T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDALARDA KULLANILMAK ÜZERE AROMA VERİCİ PEPTİT SENTEZİ

SEDA AVERBEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. SEVİL YÜCEL

İSTANBUL, 2017

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDALARDA KULLANILMAK ÜZERE AROMA VERİCİ PEPTİT SENTEZİ

Seda AVERBEK tarafından hazırlanan tez çalışması 14.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Serap ACAR DERMAN

İstanbul Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yapılmasının her aşamasında bilgisi ve becerisi ile beni yönlendiren, eşsiz desteği ile bana her konuda yardımcı olan, akademik kariyerimde bugüne gelmemde emeği olan değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e,

Engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın her yönde önünü açan, çalışmalarımda bana her konuda destek olan, beni yönlendiren, geliştiren, bilgi, beceri ve tecrübelerini aktaran değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE'ye,

Gerek Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki deney çalışmalarım sırasındaki işbirliği, gerekse tezimin hazırlanma aşamasında asla esirgemediği büyük destekleri ile yanımda olan sevgili Pelin PELİT ARAYICI ve Tayfun ACAR'a,

Hücre çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, yönlendiren, bilgi ve becerileriyle destek olan sevgili hocam Dr. Zeynep AYDIN'a

Deneysel çalışmalarım sırasında verdikleri destek ve işbirliklerinden dolayı çalışma arkadaşlarım Ecem TİRYAKİ, Ali Can ÖZARSLAN, Burcu KARAKUZU, Tülay Merve TEMEL, İlkay TURHAN, Deniz İSMİK ve diğer arkadaşlarıma,

Beni bugünlere kadar getirmek için büyük emekler veren, yüreklendiren, motive eden ve her türlü desteği esirgemeyen biricik aileme,

Her zaman yanımda olan benden desteklerini ve sevgilerini hiç esirgemeyen dostlarım Burcu ATILGAN, Kübra YÜCE, Tayfun KAPUCU, Levent BARLAS ve Gülfem CİĞERCİ'ye

İlgisi, desteği ve sevgisi ile yanımda olan Emirhan UZAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2017

Seda AVERBEK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3

BÖLÜM 2

LİTERATÜR TARAMASI 4

2.1 Aroma 4
2.1.1 Aroma Nedir? 4
2.1.2 Aromanın Tarihçesi 5
2.1.3 Aroma Çeşitleri 7
2.1.3.1 Doğal Aromalar 7
2.1.3.2 Doğala Özdeş Aromalar 8
2.1.3.3 Yapay Aromalar 8
2.1.3.4 Aroma Karışımları 8
2.1.3.5 Reaksiyon Aromaları 8
2.1.3.6 Tütsü Aromaları 8
2.1.4 Aroma Verici Maddeler Olarak Aminoasitler 9
2.1.5 Aroma Verici Maddeler Olarak Peptitler 9
2.2 Aminoasitler ve Peptitler 10
2.2.1 Aminoasitler 10
2.2.2 Peptitler 13

2.3 Peptit Sentezi 15
2.3.1 Peptit Sentezi Tarihçesi 15
2.3.2 Katı Destek ve Bağlayıcı Sistemleri 19
2.3.2.1 Jel Türü Reçineler 21
2.3.2.2 Yüzey Türü Reçineler 22
2.3.2.3 Kompozitler ve Desteklenmiş Jeller 22
2.3.2.4 Brush Polimerler 22
2.3.3 Bağlayıcı (Linker/Handle) Moleküller 23
2.3.3.1 Wang Bağlayıcı İçeren Reçineler 26
2.3.3.2 PHB Bağlayıcı İçeren Reçineler 26
2.3.3.3 HMPA ((4-hidroksimetil)fenoksi asetik asid) Bağlayıcı İçeren Reçineler 27
2.3.3.4 HMPB ((4-hidroksimetil)fenoksi) butanoik asid) Bağlayıcı İçeren Reçineler 27
2.3.3.5 Rink Amide (RAM) Bağlayıcı İçeren Reçineler 28
2.3.3.6 PAL (Peptide Amide Linker) Bağlayıcı İçeren Reçineler 28
2.3.4 Koruma Grupları 29
2.3.4.1 α- Amino Koruma Grupları 30
2.3.4.2 Tersiyer-Butiloksi Karbonil (t-Boc) Koruma Grubu 32
2.3.4.3 Fmoc Koruma Grubu 32
2.3.4.4 Yan Zincir Koruma Grupları 33
2.3.5 Koruma Gruplarının Kaldırılması (Deprotection) 35
2.3.6 Karboksil Gruplarının Aktivasyonu ve Bağlama Reaktifleri (Coupling Reagents) 37
2.3.7 Kırma (Cleavage) İşlemi 38
2.3.8 Mikrodalganın Kullanımı 41

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD 44

3.1 Materyal 44
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar 44
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 45
3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri 47
3.1.3.1 LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) 47
3.1.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 47
3.2 Metod 49
3.2.1 Lezzetli Peptit Dizisinin Katı Faz Peptit Sentezi Yöntemiyle Sentezlenmesi 49
3.2.1.1 Kırma (Cleavage) İşlemi 52
3.2.2 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Peptit Dizisinin Katı Faz Peptit Sentezi Yöntemiyle Sentezlenmesi 57
3.2.2.1 Kırma (Cleavage) İşlemi 58
3.2.3 Hücre Deneyleri 61
3.2.3.1 Hücre Kültürü 61
3.2.3.2 MTT Testleri 62

BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI 64

4.1 Sentezlenen Peptit Dizilerinin Analizleri 64
4.1.1 Lezzetli Peptit Dizisinin LC-MS Analizleri 64
4.1.2 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin LC-MS Analizleri 67
4.1.3 Lezzetli Peptit Dizisinin HPLC Analizleri 69
4.1.4 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin HPLC Analizleri 70
4.1.5 Saflaştırma İşlemi Gerçekleştirilen Lezzetli Peptit Dizisinin LC-MS Analizleri 71
4.1.6 Saflaştırma İşlemi Gerçekleştirilen Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin LC-MS Analizleri 73
4.1.7 Lezzetli Peptit Dizisine Ait MTT Analizleri 75
4.1.8 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin MTT Analizleri 77

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER 79

KAYNAKLAR 82

ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGE LİSTESİ

Å	Angström
C	Derişim
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

Aa	Amino asit (Amino asitlere ait kısatlamalar Çizelge 4.1 de verilmiştir)
Boc	Benzyl Oxy Carbonyl
cm	Santimetre
DCM	Diklor metan
DIEA	Diisopropil etil amin
dk	Dakika
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDT	Etan ditiol
ESI-MS	Elektrospray iyonizasyon-kütle spektrometri
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gram
HBTU	N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methyl methan aminium hexafluorophosphate N-oxide
HCTU	1H- Benzotriazolium- 1- [bis(dimethylamino)methylene] 5- chloro hexafluorophosphate (1-), 3-oxide
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
m/z	Kütle - yük oranı
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
nm	Nanometre
NMP	N-Methylpyrrolidinone
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline)
SS1	Saflaştırma sonrası birinci örnek
SS2	Saflaştırma sonrası ikinci örnek
TFA	Trifluoroasetikasit
V	Hacim

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Tat ve koku duyularının birlikte alınması aroma terimini karşılamaktadır. ... 4
Şekil 2. 2 Aminoasitlerin kimyasal yapı gösterimi. ... 11
Şekil 2. 3 Proteinlerin birincil yapısını oluşturan aminoasitlerin gösterimi. ... 11
Şekil 2. 4 Aminoasitler ve R gruplarına göre sınıflandırılması ... 13
Şekil 2. 5 Peptit bağı oluşum mekanizması. ... 14
Şekil 2. 6 Bir peptit zincirinin amino-terminal ve karboksil-terminal uçlarının gösterimi ... 15
Şekil 2. 7 Katı faz peptit sentez prosesi ... 17
Şekil 2. 8 Peptit sentezi esnasında reaksiyona girmeyen reaktiflerin filtrasyon ile ortamdan uzaklaştırılması. ... 18
Şekil 2. 9 Polistiren / divinilbenzen çapraz bağlı reçine ... 20
Şekil 2. 10 Çapraz bağlı polimerik Merrifield reçinesi ... 21
Şekil 2. 11 Peptit amid sentezi için reçineler ... 22
Şekil 2. 12 Peptit asit sentezi için reçineler ... 23
Şekil 2. 13 Fmoc koruma gruplu Ala aminoasiti ile yüklenmiş Wang reçinesi. ... 23
Şekil 2. 14 Reçineye bağlı fonksiyonel grup taşıyan bağlayıcı molekül. ... 24
Şekil 2. 15 Bağlayıcının reçineden ayrılması ... 24
Şekil 2. 16 (a) İlk peptit sentezi çalışmalarında kullanılan Merrifield bağlayıcı molekülü (b) Wang bağlayıcı molekülü (c) Sentezlenecek peptit dizisinin ilk aminoasidinin bağlı olduğu Wand reçinesi ... 26
Şekil 2. 17 PHB bağlayıcı molekülü içeren reçine ... 27
Şekil 2. 18 HMPA bağlayıcı molekülü içeren reçine ... 27
Şekil 2. 19 HMPB bağlayıcı molekülü içeren reçine ... 27
Şekil 2. 20 RAM bağlayıcı molekülü içeren reçine. ... 28
Şekil 2. 21 PAL bağlayıcı molekülü içeren reçine ... 28
Şekil 2. 22 Peptit sentez döngüsü ... 29
Şekil 2. 23 Nükleofilik karakter taşıyan ve nükleofilik karakter taşımayan azot atomları ... 31
Şekil 2. 24 SPPS'de Boc/Fmoc koruma grubu stratejisi ... 31
Şekil 2. 25 t-Boc koruma grubu tarafından korunan bir aminoasidin yapısı ... 32
Şekil 2. 26 Fmoc koruma grubu tarafından korunan bir aminoasitin yapısı. ... 33
Şekil 2. 27 Fmoc gubunun piperidinle eliminasyon mekanizması. ... 36
Şekil 2. 28 Karboksil grubunun aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan reaktifler ... 37

Şekil 2. 29 Peptit sentezinin aktivasyon ve bağlanma aşamalarının mekanizması..... 38
Şekil 2. 30 Peptit sentezinde yan zincir koruma gruplarının TFA ile eliminasyonunun mekanizması 40
Şekil 2. 31 a) Mikrodalga fırın ve sentezin gerçekleştiği reaksiyon kabı b) Otomatik mikrodalga destekli peptit sentez cihazı..... 41
Şekil 2. 32 a) Mikrodalga enerjisi uygulanmazken, b) Mikrodalga enerjisi uygulanırken 42
Şekil 2. 33 a) Geleneksel ısıtma yöntemi b) Mikrodalga enerjisi ile ısıtma yöntemi 42
Şekil 3. 1 HPLC sistemi..... 48
Şekil 3. 2 Bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre kolondan çıkışları..... 49
Şekil 3. 3 CEM, Liberty Mikrodalga Destekli Peptit Sentez Cihazı..... 50
Şekil 3. 4 Lezzetli peptit dizisine ait aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri 51
Şekil 3. 5 Cam fırın..... 53
Şekil 3. 6 Peptitin katı reçineden ayrılması için kırma kokteyli eklendikten sonra çalkalayıcıda bırakılması..... 54
Şekil 3. 7 Rotary Evaporatör..... 54
Şekil 3. 8 Kurutulmuş peptit..... 55
Şekil 3. 9 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri. 57
Şekil 3. 10 MTT'nin Formazon'a dönüşümü..... 62
Şekil 4. 1 Ham lezzetli peptit dizisinin LC kromatogramı 65
Şekil 4. 2 Ham lezzetli peptit dizisine ait toplam iyon kromatogramı..... 65
Şekil 4. 3 Ham lezzetli peptit dizisi MS spektrumu..... 66
Şekil 4. 4 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin LC kromatogramı..... 67
Şekil 4. 5 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait toplam iyon kromatogramı 68
Şekil 4. 6 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin MS spektrumu..... 68
Şekil 4. 7 Lezzetli peptit dizisine ait 190 nm'de elde edilen kromatogram 69
Şekil 4. 8 Lezzetli peptit dizisine ait 210 nm'de elde edilen kromatogram 70
Şekil 4. 9 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 190 nm'de elde edilen kromatogram 71
Şekil 4. 10 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 210 nm'de elde edilen kromatogram 71
Şekil 4. 11 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin LC kromatogramı..... 72
Şekil 4. 12 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin toplam iyon kromatogramı 72
Şekil 4. 13 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin MS spektrumu..... 72
Şekil 4. 14 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin LC kromatogramı ... 73
Şekil 4. 15 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin toplam iyon kromatogramı 73
Şekil 4. 16 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin MS spektrumu 74
Şekil 4. 17 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 24 sattlik % canlılık grafiği ... 75
Şekil 4. 18 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 48 sattlik % canlılık grafiği ... 76
Şekil 4. 19 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 24 saatlik % canlılık grafiği 77

Şekil 4. 20 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 48 saatlik % canlılık grafiği 78

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Aroma kimyasının gelişim tarihçesi.....5
Çizelge 2. 2 Aminoasitlerin saf halde gösterdikleri tat özellikleri..... 9
Çizelge 2. 3 Lezzetli peptite ait fragmanların tat özellikleri..... 10
Çizelge 2. 4 Tamura ve arkadaşları tarafından sentezlenen dipeptitlerin tat özellikleri..... 10
Çizelge 2. 5 Aminoasitlerin kısaltmaları ve sistematik isimleri..... 12
Çizelge 2. 6 Peptitin reçineye bağlanması için kullanılan bağlayıcı çeşitleri.....25
Çizelge 2. 7 Bazı yan zincir koruma grupları..... 34
Çizelge 3. 1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....45
Çizelge 3. 2 Lezzetli peptit dizisinin sentezinde kullanılan kimyasallar..... 56
Çizelge 3. 3 Lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin sentezinde kullanılan kimyasallar..... 60
Çizelge 4. 1 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 24 saatlik % canlılık değerleri..... 75
Çizelge 4. 2 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 48 saatlik % canlılık değerleri..... 76
Çizelge 4. 3 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 24 saatlik % canlılık değerleri..... 77
Çizelge 4. 4 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 48 saatlik % canlılık değerleri..... 78

ÖZET

GIDALARDA KULLANILMAK ÜZERE AROMA VERİCİ PEPTİT SENTEZİ

Seda AVERBEK

Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Günümüz gıda sektöründe gıda maddelerinin aromalarını artırmak için pek çok farklı bileşen kullanılmaktadır. Bu bileşenlerden çoğu kimyasal maddeler olup kanserojen etkiler yaratmaktadır. Doğal aroma vericiler olarak karbonhidratlar, oligopeptitler ve aminoasitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bileşenler arasında peptitler önemli bir yer almaktadır. Aroma verici madde doğal kaynaktan izole edilebilmekte veya sentetik olarak sentezlenebilmektedir.

Peptitler pek çok alanda çalışmalara konu olan biyokimyasal moleküllerdir. Gıdalarda aroma ve tat özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik kullanılan birçok zararlı kimyasal bileşenlere peptitler güçlü bir alternatif oluşturmaktadır. Peptitlerin yapıtaşı olan her bir aminoasitin tek başına sahip olduğu belirli bir tat özelliği bulunmaktadır. Ancak bu aminoasitlerin biraraya gelmesiyle ortaya çok farklı tatlar çıkabilmektedir. Bu şekilde farklı aminoasit kombinasyonlarıyla çeşitli tatlar elde etmek mümkündür. 'Lezzetli peptit' adı verilen ve aminoasit dizilimi 'Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala' şeklinde olan peptit zincirinin et aromasına sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu bilinmektedir.

Çalışmada Lezzetli Peptit dizisi ve bu diziden aynı tat özelliği gösteren farklı aminoasitlerin kullanılmasıyla türetilen dizi, mikrodalga destekli katı fazda peptit sentezi yöntemi (SPPS) ile sentezlenmiş ve LC-MS ile karakterize edilmiştir. Daha

sonrasında HPLC cihazı ile saflaştırma işlemleri gerçekleşmiş ve meme kanseri hücreleri olan MCF-7 hücre hattında sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aroma, peptit, LC-MS, lezzetli peptit, aminoasit

ABSTRACT

FLAVOUR PEPTIDE SYNTHESIS FOR USING IN FOODS

Seda AVERBEK

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Nowadays there are a lot of ingredients usage in food industry for the purpose of increasing flavour in food materials. Most of this ingredients are chemical materials which have cancer effect. As natural flavour ingredients carbonhydrates, oligopeptides and aminoacids can be used commonly. Peptides have very important role in this ingredients. Flavour ingredients can be isolated from natural source or can be synthesised as syntetic.

Peptides are biochemical molecules which are subject to many studies. Peptides are strong alternative for unhealty chemicals which being used in foods for improving flavour and taste properties. Each aminoacid has unique taste properties which are basic units of peptides. However combining these aminoacids can occur different tastes. This way it is possible to show up very different tastes with combining different aminoacids. It is known that from previous studies, a peptide called 'delicious peptide' has meat flavour which has 'Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala' aminoacids sequence.

In our study delicious peptide and a different peptide derived from delicious peptide which has different aminoacids that has same taste properties synthesized microwave supported solid phase peptide synthesis method (SPPS) and characterized with LC-MS device. After that, HPLC device used for purification and MCF-7 cell line which is breast cancer cells used for cytotoxicity studies.

Keywords: Flavour, peptide, LC-MS, aminoacid

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Aroma, tat ve kokunun birlikte algılandığı, çoğu uçucu bileşeni içerisinde barındıran hassasiyet olarak tanımlanmaktadır. [1]. Koku ve tat maddelerine bu duyusal özelliği veren bileşikler alkol, aldehit, ester, dikorbonil, metil keton, lakton, terpen, fenolik bileşik ve kükürt içeren bileşik yapısında olabilirler [2], [3], [4], [5]. Gıdalarda çok çeşitli aroma verici ve aroma artırıcı bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenler doğal yöntemlerle elde edilebildiği gibi sentetik olarak da sentezlenebilmektedirler.

Aminoasitlerin, peptitlerin ve proteinlerin tat ve lezzet maddesi olarak kullanımı üzerine çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Aminoasitlerin D ve L konfügrasyonlarına ve peptit dizisindeki dizilişlerine göre verdikleri aroma farklılık göstermektedir. “Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala” aminoasit dizisine sahip olan ve daha önce yapılan çalışmalarda et tadı verdiği gösterilen peptit “lezzetli peptit” olarak anılmaktadır.

Peptitler biyolojik, tıbbi ve farmasötik araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, bu gibi poliamit yapıların sentezi yüzyılı aşkın bir süredir organik kimyanın önemli bir odağı olmuştur. Şu anda, "peptit sentezi", küçük peptitlerden geniş proteinlere kadar değişen materyallerin hazırlanmasına olanak tanıyan çok çeşitli teknikler ve prosedürler içeriyor. Sentetik peptitlerin başarılı bir şekilde sentezlenmesine olanak tanıyan Katı Faz Peptit Sentezi (SPPS) yöntemi, aminoasitlerin C-terminal ucu ile çözünmeyen bir polimere tutturulan bir peptit dizisini oluşturan korunmuş aminoasitlerin art arda eklenmesiyle birleştirildiği bir süreç olarak tanımlanabilir. SPPS'de peptit zinciri, C-terminalden başlayarak olağan şekilde uzamaya

başlar. Sentezlenecek peptitin ilk aminoasidi karboksil grubu vasıtasıyla, filtrasyon ile reaktiflerden veya çözünmüş ürünlerden kolaylıkla ayrılabilen çözünmeyen bir polimere bağlanmaktadır.

Peptitlerin sentezi, Liberty Mikrodalga Destekli Peptit Sentez Cihazı (CEM) kullanılarak katı faz peptit sentezi yöntemi (SPPS) ile Fmoc kimyasına dayalı olarak yapılmıştır. Aroma verici madde olarak gıdalarda kullanılmak üzere sentezlenen peptitler sentetik olmaları yönünden özgünlük taşımaktadır. Tez çalışmasında lezzzetli peptit dizisi ve bu diziden aynı tat özellikleri gösteren farklı aminoasitlerin kullanılmasıyla türetilen başka bir dizinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezleri yapılan peptit dizilerinin karakterizasyon analizler için LC-MS cihazından faydalanılmıştır. Peptitlerin saflaştırma işlemleri HPLC cihazı tarafından yapılmıştır ve daha sonrasında peptitlerin sitotoiksisite çalışmaları için mide kanseri hücresi olan AGS hücre hattı kullanılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Gıdalardaki yeme kalitesinin en önemli bileşenini aroma oluşturmaktadır. Gıdalarda çok çeşitli aroma verici ve aroma artırıcı bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenler arasında peptitler de yer almaktadır. Peptitler farklı türde aminoasitlerin farklı dizilişte peptit bağlarıyla birbirlerine bağlandığı yapılardır. Her bir aminoasitin tek başına sahip olduğu belirli bir tat özelliği bulunmaktadır. Ancak bu aminoasitlerin biraraya gelmesiyle ortaya çok farklı tatlar çıkabilmektedir. Bu şekilde farklı aminoasit kombinasyonlarıyla çeşitli tatlar elde etmek mümkündür. ‘Lezzetli peptit’ adı verilen ve aminoasit dizilimi ‘Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala’ şeklinde olan peptit zincirinin et aromasına sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu bilinmektedir. Tez kapsamında et aroması veren lezzetli peptitin ve bu peptitten aynı tat özelliğini sağlayan aminoasitlerin kullanılmasıyla türetilen dizinin ilk etapta sentezi, karakterizasyonu ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ardından bu peptitlerin sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır.

1.3 Hipotez

Sentezlenerek karakterizasyon ve saflaştırma işlemleri yapılan 8 aminoasitlik diziden oluşan lezzetli peptit ve bu peptitten türetilen ikinci bir dizinin gıda sektöründe kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Gıda sektöründe besinlerin aroma özelliklerinin artırılmasına yönelik kullanılan kimyasal bileşenler önemli ölçüde sağlığa tehdit oluşturmaktadır. Bu kimyasal bileşenlere peptitler gibi biyokimyasal alternatif ürünlerin üretilmesi tüketiciler yönünden önemli olmasının yanısıra daha güvenilir ürünler ile halk sağlığı açısından önemli bir gelişme sağlanmış olacaktır. Pekçok çalışmaya konu olan biyokimyasal moleküller olan peptitlere bu sayede yeni bir kullanım alanı açılmış olacaktır. Sentezlenen peptitler ile yapılan hücre deneyleri çalışmaları sayesinde belirlenen toksisite dozları ile daha sonraki hayvan deneyi çalışmalarında yapılacak fazladan analizleri, maliyeti ve hayvan ziyanını önleyecektir. Sunulan bu tez çalışması, kimya, biyomühendislik ve gıda mühendisliği gibi hem teorik hem de pratik temel bilimlerin araştırma alanlarını kapsayan, multidisiplinler bir çalışmadır.

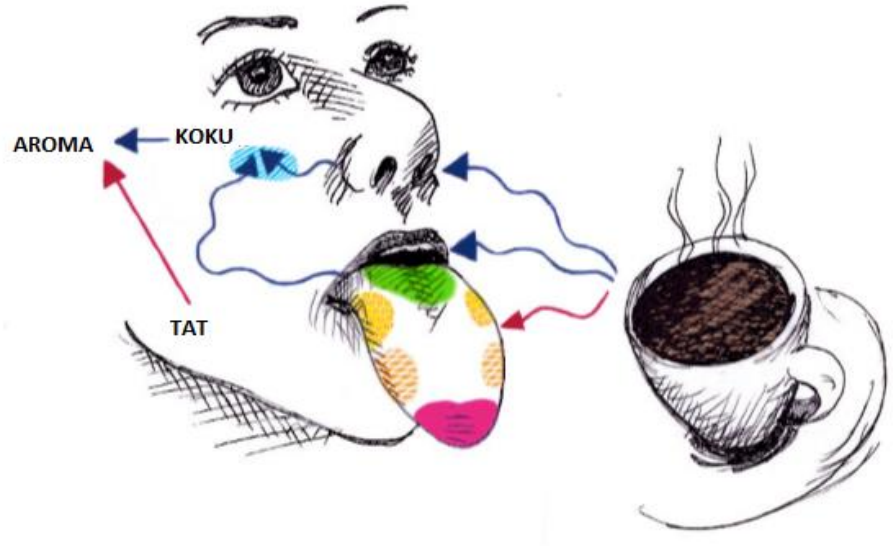
BÖLÜM 2

LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Aroma

2.1.1 Aroma Nedir?

Bir maddenin koklanması ile algılanan duyuya koku, dilde algılanan duyuya ise tat denir. Aroma, tat ve kokunun birlikte algılandığı, çoğu uçucu bileşeni içerisinde barındıran hassasiyet olarak tanımlanabilir [1]. Koku ve tat maddelerine bu duyusal özelliği veren bileşikler alkol, aldehit, ester, dikorbonil, metil keton, lakton, terpen, fenolik bileşik ve kükürt içeren bileşik yapısında olabilirler [2], [3], [4], [5].



Şekil 2. 1 Tat ve koku duyularının birlikte alınması aroma terimini karşılamaktadır [6].

2.1.2 Aromanın Tarihçesi

Aroma maddelerinin kullanımı insan tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. Eski Yunancada baharat anlamına gelen aroma kelimesi sonradan değişerek insanlar tarafından algılanan hoş kokuyu temsil etmeye başlamıştır [7]. Eski zamanlarda tıbbi amaçlar ve yiyeceklerde lezzet oluşturma amaçlarında kullanılan aroma maddelerinin eldesi, fiziksel yöntemler ile bitkisel ve hayvansal kaynaklardan gerçekleşirdi. Fakat kullanılan yöntemlerde karşılaşılan kısıtlamalar nedeniyle farklı yöntemler aranmaya başlanmıştır [8], [9]. 19. yüzyılın sonlarında organik kimya gelişmiş ve yeni sentetik aromalar elde edilmeye başlanmıştır. İvme kazanan aroma endüstrisinin altın çağı aroma maddelerinin ana yapılarını oluşturan bileşiklerin moleküler yapılarının belirlenmesiyle yaşanmıştır. Bu sayede pek çok sentetik koku ve tat maddesi üretilmeye başlanmıştır [10], [11], [12]. Çizelge 2.1'de aroma kimyasının tarihçesi kronolojik sırayla özetlenmiştir [13].

Çizelge 2. 1 Aroma kimyasının gelişim tarihçesi [13].

Yıl	Keşif Adı	Keşfeden Kişi
1701	Bazı çiçeklerden buhar damıtması ile sağlanan uçucu yağların gözlemi	Nicholas Lemery
1759	Nitrik asit buharı ile amber yağının reaksiyonu sonucu bir misk kokusunun elde dilmesi	Berlin Akademi
1800	Amber bileşeninin kimya içindeki araştırması	Dumas
1833	Anetol, borneol ve kafurun ampirik formüllerinin bildirilmesi	Dumas
1834	Sinamik aldehit izolasyonu Nitrobenzen hazırlanması	Dumas, Peligot Mitscherlich
1837	Benzaldehit izolasyonu	Liebig, Wohler
1843	Keklik üzümü yağının ana bileşeninin metil salisilat olduğu belirlenmiştir	Cahours

Çizelge 2.1 Aroma kimyasının gelişim tarihçesi (devamı)

1853	Benzil alkolün hazırlanması Alifatik aldehitlerin sentezlenmesi	Cannaizzaro Piria
1856	Sinamik aldehit sentezi	Chiozza
1859-1860	Salisilik astin büyük ölçekte hazırlanması	Kolbe
1863	Benzaldehitin hazırlanması	Cahours
1865	Benzenin yapısının belirlenmesi	Kekule
1866	Sinamik asit yapısı saptandı	Erlenmeyer
1868	Kumarin sentezi	Perkin
1869	Heliotropinin keşfi	Filtig, Mielk
1871	Heliotropinin yapısı belirlendi	Barth
1874	Gayakolden vanilin sentezi	Reimer, Tiemann
1876	Fenilaktetik aldehitin keşfi	Radziszewski
1875-1877	Sinemik asit sentezi	Perkin
1877	p-hidroksibenzaldehitten anisaldehit üretimi	Tiemann, Herzfeld
1878	Terpin hidrat yapısı belirlendi	Tilden
1880	Kinolinler keşfedildi	Skraup
1884	Limonen ve dipenten tespit edildi	Wallach
1885	Terpinolün yapısı belirlendi	Wallach, Tiemann
1888	Nitro misklerin keşfi	Baur
1889	Sitronelalin keşfi	Dodge
1890	Safrolden heliotropin sentezi	Eykmann
1891	Rhodinol keşfi	Eckhart
1893	İyononun sentezi	Tiemann, Kruger
1894	α-pinenin yapısı belirlendi	Wagner

Çizelge 2.1 Aroma kimyasının gelişim tarihçesi (devamı)

1898	Keton miskinin keşfi	Baur, Thurgau
1903	Metil heptin karbonat ve homologlarının keşfi, Aromatiklik üzerinde yapılan temel çalışma	Mourreau, Delange Von Baeyer
1904	Muskon izolasyonu Aldehitlerin sentezlenmesinde glisidik metodu	Walbaum Darzens
1905	Sinnamik alkolün sentezi	Leser, Barbier
1908	ϒ-undekalaktonun keşfi	Jukov, Schestakow
1913	Farnesolün keşfi	Kerschbaum
1919	Siklamen aldehitin keşfi Linalolün sentezi	Blanc Ruzicka, Fomasir
1923	α-amil sinamaldehitin keşfi Nerolidolün keşfi	Lesech, Descollanges Ruzicka
1926	Muskon yapısının belirlenmesi	Ruzicka, Kerschbaum
1933	Jasmonenin yapısının belirlenmesi	Treff, Werner
1934	Muskon sentezi	Treff, Werner
1946	Terpenoitler için Wallachun izopren kuralının tamamlanması	Robinson
1953	Linalolün yeni sentezi	Caroli, Kimel
1970	α ve β-damaskonların yeni sentezi	Demole

2.1.3 Aroma Çeşitleri

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre aromalar 6 sınıfta incelenir:

2.1.3.1 Doğal Aromalar

Fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak bitksel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen bileşenlerdir. Doğal aromalar bitkiler, meyve, yaprak, çiçek,

bitki sapı ve köklerden ekstrakte edilir. Doğal aroma eldesi için hayvansal kaynaklarda kullanılabilmektedir. Tereyağı ve et ekstraktı hayvansal kaynaklı doğal aromalara örnek gösterilebilir. Doğal kelimesi aromanın esans kısmını ifade ederek aromanın solvent kısmını kapsamamaktadır. Solvent kullanımında doğal zorunluluğu bulunmamaktadır [14].

