

17298

SAKKARUZUN
İNVERTAZ İLE HİDROLİZ KİNETİĞİNİN
VE İNVERTAZ DEAKTİVASYONUNUN İNCELENMESİ

Nursabah E. BAŞCI

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmenliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Ankara

Nisan - 1985

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

İşbu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Mühendisliği Anabilim dalında YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

G. Güny

Üye

Özgür Kaya

Üye

Arda Zeynep

O N A Y

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Avan İsmail

/ / 1985

Enstitü Müdürü

Aileme ...



Ö Z E T

Bu çalışmada, sakkarozun serbest maya invertazı ile hidrolizi kesikli düzende incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda, sıcaklığı, pH'ı ve karıştırma hızı denetlenebilen 400 ml. tepkime hacimli bir karıştırmalı kap kullanılmıştır. Kullanılan invertaz ekmek mayası (Bakers' Yeast) kökenli olup pH=4.5 ve T=55°C'da maksimum aktivite göstermektedir.

Sakkarozun hidrolizinde yüksek tepkiyen derişimlerinde (>0.29M. Sakkaroz) ortamdaki serbest su derişimindeki azalma ve tepkiyen inhibisyonu tepkime hızında düşmeye neden olmaktadır. Bu nedenle, bu iki etki önce ayrı ayrı ve daha sonra birlikte ele alınmış ve önerilen kinetik mekanizmalara göre türetilen tepkime hızı bağıntılarının deneysel değerler ile uyumlulukları tartışılmıştır. Tepkiyen inhibisyonu ve serbest su derişimi etkileri birlikte alındığında, en genel haliyle önerilen tepkime mekanizmasında yer alan kinetik sabitlerle ilgili bağıntılar, "Çoklu Doğrusal Regresyon Analizi" uygulanarak hesaplanmış ve bu değerlerden yararlanılarak klasik grafik çözümlene yöntemlerinin geçerlilik sınırları tartışılmıştır.

Kesikli düzende çalışıldığında enzim aktivitesi, işletme koşullarındaki (pH, sıcaklık, v.b.) deaktivasyonunun yanı sıra tepkiyen azalması ve/veya ürün inhibisyonundan da etkilenmektedir. İvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde bu üç etki bir arada görülmektedir. Bu nedenle, invertazın sadece işletme koşullarındaki deaktivasyonun saptanabilmesi amacıyla, sakkaroz azalması ve ürün (D-Fruktoz) inhibisyonu etkilerinin tepkime hızındaki düşmeye katkıları belirlenmiş ve bu etkilerin çıkartılmasıyla elde edilen gerçek enzim aktivitesi değerleri üstel deaktivasyon modelinde kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, 55°C sıcaklık ve pH=4.5'de, tepkiyen derişiminden bağımsız gerçek deaktivasyon sabiti $k_d=0.02417 \text{ dk}^{-1}$ ve invertaz aktivite yarı ömrü $\tau_{1/2}=29 \text{ dk.}$ olarak bulunmuştur.

T E Ő E K K Ü R

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında ortaya koyduğu yapıcı eleştirileri ve hazırladığı uygun çalışma koşulları ile bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan tez yöneticim sayın Yrd.Doç.Dr. Serdar S. ÇELEBİ'ye; araştırmalarım sırasında değerli yardımlarını benden esirgemeyen sayın Yrd.Doç. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ'a ve bu çalışma süresince her türlü araştırma olanağını sağlayan Kimya Mühendisliği Bölümü'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No:</u>
ÖZET.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. ENZİMLİ TEPKİME SİSTEMLERİ.....	4
2.1. Enzimler.....	4
2.1.1. Enzimlerin Yapısı.....	4
2.1.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri.....	5
2.1.3. Yakın Çevre İle Etkileşme.....	7
2.2. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği.....	9
2.2.1. Genel	9
2.2.2. Tek Tepkiyenli Enzim Tepkimelerinin Kinetiği.....	10
2.2.3. Hızlı Denge Yaklaşımı ve Michaelis-Menten Eşitliği.....	10
2.2.4. Yatışkın Durum Yaklaşımı ve Briggs-Haldane Eşitliği.....	13
2.3. İnhibisyon Kinetiği.....	15
2.3.1. İnhibitörler.....	15
2.3.2. İnhibisyon Türleri.....	16
2.3.3. İnhibisyon Türlerinin Saptanması.....	21
2.3.4. Tepkiyen ve Ürün İnhibisyonu.....	23
2.4. Enzimlerin Deaktivasyonu.....	25
2.4.1. Üstel Deaktivasyon Modeli.....	25
2.4.2. Tersİ Doğrusal Deaktivasyon Modeli.....	27
3. İNVERTAZ-SAKKAROZ SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ.....	29
3.1. Sakkaroz.....	29
3.1.1. Genel.....	29
3.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	29

	<u>Sayfa No:</u>
3.2. İvertaz.....	32
3.2.1. Genel.....	32
3.2.2. İvertaz Kaynakları.....	33
3.2.3. Maya İvertazı.....	34
3.2.4. İvertazın Etkinliğini Değiş- tiren Maddeler.....	36
3.2.5. İvertazın Uygulama Alanları..	37
3.2.6. İvertaz ile Sakkarozun Hidro- liz Kinetiği Konusunda Yapılan Çalışmalara Genel Bir Bakış...	37
4. SAKKAROZ HİDROLİZ SİSTEMİNİN TANIMLANMASI VE KİNETİĞİ.....	46
4.1. Genel.....	46
4.2. Su Derişimi ve Sakkaroz İnhibisyonu Etkileri Birlikte Alındığında Tepkime Kinetiği.....	47
4.3. İvertaz-Sakkaroz Sistemi Kinetik Sa- bitlerini İçeren Katsayıların Bulun- ması.....	49
4.4. Su Etkisi ve Ürün İnhibisyonu.....	51
4.5. İvertazın Deaktivasyonu.....	53
5. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ.....	57
5.1. Tepkime Sistemi ve Ortam Bileşimi.....	57
5.2. Deney Düzeneği.....	58
5.3. Deneyin Yapılışı.....	59
5.4. Kullanılan Aletler ve Maddeler.....	60
5.4.1. Kullanılan Aletler.....	60
5.4.2. Kullanılan Maddeler.....	61
5.5. İvertaz Çözeltisinin Hazırlanması....	62
5.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması..	62
5.6.1. Tepkiyen Çözeltisi.....	62
5.6.2. Diğer Çözeltiiler.....	62
5.7. Tepkime Hızlarının Saptanması.....	62

	<u>Sayfa No:</u>
6. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI.....	64
6.1. Genel.....	64
6.2. Sakkarozun Hidrolizinde pH Etkileri.....	65
6.3. Sakkaroz Hidrolizinde Sıcaklık Etkileri....	66
6.4. Sakkarozun Hidroliz Kinetiği.....	67
6.4.1. Michaelis-Menten Kinetiği.....	68
6.4.2. Su Derişiminin Michaelis-Menten Kinetiği'ne Etkisi.....	71
6.4.3. Sakkaroz İnhibisyonu.....	72
6.4.4. Su Derişimi ve Sakkaroz İnhibisyonunun Tepkime Hızına Birlikte Etkileri.....	74
6.5. Su Derişiminin Ürün İnhibisyonuna Etkisi...	82
6.6. İvertazın Deaktivasyonu.....	84
7. SONUÇLAR.....	91
8. ELEŞTİRİ VE ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR.....	100
EKLER.....	105
EK- I	
I.1. Su Derişimi Etkisi Dikkate Alındığında Michaelis-Menten Kinetiği.....	105
I.2. Sakkaroz İnhibisyonu Kinetiği.....	106
I.3. Çoklu Doğrusal Regresyon (Multiple Linear Regression) Analizi Bilgisayar Programı..	109
EK- II	
II.1. D-Glukoz Analiz Yöntemi.....	113
EK- III	
III.1. Sakkaroz Çözeltilerinin 55°C'daki Yoğunluklarının Ölçülmesi.....	115
III.2. Toplam Su ve Serbest Su Derişimlerinin Sakkaroz Derişimi İle Değişimi.....	116
III.3. Herhangi Bir Andaki Serbest Su Derişiminin Hesaplanması.....	117
III.4. Çoklu Doğrusal Regresyon Analizi İle Hesaplanan $[W_F] / r$ Değerleri ve Deneysel Değerlerden sapma oranları.....	118
III.5. İvertaz-Sakkaroz Sistemi İçin von-Neuman Testi Uygulaması.....	118
EK- IV	
IV.1. Deney Verileri.....	120

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No:

(2-1) : Linweaver-Burk doğrusu.....	15
(2-2) : Değişik inhibisyon türleri için 1/r kş. 1/[S] doğruları ve kesim noktaları...	22
(2-3) : Tepkiyen derişiminin başlangıç hızına etkisi.	23
(3-1) : Sakkaroz (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)- Fischer formülü.....	29
(3-2) : Sakkaroz (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)- Haworth formülü.....	30
(3-3) : İvertaz-sakkaroz arabileşğinin oluşumu.....	35
(3-4) : Sakkaroz derişiminin maya invertazının akti- vitesine etkisi.....	39
(3-5) : İvertaz için tepkiyen inhibisyonu mekaniz- ması.....	42
(4-1) : Tepkime hızının zaman ile değışimi.....	55
(5-1) : Deney düzeneğı.....	59
(6-1) : Başlangıç tepkime hızının pH ile değışimi....	65
(6-2) : Başlangıç tepkime hızının sıcaklıkla değışimi	66
(6-3) : Serbest invertaz için Linweaver-Burk grafiğı	69
(6-4) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değışimi (Michaelis-Menten kinetiğı).....	70
(6-5) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değışimi (Michaelis-Manten kinetiğı ve su derişimi etkisi).....	72
(6-6) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değışimi (Sakkaroz inhibisyonu etkisi)...	73
(6-7) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değışimi (Serbest su derişimi ve sakkaroz inhibisyonun birlikte etkisi).....	76
(6-8) : [W _F]/r'nin sakkaroz derişimi ile değışimi....	77
(6-9) : [W _F]/r kş. 1/Sakkaroz derişimi değışimi.....	81
(6-10) : Ürün İnhibisyonu.....	83
(6-11) : Tepkime hızının zamanla değışimi.....	86
(6-12) : Enzim aktivitesinin zaman ile değışimi.....	87
(6-13) : Gerçek ve görünür deaktivasyon sabitlerinin sakkaroz derişimi ile değışimi.....	88
(6-14) : İvertaz aktivitesinin zaman ile değışimi....	89

EK'LERDEKİ ŞEKİLLER

(II-1) : Çalışma doğrusu.....	114
(III-1) : Sakkaroz çözeltilerinin yoğunlukları (T=55°C).	116
(IV-1) : D-Glukoz-zaman değışimi.....	122

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa No:

(2-1) : Doğrusal inhibisyon türlerinin özellikleri.....	21
(3-1) : 20°C'da % 10'luk şeker çözeltilerinin bağlı tatlılıkları.....	30
(3-2) : Asit hidrolizinde tepkime tamamlanma süreleri.....	31
(3-3) : Maya β -Fruktosidazı ile oligosakkarit oluşumu.....	36
(3-4) : Değişik sakkaroz ve alkol derişimlerinde hidroliz hızları.....	40
(6-1) : Başlangıç tepkime hızının tepkiyen derişimi ile derişimi.....	67
(6-2) : Hesaplanan katsayılar ve t-oranları.....	75
(6-4) : İvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde yapılan ihmallerin $[W_F]/r$ değerine etkisi.....	79
(6-5) : Serbest invertaz için D-Fruktoz derişiminin K_{sg} 'ye etkisi.....	84
(6-6) : Görünür deaktivasyon sabitleri (k_{dg}).....	85
(6-7) : Gerçek deaktivasyon sabitleri (k_d).....	88

EK'LERDEKİ ÇİZELGELER

(III-1): Sakkaroz çözeltilerinin 55°C'daki yoğunlukları.....	115
(III-2): Sakkaroz çözeltilerinin toplam su ve serbest su derişimleri (T=55°C'da).....	116

S İ M G E L E R

a	: Enzim aktivitesi.
a_g	: Görünür enzim aktivitesi.
a_o	: Başlangıç enzim aktivitesi.
d	: Durbin-Watson katsayısı.
$[E]$, $[E]_t$: Herhangi bir andaki enzim derişimi (mol/lt.).
$[E]_o$: Başlanıç enzim derişimi (mol/lt.).
$[E_d]$: Deaktive olmuş enzim derişimi (mol/lt.).
$[F]$: D-Fruktoz derişimi (mol/lt.).
$[G]$: D-Glukoz derişimi (mol/lt.).
$[I]$: İnhibitör derişimi (mol/lt.).
K_s , K_m	: Hızlı denge ve yataşkın durum yaklaşımları ile Michaelis sabitleri (mol/lt.).
K_{sg}	: Görünür Michaelis Sabiti (mol/lt.).
K_i , K_t	: Enzim-inhibitör; Tepkiyen-enzim arabileşikleri için denge sabitleri (mol/lt, mol/lt.).
K_2 , K_t'	: Enzim-tepkiyen-tepkiyen arabileşigi için denge sabitleri (mol/lt., mol/lt.).
k	: Bağımsız değişken sayısı.
k_d , k_{dg}	: Gerçek ve görünür deaktivasyon sabitleri (dk^{-1} , dk^{-1}).
k_1 , k_{-1} , ..., k_{-i}	: İleri ve geri yöndeki tepkimeler için hız sabitleri.
k_2	: Ürün oluşum hız sabiti.
n	: Deney sayısı.
r	: Başlangıç tepkime hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz. lt.}^{-1} \text{ dk.}^{-1}$).
r_o	: Deaktivasyon çalışmalarında başlangıç tepkime hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz. lt.}^{-1} \text{ dk.}^{-1}$).
r_d	: Herhangi bir andaki tepkime hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz. lt.}^{-1} \text{ dk.}^{-1}$).
r_i	: Tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkileri altında ulaşılabilecek en yüksek tepkime hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz. lt.}^{-1} \text{ dk.}^{-1}$).
r_m	: Maksimum tepkime hızı ($\mu\text{mol Sakkaroz. lt.}^{-1} \text{ dk.}^{-1}$).

- $[S]$: Tepkiyen (Sakkaroz) derişimi (mol/lt.).
 v : v-Oranı
 $[W]$: Toplam su derişimi (mol/lt.).
 $[W_F]$: Serbest su derişimi (mol/lt.).
 $[W_F]_0$: Deaktivasyon çalışmalarında başlangıç serbest su derişimi (mol/lt.).
 $[W_F]_t$: Deaktivasyon çalışmalarında herhangi bir andaki serbest su derişimi (mol/lt.).
 $[W_S]$: Hidroliz tepkimesiyle tüketilen su derişimi (mol/lt.).
 $[W_S']$: Tepkimeye giren sakkarozun serbest bıraktığı su derişimi (mol/lt.).
 $[W]_0$: Su derişimi (mol/lt.).
 μ : Sakkaroz çözeltisinin özlülüğü (cP).
 μ_0 : Suyun özlülüğü (cP).
 $\tau_{1/2}$: Aktivite yarı ömrü (dk.).

1. GİRİŞ

Canlı sistemlerde oluşan tepkimelerin hemen hemen hepsi enzimler tarafından katalizlenir ve denetlenir. Bu tepkimelerin her biri için farklı ve özel enzim kullanılması nedeniyle bilinen enzim sayısı oldukça fazladır. Endüstriyel önemi bulunan pek çok tepkimenin, canlı sistemlerde çok daha kolay ve ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi enzimlerin endüstride kullanılabileceği düşüncesini doğurmuştur.

Düşük aktivasyon enerjisi gerektiren enzimler bu özellikleri nedeniyle düşük işletme sıcaklığı ve basıncında yüksek katalitik aktivite gösterirler. Ayrıca, yüksek tepkime özgüllüğü göstermelerinin doğal bir sonucu olarak, yan ürün oluşmaz veya çok az oluşur. Buna bağlı olarak, tepkime sonrasında ayırma işlemleri ya kullanılmaz ya da bu işlemler önemli bir yük getirmezler.

Enzimlerin endüstriyel olarak kullanılması henüz yaygınlaşmamıştır. Bu konuda karşılaşılan en önemli güçlükler; yüksek aktiviteli enzimin saf ve bol miktarda canlı dokudan ayrılabilmesi, aynı enzimin bir çok kez ve uzun süre aktivitesini yitirmeden kullanılma olanaklarının yaratılması ve geliştirilmesi, yapay enzimlerin geliştirilmesi ve endüstriyel ölçekte enzimatik tepkime kaplarının tasarımıdır. Çağdaş enzim bilimi bu konuda akılcı çözümlerin getirilebilmesi amacıyla tepkime kinetiği ve termodinamiği, polimer kimyası, mikrobiyal genetik gibi bilim dallarıyla yakın ilişkiye girmiştir. Saf ve yüksek aktivitede elde edilen enzimlerin geliştirilen tutuklama (immobilization) ve bağlanma yöntemleri yardımı ile sürekli sistemlerde, uzun süre aktivitelerini kaybetmeden kullanılabilmeleri enzimli tepkimelere ilgiyi arttırmıştır. 1960 yılına değin daha çok enzimin canlı dokudan ayrılması konusunda çalışan araştırmacılar, daha sonra enzim tepkimelerinin kinetiği ve mekanizmalarının aydınlatılması ve enzimlerin tutuklanması konularına yönelmişlerdir.

Sakkarozun asidik hidrolizi yüksek sıcaklıklarda ($\approx 70^{\circ}\text{C}$.) gerçekleştirilebilir. Yaklaşık % 7-8 D-Fruktoz kaybına neden olan bu hidroliz tepkimesi İvertaz enzimi ile 55°C !da herhangi bir ürün kaybına neden olmadan gerçekleştirilebilmektedir. İvertaz - sakkaroz sisteminin ele alındığı bu kinetik çalışmada serbest durumdaki maya invertazı kullanılmış ve hidroliz tepkimesi kesikli sistemde (batch system) incelenmiştir.

İvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde yüksek sakkaroz derişimlerinde ($> 0.29 \text{ M}$.) tepkiyen inhibisyonunun yanı sıra sakkaroz derişiminin artması sonucunda görülen serbest su derişimi azalması da, tepkime hızındaki düşmenin ikinci bir nedeni olabilir. Bu çalışmanın temel amaçlarından birisi, bu iki etkinin birlikte ele alınması, herhangi bir ampirik katsayı kullanımına gerek duyulmadan, önerilen kinetik mekanizmanın deneysel sonuçlarla uyumluluğunun sınanması ve tepkime mekanizmasında yer alan kinetik sabitlerin bölgesel çözümlmeye dayalı grafiksel analiz yöntemi kullanılmadan hesaplanmasıdır. Bu kinetik sabitlerin hesaplanmasında "Çoklu Doğrusal Regresyon (Multiple Linear Regression) Analizi"nden yararlanılmıştır. Bu çalışmanın ikinci ana amacı ise, kesikli düzende sadece işletme koşullarına bağlı olan gerçek enzim deaktivasyonunun saptanmasıdır. Bu amaç ile aynı enzim derişiminde gerçekleştirilen ürün inhibisyonu çalışmalarından yararlanılmış, tepkiyen derişimi ve ürün inhibisyonundan bağımsız deaktivasyon sabiti hesaplanmıştır.

Enzim kinetiğinde istatistiksel yöntemlerin kullanılması oldukça yenidir. İlk kez 1961 yılında Wilkinson (49) tarafından önerilen enzim kinetiğinde istatistiksel analiz kullanımı, günümüze dek araştırmacıların fazla ilgisini çekmemiştir. Oysa kinetik sistemlerin sayısal çözümlmeler ile incelendiği son araştırmalarda, değişik varsayımları içeren ve farklı tepkime koşullarında saptandığı için karşılaştırma olanağı olmayan grafiksel yöntem sonuçlarının

yeterli olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle, sadece daha doğru sonuçları değil aynı zamanda elde edilen sonuçların kesinliğini de belirleyen istatistiksel yöntemlerin kullanılması, enzim kinetiğinde önem kazanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada istatistiksel verilerin kullanımı ve değerlendirilmesi üzerinde önemle durulmuştur.



2. ENZİMLİ TEPKİME SİSTEMLERİ

2.1. Enzimler

Laboratuvar koşullarında ağır fizikokimyasal yöntemlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilen tepkimeler, biyolojik sistemlerde düşük sıcaklık ve çevre basıncında enzimler aracılığı ile kolaylıkla yürütülür ve denetlenir. Organizmalardaki değişmelerin böylesine hızlı ve kolay oluşu, bu tepkimelerin yaşam hızına uymasını ve canlılığın varoluşunu sağlamaktadır. Her biyokimyasal tepkime genellikle farklı bir enzim tarafından katalizlenir. Enzimler, katalizledikleri tepkimelerde tepkiyen (= substrat) ile sıkı bir ilişkiye girmelerine rağmen tepkime sonucunda değişmeksizin kalırlar.

Enzimler, hayvansal ve bitkisel dokulardan veya mikroorganizmalardan bilinen ayırma yöntemleri ile elde edilir ve saflaştırılırlar. Genellikle bu kaynaklardan biri aranan enzim için üretim açısından uygundur. Günümüzde, özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikroorganizma kökenlidir (23). Son yıllarda katalitik aktivite gösteren bazı polipeptidlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Örneğin, pepsin gibi bazı sentetik protein parçalayıcı enzimler sentezlenmiş fakat bu basit sentetik enzimlerin üretimi ve kullanımını yaygınlaştırılamamıştır(6).

2.1.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler, sarmal biçimde kıvrılmış, yüksek molekül ağırlıklı maddelerdir. İşlev ve biçimce birbirinden farklı iki kısımdan oluşurlar. Bunlardan birisi "Apoenzim", diğeri "Kofaktör" veya "Koenzim"dir. Koenzim enzime sıkıca bağlı ise "Prostetik Grup" adını alır (16).

Enzimlerin apoenzim kısmı protein moleküllerinden oluşmuştur ve protein yapısı enzimden enzime değişir. Proteindeki amino asitlerin dizilişleri ve türlerinin farklılığından kaynaklanan bu değişiklik enzimin özgülüğünü ve özelliğini sağlar. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez.

Kofaktörler, apoenzime bağlı ya da ayrı olabildikleri gibi organik veya inorganik yapıda da olabilirler. Kofaktörlerin molekül ağırlıkları apoenzime göre çok düşüktür. Kofaktörler yalnız olduklarında gerçek enzime göre çok düşük aktivite gösterebilirler. Gerçek enzim aktivitesi sadece kofaktör ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir (27).

Enzimler, yapılarında amino asite bağlı asidik ($-COOH$) ve bazik ($-NH_2$) grupları içerirler ve bu nedenle "Amfoterik" özellik gösterirler. Böylece, genellikle sulu ortamlardaki tepkimeleri katalizleyen enzimler için pH değeri aktivite açısından önem kazanır. Ayrıca, yapılarını oluşturan amino asitlerin bir kısmının hidrofilik ve diğer bir kısmının hidrofobik olmasına bağlı olarak enzimler "Amfipatik" özellik de gösterirler.

2.1.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri

Biyolojik tepkimeleri katalize eden enzimler biyolojik katalizörler olarak bilinirler. Doğal enzimler, molekül büyüklükleri nedeniyle kolloidal taneciklerdir. Yine aynı nedenle, mikro-heterojen katalizör olarak da adlandırılırlar.

Enzimlerin katalitik aktiviteleri katalizledikleri tepkimenin hızı saptanarak belirlenir ve enzim aktivitesi "turnover sayısı" ile verilir. Turnover sayısı, 1 mol. aktif enzim tarafından 1 dk.(ya da 1 sn.'de) ürüne dönüştürülen tepkiyenin mol sayısı olarak tanımlanır.

Enzim aktivitesinin tanımlanması için turnover sayısı yerine "enzim birimi"de kullanılabilir. Bir enzim birimi (1 E.U.) dakikada 1 μ mol tepkiyen katalizleyebilen enzimin mg.olarak miktarıdır. Enzim birimi genel olarak enzimin optimum pH ve sıcaklığında verilir.

Enzimler, sadece belirli ve özel tepkimeleri katalizlerler. Bu duruma, enzimlerin "Özgüllüğü (Spesifikliği)" denir. Tepkime özgüllüğü açısından enzimler dört gruba ayrılırlar:

a. Mutlak Özgüllük: Enzim yalnız ve yalnız bir tek tepkimeyi katalizler, dolayısıyla tek tepkiyene özgüdür. Örneğin, üreyi hidrolizleyen Üreaz ve süksinik asiti yükseltgeyen Süksinik dehidrojenaz enzimleri bu türden özgüllük gösterirler (16,27,37).

b. Grup Özgüllüğü: Enzim, yapısında belli bir grup bulunan tepkiyenle ilgili tepkimeleri katalizler. Protein parçalayan enzimlerin pek çoğu grup özgüllüğü göstermektedir (16,27,37).

c. Tepkime ya da Bağ Özgüllüğü: Bu gruptaki enzimler, belli bir tepkime türünü katalizler ve tepkiyen yapısında bulunan belli bir bağa özgüdür. Lipid bağı içeren organik esterlerin hidrolizini katalizleyen lipazlar bu tür özgüllüğe örnek oluştururlar (16,27,37).

d. Sterokimyasal Özgüllük: Enzim tepkiyenin stereokimyasal şekli üzerine etki yapıyorsa stereokimyasal özgüdür. Laktik dehidrojenaz, laktik asitin yükseltgenmesinde D-Laktik asite karşı katalitik aktivite göstermemesine karşın L-Laktik asit üzerine etki yapar (16,27,37). Aynı özellik arijinaz enzimi için de geçerlidir (37).

2.1.3. Yakın Çevre İle Etkileşme

Bütün kataliz sistemlerinde olduğu gibi, yakın çevre koşulları enzimli sistemlerde de çok önemlidir. Enzim sistemlerinde, ana tepkiyen, tepkime geriletici (inhibitör) ve hızlandırıcı (aktivatör) gibi maddelerin derişimleri sahip oldukları doğrudan bağlanma etkileri nedeniyle enzim aktivitesinde etkili olmaktadır. Ayrıca, enzimin iyonlaşma derecesini değiştiren ya da yapısal bozunmalara neden olan etkiler de enzim aktivitesini değiştirirler. Bunlar;

- a. pH,
- b. Sıcaklık,
- c. Akışkan kuvvetleri (Kayma gerilimi ve hidrostatik basınç),
- d. Işıma (ışık, ses, iyonizasyon ışınması)'dır.

Genel kural olarak, bu etkilerin yarattıkları bozunmalar normal çevre koşullarında tersinir, fakat bu koşullardan uzaklaşıldığında tersinmezdir. Bazı durumlarda, her iki tip bozunma birarada oluşabilir (27).

Hidrojen iyonu değişimi (pH), enzim aktif gruplarının iyonlaşmalarını doğrudan etkileyerek enzim aktivitesini değiştirir. Tepkime ortamına konulan enzimin ancak belli bir kesri aktif haldedir. Bu kesrin alabileceği en fazla değere karşı gelen hidrojen iyonu derişimi optimum pH değeri olacaktır. Bu değer, enzimden enzime farklılık gösteren asidik (karboksil) ve bazik (amino) grupların dağılımına bağlı olarak değişecektir. Optimum pH genelde 2-10 aralığındadır.

Enzimle katalizlenen tepkimelerde sıcaklık etkileri uzun yıllardan beri çalışma konusu olmuştur. Enzimatik tepkimenin hızı kararlı biçimde artan sıcaklıkla önce artar, daha sonra bir maksimum vererek azalır. Bu maksimuma karşı

gelen sıcaklık, optimum sıcaklık olarak bilinir ve bu değer enzimli tepkime sistemleri için tanımlayıcıdır.

Bu tür davranış, birbirinden farklı iki etkinin sonucudur. Bunlar, kataliz tepkimesi hızının sıcaklık artışıyla artması ve enzimin ısı deaktivasyonudur. Düşük sıcaklıklarda deaktivasyon toplam tepkime hızını etkilemeyecek düzeydedir. Fakat, sıcaklık arttıkça deaktivasyon önem kazanmaya başlar. Çok yüksek sıcaklıklarda enzim deaktivasyonun hızı tepkime hızını izlenemeyecek değerlere düşürebilir. Bazı enzimler, 50-60°C. gibi sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar. Ancak, genellikle, bu sıcaklıklarda enzimlerin çoğu deaktive olur ve böylece katalitik tepkime hızı hemen hemen sıfıra yaklaşır. Optimum sıcaklıkta bu iki etki birbirini dengeler.

Enzimin ısı deaktivasyonunun ihmal edildiği veya uygun bir düzeltmenin yapıldığı sıcaklıklarda, sıcaklığın katalitik tepkime hızına etkisi Arrhenius Yasası ile açıklanır. Michaelis-Menten Kinetiği'nde kullanılan özgül hız sabitleri, k_1 , k_{-1} ve k_2 'nin (Bkz. Bölüm : 2.2.3) sıcaklıkla değişimi bu yasa ile verilir (4,20,27).

Arrhenius Yasası;

$$k = A \exp (- E/RT) \quad \dots(2-1)$$

biçimindedir. Burada;

A : Sıklık Faktörü (Frequency Factor)

E : Aktivasyon Enerjisi,

R : Gaz Sabiti,

T : Sıcaklık (°K)'dir.

Katı veya çözülmüş haldeki proteinler artan sıcaklıkla denatüre olurlar. Bu sıcaklıklarda proteinin yapısında değişimler oluşur. Dikkate değer değişimler, genellikle,

45-50°C.aralığında gözlenir ve 55°C.da çok hızlıdır. Diğer taraftan, yüksek sıcaklık kısa süreli etkili ise denatürasyon tersinir olabilir. Protein yapısındaki enzimler de bu özelliklerin tümünü gösterirler. Yüksek sıcaklık nedeniyle ikincil (sekonder) ve üçüncül (tersiyer) yapılar bozulur, böylece enzim aktivitesini yitirir (deaktivasyon).

Enzimler, yüksek hidrostatik basınç (5000-10000 atm.) etkisi ile denatüre olabirler. Böyle yüksek basınçlar, ikincil ve üçüncül yapılarda kırılmalara neden olur. Aynı türden etki, α ve β ışınları, x ışınları, katot ışınları gibi değişik iyonizasyon ışınları veya ultraviyole ışınların taşıdıkları enerjinin soğurulması sonucunda da gözlenir. Ultrasonik dalgalarda ise, küçük bir değerde ses enerjisinin soğurulmasıyla bölgesel sıcaklık artışına bağlı denatürasyon gözlenebilir (20,27).

Enzim denatürasyonunda değişik kimyasal maddeleri (alkol, aseton v.b.)'in etkilerinin yanı sıra ortamda bulunan protein parçalayıcı enzimlerin etkileri de saptanmıştır.

Denatüre olmuş enzimde, çözünürlük, kristallenebilirlik, molekül ağırlığı, molekül biçimi gibi fiziksel özellikler değişir. Ancak, en fazla ve önemli değişim kimyasal kataliz aktivitesinde oluşur (27).

2.2. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği

2.2.1. Genel

Enzimlerin temel özellikleri, kimyasal tepkimelerin hızını etkilemelerine rağmen işlem sonunda tüketilmeden tepkime ortamında kalmalarıdır. Bütün katalizörler tepkiyenle önce bir arabileşik oluştururlar, sonra bu arabileşik katalizör ve ürün verecek biçimde yıkılır. Katalizlenen tepkime hızı tepkiyen kısıtlaması olmadığında kullanılan katalizör derişimi ile orantılıdır.

İleri ve geri yöndeki tepkime hızını aynı oranda etkileyen katalizör derişimi toplu dengeye katılmaz ve denge sabitini etkilemez (27).

