

77190

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus subtilis' TEN İZOLE EDİLEN
 α -AMİLAZIN AKTİVİTESİ ÜZERİNE
[H⁺] ETKİSİ.

77190

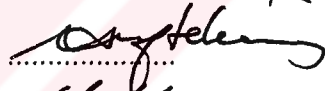
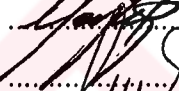
Günay TURMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(KİMYA ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR
TEMMUZ - 1998

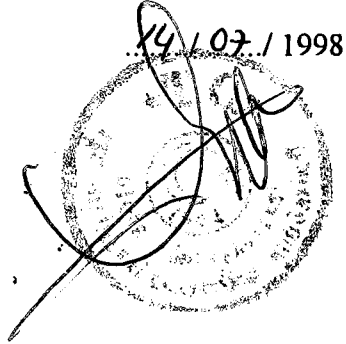
D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından *KİMYA* Anabilim Dalı' nda *YÜKSEK LİSANS* tezi olarak kabul edilmiştir.

	Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. G. T. İN AYTEKİN	
Üye	: Doç. Dr. YAVUZ ENSARI	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL	

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

Prof. Dr. Davut BAŞARAN

14 / 07 / 1998


TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarım için bana gerekli koşulları sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu tezin hazırlanmasında büyük emekleri geçmiş olan, rehberliklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Arş. Gör. Dr. Murat KIZIL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Deney çalışmalarım süresince Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve büyük bir dayanışma örneği oluşturduğumuza inandığım Arş. Gör. Mehmet DOĞRU'ya teşekkür ederim.

Günay TURMUŞ

AMAÇ

Ekstraselüler enzimlerden biri olan α -amilaz, endüstride özellikle deterjan sanayiinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu enzimin bir çok Basil türü tarafından salgılanması, dolayısıyla kolaylıkla temin edilmesi endüstriyel önemini arttırmaktadır.

Çalışmada *Bacillus subtilis* ' ten saflaştırılmış olan ve ticari olarak temin edilen α -amilaz enzimi üzerine $[H^+]$ iyonlarının nasıl bir etkisi olduğunu saptayarak reaksiyon mekanizmasını aydınlatmaya çalışmak, buna bağlı olarak da endüstriyel proseslere müdahale edebilmek amaçlanmıştır.

ÖZET

Bacillus subtilis'ten izole edilen α -amilazın aktivitesi üzerine $[H^+]$ iyonlarının etkisi araştırıldı. Bu amaçla öncelikle enzim derişimi ve uygun inkübasyon süresi belirlenmeye çalışıldı.

Sonuçta uygun enzim derişiminin $3 \cdot 10^{-3} \mu g/\mu L$ ve uygun inkübasyon süresinin 15 dakika olduğu saptandı.

Uygun enzim derişiminde farklı pH'larda ve farklı substrat derişimlerinde her biri için ayrı ayrı olmak üzere enzim ön inkübasyonsuz ve enzim her bir pH'da tamponla 120 dakikalık ön inkübasyonundan sonra optimal pH değerleri tayin edildi. Her iki koşulda da optimal pH'nın 7.12 olduğu saptandı.

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek üzere enzim, sabit substrat derişiminde ($[S]: 2.52 \mu g/\mu L$) daha önce saptanan optimal pH'da 120 dakikalık ön inkübasyona tabi tutuldu. $pH_1=pK_a=6.15$ ve $pH_2=pK_b=8.68$ ve optimal $pH=7.415$ olarak bulundu.

Farklı pH'larda Michaelis-Menten kinetiği çalışılarak enzim için K_M değerleri (4.898; 4.7311; 5.004; 1.4615; 0.2483; 1.6666 $\mu g/\mu L$) ve V_{max} değerleri (2.023; 2.431; 2.542; 0.952; 0.117; 0.438 $\mu mol/dak.$) bulundu.

Oligomerik yapıdaki enzimlerin makromoleküler yapıdaki substratlarla Tippon, Dixon ve Webb teorilerini doğrulamakta uygun modeller olmadıkları kanısını uyandırdı.

ABSTRACT

The effect of $[H^+]$ ions on α -amylase activity which was isolated from *Bacillus subtilis* was investigated. We first tried to determine the appropriate enzyme concentration and incubation time. Results obtained showed that appropriate enzyme concentration is $3.10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ and appropriate incubation time is 15 minutes.

Optimal pH value was determined in appropriate enzyme concentration, different pH values and substrate concentrations both with pre-incubation for 120 minutes and without pre-incubation. Optimal pH was found to be 7.12 in both conditions.

To examine the effect of pH on enzyme stability, the enzyme was pre-incubated for 120 minutes in constant substrate concentration ($[S]$: $2.52 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) and in previously obtained pH value. $\text{pH}_1=\text{pH}_a$, $\text{pH}_2=\text{pH}_b$ And optimal pH values were found to be 6.15, 8.68 and 7.415 respectively.

K_M and $V_{\max}$ values for the enzyme were found by using Michaelis-Menten kinetics in different pH values K_M 4.898; 4.7311; 5.004; 1.4615; 0.2483; 1.6666 and $V_{\max}$ 2.023; 2.431; 2.542; 0.952; 0.117; 0.438

Tippon, Dixon and Webb theories can not be applied to a system contains an oligomeric enzyme and a substrate in a macromolecular structure.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. NİŞASTA	1
1.2. EKSTRASELÜLER ENZİMLER	4
1.3. AMİLAZLAR	4
1.3.1. Termofilik Amilazlar	5
1.3.2. Alkalın Amilazlar	6
1.3.3. Asidik Amilazlar	6
1.3.4. Amilazların Etki Mekanizmaları	7
1.4. TAMPON ÇÖZELTİLER	10
1.4.1. Tampon Kapasitesi	11
1.4.2. İyon Şiddetinin Etkisi	11
1.5. ENZİM KİNETİĞİNE GİRİŞ	12
1.5.1. $[E]_0$ 'nin Fonksiyonu Olarak Başlangıç Hızı	12
1.6. ENZİMATİK REAKSİYONLARIN HIZI ÜZERİNE pH'NIN ETKİSİ	14
1.7. pH'YA BAĞLI HIZ DENKLEMLERİNİN TÜRETİLMESİ İÇİN MODELLER	15
A. Serbest Enzimin İyonizasyonu	15
B. Enzim Substrat Kompleksinin İyonizasyonu	20
C. Serbest Enzim ve Enzim Substrat Kompleksinin İkisinin Birden İyonlaşması	25
2. MATERYAL VE METOD	27
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
2.2. Kullanılan Aletler	27
2.3. Kullanılan Tampon Sistemleri	27
2.4. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması	27
2.5. Uygun Enzim Derişimi ve Deney Süresinin Belirlenmesi	28
2.6. Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi	28
2.7. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	28
3. SONUÇLAR	29
4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI	37
KAYNAKLAR	46
EKLER	48
EK.1	48
1.1. 0.0286 M A Çözeltisi	48
ÖZGEÇMİŞ	49

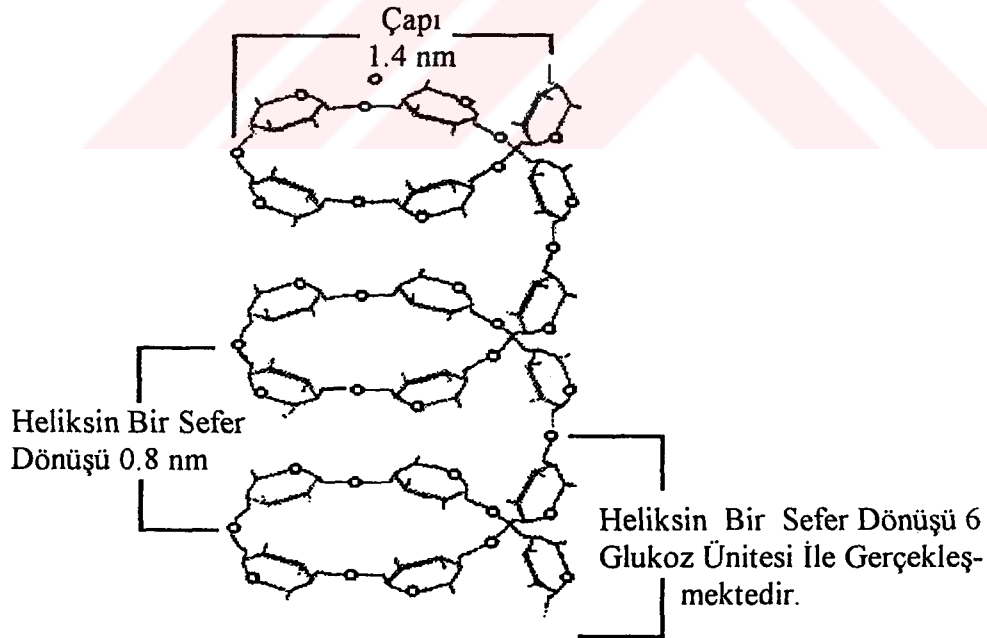
1. GİRİŞ

1.1. NİŞASTA

Niştaya patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday ve pirinç gibi tahıllarda daha çok rastlanmakla beraber, bütün bitki hücreleri niştaya yapma kabiliyetine sahiptir.

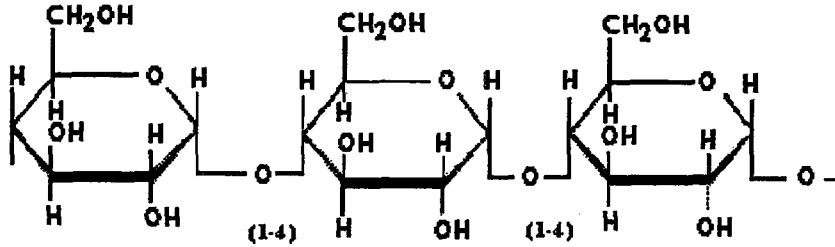
Niştaya iki yapısal formda bulunmaktadır. bunlardan biri amiloz diğeri ise amilopektin'dir. Niştanın α -Amiloz ve amilopektin içeriğı kaynağına bağılı olarak farklılıklar gösterir (1).

α -amiloz dallanma göstermeden düz zincirler halinde uzamakta ve D-glukoz ünitelerinin α -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağı ile birbirine bağlanması sonucu meydana gelmiş bir depo polisakkarittir. α -amiloz suda çözünmez fakat su emerek miseller haline gelebilir. Bu misellerde polisakkarit zinciri kendi etrafında sarmal yaparak Şekil 1.1'de görüldüğü gibi bir heliks yapısı oluşturabilir.



Şekil 1.1: α -amiloz molekülünün α -heliks yapı kazanmış şekli.

α -amilozun düz zincir yapısı ise Şekil 1.2'de görüldüğü gibi D-glukoz ünitelerinin α -(1→4) glikozidik bağı ile birbirine bağlanması sonucu ortaya çıkmıştır.

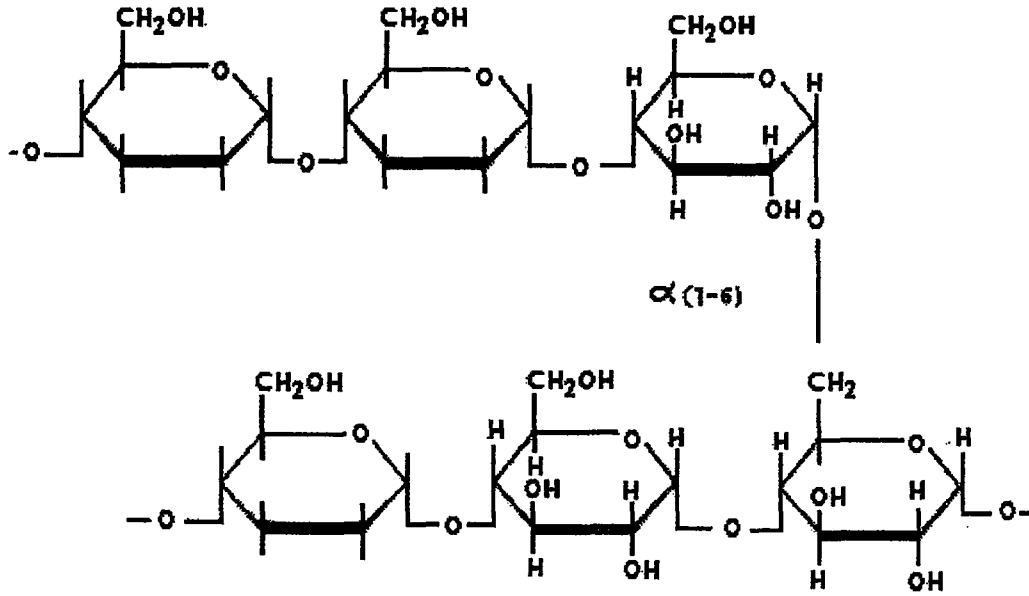


Şekil 1.2 : Dallanma göstermeyen düz zincir yapısındaki α -amiloz molekülü, D-glukoz ünitelerinin birbirine α -(1→4) glikozidik bağı ile bağlanması suretiyle meydana gelmiştir.

Amiloz polisakkariti düz zincirler yerine sol el heliks yapısı meydana getirerek helezonlar oluşturmaktadır. Bu heliksin her dönüsünde 6 glukoz ünitesi yer almaktadır. İki heliks arasındaki mesafe 0.8 nm'dir. Heliksin çapı ise 1.4 nm'dir. Bir amiloz polisakkaritinde yaklaşık 250-300 glukoz ünitesi bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 40.000-50.000'dir (2).

Amilopektin; daha yüksek molekül ağırlığına sahip ve dallanma gösteren bir bitki polisakkaritidir. Düz zincir amilozda olduğu gibi glukoz ünitelerinin α -(1→4) glikozidik bağı ile birbirine bağlanması ile uzamaktadır. Türden türe değişiklik göstermek üzere her 20 ile 30 glukoz ünitesinden sonra bir dallanma noktası ortaya çıkmaktadır.

