

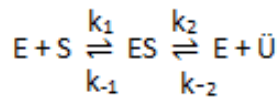
## ENZİMLER

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki maddelere “enzim” denir (Küçük bir grup katalitik RNA moleküllerinin haricinde tüm enzimler protein yapısındadırlar). Protein yapısında olduklarından proteinlerdeki aminoasitlerin dizilişi, enzimlerin belirli bir konformasyonu almasında ve üç boyutlu yapı kazanmasında büyük öneme sahiptir. Bu üç boyutlu yapı, katalitik aktivitesinde ve spesifik olmasında etkilidir. Enzimler reaksiyon hızını  $10^6$ - $10^{16}$  defa arttırabilirler. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda yan ürün meydana gelmez ve reaksiyon verimi %100'dür.

Enzimin etki ettiği bileşiğe **substrat** adı verilir. Substrat, enzimin her yerine değil **aktif merkez** denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar burada gerçekleşir.

### Enzim Kinetiğinde Michaelis-Menten Denklemi

1913 yılında Michaelis ve Menten, enzimle katalizlenen reaksiyonların özelliklerini kapsayan basit bir model öne sürmüşlerdir. Bu modelle, enzim substratıyla geri dönüşümlü olarak bağlanır, daha sonra enzimi serbest bırakarak, ürüne dönüşen bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. Bir substrat molekülünü kapsayan model aşağıdaki gibidir.



S : Substrat

E : Enzim

ES : Enzim-substrat kompleksi

$k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}$  : Hız sabitleri

$$k_{-2} \ll k_2 \quad V = k_2 \cdot [ES]$$

Michaelis-Menten denklemi, reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

V : Reaksiyon hızı

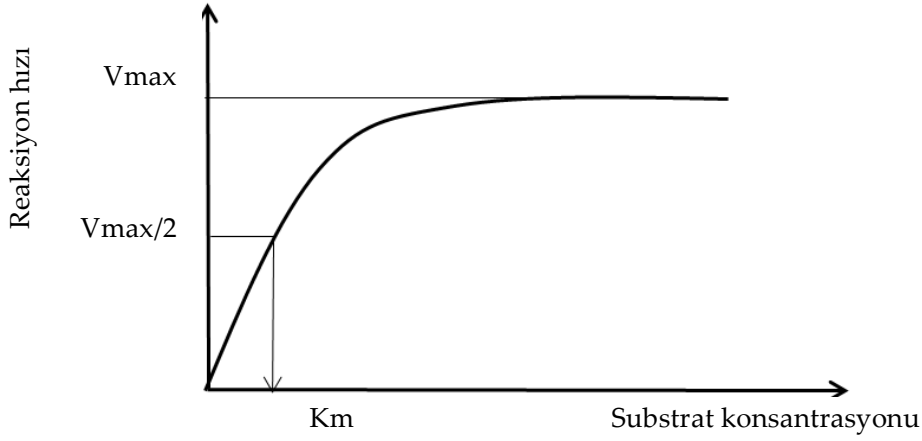
$V_m$  : Maksimum hız

$K_m$  : Michaelis-Menten sabiti

[S] : Substrat konsantrasyonu

Michaelis-Menten denklemi

Sabit bir enzim konsantrasyonu için substrat konsantrasyonu değiştirilerek ilk hızlar ölçülür ve grafiğe geçirilirse şekildeki eğriye benzer bir grafik elde edilir.



**Şekil 1.** Michaelis-Menten grafiği

Bu grafikten  $V_{max} /2$ 'ye karşılık gelen substrat konsantrasyonundan  $K_m$  değeri bulunur.  $K_m$  değeri, aktif merkezin yarısını doldurmak için gerekli substrat konsantrasyonudur ve her enzim için farklıdır.

## 8.2. Enzimatik Tepkimeyi Etkileyen Etkenler

Enzimle katalizlenen reaksiyonların hızı, enzim ve substrat konsantrasyonu, sıcaklık, ortamın pH'si, zaman ve reaksiyon ürünleri gibi etkenlerden etkilenmektedir.