2.1.3.2 Doğala Özdeş Aromalar

Doğala özdeş aromalar kimyasal yöntemlerle sentezlenir veya izole edilirler. Kimyasal yapı olarak doğal aromalar ile aynı özelliktedirler. Doğala özdeş aromalar her zaman bulunabilir olup mevsimsel olmamaları yönüyle avantaj taşımaktadır. Doğala özdeş aromalar doğal aromalara kıyasla daha ucuzdur [14].

2.1.3.3 Yapay Aromalar

Yapay aromalar kimyasal yöntemlerle sentezlenir ve yapısı bakımından doğal aromalardan farklıdır. Doğada bulunmayadan yapay kimyasallar içerir. Bu aromalar tamamen yapay kimyasallar içerdiği gibi doğal veya doğala özdeş kimyasal maddeler de içerebilirler. Günümüzde yapay kimyasalların kullanımı çok yaygın değildir [14].

2.1.3.4 Aroma Karışımları

Doğal aromalardan farklı olarak fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yöntemler ile bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen maddelerdir [15].

2.1.3.5 Reaksiyon Aromaları

İlk etapta aroma verici özellik göstermeyen en az bir bileşeni azot ve diğer bileşeni indirgen şeker olan iki maddenin yüksek sıcaklıkta reaksiyona girmesi ile oluşan aroma verici karışımlardır [15].

2.1.3.6 Tütsü Aromaları

Bazı gıdaların tütsülenmesi ile elde edilen tütsü ekstraktlarıdır [15].

2.1.4 Aroma Verici Maddeler Olarak Aminoasitler

Aminoasitler, peptitler ve proteinlerin yerine getirdiği birçok önemli biyolojik fonksiyon sayesinde bu bileşiklerin fizyolojik rolü üzerine araştırmalar oldukça fazladır. Bu araştırmalardan bir kısmı aminoasitlerin, peptitlerin ve proteinlerin tat ve lezzet maddesi olarak kullanımı üzerine yapılmıştır.

Aminoasitlerin D ve L konfügrasyonlarına ve peptit dizisindeki dizilişlerine göre verdikleri aroma farklılık göstermektedir. Juerg Solms'un yaptığı 12 farklı kişinin değerlendirmede bulunduğu bir çalışmada aminoasitlerin saf halde bile belirli tatlara sahip oldukları gösterilmiştir. Buna göre oluşturulan tablo Çizelge 2.2'de verilmiştir [16].

Çizelge 2. 2 Aminoasitlerin saf halde gösterdikleri tat özellikleri [16].

Tatsız aminoasitler	**Tatlı aminoasitler**	**Acı aminoasitler**
D-Ala	D-Try	L-Try
D ve L-Arg	D-His	L-Phe
D ve L-Pro	D-Phe	L-Tyr
D ve L-Ser	D-Tyr	L-Leu
D ve L-Thr	D-Leu	-
D ve L-Val	L-Ala	-
-	Gly	-

2.1.5 Aroma Verici Maddeler Olarak Peptitler

Yamasaki ve Maekawa yaptıkları bir çalışmada sığır çorbasından peptit izole etmişlerdir [17]. İzole ettikleri peptitin sığır çorbası gibi lezzetli bir tada sahip olduğunu bildirmişlerdir. "Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala" dizisine sahip olan ve et tadı veren bu peptit "lezzetli peptit" olarak anılmaya başlanmıştır.

Tamura ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada bu peptit ve peptide ait fragmanları aktif tat bölgelerinin incelenmesi için sentezlemiştir [18]. Bu peptite ait fragmanların tat

özellikleri Çizelge 2.3'deki gibidir. Aynı kişiler birkaç bazik ve asidik aminoasitler ile dipeptitler sentezlemişlerdir (Çizelge 2.4). Görülmüştür ki "Lys-Lys" fragmenti bazik karakterli olduğu için tuzlu bir tat vermesi beklenirken ekşi bir tat sağlar. Bu da aminoasitlerin serbest hallerinde verdikleri tatları moleküler halde veremeyeceklerini gösterir.

Çizelge 2. 3 Lezzetli peptite ait fragmanların tat özellikleri [18].

Bileşim	**Tat**
Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	Umami/ekşi
Lys-Gly· HCl	Tuzlu/ umami
Lys-Gly-Asp	Tatlı
Asp-Glu-Glu	Ekşi
Ser-Leu-Ala	Acı

Çizelge 2. 4 Tamura ve arkadaşları tarafından sentezlenen dipeptitlerin tat özellikleri [18].

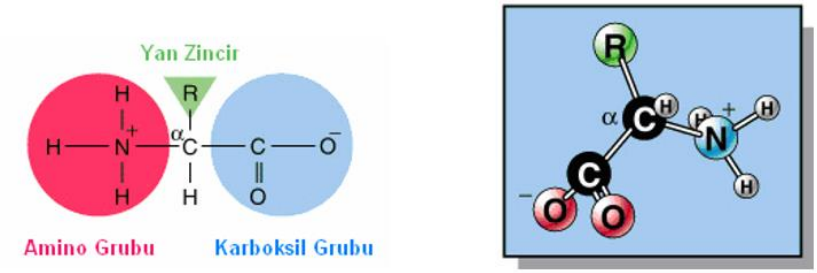
Bileşim	**Tat**
Lys-Gly	Tuzlu/ umami
Lys-Lys	Ekşi
Gly-Lys	Ekşi/Tatlı
Gly-Gly	Tatsız

2.2 Aminoasitler ve Peptitler

2.2.1 Aminoasitler

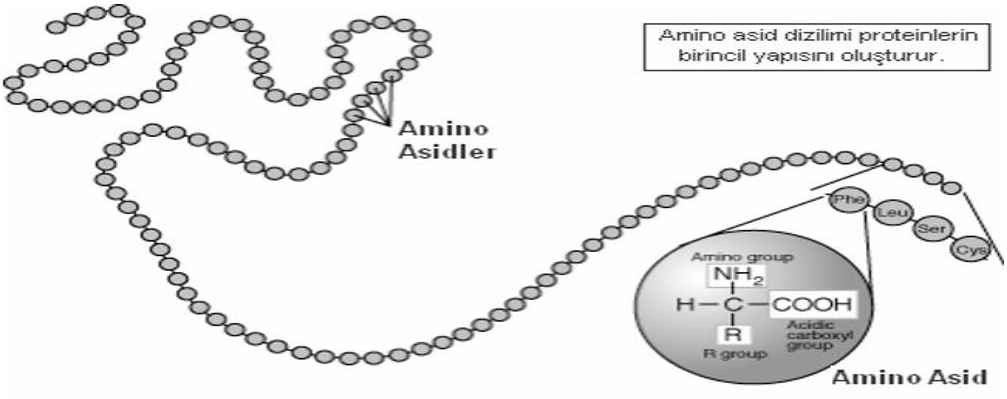
Aminoasitlerin dehidrate (su kaybetmiş) olarak kondenzasyonla birleşmeleri sonucu peptitler oluşur. Bu nedenle aminoasitlerin özelliklerinin bilinmesi bu aminoasitlerle oluşacak peptitler hakkında bilgi sahibi olmak için önem taşımaktadır.

Her bir aminoasit kalıntısı birbirine kovalent bir bağ olan peptit bağı ile bağlanmaktadır. Proteinlerin birincil yapısını oluşturan 20 standart aminoasitin hepsi α-aminoasittir. α-karbon atomuna bağlı halde bir karboksil grup ve bir de amino grubu vardır [19].



Şekil 2. 2 Aminoasitlerin kimyasal yapı gösterimi [20].

Aminoasitlerin belirli bir sıra içerisinde dizilimi ile proteinlerin birincil yapıları oluşur.



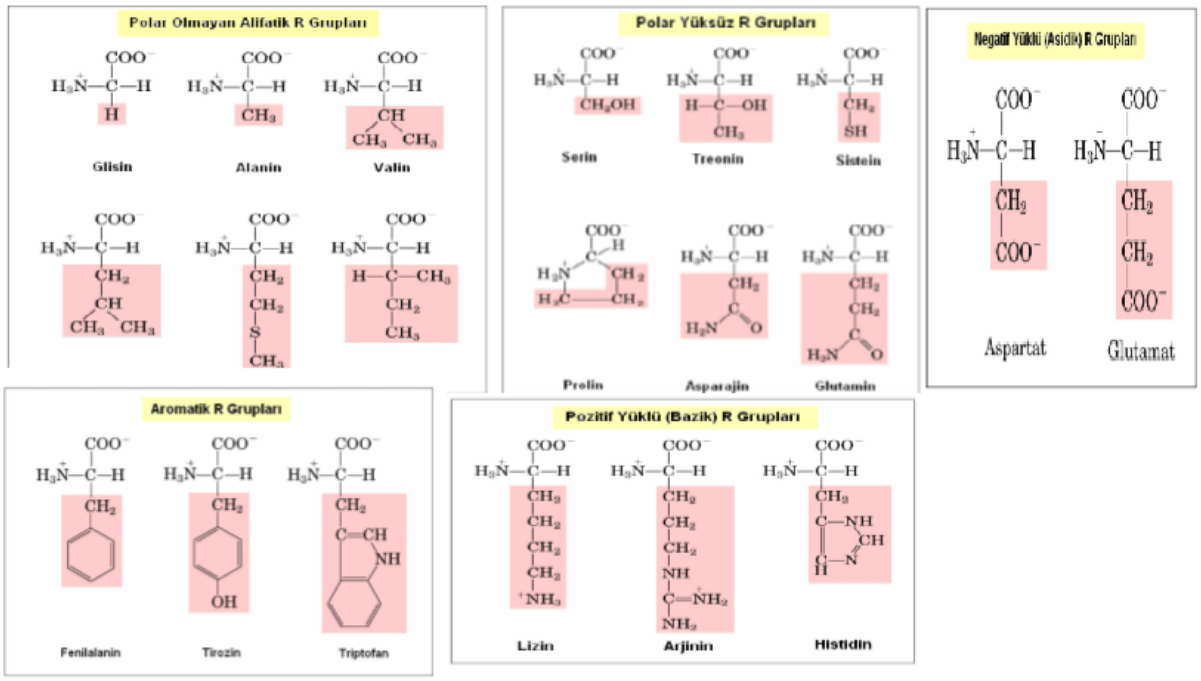
Şekil 2. 3 Proteinlerin birincil yapısını oluşturan aminoasitlerin gösterimi [21].

Aminoasitler adlandırılırken 3 harfli ve 1 harfli kısaltmalardan faydalanılır. Bu kısaltmalar yardımıyla peptit dizilerinin yazılması sırasında oluşabilecek karışıklıklar engellenmiş olur.

Çizelge 2. 5 Aminoasitlerin kısaltmaları ve sistematik isimleri [22].

Genel İsim	Üç Harf	Bir Harf	Sistematik İsim
Alanin	Ala	A	2-Aminopropanoik aist
Arjinin	Arg	R	2-Amino-5-guanidinopentanoik asit
Asparajin	Asn	N	2-Amino-3-karbamoilpropanoik asit
Aspartik asit	Asp	D	2-Aminobutanedioik asit
Sistein	Cys	C	2-Amino-3-merkaptopropanoik asit
Glutamin	Gln	Q	2-Amino-4-karbamoilbutanoik asit
Glutamik asit	Glu	E	2-Aminopentanedioik asit
Glisin	Gly	G	Aminoetanoik asit
Histidin	His	H	2-Amino-3-(1H-imidazol-4yl)propanoik asit
İzolösin	Ile	I	2-Amino-3-metilpentanoik asit
Lösin	Leu	L	2-Amino-4-metilpentanoik asit
Lizin	Lys	K	2,6-Diaminohekzanoik asit
Metiyonin	Met	M	2-Amino-4-(metiltio)butanoik asit
Fenilalanin	Phe	F	2-Amino-3-fenilpropanoik asit
Prolin	Pro	P	Pirolidin-2-karboksil asit
Serin	Ser	S	2-Amino-3-hidroksipropanoik asit
Treonin	Thr	T	2-Amino-3-hidroksibütanoik asit
Triptofan	Trp	W	2-Amino-3(1H-indol-3-yl)propanoik asit
Tirozin	Tyr	Y	2-Amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit
Valin	Val	V	2-Amino-3-metilbütanoik asit
Asp veya Asn	Asx	B	-
Glu veya Gln	Glx	Z	-
Ile veya Leu	Xle	J	-

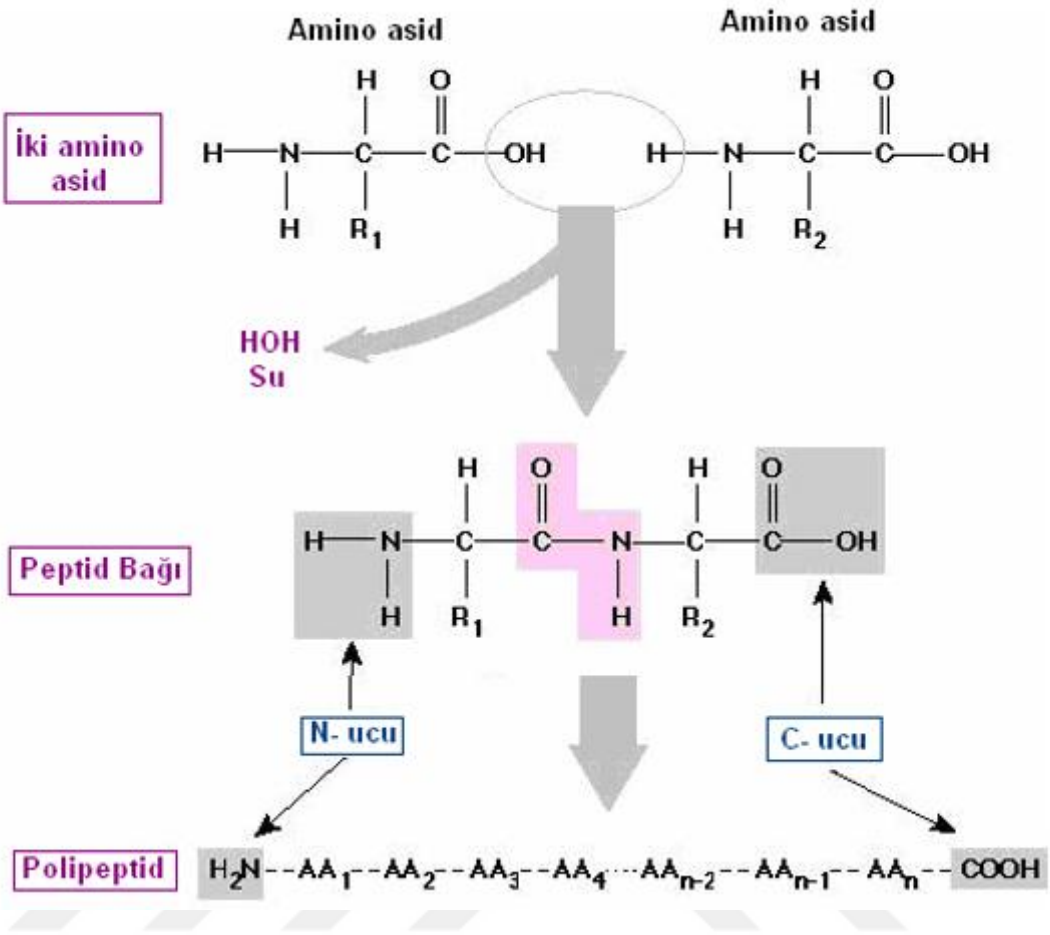
Aminoasitler yan zincirleri veya R gruplarına göre Şekil 2.4'de gösterildiği gibi 5 gruba ayrılırlar.



Şekil 2. 4 Aminoasitler ve R gruplarına göre sınıflandırılması [19].

2.2.2 Peptitler

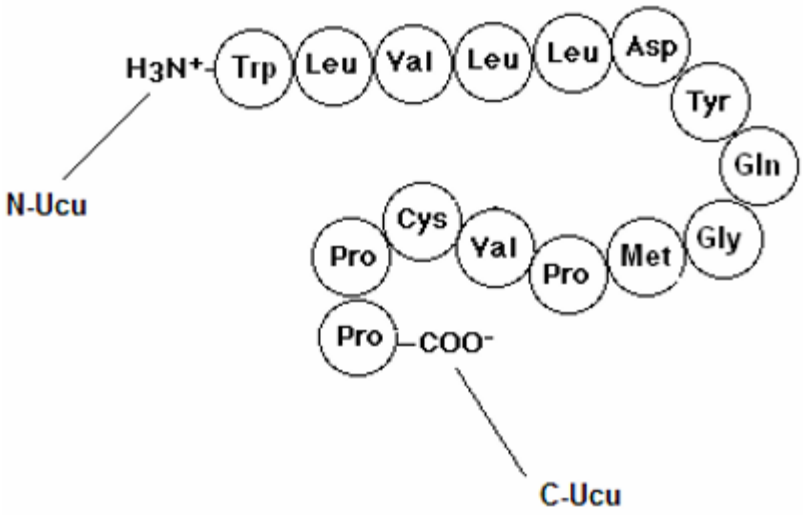
En az iki aminoasitin peptit bağı adı verilen bir bağ ile kovalent olarak bağlanması sonucu peptitler oluşur. Peptit bağı aminoasitlerin peptitlere ve proteinlere polimerleşmesine yol açan, kondenzasyon reaksiyonları sonucunda karbonil ve amin fonksiyonel grupları arasında oluştuğundan amid bağıdır. Bu bağın oluşumu sırasında 1 mol su ortamdan ayrılmaktadır (Şekil 2.5) [23], [24].



Şekil 2. 5 Peptit bağı oluşum mekanizması [25].

İki aminoasitin bir peptit bağıyla bağlandığı yapılara dipeptit, üç aminoasitten oluşan yapıya ise tripeptit denilmektedir. Az sayıda aminoasitten meydana gelen yapılar oligopeptitler olarak anılmaktadır. Çok sayıda aminoasitin bağlanmasıyla oluşan yapılar polipeptitler olarak adlandırılır [19].

Bir peptitte serbest α-amino grubunu ($-NH_3^+$) içeren aminoasit kalıntısı amino-terminal (veya N-terminal) kalıntı, diğer uçtaki serbest karboksil grubu içeren kalıntı ise karboksil-terminal (veya C-terminal) kalıntıdır [19].



Şekil 2. 6 Bir peptit zincirinin amino-terminal ve karboksil-terminal uçlarının gösterimi [25].

2.3 Peptit Sentezi

2.3.1 Peptit Sentezi Tarihçesi

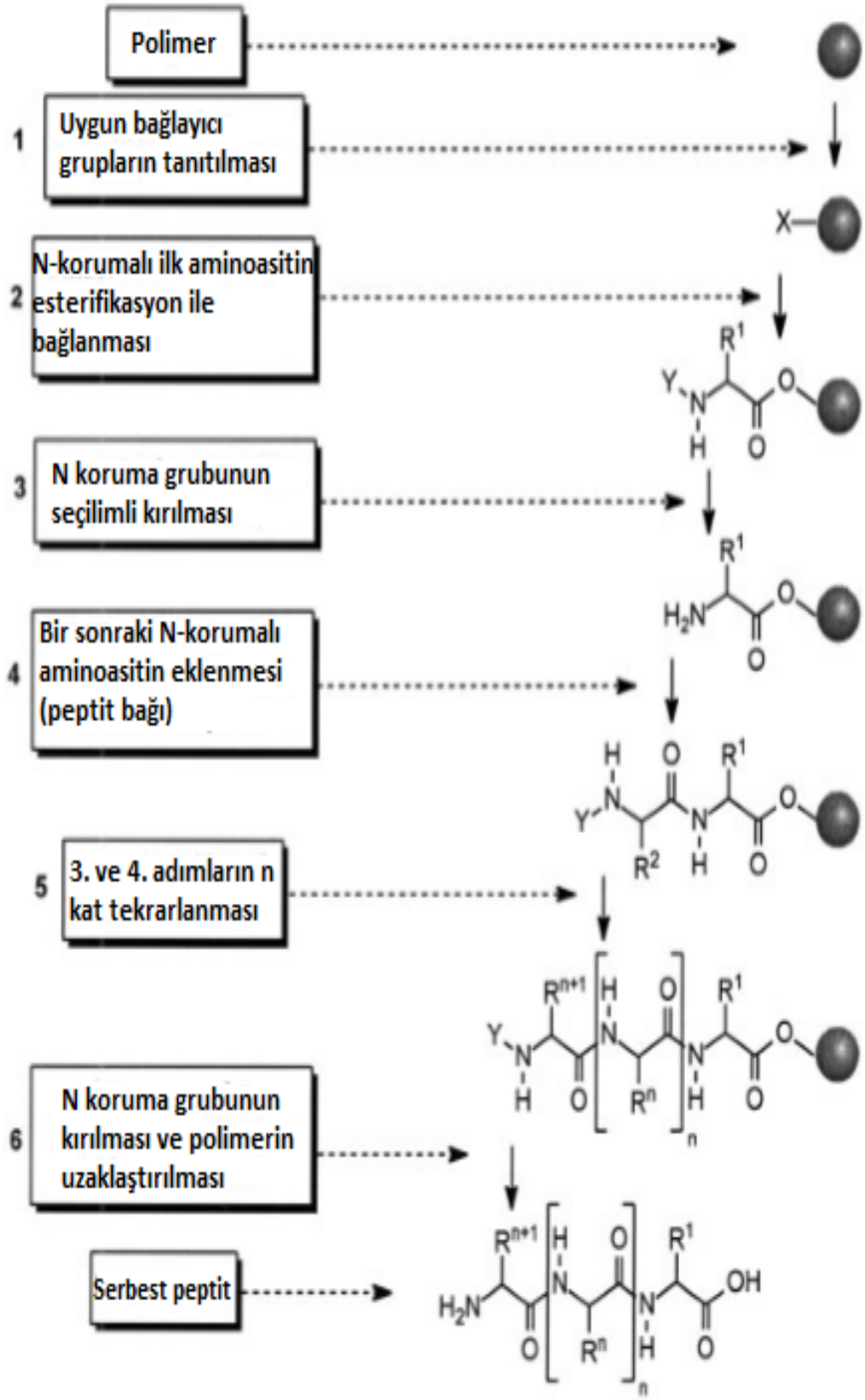
Peptitler biyolojik, tıbbi ve farmasötik araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, bu gibi poliamit yapıların sentezi yüzyılı aşkın bir süredir organik kimyanın önemli bir odağı olmuştur. İki aminoasitin ilk başarılı birleşimi asil klorürler yoluyla Emil Fischer tarafından 1903'de gerçekleştirildi, ancak o zaman daha uzun peptitlerin sentezi için uygun bir amino koruyucu grup mevcut değildi [26]. Şu anda, "peptit sentezi", küçük peptitlerden geniş proteinlere kadar değişen materyallerin hazırlanmasına olanak tanıyan çok çeşitli teknikler ve prosedürler içeriyor.

Peptit kimyasının ilk günlerinden beri, peptit sentezini içeren reaksiyonlar geleneksel olarak çözüme kavuşturulmuştur. Bu geleneksel tekniği kullanarak küçük proteinlerin sentezi de dahil olmak üzere birçok etkileyici sonuç elde edilmiştir. 1981'de 124 aminoasitten oluşan ribonükleaz A, Yajima ve Fujii tarafından kristal formda sentezlenmiş ve yüksek spesifik etkinliğe sahip oldukları gösterilmiştir [27]. Ne yazık ki, çözelti içinde gerçekleştirilen peptit sentezi oldukça yoğun bir emek isteyen yöntemdir. Bu yöntem koruma gruplarının seçiminde ve bağlanma yöntemlerinde strateji ve taktik gerektirmesinin yanı sıra çözünürlük problemlerinin çözülmesi konusunda da kapsamlı bilgi gerektirmektedir.

Ara ürünlerin saflaştırılmasına bağlı olmasına rağmen çözelti bazlı sentezin en büyük avantajı son ürünün yüksek saflıkta olmasıdır. Bu kısıtlamalara rağmen, son derece uzmanlaşmış ve deneyimli araştırma ekipleri, bu tekniği takiben birçok iddialı sentezi başarıyla tamamlamışlardır.

Katı faz peptit sentezi (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) hakkında öncü çalışmalar yapan Bruce Merrifield [28], peptit sentezi stratejisini önemli ölçüde değiştirdi ve çözelti faz senteziyle ilgili sıkıcı ve zorlayıcı saflaştırma adımlarını basitleştirdi. Merrifield, organik kimyada devrim yaratan bu eşsiz icat için 1984'te Nobel ödülüne layık görüldü. Merrifield'in katı faz peptit sentezi otomasyon geliştirmeye ve geniş kapsamlı robotik enstrümantasyona izin verdi. Bir sentez stratejisi tanımladıktan ve peptitlerin aminoasit dizilimini programladıktan sonra, makineler birden fazla peptit numunesi hazırlamak için gerekli tüm sentez aşamalarını otomatik olarak gerçekleştirebilir olarak tasarlandı. Çözelti fazı sentezi, belirli bir peptitin büyük ölçekli üretimi için halen yararlı olabilse de, katı faz peptit sentezi artık peptitlerin üretilmesi için bir yöntem haline geldi [29]. Katı Faz Peptit Sentezi (SPPS), aminoasitlerin C-terminal ucu ile çözünmeyen bir polimere tutturulan bir peptit dizisini oluşturan korunmuş aminoasitlerin art arda eklenmesiyle birleştirildiği bir süreç olarak tanımlanabilir.

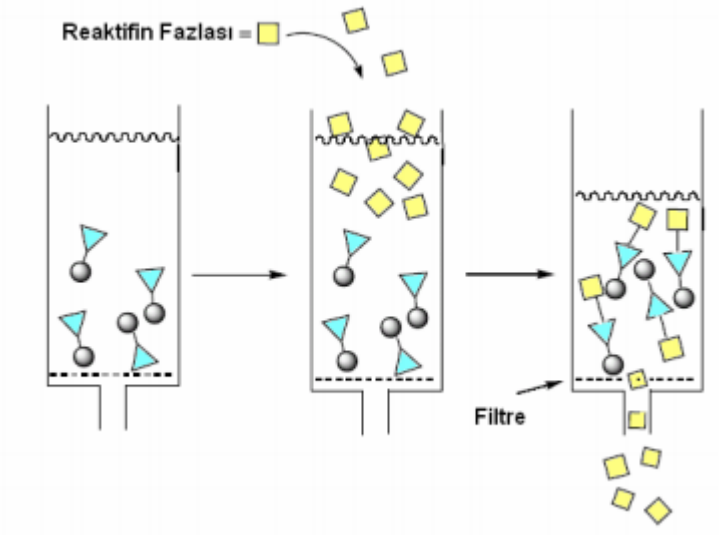
SPPS'de peptit zinciri, C-terminalden başlayarak olağan şekilde uzamaya başlar. Sentezlenecek peptitin ilk aminoasidi karboksil grubu vasıtasıyla, filtrasyon ile reaktiflerden veya çözünmüş ürünlerden kolaylıkla ayrılabilen çözünmeyen bir polimere bağlanmaktadır. Şekil 2.7’de genel prensip gösterilmiştir.