2.2.2. Tek Tepkiyenli Enzim Tepkimelerinin Kinetiği

Enzim tepkimelerinin önemli bir kısmında birden fazla tepkiyen yer alır. Tek tepkiyenli enzim tepkimeleri biyolojik sistemlerde enderdir. Ancak, tek tepkiyenli tepkimelerle ulaşılan kinetik sonuçlar daha karmaşık sistemlere doğrudan uygulanabilir veya yeni kuramların geliştirilmesinde önemli çıkış noktaları oluşturabilir.

2.2.3. Hızlı Denge Yaklaşımı ve Michaelis-Menten Eşitliği

Bütün kataliz tepkimeleri, enzim tepkimeleri de dahil olmak üzere, bir arabileşik oluşumu ile ilerlerler. Arabileşğin oluşumu ve bozunması iki ayrı mekanizma ile gerçekleşebilir (27). Bunlardan birincisi;



ve ikincisi;



dir.

Burada;

E : Enzim,
 S : Tepkiyen,
 P : Ürün,
 ES: Enzim-tepkiyen arabileşiği,
 X : Diğer bir arabileşik,
 k_1, k_{-1}, k_2 : İlgili tepkimelerin özgül hız sabitle-
 ri'dir.

Henri 1903 yılında enzim katalizli tepkimelerde Eşitlik (2-2) ve Eşitlik (2-3)'ün geçerliliğini önermiş, Michaelis ve Menten ise bu önerme ile birlikte aşağıda belirtilen yedi temel varsayıma dayalı olarak genel tepkime hızı eşitliğini türetmişlerdir (39,47).

1. Enzim bir katalizleyicidir (1835-1837'de Berzelius tarafından önerilmiştir.).

2. Enzim ve tepkiyen enzim-tepkiyen arabileşiğini oluşturmak için hızla tepkime verirler (1902'de Brown tarafından önerilmiştir.).

3. Tek tepkiyen ve tek enzim-tepkiyen arabileşiği vardır ve enzim-tepkiyen arabileşiği serbest enzim ve ürün oluşturacak biçimde bozunur.

4. Enzim, tepkiyen ve enzim-tepkiyen arabileşiği dengededir, ayrıca ES'nin serbest enzim ve tepkiyene ayrışma hızı serbest enzim ve ürüne bozunma hızından daha hızlıdır.

5. Tepkiyen derişimi enzim derişiminden çok daha fazladır, böylece ES arabileşiğinin oluşumu tepkiyen derişimini değiştirmez.

6. Tepkime hızı ES arabileşiğinin serbest enzim ve ürüne bozunmasına bağlıdır.

7. Tepkime hızı başlangıç tepkime hızı olarak alınır ve böylece ters yöndeki tepkime hızı (k_{-2}) ihmal edilebilir.

Tepkimenin dengede olduğu düşüncesine dayalı olan bu varsayıma "Hızlı Denge Varsayımı" denir. Burada ayrışma sabiti (K_s),

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \dots (2-6)$$

gereği,

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \dots (2-7)$$

dir. Enzim için kütle denkliği ise,

$$[E] = [E]_o - [ES] \quad \dots (2-8)$$

olarak yazılabilir. Eşitlik (2-7) ve Eşitlik (2-8) birleştirilip gerekli düzenlemeler yapıldığında;

$$[E] = \frac{[E]_o}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad \dots (2-9)$$

ve

$$[ES] = \frac{[E]_o [S]}{K_s + [S]} \quad \dots (2-10)$$

elde edilir. Ürün oluşum hızı,

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad \dots (2-11)$$

dir. Eşitlik (2-10) Eşitlik (2-11)'de yerine konursa tepkime hızı için,

$$r = \frac{k_2 [E]_o [S]}{K_s + [S]} \quad \dots (2-12)$$

elde edilir. En yüksek tepkime hızı (r_m), aktif enzimin tümünün enzim-tepkimen arabileşiği oluşturduğu durumda gözlemlenir. Bu durumda;

$$[ES] = [E]_0 \quad \dots (2-13)$$

ve

$$r_m = k_2 [E]_0 \quad \dots (2-14)$$

dir. Eşitlik (2-12)'de gereken düzenleme yapıldığında

$$r = \frac{r_m [S]}{K_s + [S]} \quad \dots (2-15)$$

elde edilir. Bu eşitlik Michaelis-Menten Eşitliği olarak bilinir. Eşitlikte r_m maksimum tepkime hızı ve K_s Michaelis Sabiti'dir. Fiziksel olarak, K_s , en yüksek tepkime hızının (r_m) yarısını sağlamak için gerekli olan tepkiyen derişimi-dir, dolayısıyla enzimin "Doygunluk Derişimi" olarak ta adlandırılır. Tanımlanan deneysel koşullarda sabit olan K_s , genellikle pH, sıcaklık, iyon gücü gibi etkilerle değişir. Michaelis sabiti tepkiyen derişimi ile tepkime hızının nicel bağımlılığını belirleyerek, enzim için tanımlayıcı bir sabit olma özelliğini taşır.

2.2.4. Yatışkın Durum Yaklaşımı ve Briggs-Haldane Eşitliği

Michaelis ve Menten'in hızlı denge yaklaşımı ile türettikleri tepkime hızı eşitliği daha genel bir yaklaşımla Briggs ve Haldane (1925) tarafından yatışkın durum kine-tiği temelinde geliştirilmiştir. Bazı durumlarda, ES arabileşğinin serbest enzim ve tepkiyene ayrışma hızının, serbest enzim ve ürüne bozunma hızına yakın veya daha küçük olması bu türden bir yaklaşımı gerektirir (27,39).

Yatışkın durum varsayımına göre, ES arabileşğinin oluşum hızı tüketim hızına eşit, diğer bir deyişle ES arabileşğinin net üretim hızı sıfır olarak yazılabilir. Bu koşul, ES derişiminin tepkiyen derişiminden çok küçük olduğu başlangıç koşullarında geçerlidir.

$$\frac{d [ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad \dots(2-16)$$

Böylece

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \dots(2-17)$$

olmak koşulu ile ES derişimi için,

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad \dots(2-18)$$

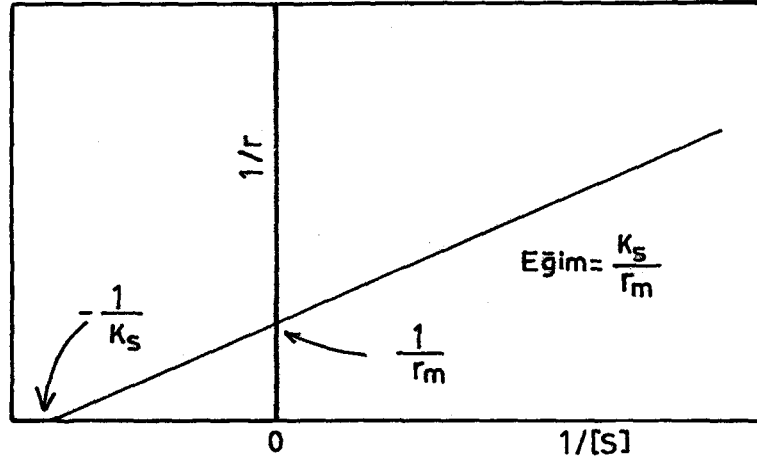
ve tepkime hızı için,

$$r = \frac{r_m [S]}{K_m + [S]} \quad \dots(2-19)$$

elde edilir. Eşitlik (2-6) ve (2-17)'den görüldüğü gibi K_m K_s farklıdır, ancak tepkime hız bağıntıları iki yaklaşım için de aynı biçimdedir. [Bkz. Eşitlik (2-15) ve (2-19)].

Enzim tepkimelerinin kinetiğinde hem hızlı denge ve hem de yatışkın durum varsayımlarında elde edilen başlangıç tepkime hızı tepkiyen derişimi ile doğrusal olmayan bir değişim gösterirler. Ancak $1/$ Başlangıç tepkime hızı ($=1/r$)'na kş. $1/$ Tepkiyen derişimi ($=1/[S]$) işaretlendiğinde bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi, apsis ve ordinat kesim noktaları kullanılarak maksimum tepkime hızı (r_m) ve K_s veya K_m hesaplanabilir. Lineweaver-Burk Doğrusu olarak adlandırılan bu doğru Michaelis-Menten eşitliği için aşağıdaki biçimdedir. [Şekil (2-1)].

$$\frac{1}{r} = \frac{K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{r_m} \quad \dots(2-20)$$



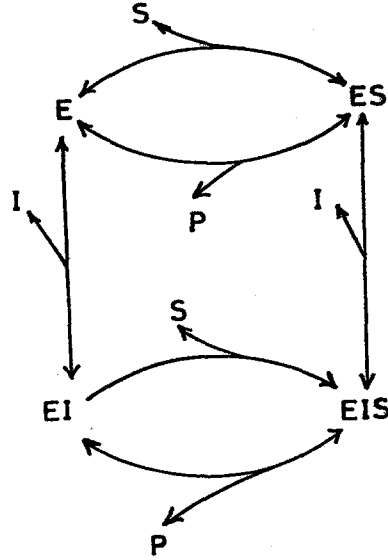
Şekil (2-1) : Lineweaver-Burk doğrusu

2.3. İnhibisyon Kinetiği

2.3.1. İnhibitörler

Tepkime ortamında bulduklarında, enzim katalizlediği tepkimenin hızını düşüren bileşiklere "inhibitör" denir. İnhibitörler, tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılırlar. Tersinmez inhibitörler enzim etkinliğini tümüyle yok eden maddelerdir, enzim kinetiği açısından fazla önem taşımazlar. İkinci tip inhibitörler ise enzimlerle arabileşik oluşturarak ya Michaelis Sabiti (K_s)'ni ya da maksimum tepkime hızı (r_m) değerini veya her ikisini de azaltıcı yönde etkiler.

Basit inhibisyon türlerinin tartışılmasında, Botts ve Morales tarafından önerilen mekanizmadan yararlanılır. (14). Bu mekanizma aşağıdaki biçimdedir:



Bu genel gösterimdeki altı tepkimede rol alan E,ES, EI ve EIS gibi dört temel bileşik vardır. Buradan, basit inhibisyon türlerine geçerken bazı tepkimeler yok sayılır. Böylece yarışmalı, sınırlı yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyon türlerine ulaşılır.

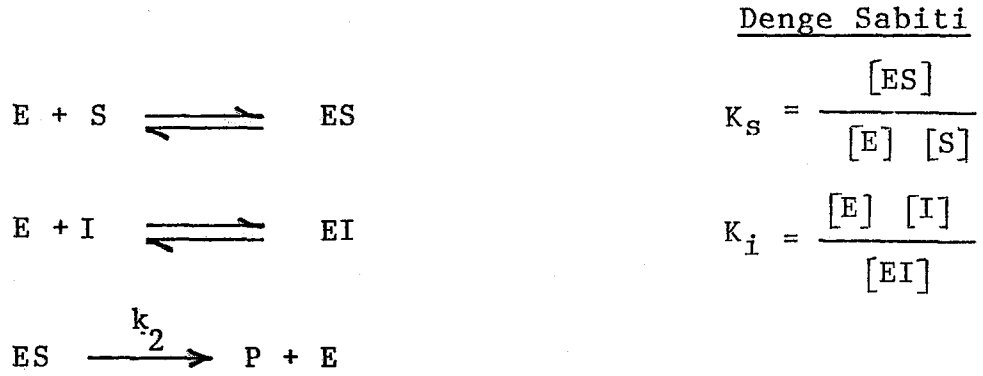
Bazı araştırmacılar, EI ve IE arabileşiklerinin farklı olduğunu; EI'da tepkiyenin bağlandığı bölgeye bağlanan inhibitörün IE'de farklı bir bölgeye bağlandığını ileri sürmektedirler. Bu farklılık, uygulamada yarar sağlamaz ve genel mekanizmada gereksiz karışıklıklar oluşturur. EIS arabileşiği için böyle bir farklılık söz konusu değildir, inhibitör ve tepkiyen enzimin farklı bölgelerine bağlanırlar (4,16,47).

2.3.2. İnhibisyon Türleri

a. Yarışmalı İnhibisyon (Competitive Inhibition)

Bu tip inhibisyonda, tepkiyen ve inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için yarışırırlar. Böylece, EI

arabilesiği enzim-inhibitör arabilesiği için söz sahibi olur. Yarışmalı inhibisyon kinetiğinde aşağıdaki tepkimeler geçerlidir (16,47).



Hızlı denge varsayımıyla, yarışmalı inhibisyon için hız bağıntısı;

$$r = \frac{r_{mg} [S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad \dots(2-21)$$

biçimindedir. Burada; I, serbest inhibitördür. Eşitlik Michaelis-Menten biçiminde yazılırsa,

$$r = \frac{r_{mg} [S]}{K_{sg} + [S]} \quad \dots(2-22)$$

elde edilir. r_{mg} ve K_{sg} inhibitör varlığındaki görünür (apparent) r_m ve K_s 'dir.

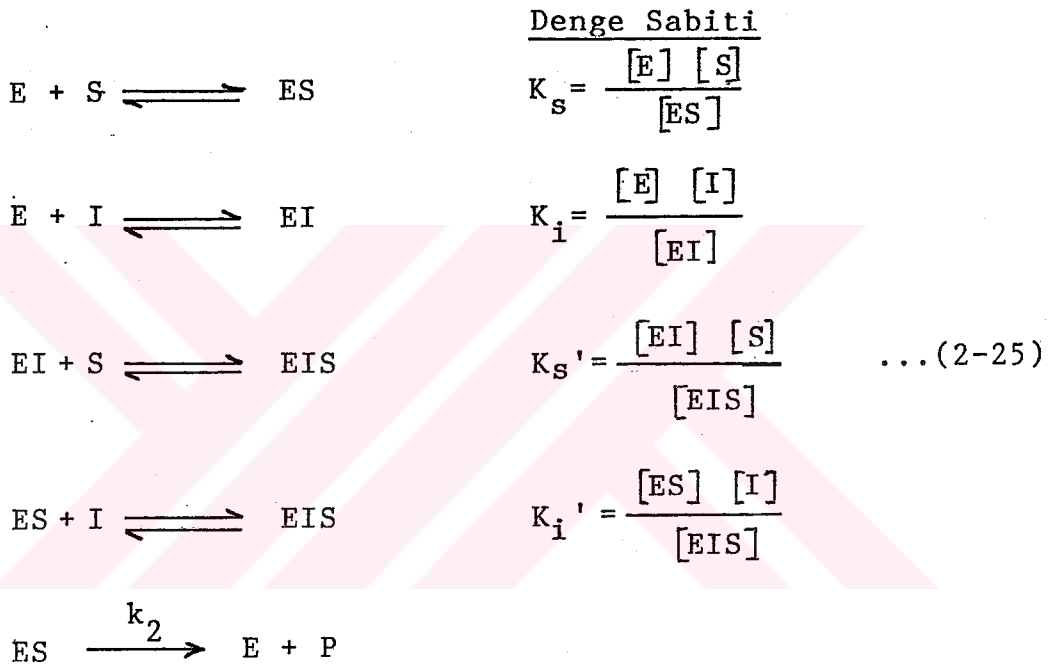
$$r_m = r_{mg} \quad \dots(2-23)$$

$$K_{sg} = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \dots(2-24)$$

dir.

b. Yarışmasız İnhibisyon (Non-Competitive Inhibition)

Bazı inhibitörler, ES arabileşiği oluşumunu etkilemezler ve böylece K_s değerini değiştirmezler. Ancak, r_m değeri küçülür. Bu durum, yarışmalı inhibisyonun karşıtıdır ve yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır. Yarışmasız inhibisyonda aşağıdaki tepkimeler geçerlidir (16).



Oluşan EIS arabileşiği ürün oluşturmadığı için ürün oluşum hızı, sadece ES arabileşiğinin ayrışma hızına bağlıdır. Enzim, EI biçimindeyken tepkiyene karşı ilgisinin değişmemesi nedeniyle $K_s = K_s'$ alınabilir. Aynı durum ES için de geçerlidir ve $K_i = K_i'$ alınabilir.

Yarışmasız inhibisyon için hızlı denge varsayıldığında tepkime hızı

$$r = \frac{r_m [S]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \dots (2-26)$$

şeklindedir, ve

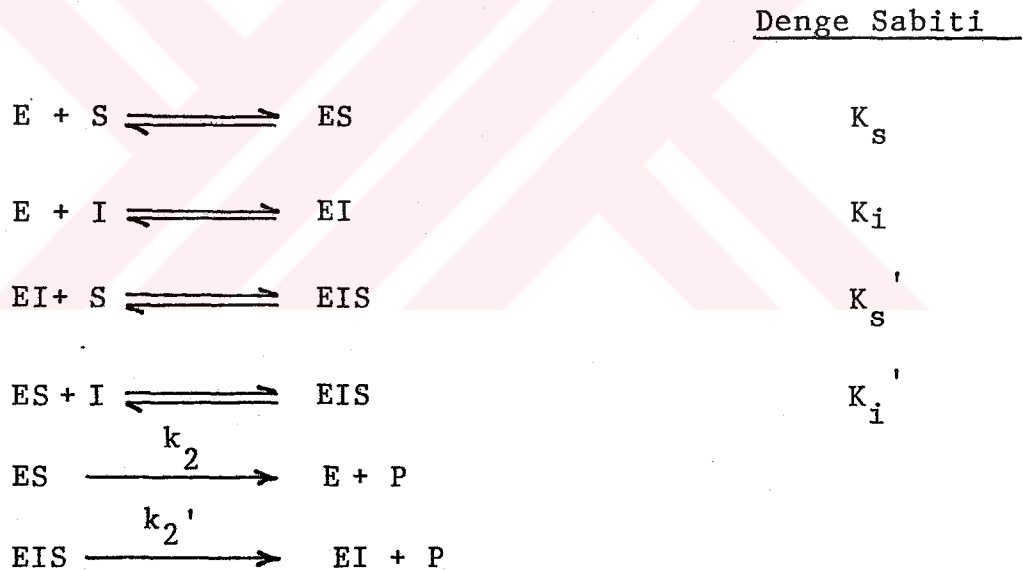
$$K_{sg} = K_s \quad \dots (2-27)$$

$$r_{mg} = \frac{r_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \dots (2-28)$$

dir.

c. Karışık İnhibisyon (Mixed Inhibition)

İnhibitör etkisiyle, hem K_s hem de r_m değişiyorsa, bu tür inhibisyona karışık inhibisyon denir. Enzim, substrat ve inhibitör etkileşimleri aşağıdaki biçimdedir (16).



Bu tepkimelerde inhibisyon türünün özelliğinden dolayı, $K_s = K_s'$, $K_i = K_i'$ ve $k_2 = k_2'$ alınamaz. EIS arabileşiminin ayrı-şarak ürün vermediği varsayılırsa, ürün oluşum hızı $r = k_2 [ES]$ olur. Hızlı denge varsayımıyla tepkime hızı,

$$r = \frac{r_m}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s}{K_i} \frac{[I]}{[S]} + \frac{[I]}{K_i'}} \quad \dots (2-29)$$

dir. Eşitlik Michaelis-Menten biçiminde yazılırsa,

$$r = \frac{\frac{r_m}{(1 + [I]/K_i)}}{\left[K_s (1 + [I]/K_i) / \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right) \right] + [S]} \quad \dots (2-30)$$

Bu durumda,

$$r_{mg} = r_m / \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad \dots (2-31)$$

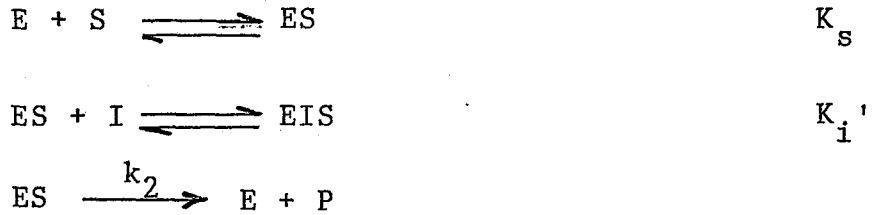
$$K_{sg} = \frac{K_s (1 + [S]/K_i)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right)} \quad \dots (2-32)$$

dir.

d. Sınırlı Yarışmalı İnhibisyon (Un-competetive Inhibition)

Bu tür inhibisyonda, enzim-inhibitör arabileşegi oluşmaz, ancak inhibitör ES arabileşigi ile bağlanır. İnhibisyon için aşağıdaki tepkimeler geçerlidir (16) :

Denge Sabiti :



Hızlı denge varsayımı ile tepkime hızı,

$$r = \frac{r_m}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[I]}{K_i'}} \quad \dots (2-33)$$

dir. Bu eşitlikte,

$$r_{mg} = \frac{r_m}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \quad \dots (2-34)$$

ve

$$K_{sg} = \frac{K_s}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \quad \dots (2-35)$$

dır.

$1/r$ k.ş. $1/[S]$ doğrusunun eğimi, inhibitör derişiminden bağımsızdır ve K_s/r_m sabit değerdedir. Eşitlik (2-29) Eşitlik (2-33) ile karşılaştırıldığında, sınırlı yarışmalı inhibisyonun, K_i' 'nin sonsuz değeri için karışık inhibisyonun bir asimptotik durumu olduğu görülür (4, 16).

2.3.3. Inhibisyon Türlerinin Saptanması

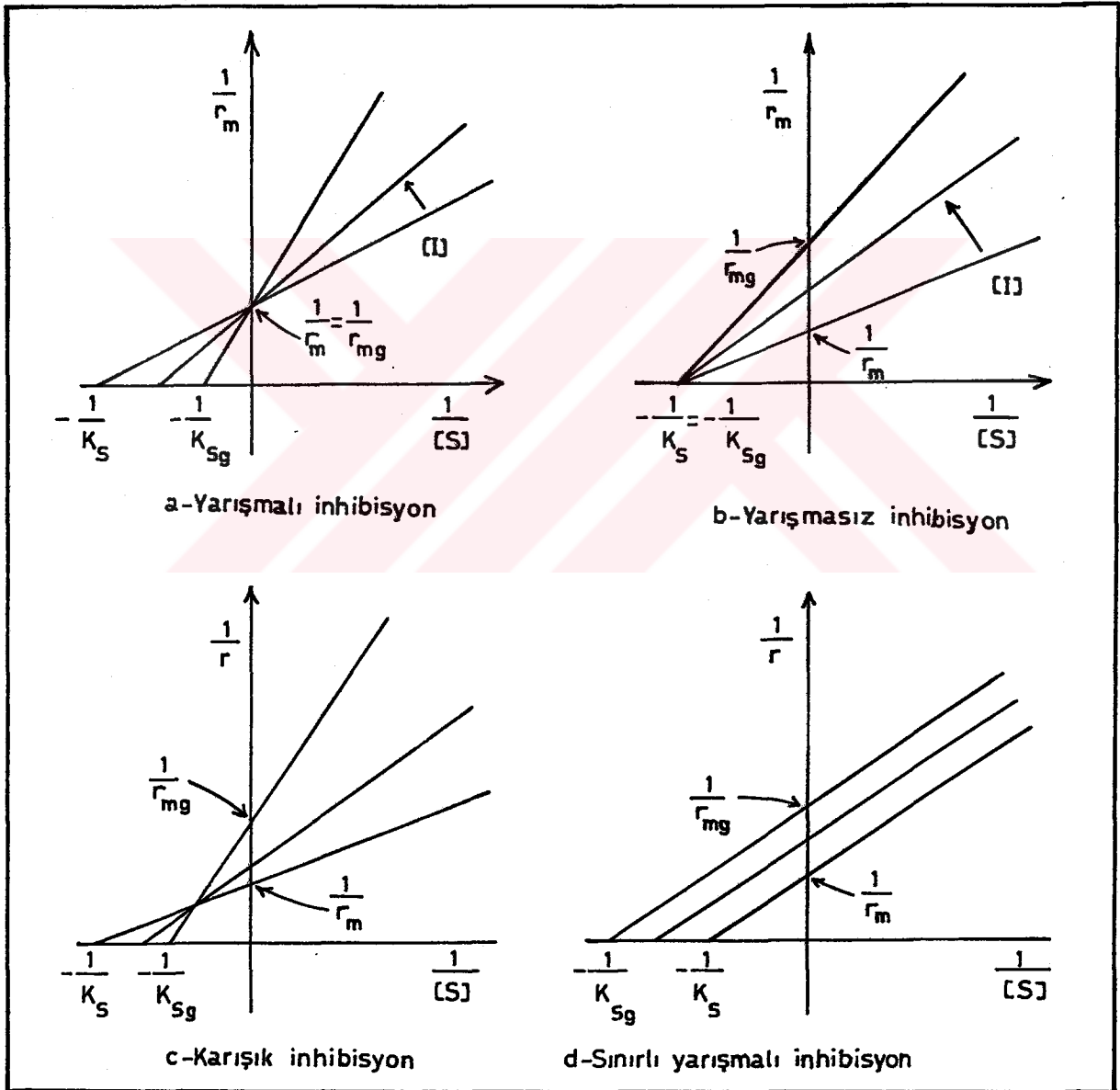
Yarışmalı, yarışmasız, karışık ve sınırlı inhibisyon türleri, doğrusal inhibisyon türleri olarak bilinir. Çünkü, $1/r_{mg}$ ve K_{sg}/r_{mg} değerlerinin inhibitör derişimiyle değişimi doğrusaldır. Doğrusal inhibisyon türlerinin özellikleri Çizelge (2-1)'de verilmiştir (4,16)

Çizelge (2-1) : Doğrusal İnhibisyon Türlerinin Özellikleri

İnhibisyon Türü	r_{mg}	* K_{sg}/r_{mg}	K_{sg}
Yarışmalı İnhibisyon	r_m	$\frac{K_s (1 + [I]/K_i')}{r_m}$	$K_s (1 + [I]/K_i')$
Yarışmasız İnhibisyon	$\frac{r_m}{1 + K_i' [I]}$	$\frac{K (1 + [I]/K_i')}{r_m}$	K_s
Karışık İnhibisyon	$\frac{r_m}{1 + [I]/K_i'}$	$\frac{K_s (1 + [I]/K_i')}{r_m}$	$\frac{K_s (1 + [I]/K_i')}{1 + [I]/K_i'}$
Sınırlı Yarışmalı İnhibisyon	$\frac{r_m}{1 + [I]/K_i'}$	$\frac{K_s}{r_m}$	$\frac{K_s}{1 + [I]/K_i'}$

* Bu değer $1/r$ kş. $1/[S]$ grafiğinin eğimidir.

Ortamda inhibitör varken saptanan r_{mg} ve K_{sg} değerleri inhibisyon türleri hakkında bilgi verir. Eğer $r_{mg} = r_m$ ise yarışmalı inhibisyon, $K_{sg} = K_m$ ise yarışmasız inhibisyon vardır. K_{sg} ve r_{mg} değerleri inhibitörsüz duruma göre değişmiş ise, karışık veya sınırlı yarışmalı inhibisyon vardır. Bunların tümünde doğruların kesişme noktalarına göre kadar verilir. Şekil (2-2)'de, inhibisyon türleri için doğruların birbirleriyle ve eksenle kesim noktaları görülmektedir. Genellikle,

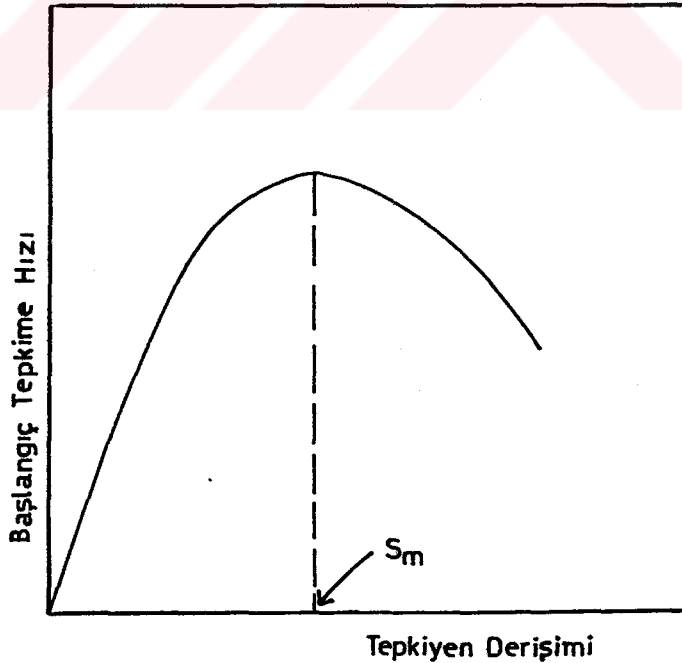


Şekil : (2-2) Değişik inhibisyon türleri için $1/r$ kş $1/[S]$ doğruları ve kesim noktaları.

sabit-inhibitör derişimlerinde çizilen $1/r$ kş. $1/[S]$ doğrularının kesim noktalarına bakılarak inhibisyon türü saptanır. Örneğin, yarışmalı inhibisyonda doğrular $1/r$ ekseninde aynı noktada kesişirlerken, karışık inhibisyonda doğrular bu eksenin dışında bir noktada kesişirler. Sınırlı yarışmalı inhibisyonda, eğim sabit K_s/r_m olduğundan doğrular birbirine paraleldir (16). İnhibisyon türleri için verilen bu genel kinetik bağıntılar ve grafikler tepkiyen ve inhibitörün çözünür olduğu homojen ortamlar için geçerlidir.

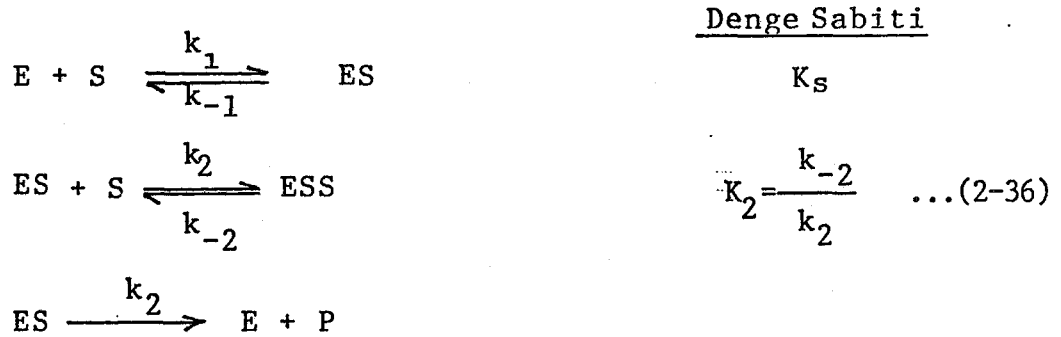
2.3.4. Tepkiyen ve Ürün İnhibisyonları

Bazı enzim tepkimelerinde, yüksek tepkiyen derişimlerinde, enzim aktivitesinin azaldığı görülür. Bu davranışa "Tepkiyen İnhibisyonu" denir. Bu durumda deneysel olarak elde edilen en yüksek başlangıç hızına karşı gelen tepkiyen derişimi (S_m)'nden yüksek tepkiyen derişimlerinde başlangıç tepkime hızının azaldığı gözlenir. Şekil (2-3) bu değişimi nitel olarak göstermektedir.



+
Şekil (2-3): Tepkiyen derişiminin başlangıç hızına etkisi

Tepkiyen inhibisyonu, Michaelis-Menten hızlı denge yaklaşımı ile açıklanabilir. Kabul edilen mekanizma, ikinci bir tepkiyen molekülünün ES arabileşiğine bağlanmasına dayanır (4). Önerilen tepkime basamakları aşağıdaki biçimdedir.



