGULAR	51
4.1.	ÇÖZÜCÜ CINSİNİN PEPTİDLEŞMEYE ETKİSİ	51
4.1.1-	Izo Amil Alkol Çözücüsünün Etkisi	52
4.1.1.1-	Fosfat Tamponuyla Doymuş Izo Amil alkol Çö- zücülü Ortamda Peptid Sentezleri	54
4.1.2-	Izo Propanol Çözücüsünün Etkisi	55
4.1.2.1-	Fosfat Tamponuyla Doymuş Izo Propanol Çözü- cülü Ortamda Peptid Sentezleri	57
4.1.3-	Etil Metil Keton Çözücüsünün Etkisi	58
4.1.3.1-	Fosfat Tamponuyla Doymuş Etil Metil Keton Çö- zücülü Ortamda Peptid Sentezleri	60
4.2-	DEĞİŞEN SU İÇERİĞİNE GÖRE PEPTİD SENTEZLERİ	61
4.2.1-	%5 Sulu Izo Amil Alkollü Ortamda Peptid Sentez- leri	61
4.2.2-	%10 Sulu Izo Amil Alkollü Ortamda Peptid Sentez- leri	63

4.2.3- %15 Sulu Izo Amil Alkollü Ortamda Peptid Sentez- leri	63
4.2.4- %20 Sulu Izo Amil Alkollü Ortamda Peptid Sentez- leri	65
4.2.5- %5 Sulu Izo Propanollü Ortamda Peptid Sentez- leri	66
4.2.6- %10 Sulu Izo Propanollü Ortamda Peptid Sentez- leri	67
4.2.7- %15 Sulu Izo Propanollü Ortamda Peptid Sentez- leri	68
4.2.8- %20 Sulu Izo Propanollü Ortamda Peptid Sentez- leri	69
4.2.9- %5 Sulu Etil Metil Ketonlu Ortamda Peptid Sen- tezleri	70
4.2.10- %10 Sulu Etil Metil Ketonlu Ortamda Peptid Sen- tezleri	71,
4.2.11- %15 Sulu Etil Metil Ketonlu Ortamda Peptid Sen- tezleri	72
4.2.12- %20 Sulu Etil Metil Ketonlu Ortamda Peptid Sen- tezleri	73
4.3- REAKSIYON KARIŞIMLARININ GAZ KROMATOGRAMLARI	76
5- SONUÇLAR VE TARTIŞMA	83
6- KAYNAKLAR	89

ÖZGEÇMİŞ

1. GİRİŞ

Son yıllarda sentetik kimya araştırmalarında enzimlerin katalizatör olarak kullanılması geniş bir alanda önemli yer tutmaktadır. En çok hidrolaz sınıfı enzimlerinden proteazlar ve lipazlarla, oksidoredük-taz enzimleri çeşitli önemli bileşiklerin sentezinde denenmiş başarılı sonuçlar alınmıştır.

Proteolitik enzimlerle, özellikle fizyolojik öneme sahip bazı peptidler, esterler ve amidlerin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bu yolla peptid bağlarının oluşumu ılımlı şartlarda, oldukça hızlı ilerleyip genellikle kantitatif ürünle sonuçlanır.

Bu çalışmamızda spesifikasyonları iyi belirlenmiş bir pankreatik enzim olan serbest tripsin katalizatörlüğünde, organik ortamda, amino asitler arasındaki peptidleşme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu ortamlarda enzimin peptidaz aktivitesi ve etkinliği organik ortam cinsinin peptidleşmeye etkisi, ortam enzimi koruyucu olarak eklenen su miktarının etkisi ve amino asitlerin kimyasal yapılarının peptidleş-

meye etkisi çalışma sonuçlarına göre incelenmiştir.

Tezimde yapılan deneysel ve teorik çalışmalar ve sonuçları detaylarıyla açıklanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAKLAR ARAŞTIRMASI

2.1. AMINO ASİTLER VE PEPTİDLER

Proteinler bütün canlılarda sudan sonra en çok bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bunlar amino asitlerin kopolimerleridir. Proteinlerin yapıtaşı olan amino asitler yapılarında en az bir $-NH_2$ ve $-COOH$ grubu bulundurlar. Doğal proteinlerde en az 20 değişik amino asit bulunur. R- grupları ile birbirinden ayrılırlar. Proteinlerde bulunan amino asitler L- serisine aittir.

Amino asitleri şu şekilde sınıflandırmak mümkündür:

* Yalnız C İçeren Yan Zincirli Amino Asitler:

Glisin, Alanin, Valin, İzolösin, Prolin, ve Fenilalanin. Bu amino asitlerin (Glisin hariç) yan zincirleri hidrofobik bağlar oluşturur.

* Yan Zincirde İyonize Olmayan Ama Polar Etkiyen Grupları ($-OH$, $-SH$, ve birkaç hetero halka) İçeren Amino Asitler : Tirozin, Serin, Triptofan, Treonin,

Sistein, Sistin ve Metiyonin. Yan zincirlerdeki polar etkiyen gruplar peptid zincirinin değişik kısımları arasında hidrojen köprüleri oluşturulmasına katılırlar ve protein molekülünü stabilize ederler.

* Asidik Amino Asitler, Mono Amino Dikarboksilik Asitler: Glutamik Asit, Aspartik Asit. İki karboksil grubu içerirler ve protein molekülüne negatif yük kazandırırılar.

* Bazik Amino Asitler veya Diamino Mono Karboksilik Asitler: Arginin, Lizin, Histidin. İlave bir bazik grup içerirler ve protein molekülüne pozitif yük kazandırırılar.

Tripsinin bazik amino asitlere karşı hidrolaz spesifitesi vardır. Peptidleşme reaksiyonlarında daha çok kromatografik özellikleri sebebiyle tirozin, histidin, triptofan ve prolin amino asitleri seçilmiştir.

Glisin en basit, endojen, asimetrik karbon atomu içermeyen tek amino asittir.

Prolin halkalı yapıda bir sekonder amindir. En çok prolamin grubu proteinlerde bulunur. Endojendir, imino grubu içerir. İzoelektrik noktası 6.10 dur. apolar ve nötraldir.

Tirozin proteinlerde bulunan bir amino asittir. Organizmaya yeter miktarda fenil alanin girdiğinde e-sansiyel değildir. İzoelektrik noktası 5.65 dir, polardır.

Histidin, zayıf bazik imidazol sistemi içerir. Birçok proteinde % 1-2 oranında, hemoglobinde % 10 oranında bulunur. Endojendir. İzoelektrik noktası 7.58 dir. Polar ve zayıf baziktir.

Triptofan birçok proteinde bulunur, eksojendir. Organizmadaki katabolizma yolları iyice bilinmemektedir. İzoelektrik noktası 5.88 dir. Nötral ve apolardır (Karlson, P., Çev: Telefoncu, A.).

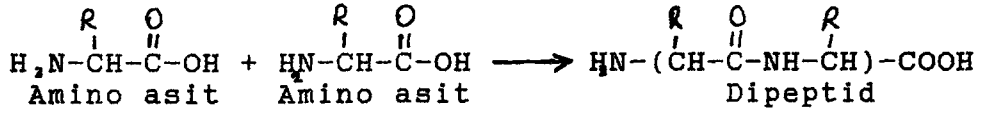
2.1.1. Peptidleşme Reaksiyonları

Peptidler kimyasal yapıları bakımından asit amidleri sınıfına girerler.

Bir amino asitin karboksil grubu ile ikinci bir amino asitin amino grubunun bir mol su ayrılması sonucunda birleşmesiyle bir dipeptid, üç amino asitin aynı şekilde birleşmesiyle bir tripeptid, 2-10 amino

asitten oligopeptid, 10-100 amino asitten de polipeptidler meydana gelir.

Genel bir peptidleşme reaksiyonu aşağıdaki gibi gösterilebilir:



Böylece n tane çeşit amino asit arasından n-1 tane su molekülü ayrılarak çeşitli uzunlukta peptidler sentezlenir.

Peptidler geri reaksiyonla hidroliz olduklarında amino asitlere parçalanırlar. Her tersinir reaksiyon gibi bu da sabit sıcaklıkta bir denge reaksiyonudur. Denge daha çok hidroliz lehinedir. Bunun sebebi; bir peptidin büyük ölçüde dissosiye olmamış ve polar olmayan formlardan sentezlenmesi, bu yapının sulu çözeltilerde pratikçe mümkün olmaması, dayanıksız oluşudur (Tekman, Ş., Öner, N.).

2.1.2. Kimyasal Katalizatörlerle Peptidleşme Reaksiyonları

Basit peptidlerin hormon olarak önemli rol oynamaları ve bu nedenle ilaç araştırmalarında ilginç olmaları son zamanlarda kimyasal peptid sentezlerine ilgiyi tekrar arttırmıştır.

Peptid sentezleri genelde ; bir amino asitin karboksil grubunun aktif bir türevi ile bir amino asit veya peptidin amino grubunun reaksiyona sokulması prensibine dayanır.

Mevcut reaksiyon ortağı gruplar (uç amino grubu, yan zincirdeki $-OH$, $-NH_2$ grupları v.b.) belirli koruma grupları ile korunarak reaksiyona girmeleri engellenmelidir. Son yıllarda bir seri standart reaksiyon ortağı ve koruma grupları geliştirilmiş olmasına rağmen uzun peptidlerin kimyasal yöntemlerle sentezleri hala çok zordur. Herşeyden önce peptid başının oluşumunda $-C$ atomunda rasemleşmeden sakınılmalıdır. Aksi halde doğal olmayan D- amino asitli peptidler ele geçer.

Merrifield tarafından çok zarif bir yöntem gelişt-

tirilmiştir. Burada ilk amino asit karboksil grubu üzerinden çözünmeyen bir polistiren reçineye bağlanır ve adım adım diğer amino asitler kondanse olurlar. Ara ürünlerin saflaştırılması işlemine gerek yoktur ve reaktiflerin fazlası basit bir yıkama ile uzaklaştırılabilir. Ancak yöntem bir sakıncayı da beraberinde getirir: Eğer kondenzasyon kantitatif yürümezse safsızlık olarak kısa ve birbirine çok benzeyen peptidler oluşur.

Sonunda sentezi tamamlanan peptid reçineden hidroliz edilir ve hatalı sentez ürünlerini ayırmak için saflaştırılır (Karlson, P., Çev: Telefoncu, A.).

1960'lı yıllardan beri biyoorganik kimyanın en önemli metotlarından biri katı faz peptid sentezleridir (SPPS).

Bu yöntemde başarı; reçineye bağlı peptid zincirinin serbest amino terminalinin kolay bulunabilmesine bağlıdır. Bundan dolayı etkili katı faz peptid sentezleri; peptid reçinesinin fizikokimyasal özelliklerinin tam olarak anlaşılmasını gerektirir. Polar çözücüler kullanıldığında SPPS'nde peptid sentezinin daha başarılı olacağı düşünülürken peptid ile reçine arasın-

daki solvatasyon ve reçine üzerindeki çözücüye ait özelliklerin kritik değerlendirmesi göz önüne alınmamaktadır (Fields, G.B., Fields, C.G., 1991, Bohinski, R.C., 1983).

2.1.3. Enzimatik Peptid Sentezleri

Enzimler bütün canlı organizmalarda katalizör olarak görev yaparlar. Enzimlerin fonksiyonları biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek ve yaşam sürecinin bütün dinamik olaylarını yönetmektir. Enzimler hücrelerde daima önemsiz miktarlarda mevcuttur. Her enzim daima belirli yalnız bir çeşit reaksiyonu katalizler ve substratın yalnız bir tipi üzerinde etkilidir. Enzimlerin çoğu hücrelerden izole edilirler. Sıcaklığa karşı duyarlıdırlar ve birkaç dakikada 72°C civarında sıcaklıkla inaktif hale gelebilirler (Henry C. vd.)

Geçen on sene zarfında enzimatik reaksiyonlar enzimlerin substrat ve stereoseçiciliklerinden faydalanmak amacıyla organik sentezlerde yaygın olarak kulla-

nılmıştır. Bununla beraber, enzimler organik çözücülerle doğrudan temas ettiklerinde çabuk etkilenip çalışamaz duruma gelirler. Bu problemi gidermek için su ile karışmayan organik çözücüler ve sudan meydana gelen bifazik reaksiyon sistemlerinde enzimlerin korunması sık sık uygulanmıştır. Bunlara örnek olarak proteazlar yada lipazlarla ester ya da peptid sentezlerini verebiliriz. Bu reaksiyon sistemlerinde enzimler sulu fazda çözünürleştirilmiş yahut hidrofilik destekler üzerinde immobilize edilmiştir. Böylece organik çözücülerle temasından korunduğu düşünülmüştür. Ayrıca suyla karışabilen organik çözücülerle birlikte hazırlanan çözeltilerde enzimatik reaksiyonlar, ester ya da peptid sentezlerinde de uygulanmıştır. Fakat böyle hidrofilik organik çözücülerin yüksek konsantrasyonlarında çoğu kez enzimlerin deaktivasyonundan dolayı reaksiyonlar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Hidrofilik organik çözücülerde Polivinilalkole immobilize edilmiş Kimotripsin ile katalizlenen peptid ya da ester sentezleri yapılmıştır.

Bu çalışmada peptid ya da ester sentezlerinde en uygun şartları tayin etmek için; ortamın etkisi, çözü-

cünün yapısının etkisi, PVA/Enzim oranı ve uygun su oranı araştırılmıştır. Yapılan denemeler kimotripsinin basit adsorbsiyon metoduyla polivinilalkol matrixine immobilize edilebildiğini ve immobilize kimotripsinin hidrofilik organik çözücülerde Ac-Tyr-OH' dan peptid ya da ester sentezleri için dayanıklı ve etkili bir katalizatör olduğunu göstermiştir. Peptidler ve esterlerin sentezlerinde karışımdaki su miktarı sonuç ürünlerine ve reaksiyon hızına birinci derecede etkiyen faktör olarak bulunmuştur (Noritomi, H. vd. 1989).

Son yıllarda sentetik kimyada enzimlerin kullanılması araştırma çalışmalarında geniş bir yer kaplamaktadır (White side, vd. 1985). Proteolitik enzimlerin kullanılmasıyla esterler, amidler ve peptid bağlarının sentezlenmelerine çeşitli yönlerde çalışılmıştır (Moriniere, vd. 1988). Bifazik ortamda (Cantucuzene, vd. 1989, Chuang, vd. 1989) ve konsantrasyonu yüksek organik ortamda (Klibanov, vd. 1987, Homandberg, vd. 1978) yapılan denemeler amino asit türevlerinden peptidlerin enzim katalizli sentezlerinde olumlu sonuçlar vermiştir. Bazı amino asit türevlerinden, papain ve pepsin enzimleri katalizatörlüğünde

yapılan peptid sentezi çalışmalarında di ve tri peptidlerin yanında esterlerin de sentezlendiği görülmüştür (Çavdar, E., Uslan, A.H., 1991).

Organik ortamda gerçekleştirilen enzimatik peptid sentezlerinde ortamın içerdiği su miktarının önemini belirlemek için immobilize edilmiş α -kimotripsin katalizatörlü reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda peptidler yüksek verimle sentezlenmiştir. Destek tipinin değiştirilmesiyle enzim çevresinin modifikasyonu gözlenmiş ve az afiniteli nükleofillerde reaksiyon ürünüde önemli bir artışla karşılaşılmıştır.

Son yıllarda az sulu organik ortamda gerçekleşen sentezlere yoğun bir ilgi vardır. Bu sentezlerde enzim ya doğrudan doğruya organik ortamda kolloidal halde kalır ya da inert desteklere immobilize edilir.

Kullanılan immobilize enzimin çeşiti ne olursa olsun nükleofil olarak Phe-NH₂ ve açil vericisi olarak Bz-Tyr-OEt içeren ve 1,1,1-trikloreten'da yürütülen deneylerde yeterli miktarda reaksiyon ürünleri elde edilmiştir. Enzimatik katalizin ilerlemesinde suyun minimum miktarı esastır ve reaksiyon ürünü reak-

siyon ortamına ilave edilen suyun miktarına bağılıdır.

Benzen, 1,1,1-trikloretan, asetonitril, t-amil-alkol, toluen, THF gibi çözücülerin kullanıldığı reaksiyon ortamlarında ürünler yüksek verimle bulunmuştur. Sonuçlar, organik ortamlarda hidroksillenmiş aromatik amino asit esterleri için enzimin yüksek spesifikite gösterdiğini belirler ve sulu organik fazda bulunanlarla karşılaştırıldığında reaksiyon ürünlerinde belirli bir artış gösterir.

Peptidlerin enzimatik sentezlerinin en önemli avantajı, ılımlı deneysel şartlar altında meydana gelmesidir. Çirial karbonların epimerizasyonu gözlenmez. Bununla beraber çoğu durumda substrat çözünürlüğünün artması için suda çözünebilen organik çözücülerin ilavesi, enzimin katalitik özelliklerinde değişikliklere sebep olur (Gaertner, H., vd., 1991).

Enzimatik reaksiyonlarda 3-pentanonun kullanımı her zaman doğru değildir. Çünkü peptidler ve amino asit türevlerinin uygun çözünürlüklerini bulmak için polar çözücüler kullanmak gereklidir. Yayınlanmış çoğu çalışmada etilasetat kullanılmıştır, fakat bazı dezavantajları vardır. Birincisi; esteraz aktivitesi

ile proteazlara riski vardır, dolayısıyla ürünler üzerine etil yada asetil grupları transfer ederek kendi kendine çözücü üzerine etki edebilir. İkincisi; etil asetat yavaş kimyasal hidrolizlerde hassastır ve ürünler sistem ile karışabilir (örneğin pH etkisiyle). Fakat bu çalışma 3-pentanonun etil asetatın yerine geçebilecek değerde olduğunu göstermiştir (Blanco, R.M., vd. 1989).

