

9. Hafta: Enzimler ve Enzim Kinetiği

Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Enzimler, proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar. Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır.

Biyokimya tarihindeki araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk önemli denemeler 1760-1825 yılları arasında midede bulunansindirim enzimleri üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı ise 1935 yılında bir İsveçli kimyager olan S.S.Berzelius gerçekleştirmiş ve diastaz enziminin nişastayı "**in vivo**" olarak sülfirik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini göstermiştir.

ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Enzimler, önce katalitik etkilerini üzerlerinde gösterdikleri ve "**substrat**" adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, "az" eki getirilerek belirlenebiliyordu. Örneğin üreyi CO₂ ve NH₃'e parçalayan enzime üreaz, argininiornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesinikatalizleyen enzimlerin tümüne de fosfataz deniliyordu

Sistematik isimlendirmeye göre reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 grupta toplanmıştır. Herbir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır. Enzimlerin adlandırılmasında ismin ilk bölümü substrat veya substratlarındır. İkinci bölüm ise katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna "az" eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.

Reaksiyonun özelliğini açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonuna yazılabilir. Örneğin,



reaksiyonunun bir yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu olduğunu belirtmek için enzim adı;

L-malat: NADP⁺ oksidoredüktaz şeklinde yazılır.

Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamdan ibarettir.

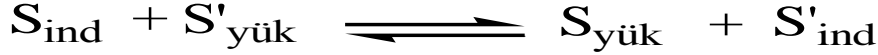
Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir.

Örneğin E.C. 2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna yapıldığını ve son rakam da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını

göstermektedir. Sözü edilen enzim heksokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP: D-heksoz-6-fosfotransferaz enzimidir.

Enzimler 6 sınıf altında incelenmektedir:

1. **Oksidoredüktazlar:** İki substratarasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Substratlara S ve S' dersek,



Bu büyük ve önemli olan grup dehidrogenazlar veya oksidazlar olarak bilinmektedir.

Eski adı: Alkol dehidrogenaz

Sistematik adı: Alkol: NAD⁺ oksidoredüktaz

E.C. 1.1.1.1

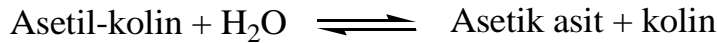
2. **Transferazlar:** İki substrat arasında H⁺ dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Taşınan gruba G denilirse,



Genel reaksiyonu yazılabilir.

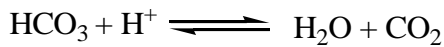
3.Hidrolazlar: Ester, eter, peptit, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:



4.Liyazlar : Hidrolizden farklı bir mekanizma ile grupların substratlardan uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:



Eski adı : Karbonikanhidraz

Sistematik adı : Karbonat: hidroliyaz

E.C. 4.2.1.1.

5.İzomerazlar : Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:

D-gliseraldehit-3-fosfat \rightleftharpoons Dihidroksi aseton fosfat

Eski adı : Trioz fosfat izomeraz

Sist. adı : D-Gliseraldehit-3-fosfat ketolizomeraz

E.C. 5.3.1.1.

6.Ligazlar : ATP veya GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji yardımıyla iki bileşiğin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:

ATP + L-glutamat + NH₄ \rightleftharpoons ADP + PO₄⁻³ + L-glutamin

Eski adı : Glutaminsentetaz

Sistemik adı : L- glutamat : NH₄⁺ligaz (ADP)

E.C. 6.3.1.2.

Enzimler uzun yıllardır ekmek, bira, peynir üretimi, şarap üretimi ve benzeri konularda gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca enzimler tıp, ziraat, eczacılık gibi konularda da çok geniş kullanım alanı bulmaktadır.

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik ortamda sentezlenmektedir ve bu ortamdan izole edildikten sonra bile aktivite gösterebilmektedirler. Enzimlerin katalizleme güçleri, kimyasal katalizörlere göre 10⁶ - 10¹⁶ kez daha fazladır. Enzimlerin mol kütlesi 10⁴ - 10⁶ dalton arasında değişmektedir.

Bir çözeltideki enzim aktivitesi "enzim ünitesi" olarak verilir. Her enzimi içine alabilecek bir ünite tanımı olmamasına rağmen, 25°C'de optimum koşullarda 1 mikromol (10⁻⁶ mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına "1 enzim ünitesi" denilmektedir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre enzim aktivite birimi katal'dır. 1 katal enzim ise bir saniyede bir mol madde dönüşümüne yol açan enzim miktarıdır.

Enzimler aktivitelerini aktif merkez adı verilen küçük bir bölgeleriyle yaparlar, bununla birlikte bir bütün olarak proteinin üç boyutlu doğal yapısı da önemli bir rol oynamaktadır. Enzimlerin katalizör olarak etki ettikleri maddelere substrat adı verilmektedir.

