

Kuvaterner Amino Asit

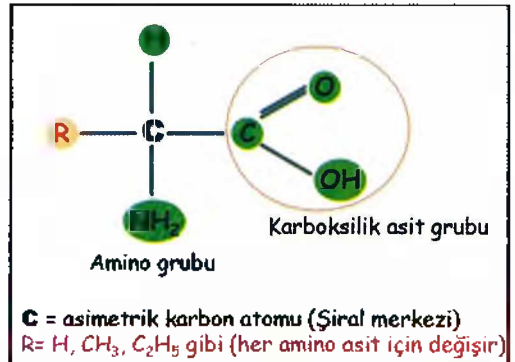
Jeokronolojisi

1960' lı yıllarda, mollusk fosil kavkılarında yaş saptamak amacıyla Hare ve Mitterer (1967)⁽¹⁾ tarafından kullanılmaya başlanan amino asit' ler günümüzde jeokronoloji, kronostratigrafi, paleoiklim ve arkeoloji gibi birçok araştırma dalında, özellikle Kuvaterner döneminin incelenmesinde yaygın uygulama alanı bulmuştur^(2,3,4,5,6). Amino asitlerin yaş tayini özelliği, moleküler yapılarının epimerizasyon ve rasemizasyon reaksiyonlarına uygun olmasından kaynaklanır. Şimdi konuyu biraz açalım.

Protein ve amino asit nedir?

Bir canlı kemiğinin yaklaşık olarak % 23'ünü oluşturan proteinler, canlıların yapı taşı olarak bilinirler. Fosiller içerisinde protein kalıntıları ilk kez 1954 yılında Abelson⁽⁷⁾ tarafından bulunmuştur. Bir karbon (C) atomuna bir amino (NH₂) ve bir karboksilik asit (COOH) grubunun bağlanmasıyla bir amino asit molekülü oluşur (Şekil 1). Birçok amino asit peptit adı verilen bağlar yardımıyla uzun zincir ya da büyük bir molekül proteinini oluşturur. Peptit bağ ikli amino asiti birleştirmişse di-peptit, üç amino asiti birleştirmişse tri-peptit adını alır. Proteinler yüzlerce amino asitten (poli-peptit) meydana gelebilir.

Doğada canlı organizmaların değişik bölümlerinde yaklaşık 150 değişik amino asit molekülü mevcut-



Şekil 1. Aminoasit molekülü

Uğraş Işık* ve Kadir Gürgey**

*Türkiye Petrolleri A.O.

Araştırma Merkezi Grubu

ugras@petrol.tpa.gov.tr

**Pamukkale Üniversitesi

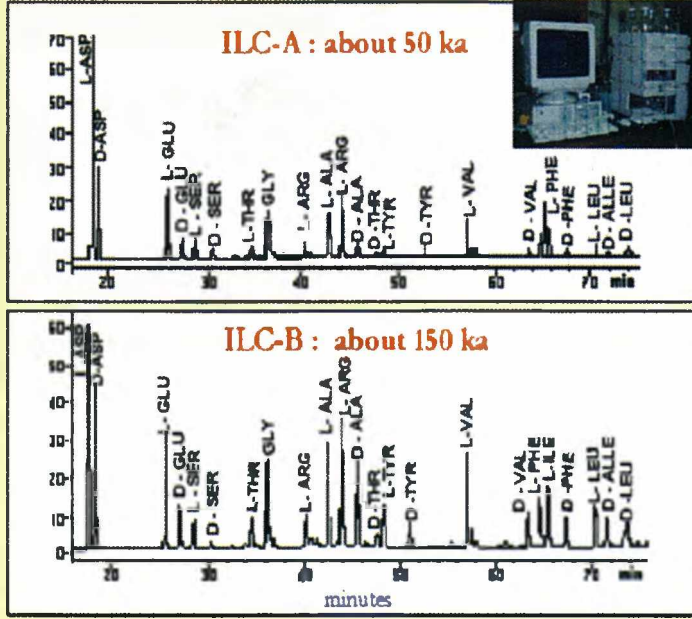
Jeoloji Mühendisliği Bölümü

Kınıklı Kampüsü, 20017, Denizli

kgurgey@pamukkale.edu.tr

tur. Bunlardan 25 adeti proteinlerin bünyesinde "amino asit kalıntısı" olarak bulunur. Bu amino asitlerden 20 adeti DNA üzerine kodlanmış olarak, kalan 5 tanesi ise protein sentezi tamamlandıktan sonra biyokimyasal reaksiyonlar ile protein üzerinde sonradan oluşmuş olanlardır. Canlılarda ve fosillerde en yaygın olarak bulunan 20 amino asitin neler olduğu yüksek basınçlı sıvı (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) kromatogramından geliş sıraları ve literatürdeki kısaltılmış isimleriyle Şekil 2 de verilmiştir⁽⁶⁾.