Biz bu çalışmadan yola çıkarak 3-pentanondan az karbon sayılı olan etil metil keton kullanarak olayı araştırdık.

2.1.3.1. Proteaz Enzimleri

Peptid bağlarının, yan reaksiyonsuz ve ılımlı şartlar altında stereospesifik oluşumu peptid sentezlerinde oldukça zordur. Peptidlerin doğal resolusyonu proteazlarla başarılmıştır. Proteazlar genellikle bir reaksiyonda peptid bağlarının hidrolitik yıkılmasıyla peptidler ve proteinlerin enzimatik indirgenmesini katalizler. Denge etkisi için fizikokimyasal prensip-

lerin kullanımı, ürünlerin konsantrasyonu ve reaksiyonun kinetik parametreleri peptid sentezlerinde proteazların katalitik özelliklerinin başarılı uygulama alanlarındanıdır (Jakubke, D.H., vd. 1985).

Proteaz katalizli peptid oluşumunda genellikle iki strateji kullanılır. Birincisi reaksiyon kinetiği, ikincisi denge kontrolleridir (Gaertner, H. , vd. 1991).

Adsorplanmış yada tutuklanmış bütün sulu sistemlerde ve iki sıvı fazlı sistemlerde kimotripsinin aktif olduğu bulunmuştur. Termodinamik kontrollü sentezlerde kimotripsin kullanıldığında serbest karboksil grubundan gelen açil grubundan dolayı reaksiyon hızları oldukça yavaştır. Sonuçta reaksiyonlar yavaşladığından dolayı artan zamanda enzimin inaktivasyonu söz konusu olduğundan bir problem oluşturur. Kimotripsin'i çeşitli desteklere immobilize ederek çalışan birkaç grup bu sistemleri stabilize etmede faydalı olmuştur (Blanco, R.M., vd. 1989).

Proteaz katalizli sentezlerin faydaları; ılımlı reaksiyon şartları, az rasemizasyon ve korumalı korumasız yan zincir için ihtiyacın az olmasıdır (Kıta-

guchi, H., vd. 1988, Margolin, A.L., Klibanov, A.M., 1987, Guinn, R.M., vd. 1991).

Proteazların sentez reaksiyonlarındaki faydaları seçilen uygun çözücülerle arttırılabilir. Örneğin, çeşitli çalışmalar suyla karışabilir organik kosolventlerin esteraz aktivitesine bağlı amidaz aktivitesinin azaltılabileceğini göstermiştir. Bu durumun da dipeptidlerin sentezlerinde kullanılabileceği bulunmuştur.

Önemli bir çalışmada da tripsinin amidaz ve esteraz aktiviteleri incelenmiştir. K_m ve K_{cat} kinetik parametreleri farklı çözücü konsantrasyonlarında farklı substratlar için tayin edilmiştir. Sonuçlarda kinetik parametrelerde yönelmelerle karşılaşılmıştır. Enzimin yapısı elektron manyetik rezonans spektroskopisi (EPR) ve floresans spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir (Guinn, R.M., vd. 1991).

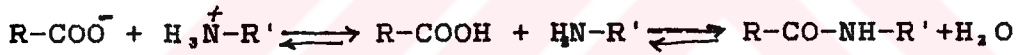
Son zamanlarda sulu çözücüler üzerinden susuz organik çözücülere bir geçiş olduğundan organik ortamda subtilisin proteazla katalizli D-amino asit içeren peptidler sentezlenmiştir (Margolin, A.L., vd. 1987).

Kimotripsin gibi proteazlar amino asit esterleri ve peptidlerin sentezleri için faydalı katalizatörlerdir. Çözünmüş reaktantlar ya da hidrolizin aleyhine denge değiştirmek için suyla karışmayan organik çözücüleri içeren reaksiyon karışımlarını kullanmak ilginçtir.

1898'den önce Vant Hoff kimyasal dengeye ait sebeplere bağlı olarak genellikle peptid bağlarının hidrolizlerini, oluşumlarını katalizleyen proteazların kullanımının mümkün olduğunu savunmuştur. Bu hipotezden yaklaşık kırk yıl sonra Bergmann ve Fraenkel Conrat'ın sunduğu proteaz katalizli reaksiyonların tersine çevrilebilmesinin deneysel ispatı olarak peptid bağı oluşumları kullanılabilir. Bergmann ve öğrencileri proteazların substrat spesifitesi ve stereospesifitesinin hidrolitik etkileri üzerindeki sonuçlara bağlı olarak enzimatik peptid sentezleri hakkında doğru sonuçlara varmışlardır. Son yapılan çalışmalardan proteazların peptid sentezlerinin hazırlık safhasında biyokatalizatör olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

* Termodinamik Kontrollü Peptid Sentezleri

Peptid bağları oluşunun termodinamik kontrolleri peptidlerin katalitik yarılmalarının proteazlarla doğrudan tersine çevrilebileceğini göstermiştir. Aktivitelerin yerine de konsantrasyonlar tanımlanmıştır. Peptid bağı sentezleri endotermik reaksiyonlar olup 10^{-5} den daha küçük iki korumasız amino asidin bağlanması enerji bakımından ve entropi kaybıyla denge sabitinin ($K_{p,p}$ 'nin) dūřmesi daha fazla olur. Hesaplamalarda denge yaklaşımı için alınacak iki termodinamik denge aşağıdaki gibidir.



Yüksüz substratlar arasındaki $K_{i,nv}$; inversiyon dengesi ve ürün $K_{i,oa}$; iyonizasyon dengesidir. Denge sabitinde suyun konsantrasyonu alınarak, toplam yöntem substratın ikisiyle verilir ve pH'ı bilinir. $K_{i,oa}$ ve $K_{i,nv}$ bulunur.

$$K_{p,p} = K_{i,oa} \quad K_{i,nv} = [R-CO-NH-R'] ([R-COO] [H_2N-R'])$$

Bundan dolayı inversiyon dengesi için peptid konsant-

rasyonu önceki iyonizasyon dengesinde oluşan yüksüz substratların konsantrasyonlarına bağlıdır. Dönüşte bu substratlar onların pK değerleriyle tayin edilir. Inversiyon dengesinde yeterince yüksüz substratların konsantrasyonları iyonizasyon dengesinde mevcut olan peptidlerin ölçülebilir konsantrasyonlarını verir.

Termodinamik kontrollü peptid sentezlerine etki eden başlıca iki faktör vardır :

* Substratların pK değerlerinin değişmesiyle $K_{1,00}$ ' un artması,

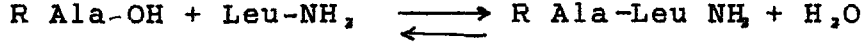
* Hacim etkisine bağlı olarak peptid ürününün konsantrasyonunun artmasıdır.

Her iki faktörün bileşimiyle denge sentez lehinde olacak şekilde ayarlanabildiği için genellikle birincisi tercih edilir (Jakubke, H.D., vd., 1985).

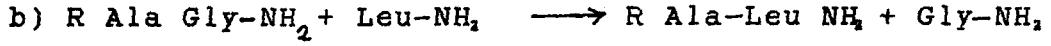
Proteaz enzimleri peptid bağlarının oluşumunu katalizlemede aşağıda gösterilen üç tip reaksiyonda kullanılır.

Proteaz destekli peptid sentezi üzerine üç temel yaklaşım;

* Hidrolizin tersine çevrilmesi:



* Amidlerin aminolizi (Transpeptidasyon):



* Esterlerin aminolizleri:



Çıkan hidroliz ürünleriyle " Hidrolizin Ters Çevrilme " reaksiyonu dengededir. Yüksek ürün verimi; ürünün çökelmesine, suyla karışmayan organik çözücüye ürün geçişine, dört komponente engel olan ürüne ya da kosolventin yüksek konsantrasyonlarının ilavesiyle tercih edilen kararlı ürünün dengede yer değiştirmesine bağlıdır. Hidrolizin ters çevrilmesi domuz insülininde, insan insülininde ve aspartamdaki gibi sentezlerde çok başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Esterlerin aminolizleri; ester substratlarının açılması hızlı olduğundan peptid sentezlerinin ge-

nel yaklaşımları olarak, uygun yaklaşımlardır. Böylece ürün verimi, çözünürlük özelliğine bağlı olmadığından enzim konsantrasyonunun çok azı yeterlidir. Bu yaklaşım dikkate alınmazsa yalnız esterolitik serin ve tiol proteazları katalizator olarak kullanılabilir. Peptidlerin sentezle hazırlanmasında halen kullanılan bu sınıf enzimler aşağıda listelenmiştir.

Tablo 2.1. Peptid sentezlerinde kullanılan serin ve tiol proteazları.

PROTEAZLAR	SPESIFİTELERİ
Kimotripsin	Trp, Tyr, Phe, Leu, Met
Tripsin	Lys, Arg
Elastaz	Küçük hidrofobik kalıntılar
Papain, Kimopapain	P,'de hidrofobik kalıntılar
Postprolin spesifik- endoproteaz	Pro
Karboksi peptidaz Y	Nonspesifik
V ₆ Proteazı	Asp, Glu

Enzimatik peptid sentezlerinde gelecekteki gelişmelerin bir kısmı yeni spesifiteler, serin endo ve karboksi peptidazlar, tiol üretimi ve mikrobiyolojik bölümü ile ilgili olacaktır. Tablo 2.1. deki, proteinlerin sentezinde cüz'i miktarlarda gerekli olan birkaç enzim ticari bakımdan kullanışlıdır.

Proteazlar; enzimatik peptid sentezlerinde gelecekteki gelişmelerin diğer bir alanı olacaklardır (Widmer, F. vd., 1986).

2.1.3.1.1. Spesifikliği Yüksek Proteazlar

Proteazların; sınırlı sayıda peptid bağlarını hidrolizleyen, yüksek spesifitede olması yaygın kullanımını etkileyen önemli bir faktördür. Bilinen modifikasyon yöntemleriyle spesifikliğin amaca uygun yönlendirilmesi sağlanır. Tripsin, proteinlerde arginin ve lizin birimlerinden hidroliz alternatifi nedeniyle spesifikliği yüksek proteazların en önemlisi ve en yaygın kullanılanıdır. Son yıllarda kullanımı artan bir diğer enzim de Staphyococcus Aureus'dan izole edilen V₈ proteazıdır. Bu enzim tripsinle önemli

bir alternatif oluşturarak asidik birimlerde özellikle glutamik asitte spesifik kırılmalara neden olur. Yine son yıllarda pseudomonas fraginin mutandından izole edilen bir proteazın, aspartik veya sisteik asit birimlerini N terminalinden hidrolizlediği bulunmuştur. Ele alınan diğer enzimlerin kullanımı tripsin gibi yaygın değildir. Bu enzimler genelde beklenenden daha az başa hücum ederler. Bu durum bazen avantaj oluşturabilir. Bunların dışında yaygın olarak kullanılan bir diğer proteaz da kimotripsindir (Telefoncu, A., 1988).

* Tripsin

Tripsin, proteinlerden büyük fragmentlerin eldesinde kullanılan en spesifik endopeptidazdır. Spesifik olduğu lizin ve arginin birimlerinde geliştirilen modifikasyon yöntemleri de ayrıca ek bir seçimlilik sağlamaktadır. Spesifikliği yüksek olan tripsin enzimi, lizin veya arginin gibi bazik amino asitlerin oluşturduğu peptid bağlarını C uçları açıkta kalacak şekilde hidrolizler. Tripsinin spesifik olduğu başa komşu olan amino asitler hidroliz oranını etkilerler.

Lizin veya argininin kendi aralarında birbirine komşu olması veya proteinin N- ucunu oluşturması gibi durumlarda pozitif yük etkisi hidroliz oranının azalmasına neden olur. Lizin veya argininin proline komşu olduğu durumda hidroliz meydana gelmez. Okside edilmiş ribonükleaz, kortikotropin ve balina miyoglobinindeki -Lys-Pro- bağları tripsinle hidrolizlenmiştir. Ancak Tyr-Arg-Pro-Ala ve Ala-Arg-Pro-Ala dizinimlerinde -Arg-Pro- bağlarının kırıldığı belirtilmiştir. Spesifik bağlara polar grupların yakınlıkları da hidroliz oranında azalmaya neden olur.

Tripsinin yüksek spesifikliğine rağmen nadiren de olsa spesifik olmayan kırılmalar rapor edilmiştir. Spesifik bağlar genelde aromatik ya da hidrofobik bağlara komşudur.

Lizin ve argininin karboksil gruplarının dışında diğer bağlardan hidroliz yalnızca uzatılmış reaksiyon süresinde veya tripsinin yüksek derişimlerinde meydana gelebilir.

Tripsin pH:7-9 arasında max. aktiviteye sahiptir. pH<4 de dönüşümlü olarak aktivitesini kaybeder. Otohrolizi önlemek için tripsin 10mM HCL de hazır-

lanmalıdır. Tripsinle hidroliz; 0.1M NH_4HCO_3 tampo-
nunda (pH:8.0), %1-2(w/w) lik enzim substrat oranında
37°C de ve 1-4 saatlik reaksiyon süresinde gerçekleş-
tirilir. Proteinlerde triptik parçalamaları sınırlama
amacıyla reaksiyon süresi ve sıcaklık azaltılabilir.
Tripsinle reaksiyon; DMF, DMSF, Soya tripsin inhibi-
törüyle durdurulabilir (Telefoncu, A., 1989).

Literatür araştırması sırasında öğrendiğimize
göre bizim kullandığımız reaksiyon ortamında veya
benzer reaksiyon ortamlarında Tripsin enzimi kolloi-
dal halde dağılmış olarak kalmakta ve çözünürlüğü
dikkate alınmayacak kadar az olmaktadır. Kullandığı-
mız tripsin enzimi aktivitesi kazeine karşı pH:7 de
35°C de 200 FIP-u/g olan bir pankreas proteazıdır. Bu
enzimin serbest haldeki peptidasyon ve esterifikasyon
aktivitesi potansiyelini araştırdık. Sonraki çalışma-
larda immobilize halde kullanmayı düşünöyoruz.

2.1.3.2. Lipaz Enzimleri

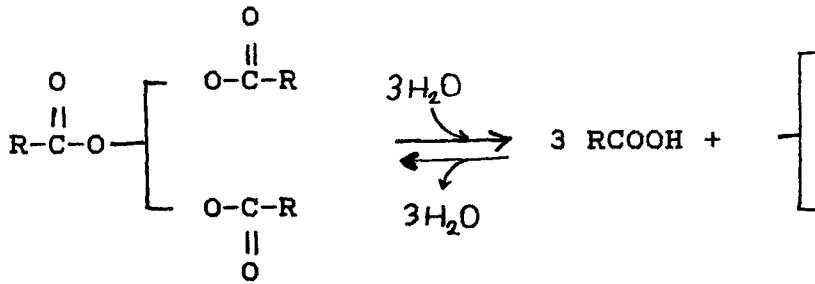
Lipaz enzimleri başlıca; insan ve diğer memeli-
lerin pankreas ve bağırsaklarından, maya ve mantar-

lardan, mikrobiyal kaynaklardan elde edilirler. Kaynağına bağlı olmaksızın hepsi lipid hidrolazlarıdır. Ancak herbirinin spesifiklikleri ve seçimlilikleri farklı olabileceği gibi genellikle aktiviteleri de farklıdır.

Lipazlar spesifikliklerine göre, spesifik olmayan (nonspesifik), yağ asidi spesifikliği ve stereospesifik olmak üzere üç ana grupta incelenirler.

* Spesifik Olmayan Lipazlar :

Bu gruba giren enzimler trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını seçimsiz olarak ayırabilir. Sonuçta gliserin ve yağ asitleri oluşurken ara ürünlerin monoaçil ve diaçil gliseridler olacağı açıktır.



* Yağ Asidi Spesifik Lipazlar :

Bu lipaz grubu bazı özel yağ asitlerine spesifikte gösterir. Genellikle seçicilik yağ asidinin C zinciri uzunluğuna veya cis-9- yerinde doymamış bağ içeren yağ asitlerinde olur.

* Stereospesifik Lipazlar :

Bu lipaz grubu trigliseridlerin eşdeğer konumdaki 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda yağ asidi yanında digliseridler (1,2-diaçil ve 2,3-diaçil olmak üzere) ve monogliseridler (2-monoaçil) oluşur. Bu yapılar kimyasal bakımdan kararsız olup 1,3-diaçil gliseridlere veya 1 veya 3-monoaçil-gliseridlere izomerleşerek enzimler tarafından tekrar hidrolizlenebilir konuma dönüşürler. Sonuçta 1,3-spesifik lipazlarla spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalarlar.

Denge ve çözünürlük söz konusu olan reaksiyonlarda ortamda çözen olarak suyun yerine organik çö-

zücüler kullanılır. Proteolitik enzimlere göre lipazların daha geniş spesifiteleri vardır ve peptidlerin ikincil hidrolizlerini kataliz etmezler. Son zamanlarda, biyolojik aktif peptidlerin sentezlerinde lipazlar kullanılmaktadır (Margolin, A.L ., Klibanov, A.M., 1989).

Seçici açılasyon; peptidlerdeki çok sayıda reaktif grupların varlığı ve enzimatik sistemlerin kompleksliği dolayısıyla çok zordur. Susuz ortamdaki esterlerin aminolizinde lipazların seçiciliği, asimetrik transformasyon ve peptid sentezlerinde çok başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Lipazların seçiciliği şimdi peptidlerin seçici açılasyonunda uygulanmaktadır (Gardossi, L., vd., 1991).

