

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARIMSAK FİLİZİNDEN ASİT FOSFATAZIN
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Didem SALOĞLU
(506991033)**

101381

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 3 Ağustos 2001
Tezin Savunulduğu Tarih : 4 Temmuz 2001**

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Yüksel A. GÜVENİLİR

Diğer Jüri Üyeleri: Prof.Dr. Nuran DEVECİ

Doç.Dr. Necla ARAN

HAZİRAN 2001

ÖNSÖZ

Bulunduğumuz yüzyılda, biyokimyanın çok hızlı gelişmesi, bir çok sanayi kuruluşunun enzimlere verdiği önemi arttırmıştır.

Bu çalışmada sarımsak filizinden asit fosfataz enziminin izolasyonu ve kısmi saflaştırılması yapılmış ve enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Çalışmalarım boyunca gerek dostça gerekse akademik olarak desteğini esirgemeyen, her türlü sorunda ve bunların çözümünde daima arkamda olan , bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan asla çekinmeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yüksel Avcıbaşı Güvenilir 'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Her an bana destek olan sevgili eşime ve çok sevdiğim aileme daima yanımda oldukları için bir kez daha teşekkürler.

Haziran 2001

Didem Saloğlu

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.ENZİMLER	3
2.1.Enzimlerin genel özellikleri	3
2.2.Enzimlerin yapısı	3
2.3.Enzimlerin sınıflandırılması	4
2.4.Enzim mekanizması	4
2.4.1.Aktif merkez modeli	4
2.4.2.Anahtar kilit modeli	5
2.4.3.İndüklenmiş uyum modeli	6
2.4.4.Gerilme ve geçiş düzeyi stabilizasyonunu içeren model	6
2.5.Enzim izolasyonu ve saflaştırılması	6
2.6.Tek substratlı reaksiyonlarda yaklaşımlar	7
2.6.1.Michaelis Menten eşitliği	7
2.6.2.Michaelis Mentenden türetilen diğer eşitlikler	12
2.6.2.1.Lineweaver Burk denklemi	12
2.6.2.2.Eadie Hofstee denklemi	12
2.6.2.3.Hanes denklemi	13
2.6.2.4.Van Slyke eşitliği	13
2.6.2.5.Haldene Briggs yatışkın hal denklemi	15
3.ASİT FOSFATAZ VE ÖZELLİKLERİ	18
3.1.Asit fosfatazın yapısı ve işlevi	18
3.2.Asit fosfatazın karakterizasyonu	20
3.2.1.Asit fosfatazın aktivitesinin belirlenmesi	20
3.2.2.Asit fosfatazın katalitik aktivitesine etki eden faktörler	20
3.2.2.1.Sıcaklık etkisi	21
3.2.2.2.Tampon ve pH etkisi	21
3.2.2.3.Sustrat etkisi	22
3.2.2.4.İnhibitörler ve aktivatörler	22
3.3.Asit Fosfataz enziminin kaynağı: Sarımsak	22
3.4.Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan asit fosfataz eldesine ilişkin özetler	23

4.DENEYSEL ÇALIŞMALAR	25
4.1.Materyel ve yöntem	25
4.1.1.Materyel	25
4.2.Deneysel çalışmalarda hazırlanan çözeltiler	26
4.3.Sarımsak çözeltisinin hazırlanması	26
4.4.Amonyum sülfatla doyurma	27
4.5.İnert maddelerin çöktürülmesi	27
4.6.Spektrofotometrik olarak protein ve aktivite tayini	28
4.7.Aktivite değerlerinin çevrilmesi	28
4.7.1.Toplam aktivite	28
4.7.2.Spesifik aktivite	28
4.8.Sarımsak filizinden elde edilen asit fosfatazın kinetik özellikleri	30
4.8.1.Sıcaklık etkisi	30
4.8.1.1.Optimum sıcaklık	30
4.8.1.2.Sıcaklık stabilite	32
4.9.Enzim üzerine pH etkisi	34
4.9.1.Optimum pH	34
4.9.2.pH stabilite	35
4.10.Substrat konsantrasyonunun etkisi	37
4.11.Enzim konsantrasyonunun etkisi	40
4.12.Substrat konsantrasyonu ilk hız değerleri	42
4.13.Termal inaktivasyon	43
4.14.Asit fosfataz enziminin aktivasyon enerjisinin saptanması	45
4.15.Substrat konsantrasyonunun reaksiyon süresine etkisi	46
4.16.Asit fosfatazın inhibisyonu ve aktivasyonu	48
4.16.1.İnhibitör etkisinin incelenmesi	49
4.16.2.Aktivatör etkisinin incelenmesi	50
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Enzimlerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler ve çeşitli özellikler.....	7
Tablo 4.1 Asit fosfatazın izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında substrat olarak pNPP kullanıldığında doyurma oranlarına ilişkin aktivite ve protein değerleri.....	29
Tablo 4.2. Asit fosfatazın izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında substrat olarak pNP kullanıldığında doyurma oranlarına ilişkin aktivite ve protein değerleri.....	29
Tablo 4.3. Asit fosfatazın optimum sıcaklık değerleri (pNPP ile yapılan çalışma).....	30
Tablo 4.4. Asit fosfatazın optimum sıcaklık değerleri (pNP ile yapılan çalışma).....	31
Tablo 4.5. Asit fosfatazın sıcaklık stabilite değerleri.....	33
Tablo 4.6. Asit fosfatazın optimum pH değerleri.....	34
Tablo 4.7. Asit fosfatazın pH stabilite değerleri.....	36
Tablo 4.8. Asit fosfataz enzimine substrat konsantrasyonu etkisi.....	37
Tablo 4.9 Asit fosfataz enzimine enzim konsantrasyon değişimi ve reaksiyon süresi etkisi.....	40
Tablo 4.10. Asit fosfataz enzimi substrat konsantrasyonu ilk hız değerleri.....	42
Tablo 4.11. Asit fosfataz enzimi termal inaktivasyon değerleri.....	43
Tablo 4.12. Termal inaktivasyon değerleri logaritmik ifadesi.....	44
Tablo 4.13. Sarımsak filizinden elde edilen asit fosfataz enzimi aktivasyon enerjileri.....	45
Tablo 4.14. Substrat konsantrasyonu reaksiyon süresi değişimi (pNPP ile yapılan çalışma).....	46
Tablo 4.15. Substrat konsantrasyonu reaksiyon süresi değişimi (pNP ile yapılan çalışma).....	47
Tablo 4.16. Asit fosfataz üzerine inhibitör etkisi.....	49
Tablo 4.17. Asit fosfataz üzerine aktivatör etkisi.....	51

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Michaelis Menten grafiği.....	10
Şekil 2.2 : Hanes grafiği.....	13
Şekil 4.1 : Optimum sıcaklık (pNPP ile yapılan çalışma).....	31
Şekil 4.2 : Optimum sıcaklık (pNP ile yapılan çalışma).....	32
Şekil 4.3 : Sıcaklık stabilite.....	33
Şekil 4.4 : Optimum pH.....	35
Şekil 4.5 : pH stabilite.....	36
Şekil 4.6 : $1/s - 1/v$ grafiği (pNPP ile yapılan çalışma).....	38
Şekil 4.7 : $1/s - 1/v$ grafiği (pNP ile yapılan çalışma).....	39
Şekil 4.8 : Enzim konsantrasyonu.....	41
Şekil 4.9 : Substrat konsantrasyonu ilk hız.....	42
Şekil 4.10 : Termal inaktivasyon.....	44
Şekil 4.11 : Konsantrasyon zaman değişimi (pNP ile yapılan çalışma).....	47
Şekil 4.12 : Konsantrasyon zaman değişimi (pNPP ile yapılan çalışma).....	48
Şekil 4.13 : İnhibitör etkisi.....	50
Şekil 4.14 : Aktivatör etkisi.....	51

SARIMSAK FİLİZİNDEN ASİT FOSFATAZIN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Enzimler bütün yaşayan hücrelerde bulunan ve metabolik prosesleri kontrol eden, protein yapısındaki katalizörlerdir. Proseste harcanmadan, çok yavaş ilerleyen kimyasal reaksiyonları hızlandırırlar.

Asit Fosfataz enzimi doğada çok yaygın fakat düşük miktarlarda bulunan bir enzimdir. Çeşitli fosfataz esterlerini katalizleyen pH optimumu 6 olan bir enzimdir.

Çalışmada, sarımsak filizlerinden asit fosfatazin izolasyonu ve kısmi saflaştırılması hedeflenmiş ve enzimin bazı kinetik özellikleri saptanmıştır.

Saflaştırmada, p-nitrofenilfosfat (pNPP) ve p-nitrofenol (pNP) kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar sonucunda başlangıca göre sırasıyla 20 ve 17 kat saflaşma sağlanmıştır.

Çalışma kapsamında substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, aktivasyon enerjisi ve stabilite profilleri incelenmiştir.

Optimum izolasyon pH ve sıcaklık değerleri 6 ve 50 °C olarak tespit edilmiştir. Enzimin aktivasyon enerjisi ise 10 ile 20 kcal. olarak belirlenmiştir. Kinetik sabitlerinden biri olan Michealis Menten sabitleri de $V_m - K_m$ olmak üzere sırasıyla 100 mM/sn -21.27 mM (pNPP) ve 20 mM/sn - 8.33 (pNP) hesaplanmıştır.

KINETIC PARAMETERS AND CHARACTERIZATION OF GARLIC SEEDLING ACID PHOSPHATASE

SUMMARY

Today's biotechnological methods are capable to supply a multitude of enzyme variations. To develop economically and ecologically competitive bioconversion processes one has to gather as much information as possible as early stage of process development to determine further investigations. The application of enzymes in organic/inorganic synthesis has become increasingly important in the last decade.

Like any other catalyst, an enzyme brings the reaction catalyzed to its equilibrium position more quickly than would occur otherwise; an enzyme cannot bring about a reaction with an unfavorable change in free energy unless that reaction can be coupled to one whose free energy change is more favorable. This situation is common in biological systems, but the true role of enzymes involved should not be mistaken.

Acid phosphatases are enzymes that catalyze the hydrolysis of variety of phosphatase esters and appear to exhibit pH optima below 6. Phosphate esters are widely distributed in any organism. While many metabolic intermediates are activated through the transfer of phosphate groups it is equally important that phosphate esters can also be rapidly broken down. The hydrolytic removal of phosphate groups from phosphoesters is catalyzed by phosphatases. Depending on the pH at which such phosphatases have optimal activity, we distinguish between acidic phosphatases and alkaline phosphatases.

Acid phosphatase has been widely used for medicine, pharmacy, the preparation of food additives, the analytical area or the synthesis of organic compounds. Acid phosphatase that catalyze the hydrolysis of large number of orthophosphoric plants and animals.

Monoester compounds, is widely distributed in nature and has been studied in various in plants, acid phosphatase's activity in seeds often increases greatly during germination. Sunflower seed acid phosphatase consists of two polypeptide chains, each of which similar in size to the one that is present in wheat germ enzyme. Garlic acid phosphatase is a metalloprotein as a monomer with a molecular weight 56000 – 58000.

The aim of the presented experiments is partial isolation and purification of acid phosphatase from three week garlic seedlings and to determine its characteristics and kinetic parameters.

In this study two different substrates were used in the beginning. Para nitro phenyl phosphate and para nitro phenol. The highest activity is obtained from pNPP. So kinetic parameters are controlled by using pNPP.

The study steps ;

- Extraction and homogenization :Three week garlic seedlings were disrupted by 0,1mM Sodium Acetate buffer. (0,1 M NaCl , pH 5,5 ,%0,1 TritonX-100)
- Centrifugation : Solution is centrifugated at 20000-22000 rpm.
- Three Step Amonium Sulfate Fraction : %40 , %60 ,%80 Amonium Sulfate Fraction
- Dialysis :Used a dialysis membrane (24 hours , Sodium Acetate buffer)

Garlic seedling was homogenated with 0.1 M acetate buffer. After homogenating supernatant was filtrated with paper filters. Filtrated supernatant was cooled to 4°C, followed by a three step fractionation of proteins with ammonium sulfate. After ammonium sulfate fractions, enzyme solution was dialysed to decreased ammonium sulfate concentration. Every step is controlled by measuring protein and activity with spectrophotometer at 280 nm and 405 nm respectively.

- Asid phosphatase was purified 17.40 (pNPP) and 14.40 (pNP) fold from the starting material.
- After dialysis , asid phosphatase was purified 20.70 (pNPP) and 17.96 (pNP) fold.
- The highest activity is obtained at 60 ° C.
- The pH optimum is 6 .
- The enzyme is stable at pH 4- 6 and 40 – 60 ° C.
- Activation energy of enzyme is between 10 – 20 kcal.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler, organizmadaki metabolik olayları hızlandıran organik katalizörlerdir. Yapılarını esas olarak proteinler oluşturduğu için, enzimlere metabolik proteinler de denmektedir. Enzimin olmadığı bir ortamda reaksiyonların çoğu gerçekleşmez ya da gerçekleşmesi uzun zaman alır [1]. Gerçekte kimyasal dönüşümler enzim yokluğunda oldukça yavaş gerçekleşir. Bu nedenle enzimler olmadan biyokimyasal dönüşmelerin çoğu yaşam hızına ayak uyduramayacak yani hayatsal bir değeri olmayacaktır [2]. Canlı hücrenin bütün fonksiyonları enzimlerle sağlandığından; yaşama bir anlamda birbirini izleyen enzimatik tepkimeler bütünü de denebilir [1].

Enzim kelimesi Yunanca'da "mayada bulunan" ya da "hücre içinde" anlamına gelmekte olup 19. yüzyılda Kühne tarafından biyolojik reaksiyon hızına etki eden maddeleri diğer katalizörlerden ayırmak amacıyla kullanılmıştır [2].

Teknikte uygulama alanı bulan enzimler daha çok hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Proteazlar yanında, nişastadan glikoz üretiminde kullanılan amilazlar, ayrıca glikozun fruktoza dönüştürülmesinde kullanılan glikoz-izomeraz tüketimi de sürekli artış göstermektedir [3].

Katalizörler tepkimeleri hızlandırırlar ve tepkime sonunda değişmeden çıkarlar. Enzimler her ne kadar katalizör iseler de bazı yönleriyle inorganik katalizörlerden ayrılırlar. Anorganik katalizörler çok çeşitli tepkimeleri katalize ettikleri halde enzimler ancak belirli maddeler üzerinde etki edebilirler. Anorganik katalizörler, katalize ettikleri tepkime tarafından değiştirilmezler ve tepkime sonunda kantitatif olarak yeniden kazanılabilirler. Enzimler bu katalizörlerden farklı olarak aktiviteleri sırasında az veya çok tahrip olurlar [1].

Enzimler diğer çeşitli katalizörlerle karşılaştırıldıklarında önemli birçok özellik göstermektedirler. Bunların en önemlileri yüksek katalitik güçleri, spesifiklikleri ve

katalitik aktivitelerinin doğal bir şekilde meydana gelen çeşitli bileşikler tarafından ayarlanabilmesidir [1].

Enzimlerdeki proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerin sayısı, çeşidi ve dizilişleri, enzimlerin yüzeyinde aktif bir bölge oluşturmaktadır. Amino asitlerin meydana getirdiği polipeptitlerin fonksiyonel bir yapı kazanabilmeleri için üç boyutlu bir yapı oluşturmaları gerekir. Proteinlerdeki bu üç boyutlu yapı, yüksek ısı ve pH değişikliği ile bozulabilir. Buna denaturasyon denir. Enzimlerin molekül ağırlıkları 13.000 ile 1.000.000 arasında değişir.