Şekil 2. 7 Katı faz peptit sentez prosesi. Y= geçici koruma grubu; R^1, R^2, R^n, R^{n+1}= aminoasit yan zincirleri [30].

Bağlayıcı grupların (linker) polimerik malzemeye tanıtılması gerekli bir ön şarttır (Adım 1). Nα koruma gruplu aminoasit daha sonra bağlayıcının işlevsel grubu ile reaksiyona sokulur (adım 2). Daha sonra, geçici koruma grubu uzaklaştırılır (adım 3) ve bir sonraki aminoasit bileşeni bağlanır (adım 4). Daha sonra gerekli peptit sekansı birleştirilene kadar adım 3 ve 4 tekrarlanır (adım 5). Son olarak, bağlayıcı parça ve peptit zinciri arasındaki kovalent bağ ayrılır. Birçok durumda, geçici yan zincir koruma grupları aynı anda çıkarılabilir (adım 6). Daha sonra, çözünmeyen polimerik destek, süzülerek çözünmüş üründen ayrılır [30].

Sentezler polimerik bir destek üzerinde yapıldığından dolayı çözelti sentezinde gerekli olduğu gibi tüm ara ürünlerin zaman alıcı izolasyon ve saflaştırılma basamakları gerekmez. Tüm reaksiyon ürünler (büyüyen peptit zincirindeki), 3-5 arasındaki basamaklarda desteğe bağlı kalır ve fazlalık reaktifler ve yan ürünler süzülerek atılır (Şekil 2.8). Basit operasyon ve otomasyon potansiyeli başlangıçta, polipeptitlerin ve proteinlerin kimyasal sentezinin katı faz konsepti ile çözüldüğünü iddia etmiştir. Merrifield sentezi, katı faz organik sentezin yanı sıra, kimyasal peptit ve protein sentezi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Polimerik bir destek üzerindeki kimyasal sentez kavramı, oligo ve polinükleotitler de dahil olmak üzere birçok diğer biyomolekülün kimyasal sentezini geliştirmiştir.



Şekil 2. 8 Peptit sentezi esnasında reaksiyona girmeyen reaktiflerin filtrasyon ile ortamdan uzaklaştırılması [31].

Başlangıçta Merrifield yöntemi üzerindeki yüksek beklentilere rağmen yöntem maalesef birkaç kısıtlamaya uğramaktadır:

- Polimer bir destek üzerinde gerçekleştirilen sentezin nihai ürünü, korumanın bozulması ve bağlanma adımlarının nicel olarak ilerlemesi durumunda, homojen bir bileşiktir.
- Aktivasyon, bağlanma ve korumanın kaldırılması sırasında istenmeyen kalıcı yan reaksiyon riski vardır.
- Reaksiyon ilerleyişinin izlenmesi, heterojen reaksiyon sistemlerinde gerçekleştirmek zordur ve deneysel hata ile engellenmektedir.
- Polimerik reçinenin şişme özellikleri ve reaktiflerin difüzyonu, katı-faz sentezinin başarısı için önemli parametrelerdir.
- Büyüyen peptit zincirinin agregasyonu sentezi zorlaştırır.
- Bazı durumlarda, peptitin polimerden ayrılması için gerekli koşullar altında nihai üründe hasar görebilir.

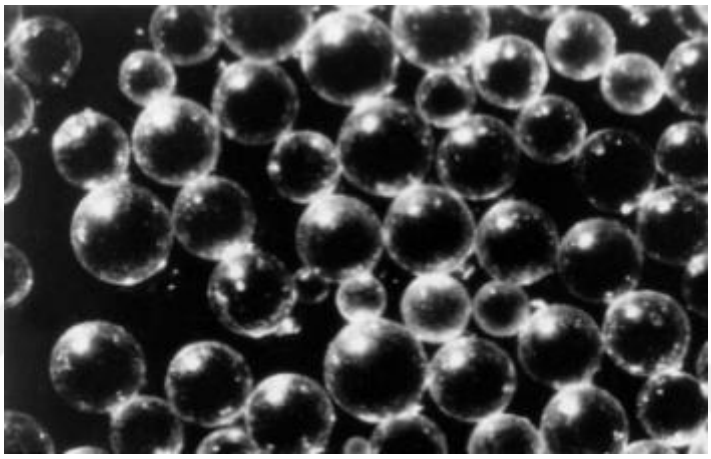
Polimerik destek üzerindeki peptitlerin ve organik moleküllerin sentezi için açıklanan tüm yöntemler Merrifield'ın getirdiği temel ilkeye dayanmasına rağmen, "Merrifield sentezi" ifadesi ağırlıklı olarak SPPS için kullanılmaktadır [30].

2.3.2 Katı Destek ve Bağlayıcı Sistemleri

Katı faz peptit sentezinde katı desteğin sahip olması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Sıvılardan hızlıca filtre edilebilecek ve kolay manipüle edilebilecek kadar fiziksel olarak sağlam, uygun bir boyut ve şekil parçacıklarından oluşmalıdır. Aynı zamanda kimyasal olarak inert olup, peptit sentezi için kullanılan kimyasallar ve çözücülerle reaksiyona girmemelidir. Ayrıca fiziksel olarak bunlardan herhangi biriyle ve peptit zincirinin kendisi ile etkileşime girmemelidir. Katı desteğin kimyasal olarak modifiye edilmesi mümkün olmalı, sentezlenecek dizinin birinci aminoasitinin bir kovalent bağ oluşumu ile kolaylıkla bağlanabileceği şekilde tasarlanmalıdır [32]. Sentezlenecek olan peptit zincirinin ilk aminoasitinin bağlanabileceği yeterli sayıda

reaktif yer içermelidir. Reçineye bağlı olan peptit zincirleri arasındaki etkileşimler minimal olmalıdır.

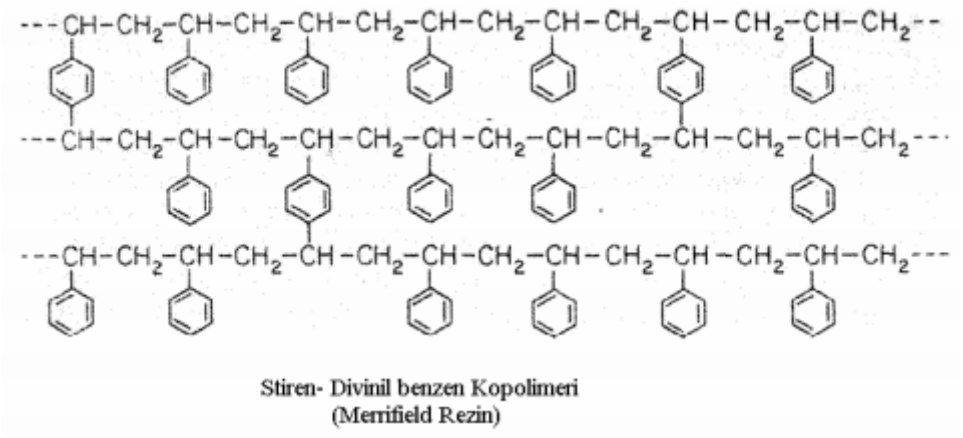
Başlangıçta, SPPS'de çapraz bağlayıcı olarak % 1-2 divinil benzen içeren bir polistiren kopolimeri kullanılmıştır. Kuru reçine küresel yapılı (Şekil 2.9), 20-80 µm çapındadır ve peptit sentezi için kullanılan farklı organik çözücüler içerisinde beş veya altı kat hacme kadar şişebilirler. Sonuç olarak, polimerik destek, statik bir katı matris olmayıp mobil polimerik zincirleri olan bir yapıdır. Böylece tüm reaktifler kolayca reaksiyon bölgelerine dağılabilmektedir. Daha düşük derecede çapraz bağlanma içeren polistiren, geliştirilmiş şişme özellikleri sayesinde üstün bir performansa sahiptir [30].



Şekil 2. 9 Polistiren / divinilbenzen çapraz bağlı reçine [30].

SPPS'de kullanılan heterojen reaksiyonlar genellikle homojen reaksiyonlardan iki veya üç kat daha yavaştır. Reaksiyon bölgeleri polimerik matrikste homojen olarak dağılmıştır. İlk aminoasit ile yüklü reçinenin optimum derecesi gram reçine başına 0,2 ila 0,5 mmol arasında değişir. Peptit/reçine maddesinin gittikçe artan kütle oranı, zincir uzamasının verimliliğini genellikle azaltmaz, ancak polar olmayan çözücülerdeki şişme davranışı önemli ölçüde azaltılır. Bu gibi durumlarda yüksek oranlarda DMF veya üre ilavesinin avantajlı olduğu rapor edilmiştir. Polar olan katı destek malzemeleri (ör., Poliamid esaslı reçineler) daha uzun peptitlerin sentezi için tavsiye edilmiştir [30].

Klasik Merrifield reçine, polimerik destek malzemeleri için uygun gerekliliklere sahiptir (Şekil 2.10). Ancak mekanik stabilite, yükleme kapasitesi, dağılma problemleri ve polimer ile peptit arasındaki çözünme farklılığı açısından optimal değildir.



Şekil 2. 10 Çapraz bağlı polimerik Merrifield reçinesi [33].

Merrifield'ın sentezlediği polimerik reçineden bu yana farklı türlerde pek çok katı destek geliştirilmiştir.

2.3.2.1 Jel Türü Reçineler

SPPS'de en çok kullanılan reçine türüdür. İnert bir polimer ağı oluştururlar ve bu ağ oldukça esnek yapılı olup büyük moleküllerin bir araya gelmesi için idealdir. Bu tipteki reçineler jelin içerisinde büyüyen molekülleri taşıyabilmek için çözücüyü absorbe ederek şişerler.

Jel reçineler 4 başlık altında toplanır:

- **Polistiren Reçineler (PS):** Stiren moleküllerinin % 1 ya da % 2'lik divinilbenzen (DVB) molekülleriyle çapraz bağ yapması sonucu oluşan polistiren reçineler hidrofobik özelliktedir.

- **Poliakrilamid Reçineler:** Poli-N,N-dimetilakrilamid, bis-N,N'-açiloiletilendiamin ve N-akrioilsarkosin metil esterinin çapraz bağlanmasıyla oluşan poliakrilamid reçineler polistirene alternatif olarak kullanılan hidrofobik katı destektirler.

- **Polietilen Glikol (PEG)- Aşı (Grafted) Reçineler:** PEG-PS polistiren partikülleri üzerinde aşı polimerizasyonu yoluyla geliştirilmiştir. PEG-PS reçineler mekanik olarak oldukça kararlıdır.

- **PEG Bazlı Reçineler:** PEG bazlı reçineler, PEG-Polipropilen glikol (PPG) ağıyla veya az miktardaki polistirenin PEG ile kombinasyonu sonucu oluşturulur [25].

2.3.2.2 Yüzey Türü Reçineler

Yüzeyin fonksiyonelleştirilmesinde, polietilen, selüloz fiberler, gözenekli çapraz bağlı polistiren veya polimetakrilat ve silika gibi farklı materyallerden oluşturulanlar kullanılabilirler [25].

2.3.2.3 Kompozitler ve Desteklenmiş Jeller

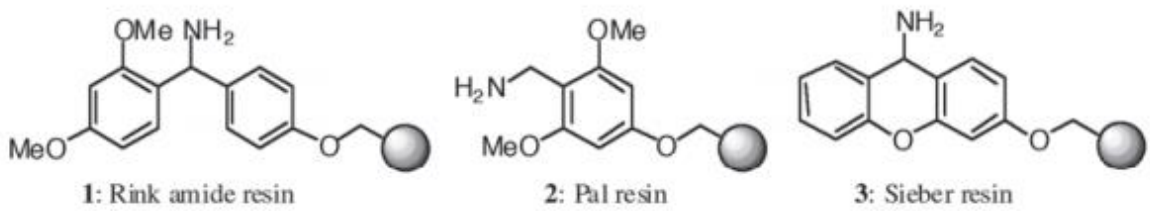
Jel türü reçinelerin rijit matriksler ile desteklenmesi yoluyla polimerik desteğin mekanik kararlılığı artırılabilir [25].

2.3.2.4 Brush Polimerler

Polietilen bir film veya tüp üzerine polistiren konjuge edilir. Polimer zincirlerinin rijit film üzerinde uzamasıyla fonksiyonelleşme sağlanır. Bu fonksiyonel gruplar daha sonra arabağlayıcılar (linker) ile modifiye edilebilmektedir [34].

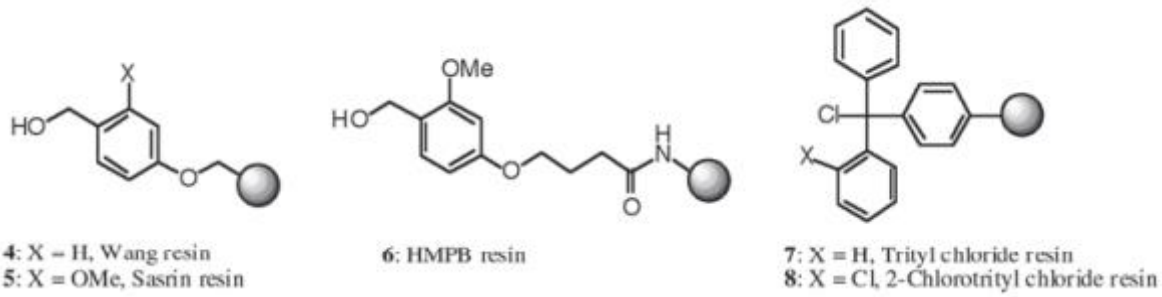
SPPS'nin ilk basamağı, N-korumalı C terminal aminoasit kalıntısının, hedef peptitin C-terminal işlevsel grubuna (sırasıyla asit veya amit) bağlı olarak bir ester veya bir amid bağı yoluyla katı desteğe tutturulmasıdır. Bağlayıcıların çoğu ticari olarak farklı matrislere sabitlenmiştir.

C-terminal peptit amidlerinin sentezi için yaygın olarak kullanılan reçineler Şekil 2.11'de gösterilmiştir [35], [36], [37]. Bu reçineler Fmoc kimyası ve son TFA bölünmesi ile uyumludur. Bu reçineler genellikle Fmoc korumalı olarak sağlanır ve ilk aminoasitin katılmadan önce korumasının kaldırılması gerekir.



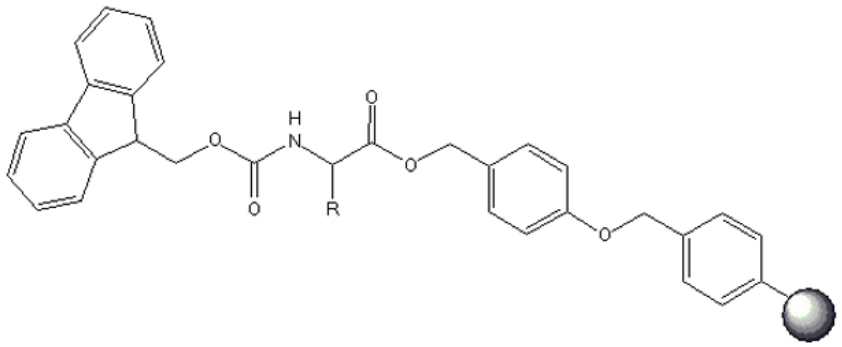
Şekil 2. 11 Peptit amid sentezi için reçineler [38].

C-terminal peptit asit sentezi için Fmoc/tBu stratejisinde yaygın olarak kullanılan reçineler Şekil 2.12'de gösterilmektedir [39], [40], [41].



Şekil 2. 12 Peptit asit sentezi için reçineler [38].

Reçineler ticari olarak yüklenmiş veya yüklenmemiş olarak temin edilebilmektedir. Reçine üzerinde sentezlenecek peptitin ilk aminoasidinin bağlı olması durumunda reçine yüklenmiş reçinedir. Yüklenmiş reçine kullanmak yüklenmemiş reçinelere göre daha avantajlıdır. Yüklenmiş reçineler sentezlenecek peptitin ilk aminoasidini bağlı halde bulundurmakta ve bu aminoasidi SPPS'de eklemek mümkün olmamaktadır [42].



Şekil 2. 13 Fmoc koruma gruplu Ala aminoasiti ile yüklenmiş Wang reçinesi [22].

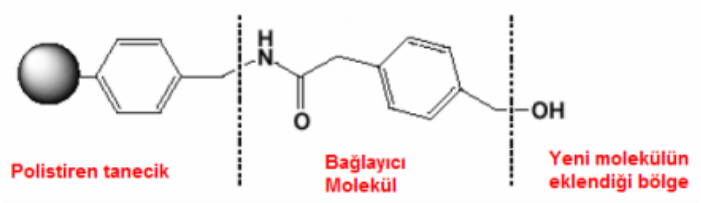
Yüklü reçineler kendi aralarında az yüklü (Lower Loaded) ve çok yüklü (Higher Loaded) olarak ikiye ayrılırlar. Az yüklü reçine kullanmak peptit uzaması sırasında oluşabilecek aggregasyonları engellemesi ve bundan dolayı eksik aminoasit eklenmesi durumunun oluşmaması yönüyle daha avantajlıdır.

2.3.3 Bağlayıcı (Linker/Handle) Moleküller

SPPS yönteminde kullanılan bağlayıcı moleküller sentezlenecek peptit molekülü ile reçine arasında bağlantı kurulmasını sağlamakla görevlidir [43].

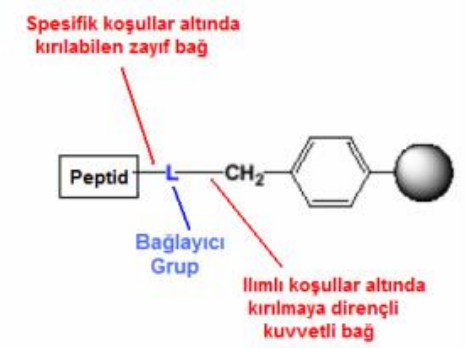
Ticari olarak temin edilen bu reçineler; sadece bağlayıcının katı desteğe bağlı olduğu veya sentezi yapılacak dizinin ilk aminoasidinin bu bağlayıcılar aracılığıyla katı desteğe bağlı olduğu şekilde üretilmektedir.

Aminoasit kalıntısının C-terminal ucundan reçineye bağlanması reçinenin fonksiyonelliği veya bağlayıcının yardımıyla gerçekleşir. Bağlayıcı molekülün verimli prosedürünün olması, ilk aminoasidin eklenmesi sırasında rasemizasyona yol açmaması ve kırma şartları hedef molekülün sentezlenmesi için uygun reçinenin seçilmesinde önemlidir.



Şekil 2. 14 Reçineye bağlı fonksiyonel grup taşıyan bağlayıcı molekül [25].

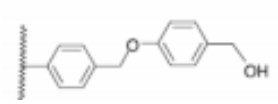
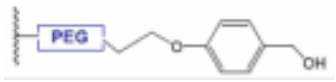
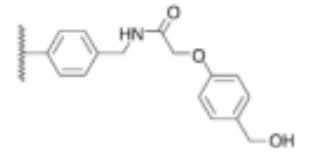
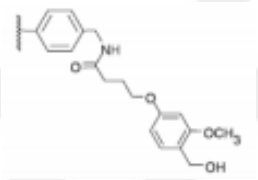
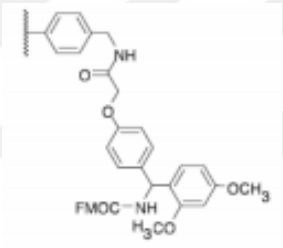
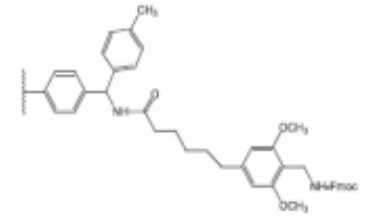
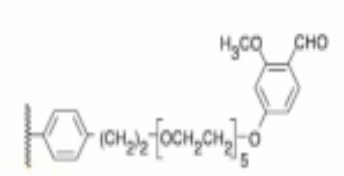
Peptitin reçineye bağlanması esnasında bağlayıcının sentez koşullarına dayanıklı olmalıdır. Sentez sonunda peptitin reçineden ayrılabilmesi için kolaylık sağlamalıdır [43].



Şekil 2. 15 Bağlayıcının reçineden ayrılması [25].

Çizelge 2.6'da Fmoc kimyasına dayalı katı faz peptit sentezi için kullanılan reçineler gösterilmiştir.

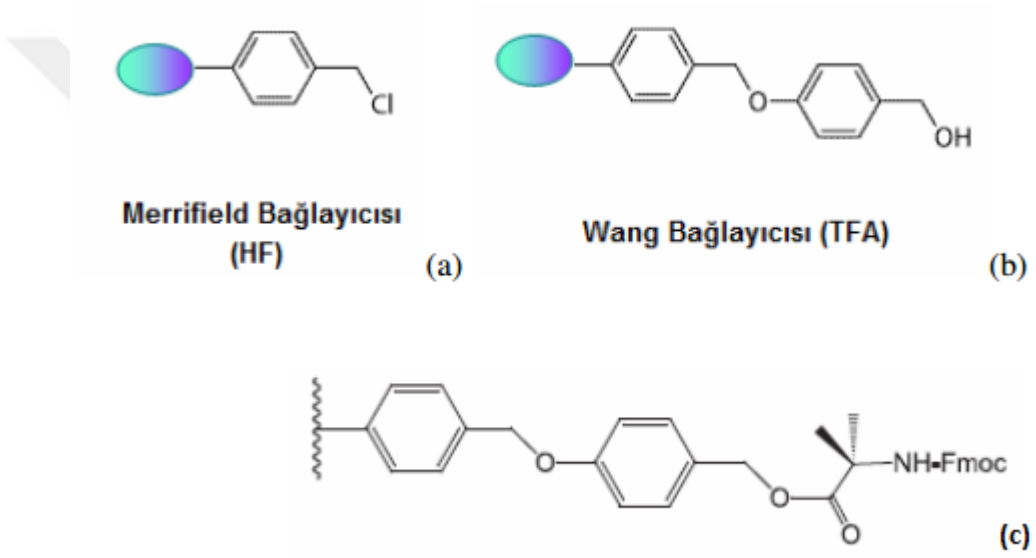
Çizelge 2. 6 Peptitin reçineye bağlanması için kullanılan bağlayıcı çeşitleri [25].

Ara bağlayıcı moleküller	**Yapı**	**Son ürün**	**Kırma koşulları**
Wang		Peptit asitleri	TFA (Tutucuları)
PHB		Peptit asitleri	TFA (Tutucuları)
HMPA		Peptit asitleri	TFA (Tutucuları)
HMPB		Korunmuş peptit asitleri	Seyreltik TFA (%1-5)
Rink Amid (RAM)		Peptit Karboksiamitler	TFA (Tutucuları)
PAL		Peptit karboksiamitler	TFA (Tutucuları)
FMP		Peptit Amidleri Peptit Asitleri	TFA (Tutucuları)

2.3.3.1 Wang Bağlayıcı İçeren Reçineler

1973 yılında S. Wang, Merrifield reçinesini 4-fenoksibenzilalkol ile modifiye etmiş ve Wang reçinesini geliştirmiştir.

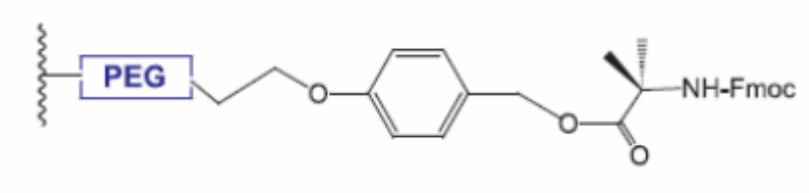
4-hidroksimetilfenoksiasetik asid Wang olarak adlanırılır. Bu bağlayıcı moleküllerin kullanıldığı reçineler, Fmoc/t-Bu koruma metodunda %95'lik TFA yardımıyla kolay bir şekilde kırılır ve sentez sonunda peptit asitleri oluşur. Fmoc korumalı aminoasitler Wang bağlayıcı molekülü sayesinde epimerizasyon en aza indirilerek reçineye bağlanırlar. Wang reçineler, polistirenin %1'lik DVB ile çapraz bağlanması yoluyla oluşur [25].



Şekil 2. 16 (a) İlk peptit sentezi çalışmalarında kullanılan Merrifield bağlayıcı molekülü (b) Wang bağlayıcı molekülü (c) Sentezlenecek peptit dizisinin ilk aminoasidinin bağlı olduğu Wand reçinesi [25].

2.3.3.2 PHB Bağlayıcı İçeren Reçineler

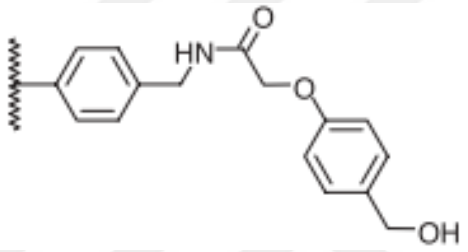
PHB bağlayıcısı (p-hidroksibenzil alkol), Fmoc/tBu koruma metodunda peptit asitlerini oluşturur. Asit ile muamele edildiğinde peptit molekülü reçineden kolayca ayrılır. Bu ayrılma işlemi için %95'lik TFA kullanılabilir. PHB bağlayıcı içeren reçineler PEG'in polistiren taneciklerine çağraz bağlar ile bağlanması sonucu oluşur.



Şekil 2. 17 PHB bağlayıcı molekülü içeren reçine [25].

2.3.3.3 HMPA ((4-hidroksimetil)fenoksi asetik asid) Bağlayıcı İçeren Reçineler

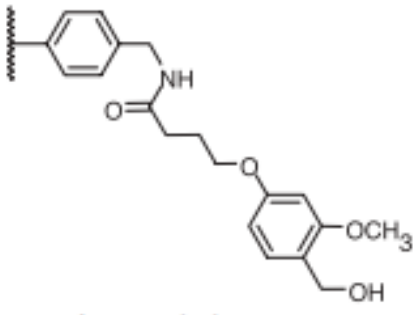
HMPA içeren reçineler peptit sentezi sonunda peptit molekülünden %95'lik TFA ile kolayca ayrılabilirler. HMPA ile aminometil polistiren arasında amid bağı oluşmasıyla geliştirilmiştir.



Şekil 2. 18 HMPA bağlayıcı molekülü içeren reçine [44].

2.3.3.4 HMPB ((4-hidroksimetil)fenoksi) butanoik asid) Bağlayıcı İçeren Reçineler

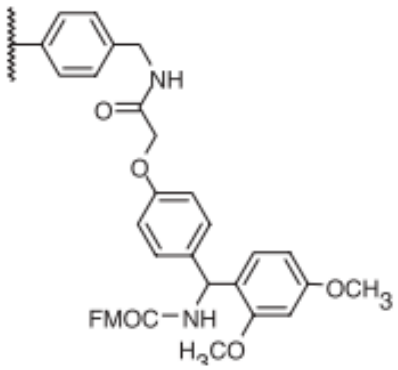
HMPB bağlayıcı molekülü içeren reçineler korunmuş peptit asitlerinin oluşmasında kullanılır. Diklorometan (DCM) içerisinde hazırlanan %1'lik TFA ile peptit ve reçine kolayca birbirinden ayrılır.



Şekil 2. 19 HMPB bağlayıcı molekülü içeren reçine [44].

2.3.3.5 Rink Amide (RAM) Bağlayıcı İçeren Reçineler

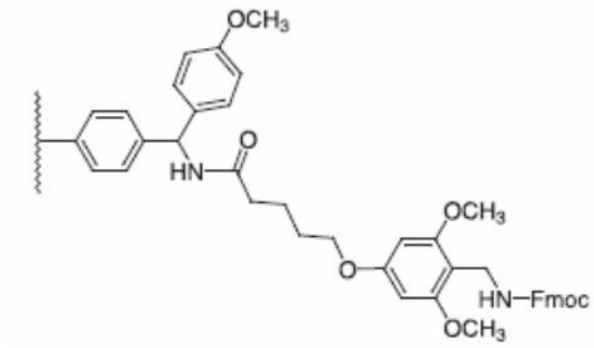
Fmoc metodunda SPPS yöntemiyle sentezlenen peptitlerin karboksil uçlarının peptit amid olmasını sağlayan reçineler bu bağlayıcı molekülünü taşırlar. Sentez sonunda peptit ile reçine arasındaki bağı kırmak için TFA kullanılır [44].