- Asp Aspartik asit
- Glü Glutamik asit
- Ser Servin
- Thr Treonin
- Gly Glisin
- Arg Arginin
- Ala Alanin
- Tyr Tirozin
- Val Valin
- Phe Fenilalanin
- Leu Leusin
- Ile İzoleüsin

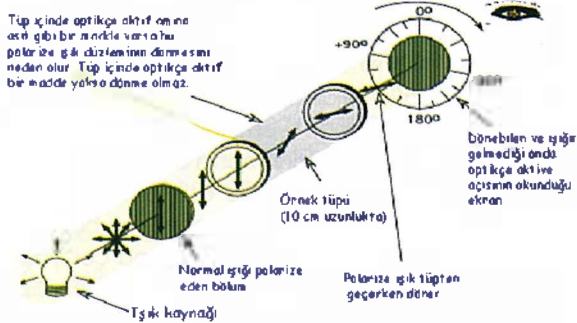


Şekil 2. Bir gaz kromatogramıyla belirlenen en yaygın amino asitler⁽⁶⁾

Amino asit kimyası

Stereokimyasal olarak, bir karbon atomuna moleküler ağırlığı farklı 4 grup bağlanmış ise bu C atomuna "asimetrik şiral merkez" veya "şiral merkez" (chiral center) denir. Amino asitler, (1) şiral merkezli (asimetrik C atomuna 2 H (hidrojen) atomu bağlanması; örnek, Glisin), (2) tek şiral merkezli (örnek, aspartik asit) ve (3) çift şiral merkezli (iki asimetrik şiral merkezden her birine moleküler ağırlığı farklı 4 grubun bağlanması; örnek, izolösin "isoleucine") olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Görüldüğü gibi glisin hariç

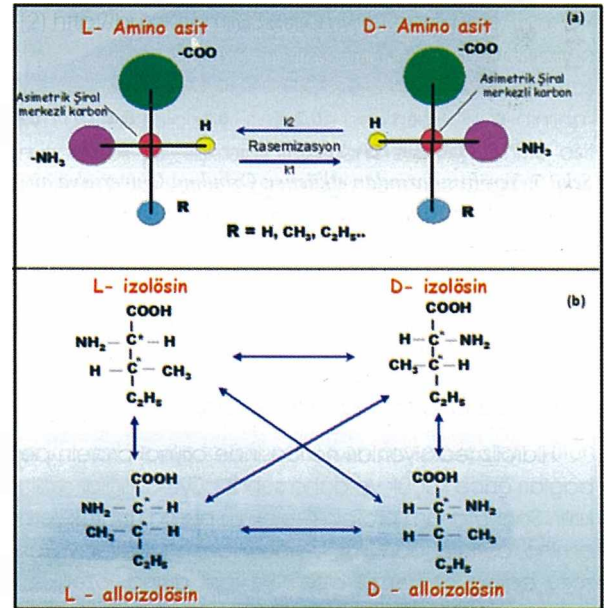
Polarimetre



Şekil 3. Polarimetre ve iç yapısı

geriye kalan 19 amino asit şiral merkezine sahiptir. Şiral merkezli moleküller optikçe aktiftir. Optikçe aktivite Şekil 3'te gösterilen ve polarimetre adı verilen bir cihaz ile ölçülür. Cihazın örnek tüpünde amino asit gibi şiral merkezli bir molekül var ise, tüp içinden geçen polarize ışıkta polarimetreye Şekil 3'deki gibi bakıldığında sağa ya da sola sapmalar gözlenir. Bu sapma miktarları molekülün uzaysal yapısına (configuration) bağlıdır. Sapma sola ise L, sağa ise D yapısından bahsedilir (Şekil 4a). L- yapısına