Enzimlerin saflaştırılması ve kristalizasyonu, enzimoloji açısından büyük bir öneme sahip olmakla beraber bu bilim dalının sadece bir kolunu oluşturmaktadır. Enzimolojinin diğer çalışma konularını yaşayan hücrelerde enzimlerin lokalizasyonunun belirlenmesi, fotosentez, solunum, biyolojik oksidasyon ve biyokimyasal reaksiyonlardaki görevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının incelenmesi ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla belirlenmesi oluşturmaktadır [4]

Gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı, sarımsak filizinden asit fosfataz enziminin izolasyonu ve kısmi saflaştırılması sonrasında aktivite, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyon ve reaksiyon süresi değişiminin incelenmesidir.

2. ENZİMLER

2.1 Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler kimyasal bakımdan protein yapısında moleküllerdir. Proteinler temel olarak ağırlıkça %60 C, %16 N ve %8 H içeren moleküllerdir. Bunların yanında az oranda S içerirler. Her enzim proteinlerin tipik yapısına sahiptir. Proteinlerin alt birimi olan aminoasitlerin peptit bağlarıyla lineer olarak birbirine bağlanmasıyla oluşurlar. Bu bağlarla oluşan dallanmamış basit aminoasit zincirine polipeptit denir. Enzim molekülleri tek bir polipeptit zincirinden ya da özel bir polipeptit kümesinden oluşabilir. Aminoasit içeriklerinin tümü düzenli ve aynı geometrik yapıdadır [4].

Enzimler kristallendirilebilirler. Fakat tüm enzimler sıcaklığın yükselmesi, pH stabilite aralığının dışına çıkılması, yapısını bozabilen çözücülerle muamele edilmesi gibi durumlarda bozulabilirler. Bozunan enzimler kristalize olmazlar ve fonksiyonlarını kaybederler. Ancak bozunma sırasında kimyasal bağlar değişime uğramazlar [5].

2.2 Enzimlerin Yapısı

Bütün enzimler proteindir. Enzimlerle katalizlenen tepkimelerin tepkenlerine **substrat** adı verilir ve her enzimin belirli bir substrat ya da substratlardan belirli bir ürün veya ürünler oluşturmak üzere gösterdiği etkiler seçici ve karakteristiktir. Enzimin protein olmayan birimine **kofaktör** denir ve bu birimin olmaması durumunda enzimler katalitik aktivitelerini kaybederler. Bu durumdaki enzimin aktif olmayan protein birimine **apoenzim**, kofaktör içeren aktif enzime **haloenzim** denir. Kofaktör bir metal iyonu veya **koenzim** olarak adlandırılan bir organik molekül olabilir. Bazı enzimler kofaktörü diğerlerinden daha sıkı bağlarlar. Bir kofaktör çok sıkı bağlı ise bunu enzimi bozmadan enzimden ayırmak zordur. Buna **prostetik grup** denir [3].

Enzim = Aktif Protein + İnaktif Protein + Kofaktör

Enzimlerin protein kısmı enzimin hangi substratla reaksiyona gireceğini belirlemektedir. Koenzim ise bir reaksiyonda substrata bağlanmış ya da ondan ayrılmış taneciklerin alıcısı gibidir [6].

2.3. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Enzim Komisyonu enzimleri katalizledikleri tepkimelere göre altı sınıfa ayırmıştır :

Oksidoredüktazlar : Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.1... şeklinde adlandırılır.

Transferazlar : İki molekül arasında bir atom veya grup transferini sağlarlar. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.2... şeklinde adlandırılır.

Hidrolazlar : Hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.3... şeklinde adlandırılır. Asit fosfataz enzimi de bu grupta olup enzim adlandırma sistemine göre E.C.3.1.3.2 (ortofosforik monoester monohidrolaz) olarak adlandırılır.

Liyazlar : Substrattan bir grubun ayrılmasını sağlarlar. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.4... şeklinde adlandırılır.

İzomerazlar : İzomerizasyon reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.5... şeklinde adlandırılır.

Ligazlar : İki molekülün sentezle birleşmesi sırasında nükleozid trifosfattaki bir pirofosfat bağının kırılmasını sağlarlar. Enzim sınıflandırma sistemine göre E.C.6... şeklinde adlandırılır [3.5].

2.4 Enzim Mekanizması

2.4.1 Aktif Merkez Modeli

Enzimlerin stereokimyasal yapısını açıklamak üzere Ogston , enzimle substrat arasında en az üç değişik etkileşim noktasının olması gerektiğini göstermiştir [3]. Bu etkileşimler, bağlanma ve katalitik işlevlerden birini içerebilir. Bağlanma bölgeleri substrattaki özgül gruplara enzimle substrat moleküllerinin birbirlerine göre yönelimlerini sabit durumda tutarak tepkiyen grup veya grupların katalitik bölgenin karşısına düşmesini sağlar.

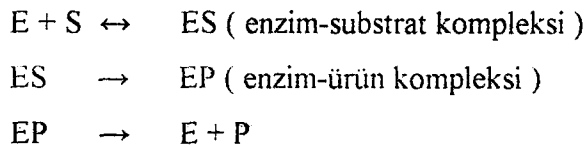
Bağlanma ve katalitik uçlarını içeren bölgeye aktif bölge veya enzimin aktif merkezi denir. Bu, enzimin toplam hacminin küçük bir kısmını oluşturur ve substrat moleküllerine kolayca ulaşması gerektiğinden yüzeyde veya yüzeye yakın yerdedir.

Aktif bölge enzim molekülünün diğer yerlerinde bulunmayan hidrofilik veya hidrofobik mikroçevrelerin bir düzenlemesini oluşturan polar ve apolar aminoasit artıklarının her iki türünü de içerebilir. Böylece bir enzimin işlevi yalnızca katalitik ve bağlanma uçlarının uzaysal düzenlenmesine değil aynı zamanda bu bölgenin bulunduğu ortama da bağlıdır.

Üç nokta etkileşim teorisi enzim özgüllüğünün açıklanmasında sadece sınırlı bir açıklama sağlar, daha mükemmel bir açıklama üç boyutlu uzaydaki etkileşimlerin tamamının düşünülmesi ile sağlanır [3].

2.4.2 Anahtar Kilit Modeli

Enzimler, yaygın olarak kullanılan kimyasal katalizörler ile benzer şekilde iş görürler. Bir katalizör ne çeşit olursa olsun bir reaktan ile onu aktive etmek için bağlanır. Enzim katalizli reaksiyonlarda, reaktanlar **substrat (S)** olarak isimlendirilirler. Enzim katalizinde ilk ve en kritik basamakta, enzim ve substrat, **enzim-substrat kompleksi (ES)** olarak adlandırılan aktive olmuş kompleksi oluşturmak üzere birleşirler. Bu kompleks, daha sonra bir ya da daha fazla ürünün ortaya çıktığı ve sonrasında enzimin rejenere edildiği bir **enzim-ürün kompleksini (EP)** oluşturmak üzere aşağıda gösterilen reaksiyonlara göre bir kimyasal değişime uğrar:



Enzim ve substrat arası etkileşimler genellikle iyon-iyon, iyon-dipol etkileşimler, hidrojen bağları gibi non-kovalent kuvvetleri içerir. Bununla birlikte bazı durumlarda enzim ve substrat arasında gerçek kovalent bağlar da oluşabilir. Enzim-substrat ve

enzim-ürün arasında ne tip bir etkileşim olursa olsun bağların, enzim-ürün kompleksinin parçalanarak ürün ve enzimi açığa çıkaracak derecede zayıf olması gerekmektedir [4,7].

2.4.3 İndüklenmiş Uyum Modeli

Koschland tarafından ortaya atılan indüklenmiş uyum hipotezine göre, bir substrat ile enzimin bağlanması birincil yapıda bir değişime neden olmadan üç boyutlu yapıda konformasyonel bir değişliğe neden olabilir [6] . Bu hipoteze göre substratın katı, enzimin ise kendini substratın etrafına saran bir değişken bölge olduğu kabul edilebilir. Substrat ve aktif bölge arasındaki ilişki bir el ile eldiven arasındaki ilişkiye benzetilebilir [8].

2.4.4 Gerilme ve Geçiş Düzeyi Stabilizasyonunu İçeren Model

1948 yılında Pauling tarafından bu kavram geliştirilmiştir. Substrat bağlanması önemli miktarda enerji harcanmasını gerektirir. Reaksiyonun devamlılığı içinse daha fazla enerji sağlanmalıdır. Aktif bölgenin yapısı katı ise substratın enzime bağlanmak için şeklini değiştirmesi gerekir. Bu değişme daha sonra kırılarak ileri yöndeki reaksiyonun yürümesini sağlayacak gerilme ile sonuçlanmalıdır [3].

2.5 Enzim İzolasyonu ve Saflaştırılması

Enzimlerde saflaştırmanın amacı istenen enzimi mümkün olan maksimum verimle enzim kaynağından uzaklaştırmaktır. Saflaştırma işlemi sırasında ortamda bozunmuş ya da inaktif enzimler bulunmamalı, başka enzimleri veya büyük molekülleri içermemelidir [6] Enzim ayırma ve saflaştırma yöntemlerinin seçilmesinde enzimlerin büyüklük/kütle, yük, çözünürlük ve spesifik bağlanma merkezlerine sahip olma özellikleri gözönünde bulundurulmalıdır.

Verilen şartlar altında saflaştırılmış bir enzimin katalitik aktivitesini tahmin etmek mümkün değildir. Bu nedenle saflaştırma işlemine preparatın spesifik aktivitesi daha ileri saflaştırma adımlarıyla artmayacak sabit bir değere ulaşana kadar devam edilir [1].

Tablo 2.1’ de görüldüğü gibi enzimlerin farklı özellikleri uygulanan yöntemleri de farklılaştırmaktadır.

Tablo 2.1 Enzimlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler ve Çeşitli Özellikleri

Özellik	Yöntem	Ölçek
Büyüklik/Kütle	Santrifüj	Büyük, Küçük
	Jel Filtrasyonu	Genellikle Küçük
	Diyaliz,Ultrafiltrasyon	Genellikle Küçük
İyon Yüğü	İyon Değiştirici	Büyük, Küçük
	Elektroforez	Genellikle Küçük
	İzoelektrik Odaklaşma	Genellikle Küçük
Çözünürlük	pH Değişimi	Genellikle Büyük
	İyonik Kuvvetteki Değişim	Büyük, Küçük
	Dielektrik Sabitinde Düşme	Genellikle Büyük
Spesifik Bağlanma Yeri	Affinite Kromatografisi	Genellikle Küçük
	Affinite Elusyonu	Büyük, Küçük

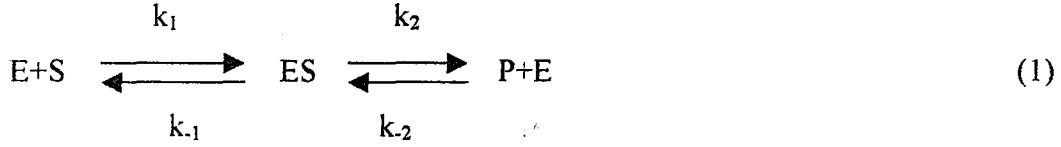
Bu yöntemlerin dışında sıcaklık ile denatürasyon, kalsiyum fosfat jelleri üzerinde fraksiyonel adsorpsiyon, hidrolik kromatografi, polietilen glikol gibi suda çözünen non-iyonik polimerlerle çöktürme ve liyofilizasyon ile konsantre etme gibi yöntemler de uygulanabilir [16] .

2.6 Tek Substratlı Reaksiyonlarda Yaklaşımlar

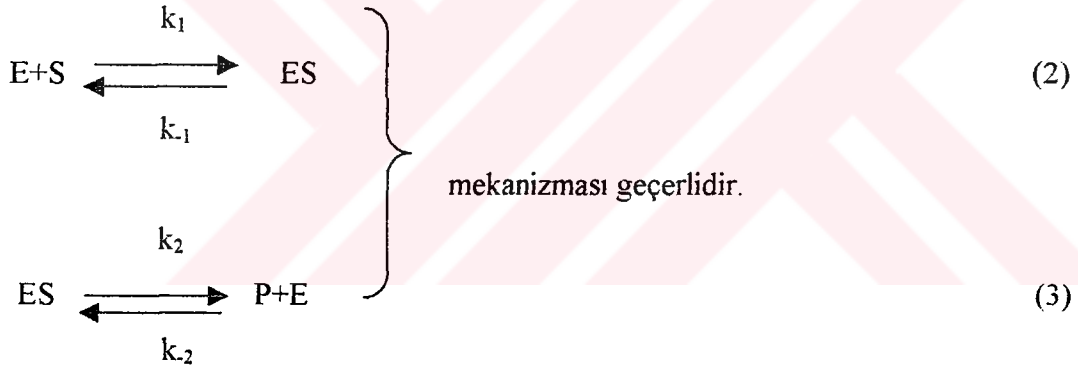
2.6.1 Michaelis-Menten Eşitliği

Enzimler spesifik aktiviteye sahip proteinlerdir. Substrat için enzimin bu spesifitesi, geçici olarak ENZİM-SUBSTRAT (ES) kompleksi kurmaktadır. Bu geçici kompleksten ürünler ve yeniden enzim oluşmaktadır. Kompleksten serbest hale geçen enzim tepkimedeki katalitik etkisine yeniden başlar.

Substrat enzim tarafından etkilenen spesifik bir bileşiktir. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlanır. Bu şekilde bir ES kompleksi oluşur. Bundan sonra bu kompleks enzim ile ürüne parçalanır.



Reaksiyonun ilk anlarında ürün konsantrasyonu çok düşük olacağından, P ile E' nin birleşerek ara kompleks oluşturma hızı, çok yavaştır. Başka bir deyimle, reaksiyonun başlangıcında



Kinetik hesaplarda kolaylık açısından reaksiyon başlangıç mekanizması kullanılmalıdır. Bu mekanizmada reaksiyon hızı,

$$V=k_2 \cdot [ES] \text{ şeklinde gösterilir.} \quad (4)$$

Sürekli hal varsayımına göre [ES] konsantrasyonunun zamanla değişimi sabit kabul edilirse;

$$d[S]/dt= k_1 \cdot [E] \cdot [S]-k_{-1} \cdot [ES]-k_2 \cdot [ES] =0 (*) \quad (5)$$

bağıntısı yazılabilir.

Herhangi bir t anında serbest enzim ile o andaki ES kompleksinin konsantrasyonlarının toplamı; başlangıçtaki enzim konsantrasyonuna eşit olacağından her üç konsantrasyon arasında

$[E] + [ES] = [E]_0$ bağıntısı geçerlidir.

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (**)$$

(**) denklemi (*) denkleminde $[E]$ yerine yazılırsa;

$$k_1 \cdot ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] = 0 \quad (7)$$

Buradan da;

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]} \quad (8)$$

bağıntısı kurulabilir

$$V = k_2 \cdot [ES] \text{ olduğundan} \quad (9)$$

$$V = k_2 \cdot \frac{k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]} \quad (10)$$

Bu eşitliğin pay ve paydası k_1 ile bölünürse ;

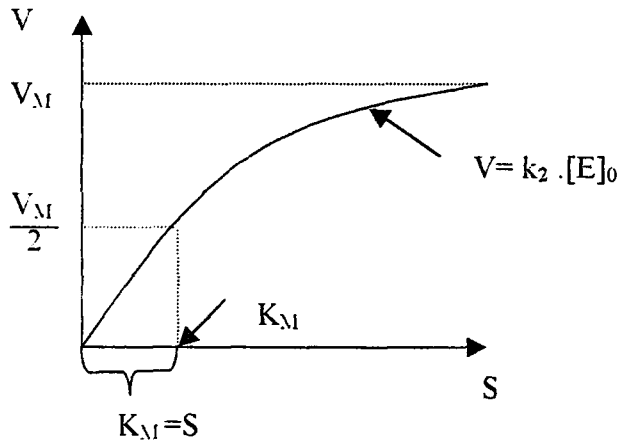
$$V = \frac{k_2 \cdot [ES]_0 \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (11)$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \text{ ile gösterilirse;} \quad (12)$$

$$V = \frac{k_2 \cdot [ES]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (13)$$

Bu eşitlikteki K_M sabitine Michaelis-Menten sabiti adı verilmektedir.