Amilopektindeki dallanma bir glukoz ünitesinin 1 nolu karbon atomu ile, düz zincirde yer alan glukoz ünitesinin 6 nolu karbonu arasında bir α -(1→6) glikozidik bağı oluşması ile meydana gelmektedir.



Şekil 1.3: Amilopektin molekülünde düz zincirler, D-glukoz ünitelerinin birbirine α -(1→4) glikozidik bağı ile bağlanması suretiyle dallanma noktaları ise iki şeker ünitesinin birbirine α -(1→6) glikozidik bağı ile bağlanması suretiyle meydana gelmektedir.

Amilopektin suda çözünmez, sulu çözeltilerde kolloidal yada miseller yapı gösterir. 250-5000 glukoz biriminden oluşur. Molekül ağırlığı 40.000-800.000 dir

Nişastanın ana maddesi enzimatik olarak iki ana yolla hidrolize edilmektedir. Maltta bulunan β -amilaz enzimi α -amilazdan farklı davranış göstererek amilaz ve amilopektinden çok az miktarda glukoz ünitelerini koparıırken çoğunlukla bir disakkarit olan maltoz ünitelerini meydana getirmektedir.

α - ve β - amilaz amiloz ve amilopektindeki α -(1→4) glikozidik bağlarını koparır. Ve bu enzimlerin etkisi amilopektindeki α -(1→6) glikozidik bağa gelince durur. Büyük bir molekül olan bu dallı zincire limit dekstirin adı verilmektedir. Amilopektinin dallanma noktasında bulunan α -(1→6) glikozidik bağları α -(1→6) glikozidaz enzimi tarafından kırılmaktadır (3).

1.2. EKSTRASELÜLER ENZİMLER

Bir çok bakteri üredikleri ortamda besin maddelerinden faydalanmak için üredikleri besi yerine ekstraselüler enzimleri (eksoenzimler) salgılar. Çoğunluğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimlerin temel fonksiyonlarından biri mikroorganizmaya kullanılabilir besin sağlamaktır. Diğer bir fonksiyonları ise enfeksiyon esnasında koruyucu olarak işlev görmesidir.

Ekstraselüler proteolitik enzimler besin endüstrisi ve buna bağlı diğer biyoteknolojik alanlarda yaygın bir şekilde kullanılır (4). Bunun haricinde deterjan sanayii , bira yapımı protein hidrolizatlarının üretiminde, fungal kökenli olanlar ise besin endüstrisinde kullanılır (5).

Ekstraselüler enzimlerin sentezi sporlaşmadan önce geç eksponentiyal ve erken stationer fazda maksimuma ulaşır. Bu durum eksoenzim sentezi ve sporlaşma arasında bir ilişki olduğunu gösterir. Bununla birlikte eksponentiyal fazdan stationer faza geçiş besi yerindeki karbon kaynağını azalması ile ilgilidir (6).

Farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerden amilaz üretimi ile üreyen bakteri arasında bir orantı olmadığı, karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmasının şekerlere oranla daha yüksek amilaz üretimini gerçekleştirdiğini, azot kaynağı olarak da organik azot kaynaklarının amilaz üretimini artırdığını, inorganik azot kaynaklarının kullanımının ise amilaz üretimini çok olumsuz etkilediği belirtilmiştir (7).

1.3.AMİLAZLAR

Amilaz terimi; ilk kez nişasta veya bunların parçalanma ürünleri gibi polisakkaritlerdeki α -(1→4) glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimleri tanımlamada kullanıldı (8,9,10).

Amilazlar; pankreas, tükürük bezleri, bitkiler ve mikroorganizmalar, özellikle bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen bir enzim grubudur. Özellikle bakteriler tarafından üretilen amilazlar ısıya dayanıklı olmaları nedeniyle büyük bir ticari öneme sahiptirler ve nişasta endüstrisinde kullanılırlar (11).

Malt'ta bulunan amilazlar bira ve diğer alkollü içeceklerin üretiminde oldukça önemlidir (8).

Çeşitli canlılardan izole edilen amilazlar substratı olan nişastayı hidrolizleme mekanizmasına göre Endo- ve Ekzo- amilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (12).

Endoamilazlar ; glikojenin ve nişastada bulunan amilopektinin dallanma noktalarını oluşturan α -(1→6) glikozidik bağlarına etki edemedikleri halde α -(1→4) glikozidik bağlarına etki ederler. Bunun sonucu olarak substratın ortalama molekul ağırlığı ve viskozitesi hızla düşer. Başlıca ürünler oligosakkaritlerdir.

En çok araştırılan endo- amilazlar α -amilazlardır. Son yıllarda özellikle *B.subtilis* ' ten izole edilen α -amilaz üzerinde yoğun çalışmalar vardır. *B.subtilis*'in salgıladığı α -amilaz enzimi ısıya oldukça dayanıklılık gösterir (13).

Ekzoamilazlar bir β -amilaz olup, bitki veya mikrobiyal kaynaklı olabilirler. Bunlar düzenli olarak indirgen olmayan uçtan başlayarak polisakkaritlere etki ederler. α -(1→4) glikozidik bağların tümünü kırarak α -glukoz veya maltoz oluşumunu sağlarlar.

α - veya β - amilazlardan başka birde γ -amilazlar vardır. γ -amilazlar glukoamilazlar sınıfına girmektedir (14).

1.3.1 Termofilik Amilazlar

Farklı mikroorganizmalardan saflaştırılan, yüksek sıcaklıklara (80-90 °C) dayanıklı amilazlar ticari öneme sahiptir.

Termal kararlılığa sahip α -amilaz kaynağı olarak önceleri *B.coagulase* daha sonra *B.stearothermophilus* kullanılmıştır (15). Termofilik bakteriler ısıya dayanıklı α -amilazlar üretmelerine rağmen mikroorganizmanın termofilik karakteri ile bunun salgıladığı ekstraselüler α -amilazı arasında zorunlu bir ilişki yoktur.

Örneğin *Thermonorropa curteva*'nın salgıladığı α -amilaz 65 °C ' ye kadar ve *B.acidocaldarius*'un salgıladığı α -amilaz 60-63 °C' ye kadar kararlı iken *B.licheniformis* (genel olarak termofil olarak bilinmez)' in salgıladığı α -amilaz 76° C ' ye kadar kararlıdır (16).

1.3.2. Alkalın Amilazlar

Alkalın pH'da aktivite gösteren enzimler deterjan sanayisi bakımından önemlidir. Robyt ve Ackerman *Psuedomonas stutzeri*' den optimum pH' sı 8 olan amilazı tanımlamışlardır (17).

Bazı basil türlerinin pH :10 veya daha yukarısında aktivite gösteren α -amilazlara sahip olduğu belirtilmiştir.Amilaz aktivitesi için optimum pH aralıklarının 4-11 arasında değiştiği saptanmıştır (18).

1.3.3. Asidik Amilazlar

Nişasta endüstrisinde kullanılan bu tür enzimler hakkında çok az şey bilinmektedir. Endüstriyel proseslerle dekstroz üretimi pH: 4-5 aralığında gerçekleşmektedir. Bu iş için asidik amilazların kullanımı avantaj oluşturur. *B.acidocaldarius*' tan izole edilen α -amilazın nişastayı hidrolizi ile elde edilen sonuçlar onun karakterizasyonunda kullanılmıştır. Diğer yandan Buonocore ve ark. farklı kaynaklardan izole ettikleri bakterilerin salgıladığı endoamilazların geniş bir sıcaklık (50-75 °C) ve pH:3.5-4.5 aralığında optimal pH' ya sahip olduklarını göstermişlerdir (20).

1.3.4. Amilazların Etki Mekanizmaları

1963 yılına kadar α -amilazın nişastayı rasgele hidrolizleyip glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülürken. *B.subtilis* ' ten izole edilen α -amilazın amiloz üzerine etkisini konu alan bir çalışmada, maltotrioz (G_3) ve maltohegzoz (G_6) ' un baskın olduğu bir karışımın ele geçtiği ortaya konmuştur. Bu sonuç, α -amilazın nişasta üzerine rasgele etki etmediğini kanıtlamıştır (21).

Buna göre etki mekanizması şu şekilde açıklanmıştır.

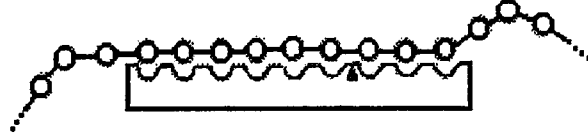
Enzim üzerine dokuz glukoz kalıntısının bağlanabildiği bağlanma merkezlerinin bulunduğu ve α -(1→4) glikozidik bağını hidrolizleyen aktif merkezin, 3 ve 4 nolu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri arasında kaldığı iddia edilmektedir.

Buna göre hidroliz işleminden sonra soldaki veya sağdaki grubun enzim üzerinden ayrılabilceği ve eğer ilk olarak sağdaki grup ayrılırsa, nişasta zinciri boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kendiliğinden hareket eder ve G_3 ürün olarak ele geçer. Eğer hidrolizden sonra zincirin sol tarafı ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere nişasta zinciri sola doğru kendiliğinden hareket eder ve ürün olarak G_6 ele geçer (22). Substrat olarak amilopektin kullanıldığında benzer mekanizma ile maltoz (G_1), maltodioz (G_2), maltotrioz (G_3) ve maltohegzoz (G_6) meydana gelir. α -amilazın mekanizması Şekil 4a ve 4b' de verilmektedir (23). Amilolitik aktivite gösteren enzimlerin katolizinde glikozidik bağda bulunan oksijen, enzim üzerinde bulunan bir asidik aminoasit ile protonlanır. Substratın indirgen olmayan yarı parçası ayrılınca karbonyum iyonuna benzeyen ara ürün bir karboksilat grubu tarafından kararlı hale getirilir veya glikozil – enzim ara ürünü oluşur. Her iki durumda da ara ürün suyun saldırısını enzime yönlendirerek, son ürünün konfigürasyonunu belirler (24).

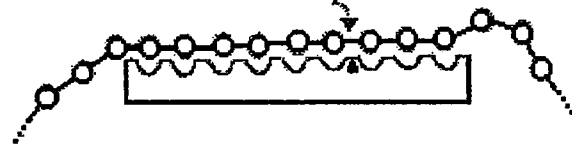
Bu iki mekanizmadan hangisinin geçerli olduğu konusu halen tartışma halindedir. Ancak reaksiyonun karbonyum iyonuna benzeyen , ara ürün oluşumu üzerinde gerçekleştiği mekanizması üzerinde durulmaktadır (23).

G₃ OLUŞUMU

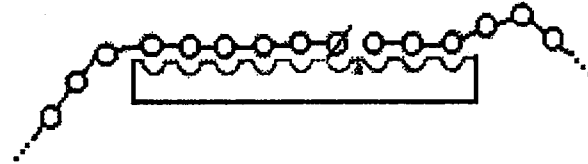
1- Enzim-substrat kompleksi oluşur.



2- Glikozidik bağ hidrolizlenir.



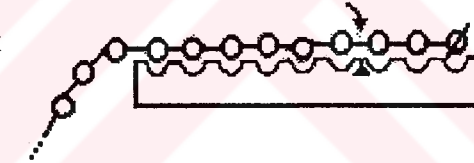
3- Zincirin sağ tarafı ayrılır.



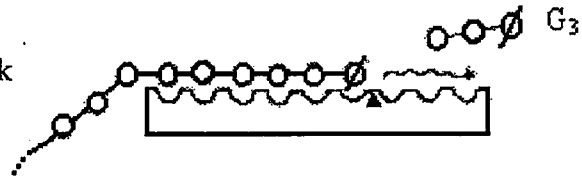
4- Zincirin sol tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa kayar.



5- G₃ ürününü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.



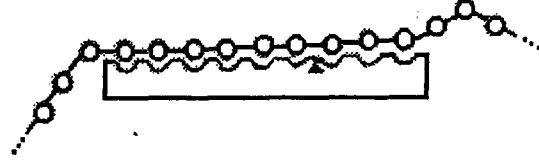
6- Yeniden G₃'ü ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.



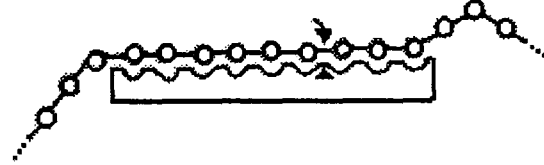
Şekil 4a: Enzimin Etki Mekanizması

G₆ OLUŞUMU

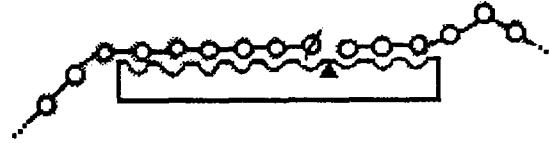
1- Enzim-substrat kompleksi oluşur.



2- Glikozidik bağ hidrolizlenir.



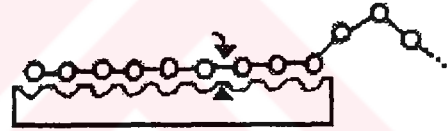
3- Zincirin sol tarafı ayrılır.



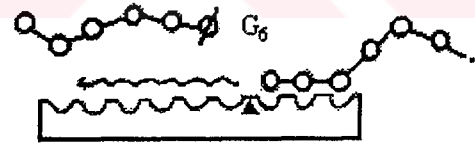
4- Zincirin sağ tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sola kayar.



5- G₆ ürününü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.



6- Yeniden G₆'yı ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.