Bu durumda, enzim için kütle denkleği;

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESS] \quad \dots(2-37)$$

dir. Bu denklik ve denge sabitleri dikkate alınarak yapılan işlemler sonucunda tepkime hızı için,

$$r = \frac{r_m K_2 [S]}{[S]^2 + K_2 [S] + K_s K_2} \quad \dots(2-38)$$

bağıntısı elde edilir.

Bazı tepkimelerde ürün derişimide belli bir değerden sonra tepkime hızını düşürücü işlev görür. Bu durumda, ürün inhibitör olarak alınır ve ürün derişimi parametre alınarak inhibisyon türü saptanır. İnhibisyon türünün saptanmasından sonra kinetik sabitler önerilen mekanizmaya göre hesaplanır. (İnhibisyon türünün saptanması ile ilgili ayrıntılı bilgi Bölüm: 2.3.2 ve 2.3.3'de verilmiştir.)

2.4. Enzimlerin Deaktivasyonu

Enzimler tepkime sırasında zamanla aktivitelerini yitirirler. Kimyasal katalizörlere benzer biçimde deaktive olan enzimler daha da duyarlıdırlar. Enzimlerin deaktivasyonu ürün inhibisyonu, enzim zehirlenmesi ve enzim denatürasyonu gibi nedenlerle oluşabilir. Enzim zehirlenmesi aktif bölgelerin bazı bileşiklerle tersinmez tepkime vermesi sonucunda görülür. Enzim denatürasyonu ise, işletme koşulları nedeniyle enzim molekül yapısında oluşan değişmelere bağlıdır. Böylece, aktif bölge derişimi hızla azalır. pH ın, sıcaklığın ve karıştırmanın neden olduğu katalitik aktivite kaybı bu türdendir. Çünkü, deaktivasyon enzime katalitik aktivitesini kazandıran sarmal ve üçüncül (tersiyer) yapıların bozunmasından ileri gelmektedir.

Sabit sıcaklık ve pH'da yürütülen bir tepkimede, enzim deaktivasyon hızı tepkiyen ve ürün derişiminden bağımsız ise deaktivasyon için üstel deaktivasyon (exponential deactivation) ve tersi doğrusal deaktivasyon (inverted linear deactivation) modelleri kullanılabilir (13, 17).

2.4.1. Üstel Deaktivasyon Modeli

Enzim derişimine göre, birinci dereceden olan bu modelde aktif enzim derişiminin deaktivasyonla derişimi aşağıdaki biçimde verilir (13):

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d [E] \quad \dots (2-39)$$

Burada, k_d enzim deaktivasyonu hız sabiti'dir ve sıcaklığa Arrhenius tipi bir bağıntı ile bağlıdır.

Enzim aktivitesi (a), herhangi bir andaki tepkime hızının başlangıç tepkime hızına oranı olarak tanımlanır. Özgül tepkime hız sabitinin tepkime süresince başlangıçtaki değerini koruduğu düşünülürse enzim aktivitesi, herhangi bir andaki aktif enzim derişiminin tepkime başlangıcındaki enzim derişimine oranı olarak da alınabilir. Diğer bir deyişle;

$$\frac{r_t}{r_o} = \frac{[E]_t}{[E]_o} = a \quad \dots (2-40)$$

dir. Burada, "t indisi" herhangi bir an, "o indisi" başlangıç koşulları için kullanılmıştır. Eşitlik (2-40) Eşitlik (2-39)'da yerine konursa deaktivasyon hızı için,

$$-\frac{da}{dt} = k_d a \quad \dots (2-41)$$

denkliği elde edilir. Bu eşitliğe göre,

$$a = a_o e^{-k_d t} \quad \dots (2-42)$$

veya

$$\ln \frac{a}{a_o} = -k_d t \quad \dots (2-43)$$

dir. a_o enzimin başlangıç aktivitesidir. Tepkimenin yürütüldüğü koşullarda enzim kararlılığı, işletme kararlılığı (operational stability) olarak bilinir. İşletme kararlılığının ölçüsü, enzimin "Aktivite Yarı Ömrü ($Z_{1/2}$)"dür ve enzimin başlangıç aktivitesinin yarıya düşmesi için geçen zaman olarak tanımlanır. Eşitlik (2-43)'den aktivite yarı ömrü için,

$$Z_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad \dots (2-44)$$

bulunur.

2.4.2. Tersi Doğrusal Deaktivasyon Modeli

Bu modele göre, enzim deaktivasyonu enzim derişimi cinsinden aşağıdaki biçimde yazılabilir (13),

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + k_d t} \quad \dots (2-45)$$

Üstel deaktivasyon modelinde anlatılan düzenlemeler bu model için de uygulanabilir ve deaktivasyon için,

$$a = \frac{a_0}{1 + k_d t} \quad \dots (2-46)$$

bağıntısı elde edilir.

Bu model, küçük k_d değerlerinde ve kısa zaman aralıklarında gerçekleştirilen çalışmalar için üstel deaktivasyon modeli ile çakışır. Çünkü,

$$e^{-k_d t} = \frac{1}{e^{k_d t}} = \frac{1}{1 + k_d t + k_d \frac{t^2}{2} + k_d \frac{t^3}{6} + \dots} \quad \dots (2-47)$$

veya

$$e^{-k_d t} = \frac{1}{1 + k_d t} \quad \dots (2-48)$$

olarak yazılabilir.

Bu model için aktivite yarı ömrü, $\tau_{1/2} = \frac{1}{k_d}$ olarak bulunur.

Bu iki model, enzim deaktivasyonunun tepkiyen derişimine bağlı olmadığı veya sabit tepkiyen derişimlerinde geçerlidir. Sürekli sistemlerde tutuklanmış enzimlerle çalışırken tepkiyen derişimi sabit tutulabilir ve her iki model uygulanabilir. Kesikli kaplarda ise, kısıtlayıcı olmayan tepkiyen derişimlerinde ve kısa zaman aralıklarında çalışılarak bu şartlar sağlanır.

Deaktivasyon hız sabiti tepkiyen derişiminin bir fonksiyonu olduğunda, George enzim derişimi için aşağıdaki eşitliği yazmıştır (17).

$$-\frac{d[E]}{dt} = \left[\frac{a[S]}{b + [S]} + c[S][E] \right] \quad \dots (2-49)$$

Bu eşitlik Altomare (2) ve O'Neill (33) tarafından tepkiyen hidrojenperoksitin deaktive ettiği tutuklanmış katalaz için tepkime kabı tasarımında kullanılmıştır. Düşük hidrojenperoksit derişimlerinde ($[S] \ll b$) Eşitlik (2-49) aşağıdaki biçime dönüşür:

$$-\frac{d[E]}{dt} = -k_d [E][S] \quad \dots (2-50)$$

ve bu eşitlik Altomare tarafından tutuklanmış kataliz için uygulanmıştır (2,3).

3. İNVERTAZ-SAKKAROZ SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ

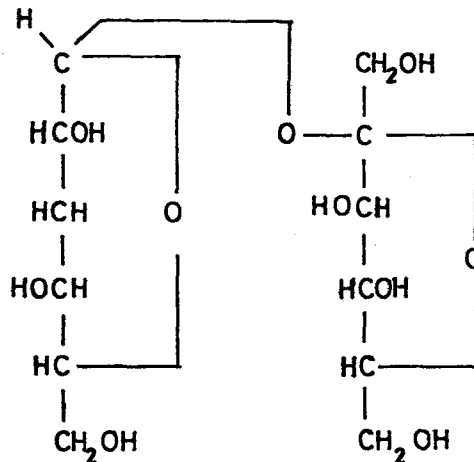
3.1. Sakkaroz

3.1.1. Genel

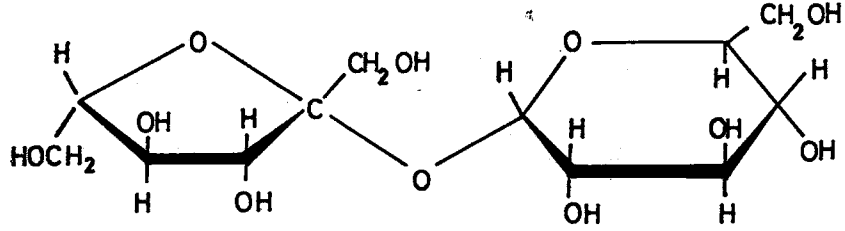
Ticari olarak şeker adıyla bilinen sakkaroz kimyasal olarak α - D - glukopranozil- β - D - fruktofuransit'tir ve kapalı formülü $C_{12} H_{22} O_{11}$ 'dir. Sakkaroz, bölgelere bağlı olarak şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.)'ndan veya şeker pancarı (*Beta vulgaris*)'ndan elde edilir. Süpürge darısı (*Sargum vulgare*) ve akağaç (*Accer saccharum*)'dan da sakkaroz elde edilebilir. Bu iki şeker kaynağı daha çok şeker şurubu elde etmek için kullanılır, ne süpürge darısı ne de akağaç şeker üretiminde ticari önem taşımaz (36,40). Sakkaroz bütün kara bitkilerinin özsularında, tohumlarında, çiçeklerinde, dallarında ve köklerinde vardır.

3.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

D-Fruktoz ve D-Glukoz'un glukozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan sakkaroz bir disakkarittir. Sakkarozun Fischer ve Haworth formülleri aşağıda verilmiştir.



Şekil (3-1): Sakkaroz ($C_{12} H_{22} O_{11}$)-Fischer formülü.



Şekil (3-2) : Sakkaroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$)-Haworth formülü.

Sakkaroz suda yüksek oranda çözünür. Seyreltik etil alkol ve amonyakta da çözünmesine karşın susuz alkol, eter, kloroform ve susuz gliserolde çözünmezdir. $184^{\circ}C$ 'de yumuşar ve bir kısmı dekompoze olarak (bozunarak) erir. Bu bozunma sonunda ketonlar ve diğer karbohidratlar oluşur. Sakkarozun özgül ağırlığı, $d=1.58056$, yüzey enerjisi 224 erg/cm^2 'dir.

Sakkarozun önemli bir fiziksel özelliği de tatlılığıdır. Tatlılık karşılaştırmasında sakkaroz standart alınır. Çizelge (3-1)'de sakkaroz ve diğer şekerlerin bağıl tatlılıkları verilmiştir.

Çizelge (3-1): $20^{\circ}C$ 'da % 10'luk şeker çözeltilerinin bağıl tatlılıkları (36).

Fruktoz	120	Galaktoz	67
Sakkaroz	100	Mannitol	64
Gliserol	77	Laktoz	39
Glukoz	69		

Sakkarozun iki önemli kimyasal özelliği vardır:

a. α - D -Glukoz ve β -D-Fruktoz bir molekül su ayrılması ile birleşirken bu iki monosakkarittin serbest haldeki karbonil grupları asetal bağı oluştururlar; bu nedenle de sakkaroz indirgeyici özellik göstermez.

b. Sakkarozun verdiği en önemli tepkime, hidroliz tepkimesidir. Glukozidik bağ, seyreltik alkali ve nötr çözeltilerde kararlıdır. En fazla kararlılık pH 9'dadır. Sakkaroz, hidrojen iyonu, amonyum iyonu ve katalitik aktivite gösteren enzim (invertaz)'in varlığında kolaylıkla hidroliz olur. Sonuçta ürün olarak 1/1 (mol. ce) oranında D-Glukoz ve D-Fruktoz dan oluşan indirgenmiş şekerler karışımı (invert şeker) oluşur.

Asit hidrolizi ile invert şeker üretildiğinde % 7-8 oranında D-Fruktoz kaybı söz konusudur. Fruktoz, fruktodianhidritler biçiminde kaybedilir. Enzimatik hidrolizde bu türden bir fruktoz kaybı söz konusu değildir. Aşağıdaki çizelgede, genel olarak, sakkarozun asit hidrolizinde tepkime tamamlanma süreleri verilmiştir:

Çizelge (3-2): Asit Hidrolizinde Tepkime Tamamlanma Süreleri (40).

Sıcaklık °C	% 99.99 Sakkaroz Dönüşümü İçin Gerekli Zaman		
	0.01N HCl	0.1N HCl	0.795 N HCl
20	3511 sa.	328 sa.	30.8 sa.
25	1673 sa.	156 sa.	14.6 sa.
30	818 sa.	76 sa.	7.1 sa.
35	409 sa.	38.2 sa.	3.5 sa.
40	209 sa.	19.3 sa.	106.0 dk.
50	58 sa.	5.4 sa.	29.3 dk.
60	17.5 sa.	1.6 sa.	8.7 dk.
70	5.6 sa.	31.4 sa.	2.76 dk.
80	2.02 sa.	11.3 dk.	
90	0.74 sa.		

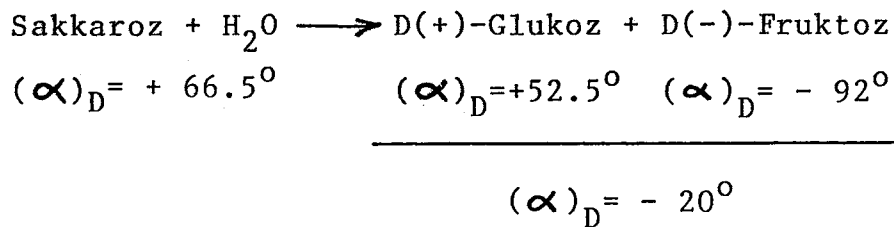
3.2. İnvertaz

3.2.1. Genel

Hidroliz enzimlerinin alt grubu olan karbohidrazlardan invertaz çok eski yıllardan beri bilinir. İlk defa Dumas ve Bouley (1828) mayaların sulu ortamda sakkarozu hidrolizlediklerini görmüş ve daha sonra Persoz (1833) mayanın inversiyon özelliğini saptamıştır. Enzimin hücreden özütlenmesi 1860'da Berthelot tarafından gerçekleştirilmiştir. Uzun süreden beri bilinmesi nedeniyle invertaz, enzim kinetiğinde pek çok çalışmada kullanılmış ve bunun sonucunda hakkında oldukça fazla bilgi birikimi oluşmuştur.

Sakkaroz molekülünün fruktoz veya glukoz kısmına etkimesine bağlı olarak iki tip invertaz saptanmıştır. Bunlar, fruktosidaz (β -D-fruktofuransidaz, β -h-fruktosidaz, fruktoinvertaz) ve glukosidaz (α -n-glukosidoinvertaz, α -glukopiranosidaz)'dır (42).

İnvertaz (β -D-fruktofuranosidaz (EC. 3.2.1.26) sakkarozu etki ederek glukoz hidrolizini veya değişen derecelerde fruktosil aktarımını gerçekleştirir. Bunun için tepkiyen β -D-fruktofuranosil grubu içermelidir (38). Hidroliz tepkimesi sonucunda oluşan karışım sakkaroz çözeltisinin gösterdiği optik dönmeden farklı bir optik dönme gösterir. Bu nedenle, oluşan şekerler karışımına "İnvert Şeker", olaya ise "İnversiyon" denilmiştir.



3.2.2. İnvertaz Kaynakları

İnvertaz yaygın olarak mayalardan elde edilir. Ancak, otumsuz bitkilerde, olgunlaşma sırasında arpa ve domateste, şeker pancarının sap ve yapraklarında ve patateste de bulunur. Ayrıca, omurgasızlarda; kan, yumurta, tükürük, bağırsak ve özellikle arıların bal keselerinde, deniz anası gibi ilkel hayvanlarda ve omurgalılarda metabolik enzim olarak saptanmıştır (44).

İnvertaz için mikroorganizma kaynakları çok daha önemlidir. Özellikle mayalar, invertazın ana kaynaklarıdır. Ekmek mayası, bira mayası ve hatta laktoz fermente eden mayalarda invertaz vardır. S.albicans, S. actosporus ve Torula türleri dışında kalan Saccharomyces türleri invertaz içerirler. İnvertaz kaynağı olabilecek mikroorganizma türleri şunlardır (5,8,38,44).

Saccharomyces calshbergensis

S. cerevisiae

S. ludwigii

S.fragilus

S.melis

Aspargillus oryzae

Aspargillus niger

Thermobakterium mobile

Candida utilis

Neurospora crassa

Bacillus subtilis

İnvertaza ayrıca, yeşil alglerde, Vibrio cholerae, Streptococci ve Pneumococci gibi patojenik mikroorganizmalarda da rastlanmıştır. Ancak, invertaz yaygın biçimde bira

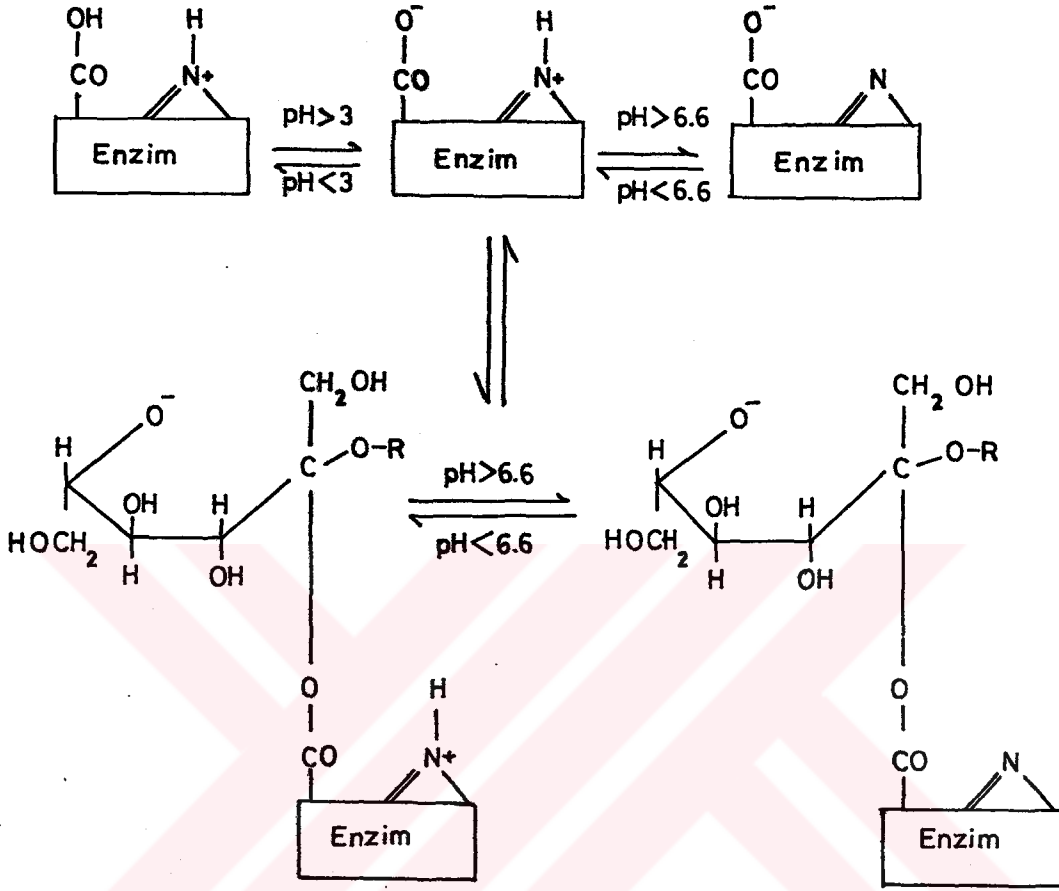
ve ekmek mayasından elde edilir. Mikroorganizmalar içinde Saccharomyces cerevisiae ve Saccharomyces carbergensis'in endüstriyel önemi vardır (23).

3.2.3. Maya İvertazı

İvertazın büyük bir kısmı, maya hücresinde protoplazma ile hücre zarı arasına yerleşmiştir, bununla beraber, bazı tür mayalar enzimi buldukları ortama verebilirler. Ayrıca, protoplazma ve vakuollerde yerleşmiş invertaz türleri de saptanmıştır. Hücre içi invertazın elde edilmesi için mayanın ölüm evresi (autolysis) ne yaklaşması beklenir. Genel olarak, hücre dışı invertaz hücre içi invertazdan çok daha azdır.

Maya invertazının optimum pH değeri 4.0-5.5 aralığındadır ve bu aralık invertazın en kararlı olduğu pH aralığıdır. Yapılan ayrıntılı çalışmalarla optimum pH değeri 4.5 olarak saptanmıştır (44). Katı haldeki kurutulmuş invertaz ısıya çok dayanıklıdır. Salkowski katı invertazın 105°C'!a, hatta vakumda 145-160°C'!a kadar bozunmaksızın ısıtılabilildiğini saptamıştır. İvertazın çözeltideki ısıl kararlılığı kullanılan preparatın saflığına bağlıdır. Ham invertaz preparatları saf olanlardan daha fazla dayanıklıdırlar. Bu nedenle, değişik enzim preparatları için ortak bir optimum sıcaklık saptamak çok zordur. Ticari invertaz için düşük sakkaroz derişimlerinde optimum sıcaklık 55°C. olarak verilir.

İvertazın katalitik aktivitesini -SH grupları sağlar ve tepkiyene bağlanma asidik (-COOH) bölgesinde oluşur. Enzimin çalışabilmesi için tepkiyenin β -D-fruktofuranosil grubunu içermesi gerekir. Enzim özellikle C-6 ve C-3 karbonlarında bulunan -OH ve glukozidik oksijenle birleşir. Ortam pH'ına göre enzim-tepkiyen (ES) arabileşliğinin oluşum biçimi Şekil (3-3)'de verilmiştir.



Şekil (3-3) : İvertaz-sakkaroz arabileşiginin oluşumu (27).

İvertaz, hidroliz aktivitesine ek olarak, su dışındaki uygun alıcılarla aktarım (transfer) tepkimelerini de katalizler (38). Bu işlem, yüksek oligosakkaritlerin veya sakkarozun tekrar oluşmasına neden olabilir. Örneğin, maya invertazı, sakkarozun D-fruktosil grubunu serbest D-Glukoz ve D-Fruktoz'un aldehit grubuna aktararak üç disakkaritin oluşumunu katalizler. Bunlar; 0- β -D-fruktosil-(2 \rightarrow 6)-D-glukoz, 0- β -D-fruktosil-(2 \rightarrow 1)-D-fruktoz (inubiyaz) ve 0- β -D-fruktosil-(2 \rightarrow 6)-D-fruktoz (levanbiyaz)'dur. Maya β -fruktositazı ile oligosakkarit oluşum miktarları Çizelge (3-3)'de verilmiştir:

Çizelge (3-3) : Maya β -Fruktasidazı ile Oligosakkarit Oluşumu (38).

	Sakkaroz	Derişimi	(%)
	2	10	30
			60
Toplam indirgenmiş şeker, D-Fruktoz olarak (mg/ml)	7.49	10.92	8.21
Oligosakkaritlerdeki ketozlar, D-Fruktoz olarak (mg/ml)	0.11	1.15	2.03
			1.44

Çizelge (3-3) incelendiğinde yüksek derişimli sakkaroz çözeltilerinde invertaz aktarım aktivitesinin önemli değerlere ulaşabileceği görülür. Ancak, invertazın eldesinde endüstriyel önemi olan S.cerevisia gibi maya türlerinden elde edilen enzim önemli bir aktarım aktivitesi göstermez (51).

3.2.4. Invertazın Etkinliğini Değiştiren Maddeler

Maya invertazı ağır metallerle, özellikle Ag^+ ile hızla inhibe olur. Her invertaz molekülü başına 7-8 Ag^+ iyonu olduğunda tam, fakat, tersinir inhibisyon oluşur (38). Invertazın Zn^{+2} ile inaktivasyonu tersinir, yarışmasız ve pH bağımlıdır (4). Ag^+ iyonları enzimin histidin kısmını etkileyerek inhibisyon yaratır. Zn^{+2} ve Hg^{+2} ve Hg^{+2} iki enzim molekülünü dimer oluşturacak biçimde bağlar.

Düşük derişimlerdeki üre, invertazı fiziksel özelliklerini fazla değiştirmeden tersinir biçimde inaktive eder. Katalitik bölgeye üre bağlanması ile oluşan bu inaktivasyon yüksek üre derişimlerinde ikincil ve üçüncül yapıların bozulması biçimine dönüşür ve bu durumda tersinmez inhibisyon görülür. Anilin ise patates invertazını maya invertazından daha az etkiler.

İnvertaz için en önemli bir inhibitör de tepkime ürünü D-Fruktoz'dur (27). Yarışmalı inhibisyon türünde etkiyen bu inhibitör ile ilgili ayrıntılı bilgi bu çalışmanın ileri bölümlerinde verilmiştir (Bkz: Bölüm : 4.4 ve Bölüm : 6.5)

3.2.5. İnvertazın Uygulama Alanları

İnvertaz gıda endüstrisinde önemlidir (33). Derişik sakkaroz çözeltilerinin hidrolizi daha tatlı şurupların oluşmasına neden olur. Çünkü, indirgenmiş şeker D-Fruktoz'un tatlılık oranı indirgenmemiş şeker sakkarozdan daha fazladır. İinvert şurubun kaynama noktası daha yüksek ve donma noktası daha düşüktür. İinvertaz etkisi ile oluşan monosakkaritler sakkarozdan daha fazla çözünürdür ve yüksek derişimdeki şurupları hemen kristallenmez.

Tüm bu özellikleri ile invert şeker gıda endüstrisinde şekerli ve tatlı yiyeceklerde tercih edilmektedir.

3.2.6. İnvertaz İle Sakkarozun Hidroliz Kinetiği Konusunda Yapılan Çalışmalara Genel Bir Bakış

Sakkarozun enzim ile hidrolizi tepkimesi enzim kinetiği çalışmalarında oldukça yaygın bir biçimde yer almıştır. Bu konudaki araştırmalar, genel olarak, tepkime kinetiğinin aydınlatılması ve tepkimeyi katalizleyen enzim olan invertazın deaktivasyonu ile ilgilidir. Özellikle, invertazın aktivitesini düşüren etkiler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Günümüze kadar yapılan araştırmaların bilimsel temelleri ve ulaşılan sonuçlara kısaca bakmak yararlı olacaktır.

İnvertaz ile ilgili kinetik çalışmalarda, tepkime hızının tepkiyen derişimiyle değışiminin belli bir değer (\cong % 10 w/v veya 0.29 M. sakkaroz)'e kadar Michaelis-Menten

kinetiğine uyduğu, fakat, artan tepkiyen derişimiyle tepki-
me hızının azalma göstererek bu kinetikten saptığı gözlen-
miştir. İvertaz aktivitesinin düştüğü bu bölge, araştırmacılar tarafından değişik yorumlarla açıklanmaya çalışılmıştır. İlk çalışmalarda, enzimin aktivitesini yitirmesinin ana nedeni olarak tepkiyen inhibisyonu öne sürülmüş, ancak, daha sonra değişik parametrelerin etkileri araştırılmıştır.

Mc Laren (31), Michaelis-Menten kinetiğinde sapmayı sakkaroz derişimi ile değişen özlülüğün bir sonucu olarak ifade etmiş ve başlangıç tepkime hızının tepkime ortamının bağıl akışkanlığına doğrusal olarak bağlı olduğunu ileri sürmüştür. McLaren'in önerdiği ampirik bağıntı

$$r = \frac{1.2 r_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\mu_0/\mu) \quad \dots (3-1)$$

biçimindedir. Burada;

$$\mu_0 = 25^\circ\text{C}'\text{daki suyun özlülüğü (cP)}$$

$\mu = 25^\circ$ 'daki sakkaroz çözeltisinin özlülüğü (cP) ve 1.2 katsayısı ise Michaelis-Menten eşitliğinin deneysel verilere uygunluğunu sağlamak için kullanılan ampirik katsayıdır.

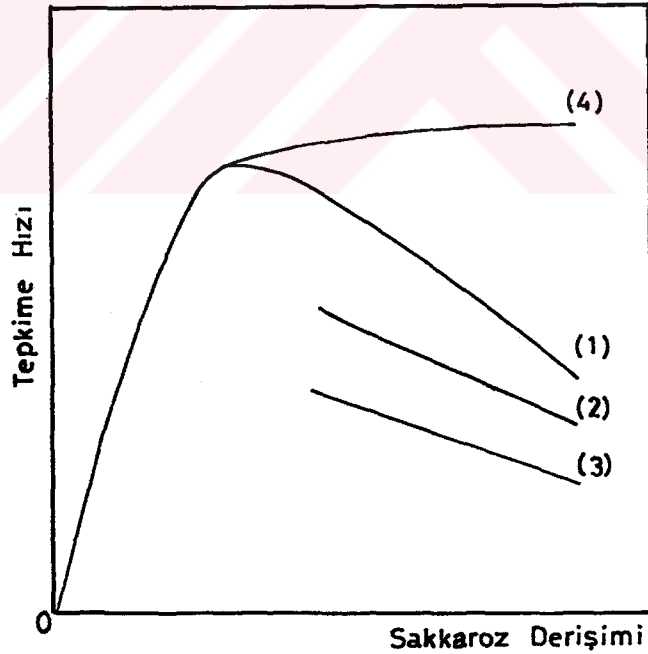
İvertaz aktivitesini sakkaroz çözeltisinin özlülüğüne bağlamak amacıyla yapılan diğer bir çalışma ise Vitolo ve Cuhna tarafından gerçekleştirilmiştir (50). Bu araştırmada % 5-50 (w/v) sakkaroz derişimi aralığında özgül invertaz aktivitesi (SIA) izlenmiştir. Özlülük değerleri, 1.15-6.90 cP aralığında değişen sakkaroz çözeltileri için aşağıdaki denklemler elde edilmiştir:

$$\frac{\mu}{\text{SIA}} \Big|_{1.15}^{2.03} = 9.054\mu - 5.006 \quad \dots (3-2)$$

$$\frac{\mu}{\text{SIA}} \Big|_{3.05}^{6.9} = 1.196\mu + 11.8 \quad \dots (3-3)$$

Burada, SIA mg. indirgenmiş şeker/mg. enzim.dk. birimi ile verilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmalarla özgülüğün hidroliz tepkimesi hızına (veya enzimin aktivitesine) etkisi belirlenmiş, fakat ileri sürülen modeller yüksek tepkiyen derişiminde başlangıç tepkime hızındaki düşmeyi tam olarak açıklayamamıştır.

İnvertaz-sakkaroz sisteminde artan tepkiyen derişimiyle su derişimi azalmaktadır. Su derişimindeki azalmanın tepkime hızına etkisiyle ilgili bir çalışma Nelson ve Schubert (32) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, tepkime ortamına % 10-20 oranında alkol eklenmiş ve elde edilen hidroliz tepkimesi hızları karşılaştırılmıştır. Değişik sakkaroz derişimlerinde tekrarlanan bu işlem sonucunda Şekil (3-2)'de nitel değişimi verilen eğriler elde edilmiştir.



Şekil (3-4) : Sakkaroz derişiminin maya invertazının aktivitesine etkisi (1) Alkolsüz ortam, (2) % 10 Alkol içerikli ortam, (3) % 20 Alkol içerikli ortamlarda (4) Michaelis-Menten yaklaşımı ile elde edilen eğriler (16,32,38).

Bu eğriler, su derişimi apse alınarak yeniden çizildiğinde derişik sakkaroz derişimlerinde serbest su derişiminin hidroliz hızı için kısıtlayıcı değişken olduğu görülür. Elde edilen hidroliz hızları Çizelge (3-4)'de verilmiştir.

Çizelge (3-4): Değişik sakkaroz ve alkol derişimlerinde hidroliz hızları (32).

(pH=4.5, Tepkime Sıcaklığı=25°C.)