V ile S arasında grafik çizilirse maksimum hız değerleri bu grafikten hesaplanabilir.



Şekil 2.1 Michaelis – Menten Grafiği

Grafikten de görüleceği gibi; belirli bir substrat konsantrasyonundan sonra rxn hızı sınır bir değere vararak sabit kalmaktadır. V_M ile gösterilen bu sınır değer enzim reaksiyonunun erişebileceği en yüksek (maximum) hızdır.

i) Substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu hallerde $S \gg K_M$ olacağından eşitlikte paydadaki S yanındaki K_M yok sayılabilir. O halde substrat konsantrasyonunun çok yüksek olduğu bu sınır limit bölgelerde;

$$V = k_2 \cdot [E]_0 \text{ eşitliğinin geçerli olacağı açıktır.}$$

ii) Eğrinin sınır hıza kadar olan kısmını incelersek, burada hız ile substrat konsantrasyonu arasında ;

$$V = (k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]) / K_M$$

Bağıntısının geçerli olduğu anlaşılır. Çünkü S değerlerinin küçük olduğu bu bölgede K_M yanında S konsantrasyonu ihmal edilebilir. Bunun sonunda da

$$V = (V_M \cdot [S]) / K_M \text{ elde edilir.}$$

iii) Substrat konsantrasyonu K_M değerine eşit olduğu durumda;

$$S = K_M$$

$$V = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{2 \cdot [S]}$$

$$V = \frac{k_2 \cdot [E]_0}{2} \Rightarrow V = \frac{V_M}{2}$$

bağıntılarının geçerli olacağı görülür.

2.6.2 Michaelis-Menten'den Türetilen Diğer Eşitlikler

Yukarıdaki açıklamalardan anlaşılacağı gibi V ile S arasında çizilecek grafikler yardımı ile enzim reaksiyonlarına ilişkin V_M sınır hızlarının, K_M sabitlerinin ya da substrat konsantrasyonlarının tayin edilmesi mümkün olabilmektedir. Ayrıca (13) denkliği ters çevrilirse elde edilen doğruların y –eksenini kestiği noktaların düşey konumlarından V_M sınır hızları ve doğruların eğimlerinden de Michaelis-Menten sabitleri tayin edilebilir.

2.6.2.1 Lineweaver- Burk Denklemi

(13) eşitliği ters çevrilirse;

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{k_2 \cdot [E]_0} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_2 \cdot [E]_0} \quad (14)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M} \quad (15)$$

2.6.2.2 Eadie- Hofstee Denklemi

Doğrusal bir grafik elde etmek için kullanılan ikinci bir yöntem de Eadie- Hofstee diagramını çizmektir. Bunun için;

$$\frac{V}{S} = \frac{V_M}{K} + \frac{V}{K_M} \quad (16)$$

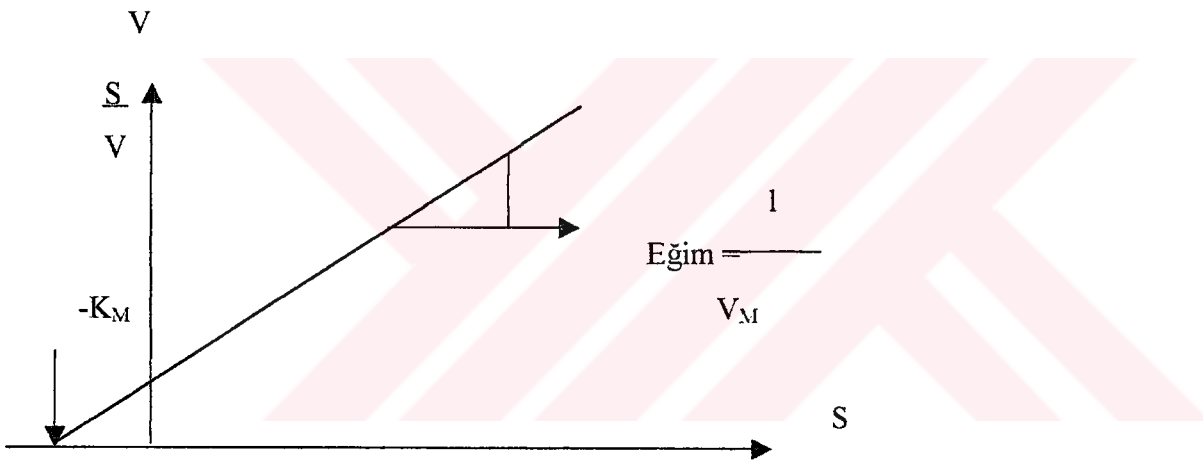
Denklemleri kullanılarak grafik çizilir ve ilgili sabitler hesaplanır.

2.6.2.3 Hanes Denklem

Michaelis-Menten' den türetilen bir değer eşitlik de Hanes Denklemidir.

$$\frac{S}{V} = \frac{S}{V_M} + \frac{K_M}{V} \quad (17)$$

$\frac{S}{V}$ ile S arasında grafik çizilirse;



Şekil 2.2 Hanes Grafiği

2.6.2.4 Van Slyke Eşitliği:



Bu reaksiyonun olması için gereken süre, her parçanın oluşması için gereken sürelere eşittir.

$$t = \frac{1}{k_1 \cdot [S]} + \frac{1}{k_p} \quad (19)$$

$$t = \frac{k_p + k_1 \cdot [S]}{k_1 \cdot k_p \cdot [S]} \Rightarrow \frac{1}{t} = \frac{k_1 \cdot k_p \cdot [S]}{k_p + k_1 \cdot [S]} \quad (20)$$

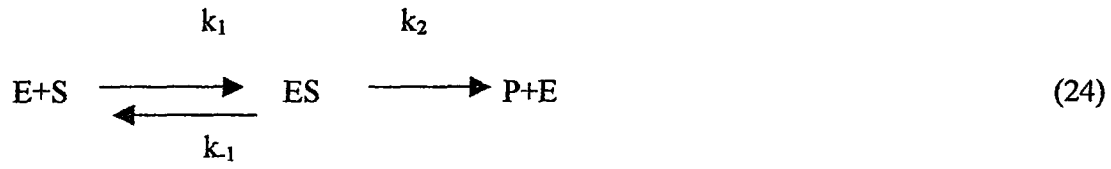
$$V = [E]_t \frac{1}{t} \quad (21)$$

$$V = [E]_t \cdot \frac{k_1 \cdot k_p \cdot [S]}{k_p + k_1 \cdot [S]} \Rightarrow V = [E]_t \cdot \frac{k_p \cdot [S]}{\frac{k_p + [S]}{k_1}} \quad (22)$$

$$V = [E]_t \cdot \frac{k_p \cdot [S]}{K + [S]} \quad (23)$$

Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği ile analogik özellik göstermektedir.

2.6.2.5 Haldene- Briggs Yatışkın Hal Yaklaşımı:



Başlangıçta [ES] yaklaşık olarak sıfırdır ve P oluşumu yoktur.

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad (25)$$

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E] \cdot [S]}{k_{-1} + k_2} \quad (26)$$

$$F = \frac{[ES]}{[E] + [ES]} \Rightarrow F = \frac{[S]}{(k_{-1} + k_2 / k_1) + [S]} \quad (27)$$

Enzim toplam miktarı $[E]_t$ ise;

$$[ES] = F \cdot [E]_t \Rightarrow [ES] = \frac{[S] \cdot [E]_t}{(k_{-1} + k_2 / k_1) + [S]} \quad (28)$$

$$V = k_2 \cdot [ES]$$

$$V = k_2 \cdot \frac{[S] \cdot [E]_t}{(k_{-1} + k_2 / k_1) + [S]} \quad (29)$$

$$V_m = k_2 \cdot [E]_t \quad V = k_2 \cdot \frac{V_m \cdot [S]}{(k_{-1} + k_2 / k_1) + [S]} \quad (30)$$

$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M$ ile gösterilirse; ve $k_2 \ll k_{-1}$ ise eşitlik yaklaşımı, yatışkın hal yaklaşımının limit durumuna dönüşür ve;

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_M \quad \text{olur.}$$

$$V = k_2 \cdot \frac{V_m \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{olur.} \quad V_{\max} = k_2 \cdot [E]_t \quad \text{ise} \quad (31)$$

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{k_1 \cdot [S]}{k_1 + k_2}}{1 + (k_1 \cdot [S] / k_1 + k_2)} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (32)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] - k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (33)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - (k_{-1} + k_p) \cdot [ES] \quad (34)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1} \cdot [ES] - k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (35)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (36)$$

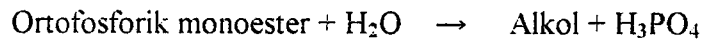
Yatışkın şartlarda $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ dır.

3. ASİT FOSFATAZ VE ÖZELLİKLERİ

3.1 Asit Fosfatazın Yapısı ve İşlevi

Fosfataz enzimleri doğada çok yaygındır. Fosfatazlar çok çeşitli organik fosfatlardan fosfat gruplarını uzaklaştırmaya yardım ederler. Böylece fosfat iyonlarından oluşan metabolik bir birikim oluştururlar. ATP ve nükleotitlerin oluşumu, ribuloz bi-fosfatın rejenerasyonu ve glikolitik yolun başlangıcında glukozun fosforlanması, fosfat gerektiren önemli biyokimyasal proseslerdir. Bazı fosfatazlar belli substratlar için spesifiklik gösterirlerken diğerlerinin spesifikliği daha geniştir ve çok sayıda organik substratlardan fosfat gruplarını ayırabilirler.

Asit fosfataz veya ortofosforik monoester fosfohidrolaz, asidik şartlar altında fosfomonoesterleri ayıran bir enzimdir. Asit fosfataz ismi bu enzimin asidik aralık içindeki optimum pH'da çalışmasından gelmektedir. Asit fosfataz doğada oldukça yaygındır ve transfosforilasyon reaksiyonlarının yanısıra ortofosfat esterlerinin hidrolizini de katalizlerler. Bu enzim fosfomonoesterazdır ve aktif olduğu pH aralığında tanımlanabilir. Asit fosfataz aşağıdaki reaksiyonu pH 7'nin altında katalizler[3.6].



Martland alyuvarlardaki fosfataz aktivitesine değindikten sonra konuyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır[14]. Roche optimum pH derecesi 6.0-6.2 olan alyuvar fosfatazı ile optimum pH derecesi 8.8-8.9 olan akyuvar fosfatazı arasındaki farkı göstermiştir. Böylece asit ve alkalın fosfataz kavramı ortaya çıkmıştır. Daha sonra insan prostatında ve fare ciğerinde asit fosfataz üzerine incelemeler yapılmıştır

Enzimler klinik tanıda kullanılmaktadır. Çünkü, kan koagülasyonunda bulunan enzimler gibi bazı bilinen enzimler plazmanın normal bileşenleridir. Plazmadaki konsantrasyonları hücrelerdeki konsantrasyonlarından daha fazladır. Diğer enzimler normal olarak sadece hücrelerde bulunurlar ve sadece hücreler zarar gördükleri zaman kana ya da diğer biyolojik sıvılara salınırlar. Bu enzimlerin plazmadaki seviyeleri, hücrelerdeki seviyelerinden milyon kere veya daha fazla düşüktür. Bununla birlikte bu enzimlerin plazmada normal değerinin üstündeki düzeylerde var oluşu, doku yıkımı hızında bir artışı düşündürür.[9,18] Kan plazmasında ve diğer vücut sıvılarındaki enzim konsantrasyonlarının ölçümü özellikle kalp, karaciğer, pankreas, kas ve kemik gibi hastalıkların teşhisinde çok önemli bir tanı aracı haline gelmiştir. Örneğin, laktat dehidrojenaz (LDH) kalp ya da iskelet kasları hasarlarında, alkalın fosfataz karaciğer ya da kemik hastalıklarında, serum glutamat oksaloasetat transaminaz (SGOT) kalp ve karaciğer hastalıklarında, keratin fosfokinaz (CK) kas hastalıklarında kullanılmaktadır[6,9].

Asit fosfatazın en derişik olarak rastlandığı yer insan prostatıdır. Bu durum klinik kimyacılar tarafından prostat kanserinin teşhisinde kullanılmaktadır. Prostat kanserine neden olan prostatik asit fosfataz hızlı gelişip üzerinde çalışılması kolay bir enzimdir. Asit fosfataz enziminin prostat kanseri dışında bazı hastalıklarla da bağlantılı olarak derişiminin artabildiği saptanmıştır.

Asit fosfataz enzimi hücrenin içinde veya hücrenin dışında bulunabilir. Hücre içinde golgi aygıtında, lizozomlarda, endoplazmik retikulumda, besin moleküllerinde bulunabilir [17].

Asit ve alkali fosfataz arasında basit bir fark vardır. Bu enzimler çok farklı pH aralıklarında optimal hız sergilerler. Alkali fosfatazlar kofaktör olarak divalent metal iyonları gerektirirler ve hayvan organlarıyla mikroorganizmalardan elde edilirler. Asit fosfatazlar ise bitkiler dahil birçok organizmada bulunur. Asit fosfataz fosfotioik asitin S- değışimli monoesterlerini hidrolizlemez. Fakat aynı şartlar altında O- değışimli monoesterlerini hidrolizler. Alkali fosfataz ise S-değışimli monoesterleri hidrolizleyebilir. Asit fosfataz, alkali fosfatazın aksine metal kompleksi oluşturan ajanlar ile inhibe edilmezler.

Günümüze kadar üzerinde en fazla araştırma yapılmış asit fosfataz enzimleri, Prostatik Asit Fosfataz, Alyuvar Asit Fosfatazı, Ciğer Asit Fosfatazı, Dalak Asit Fosfatazı, Kemik Asit Fosfatazı, Bitki Asit Fosfatazı, E.coli Asit Fosfatazı, Saccharamyces Asit Fosfatazı'dır [4].

3.2 Asit Fosfatazın Karakterizasyonu

3.2.1 Asit Fosfataz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bir enzimin bir doku ekstraktı veya başka bir biyolojik sıvı içindeki miktarını ölçmek için, o örnek içindeki o enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı ölçülür. Uygun şartlar altında ölçülen hız enzim miktarı ile orantılıdır. Mümkün olduğu takdirde, bu hız, o enzimin ileri derecede saflaştırılmış şeklinin belli bir miktarı tarafından katalize edilen reaksiyonun hızı ile karşılaştırılır. Enzimatik belirlemeler için kullanılacak metodun seçimi birkaç parametreye bağlıdır. Buna göre; metot çabuk, hassas ve doğru olmalı, uygun substrat kolaylıkla temin edilebilir olmalı ve maliyet düşük olmalıdır [9,12].

