

Anadolu Orkidesi (*Orchis Anatolica*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Peynir Üretimindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Bahar Parlak¹, Azize A. Güngör¹, Yaşar Demir², Nazan Demir^{1*}

¹Atatürk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümü, 25240, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 25240, Erzurum
demirn@yahoo.com

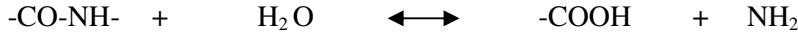
Özet

Bu çalışmada bitkisel kaynaklı yeni bir proteaz enziminin aranmasına yönelik bir araştırma yapılmıştır. Bu amaçla zehirli olmadığı bilinen ve yumruları salep yapımında kullanılan Anadolu Orkidesi kullanılmıştır. Proteaz enzimi Anadolu Orkidesi (*Orchis Anatolica*) inden amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (1). Bitkiden saflaştırılan proteaz enziminin kaç kat saflaştırıldığı hesaplanmıştır. SDS-PAGE ile enzimlerin alt birimlerinin ağırlıkları ve Sephadex G-100 jel fitrasyonu ile de enzimin molekül ağırlığı bulunmuştur. Ayrıca enzimin optimum pH'sı ve sıcaklığı belirlenmiştir. Saflaştırma basamaklarında ve karakterizasyonu sırasında enzimin aktivitesini ölçmek için kazein, substratı kullanılmıştır. Ayrıca enzimin substrat spesifikliği, kazein, albumin, azoalbumin ve hemoglobin kullanılarak incelenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi incelenmiştir (1,2). Enzimin proteolitik özeliğinden yararlanılarak peynir üretilip üretilmeyeceği araştırılmıştır (3).

Anahtar Kelimeler: Anadolu Orkidesi (*Orchis Anatolica*), Proteaz, Saflaştırma, Peynir

Giriş

Hidrolazlar ana grubuna dâhil olan proteazlar (4.3.1.1), proteolitik enzimler olarak da bilinir. Bunlar peptit bağlarının su etkisiyle bölünmesini katalizlerler (4).



Proteazlar hücre fizyolojisindeki kritik rolleri ve yeni bir yelpazeye yayılan endüstriyel kullanım potansiyelleri nedeniyle önemli bir enzim grubudur ve dünya enzim pazarında %60'lık bir pay ile ilk sırada bulunmaktadır (5). Bitkisel kaynaklı pek çok proteaz günümüze kadar lateks, meyve ve tohumlardan izole edilmiştir. Bunların büyük bir kısmı sistein proteazları ailesine aittir (6). Proteazlar bitkilerden, hayvanlardan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilirler. Ancak günümüzde hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıkların başında yoğun bir

şekilde yer almasından dolayı (SARS, deli dana, kuş gribi vs.), hayvansal proteazların özellikle gıda maddesi yapımında kullanımı konusunda kuşkular artmıştır ve bu gelişme araştırmacıları yeni bitkisel proteaz kaynakları aramaya sevk etmiştir (1). Orkideler, Orchidaceae familyasına ait olup; yaklaşık 450 cins ve 20.000 tür içermektedir (7). Anadolu, çok zengin bir bitki örtüsüne sahiptir (7). Türkiye, orta kuşak orkideleri bakımından Avrupa ve Ortadoğunun en zengin ülkelerinden biridir (8). Türkiye’de Orchidaceae familyasına ait 24 cins ve 100 kadar tür saptanmıştır. Yumrulu orkideler ülkemizin birçok bölgesinde doğal olarak yetişmekte olup yumrularından gıda ve ilaç hammaddesi olarak kullanılan salep elde edilmektedir (9). Araştırmada kullanılacak Anadolu orkidesi Çukurova yöresindeki Toros dağlarından toplanarak kullanılmıştır (10). Enzimin saflaştırılmasından sonra, saf enzimin ve bitki ekstralarının peynir yapımında kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyalin Toplanması: Mayıs-Haziran 2007 döneminde Anadolu orkidesi (*Orchis Anatolica*) Mersin ili içinde bulunan Çamlıyayla’dan toplanmıştır. Proteaz enzimi saflaştırmak için kullanılan bitki -80 °C lik derin dondurucuda saklanmıştır.

Homojenatın hazırlanması: Dondurucuda muhafaza edilen 25 g bitki, ilk önce sıvı azot kullanılarak mekanik olarak parçalanmış daha sonra 50 mL destile su içerisine alınarak ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 30 dak oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Homojenat 30 dak +4 °C’de 5000xg’de santrifüjlenmiştir. Böylece bitki posasının protein çözeltisinden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Coomassie blue yöntemi ile protein tayini: Deneyin esnasında protein tayinininde bu yöntem kullanılmıştır. Coomassie brilliant blue G-250 fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir.

Amonyum sülfat çöktürmesi: Homojenatta %10 ve %100’lük arasında 0–20, 20–40, 40–60, 60–80 ve 80–100 olacak şekilde amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Kullanılan Amonyum sülfatın gram miktarı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{Amonyum Sülfat Miktarı (Gram)} = \frac{1,77 \times V \times (S-S_0)}{3,54-S}$$

$$3,54-S$$

CM- selüloz kolonu iyon değişim kolonunun hazırlanması: 5 gram kuru CM-selüloz bir beher içerisinde 100 mL 0,5 M NaOH ile aktifleştirilmiş ve oda sıcaklığında 24 saat şişmeye bırakılmıştır. Kullanılan NaOH iyon değişim uçlarının dışarı çıkmasını sağlanmıştır. 0.5 M HCl ile yıkanarak ortam nötralize edilmiştir. Daha sonra jel asetat tamponu (0,01 M, pH: 5) içerisine alınmıştır.