Sakkaroz (% w/v)	% 0 Alkol		% 10 Alkol		% 20 Alkol	
	Su Derişimi (mol/lit)	Hidroliz Hızı (DDD/dk)	Su Derişimi (mol/lit)	Hidroliz Hızı (DDD/dk)	Su Derişimi (mol/lit)	Hidroliz Hızı (DDD/dk)
20	43.3	0.0428	41.9	0.0280	35.5	0.0177
30	44.9	0.0360	38.4	0.0236	32.0	0.0137
40	41.4	0.0301	35.0	0.0197	28.5	0.0106
50	38.0	0.0235	31.5	0.0153	24.9	0.00716
60	34.4	0.0178	26.0	0.0109	-	-
70	35.9	0.0124	-	-	-	-

DDD : Dönmedeki değişim derecesi (Degrees Change in rotation)
Oluşan invert şeker derişiminin bir ölçütüdür.

Bu çalışmada ulaşılan en önemli sonuç, invertazın hidrolizinde su azalmasının sakkaroz artmasıyla birlikte tepkime hızını azaltıcı biçimde etkilediğinin görülmesidir. Araştırmacılar, alkol kullanımının tepkime hızında çok az da olsa bir inhibisyon etkisinin olacağını belirtmişlerdir.

Su derişimindeki azalmanın hidroliz tepkimesine etkisinin açıklanabilmesi amacıyla Bowski Saini, Ryu ve Vieth (7) tarafından aşağıdaki mekanizma önerilmiş,



ve tepkime hızı için,

$$r = \frac{r_m [S]}{K_m + [S]} [W] \quad \dots (3-3)$$

bağıntısı elde edilmiştir. Bu eşitlikte,

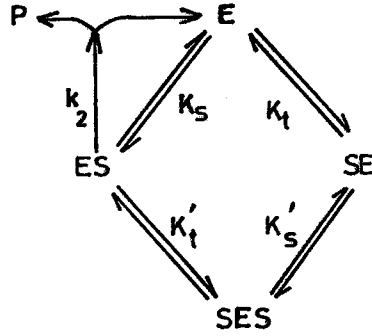
$$r_m = k_2 [E]_0 [W]_0 \quad \dots (3-4)$$

olarak tanımlanıp, eşitlik ampirik düzeltme uygulanarak tepkime hızı,

$$r = \frac{1.04 r_m [S]}{K_m + [S]} \frac{[W]}{[W]_0} \quad \dots (3-5)$$

olarak verilmiştir. Burada, $[W]$ toplam su derişimi, $[W]_0 = 25^\circ\text{C.}$ ' da $55.33 \text{ mol.H}_2\text{O/lt.}$ ve 1.04 ampirik katsayıdır. Bu hız bağıntısı yüksek sakkaroz derişimindeki düşmeyi kısmen açıklamakta, fakat elde edilen kuramsal tepkime hızları deneysel değerlere yeteri kadar uyum sağlamamaktadır.

Enzim sistemlerinde, optimum tepkiyen derişiminden büyük derişimlerde görülen hız düşmesinin en önemli nedeni genellikle, tepkiyen inhibisyonudur. Sakkarozun invertaz ile hidrolizinde de aynı türden bir etki söz konusudur. Bowski, Saini, Ryu ve Vieth(7) sakkaroz-invertaz sisteminde Laidler (27)'in önerdiği tepkiyen inhibisyonu modelini kabul etmişler ve deney sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Tepkiyen inhibisyonu mekanizması Şekil (3-5)'de verilmiştir.



Şekil (3-5) : İntertaz için tepkiyen inhibisyonu mekanizması (5)

Burada, inaktif arabileşikler tepkiyen-enzim (SE) ve tepkiyen-enzim-tepkiiyen (SES) arabileşikleridir. Bu mekanizma kullanılarak tepkime hızı için,

$$r = \frac{k_2 K_s [E]_0 [S]}{1 + (K_s + K_t) [S] + K_s K_t' [S]^2} \quad \dots (3-6)$$

bağıntısı elde edilmiştir. Bu eşitlikten yararlanılarak,

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{k_2 K_s [E]_0} + \frac{1}{[S]} + \frac{K_s K_t'}{k_2 K_s [E]_0} [S] + \frac{(K_s + K_t)}{k_2 K_s [E]_0} \dots (3-7)$$

eşitliği türetilmiştir. Düşük tepkiyen derişimlerinde $[S]$, yüksek tepkiyen derişimlerinde ise $1/[S]$ terimleri ihmal edilerek tepkime hızına kş. tepkiyen derişimi için iki bölge ve bu bölgelerde geçerli iki ayrı denklik elde edilmiştir. Bu denklikler kullanılarak grafiksel çözümleme ile,

$$k_2 K_s [E]_0 = 0.0103 \text{ mol.Glukoz/mol.Sakkaroz.dk.} \dots(3-3)$$

$$K_s + K_t = 6.27 \text{ lt/mol. Sakkaroz} \dots(3-9)$$

$$K_s K_t' = 7.26 \text{ lt}^2 / (\text{mol. Sakkaroz})^2 \dots(3-10)$$

olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada $k_2 K_s [E]_0$ ve $K_s + K_t$ sabitleri düşük sakkaroz derişimi bölgesinden, $K_s K_t'$ sabiti ise yüksek sakkaroz derişimi bölgesinden saptanmıştır.

Sakkaroz derişimi için 0.040-2.060 M.aralığında yapılan deneylerde hesaplanan tepkime hızı değerlerinin optimum tepkiyen derişimine (≈ 0.29 M.) kadar deneysel değerlere tam uyum gösterdiği, ancak daha yüksek derişimlerde hızda düşme görülmesine rağmen uygunluk sağlanamadığı gözlenmiştir.

Sakkarozun invertaz ile hidrolizinde tepkime hızını azaltıcı yönde etki gösteren tepkiyen inhibisyonu ve su derişimi azalmasının bir arada ele alındığı bir çalışma Bowski, Saini, Ryu ve Vieth (7) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada tepkime hızı, kinetik mekanizma önerilmeksizin serbest su derişimiyle orantılı kabul edilerek

$$r = \frac{k_2 K_s [E]_0 [S]}{1 + (K_s + K_t) [S] + K_s K_t' [S]^2} \frac{[W_F]}{[W]} \dots(3-11)$$

şeklinde verilmiştir. Bu eşitlikte;

$$[W_F] = \text{Serbest su derişimi (mol/lt)}$$

$$[W] = \text{Toplam su derişimi (mol/lt)}$$

dir ve $[W_F] / [W]$ oranı sakkaroz derişimine bağlı olarak hesaplanmıştır. Eşitlik (3-11) adı geçen araştırmacıların invertaz için sadece sakkaroz inhibisyonu dikkate alındığında elde ettikleri tepkime hızı eşitliği [Bkz. Eşitlik (3-6)]'nin serbest su derişimine göre düzeltilmiş biçimidir.

Daha önce tepkiyen inhibisyonu kinetiğinden bulunan sabitler ($k_2 K_s [E]_0$, $(K_s + K_t)$ ve $K_s K_t'$) kullanılarak hesaplanan tepkime hızı kş. sakkaroz derişimi eğrisi çizilebilir. Çalışmada bu işlem yapılarak model eğrinin deneysel sonuçlarla uyum sağladığı belirtilmiştir.

İnvertazın tepkimesiz durumdaki ısıl kararlılığı Ooshima, Sakimoto ve Harano (34,35) tarafından tartışılmış ve ulaşılan deneysel sonuçlar serbest ve tutuklanmış enzimler için irdelenmiştir. Değişik pH değerlerinde ve tepkiyen içermeyen tampon çözeltilerde sabit deaktivasyon sıcaklığında belirli bir süre bekletilen invertazın aktivitesi daha sonra, kesikli düzende çalışan karıştırmalı kapta saptanmıştır. Bu kademedeki hidroliz tepkimesinin hızı,

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2 [E][S]}{K_m + [S]} \quad \dots(3-18)$$

eşitliğiyle açıklanmıştır.

İnvertazın ısıl deaktivasyonu ortamda tepkiyen olmadığından tepkiyen derişiminden bağımsız olarak birinci derece tepkime kinetiği ile enzim derişimine bağlanmıştır. Isıl ön işlemdeki aktivite düşmesinin aktif enzim derişimine bağlılığı aşağıdaki eşitlikle verilmiştir.

$$-\frac{d[E]_{td}}{dt_d} = k_d [E]_{td} \quad \dots(3-19)$$

Burada,

k_d : Deaktivasyon hız sabiti (dk^{-1}),

t_d : Deaktivasyon süresi (dk),

$[E]_{td}$: t_d anındaki enzim derişimi (mol/lt veya mg/lt)

dir. Eşitlik (3-19) kullanılarak enzim derişiminin zamanla değişimi için,

$$- \ln [E]_{td} / [E]_0 = \ln (r/r_0) = k_d t_d \quad \dots(3-20)$$

elde edilmiştir. Bu eşitlikte "o indisi" başlangıç koşullarını tanımlamaktadır. Deaktivasyon hız sabiti (k_d)'nin hesaplanmasında invertazın tampon çözeltide bekletildiği süre temel alınmıştır. Deneysel sonuçlar enzim deaktivasyonunun sıcaklıkla ve tutuklama ile arttığını göstermektedir. Ancak, invertazın tepkiyensiz ortamda yüksek sıcaklıklı tampon çözeltilerde önceden deaktive edilmesinden ötürü bu çalışmada elde edilen deaktivasyon hız sabiti işletme kararlılığının ölçütü olmayıp sadece depolama kararlılığının bir ölçütü niteliğindedir. Bu nedenle de kinetik açıdan pek önem taşımamaktadır.

4. SAKKAROZ HİDROLİZ SİSTEMİNİN TANIMLANMASI VE KİNETİĞİ

4.1. Genel

Hidroliz tepkimelerinde ortamdaki su derişimi ana tepkiyene göre oldukça fazladır ve tepkime ile harcanan su miktarı toplam derişimi çok değiştirmez. Bu nedenle, su ikinci bir tepkiyen olarak gözükmez ve sabit kabul edilerek özgül tepkime hızı (veya tepkime hız sabiti) kapsamına alınır (16). Ancak, yüksek ana tepkiyen derişimlerinde, su derişiminin azalmasından ötürü, bu düşünce geçerliliğini yitirir. Böylece, yüksek tepkiyen derişimlerinde suyun ikinci bir tepkiyen olarak dikkate alınması gerekir.

İnvertaz-sakkaroz sisteminde de su derişiminin aynı türden etkisi vardır. Bu konuda günümüze dek gerçekleştirilen çalışmalarda araştırmacılar ya su etkisini ampirik şekilde yerleştirerek Michaelis-Menten eşitliğini yeniden düzenlemişler (Browski, Saini, Ryu ve Vieth) ya da ortamda sakkaroz derişimi artmasının doğal bir sonucu olan özlülük artışını Michaelis-Menten kinetiğinde yerleştirmeye (Mc Laren) çalışmışlardır (Bkz. Bölüm : 3.2.6).

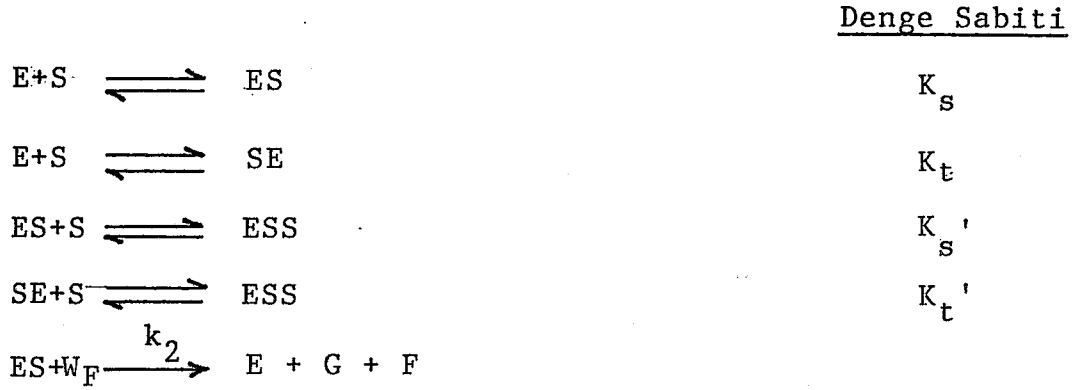
Bu iki yaklaşımın dışında ve daha tutarlı sonuçlar verebilen diğer bir düşünce ise, tepkime hızının düşmesinden serbest su derişiminin azalmasının etkili olduğu savıdır. İlk defa Nelson ve Schubert (32) tarafından öne sürülen bu düşünce Browski, Saini, Ryu ve Vieth (7) tarafından benimsenmiştir (Bkz. Bölüm : 2.3.6). Buradaki serbest su derişimi azalması, hem sakkaroz derişiminin artmasıyla su (çözücü) derişiminin düşmesinden hem de sakkaroz moleküllerinin tepkime ortamındaki su moleküllerini hidrojen bağı ile bağlamasından kaynaklanmaktadır. Einstein (1956), sakkarozun hidrasyon düzeyi için kuramsal olarak 7 mol. su/mol. sakkaroz

değerini elde etmiş, daha sonra Combes ve Monsan (1983) 1.8M. sakkaroz derişimine kadar bu değer 5 mol. su/mol sakkaroz olduğunu göstermişlerdir (10). Hidroliz tepkimesinde yer alan serbest su derişimi, çalışılan sakkaroz derişimine karşı gelen toplam su derişiminden bağlanmış su derişiminin çıkartılması ile elde edilir (7).

Bu çalışmada üzerinde durulan konulardan birisi yüksek sakkaroz derişimlerinde ($>0.29M.$) hidroliz hızında görülen düşüşün nedenlerinin saptanmasıdır. Bu durum yukarıda da bahsedildiği gibi ya su derişiminin azalmasının ya da sakkaroz inhibisyonunun veya her iki etkinin birlikte gözükmesinin sonucu olabilir. Yapılan deneysel çalışmalarda bu iki etki ayrı ayrı ele alındığında hızdaki düşmenin açıklanamadığı saptanmıştır (Bkz. Bölüm : 6.4.2 ve Bölüm : 6.4.3). Ayrıca diğer araştırmacılar tarafından da benzer yaklaşımların uygulanması nedeniyle bu iki etkinin ayrı ayrı kinetik incelenmesi bu bölümde sunulmamış, ancak tepkime mekanizmaları ve çıkarılan tepkime hız bağıntıları EK : I-1 ve EK: I-2'de verilmiştir. Her iki etkinin birlikte incelendiği durumla ilgili kinetik yaklaşım ise Bölüm : 4.2'de verilmiştir.

4.2. Su Derişimi ve Sakkaroz İnhibisyonu Etkileri Birlikte Alındığında Tepkime Kinetiği

Daha önceki bölümlerde (Bkz. Bölüm : 3.2.6 ve 4.1) serbest su derişimi azalmasının ve sakkaroz inhibisyonunun tepkime hızına etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. İvertaz-sakkaroz sisteminde, artan sakkaroz derişimi ile serbest su derişiminin azalmasının doğal bir sonucu olarak bu iki değişim birbiriyle ilişkilidir. Böylece, iki etkinin bir arada ele alınması uygun olacaktır. Bu durumda önerilen mekanizma aşağıdaki biçimde verilebilir;



Enzim için kütle denkliği,

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [SE] + [ESS] \quad \dots (4-1)$$

şeklindedir. Hızlı denge kabulüyle yazılan denge sabitleri ve Eşitlik (4-1) kullanıldığında enzim için yazılan kütle denkliği,

$$[E]_0 = \left(1 + \frac{(K_s + K_t)}{K_s K_t} [S] + \frac{[S]^2}{K_t K_t'} \right) [E] \quad \dots (4-2)$$

ve

$$[E] = \frac{K_s K_t K_t' [E]_0}{K_s K_t K_t' + K_t' (K_s + K_t) [S] + K_s [S]^2} \quad \dots (4-3)$$

olarak elde edilir. Michaelis sabiti (K_s) kullanılarak enzim-tepkiyen arabileşiği derişimi için,

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_s}$$

$$= \frac{K_t K_t' [E]_0 [S]}{K_s K_t K_t' + K_t' (K_t + K_s) [S] + K_s [S]^2} \quad \dots (4-4)$$

elde edilir. Buna göre tepkime hızı bağıntısı,

$$r = \frac{d [G]}{dt} = k_2 [ES] [W_F]$$

$$= \frac{k_2 [E]_0 K_t K_t' [S] [W_F]}{K_s K_t K_t' + K_t' (K_t + K_s) [S] + K_s [S]^2} \quad \dots(4-5)$$

dir. Maksimum tepkime hızı,

$$r_m = k_2 [E]_0 [W]_0$$

şeklinde Eşitlik (4-5)'de yerinde konursa,

$$r = \frac{r_m K_t K_t' [S]}{K_s K_t K_t' + K_t' (K_t + K_s) [S] + K_s [S]^2} \frac{[W_F]}{[W]_0} \quad \dots(4-6)$$

bağıntısı elde edilir. Mekanizmada yer alan tepkimeler gereği denge sabitleri için,

$$K_s K_s' = K_t K_t' \quad \dots(4-7)$$

yazılabilir. Eşitlik (4-7) Eşitlik (4-6)'da yerine konursa, her iki etkiyide kapsayan tepkime hızı bağıntısı,

$$r = \frac{r_m K_t K_s' [S]}{K_s K_t K_s' + K_s' (K_t + K_s) [S] + K_t [S]^2} \frac{[W_F]}{[W]_0} \quad \dots(4-8)$$

olarak elde edilir.

4.3. İnvertaz-Sakkaroz Sistemi Kinetik Sabitlerini İçeren Katsayıların Bulunması

Önceki bölümde su derişimi ve sakkaroz inhibisyonu etkilerinin birlikte alındığı en genel durum için bulunan tepkime hız bağıntısı Eşitlik (4-8) yeniden düzenlenirse;

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0}{r_m K_s'} [S] + \frac{[W]_0 K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_0}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right) \dots(4-9)$$

elde edilir. Bu bağıntıdaki kinetik sabitler daha önceki çalışmalarda (7) yapıldığı gibi düşük ve yüksek tepkiyen derişimi bölgelerinde bazı ihmallerle bulunabilir. Şöyle ki, düşük sakkaroz derişimlerinde Eşitlik (4-9)'un sağ tarafındaki birinci terim, yüksek sakkaroz derişimlerinde ise ikinci terim diğer terimler yanında ihmal edilmektedir. Böylece hız bağıntısı, deneysel veriler kullanılarak grafik çözümleme ile kinetik sabitlerin bulunabileceği biçime indirgenmektedir. Ancak bu sabitlerin değerleri bilinmeden işin başında bu ihmallerin yapılması pek tutarlı gözükmemekte ve ne kadar yüksek veya ne kadar düşük sakkaroz derişimlerinde ihmallerin geçerli olabileceği sorularını akla getirmektedir. Bu nedenle bu tür ihmaller yapılmaksızın tüm sakkaroz derişimlerinde geçerli genel bir çözüm yapabilmek ve kinetik sabitleri bulabilmek amacıyla bu çalışmada istatistiksel bir yöntem olan "Çoklu Doğrusal Regresyon (Multiple Linear Regression) Analizi" (18) kullanılmıştır.

Eşitlik (4-9) incelendiğinde, $\frac{[W_F]}{r}$ bağımlı değişkeninin $[S]$ ve $\frac{1}{[S]}$ bağımsız değişkenlerine değişik katsayılarla bağlı olduğu görülür. Bu eşitlikte,

$$y = \frac{[W_F]}{r} \quad \dots(4-10)$$

$$x_1 = [S] \quad \dots(4-11)$$

$$x_2 = \frac{1}{[S]} \quad \dots(4-12)$$

ve

$$B_0 = \frac{[W]_0 (K_S + K_T)}{r_m K_T} \quad \dots(4-13)$$

$$B_1 = \frac{[W]_0}{r_m K_S} \quad \dots(4-14)$$

$$B_2 = \frac{[W]_0 K_S}{r_m} \quad \dots(4-15)$$

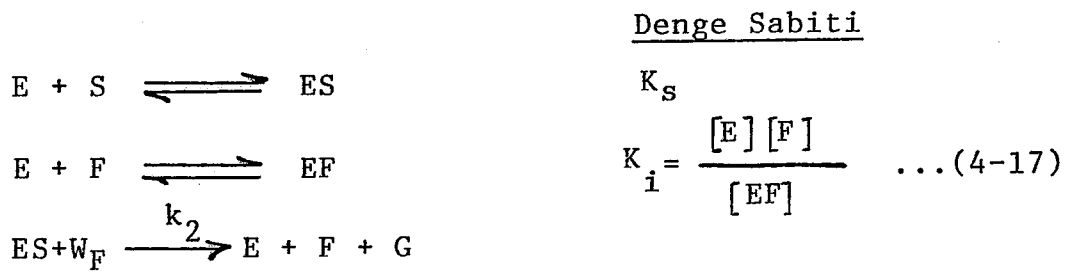
olarak tanımlanırsa,

$$y = B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_0 \quad \dots (4-16)$$

şeklinde doğrusal bir bağıntı elde edilir. Bu bağıntıdaki, invertaz-sakkaroz sisteminin kinetik sabitlerini içeren katsayıların bulunabilmesi için "Çoklu Doğrusal Regresyon Analizi" yapılmış ve bununla ilgili bilgisayar programı EK: I-3 de verilmiştir.

4.4. Su Etkisi ve Ürün İnhibisyonu

Sakkarozun invertaz ile hidrolizinde ürünlerden biri olan D-Fruktoz'un yarışmalı inhibisyon yarattığı değişik çalışmalarda (27) belirtilmiştir. Ancak serbest su derişimindeki düşmenin ve ürün inhibisyonunun tepkime hızına etkilerinin birlikte ele alındığı çalışmalara rastlanılamamıştır. Sakkaroz inhibisyonunun ihmal edilebildiği sakkaroz derişimlerinde bu iki etki birlikte alındığında önerilen tepkime mekanizması ve türetilen kinetik bağıntılar aşağıda verilmiştir:



Denge sabitleri ve enzim için kütle denkliği,

$$[E]_0 = [E] + [EF] + [ES] \quad \dots(4-18)$$

dikkate alındığında,

$$ES = \frac{[E]_o [S]}{K_s \left(1 + \frac{[F]}{K_i}\right) + [S]} \quad \dots(4-19)$$

elde edilir. Tepkime hızı ise,

$$\begin{aligned} r &= \frac{d [G]}{d_t} = k_2 [ES] [W_F] \\ &= \frac{k_2 [E]_o [S] [W_F]}{K_s \left(1 + \frac{[F]}{K_i}\right) + [S]} \quad \dots(4-20) \end{aligned}$$

dir.

Maksimum tepkime hızı,

$$r_m = k_2 [E]_o [W]_o$$

Eşitlik (4-20)'de yerine koyulduğunda,

$$r = \frac{r_m [S]}{K_s \left(1 + \frac{[F]}{K_i}\right) + [S]} \left(\frac{[W_F]}{[W]_o}\right) \quad \dots(4-21)$$

elde edilir. Bu eşitlikte, D-Fruktoz derişimi parametre alındığında,

$$K_{sg} = K_s \left(1 + \frac{[F]}{K_i}\right) \quad \dots(4-22)$$

yerleştirilirse tepkime hızı için,

$$r = \frac{r_m [S]}{K_{sg} + [S]} \left(\frac{[W_F]}{[W]_o}\right) \quad \dots(4-23)$$

bağıntısına ulaşılır. Eşitlik (4-21) ve Eşitlik (4-23)'de gerekli düzenlemeler yapıldığında sırasıyla tepkime hızı için

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0 K_s}{r_m} \left(1 + \frac{[F]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_0}{r_m} \quad \dots(4-24)$$

ve

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0 K_{sg}}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_0}{r_m} \quad \dots(4-25)$$

bağıntıları elde edilir. O halde sakkaroz inhibisyonunun ihmal edilebileceği sakkaroz derişimlerinde, başlangıçta ortama eklenen D-Fruktoz derişimleri parametre alınarak çizilen başlangıç $[W_F] / r$ kş.1/[S] grafikleri doğru vermeli ve bu doğrular ordinat üzerinde aynı noktada kesişmelidirler.

4.5. İnvertazın Deaktivasyonu

Enzim deaktivasyonunda yaygın olarak uygulanan üstel deaktivasyon modeli tepkiyen ve ürün derişiminde bağımsız olarak açıklanmış, böylece deaktivasyon enzim aktivitesine birinci dereceden kinetik ile bağlanmıştır (Bkz. Bölüm : 2.4.1). Bu kinetik sürekli düzende çalışan sistemlerde tepkiyen derişimi sabit tutularak, kesikli düzende çalışan sistemlerde ise kısa zaman aralıklarında tepkiyen ve ürün (inhibitör) derişimlerinin fazla değişmediği kabul edilerek uygulanabilir. Fakat, kesikli düzende uzun zaman aralığında çalışıldığında tepkiyen azalması ve/veya ürün inhibisyonu nedeniyle bu model işletme sırasındaki deaktivasyonun açıklanmasında doğrudan uygulanamamaktadır.

Bu durumda, sadece işletme koşullarına (pH, sıcaklık, karıştırma hızı) bağlı deaktivasyonun saptanması için, tepkime hızında görülen düşmeye, tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkilerinin saptanması ve bu etkilerin çıkartılması gerekmektedir. Bu etkilerin dışında gözlenen ilave hız

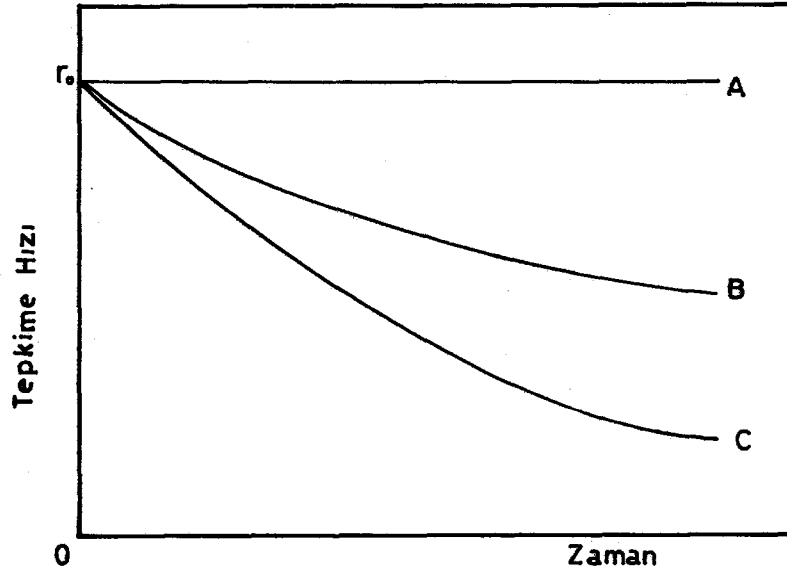
düşüşünün sadece işletme koşullarındaki enzim deaktivasyonundan ileri geldiği gözönüne alınarak üstel deaktivasyon modeli aşağıda açıklandığı biçimde uygulanmıştır.

Herhangi bir t anında tepkime ortamında oluşan D-Glukoz, dolayısıyla D-Fruktoz (inhibitör) ve ortamda kalan sakkaroz derişimleri saptanır. Çalışılan aynı enzim derişiminde daha önce hazırlanmış ürün inhibisyonu grafiklerinden [Şekil (6-10)] saptanan sakkaroz ve D-Fruktoz derişimlerine karşı gelen tepkime hızı ($[W_F]/r$)_i bulunur. Saptanan bu hız değeri sakkaroz derişimi azalmasının ve inhibitör (D-Fruktoz) oluşumunun hız düşürücü etkisini kapsamakta ancak enzim deaktivasyonunu içermemektedir. Yani başlangıçta ortama konulan enzim hiç deaktive olmasaydı sözkonusu t anında bu hız değeri gözlenecektir.

Öte yandan deneysel D-Glukoz kş. zaman grafiğinden aynı t anında saptanan gerçek tepkime hızı $\frac{[W_F]}{r}$ hem bu etkileri hem de enzim deaktivasyonunu içermektedir. Bu nedenle t anındaki enzim aktivite (a); deneysel olarak saptanan daha düşük tepkime hızının ($[W_F]/r$)_d inhibisyon grafiğinden saptanan deaktivasyonsuz ($[W_F]/r$)_i tepkime hızına oranı şeklinde

$$a = \frac{r_d}{r_i} \quad \dots (4-26)$$

yazılabilir. Bu hızların zamanla değışimleri Şekil (4-1)'de nitel olarak gösterilmiştir.



Şekil (4-1) : Tepkime hızının zaman ile değişimi

A : Tepkiyen azalması-Ürün inhibisyonu ve Deaktivasyon olmasaydı gözlenecek durum (sabit tepkime hızı; r_0),

B : Tepkiyen azalması-ürün inhibisyonu etkileri varken, Deaktivasyon olmasaydı gözlenecek durum (r_i),

C : Üç etkinin de olduğu gerçek durum (r_d).

Böylece elde edilen enzim aktivitesi değerleriyle tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonundan bağımsız olarak üstel deaktivasyon modeli uygulanır.

$$-\frac{da}{dt} = k_d a$$

$$a = a_0 e^{-k_d t}$$

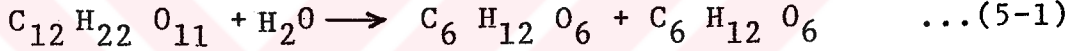
bu modele göre çizilen bu (a/a_0) kş. zaman grafiği bir doğru vermektedir. Bu doğrunun eğiminden işletme koşullarındaki deaktivasyon hız sabiti (k_d) dolayısıyla enzim aktivite yarı ömrü ($t_{1/2}$) bulunur (Bkz. Bölüm 6-6).

5. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ

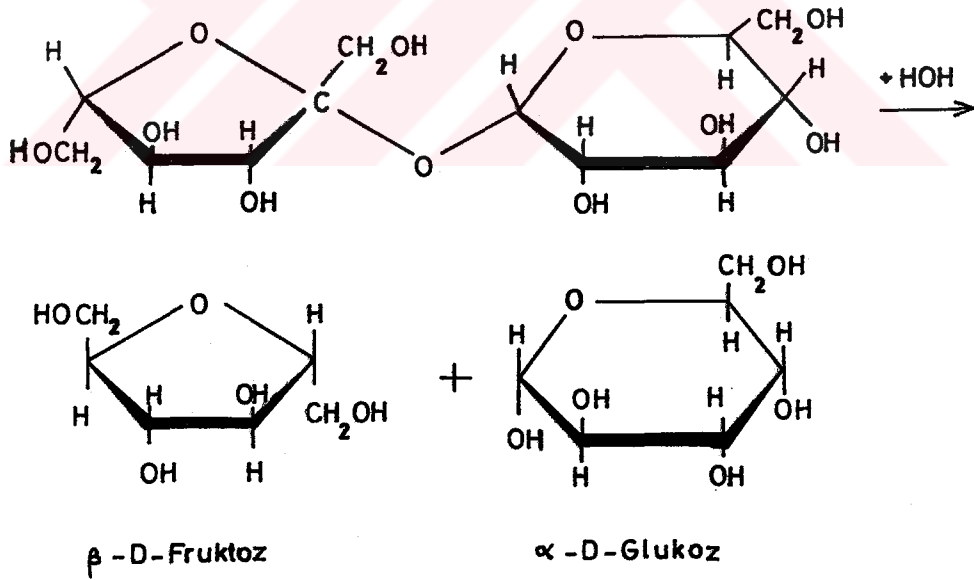
5.1. Tepkime Sistemi ve Ortam Bileşimi

Tepkime ortamı, sakkaritlerden oluşan sulu ve homojen bir çözeltilidir. Sakkaroz invertaz yardımıyla hidroliz edilir. Sonuçta genel haliyle mono-, di- ve tetra-sakkaritler, D-Glukoz ve D-Fruktoz açığa çıkar. Ortam ayrıca, eklenen 0.02 M. asetat tamponundan gelen Na^+ ve CH_3COO^- iyonlarını da içerir.