Şekil 2. 20 RAM bağlayıcı molekülü içeren reçine [44].

2.3.3.6 PAL (Peptide Amide Linker) Bağlayıcı İçeren Reçineler

PAL bağlayıcı molekülü içeren reçineler peptit karboksi amidlerin sentezi için kullanılmaktadır. PAL bağlayıcı moleküllerin amino ucu bir Fmoc koruma grubuyla bağlıdır. Sentezin ilk basamağında bu koruma grubu kaldırılır ve ilk aminoasidin bağlanması gerçekleşir. Sentezlenen peptit molekülünün reçineden ayrılabilmesi için %95 TFA kullanılır [44].



Şekil 2. 21 PAL bağlayıcı molekülü içeren reçine [44].

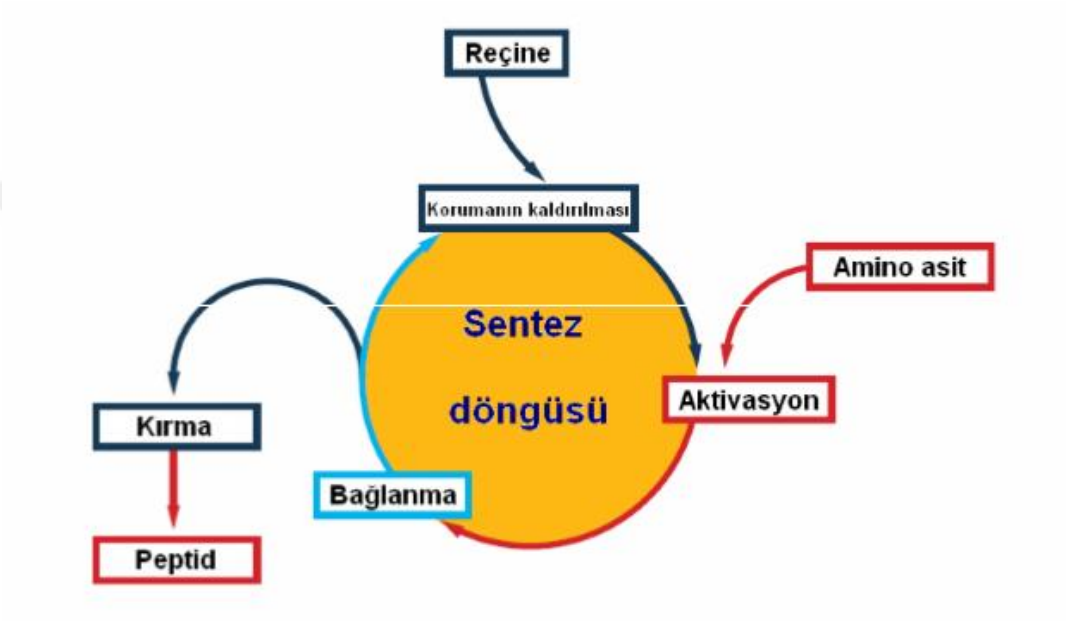
Katı halde peptit sentezi 3 temel aşamadan meydana gelir.

1.Korumanın kaldırılması (Deprotection)

2.Karboksil grubunun aktive edilmesi (Activation)

3.Peptit bağının oluşması (Coupling)

Bu aşamalar istenilen peptit dizisi tamamlanana kadar bir döngü halinde tekrarlanarak devam eder.



Şekil 2. 22 Peptit sentez döngüsü [22].

2.3.4 Koruma Grupları

Peptit sentezinde en kritik adımlardan biri de, bağlanmış olan aminoasidin amino grubunun bağlanmamış olan aminoasit aktivasyonuna kadar korunmuş olmasıdır. Amino grubunun korunması terimi bu amino grubunun nükleofilik özelliğinin açil türevine dönüştürülmesi anlamına gelir [45].

İki aminoasit molekülü peptit bağıyla bağlanırken aminoasitlerin sahip oldukları fonksiyonel grupların (amino, karboksil ve yan zincirdeki gruplar) reaktivitelerinin reaksiyona girmemeleri için baskılanmış olması gerekmektedir. Bu baskılama, reaktif gruplara ortamdan daha sonra kolaylıkla ayrılabilecek olan bir bileşiğin bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu bileşikler koruma gruplarıdır (Protecting Group) [46]. İki aminoasitin

birleşmesi sırasında, bir aminoasitin amino grubunun diğer aminoasitin karboksil grubuyla birleşme reaksiyonuna girmesi bu koruma grupları aracılığıyla engellenir.

Koruma grupları dikkatli seçilmelidir. Aminoasitlerin bağlanma basamağına gelmeden önce kolaylıkla reaktif gruptan ayrılabilir özellikte olmalıdır. Bunun yanında koruma gruplarının ayrılması için gereken koşullar peptit bağını etkilememelidir [45].

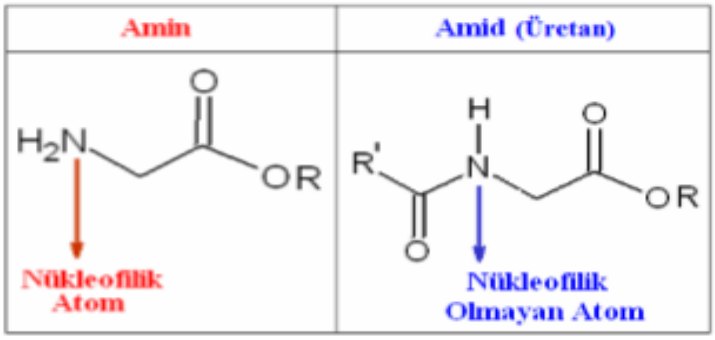
Koruma grupları peptit sentezinin gerçekleştiği esnadaki koşullarda kimyasal yönden kararlı bir yapıya sahip olmalıdır. Aynı zamanda sentez reaksiyonunun sonunda veya ara basamaklarda sentez koşulları altında kolayca uzaklaştırılabilmelidir.

Sentezlenmesi amaçlanan peptit dizisinin tamamlanmasına kadar yapıda bulunan koruma grupları "Kalıcı (permanent) gruplar" olarak adlandırılır ve yan zincirlerin korunmasında kullanılır. Sentez esnasında ara ürün basamaklarında yapıdan ayrılan koruma grupları ise "Geçici (Temporary) gruplar" olarak adlandırılır ve α-amino gruplarının korunmasında kullanılır [42].

2.3.4.1 α- Amino Koruma Grupları

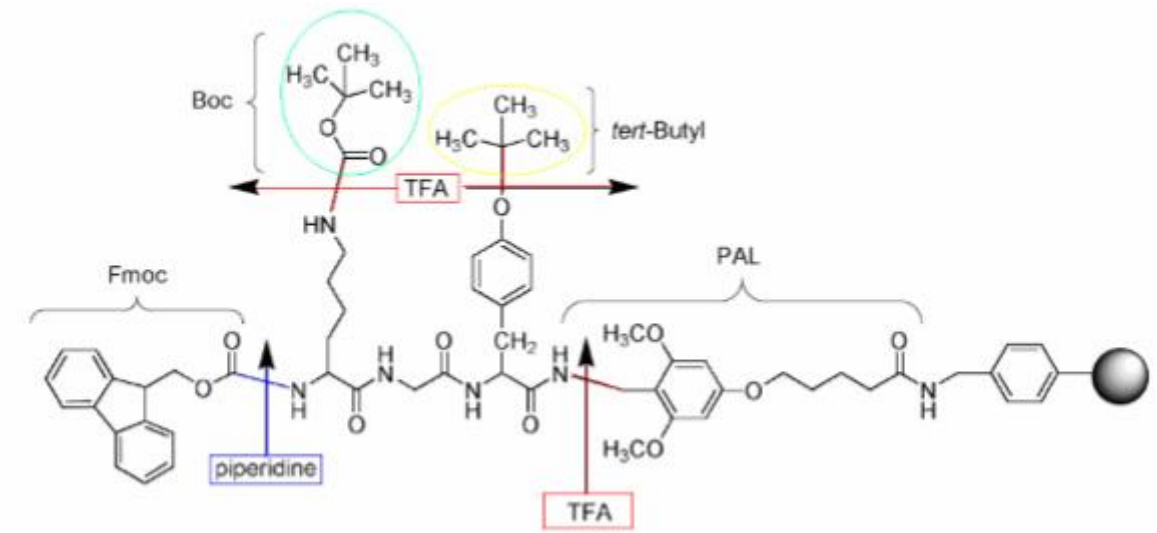
Katı faz peptit sentezinin en önemli koşullarından biri de, aminoasitlerin α-amino gruplarını bir sonraki aminoasit bağlanması gerçekleşene kadar, geçici koruma gruplarının uygun olarak seçilmesidir. Bu geçici koruma grubu oldukça önemlidir, çünkü aminoasitlerin α-amino grupları nükleofil gibi davranarak ortamdaki başka bir karboksil grubuyla istenmeyen şekilde reaksiyona girebilir.

Amid grubuna ait azot atomu, amin grubundaki azot atomuna kıyasla daha az nükleofilik özellik gösterir. Bundan yola çıkarak, amid türevleri (üretanlar ve karbamatlar) koruma grubu olarak kullanıma uygundur. Böylece amid grubundaki azot atomu nükleofil gibi davranmayıp reaktivite göstermeyecek ve ortamdaki karboksil gruplarıyla istenmeyen reaksiyonlara girmeyecektir.



Şekil 2. 23 Nükleofilik karakter taşıyan ve nükleofilik karakter taşımayan azot atomları [25].

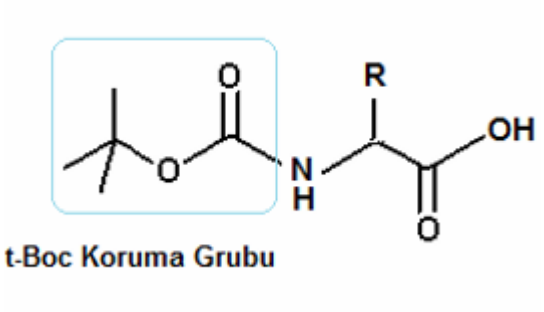
Peptit sentezinin ilk zamanlarında, sahip olduğu azot atomunun peptit sentezi koşullarında inert olmasından dolayı üretan koruma gruplarının amino grubunu korumada kullanımının uygun olabileceği düşünülmüştür. 1932 yılında Bergmann ve Zervas tarafından geliştirilen üretan koruma gruplarından bu yana çok çeşitli α-amino koruma grupları geliştirilmiştir. Tert-bütiloksi karbonil (t-Boc) koruma grubu asidle kırılabilen üretanların en önemlilerindendir. Bazla kırılabilen Fmoc koruma grubunun geliştirilip t-Boc koruma grubu ile birlikte kullanılması ortogonal stratejinin temelini oluşturmuştur [34].



Şekil 2. 24 SPPS'de Boc/Fmoc koruma grubu stratejisi [31].

2.3.4.2 Tersiyer-Butiloksi Karbonil (t-Boc) Koruma Grubu

t-Boc koruma grubu, Carpino tarafından geliştirilen üretan türündeki bir koruma grubudur [47]. Yapıda yer alan tert-butil grubundan dolayı az reaktif bir moleküldür. Asit ortamında karbonil grubu protonlanarak ayrılabilir. t-Boc koruma grupları nükleofilik özellik göstermez ancak aside karşı hassas olup $(CH_3)3C^+$ grubunu kaybeder. Tert-Butiloksikarbonil (t-Boc) koruma grubu diklorometan (DCM) içindeki %50'lik Trifloroaseteik asid (TFA) ile yapıdan kolayca ayrılabilir [33].



Şekil 2. 25 t-Boc koruma grubu tarafından korunan bir aminoasidin yapısı [25].

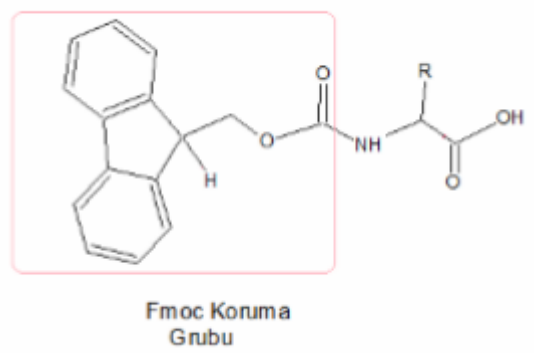
Fmoc koruma grubunun geliştirilmesiyle ortaya çıkan ortogonal koruma stratejisinden sonra t-Boc koruma grubu yan zincir koruma grubu olarak kullanılmaya başlanmıştır.

2.3.4.3 Fmoc Koruma Grubu

1972'de Carpino ve arkadaşları tarafından geliştirilen Fmoc koruma grubu aminoasitlerin alifatik ve aromatik amin gruplarını korumada kullanılan koruma grubudur [48].

Fmoc koruma grubu organik bir baz olan piperidin ile kolaylıkla kırılabilir. Fmoc koruma grubunun güçlü bir UV absorbsiyonunun olması dolayısıyla bu grubun kullanıldığı peptit sentezlerinin analitik yöntemlerle kontrolü açısından önem taşımaktadır [49].

Fmoc koruma grubuna ait floren halka sistemindeki beta karbonun hidrojen atomu asidik yapıdadır. Bu nedenle bu grup zayıf bir bazla kolaylıkla kırılabilir [47].



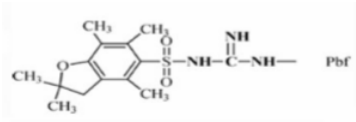
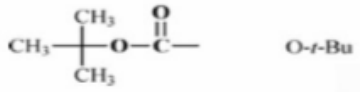
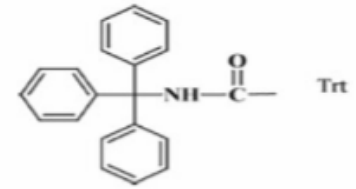
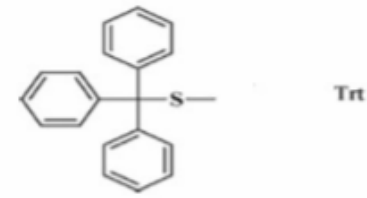
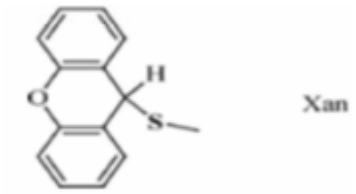
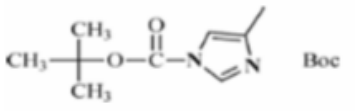
Şekil 2. 26 Fmoc koruma grubu tarafından korunan bir aminoasitin yapısı [25].

Fmoc koruma grubu DMF veya NMP içindeki %20-50'lik piperidin ile yapıdan uzaklaştırılabilir [50].

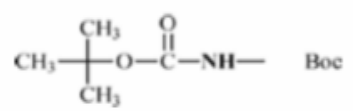
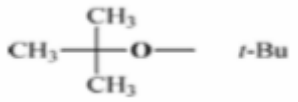
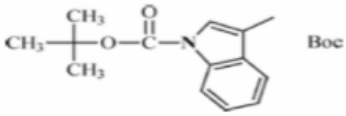
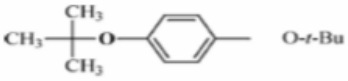
2.3.4.4 Yan Zincir Koruma Grupları

Katı faz peptit sentezinde zorlayıcı kısımlardan biri de, lizin, glutamik asit ve sistein gibi yan zincirlerinde fonksiyonel grup bulunduran aminoasitlerin yan zincirlerinde oluşacak reaksiyonların engellenmesidir. Yan zincir reaksiyonlarını engellemek için, "yan zincir koruma grupları" kullanılmaktadır. Yan zincir koruma grupları, bağlanma ve kırma koşulları altında kararlı bir halde bulunmalıdır. Ancak sentezlenen peptitin katı fazdan ayrılması sırasında gerekli olan koşullarda peptitden kolaylıkla ayrılabilir olmalıdır [31]. Yan zincir koruma gruplarından t-bütil eterleri Ser, Thr ve Tyr aminoasitleri için, t-bütil esterleri Asp ve Glu aminoasitleri için ve t-Boc koruma grubu ise His ve Lys aminoasitleri için kullanılırlar [51].

Çizelge 2. 7 Bazı yan zincir koruma grupları [31]

Aminoasit ve koruma grubu	Kısaltma	Kararlı olduğu koşullar	Kimyasal yapısı
Arjinin 2,2,4,6,7-Pentametildihidro benzofuran-5-sülfonil	Arg (Pbf)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Aspartamik/ **Glutamik asit** t-Bütil	Asp/Glu(O-t-Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Asparajin/Glutamin Trifenilmetil	Asn/Gln(Trt)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Sistein Trifenilmetil 9-Ksantenil	Cys(Trt) Cys(Xan)	Piperidin Pd(0) Hidrazin Piperidin Pd(0) Hidrazin	 
Histidin t-Bütiloksikarbonil	His(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	

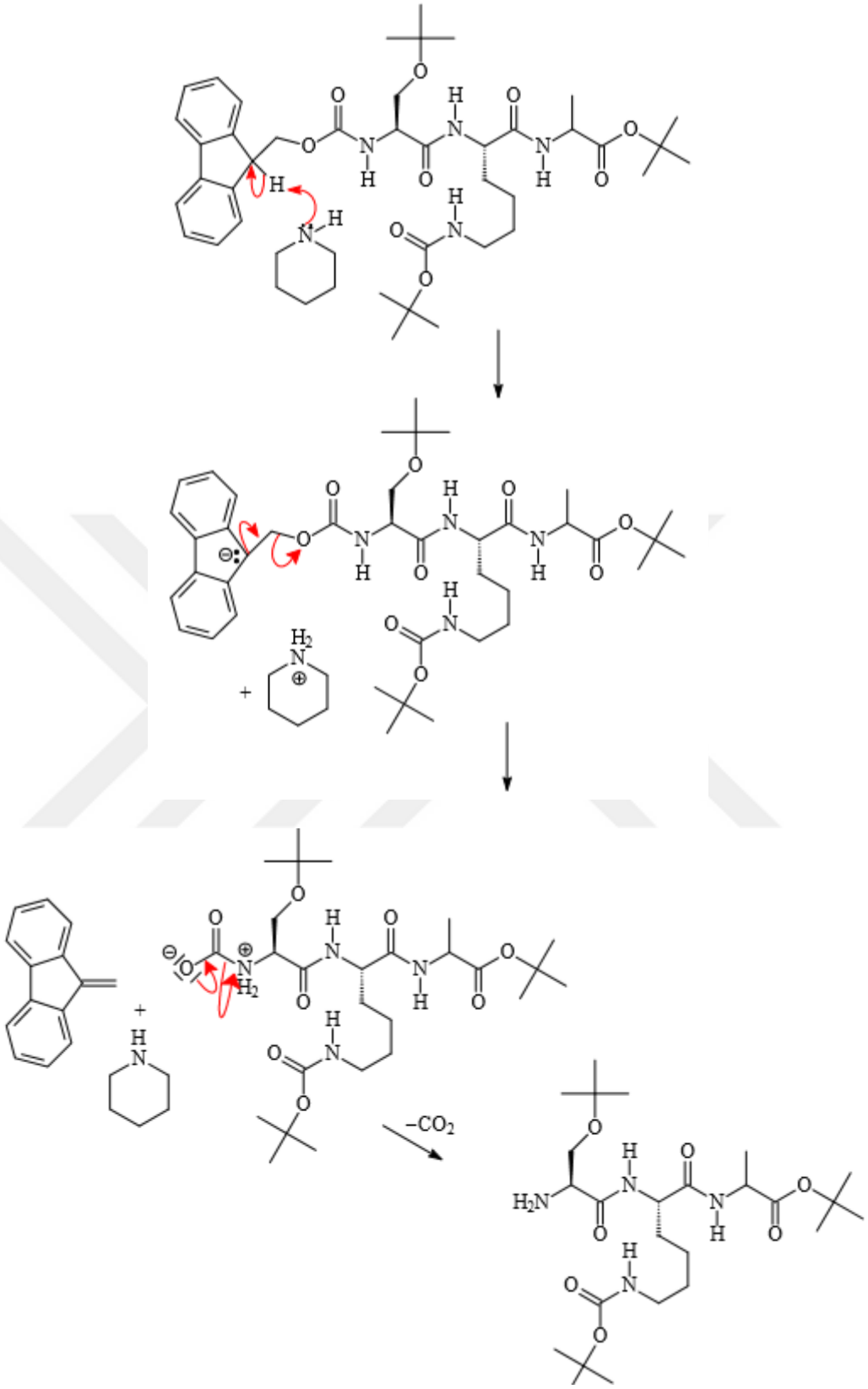
Çizelge 2.7 Bazı yan zincir koruma grupları (devamı)

Lizin t-Bütiloksikarbonil	Lys(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Serin/Treonin t-Bütil	Ser/ Thr(t-Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Triptofan t-Bütiloksikarbonil	Trp(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Tirozin t-Bütil	Tyr(t-Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	

2.3.5 Koruma Gruplarının Kaldırılması (Deprotection)

N-α grubunun korumasının kaldırılması SPPS'de ilk adımdır ve oldukça önem taşımaktadır. Katı desteğe bağlı halde olan sentezlenecek dizinin ilk aminoasidinin α-amino grubu korunmuş durumdadır. Senteze başlamadan önce bu koruma grubunun kırılırken yan zincir koruma gruplarına zara vermeden uzaklaştırılması gerekmektedir.

Peptit sentezinde zincir uzaması için N-ucundaki korumanın kaldırıldığı esnada yan zincirlerin fonksiyonel gruplarındaki korumanın kararlı halde tutulması gerekmektedir. α-amino grubu Fmoc koruma grubu ile korunduğunda, yan zincir koruma grupları için t-Boc koruma grubu kullanılır. Fmoc koruma grubu piperidin gibi organik bir bazla kırılabilirken, t-Boc koruma grubunun yan zincirlerden ayrılabilmesi için asit yardımı gerekmektedir. Bu metoda "Fmoc/t-Boc Ortogonal Koruma Stratejisi" denilmektedir [52].



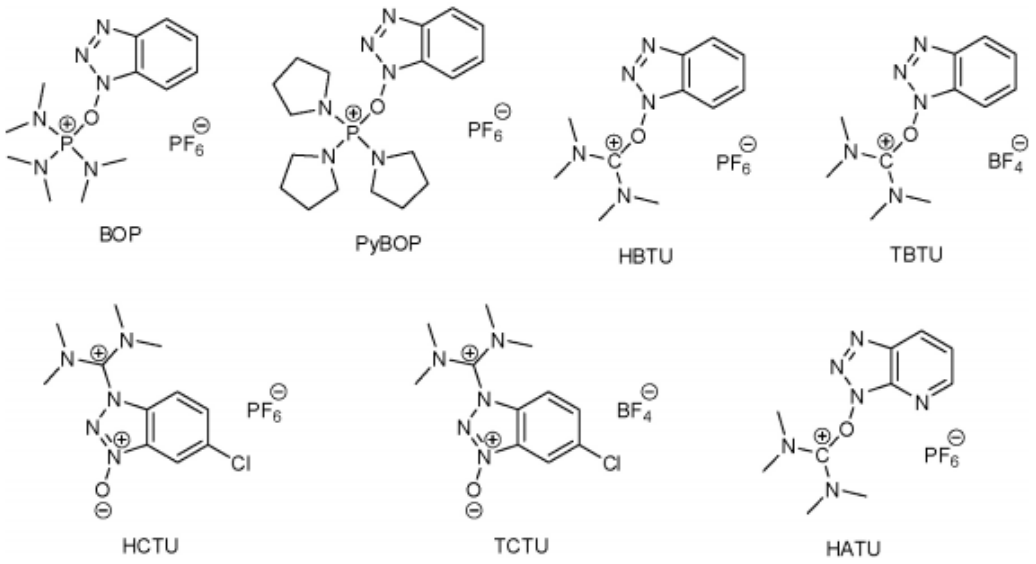
Şekil 2. 27 Fmoc gubunun piperidinle eliminasyon mekanizması [22].

Şekil 2.27'de sırasıyla serin, lizin ve glisin aminoasitlerinden oluşan dizinin N- ucundan Fmoc koruma grubunun uzaklaştırılması gösterilmiştir [22].

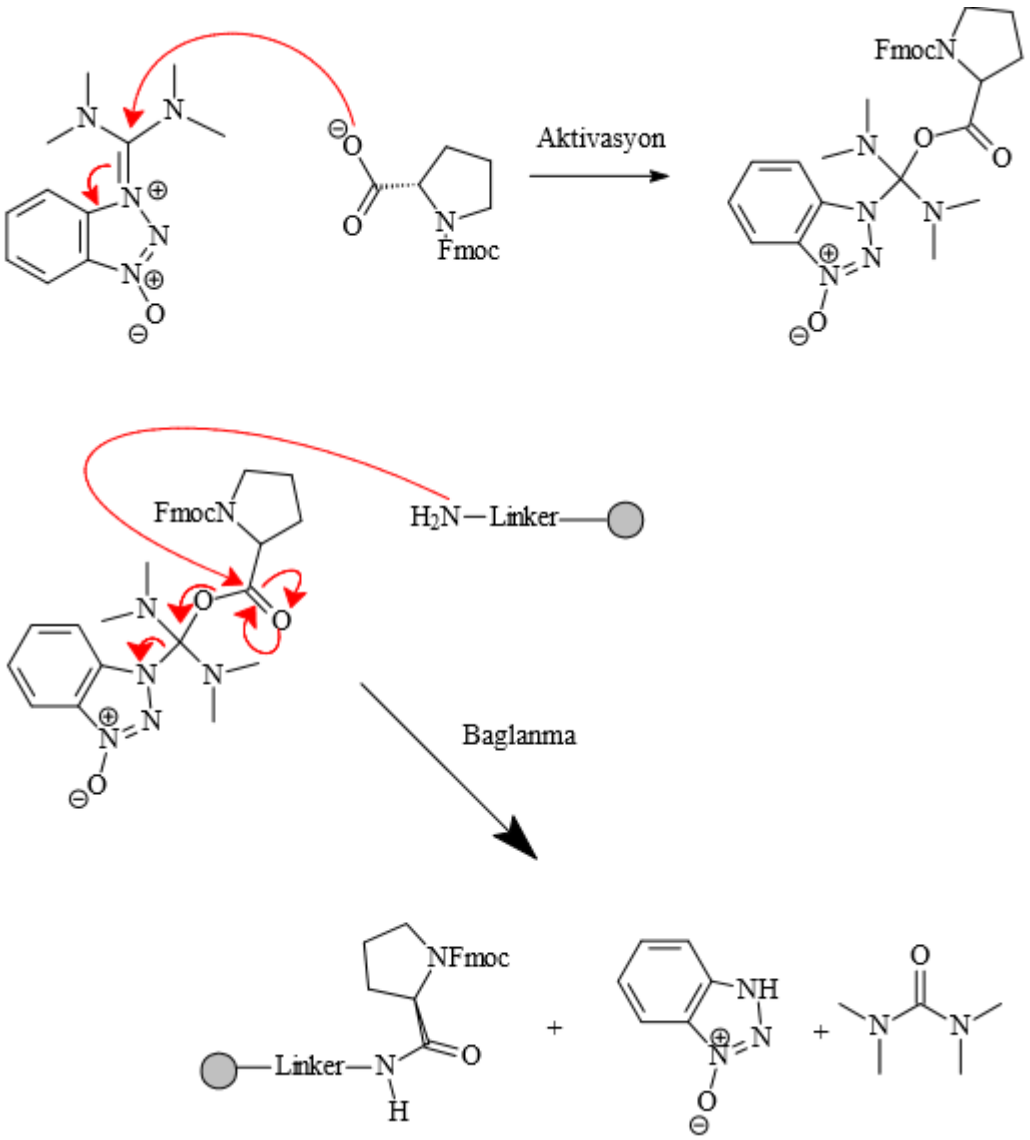
2.3.6 Karboksil Gruplarının Aktivasyonu ve Bağlama Reaktifleri (Coupling Reagents)

İki aminoasit kalıntısının bir peptit bağı oluşturmak üzere bir araya geldiği duruma "Bağlanma (Coupling)" denir. Bağlanma esnasında bir aminoasit kalıntısının amino grubunun karboksil grubu içeren diğer aminoasit kalıntısına nükleofilik atağı yoluyla gerçekleşir. Bu reaksiyon, bir bağlanma reaktifi (coupling agents) yardımıyla esterleşme reaksiyonu ile gerçekleşir [53].