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gereklolan ve protein yapısında olmayan gruplara da kofaktör denilmektedir. Kofaktörler bir metal iyonu olabilecekleri gibi koenzim adı verilen kompleks organik bir bileşik de olabilirler. Bazı durumlarda aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksine haloenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine ise apoenzim adı verilmektedir

Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri vardır. Genellikle bu kofaktörler diyalizle uzaklaştırılabilir. Fakat bazı enzim- kofaktör bağlanmaları kovalent yapıdadır veya diyalizle uzaklaştırılamıyacak kadar sağlamdır. Böyle kofaktörlere "prostetik grup" adı verilir.

Örneğin "sitokrom C" deki "hem" grubu, enzime kovalent bir bağla bağlıdır. Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısına turnover sayısı adı verilir.

Kofaktör olarak metal iyonu içeren bazı enzimler

Alkol dehidrogenaz Zn^{+2}
Karbonik anhidraz Zn^{+2}
Karboksipeptidaz Zn^{+2}
Fosfohidrolazlar Mg^{+2}
Fosfotransferazlar Mg^{+2}
Arginaz Mn^{+2}
Sitokromlar Fe^{+2} veya Fe^{+3}
Katalaz Fe^{+2} veya Fe^{+3}
Tirozinaz Cu^{+2}
Sitokromoksidaz Cu^{+2}

Grup transferini sağlayan koenzimler

Koenzim Taşınan grup

Nikotinamidadenin dinükleotid (NAD^+)	1 H atomu ve 2 elektron
Nikotinamidadenin dinükleotid fosfat ($NADP^+$)	1 H atomu ve $2e^-$
Flavin mononükleotid (FMN)	2 H atomu ve 2 elektron
Flavin adenin dinükleotid (FAD)	2 H atomu ve 2 elektron
Koenzim Q (CoQ)	2 H atomu ve 2 elektron
Tiamin pirofosfat (TPP)	Aldehitler
Koenzim A (CoA)	Açıl grupları
Lipoamin	Açıl grupları
Piridoksal fosfat	Amino grupları

Koenzimler genellikle belirli atom veya fonksiyonel grupların transferini yaparlar. Koenzimlerin çoğu tiamin, lipoik asit, riboflavin, pantotenik asit, nikotin amid gibi vitaminleri yapılarında bulundurulur.

Enzimlerin bir dakikada etkiledikleri substrat sayısına **turnover sayısı** adı verilmektedir.

Enzim Turnover sayısı

Katalaz	40 000 000
Karbonik anhidraz	1 000 000
Asetilkolinesteraz	14 000
Penisillinaz	2 000
Laktat dehidrogenaz	1 000
Kimotripsin	100

Enzimlerle çalışan **kofaktörlerin** (metal iyonlarının) iki çeşit fonksiyonu vardır.

KATALİZ

Glikozdan glikoz-6-fosfat elde edilmesi reaksiyonunu ele alalım. Burada aktifleşmiş durumdaki glikoz molekülleri gerekli bağ oluşumu ve parçalanması reaksiyonlarını hemen tamamlayarak ürüne dönüşür. Bu şekilde ürünün meydana gelebilmesi için, reaksiyona giren maddelerin belirli bir enerji bariyerini aşmaları gerekir. Aşılması gerekli olan bu enerji engeline aktifleşme enerjisi adı verilmektedir ve belirli sıcaklıkta bir molsubstratın aktifleşebilmesi için gerekli enerji miktarı olarak tanımlanmaktadır.

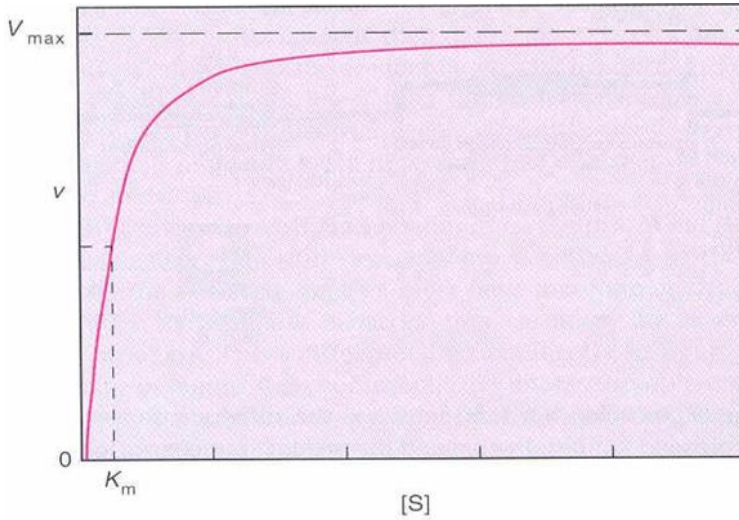
Her kimyasal reaksiyonda aktifleşme engelini üst noktasına karşılık gelen bir geçiş hali veya geçiş kompleksi adı verilen ve etkileşen moleküllerin enerjice zengin hallerini gösteren bir durum vardır.

Reaksiyonun hızı geçiş kompleksi konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Sıcaklığın artırılması, termik hareketi ve kinetik enerjiyi arttıracığından geçiş kompleksinin konsantrasyonu artacak ve reaksiyon hızlanacaktır.