Sakkaroz için hidroliz tepkimesi;



veya



Bu tepkime sakkaroz ve suyun etkileştiği bir bimoleküler tepkimedir. Seyreltik çözeltilerde su derişimi ile tepkime hızında görülen değişim önemli değildir ve tepkime monomoleküler tersinmez tepkime olarak alınabilir (40). Ancak derişik sakkaroz çözeltilerinde, su derişiminin tepkime hızına etkisini dikkate almak gerekir.

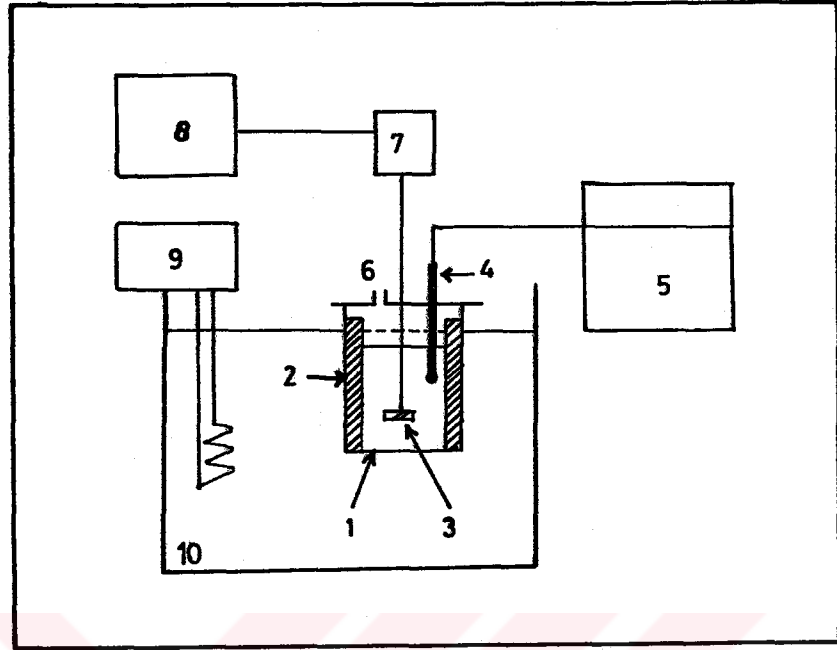
Yapılan çalışmalarda, ortam derişimleri amaca uygun biçimde hazırlanmıştır. Uygun işletme koşullarının saptanmasına yönelik çalışmalarda % 20 (w/v)'lik (0.58M) sakkaroz çözeltisi kullanılmıştır. Tepkiyen derişimi etkileri araştırılırken ortamdaki sakkaroz derişimi 0.03601-1.13902M. aralığında değiştirilmiştir.

Ürün inhibisyonu çalışmalarında ise, tepkime başlatılmadan önce ($t=0$ anında) ortama saptanan derişimlerde inhibitör (D-Fruktoz) eklenmiştir.

Çözücü olarak sadece damıtık su kullanılmıştır.

5.2. Deney Düzenegi

Kullanılan düzenek, kesikli düzende çalışan ve karıştırma hızı, pH ve sıcaklığı denetlenen standart tepkime kabından oluşmuştur. Çalışılan sıcaklıkta (55°C) buharlaşma ile sıvı kaybını engellemek amacıyla sızdırmaz kapak kullanmış, sistem örnek alımı dışında çevreye kapatılmıştır [Şekil (5-1)].



Şekil (5-1): Deney düzeneği.

1. Tepkime kabı, 2. Tampon levha,
3. Karıştırıcı pervane; dörtlü-düz-bıçak (flat-blade), 4. pH-elektrodu, 5. pH-metre,
6. Örnek alma yeri, 7. Karıştırıcı motor,
8. Varyak, 9. Denetimli (on-off) ısıtıcı,
10. Sabit sıcak su banyosu.

5.3. Deneyin Yapılışı

Tepkime kabı, seçilen derişimde sakkaroz çözeltisi ile tepkime hacmi 400 ml. olacak biçimde doldurulur. Kullanılan sakkaroz çözeltisi 0.02M Asetik asit-sodyum asetat (pH=4.5) tamponu ile % 2 (v/v) oranında tamponlanmıştır.

Kapak kapatılarak sabit sıcaklık banyosuna daldırılır, karıştırmaya başlanır. Karışım istenilen sıcaklığa gelip sistem ısıl dengeye ulaştığında bir pipet yardımıyla enzim çözeltisi ortama eklenir, tepkime başlatılır. Tepkime ilerlerken pH, sıcaklık ve karıştırma hızının sabitliği denetlenir.

Tepkime sonucunda oluşan D-Glukoz derişimi, uygun görülen zaman aralıklarında alınan 0.2 ml.'lik örneklerde glukoz oksidaz-peroksidaz enzim karışımı kullanılarak saptanır (40). Elde edilen derişim değerleri hidroliz tepkimesinin izlenmesi ve hız değerlerinin saptanması için kullanılır.

5.4. Kullanılan Aletler ve Maddeler

5.4.1. Kullanılan Aletler

a. Tepkime Kabı : Ağzı rodajlı 800 ml. kapasiteli yerli yapım pyreks cam beherdir. Sızdırmaz kapak polipropilenden, mil, pervane, ve dört adet tampon levha paslanmaz çelikten yapılmıştır. Özellikleri; Çap: 8 cm., Sıvı yüksekliği 8 cm. (400 ml.), Pervane çapı: 4 cm., Tampon levha eni: 0.8 cm. dir.

b. Diğer Aletler :

Karıştırıcı Motor: Singer, sabit devir hızlı motor.

Isıtıcı-Denetleyici: Techne, açık-kapalı denetimli ve 0-100°C skalalı.

pH-Metre : Pye-Unicam, Pye Model 292 pH-Metre, Kombine elektrotlu.

Varyak : Sistem Teknik, 0-200 V aralığında ayarlanabilir (Karıştırma hızının ayarlanması için).

Yardımcı Aletler :

Voltaj Regülatörü : Burç Otomatik Voltaj Regülatörü
2000 VA.

Santrifüj : International Clinical Santrifigue
Model Cl.

Magnetik Karıştırıcı : Elektro-Mag., Karıştırma ve ısıtma dentimli.

Devir Ölçer (Tachometer) : Power Instruments Inc., Operating Directions, genişletilebilir skalalı (3-30000 devir/dk.), Model B-891.

Spektrofotometre : Bausch and Lomb, Spectronic 20.

5.4.2. Kullanılan Maddeler

- a. İnvertaz : Sigma Chemical Company, No. I-5875, Grade : VI (pH=4.5 ve T=55°C'da 220 mol.sakkaroz/mg.enzim), Ekmek mayası kökenli.
- b. Peroksidaz:Merck (pH=7 ve T=25°C da 100 U/mg.)
- c. Glukoz oksidaz: Sigma Chemical Company, No.G-6125, Tip II (17600 Units/g. Katı), Aspergillus niger kökenli.
- d. Diğer kimyasal maddeler :
 - Sakkaroz : Difco, BDH (Analar)
 - D-Fruktoz : Merck (Analitikal reagent)
 - o-Dionosidin 2 Hcl: Sigma Chemical Company.
 - Tris : Merck (reinst)
 - Sülfirik Asit: Merck, BDH (Analar)
 - Sodyum Hidroksit: Merck (Lab. Reagent)
 - Asetik Asit : Merck (Lab. Reagent)

5.5. İnvertaz Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan invertaz, ekme mayası (Bakers' Yeast) kökenlidir. Etiket aktivitesi $\text{pH}=4.5$ ve $T=55^{\circ}\text{C}$ 'da $220 \mu\text{mol}$. sakkaroz/mg. enzim'dir.

Bir seri deney için gerekli toz enzim, 0.02M .asetat tamponunda ($\text{pH}=4.5$) 20 mg . İnvertaz/ml. olacak biçimde magnetik karıştırıcıda, köpürme olmadan karıştırılarak (5 dk.) iyice çözülür. Çözünmeyen kısım 3 dk. 'lık santrifujleme (5000 dev./dk.) ile ayrılır, homojen invertaz çözeltisi elde edilir. Bu çözelti her bir deneyde kullanılacak miktar kadar kısımlara ayrılarak -25°C 'daki derin soğutucu (deep freezer)'da dondurulur. Kullanılacağı zaman dondurucudan çıkarılan tüp, 25°C 'daki suya daldırılarak çözelti eritilir ve karıştırılıp kullanılır. Derin soğutucuda invertaz çözeltisinin yaklaşık 90 gün aktivitesini kaybetmeden saklanabileceği saptanmıştır.

5.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

5.6.1. Tepkiyen Çözeltisi

Kullanılan tepkiyen çözeltilerinde gereken miktar sakkaroz tartıldıktan sonra biraz suda çözülür, istenilen hacime damıtık su ile tamamlanır. Ürün inhibisyonu ile ilgili çalışmalarda ise, gereken miktardaki D-Fruktoz tepkime başlatılmadan önce tepkime ortamına eklenir.

5.6.2. Diğer Çözeltiler

a- Asetik Asit/Asetat Tampon Çözeltisi (0.02M ., $\text{pH}=4.5$): Enzim çözeltisi hazırlamak için kullanılır. 1 lt. çözeltide 1.6 gr. NaOH ve 6.4 ml. $\text{CH}_3 \text{ COOH}$ ($d=1.014$) olacak biçimde hazırlanır, pH 4.5 'e ayarlanır.

5.7. Tepkime Hızlarının Saptanması

Değişik anlardaki tepkime hızlarının saptanmasında D-Glukoz derişiminin zamanla değişiminden yararlanılır. Uygun görülen

zaman aralıklarında ortamda alınan 0.2 ml. hacimdeki örnekler Glukoz oksidaz-Peroksidaz enzimatik yöntemi ile analiz edilmiştir (Bkz. EK-II.1). Saptanan D-Glukoz derişimleri zamana karşı işaretlendiğinde elde edilen eğrinin belirli anlardaki eğiminden D-Glukoz oluşum hızları bulunmuştur. Bulunan bu hızlar, diğer bir anlamda, sakkaroz tüketim hızının da bir ölçüsüdür.



6. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI

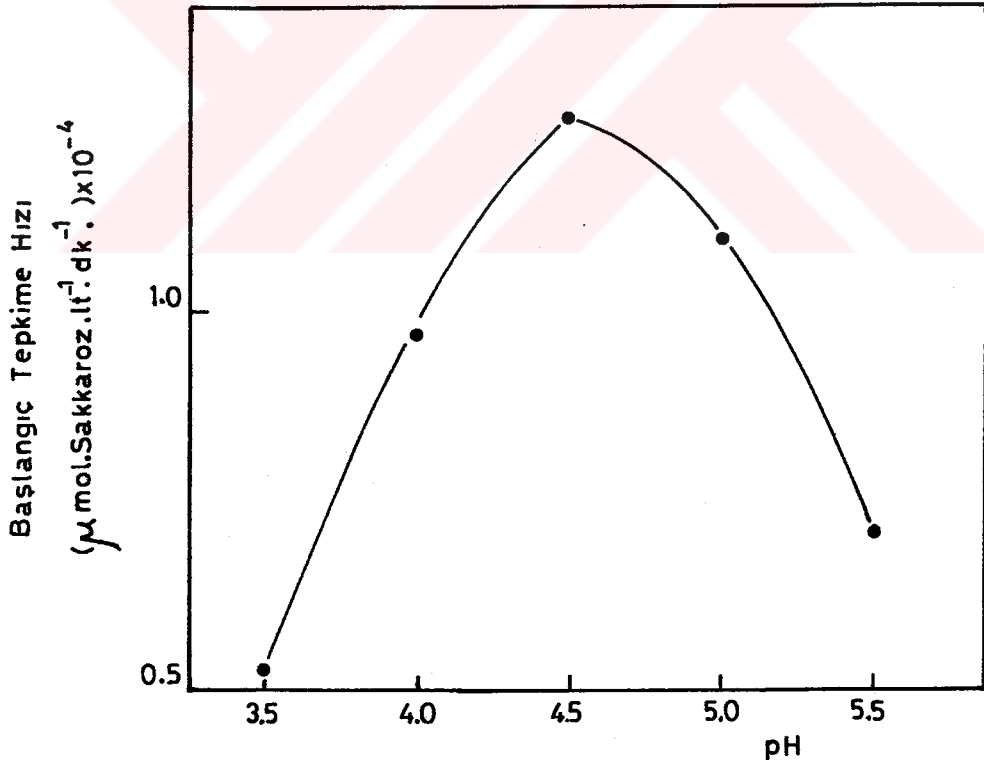
6.1. Genel

Bu çalışmada, sakkarozun maya invertazı ile hidrolizinin kinetiği kesikli düzende incelenmiştir. Enzimlerin kullandıkları ortam koşullarından fazlaca etkilenmeleri ve bu koşullara karşı davranışlarının büyük ölçüde elde edildikleri kaynağa bağlı olması nedeniyle araştırmanın başlangıcında pH ve sıcaklığın maya invertazı aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Daha sonra, saptanan bu uygun koşullarda invertaz-sakkaroz sisteminde sakkaroz derişiminin tepkime hızına etkileri araştırılmış ve yüksek sakkaroz derişimlerinde ($>0.29M.$) tepkime hızında görülen düşmenin nedenlerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu düşmenin nedeni tepkiyen inhibisyonu ve serbest su derişimi azalması veya her iki etkinin birlikte gözükmesinin olabileceği düşüncesi ile önce bu iki etki ayrı ayrı ve daha sonra birlikte ele alınarak incelenmiş, deneysel sonuçlarla uyumlulukları karşılaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda her iki etkinin birlikte tepkime hızında düşmeye neden olduğu saptanmış ve bu durum için önerilen kinetik mekanizmada yer alan kinetik sabitlerin hesaplanmasına çalışılmıştır.

Sakkarozun hidroliz ürünü olan D-Fruktoz'un inhibisyon etkisi üzerinde durulmuş ve inhibisyonun türü saptanmıştır. Tepkiyen inhibisyonunun ihmal edilebildiği düşük sakkaroz derişimlerinde serbest su derişimi etkisinin de dikkate alındığı bu çalışmada elde edilen sonuçlardan, sadece inhibisyon kinetiği açısından değil aynı zamanda kesikli düzende işletme koşullarındaki enzim deaktivasyonunun saptanması açısından da yararlanılmıştır. İvertazın aktivitesinde zamanla görülen düşmeye tepkiyen azalmasının, ürün (D-Fruktoz) inhibisyonunun ve işletme koşullarına bağlı enzim deaktivasyonunun neden olduğu göz önünde tutularak sadece işletme koşullarına bağlı enzim deaktivasyonunun saptanmasına çalışılmıştır.

6.2. Sakkarozun Hidrolizinde pH Etkileri

Maya invertazı, zayıf asidik bölgede en aktif ve pH 4-5 aralığında en kararlı haldedir. Bununla birlikte, değişik invertaz kaynaklarından sağlanan enzimin pH değişimine karşı davranışı farklılık göstermektedir. Örneğin, Aspergillus oryzae veya bağırsak dokusundan elde edilen invertaz için en kararlı halin yüksek pH değerleri olan 6-8 aralığında gözlemlendiği belirtilmiştir (44). Ayrıca, değişik kökenli invertazlar için 4.2'den 7'ye kadar uzanan oldukça geniş bir aralıkta en uygun pH değerleri saptanmıştır (8, 44). Bu nedenle, kullanılan invertazın aktivitesinin en yüksek olduğu pH'nın saptanması amacıyla, ortam pH'ı 3.5-5.5 aralığında değiştirilerek başlangıç tepkime hızının değişimi izlenmiş ve pH 4.5 değerinde maksimum aktivite gözlemlenmiştir. Şekil(6-1)'de belirgin bir biçimde görülen bu dönüm noktası en uygun pH değeri

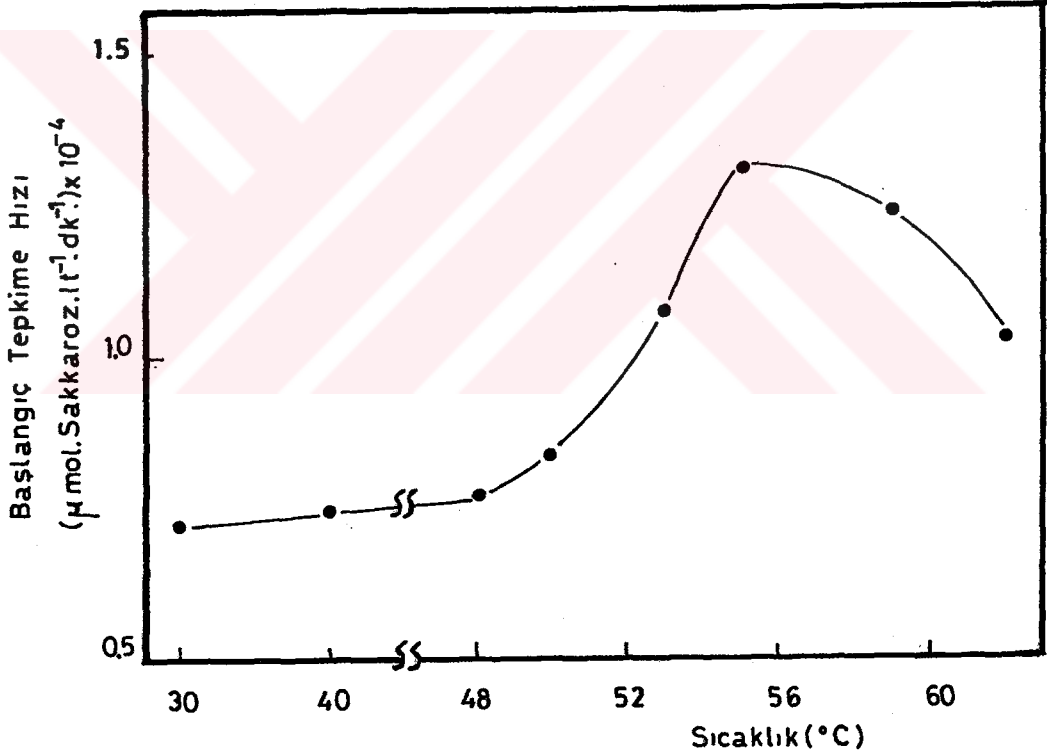


Şekil (6-1) : Başlangıç tepkime hızının pH ile değişimi
 $[S]_0 = 0.5768$ M.Sakkaroz, $[W] = 45.9292$ M. Su
 $[E]_0 = 50$ mg. İvertaz/lt., $T=55^\circ\text{C}$, Tepkime hacmi=400 ml., Karıştırma hızı=300 dev./dk.

olarak alınmış ve diğer çalışmaların tümü pH = 4.5'ta yürütülmüştür. Bu değer, değişik çalışmaların sonuçlarıyla da uyum sağlamaktadır (21, 29, 34, 46).

6.3. Sakkaroz Hidrolizinde Sıcaklık Etkileri

Genel olarak enzimli tepkimelerde, sıcaklık artışı ile tepkime hızı önce artar ve bir maksimum vererek daha sonra azalır. Bu çalışmada da, serbest invertaz ile yapılan deneyler sonucunda 30-45°C. aralığında tepkime hızının çok fazla değişmediği, 45°C.dan sonra ani olarak arttığı ve 55°C.'da maksimum vererek hızla düştüğü gözlenmiştir. Şekil (6-2)'de de



Şekil (6-2): Başlangıç tepkime hızının sıcaklıkla değişimi.

$[S]_0 = 0.5766M$. Sakkaroz, $[W] = 45.9292 M$. Su,

$[E]_0 = 50$ mg. İvertaz/lt., pH=4.5,

Tepkime hacmi = 400 ml.

Karıştırma hızı = 300 dev./dk.

görüldüğü gibi 55°C. belirgin bir dönüm noktasıdır ve bu değer en uygun sıcaklık olarak alınabilir. Daha yüksek sıcaklıklarda tepkime hızında görülen düşüşün nedeni, enzimin denatüre olarak aktivitesini kaybetmesidir.

Bugüne kadar sıcaklığın değişik kaynaklı serbest invertaz aktiviteleri üzerine etkileri oldukça fazla tartışılmış ve bu çalışmada gözlenen değişime benzer sonuçlar elde edilmiştir (21, 29, 34, 46).

6.4. Sakkarozun Hidroliz Kinetiği

Sakkarozun invertaz ile hidrolizinde başlangıç tepkime hızının tepkiyen derişimiyle değişimi pH=4.5 ve T=55°C. koşullarında incelenmiştir. Çalışılan 0.0361-1.1390 M. Sakkaroz derişim aralığında elde edilen başlangıç tepkime hızı değerleri Çizelge (6-1)'de verilmiştir.

Çizelge (6-1): Başlangıç tepkime hızının tepkiyen derişimi ile değişimi.

Sakkaroz Derişimi (M)	Başlangıç tepkime hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz.lit.}^{-1}\text{dk.}^{-1}) \times 10^4$
0.0361	0.2778
0.0723	0.4861
0.1084	0.6205
0.1443	0.7639
0.2169	0.9722
0.2873	1.0556
0.4333	1.2500
0.5768	1.2418
0.7194	1.2346
0.8608	1.2073
0.9450	1.1364
1.0282	1.0918
1.1390	1.0069

Bu deneyler sırasında uygulanan diğer işletme koşulları ise, Karıştırma hızı = 300 dev./dk., Tepkime hacmi = 400 ml. ve $[E]_0 = 50$ mg. İvertaz/lt.'dir.

Buradan sonraki bölümlerde; elde edilen bu deneysel sonuçları açıklayabilecek değişik kinetik modeller ayrı ayrı ele alınmış ve deneysel verilere uygunluk açısından tartışılmıştır.

6.4.1. Michaelis-Menten Kinetiği

Michaelis - Menten kinetiği enzim kinetiğinde yaygın olarak uygulanan ve bu nedenle grafik çözümlerin temelini oluşturan önemli bir yaklaşımdır. Bölüm : 2.2.3'de ayrıntılı olarak anlatılan bu modelde başlangıç tepkime hızı [Eşitlik(2-19)],

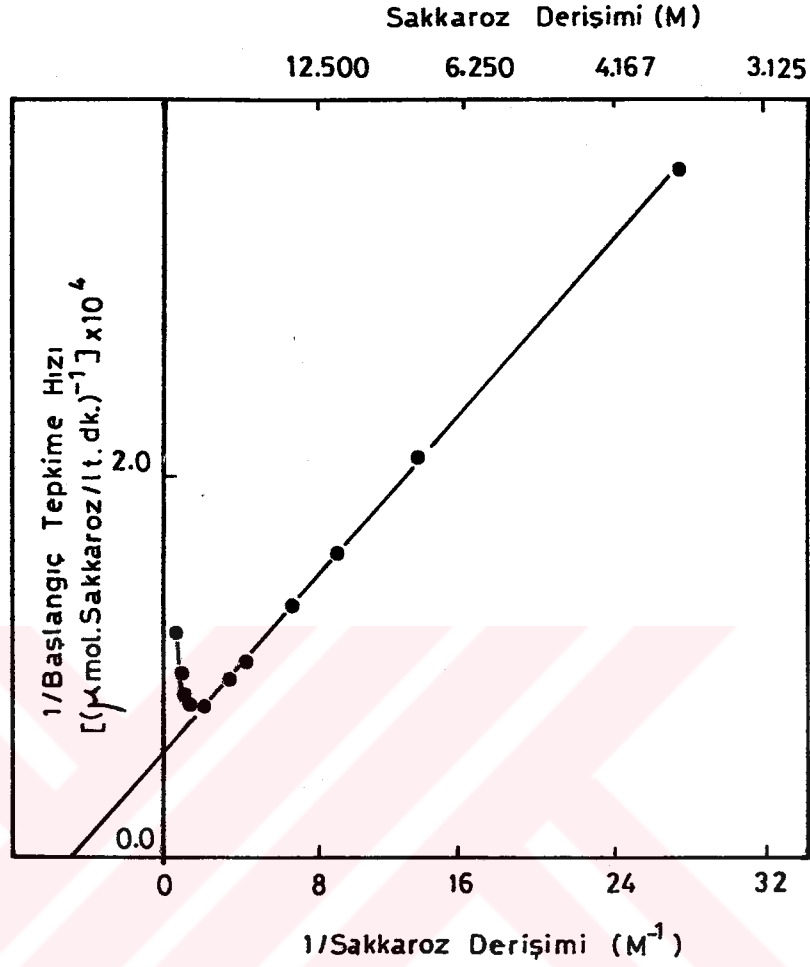
$$r = \frac{r_m [S]}{K_s + [S]}$$

veya doğrusallaştırılmış Lineweaver - Burk biçiminde [Eşitlik (2-20)],

$$\frac{1}{r} = \frac{K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{r_m}$$

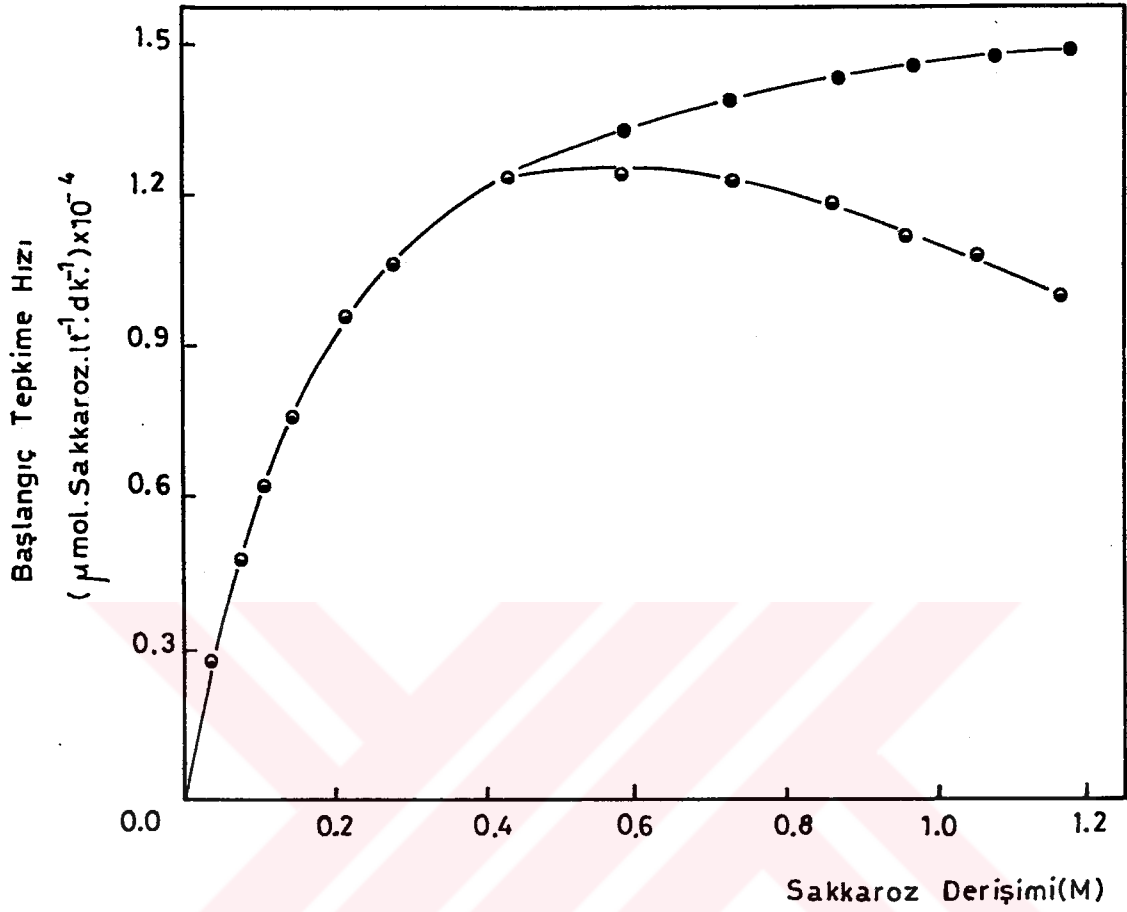
bağıntılarıyla verilir.

Bu bağıntı kullanılarak tepkime hızlarının hesaplanması bağıntıdaki kinetik sabitlerin bulunması gerekir. Bu amaçla çizilen Şekil (6-3) Lineweaver - Burk grafiğinde görüldüğü gibi deneysel sonuçlar doğrusallıktan



Şekil (6-3) Serbest invertaz için Lineweaver Burk grafiği
 pH = 4.5, T= 55°C, Tepkime hacmi = 400 ml.,
 Karıştırma hızı = 300 dev./dk,
 $[E]_0 = 50$ mg. İvertaz/lt.,
 (Doğrusal bölge için korelasyon katsayısı = 0.9994)

sapmaktadır. Ancak, doğrusal bölgenin dikkate alınmasıyla bu kinetik sabitler, Michaelis sabiti, $K_s = 0.1800M$. Sakkaroz ve maksimum tepkime hızı, $r_m = 1.7241 \times 10^4 \mu\text{mol. Sakkaroz.lt.}^{-1}\text{dk.}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değerlerin kullanılmasıyla değişik sakkaroz derişimlerinde bağıntıdan hesaplanan tepkime hızı değerleri ile deneysel hızlar Şekil (6-4)'de görülmektedir.



Şekil (6-4) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi

(●) : Michaelis-Menten bağıntısı ile hesaplanan değerler,

(○) : Deneysel değerler.

(Deney koşulları Şekil (6-3)'deki ile aynıdır.)

Görüldüğü gibi sakkaroz-invertaz sisteminde başlangıç tepkime hızının tepkiyen derişimiyle değişimi belli bir sakkaroz derişimine (0.43M) kadar Michaelis-Menten kinetiğine uymakta, fakat daha yüksek tepkiyen derişimlerinde tepkime hızında gözlenen düşme bu kinetik ile açıklanamamaktadır. Bu durum Bölüm: 4.1'de tartışıldığı gibi yüksek

sakkaroz derişimlerinde serbest su derişimindeki azalmadan ileri gelebilir. Bu nedenle, suyun ikinci bir tepkiyen olarak dikkate alınmasıyla serbest su derişimindeki düşmenin Michaelis-Menten Kinetiği'ne etkisinin öncelikle araştırılması ve ilgili bağıntıdan hesaplanan tepkime hızlarının deneysel sonuçlarla karşılaştırılması yararlı olacaktır.