Son zamanlarda hidrolitik enzimlerden; lipazlar ve proteazlar, organik çözücülerdeki dioller ve şekerlerin monoaçılasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmışlardır. Günümüzdeki çalışmalarda, heterofonksiyonel bileşiklerde, amino alkollerdeki gibi, enzimatik açılasyonun kemoseçiciliğinin açıl kısmının yapısı ile kontrol edildiği de bulunmuştur.

Lipazlar susuz organik çözücülerde de kataliza-

tör gibi davranabilirler. Örnek olarak karboksilik esterler ve alifatik aminler arasındaki reaksiyon verilebilir. Ancak enzimin denatürasyonunu önleyecek korunması unutulmamalıdır. Bu aminoliz, görünen peptid başlarının oluşumunda nonproteazların kullanılma olasılığını gösterir. Çünkü lipazlar, proteazlardaki sınırlamaların aynısına sahip olmayabilirler.

Enzimatik modifikasyonun kemoseçiciliği kontrol edilebilirse, amino alkoller için sentetik değerlerden uzak olarak heterofonksiyonel bileşiklere genişletilebilir (Chinsky, N., vd., 1987).

2.2. ESTERİFİKASYON

2.2.1. Esterleşme Reaksiyonları

Esterler, karboksil grubundan alkillendirilmiş asitler veya -OH grubundan açillendirilmiş alkoller olarak düşünülebilen bileşiklerdir.

Esterler, tanımlanmalarına uygun şekilde, ya al-

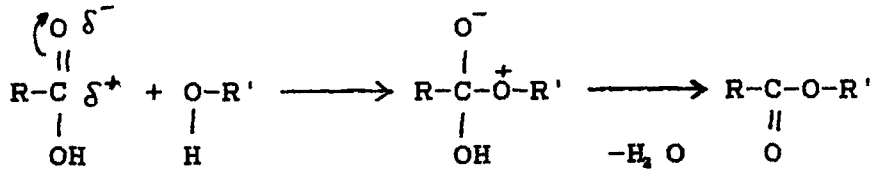
kollerin açillendirilmesinden veya karboksilik asitlerin alkilendirilmesinden elde edilirler. Ancak birinci yol daha çok kullanılır.

Esterlerin elde edilmeleri için, çoğu kez, alkollerin karboksilik asitlerle reaksiyonuna başvurulur, bu reaksiyon basit olarak,



şeklinde gösterilebilir.

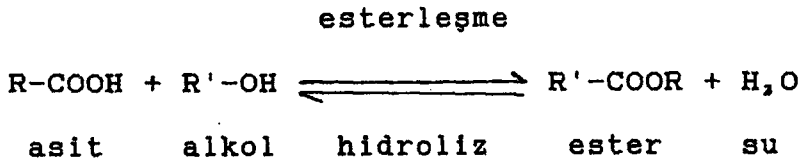
Karboksilik asitlerin nükleofilik substitüsyona yatkın olmaları sebebiyle, esterleşme reaksiyonu için uzun süreden beri kabul edilen mekanizma,



olmakla beraber, esterleşmenin asidin -OH'ı ile alkolün H unun su halinde ayrılması şeklinde yürüdüğü, yakın tarihlerde izotopik işaretleme yöntemi ile kesinlikle kanıtlanmıştır.

2.2.2. Kimyasal Katalizatörlerle Esterleşme Reaksiyonları

Karboksilik asitler; asit klorürlerinden ve anhidritlerinden daha az etkin olduklarından asidik katalize gereklilik vardır ve bu amaçla en çok der. H_2SO_4 veya HCl kullanılır. Böyle bir asidik esterleştirme " Fischer Esterleştirme " olarak bilinir. Ancak asitler, reaksiyonda oluşan su ile yeniden esterlerin hidrolizini katalize ederler ki, asıl reaksiyon bunun tam tersidir. Dolayısıyla esterleşme reaksiyonu bir denge reaksiyonudur.



Dengenin esterleşme lehine oluşması için, asidin veya alkolün aşırısının alınması, oluşan ester ve suyun dengeden çıkarılması gerekir. Pratikte seçeneklerin ikisi beraber uygulanır. Asit veya alkolden uygun olanının aşırısı alınırken ester ve suyun kaynama noktası

düşük ise fraksiyonlu destilasyon ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılır. Değilse asidin katalitik miktardan çok fazlası alınarak oluşan su susuz asit tarafından hidrasyonla tutulur.

2.2.3. Enzimatik Esterleşme Reaksiyonları

Günümüzde diğer organik sentezlerde olduğu gibi esterifikasyon reaksiyonlarında da enzimler bazı önemli avantajları nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Lazar, G., vd., 1986, Gatfield, I.L., 1987, Halling, J., 1984, Iwai, M., Okumuro, S., 1980). Özellikle esteraz ve lipaz enzimlerinin spesifiteleri ve selektivitelerinden yararlanarak diğer kimyasal yöntemlerle eldesi zor ve pahalı olan ticari öneme sahip ürünlerin elde edilmesi amacıyla uygulanmaktadır (Sağıroğlu A., Telefoncu, A., 1992, Cambou, B., Klibanov, A.M., 1984). Serbest enzimlerin ılımlı şartlar gerektirmesi, hassas spesifite ve selektiviteleri yanında, katalizlediği reaksiyonun hızını 10^{12} kat arttırabilmesi cazip avantajlarıdır. Ancak uygulamada sudaki çözü-

nürlükleri nedeniyle reaksiyon ortamından ayrılma güçlüğü ve denatürasyon sorunları ortaya çıkar. Bunun için serbest enzimler yerine inert desteklere immobilize edilmiş enzimlerin katalizatör olarak kullanımı tercih edilmektedir.

Lipazlar gliserin esterlerini hidrolizleyen enzimler olarak tanınırlar. En önemli özellikleri hidroliz tepkimelerini hidrofobik ara düzeylerde yüksek etkinlikle yürütebilmesidir. Bu ilk kez Willstatter ve çalışma grubunca belirlenmiştir (Willstatter, R., vd., 1923). Yapılan araştırmalar sonunda lipazların su içeriği düşük organik ortamlarda hidrolizin tersini yani esterleştirmeyi gerçekleştirdiği bulunmuştur. Reaksiyon ortamı enzimin cinsine göre değişen, düşük su içerikli organik çözücünden oluşan çift fazlı sistem olup, su; enzimi koruyan, reaksiyonu kolaylaştıran bir faktördür. Su içeriğinin artması reaksiyonun hızının hidroliz lehine; azalması esterifikasyonun lehinedir (Gatfield, I.L., 1987, Iwai, M., vd., 1984). Ancak özellikle esteraz aktivitesinin max. değerine organik ortamın su içeriğinin önceden optimizasyonu ile ulaşılabileceği unutulmamalıdır.

Değişik araştırma grupları tarafından immobilize lipazlar transesterifikasyon (Cambou, B., Klivanov, A.M., 1984, Sağıroğlu, A., Telefoncu, A., 1992) , interesterifikasyon (Aydemir, T., Telefoncu, A., 1991, Yokozeki, K., vd., 1984), esterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında başarıyla kullanılmışlardır (Cambou, B., Klivanov, A.M., 1984, Ekiz, H.I., vd., 1987).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

L-Prolin, L-Tirozin, L-Histidin, DL-Triptofan, Glisin, Tripsin, Metanol, Etil Metil Keton, 2-Propanol, Izo Amilalkol, Izo Oktan, n-Butanol, Aseton, Pridin, n-Benzol, Glasial Asetik Asit, Hegzan, Ninhidrin, Silikajel G-60, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

Yukarıdaki maddelerin hepsi merck olarak seçilmiştir.

3.2. KULLANILAN ALETLER

* pH Metre : WTW yapımı, 537 model, microprocessor Ph metre. Elektrodu WTW firmasının E50 tipinde kombine elektrod.

* UV Lamba : Min UVIS, UV 254/366 nm, DESAGA Nr: 13/200.

* Etüv : Elektromag marka, 20-80°C arası, termostatlı.

* Çalkalayıcı : Termostatlı, Kottermann Labortechn-

nik, 220V, 0.5 AMP-T.

* Gaz Kromatografisi : GC-6AM Shimadzu, Integratör
Chromjet Spektra-Physics.

* Ince Tabaka Seti : TLC Basic Set, DESAGA GmbH-
postfach 101969-D 6900 Heidelberg.

* Kağıt Kromatografisi Seti.

3.3. ÇÖZELTİLER

Deneyisel çalışmalar için aşağıda belirtilen çö-
zelti hazırlanmıştır.

- * Fosfat tamponu (0.1 M, pH:8)
- * Izo amilalkol (A)
- * Izo propanol (B)
- * Etil metil keton (C)
- * N-benzol (D)
- * Izo oktan (E)
- * Ninhidrin çözeltisi (Asetonda %0.2 'lik)

Yukarıda adı geçen çözücüler bundan sonra yanın-
da gösterilen sembolleriyle belirtileceklerdir.

3.4. YÖNTEM

3.4.1. Çözücü Cinsinin Enzimatik Peptid Sentezlerine Etkisinin Belirlenmesi

Bir proteolitik enzim olan tripsin enzimiyle peptid sentezlerine çözücü olan organik ortamın cinsinin etkisini belirlemek amacıyla farklı karbon sayılı iki alkol, bir keton, bir hidrokarbon, bir de doymuş hidrokarbon seçilmiştir. Alkoller, izo amilalkol ve izo propanol olup, organik reaksiyon ortamının polaritesi ve polarlık derecesinin etkisinin incelenmesi amaçlandığından bu alkoller tercih edildiler. Polaritesi düşük keton, etil metil keton olup, bu çözücülerin etkisiyle apolar çözücülerden, n-benzol ve izo oktan reaksiyon ortamı olarak kullanıldığında enzimatik peptidlerin sentezindeki değişme gözlenmiştir.

3.4.2. Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanışı

* Fosfat Tamponunun Hazırlanışı

NaH₂PQ.2 H₂O 'dan 2.5492 g. tartıldı. 100 ml bidestile suda çözüldü. Diğer taraftan, Na₂HPQ.12 H₂O dan 4.7062 g. tartıldı ve 100 ml bidestile suda çözüldü. Sonra iki sistem karıştırılıp, toplam 300 ml olacak şekilde su ile tamamlandı ve doygun NaOH çözeltisiyle pH:8 olacak şekilde ayarlandı.

* Fosfat Tamponu ile Doymun Izo Amilalkol Çözeltileri (A₁ , A₂ , A₃ , A₄)

40 ml fosfat tamponuyla 40 ml izo amilalkol ayırma hunisinde 10 dk. çalkalandı. Üstteki organik faz ayrıldı. Bu çözeltilerin hepsi 9 ml tamponla doymun izo amilalkol (%10 tampon), 1 ml metanol, 0.5 ml tampon, 200 mM (40 mg) glisin, 1 mg tripsin içermektedir. Buna ilaveten her birine sırasıyla 50 mM aşağıdaki amino asitler eklenmiştir.

- A₁ ----- 5.75 mg Prolin
- A₂ ----- 9.05 mg Tirozin
- A₃ ----- 7.75 mg Histidin
- A₄ ----- 10.2 mg Triptofan

* Fosfat Tamponu ile Doygun Izo Propanol Çözeltileri
(B₁, B₂, B₃, B₄)

Izo amilalkol yerine izopropanol alındı ve B₁:Prolinli, B₂:Tirozinli, B₃:Histidinli, B₄:Triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Fosfat Tamponu ile Doygun Etil Metil Keton Çözeltileri (C₁, C₂, C₃, C₄)

Çözücü olarak etil metil keton alındı ve C₁:Prolinli, C₂:Tirozinli, C₃:Histidinli, C₄:Triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Fosfat Tamponu ile Doygun N-Benzol Çözeltileri
(D₁, D₂, D₃, D₄)

Çözücü olarak benzol alındı. D₁:Prolinli, D₂:Tirozinli, D₃:Histidinli, D₄:Triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Fosfat Tamponu ile Doygun Izo Oktan Çözeltileri
(E₁, E₂, E₃, E₄)

Çözücü olarak izo oktan alındı. E₁:Prolinli, E₂:Tirozinli, E₃:Histidinli, E₄:Triptofanlı çözeltiler

hazırlandı.

3.4.3. Peptidlerin Sentezlenmesi

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları termostatlı çalkalayıcıda 25-30° C'de 20 saat çalkalanarak peptidlerin sentezlenmesi gerçekleştirildi.

3.4.4. Ürünlerin Analizi

Sentezlenen ürünlerin analizleri amacıyla kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. Kağıt ve ince tabaka kromatografisi teknikleri amino asitleri ve peptidleri ayırmada uygun destek ve çözücü sistemi ile iyi ayırım sağladıklarından tercih sebebi olmuşlardır.

3.4.4.1. Kağıt Kromatografisi Uygulamaları (KC)

Amino asitlerin kalitatif tayini için iyi bir ayırım metodu olan kağıt kromatografisi de kullanılı-

mıştır.

Gerekli maddeler:

- 20*20 cm.lik wattmann no:1 kağıdı
- Belirteç çözeltisi (Asetonda %0.2'lik ninhidrin)
- Çözgen sistemleri

Reaksiyon karışımları kağıt üzerine tatbik edildikten sonra kağıt, içinde çözgen bulunan tanka yerleştirildi.

Çözgen sistemi olarak n-butanol:piridin:su (1:1:1)*16 kullanıldı. Yaklaşık 2.5-3 saatte 14-15 cm. lik yükselme sonunda kağıt tanktan çıkarılıp kurutuldu. Üzerine belirteç çözeltisi püskürtüldükten sonra amino asitlerin mavi-mor renkler verdikleri görüldü ve Rf değerleri hesaplandı.

3.4.4.2. İnce Tabaka Kromatografisi Uygulamaları(TLC)

Reaksiyon karışımlarına ayrı ayrı ince tabaka kromatografisi uygulanmıştır. Reaktifler ve ürünler mole-

kül kütlesi ve polarlıklarına bağlı olarak ince tabaka üzerinde çözgen tarafından farklı uzaklığa sürüklendiler.

Gerekli maddeler:

- 20*20 cm. cam plakalar
- 5 g. silikajel G-60 (herbir plaka için)
- 14 ml bidestile su
- Belirteç çözeltisi (Asetonda %0.2'lik ninhidrin)
- Çözgen sistemleri

5 g. silikajel G tartılıp üzerine 14 ml bidestile su eklenerek homojenizasyon sağlandı. Bu süspanسیون temiz ve kuru 20*20 cm.lik cam plakaya özel aygıtı yardımıyla düzgün biçimde yayıldı. Etüvde 45 dk. 105° C'de kurutuldu. Tabaka üzerine örnekler tatbik edildi ve daha önceden belirlenen en iyi ayırımı sağlayan çözgen sistemini bulunduran tanka konuldu. Ortalama 3 saatte 15-16 cm. yükselmeden sonra plakalar kromatografi tankından çıkarılarak kurutuldu. Üzerine önceden tayin edilen belirteç çözeltisi püskürtülerek lekelerin belirmesi izlendi. Renkler UV ışığı altında gözlemlendi.

Çözgen sistemi :

n-butanol : glasiyal asetik asit : su (12:3:5)*2

3.4.4.3. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi de diğer kromatografi çeşitleri gibi bir karışımında bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Gaz kromatografisinden çeşitli yararlar sağlanır. Bunları şöyle sıralamak mümkündür:

- Verilen bir numune içindeki uçucu maddelerin sayısının tayini,
- Bir maddenin saf olup olmadığının araştırılması,
- Yeni geliştirilen bir metodun ne derecede duyarlı olduğunun araştırılması.

Gaz kromatografisi şartları

Kolon	:	3 m.uzunluğunda cam kolon
Kolon dolgu maddesi	:	Poli etilen glikol
Enjeksiyon Sıcaklığı	:	250° C
Giriş Sıcaklığı	:	190° C
Final Sıcaklığı	:	195° C
N ₂ Geçiş Hızı	:	65-70 ml/min.
H ₂ Geçiş Basıncı	:	0.82 kg/cm ²
Hava Basıncı	:	0.7 kg/cm
Enjeksiyon Hacmi	:	1 Ml

3.4.5. Değişen Su İçerikli Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması

* Izo amilalkolün %5 Su İçeren Çözeltileri (5A₁, 5A₂, 5A₃, 5A₄.)

Bu çözeltilerin hepsi 9 ml tamponla doymun izo amilalkol (%5 tampon), 1 ml metanol, 200 mM (40 mg)gli-sin, 1 mg tripsin içermektedir. Buna ilaveten herbiri-ne sırasıyla aşağıdaki amino asitler eklenmiştir.

5A₁ ----- 5.75 mg Prolin
5A₂ ----- 9.05 mg Tirozin
5A₃ ----- 7.75 mg Histidin
5A₄ ----- 10.2 mg Triptofan

* Izo propanolün %5 Su İçeren Çözeltileri (5B₁, 5B₂, 5B₃, 5B₄)

Izo amilalkol yerine izo propanol alındı ve 5B₁:prolinli, 5B₂:tirozinli, 5B₃:histidinli, 5B₄:triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Etil metil ketonun %5 Su İçeren Çözeltileri (5C₁, 5C₂, 5C₃, 5C₄)

Çözücü olarak bu kez etil metil keton alındı ve 5C₁:prolinli, 5C₂:tirozinli, 5C₃:histidinli, 5C₄:triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Izo Amilalkolün %10 Su İçeren Çözeltileri (10A₁, 10A₂, 10A₃, 10A₄)

Bu çözeltilerin hepsi 9 ml tamponla doygun izo amilalkol, 1 ml metanol, 0.5 ml tampon, 200 mM (40 mg) glisin, 1 mg tripsin içermektedir. Buna ilaveten

herbirine sırasıyla aşağıdaki amino asitler eklenmiştir.