Bu nedenle birçok enzimin karakterizasyonu için mümkün ise optik sistemler kullanılır. Enzim katalizli reaksiyonlarda substratların çoğu ve reaksiyon ürünleri görünen ve görünmeyen ışığı absorplarlar. Bunu için spektrofotometrik olarak tespit edilebilirler. Bu en yaygın ve en kolay metottur [12]. Substrat ya da ürün renklendiği veya ultraviyole bölgede ışığı absorpladığı zaman bu yöntem hızlı ve güvenilir sonuçlar verir. Işık absorplayan bir ürün veya substratın oluşum veya harcanma hızı spektrofotometrik olarak takip edilebilir [17].

3.2.2 Asit Fosfatazın Katalitik Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Asit fosfataz enziminin kararlılığına etki eden faktörler şöyle sıralanabilir:

- Sıcaklık
- Tampon çözelti ve pH
- Substrat
- Aktivatör ve İnhibitörler

3.2.2.1. Sıcaklık Etkisi

Diğer kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim katalizli reaksiyonların hızı da sıcaklığın artmasıyla birlikte artmaktadır ve enzimler sıcaklığa karşı oldukça duyarlıdır. 1°C'lik sıcaklık artışı için katalitik aktivitenin artış değeri %10 daha fazla olabilmektedir. Enzim kararlılığı da sıcaklıktan etkilenebilmektedir. Yüksek sıcaklıklar aktivitede artışa neden olurken enzimin kararlılığını azaltır. Enzim aktivitesinin sıcaklıkla artışı belirli bir noktaya kadardır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık, reaksiyon hızındaki artış ile aktivitedeki düşüş arasındaki ilişkiyi ortaya koyar [13,14].

Birçok enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık aralığı vardır ve bu sıcaklık aralığı enzimin izole edildiği kaynağa bağlı olarak değişebilir. Bitkiler gibi bazı organizmalar yaklaşık oda sıcaklığında büyürler ve bunlardan elde edilen enzimler de çoğunlukla 30-40 °C civarlarında en yüksek aktiviteyi gösterirler[16].

Düşük sıcaklıkta ise çözeltideki reaksiyon hızı düşer. Çok yüksek sıcaklıklarda, moleküllerin termal hareketi, enzimin şeklini ve yapısını koruyamayacağı kadar hızlanır, bu nedenle protein yapı bozulur ve aktivitesini kaybetmeye başlar[4,18].

3.2.2.2 Tampon ve pH Etkisi

Tüm enzimlerin aktiviteleri için bir optimum pH aralığı vardır. Bu aralık genelde geniş bir aralıktır. Optimum pH sadece tamponun iyonik şiddetine, doğasına bağlı olmamakla beraber sıcaklıkla ve substrat konsantrasyonuyla da değişebilir[12,16].

pH'daki veya çevre şartlarının asiditesinin değişimi enzim aktivitesini değiştirebilir veya tamamen inhibe edebilir. pH'daki bu değişim moleküller arası polar ve apolar çekme ve itme kuvvetlerini etkiler ve enzimin şeklini değiştirir. Bu durum substrat ile enzim arasında uyumsuzluğa yol açar[17,19].

3.2.2.3. Substrat Etkisi

Enzim tarafından dönüştürülen komponent aynı zamanda katalitik aktiviteyi ölçmek için enzimin substratı olmaktadır. Bununla beraber çeşitli hidrolazlar için sentetik substartlar kullanılmaktadır. Çünkü doğal substratlar genellikle kesin olarak tanımlanamamaktadır ve enzimin çalışması sonucu ele geçen ürün kolaylıkla ölçülememektedir. Substratın seçimi önemlidir çünkü sentetik substratlar farklı hızlarda hidrolizlenmektedir. Genellikle optimum substrat konsantrasyonu pH ve sıcaklığa bağlıdır [15,20].

3.2.2.4. İnhibitörler ve Aktivatörler

Birçok kimyasal etkenler enzimin katalitik aktivitesini, aktive ya da inhibe edebilir. Substrat ve koenzimlerin yanısıra birçok enzim tam olarak aktif hale geçebilmek için protein olmayan, bazı hallerde de protein olan bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Aktive edici iyon, koenzim ya da ko-substrat ile kompleks oluşturarak direkt olarak reaksiyona katılabilir. Diğer durumlarda ise iyon enzimin bir parçasıdır ve aktif merkeze direkt olarak bağlanabilir [13,15].

3.3 Asit Fosfataz Enziminin Kaynağı : Sarımsak (*Allivum Sativum* L.)

Orta Asya ve Batı kökenli bir bitkidir. 25 – 100 cm boyunda soğanlı diye tabir edilen dişlerden oluşmuştur. Nadiren tohum verir. Ilıman ve sıcak iklimlerde yetişir. Sarımsağın her bir dişi uçucu yağ , karbonhidrat, protein , selüloz , vitamin içerir. Koku son derece keskin , kalıcı , tipik , lezzeti ise çok kuvvetlidir.Yapısında S-(2-propenil) L-sistein sülfoksit , alliinaz etkisiyle diallil tiyosülfonat ve çeşitli allil bileşikleri vardır.

Sarımsak Ürünleri:Uçucu Yağ: Ezilmiş soğancıklardan su buharı damıtılmasıyla 0.1 ve 0.3 verimle elde edilir. Sarı ve kırmızı renkli olan bu yağ tipik sarımsak kokusuna sahiptir.

1. Dehidrate Sarımsak: ABD ve bazı Avrupa ülkelerinde üretilir. Kuru maddesi yüksek , kuvvetli aromalı , beyaz renkli çeşitleri tercih edilir.Toz, granül, öğütülmüş , kıyılmış ve doğranmış olarak beş grupta işlem görür. Ürünler sıkı ve nemsiz kaplarda saklanır.Lezzet gücü tazesinden 5 kat daha fazladır.

2. Sarımsak Tuzu :Toz haldeki sarımsak , tuz ve akıcılık için nişasta veya trikalsiyum fosfattan oluşur. Çeşni olarak kullanılır.

3. Kapsüllenmiş Sarımsak :Sarımsağın ucu Arap zımkı veya modifiye nişasta ile kaplanmıştır.

Tüm sarımsak ürünleri ve kendisi soğan gibi tek başına kullanılamaz genelde çeşni olarak tüketilir.

Gıda sanayide en fazla olarak dehidrate sarımsak tüketilir. Tıbbi olarak güçlü antimikrobiyal etkisi vardır.Gıda dışında eczacılıkta da kullanılır.

Türkiye’de büyük çapta tarımı yapılır.Özellikle taze yaprakları ülkemizde çeşni otu olarak da kullanılır. Türk mutfağında özellikle pastırma , sucuk ,çemen yapımında kullanılır.

3.4 Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan asit fosfataz eldesi ve özelliklerinin saptanmasına ilişkin literatür çalışmalarının özeti

Asit fosfataz enziminin katalizlediği reaksiyonlar değişik kaynaklarda görülmektedir: Tohumlarda [6,7], bakterilerde [8,9], soğanda [10], buğdayda [5,11], Japon kırmızı turbunda [12].

Asit fosfatazlar birçok doku ve organlarda bulunmakta ve çoğu kez spesifik olmadığı tanımlanmaktadır.Genelde asit fosfataz çok az miktarlarda oluşmakta ve seyreltik çözeltilerde kararsız ve saf halde yüzey denatürasyonuna uğramaktadır.Bu özellikler ve onların birçok formda olması asit fosfatazın saflaştırılmasını zorlaştırmaktadır [5].

Asit fosfatazın pH aralığı 4,5 – 6,5 asidik ortam olarak saptanmıştır. Asit fosfatazın yapısı homodimer ve monomer halinde bulunur ve moleköl ağırlıkları sırasıyla 100 – 105 kDa ve 45 – 47 kDa' dır [6].

Enzimlerin optimum sıcaklık aralıkları genelde 40 – 60 °C'dır. Asit fosfataz için optimum sıcaklık 30 – 80 °C arasında değişmektedir. Soya tohumunda asit fosfataz incelemelerinde çok yüksek optimum sıcaklık değeri tespit edilmiştir. Araştırmacılara göre alışılmamış yüksek optimum sıcaklık enzimin stabilitesinden kaynaklanmaktadır [13] .

Jie Guo ve Thomas C. Pesacreta soğan asit fosfatazı üzerinde yaptıkları çalışmada optimum pH aralığı 4,5 – 6,5 arasındadır[7,10].

Pirinç ve soğan asit fosfatazı incelendiğinde Li'nin enzim aktivitesine etki etmediği gözlenmiş buna karşın Mg ve Zn'nin kuvvetli inhibitörler olduğu saptanmıştır[7,10].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1 Materyal ve Yöntem

4.1.1 Materyal

pNPP , (Sigma)

pNP , (Sigma)

Triton-X 100 , (Merck)

Amonyum Sülfat , (Merck)

Sodyum Hidroksit , (Merck)

Amonyak , (Merck)

Sodyum Asetat , (Merck)

Asetik Asit , (Merck)

Sodyum Klorür , (Merck)

Bakır Klorür , (Merck)

Magnezyum Klorür , (Merck)

Molibdat , (Merck)

Potasyum Klorür , (Merck)

Distile su

Siyah bant süzgeç kağıdı , (Whatman)

Beyaz bant süzgeç kağıdı , (Whatman)

Kullanılan Cihazlar

Su banyosu , (Nüve ST 400)

Su banyosu , (Clifton)

Santrifüj , (Heraeus CHRIST US III), (25000d/dak)

Hassas terazi , (Oerling Na 264)

Magnetik karıştırıcı (IKAMAG)

UV Spektrofotometre , (HP)

İnkübatör , (Elektromag)

Sarımsak Çanakkale bölgesinden elde edilmiş olup çalışmada 3 haftalık sarımsak filizi kullanılmıştır.

4.2 Deneysel çalışmalarda hazırlanan çözeltiler

Reaksiyon durdurucu : NaOH (0,02 mol/lit) 0,8 gr. NaOH balon jode 1 lt distile su ile tamamlanmıştır [16,17].

Tampon : 0,1 mol/lit Asetat Tampon (13,6 gr CH_3COONa , 5,85 gr NaCl ve 1 ml Triton-X 100 1000 ml distile suda çözülmüş ve Asetik Asit ile pH ı 5,5' e ayarlanmıştır [17].

Substrat Çözeltisi : 5mmol/lit pNPP çözeltisi (Asetat tamponda çözülmüş olan substrat kullanılmıştır [16,17].

4.3 Sarımsak Çözeltisinin Hazırlanması

Sarımsak filizleri köklerinden kesilerek hassas terazide tartıldıktan sonra distile su ile iyice yıkanmıştır.Filizler homojenizatöre konularak üzerine 5 katı kadar asetat tampon ilave edilmiştir. 20 saniye yavaş 40 saniye hızlı devirde parçalandıktan sonra oluşan koyu renkli ve kalın bir köpük tabakalı çözelti önce siyah bant süzgeç kağıdından , sonra da beyaz bant süzgeç kağıdından geçirilmiştir.Süzme işleminden sonra ele geçen çözelti ham homojenat olarak adlandırılmıştır. Bu çözelti içersindeki kolloidal maddelerin ayrılması için 20000 rpm'de 10 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası çökelti asetat tamponda saklanmış , çözelti ise amonyum sülfatla doyurulmuştur[17].

4.4 Amonyum Sülfatla Doyurma

Çözelti amonyum sülfatla doyurularak içersindeki proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Bu amaçla önce % 40 doyurma işlemi yapılmıştır. 100 ml'lik çözeltiye 25 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ denk gelecek şekilde santrifüjden çıkan çözeltinin hacmine bağlı olarak ilave edilecek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı hesaplanmıştır. Karışım soğuk ortamda 2 saat karıştırıldıktan sonra 20000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüje edildikten sonra aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Çökelti asetat tamponda çözülerek buzdolabında saklanmıştır[17].

Amonyum sülfatla % 40 doyurma işleminden sonra, % 60 doyurma işlemine geçilmiştir. 100 ml'lik çözeltiye 39 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edilecek şekilde ve başlangıçta eklene miktar çıkarılarak yeniden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenmiştir. 2 saat karıştırma sonunda santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Çökelti asetat tamponda çözülüp buz dolabına kaldırılmıştır. Aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır[17].

Doyurmanın son adımında % 80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonuna çıkılmıştır. 100 ml'lik çözeltiye 52,3 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ denk gelecek şekilde , başlangıçtaki ilave edilen miktarlar azaltılarak tekrar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenmiştir. 2 saat karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve çökelek asetat tamponda çözülerek buzluğa kaldırılmıştır, gerekli tayinler yapılmıştır[17].

Değişik substratlar kullanılarak elde edilen protein ve aktivite değerleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de sunulmuştur.

4.5 İnert Maddelerin Çöktürülmesi

Aktiviteler çökelek fazlarında daha yüksek çıktığından her kademedeki çökelekler bir kaba toplanmıştır. Ortamda çözünmemiş olan yağ ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için tekrar bir santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüjleme 20000 rpm'de 30 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Santrifüjleme sonucu 2 tabaka oluşmuştur. Bu işlem sonucu ele geçen çökelek atılmış , çözelti ise aktivite ve protein tayinleri yapıldıktan sonra kinetik işlemleri için saklanmıştır.

4.6 Spektrofotometrik Olarak Protein ve Aktivite Tayini:

Protein Tayini: Aktivite ve protein tayini için buzlukta saklanan amonyum sülfatla doyurulmuş numuneler hiçbir işleme tabi tutulmadan UV spektrofotometrede 280 nm’ de protein ölçümü yapılmıştır. Şahit numune olarak asetat tampon kullanılmıştır.

Aktivite Tayini: Protein ölçümü yapıldıktan sonra numunelere aktivite ölçümü uygulanmıştır. 37°C reaksiyon sıcaklığı olarak tespit edilmiştir. Substrat olarak asetat tamponda hazırlanmış 5mM p-nitrofenilfosfat (pNPP) ve p-nitrofenol (pNP) çözeltileri kullanılmıştır. Numune sayısınınca tüplere 2,25 ml pNPP ve pNP konulmuştur. 5 dakika 37°C ‘de bekletildikten substrat çözeltilerine birer dakika arayla 0,25 ml. enzim çözeltisi eklenmiştir. 30 dakika reaksiyona tabi tutulduktan sonra 2,5 ml. NaOH ilave edilerek reaksiyonlar durdurulmuştur. Şahit numune olarak enzim çözeltisi yerine asetat tampon konarak hazırlanan preparatlar kullanılarak spektrofotometrede 405 nm ‘de aktivite değerleri tespit edilmiştir.

4.7 Aktivite Değerlerinin Çevrilmesi

4.7.1 Toplam Aktivite

$$A(U/ml) = \{A_{405}/A_{\text{şahit},405}\} * \{1/\text{Enzim mik.}\} * \{1/\text{Reak. süresi}\} * \text{Sey. derecesi}$$

4.7.2 Spesifik Aktivite

$$A(U/mg) = A(U/ml)/\text{protein}$$

Tablo 4.1 Asit Fosfataz Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılmasında Substrat Olarak pNPP Kullanıldığında Doyurma Oranlarına İlişkin Protein ve Aktivite Değerleri

Kademe	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Derecesi
Ham Homojenat	188,56	56,330	0,298	1,000
%40DoyurmaOranı	163,24	85,150	0,521	1,740
%60DoyurmaOranı	122,51	140,44	1,146	3,840
%80DoyurmaOranı	83,480	434,93	5,210	17,40
Diyaliz Sonrası	76,120	469,66	6,170	20,70

Tablo 4.2 Asit Fosfataz Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılmasında Substrat Olarak pNP Kullanıldığında Doyurma Oranlarına İlişkin Protein ve Aktivite Değerleri

Kademe	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Derecesi
Ham Homojenat	188,56	50,91	0,27	1,00
%40Doyurma Oranı	163,24	74,370	0,450	1,660
%60Doyurma Oranı	122,51	130,27	1,060	3,920
%80Doyurma Oranı	83,480	325,60	3,900	14,40
Diyaliz Sonrası	76,120	369,30	4,850	17,96

Sarımsak filizinin pNP ve pNPP substratlarıyla yapılan saflaştırma işlemleri sonucu , aktivite tayinlerinde pNPP 'ın daha yüksek aktivite verdiği ve saflaştırma oranlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Başlangıçta saflaştırma işlemine tabi tutulmamış asit fosfatazın aktivitesi 0,298 ve 0,270 iken %80 doyurma ile bu oran 5,210 ve 3,900 'e kadar çıkartılmıştır. Diyaliz sonrası ise 20,70 ile 17,96 kat saflaştırma yapılmış olup değerler 6,170 ile 4,850 'ye yükseltilmiştir.

