

CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATION OF TRYPSIN CATALYZED PEPTIDE SYNTHESIS TRİPSİN KATALİZÖRLÜĞÜNDEKİ PEPTİD SENTEZLERİNİN KROMATOĞRAFİK İNCELEMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU*, Ayten SAĞIROĞLU**

ÖZET

Çalışmamızda homojen ve bifazik reaksiyon sistemlerinde glisin ile dört farklı amino asit (prolin, tirozin, histidin ve triptofan) arasında tripsin katalizörlüğündeki peptid sentezleri yapıldı. Çözücü ve reaksiyon ortamı olarak izo propanol, izo amilalkol, etilmetil keton, benzen ve izo oktan'ın peptid sentezlerine etkisi incelendi.

Ayrıca peptid oluşumu üzerine ortamın su içeriğinin etkisini incelemek amacıyla %5, 10, 15, 20 oranlarında fosfat tamponu (0.1M, pH:8) içeren izo propanol, izo amilalkol ve etilmetil keton çözücülü reaksiyon ortamlarında peptid bağı oluşumu gerçekleştirildi. En iyi peptid oluşumu, %10-15 oranlarında tampon içeren etilmetil keton çözücülü reaksiyon karışımlarında gerçekleşti. İzo propanol ve izo amilalkol çözücülü reaksiyonlarda değişik oranlarda peptidler sentezlenirken, benzen ve izo oktan karışımlarında peptid ürünlerine rastlanmadı. Reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonunda kağıt ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanıldı.

CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATION OF TRYPSIN CATALYZED PEPTIDE SYNTHESIS

SUMMARY

In our study, the peptide synthesis catalyzed by trypsin between four different amino acids (prolin, tyrosin, histidin and tryptophan) and glicine were performed in biphasic and homogen systems. It was determined that effect of iso octane and bensen, ethylmethyl ketone, iso amylalcohol, iso propanol as reaction medium and solvent on peptide synthesis.

Moreover, In order to determine effect of water content (5, 10, 15, 20%) in the reaction medium, peptide synthesis were carried out in ethylmethyl ketone and iso amylalcohol, iso propanol. The best of peptide formation obtained with ethylmethyl ketone which consist of 10-15% buffer. In presence of bensen and iso octane, the expected peptide products were not obtained but peptides were synthesized with iso amylalcohol and iso propanol.

The product analysis were carried out by using the paper and thin-layer chromatography.

*Araş.Gör.Dr.Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

** Yrd.Doç.Dr.Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

GİRİŞ

Son yıllarda sentetik kimyada enzimlerin uygulamaları üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin proteazlar; ester, amid ve peptid bağlarının oluşumu reaksiyonlarında kullanılmaktadırlar. Proteaz katalizörlü sentezlerin başlıca avantajları arasında; ılımlı reaksiyon şartları, rasemizasyonun minimum olması, substratlarına karşı seçicilikleri ve yan reaksiyonların olmaması sayılabilir. Peptid bağının hidrolizi ve oluşumu bir denge reaksiyonudur. Peptid bağının oluşumunu kolaylaştırmak için, dengenin peptidleşme lehine değişmesini sağlayan şartlar belirlenmelidir. Bunun için sentezler bifazik sistemde ve yüksek konsantrasyonlu organik çözücü varlığında yapılmaktadır.¹⁻⁵ Enzimatik peptid sentezi reaksiyonlarında suyun minimum ve optimize edilen miktarda kullanılması gerekir. Reaksiyon verimi, reaksiyon ortamının kapsadığı suyun miktarına bağlıdır.^{6,7}

Peptid bağlarının organik çözücülerdeki enzimatik sentezlerinde ortamdaki suyun önemini belirlemek için immobilize edilmiş proteazlar içinde en çok α -ki motripsin kullanılmıştır.⁸ Enzimler genelde organik çözücülerle doğrudan temas ettiklerinde aktivitelerini kaybederler. Bu problemi gidermek için proteaz katalizörlü peptid ya da ester sentezlerinde su içeren bifazik reaksiyon sistemleri kullanılmıştır. Bu reaksiyon sistemlerinde enzimler sulu fazda çözünürleştirilmiş ya da hidrofilik destekler üzerine immobilize edilmiş, böylece organik çözücülerle doğrudan teması engellenmiş ve inaktivasyonu önlenmiştir.^{9,10} Doğrudan sulu ortamda yapılması tercih edilmeyen ester ve peptidlerin sentezlenmelerinde olduğu gibi birçok sentez prosesinde termodinamik denge için su-organik faz oranı çok önemlidir. Böylece özel ürünlerin sentezine imkan sağlanabildiği gibi atıkların da azaltılması avantajı yakalanabilir.¹¹

MATERYAL ve METOD

Materyal

L-prolin, L-tirozin, L-histidin, DL-triptofan, glisin, amino asitleri ile tripsin enzimi (E.C. 3.4.21.4) Sigma Chem. Co'dan sağlandı. Metil alkol, etilmetil keton, izo propanol, izo amilalkol, izo oktan, n-butanol, aseton, piridin, benzen, glasiyel asetik asit, heksan, ninhidrin, silikajel G-60, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck Darmstadt, Almanya'dan temin edildi.