10A₁ ----- 5.75 mg prolin
10A₂ ----- 9.05 mg tirozin
10A₃ ----- 7.75 mg histidin
10A₄ ----- 10.2 mg triptofan

* Izo Propanolün %10 Su İçeren Çözeltileri (10B₁,
10B₂, 10B₃, 10B₄)

Izo amilalkol yerine izo propanol alındı ve
10B₁ prolinli, 10B₂:tirozinli, 10B₃:histidinli, 10B₄:
triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Etil Metil Ketonun %10 Su İçeren Çözeltileri (10C₁,
10C₂, 10C₃, 10C₄)

Çözücü olarak bu kez etil metil keton alındı.
10C₁:prolinli, 10C₂:tirozinli, 10C₃:histidinli, 10C₄:
triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* N-Benzolün %10 Su İçeren Çözeltileri (10D₁, 10D₂,
10D₃, 10D₄)

Çözücü olarak n-benzol alındı ve 10D₁:prolinli, 10D₂: tirozinli, 10D₃:histidinli, 10D₄:triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Izo Oktanın %10 Su İçeren Çözeltileri (10E₁, 10E₂, 10E₃, 10E₄)

Bu kez çözücü olarak izo oktan alındı. 10E₁:prolinli, 10E₂: tirozinli, 10E₃:histidinli, 10E₄:triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Izo amilalkolün %15 Su İçeren Çözeltileri (15A₁, 15A₂, 15A₃, 15A₄)

Bu çözeltilerin hepsi 9 ml tamponla doygun izo amilalkol (%15 tampon), 1 ml metanol, 1 ml tampon, 200 mM glisin, 1 mg tripsin içermektedir. Buna ilave olarak herbirine sırasıyla aşağıdaki amino asitler eklenmiştir.

15A₁ ----- 5.75 mg prolin
15A₂ ----- 9.05 mg tirozin
15A₃ ----- 7.75 mg histidin
15A₄ ----- 10.2 mg triptofan

* Izo propanolün %15 Su İçeren Çözeltileri (15B₁, 15B₂, 15B₃, 15B₄)

Izo amilalkol yerine izo propanol alındı ve 15B₁: prolinli, 15B₂: tirozinli, 15B₃: histidinli, 15B₄: triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Etil Metil Ketonun %15 Su İçeren Çözeltileri (15C₁, 15C₂, 15C₃, 15C₄)

Bu kez çözücü olarak etil metil keton alındı. Sonra 15C₁: prolinli, 15C₂: tirozinli, 15C₃: histidinli, 15C₄: triptofanlı çözeltiler hazırlandı.

* Izo amilalkolün %20 Su İçeren Çözeltileri (20A₁, 20A₂, 20A₃, 20A₄)

Bu çözeltilerin hepsi 9 ml tamponla doyyun izo amilalkol (%20 tampon) , 1 ml metanol, 1.5 ml tampon, 200 mM glisin, 1 mg tripsin içermektedir. Buna ilave-ten her birine sırasıyla aşağıdaki amino asitler eklenmiştir.

20A₁ ----- 5.75 mg prolin

20A₂ ----- 9.05 mg tirozin

20A₃ ----- 7.75 mg histidin

20A₄ ----- 10.2 mg triptofan

* Izo propanolün %20 Su İçeren Çözeltileri (20B₁,
20B₂, 20B₃, 20B₄)

Izo amilalkol yerine izo propanol alındı ve 20B₁ :
prolinli, 20B₂ : tirozinli, 20B₃ : histidinli, 20B₄ : tripto-
fanlı çözeltiler hazırlandı.

* Etil Metil Ketonun %20 Su İçeren Çözeltileri (20C₁,
20C₂, 20C₃, 20C₄)

Bu kez çözücü olarak etil metil keton alındı. 20C₁ :
prolinli, 20C₂ : tirozinli, 20C₃ : histidinli, 20C₄ : tripto-
fanlı çözeltiler hazırlandı.

3.4.5.1. Reaksiyonların Gerçekleştirilmesi

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan çözeltiler termostatlı çalkalayıcıda 25-30° C'de 20 saat çalkalandı.

3.4.5.2. Reaksiyon Karışımlarının Kağıt, İnce Tabaka Ve Gaz Kromatografileri İle Analizi

Değişen su içerikli reaksiyon karışımlarının analizinde yine kağıt, ince tabaka, gaz kromatografisi teknikleri kullanılmıştır.



4. DENEYLER VE BULGULAR

4.1. Çözücü Cinsinin Peptidleşmeye Etkisi

Daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan reaksiyon ortamına önce ayrı ayrı her amino asitin tepkimelerde kullanılan miktarları, enzim varlığında ilave edilmiş ve reaksiyon şartlarında çalkalanıp, bekletilmiş, her birinin kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografileri alınmıştır.

Bununla amaçlanan; amino asit-çözücü etkileşmesinin (özellikle alkol çözücüleriyle esterleşme) olup olmadığının belirlenmesidir. Çünkü enzim katalizli ortamda beklenen peptid ürünleri yanında ester ürünlerinin de oluşması mümkündür. Böylece peptid ürünü yanında yan ürünler de önceden belirlenmiş, asıl reaksiyon ürünleriyle karşılaştırılarak ürün kompozisyonu daha doğru açıklanmıştır.

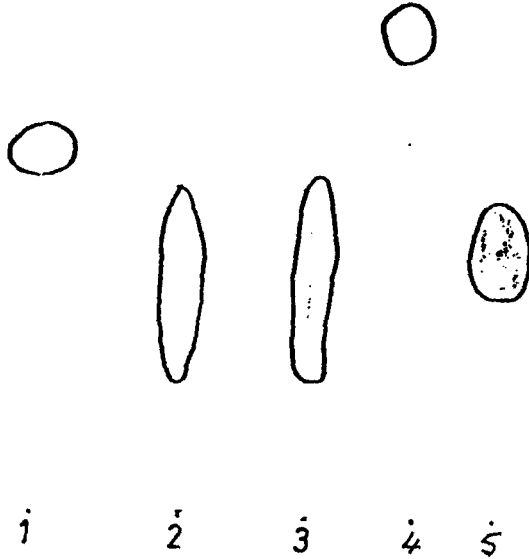
Amino asitlerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri az, sudaki çözünürlükleri ise çoktur. Kullandığımız reaksiyon karışımlarında organik çözücü yüzdesi yüksek olduğundan amino asitlerin çözünürlüğü-

nün arttırılması amacıyla her karışıma tampon yanında metanol de eklendi. Literatürlerdeki benzer çalışmalarda da metanol aynı amaçla kullanılmıştır.

4.1.1. Izo Amilalkol Çözücüsünün Etkisi

Aşağıda fosfat tamponu (0.1 M, pH:8) ile doyun izo amilalkollü ortamda sırasıyla prolin, tirozin, histidin, triptofan ve glisin amino asitlerinin reaksiyon karışımlarına uygulanan kağıt kromatografisi Şekil 4.1. de, Rf değerleri ve renkleri Tablo 4.1.de; ince tabaka kromatografileri Şekil 4.2. de, Rf değerleri ve renkleri Tablo 4.2. de verilmiştir.

Bunlar su kapsamı değiştirilerek gerçekleştirilen diğer reaksiyon karışımları için de referans olarak kullanılmıştır.

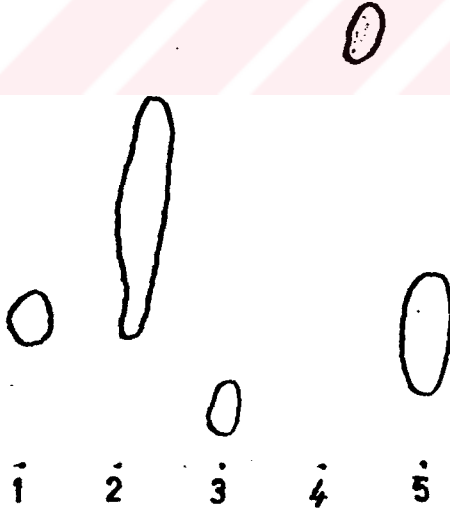


Tablo 4.1. Fosfat tamponuyla doygun izo amilalkolde amino asitlerin tek tek Rf değerleri, renkleri.

Amino asit	Rf	Renk
Prolin	0.50	sarı
Tirozin	0.56	pembe
Histidin	0.34	mor
Triptofan	0.67	pembe
Glisin	0.37	mor

Şekil 4.1. Tamponla doygun izo amilalkolde amino asitlerin kağıt kromatogramı.

Tablo 4.1. deki Rf değerlerinden amino asitlerin izo amilalkol çözücüsüyle reaksiyon vermediği görülmektedir.

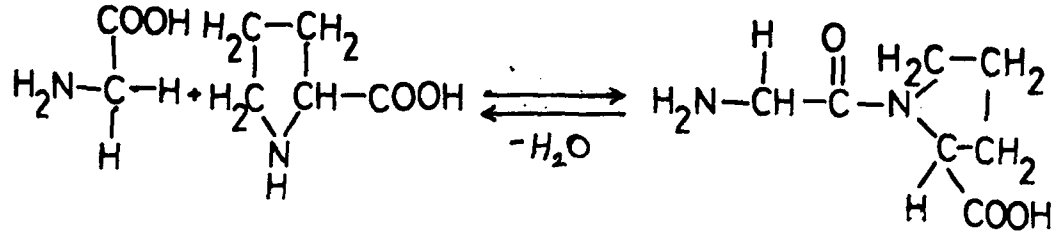


Tablo 4.2. Tamponla doygun izo amilalkolde amino asitlerin Rf değerleri, renkleri

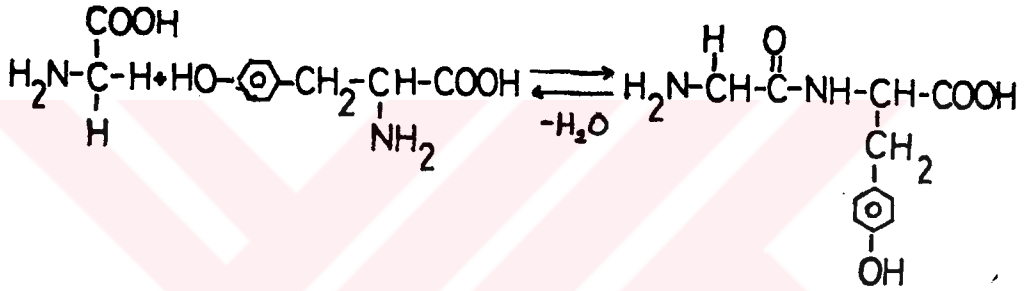
Amino asit	Rf	Renk
Prolin	0.34	sarı
Tirozin	0.45	açık pembe
Histidin	0.25	morkırmızı
Triptofan	0.25	kahverengi
Glisin	0.33	açık mor

Şekil 4.2. Tamponla doygun izo amilalkolde amino asitlerin ince tabaka-kromatogramı.

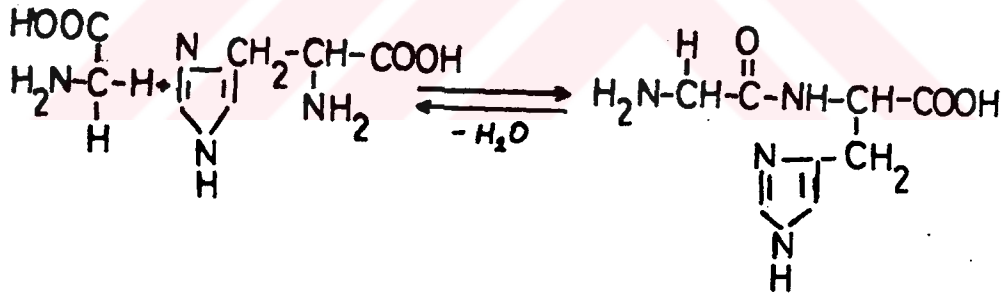
* Glisin-Prolin peptidinin reaksiyon denklemi;



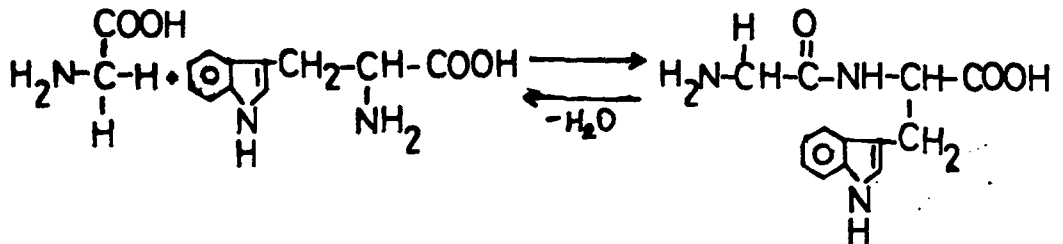
* Glisin-Tirozin peptidinin reaksiyon denklemi;



* Glisin-Histidin peptidinin reaksiyon denklemi;



* Glisin-Triptofan peptidinin reaksiyon denklemi;



4.1.1.1. Fosfat Tamponu Ile Doygun Izo Amilalkol

Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri



Tablo 4.3. Fosfat tamponuyla doymun izo amil alkollü ortamda oluşan peptidler, Rf değerleri.

Peptid	Rf	Renk
A ₁	0.47	eflatun
A ₂	0.41	koyu mor
A ₃	----	----
A ₄	0.72	sarı

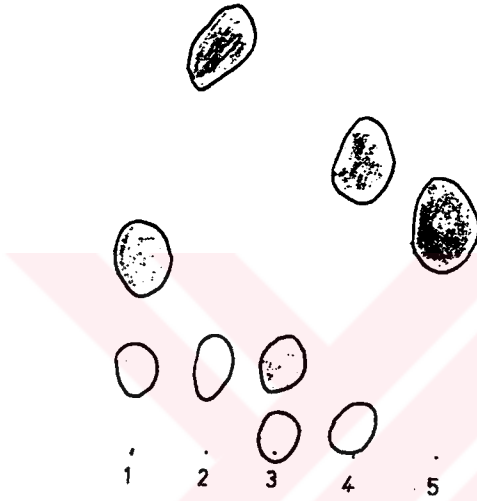
Şekil 4.3. Tamponla doymun izo amilalkolde (A) reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Aynı ortamda yapılan ince tabaka kromatografisi sonuularından %10 izo amilalkolde, 254 nm.de hiç ürün gözlenememiştir. %10 sulu izo amilalkollü ortamdan elde edilen gaz kromatografisi Şekil 4.35. de verilmiştir.

4.1.2. Izo Propanol zcsnn Etkisi

Aşağıda fosfat tamponu ile doymun izo propanollü ortamda sırasıyla prolin, tirozin, histidin, triptofan ve glisin'in reaksiyon karışımları için referans olarak kullanılan kağıt kromatografileri Şekil 4.4. de, Rf değer-

leri Tablo 4.4. de; ince tabaka kromatografileri Şekil 4.5., Rf değerleri Tablo 4.5. de verilmiştir. Bunlar su kapsamı değiştirilerek gerçekleştirilen diğer reaksiyonlarda referans olarak kullanıldılar.

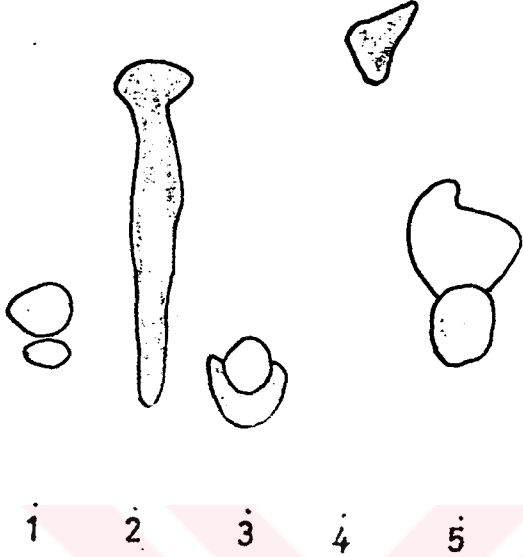


Tablo 4.4. Tamponla doygun izopropanolde amino asitlerin kağıt kromatografisi.

Amino asit	Rf	Renk
Prolin	0.32	sarımor
Tirozin	0.66	morkırmızı
Histidin	0.19	mavi
Triptofan	0.49	morkırmızı
Glisin	0.43	mor

Şekil 4.4. Tamponla doygun izopropanolde amino asitlerin kağıt kromatogramı.

Aynı ortamda alınan ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.5. de, Rf değerleri ve 366 nm. deki renkleri Tablo 4.5. de görülmektedir.

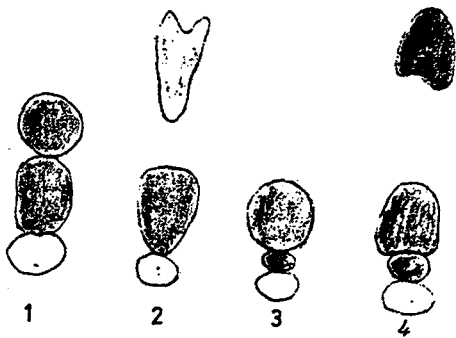


Şekil 4.5. Doygun izopropanolde amino asitlerin ince tabaka kromatogramı.

Tablo 4.5. Tamponla doygun izopropanolde amino asitlerin ince tabaka kromatografisi sonuçları.

Amino asit	Rf	Renk
Prolin	0.28	Sarı
Tirozin	0.43	koyumor
Histidin	0.15	mor
Triptofan	0.77	kahverengi
Glisin	0.34	pembe

4.1.2.1. Fosfat Tamponu ile Doygun Izo Propanol Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

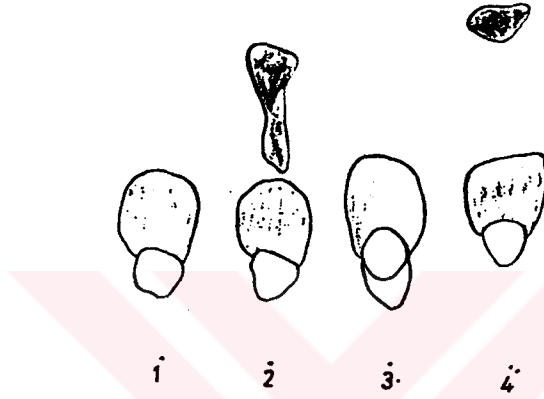


Şekil 4.6. Doygun izo propanolde (B) reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Tablo 4.6. Doygun izopropanolde peptidlerin kağıt kromatografisi sonuçları.

Peptid	Rf	Renk
B ₁	----	----
B ₂	----	----
B ₃	0.06	bordo
B ₄	0.07	bordo

Izo propanolde alınan ince tabaka kromatografisi sonuçları da Şekil 4.7. de, Rf değerleriyle 254 nm. deki renkleri de Tablo 4.7. görülmektedir.



Tablo 4.7. Doymun izopropanolde ürünlerin ince tabaka kromatografisi.

Ester	Rf	Renk
B ₁	0.22	açikkahve
B ₂	0.20	açikkahve
B ₃	0.22	açikkahve
B ₄	0.23	açikkahve

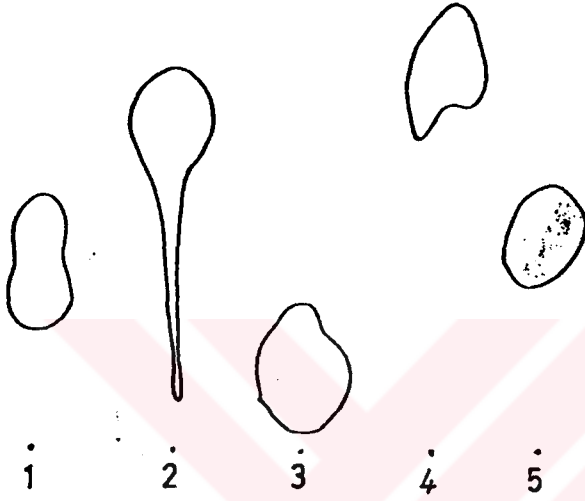
Şekil 4.7. İzopropanolde reaksiyon karışımlarının (B) ince tabaka kromatogramı.

Aynı çözücü ortamından elde edilen gaz kromatografisi sonuçları da Şekil 4.36. da verilmiştir.

4.1.3. Etil Metil Keton Çözücüsünün Etkisi

Aşağıda fosfat tamponuyla doymun etil metil keton çözücülü ortamda sırasıyla prolin, tirozin, histidin, triptofan ve glisin amino asitlerinin reaksiyonlarda referans olarak kullanılan kağıt kromatografileri Şekil 4.8

de, Rf değerleri Tablo 4.8. de; ince tabaka kromatografileri Şekil 4.9., Rf değerleri ve 254 nm. deki renkleri Tablo 4.9. da; verilmiştir.

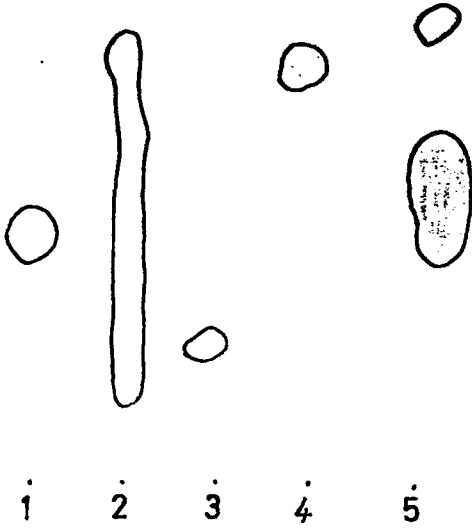


Tablo 4.8. Doygun etil metil ketonda amino asitlerin kağıt kromatografisi Rf değerleri.

Amino Asit	Rf	Renk
Prolin	0.31	pembe
Tirozin	0.47	eflatun
Histidin	0.20	mor
Triptofan	0.60	pembe
Glisin	0.47	mor

Şekil 4.8. Doygun etil metil ketonda amino asitlerin kağıt kromatogramı.

Aynı ortamda yürütölen ince tabaka kromatografisi Şekil 4.9 da, Rf değerleri ve 254 nm. deki renkleri Tablo 4.9. da verilmiştir.



Tablo 4.9. Doymun etil metil ketonda amino asitlerin ince tabaka kromatografisi.

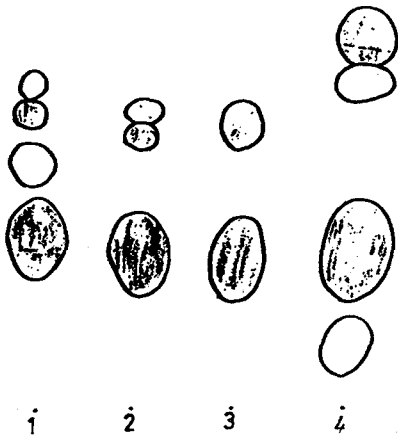
Amino asit	Rf	Renk
Prolin	0.32	sarı
Tirozin	0.36	pembe
Histidin	0.18	eflatun
Triptofan	0.56	kahverengi
Glisin	0.37	sarı mor

Şekil 4.9. Doymun etil metil ketonda amino asitlerin ince tabaka kromatogramı.

4.1.3.1. Fosfat Tamponu İle Doymun Etil Metil Keton

Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

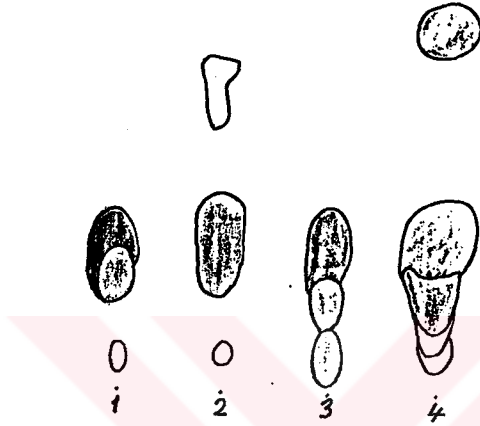
Tablo 4.10. Doymun etil metil ketonda peptidlerin kağıt kromatografisi.



Peptid	Rf	Renk
C ₁	0.52	eflatun
	0.57	eflatun
C ₂	0.50	eflatun
C ₃	0.52	eflatun
C ₄	0.56	eflatun
	0.10	beyaz

Şekil 4.10. Doymun etil metil ketonda (C) reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Aynı çözücüyle yürütülen ince tabaka kromatografisi Şekil 4.11. de, Rf değerleri ve 366 nm.deki renkleri Tablo 4.11. de görülmektedir.



Tablo 4.11. Doygun etilmetil ketonda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

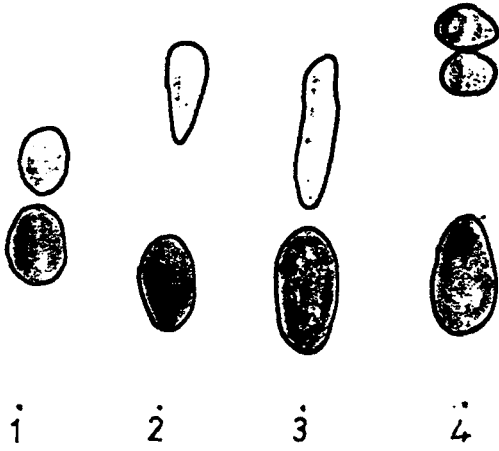
Peptid	Rf	Renk
C ₁	0.16	açık pembe
	0.30	açık mor
C ₂	0.16	açık pembe
C ₃	0.24	sarı mor
C ₄	0.14	pembe
	0.18	beyaz
	0.24	mavimor

Şekil 4.11. Etilmetil ketonda (C) reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

Aynı ortamdan elde edilen gaz kromatografisi sonuçları Şekil 4.37. de verilmiştir.

4.2. Değişen Su İçeriğine Göre Peptid Sentezleri

4.2.1. %5 Sulu Izo Amilalkollü Ortamda Peptid Sentezleri

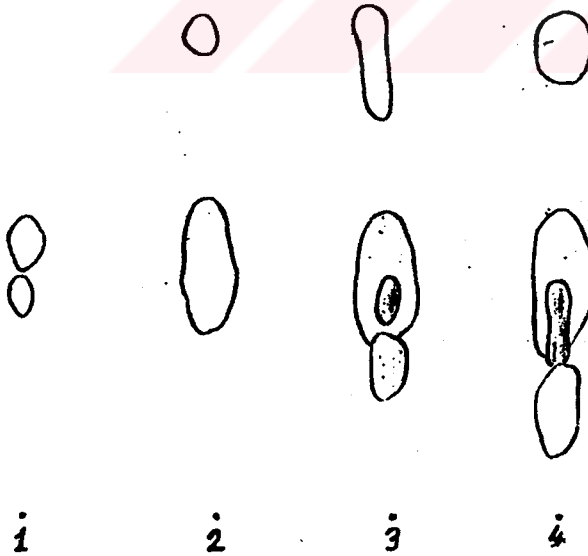


Tablo 4.12. %5 sulu izo amil alkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
5A ₁	----	----
5A ₂	----	----
5A ₃	----	----
5A ₄	0.71	sarı

Şekil 4.12. %5 sulu izo amilalkollü (5A) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Aynı ortamda yürütülen ince tabaka kromatografisi Şekil 4.13. de, Rf değerleri ve 366 nm.deki renkleri Tablo 4.13. de verilmiştir.



Tablo 4.13. %5 sulu izo amil alkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.


Peptid	Rf	Renk
5A ₁	----	----
5A ₂	----	----
5A ₃	0.48	açık kahve
5A ₄	0.79	morkahve
5A ₅	0.33	açık mor
5A ₆	0.45	açık kahve

Şekil 4.13. %5 sulu izo amilalkollü (5A) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı..

4.2.2. %10 Sulu Izo Amilalkollü Ortamda Peptid Sentezleri

Tablo 4.14. %10 sulu izo amil alkolde reaksiyon karışımlarının Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
10A ₁	0.41	koyu mor
	0.47	eflatun
10A ₂	----	----
10A ₃	----	----
10A ₄	0.72	sarı

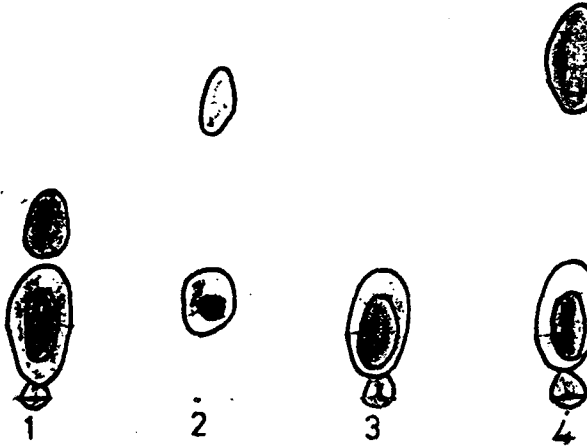


Şekil 4.14. %10 sulu izo amil alkollü (10A) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%10 sulu izo amil alkollü ortamdaki ince tabaka kromatografisine göre hiç ürün elde edilememiştir.

4.2.3. %15 Sulu Izo Amilalkol Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

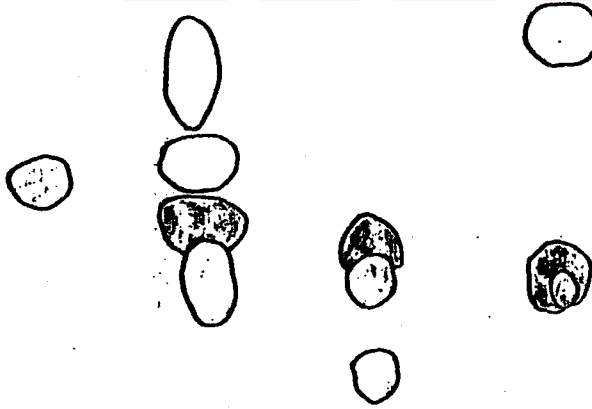
Tablo 4.15. %15 sulu izo amil alkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.



Peptid	Rf	Renk
15A ₁	0.09	sarıkahve
	0.007	pembe
15A ₂	0.10	sarıkahve
15A ₃	0.08	sarıkahve
	0.007	pembe
15A ₄	0.09	sarıkahve
	0.01	pembe

Şekil 4.15. %15 sulu izo amil alkollü (15A) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%15 sulu izo amilalkollü ortamdan elde edilen ince tabaka kromatografisi Şekil 4.16. da, Rf değerleri ve 366 nm.deki renkleri Tablo 4.16. da verilmiştir.



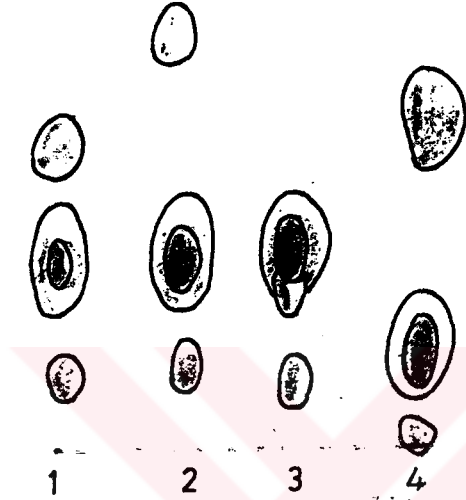
Tablo 4.16. %15 sulu izo amil alkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
15A ₁	----	----
15A ₂	0.40	kahve
	0.53	sarı
15A ₃	0.39	kahve
15A ₄	0.37	kahve

Şekil 4.16. %15 sulu izoamil-alkollü (15A) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.4. %20 Sulu Izo Amilalkollü Ortamda Peptid

Sentezleri

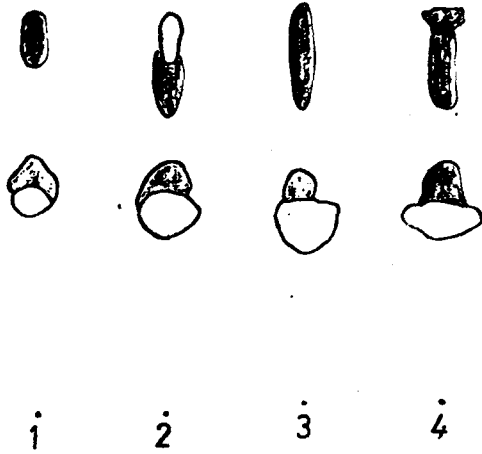


Tablo 4.17. %20 sulu izo amil alkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
20A ₁	0.26	sarıkahve
	0.09	beyaz
20A ₂	0.25	sarıkahve
	0.14	beyaz
20A ₃	0.26	sarıkahve
	0.09	beyaz
20A ₄	0.14	sarıkahve
	0.01	beyaz

Şekil 4.17. %20 sulu izoamil-alkollü (20A) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%20 sulu izo amilalkollü ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatografisi Şekil 4.18.'de Rf değerleri ve 366 nm. deki renkleri Tablo 4.18. de verilmiştir.



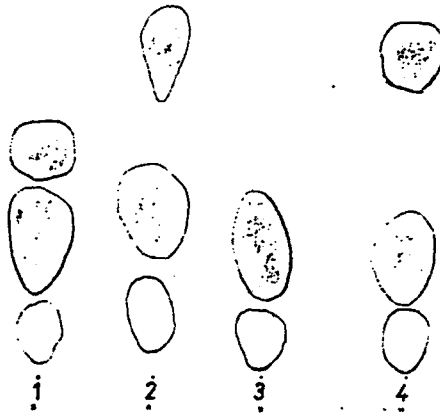
Tablo 4.18. % 20 sulu izoamilalkollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Şekil 4.18. 8%20 sulu izoamilalkollü (20A) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.5. %5 Sulu Izo Propanol Çözücülü Ortamda Peptid

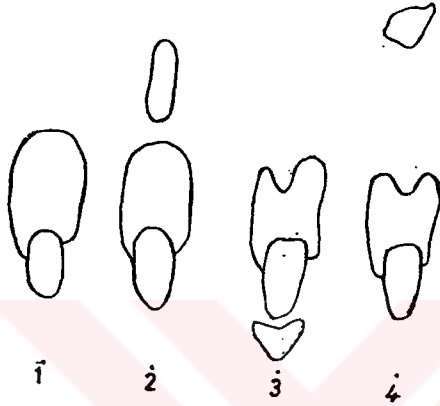
Sentezleri

%5 sulu izo propanollü ortamda kağıt kromatografisine göre peptid sentezlenmemiş, Şekil 4.19. da görüldüğü gibi ester sentezi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.19. %5 sulu izo propanollü ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%5 sulu izo propanollü ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.20. de, Rf değerleri ve 366 nm.deki renkleri Tablo 4.20. de verilmiştir.



Tablo 4.20. %5 sulu izo propanollü ortamda ürünlerin Rf değerleri, renkleri

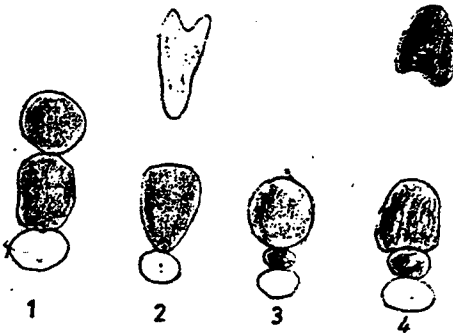
Ester	Rf	Renk
5B ₁	0.38	kahverengi
5B ₂	0.38	kahverengi
5B ₃	0.36	kahverengi
5B ₄	0.35	kahverengi

Şekil 4.20. %5 sulu izo propanollü (5B) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.6. %10 Sulu Izo Propanol Çözücülü Ortamda Peptid

Sentezleri

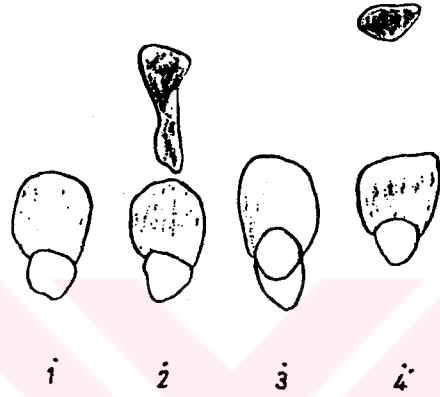
Tablo 4.21. %10 sulu izo propanollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.



Peptid	Rf	Renk
10B ₁	----	----
10B ₂	----	----
10B ₃	0.06	bordo
10B ₄	0.07	bordo

Şekil 4.21. %10 sulu izo propanollü (10B) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Aynı ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.22. de, Rf değerleri ve 254 nm.deki renkleri Tablo 4.22. de verilmiştir.



Tablo 4.22. %10 sulu izo propanolde ürünlerin Rf değerleri ve renkleri.

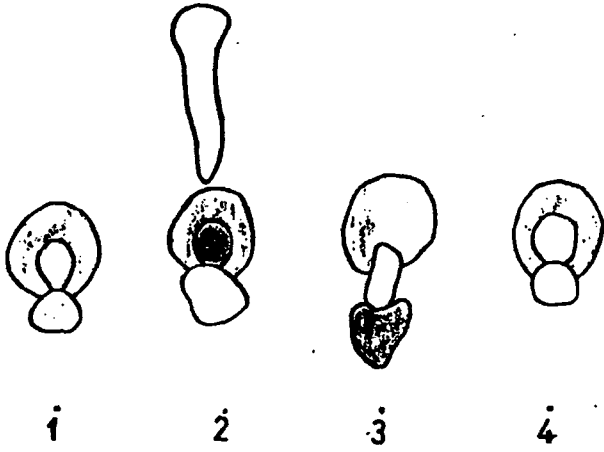
Ester	Rf	Renk
10B ₁	0.22	açık kahve
10B ₂	0.20	açık kahve
10B ₃	0.22	açık kahve
10B ₄	0.23	açık kahve

Şekil 4.22. %10 sulu izo propanollü ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı. (10B)

4.2.7. %15 Sulu Izo Propanol Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

Bu ortamda kağıt kromatografisine göre ürün gözlenmemiştir.

%15 sulu izo propanol çözücülü ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.23. de, Rf değerleri ve 254 nm. deki renkleri Tablo 4.23. de verilmiştir.



Şekil 4.23. %15 sulu izopropanollü (15B) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı

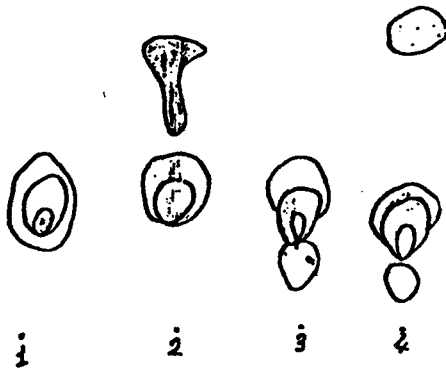
Tablo 4.23. %15 sulu izopropanollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
15B ₁	----	---
15B ₂	0.25	sarı
15B ₃	0.20	mor
15B ₄	0.25	sarı

4.2.8. %20 Sulu Izo Propanol Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

Bu ortamda kağıt kromatografisine göre peptid sentezlenememiştir.

%20 sulu izopropanol çözücülü ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.24. de, Rf değerleri ve 366 nm. deki renkleri Tablo 4.24. de verilmiştir.



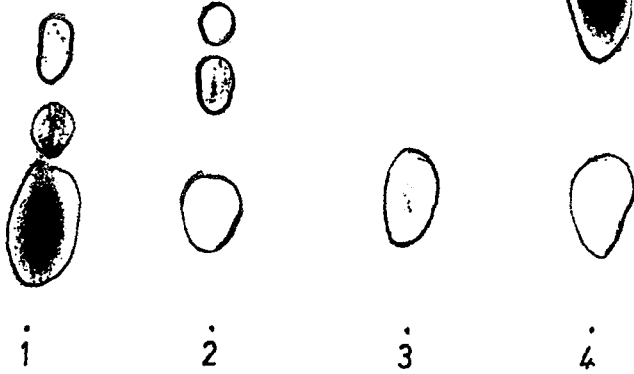
Tablo 4.24. %20 sulu izopropanollü ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
20B ₁	----	----
20B ₂	----	----
20B ₃	0.21	beyaz
20B ₄	0.18	açık mor

Şekil 4.24. %20 sulu izopropanolde (20B) reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.9. %5 Sulu Etil Metil Keton Çözücülü Ortamda Peptid

Sentezleri

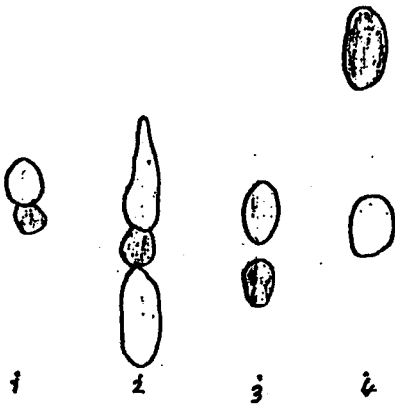


Tablo 4.25. %5 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
5C ₁	0.67	pembe
5C ₂	0.62	eflatun
5C ₃	----	----
5C ₄	----	----

Şekil 4.25. %5 sulu etil metil ketonlu (5C) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%5 sulu etil metil keton çözücülü ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.26.'da, Rf değerleri ve 254 nm. deki renkleri Tablo 4.26. da verilmiştir.

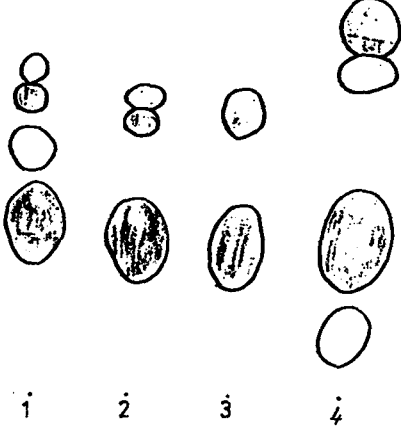


Tablo 4.26. %5 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
5C ₁	----	----
5C ₂	0.11	sarıkahve
5C ₃	----	----
5C ₄	----	----

Şekil 4.26. %5 sulu etil metil ketonlu (5C) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.10. %10 Sulu Etil Metil Keton Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

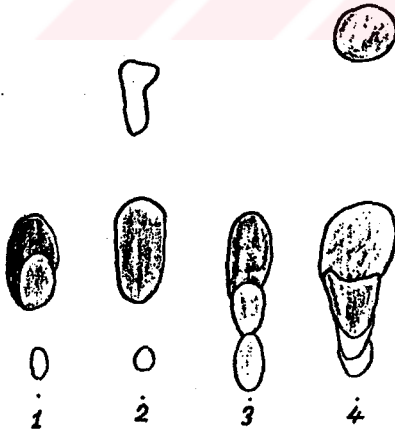


Tablo 4.27. %10 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
10C ₁	0.52	eflatun
	0.57	eflatun
10C ₂	0.50	eflatun
10C ₃	0.52	eflatun
10C ₄	0.56	eflatun
	0.10	beyaz

Şekil 4.27. %10 sulu etil metil ketonlu (10C) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

Aynı ortamdaki ince tabaka kromatografisine göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.28. de, Rf değerleri ve 366 nm. deki renkleri Tablo 4.28. de verilmiştir.



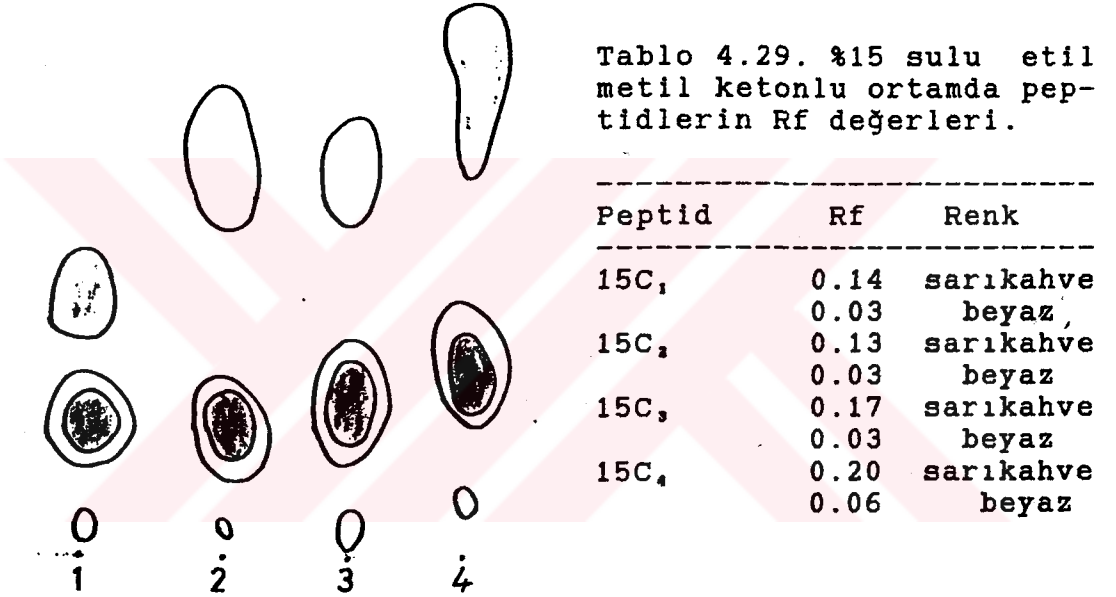
Tablo 4.28. %10 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
10C ₁	0.16	açık pembe
	0.30	açık mor
10C ₂	0.16	açık pembe
10C ₃	0.24	sarı mor
10C ₄	0.14	pembe
	0.18	beyaz
	0.24	mavi mor

Şekil 4.28. %10 sulu etil metil ketonlu ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

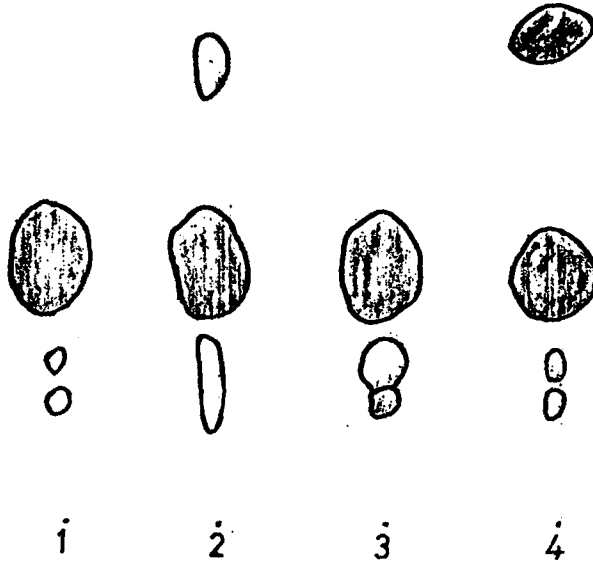
4.2.11. %15 Sulu Etil Metil Keton Çözücülü Ortamda Peptid Sentezleri

%15 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin kağıt kromatografisine göre Rf değerleri ve renkleri Tablo 4.29. da verilmiştir.



Şekil 4.29. %15 sulu etil metil ketonlu (15C) ortamdaki kağıt kromatogramı.

%15 sulu etil metil keton çözücülü ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.30. da, Rf değerleri ve 254 nm.deki renkleri Tablo 4.30. da verilmiştir.



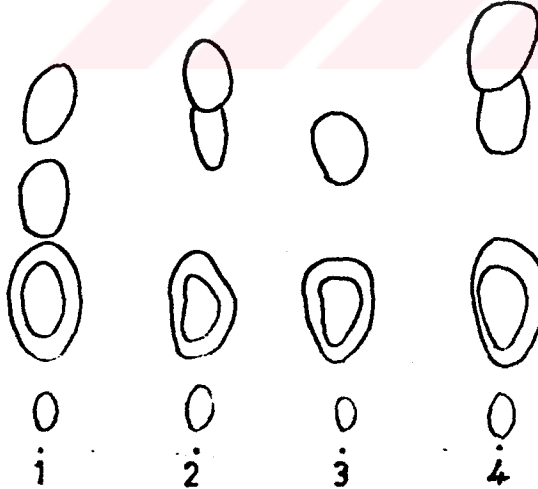
Tablo 4.30. %15 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri.

Peptid	Rf	Renk
15C ₁	0.24	açıksarı
	0.29	açıksarı
15C ₂	0.25	açıksarı
15C ₃	0.22	açikkahve
15C ₄	0.20	açıksarı
	0.24	açıksarı

Şekil 4.30. %15 sulu etil metil ketonlu (15C) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

4.2.12. %20 Sulu Etil Metil Keton Çözücülü Ortamda

Peptid Sentezleri

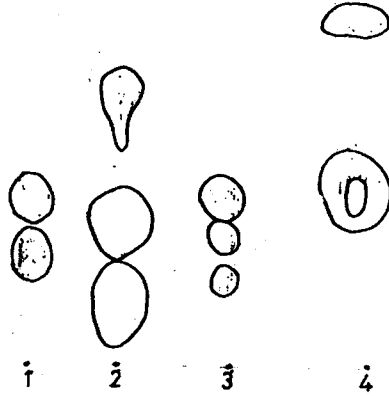


Tablo 4.31. %20 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
20C ₁	0.47	pembe
	0.06	sarı
20C ₂	0.43	pembe
	0.06	sarı
20C ₃	0.41	pembe
	0.04	sarı
20C ₄	0.43	pembe
	0.03	sarı

Şekil 4.31. %20 sulu etil metil ketonlu (20C) ortamda reaksiyon karışımlarının kağıt kromatogramı.

%20 sulu etil metil ketonlu ortamda elde edilen ince tabaka kromatografisi sonuçları Şekil 4.32. de, Rf değerleri ve 254 nm.deki renkleri Tablo 4.32. de verilmiştir.



Tablo 4.32. %20 sulu etil metil ketonlu ortamda peptidlerin Rf değerleri ve renkleri.

Peptid	Rf	Renk
20C ₁	----	----
20C ₂	0.11	sarı
20C ₃	0.14	eflatun
20C ₄	0.28	sarı

Şekil 4.32. %20 sulu etil metil ketonlu (20C) ortamda reaksiyon karışımlarının ince tabaka kromatogramı.

Tablo 4.33. Tripsin Katalizli Reaksiyon Karışımlarının Kağıt Kromatografisine Göre Analizi.

0.1M Fosfat Tamponuyla (pH:8)

Çözücü Cinsi	Glisin + Amino Asit	Doygun	%5	%10	%15	%20
Izo amilalkol	Prolin	+	-	+	+	+
	Tirozin	-	-	-	+	+
	Histidin	-	-	-	+	+
	Triptofan	+	+	+	+	+
Izo propanol	Prolin	-	-	-	-	-
	Tirozin	-	-	-	-	-
	Histidin	+	-	+	-	-
	Triptofan	+	-	+	-	-
Etilmetil keton	Prolin	+	+	+	+	+
	Tirozin	+	+	+	+	+
	Histidin	+	-	+	+	+
	Triptofan	+	-	+	+	+

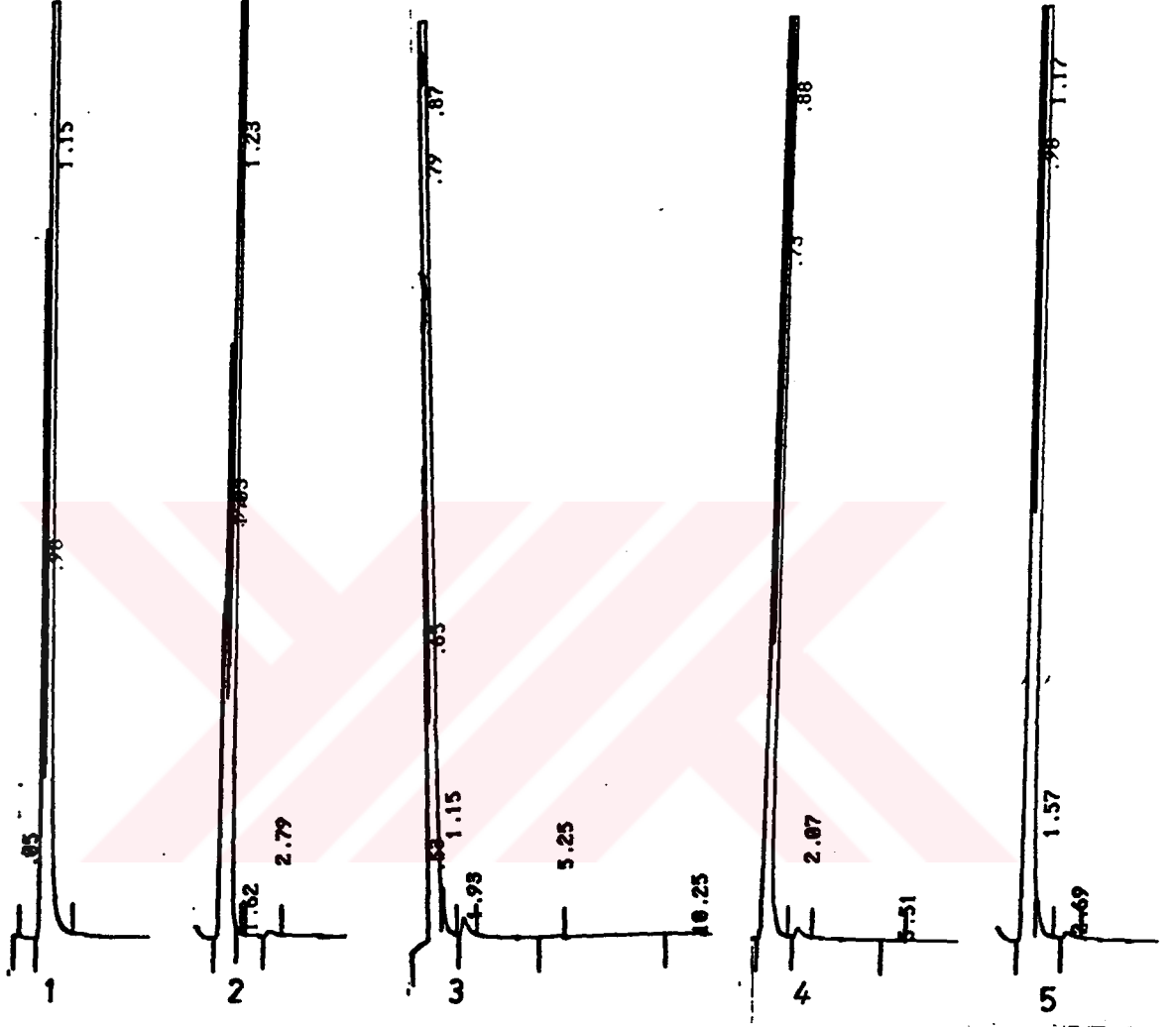
Not: (+) Reaksiyon Verenler, (-) Reaksiyon Vermeyenler

Tablo 4.34. Reaksiyon Karışımlarının İnce Tabaka Kromatografisine Göre Analizleri.

Çözücü Cinsi	Glisin + Amino Asit	Fosfat Tamponuyla (pH:8)				
		Doygun	%5	%10	%15	%20
Izo amilalkol	Prolin	-	-	-	-	+
	Tirozin	-	-	-	+	+
	Histidin	-	+	-	+	+
	Triptofan	-	+	-	+	+
Izo propanol	Prolin	-	-	-	-	-
	Tirozin	-	-	-	+	-
	Histidin	-	-	-	+	+
	Triptofan	-	-	-	+	+
Etilmetil keton	Prolin	+	-	+	+	-
	Tirozin	+	+	+	+	+
	Histidin	+	-	+	+	+
	Triptofan	+	-	+	+	+

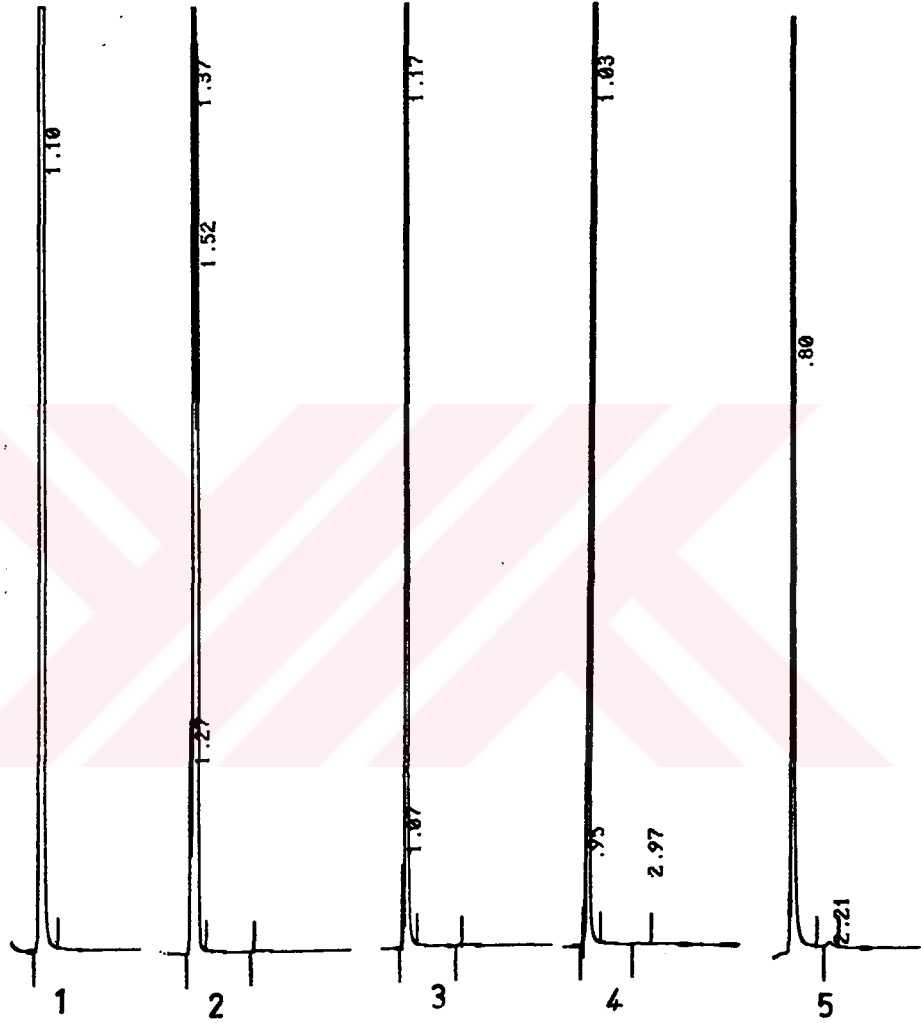
Not: (+) Reaksiyon Verenler, (-) Reaksiyon Vermeyenler

4.3. Reaksiyon Karışımlarının Gaz Kromatogramları



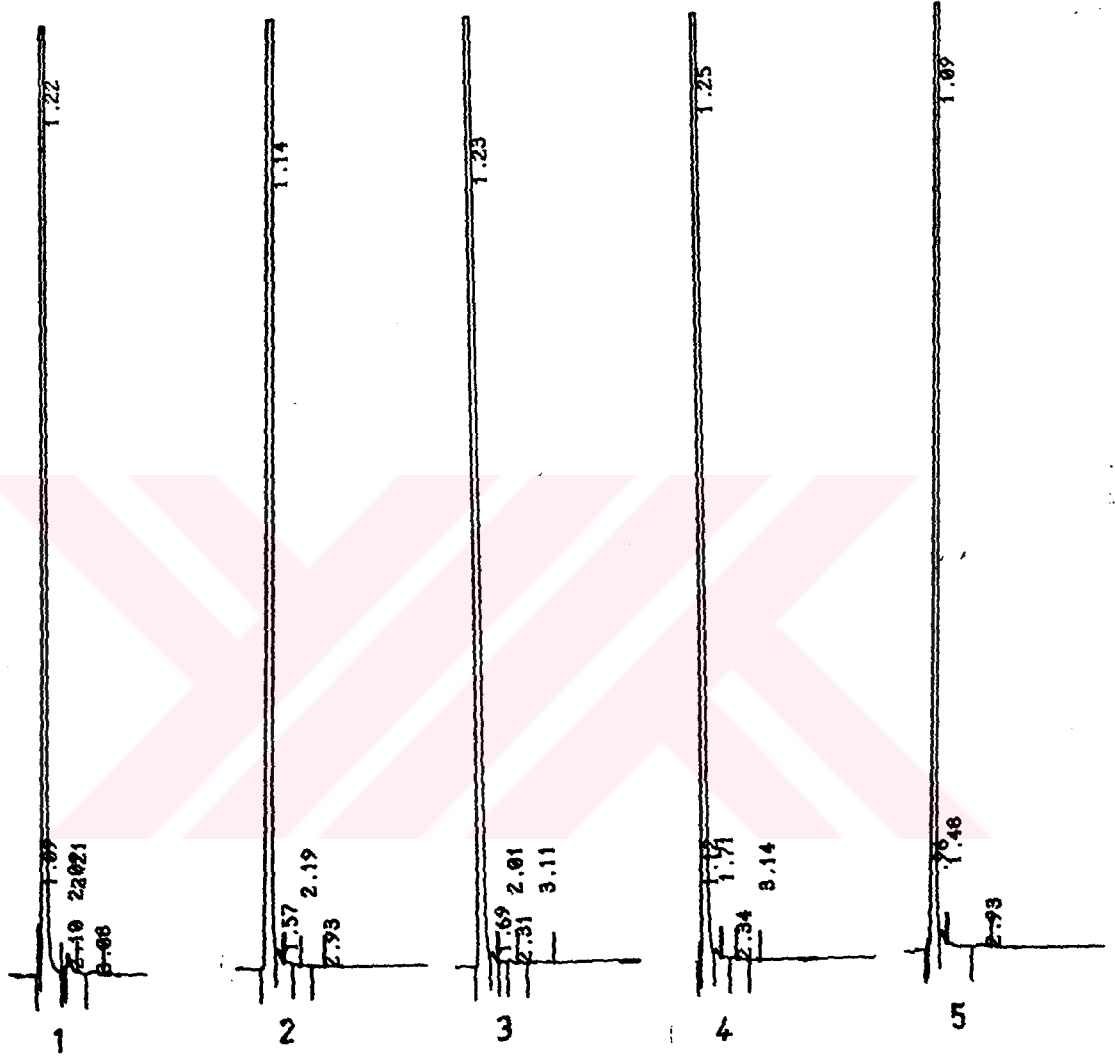
Şekil 4.35. Doymun Izo Amil Alkol çözücülü reaksiyon karışımlarının gaz kromatogramları.

1:Saf izo amilalkol, 2: Prolinli karışım, 3:Tirozinli karışım, 4:Histidinli karışım, 5:Triptofanlı karışım



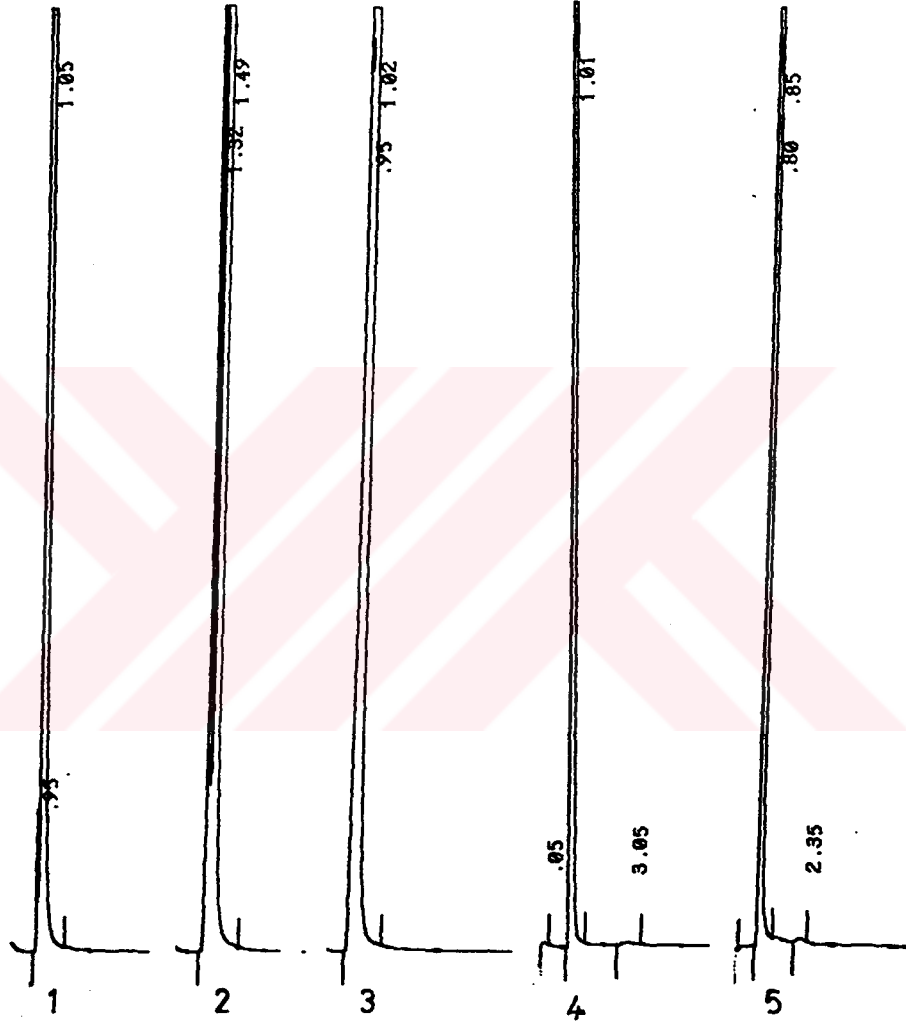
Şekil 4.36. Doygun Izo Propanol çözücülü ortamda reaksiyon karışımlarının gaz kromatogramları.

1:Saf izo propanol, 2:Prolinli karışım, 3:Tirozinli karışım, 4:Histidinli karışım, 5:Triptofanlı karışım



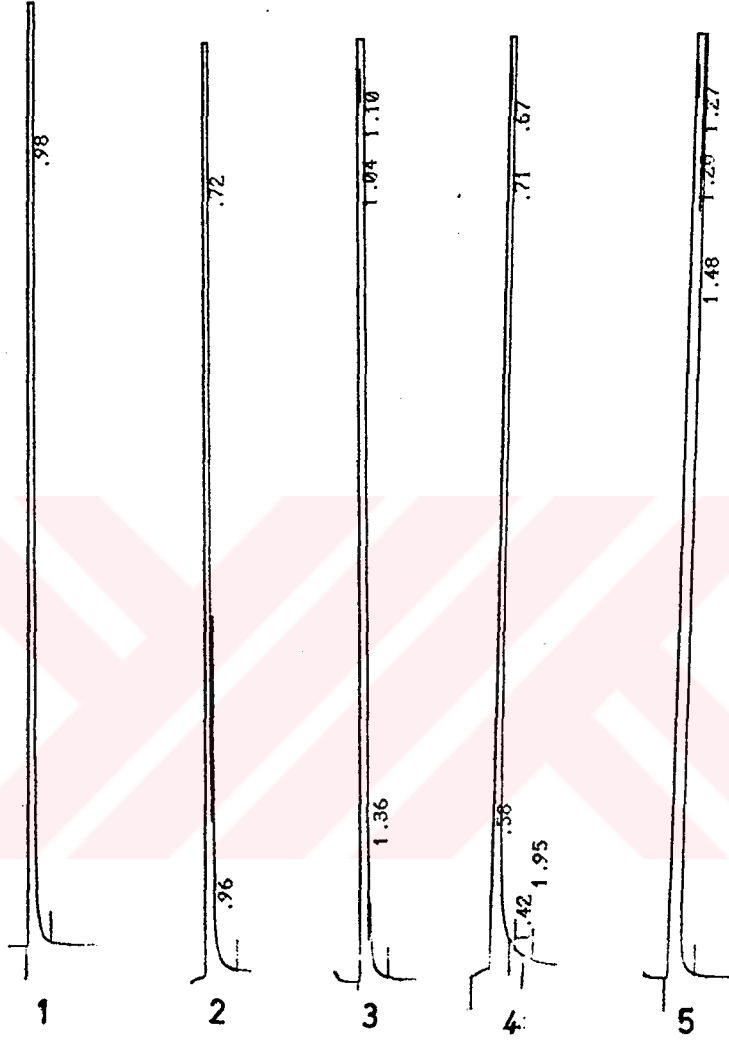
Şekil 4.37. Doygun Etil Metil Keton çözücülü reaksiyon karışımlarının gaz kromatogramları.

1:Saf etil metil keton, 2:Prolinli karışım, 3:Tirozinli karışım, 4:Histidinli karışım, 5:Triptofanlı karışım



Şekil 4.38. Doygun N-Benzol çözücülü reaksiyon karışımlarının gaz kromatogramı.

1:Saf N-Benzol, 2:Prolinli karışım, 3:Tirozinli karışım, 4:Histidinli karışım, 5:Triptofanlı karışım.



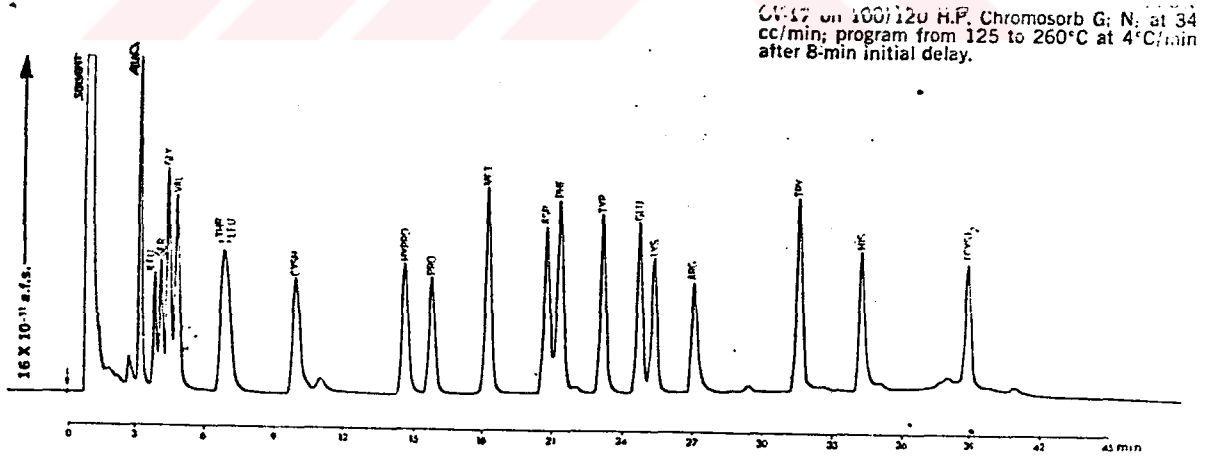
Şekil 4.39. Doygun Izo Oktan çözücülü reaksiyon karışımlarının gaz kromatogramları.