Şekil 4b: Enzimin Etki Mekanizması

1.4. TAMPON ÇÖZELTİLER

Araştırmalarda ve bazı uygulamalarda pH ve pOH' ı belirli bir değerde olan, seyrelmeyle veya az miktarda kuvvetli asit veya baz ilavesi sonucu pH ve pOH 'ını değiştirmeyen, diğer bir ifadeyle pH değişmelerine direnç gösteren çözeltiler yapmak amaçlanabilir. Böyle pH veya pOH değişimine direnç gösteren çözeltilere tampon çözeltiler denir. Bir tampon çözelti, genelde zayıf bir asit ve konjüge bazını veya zayıf bir baz ve konjüge asidini içeren bir çözeltilerdir. Çözeltinin hazırlanmasında zayıf asitin konjüge bazı asitin tuzu şeklinde, zayıf bir bazın konjüge asiti ise yine onun tuzu halinde kullanılır.

Tampon çözeltiler genellikle iki yolla hazırlanır:

- A) Zayıf asit çözeltisi konjüge bazının çözeltisi ile karıştırılır. Benzer şekilde zayıf baz çözeltisi konjüge asitin çözeltisiyle karıştırılır.
- B) Zayıf asit çözeltisi kuvvetli bir bazla kısmen nötralleştirilir. Benzer şekilde zayıf bir baz çözeltisi kuvvetli bir asitle kısmen nötralleştirilir.

Zayıf bir monoprotik asit olan HA çözeltisi ile NaAc çözeltileri karıştırıldığında aşağıdaki denge bağıntıları yazılabilir.

$$[H_3O^+] = Ka \cdot \frac{[HA]}{[A^-]}, \quad pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Benzer şekilde tek fonksiyonlu zayıf bir baz olan B ile bu bazın konjüge asiti olan BH⁺ 'nın çözeltileri karıştırıldığında yine bir tampon çözelti elde edilebilir. Böyle bir çözeltideki etkin denge, bazın iyonlaşması dengesidir.

$$[OH^-] = Kb \cdot \frac{[B]}{[BH^+]}, \quad pOH = pKb + \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

1.4.1. Tampon Kapasitesi

Bir tampon çözeltisine az miktarda asit veya baz ilavesi halinde eklenen asit, tampon çözeltinin bazı ile, baz ise tampon çözeltinin asiti ile tepkimeye girer, sonuçta asit/tuz oranı fazla değişmez ve pH değerleri sabit kalır. Eklenen kuvvetli asit veya bazın tampon çözeltisinin pH' sına etkisi tampon kapasitesi denilen bir özelliikle ifade edilir. İyi bir tampon çözelti, kapasitesi yüksek bir çözelti olarak belirlenir.

Tampon kapasitesi, 1 litre tampon çözeltisinin pH ve (pOH)'sını bir birim değiştirmek için eklenmesi gereken kuvvetli asit veya bazın milimol sayısı olarak tanımlanır. İyi bir tampon (yüksek tampon kapasitesi), tamponu oluşturan türlerin derişimlerinin birbirine eşit ve mümkün olduğunca yüksek olmasıyla sağlanır (25).

1.4.2. İyon Şiddetinin Etkisi

Çözünürlüğü az olan bir madde bir elektrolit ortamında saf su ortamındakine göre daha fazla çözünür. Elektrolitler genellikle tuz olduklarından, çözünürlüğe olan etkilerine tuz etkisi veya yabancı iyon etkisi denir. Ortama ilave edilen elektrolitin iyonları çözünürlüğü az olan maddenin iyon atmosferini ve dolayısıyla çözünürlüğünü değiştirirler.

Aynı molaritede olmak şartıyla, elektrolit iyonlarının yüklerinin büyümesiyle çözünürlükte büyür. Çünkü iyon şiddeti büyür. Benzer şekilde iyonlarının yükü büyük olan madde de iyonlarının yükü küçük olanlara göre daha çok çözünür.

Çözünürlüğü az olan bir maddenin çözünmesi üzerine ortama ilave edilen elektrolitin hem konsantrasyonunun, hem de yükünün büyük etkisi vardır. Bu iki etki bir arada gösterilebilir ve iyon şiddeti olarak tanımlanır. Aynı derişimde olmaları koşuluyla, yükü büyük olan iyonlardan oluşmuş tuzun çözünürlük üzerine etkisi, yükü küçük olandan daha fazladır.

İyon şiddeti ortamdaki iyonların ayrı ayrı yüklerinin kareleriyle konsantrasyonlarının çarpımı toplamının yarısına eşittir (26).

$$I = 0.5 \sum C_i Z_i^2$$

I : iyon şiddeti

C_i : iyonun konsantrasyonu

Z_i : herhangi bir iyonun yükü

1.5. ENZİM KINETİĞİNE GİRİŞ

1.5.1. $[E]_t$ 'nin Fonksiyonu Olarak Başlangıç Hızı:

Olağan in vitro deney koşullarında enzim, reaksiyon ortamında çok az miktarlarda yada katalitik miktarlarda mevcuttur. $[E]_t$, genellikle 10^{-12} - 10^{-7} M konsantrasyonunda iken $[S]$, genellikle 10^{-6} - 10^{-2} M konsantrasyonunda bulunur. Herhangi bir substrat konsantrasyonunda başlangıç hızı:

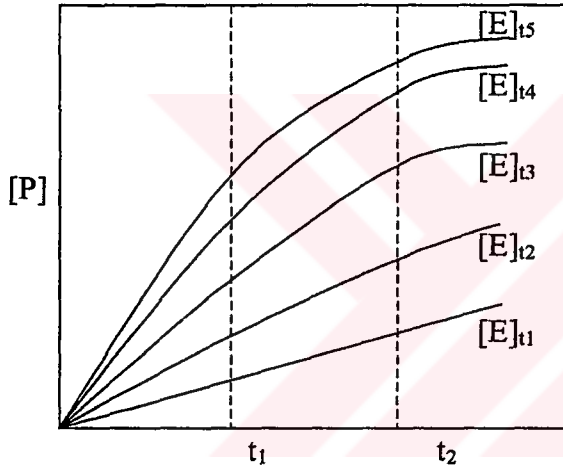
$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_p [E]_t \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_p}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)} [E]_t$$

denklemleri ile verilir. Böylelikle başlangıç hızı doğrudan doğruya bütün substrat konsantrasyonlarında $[E]_t$ ile orantılı olur. V ile $[E]_t$ arasındaki ilişki doğru başlangıç hızları ölçüldüğü zaman lineerdir, yani ürün oluşum hızı deneyin tüm zaman aralığı boyunca sabit olmalıdır. V , $[S]$ ile değiştiğinden deney süresi substratın küçük bir fonksiyonunun (yaklaşık % 5 yada daha azı) kullanılmasını sağlayacak kadar kısa olmalıdır.

Sabit substrat konsantrasyonu ve farklı total enzim konsantrasyonlarında zamanın fonksiyonu olarak ürün oluşumu aşağıdaki Şekil 1.5a da gösterilmiştir.

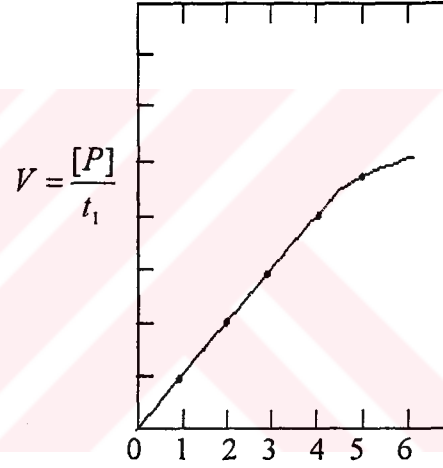
Enzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak $[P]/t$ den hesaplanan başlangıç hızının değişen grafiği ise Şeki 1.5b 'de gösterilmiştir. Ürün oluşum hızı, $d[P]/dt$ $[E]_{t1}$ 'den $[E]_{t4}$ 'e kadar olan enzim konsantrasyonları için t_1 süresine kadar lineerdir, t_2 gibi daha uzun bir deneme süresi seçilirse bütün $[E]_t$ değerlerinde lineerliğin sağlanması mümkün değildir.

Örneğin : $[E]_{t4}$ 'den daha büyük enzim konsantrasyonları kullanılırsa $[P]$ ile t arasındaki ilişki t_1 deneme süresinde de lineerlikten sapacaktır. Böylelikle bir enzimin kinetik incelenmesinde ilk yapılacak şey Şekil 1-5a da gösterilen lineerliğin sınırlarını belirlemek olmalıdır. Yani $[P] - t$ ve $V - [E]_t$ ilişkileri nonlineer olmadan önceki oluşan maksimum $[P]$ belirlenmelidir. Bu şekilde kinetik çalışmalarda kullanılacak başlangıç hızlarının anlamlı şekilde ölçülebilmesi için gerekli zaman belirlenmiş olur.



İnkübasyon Zamanı

Şekil 1.5a



$[E]_t$ (e.g. units/ml, μ L enzim.etc.)

Şekil 1.5b

Enzimlerle çalışırken deney süresinin belirlenmesi

- a- Farklı enzim konsantrasyonlarında zamanın fonksiyonu olarak ürün oluşumu
- b- Enzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak $[P]/t_1$ olarak hesaplanan başlangıç hızı (27).

1.6. ENZİMATİK REAKSİYONLARIN HIZI ÜZERİNE pH'NIN ETKİSİ

pH'nın enzimatik kataliz üzerine etkisinin doğası tam olarak açıklanamamış değil .Enzim üzerindeki aktif merkez genellikle iyonik yapıya sahip aminoasit artıklarından oluşmuştur ve substratın bağlanmasına ve reaksiyonunun katalizlenmesine elverişli bir yapıya sahiptir. pH daki değişimler bu iyonlaşabilir grupların iyonlaşabilirliğini, dolayısıyla aktif merkezin konformasyonunu değiştirmektedir. Buda kataliz hızını etkilemektedir. Bunu dışında substrat molekülünde iyonlaşabilir gruplar içerebilir ve substratın sadece bir iyonik formu enzime bağlanarak katalize uğrayabilir. Katalitik mekanizmadaki işlevsel grupların iyonizasyonundaki değişikliklerin şiddeti, reaksiyon mekanizmasının tamamen bozarak geri dönüşümsüz (irreversible) inaktivasyona neden olabilir.

pH değişimlerinin neden olduğu muhtemel etkilerden bazıları şu şekilde sıralanabilir.

- a. Katalizde rol oynayan grupların iyonlaşmasındaki değişim
- b. Substrat bağlanmasında rol alan grupların iyonlaşmasındaki değişim
- c. Substrattaki grupların iyonlaşmasındaki değişim
- d. Enzimin aktif merkezi dışındaki grupların iyonlaşmasındaki değişim

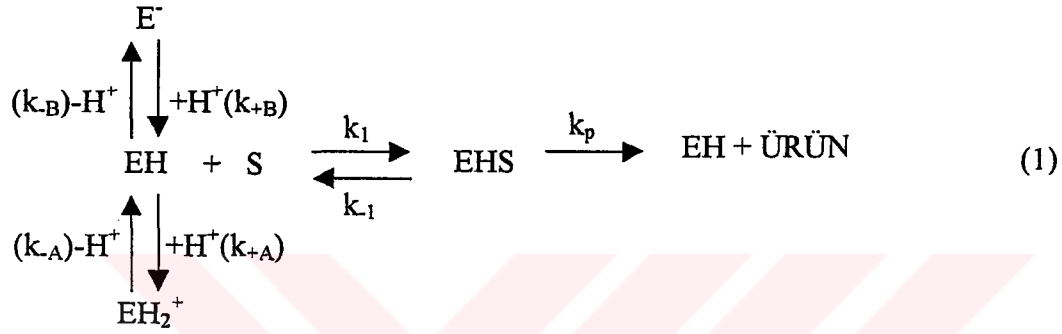
Katalitik mekanizmada işlevsel olan grupların iyonizasyonundaki değişiklikler mekanizmayı tamamen bozabilir. Bağlanma bölgesinde işlevsel olan gruplardaki değişimler enzimin substrata olan affinitesini azaltabilir ve böylece kataliz hızında düşme oluşabilir.

Substrattaki iyonlaşan gruplarda olan bir değişimde onun enzime olan affinitesini değiştirebilir. Enzimdeki diğer grupların iyonizasyonu enzimin üç boyutlu yapısında küçük yada büyük değişikliklere neden olabilir, buda aktif bölgenin bozulmasına neden olur.

1.7. pH' YA BAĞLI HIZ DENKLEMLERİNİN TÜRETİLMESİ İÇİN MODELLER

A.Serbest Enzimin İyonizasyonu

Enzim aktivitesine etki eden iki iyonlaşabilir grubun bulunduğunu ve substratın enzimin sadece bir formuna (EH) bağlanabildiğini varsayalım. Bu koşullarda şu mekanizma önerilebilir:



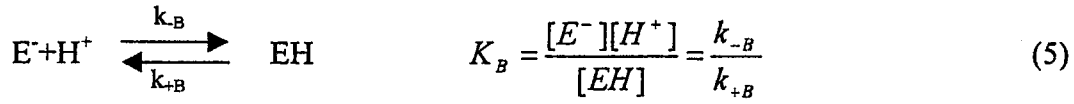
Sürekli-hal varsayımına dayanarak [EHS]'in birim zamandaki değişme hızı sıfır kabul edilirse;

$$\frac{d[\text{EHS}]}{dt} = k_1[\text{EH}].[S] - k_{-1}[\text{EHS}] - k_p[\text{EHS}] = 0 \quad (2)$$

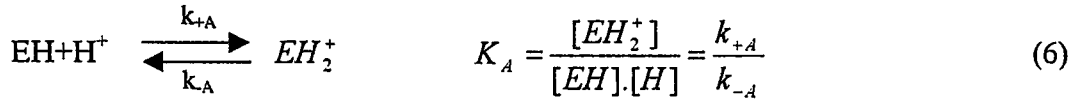
$$k_1[\text{EH}].[S] = (k_{-1} + k_p)[\text{EHS}] \quad (3)$$

$$\frac{[\text{EH}].[S]}{[\text{EHS}]} = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} = \tilde{K}_M \quad (4)$$

Yazılabilir. EH' nin iyonlaşma dengeleri içinde



ve



Burada K_A ve K_B serbest enzimin moleküler dissasyon sabitleridir.