- **Enzim konsantrasyonunun etkisi**
- **Sıcaklığın etkisi**
- **pH'nin etkisi**
- **Zamanın etkisi**

## 8.3. Enzim Aktifliğinin Düzenlenmesi

Enzimle katalizlenen reaksiyonların hızı, inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılır. İnhibitörler, reaksiyon hızını, enzim-substrat (ES) kompleksinin normal şekilde oluşmasına engel olarak azaltırlar. İnhibisyon çalışması ile; enzimin substrat spesifikliğı, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı, aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar ve enzimatik reaksiyonların kinetik mekanizmaları hakkında bilgi edinilebilir. 2 tip inhibisyon vardır;

1) **Tersinmez (irreversible) inhibisyon:** İnhibitör, aktif merkeze kovalent bağlarla bağlanarak enzimi inaktive eder.

2) **Tersinir (reversible) inhibisyon:** 3 çeşittir;

a) Yarışmalı (competitive) inhibisyon

b) Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon

c) Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon

a) **Yarışmalı (competitive) inhibisyon:** İnhibitör (I), molekül yapısı bakımından substrata (S) benzer ve enzimin aktif merkezine, substratın bağlanmasını engelleyecek şekilde bağlanarak, enzim-inhibitör (EI) kompleksini oluşturur. EI kompleksi ürüne dönüşmeyeceği için enzimin aktivitesini azaltır. Ortamda substrat konsantrasyonunun arttırılmasıyla enzimin inhibitöre olan ilgisi azaltılabilir, böylece inhibisyon ortadan kaldırılabilir.

b) **Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon:** Bu tür inhibisyonda inhibitör direkt enzime değil, ES kompleksine bağlanır. Böylece kompleksin yapısı bozulacağından ürün meydana gelmez. İnhibitör ya serbest enzime ya da ES kompleksine bağlanarak reaksiyonu yavaşlatır.

c) **Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon:** Bu tür inhibisyonda inhibitör, ya enzime ya da ES kompleksine aktif merkezin dışında bir noktadan bağlanarak inhibisyona neden olur. Bu tür inhibitörler genellikle enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olurlar. Bu nedenle ES oluşması ve ayrışması normal hızları ile olmaz.

#### 8.4. Enzim Aktiflik Birimleri

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda bulunurlar ve miktarının ölçümü çok zordur. Ancak optimum şartlarda katalizledikleri reaksiyon hızları ölçülerek tayin edilebilirler. Genellikle ortamda enzimi doyuracak kadar substrat bulunduğu için, substratın azalma miktarını ölçmek zordur. Bunun yerine ürünün oluşma hızı ölçülmesi tercih edilir.

Optimum şartlarda birim zamanda, substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına **enzim aktivitesi** denir. Enzim aktivitesini göstermek için kullanılan birimler şunlardır;

**Enzim ünitesi (U) :** 25°C de, optimum şartlarda, 1 dakikada, 1µm substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

**Spesifik aktivite:** 1 mg protein başına enzim ünitesidir. U/mg protein şeklinde hesaplanır. Enzimin saflık derecesini gösterir.

**Molar aktivite (turnover sayısı) :** Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne çevrilen substrat molekülü sayısıdır.

**Katal:** Optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

## 8.5. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, etki ettikleri reaksiyon çeşidine göre 6 gruba ayrılır.

### 1. Oksidoredüktazlar

Oksidasyon – redüksiyon, yani yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bu enzim grubuna örnek olarak; laktat dehidrojenaz, katalaz, polifenol oksidaz enzimleri verilebilir.

**Katalaz**, protein yapısında bol miktarda bulunan bir enzimdir. Katalazın temel fonksiyonu, dokularda ve özellikle karaciğerde bulunan hidrojen peroksidi  $O_2$  ve  $H_2O$  ya parçalamaktır. Bu sayede hücreyi serbest radikal ve diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur.