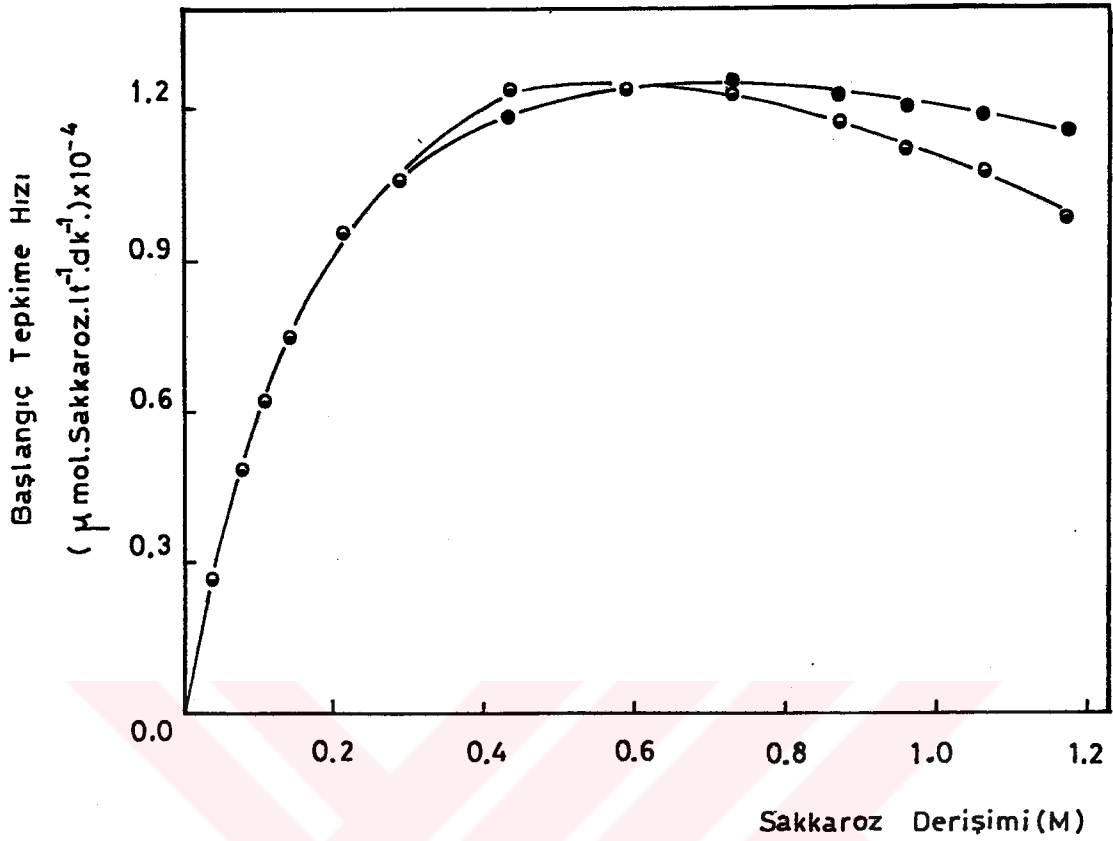
6.4.2. Su Derişiminin Michaelis-Menten Kinetiği'ne Etkisi

İnvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde serbest su derişimi, sakkaroz derişimi artışıyla hem çözücü (su) derişiminin azalması, hem de sakkaroz moleküllerinin tepkime ortamındaki su moleküllerini hidrojen bağı ile bağlaması nedeniyle düşmektedir (7,10). Serbest su derişiminin ikinci bir tepkiyen olarak ele alındığı durumda başlangıç tepkime hızı için [Bkz. EK:I.1., Eşitlik (I-8)],

$$r = \frac{r_m [S] [W_F]}{K_s + [S] [W]_0}$$

bağıntısı elde edilir (Bkz. Bölüm: 3.2.6 ve EK : I.1).

Şekil (6-5) incelendiğinde Eşitlik (I-8) bağıntısından hesaplanan tepkime hızlarının yüksek sakkaroz derişimlerinde yine deneysel değerlerden büyük değerler verdiği ve yeteri kadar uyum sağlanamadığı görülür. Eşitlik (I-8)'de tepkime hızlarının hesaplanması için kullanılan kinetik sabitler EK : I.1'de anlatıldığı biçimde bulunmuş, Michaelis sabiti, $K_s = 0.2340 \text{ M}$, $r_m = 2.0969 \times 10^4 \mu\text{mol}$. Sakkaroz $\text{lt}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak elde edilmiştir.



Şekil (6-5) : Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi.

(○): Deneysel değerler,

(●): Su derişimi etkisi dikkate alındığında Michaelis-Menten bağıntısından hesaplanan değerler.

pH = 4.5, T = 55°C, Karıştırma hızı = 300 dev./dk,

Tepkime Hacmi = 400 ml.,

[E]₀ = 50 mg. İvertaz/lt.

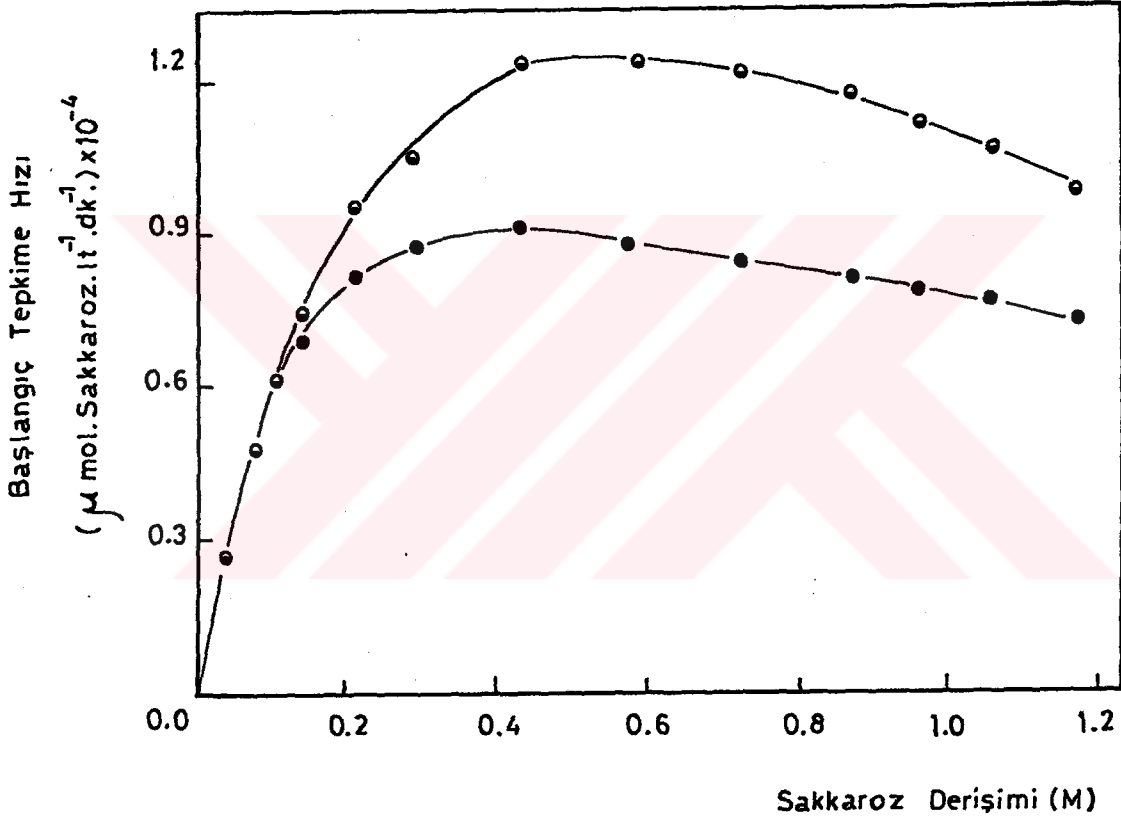
6.4.3. Sakkaroz İnhibisyonu

Enzimli tepkimelerde yüksek tepkiyen derişimlerinde başlangıç tepkime hızındaki düşmenin önemli bir nedeni de tepkiyen inhibisyonudur. Sakkaroz-invertaz hidroliz sisteminde hızın düşmesi sakkaroz inhibisyonunun sonucu olabilir Bu inhibisyon

için Laidler'in önerdiği mekanizmaya dayalı olarak tepkime hızı için [Bkz. EK : I-2, Eşitlik (I-16)],

$$r = \frac{r_m K_t K_s' [S]}{K_t [S]^2 + K_s' (K_s + K_t) [S] + K_s K_s' K_t}$$

bağıntısı elde edilir (Bkz. Bölüm 3.2.6 ve EK : I.2). Bu bağıntıya göre hesaplanan tepkime hızı değerleri ve deneysel değerler Şekil (6-6)'da görülmektedir.



Şekil (6-6) Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi

(●): Deneysel değerler,

(●): Sackaroz inhibisyonu dikkate alındığında hesaplanan değerler.

pH=4.5, T=55°C, Karıştırma Hızı=300 dev/dk.

Tepkime Hacmi=400 ml. [E]₀ = 50 mg. İnvertaz/lt.

Sadece tepkiyen inhibisyonu dikkate alındığında başlangıç tepkime hızındaki değişmelerin tam olarak açıklanamadığı görülmektedir. Düşük sakkaroz derişimlerinde ($<0.14 M$) deneysel değerlere uyum gösteren bu kinetik yaklaşım yüksek sakkaroz derişimlerinde düşük hız değerleri verirken deneysel değerlerden oldukça büyük sapmalar göstermektedir.

Sakkaroz inhibisyonu bağıntısından tepkime hızı değerinin hesaplanmasında kullanılan kinetik sabitler EK: I-2 de belirtildiği biçimde, bir takım ihmallerle uygulanan grafik çözüm sonucunda,

$$r_m K_s' = 0.01705 \text{ (mol. sakkaroz)}^2 / \text{lt}^2 \text{ dk.}, \quad \dots(6-1)$$

$$K_s / r_m = 10.85 \text{ dk.}, \quad \dots(6-2)$$

$$\frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right) = 58.70 \text{ lt. dk./mol. Sakkaroz} \dots(6-3)$$

olarak bulunmuştur.

6.4.4. Su Derişimi ve Sakkaroz İnhibisyonunun Tepkime Hızına Birlikte Etkileri

Bu bölüme kadar birbirinden ayrı olarak ele alınan serbest su derişimindeki düşme ve sakkaroz inhibisyonu etkileri sakkarozun enzimatik hidroliz kinetiğini tam olarak açıklayamamıştır. İvertaz-sakkaroz sisteminde bu iki etki birlikte göz önünde tutulduğunda başlangıç tepkime hızı için Eşitlik (4-8) ,

$$r = \frac{r_m K_t K_s' [S]}{K_t [S]^2 + K_s' (K_s + K_t) [S] + K_s K_t K_s'} \frac{[W_F]}{[W]_0}$$

elde edilmiştir (Ayrıntılı açıklama için Bkz. Bölüm : 4.2). Bu bağıntıda $[W_F]$ serbest su derişimi olarak tanımlanmış ve sakkarozun 55°C 'daki yoğunlukları kullanılarak hesaplanmıştır (Bkz. EK: III.1 ve EK : III.2). Bu bağıntıya göre tepkime hızı değerlerinin bulunabilmesi için bağıntıdaki kinetik sabitlerin saptanması gerekir. Bunun için tepkime hızı eşitliği doğrusallaştırıldığında,

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0}{r_m K_s} [S] + \frac{[W]_0 K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_0}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right)$$

bağıntısı elde edilir. Bu bağıntıdan ihmaller yapılmadan grafik çözümle katsayıların bulunması imkansızdır. Bu nedenle bağıntı $y = B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_0$ biçiminde düzenlenmiş ve çoklu doğrusal regresyon analizi (Bkz. Bölüm : 4-3) kullanılarak eşitlikte yer alan katsayılar hesaplanmıştır. Bu katsayılar ve hesaplanan değerleri Çizelge (6-2)'de verilmiştir.

Çizelge (6-2): Hesaplanan Katsayılar ve t-Oranları

Sıra No.	Değişken (X)	Katsayı (B)	Katsayı Değeri	(*) t-Oranı
0	-	$\frac{[W]_0}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right)$	2449,58	19.8577
1	[S]	$\frac{[W]_0}{r_m K_s}$	330.54	2.1247
2	$\frac{1}{[S]}$	$\frac{[W]_0 K_s}{r_m}$	619.05	77.0446

(*) t-oranı katsayısının standart hatasına oranı olarak tanımlanmıştır.

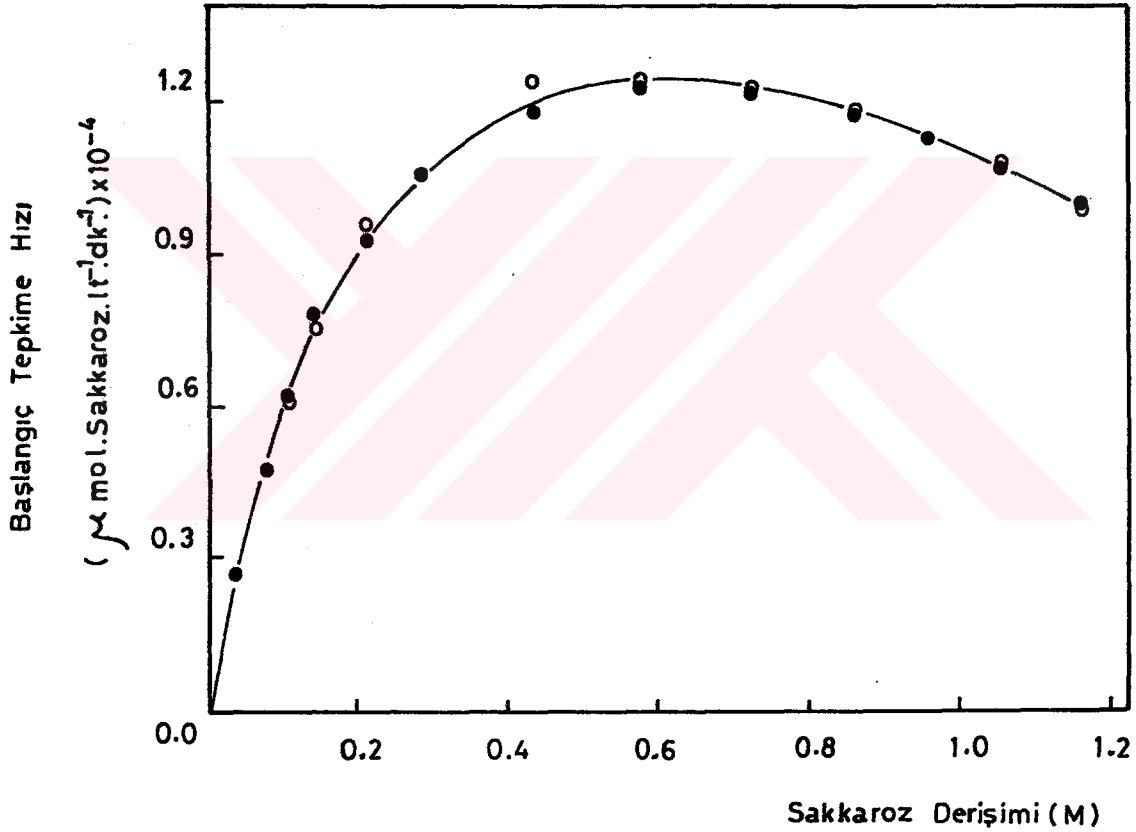
Su derişimi 55°C 'da $[W]_0 = 54.8194$ M. olarak alınır-
sa, invertaz-sakkaroz hidroliz sistemindeki kinetik sabit-
ler için,

$$r_m^{K_s'} = 0.1659 \text{ mol}^2 \cdot \text{lt}^{-2} \cdot \text{dk}^{-1}, \quad \dots(6-4)$$

$$\frac{K_s + K_t}{K_s K_t} = 3.9570 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{lt.}, \quad \dots(6-5)$$

$$K_s K_s' = 1.8728 \text{ mol}^2 \cdot \text{lt}^{-2}, \quad \dots(6-6)$$

bağlantıları verilebilir. Bu değerlerin Eşitlik (4-8)'de kullanılmasıyla değişik sakkaroz derişimleri için bağıntıdan hesaplanan tepkime hızları ve deneysel değerler Şekil (6-7) ve Şekil (6-8)'de görülmektedir. Serbest su derişimi düşmesi



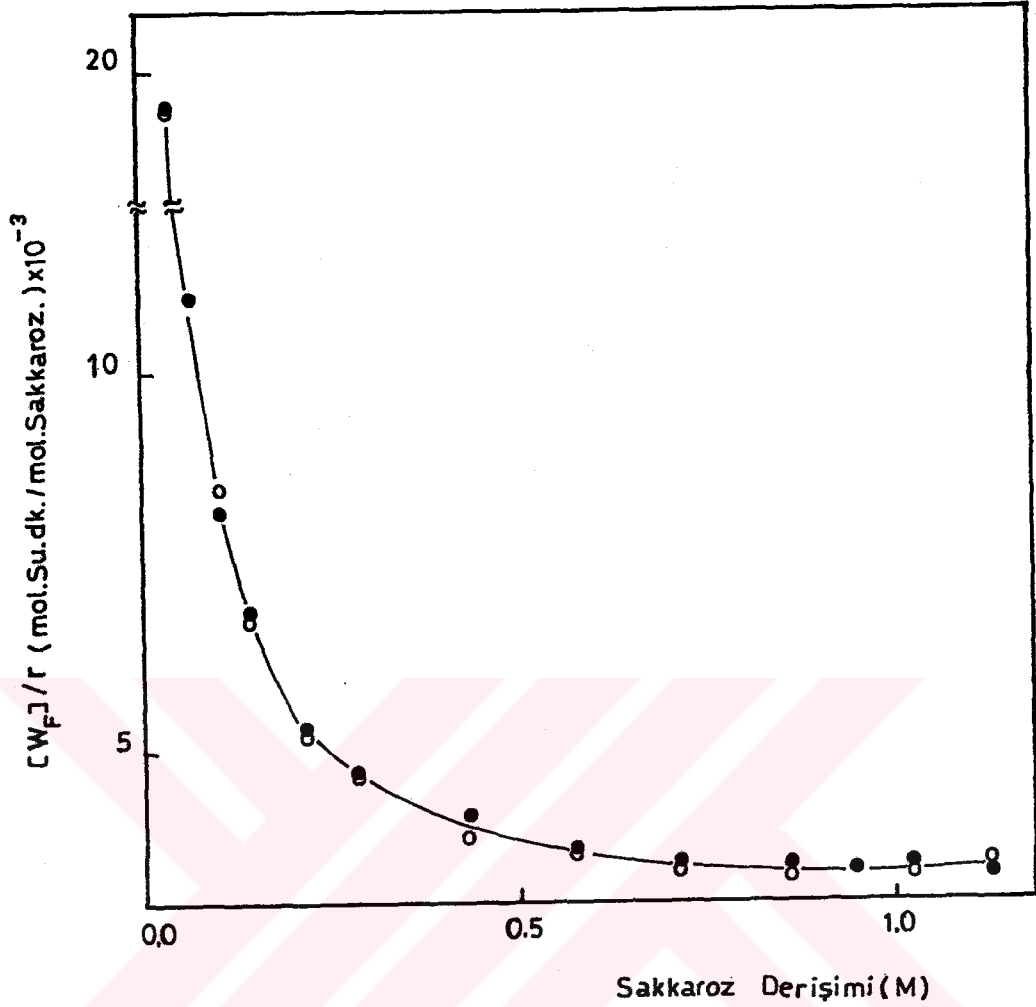
Şekil (6-7): Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi.

(o) : Deneysel değerler,

(●) : Serbest su derişimi ve sakkaroz inhibisyonu etkileri birlikte ele alındığında hesaplanan değerler.

pH=4.5, T=55°C, Karıştırma hızı=300 dev./dk,

Tepkime hacmi=400 ml., [E]₀=50 mg. invertaz/lt..



Şekil (6-8) : $[W_F]/r$ 'nin sakkaroz derişimi ile değişimi

(o) : Deneysel değerler

(●) : Serbest su derişimi ve sakkaroz inhibisyonu etkileri birlikte ele alındığında hesaplanan değerler.

(Deneysel koşullar Şekil (6-7) ile aynıdır.)

ve sakkaroz inhibisyonu etkilerinin birlikte ele alındığı kinetik modele göre hesaplanan tepkime hız değerleri tüm sakkaroz derişimlerinde (0.0361-1.1390 M) iyi bir uyum göstermektedir. (Hesaplanan $\frac{[W_F]}{r}$ değerlerinin deneysel değerlerden sapma oranları EK : III.4'de verilmiştir.)

Bu sonuca ulaşılmada kullanılan çoklu doğrusal regresyon analizinin sonuçları üzerinde biraz daha durmak yararlı olacaktır. Bu regresyon analizi sonucunda hesaplanan çoklu determinasyon katsayısı, $r^2 = 0.9991$ 'dir. Bunun anlamı, bağımlı değişken $[W_F]/r$ 'deki değişimlerin % 99.91'-inin $1/[S]$ ve $[S]$ 'deki değişimler ile açıklanabileceğidir. Ayrıca, bağımlı değişken ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin sıklılığının ölçüsü olan çoklu korelasyon katsayısı, $r=0.9995$ olarak hesaplanmıştır. Bu çok önemli iki bulgunun sonucunda, invertaz-sakkaroz sistemi için önerilen mekanizma gereği hesaplanan kinetik sabitlerin kesinliklerini iyi ve çalışan sakkaroz derişimi aralığında açıklayıcı olduğu söylenebilir.

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak geçerliliği, uygulanan von-Neuman testi ile saptanmıştır (Bkz. EK : III.5). Bu test sonucunda 1.2062-3.1928 aralığında olması gereken v-oranı için 1.6697 bulunmuştur. Bu değer bu bölümde şimdiye kadar verilen tüm sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olduğunun bir göstergesidir.

Daha önce yapılan araştırmalarda kinetik sabitlerin hesaplanmasında kullanılan grafiksel çözümler yüksek sakkaroz derişimlerinde $[W]_o K_s / r_m [S]$ teriminin düşük sakkaroz derişimlerinde ise $[W]_o [S] / r_m K_s$ teriminin ihmal edilmesine dayalıdır (Bkz. Bölüm 4.2 ve 4.3). Bu çalışmada ise, bu türden ihmallere gerek duyulmadan çoklu doğrusal regresyon analizi uygulanarak kinetik sabitler bulunmuş ve geniş sakkaroz derişimi aralığında geçerli olan tepkime hızı bağıntısı geliştirilmiştir. Şimdi bu bağıntıdan yararlanarak düşük ve yüksek yöntemlerinde ihmal edilen terimlerin önem (ağırlık) oranlarına (significant ratio) bakalım:

Çizelge (6-4) incelendiğinde düşük sakkaroz derişimlerinde (< 0.5768 M.) $[W]_o [S] / r_m K_s$ teriminin çok önemli olmamasına karşın, yüksek sakkaroz derişimlerinde $[W]_o K_s / [S] r_m$

Çizelge (6-4) : İvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde yapılan ihmallerin $[W_F]/r$ değerine etkisi.

Sakkaroz Derişimi (M)	Önem Oranı (1)* (%)	Önem Oranı (2)** (%)
0.0361	0.06	
0.0723	0.21	
0.1084	0.43	> 100
0.1443	0.70	
0.2169	1.35	
0.2873	2.06	84.66
0.4333	3.69	55.15
0.5768	5.41	40.56
0.7194	7.18	32.02
0.8608	8.98	26.26
0.9460	10.06	23.76
1.0282	11.14	21.53
1.1390	12.57	19.28

$$* : \text{Önem Oranı (1)} = \frac{[W]_o [S]/r_m K_s'}{[W]_o K_s/r_m [S] + ([W]_o/r_m)(1 + \frac{K_s}{K_t})} \times 100$$

olarak tanımlanmıştır ve düşük sakkaroz derişimlerinde $[W]_o [S]/r_m K_s'$ teriminin önem oranıdır.

$$** : \text{Önem Oranı (2)} = \frac{[W]_o K_s/r_m [S]}{[W]_o [S]/r_m K_s' + [W]_o/r_m(1 + \frac{K_s}{K_t})} \times 100$$

olarak tanımlanmıştır ve yüksek sakkaroz derişimlerinde $[W]_o K_s/r_m [S]$ teriminin önem oranıdır.

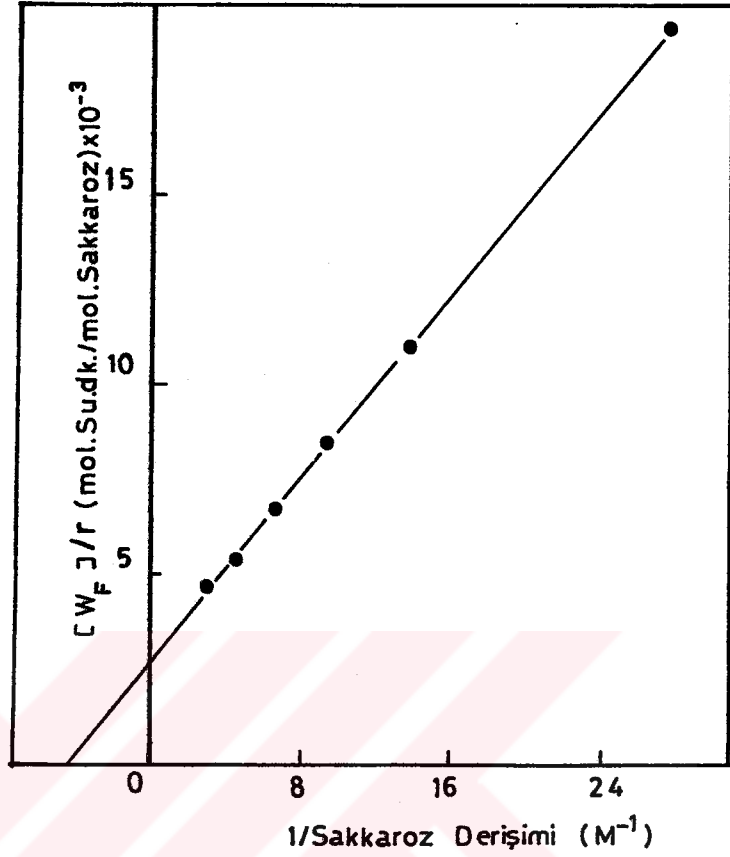
terimi oldukça önemlidir. Örneğin, 1.1390 M.'lık yüksek sakkaroz derişiminde bile $|W|_o K_s / r_m |S|$ teriminin önem oranı % 19.28'dir. $|W|_o |S| / r_m K_s'$ teriminin 0.5768 M. Sakkaroz derişimine kadar önem oranı en fazla % 5.41'dir. 0.5768 M. ve daha düşük sakkaroz derişimlerinde bu terimin ihmal edilebilmesiyle,

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_o K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_o}{r_m K_s'} [S] + \frac{[W]_o}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right)$$

genel hız bağıntısı [Eşitlik (4-9)],

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_o K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_o}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right) \dots(6-7)$$

biçimine dönüşür. Düşük sakkaroz derişimlerinde, bu eşitliğe göre, $[W_F]/r$ kş $1/[S]$ çizildiğinde bir doğru elde edilmelidir. Bu doğrunun eğim değeri $[W]_o K_s' / r_m$ ordinat kesim noktası ise, $[W]_o (1 + K_s / K_t) / r_m$ 'ı verecektir. Grafik çözümleme sonucunda bulunan bu değerler çoklu doğrusal regresyon analizi ile saptanan katsayılar (B_1 ve B_0) yaklaşık eşit olmalıdır. Bu düşünceden hareketle, önem oranının % 2.06 olduğu 0.0361 - 0.2873 M. Sakkaroz derişimi aralığında yapılan grafiksel çözümde bir doğru elde edilmiş [Şekil (6-9)] ve Eşitlik (6 - 7)'de yer alan kinetik sabitleri içereceğine bağıntılar Eşitlik (6 - 8) ve Eşitlik (6 -9)'da verildiği biçimde,



Şekil (6-9) : $\frac{[W_F]}{r}$ kş. 1/Sakkaroz derişimi değişimi (Deney koşulları Şekil (6-7) ile aynıdır.)

$$\frac{[W]_0 K_s}{r_m} = 611.71 \quad \dots (6-8)$$

$$\frac{[W]_0}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right) = 2614.28 \quad \dots (6-9)$$

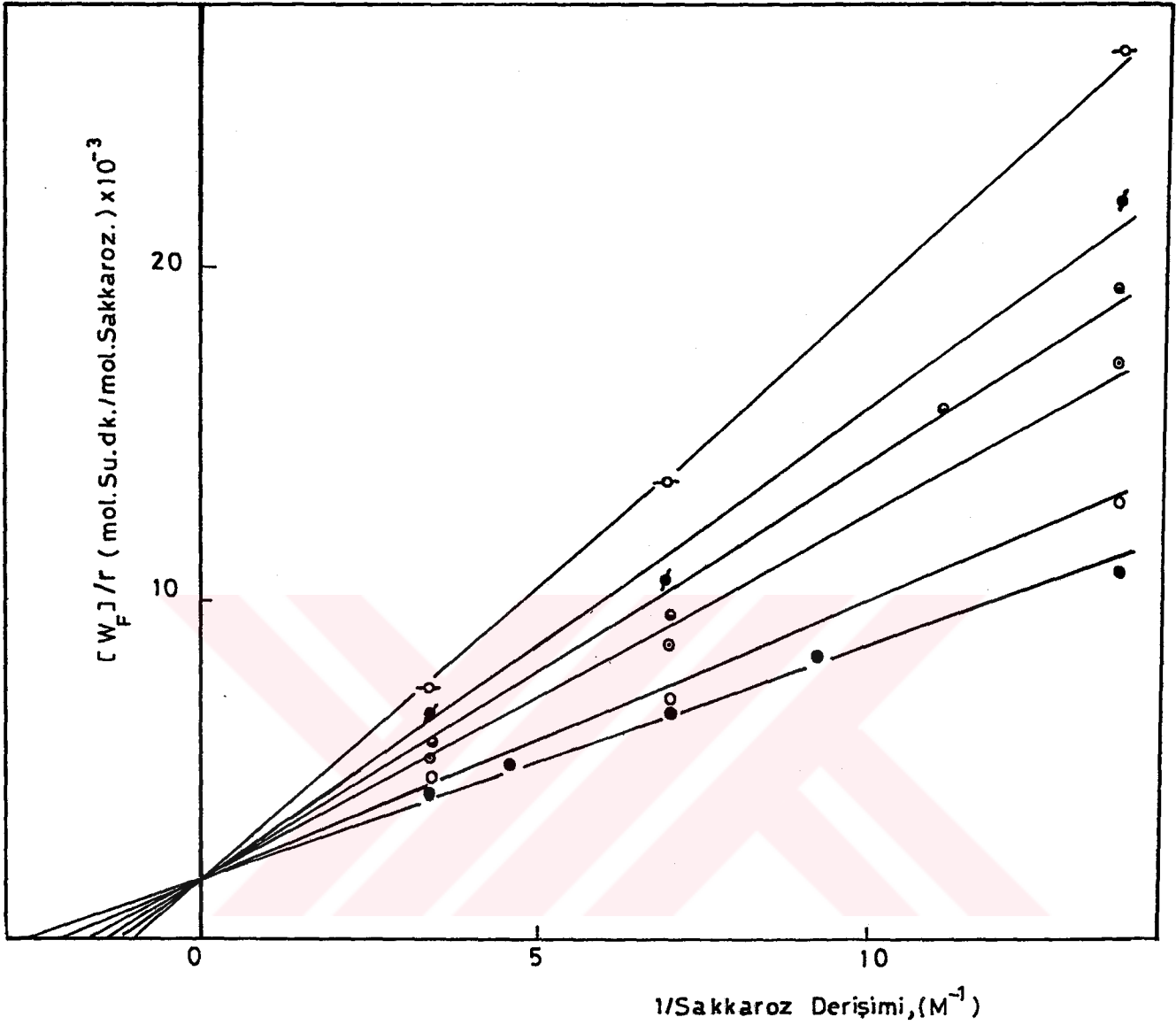
olarak bulunmuştur. Bu değerler gerçekten çoklu doğrusal regresyon analizi ile elde edilen değerlere çok yakındır [Bkz. Çizelge (6-2)]. Öte yandan, bu derişim aralığında, tepkime hızları, sadece su derişimi etkisinin dikkate alındığı Michaelis-Mente nkinetiği ile açıklanabilmekte deneysel ve ilgili bağıntıdan hesaplanan tepkime hızları uyum içinde olmaktadır [Bkz. Şekil (6-5)].

Bu nedenle 0.0361-0.2873 M. Sakkaroz.derişimi aralığında, tepkiyen inhibisyonuna yol açan tepkimelerin ihmal edilebilecek düzeylerde olduğu kabul edilebilir.