Reaksiyon başlangıcında ortama konan toplam enzim miktarı E_T herhangi bir anda

$$E_T = [E^-] + [EH] + [EHS] + [EH_2^+] \quad (7)$$

olur. $[E^-]$ yerine (5) ve (4) nolu bağıntıdaki değeri, $[EH]$ yerine (4) nolu bağıntıdaki değeri ve $[EH_2^+]$ yerine ise (6) ve (4) nolu bağıntılardan değeri yerine konursa

$$E_T = \frac{K_B \tilde{K}_M [EHS]}{[S][H^+]} + \frac{\tilde{K}_M [EHS]}{[S]} + [EHS] + \frac{\tilde{K}_M [H^+][EHS]}{[S]K_A} \quad (8)$$

$$E_T = [EHS] \left\{ 1 + \frac{\tilde{K}_M}{[S]} \left[1 + \frac{K_B}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A} \right] \right\} \quad (9)$$

yazılabilir.

$$\tilde{V}_{\max} = k_p [E_T] \quad \text{ve} \quad V = k_p [EHS] \quad (10,11)$$

$\tilde{V}_{\max}$ ve $\tilde{K}_M$ pH' ya göre düzeltilmiş değerlerdir. Birbirinden yeteri kadar uzakta olan pK_A ve pK_B değerleri arasındaki bir pH' da $V_{\max,app}$ ve $K_{M,app}$ 'in sınır değerleridir.

9, 10 ve 11 nolu eşitliklerden

$$V = \frac{\tilde{V}_{\max} \cdot [S]}{[S] + \tilde{K}_M \left[1 + \frac{K_B}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A} \right]} \quad (12)$$

yazılabilir.

(12) nolu eşitlik Michaelis – Menten denklemi ile kıyaslandığında

$$K_{M,app} = \tilde{K}_M \left[1 + \frac{K_B}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A} \right] \quad (13)$$

olduğu görülür.

Bu denklemlerden aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir.

1. Herhangi bir pH' da denklem (13) teki parantezli terim daima 1'den büyüktür. $K_{M,app} > \tilde{K}_M$ dir.
2. $[H^+]$ ' in $V_{\max}$ üzerine bir etkisi yoktur. Dolayısıyla bir inhibisyon söz konusu ise yarışmalı inhibisyon olmalıdır.
3. Düşük pH değerlerinde $[H^+] \gg K_B$ olacağından (12) nolu denklem

$$V = \frac{\tilde{V}_{\max} [S]}{[S] + \tilde{K}_M \left[1 + \frac{[H^+]}{K_A} \right]} \quad (14)$$

haline indirgenir. (14) nolu denklem yarışmalı inhibisyon hız denklemine (15) özdeşir. Bu nedenle

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M [1 + \frac{[I]}{K_i}] + [S]} \quad (15)$$

Bu pH bölgesinde H^+ iyonları yarışmalı inhibitör olarak davranır. Bu özel iyonlaşma şeklinde K_M değeri sadece pH ile değişir.

$K_A > K_B$ olduğu zaman (13) nolu denklemin $[H^+]$ göre türevini alırsak fonksiyonun minimumdan geçtiği yeri belirleyebiliriz.

$$\frac{dK_{M_{app}}}{d[H^+]} = \tilde{K}_M \left[\frac{1}{K_A} - \frac{K_B}{[H^+]^2} \right] \quad (16)$$

Bu fonksiyon

$$[H^+] = \sqrt{K_A \cdot K_B} \quad (17)$$

olduğu zaman sıfıra eşit olacaktır. Dolayısıyla incelenen reaksiyon için optimal pH;

$$pH_0 = \frac{1}{2}(pK_A + pK_B) \quad (18)$$

olacaktır. Düşük pH' larda $[H^+] \gg K_A \gg K_B$ olduğundan (13) nolu denklem

$$K_{M_{app}} = \frac{\tilde{K}_M}{K_A} \cdot [H^+] \quad (19)$$

şeklinde yazılabilir ve bu bir doğrunun denklemdir. Eşitliğin her iki tarafının logaritması alınırsa

$$-\log K_{M_{app}} = -\log \tilde{K}_M + \log K_A - \log [H^+] \quad (20)$$

$$pK_{M_{app}} = pK_M - pK_a + pH \quad (21)$$

$pK_{M_{app}}$ 'ye karşı pH grafiğe geçirilirse eğimi +1 olan bir doğru ele geçer. Yüksek pH'larda $K_A \gg K_B \gg [H^+]$ olduğundan (13) nolu eşitlik

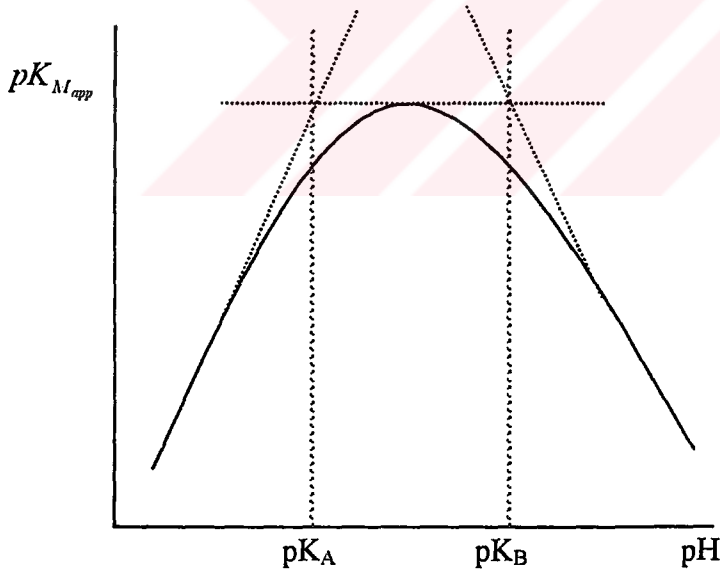
$$K_{M_{app}} = \tilde{K}_M \cdot K_B \cdot \frac{1}{[H^+]} \quad (22)$$

(22) nolu eşitliğin her iki tarafının (-) logaritması alınırsa

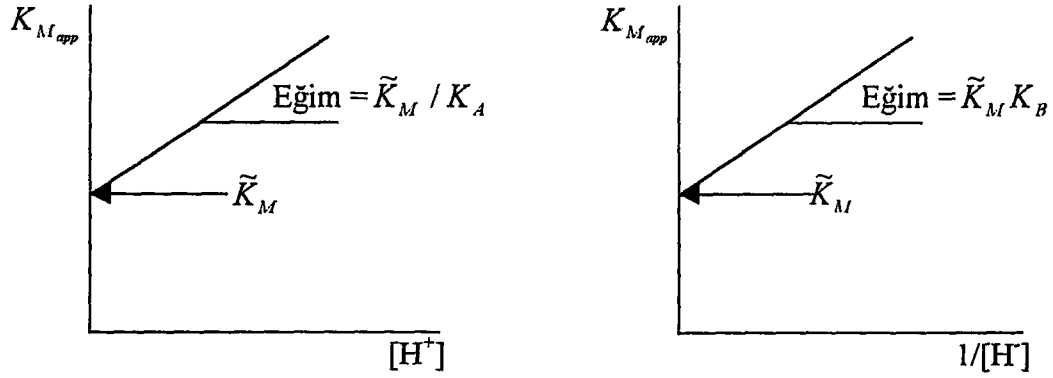
$$pK_{M_{app}} = p\tilde{K}_M + pK_B - pH \quad (23)$$

olur ve $pK_{M_{app}}$ 'e karşı pH grafiğe geçirilirse eğimi (-1) olan bir doğru ele geçer.

Eğer K_A ve K_B değerleri oldukça ayrı ise $K_A \gg [H^+] \gg K_B$ olduğu bir aralıkta $K_{M_{app}} = K_M$ olacaktır ve $pK_{M_{app}}$ 'e karşı pH grafiğe geçirildiğinde eğimi sıfır olan yatay bir doğru ele geçecektir. Bu üç durum şekilde gösterilmiştir.

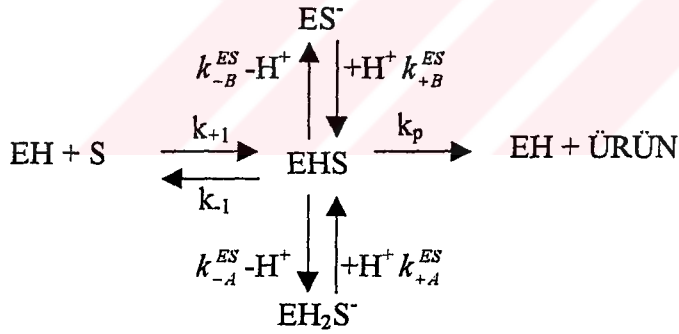


K_A ve K_B parametrelerini belirlemenin bir diğer pratik yolu da K_A için $K_{M_{app}}$, $[H^+]$ 'e karşı, K_B ise $K_{M_{app}}$, $1/[H^+]$ 'a karşı grafiğe geçirilerek bulunabilir.



B. Enzim-Substrat Kompleksinin İyonizasyonu

Enzim-Substrat kompleksindeki grupların iyonizasyon hızları pH değişiminden etkilenebilir. Bu mekanizma aşağıdaki gibi şematize edilebilir.



Reaksiyon EHS kompleksinden doğrudan

$$V = k_p [EHS] \quad (24)$$

ve bu koşullarda maksimum hızın

$$\tilde{V}_{\max} = k_p [E_T] \quad (25)$$

olduğu ve yukarıda verilen mekanizmadan

$$E_T = [EHS] \left[1 + \frac{\tilde{K}_M}{[S]} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} \right] \quad (26)$$

ve

$$[EHS] = \frac{E_T}{1 + \frac{\tilde{K}_M}{[S]} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}}} \quad (27)$$

yazılabileceği göz önüne alınırsa, reaksiyon hızı V;

$$V = \frac{\tilde{V}_{\max} \cdot [S]}{\tilde{K}_M + [S] \left[1 + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} \right]} \quad (28)$$

bağıntısı yazılabilir. (28) nolu eşitliğin pay ve paydası köşeli parantez içindeki terime bölünürse:

$$V = \frac{\frac{\tilde{V}_{\max}}{\tilde{K}_M} \cdot [S]}{\left[1 + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} \right]} \quad (29)$$

bağıntısı yazılabilir. Michaelis-Menten bağıntısı ile kıyaslandığında

$$V_{\max_{app}} = \frac{\tilde{V}_{\max}}{\left[1 + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}}\right]} \quad (30)$$

ve

$$K_{M_{app}} = \frac{\tilde{K}_M}{\left[1 + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}}\right]} \quad (31)$$

görülür ki $V_{\max_{app}}$ ve $K_{M_{app}}$ pH'ya bağlıdır. Düşük pH değerlerinde

$[H^+] \gg K_A^{ES}$ olduğundan (28) nolu eşitlik

$$V = \frac{\tilde{V}_{\max} [S]}{\tilde{K}_M + [S] \left[1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}}\right]} \quad (32)$$

yazılabilir. Bu hız denklemi yarışmasız inhibisyondaki hız denklemi ile uyumludur. Yeterince düşük substrat derişimlerinde

$$\tilde{K}_M \gg [S] \left[1 + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}}\right]$$

olduğu zaman reaksiyonun hızının pH'dan etkilenmeyeceği görülür.

$K_A^{ES} > K_B^{ES}$ olduğu zaman (31) nolu denklemle verilen fonksiyon $[H^+]$ değişimine bağlı olarak bir maksimumdan geçer. Bu maksimum yeri, fonksiyonun $[H^+]$ 'ya göre türevi alınarak belirlenebilir.

$$\frac{dK_{M_{app}}}{d[H^+]} = - \frac{\tilde{K}_M \left[\frac{1}{K_A^{ES}} - \frac{K_B^{ES}}{[H^+]^2} \right]}{\left[1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} - \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} \right]^2} \quad (33)$$

Bu denklem $[H^+] = \sqrt{K_A^{ES} \cdot K_B^{ES}}$ olduğu zaman sıfıra eşit olur. Böylece reaksiyon için optimum pH;

$$pH = \frac{1}{2} (pK_A^{ES} + pK_B^{ES})$$

değerine eşit olur.

pK_A^{ES} ve pK_B^{ES} değerleri tayin edilebilirse, optimal pH hesaplanabilir. Optimal pH'da $V_{\max_{app}}$ ve $K_{M_{app}}$ 'in her ikisi de pH'dan bağımsızdır.

Düşük pH'larda $[H^+] \gg K_A^{ES} \gg K_B^{ES}$ olduğu zaman

$$V_{\max_{app}} = \tilde{V}_{\max} \frac{K_A^{ES}}{[H^+]} \quad (34)$$

yazılabilir. (34) nolu eşitliğin her iki tarafının (-) logaritması alınırsa:

$$\log V_{\max_{app}} = \log \tilde{V}_{\max} + pK_A^{ES} + pH \quad (35)$$

olur. Yüksek pH'larda $K_A^{ES} \gg K_B^{ES} \gg [H^+]$ olduğunda

$$V_{\max_{app}} = \frac{\tilde{V}_{\max} [H^+]}{K_B^{ES}} \quad (36)$$

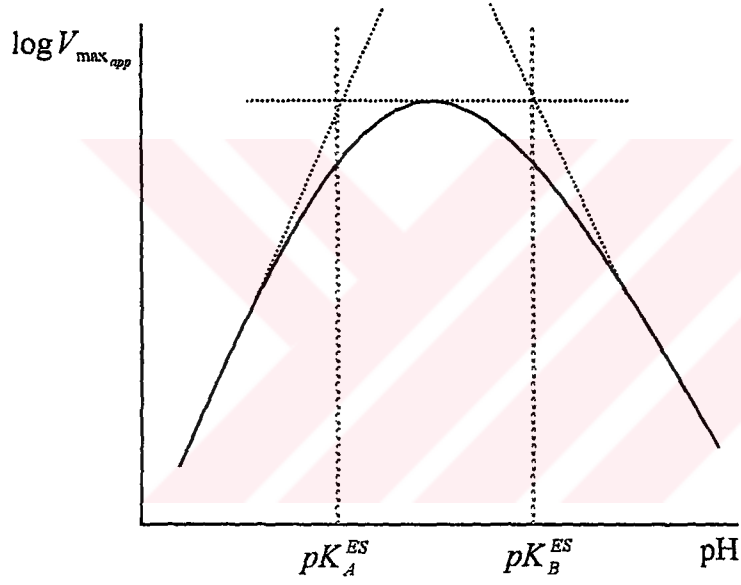
yazılabilir.