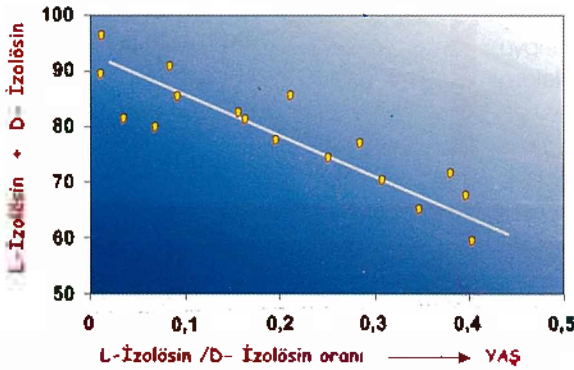
sahip bir amino asit H atomunun aynı molekülün NH₂ grubuyla yer değiştirmesi ile D- yapısına geçer. Bu moleküler dönüşüm reaksiyonlarına organik kimyada epimerizasyon ve rasemizasyon reaksiyonları denir. Amino asitler içinde kuvaterner yaşlandırılmalarında en yaygın olarak kullanılanlar, iki şiral merkezli aspartik asit (Şekil 4b) ve bir şiral merkezli izolösin amino asiti (Şekil 4b) ve bir şiral merkezli aspartik asit'tir. Ancak jeokronolojik uygulamalarda, izolösin'in D/L oranı zamana daha hassas olması ve dış etkenlere daha dayanıklı olmasından dolayı tercih edilmektedir.



Şekil 4. L amino asitinin D amino asitine dönüşümü

Organizmanın ölümü ve saatin çalışmaya başlaması

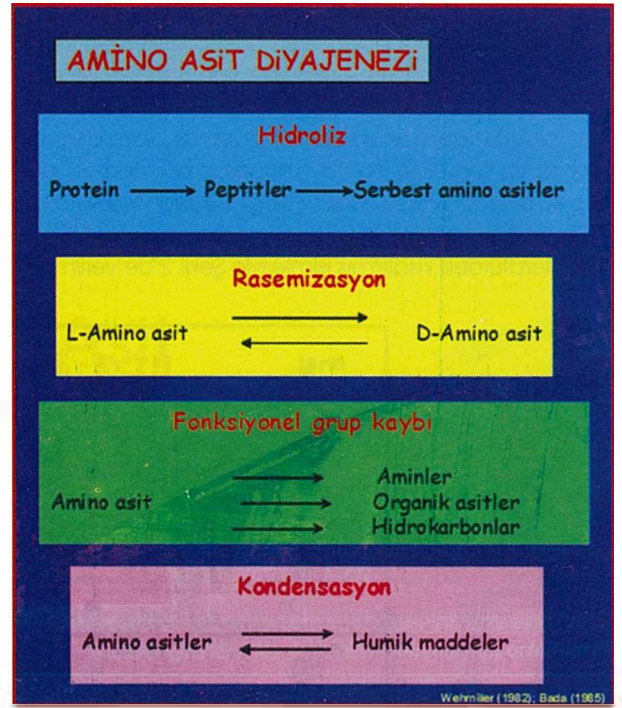
Organizmalar öldükten sonra dokuları ve kavkaları içinde bulunan proteinler dolayısıyla amino asitler, deniz tabanında üzerlerini örten ve giderek artan sediman kalınlığı ve diyajenez sürecinde fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu değişime uğrarlar. Burada, fiziksel olaylar içinden ikisi, organizmanın amino asit kompozisyonunu etkiler: (1) Kirlenme (contamination) ve (2) Kabuktan özütlenme (leaching). Bu arada muhtemelen fosil kavkalarının sert ve dayanıklı olmalarına bağlı olarak oluşan "kapalı sistem" sayesinde amino asitler optimum olarak korunur. Ancak kirlenme sırasında, amino asit içeren yer altı sularının difüzyon yolu ile fosilin içine girmesi söz konusudur. Kavkı içine nüfuz eden amino asitler organizma ile aynı yaşta değilse (daha yaşlı veya daha genç) bu kavkıdan yapılabilecek yaş tayini gerçeği yansıtmaz. Kavkıdan özütlenmede ise, yine dışarıdan fosil içine giren yeraltı suları özellikle serbest amino asitleri özütleyerek kavkı dışına çıkarır. Bu *Orbulina universa* (planktik foraminifer) kavkısı üzerinde yapılan amino asit analizleri neticesinde ölçülen İzolösin + alloisölösin konsantrasyonuna karşı çizilen Allo/Iso oranı grafiğinde de gayet iyi gözlenmektedir⁽⁹⁾. Allo/Iso oranı artarken yani rasemizasyon ilerlerken Allo/Iso konsantrasyonun azalması kavkıda bulunan bir kısım serbest amino asitin yeraltı suları ile özütlenmesi gibi yorumlanabilir (Şekil 5). Her iki fiziksel olayın da amino asit yorumlarında dikkatle incelenmesi sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır.