1:Saf izo oktan, 2:Prolinli karışım, 3:Tirozinli karışım, 4:Histidinli karışım, 5:Triptofanlı karışım.

Amino asitler uçucu olmayan bileşiklerdir. Gaz kromatografisinde uçucu hale gelebilen bileşikler analiz edilmektedir. Bu sebeple amino asitler gaz kromatografisi ile tayin edilmek istendiğinde öncelikle uçucu türevlerinin hazırlanması gerekir.

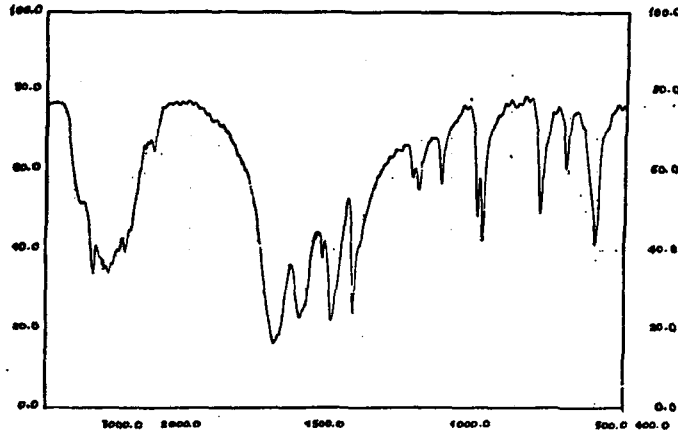
Bunun için n-butil-N-trifloro asetil veya trimetil silil kullanılmaktadır. En az 25 mg amino asitle önce uçucu türevler hazırlanır, sonra gaz kromatografisi alınır. Klinik uygulamalarda rutin olarak bu yöntemle çalışılmaktadır.

Aşağıda böyle alınmış bir amino asitler karışımının n-butil-N-trifloro asetil türevi yapılmış haldeki gaz kromatogramları Şekil 4.40. da görülmektedir (Gaz kromatografisi kitabı).



Şekil 4.40. Amino asitlerin n-butil-N-trifloro asetil türevlerinin gaz kromatogramı.

Bizim çalışmamızda gaz kromatografisi, çözücü olarak kullanılan maddelerin değişimini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü gerek kağıt kromatografisi, gerekse ince tabaka kromatografisi amino asit ve peptidler için iyi bir ayırma sağlamaktadır. Bu yüzden amino asit ve peptidlerin ayrıca uçucu türevleri hazırlanıp gaz kromatografileri alınma yoluna gidilmemiştir. Bütün reaksiyon karışımlarına uygulanan gaz kromatografik analizlerinde değişen su içeriklerine göre farklı bir durum gözlenmediğinden örnek olarak yalnız %10 tampon içeren reaksiyon karışımlarının gaz kromatografileri Izo amilalkollü Şekil 4.35. de, Izo propanollü Şekil 4.36. da, Etil metil ketonlu Şekil 4.37. de, N-benzollü Şekil 4.38. de, Izo oktanlı Şekil 4.39. da verilmiştir.



Şekil 4.41. Etil metil ketonlu reaksiyon karışımının IR spekturumu.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Asıl peptidleşme reaksiyonlarına geçmeden önce; kullanılan çözücülerle reaktif amino asitler arasında olabilecek etkileşmeleri belirlemek amacıyla tek tek her çözücü ile amino asitler reaksiyon şartlarında etkileştirildi. Kağıt, inca tabaka, gaz kromatografisi ve gerektiğinde IR spektrofotometresinde karışımlar analiz edildi. Buna göre izo amil alkol, n-benzol ve izo oktan çözücüleri ile kullanılan beş amino asidin hiçbiri reaksiyon vermedi, yeni bir ürün bulunamadı.

Etil metil keton ile glisin arasındaki etkileşmede pembe renkli zamanla açık kahverengine dönüşen bir ürün tesbit edildi. Bunun ketonla glisin arasında önce hidrojen bağı sonra su ayrılmasıyla etil metil keton-glisin olduğu IR spektrofotometresi'nde $-C=N-$ (1620 cm^{-1}) bağının tesbitiyle anlaşıldı (Şekil 4.41.). Diğer amino asitlerle etil metil keton arasında ürün oluşmadı.

Izo propanol ile amino asitler arasındaki etkileşmelerde ise glisin hariç prolin, tirozin, histidin triptofan arasında esterlerinin oluştuğu belirlendi. Izo amil alkole göre daha az karbon sayılı olması,

kısmi polaritesi ve tampon çözelti ile kısmi bir karışabilirlik göstermesi ürün oluşumundaki etkenlerdir.

Benzen ve izo oktan çözücü olarak amino asitlerle ayrı ayrı etkileştirildiğinde ise reaktifler dışında hiçbir ürüne rastlanmadı. Tamponla doygun olmasına karşın amino asitlerin bu ortamlardaki çözünürlükleri de az bulundu.

Tripsin enziminin lizin-arginin gibi bazı amino asit bağlarına karşı keskin hidrolaz aktivitesi bilinmektedir. Ancak enzimin, peptidasyon ve esterifikasyon aktivitesi çalışmaları yeni başlamıştır. Bizim çalışmamız da bu çalışmalara katkı niteliğindedir.

Serbest tripsin enzimi denediğimiz az sulu organik ortamlardan yalnızca izo propanol ile prolin, tirozin, histidin ve triptofan amino asitleri az oranda esterleşme reaksiyonlarını katalizledi.

Peptidleşme reaksiyonlarında; Izo amil alkol çözücüsü kullanılanlarda glisin-prolin arasında %10 ve daha çok tampon içeren reaksiyon karışımlarında peptid oluştu. Glisin-tirozin ve glisin-histidin arasında %15-20 lik karışımlarda peptidler elde edildi. Glisin-triptofan arasında ise %5,10,15,20 tamponlu çözeltilerde peptidler meydana geldi.

Izo propanol çözücüsü kullanılan reaksiyonlarda %15'lik karışımlarda tirozinin-glisin peptidi, %15,20 lik karışımlarda da histidin ve triptofanın glisin peptidleri düşük oranda sentezlendi. Kağıt ve ince tabaka kromatografilerinde bu peptidlerin yanında daha önce belirttiğimiz esterler de gözlemlendi.

Etil metil keton kullanılan reaksiyon karışımlarında glisin-prolin arasında %10,15 tamponlularda, glisin-tirozin arasında %5,10,15,20 tamponlularda, glisin-histidin arasında %10,15,20 tamponlularda, glisin triptofan arasında %10,15,20 tamponlularda peptidlerini oluşturdu. Ayrıca ketonun glisinle oluşturduğu renkli bileşik bütün karışımlarda mevcuttu.

Benzen ve izo oktan karışımlarının hiçbirinde peptidleşme reaksiyonları oluşmadı. Ayrıca amino asitlerin bu iki çözücüdeki çözünürlükleri tampon eklenmesine rağmen diğer çözücülere göre daha azdı.

Ince tabaka ve kağıt kromatografisine göre organik ortamın cinsine göre tripsin katalizatörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlarda peptid oluşumları; kağıt kromatografisine göre Tablo 4.33.de, ince tabaka kromatografisine göre Tablo 4.34. dedir.

Tamponla doygun organik ortamların reaksiyondan

Önce ve sonraki gaz kromatogramlarından Şekil 4.35. de ki izo amilalkol ortamlarında 1 nolu standarda göre diğerlerinde belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Çıkış zamanındaki küçük farklılıklar enjeksiyon süresinden kaynaklanmaktadır. Şekil 4.36. daki izo propa- nol ortamlarının kromatogramlarında, Şekil 4.37. deki metil etil ketonlu, Şekil 4.38. deki benzen ve Şekil 4.39. daki izo oktanlı kromatogramlarda da çözücülerin bir değişikliğe uğramadığı görülmektedir.

Sonuç olarak; Tripsin enzimi katalizatörlüğünde korunmayan amino asitlerle gerçekleştirilen esterleş- leştirme reaksiyonlarında en önemli etken kullanılan alkolün polarlığı ve molekül büyüklüğüdür. Karbon sa- yısı azalması ve polarite amino asitlerin çözünürlü- ğünü arttırırken etkileşme hızını da arttırır. Orta- mın su içeriği önemli etkidir. Az su içeriyorsa çö- zünürlüğün azalmasından, daha çok su içeriyorsa hid- roliz hızının artmasından dolayı denge esterifikas- yon aleyhinedir. Her alkol için su içeriğinin opti- mizasyonu gerekir.

Aynı biyokatalizatörle gerçekleştirilen değişik ortamdaki peptidleşmelerde; peptid sentezine etkiyen etkenler, amino asitlerin kimyasal yapıları, çözünür-

lükleri, ortamın polaritesi ve su içeriğidir. Amino asitlerin yapısı enzim bakımından önemlidir. Tripsin enzimi protein ve peptidlerdeki lizin ve arginin bağlarını C-terminalinden spesifik olarak hidrolizler. Ancak enzimin fizyolojik şartlarda hangi amino asitleri, hangi ortamda peptidasyon için substrat kabul ettiği değişik gruplarca araştırma aşamasındadır.

Biz de oda sıcaklığında 0.1 M, pH:8 olan fosfat tamponlu izo amilalkol, izo propanol ve etil metil keton'un %10-15 su içeren reaksiyon ortamlarında tripsin enzimi tirozin, histidin ve triptofanın; glisin ile peptidasyonunu katalizledi.

Üç çözücüde en çok glisin-triptofan peptidi sentezlenirken, en az glisin-prolin peptidi oluştu. Izo oktan ve benzen ortamlarında tripsin hiç peptidasyon aktivitesi göstermedi. Çözücü cinsi bakımından en yüksek peptidleşme oranı etil metil keton çözücülü ortamda, sonra izo amilalkol ve izo propanollü ortamlarda oldu.

Organik ortamlarda cüz'i orandaki suyun, enzimleri koruyarak denatürasyonunu önlediği bilinmektedir. Enzim, çözücü cinsleri ve reaksiyonun amacına bağlı olarak su içeriğinin optimizasyonu gerekir. Çalışmamız-

da peptidasyon için optimum su içeriğini üç organik çözücü için yaklaşık %10-15 bulduk.

Bundan sonra amino asitlerin bir gruplarını koruyarak ve tripsin enziminin modifikasyon veya immobilizasyonla dayanıklılığını arttırarak çalışmalara devam etmek istiyoruz.



6. KAYNAKLAR

- 1- Karlson, P., Çev: Telefoncu, A., 1988, "Biyokimya" 22-30.
- 2- Tekman, Ş., Öner, N., 1981, "Genel Biyokimya" 219-220.
- 3- Fields, G.B., Fields, C.G., 1991, "Solvation Effects In Solid-Phase Peptide Synthesis", J. Am. Chem. Soc. 113, 11, 4202-4207.
- 4- Henry, C., Damm, PH.D., Paige, K., Besch, PH.D., Alvin, J., Goldwyn, M.A., "The Handbook Of Biochemistry And Biophysics".
- 5- Noritomi, H., Watanabe, A., Kise, H., 1989, "Enzymatic Reactions In Aqueous-Organic Media VII. Peptide And Ester Synthesis In Organic Solvents By α -Chymotrypsin Immobilized Through Non-Covalent Binding To Poly (Vinyl Alcohol)", Polimer Journal, 21, 2, 147-153.
- 6- Whiteside, G.M., Wong, C.H., 1985, Angew. Che. Int. Ed. Engl., 24, 617-638.
- 7- Danree, B., Guy, A., Lemoine, J., Moriniere, J.L. 1988, Synt. Comm., 18, 4, 441-444.
- 8- Cantacuzene, D., Guerreiro, C., 1987, Tetrahedron Lett., 43, 2, 5153-5156.
- 9- Chuang, S.F., Fu, S.L., Tai, D.F., Tsai, H.H., 1989 Biotech. Lett., 11, 3, 173-176.

10- Klibanov, M.A., Margolin, A.L., Tai, D.F., 1987, Tett. Lett., 29, 43, 5487-5488.

11- Homandberg, G.A., Laskowski, Jr.M., Mattis, J.A. 1978, Biochemistry, 17-5220.

12- Çavdar, E., Uslan, H.A., 1991, " Enzyme Catalyzed Synthesis Of Amino Acid Derivatives " Kimya ve Kimya Mühendisliği Sempozyuum-KIBRIS.

13- Gaertner, H., Watanabe, T., Sinisterra, J.V., Puigserver, A., 1991, " Peptide Synthesis Catalyzed By Modified α -Chymotrypsin in Low-Water Organic Media ", J. Org. Chem., 56, 9, 3149-3153.

14- Khmel'nitski, Yu.L., Dien, F.K., Semenov, A.N., Martinek, K., 1984, Tetrahedron, 40, 4425-4432.

15- Cassels, J.M., Halling, P.J., 1988, Enzyme Microb. Technol., 10, 486-491.

16- Targuis, D., Monsan, P., Durand, G., 1980, Bull. Soc. Chim. France 1980 (II), 76-79.

17- Jakubke, H.D., Butterjahn, R., Hansler, M., Könnecke, A., 1982, In " Affinity Chromatography And Related Techniques ", Gribnau, T.C.J., Visser, J., Nivard, R.J.F., Amsterdam, Elsevier. 529-536.

18- Turkova, J., Vanek, T., Turkova, R., Vervovic, B., Kubanek, V., 1982, Biotech. Lett., 4, 165-170.

19- Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., 1987,

Appl. Microb. Biotechnol., 26, 1-8.

20- Blanco, R.M., Guisan, J.M., Halling, P.J., 1989, " Agarose-chymotrypsin As A Catalyst For Peptide And Amino Acid Ester Synthesis In Organic Media ", Biotechnology Letters, 11, 11, 811-816.

21- Kitaguchi, H., Tai, F., Klivanov, A.M., 1988, " Enzymatic Formation Of An Isopeptide Bond Involving The -Amino Group Of Lysine ", Tetrahedron Letters, 29, 43, 5487-5488.

22- Margolin, A.L., Tai, D.F., Klivanov, A.M., 1987, "Incorporation Of D-Amino Acids Into Peptides Via Enzymatic Condensation In Organic Solvents", J. Am. Chem. Soc., 109, 25, 7885-7887.

23- Jakubke, D.H., Kahl, P., Könnecke, A., 1985, " Basic Principles Of Protease-Catalyzed Peptide Bond Formation ", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 24, 2, 85-93.

24- Margolin, A.L., Klivanov, A.M., 1989, " Peptide Synthesis Catalyzed By Lipases In Anhydrous Organic Solvents ", J. Am. Chem. Soc., 111, 1, 386-388.

25- Guinn, M.R., Harvey, W.B., Douglas, S.C., 1991, " Effect Of A Water-Miscible Organic Solvent On The Kinetic And Structural Properties Of Trypsin ", Enzyme Microb. Technol., 13, 4, 320-326.

26- Widmer, F., Bayne, S., Hoven, G., Thorbek, P., Johansen, J.T., 1986, " Enzymic Peptide Synthesis: Current

Possibilities And Future Prospects ", Protides Of The Biol. Fluids, 34, 27-30.

27- Telefoncu, A., 1988, Protein Yapısı Ve Fonksiyonu Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme-İZMİR.

28- Gardossi, L., Bianchi, D., Klivanov, A.M., 1991, "Selective Acylation Of Peptides Catalyzed By Lipases In Organic Solvents", J. Am. Chem. Soc., 113, 16, 6328-6329.

29- Chinsky, N., Margolin, A.L., Klivanov, A.M., 1987, " Chemoselective Enzymatic Monoacylation Of Bifunctional Compounds ", J. Am. Chem. Soc., 109, 12, 3802-3804.

30- Cambou, B., Klivanov, A.M., 1984, " Preparative Production Of Optically Active Esters And Alcohols Using, Esterase Catalyzed Stereospecific Transesterification In Organic Media ", J. Am. Chem. Soc., 106, 2687-2692.

31- Aydemir, T., Telefoncu, A., 1991, " Immobilize Lipazlarla Yağların Interesterifikasyonu ", (Ph D Thesis) Ege Ün. Fen Bil. Ens. Dergisi.

32- Yokozeke, K., Yamanaka, Y., Takinami, K., Hirose, Y. Tanaka, A., Somonoto, K., Fukui, S., 1984, "Interesterification Of Fats ", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.,14, 1-5.

33- Ekiz, H.I., Uçar, T., Çağlar, A., 1987, "The Effects Of Alcohols On The Hydrolysis Of Triacetin And Tributyrin By A Candidal Lipase ", The Journal Of Fırat Ün. 2, 1, 31-38.

34- Gaz Kromatografisi Kitabı.

ÖZGEÇMİŞ

1968 Havsa doğumluyum. İlk, orta ve liseyi Havsa da bitirdim. 1986.yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdim. 1990 yılında aynı üniversiteden mezun oldum. 1991 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak girdim. Halen bu görevdeyim.