(36) nolu denklemin her iki tarafının (-) logaritması alındığında

$$\log V_{\max_{app}} = \log \tilde{V}_{\max} + pK_B^{ES} - pH \quad (37)$$

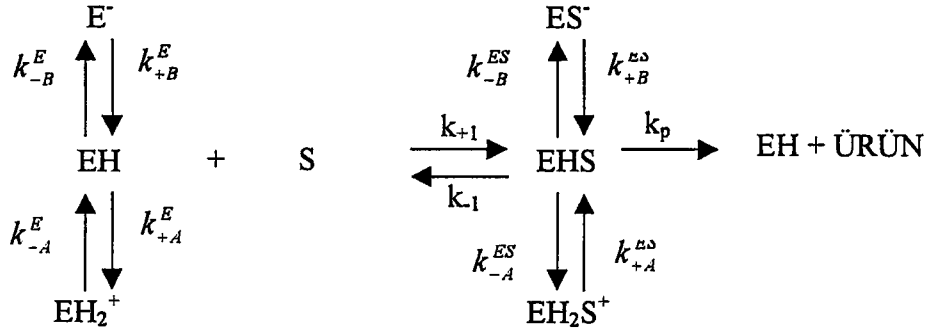
olur.

Düşük pH'larda $\log V_{\max_{app}}$ 'a karşı pH grafiğe geçirilirse eğimi (+1) olan bir doğru ele geçer. Aynı şekilde yüksek pH'larda eğimi (-1) olan doğru ele geçer. Optimum pH bölgesinde ise eğimi sıfır olan yatay bir doğru ele geçer.



C. Serbest Enzim Ve ES Kompleksinin İkisinin Birden İyonlaşması

Hem serbest enzimin , hem de enzim-substrat kompleksinin ikisinin birden $[H^+]$ 'e bağlı olarak iyonlaşmaları söz konusu olabilir. Bu durum için şu mekanizma önerilmektedir.



Bu mekanizmanın da analitik incelenmesinden, bu koşullarda serbest enzimin iyonlaşma sabitleri (K_A^E ve K_B^E) ile enzim-substrat kompleksinin iyonlaşma sabitleri (K_A^{ES} ve K_B^{ES}) grafik yöntemi ile hesaplanabilir.

Bu durumda $[H^+]$ 'e bağlı olarak karışık inhibisyon türüne benzer bir inhibisyon gözleneceği 1924 yılında Von Euler ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur.

Sonuç olarak

1. Eğer H^+ iyonları sadece serbest enzime bağlanırsa ($K_A^{ES} \rightarrow \infty, K_B^{ES} \rightarrow 0$), kinetik model yarışmalı inhibisyona benzeyecektir.
2. Eğer H^+ iyonları sadece ES kompleksine bağlanırsa ($K_A^E \rightarrow \infty, K_B^E \rightarrow 0$), kinetik model yarışmasız inhibisyona benzeyecektir.

3. Eğer enzime substrat bağlanması, iyonlaşma sabitlerini etkilemiyorsa yani $K_A^{ES} = K_A^E$ ve $K_B^{ES} = K_B^E$ ise kinetik model gerçek yarışmalı olmayan inhibisyon türüne benzeyecektir.
4. Eğer hidrojen iyonları hem serbest enzime hem de ES kompleksine bağlanabiliyorsa, kinetik model karışık inhibisyon türüne benzeyecektir (28, 29).



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

α -amilaz (E.C.3.2.1.1. Katalog no:10070) Fluka'dan, sitrik asit, potasyumdihidrojenfosfat, borik asit, dietilbarbutirik asit (DEBA), sodyum hidroksit, çözünür nişasta, sodyum-potasyum tartarat Merck'ten, 3-5-dinitrosalisilik asit (DCA) Sigma Chemical Co.St Louis'ten temin edilmiştir. Saf su (Bütün deneysel çalışmalarda deiyonize ve bidestile saf su kullanılmıştır.)

2.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre (U.V-160 Shimadzu U.V-Visible Recording Spectrophotometer), çalkalayıcı (Memmert), Vortex (Fisons Whirli MixerTM), pH metre (Jenway 3040 Ion Analyser).

2.3. Kullanılan Tampon Sistemleri

Ekler kısmında verilmiştir (Ek-1).

2.4. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

20 g 3.5-Dinitrosalisilik asit, 400 mL saf su içinde süspansiyon haline getirilir. 32 g/300 mL sodyumhidroksit çözeltisi magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak damla damla ilave edilir. Berrak bir çözelti elde edilmezse sıcak su banyosu kullanılır. 600 g sodyum-potasyumtartarat küçük porsiyonlar halinde eklenerek, hacim saf su ile 2000 mL'ye tamamlanır.

2.5. Uygun Enzim Derişimi Ve Deney Süresinin Belirlenmesi

Bu amaçla sabit substrat derişimlerin de, $[E_1]$, $[E_2]$, $[E_3]$, $[E_4]$, $[E_5]$ derişimlerindeki enzim çözeltileri, t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , sürelerinde inkübasyona bırakılarak aktivite tayininden elde edilen sonuçlara bağılı olarak çalışmamızda kullanılacak enzim derişimi ve inkübasyon süresi belirlendi.

2.6. Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Enzim aktivitesi Bernfeld yöntemi ile tayin edildi (30).

0,0286 M'lık Üiversal (A çözeltisi) tampon içinde ayrı ayrı pH'lar (5.05; 5.62; 6.15; 7.12; 8.02; 8.68; 9.29; 9.91) için farklı derişimlerde (2.52; 2.1; 1.67; 1.25; 0.83 ve 0.42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) nişasta çözeltisi hazırlandı. Buradan hazırlanan nişasta çözeltileri ile aynı tamponlar için de seyreltilmiş enzim çözeltisi ($3 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) belli bir çalkalama hızında (120 rpm) 30 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak ve renklendirmek için 500 μL 3-5-dinitrosalisilik asit ilave edildi. Çözelti 5' kaynar su banyosunda bekletildi. Bunun nedeni; DCA ile şeker ünitelerinin indirgen uçları arasındaki reaksiyon düşük sıcaklıklarda gerçekleşmediğı içindir. Daha sonra 5mL saf su ile seyreltme yapılarak maltoz ünitelerinin DCA ile maksimum absorpsiyon yaptığı 489 nm' de absorbans ölçüldü. Maltoz kullanılarak hazırlanan standart eğriden her bir koşul için oluşum hızı tayin edildi.

2.7. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

Farklı pH' larda hazırlanan, derişimleri sabit nişasta ve enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Bu amaçla 0,0286 M'lık üiversal (A çözeltisi) tamponlar içinde enzim çözeltisi ($3 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 30 °C 'de 120 dakika ön inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapıldı.

3. SONUÇLAR

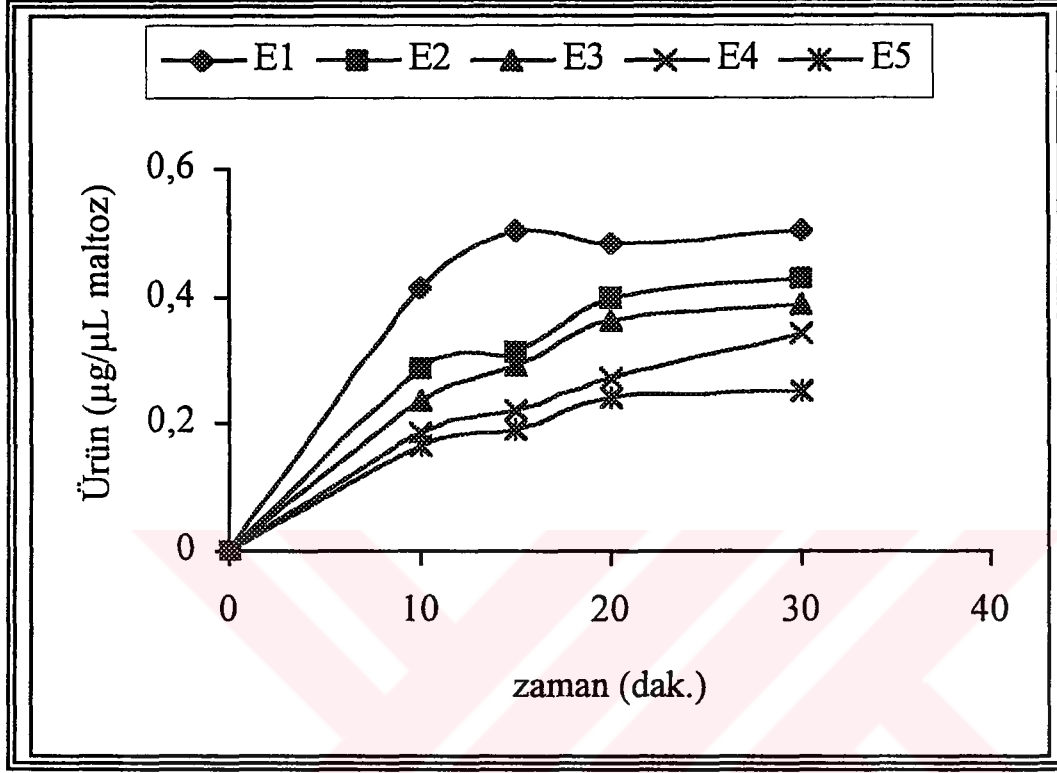
Uygun enzim derişimini belirlemek üzere pH: 7 de sabit substrat derişiminde ([S]:2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) farklı sürelerde (10; 15; 20 ve 30 dakika) ve farklı enzim derişimlerinde ($E_1:2.10^{-3}$, $E_2:2,4.10^{-3}$, $E_3:3.10^{-3}$, $E_4:4.10^{-3}$, $E_5:6.10^{-3}$, $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ve substrat olarak çözünür nişasta kullanılarak yapılan aktivite tayini ile elde edilen sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de verilmiştir.

Çalışılan her bir pH’da (pH: 5.05; 5.62; 6.15; 7.12; 8.02; 8.68; 9.29; 9.91), sabit enzim derişiminde ([E]: 3.10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ve farklı substrat derişimlerinde ([S]: 0.42; 0.83; 1.25; 1.67; 2.10; 2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ön inkübasyonsuz ve çalışma için daha önceden belirlenen uygun inkübasyon süresinde aktivite tayini yapılarak optimal pH değeri tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.3’de verilmiştir.

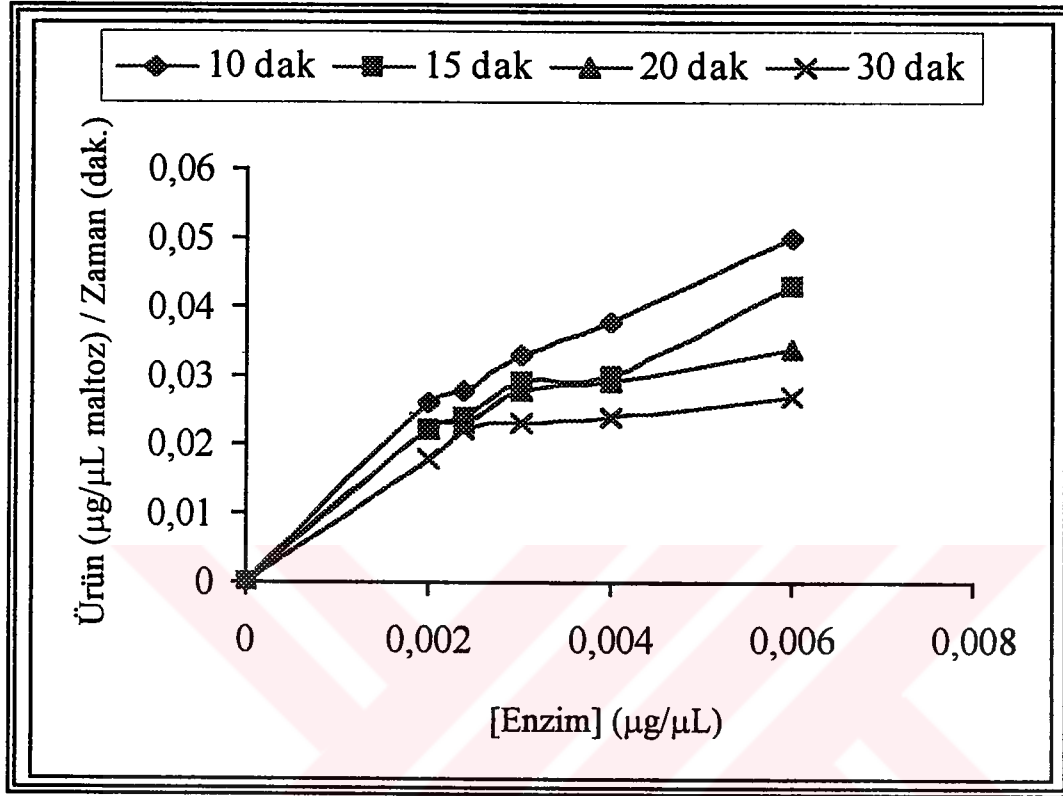
Ayrıca sabit enzim derişiminde ([E]: 3.10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ve pH’sı 7.12 olan sabit substrat derişiminde ([S]:2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), çalışılan her bir enzim 120 dakikalık ön inkübasyona tabi tutularak aktivite tayini yapıldı. Bu işlem ile tayin edilen optimal pH değeri de Şekil 3.4’te verilmiştir.

Çalışılan pH’lar da hazırlanan sabit derişimdeki (3.10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) enzim çözeltileri, sabit substrat derişimleri ([S]:2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ile, daha önce saptanan optimal pH da inkübasyona tabi tutularak elde edilen aktivite değerleri Şekil 3.5’te verilmiştir.

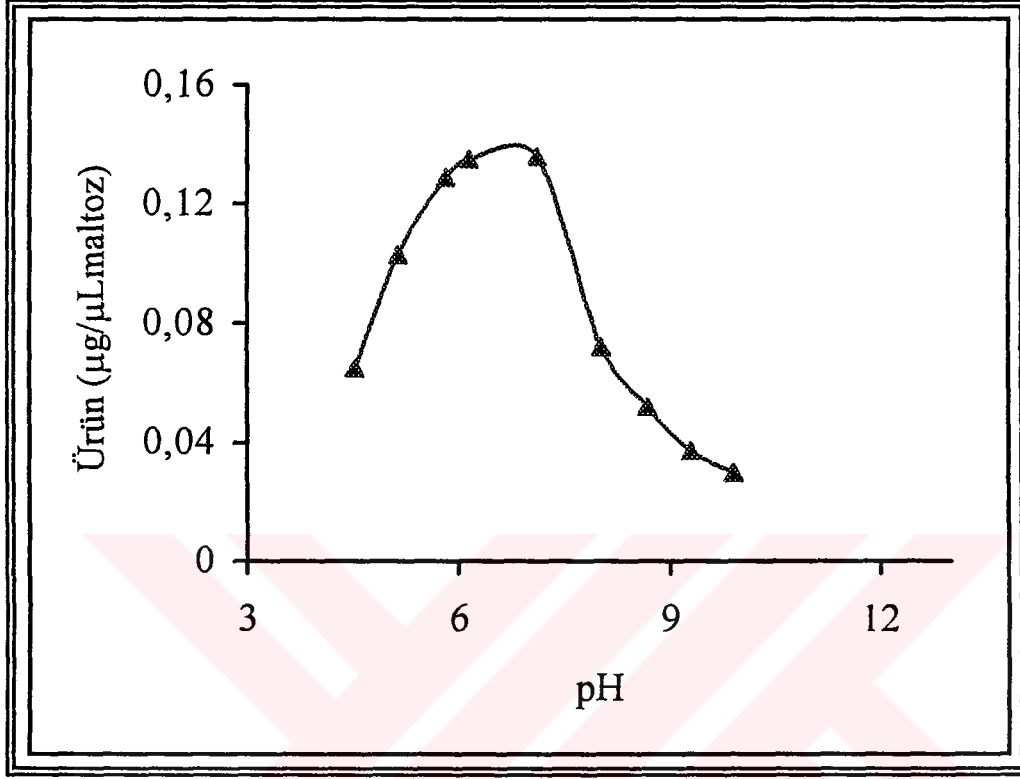
Saptanan uygun enzim derişiminde ([E]: 3.10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ve çalışılan her bir pH’da farklı substrat derişimleri ([S]:0.42; 0.83; 1.25; 1.67; 2.10; 2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ile elde edilen sonuçlar Şekil 3.6 ve Tablo 3.1’de, Ms-DOS altında çalışan Fig.P programıyla hesaplanan $K_{M_{app}}$ ve V_{max} değerleri ise Tablo 3.2’de verilmiştir.



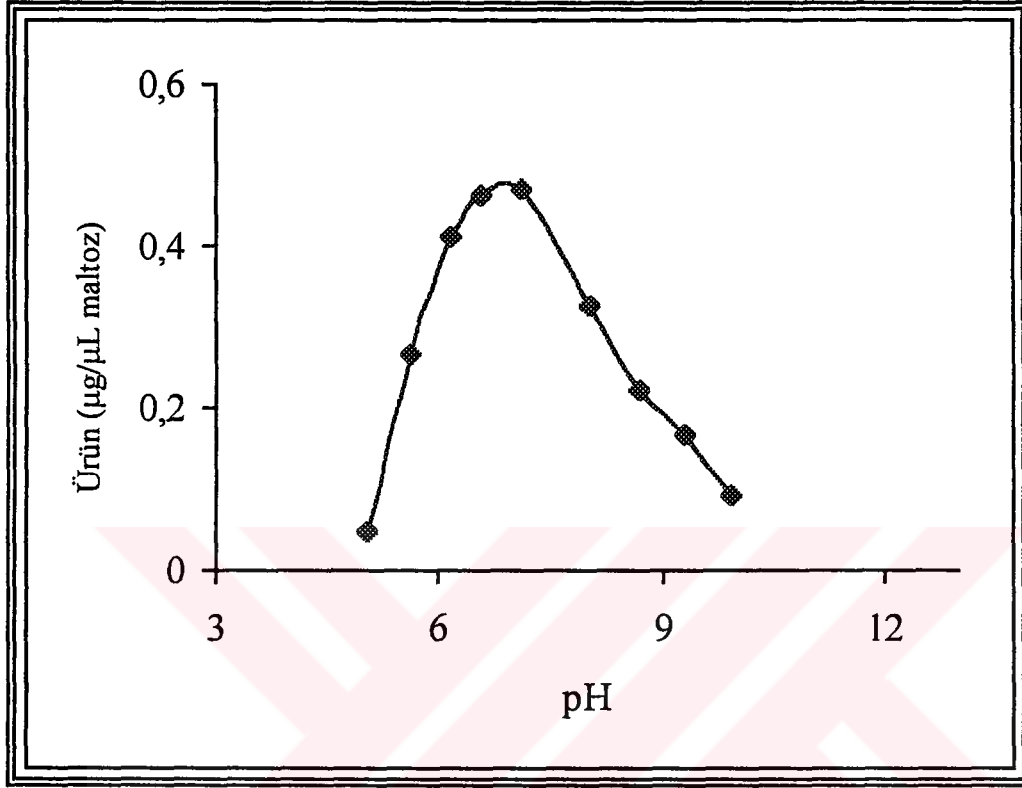
Şekil 3.1: Farklı Enzim Derişimlerinde Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi



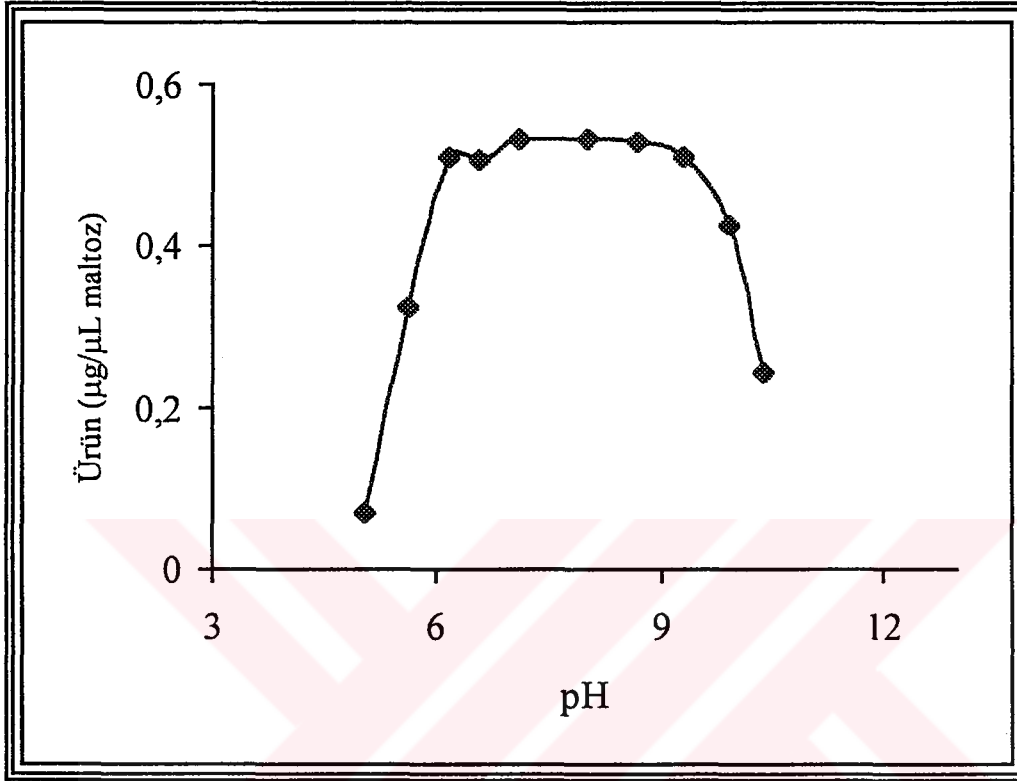
Şekil 3.2 : Enzim Derişimine Bağlı Olarak İnkübasyon Süresi Başına Ürün Oluşumu



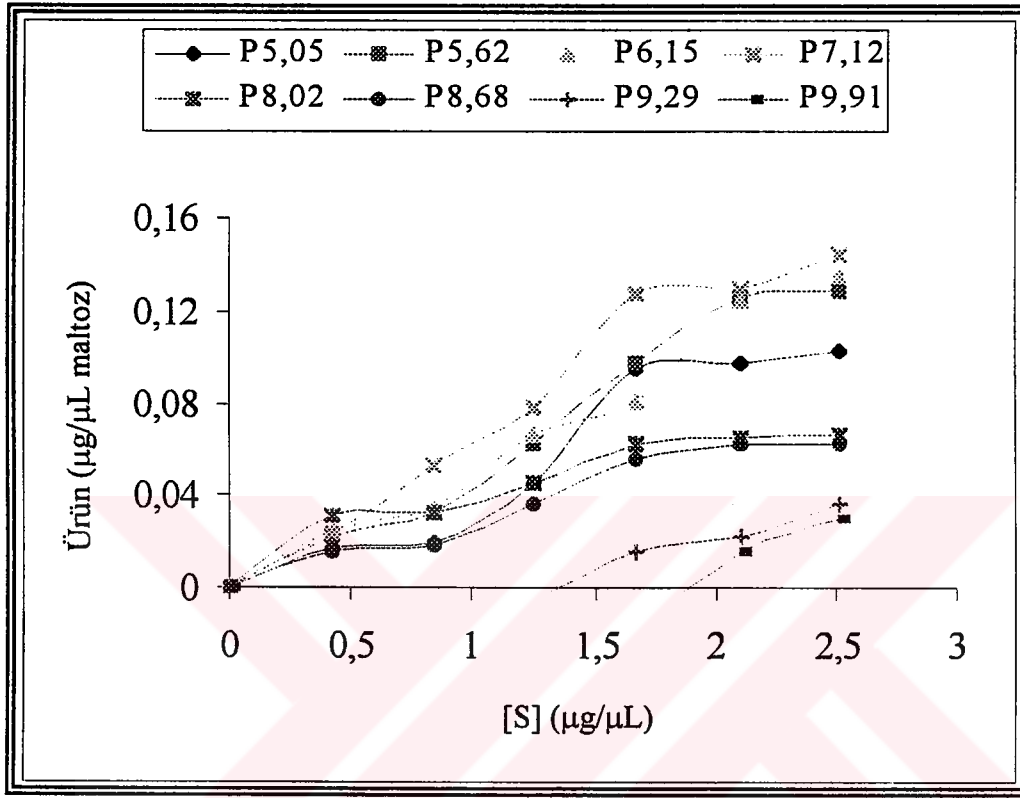
Şekil 3.3 : Ön İnkübasyonsuz Koşullarda Optimal pH'nın Saptanması
(Optimal pH 7,12)



Şekil 3.4: Belli Bir Substrat Derişiminde Çalışılan Her Bir pH'da İki Saatlik Ön İnkübasyondan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri (Optimal pH 7,12)



Şekil 3.5: Enzim çalışılan pH'larda iki saat ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra optimal pH'da sabit substrat derişimi ile inkübasyona tutulduğunda ölçülen aktivite değerleri ($pH_1=pK_a=6.15$ ve $pH_2=pK_b=8.68$ ve optimal $pH=7.4$)



Şekil 3.6: pH'ya Bağlı Olarak Farklı Substrat Derişimlerinde Michaelis-Menten Eğrileri

Tablo 3.1: Farklı substrat derişiminde farklı pH'larda 489 nm de aktivite değerleri

[S]($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	pH							
	5.05	5.62	6.15	7.12	8.02	8.68	9.29	9.91
0.42	0.017	0.022	0.025	0.024	0.031	0.016	-0.029	-0.037
0.84	0.11	0.032	0.035	0.053	0.033	0.018	-0.018	-0.015
1.25	0.046	0.063	0.066	0.078	0.046	0.037	-0.005	-0.02
1.67	0.095	0.097	0.081	0.128	0.063	0.056	0.015	-0.015
2.1	0.097	0.126	0.125	0.13	0.065	0.062	0.022	0.015
2.52	0.103	0.129	0.135	0.144	0.066	0.063	0.037	0.03

Tablo 3.2: Farklı pH'larda aktivite tayini yapılarak elde edilen K_M , pK_M , $V_{\max}$, $\text{Log}(V_{\max})$, $\text{Log}(V_{\max}/K_M)$ değerleri

	5.05	5.62	6.15	7.12	8.02	8.68
$K_M(\times 10^{-2})$	4,898	4,7311	5,004	1,4615	0,2483	1,6666
pK_M	1,31	1,325	1,300	1,835	2,605	1,779
$V_{\max}$	2.023	2.431	2.542	0.952	0.117	0.438
$\text{Log}(V_{\max})$	0,305	0,385	0,405	-0,021	-0,931	-0,358
$\text{Log}(V_{\max}/K_M)$	1,616	1,711	1,706	1,814	1,674	1,419

4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI

Enzim kinetiği çalışmalarında enzim derişiminin ve çalışılacak inkübasyon süresinin doğru olarak belirlenmesi önemli bir faktördür. Deney koşullarında enzim, reaksiyon ortamında genellikle çok az miktarlarda bulunur. Toplam enzim derişimi $[E]_t$ $10^{-12} - 10^{-7}$ M iken, $[S]_t$ genellikle $10^{-6} - 10^{-2}$ M derişimlerinde bulunur. Herhangi bir substrat derişimin de başlangıç hızı

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_p [E]_T [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_p}{\left[1 + \frac{K_M}{[S]}\right]} \cdot [E]_T$$

bağıntısı ile verilir. Dolayısıyla başlangıç hızının substrat derişimi ile orantılı olduğu görülür. V ile $[E]_T$ arasındaki ilişki, doğru başlangıç hızları seçildiğinde doğrusaldır, yani ürün oluşum hızı deneyin tüm zaman aralığı boyunca sabit olmalıdır.

Reaksiyon hızı V, $[S]$ ile değiştiğinden deney süresi substratın küçük bir kısmının kullanılmasını sağlayacak kadar kısa olmalıdır. Sabit substrat derişimi ve farklı toplam enzim derişimlerinde zamanın fonksiyonu olarak ürün oluşumu Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Enzim derişiminin fonksiyonu olarak $[P]/t$ 'den hesaplanan başlangıç hızının değişen değeri ise Şekil 3.2'de verilmiştir. Ürün oluşum hızı $\frac{d[P]}{dt}$, toplam enzim derişimi $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'den $6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'ye kadar 15 dakikalık inkübasyon süresine kadar doğrusaldır. Daha uzun inkübasyon sürelerinde ise bütün seçilen enzim derişimlerinde doğrusallıktan saptığı belirlendi. Doğrusallığın sınırlarını belirlemek üzere yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir. Uygun enzim derişiminin $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve uygun inkübasyon süresinin 15 dakika olduğu saptandı

Enzim derişimi $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, substrat derişimi de $2.52 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ alınarak, enzim çalışılan pH'larda bir-ön inkübasyona tabi tutulmadan enzimin her bir

pH'da substrat ile 15 dakikalık inkübasyonundan sonra ölçülen aktivite değerlerinden optimal pH'nın (pH_0) 7.12 olduğu saptandı (Şekil 3.3).

Yine enzim derişimi 3.10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde alınıp, çalışacak pH'larda enzim tampon ile 120 dakikalık bir ön inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra, 2.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ derişimdeki substrat ile 15 dakikalık inkübasyonundan sonra ölçülen aktivite değerlerinden pH_0 'ın 7.12 olduğu saptandı. Ancak aynı madde derişimleri ve reaksiyon hacmine rağmen bu koşullarda ölçülen absorbans değerlerinin (örneğin pH: 7.12 de ürün 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ön inkübasyonsuz koşullarda ölçülen absorbans değerlerinden (pH: 7.12'de ürün 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.4). Bu sonuçlar ön inkübasyon esnasında enzimin konformasyonunda aktiviteyi arttırıcı yönde olumlu değişmelerin gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Memeli amilazlarının optimal pH'sının, ortamda bulunan monovalent (tek değerlikli) anyonların varlığına bağlı olarak 6.0 ile 7.0 arasında değiştii, *B.subtilis*'ten izole edilenin 5.85 ile 6.0, *A.oryzae*'dan izole edilenin 4.8 ile 5.8 ve malttan izole edilen α -amilazın ise optimal pH'sının 4.75 ile 5.4 arasında değiştii belirtilmektedir (31,32,33).

Bizim kullandığımız ticari olarak temin edilen ve bakteriyel kaynaklı α -amilaz (E.C.3.2.1.1 Fluka, Katalog no:10070) için optimal pH'nın yüksek olmasının saf, kristalin yapıda olmamasından, yani içerdii safsızlıklardan kaynaklandığı kanısındayız.

Bir enzim çözeltisinin daha önce belirtilen pH'larda ön inkübasyona bırakılmadan da optimal pH'sının hesaplanabileceği ancak bu veriler ile optimal pH'nın dışında enzimin kararlı olduğu pH değerlerinin bulunamayacağı belirtilmektedir.

Şekil 3.4'te optimal pH'nın 7.12 olduğu görülmekle beraber $pH_0:7.12$ 'nin altındaki veya üstündeki pH aralıklarında reaksiyon hızının neden düştüğü hakkında bir fikir vermez. Grafikteki bu düşüş enzim, substrat ve enzim-substrat kompleksinin uygun olmayan iyonik formlarının oluşumunun veya enzimin inaktivasyonunun bir sonucu olabilir. Başka bir şekilde ifade edilecek olursa bu etkilerin bir arada bulunmasının kombinasyonunun bir sonucu olabilir.

Şekil 3.5'te uygun derişimdeki enzim, çalışılan pH'larda 120 dakika ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra optimal pH'da ($pH_0:7.12$), sabit substrat derişimi ile inkübasyona tutulduğunda ölçülen aktivite değerlerinden $pH_1:pK_A:6.15$, $pH_2:pK_B:8.68$ ve optimal $pH_0:7.415$ olarak bulundu. Böylece enzim ön inkübasyona tabi tutularak pH'nın enzim stabilizesi üzerine etkisi incelenebilmektedir. Enzimin 6.15 ve 8.68 arasındaki pH'larda 120 dakikalık ön inkübasyonundan sonra $pH_0:7.415$ 'de aktivitesi ölçülürse, bu değerin ön inkübasyonsuz koşullarda $pH:7.12$ 'de ölçülen aktivite değerleri ile uyum içinde olduğu görülebilir.

Ono ve ark. Kristalin bakteriyel amilazın, amilozu hidrolizi üzerine pH'nın etkisini incelemişlerdir. Enzimin iki iyonlaşan grubu için $pK_A:4.22$ ve $pK_B:7.55$ değerlerini bulmuşlardır. Bu iyonlaşma sabitlerinin ne substrat derişimi ile ne de sıcaklıkla değişmediğini belirtmişlerdir. Bu enzim için A ve B'nin sırasıyla karboksil grubunu ve histidil imino grubunu temsil ettiğini postule etmişlerdir.

α -Amilaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda enzim-substrat kompleksinin oluşumunun, pH'daki değişmelerden etkilenmediği belirtilmektedir. Bu, pH'nın Michaelis-Menten tipi reaksiyonların ikinci aşamasını, örneğimizde glikozidik bağın hidrolizi aşamasını etkilediğini iddia etmişlerdir (31).

$pH:8.68$ 'in üzerinde veya $pH:6.15$ 'in altında aktivitenin düşmesi enzimin tersinmez (irreversible) inhibisyonunun bir sonucu olabilir. $pH:7.12$ ile $pH:8.68$ ve $pH:7.12$ ile $pH:6.15$ arasında meydana gelen değişme enzim veya

substratın uygun olmayan iyonik formlarından kaynaklanabildiği söylenebilir. Ancak enzimin pH:6.15 ile pH:8.68 arasında kararlı olduğu söylenebilir.

Optimal pH'nın altındaki veya üstündeki pH'larda enzim aktivitesindeki düşme enzimatik reaksiyonun K_M sabitinin pH'ya bağlılığından kaynaklanmaktadır. pH'daki bu değişimler enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan grupların iyonlaşabilirliklerinin etkiler.

Elde edilen sonuçlara göre 6.15'in altında ve 8.68'in üstündeki pH'larda teorik olarak enzimin tersinme olarak inhibe olması gerekir. Ancak incelenen reaksiyon kinetiğinden çalışılan enzimin katalitik etkinliğinin hafif asidik bölgelerde (pH:5.05, 5.62, ve 6.15'te) pek fazla değişmediğini ama 8.02 ve üzerindeki pH'larda enzimin katalitik etkinliğinde anlamlı azalmalar, hatta inaktivasyonlar gözlenmesi, enzimin aktif merkezinde asidik amino asit artıklarının varlığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Belki de yüksek pH'larda, α -amilaz için kofaktör olan Ca^{2+} iyonları proteinin yapısından uzaklaştırıldığı için enzim inaktive olmaktadır. Çünkü bilinen α -amilaz inhibitörlerinin inhibisyon etkisi, bu enzim için kofaktör özelliğine sahip Ca^{2+} iyonlarını şelatlaştırmalarıyla açıklanmaktadır (34).

Değişik hidrojen iyonlarının derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi diğer aktivatör yada inhibitörlerin etkisine benzemektedir, dolayısıyla aynı teori ve kinetik yöntemler bu etkinin açıklanmasında kullanılabilir.

Bu incelemeler enzim katalizli reaksiyonun mekanizmasının aydınlatılmasında yararlı sonuçlar verebilir. Ancak sınırlı sayıda mekanizma kinetik parametre ile uyum içindedir. Çünkü kinetik parametreler basitleştirilmiş modellerle üretilmektedir. Başka bir deyimle kompleks mekanizmaların bu yöntemle aydınlatılması olası değildir.

Takayanagi ve ark. *Arthrobacter globiformis*'ten izole ettikleri izomalto dekstranaz enziminin aktif merkezindeki iyonlaşabilen gruplar için pK değerlerini substrat olarak dekstran 1200 kullanıldığında 3.3 ve 6.3 izomaltotrioz kullanıldığında ise 3.5 ve 6.1 olarak bulmuşlardır

Bu kinetik sonuçlardan, enzim aktivitesi için iyonlaşan temel grupların karboksil ve karboksilat olduğunu ileri sürmüşlerdir (35).

Dixon ve Webb, kinetik sabitlerin (V_{max} ve K_M) logaritmalarının, pH'ya karşı grafiğe geçirilmesi ile iyonlaşan grupların pK değerlerinin saptanabileceğini bulmuşlardır (36).

Bu kinetik analiz, aktivite için temel olarak sadece iki iyonlaşabilen grup içeren serbest enzim için, asidik bölge A ve bazik bölge B ile indislenirse; $pK_M: -\log K_M$ veya $\log (V_{max}/K_M)$, pH'ya karşı grafiğe geçirilirse pK_A^E ve pK_B^E değerleri, $\log V_{max}$, pH'ya karşı grafiğe geçirilirse pK_A^{ES} ve pK_B^{ES} değerlerinin saptanabileceği belirtilmektedir.

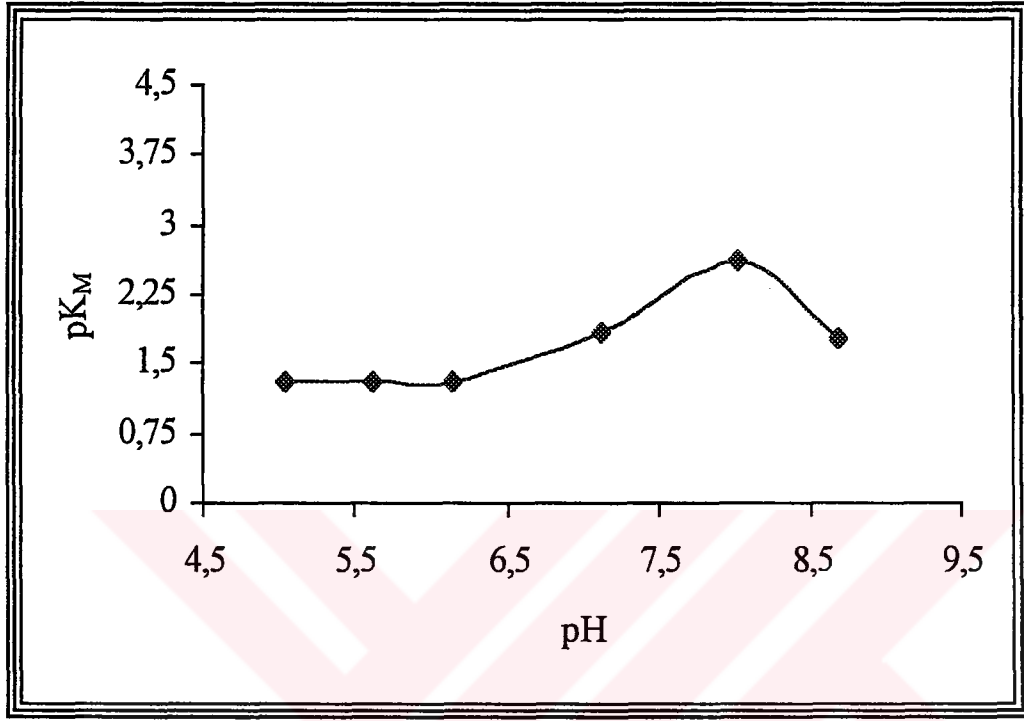
Çeşitli kaynaklardan izole edilen α -amilazların aktif merkezlerinden farklı karboksilik asit çiftlerinin bulunduğu (örneğin Taka-amilaz A'da Glu 230 ve Asp 297) bunlara komşu yerlerde histidin artıklarının bulunduğu belirtilmektedir (37,38).

H_2O^{18} varlığında nişastanın α -amilaz tarafından hidrolizi incelendiğinde, önce glikozidik bağdaki oksijen atomunun protonlanarak oksonyum iyonu oluştuğu ve glikozidik bağın anomerik karbon atomuna yakın yerden koptuğu ve katalizin enzimin aktif merkezindeki karboksilat ve imidazol grupları üzerinden gerçekleştiği ileri sürülmektedir (39).