Katalizörlerin reaksiyon hızları üzerine etkileri aktivasyon enerjisini azaltmak şeklindedir. Böylece reaksiyona giren maddelerle düşük enerjili bir geçiş kompleksi oluşturulur ve daha fazla sayıda ürün meydana gelmesi sağlanır. Reaksiyon bitiminde katalizörde herhangi bir değişiklik meydana gelmez.

ENZİM KATALİZLİ REAKSİYONLARIN KİNETİĞİ

Kimyasal reaksiyon kinetiğinin genel prensipleri enzim reaksiyonlarında da aynen uygulanmaktadır. Ancak enzim tepkimelerinde bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu da enzimlerin substratla doygunluğa gelmeleridir.



Bir enzim reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimine baktığımızda, düşük substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Reaksiyon hızı substrata göre birinci derecedendir.

Substrat konsantrasyonu artırıldığında zaman, reaksiyon hızının artmasında bir miktar azalma gözlenir. Burada reaksiyon hızı sıfırcı ve birinci dereceler arasında karışık bir dereceye sahiptir. Substrat daha fazla artırıldığında ise hız, sabit hale gelir ve artık substrat konsantrasyonu ile değişmez, substrat ne kadar çok artırılsa da hızda herhangi bir değişiklik gözlenmez.

Bu bölgede reaksiyon sıfırcı derecedendir ve tüm enzim molekülleri substratla birleşmiş yani doymuş haldedir. Her enzim için doygunluk noktasına erişebilme, farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleşir.

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M}$$

$[S]=K_M$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_M sabitinin tanımını, ‘maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu’ olarak çıkarabiliriz. Birimi de mol/l’dir.

Michaelis-Menten denklemi enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde tüm enzimler için temel bir ifadedir. Ancak enzimlerin çoğu, bu eşitliği çıkartırken kabul ettiğimiz bazı ideal şartlara uymayabilirler. Örneğin birden fazla enzim-substrat kompleksinden sonra ürün oluşabilir.

Bundan başka bazı reaksiyonlarda iki ya da daha çok sayıda substrat olabilir. Böyle bir durumda ES_1 , ES_2 ve ES_1S_2 gibi üç ayrı enzim-substrat kompleksi oluşabilir. Bu tip enzim reaksiyonlarının kinetik analizi çok karmaşıktır ve çözümlerinde bilgisayarlardan yararlanır. Bununla birlikte bütün enzimlerin kinetiğinin analizinde başlangıçta Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanır.

K_M ve V_{max} Değerlerinin Önemi

Enzimlerin K_M değerleri 10^{-1} ile 10^{-6} M arasında değişmektedir. K_M değeri, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır.

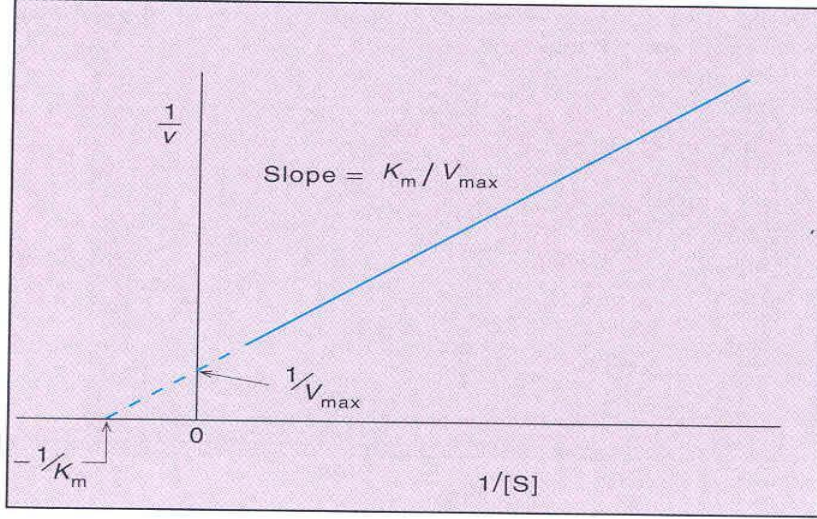
Enzim maksimum hızla çalışırken, enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna **K_M sabiti adı** verilir.

K_M değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir, enzimin substrata ilgisi büyükse K_M değeri küçüktür, bu da küçük substrat konsantrasyonlarında bile enzim ve substratın ES kompleksini yapabildiğini gösterir. Enzimin substrata olan ilgisi zayıfsa K_M daha büyüktür.

V_{max} ve K_M Değerlerinin Grafikle Tayini

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler, Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{\max} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunabilmesi için değişik substrat konsantrasyonlarında ilk hızlar tayin edilir. Bulunan değerlerle Michaelis-Menteneğrisi

izilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlenir. Fakat bu eğri bir hiperbol olduğu için ve her nokta deneysel olarak bulunamayacağı için elde edilen hız hatalı olabilir. Bu nedenlerden dolayı Michaelis-Mentendenkliğini doğru denklemi haline getirmek gerekmektedir. Eşitliğin her iki tarafını ters çevirerek bunu yapabiliriz.



LineweaverBurk veya double-reciprocal grafięi

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad (26)$$