6.5. Su Derişiminin Ürün İnhibisyonuna Etkisi

Enzim sistemlerinde elde edilen ürünlerin tepkime hızını düşürücü etkileri olabilir ve buna ürün inhibisyonu denir (Bkz. Bölüm : 2.3.4). Sakkaroz-invertaz sistemi için aynı türden bir etkinin varlığı değişik çalışmalarda su derişimi etkileri dikkate alınmadan araştırılmış ve bu amaçla sabit sakkaroz derişiminde başlangıçta değişik derişimlerde ürün (D-Fruktoz) içeren ortamlar hazırlanarak elde edilen başlangıç tepkime hızları karşılaştırılmıştır. Serbest su derişiminin ve ürün inhibisyonunun tepkime hızına birlikte etkilerinin ele alındığı bu çalışmada deneyler tepkiyen inhibisyonunun ihmal edilebildiği (Maksimum önem oranı % 1.35, Bkz. Bölüm : 6.4.4) sakkaroz derişim aralığında (0.0723-0.2169 M.) gerçekleştirilmiştir. Kullanılan D-Fruktoz derişimi aralığı ise 0-0.4386M.'-dir.

Bir dizi deney sonucunda elde edilen başlangıç tepkime hızları kullanılarak $\frac{[W_F]}{r}$ kş. 1/Sakkaroz derişimi çizildiğinde Şekil (6-9)'deki değişim elde edilir. $[W_F]$ değerleri 55°C. daki sakkaroz çözeltilerinin yoğunlukları kullanılarak hesaplanmıştır (Bkz. EK : III.1). Şekil (6-10) incelendiğinde elde edilen doğruların $\frac{[W_F]}{r}$ ekseninde aynı noktada keşsettikleri görülür. Diğer bir deyişle artan D-Fruktoz (inhibitör) derişimi ile r_m değerinin sabit kalmasına karşın K_{sg} değeri artış gösterir. Bu durum, sakkarozun invertazla hidrolizinde ürün D-Fruktoz'un yarışmalı inhibisyona neden olduğunu gösterir (Bkz. Bölüm : 4.4). Artan D-Fruktoz derişimi ile değişen K_{sg} değerleri Çizelge (6-5)'de verildiği gibidir.



Şekil (6-10): Ürün inhibisyonu.

pH= 4.5, T=55°C, Karıştırma hızı= 300 dev./dk., Tepkime hacmi = 400 ml.

D-Fruktos derişimleri (I_o): (●):0-0000 M,
 (○) : 0.1462 M., (⊙) : 0.3000 M.,
 (◐) : 0.3500 M., (◑) : 0.4000 M.,
 (◒) : 0.4386 M.'dir.

Çizelge (6-5) : Serbest invertaz için D-Fruktoz derişiminin Ksg'ye etkisi; pH=4.5, T=55°C

D-Fruktoz Derişimi (M)	Ksg (M)
0.1462	0.7631
0.3000	1.1817
0.3500	1.4629
0.4000	1.6269
0.4386	2.1798

6.6. Invertazın Deaktivasyonu

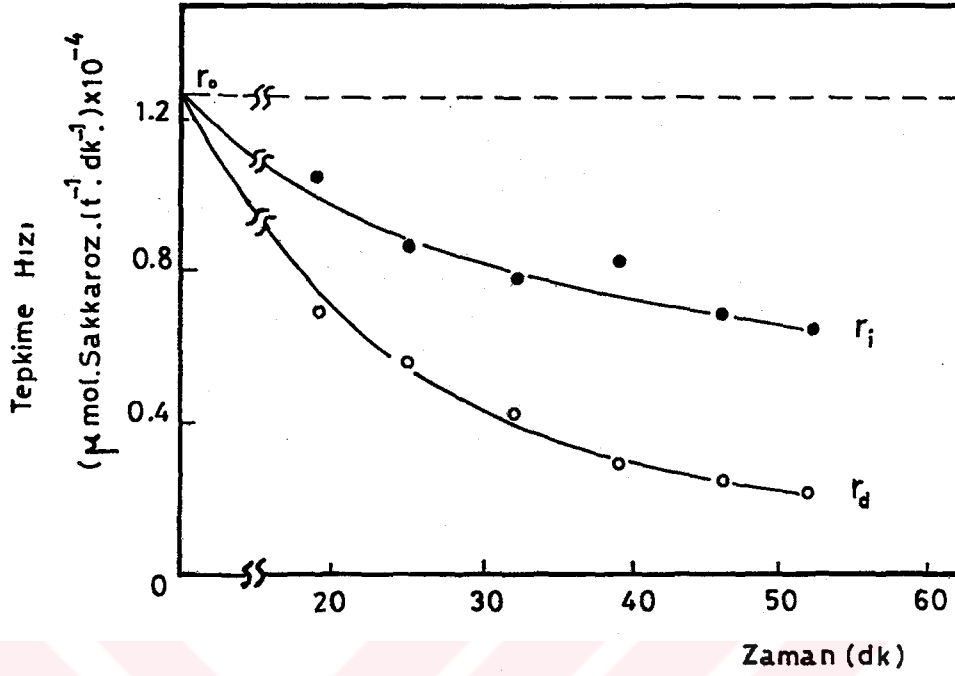
Enzimlerin deaktivasyonu çoğunlukla üstel deaktivasyon modeli ile açıklanır (Bkz. Bölüm : 2.4.1). Ürün inhibisyonu etkisinin ve tepkiyen inhibisyonunun ihmal edilebildiği durumlarda geçerli olan bu model bazı enzimler için açıklayıcı olamamaktadır (42, 43, 46). İvertazın deaktivasyonu kesikli düzende incelendiğinde, tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkileri nedeniyle bu modelden sapma görülmektedir. İvertaz-sakkaroz sistemi için üstel deaktivasyon modeli [Eşitlik (2-41)] kısa zaman aralıklarında doğrudan uygulandığında değişik başlangıç tepkiyen derişimleri için farklı görünür deaktivasyon sabitleri (k_{dg}) bulunmuştur [Çizelge (6-6)]. Üstel deaktivasyon modelinden sapmanın başka bir göstergesi de kesikli tepkime kabında uzun süre çalışıldığında tepkiyen azalmasından ötürü belirli zaman aralıkları için farklı deaktivasyon sabitlerinin saptanmasıdır (15). Birinci dereceden deaktivasyon modeli herhangi bir ön işlem yapılmadan uygulandığında bulunan deaktivasyon sabitleri tepkiyen azalması, ürün inhibisyonu ve işletme koşullarındaki enzim deaktivasyonunun bileşimini ifade eder. Sadece işletme koşullarına bağlı enzim deaktivasyonunun belirlenmesi ve bununla ilgili

Çizelge (6-6): Görünür deaktivasyon sabitleri (k_{dg}).

Sakkaroz Başlangıç Derişimi (M)	k_{dg} (dk^{-1})
0.0723	0.2022
0.1443	0.1018
0.2169	0.0813
0.2873	0.0701
0.4333	0.0541
0.5768	0.0369
0.7194	0.0303
0.9450	0.0255
1.0282	0.0148
1.1390	0.0111

deaktivasyon sabitinin hesaplanması amacıyla Bölüm (4-5)'de ayrıntıları ile verilen işlem uygulanmıştır. Bu işlem, enzim aktivitesi (a)'nin, deneysel tepkime hızı (r_d)'nin tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkileri altında ulaşılabilecek en yüksek tepkime hızı (r_i)'na oranı olarak tanımlanmasına ve bu şekilde bulunan aktivitenin üstel deaktivasyon modelinde kullanılmasına dayanır.

Elde edilen r_d ve r_i değerlerinin zamanla değişimi 0.5768 M. Sakkaroz derişimi için incelendiğinde tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkilerini içeren r_i ile bu etkilere ek olarak işletme koşulları deaktivasyonunu da içeren deneysel tepkime hızı r_d arasında belirgin bir fark görülmektedir [Şekil (6-11)]. Herhangi bir anda r_d 'nin daha düşük olması enzim deaktivasyonunun bir sonucu olmakta ve bu fark deaktivasyona karşı gelmektedir.



Şekil (6-11): Tepkime hızının zamanla değişimi.

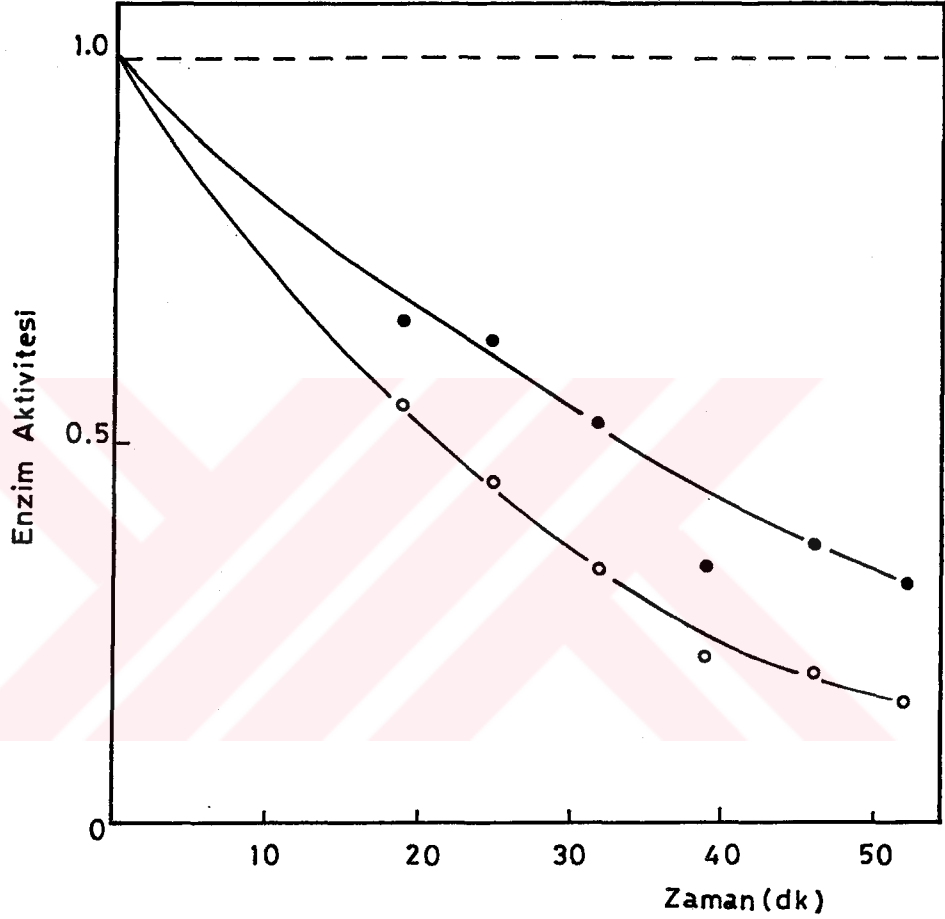
(●): Tepkiyen azalması, ürün inhibisyonu ve enzim deaktivasyonu etkileri altında hızın (r_d) zamanla değişimi,

(○): Tepkiyen azalması, ürün inhibisyonu etkileri altında enzim deaktivasyonu yokken hızın (r_i) zamanla değişimi.

pH = 4.5, T. = 55°C, Karıştırma hızı = 300 dev./dk., Tepkime hacmi = 400 ml., $[E]_0 = 50$ mg. İvertaz/lt., $[S]_0 = 0.5768$ M. Sakkaroz., $[W] = 45.9292$ M. Su.

Benzer farklılık, görünür enzim aktivite ($a_g = r_d/r_0$, r_0 : Başlangıç tepkime hızı) ve gerçek enzim aktivitesi ($a = r_d/r_i$) zamana karşı grafiğe geçirildiğinde de görülmektedir

[Şekil (6-12)]. Değişik şekilde tanımlanan iki enzim aktivitesi arasındaki bu fark, yine tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkilerinin birinde dikkate alınması değerinde alınmamasından kaynaklanmaktadır.



Şekil (6-12) Enzim aktivitesinin zaman ile değişimi.

(●): Gerçek enzim aktivitesi ($a = r_d/r_i$) eğrisi,

(○): Görünür enzim aktivitesi ($a_g = r_d/r_o$) eğrisi,

pH= 4.5, T= 55°C, Karıştırma hızı=300 dev./dk., Tepki-
me hacmi= 400 ml., [E] o = 50 mg. İvertaz/lt.,

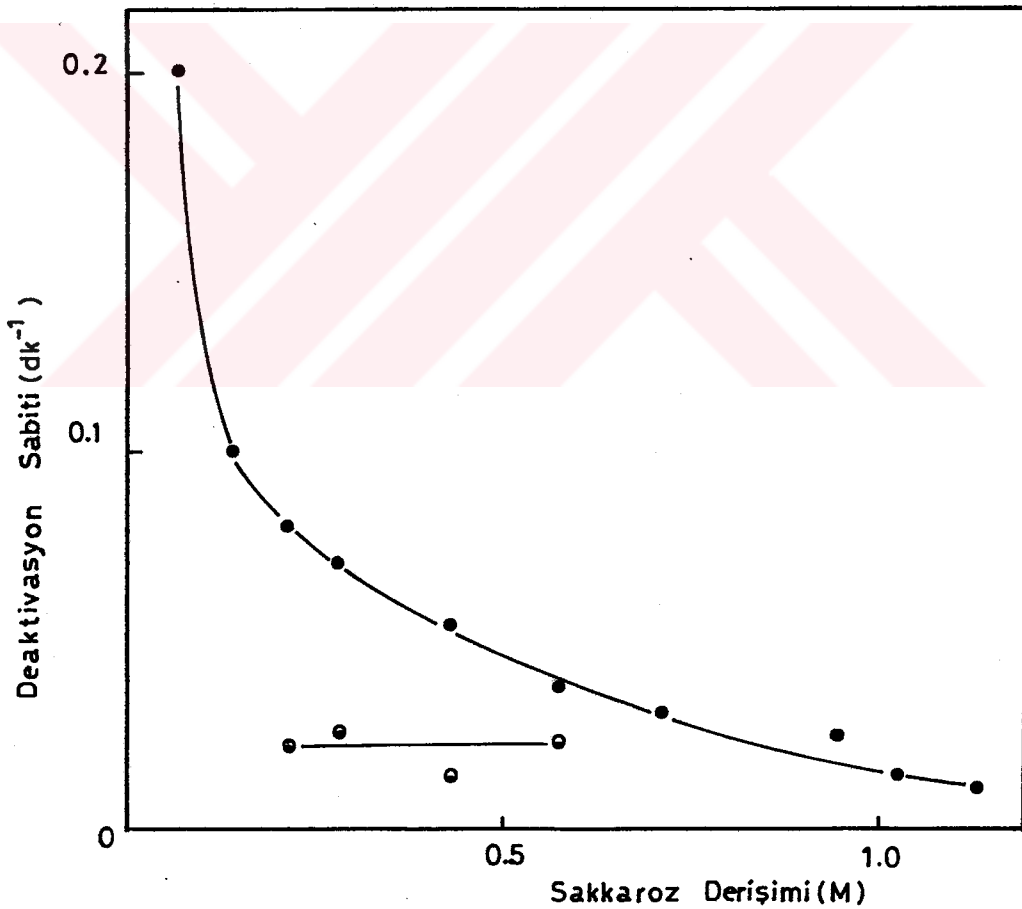
[S] o = 0.5768 M. Sakkaroz, [W] = 45.9292 M. Su

Bu deneysel verilere dayalı olarak uygulanan yöntemle (Bkz. Bölüm : 4-5) özellikle düşük sakkaroz derişimi bölgesinde hesaplanan gerçek deaktivasyon sabitleri Çizelge (6-7)'de verilmiştir. Bu çizelgeye göre, 0.2169-0.5768 M. Sakkaroz

Çizelge (6-7): Gerçek deaktivasyon sabitleri (k_d).

Sakkaroz Başlangıç Değişimi (M)	k_d (dk ⁻¹)
0.2169	0.02254
0.2873	0.02550
0.4333	0.01405
0.5768	0.02410

değişim aralığında elde edilen gerçek deaktivasyon sabitleri birbirine oldukça yakın olup, sakkaroz değişiminden bağımsızdır. Gerçek ve görünür deaktivasyon sabitlerinin tepkiyen değişimi ile değişimi ise Şekil (6-13)'de verilmiştir.



Şekil (6-13): Gerçek ve görünür deaktivasyon sabitlerinin sakkaroz değişimi ile değişimi

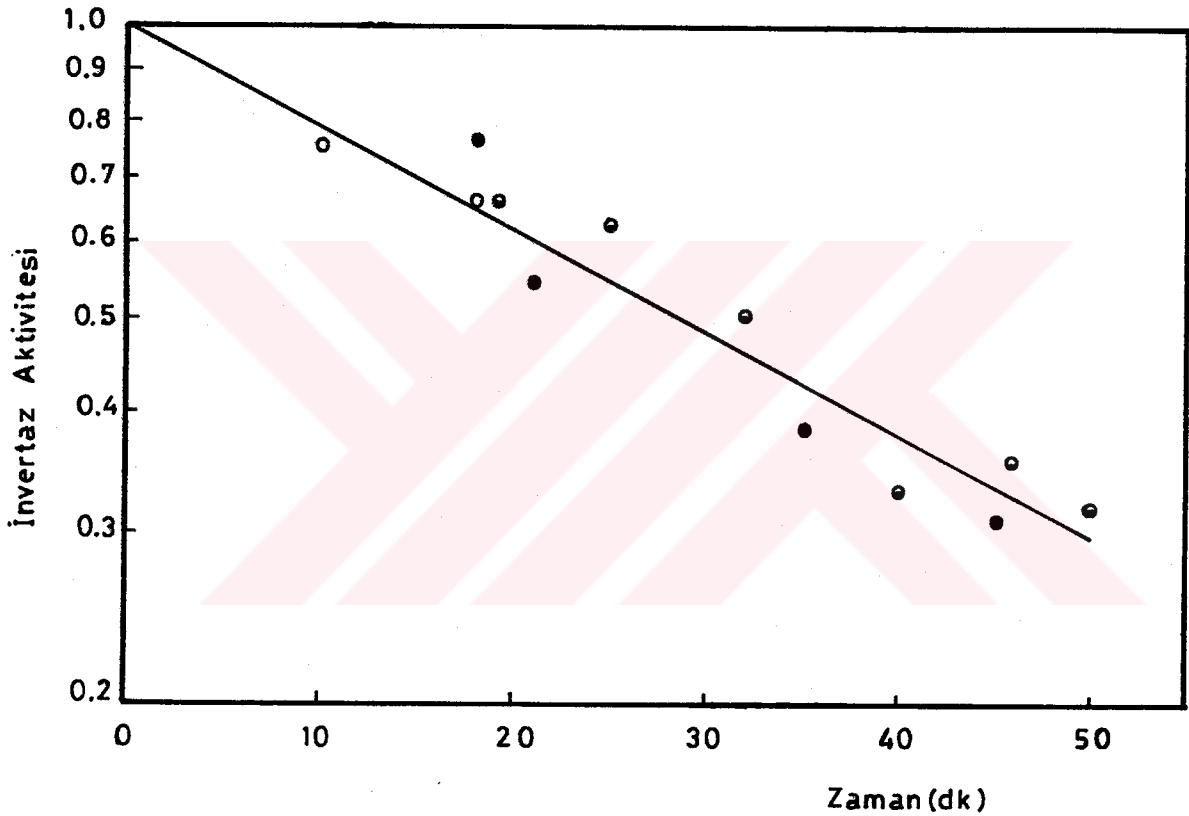
(●): Görünür deaktivasyon sabitleri,

(○): Gerçek deaktivasyon sabitleri.

pH=4.5, T=55°C, Karıştırma hızı=300 dev./dk.,

Tepkime hacmi= 400 ml, [E]₀ = 50 mg. İnvvertaz/lt.

Böylece, tepkiyen derişimi ile değişen görünür deaktivasyon sabitleri (k_{dg}) yerine sadece işletme koşullarına bağlı tek gerçek deaktivasyon sabiti (k_d) elde edilebilmektedir. Değişik başlangıç sakkaroz derişimleri için belirlenen \ln (İnvertaz Aktivitesi) değerleri zamana karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen dağılım [Şekil (6-14)] kullanılarak tek bir gerçek deaktivasyon sabiti bulunabilir. Şekil (6-14)'deki



Şekil (6-14): İnvertaz aktivitesinin zaman ile değişimi.

(o): 0.2169M. Sakkaroz,

(◐): 0.2873M. Sakkaroz,

(●): 0.5768M. Sakkaroz,

(Korelasyon katsayısı=0.9079)

pH=4.5, T=55°C, Karıştırma hızı=300 dev./dk.

Tepkime hacmi=400 ml., $[E]_0 = 50$ mg. İnvertaz/lt.

veriler kullanılarak uygulanan doğrusal regresyon analizi sonucunda gerçek deaktivasyon sabiti, $k_d = 0.02417 \text{ dk}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Bu değerler kullanılarak invertaz aktivite yarı ömrü ise, üstel deaktivasyon modelinden [Bkz. Bölüm : 2-4 ve Eşitlik (2-46)],

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} = 28 \text{ dk. } 40 \text{ sn.} \approx 29 \text{ dk.}$$

olarak bulunmuştur.



7. SONUÇLAR

Sakkarozun serbest maya invertazı ile hidrolizi, kesikli düzende çalışan karıştırmalı bir tepkime kabında incelenmiştir. Deneysel çalışmalar, $T=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4.5$, 300 dev./dk.karıştırma hızında ve 400 ml. tepkime hacminde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile ulaşılan önemli sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. İvertaz-sakkaroz hidroliz sisteminde düşük tepkiyen derişimlerinde bir kısıtlama getirmeyen ve sabit alınan su derişimi, yüksek tepkiyen derişimlerinde oldukça azalır (Bkz. EK: III-2). Serbest su derişimindeki düşme olarak ifade edilebilen bu durum suyun ikinci bir tepkiyen olması nedeniyle hidroliz hızında düşmeye neden olmaktadır [Şekil (6-5)]. Bu nedenle, invertaz-sakkaroz sistemi için ürün inhibisyonu, tepkiyen inhibisyonu ve enzim deaktivasyonu ile ilgili kinetik çalışmalarda göz önünde tutulmalı ve suyun da tepkiyen olarak alınmasıyla gerekli düzeltmeler yapılmalıdır.

2. Tepkiyen inhibisyonu ve serbest su derişimindeki düşmenin etkileri biribirinden ayrı kinetik modeller olarak ele alındığında başlangıç tepkime hızında tepkiyen derişimine bağlı olarak görülen değişim tam olarak açıklanamamıştır [Şekil (6-5) ve Şekil (6-6)]. Düşük tepkiyen derişimlerinde oldukça uyumlu sonuçlar veren her iki model de yüksek tepkiyen derişimlerinde açıklayıcı olamamaktadır.

3. Tepkiyen inhibisyonu ve serbest su derişimindeki düşmenin etkileri bir arada ele alındığında uygulanan "Çoklu Doğrusal Regresyon Analizi" sonuçları başlangıç sakkaroz derişimi ile tepkime hızındaki ($[W_F]/r$) değişimlerin bu iki etki ile açıklanabileceğini ortaya koymuştur. Böylece, önerilen kinetik mekanizmanın ve

$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0}{r_m K'_s} [S] + \frac{[W]_0 K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]_0}{r_m} \left(1 + \frac{K_s}{K_t}\right)$$

şeklinde bulunan tepkime hızı bağıntısının çalışılan tepkiyen derişimi (0.0361-1.1390M. Sakkaroz) aralığında geçerli olduğu belirlenmiştir. Uygulanan analiz sonucunda elde edilen katsayılar kullanılarak, bu mekanizmadaki kinetik sabitler için,

$$r_m K'_s = 0.1659 \text{ mol}^2 \text{ lt.}^{-2} \text{ -dk.}^{-1}$$

$$\frac{K_s + K_t}{K_s K_t} = 3.9570 \text{ mol}^{-1} \text{ lt.}$$

$$K_s K'_s = 1.8728 \text{ mol}^2 \text{ lt.}^{-2}$$

bağıntıları elde edilmiştir. Terim ihmallerine dayalı bölgesel grafik çözümlere gerek duyulmadan elde edilen bu değerler çalışılan sakkaroz derişimi aralığının tümünde geçerlidir.

Bulunan hız bağıntılarından her tepkiyen derişimi için hesaplanan $[W_F]/r$ değerlerinin deneysel değerlerden sapma oranı en fazla % 5.64 (Bkz. EK: III-4) olarak saptanmıştır. Ek olarak, t-oranları [Çizelge (6-2)] dikkate alındığında $[W_F]/r$ 'deki değişimlerin açıklayıcısı olan değişkenlerden $1/[S]$ 'in $[S]$ teriminden daha fazla etkili olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar, başlangıç sakkaroz derişimi ile tepkime hızındaki değişimlerin bu iki etki ile açıklanabileceği, öte yandan diğer araştırmacılar tarafından ileri sürüldüğü gibi (Bkz. Bölüm : 3.2.6) özlüğün bu derişimde etkili diğer bir açıklayıcı değişken olarak alınmasına gerek olmadığını göstermektedir. Ancak özlülük, farklı sakkaroz derişimlerinde serbest su derişimindeki değişimin bir göstergesi olabildiğinden tepkime hızını etkileyen dolaylı bir değişken olabilmektedir.

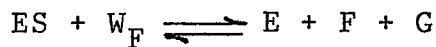
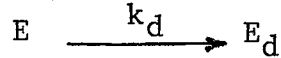
4. Kesikli düzende çalışan tepkime kabında enzim deaktivasyonu için, tepkiyen derişiminden bağımsız ve ürün inhibisyonunun olmadığı durumlarda geçerli olan üstel deaktivasyon modelinin doğrudan kullanılması uygun olmamaktadır. Bu etkiler ile birlikte kısa zaman aralığında hesaplanan görünür deaktivasyon sabiti sakkaroz derişimi artışı ile azalmakta ve böylece her tepkiyen derişimi için farklı deaktivasyon sabiti elde edilebilmektedir. Bu nedenle işletme koşullarına bağlı tek bir deaktivasyon sabitinin saptanabilmesi için, herhangi bir andaki görünür enzim aktivitesinde bu tür etkilerin olduğu dikkate alınmalı ve gerçek aktivite saptanmalıdır. Deaktivasyon çalışmaları sırasında, görünür enzim aktivite (a_g) değerinin gerçek enzim aktivite değerinden (a) daha düşük ve zamanla değişiminin daha hızlı olduğu görülmüştür. [Şekil (6-12)]. Bunun nedeninin, görünür enzim aktivitesinin, enzim deaktivasyonunun yanı sıra tepkiyen azalması ve ürün inhibisyonu etkilerini de içermesi olduğu söylenebilir. Sadece işletme koşullarına bağlı enzim deaktivasyonunu içerecek biçimde hesaplanan (Bkz. Bölüm: 6.4.4.) aktivite değerleri, üstel deaktivasyon modelinde kullanarak farklı tepkiyen derişimleri için 0.02417 dk^{-1} değerinde tek bir deaktivasyon sabiti bulunmuş invertaz aktivite yarı ömrü ise, $\tau_{1/2} = 29 \text{ dk}$. olarak hesaplanmıştır.

8. ELEŞTİRİ VE ÖNERİLER

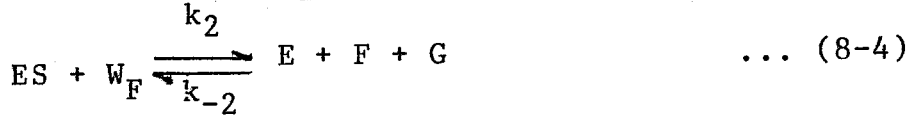
Bu çalışmada, sakkarozun invertaz ile hidrolizi konusunda günümüze değin gerçekleştirilen tüm kinetik çalışmalardan farklı olarak, başlangıç tepkime hızının tepkiyen derişimi ile değişimini bir bütün halinde açıklayan eşitlik ve bu eşitliğe ait kinetik sabitleri içeren katsayılar saptanmıştır. İhmallere dayalı düşük ve yüksek sakkaroz derişimlerdeki bölgesel grafik çözümlerin getirdiği belirsizliklerden arındırılmış olan bu değerler, aynı zamanda bu türden ihmallerin geçerlilik sınırlarının belirlenmesinde de kullanılmıştır. Öte yandan, uygulanabilirliği kanıtlanmış (49) olmasına rağmen enzim katalizli tepkimelerde pek az kullanılan doğrusal regresyon analizi yöntemi invertaz-sakkaroz sistemi için ilk defa uygulanmış ve ulaşılan sonuçların istatistikî açıdan güvenilirlik derecesi de belirlenmiştir.

Sakkaroz-invertaz hidroliz sisteminde $|W|_0 [S] / r_m K_s$ teriminin ihmal edilebileceği derişim aralığında (0.0361-0.2873 M. Sakkaroz.) grafik çözümlene sonucunda elde edilen katsayılar, çoklu doğrusal regresyon analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu değerlerin birbirine çok yakın olduğu görülür. Aynı türden bir karşılaştırma, $[W]_0 K_s / r_m [S]$ teriminin ihmal edilebildiği yüksek tepkiyen derişimlerinde de yapılabilir. Ancak, çalışılan derişim aralığında (0.0361-1.1390 M. Sakkaroz) bu terim için en düşük önem oranı 1.1390 M. derişiminde % 19.28 olarak bulunduğundan böyle bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle, daha yüksek tepkiyen derişimlerinde çalışılarak $[W]_0 K_s / r_m [S]$ teriminin ihmal edilebildiği düşük önem oranlı bölgede de grafik çözümlene yapılmalı ve bulunan katsayılar çoklu doğrusal regresyon analizi sonuçları ile karşılaştırılmalıdır. Böylece, yapılabilecek ihmallerin geçerlilik sınırları da tam olarak belirlenmiş olacaktır.

Sakkaroz-invertaz sistemi için önerilen serbest su derişimi düşmesi ve tepkiyen inhibisyonu etkilerini birlikte içeren model ve bu modelin matematiksel ifadesi olan kinetik eşitliklerin tüm sakkaroz derişimlerinde deneysel sonuçlar ile uyum içinde olması, izlenen yöntemin geçerli olduğunu göstermektedir. Bu yöntemde önerilen mekanizmanın sınanması için hızlı ölçüm tekniklerinin uygulandığı diğer yöntemler de kullanılabilir. Bu işlem sonucunda kullanılan yöntemin sınanmasının yanı sıra bu çalışmada saptanamayan kinetik sabitler de (k_1 , k_{-1} , k_2 v.b.) hesaplanabilir. Böylece elde edilen kinetik sabitler, önerilen hız denklemlerinin sayısal çözümlenmesinde veri olarak kullanılabilir. Mekanizmada yer alan tepkimeler en genel haliyle aşağıdaki biçimde sıralanabilir:



Gerçekleştirilen kinetik çalışma sonucunda, düşük sakkaroz derişimlerinde ($[S]_0 < 0.2873M.$) tepkiyen inhibisyonunun ihmal edilebileceği saptanmıştır. Buna göre, SE ve ESS ara-bileşiklerinin oluşumunu sağlayan tepkiyen inhibisyonu tepkimeleri bu bölgede ihmal edilebilir. Ürün oluşumu tepkimesinde ise, zamanla ürün derişiminin artması nedeniyle, tepkime hız sabiti k_{-2} olarak verilebilen geri yöndeki tepkimeyi de dikkate almak gerekecektir. Bu durumda, düşük sakkaroz derişimlerinde mekanizmada yer alacak tepkimeler;



şeklinde olacaktır. Bu tepkimelere göre aşağıdaki hız ifadeleri yazılabilir:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1} [ES] - k_1 [E] [S] \quad \dots (8-5)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = k_2 [W_F] [ES] - k_{-2} [E] [F] [G] \quad \dots (8-6)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = k_{-i} [EF] - k_i [E] [F] \quad \dots (8-7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= k_{-1} [ES] + k_i [EF] + k_2 [W_F] [ES] - k_{-2} \\ &\quad [E] [F] [G] - k_i [E] [F] - k_1 [E] [S] \\ &\quad - k_d [E] \quad \dots (8-8) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} &= k_1 [E] [S] + k_{-2} [E] [F] [G] - k_2 \\ &\quad [W_F] [ES] - k_{-1} [ES] \quad \dots (8-9) \end{aligned}$$

$$\frac{d[EF]}{dt} = k_i [E] [F] - k_{-i} [EF] \quad \dots (8-10)$$

$$\frac{d[Ed]}{dt} = k_d [E] \quad \dots (8-11)$$

Deaktivasyon çalışmaları sırasında serbest su derişiminin zaman ile çok değişmediği ve deney süresi boyunca (120 dk.) sabit alınabileceği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen gerçek deaktivasyon sabiti ve hızlı ölçüm teknikleri ile sonradan bulunacak diğer hız sabitleri yerlerine konularak, bu simultane diferansiyel denklemler sayısal çözümleme yöntemleri ile çözülebilir. Bu amaçla, Runge-Kutta-Gill Algoritması kullanılabilir (30). Böylece tepkiyen ve ürün derişimlerinin, ve deaktive olmuş enzim derişiminin zamanla değişimleri saptanarak önerilen tepkime mekanizmasının geçerliliği sınıanabilir.