Aminoasit kalıntılarının karboksil grubu çok reaktif değildir. Aminoasitlerin birleşerek peptit bağını oluşturabilmeleri için karboksil grubun aktifleştirilmesi gerekmektedir. Karboksil grubu aktivasyonunda C-ucundaki karboksil grubun sahip olduğu –OH ya da –O grubunun kolay kırılabilir bir gruba dönüştürülmesi gerekmektedir [45].



Şekil 2. 28 Karboksil grubunun aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan reaktifler [54].



Şekil 2. 29 Peptit sentezinin aktivasyon ve bağlanma aşamalarının mekanizması [22].

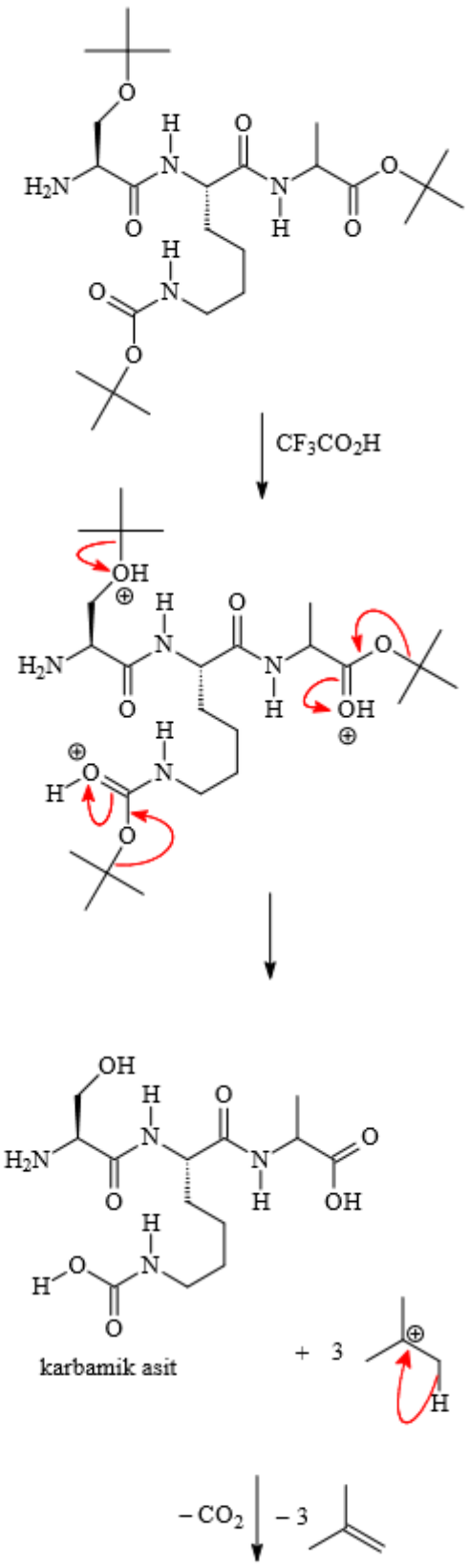
Şekl 2.29'da HBTU aktivatörü aracılığıyla yapılan aktivasyon ve bağlanma mekanizması gösterilmektedir. Karbonil grubu aktivasyonu karbodiimidler aracılığıyla yapılabildiği gibi Uronyum ve Fosfonyum gibi yeni geliştirilen aktivatörlerle de yapılabilmektedir. Bu aktivatörler rasemizasyona daha az yol açtıklarından dolayı daha fazla tercih edilebilmektedir [55].

2.3.7 Kırma (Cleavage) İşlemi

Peptit sentezi sonunda, sentezlenen peptitin saf olarak elde edilebilmesi peptitin reçineden ayrılmasının yanı sıra yan zincir koruma gruplarının da yapıdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemler için "Kırma (Cleavage)" basamağına geçilir.

Peptitin reçineden ayrılabilmesi için TFA içeriği yüksek olan bir kırma kokteyli hazırlanır. Bu kokteyl ile muamele edilen peptit-reçine bileşiminden peptitin ayrılması sağlanır.

Peptit zincirinin uzunluğu, aminoasitlerin dizilimi, yan zincirlerde bulunan koruma grupları ve reçineye bağlanmanın gerçekleşmesi için kullanılan bağlayıcı (linker) moleküllerin yapısı optimum kırma koşullarını etkilemektedir [48].

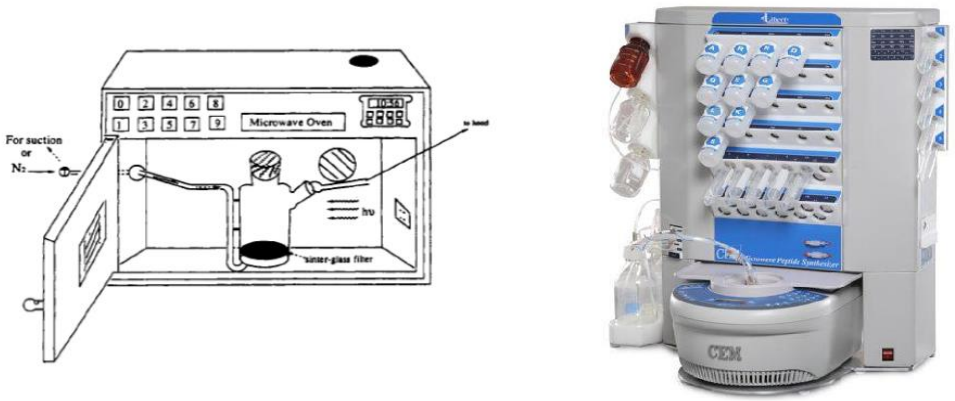


Şekil 2. 30 Peptit sentezinde yan zincir koruma gruplarının TFA ile eliminasyonunun mekanizması [22].

Şekil 2.30'da TFA ile kırma "cleavage" işlemi sonrasında peptitin reçineden ayrıldığı gösterilmiştir. Karbamik asitten bir mol CO_2 ayrılır ve peptit molekülü reçineden ayrılır. Reaksiyon karbokatyon üzerinden yürür [56].

2.3.8 Mikrodalganın Kullanımı

1986 yılında R. Gedye ve R. J. Majetich organik kimyada ilk kez mikrodalga teknolojisini kullanmışlardır. Mikrodalga teknolojisi sayesinde reaksiyonların, kullanılan geleneksel ısıtma yöntemine göre çok daha hızlı ilerlediği görülmüştür. Peptit sentezinde mikrodalga teknolojisinin kullanımı ilk kez 1992 yılında gerçekleşmiştir [57]. Kullanımın gerçekleştiği çalışmada ev tipi bir mikrodalga fırın çeşitli modifikasyonlar neticesinde sentez yapabilir duruma getirilmiştir.

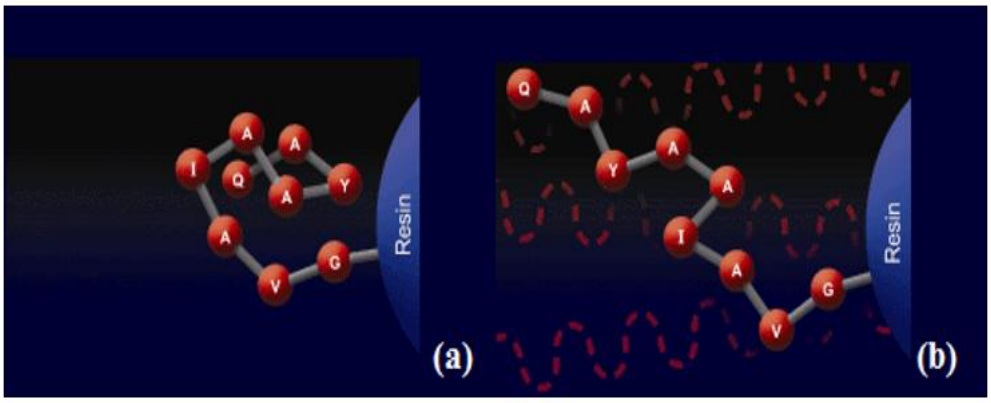


a b

Şekil 2. 31 a) Mikrodalga fırın ve sentezin gerçekleştiği reaksiyon kabı [57]. b) Otomatik mikrodalga destekli peptit sentez cihazı [58].

Peptit sentezi sırasında mikrodalga enerjisi sürekli olarak uygulanmaz. Reaksiyon sırasında belirlenen sürelerde ve istenilen sıcaklığa ulaşılana kadar enerji verilmektedir. Mikrodalganın enerjisi çok düşük olduğundan dolayı bağları kırmayıp bağ dönmesini sağlamaktadır. Mikrodalganın dipol etkileşimlerden kaynaklanan titreştirme özelliği sayesinde reçine üzerinde büyüyen zincirin lineer olarak yönelmesi gerçekleşmektedir. Bu sayede agregasyon engellenmiş olur ve yeni bağlanacak olan aminoasidin büyüyen zincirin ucuna bağlanması kolaylaşacaktır. Uzayan peptit zincirinde meydana gelen agregasyon aminoasit eklenmesinde sorun yaratacağı için zincirde hasarlar

yaratacaktır. Sentez sırasında eksik aminoasit eklenmesi peptit zincirinin dizi yapısını değiştireceği için nihai ürünün doğrudan etkilenmesine sebep olur.

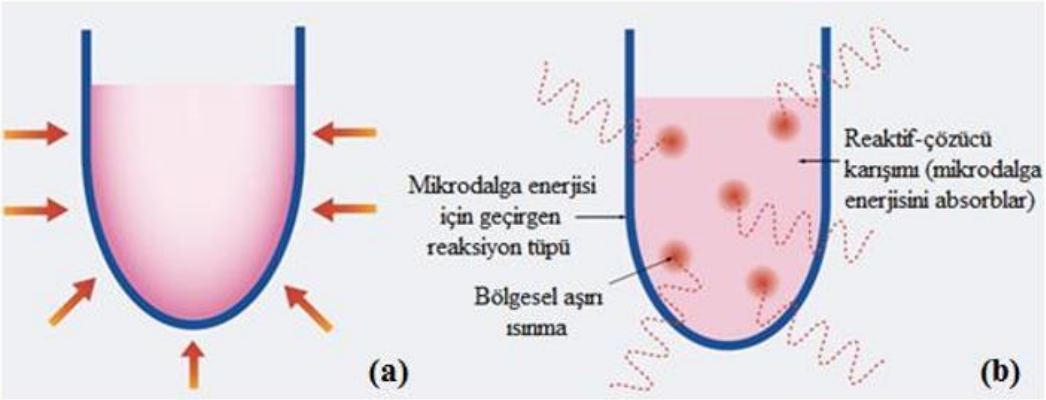


Şekil 2. 32 a) Mikrodalga enerjisi uygulanmazken, b) Mikrodalga enerjisi uygulanırken [59].

Geleneksel ısıtma sistemlerinde, ilk etapta ısıtıcı ısınmakta, oluşan enerji reaksiyon kabına aktarılıp tüm sistemin sıcaklığı eşitlenene kadar ısı enerjisi reaksiyon çözeltisine verilmektedir. Mikrodalga teknolojisinde ise çözelti reaksiyon kabı tarafından ısıtılmayıp doğrudan mikrodalga ışınları tarafından ısıtılmaktadır.

Bu iki önemli sonucu beraberinde getirir:

- Reaksiyon çözeltisine daha etkin bir enerji aktarımı gerçekleşmektedir.
- Reaksiyon kabındaki tüm bileşenler eşit miktarda enerjiye maruz kalırlar [60].



Şekil 2. 33 a) Geleneksel ısıtma yöntemi b) Mikrodalga enerjisi ile ısıtma yöntemi [61].

Mikrodalgayla enerji aktarımı çok hızlı bir şekilde gerçekleştiğinden dolayı enerjiye maruz kalan moleküller kısa bir süre sonra durulmadan tekrardan enerjiye maruz

kalırlar. Bu sayede moleküller reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisine ulaşıp reaksiyonun kısa bir sürede tamamlanmasını sağlarlar [62]. Mikrodalga enerjisinin hem reaksiyon çözeltisini homojen olarak ısıtabilmesi, hem de reaksiyon süresini kısaltması avantajlarından dolayı peptit sentezi çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. J. K. Murray ve S. H. Gellman'ın yaptıkları bir çalışmada mikrodalga enerjisinin yüksek miktarda ve yüksek saflıkta peptit sentezine olanak sağladığı gösterilmiştir [63].

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

- Sartorius CP 225D Hassas Terazi
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Laminar-hava akışlı kabin (Heraeus, KS12)
- Su saflaştırma sistemi (Millipore MilliQ Elix 5)
- Liberty Mikro Dalga destekli Katı Faz Peptit Sentez Cihazı
- Shimadzu LC-MS 2010 EV
- Shimadzu Preparatif HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Etüv
- Karbondioksit etüvü
- İnvert ışık mikroskobu
- Santrifüj
- Derin dondurucu (-20 ^{o}C)
- Derin dondurucu (-70 ^{o}C)

- Buzdolabı
- Otoklav
- Elisa Reader
- Parafilm
- 2 ml steril ependorf
- 250 ml cam beher
- 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl tekli ve çoklu otomatik pipetler ve uygun steril pipet uçları
- 5 ml ve 10 ml steril serolojik pipet ve uygun elektrikli otomatik pipet
- 15 ml ve 50 ml steril falkon tüp
- 0.2 µm enjektör filtresi ve 5-10 ml'lik enjektör
- 100 mm steril petri kabı
- 96 kuyucuklu, 48 kuyucuklu, 24 kuyucuklu, 12 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu plate

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların isimleri, alındıkları firmalar ve katalog numaraları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasalın Adı	**Alındığı Firma**
Piperidin	Merck
N-Hidroksibenzotriazol (HOBt)	Fluka
N,N-Diisopropilethilamine (DIEA)	Sigma-Aldrich
N-Metil-2-pirrolidon (NMP)	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Diklorometan (DCM)	Riedel-de Haen
Dimetilformamid (DMF)	Fluka
Thioanisol	Fluka
Trifluoroasetikasit (TFA)	Fluka
O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametiluronyum-hekzafluoro-fosfat (HBTU)	Fluka
1,2-Etan ditiol (EDT)	Sigma-Aldrich
Fmoc-Ala-Wang resin LL (Recine)	Novabiochem
Dietileter	Riedel-de Haen
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fluka
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fluka
Fmoc-Gly-OH	Fluka
Fmoc-Leu-OH	Fluka
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fluka
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Sigma- Aldrich
Fmoc-Ala-OH	Sigma- Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma- Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-High Glucose)	Sigma- Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma- Aldrich
Tripsin-EDTA	Sigma- Aldrich
Penisilin	Sigma- Aldrich
Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma- Aldrich

3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.1.3.1 LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi)

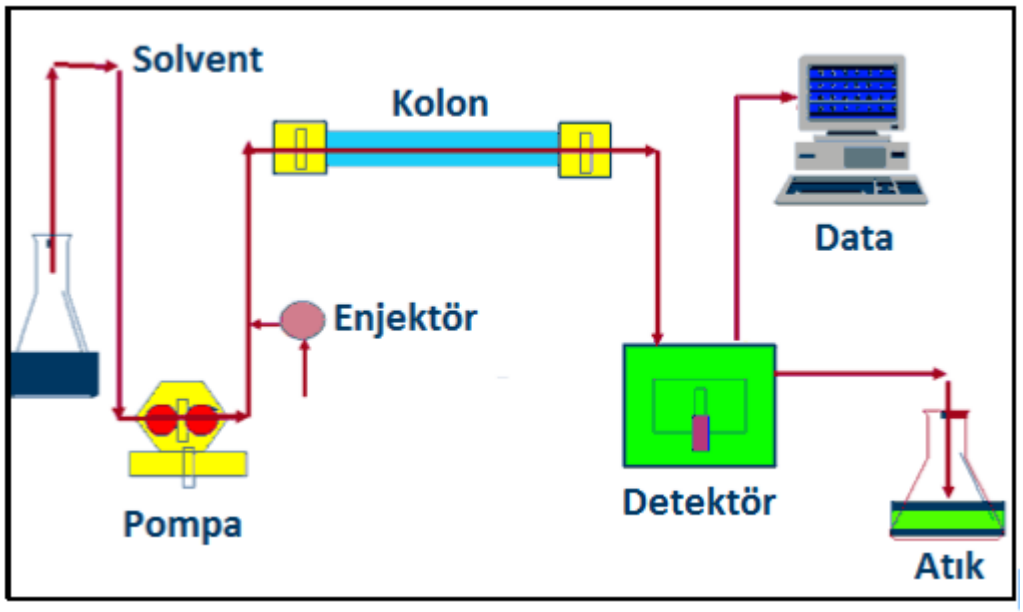
Çalışmada sentezi yapılan peptit dizilerinin molekül ağırlığı ve saflık tayini LC-MS cihazı ile yapılmıştır.

LC-MS cihazı HPLC ve MS'in birlikte kullanıldığı günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok kullanılan laboratuvar sistemidir. Düşük konsantrasyonlarda analize olanak tanıması, yapısal analizi olanaklı kılması ve otomatik olarak kullanılabilen bir sistem olduğu için oldukça önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu cihaz sayesinde fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptitlerin yapısal analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresi ile birlikte çalıştığında kolondan bileşenler çıkarken her bir bileşenin kütle spektrumu aynı anda elde edilebilir.

Kütle spektrometresinde molekülün kütlesi değil, kütle/yük oran tayini yapılmaktadır. Kütle spektrumu iyon miktarıyla kütle/yük arasında çizilen bir grafiktir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaşması gerekmektedir. Bunun için işlem gaz fazında gerçekleştirilmektedir. LC-MS cihazı temelde 4 bölümden oluşur. HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör sırasıyla bu bölümleri oluşturmaktadır.

3.1.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

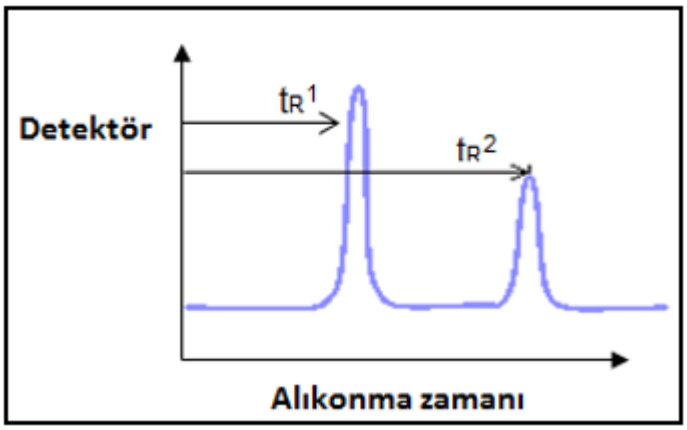
Çok ufak tanecik yapısına sahip sabit fazın üzerinden örneğin yüksek basınçta hareketli faz ile birlikte yürütülmesiyle gerçekleşen bir kromatografi yöntemidir.



Şekil 3. 1 HPLC sistemi [64].

HPLC sisteminde kullanılan pompa hareketli fazın belirlenen basınç ve akış hızında kromatografi sisteminde ilerlemesini sağlamaktadır. Sistemde kullanılan kolonların dayanabildikleri maksimum basınç değeri aşılması durumunda kolon bozulmaktadır. Bu nedenle kolonun dayanabileceği maksimum basınç değeri önceden belirlenmelidir. Diğer bir faktör olan akış hızı ise karışım bileşenlerinin uygun bir şekilde ayrılmaları sağlanacak şekilde ayarlanmalıdır. Akış hızının düşük seviyede olması ile karışım kolonda daha uzun süre kalacak ve bu şekilde daha verimli bir ayırma gerçekleştirilecektir. Fakat bunun yanında çalışma süresinin uzaması bir dezavantaj olacaktır. Bu da optimum akış hızı ile çalışmanın daha avantajlı olmasını beraberinde getirecektir. Karışım hareketli faza enjeksiyon yöntemiyle aktarılmaktdır.

Karışımı çözmek amacıyla kullanılan çözücü hareketli faza uyum sağlamalıdır. Polarlık dereceleri yakın olmalı, çökme veya bulanıklığa yol açmamalıdır. Kolonlarda kromatografik ayırma gerçekleşmektedir. Kolon tarafından ayrılmış bir şekilde çıkan bileşenler dedektörlere girer. Dedektör sistemine giren bileşenler miktara ve çeşitli özelliklere göre saptanırlar.



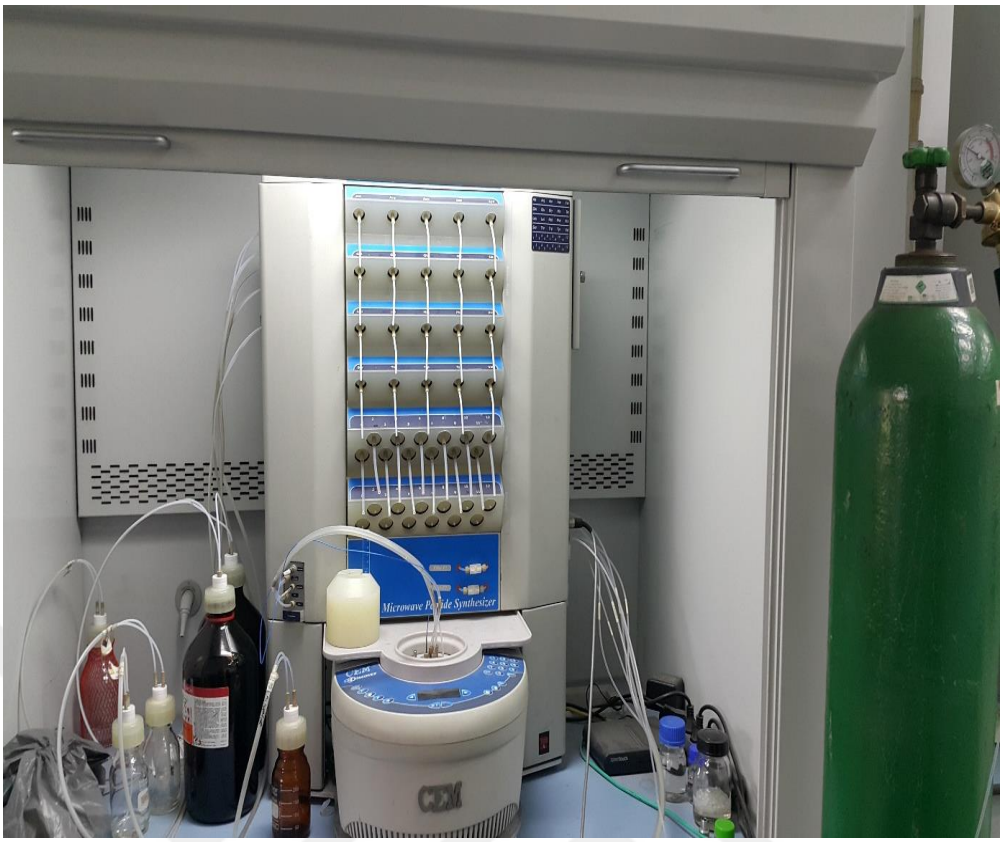
Şekil 3. 2 Bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre kolondan çıkışları

HPLC sisteminde dedektör tarafından okunan her bir bileşen, kromatogramda bir pik olarak gözlemlenir. Bir bileşenin kolonda ne kadar süre kaldığını belirten değer alıkonma zamanıdır. t_R^1 ve t_R^2 iki farklı bileşen için alıkonma süresini gösterir. Alıkonma zamanı dakika cinsinden verilir.

3.2 Metod

3.2.1 Lezzetli Peptit Dizisinin Katı Faz Peptit Sentezi Yöntemiyle Sentezlenmesi

Peptitlerin sentezi, Liberty Mikrodalga Destekli Peptit Sentez Cihazı (CEM) kullanılarak yapılmıştır. Cihaz 0.1-1 mmol aralığında sentez yapabilmektedir ve Fmoc kimyasına dayalı çalışma prensibi vardır. Cihaz bilgisayar programına bağlı olarak çalıştığından dolayı bütün sentez basamakları otomatik olarak cihaz tarafından gerçekleşmektedir. Sentezi yapılacak olan peptitin aminoasit dizisi, kullanılan reçinenin özellikleri ve sentez için gerekli olan kimyasallar cihazın bağlı olduğu bilgisayar programına kaydedildikten sonra, tüm kimyasalların (aminoasitler, aktivatörler, aktivatör bazlar ve diğer tüm çözeltiler) miktarları bilgisayar programı tarafından hesaplanmış bir şekilde sunulmaktadır.

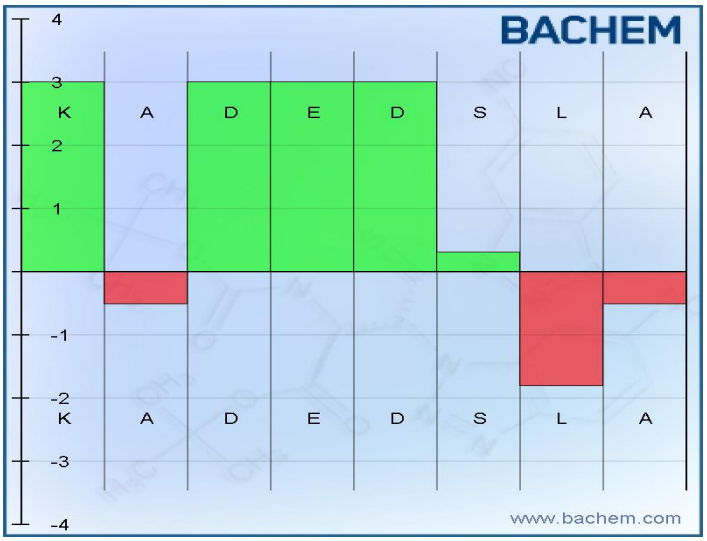


Şekil 3. 3 CEM, Liberty Mikrodalga Destekli Peptit Sentez Cihazı

Tez çalışmasında sentezlenen lezzetli peptit dizisi 8 aminoasitten meydana gelmektedir ve bu dizinin aminoasit içeriği aşağıdaki gibidir:

NH_2-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala-COOH

Molekül ağırlığı "Bachem peptide calculator" programı tarafından hesaplanan 8 aminoasitlik lezzetli peptit dizisinin molekül ağırlığı teorik olarak 847.8774 Da olarak belirlenmiştir. Dizinin hidrofilik aminoasit kalıntılarının toplam aminoasitlere oranı %63 olarak "Bachem peptide calculator" programı tarafından hesaplanmıştır ve tüm aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3. 4 Lezzetli peptit dizisine ait aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri. (●) Hidrofilik özellikteki aminoasitler, (●) Hidrofobik özellikteki aminoasitler

Sentezde kullanılan bütün aminoasitlerin α-amino grupları Fmoc grubu ile korunmuş haldedir.

Peptit dizisinin karboksil ucunda bulunan ilk aminoasit olan alanin (Ala), reçineye bağlı (preloaded) şekilde bulunmaktadır.

Sentezde, katı polimerik destek olarak, Novabiochem firmasından temin edilen Fmoc-Ala-Wang Rezin LL reçine kullanılmıştır.

Sentezde kullanılan diğer kimyasallar ise aşağıdaki gibidir:

- **N,N'-Dimetil formamid (DMF):** Katı faz peptit sentezinde ana çözücü olarak kullanılır.

- **Diklorometan (DCM):** Peptit sentezinde yardımcı çözücü olarak kullanılır. Diklorometan ikinci yıkamayı sağlar.

- **1-Hidroksibenzotriazol (HOBt):** Katı faz peptit sentezinde, eklenen her aminoasitin karboksil grubunun aktivasyonunda kullanılır.

- **2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronyum hekzaflurofosfat (HBTU):** Katı faz peptit sentezinde, eklenen her aminoasitin karboksil grubunun aktivasyonunda kullanılır.

• **Diizopropil etilendiamin (DIEA):** Katı faz peptit sentezinde aktivatör baz olarak kullanılır.

• **N-Metil pirilidon (NMP):** Aktivatör bazın içinde çözüldüğü bir kimyasaldır.

• **Piperidin:** Aminoasitlerin Fmoc koruma grubunun ayrılmasında kullanılan bir kimyasaldır.

