

ENZİMATİK TEPKİMEYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Enzim tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen etmenler; enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, ortamın pH'ı, sıcaklık, zaman, tepkimenin ürünü, çeşitli iyonların konsantrasyonu ile ışık ve diğer fiziksel etmenlerdir. Bu etmenlerin enzim tepkimeleri üzerine olan etkilerini belirlemek için, farklı koşullar altında enzim tepkime hızını belirlemek gerekmektedir.

- (1) **Enzim miktarının etkisi:** Enzim reaksiyonunun hızı, enzimin substrata doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal olarak artar. Ortamda ne kadar çok enzim molekülü varsa yeterli substrat olduğu sürece reaksiyon da sürecektir.
- (2) **Substrat miktarının etkisi:** Enzim konsantrasyonu sabit tutularak substrat konsantrasyonuna bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktası V_{max} adını alır. Substrat konsantrasyonu açısından önemli bir durum da, ortamda aşırı miktarda olan substratın enzimi inhibe etmesidir. Ortamda çok fazla miktarlarda substrat bulunması, substrat moleküllerinin enzime bağlanmasını zorlaştırır. Buna 'substrat inhibisyonu' denir.
- (3) **Ortam pH'nin etkisi:** Enzimin reaksiyon hızı, ortamın pH'sine bağlıdır. Belirli bir pH aralığında enzimin etkisi daha fazladır. Bir enzim için aktivitenin en fazla olduğu pH' ye enzimin 'optimum pH'si' denir.
- (4) **Sıcaklığın etkisi:** Enzimatik reaksiyonlarda başlangıçta sıcaklık artışı ile aktivitede artış gözlenir. Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimler de diğer proteinler gibi denatüre olur ve aktivitelerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratla ES kompleksini hızlı bir şekilde oluşturduğu belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin 'optimum sıcaklığı' denir.
- (5) **Zamanın etkisi:** Enzim katalizli reaksiyon yürürken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında tepkimeye girerek ters yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu inhibe eden maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin

ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (ilk 1-3 dakika).

2.1. Deneysel Çalışmalar

Deney 2.1. α -Amilaz Miktarının Etkisi

Deneyin prensibi: Enzim miktarının reaksiyon hızına etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi esasına dayanır.

Deneyin yapılışı:

Aşağıdaki çizelgeye göre altı deney tüpü numaralandırıp hazırlanır.

Çözeltiler / μ L	Kör	1	2	3	4	5
Saf su	100	90	80	70	60	50
Nişasta çözeltisi	900	900	900	900	900	900
Enzim çözeltisi	—	10	20	30	40	50

Tüpler karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.

Tüplere 1 mL renk ayırıcı eklenip, kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir.

Soğuyan tüplere 10 mL saf su eklenerek tüpler karıştırılır, spektrofotometrede köre karşı 546 nm'de absorbanlar okunur. Enzim konsantrasyonuna karşı hız grafiği çizilir.

Deney 2.2. Substrat Miktarının Etkisi

Deneyin prensibi: Standart nişasta çözeltisi kullanarak α -amilazın doygunluk eğrisinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi.

Deneyin yapılışı: α -Amilazın doygunluk konsantrasyonunun bulunması amacıyla aşağıdaki çizelgeye göre hazırlanan nişasta çözeltisi kullanılır.

Çözeltiler / μL	Kör Tüpler					Standart Tüpler				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Saf su	900	800	700	600	500	880	780	680	580	480
Nişasta çözeltisi	100	200	300	400	500	100	200	300	400	500
Enzim çözeltisi	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20

Tüpler karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.

Daha sonra tüplere 1 mL renk ayırıcı eklenerek karıştırılır ve kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir.

Soğuyan tüplere 10 mL saf su eklenerek tekrar karıştırılır.

Her tüpün 546 nm'deki absorbanısı kendi körüne karşı okutulur.

Hız ile substrat arasında çizilen grafikten α -amilazın maksimum hıza ulaştığı substrat konsantrasyonu belirlenir.

Deney 2.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Deneyin prensibi: α -Amilazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır.

Deneyin yapılışı: α -Amilazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla 12 deney tüpünün 6'sı örnek, diğer 6'sı kör tüpü olmak üzere aşağıdaki çizelgeye göre hazırlanır.

Çözeltiler / μL	Kör	Örnek
Saf su	500	480
Nişasta çözeltisi	500	500
Enzim çözeltisi	—	20

Tüplerin her biri için ayrı bir sıcaklık seçerek (10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80 °C) 5 dk bekletilir.

Tüplere 1 mL renk ayırıcı eklenip karıştırılır ve kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir.

Tüplere 10 mL saf su eklenip karıştırılır ve her tüpün 546 nm'deki absorbanısı kendi körüne karşı okutulur.

% aktivite ile sıcaklık arasında çizilen grafikten α -amilazın optimum sıcaklığı belirlenir.

Çözeltiler:

10 mM maltoz standardı: 0.171 g maltoz 50 mL saf suda çözülür.

α -amilaz çözeltisi: 1 mg α -amilaz 1 mL fosfat tamponunda çözülür.

%0.1'lik Nişasta çözeltisi: 500 mg nişasta 50 mL saf suda hafifçe ısıtılarak çözülür.

Renk ayıracağı: 1 g 3,5 dinitrosalisilik asit, 20 mL 2 N NaOH, 50 mL saf suya 30 g Na-K tartarat ilave edilip, 100 mL'ye tamamlanır.

KAYNAKLAR

- (1) A. Atalay, Deneysel Biyokimya, H.Ü.FF. Yayınları Ders Kitapları Dizisi: 5, 95 - 99, 1978.
- (2) E. Gözükara, Biyokimya, Ofset Repromat Basımevi, 572 - 719, 1989.
- (3) Y. Kikuchi and N. Sasaki, Site-specific cleavage of natural mRNA sequences by newly designed hairpin catalytic RNAs., Nucleic Acid Research, 19(24): 6751 - 6755, 1991.
- (4) H. F. Noller, V. Hoffarth and L. Zimniak, Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures., Science, 256: 1416 - 1419, 1992.
- (5) Dr. H. Nursevin Öztop, Dr. Ferda Candan T.C. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Biyokimya Laboratuvarı.
- (6) Fahrünnisa P. 2000. Biyokimya, Ankara.
- (7) http://www.hasanunal.net/index.php?option=com_content&view=article&id=18&Itemid=9
- (8) <http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/358.pdf>
- (9) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/Amylopektin_Sessel.svg