**Polifenol oksidaz (PPO; monofenol dihidroksifenil alanin)**, yapısında bakır bulunduran ve birden fazla alt birimden oluşan oligomerik yapıda bir enzimdir. PPO, fenolik bileşikleri, moleküler  $O_2$  varlığında yükseltgeyen bir enzimdir. İki türlü reaksiyonu katalizler; hidroksilasyon ve oksidasyon.

### 2. Transferazlar

Bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlar. Örnek; glutamik pirüvik transaminaz, fosforilaz vb.

**Glutamik Pirüvik Transaminaz (GPT)**, birçok dokuda bulunan bu enzimin bir diğer adı, alanin amino transferazdır (ALT, ALAT). GPT, alaninin amino grubunu  $\alpha$ -keto glutarata aktarır, reaksiyon sonucunda pirüvat ve glutamat oluşur.

### 3. Hidrolazlar

Bağların su katılarak koparılmasını (hidroliz) katalize eden enzim grubudur. Örnek; proteazlar, karbonhidrazlar, lipazlar vb.

#### 4. Liyazlar

Bağları oksidasyon ya da hidrolizden başka yollarla koparan veya oluşturan enzimlerdir. Örnek; pirüvat dekarboksilaz, sitrat sentaz, adenilat siklaz vb.

#### 5. İzomerazlar

Molekül içinde değişiklik yaparak molekülün optik, geometrik ya da yapısal izomerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Örnek; triozfosfat izomeraz, glukoz-6-fosfat izomeraz vb.

#### 6. Ligazlar (Sentetazlar)

Enerji kullanarak iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir. Örnek; DNA ligaz vb.

#### 8.6. Klinik Enzim Aktivite Tayinleri

Vücut sıvılarında veya dokularında bulunan enzimlerin aktivite ölçümleri hastalıkların teşhisi açısından oldukça önemlidir. Enzimlerin vücut sıvılarında veya doku ekstraktındaki miktarları çok düşük olduğundan direkt olarak ölçmek zordur. Bir enzimin miktarını belirlemek için örnekte bulunan enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı ölçülmektedir. Ölçülen reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile orantılıdır.

#### Deneysel Çalışmalar

##### Deney 1. Polifenol oksidaz Enziminin Aktivite Tayini

**Deneyin prensibi:** Bu deney, PPO enziminin, bir difenol olan katekolün oksidasyonunu katalizlemesi sonucu benzokinin oluşturması esasına dayanan kolorimetrik bir metottur.

**Deneyin yapılışı:** Fosfat tamponunda (pH 7.2) hazırlanmış katekol çözeltileri kullanarak spektrofotometrik olarak aşağıdaki çalışmalar yapılacaktır:

- (1) Polifenoloksidaz enzimin aktivite tayini yapılacak,
- (2) Aktiviteye (reaksiyon hızına) substrat konsantrasyonunun etkisi; V-[S] grafiği (Michaelis-Menten grafiği) çizilerek incelenecek,
- (3) Michaelis-Menten grafiği üzerinde enzimin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri bulunacaktır.

- (4) Farklı konsantrasyonda hazırlanmış katekol (pH 7.2) substratı ve enzim, tabloda verilen miktarlarda alınıp karıştırılarak 420 nm'de 2 dakika süresince, her 15 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilecektir. Absorbans–zaman grafiği çizilerek reaksiyon hızları belirlenecektir.

<b>Katekol konsantrasyonları</b>	<b>Std.1 (0.5 mM)</b>	<b>Std.2 (1 mM)</b>	<b>Std.3 (2 mM)</b>	<b>Std.4 (3 mM)</b>	<b>Std.5 (4 mM)</b>
<b>Katekol (mL)</b>	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
<b>PPO (mL)</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
420 nm'de 2 dakika süresince absorbans artışı her 15 saniyede spektrofotometrede okuma yapılarak kaydedilir.					