Peptit sentezine başlamadan 1 gün önce, gerekli miktar reçinenin tartımı yapılır, 50 mL hacimli falkon tüpe konulur ve üzerine yaklaşık 5-6 mL DMF eklenerek 1 gün boyunca oda sıcaklığında çalkalıyıcıya karışması için bırakılır. Aminoasitler ve aktivatörlerin miktarları cihaz tarafından gerekli hesaplamalar yapılarak belirlenir ve tartımları yapılır, gereken miktarlarda DMF eklenerek iyice çözülürler. Cihaz programı tarafından hesaplanan miktarlarda aktivatör baz çözeltisi ve Fmoc korumasının kaldırılmasında kullanılan (deprotection) çözeltiler hazırlanır. Hazırlanan bütün çözeltiler, Liberty peptit sentez cihazındaki gerekli bölgelere bağlanır. Cihazın bağlı olduğu bilgisayar programı yardımıyla kontroller yapıldıktan sonra sentez başlatılır. Peptit sentezinin bitme süresi, sentezlenmek istenen peptitin uzunluğuyla doğru orantılı olup cihaz tarafından sentez süresi gösterilmektedir. Sentez sonunda, cihaz reçinenin üzerinde bağlı durumdaki peptit zincirini falkon tüpe göndererek sentezi bitirir.

3.2.1.1 Kırma (Cleavage) İşlemi

Kırma (Cleavage) yani polimerik katı destek üzerine bağlı bir şekilde uzayan peptit zincirinin bu destekten ayrılması işlemidir. Kırmanın başarılı gerçekleşebilmesi için seçilecek olan kırma kokteylinin içeriği oldukça önem taşımaktadır. Kırma kokteylinin ana reaktifi TFA'dır. Kırma işlemi sırasında oluşan karbonyum iyonlarının aminoasitlere zarar vermesini engellemek amacıyla bazı kimyasallar eklenmektedir. Bu işlem için TFA: Su: Tiyoanisol: EDT (v:v) kimyasalları, 87,5: 5: 5: 2,5 oranlarında kullanılmıştır.

Kırma kokteylinde kullanılan kimyasalların özellikleri aşağıdaki gibidir:

• **Trifloroasetikasid (TFA):** Kırma işleminin ana reaktifidir. Olukça kuvvetli bir asittir.

• **1,2-Etanditiyol (EDT):** Kırma işleminde baskılayıcı (Scavengers) olarak kullanılır.

• **Tiyoanisol:** Kırma işleminde baskılayıcı (Scavengers) olarak kullanılır.

• **Su:** Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su cihazında damıtılan ultra saf su kullanılır.

Kırma işlemlerinde kullanılan cihazlar ise aşağıda verilmiştir:

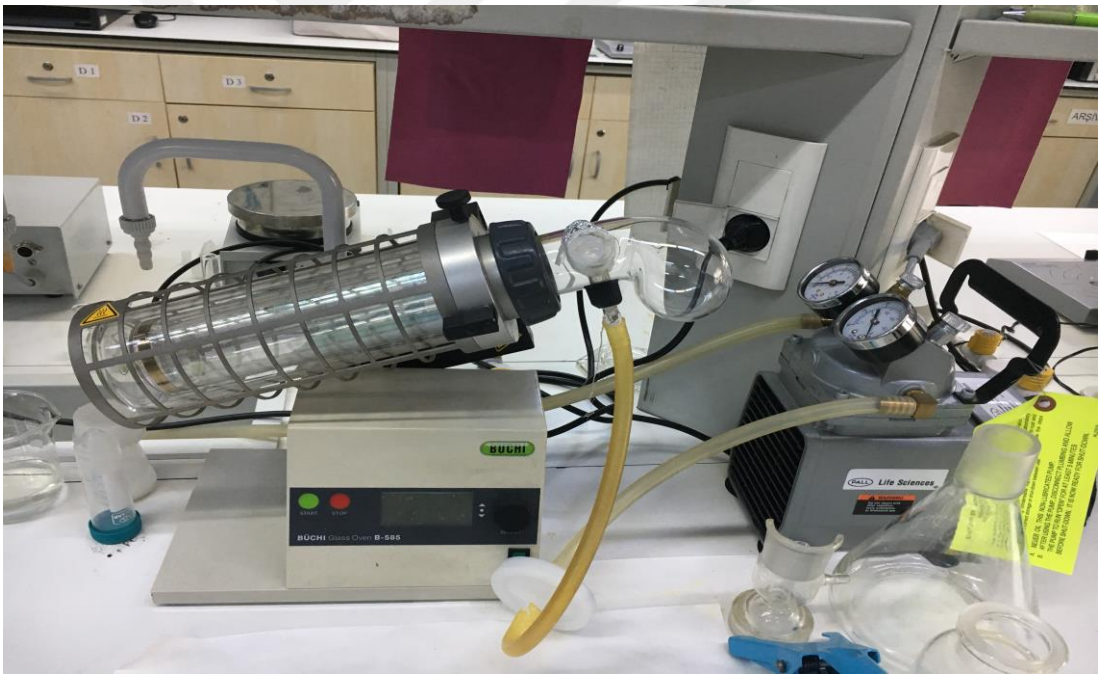
• **Çalkalama işlemleri için:** Heidolph Multi Reax çalkalayıcı

• **Evaporasyon işlemleri için:** Heidolph Laborota 4010-digital Rotary Evaporatör

• **Kurutma İşlemleri için:** Büchi Glass Oven B-585 Cam Fırını

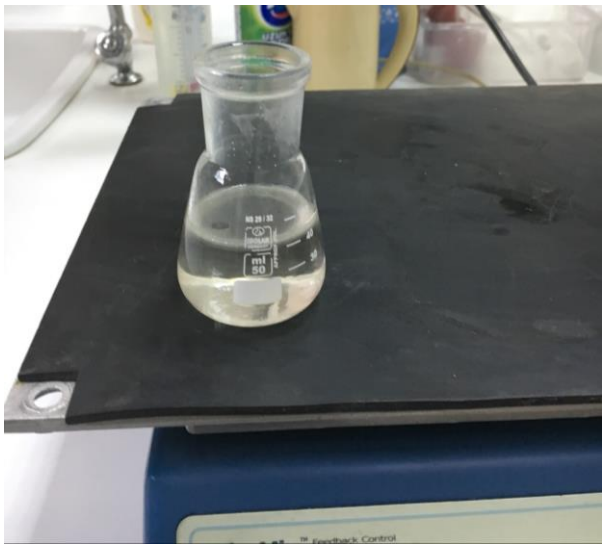
• **Santrifüj İşlemleri için:** Heraeus Biofuge Stratos Ultra Santrifüj

Peptit sentez cihazından sentez sonunda reçineye bağlı olarak alınan peptit önce 30 mL DMF ile 3 kez daha sonra 30 mL DMF:DCM (1:1) çözeltileriyle 3 kez ve son olarak da tek başına 30 mL DCM ile 3 kez yıkanır ve süzülerek çözeltiler uzaklaştırılır. Yıkanmış reçineye bağlı peptit, cam fırınında (glass oven) vakum altında (Şekil 3.5) yaklaşık 3-4 saat kurumaya bırakılır.



Şekil 3. 5 Cam fırın

Kuruyan reçineye bağlı peptit, altı düz yuvarlak bir balona aktarılarak üzerine kırma (cleavage) kokteyli eklenir. Yaklaşık 3 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (Şekil 3.6) bırakılır. Bu süre zarfında peptitin polimerik katı reçineden ayrılması sağlanır.



Şekil 3. 6 Peptitin katı reçineden ayrılması için kırma kokteyli eklendikten sonra çalkalayıcıda bırakılması

Kırma işlemi bittikten sonra, reçine vakum yardımıyla bir krozeden süzülür ve krozenin üstünde katı reçine kalırken yuvarlak balona kırma kokteyli içinde peptit süzülür. Süzüntü, kokteyldeki TFA uçana kadar Rotary Evaporatörde 25^{o}C'de 130-200 rpm'de buharlaştırılır (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7 Rotary Evaporatör

TFA uçurulduktan sonra geride kalan süzüntüden şırınga yardımı ile dipte kalan su çekilir. Daha sonra peptit soğuk dietil eter ile (-20 °C) çöktürülür ve vakumlu pompa

yardımıyla eter çöktürülen peptitten uzaklaştırılır. Peptiti nemli halde tutan az miktarda eter de cam fırında vakum altında (Şekil 3.5) yaklaşık 2 saatlik süre ile uzaklaştırılır. Peptitlerin cam fırında kurutulduktan sonra tartımları alınır. Kuru peptitlerden hazırlanan örnekler, preparatif HPLC, LC-MS cihazlarında analiz edilmek için hazır durumda bulunur (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8 Kurutulmuş peptit

Lezzetli peptit sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıdaki Çizelge 3.2 ‘de toplu olarak gösterilmektedir:

Çizelge 3. 2 Lezzetli peptit dizisinin sentezinde kullanılan kimyasallar

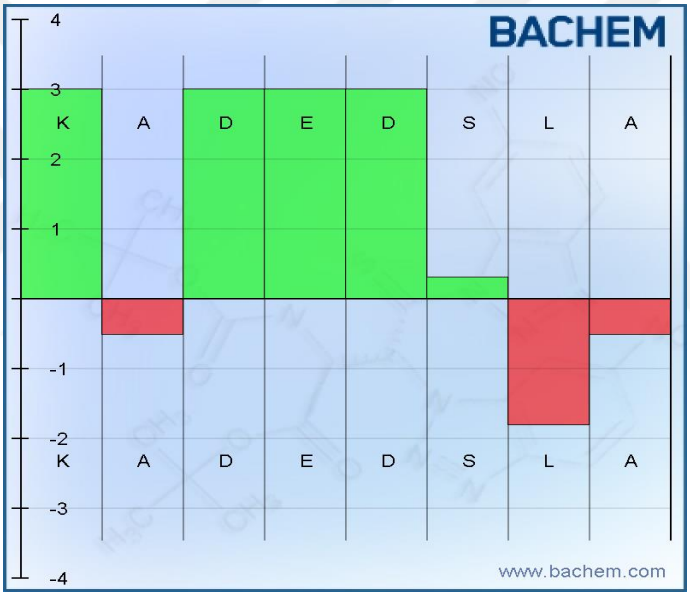
Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar (mL)	Kullanılan Miktar (gr)
Rezin		
Fmoc-Ala-Wang Rezin	-	0.167
Aminoasitler		
Aspartik Asit (Asp)	7	0.576
Glutamik Asit (Glu)	8	0.681
Glisin (Gly)	7	0.416
Lösin (Leu)	7	0.495
Lizin (Lys)	7	0.656
Serin (Ser)	7	0.537
Aktivatör		
HCTU	-	3.103
HOBt	-	1.149
Aktivatör Baz		
Diea	2.8	-
NMP	5.2	-
Deprotection		
Piperidin	50	-
DMF	200	-
Kırma Kokteyl		
TFA	43.5	-
Tiyoanisol	2.5	-
EDT	1.25	-
Su	2.5	-

3.2.2 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Peptit Dizisinin Katı Faz Peptit Sentezi Yöntemiyle Sentezlenmesi

Tez çalışmasında sentezlenen lezzetli peptit dizisinden türetilen dizi 8 aminoasitten meydana gelmektedir ve bu dizinin aminoasit içeriği aşağıdaki gibidir:

NH_2-Lys-Ala-Asp-Glu-Asp-Ser-Leu-Ala-COOH

Molekül ağırlığı "Bachem peptide calculator" programı tarafından hesaplanan 8 aminoasitlik lezzetli peptit dizisinin molekül ağırlığı teorik olarak 847.8774 Da olarak belirlenmiştir. Dizinin hidrofilik aminoasit kalıntılarının toplam aminoasitlere oranı % 63 olarak "Bachem peptide calculator" programı tarafından hesaplanmıştır ve tüm aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3. 9 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri. (●) Hidrofilik özellikteki aminoasitler, (●) Hidrofobik özellikteki aminoasitler

Sentezde kullanılan bütün aminoasitlerin α-amino grupları Fmoc grubu ile korunmuş haldedir.

Peptit dizisinin karboksil ucunda bulunan ilk aminoasit olan alanin (Ala), reçineye bağlı (preloaded) şekilde bulunmaktadır.

Sentezde, katı polimerik destek olarak, Novabiochem firmasından temin edilen Fmoc-Ala-Wang Rezin LL reçine kullanılmıştır.

Sentezde kullanılan diğer kimyasallar ise aşağıdaki gibidir:

- N,N'-Dimetil formamid (DMF)
- Diklorometan (DCM)
- 1-Hidroksibenzotriazol (HOBt)
- 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronyum hekzaflurofosfat (HBTU)
- Diizopropil etilendiamin (DIEA)
- N-Metil pirilidon (NMP)
- Piperidin

Lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin sentezi daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 Kırma (Cleavage) İşlemi

Lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin katı reçineden ayrılması için kullanılan kırma kokteylinde TFA: Su: Tiyoanisol: EDT (v:v) kimyasalları, 87,5: 5: 5: 2,5 oranlarında kullanılmıştır.

Kırma kokteylinde kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

- Trifloroasetikasid (TFA)
- 1,2-Etanditiyol (EDT)
- Tiyoanisol
- Su

Kırma işlemlerinde kullanılan cihazlar ise aşağıda verilmiştir:

- Heidolph Multi Reax çalkalayıcı
- Heidolph Laborota 4010-digital Rotary Evaporatör
- Büchi Glass Oven B-585 Cam Fırını
- Heraeus Biofuge Stratos Ultra Santrifüj

Peptit sentez cihazından sentez sonunda reçineye bağlı olarak alınan peptit önce 30 mL DMF ile 3 kez daha sonra 30 mL DMF:DCM (1:1) çözeltileriyle 3 kez ve son olarak da tek başına 30 mL DCM ile 3 kez yıkanır ve süzülerek çözeltiler uzaklaştırılır. Yıkanmış reçineye bağlı peptit, cam fırında (glass oven) vakum altında yaklaşık 3-4 saat kurumaya bırakılır.

Kuruyan reçineye bağlı peptit, altı düz yuvarlak bir balona aktarılarak üzerine kırma (cleavage) kokteyli eklenir. Yaklaşık 3 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcıda bırakılır. Bu süre zarfında peptitin polimerik katı reçineden ayrılması sağlanır.

Kırma işlemi bittikten sonra, reçine vakum yardımıyla bir krozeden süzülür ve krozenin üstünde katı reçine kalırken yuvarlak balona kırma kokteyli içinde peptit süzülür. Süzüntü, kokteyldeki TFA uçana kadar Rotary Evaporatörde 25 ^{o}C'de 130-200 rpm'de buharlaştırılır.

TFA uçurulduktan sonra geride kalan jel kıvamındaki süzüntüden şırınga yardımı ile dipte kalan su çekilir. Daha sonra peptit soğuk dietil eter ile (-20 °C) çöktürülür ve vakumlu pompa yardımıyla eter çöktürülen peptitten uzaklaştırılır. Peptiti nemli halde tutan az miktarda eter de cam fırında vakum altında yaklaşık 2 saatlik süre ile uzaklaştırılır. Peptitlerin cam fırında kurutulduktan sonra tartımları alınır. Kuru peptitlerden hazırlanan örnekler, preparatif HPLC, LC-MS cihazlarında analiz edilmek için hazır durumda bulunur.

Lezzetli peptit dizisinden türetilen peptit dizisinin sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıdaki Çizelge 3.3 'de toplu olarak gösterilmektedir:

Çizelge 3. 3 Lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin sentezinde kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar (mL)	Kullanılan Miktar (gr)
Rezin		
Fmoc-Ala-Wang Rezin	-	0.167
Aminoasitler		
Aspartik Asit (Asp)	8	0.658
Glutamik Asit (Glu)	7	0.596
Lösin (Leu)	7	0.495
Lizin (Lys)	7	0.656
Serin (Ser)	7	0.537
Aktivatör		
HCTU	-	2.069
HOBt	-	0.766
Aktivatör Baz		
Diea	3.5	-
NMP	6.5	-
Deprotection		
Piperidin	26	-
DMF	104	-
Kırma Kokteyl		
TFA	43.5	-
Tiyoanisol	2.5	-
EDT	1.25	-
Su	2.5	-

3.2.3 Hücre Deneyleri

3.2.3.1 Hücre Kültürü

• Yeni açılan FBS ve tripsin-EDTA kimyasalları tekrar kullanım için 15 mL'lik falkon tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

• FBS, ilk defa açılma öncesinde aşamalı olarak 37 °C'de eritildi ve 56 °C'de yarım saat bekletildi. Ardından alikotlanarak 50 mL'lik falkonlara bölünerek -20°C'de muhafaza edildi. Alikotlanmış FBS tekrar kullanımlarda sadece 37 °C'de eritilerek kullanıldı.

• Yeni açılan DMEM besi yeri içerisine %10 FBS, %1 penisilin eklendi ve +4 °C'de muhafaza edildi.

• -80 °C'de kriyo tüp içerisinde muhafaza edilen donmuş MCF-7 hücre hattı, +37 °C'de dikkatli bir şekilde çözündürüldü.

• Çözünmüş MCF-7 hücre hattı 15 mL'lik falkon tüp içerisine 5 mL DMEM yardımı ile alınarak pipetajlandı.

• Ardından DMSO içeren dondurma çözeltisinin uzaklaştırılması amacı ile falkon tüp 5 dk 2000 rpm'de santrifüjlendi.

• Santrifüj sonrası üstte kalan kısım atıldı, dipte kalan hücreler 1 mL DMEM içerisine alındı, ardından petri kabına ekildi ve üzeri 9 mL DMEM ile tamamlandı.

• Petri kabına alınan hücreler +37 °C'de CO_2 etüv içerisinde inkübe edildi.

• Haftada üç kere kültür ortamı değiştirilerek pasajlama işlemi yapıldı.

Pasajlama esnasında;

• Renk değişimi gözlenen besiyeri petriden uzaklaştırıldı.

• Petri içerisine 5 mL PBS eklenerek bir defa yıkama işlemi yapıldı.

• Petri üzerine 2 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 5-7 dk +37°C'de CO_2 etüv içerisinde inkübe edildi.

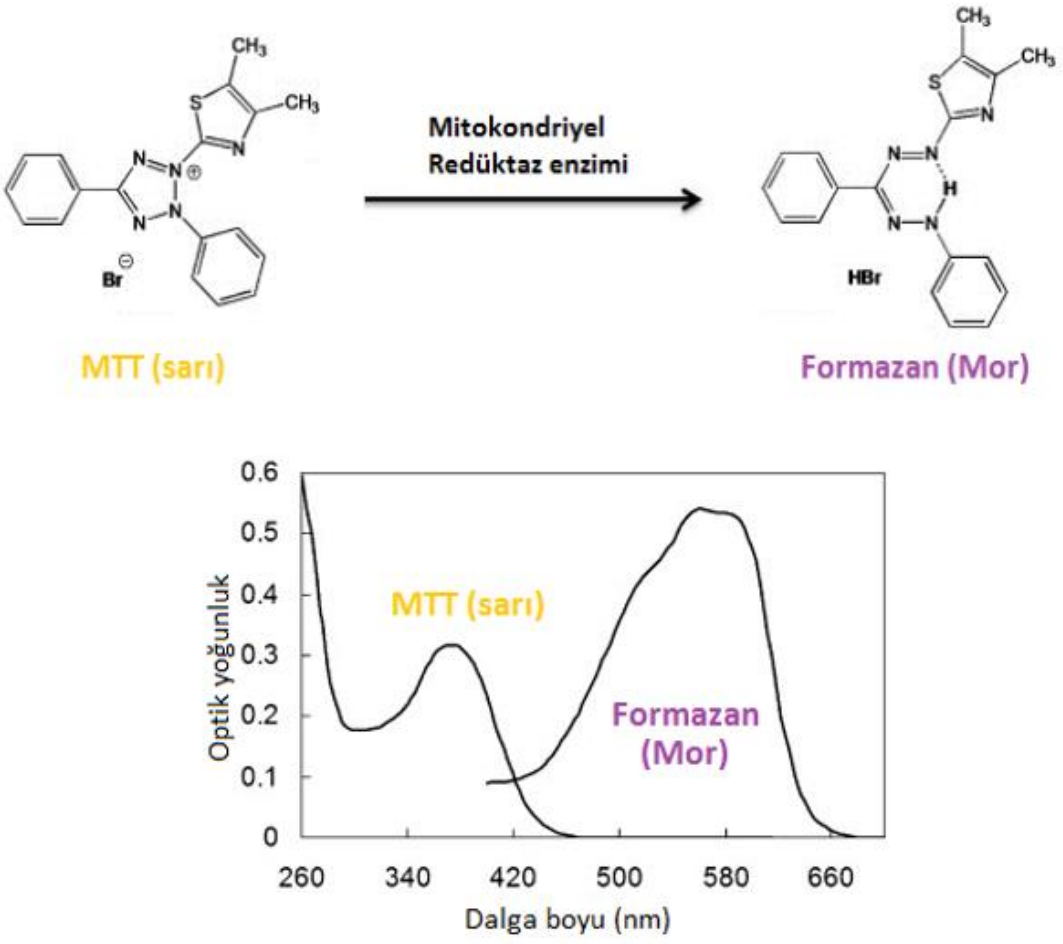
• Petriye çoğalma esnasında yapışan MCF-7 hücreleri kaldırıldıktan sonra petri içerisine 5 mL DMEM eklendi.

• Ardından yaklaşık 7 mL çözelti iki petriye eşit olarak bölündü petrilerin içerisinde toplam 10 mL çözelti olacak şekilde DMEM eklendi.

• Petriler +37 °C'de CO_2 etüv içerisinde inkübe edildi ve gerektiğinde tekrar pasajlama yapıldı.

3.2.3.2 MTT Testleri

3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) testi, kimyasalların sitotoksik etkilerini *in vitro* olarak gözlemleyebilmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir [65]. Bu yöntem ile hücre canlılığının uygulanan kimyasal ajan konsantrasyonuna bağlı değişimi ölçülür. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerin mitokondriyel enzimleri ile indirgenir ve bu reaksiyon sonucunda mor renkli kristaller oluşur [66].



Şekil 3. 10 MTT'nin Formazon'a dönüşümü [67]

Bu kristallerin organik çözücülerde (SDS, DMSO, izopropanol gibi) çözünmesiyle oluşan renk değişikliği, 540 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ölçülmesiyle tayin edilir. MTT testinde sitotoksisite arttıkça formazon oluşumu azalmakta, renk açılmakta yani ölçülen absorbans da azalmaktadır.

1-2 hafta süresince pasajlanarak çoğaltılan hücreler MTT testinde kullanılmak üzere hazır duruma getirildi. MTT testleri için MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plate içerisine ekildi. +37 °C'de CO_2 etüv içerisinde 24 saat inkübe edildi. Sitotoksisitesi belirlenecek malzemeler DMEM içerisine eklendi ve 37 °C'de 1 gün boyunca inkübe edildi. 1 gün sonra, malzeme ekimi öncesi, güvenlik kabini içerisinde 0.2 µm'lik filtre ve 5 mL'lik enjektörler yardımı ile steril edilen örnekler steril ependorflar içerisine toplandı. 24 saat inkübe edilen hücreler lezzetli peptit dizisinin ve bu diziden türetilen peptitin saflaştırma sonrası farklı konsantrasyonları ile muamele edildi. Uygulanan konsantrasyonlar lezzetli peptit dizisi için sırasıyla 40 µg/µL, 80 µg/µL ve 200 µg/µL; lezzetli peptit dizisinden türetilen dizi için 20 µg/µL, 40 µg/µL ve 100 µg/µL'dir.

MTT ekimi öncesinde, 5 mg/mL (MTT kimyasalı/DMEM) olacak şekilde MTT solüsyonu hazırlandı ve 0.2 µm'lik filtre ve 5 mL'lik enjektörler yardımı ile steril edildi. MTT ekim işlemi ve inkübasyonu, hücre-malzeme bulunan kuyucuklara 50 µl MTT solüsyonu eklenmesi ve 4 saat 37°C'de, %5 CO2 etüvde bekletilmesi şeklinde gerçekleştirildi. 4 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklar içerisindeki çözeltiler atıldı. Ardından 100 µl DMSO çözeltisi eklenerek 15-20 dk inkübe edildi. DMSO eklenmesi ve 15-20 dk beklemeden sonra 96'lık plate 540 nm dalga boyunda mikroplate okuyucuda okutuldu ve absorbans değerleri kaydedildi.

% Hücre canlılığı Denklem 3.1'e göre hesaplanır.

$$\%\text{Hücre Canlılığı} = (A_{örnek}-A_{blank}/A_{kontrol}-A_{blank)} \times 100 \quad (3.1)$$

$A_{örnek}$=hücre- malzeme ekstrakt- MTT solüsyonu içeren kuyucuk Absorbans değeri

A_{blank}= sadece DMSO bulunan kuyucuk Absorbans değeri

$A_{kontrol}$=hücre-MTT solüsyonu bulunan kuyucuk Absorbans değeri

BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI

4.1 Sentezlenen Peptit Dizilerinin Analizleri

Sentezlenen lezzetli peptit dizisi ve lezzetli peptit dizisinden türetilen dizisin LC-MS cihazı ile analizleri yapıldı. Elde edilen kromatogramda görülen piklerin molekül ağırlıkları hesaplandı. LC-MS cihazı ile analizleri yapılan peptit dizilerinin HPLC sistemi kullanılarak saflaştırma işlemleri yapıldı. Saflaştırma işlemi gerçekleştirilen peptit dizileri LC-MS cihazında analiz edildi.

4.1.1 Lezzetli Peptit Dizisinin LC-MS Analizleri

Sentezlenen lezzetli peptit dizisinin LC-MC analizleri aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirildi.