Peptidlerin sentezlerinde 537 model pH metre, WTW firmasının E50 tipi kombine elektrodu, Desaga Nr. 13/200 UV-Lamba (254/366 nm), Kottermann Labor teknik model termostatlı ve çalkalayıcı su banyosu ve ince tabaka seti kullanıldı.

Metod

Peptidleşme Reaksiyonları

Çalışmamızda tripsin enzimi kullanılarak peptid bağlarının sentezleri incelenmiştir. Glisin amino asidi ile dipeptid oluşturmak amacıyla prolin, tirozin, histidin ve triptofan amino asitleri farklı yapıları nedeniyle seçildi. Reaksiyonlar iki aşamada gerçekleştirildi:

İlk olarak reaksiyon ortamındaki çözücü cinsinin peptidleşmeye etkisi incelendi. Bunun için farklı polaritelerde izo propanol, izo amilalkol, etilmetil keton, izo oktan ve benzen çözücüleri fosfat tamponuyla (0.1M, pH:8) çalkalanıp doyuruldu. Reaksiyon kabı; tamponlanmış organik çözücü (9mL), glisin (200mM), diğer amino asitler (500mM), tripsin (1mg) ve amino asitlerin çözünürlüğünün artması için metil alkol (1mL) içeriyordu. Reaksiyonlar 25°C'de 20 saat sürede termostatlı çalkalayıcıda (200 rpm) gerçekleştirildi.

İkinci aşamada, reaksiyon ortamı olarak en iyi ürün veren organik ortamın cinsi belirlendikten sonra ortamın su içeriğinin optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla % 5, 10, 15, 20 oranlarında tampon içeren çözücü ortamları kullanılarak peptidleşme reaksiyonları yapıldı.

Analizler

Ürünlerin analizinde kağıt kromatografisi (PC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) teknikleri kullanıldı. Uygun çözücü sistemleri ile amino asit ve peptidlerin ayrılmasında bu yöntemler en iyi kalitatif ve istenirse kantitatif sonuç alınabilen tekniklerdir. PC için; Wattmann No:1 kağıdı üzerine amino asit standartları ve örnekler uygulandı. Kullanılan çözücü sistem n-butanol/piridin/su (16/16/16) dır. Ürün ve reaktiflerin belirlenmesi ninhidrin çözeltisi ile gerçekleştirildi. TLC ise silika jel G-60 adsorbanı üzerinde n-butanol/ glasiyel asetik asit/su (24/6/10) çözücü sistemi içinde yapıldı.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tripsin enziminin lizin-arginin gibi bazik amino asit bağlarına karşı hidrolaz aktivitesi bilinmektedir. Ancak son yıllarda tripsinin peptidasyon ve esterifikasyon aktivitesine etkileri de çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.^{2,3}

Peptid oluşumu reaksiyonlarına geçmeden önce, kullanılan çözücülerle reaktif amino asitler arasında olabilecek etkileşmeleri belirlemek amacıyla ayrı ayrı her amino asidin reaksiyonlarda kullanılan miktarları, tripsin varlığında çalkalanıp bekletilerek herbirinin kağıt ve ince tabaka kromatografileri alındı. Bununla amaçlanan amino asit-çözücü etkileşmesinin (özellikle alkol çözücüleriyle esterleşme) olup olmadığının belirlenmesidir. Çünkü enzim katalizörlü ortamda beklenen peptid ürünleri yanında yan ürünler de önceden belirlendi, asıl reaksiyon ürünleriyle karşılaştırılarak ürün kompozisyonu daha doğru açıklandı. Buna göre izo amilalkol, etilmetil keton, benzen ve izo oktan çözücüleri ile kullanılan beş amino asidin hiçbiri, yeni bir ürün sentezini gerçekleştirmedi. Ancak izo propanol ile bütün amino asitlerin ester ürünü oluşturduğu gözlemlendi.

Uygun çözücü çeşidinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin analizleri sonunda benzen ve izo oktan çözücülerinde peptid ürününe rastlanmadı. Sadece reaktif amino asitlerin lekeleri bulundu. Sonuçlar Tablo I ve II de verildi. İzo amilalkol ve etilmetil keton çözücülerinde reaktiflerin dışında peptid ürünlerine ait lekeler belirlendi. İzo propanolde ise reaktiflerin dışında iki

ürün belirlendi. Bunlardan biri daha önce sözü edilen estere diğeri ise peptid ürününe aitti.

Reaksiyon ortamının içerdiği suyun optimizasyonu amacıyla izo propanol, izo amilalkol ve etilmetil keton çözücülerinin, en çok %10-15 su içerdikleri durumlarda peptid verimleri elde edildi. %5 ile %20 su içeren ortamlarda peptid lekelerine rastlanmadı. Buradan kromatografiyle tesbit edilebilir ölçüde ürün sentezlenemediği söylenebilir. Çünkü yüksek su içeriğinin reaksiyonu hidroliz lehine hızlandırdığı, düşük su içeriğinde ise organik çözücünün tripsini denatüre etmiş olabileceği sonucuna varılabilir.

Genel olarak analiz sonuçlarına göre daha yoğun peptid lekeleri etilmetil keton çözücüsü içeren ortamlarda gözlemlendi. Buna göre tripsin ile seçtiğimiz amino asitler arasındaki %10-15 su içeren peptidleşmelerde en uygun organik çözücü olarak etilmetil keton belirlendi.

Bu çalışmada, glisin ile diğeri amino asitler arasında oluşan peptidler iki izomer şeklinde de olabilir. Ancak hangisinin oluştuğu bizim kullandığımız yöntemlerle belirlenemez. Çalışmamızda tek peptid lekelerinin oluşmasını buna bağlıyoruz.

Tablo I. %15 su içeren organik çözücülü ortamlarda elde edilen dipeptidlerin kağıt kromatografisi ile hesaplanmış R_f değerleri ve renkleri.

Çözücü	Glisin+amino asit	$R_f \times 10^{-2}$	Renk
İzo amilalkol	Prolin	09	Sarı-kahverengi
	Tirozin	10	Sarı-kahverengi
	Histidin	08	Sarı-kahverengi
	Triptofan	09	Sarı-kahverengi
İzo propanol	Prolin	-	-
	Tirozin	-	-
	Histidin	-	-
	Triptofan	-	-
Etilmetil keton	Prolin	14	Sarı-kahverengi
	Tirozin	13	Sarı-kahverengi
	Histidin	17	Sarı-kahverengi
	Triptofan	20	Sarı-kahverengi

Tablo II. %15 su içeren ortamlarda elde edilen dipeptidlerin ince tabaka kromatografisi ile hesaplanmış R_f değerleri ve renkleri.

Çözücü	Glisin+amino asit	$R_f \times 10^{-2}$	Renk
İzo amilalkol	Prolin	-	-
	Tirozin	40	Kahverengi
	Histidin	39	Kahverengi
	Triptofan	37	Kahverengi
İzo propanol	Prolin	-	-
	Tirozin	25	Sarı
	Histidin	20	Mor
	Triptofan	25	Sarı
Etilmetil keton	Prolin	24	Açık sarı
	Tirozin	25	Açık sarı
	Histidin	22	Açık sarı
	Triptofan	20	Açık sarı

KAYNAKLAR

1. Bongers J. ve Heimer E. P., Recent applications of enzymatic peptide synthesis, *Peptides*, 15, 1, 183-193, 1994.
2. Blanco R. M., Alvaro G. ve Guisan J. M., Enzyme reaction engineering: design of peptide synthesis by stabilized trypsin, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 573-583, 1991.
3. Kise H. ve Hayakawa A., Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptid synthesis in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 584-599, 1991.
4. Blanco R. M., Alvaro G., Tercero J. C. ve Guisan J. M., Peptide synthesis by stabilized trypsin: industrial kinetic studies under extreme experimental conditions., *Journal of Molecular Catalysis*, 73, 97-113, 1992.
5. Gaertner H., Watanabe J. V., Sinisterra J. V., Puigserver A., Peptide synthesis catalyzed by modified α -chymotrypsin in low-water organic media, *J. Org. Chem.*, 56, 3149-3153, 1991.
6. Guinn R. M., Blanch H. W. ve Clark D. S., Effect of a water-miscible organic solvent on the kinetic and structural properties of trypsin, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 320-326, 1991.
7. Sears P. S. ve Clark D. S., Comparison of soluble and immobilized trypsin kinetics: Implications for peptide synthesis, *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 118-124, 1993.

8. Noritomi H., Watanabe A., Kise H., Enzymatic reactions in aqueous-organic media VII. Peptide and ester synthesis in organic solvents by α -chymotrypsin immobilized through non-covalent binding to poly(vinyl alcohol), *Polymer Journal*, 21, 2, 147-153, 1989.
9. Halling P. J., Effect of thermodynamic water activity on protease catalyzed peptide synthesis in mainly organic media., *Biomed. Biochim. Acta*, 50, 61-66, 1991.
10. Jiang H. H., Zou H. F., Wang H. L., et. al., Covalent immobilization of trypsin on glycidyl methacrylate modified cellulose membrane as enzyme reactor, *Chem. J. Chinese U.*, 21, 5, 702-706, 2000.
11. Heizir F. de Castro, Oliviera de P. C., Soares M. F., and Zanin G. M., Immobilization of porcine pancreatic lipase on celite for application in synthesis of butyl butyrate in a non aqueous system, *Jaocs*, 76, 1, 147-152, 1999.