Şekil 5. Yeraltı sularından etkilenen *Orbulina Universa*'ya ait L-İzolösin + D-İzolösin Konsantrasyonunda gözlenen azalma⁽⁹⁾

Diyajenez esnasında, aminoasitlerde görülen kimyasal değişiklikler ise başlıca dört reaksiyonla özetlenebilir (Şekil 6): (1) Hidroliz, (2) Rasemizasyon, (3) Fonksiyonel grup kaybı ve (4) Kondensasyon^(2,10). Bunlardan 3 ve 4'te verilen kimyasal reaksiyonlar konumuzun dışındadır bu yüzden daha fazla değinilmeyecektir.

Hidroliz reaksiyonları neticesinde orijinal protein-peptit bağları önce küçük ve daha sonra büyük bağlar şeklinde kırılır. Sonuçta tüm protein molekülü parçalanarak serbest amino asitlere dönüşür. Serbest amino asitler yukarıda sözü edilen özütlenme işlemi ile fosil dışına, özellikle de yeraltı suları yoluyla kolaylıkla alınabilir. Hidroliz reaksiyon-

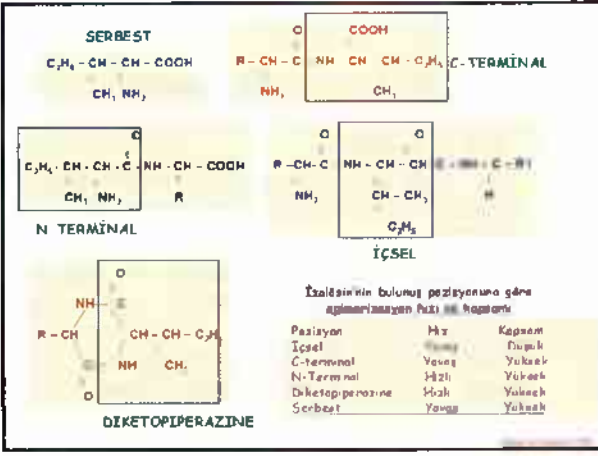


Şekil 6. Diyajenez sırasında amino asitlerde görülen kimyasal değişiklikler

ları neticesinde fosil içinde var olan serbest amino asit konsantrasyonları böylelikle azalmış olur. Zaman içinde ise serbest amino asitlerin, peptit bağlı amino asitlere oranı artar, Şekil 7'de açık formülleri verilen amino asitler hidroliz yolu ile değişik oranlarda olmak üzere 5 farklı yapıya dönüşürler: Serbest, C-terminal, N-terminal, içsel ve Diketopiperazine amino asitler⁽¹¹⁾. Bu grupların aminoasit yaşlandırılmalarındaki önemine aşağıda değinilecektir.

Rasemizasyon ve/veya epimerizasyon reaksiyonları ile organizma canlı iken kavkalarında var olan optikçe aktif L- amino asitleri, (bu durumda D- amino asit konsantrasyonu sıfır kabul edilmektedir) sıcaklık etkisi altında D- amino asitlere dönüşür. Reaksiyon dengeye geldiğinde D/L oranı 1 dir. D ve L molekülleri iki elin parmakları gibi üst üste getirilemez. Bunlara "optikçe aktif izomer" ya da enantiomer adı verilir. İzolösin gibi çift şiral merkezlilerde (örneğin izolösin; Şekil 4a) L den D ye dönüşüme epimerizasyon ve D ve L'den her birine diastereoisomer ya da epimer denilir.

Amino asitlerde görülen rasemizasyon ve epimerizasyon reaksiyonları amino asit yaşlandırma tekniğinin temelini oluşturur; yani saatidir. Buna göre, organizma canlı iken bünyelerinde bulunan L- amino asitlerini korur, bu durumda saat çalışmaz. Organizmanın ölümünden hemen sonra L- amino asitleri D- amino asitlerine dönüşmeye başlar (Şekil 4a ve 4b). Saat artık çalışmaya başlamıştır. D/ L = 1 olduğunda saat durur (Organizma çok yaşlıysa tersine olarak D den L' ye dönüşümlerde olabilir, dikkatli olunmalıdır). Araştırmacılar amino asit D/L oranlarını tayin



Şekil 7. Aminoasitlerin hidroliz ile dönüştüğü yapılar⁽⁸⁾.

etmekle bir bakıma saatin başlamasıyla durması arasında geçen süreyi elde ederler. İşte saatin başlamasıyla durması arasında geçen sürenin D/L oranlarındaki artış değerleriyle (yıl) ifade edilmesine "amino asit ile yaşlandırma" tekniği diyoruz. D ve L rasemik bir bileşik oluşturmuş ise (D=L) fosillerin D/L oranları kantitatif yaşlandırma yerine göreceli (relative) yaşlandırmada kullanılır. Aynı zamanda, fosiller ve bunlarla ilişkili sedimanların göreceli yaş ilişkilerinin belirlenmesinde D/L oranlarının kullanılması, "aminostratigrafi" olarak adlandırılır.

Sıcaklık faktörü

Bu yaşlandırma yönteminde D/L oranı; amino asite, ortamın sıcaklığına, nem içeriğine, zamana, ortamın pH şartlarına, fosilin cinsine ve metal iyonlarının varlığı ile bunların konsantrasyonları gibi etkenlere bağlı olarak değişim gösterdiğinden numunenin dikkatli alınması gerekmektedir.

Amino asitlerdeki rasemizasyon reaksiyonları organizmanın ölümlünden sonra geçen zamana değil, aynı zamanda organizmanın ölümlünden sonra maruz kaldığı sıcaklığa da bağlıdır. Amino asit rasemizasyon oranı soğuk kutup ve kutba yakın bölgelerde yavaş iken, bu etkilenme özellikle sıcaklığa bağlı bir şekilde logaritmik olarak artmaktadır⁽⁹⁾:

Ortalama yıllık sıcaklık (°C)	Maksimum yaş (Yıl)
> 25 (Ekvatora yakın bölgeler)	200 000 ± 10 000
+ 10 (Ekvator-kutup arası bölgeler)	2 Milyon ± 200 000
< -10 (Kutup bölgeleri)	10 Milyon ± >400 000

Tablodan da görüldüğü gibi sıcaklık, değerinde yapılacak %5 lik bir hata hesaplanan yaşta %25-30 luk bir hata ile sonuçlanabilmektedir. Başka bir ifade ile amino asitlerle yaş tayinlerinde, yaş tayin edilecek fosil kavkısına ait bölgenin yıllık sıcaklık ortalamasının bilinmesi gerekir.

Amino asitler ile yaş tayini

D/L oranı ile stratigrafik yaş arasındaki ilişki derin deniz karotlarında bulunan foraminiferlerde daha iyi görülmektedir. Sıcaklığın daha duraylı olduğu deniz tabanlarında

rasemizasyon reaksiyonları teoriye çok uygun olarak meydana gelmektedir. Bu tip çalışmalarda iyi tanımlanmış radyometrik yaşlar (¹⁴C, uranyum serisi, ²³⁰Th ve manyetostratigrafi, duraylı oksijen izotopları yolu ile) D/L değerleri ile kalibre edilir. Böyle bir çalışmadan alınan sonuçlar Şekil 8'de grafiklenmiştir. Burada, 900 000 yıllık stratigrafik bir istiften (denizel KD Atlantik okyanusu sedimanları) alınan foraminifer grubundan *Orbulina universa* ve *Globorotilla tumida-menardii*lere ait D/L oranları ile aynı örneklerin radyometrik yaşları arasındaki yüksek korelasyon ilgi çekicidir⁽⁹⁾. Bu örnek aynı zamanda rasemizasyon reaksiyonları üzerindeki taksonomik etkiyi açıklaması bakımından da önemlidir. Görüldüğü gibi her durumda *G.tumida* D/L değerleri *O.universa* D/L değerlerinden daha büyüktür. Bunun nedeni büyük olasılıkla *G. tumida*'nın sahip olduğu serbest amino asitlerin toplam amino asit oranının *O.universa*'ya göre çok daha büyük değere sahip olmasıdır. Şekil 8'de dikkat edilirse her iki tren'ten de bazı sapmalar göze çarpmaktadır. Bu sapmalar şu nedenlerden birinin veya birkaçının beraber gerçekleşmesi sonucunda oluşabilir: (1) analitik belirsizlikler, (2) diyajenez esnasında örnek kirlenmesi (D/L değerlerini olduğundan küçük hale getirir), (3) toplam amino asitlerin diyajenezle alterasyonu (spesifik rasemizasyon oranlarını etkiler), (4) serbest amino asitlerin özütlenmesi ve (5) sedimantasyon sırasında örneğin kendinden farklı yaştaki amino asitlerle karışmasıdır. Her şeye rağmen Şekil 8'de elde edilen tren'ter, benzer sıcaklık tarihçesine sahip çalışma alanına yakın bölgelerden alınan karotların yaşlarını, radyometrik analizler yapmaksızın sağlamada kullanılabilir. Kısaca, amino asit uygulamalarında, örneklerin D/L oranları ile radyometrik olarak elde edilen yaşlara ait bir kalibrasyon eğrisi elde edilir. Bu kalibrasyon eğrisinin seçilen çalışma alanının stratigrafik yaş yelpazesini temsil etmesi gerekir. Daha sonra aynı bölgeden/havzadan alınan örneklerin sadece D/L değerleriyle fosil kavkılarının yaşını tespit etmek mümkündür.

Mutlak yaş veren diğer metotlar ile kalibrasyonun mümkün olmadığı durumlarda D/L oranları, göreceli yaş tayinin de kullanılabilir. Fosiller ve bunlarla ilişkili sedimanların göreceli yaş ilişkilerinin belirlenmesinde, amino asit oranlarının kullanılarak oluşturduğu "aminostratigrafi" yerel ve bölgesel olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır⁽¹²⁾.

Bütün canlıların kendilerine özgü, tür düzeyine kadar inebilen amino asit kompozisyonları vardır. Bu nedenle fosil kavkılarında belirlenen amino asit dağılımları taksonomi çalışmalarında da kullanılabilir.

Örnekleme

1. Amino asit ile yaş tayini, canlı iken protein içeren bütün organizmalarda yapılabilir.

2. Analiz için yaklaşık olarak 0.1-1.0 gr. örnek yeterlidir.

3. Kuvaterner sedimanlarında bulunan mollusk ve foraminifera kavkılarını gibi sıkı iskeletsel karbonat matrisine sahip

olan fosiller uygundur. Bunlara ek olarak, koplitlerde, mercanlarda, diş, kemik, saç ve ağaç parçaları üzerinde de amino asit yaşlandırma tekniği kullanılmıştır.

4. Güvenilir D/L oranları için en az 3 analizin ortalaması alınmalıdır. Anatomik olarak kavkinin farklı yerlerinden alınan örneklerde az da olsa farklı D/L oranı elde edilmektedir.

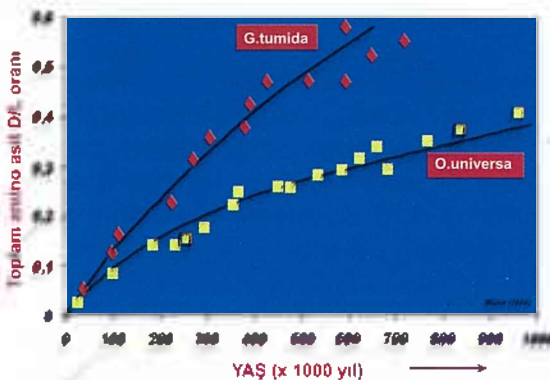
5. Kuvaterner dönemine ait fosillerin protein kalıntıları, paleoklim, buzullar ve deniz seviyesi değişimleri ile ilgili de yararlı bilgiler vermektedir.

6. Bütün canlılar tür düzeyine kadar inebilen kendilerine özgün amino asit kompozisyonlarına sahiptir. Bu nedenle fosil kavkılarında belirlenen amino asit oranları taksonomi çalışmalarında da kullanılabilir (13).

7. Farklı türlere ait D/L oranları, fosiller aynı yaşta olsa bile farklı yaş yorumlarına neden olabilir.

8. Şekil 7 de verilen tablonun gösterdiği gibi farklı yapılarda bulunan amino asitlerin rasemizasyon hızları ve kapsamı (verebilecekleri maksimum yaş-yıl olarak) farklıdır. Dolayısıyla içsel bir amino asitin D/L oranı ile serbest bir amino asitin D/L oranları birbirleriyle karşılaştırılmamalıdır.

9. Fosil kavkılardan uygun laboratuvar teknikleriyle elde edilen amino asitler, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz edilirler. Her bir amino asidin yüksekliği, konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan, göreceli konsantrasyonlar plk boyaları veya piklerin altında kalan alanların cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmesiyle elde edilir. Daha sonra amaca uygun olarak bir veya birden çok amino asitin D/L oranları hesaplanır.



Şekil 8. Aynı tariheye sahip olsalar bile türler farklı D/L oranlarına sahip olabilirler. Yaşlandırmada aynı tür kullanılmaktadır⁽⁹⁾.

Kaynaklar

- (1) Hare, P.E., Mitterer, R.M., 1967, Nonprotein amino acids in fossil shells. Carnegie Inst. Washington Yearb., 76, 625-631.
- (2) Bada, J.L., 1985, Amino acid racemization dating of fossil bones. Ann. Rev. Earth Planet. Sci. 13, 241-268.
- (3) Wehmiller, J.F., 1993, Applications of Organic Geochemistry for Quaternary Research: Aminostratigraphy and AminoChronology. Chapter 36, Organic geochemistry (eds M.H Engel and S.A. Macko), Plenum Press, 755-783.
- (4) Mitterer, R.M., 1993, The diagenesis of proteins and aminoacids in fossil shells. Chapter 35 of Organic geochemistry (eds M.H Engel and S.A. Macko), Plenum Press, 739-753.
- (5) Roof, S., 1997, Comparison of isoleucine epimerization and leaching potential in the molluscan genera Astarte, Macoma, and Mya. Geochimica Cosmochimica Acta 61, 5325-5333.
- (6) Nyberg, J., Csapo, J., Malmgren, A.B., Winter, A., 2001, Changes in the D- and L-content of aspartic acid, glutamic acid, and alanine in a scleractinian coral over the last 300 years. Organic Geochemistry, 32, 623-632.
- (7) Abelson, P.H., 1954, Organic constituents of fossils. Carnegie Inst., Washington Yearb, 53, 97-101.
- (8) Kaufman, D.S., Manley, W.F., 1998, A new procedure for determining enantiometric (D/L) amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. Quaternary Science Reviews, 17, 103-110.
- (9) Müller, P.J., 1984, Isoleucine epimerization in Quaternary planktonic foraminifera. Effects of diagenetic hydrolysis and leaching, and Atlantic-Pacific intercore correlations. Meteorit. Forschungs-Ergebnisse, Reihe C., 38, 25-47.
- (10) Wehmiller, J.F., 1982, A review of amino acid racemization studies in Quaternary mollusks: Stratigraphy and chronological applications in coastal and interglacial sites, Pacific and Atlantic coasts, United States, United Kingdom, Baffin Islands, and tropical islands. Quat. Sci. Rev., 1, 83-120.
- (11) Mitterer, R.M., Kriusakul, N., 1984, Comparison of rates and degrees of isoleucine epimerization in dipeptides and tripeptides. Organic Geochemistry, 7, 91-98.
- (12) Miller, G.H., Hollin, J.T., Andrews, J.T., 1979, Aminostratigraphy of U.K Pleistocene deposits. Nature, 281, 539-543.
- (13) King, K., Jr., and P. E. Hare, 1972, Species effects in the epimerization of L-isoleucine in fossil planktonic foraminifera. Carnegie Institution of Washington Year Book 71 (1971-1972), 594-598.