25 ºC Oda Sıcaklığı

Mobil Faz A: Su, % 0,1 Formik Asit,

Mobil Faz B: Asetonitril, % 0,1 Formik Asit,

Akış Hızı: 0,6 mL/dak,

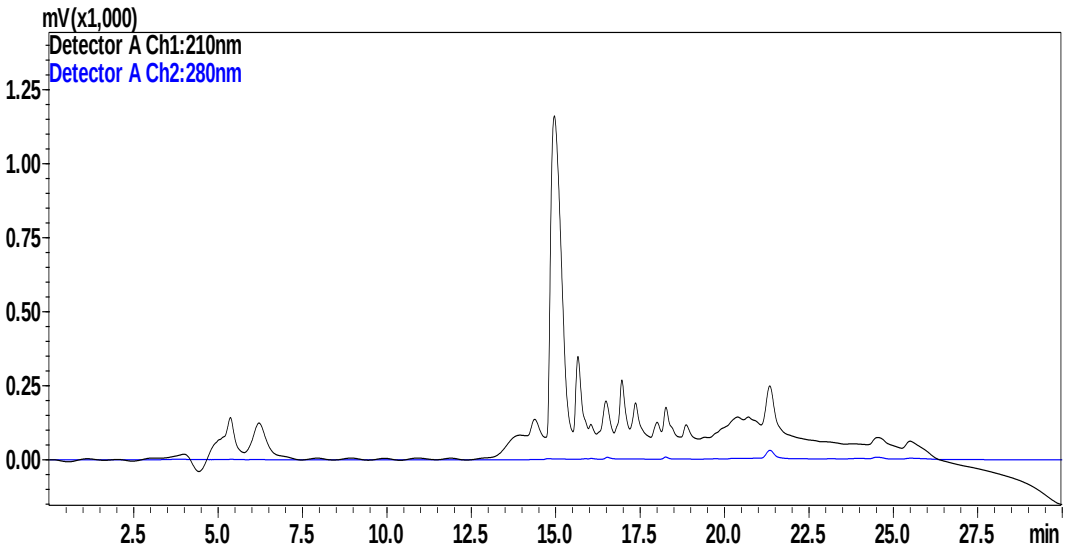
Elusyon Gradienti: % 20 Mobil Faz B,

Dedektor Voltajı: 1,5 kV,

Gaz Akış Hızı: 1,5 L/dak,

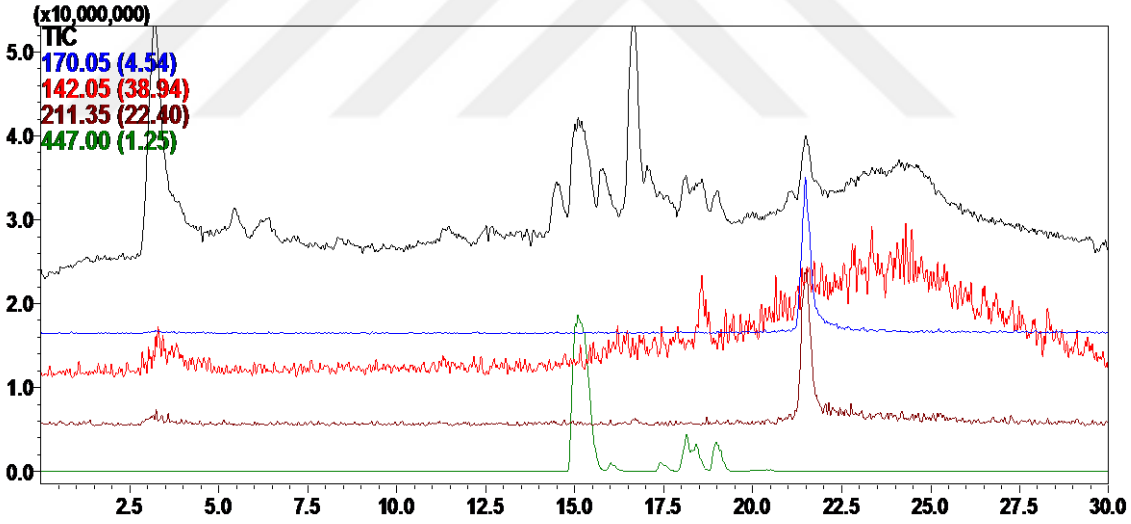
CDL Sıcaklığı: 300 °C,

Kolon: Shimadzu Shim-Pack MRC-ODS, 5mmI.D.x25 cm

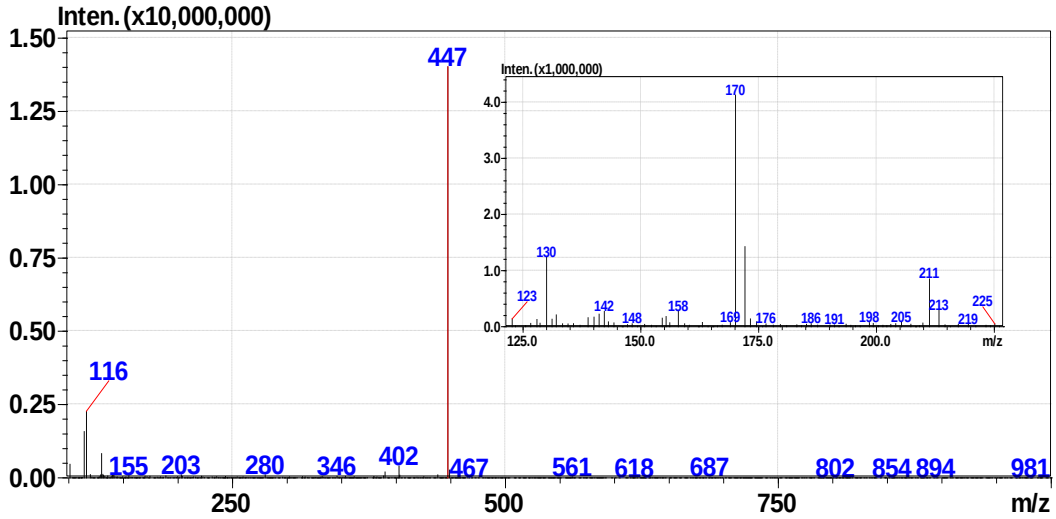


Şekil 4. 1 Ham lezzetli peptit dizisinin LC kromatogramı

Ham lezzetli peptit dizisi LC-MS cihazının MS iyonlastırma ünitesinde, ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırıldı. Lezzetli peptit dizisine ait toplam iyon kromatogramı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 Ham lezzetli peptit dizisine ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4. 3 Ham lezzetli peptit dizisi MS spektrumu

LC kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında 15. dakika civarı gözlenen pike ait 170,05; 142,05; 211,35; 447,00 iyonları kullanılarak deneysel molekül ağırlığı Denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\frac{m}{z} = \frac{MW + nH^+}{n} \qquad (4.1)$$

$[M + 5H^+]^{+5}$ = 170,05 → MW = 845,25 Da

$[M + 6H^+]^{+6}$ = 142,05 → MW = 846,3 Da

$[M + 4H^+]^{+4}$ = 211,35 → MW = 841,4 Da

$[M + Na^+ + 2H^+]^{+2}$ = 447,00 → MW = 846,0 Da

$M_{Wortalama}$ = 844,7375 Da

Sentezlenen lezzetli peptit dizisinin deneysel molekül ağırlığı 844,7375 Da olarak hesaplanmıştır. Peptit dizisinin teorik olarak molekül ağırlığı 'Bachem peptide calculator' programı yardımıyla 847,8774 Da olarak hesaplanmıştır. LC-MS kullanırak hesaplanan deneysel molekül ağırlığının programdan hesaplanan molekül ağırlığına benzer çıktığı görülmektedir. Deneysel hata %0,37 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda lezzetli peptit dizisinin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir.

4.1.2 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin LC-MS Analizleri

Sentezlenen lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin LC-MC analizleri aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirildi:

25 ºC Oda Sıcaklığı

Mobil Faz A: Su, % 0,1 Formik Asit,

Mobil Faz B: Asetonitril, % 0,1 Formik Asit,

Akış Hızı: 0,6 mL/dak,

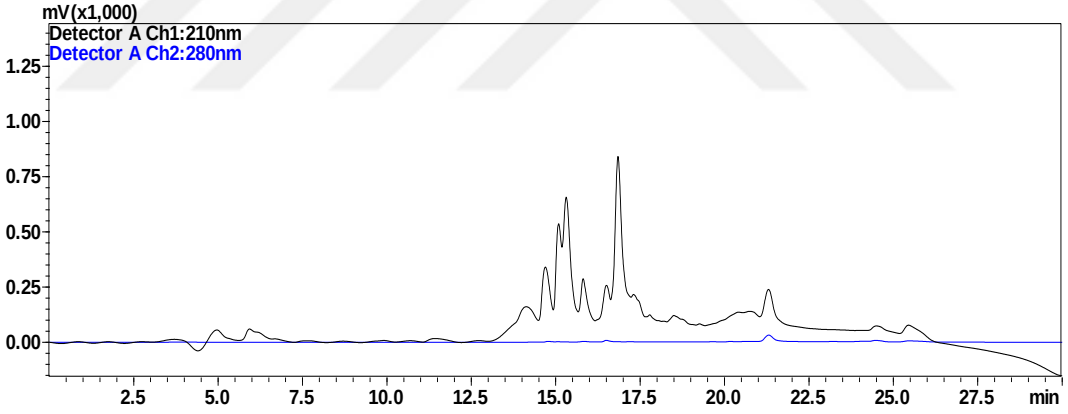
Elusyon Gradienti: % 20 Mobil Faz B,

Dedektor Voltajı: 1,5 kV,

Gaz Akış Hızı: 1,5 L/dak,

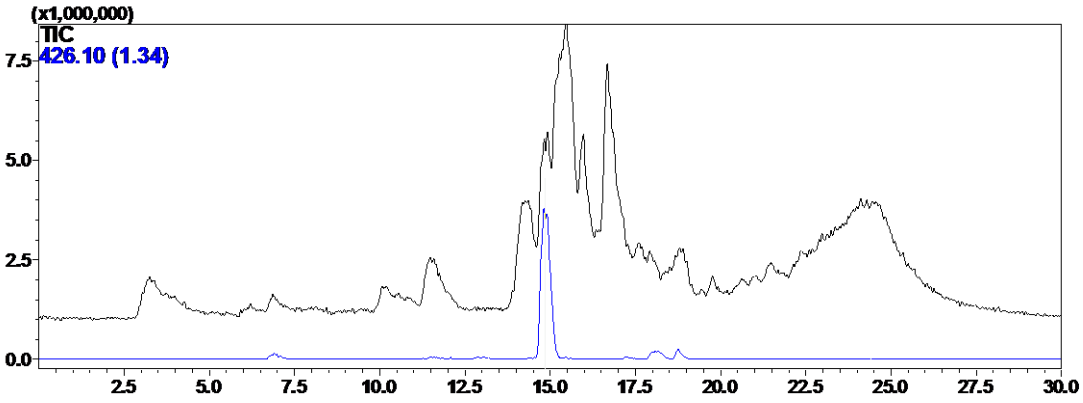
CDL Sıcaklığı: 300 °C,

Kolon: Shimadzu Shim-Pack MRC-ODS, 5mmI.D.x25 cm

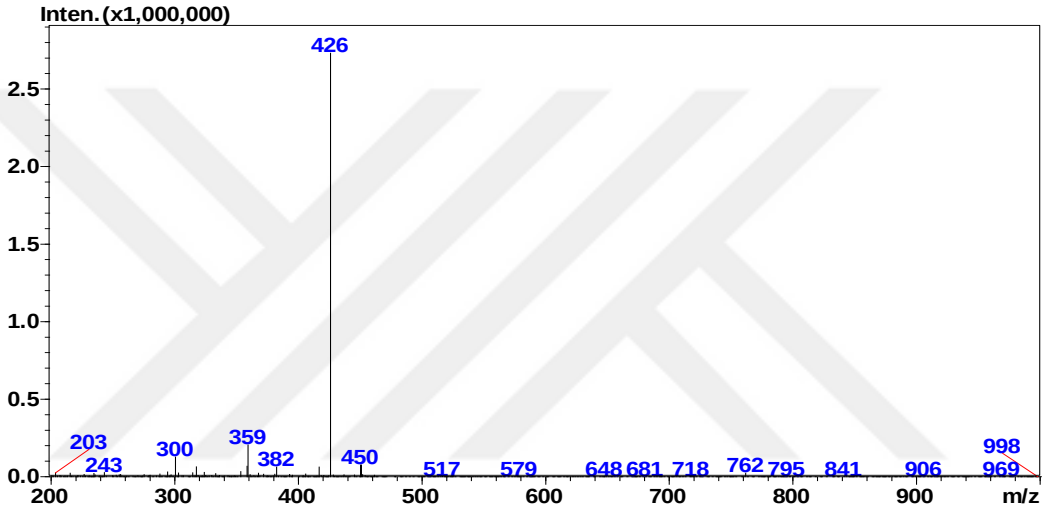


Şekil 4. 4 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin LC kromatogramı

Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen dizi LC-MS cihazının MS iyonlastırma ünitesinde, ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırıldı. Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait toplam iyon kromatogramı Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 5 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4. 6 Ham lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin MS spektrumu

LC kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında gözlenen pike ait 142,75; 122,15; 425,65; 188,00 iyonları kullanılarak deneysel molekül ağırlığı Denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$[M + 6H^+]^{+6}$ = 142,75 → MW = 847,5 Da

$[M + 7H^+]^{+7}$ = 122,15 → MW = 848,05 Da

$[M + 2H^+]^{+2}$ = 425,65 → MW = 849,3 Da

$[M + H_2O^+ + 5H^+]^{+5}$ = 188,00 → MW = 845 Da

$M_{Wortalama}$ = 847,6875 Da

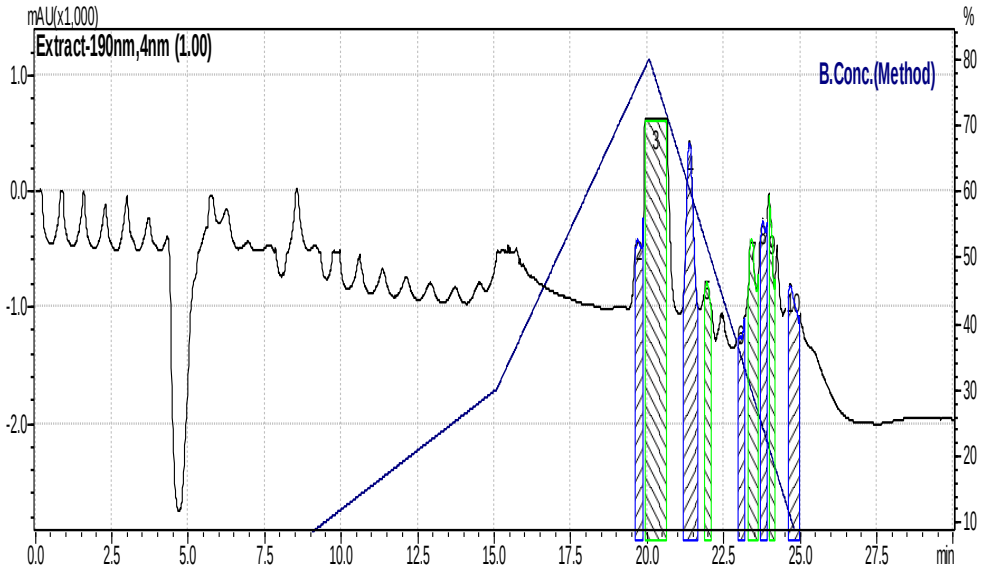
Sentezlenen lezzetli peptit dizisinden türetilen peptit dizisinin deneysel molekül ağırlığı 847,6875 Da olarak hesaplanmıştır. Peptit dizisinin teorik olarak molekül ağırlığı

'Bachem peptide calculator' programı yardımıyla 847,8774 Da olarak hesaplanmıştır. LC-MS kullanırak hesaplanan deneysel molekül ağırlığının programdan hesaplanan molekül ağırlığına benzer çıktığı görülmektedir. Deneysel hata %0.022 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda lezzetli peptit dizisinin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir.

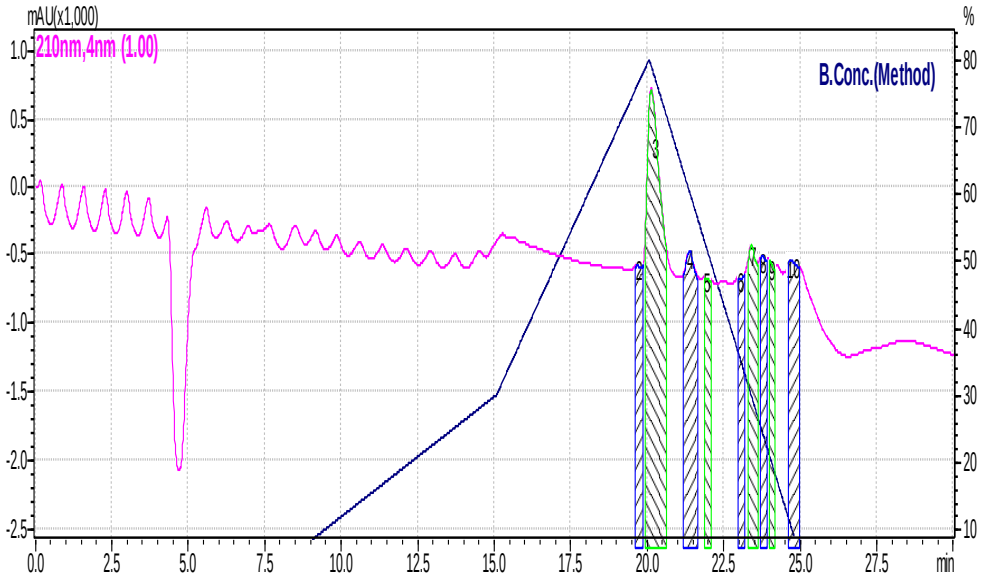
4.1.3 Lezzetli Peptit Dizisinin HPLC Analizleri

LC-MS cihazı yardımıyla molekül ağırlığı analizi yapılan lezzetli peptit dizisinin HPLC sistemi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Kromatogramda çıkan her bir farklı pik fraksiyonlanarak toplandı. Her bir pik için LC-MS cihazında karakter analizi gerçekleştirildi. HPLC sisteminde analiz aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

- Akış hızı: 14 mL/dak
- Mobil Faz A: Su (%0,1 Formik Asit)
- Mobil Faz B:Asetonitril (%0,1 Formik Asit)
- Kolon: Shimadzu PRC-ODS 30x2,1
- UV Dedektör: 210 nm, 280 nm, 190 nm



Şekil 4. 7 Lezzetli peptit dizisine ait 190 nm'de elde edilen kromatogram



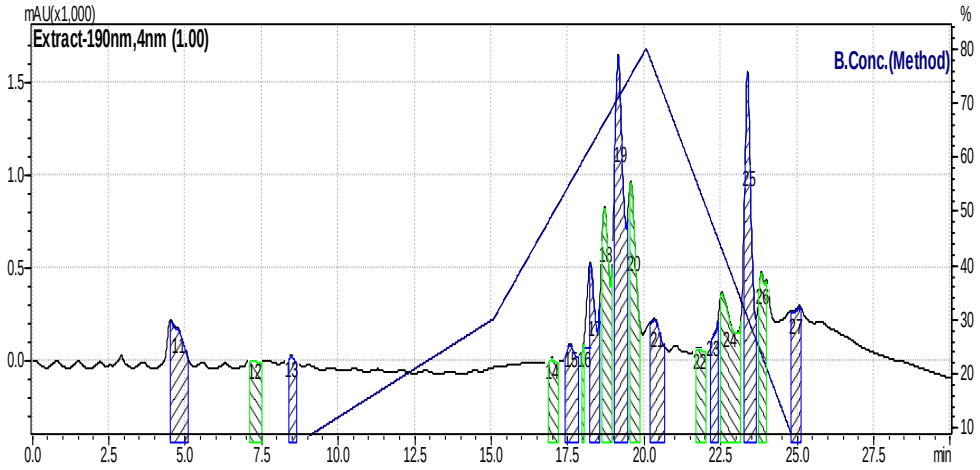
Şekil 4. 8 Lezzetli peptit dizisine ait 210 nm'de elde edilen kromatogram

Şekil 4.7 ve Şeki 4.8'deki HPLC kromatogramlarına ait pikler ayrı ayrı tüplerde toplandı ve bu örnekler karakterizasyon için LC-MS cihazına verildi. Fraksiyonlanan örneklerin MS spektrumu sonuçlarına göre 3 numaralı pikin peptide ait olduğu saptandı.

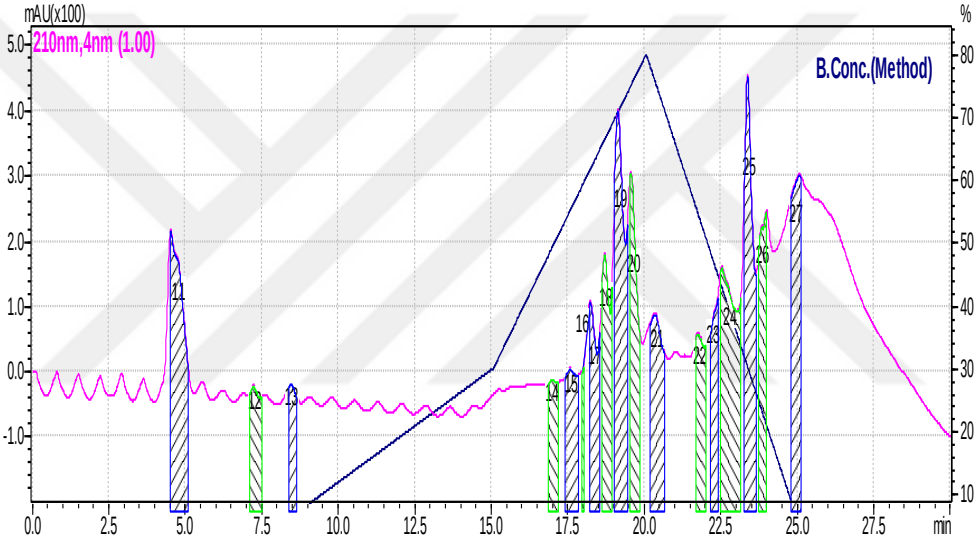
4.1.4 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin HPLC Analizleri

LC-MS cihazı yardımıyla molekül ağırlığı analizi yapılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin HPLC sistemi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Kromatogramda çıkan her bir farklı pik fraksiyonlanarak toplandı. Her bir pik için LC-MS cihazında karakter analizi gerçekleştirildi. HPLC sisteminde analiz aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

- Akış hızı: 14 mL/dak
- Mobil Faz A: Su (%0,1 Formik Asit)
- Mobil Faz B:Asetonitril (%0,1 Formik Asit)
- Kolon: Shimadzu PRC-ODS 30x2,1
- UV Dedektör: 210 nm, 280 nm, 190 nm



Şekil 4. 9 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 190 nm'de elde edilen kromatogram

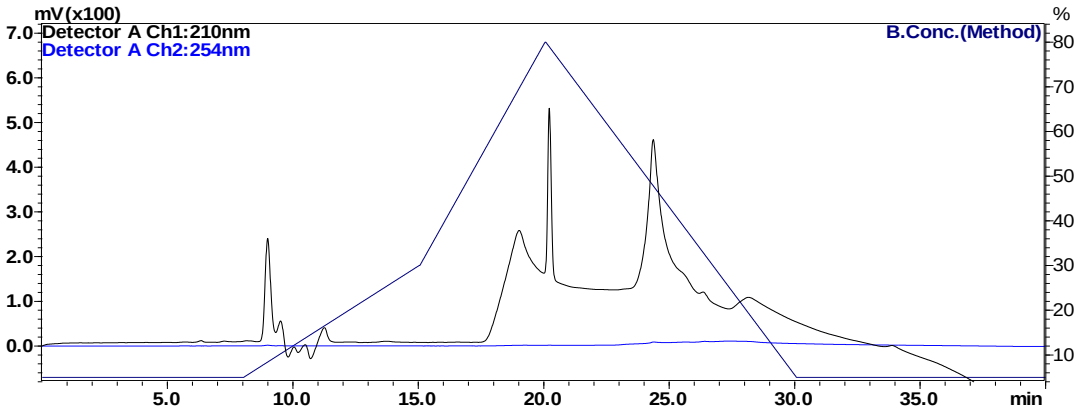


Şekil 4. 10 Lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 210 nm'de elde edilen kromatogram

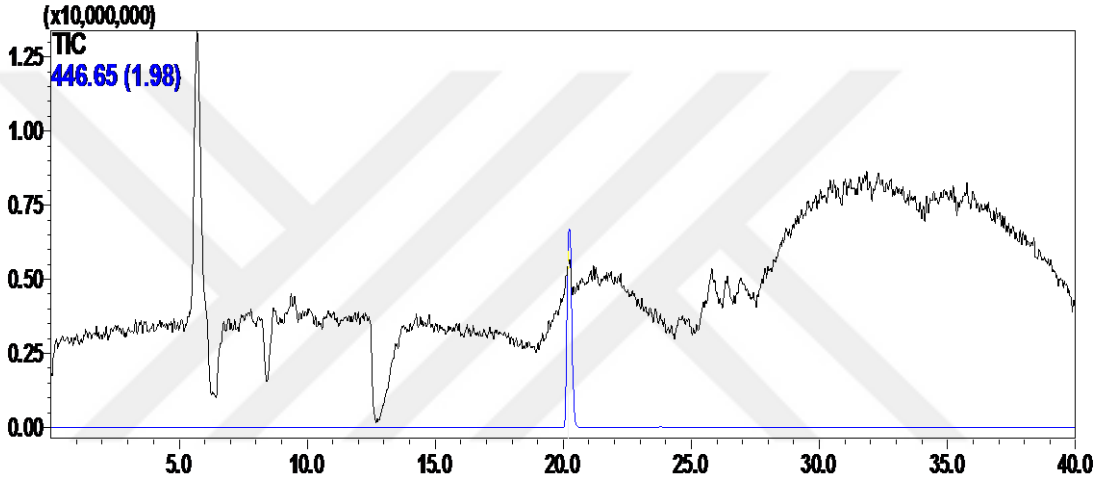
Şekil 4.9 ve Şeki 4.10'daki HPLC kromatogramlarına ait pikler ayrı ayrı tüplerde toplandı ve bu örnekler karakterizasyon için LC-MS cihazına verildi. Fraksiyonlanan örneklerin MS spektrumu sonuçlarına göre 19 numaralı pikin peptide ait olduğu saptandı.

4.1.5 Saflaştırma İşlemi Gerçekleştirilen Lezzetli Peptit Dizisinin LC-MS Analizleri

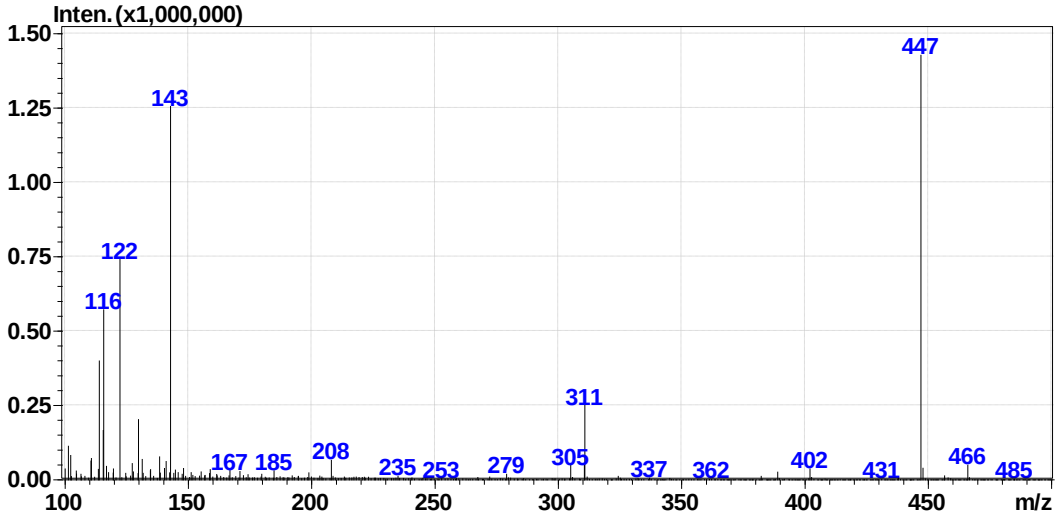
Şekil 4.11 - Şekil 4.13'te saflaştırılmış peptidin UV kromatogramları, toplam iyon kromatogramları ve pike ait kütle spektrumları verildi.



Şekil 4. 11 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin LC kromatogramı



Şekil 4. 12 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin toplam iyon kromatogramı



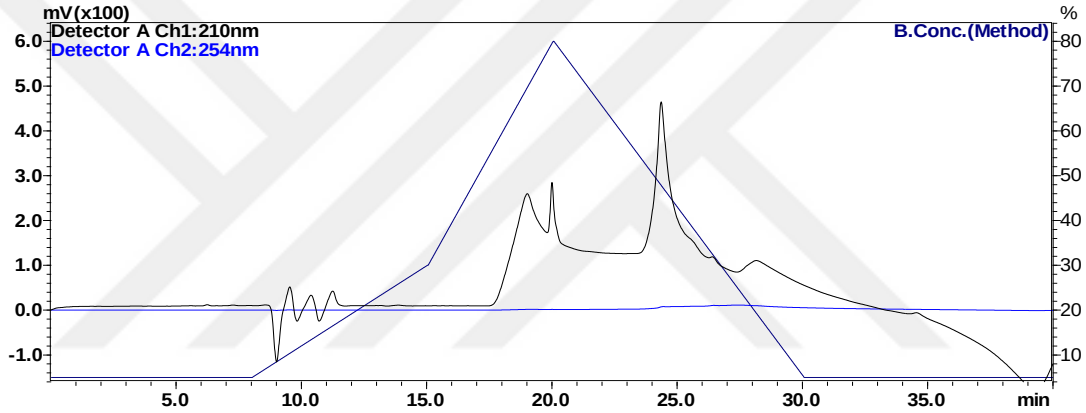
Şekil 4. 13 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin MS spektrumu

Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinin UV kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında yaklaşık 20. dakika gözlenen pike ait kütle spektrumunda 446,65 iyonu kullanılarak deneysel molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

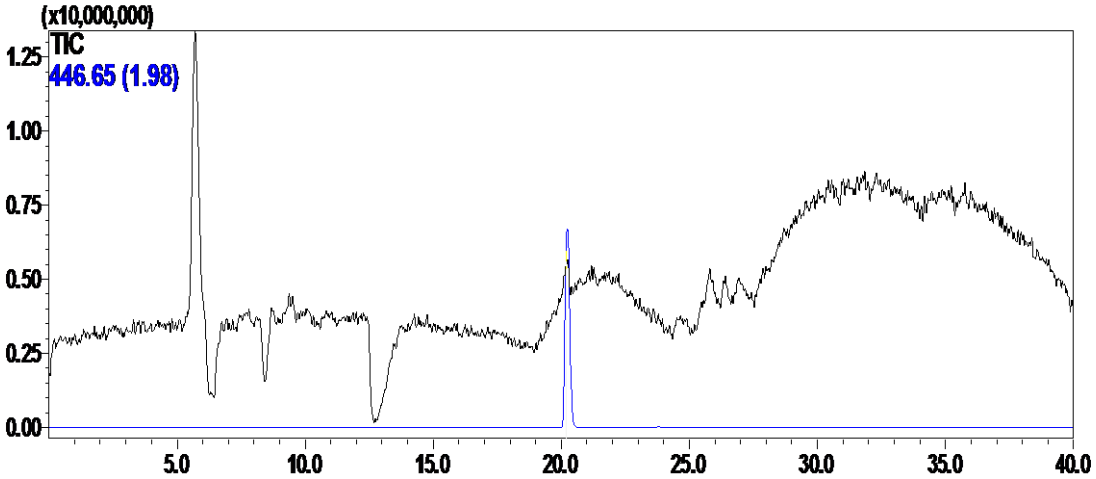
$[M + Na^+ + 2H+]+2 = 446,65 \rightarrow MW = 845,3$ Da

Fraksiyonlama sonucu elde edilen pikin UV kromatogramları incelendiğinde saf olarak elde edildiği görülmektedir. Elde edilen pikin MS spekturumundan peptidin molekül ağırlığı 845,3 Da olarak bulunmuştur. Deneysel hata %0,3 olarak hesaplanmıştır.