4.8 Sarımsak Filizinden Elde Edilen Asit Fosfataz Enziminin Kinetik Özellikleri

4.8.1 Sıcaklık Etkisi

Enzimler üzerine sıcaklık etkisi iki şekilde incelenmiştir.

- Optimum Sıcaklık
- Sıcaklık Stabilitesi

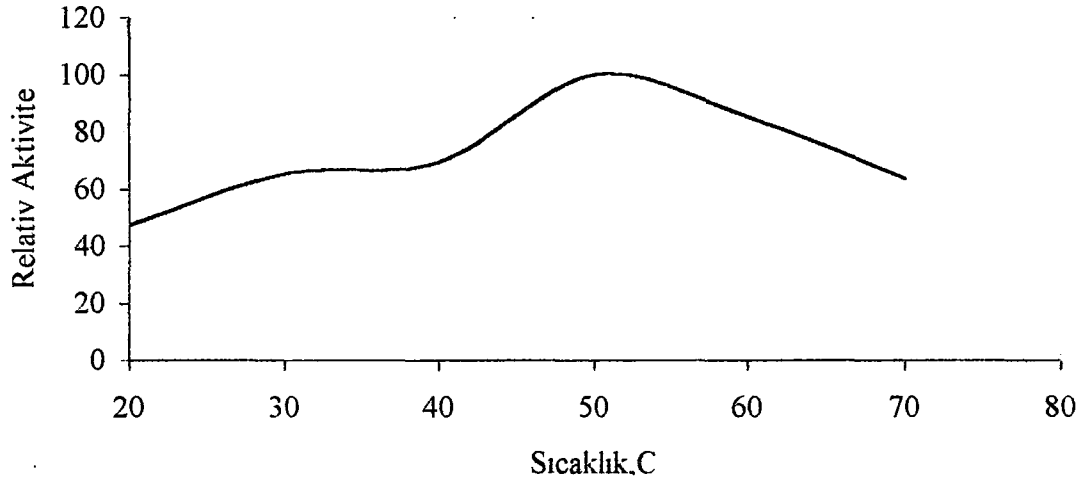
4.8.1.1 Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklık , enzimin farklı sıcaklıklarda aktivite tayini ile tespit edilmiştir. Aktivite tayini yapılırken şahit numune olarak o sıcaklıktaki enzimsiz numune kullanılmıştır .Değerler Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de sunulmuştur ve grafiksel sonuç Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Asit Fosfataz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerleri (pNPP kullanılarak yapılan çalışma)

Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Relativ Aktivite (%)
20	20.16	47.50
30	27.82	65.50
40	29.45	69.39
50	42.44	100.0
60	36.29	85.50
70	27.13	63.92

Tablo 4.3’de görülen değerler Şekil 4.1’de grafiklendirilmiştir.

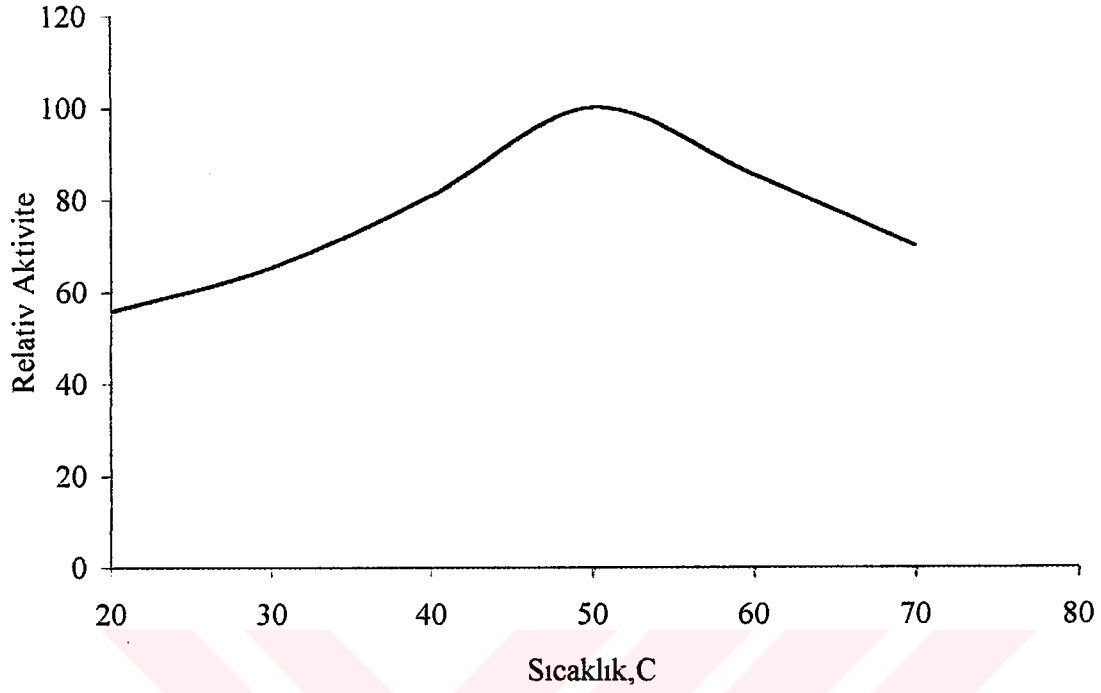


Şekil 4.1 Optimum Sıcaklık (pNPP)

Tablo 4.4 Asit fosfataz enziminin optimum sıcaklık değerleri (pNP kullanılarak yapılan çalışma)

Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Relativ Aktivite (%)
20	16.26	55.76
30	19.03	65.26
40	23.57	80.82
50	29.16	100.00
60	24.88	85.32
70	20.37	69.85

Grafiksel yapıyı incelemek için Tablo 4.4'de verilen değerler Şekil 4.2'ye aktarılmıştır.



Şekil 4.2 Optimum Sıcaklık (pNP)

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi sarımsak filizinden kısmi saflaştırılmış asit fosfataz enzimi 40°C ile 60°C arasında kararlıdır. Enzimin aktivitesinin pNPP ve pNP kullanılması durumunda maksimum aktiviteye 50°C’ de ulaştığı gözlenmiştir. 60°C’den sonra aktivite de ani düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebi enzimin protein yapısının bozulmasıdır.

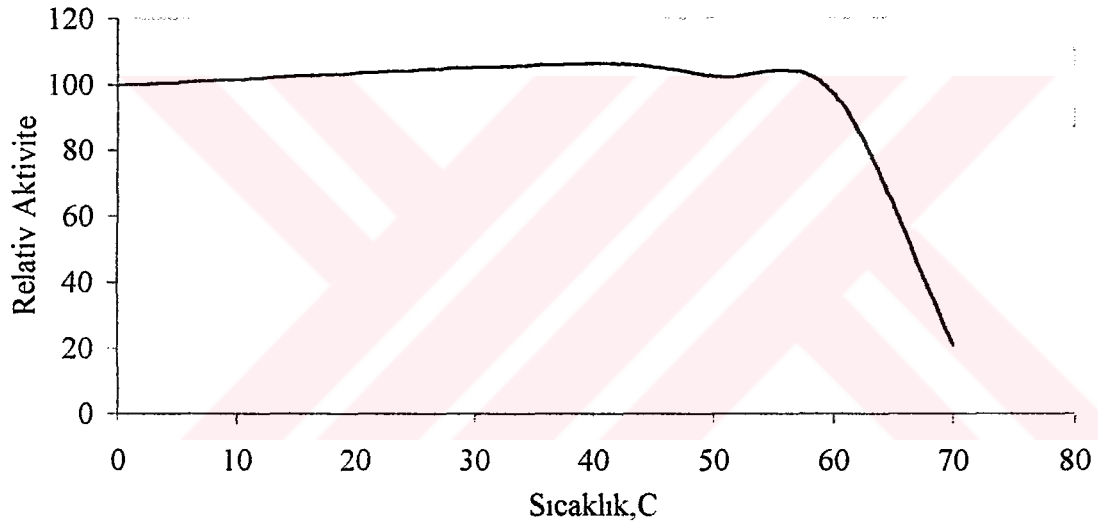
4.8.1.2 Sıcaklık Stabillite

Sıcaklık stabilitesi için seyreltik enzim ile çalışılmıştır. Seyreltik enzim numunesinden 7 ayrı tüpe 0,5 ml eklenmiştir. Her tüp 0 –70 °C ‘ lerde 15 dakika bırakılmıştır. 15 dakika sonunda 5 dakika soğutulmuştur. Bu numunelerin aktivite tayinleri Bölüm 4.6’da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5’de sunulmuş, grafiksel ifade Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5 Asit Fosfataz Enziminin Sıcaklık Stabilite Değerleri

Sıcaklık (°C)	SpesifikAktivite (U/mg)	Relativ Aktivite (%)
0	48,07	100,00
40	51.16	106,42
50	49.28	102,51
60	46.66	97,060
70	10.03	20,86

Tablodaki sonuçları grafiğe aktarırsak,



Şekil 4.3 Sıcaklık Stabilite

Enzim üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde , sarımsak filizinden elde edilen asit fosfatazın 50°C maksimum aktivite gösterdiği Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterildiği gibi tekrar saptanmıştır ve kararlılığının 40°C ile 60°C olduğu gözlenmiştir. 60°C’den sonra çok hızlı bir aktivite kaybına uğradığı görülmüştür.

4.9 Enzim Üzerine pH Etkisi

Enzimler üzerine pH etkisi optimum reaksiyon koşullarını saptamak için önemli bir parametredir. Enzim üzerine pH etkisi iki şekilde incelenmiştir:

- optimum pH
- pH stabilite

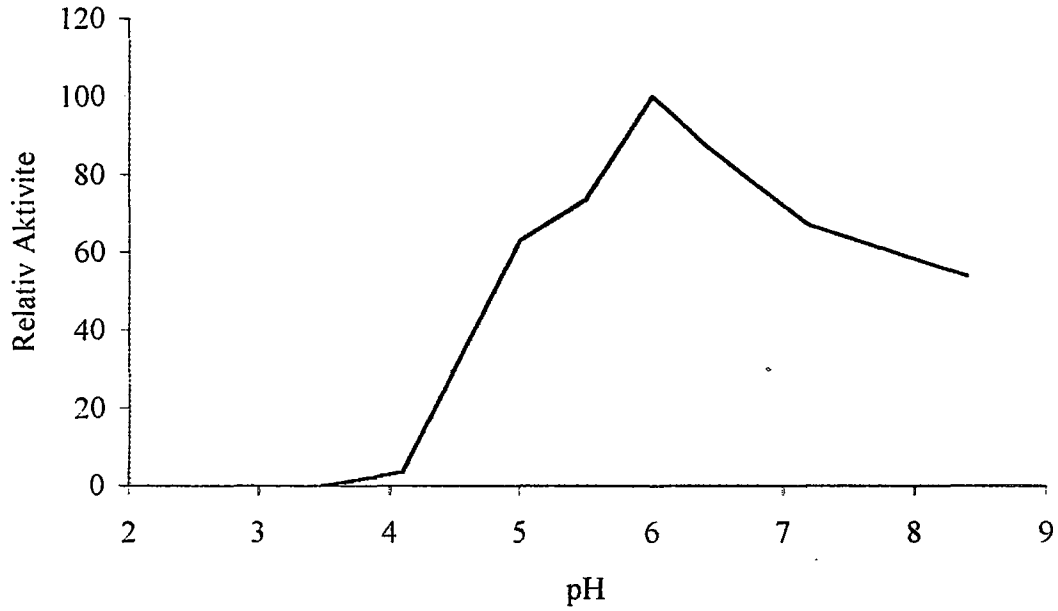
4.9.1 Optimum pH

Çalışmanın bu bölümünde substratın pH değeri 3,5 ile 9 arasında ayarlanmıştır. Hazırlanan farklı pH larda substrat çözeltileri hazırlanarak aktivite tayini yapılmıştır. Şahit numune olarak o pH değerindeki enzimsiz numune kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.6’da , grafiksel ifade Şekil 4.4’de sunulmuştur.

Tablo 4.6 Asit Fosfataz Enziminin Optimum pH Değerleri

pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Relatif Aktivite (%)
3.5	0	0
4.1	0.523	3.420
5.0	9.640	63.04
5.5	11.25	73.57
6.0	15.29	100,0
6.4	13.40	87.63
7.2	10.22	66.88
8.4	8.250	53.95

Tablo 4.6’nın değerlerini grafiğe aktardığımızda, Şekil 4.4’ü elde etmekteyiz.



Şekil 4.4 Optimum pH

Enzim üzerine pH etkisi incelendiğinde sarımsak filizinden elde edilen asit fosfataz enziminin Şekil 4.4' de görüldüğü gibi optimum pH'ı 6 olarak saptanmıştır. Kararlılık aralığı ise görüldüğü gibi 5–7 arasındadır. pH 4 ile 5,5 arasında ani bir artış, pH 7'den sonra hızlı bir aktivite kaybı söz konusudur.

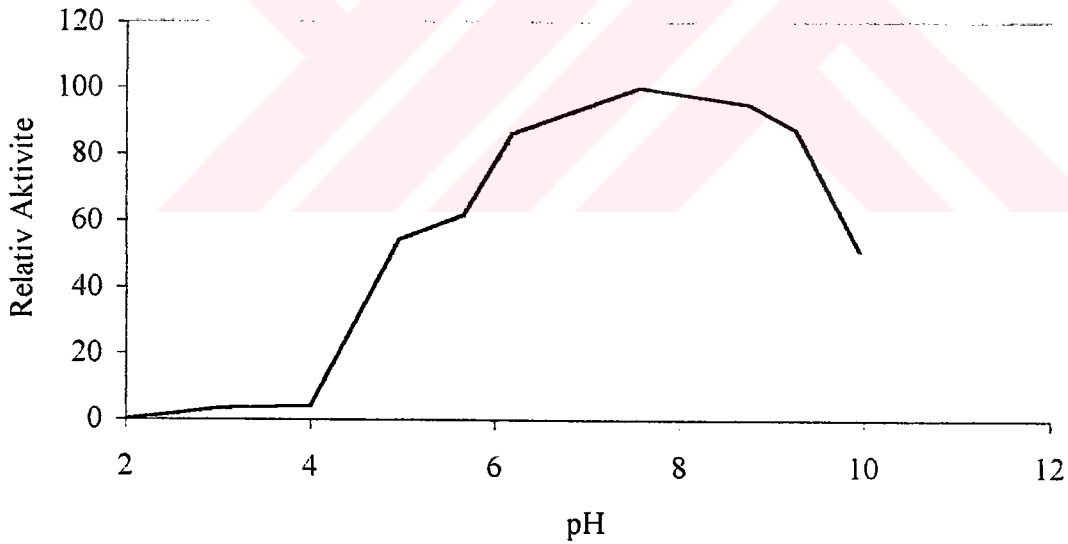
4.9.2 pH stabilite

Çalışmanın bu bölümünde asetat tamponun pH değeri 2 ile 10 arasında ayarlanmıştır. Ayarlanan pH sayısınca deney tüplerine 1:1 oranında tampon çözeltisi ve enzim eklenmiştir. Bu tüpler 30 °C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat bırakılmıştır. 24 saat sonunda aktivite tayini yapılmıştır. Şahit numune olarak enzimsiz distile su kullanılmıştır. Deneysel sonuçlar Tablo 4.6'da , grafiksel sonuç ise Şekil 4.5'de sunulmuştur.