Afinite kromatografisi : Afinite jeli sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlanmış ve Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, L-tirozin kovalent olarak takılmıştır. Daha sonra p-amino benzoik asit diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu oluştururken p-amino benzoik asit ise enzime spesifik olarak bağlanacak kısmı oluşturmaktadır.

Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi: Proteolitik aktivite kazein varlığında kazeinin sindirimi metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla kazeinin %1'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. 0.5 mL saf enzim çözeltisi 1 mL kazein üzerine eklenerek reaksiyon başlatılmıştır (2).

Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Sütün Çöktürülmesi : Anadolu orkidesi bitkisinden elde edilen homojenat ve saflaştırılan proteaz enziminin peynir endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağını anlaşılabilmesi için enzimin sütü çöktürüp çöktürmediği araştırılmıştır. Bu amaçla Berridge metodunun modifiye şekli uygulanmıştır (3).

Bulgular ve Tartışma

Proteaz enzimi Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerin den %0-30, 30-50, 50-70 ve 70-100 lük amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak saflaştırmaya başlanmıştır. Yapılan aktivite ölçümlerinin sonucunda enzimin %30-50 lik amonyum sülfat çöktürmesinde çöktüğü anlaşılmış ve daha sonraki saflaştırma işlemleri için bu çökelek kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve CM-selüloz iyon değişim ve afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan proteaz enzimi için, her basamak da protein ve aktivite tayini yapılarak saflaştırma kat sayısı hesaplanmıştır. Afinite kullanılarak saflaştırılan proteaz enzimi için saflaştırma katsayısı hesaplanarak 108 kat saflaştırıldığı anlaşılmıştır. Saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi kazein substratı kullanılarak ölçülmüştür. Denemeler sonucunda saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürebildiği ve peynir üretiminde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Sonuçlar

Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH' sı 6 ve aktif olduğu pH aralığı 4-9 olarak bulunmuştur. Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 10-70°C ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60 °C olarak belirlenmiş. Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratı kullanılarak, Linewear-Burk grafiğinden yararlanılarak hesaplanan V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla 0,16 g/L.dak ve 2.8×10^{-3} g/mL olarak bulunmuştur.

Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve sephadex G-100 jelfiltrasyon kromatografisi kullanılarak 8.4 kDa olduğu bulunmuştur. Anadolu

orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı araştırılmıştır. Denenen substratlardan hemoglobin, albumin, azoalbumini ve kazeini hidrolizlediğı, jelatini ise hidrolizlemediğı bulunmuştur. Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi araştırılmıştır. β -Merkaptoetanol ve SDS ve EDTA nın tüm konsantrasyonlar da enzim aktivitesi arttırdığı anlaşılmıştır. Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine Co^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Fe^{2+} bunlardan Co^{2+} 'nin tamamen inhibe ettiği, Hg^{2+} ve Zn^{2+} kısmen inhibe ettiği görülmüştür. Ca^{2+} 'nin aktivite üzerinde çok fazla etkisinin olmadığı Mg^{2+} 'nin enzimi az miktarda aktive ettiği anlaşılmıştır. Fe^{2+} 'nin enzimi tüm konsantrasyonlar da aktive ettiği gözlenmiştir. Anadolu orkidesi (*Orchis anatolica*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin, güçlü proteaz aktivitesinden dolayı, sütü çöktürebildiğı ve peynir üretiminde güvenle kullanılabilceğı anlaşılmıştır.

Teşekkür: Gurubumuz tarafından yapılan bu çalışma TÜBİTAK (105T414) tarafından desteklenmektedir.

Kaynaklar

1. Demir Y, Alaylı A, Yıldırım S, Demir N. 2005. Identification of Protease from *Euphorbia Amygdaloides* Latex and It's Using in Cheese Producing. Preparative Biochemistry and Biotechnology 35. 291–299.
2. Fadiloğlu S. 2001. İmmobilization and characterization of ficin. Nahrung/Food 45 (2), 143-146.
3. Demir Y, Güngör A, Sarıkaya SB, Demir N. 2007. The Purification of Protease from Cowslip(*Primula Veris*) and Its use in Food Processing. Journal of Food Processing and Preservation. 31, 559-570.
4. Keskin H. 1987. Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık Tic. Ltd.Şti, 49, 51 s, İstanbul
5. Çalkı Ş. 1999. Bazı Su Ürünlerinde Proteolitik Enzim Aktiviteleri (Katepsin D ve Kazein Test) Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 23, 385–390.
6. Boller T. 1986. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: Dalling, M.J. (Ed.), Plant Proteolytic Enzymes. CRC Press, BocaRaton, pp. 67–96.
7. Rao AN. 1977, Tissue Culture in the Orchid Industry. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. (Ed) Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44-65. Springer Verlag, New York.
8. Vavilov NI. 1951. The Origin, Variation, Immunity and breeding of Cultivated Plants, Chron. Bot., 13: 1-364.
9. Baytop T, Sezik E. 1968. Türk salep çeşitleri üzerine araştırmalar. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Mec. 4: 61–68, 1968.
10. Acartürk R. Sifalı bitkiler Flora ve Sağlığımız. 1997, Repo Vizyon Ltd. Şti. Ankara.