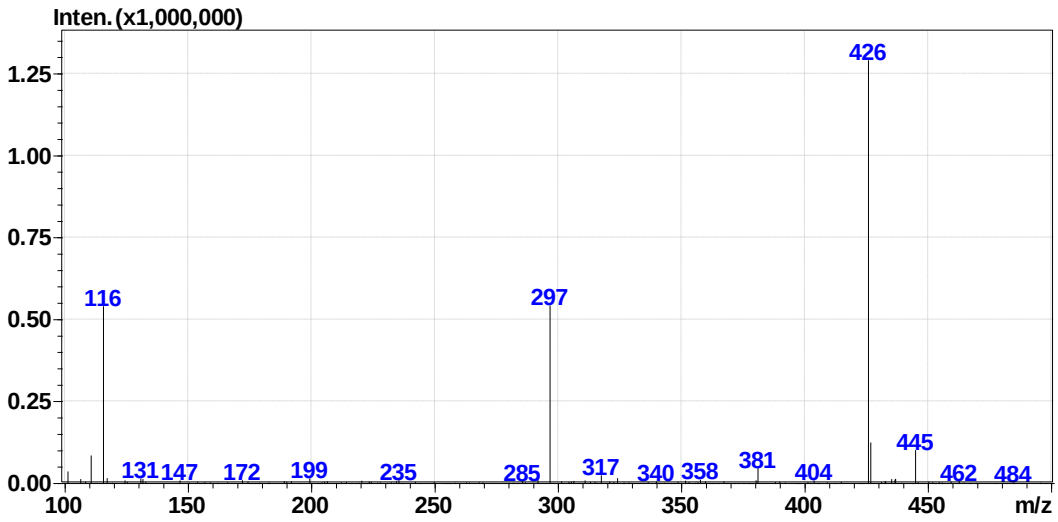
4.1.6 Saflaştırma İşlemi Gerçekleştirilen Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin LC-MS Analizleri



Şekil 4. 14 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin LC kromatogramı



Şekil 4. 15 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin toplam iyon kromatogramı



Şekil 4. 16 Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin MS spektrumu

Saflaştırılan lezzetli peptit dizisinden türetilen dizinin UV kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında yaklaşık 20. dakika gözlenen pike ait kütle spektrumunda 446,65 iyonu kullanılarak deneysel molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

$[M + Na^+ + 2H^+]^{+2} = 446,65 \rightarrow MW = 845,3$ Da

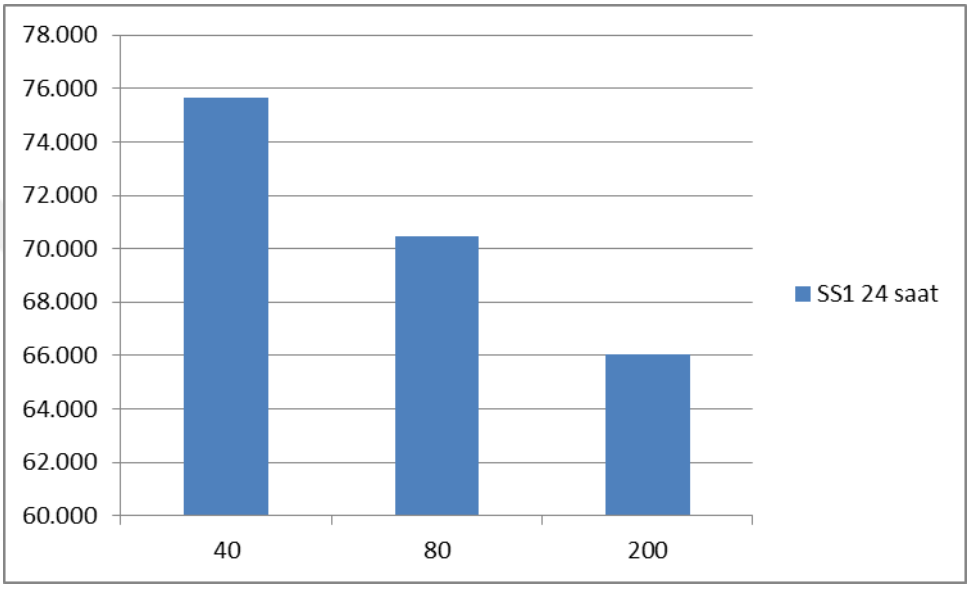
Fraksiyonlama sonucu elde edilen pikin UV kromatogramları incelendiğinde saf olarak elde edildiği görülmektedir. Elde edilen pikin MS spekturumundan peptidin molekül ağırlığı 845,3 Da olarak bulunmuştur. Deneysel hata %0,3 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7 Lezzetli Peptit Dizisine Ait MTT Analizleri

Lezzetli peptit dizisine ait saflaştırma sonrası (SS1) grafiklerinin ve tabloların 24 saat ve 48 saatlik değerleri Şekil 4.17-Şekil 4. 18 ve Çizelge 4.1-Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 24 saatlik % canlılık değerleri

Konsantrasyon	40 µg/µL	80 µg/µL	200 µg/µL
% canlılık	75.638	70.454	66.068

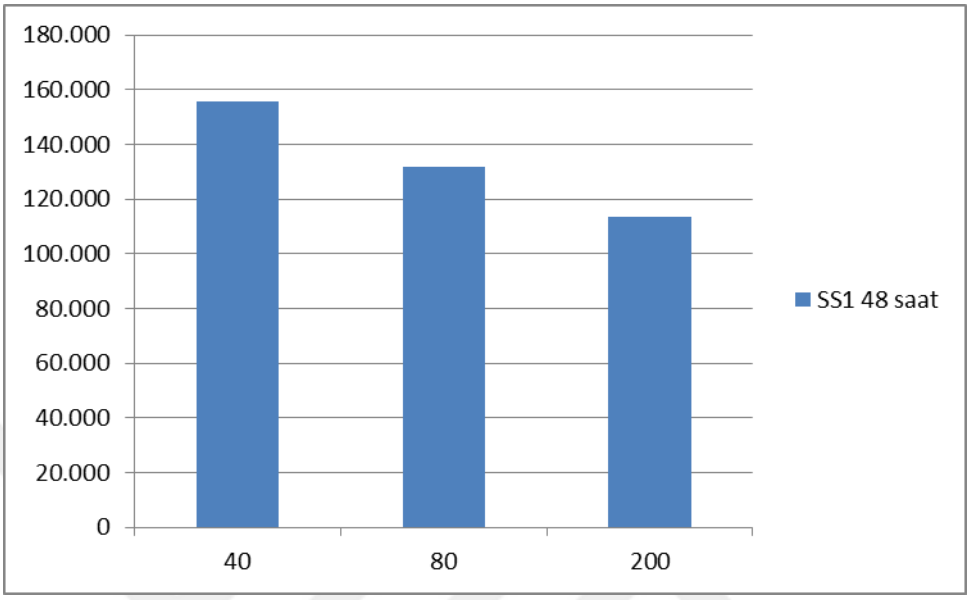


Şekil 4. 17 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 24 sattlik % canlılık grafiği

SS1 numunesinin 24 saatlik MTT analizi sonrasında elde edilen grafik ve çizelge Şekil 4.17 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir. Numunelerin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla gerçekleştirilen MTT analizleri sonucunda SS1 numunesinin artan konsantrasyon uygulamaları ile hücre canlılığında azalış meydana geldiği görülmüştür.

Çizelge 4. 2 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 48 saatlik % canlılık değerleri

Konsantrasyon	40 µg/µL	80 µg/µL	200 µg/µL
% canlılık	155.545	131.627	113.480



Şekil 4. 18 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisine ait 48 sattlik % canlılık grafiği

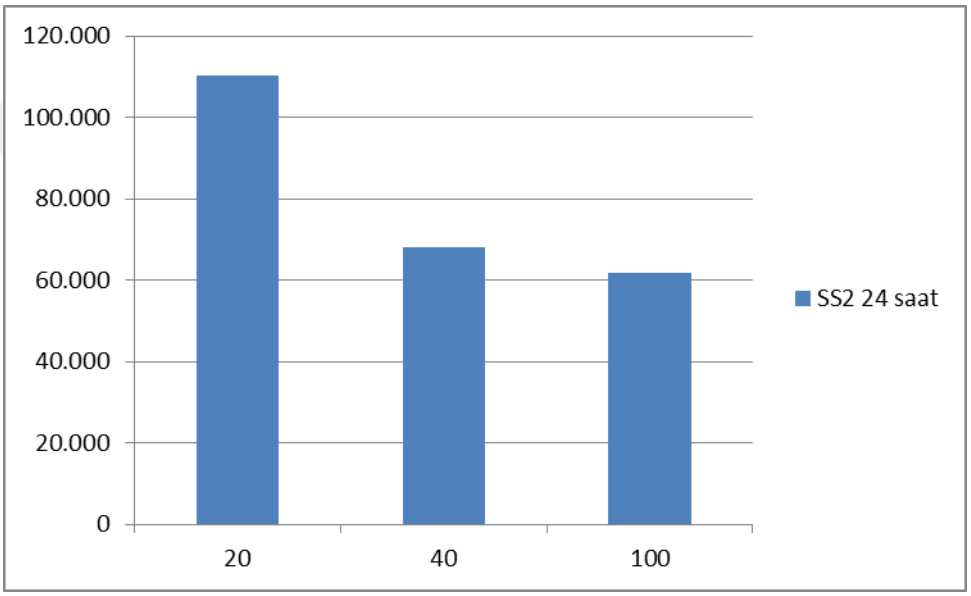
SS1 numunesinin 48 saatlik MTT analizi sonrasında elde edilen grafik ve çizelge Şekil 4.18 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Numunelerin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla gerçekleştirilen MTT analizleri sonucunda SS1 numunesinin artan konsantrasyon uygulamaları ile hücre canlılığında azalış meydana geldiği görülmüştür. 40 µg/µL, 80 µg/µL ve 200 µg/µL'lik konsantrasyonda hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir.

4.1.8 Lezzetli Peptit Dizisinden Türetilen Dizinin MTT Analizleri

Lezzetli peptit dizisinden türetilmiş diziye ait saflaştırma sonrası (SS2) grafiklerinin ve tabloların 24 saat ve 48 saatlik değerleri Şekil 4.19 – Şekil 4.20 ve Çizelge 4.3 – Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 24 saatlik % canlılık değerleri

Konsantrasyon	20 µg/µL	40 µg/µL	100 µg/µL
% canlılık	110.176	67.976	61.784

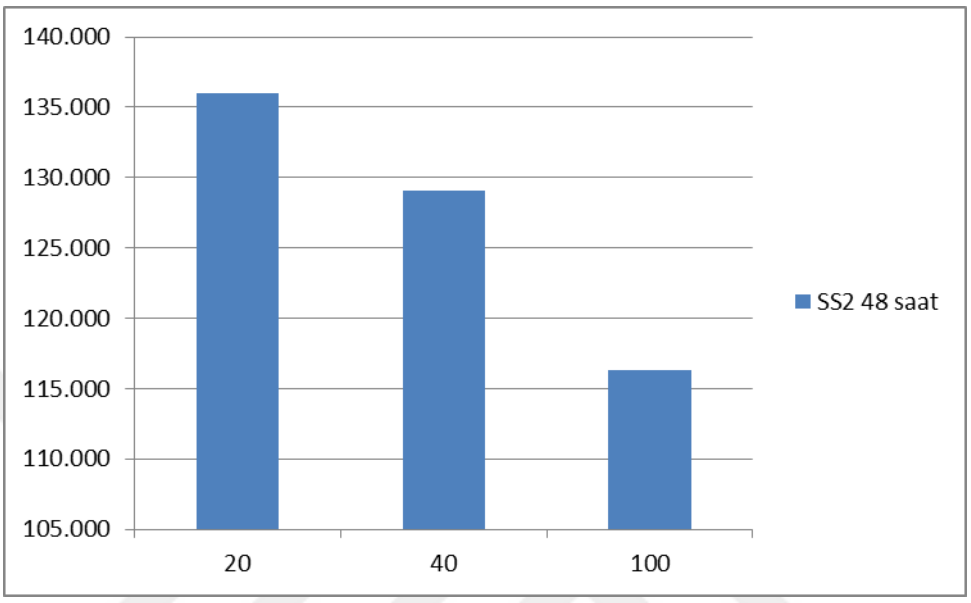


Şekil 4. 19 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 24 saatlik % canlılık grafiği

SS2 numunesinin 24 saatlik MTT analizi sonrasında elde edilen grafik ve çizelge Şekil 4.19 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. Numunelerin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla gerçekleştirilen MTT analizleri sonucunda SS2 numunesinin artan konsantrasyon uygulamaları ile hücre canlılığında azalış meydana geldiği görülmüştür. 20 µg/µL'lik konsantrasyonda hücre canlılığında artış gözlenirken bu konsantrasyonun üzerindeki değerlerde hücre canlılığının farkedilebilir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4. 4 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 48 saatlik % canlılık değerleri

Konsantrasyon	20 µg/µL	40 µg/µL	100 µg/µL
% canlılık	135.961	129.097	116.353



Şekil 4. 20 Saflaştırma sonrası lezzetli peptit dizisinden türetilen diziye ait 48 saatlik % canlılık grafiği

SS2 numunesinin 48 saatlik MTT analizi sonrasında elde edilen grafik ve çizelge Şekil 4.20 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Numunelerin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla gerçekleştirilen MTT analizleri sonucunda SS2 numunesinin artan konsantrasyon uygulamaları ile hücre canlılığında azalış meydana geldiği görülmüştür. 20 µg/µL, 40 µg/µL ve 100 µg/µL'lik konsantrasyonda hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Üzerinde fazlaca çalışma yapılan aminoasitler D ve L konfigürasyonlarına göre farklı tat özellikleri sergilemektedirler. Bu tat özellikleri farklı aminoasit kombinasyonlarıyla değişiklik göstermektedir. Burdan yola çıkarak aminoasitlerden oluşan peptit moleküllerinin tat özelliklerine sahip olduğunu söylemek literatürde bulunan çoğu çalışmayla da mümkün olmuştur.

Bu tez çalışmasında ilk aşama olarak günümüz gıda sektöründe aroma verici madde olarak kullanılan kimyasal maddelere alternatif olması amacıyla daha önce sığır çorbasından elde edilen ve et tadı verdiği tespit edilen "lezzetli peptit" olarak anılan dizi (NH2-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala-COOH) mikrodalga destekli katı faz peptit sentezi yöntemiyle (SPPS) sentezlenmiştir. Sentezlenen dizinin karakterizasyon işlemi LC-MS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LC kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında 15. dakika civarı gözlenen pike ait 170,05; 142,05; 211,35; 447,00 iyonları kullanılarak deneysel molekül ağırlığı 844,7375 Da olarak hesaplanmıştır. Peptit dizisinin teorik olarak molekül ağırlığı 'Bachem peptide calculator' programı yardımıyla 847,8774 Da olarak hesaplanmıştır. LC-MS kullanırak hesaplanan deneysel molekül ağırlığının programdan hesaplanan molekül ağırlığına benzer çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda lezzetli peptit dizisinin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir. Daha sonrasında HPLC kromatogramlarında belirlenen pikler toplanmıştır ve bu piklerin karakterizasyon analizleri tekrar LC-MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toplanan fraksiyonların MS spektrum sonuçlarına göre 3 numaralı pikin peptide ait olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan peptide ait MS spektrumda ham

peptid ile aynı iyonlar gözlemlenerek peptidin molekül ağırlığı saflaştırmadan sonrada benzer şekilde hesaplanmıştır.

Lezzetli peptit dizisinde bulunan bazı aminoasitlerin yerine aynı tat özelliği gösteren farklı aminoasitlerin kullanılmasıyla yeni bir dizi türetilmiş (NH_2-Lys-Ala-Asp-Glu-Asp-Ser-Leu-Ala-COOH) ve bu dizinin de sırasıyla aynı protokolde sentez, karakterizasyon ve saflaştırma işlemleri yapılmıştır. LC kromatogramında ve toplam iyon kromatogramında gözlenen pike ait 142,75; 122,15; 425,65; 188,00 iyonları kullanılarak deneysel molekül ağırlığı 847,6875 Da olarak hesaplanmıştır. Peptit dizisinin teorik olarak molekül ağırlığı 'Bachem peptide calculator' programı yardımıyla 847,8774 Da olarak hesaplanmıştır. LC-MS kullanırak hesaplanan deneysel molekül ağırlığının programdan hesaplanan molekül ağırlığına benzer çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda lezzetli peptit dizisinin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir. Daha sonrasında HPLC kromatogramlarında belirlenen pikler toplanmıştır ve bu piklerin karakterizasyon analizleri tekrar LC-MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toplanan fraksiyonların MS spektrum sonuçlarına göre 19 numaralı pikin peptide ait olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan peptide ait MS spektrumda ham peptid ile aynı iyonlar gözlemlenerek peptidin molekül ağırlığı saflaştırmadan sonrada benzer şekilde hesaplanmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında sentezlenen peptit dizilerinin saflaştırma sonrası sitotoksisite çalışmalarının test edilebilmesi amacıyla MCF-7 hücre hattı üzerinde uygulama yapıldı. Bu hücreler üzerinde 24 ve 48 saatlik MTT analizleri gerçekleştirildi. Sentezlenen peptit dizilerinin hücre canlılıkları üzerindeki etkisini belirlemek üzere MTT testi, farklı konsantrasyonlarda lezzetli peptit dizisi için sırasıyla 40 µg/µL, 80 µg/µL ve 200 µg/µL; lezzetli peptit dizisinden türetilen dizi için 20 µg/µL, 40 µg/µL ve 100 µg/µL uygulanarak hücre canlılık oranları belirlenmiştir.

Uygulanan testlerin sonucunda sonrası her iki peptit dizisinin de hücreler üzerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuca hücrelerin daha uzun süre örneklerle muamele edildiği 48 saatlik MTT sonuçlarının 24 saatlik MTT sonuçlarıyla kıyaslandığında canlılığın artmasının görülmesiyle varılmaktadır. Ancak hücre canlılığı grafiklerinde görüldüğü gibi her bir örneğin artan konsantrasyon uygulamalarında hücre canlılık oranında azalma görülmektedir.

Bu tez çalışmasında sentezlenen peptit dizileri daha sonra duyusal analizleri yapılmak üzere elektronik dil veya elektronik burun cihazlarında test edilebilir.

Örneklerin toksik etkilerinin belirlenebilmesi adına hücre deneylerinde hücreler daha yüksek konsantrasyonlarda örnekler ile muamele edilebilir.

Toksisite çalışmaları farklı hücre hatları üzerinde denenebilir. Bunun için kanser hücrelerinden farklı olarak fibroblast hücreleri üzerinde çalışmalar yapılabilir.

Farklı tat özellikleri elde edebilmek adına dizide farklı aminoasit kombinasyonları denenerek duyusal analizleri gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

[1] Barrett, D.M., Beaulieu, J.C. ve Shewfelt, R., (2010). "Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement and the effects of processing", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50:369-389.

[2] Gatfield, I.L., (1988). "Production of flavour and aroma compounds by biotechnology", Food Technol, 10:110–122.

[3] Janssens, L., Pooter, H.L., Schamp, N.M. ve Vandamme, E.J., (1992). "Production of flavours by microorganisms", Process Biochemistry, 27:195-215.

[4] Longo, M.A. ve Sanromán, M.A., (2006). "Production of food aroma compounds", Food technology and biotechnology, 44:335-353.

[5] Urbach, G., (1997). "The Flavour of milk and dairy products, II. cheese: contribution of volatile compounds", International Journal of Dairy Technology, 50:79–89.

[6] Lindqvist, M., (2011). "Flavour improvement of water solutions comprising bitter amino acids", Food Science, 77:321.

[7] Bayrak, A., (2006). Gıda aromaları, Ankara: Baran Ofset.

[8] Rodriguez-Bustamante, E. ve S´anchez, S., (2007). "Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage", Informa Healthcare, 33:211-230.

[9] Sell, C.S., (2006). The chemistry of fragrances: From perfumer to consumer, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

[10] Armstrong, D.W. ve Yamazak, H., (1986). "A biotechnological approach, Natural Flavours Production", Trends in Biotechnological, 4:264-268.

[11] Soares, M.P., Pandey, A., Raimbault, M. ve Soccol, C.R., (2000). "A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue", Bioprocess Engineering, 23:695-699.

[12] Berger, R.G., (2007). Flavours and fragrances chemistry, Bioprocessing and sustainability, Berlin Heidelberg: Springer.

[13] Kaya, N., (2014). Yeni Tat Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

[14] Bölüknaşı, B., (2006). Aroma Üretİmİ Yapan Fİrmalarda Uygulanacak Haccp Kriterlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

[15] Deveci, E., (2012). Yenilebilir Bazı Mantarların Aroma Bileşenlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sitki Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.

[16] Juerg, S., (1969). "Taste of amino acids, peptides, and proteins", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 4:686–688.

[17] Yamasaki, Y. ve Maekawa, K., (1978). "A peptide with a delicious taste", Agricultural and Biological Chemistry, 42:1761.

[18] Tamura, M., (1989). "The relationship between taste and primary structure of “delicious peptide”(Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup", Agricultural and Biological Chemistry, 53.2:319-325.

[19] Nelson, L.N. ve Cox, M.M., (2005). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayınları, Ankara.

[20] Aminoacids Structure, http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/gk2x24.gif, 5 Mayıs 2017.

[21] Aminoacids, http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/amino_acid.gif, 5 Mayıs 2017.

[22] Özdemir, Z.Ö., (2008). Sentetik Viral Pepetitler Kullanılarak Polielektrolit Esaslı Biyokonjugatların Geliştirilmesi. Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[23] Garrett, R.H. ve Grisham, C.M., (1996). Biochemistry: Harcourt College Pub.

[24] Pauling, L., (1950). College Chemistry Introductory Textbook of General Chemistry.

[25] İşcanı, B., (2007). Hepatit B yüzey antijeni 95-109 peptid dizisinin sentezi ve polielektrolitler ile suda çözünebilen biyokonjugatlarının geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[26] Coin, I., Beyermann, M., ve Bienert, M., (2007). "Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences", Nature Protocols, 2:3247-3256.

[27] Yajima, H. ve Nobutaka, F., (1980). "Chemical synthesis of bovine pancreatic ribonuclease A", Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 3:115-116.

[28] Merrifield, R.B., (1963). "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide", Journal of the American Chemical Society, 85:2149–2154.

[29] Amblard, M., (2006). "Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis", Molecular biotechnology, 33.3:239-254.

[30] Sewald, N., ve Jakubke, H.D., (2015). Peptides: Chemistry and Biology: John Wiley & Sons.

[31] José, G., (2003). Design and Synthesis of Handles for Solid-phase Peptide Synthesis and Convergent Peptide Synthesis: Louisiana State University.

[32] Lloyd-Williams, P., Albericio, F. ve Giralt, E., (1997). Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins Florida.

[33] Merrifield, B., (1984). Solid phase Peptide Synthesis, The Rockefeller University: Nobel Lecture.

[34] Albericio, F., (2000). Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, New York: CRC Press

[35] Bernatowicz, M.S., Daniels, S.B. ve Köster, H., (1989). "A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides", Tetrahedron Letters, 30:4645–4648.

[36] Rink, H., (1987). "Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin", Tetrahedron Letters, 28:3787–3790.

[37] Sieber, P., (1987). "A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method", Tetrahedron Letters, 28:2107–2110.

[38] Howl, J., (2005). Peptide synthesis and applications: Humana Press Inc.

[39] Mergler, M., Nyfeler, R., Tanner, R., Gosteli, J. ve Grogg, P., (1988). "Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods II synthesis of fully protected peptide fragments on 2-methoxy-4-alkoxy-benzyl alcohol resin", Tetrahedron Letters, 29:4009–4012.

[40] Wang, S.-S., (1973). "p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments", Journal of the American Chemical Society, 95:1328-1333.

[41] Flörsheimer, A. ve Riniker, B., (1991). Solid-phase synthesis of peptides with the highly acid-sensitive HMPB linker, in Peptides. Proceedings of the 21st European Peptide Symposium ESCOM, Lieden, 131-133.

[42] Atherton, E. ve Sheppard, R.C., (1989). Solid Phase Synthesis; A Practical Approach: IRL Press.

[43] Salman, D., (1998). Hepatit B Yüzey Antijenleri Polipeptidlerin Kimyasal Yolla Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi. İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[44] Resins for Solid Phase Peptide Synthesis, https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Brochure/al_chemfile_v3_no4.pdf, 5 Mayıs 2017.

[45] Hoffman, R.V., (2004). Organic Chemistry, United States of America. John Wiley & Sons.

[46] Benoiton, N.L., (2005). Chemistry of Peptide Synthesis, New York: CRC Press.

[47] Pennington, M.W. ve Dunn, B.M., (1994). Peptide Synthesis Protocols, New Jersey: Humana Pres.

[48] Dorwald, F.Z., (2002). Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions, Dörwald Published Wiley-VCH Science.

[49] Meyers, R.A., (1995). Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference: Meyers Published Wiley-VCH Sciences.

[50] Chemistry of peptide synthesis, http://mason.gmu.edu/~bbishop1/chem468/Chem468peptsynth.pdf, 5 Mayıs 2017.

[51] Bhagavan, V.N., (2002). Medical Biochemistry: Jones & Bartlett Pub.

[52] Davies, J.S. ve Barret, G.C., (2002). Peptides and Proteins: Royal Society of Chemistry Published.

[53] Coupling Agents, http://www.chemsoc.org.uk/, 5 Mayıs 2017.

[54] Knecht, S., (2008). Development of New Tags for Solid-phase Peptide Synthesis. Yüksek Lisans Tezi, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Basel, Basel.

[55] Jakubke, H. ve N., S., (2008). Peptides from A to Z, Weinheim: Wiley-Vch.

[56] Reinhard, B., (2001). Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms: Academic Press.

[57] Yu, H.M., Chen, S.T. ve Wang, K.T., (1992). "Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation", Organic Chemistry 57:4781-4784.

[58] Liberty Blue Peptide Synthesizer, http://cem.com/liberty-blue/, 5 Mayıs 2017.

[59] Derman, S.A., (2012). Canine parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin sentezi ve biyokonjugatlarının geliştirilmesi, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[60] Kappe, C.O., (2004). "Controlled microwave heating in modern organic synthesis", Angewandte Chemie International Edition, 43:6250-6284.

[61] Collins Jr, M.J., (2010). "Future trends in microwave synthesis", Future, 2:151-155.

[62] Hayes, B.L., (2002). Microwave synthesis: chemistry at the speed of light, Matthews, North Carolina: CEM publishing.

[63] Murray, J.K. ve Gellman, S.H., (2005). "Application of microwave irradiation to the synthesis of 14-helical β-peptides ", Organic letters, 7:1517-1520.

[64] HPLC/MS cihazı, http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Waters_HPLC_MS_TitlePg.html, 5 Mayıs 2017.

[65] Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sanger, M., Schmidberger, H. ve Langguth, P., (2012). "Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study", Radiation oncology, 7.

[66] Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", J Immunol Methods, 65:55-63.

[67] İşcanı Eroğlu, B., (2014). Alzheimer Amiloid Beta Peptidine Ait Farklı Amino Asid Dizilerinin Polielektrolitler İle Konjugasyon Reaksiyonlarinin İncelenmesi. Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Seda AVERBEK

Doğum Tarihi ve Yeri : 11.04.1992 / İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : seda.averbek@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Mehmet Niyazi Altuğ Anadolu Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi DETAM	Stajer
2014	Sanovel	Stajer

YAYINLARI

Bildiri

1. Seda Averbek, Sevil Yücel, Tayfun Acar, Zeynep Mustafaeva, Nanoteknolojide Peptitlerin Kullanımı, V. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi 9-10 Mart 2017, İstanbul, Türkiye.