Tablo 4.7 Asit Fosfataz Enziminin pH Stabilit  Değerleri

pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Relatif Aktivite (%)
2.00	0	0
3.00	0.666	3.290
4.00	0.809	4.000
4.95	11.00	54.42
5.65	12.46	61.65
6.18	17.43	86.24
7.56	20.21	100.0
8.75	19.18	94.98
9.25	17.68	87.48
9.95	10.35	51.21

pH stabilite değerlerini grafiğe geçirdiğimizde Şekil 4.5'i elde etmekteyiz.



Şekil 4.5 pH Stabilit 

Enzim  zerine pH etkisi incelendiğinde , sarımsak filizinden elde edilen asit fosfatazın optimum pH değeri 6 olarak saptanmıştır (Şekil 4.5). pH 5-9 arasında kararlılık aralığı tespit edilmiştir. pH 2-4 arasında aktivite 0'a yakın bir değerde olup, pH 9' dan sonra hızlı bir aktivite kaybı olduğu görülmüştür.

4.10 Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

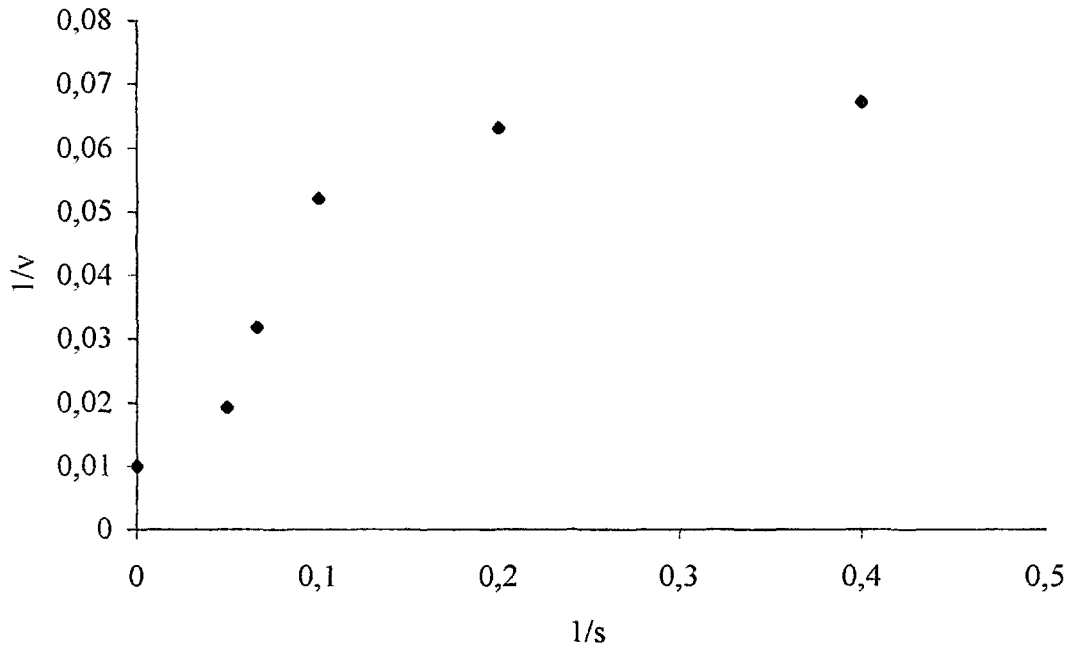
Substrat konsantrasyonu enzim reaksiyon derecesinin tespitinde önemli bir faktördür. Eğer , enzim konsantrasyonunu sabit tutup substrat konsantrasyonu değiştirir ve elde edilen değerlerle başlangıç hızına karşı substrat konsantrasyonu çizilirse Michealis – Menten eğrisi elde edilir. Bu sayede enzimatik reaksiyonun derecesi , mekanizması , K_m ve V_m değerleri hakkında bilgi edinilebilir.

Bu çalışmada pNPP ve pNP substrat olarak kullanılmış ve konsantrasyon değişiklikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de belirtilmiş , grafiksel ifade Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmuştur.

Tablo 4.8 Asit Fosfataz Enzimine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

S (mM)	V (mM/sec) (pNP)	V (mM/sec) (pNPP)
2,5	12.917	14.912
5.0	13.220	15.784
10	16.028	19.215
15	16.016	31.472
20	16.017	52.264

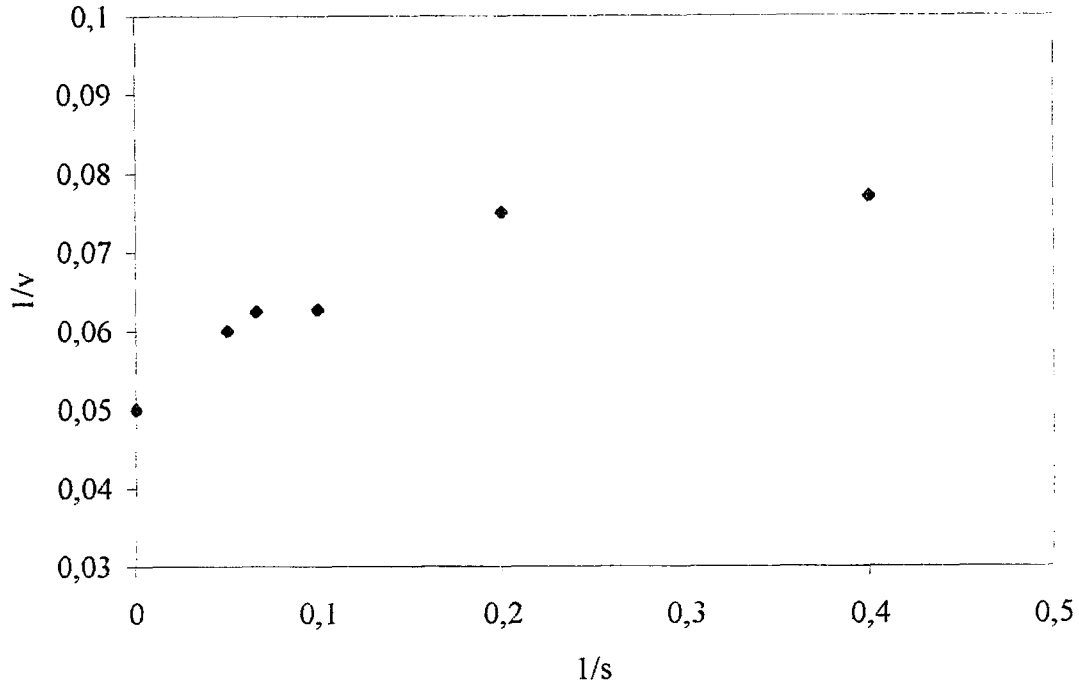
Tablodaki değerleri grafiğe aktarıp incelersek Michaelis Menten sabitlerini hesaplayabiliriz. Şekil 4.6’yı ve Şekil 4.7’yi incelersek;



Şekil 4.6 $1/s - 1/v$ (pNPP ile yapılan çalışma)

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi pNPP ile yapılan çalışmada, grafiğin $1/v$ eksenini kestiği nokta 0,01’dir. Bu değer $1/V_m$ değerine eşittir. Buradan V_m (Michaelis-Menten Sabiti) 100mM/sn olarak hesaplanır. pNPP ile yapılan çalışmadaki maksimum hız değeri 100mM/sn olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde, $1/s$ eksenini kesen nokta ise -0,047’dir. $-1/K_m$ (Michaelis Menten Sabiti) değeri bu büyüklüğe eşit olduğundan K_m değeri 21,27mM olarak hesaplanır.

Benzer şekilde pNP ile yapılan çalışma sonuçlarını da Şekil 4.7’de görebiliriz.



Şekil 4.7 1/s –1/v (pNP ile yapılan çalışma)

Şekil 4.7 incelendiğinde ve pNPP ile yapılan çalışmadaki Michaelis Menten Sabitlerini bulma yöntemi takip edildiğinde pNP için V_m değerinin 20 mM/sn, K_m değerinin ise 8,33mM olarak hesaplandığı görülür. Sonuçlar karşılaştırıldığında K_m değeri daha büyük olan pNPP’de reaksiyonun daha hızlı olduğu ve maksimum hızın da buna bağlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır.

4.11 Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Genelde iki enzim molekülü , substratı , tek enzim molekülünden iki kat daha fazla katalizlemektedir. Diğer bir deyişle reaksiyon başlangıç hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Eğer reaksiyon başlangıç hızı bu orantıdan sapma gösteriyorsa aşağıdaki durumlar olabilir;

- Yüksek enzim konsantrasyonu
- Enzim yapısındaki bazı komponentlere (koenzim) çok yakınlık duyması
- Bazı periyotlarla değişim , reaksiyon başlangıç hızı ölçülmeden elde edilmesi
- Tam inhibe etkisi olan çok az safsızlığın reaksiyon ortamında olması
- Reversibl olarak enzime bağlanarak inert kompleks oluşturabilen inhibitörlerin enzim çözeltisinde olması
- Ayrılabilen aktivatörün veya koenzimin enzim çözeltisinde olması

Eğer reaksiyon başlangıç hızı enzim konsantrasyonuna orantılı olarak değişse de , bu enzimin tam kinetik özelliklerini vermez.

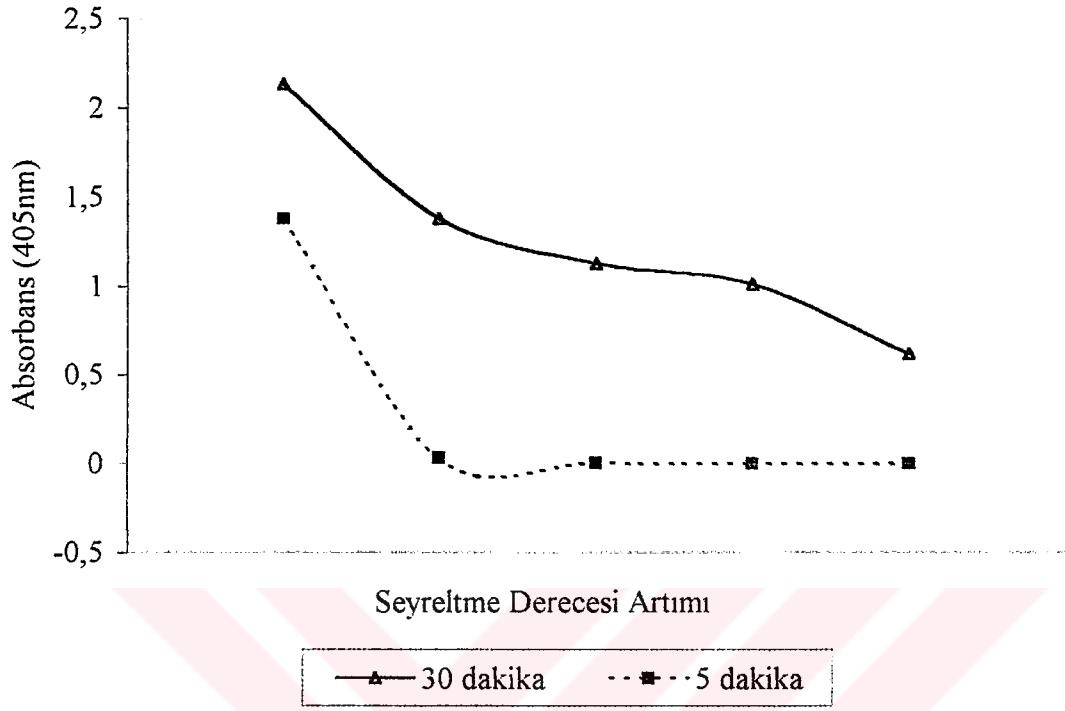
Bu çalışmada sarımsak filizinden elde edilen asit fosfataz enziminin konsantrasyon değişimi değerleri Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9 Asit Fosfataz Enzimine Konsantrasyon Değişimi ve Reaksiyon Süresinin Etkisi

Enzim Konsantrasyonu (seyreltme derecesi)	Aktivite değerleri (30 dk . reaksiyon)	Aktivite değerleri (5 dk. reaksiyon)
1/2	2.1327	1.3764
1/5	1.3764	0.0346
1/10	1.1236	$4.21 \cdot 10^{-3}$
1/20	1.0084	$8.13 \cdot 10^{-4}$
1/50	0.6166	$6.81 \cdot 10^{-4}$

Not :Tablo 4.9’un değerleri absorbans cinsinden verilmiştir.

Tablo 4.9’un değerlerini grafik alanına aktarırsak Şekil 4.8’i elde ederiz.Enzim konsantrasyon ve reaksiyon sürelerin grafik üzerinde incelersek;



Şekil 4.8 Enzim Konsantrasyonu

Reaksiyon süresi 30 ve 5 dakika olarak inceleme yapıldığında genel olarak seyreltik enzimle çalışıldığı durumda aktivite oldukça düşmüştür. Seyreltme oranı artıp reaksiyon süresi kısaldıkça değerlerde bir dalgalanma gözlenmiştir. Bunun sebebi de substratla enzimin temas miktarının azlığı ve reaksiyonun tam olarak olamamasıdır. Fakat reaksiyon süresi 30 dakika olarak deneysel çalışmalarımızı yürüttüğümüzde, enzim ile substrat arasında temas daha iyi sağlandığından dalgalanma durumu kaybolmuştur. Literatür çalışmaların baktığımızda da uygun reaksiyon süresinin 30 dakika olduğu görülmüştür[17].

4.12 Substrat Konsantrasyonu İlk hız Değerleri

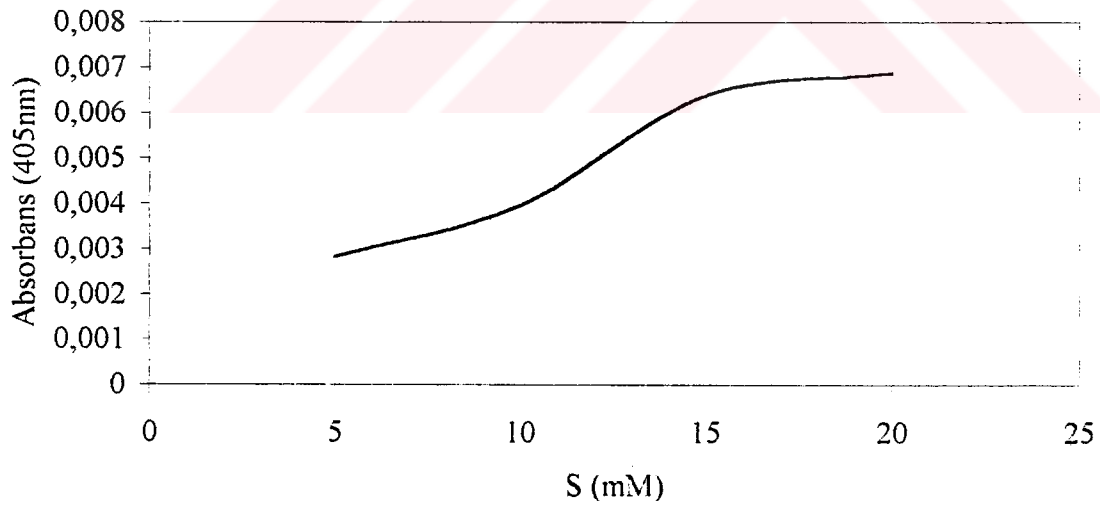
Asit fosfataz enzimi kullanılarak değişik substrat konsantrasyonlarında 5 dakika reaksiyon süresi uygulanarak ilk hız değerleri tespit edilmiştir. Deneysel veriler Tablo 4.10'da sunulmuştur.