- (5) Her substrat konsantrasyonu için absorbans – zaman grafiği çizilerek eğimden ilk hızlar (enzim aktivitesi) bulunur.
- (6) İlk hız değerleri substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilirse Michaelis-Menten grafiği elde edilir. Bu grafiğe göre substrat konsantrasyonunun hıza etkisini tartışınız.
- (7) Michaelis-Menten grafiği üzerinde enzimin Km ve Vmax değerleri bulunur.

#### **Çözeltiler:**

- 1) 0.5; 1; 2; 3 ve 4 mM konsantrasyonlarında fosfat tamponunda (pH 7.2) hazırlanmış katekol çözeltileri.
- 2) Polifenoloksidaz enzimi (1 mg / 20 mL fosfat tamponu)

#### **Deney 2. PPO İnhibisyonu**

**Deneyin prensibi:** Substrat olarak katekol (pH 7.2) ve polifenoloksidaz enziminin bir inhibitörü olan L-sistein (pH 7.2) kullanıldığı deneyde hızdaki azalma incelenerek enzim inhibisyonu gözlenecektir.

### Deneyin yapılışı:

Deney aşağıdaki şemada belirtildiği gibi yapılacaktır.

<b>Kör</b>	2.8 mL Katekol
<b>Örnek</b>	Kör + 0.2 mL PPO
420 nm'de 2 dakika süresince her 15 sn'de absorbans artışı spektrofotometrede okunarak kaydedilir.	
Absorbans – zaman grafiği çizilerek eğimden hız değeri bulunur.	

<b>Kör</b>	1.4 mL Katekol + 0.2 mL L-Sistein
<b>Örnek</b>	Kör + 0.2 mL PPO
420 nm'de 2 dakika süresince her 15 sn'de absorbans artışı spektrofotometrede okunarak kaydedilir.	
Absorbans - zaman grafiği çizilerek eğimden hız değeri bulunur.	
İnhibitör ilave edildikten sonra enzim aktivitesindeki değişme, hız değerleri mukayese edilerek tartışılacaktır.	

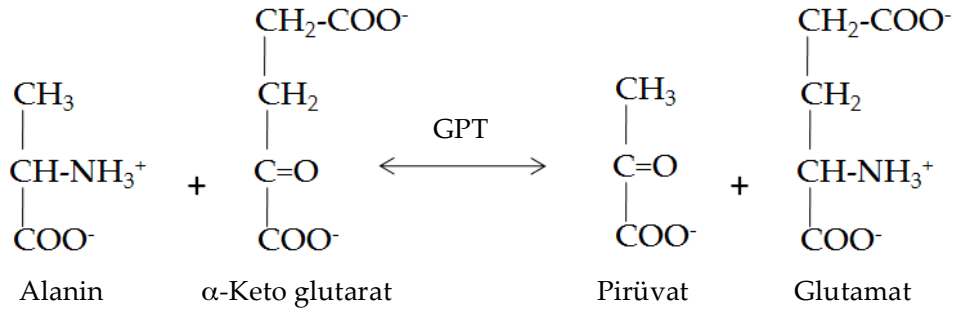
### Çözeltiler:

- 1) 2 mM L-Sistein (pH 7.2)
- 2) 2 mM katekol (pH 7.2)
- 3) Polifenoloksidaz enzimi (1 mg / 20 mL fosfat tamponu)

### Deney 3. Glutamik Pirüvik Transaminaz (GPT) Aktivitesinin Tayini

**Deneyin prensibi:** Glutamik pirüvik transaminaz enziminin katalizlediği transaminasyon reaksiyonunda, alanin ve  $\alpha$ -keto glutarik asitten, pirüvik asit ve glutamik asit meydana gelmektedir. Oluşan pirüvik asit, 2,4-dinitrofenil hidrazin ile reaksiyona girerek hidrazon oluşturur. Bazı ortamlarda kahverengi olan bileşiğin renk

şiddeti GPT aktivitesiyle doğru orantılıdır.