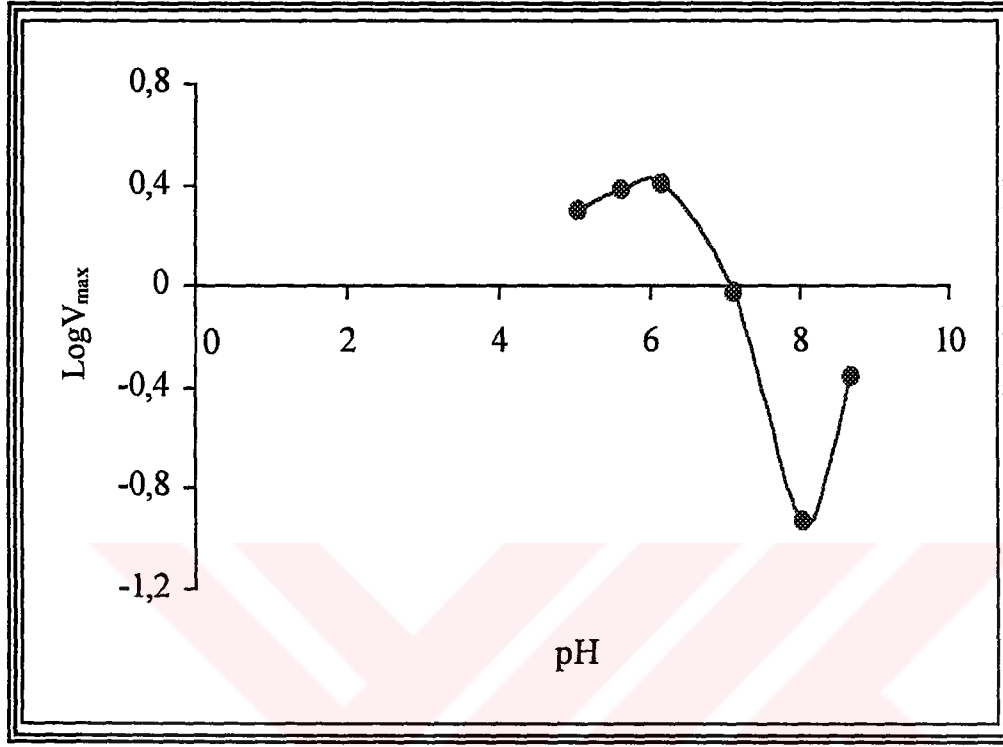
B. subtilis'ten izole edilen α -amilazın molekül ağırlığının, diğer α -amilazların iki katı (96000) olmasıyla farklıdır. Diğer α -amilazlar gibi Ca^{2+} içermesine ilave olarak mol başına 1 mol Zn^{2+} iyonu içerir. Şelatlaştırıcı

maddelerin etkisiyle çinkosu uzaklaştırılmış α -amilazın molekül ağırlıkları 24000 olan dört alt üniteden oluştuğu göstermektedir (40). Sen ve ark. *Lactobacillus cellobiosus* D – 39' dan izole ettikleri α -amilazın molekül ağırlıkları 22.500 ve 24.000 olan iki alt üniteden oluşmuş dimerik bir yapıda olduklarını göstermektedir. Bu enzimin pH: 6,3 ile 7,9 aralığında kararlı olduğunu, bunun dışındaki asidik ve bazik ortamlarda kararsız olduğunu belirtmişlerdir (11).

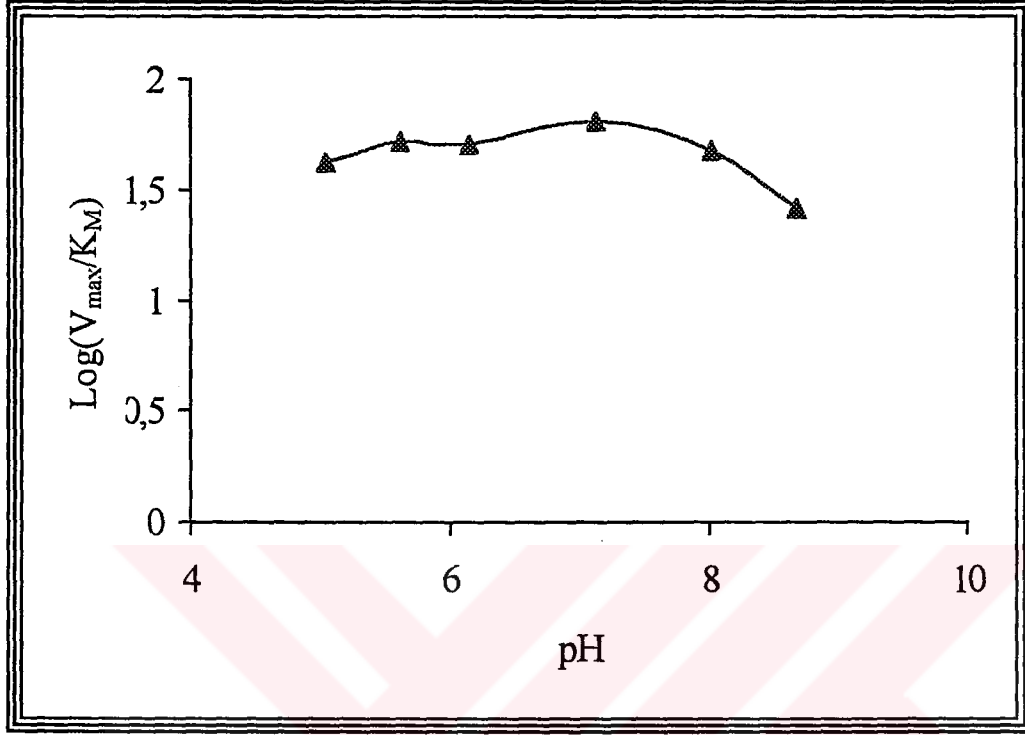
Çalışmamızın amaçlarından biri kinetik parametreleri (K_M ve V_{max}) kullanarak enzimin iyonlaşan gruplarını belirlemek ve buna bağlı olarakta reaksiyon mekanizması hakkında bir iddiada bulunmaktır. Ancak Michaelis-Menten eğrilerinin hiperbolik değil sigmoidal olması dolayısıyla Lineweaver-Burk grafiklerinden inhibisyon türünü belirleyemememize neden olmuştur. K_M ve V_{max} kinetik parametrelerini her bir pH için Ms-DOS altında çalışan Fig. P programı ile belirledik. Bu kinetik parametreleri kullanarak Dixon ve Webb'in önerdikleri grafiklerin Microsoft Windows 95 altında çalışan Excel 7.0 ile çizdik (Şekil 4.1-3). Elde ettiğimiz sonuçların her ne kadar $\text{Log}(V_{max}/K_M)$ pH'ya karşı grafiğe geçirildiğinde pK_A^E için 6,15 ve pK_B^E için 8,68 değerleri hesaplanabiliyorsa da Tippon ve Dixon'nun teorik yaklaşımları ile çok iyi bir şekilde uyum içinde olmamasını türetilen teorik bağıntıların ancak basitleştirilmiş sistemler için geçerli olduğunu, substratının biopolimer ve enzimin oligomerik yapıda olması durumunda geçerli olmadığı sonucuna bizi götürmüştür.



Şekil 4.1: pK_M -pH Grafiğinden İyonlaşabilen Grupların pK^E Değerlerinin Hesaplanabilirliği



Şekil 4.2: $\log V_{\max}$ -pH Grafiğinden İyonlaşabilen Grupların pK_A^{ES} ve pK_B^{ES} Değerlerinin Hesaplanabilirliği



Şekil 4.3: $\log(V_{\max}/K_M)$ -pH Grafiğinden İyonlaşabilen Grupların pK_A^E ve pK_B^E Değerlerinin Hesaplanabilirliği

KAYNAKLAR

1. Martinez, J. P., Garay. E. Alcaide. E., Hernandez. E. ; *Acta. Biotechnol.* 3(2) : 99 (1983).
2. Karlson Peter (Çeviri Azmi Telefoncu) ; *Biyokimya*, 1. Baskı. Sernet Matbaası. (1988) p235-236
3. Gözükar, M. Engin ; *Biyokimya – I*, 3.Baskı, Tayf Ofset (1997) p. 225-230
4. Taylor. M. J. , Richardson, T. ; *Advancesin Appiled Microbiology*. Ed. by Perlman, D.; Academic Press. London (1979) pp. 7 31
5. Boing, J. T. P. ; *Industrial Microbiology*. 4 th ed. 634-709 Published by the saybrook Press Inc., Connecticut (1982).
6. Fergus, G. ; *American Society For Microgiology*. 41(3) : 711 (1977).
7. Babu, K. R and Satyanarayana, T. ; *Folia Microbiol.* 38 (1) : 77 (1993).
8. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Their Sources, Isolation, Methods, Properties and Applications. (ed. "The Amylase Research Society of Japan"), Pergamon Press. Tokyo (1988).
9. Barfoed, H., Cereal C. ; *Foods World*. 21: 588 (1976).
10. Aungttrup, K. ; *Applied Biochemistry and Bioengineering*. 2: 27 (1979).
11. Sen, S., Chakrabarty, S. L. ; *Journal of Applied Bacteriology*. 60 : 419 (1986).
12. Myrback, K. and Neymüller, G. ; In " *The Enzymes* " Ist ed., Vol. I, Part 1 , (1950) p. 653
13. Anderson, J. E., Adams, D. M., Walter, Jr W. M. ; *J. Food Sci.* 48 : 1622 (1983).
14. Euler, H. Von and Helleberg, K. ; *Z. Physiol. Chem* 139 : 24 (1924).
15. Singleton, R., Jr., and Amelunxen, R. E.; *Bacteriol Rev.* 37 : 320 (1973).
16. Saito, N.; *Arch. Biochem. Biophys.* 155 : 290 (1973).
17. Robyt, J. and Ackerman, R. J. ; *Arch. Biochem. Biophys.* 145 : 104 (1971).
18. Ajinomoto, C. ; *Netherlands Patent Appl.*, 70-13, Inc. (1971).
19. Yamamoto, M., Tanaka, Y., and Horikoski, K. ; *Agric. Biol. Chem.* 36 : 819 (1972).
20. Buonocore, V., Caporale, C., Derosa, M., and Gambacorta, A. ; *Bacteriol.* 128 : 515 (1976)
21. Olnishi, M., Trends, Glycosci. ; *Gly Technol.* 2 : 343 (1990).
22. Robyt, J. F. and French, D. ; *Arch Biochem. Biophys.* 100 : 451 (1963).
23. Robyt, J. F. ; *Denpun Kagaku.* 36 : 197 (1989).
24. Sinnot, M. L. ; *Chem. Rew.* 990 : 1171 (1990).

25. Demirci, Ş., Özkan, G. :*Analitik Kimya*. A. Ü. F. F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları No: 34: 76 (1995).
26. Gündüz, T.: *Kalitatif Analiz Ders Kitabı*. Bilge Yayıncılık p 115-116 (1993).
27. *Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar*; Lisans Üstü Yaz. Okulu. 4. 26-27. 14-18 Temmuz p. 183-234 (1997).
28. Tippon, K.F., Dixon, H.H.B. : *Methods in Enzymology*, Vol: 63. Academic Press. Inc., New-York (1979).
29. Tippon, K.F., Dixon, H.B.F.: *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism* (D.L. Purich Ed), Academic Press. Inc., New-York p. 96-148 (1983).
30. Bernfeld, P. : *Methods in Enzymology* (S.F. Colowick and M.O. Kaplan. Eds.). Academic Press. New York. 1. 149 (1955).
31. Ono, S., Hiromi, K. and Yoshikawa, Y.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 31:957 (1958).
32. Matsubara, S., Ikenaka, T. And Akabori, S.: *J.Biochem.* (Tokyo) 46: 425 (1959).
33. Bernfeld, P. and Studer, H.: *Helv. Chim. Acta.* 30: 1985 (1947).
34. Hussain, S. A. and Paulsen, G. M.: *J. Agric. Food. Chem.* 37:295 (1989).
35. Takayanagi, T., Kimura, A., Okada, G. and Chiba, S. : *Biosci. Biotech.* 58 (11): 1194 (1995).
36. Dixon, M. and Webb, E.C.: "*Enzymes*" Longman Group Ltd. London p., 271 (1979).
37. Ishikawa, K., Maatsui, I., Honda, K. and Nakatani, H.: *Biochemistry* 29: 7119 (1990).
38. Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derevenda, Z., Dadson, G.G., Jemsen, V.J., Peterson, S.B., Swift, H., Thim, L. and Wldike, H.: *Biochemistry* 29 : 6244 (1990).
39. Tao, B.Y., Reilly, P.J. and Robyt J.F.: *Biochim Biophys. Acta.* 995 : 214 (1989).
40. Robyt, J.F., and Acherman, R.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 445 (1973).
41. Perrin, D.D., Dempsey, B.: *Buffers for pH and Metal Ion Control*. John Wiley and Sons, Inc. New York. 155 (1979).

EKLER

EK.1

1.1 0.0286 M A Çözeltisi

3.004 g sitrikasit, 1949 g potasyumdihidrojenfosfat, 0.885 g borik asit, 2.633 g DEBA yaklaşık olarak 200 mL saf su içinde çözündü. Son olarak saf su ile bu çözeltinin hacmi 500 mL'ye getirildi.

Perrin ve Dempsey'e göre hazırlanan tamponların pH'sı pH metre ile doğrulandı (41).

A Çözeltisi (mL)	0.2 M NaOH (mL)	Saf su (mL)	pH
25	7	18	5.05
25	8.5	16.5	5.62
25	10	15	6.15
25	13	12	7.12
25	16	9	8.02
25	18	7	8.68
25	19.5	5.5	9.29
25	21	4	9.91

ÖZGEÇMİŞ

1966 Diyarbakır doğumluyum. Üniversite öğrenimimi 1985-1989 yılları arasında Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamladım. 1996 yılında D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN danışmanlığında Yüksek Lisans'a başladım.

Yüksek Lisans çalışmam "*Bacillus subtilis*' ten İzole Edilen α -Amilazın Aktivitesi Üzerine $[H^+]$ Etkisi" konusundadır.

Halen Diyarbakır Anadolu Lisesi'nde Kimya öğretmeni olarak görev yapmaktayım.