Tablo 4.10 Asit Fosfataz Enziminin Substrat Konsantrasyonu İlk Hız Değerleri

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Aktivite değerleri (5 dk. Reaksiyon)
5	$2.837 \cdot 10^{-3}$
10	$3.964 \cdot 10^{-3}$
15	$6.382 \cdot 10^{-3}$
20	$6.879 \cdot 10^{-3}$

Not : Tablo 4.10'un değerleri absorbans cinsinden verilmiştir.

Tablo 4.10'un değerlerini grafiksel olarak Şekil 4.9 üzerinde gösterdiğimizde;



Şekil 4.9 Substrat Konsantrasyonu İlk Hız

Reaksiyon süresi çok kısa olduğundan aktivite değerleri oldukça düşüktür. Bunun sebebi de enzim konsantrasyonunun da olduğu gibi substrat ile enzimin yeterince temas sağlayamamasıdır. Fakat, Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi substrat konsantrasyonu arttıkça aktivite değerleri de artmaktadır.

4.13 Termal İnaktivasyon

Deneysel çalışmanın termal inaktivasyon bölümü 65°C , 67°C ve 69°C 'lerde gerçekleştirilmiştir. Bunun için enzim numunesinden 2 ml alınmış ve daha önce 65°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiştir. 0. , 10. , 20. , 40. , 60. dakikalarda numuneler alınmıştır. Alınan numunelere 37°C de aktivite tayini yapılmıştır. Şahit olarak aynı sıcaklıkta enzimsiz numune kullanılmıştır. Aynı olaylar 67 ve 69° C lar için de tekrarlanmıştır. Deneysel çalışmanın sonuçları Tablo 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.11 Asit Fosfatazın Termal İnaktivasyon Değerleri

Zaman (dakika)	Sıcaklık , 65° C	Sıcaklık , 67° C	Sıcaklık , 69° C
0	2.13499	1.69402	1.64265
10	1.87626	1.63274	1.52883
20	1.63818	1.57686	1.42596
40	1.32736	1.43363	1.33172
60	1.22964	1.32239	1.16869

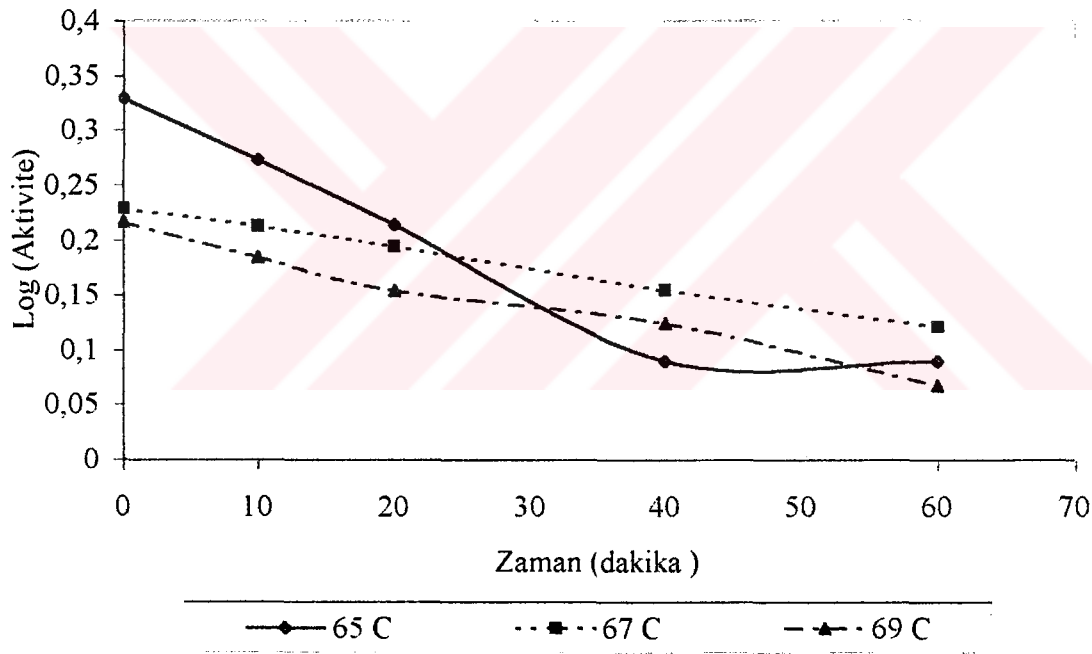
Not: Tablo 4.11'in değerleri absorbans cinsinden verilmiştir.

Enzimin stabilitesini anlayabilmek için zamana karşı Tablo 4.11'de sunulan absorbans değerlerinin logaritmik olarak grafiğe geçirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hesaplanan logaritmik değerler Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12 Termal İnaktivasyon Değerlerinin Logaritmik İfadesi

Zaman (dakika)	LogV (65°C)	LogV (67°C)	LogV (69°C)
0	0.3293	0.2289	0.2166
10	0.2732	0.2129	0.1843
20	0.2143	0.1944	0.1541
40	1.2298	0.1546	0.1244
60	0.0897	0.1213	0.0677

Tablo 4.12’de bulunan değerleri grafik ortamına taşır (Şekil 4.10), enzimin termal stabilitesini incelersek ;



Şekil 4.10 Termal İnaktivasyon

Asit fosfataz enzimi 60°C’den sonra hızlı bir aktivite kaybına uğramıştır. Özellikle 62°C ‘de aktivite oldukça düşmüştür. Bu nedenle, sıcaklık kontrolünün en fazla 65°C’ ye kadar sağlıklı bir şekilde yapılabildiği söylenebilir. Bunun nedeni yüksek sıcaklıkta enzim yapısındaki proteinin denatüre olmasıdır.

4.14 Asit Fosfataz Enziminin Aktivasyon Enerjisinin Saptanması

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek oldukça karmaşıktır. Çünkü kimyasal kinetik kurallarına göre reaksiyon hızlarının sıcaklıkla arttığını bilmekteyiz. Enzim reaksiyonları ise ancak belli bir sıcaklığa kadar bu kurala uyar. Başka bir deyimle , enzim aktiviteleri belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar. Ve buna bağımlı olarak enzimlerin katalize ettiği reaksiyon hızları da optimum sıcaklığa kadar artmaktadır. Enzim reaksiyonlarında bu bölgede genel olarak Arrhenius Eşitliği geçerlidir.

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

ile ifade edilen bu eşitlikte , enzim reaksiyonları için k hız sabiti yerine reaksiyon hızları kullanılarak işlemler sürdürülebilir. Bu durumda Arrhenius eşitliği

$$V = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$
 şeklini alır.

Bu eşitlikten $1/T$ ye karşı $1/V$ grafiği çizilirse eğim $-E_a/R$ değerini vermektedir.

Bu çalışmada Asit Fosfataz enzimi kullanılarak farklı substratlar (pNPP ve pNP) ve farklı konsantrasyon değerleri için aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 4.13’de sunulmuştur.

Tablo 4.13 Sarımsak Filizinden Elde Edilen Asit Fosfatazın Aktivasyon Enerjileri

Konsantrasyon (mM)	Aktivasyon En.(kcal) (pNP)	Aktivasyon En.(kcal) (pNPP)
1.25	12.974	12.661
2.50	15.799	17.324
5.00	12.200	12.119
10.0	12.902	11.566
15.0	11.925	12.325
20.0	17.372	11.180

Literatür çalışmaları incelendiğinde asit fosfataz enziminin aktivasyon enerjisinin 10 kcal ile 20 kcal arasında olduğu gözlenmiştir[8]. Deneysel çalışmamızda da farklı konsantrasyonlar için aktivasyon enerjisinin aralığı doğru olarak saptanmıştır. Fakat genel bir bakışla pNP kullanıldığında aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çalışma şartı olan 5mM konsantrasyonda da pNP'nin substratlığındaki aktivasyon enerjisi yüksektir.

4.15 Substrat Konsantrasyonun Reaksiyon Süresine Etkisi ve İlk Hız Değerleri

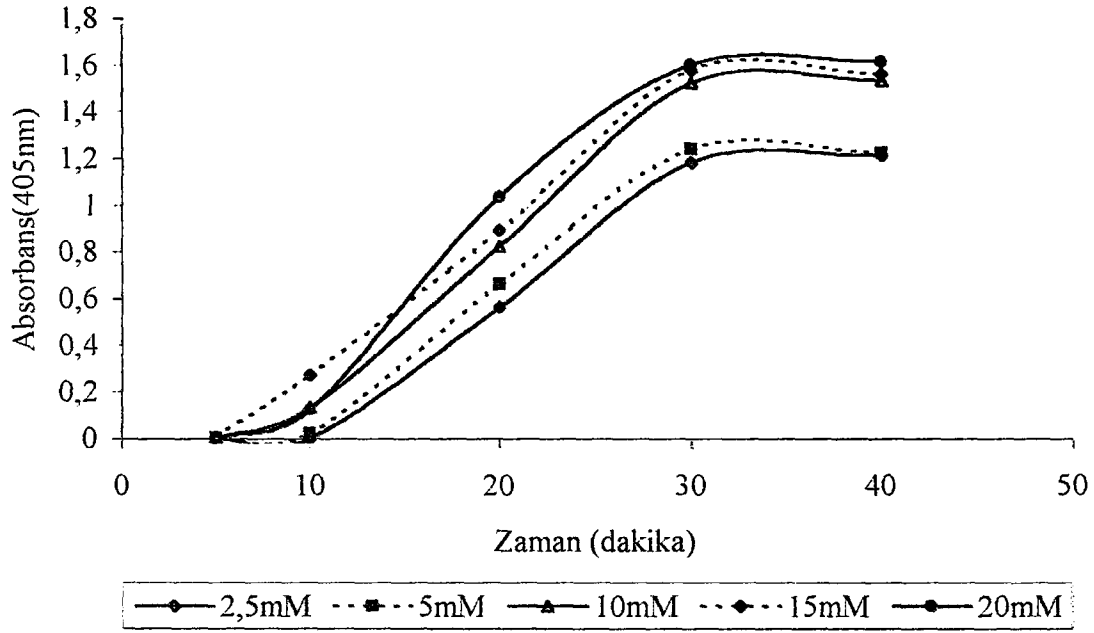
Substrat konsantrasyonu ve reaksiyon süresi Asit Fosfataz enziminin kinetik özellikleri açısından oldukça önemlidir. Farklı substratlarda ve farklı reaksiyon sürelerinde enzimin aktivite değerleri incelenerek reaksiyonların hız değerleri tespit edilmiştir. Bulunan değerler aşağıdaki Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'de, grafiksel ifade ise Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de sunulmuştur.

Tablo 4.14 Substrat Konsantrasyonu Reaksiyon Süresi Değişimi (pNP ile yapılan çalışma)

Zaman (dak)	2.5 mM	5.0 mM	10 mM	15 mM	20 mM
5	0.0026	0.0028	0.0039	0.0063	0.0068
10	0.1625	0.1326	0.1528	0.1624	0.1344
20	0.7613	0.8224	0.9861	1.1630	1.2716
30	1.2367	1.3646	1.5268	1.6114	1.6688
40	1.6221	1.6421	1.6339	1.6527	1.6622

Not : Değerler absorbens cinsinden verilmiştir.

Tablo 4.14'deki sonuçları grafik üzerinde gösterirsek Şekil 4.11'i elde ederiz. Şekil incelendiğinde;



Şekil 4.11 Konsantrasyon zaman değişimi (pNP)

İlk 20 dakikalık zaman dilimi içerisinde enzimin aktivite değerleri dalgalı olmaktadır. 20 dakikadan sonra 5 ve 10mM'lık konsantrasyonlar için aktivite değerlerinin birbirine yaklaştığı, 2,5 , 15 ve 20mM'da birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Her konsantrasyon değeri için 30 ve 40 dakikalık reaksiyon süresi uygun bulunmuştur.

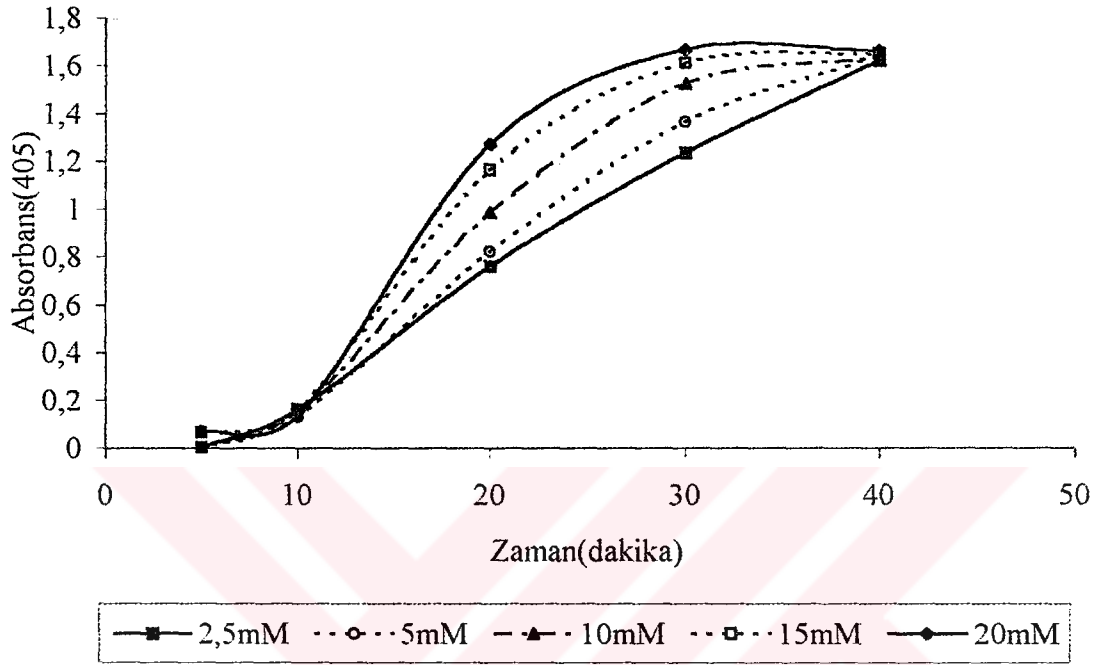
pNPP ile yapılan deneysel çalışma sonuçlarını da Tablo 4.15'de incelersek ;

Tablo 4.15 Substrat Konsantrasyonu Reaksiyon Süresi Değişimi (pNPP ile yapılan çalışma)

Zaman (dak)	2.5 mM	5.0 mM	10 mM	15 mM	20 mM
5	0.0016	0.0020	0.0028	0.0087	0.0032
10	0.0113	0.0221	0.1327	0.2718	0.1229
20	0.5617	0.6618	0.8219	0.8919	1.0345
30	1.1795	1.2386	1.5219	1.5765	1.5998
40	1.2119	1.2218	1.5321	1.5617	1.6186

Not: Değerler absorbans cinsinden verilmiştir.