**Deneyin yapılışı:** Aşağıdaki tablolarda belirtilen işlemler sırası ile uygulanır.

### I. Aşama: Örnek çalışması

Maddeler / mL	Kör	Örnek
Substrat	0.5	0.5
37°C' de su banyosunda 3 dakika bekletilir.		
Distile su	0.1	-
Serum	-	0.1
37°C' de su banyosunda 30 dakika bekletilir.		
2,4-dinitrofenil hidrazin	0.5	0.5
Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.		
0.4 M NaOH	5	5
Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.		
Absorbans değerleri köre karşı 510 nm' de okunur.		

### II. Aşama: Standart kalibrasyon grafiğinin çizilmesi

Maddeler / mL	Kör	St Tüp 1	St Tüp 2	St Tüp 3
Ünite Değerleri	-	28	57	97
Substrat	1	0.9	0.8	0.7



<b>Distile su</b>	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>Sodyum pirüvat</b>	-	0.1	0.2	0.3
<b>2,4-dinitrofenil hidrazin</b>	1	1	1	1

Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

<b>0.4 M NaOH</b>	10	10	10	10
-------------------	----	----	----	----

Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.

Absorbanslar köre karşı 510 nm’de okunur. Ölçülen absorbans değerleri üniteye karşı grafiğe geçirilerek standart kalibrasyon grafiği çizilir ve bu standart grafik kullanılarak serum GPT enzim ünitesi hesaplanır.

#### Çözeltiler

**Fosfat tamponu:** 13.97 g  $K_2HPO_4$  ve 2.69 g  $KH_2PO_4$  bir miktar distile suda çözülerek litreye tamamlanır (pH 7.4) ve +4°C’de saklanır.

**Substrat:** 29.2 mg  $\alpha$ -keto glutarik asit ve 1.78 g dl-alanin 1 M NaOH’de çözülür. pH 7.4’e ayarlanır. Fosfat tamponu ile 100 mL’ye tamamlanır.

**2,4-Dinitrofenil hidrazin:** 19.8 mg 2,4-Dinitrofenil hidrazin 10 mL derişik HCl’de çözülür, distile su ile 100 mL’e tamamlanır. Oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanır.

**Sodyum pirüvat:** 22 mg sodyum pirüvat 100 mL fosfat tamponunda çözülür. Dondurularak saklanır.

#### Deney 4. Enzim Aktivitesine Sıcaklık ve Enzim Miktarının Etkisi

**Deney prensibi:** Deneyde, karaciğerde bulunan katalaz enziminin,  $H_2O_2$  ile reaksiyonunun hızının, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimi gözlenecektir.

##### a) Sıcaklığın etkisi

**Deneyin yapılışı:** Karaciğer küçük parçalara kesildikten sonra 2 kısma ayrılır. Bir kısmı su dolu bir kaptta kaynatılır. Suda kaynatılmış karaciğer parçaları bir behere alınır ve üzerine 3 mL  $H_2O_2$  eklenir. Başka bir behere, oda sıcaklığındaki karaciğer parçaları alınır ve üzerine 3 mL  $H_2O_2$  eklenir. Reaksiyon hızına sıcaklığın etkisi gözlenir.

## **b) Enzim miktarının etkisi**

**Deneyin yapılışı:** Eşit miktarda karaciğer parçaları alınarak 2 kısma ayrılır. Parçalardan biri havanda dövülerek ezilir. Eşit miktarda (3 mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan deney tüplerinden birine ezilmiş karaciğer, diğerine parça karaciğer koyularak reaksiyon hızları gözlenir.

## **KAYNAKLAR**

- (1) <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm>
- (2) <http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.html>.
- (3) Berthelot M.: Report Chem.Aplique 1, 284 (1859).
- (4) Bergmayer H. U., Verlag Chemie GMBH Wein Heim/Bergster Academic Press, New York and London. Pp. 779-787 & 837-853 (1956).
- (5) [www.mustafaaltinisik.org.uk/09-tbl102-0809Enzimler.ppt](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/09-tbl102-0809Enzimler.ppt)
- (6) [www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf](http://www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf)