

## **Proteinlerin Isı Koagülasyonu Üzerine Bazı Şekerler ve Mannitolun Önleyici Etkisi**

### **The Preventive Effect of Some Sugars and Mannitol on the Heat Coagulation of Proteins**

Şevket TEKMAN ve Sedat ÖZTEKİN \*

Proteinler çok dayanıksız maddelerdir. Isı, ultraviyole, ışık, ağır metal iyonları gibi bazı dış etkenlere maruz bırakıldıkları zaman irreversibl olarak çökerler ve natif halde malik oldukları özelliklerin birçoğunu kaybederler. Proteinler genellikle 80°C nin üzerinde ısıtıldıkları zaman pıhtılaşır. Fakat bu ısıtma bazı maddeler muvacehesinde yapıldığı takdirde proteinlerin pıhtılaşmadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Nitekim Boyer ve arkadaşları (1) serum albumini 80°-83° C de kısa zincirli yağ asitleriyle birlikte ısıtmışlar ve proteinin stabil kaldığını görmüşlerdir. Haurowitz ve arkadaşları (2) Kongo kırmızısının, proteinlerin ısı koagülasyonuna engel olduğunu tesbit etmişlerdir. Greenstein ve Hoyer (3) sodyum nükleat ile kombine edilmiş serum albuminin 98° C de koagüle olmadığını, Hamer (4) heparin, dekstran sülfat, dezoksiribonükleat, poliglutamat ve alginatın kaynar suda serum albuminin pıhtılaşmasını önlediğini göstermişlerdir. Michiro ve Ochi (5) ise serum albumin ve globulini 80° C nin üzerinde sodyum dipikolinat ile beraber ısıtmışlar ve koagülasyonun önlendiğini tesbit etmişlerdir. Öner (6) Evan mavisıyla birlikte serum albumini kaynar su banyosunda pH 6 da ısıtmış ve çözeltinin berrak kaldığını göstermiştir.

Bütün bu çalışmalarda görüldüğü gibi araştırmacılar sıcakta protein koagülasyonunu önleyen, birbirinden farklı maddeler kullanmışlardır.

Bu çalışmada sığır serum-albumin, -pseudoglobulin ve ovalbumin, çeşitli şeker veya polialkollerle birlikte 80°-100°C de ısıtılarak bu maddelerin adı geçen proteinlerin koagülasyonunu önleyici etkileri incelendi. Ayrıca bu koruyucularla ısıtılmış aynı proteinlere renk re-

\* Biokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

aksiyonları tatbik edilerek koagülasyonun hangi mekanizmayla ön-  
lendiği araştırıldı.

#### M A T E R Y E L ve M E T O D

Deneylerde protein olarak sığır serum-albumin, -pseudoglobulin ve ovalbumin kullanıldı. Isıtmada D(+)-sakkaroz, D(+)-maltoz, D(+)-glukoz, D(+)-mannoz, D(+)-galaktoz, D(-)-fruktoz, D(+)-ksiloz, L(+)-ramnoz, D(+)-fukoz, D(—)-sorbitol, D(—)-mannitol ve dulsitol ile çalışıldı ve bu maddelerin protein koagülasyonunu önleyip önlemedikleri incelendi. Albumin ve pseudoglobulin sığır serumunun amonyum sülfatla, ovalbumin ise yumurta akının sodyum sülfatla (7) fraksiyonlu olarak çöktürülmesi suretiyle elde edildi. Tuzlardan dializ ile ayrılan protein çözeltilerinin konsantrasyonları refraktometrik olarak tayin edildi. Serum-albuminin % 4, -pseudoglobulinin % 5.4 ve ovalbuminin % 6 olarak bulundu.

Proteinlere Folin Wu-Ciocalteu (8) ve Diazo (9) renk reaksiyonları tatbik edildi.

Isıtmalar için otomatik termostatlı su banyosu, renk kıyaslamaları için Beckman C tipi elektrokolorimetre kullanıldı.

Proteinlerin ısı koagülasyonunu önleyici etkileri araştırılacak maddeler serum-albumin, -pseudoglobulin ve ovalbuminin % 0.1 lik çözeltileri içinde çözüldü. Bu maddeleri ihtiva eden protein çözeltileri 80°, 85°, 90°C lerde ve kaynar suda, ayrı ayrı 20 şer dakika ısıtıldı. Tüpler çeşme suyu altında soğutulduktan sonra çözeltilerin bulanıklık derecelerine bakıldı. Bu maddelerden ısı koagülasyonunu önleyici etki gösterenlerin protein çözeltileri içindeki nihai konsantrasyonları Cetvel 1 de gösterilmiştir.

Cetvel 1 de adı geçen maddelerle birlikte ısıtılmış serum-albuminin glukoz ve mannitol, -pseudoglobulinin mannoz ve ramnoz ve ovalbuminin maltoz ve sakkaroz muvacehesinde ısı koagülasyonlarının önlediği tesbit edildi (Cetvel 2).

1 M laktoz, 2 M fruktoz, 2 M galaktoz, 2 M ksiloz, 0.1 M fukoz, 1 M sorbitol ve 0.5 M dulsitol ihtiva eden % 0.1 lik protein çözeltileri, denenen temperatürlerde ısı ile koagüle oldular.

Cetvel 2 de ısı koagülasyonunu önledikleri görülen şekerleri ve polialkolü ihtiva eden protein çözeltileri ısıtmalar yapıldıktan sonra suya karşı dializ edildi. Glukozla ve mannitolla ısıtılmış serum-albumin, ramnoz ve mannozla ısıtılmış -pseudoglobulin ve sakkaroz ve maltozla ısıtılmış ovalbumin dializden sonra çöktüler.

Cetvel 1. Protein koagülasyonunu önleyen maddelerin % 0.1 lik protein çözeltilerindeki nihai molar konsantrasyonları.

PROTEİNİN ADI	KOAGÜLASYONU ÖNLEYEN MADDELER ve MOLAR KONSANTRASYONLARI					
	Maltoz	Sakkaroz	Glukoz	Mannoz	Ramnoz	Mannitol
Albumin	1	1	3	1.5	2	1.5
Pseudoglobulin	1	1	3	2.8	2	1.5
Ovalbumin	2	2.2	3	1.5	2	1.5

Cetvel 2. % 0.1 lik protein çözeltileri içindeki çeşitli maddelerin ısı koagülasyonuna engel olucu etkileri.

KOAGÜLASYONU ÖNLEYEN MADDE	BULANIKLIK DERECE Sİ											
	80° C			85° C			90° C			Kaynar Su		
	Alb.	Ps.g.	Oval.	Alb.	Ps.g.	Oval.	Alb.	Ps.g.	Oval.	Alb.	Ps.g.	Oval.
Maltoz	+++	+++	—	+++	+++	±	+++	+++	±	+++	+++	±
Sakkaroz	±	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—
Glukoz	—	+++	+++	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mannoz	+++	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ramnoz	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++
Mannitol	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++

(—, berrak; çok +, hafif opalesan; opalesan; ++, bulanık; +++, bulanık ve gökmüş.)

Isı koagülasyonunu önleyen maddelerin proteinleri hangi mekanizmayla koruduklarını araştırmak için % 0.1 lik serum-albumin, -pseudoglobulin ve ovalbuminin, ısı koagülasyonunu önleyen maddelerle değişik suhnet derecelerinde ısıtıldıktan sonra ısıtılmamış olan kısımlarıyla paralel olarak Folin-Fenol ve Diazo renk reaksiyonları tatbik edildi. Isıtılmış numuneler 80° C ve 90° C ye maruz kalmış olan kısımlardan alındı.

#### 1) Folin-fenol reaksiyonu:

2 ml protein çözeltisi üzerine 4 ml distile su, 3 ml % 20 lik sodyum karbonat çözeltisi ve 1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ilâve edildi.

30 dakika sonra meydana gelen mavi renklerin absorbanları, 650 m $\mu$  da aynı şartlardaki proteinsiz boş denemeye karşı okundu (Cetvel 3).

2) Diazo reaksiyonu :

2 ml protein çözeltisi üzerine 3 ml distile su konup 5 dakika buz içinde +4°C ye soğutuldu. Üzerine yine +4°C ye soğutulmuş 3.6 ml % 1.1 lik sodyum karbonat çözeltisi kondu. Diazo I ve II reaktifleri, metodun verdiği oranlarda karıştırılıp 1.5 ml reaktif yukarıdaki soğuk karışıma ilâve edildi. 60 dakika buz içinde ve 15 dakika oda temperaturünde bekletilen numunelerin absorbanları 530 m $\mu$  da, aynı şartlar dahilinde hazırlanmış proteinsiz boş denemeye karşı ölçüldü (Cetvel 3).

Cetvel 3. Koagülasyonu önleyici maddeleri ihtiva eden, çeşitli derecelerde ısıtılmış ve ısıtılmamış proteinlerin renk reaksiyonları tabbikinden sonraki absorbanları.

KOAGÜLASYONU, ÖNLEYEN MADDE	PROTEİN	Folin- Fenol			Diazo		
		Isıtılmamış	80°C	90°C	Isıtılmamış	80°C	90°C
Glukoz	S. Albumin	0,22	0,27	—	0,32	0,38	—
Mannitol	S. Albumin	0,36	0,36	0,36	0,43	0,44	0,44
Ramnoz	Pseudoglobulin	0,20	0,23	0,24	0,15	0,16	0,16
Sakkaroz	Ovalbumin	0,15	0,16	0,16	0,14	0,16	0,16

#### TARTIŞMA

Deney sonuçlarının incelenmesinden anlaşılacağı gibi bir kısım şekerler ve mannitol, bazı proteinlerin ısı koagülasyonunu önlemektedirler. Glukoz ve mannitolün serum-albumini, ramnoz ve mannozun -pseudoglobulini, sakkaroz ve maltozun ise ovalbumini ısı koagülasyonundan korumaları, değişik tipteki şekerler ve bir polialkolün değişik proteinlerde ısıtma ile meydana gelen koagülasyonu önlediklerini göstermektedir.

Proteinler ısıtıldıkları zaman moleküllerin termik ajitasyonla açıldığı ve saklı grupların meydana çıktığı yapılan renk reaksiyonları deneyleri ile gösterilmiştir (10, 11). Şekerler ve mannitolün proteinlerin ısı ile koagülasyonunu önleme mekanizmalarını aydınlatmak için yapılan renk reaksiyonlarında serum-albuminin glukozlu ortamda ısıtılmış numunesinin renk şiddetinin aynı protein-şeker karışımına ait

ısıtılmamışının verdiğiinden fazla olduğu tesbit edildiği halde mannitol muvacehesinde ısıtılmış serum-albumin, ramnozla birlikte ısıtılmış serum-pseudoglobulin ve sakkarozla ısıtılmış ovalbumin numunelerinin ısıtılmamışlarına nazaran bariz bir renk şiddeti farkı göstermedikleri tesbit edildi. Bu durum, adı geçen renk reaksiyonlarını veren tirozil bakiyelerinin serum-albuminde, -pseudoglobulin ve ovalbumindekinden daha fazla sayıda olması ve dolayısıyla ısıtma sonucu meydana çıkan saklı tirozil bakiyesi sayısının da daha fazla olmasından ileri gelebilir.

Mannitol muvacehesinde ısıtılmış serum-albuminin, ısıtılmamışıyla paralel olarak yapılan renk reaksiyonlarında renk şiddetleri arasında bir fark bulunmaması, muhtemelen serum-albumindeki tirozil bakiyelerinin —OH grupları ile mannitolün —OH gruplarından biri arasındaki karşılıklı bir etkiden ileri gelmektedir. Nitekim Debourge ve Creac'h (12) de mannitolün tirozil bakiyeleriyle düşük enerjili kompleksler teşkil ettiğini göstermişlerdir. Mannitollu serum-albuminin ısıtılmış ve ısıtılmamış numuneleri arasında, glukozlu serum-albuminin ısıtılmış ve ısıtılmamış arasında görüldüğü gibi, bir renk şiddeti farkının görülmemesi, mannitole glukozun kenfigurasyon bakımından farklı olmaları, başka bir deyimle glukozun siklik bir yapıya malik olmasına mukabil mannitolün açık zincir yapısında olmasından ileri gelebilir.

Isıtılmış protein ve koagülasyonu önleyici madde karışımlarındaki polialkol veya şeker, dializ ile uzaklaştırıldıktan sonra bu proteinlerin çökmesi de bu koruyucu maddelerin ısıtma esnasında polipeptid moleküllerinde meydana gelen açılma safhasını değil, sadece koagülasyon safhasını önlediği kanısını vermektedir.

#### Ö Z E T

Sığır serum-albumin, -pseudoglobulin ve ovalbumin, çözeltileri içinde çeşitli miktarlarda glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, laktoz, sakkaroz, maltoz, ksiloz, ramnoz, fukoz, mannitol, sorbitol ve dulsitol çözüldü. Elde edilen karışımlar 80°, 85°, 90°C ve kaynar su banyosunda ısıtıldılar. Serum-albuminin glukoz, -pseudoglobulin mannoz ve ovalbuminin maltoz ihtiva eden çözeltilerinin 80°C de koagüle olmadığı görüldü. Mannitollu serum-albumin, ramnozlu -pseudoglobulin ve sakkarozlu ovalbuminin 80°-100°C de adı geçen maddeler tarafından koagülasyonlarının önlediği tesbit edildi.

Isıtmalar yapıldıktan ve ısı koagülasyonunu önleyen yukarıdaki maddeler dializ edildikten sonra protein çözeltilerinin bulandıkları ve çökelti husule geldiği müşahede edildi.

Koruyucu maddeleri ihtiva eden protein çözeltilerine Folin-fenol ve Diazo renk reaksiyonları tatbik edildi. Neticede glukozla ısıtılmış serum albumin çözeltisi ısıtılmamışına nazaran daha şiddetli absorbsiyon gösterdi. Mannitole birlikte ısıtılmış serum-albumin, ramnozla birlikte ısıtılmış -pseudoglobulin ve sakkarozla ısıtılmış ovalbumin çözeltileri ile ısıtılmamışları arasında renk şiddeti bakımından bariz bir fark olmadığı tesbit edildi ve bulgular tartışıldı.

#### S U M M A R Y

Different molar concentrations of glucose, fructose, galactose, mannose, lactose, saccharose, xylose, rhamnose, fucose, mannitol, sorbitol and dulcitol were dissolved in bovine serum-albumin (BSA), -pseudoglobulin and eggalbumin solutions. Then those mixtures were heated at 80°, 85°, 90°C in boiling water bath for 20 minutes. BSA with glucose, -pseudoglobulin with mannose and eggalbumin with maltose were prevented from heat coagulation at 80°C. Mannitol-BSA, rhamnose-pseudoglobulin and saccharose-eggalbumin mixtures were heated at 80-100°C and those proteins didn't coagulate with above mentioned substances.

After heat treating, the mixtures were dialysed against distilled water and the proteins coagulated.

The colour reactions given by heat treated BSA-glucose solution with Folin's Phenol reagent and diazobenzene sulphonate are more intensive than those of unheated forms. There was no difference of colour absorptions between BSA heated with mannitol, -pseudoglobulin with rhamnose and eggalbumin with saccharose and those of unheated forms in above mentioned colour reactions. Then the results were discussed.

#### L İ T E R A T Ü R

1. Boyer, P. D., Lum, F. G., Ballou, G. A., Luck, J. M., Rice, R., J. Biol. Chem., **162**, 181 (1946).
2. Haurowitz, F., Dimoia, F., Tekman, Ş., J. Amer. Chem. Soc., **74**, 2265 (1952).
3. Greenstein, J. P., Hoyer, M. L., J. Biol. Chem., **182**, 457 (1950).
4. Hamer, D., Biochem. J., **56**, 610 (1954).
5. Mishiro, Y., Ochi, M., Nature, (London), **211**, 1190 (1966).
6. Öner, N., İst. Ecz. Fak. Mec., **3**, 195 (1967).
7. Kekwick, R., Cannan, R., Biochem. J., **30**, 227 (1936).
8. Folin, O., Cioccheteu, V., J. Biol. Chem., **73**, 627 (1927).
9. Koessler, K., Hanke, M. T., ibid., **39**, 497 (1919).
10. Haurowitz, F., Tekman, Ş., Biochim. Biophys. Acta, **1**, 484 (1947).
11. Herriott, R. M., J. Gen. Physiol., **19**, 283 (1935).
12. Debourge, J. C., Creac'h, P. V., Procès-Verbaux Séances Soc. Sci. Phys. Nat., **64**, 271 (1963).

(Redaksiyona verildiği tarih: 10 Mart 1972)