Substrat konsantrasyonunun ve reaksiyon süresinin asit fosfataz üzerine etkisi grafik ortamında Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Konsantrasyon zaman değişimi (pNPP)

Deneyssel çalışmalarda uygulanan 30 dakikalık reaksiyon süresinde alınan sonuçlar 40 dakikalık sürede daha fazla aktivite verdiği için tercih edilebilir özelliktedir.

4.16 Asit Fosfatazın İnhibisyonu ve Aktivasyonu

Birçok kimyasal etmenler enzimin katalitik aktivitesini , aktive ya da inhibe edebilir. Substrat ve koenzimlerin yanısıra birçok enzim tam olarak aktif hale geçebilmek için protein olmayan, bazı hallerde de protein olan bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Aktive edici iyon , koenzim ya da kosubstrat ile kompleks oluşturarak direkt olarak reaksiyona katılabilir. Diğer durumlarda ise iyon enzimin bir parçasıdır ve aktif merkeze direkt olarak bağlanabilir.

İnhibitörler ya numuneden ya da reaktiflerden gelebilir. Substratların ve dönüşen ürünlerinin inhibitör etkileri oldukça iyi bilinmektedir. Katalitik aktivite üzerine substrat etkisi yüksek substrat konsantrasyonunun kullanımı ile sınırlandırılmaktadır.

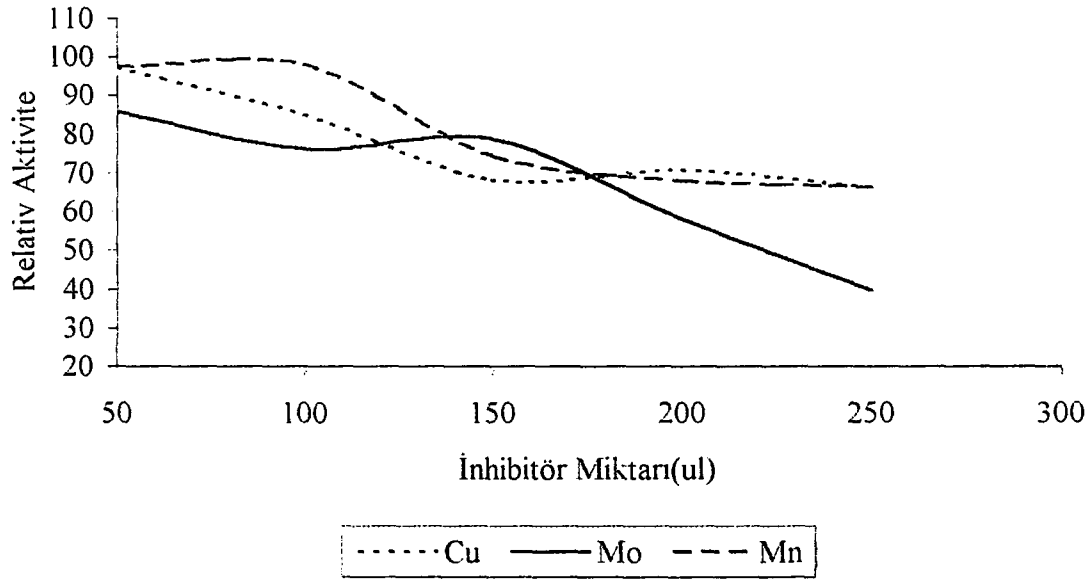
4.16.1 İnhibitör Etkisinin İncelenmesi

Asit Fosfataz enzimini en yüksek şekilde inhibe eden maddeler Cu ,Mo ,Mn dir.Buna göre 10^{-3} M olarak hazırlanan inhibitör çözeltilerinden tüplere 50 , 100 ,150 ,200 ve 250 mikrolitre konarak üzeri substratla 2,25 ml ye tamamlanır. 5 dakika 37°C de bekletilen çözeltiye 0,25 ml enzim ilavesi yapılır . 30 dakika reaksiyona tabi tutularak aktivite tayini yapılır[7].

Tablo 4.16 Asit Fosfataz Üzerine İnhibitör Etkisi

İnhibitör Miktarı (μl)	Relatif Aktivite (Cu)	Relatif Aktivite (Mo)	Relatif Aktivite (Mn)
50	97.26	85.72	97.31
100	84.95	76.15	97.85
150	68.15	78.62	74.29
200	70.63	58.01	67.99
250	66.21	39.62	66.25

Literatür çalışmaları incelendiğinde Mo ve Cu'nun asit fosfataz için iyi bir inhibitör olduğu saptanmıştır. Mn'in ise asit fosfataz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır[7,10,17]. Deneyisel sonuçları grafik üzerinde gösterirsek (Şekil 4.13) literatür ifadelerini daha net görebiliriz.



Şekil 4.13 İnhibitör Etkisi

Çalışmamızda, Tablo 4.16’da sunulan ve Şekil 4.13’de gösterilen değerler literatür çalışmalarını doğrulamaktadır. İnhibitör seçimi yapıldığında Mo’nın asit fosfataz için iyi bir inhibitör olduğu gözlenmiştir. Mo ve Cu Şekil 4.13’den de görüldüğü gibi iyi birer inhibitörken, Mn diğerlerine göre daha az , fakat yüksek oranda inhibe özelliğine sahiptir.

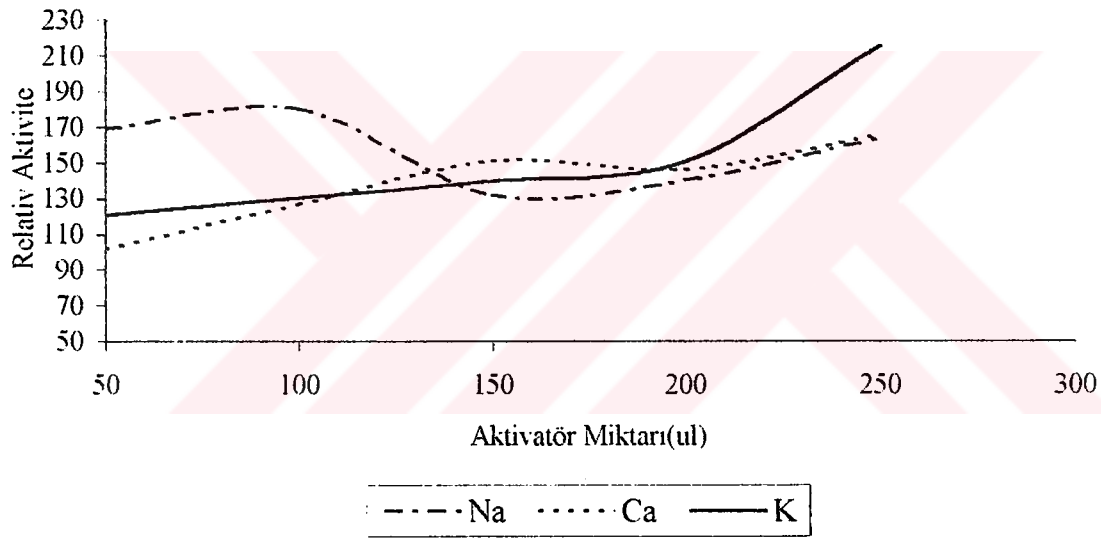
4.16.2 Aktivatör Etkisinin İncelenmesi

Asit Fosfataz enzimini en belirgin aktivatörlerinin başında Na , Ca ve K gelmektedir. İnhibitör etkisinin incelenmesine benzer şekilde bir deney takip edilerek aktivasyon durumu belirlenmiştir[17].

Tablo 4.17 Asit Fosfataz Üzerine Aktivatör Etkisi

Aktivator Miktarı (μl)	Relatif Aktivite (Na)	Relatif Aktivite (Ca)	Relatif Aktivite (K)
50	169.05	101.59	120.51
100	180.18	126.62	130.41
150	131.83	150.77	139.33
200	139.65	146.15	150.38
250	163.32	165.15	215.03

Tablo 4.17'deki değerleri grafik üzerinde gösterirsek Şekil 4.14'ü elde ederiz ve grafik üzerinde aktivator seçimini daha iyi tayin edebiliriz.



Şekil 4.14 Aktivator Etkisi

Aktivatorların tümüne bakıldığında düşük aktivator miktarlarında Na'nın , ancak yüksek aktivator miktarlarında ise K'nın uygun bir aktivator olduğu görülmüştür. Literatür çalışmalarında da K'nın asit fosfataz için iyi bir aktivator olduğu belirtilmektedir. Şekil 4.14'den görüldüğü gibi Ca ve Na'nın aktivasyon değerleri birbirine oldukça yakındır. Ca ve Na asit fosfataz enzimini yüksek oranda aktive etme özelliğine sahiptirler.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Laboratuvar ölçeğinde yapılan sarımsak filizinden asit fosfatazın kısmi saflaştırılması ve kinetik yapısının incelenmesi çalışmasında elde edilen sonuçlar ve gözlemler ışığında aşağıdaki genel yargılara varılmıştır:

1.Sarımsak filizinden elde edilen asit fosfatazın farklı reaksiyon sürelerinde ve farklı substrat konsantrasyonlarında aktivitesi ölçüldüğünde pNPP ve pNP ile çalışıldığında maksimum aktivitenin 20 mM 'da ve 30 dakika reaksiyonda elde edildiği gözlenmiştir.

2.Ekstraksiyon safhasında tampon çözelti olarak asetat tampon kullanılmıştır.Bu çözelti 5 mM olarak ve pH 'ı 5.5 olarak hazırlanmıştır.

3.Deneysel çalışmada , izolasyon ve kısmi saflaştırma sırasında ;

-Ham homojenat ile % 80 doyurulmuş çözeltinin aktivite oranları pNP kullanıldığında 14.4 kat iken pNPP kullanıldığında 17.48 kat artmıştır.

-Diyaliz işleminden sonra bu oranlar ham homojenata göre pNP ve pNPP ile sırasıyla 17.96 ve 20.70 kat olacak şekilde arttırılmıştır.

4.Bütün saflaştırma ve izolasyon işlemleri +4 C 'de yapılmıştır.

5.Enzim kararlılığı için optimum pH değerinin 5.5 ile 7.5 arasında olması gerekmektedir.

6.Saf enzim pH 6 'da maksimum aktiviteye ulaşmıştır.

7.Saf enzim 40 ile 60° C aralığında kararlılık göstermiştir.

- 8.Enzimin maksimum aktiviteye ulaştığı sıcaklık 50° C dir.
- 9.Sarınak filizinden elde edilen asit fosfatazda % 80 doyurma oranı (NH₄)₂SO₄ uzaklaştırılması için yeterlidir.
- 10.Enzim kinetiği incelendiğinde çok dşşşk enzim konsantrasyonlarında ve çok az reaksiyon sşrelerinde aktivite değerlerinin son derece dşşşk oluğu gşzlenmiştir.
- 11.Enzim konsantrasyonunun incelenmesi sonucu 1/10 oranındaki seyreltik enzim ile çalışması uygun bulunmuştur.
- 12.Substart konsantrasyon değerleri incelendiğinde maksimum aktivite veren 20 mM ile çalışmak uygun bulunmuştur.
- 13.Reaksiyon sşresi olarak 30 dakika uygun gşrşlmşştir. 5 dakika reaksiyon sşresi son derece kısa olduğundan aktivite değerleri dalgalı ve çok dşşşk elde edilmiştir.
- 14.Enzimin termal inaktivasyon sonuçlarına bakıldığında kararlılığı 40 ile 60° C olan enzim 65 , 67 ve 69° C 'ler de lineerlikten sapma gşstermiş ve bu da enzimin tek bir enzim olarak elde edilemediği fikrini doğurmuştur.
- 15.Çalışmada saptanan aktivasyon enerjileri değerlerinden gřrřldřęř gibi enzimin aktivasyon enerjisi 10 ile 20 kcal . arasındadır.
- 16.Enzimin inhibitşr durumuna bakıldığında Mo Cu ve Mn içinden en fazla inhibe ızelliği taşıyanın Mo olduğu bulunmuştur.
- 17.Aktivatşr etkisine bakıldığında Na ve K 'nın uygun aktivatşrler olduğu saptanmıştır.
- 18.Asit fosfataz enzimi için en iyi substrat pNPP olarak bulunmuştur.

19.Kinetik sabitlerden V_m ve K_m değerleri hesaplandığında pNPP için V_m değeri 100mM/sn K_m değeri ise 21.27mM olarak bulunmuştur.Aynı değerler pNP için ise sırasıyla 20 mM/sn ve 8.33 mM olarak hesaplanmıştır.



KAYNAKLAR

- [1] PRICE, N.C., STEVENS, L., Fundamentals of enzymology, Oxford, 1982
- [2] ÖZGEN, S., Hayvansal Kaynaklardan Ksantin Oksidaz İzolasyonu ve Saflaştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, 1996
- [3] GÜVENİLİR, Y., *Biyokatalizörler ve Karakterizasyonu Ders Notları*, İTÜ, İstanbul, 2000
- [4] YENİGÜN, B., Domates Filizinden Asit Fosfatazın Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, 2000
- [5] BERNHARD, S., The Structure and Function of Enzymes, W.A.Benjamin Inc., USA, 1968
- [6] ODABAŞ, H., POLATOĞLU, K., Domates Filizlerinden Asit Fosfataz Enziminin Kısmi Saflaştırılması, *Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, 2000
- [7] BROWN, H.W., Introduction to Organic and Biochemistry, 4th Ed., Brooks/Cole Pub.Co., Belmont, California, 1987
- [8] HOLLANDER, V.P., *The Enzymes*, Vol.4, Ed.by P.D. Boyer, Academic Press, NY, 1990
- [9] MARTIN, D.W., MAYES, P.A., RODWELL, V.W., Harper'ın Biyokimyaya Bakışı, 19. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1986
- [10] SAWADA, H., SHINODA, M., MARUYAMA, H., NAKAYAMA, T., *Studies on Human Prostatic Acid Phosphatase*, Chem. Pharm. Bull., Vol.29, 1981

- [11] NAKHLA, A.M., ROSNER, W., *Characterization of ALVA-41 Cells, A New Human Prostatic Cancer Cell Line*, Steroids, Vol.59, 1994
- [12] WISEMAN, A., *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Ed., 1985
- [13] GERHARTZ, W., *Enzymes in Industry, Production and Applications*, VCH Pub., Germany, 1990
- [14] BERGMEYER, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed., Vol.1, Fundamentals, Verlag Chemie GmbH, 1983
- [15] BANCHERO, J.T., Çev. ÇATALTAŞ, İ., *Kimya Mühendisliğine Giriş, Unit Operasyonlar*, İstanbul, 1973
- [16] SALOĞLU, D., RAMAZANOĞLU, İ., *Patates Kabuklarından Asit Fosfataz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması İşlemine Ortamın Etkisi, Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, 1998
- [17] BAZAROV, S., *Sarımsak Filizlerinden Asit Fosfatazın Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, 2000
- [18] SÖYLEMEZ, Z., FADİLOĞLU, S., *Laboratory Manual Enzyme Purification and Immobilization*, Gaziantep Üniversitesi, 1996
- [19] COLWICK, P., KAPLAN, O., *Methods in Enzymology*, Vol.1, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland
- [20] COLWICK, P., KAPLAN, O., *Methods in Enzymology*, Vol.2, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İstanbul'da doğdu.1993 yılında Yahya Kemal Beyatlı Lisesi'nden mezun oldu.1993 yılında girdiği İTÜ Kimya-Metalürji Fakültesi'ni 1998 yılında bitirerek Kimya Mühendisi unvanını aldı.1999 yılında İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Programı Temel İşlemler Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