Bu çalışmada elde edilen önemli diğer bir sonuç ta, gerçek deaktivasyon sabitinin hesaplanmasıdır. Ancak bu çalışmada biribiri ile uyumlu biçimde elde edilen sonuçlar sonraki çalışmalarda kullanılmadan önce bir takım geliştirme işlemleri yapılmalıdır. Her ne kadar gerçek deaktivasyon sabitinin hesaplanması amacıyla önerilen yöntem (Bkz. Bölüm: 4.5) 0.2873-0.5768 M. Sakkaroz derişim aralığında, düşünüldüğü biçimde biribirine yakın değerler vermiş olsa da, aynı tür deneme ve hesaplamaların çok daha düşük tepkiyen derişimlerinde de yapılması yerinde olacaktır. Ancak bu düşük derişimlerde, ortamdaki tepkiyen derişimi hızla çok küçük değerlere düşmekte ve bu nedenle yöntem gereği kullanılan $1/[S]$ değerleri hızla büyümektedir. Böylece ürün inhibisyonu çalışmalarında hazırlanan grafikte tepkiyen derişimi aralığının (0.0723-0.2873M. Sakkaroz) dışına çıkılmaktadır. Bu nedenle, daha düşük sakkaroz derişimlerinde gerçek deaktivasyon sabitinin hesaplanabilmesi için ürün inhibisyonu çalışmalarının da daha düşük tepkiyen ve ürün derişimlerinde yapılması gerekmektedir. Ayrıca, deaktivasyon çalışmalarında anlık tepkime hızlarının saptanmasına yönelik analizlerin olabildiğince kısa zaman aralıklarında yapılmasına özen gösterilmelidir. Özellikle düşük tepkiyen derişimlerinde gerçekleştirilen deneylerde bu noktaya dikkat edilmelidir.

Birinci dereceden ve temel basamak olan bir tepkime için özgül tepkime hızının sıcaklıkla değişimi Arrhenius Yasası [Eşitlik (2-1)] ile verilmektedir. Bu eşitlik, enzim deaktivasyon hız sabiti için,

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad \dots (8-12)$$

biçiminde yazılabilir. Değişik sıcaklıklarda, bu çalışmada önerilen yöntemle hesaplanan gerçek deaktivasyon sabitleri kullanılarak deaktivasyon olayının aktivasyon enerjisi hesaplanabilir. Bu amaçla, $\ln k_d$ k . $1/T$ grafiğe geçirildiğinde elde edilecek doğrunun eğimi bu aktivasyon enerjisini verecektir. Ooshima ve arkadaşlarının, serbest ve tutuklanmış invertazın ısıl deaktivasyonu için aktivasyon enerjilerini tepkimesiz durumda hesaplamalarına (34,35) karşın literatürde invertazın işletme koşullarına bağlı deaktivasyonu ile ilgili aktivasyon enerjisinin hesaplandığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Böyle bir çalışma sonucunda deaktivasyon için tepkimeli ve tepkimesiz durumda bulunan aktivasyon enerjilerinin karşılaştırılması yararlı olacaktır.

Nişastanın hidrolizi ile endüstriyel ölçekte üretilebilen şeker karışımlarının şeker endüstrisinde önemi büyüktür (26). Benzer şeker (örneğin invert şeker) çözeltileri sakkarozun invertaz ile hidrolizi sonucunda da üretilebilirler. Bununla ilgili, üretim sisteminin simulasyonu (process-simulation)'nun yapılması yararlı olacaktır. Bu türden bir çalışma, Bowski ve arkadaşları tarafından düşük sıcaklıklarda (25-26°C) gerçekleştirilmiştir (50). Ancak, enzimin en aktif olduğu yüksek sıcaklık (55°C) ve üretim çalışmalarında tercih edilen yüksek başlangıç sakkaroz derişimlerinde (11,12) çalışan bir sistemin simulasyonunun yapılması daha yararlı olacaktır. Bu çalışmada elde edilen kinetik hız bağıntısı ve tepkiyen derişiminden bağımsız gerçek deaktivasyon sabiti söz konusu koşullarda geçerli olduğundan böyle bir simulasyon çalışmasında kullanılabilir.

Enzimler suda çözünmeleri nedeniyle tepkime sonucunda ürün ve dönüşmeyen tepkiyen ile birlikte çözeltide kalırlar. Bu nedenle sürekli sistemde bir takım çalışma güçlükleri yaratırlar. Sürekli sistemlerde enzimlerin ultrafiltrasyon ile geri döndürülmeleri mümkündür. Ancak, son yıllarda tutuklanmış enzimlerle çalışmanın getirdiği işletme kolaylıkları nedeniyle tutuklanmış enzim çalışmaları yaygınlaşmıştır. İvertaz için de geliştirilmiş pek çok tutuklama yönteminin uygulandığı değişik çalışmalar yapılmıştır (12, 21, 28, 29, 34, 45, 46). Bu çalışma kapsamında şimdiye kadar serbest invertaz için gerçekleştirilen ve elde edilen sonuçların veri olarak kullanılacağı diğer çalışmalar tutuklanmış invertaz için de tekrarlanabilir. Bunlar, gerçek deaktivasyon sabiti ve aktivasyon enerjisinin hesaplanması, işlem simülasyonu v.b. çalışmalardır. Özellikle tutuklanmış invertazın işletme sırasındaki deaktivasyonunun incelenmesi yerinde olacaktır. Çünkü bugüne değin tepkimesiz ortamda yapılan çalışmalarda genel durumun aksine tutuklanmış invertazın ısıl deaktivasyonunun serbest invertazdan daha hızlı olduğu ile ri sürülmektedir (34, 35).

K A Y N A K L A R

- (1) ALDRIDGE, W.N., REINER, E., "Enzyme Inhibitors as Substrates", North-Holland Publishing Comp., Amsterdam (1972).
- (2) ALTOMORE, R.E., GREENFIELD, P.F., KITTRELL, J.R. Biotechnol-Bioeng., 16, 1675-1680 (1975).
- (3) ALTOMORE, R.E., KOHLER, I., GREENFIELD, P.F., KITTRELL, J.R., Biotechnol. Bioeng., 16, 1659 (1974).
- (4) BAILEY, T.E., OLLIS, F.D., Biochemical Engineering Fundamentals", MC-Graw Hill Kozakusha Ltd., Tokyo (1977).
- (5) BARMAN, T.E., "Enzyme Handbook", Vol: 11, Pp. 584-585, Springer-Verlag Inc., New York (1969).
- (6) BOMFORD, C.H., ELLIOTT, A., HANDBY, W.E., "Synthetic Polypeptides", Academic Press, New York (1956).
- (7) BOWSKI, L., SAINI, R., DYU, D.Y., VIETH, W.R., Biotechnol. Bioeng., 13, Pp 641-656 (1971).
- (8) BOYER, P.D., "The Enzymes", Vol:5, 3 Ed., Academic Press, New York (1971).
- (9) BRAY, H.G., WHITE, K., "Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry", Academic Press, New York (1966).
- (10) COMBES, D., MONSAN, P., Carbohydrate Research, 117, 215 (1983).
- (11) COMBES, D., MONSAN, P., Biotechnol Bioeng., 26, Pp. 347-351 (1984).
- (12) COMBES, D., MONSAN, P., ALEMZADEM, I., Biotechnol Bioeng., 26, Pp. 658-664 (1984).

- (13) CORDOSO, J.P., EMERY, A.N., *Biotechnol. Bioeng.*, 20 , Pp. 1471-1477 (1978).
- (14) CORNISH-BOWDEN, A., "Principles of Enzyme Kinetics", Botterworth Co., London (1976).
- (15) ÇELEBİ, S.S., "Trigliseridlerin Serbest ve Tutuklanmış Condida Lipazı ile Hidrolizi", Doktora Tezi, Ankara Hacettepe Üniversitesi (1980).
- (16) Dixon, M., WEBB, E.C., "Enzyme" Academic Press, New York (1979).
- (17) DO, D.D., WEILAND, R.W., *Biotechnol. Bioeng.*, 22 , 1087-1093 (1980).
- (18) ERTEK, T., "Ekonometriye Giriş", Araştırma, Eğitim, Ekin Yayınları Ticaret A.Ş., İstanbul (1982).
- (19) FLASHCHELL, E., SCHUGERL, K., WANDREY, C., *Biotechnol. Bioeng.*, 21, Pp. 1649-1670 (1979).
- (20) FLORKIN, M., STOTZ, E.H., "Comprehensive Biochemistry", Vol: 12, Elsevier Publishing Company, New York (1964).
- (21) FUJISIMA, A., IMAI, K., SATO, K., SHIAMI, T., *Biotechnol Bioeng*, 24, Pp 613-617 (1983).
- (22) HAZT, D., THOMPSON, H.W., Symposium Publication Division, Pargamon Press, New York (1959).
- (23) HELPERN, M.G., "Industrial Enzymes from Microbial Sources, Recent Advances, Chemical Technology Review, No. 186, Noyes Data Corporation Park Ridge, New Jersey (1981).

- (24) Hewlett Packard Contributed Program, Basic, Software/ Publications Distribution (GSD), Hewlett-Packard Company, 5303 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, Ca. 95050 (1976).
- (25) JENKS, W.P., "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Mc Graw-Hill Book Comp., New York (1969).
- (26) JOGLEKAR, R., CLERMAN, J.R., QUELLETTE, R.P., CHEREMISINOFF, P.N., "Biotechnology in Industry, Selected Applications and Unit Operations", Ann Arbor Science Publishers, USA (1983).
- (27) LAIDLER, K.J., "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", The Clarendon Press, Oxford (1958).
- (28) MARCONI, W., GUINELLI, S., MORIS, F., Biotechnol. Bioeng., 16, Pp. 501-511 (1970).
- (29) MASON, R.D., WEETHALL, H.H., Biotechnol. Bioeng., 14 , Pp. 637-645 (1972).
- (30) MASON, M.J., "Numerical Analysis, A Practical Approach", Macmillan Publishing Co., Inc., New York (1982).
- (31) McLAREN, A.D., Enzymologia, 16-1, 1 (1963).
- (32) NELSON, I.M., SCHUBERT, P.M., Amer. Chem. Soc.J., 50, 2188-2193 (1928).
- (33) O'NEILL, S.P., Biotechnol. Bioeng., 14, 473-491 (1972).
- (34) OOSHIMA, H., SAKIMOTO, M., HARANO, Y., Biotechnol Bioeng., 22, Pp. 2169-2178 (1980).

- (35) OOSHIMA, H., SAKIMOTO, M., HARANO, Y., Biotechnol. Bioeng., 22 Pp. 2155-2167 (1980).
- (36) OTHMER, D.F., Mc KETTA, J.J., MARK, H.F., 2. Ed., Vol: 19, Page: 151, John Waley and Sons Inc., New York (1970).
- (37) PEKİN, B., "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir (1975).
- (38) REED, G., "Enzymes in Food Processing", 2. Ed., Academic Press, New York (1975).
- (39) SEGEL, I.H., "Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems", John Wiley and Sons Inc., New York (1950).
- (40) SNELL, F.D., ETTRE, L.S., "Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis", Vol: 19, Page: 409, John Wiley and Sons Inc., USA (1974).
- (41) Aynı eser, Vol: 11, Page : 38-40.
- (42) SOLOMON, B., LEVIN, Y., Biotechnol. Bioeng., 17, 1323 (1969).
- (43) SPOUL, R.D., LIM, H.C., SCHEIDER, D.D., Biotechnol. Bioeng., 18, Pp. 633 (1976).
- (44) SUMNER, J.B., MYRBACK, K., "The Enzymes", Vol: 1, Part: 1, Pp. 527-550, New York (1950).
- (45) SYNOWLECKI, J., SIKAROSKI, Z.E., NACZK, M., Biotechnol. Bioeng., 23, Pp. 231-233 (1981).

- (46) THORNTON, D., FLYNN, A., JOHNSON, D.B., Biotechnol. Bioeng. 17, Pp. 1679-1693 (1975).
- (47) WEBB, J.L., "Enzyme and Metabolic Inhibitors", Vol: 1, Academic Press, New York (1963).
- (48) WESTLEY, J., "Enzyme Catalysis", Harper and Row Publishers, New York (1969).
- (49) WILKINSON, G.N., Biochem.J., 80, 324 (1961).
- (50) VIETH, W.R., BOWSKI, L. SMITH, P.M., RYU, D.Y., Biotechnol. Bioeng Symp. No. 3, 229-239 (1972).
- (51) VITOLO, M., CUHNA, A.B. C., Biotechnol. Bioeng., 26, Pp. 811-813 (1984).

E K L E R

EK - II.1- Su Derişimi Etkisi Dikkate Alındığında Michaelis-Menten Kinetiği

Hidroliz tepkimesinde serbest su derişiminin ikinci bir tepkiyen olarak alındığı durumda önerilen kinetik mekanizma ve elde edilen hız bağıntısı aşağıdaki biçimdedir:



Eger,

$[W_F]$: Serbest su derişimi,

$[G]$: D-Glukoz derişimi,

$[F]$: D-Fruktoz derişimi,

$[S]$: Hidrate olmuş sakkaroz derişimi,

$[E]$: Enzim derişimi,

$[ES]$: Enzim-tepkiyen arabileşigi derişimi,

k_1, k_{-1}, k_2 : Tepkime hız sabitleri

olarak tanımlanırsa, ürün oluşumu cinsinden tepkime hızı,

$$r = \frac{d [G]}{dt} = k_2 [ES] [W_F] \quad \dots (I-3)$$

biçiminde yazılabilir. Burada,

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] [S]}{[ES]} \quad \dots (I-4)$$

ve

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \dots(I-5)$$

dir. Öte yandan enzim kütle denkleğinden,

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad \dots(I-6)$$

yazılabilir. Bu değerler tepkime hızı eşitliğinde [Eşitlik (I-6)] yerine konup düzenlenirse,

$$r = \frac{d[G]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s + [S]} [W_F] \quad \dots(I-7)$$

elde edilir. Maksimum tepkime hızı (r_m) için enzimin tamamının (E_0) ES arabileşığı halinde bulunduğu ve serbest su derişiminin maksimum düzeyde olduğu düşünülerek

$$r_m = k_2 [E]_0 [W]_0$$

bağıntısı yazılır. Bu tanımlamaya göre tepkime hızı aşağıdaki biçimde yazılabilir.

$$r = \frac{r_m [S]}{K_s + [S]} \frac{[W_F]}{[W]_0} \quad \dots (I-8)$$

Bu bağıntıda gerekli düzenlemeler yapılarak,

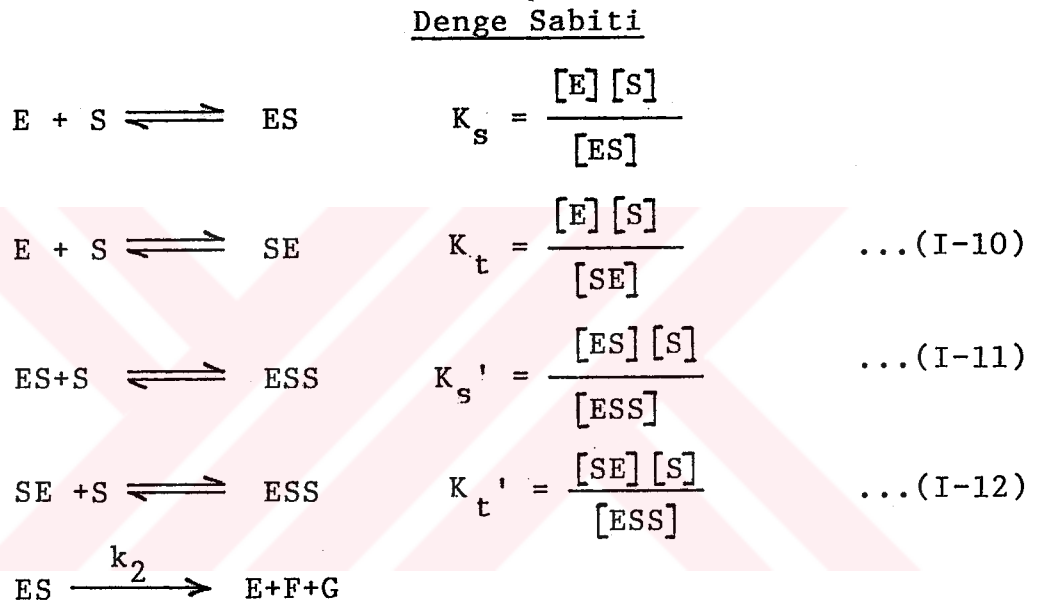
$$\frac{[W_F]}{r} = \frac{[W]_0 K_s}{r_m} \frac{1}{[S]} + \frac{[W]}{r_m} \quad \dots (I-9)$$

elde edilir. $\frac{[W_F]}{r}$ kş. $\frac{1}{[S]}$ çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $\frac{[W]_0 K_s}{r_m}$, ordinat kesim noktası ise $\frac{[W]_0}{r_m}$ değerlerini verecektir.

I.2. Sakkaroz İnhibisyonu Kinetiği

Daha önceki bölümlerde tek tepkiyenli bazı enzim sistemlerinde tepkiyen inhibisyonu için enzim-tepkiyen (ES) arabileşığının ikinci bir tepkiyen ile enzim-tepkiyen-tepkiyen (ESS) arabileşigini oluşturduğu ve bu arabileşigin inaktif olduğu belirtilmişti (Bkz. Bölüm : 2.3.4). Yüksek sakkaroz

derişimlerinde tepkime hızında görülen düşmenin su derişimi azalması dikkate alınmadan sadece tepkiyen inhibisyonundan ileri geleceği düşünülerek invertaz için aşağıdaki tepkime mekanizması önerilmiş (27)* ve bu durumdaki hız bağıntısı bulunmuştur.



Bu tepkimedeki SE ve ESS arabileşikleri, tepkiyenin enzimin farklı bölgesine bağlanmasıyla oluşmuş, ürün vermeyen arabileşiklerdir. Enzim için kütle denkliği,

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [SE] + [ESS] \quad \dots(I-13)$$

şeklinde yazılır ve hızlı denge kabulü ile denge sabitleri dikkate alınır ise,

$$[ES] = \frac{K_t K_s' [E]_0 [S]}{K_t [S]^2 + K_s' (K_s + K_t) [S] + K_s K_t K_s'} \quad \dots(I-14)$$

olarak bulunur. Tepkime hızı bağıntısı ise,

(*) : Ekler'e ait kaynaklar da ana "Kaynaklar" listesinde yer almıştır.

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{d [G]}{dt} = k_2 [ES] \\
 &= \frac{k_2 [E]_0 K_t K_s' [S]}{K_t [S]^2 + K_s' (K_s + K_t) [S] + K_s K_t K_s'} \quad \dots(I-15)
 \end{aligned}$$

şeklindedir. $r_m = k_2 [E]_0$ yerine konulduğunda tepkime hızı için,

$$r = \frac{r_m K_t K_s' [S]}{K_t [S]^2 + K_s' (K_s + K_t) [S] + K_s K_t K_s'} \quad \dots(I-16)$$

bağıntısı elde edilir.

I.3. Çoklu Doğrusal Regresyon (Multiple Linear Regression)
Analizi Bilgisayar Programı

```

10 REM ***
20 REM          mulreg:36178 (a404) rev a--9/71
30 REM *** contributed program *
35 REM *** multiple regression /correlation*
40 DIM X(20,20),A(20,20),D(80,50),Y(20),M(20),S(20)
50 DIM T(20),B(20),U(20,20),R(20,20),C(20,20),Q(80),E(20)
60 READ N,V,G
70 FOR I=2 TO N+1
80 FOR J=2 TO V+1
90 READ D(I,J)
100 NEXT J
110 NEXT I
120 FOR I=2 TO N+1
130 LET D(I,1)=1
140 NEXT I
150 READ H,K,P1,P2
160 LET M=K+1
170 FOR I=2 TO M+1
180 READ E(I)
190 NEXT I
200 LPRINT "***REGRESSION NUMBER"H":DEPENDENT VARIABLE IS"E(M+1)
210 LPRINT
220 IF H>1 THEN 370
230 FOR I=1 TO V+1
240 FOR J=1 TO V+1
250 LET X=0
260 FOR L=2 TO N+1
270 LET X=X+D(L,I)*D(L,J)
280 NEXT L
290 LET X(I,J)=X
300 LET C(I,J)=X
310 NEXT J
320 LET T(I) =X(1,I)/X(1,1)
330 LET B(I)=0
340 IF I=1 THEN 360
350 LET B(I)=SQR(X(I,I)/(N-1)-X(1,I)*X(1,I)/(N*(N-1)))
360 NEXT I
370 LPRINT "INDEX","MEANS","STANDART DEVIATIONS"
380 FOR I=2 TO M+1
390 LET M(I)=T(E(I)+1)
400 LET S(I)=B(E(I)+1)
410 LPRINT E(I),M(I),S(I)
420 NEXT I
430 LPRINT
440 LPRINT
450 LPRINT "CORRELATION COEFFICIENTS"
460 IF H>1 THEN 520
470 FOR I=2 TO V+1
480 FOR J=2 TO V+1

```

```

490 LET R(I,J)=(N*X(I,J)-X(1,I)*X(1,J))/(N*(N-1)*B(I)*B(J))
500 NEXT J
510 NEXT I
520 FOR I=2 TO M+1
530 FOR J=2 TO M+1
540 LET U(I,J)=R(E(I)+1,E(J)+1)
550 LPRINT U(I,J),
560 NEXT J
570 LPRINT
580 LPRINT
590 NEXT I
600 LPRINT
610 LET E(1)=0
620 FOR I=1 TO K+1
630 LET Y(I)=C(E(I)+1,E(M+1)+1)
640 FOR J=1 TO K+1
650 LET X(I,J)=C(E(I)+1,E(J)+1)
660 NEXT J
670 NEXT I
680 FOR I=1 TO K+1
690 FOR J=1 TO K+1
700 IF I<>J THEN 730
710 LET A(I,J)=1
720 GOTO 740
730 LET A(I,J)=0
740 NEXT J
750 NEXT I
760 FOR I=1 TO K+1
770 IF X(I,I) < 1E-34 THEN 1510
780 LET Y(I)=Y(I)/X(I,I)
790 FOR J=1 TO K+1
800 LET A(I,J)=A(I,J)/X(I,I)
810 IF J=I THEN 830
820 LET X(I,J)=X(I,J)/X(I,I)
830 NEXT J
840 LET X(I,I)=1
850 FOR L=1 TO K+1
860 IF L=I THEN 940
870 LET Y(L)=Y(L)-X(L,I)*Y(I)
880 FOR J=1 TO K+1
890 LET A(L,J)=A(L,J)-X(L,I)*A(I,J)
900 IF J=I THEN 920
910 LET X(L,J)=X(L,J)-X(L,I)*X(I,J)
920 NEXT J
930 LET X(L,I)=0
940 NEXT L
950 NEXT I
960 LET S6=C(E(M+1)+1,E(M+1)+1)
970 FOR I=1 TO K+1

```

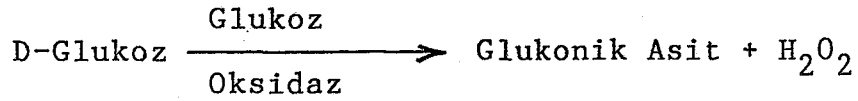
```
980 LET S6=S6-Y(I)*C(E(I)+1,E(M+1)+1)
990 NEXT I
1000 LET S7=S6/(N-M)
1010 R2=1-(S6/((S(M+1)^2)*(N-1)))
1020 LET R=SQR(R2)
1030 LET S8=SQR(S7)
1040 IF P1=0 THEN 1060
1050 LPRINT "VARIANCE-COVARIANCE MATRIX"
1060 FOR I=1 TO K+1
1070 FOR J=1 TO K+1
1080 LET A(I,J)=A(I,J)*S7
1090 IF P1=0 THEN 1110
1100 LPRINT A(I,J),
1110 NEXT J
1120 IF P1=0 THEN 1150
1130 LPRINT
1140 LPRINT
1150 NEXT I
1160 LPRINT
1170 LPRINT "INDEX","B","STD.ERROR","T-RATIO"
1180 FOR I=1 TO K+1
1190 LPRINT E(I),Y(I),SQR(A(I,I)),Y(I)/SQR(A(I,I))
1200 NEXT I
1210 LPRINT
1220 LPRINT "R-SQUARED=";R2;"R=";R
1230 LPRINT
1240 LPRINT "STAND.ERROR OF EST.=";S8;"D.F.=";(N-M)
1250 LPRINT
1260 FOR I=2 TO N+1
1270 LET Z=D(I,E(M+1)+1)-Y(1)
1280 FOR J=2 TO K+1
1290 LET Z=Z-Y(J)*D(I,E(J)+1)
1300 NEXT J
1310 LET Q(I)=Z
1320 NEXT I
1330 LET W=0
1340 FOR I=3 TO N+1
1350 LET W=W+(Q(I)-Q(I-1))^2
1360 NEXT I
1370 LPRINT
1380 IF P2=0 THEN 1450
1390 LPRINT "ACTUAL","PREDICTED","RESIDUAL"
1400 LET I=1
1410 LET I=I+1
1420 LPRINT D(I,E(M+1)+1),D(I,E(M+1)+1)-Q(I),Q(I)
1430 IF I=N+1 THEN 1450
1440 GOTO 1410
1450 LPRINT
1460 LPRINT "DURBIN-WATSON STAT.=";W/S6
```

```
1430 IF I=N+1 THEN 1450
1440 GOTO 1410
1450 LPRINT
1460 LPRINT "DURBIN-WATSON STAT.=";W/S6
1470 IF H<G THEN 1490
1480 GOTO 1520
1490 LPRINT
1500 GOTO 150
1510 LPRINT "CORRELATION MATRIX BECOMING SINGULAR"
1520 LPRINT
1530 LPRINT "      PROBLEM COMPLETED"
1540 STOP
1550 DATA
1560 DATA
1570 DATA
1580 DATA
1590 DATA
1600 DATA
1610 DATA
1620 DATA
1630 END
```

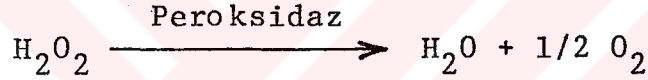
Bu bilgisayar programının yazılımı Hewlett-Packard Company tarafından geliştirilmiştir (24).

EK-IIII.1. D-Glukoz Analiz Yöntemi

D-Glukoz glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin karışımları kullanılarak saptanabilir (41). D-Glukoz glukoz oksidaz ile aşağıdaki tepkime sonucu,



oluşan glukonik asit renk çözültisi (kromojen) o-Dionosidin 2 Hcl ile tepkimeye girip görünür bölgede renk veren bileşik oluşturur. Yan ürün H_2O_2 ise peroksidaz ile tepkimeye girer.

a. Analiz Çözültileri

1^o- Tris (hydroxymethyl) hidroksimetilamin: 121g.
Tris 850 ml. 1 N.Hcl'de çözülür ve pH=7 olacak biçimde ayarlanır.

2^o- o-Dionosidin 2 Hcl : 1.60 g. o-Dionosidin 2 Hcl
1 lt.damıtık su ile çözülür ve buzdolabında saklanır.

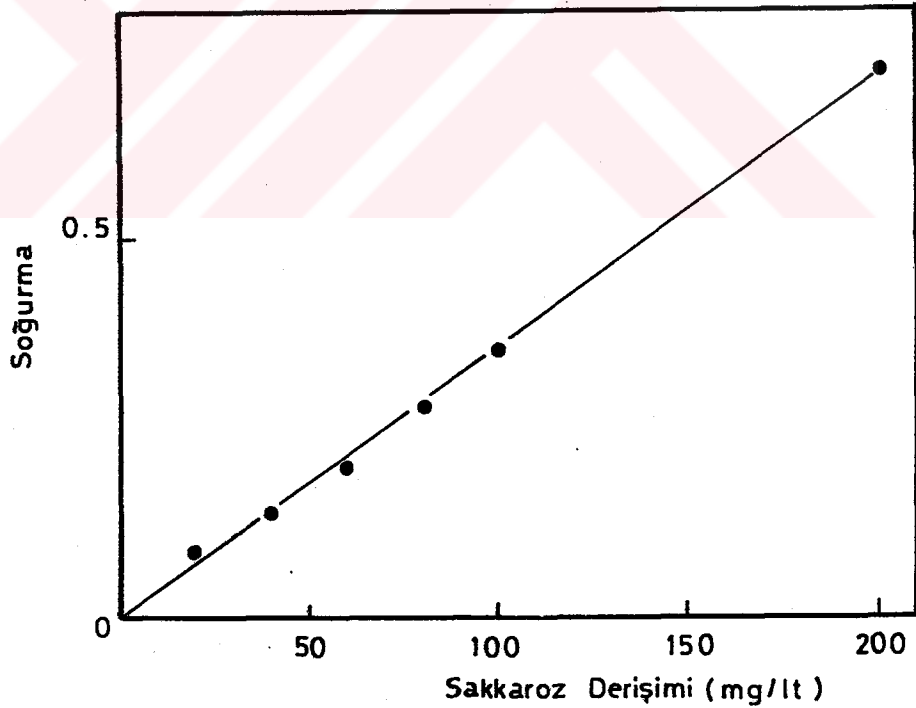
3^o- Benzoik Asit : 2.7 g. benzoik asit yaklaşık 1 lt.
damıtık suda bir saat karıştırılır. Elde edilen çözelti süzülür ve kullanılır

4^o- Enzim Çözültisi : 18 mg. peroksidaz ve 15 mg.
glukoz oksidaz 100 ml. pH=7 Tris tampon çözeltisinde çözülür ve kullanılacak kadar kısımlara ayrılıp derin dondurucuda saklanır.

b. Analiz İşlemi

1 ml örnek çözelti ve kör olarak kullanılacak 1 ml. benzoik asit çözeltisi tüplere konur. Tüplere 0.4 ml. o-Dionosidin 2 Hcl. ve 1 ml. enzim çözeltisi eklenip 37°C'daki sabit sıcaklık banyosuna yerleştirilir. 60 dk. bekletildikten sonra tüplere 5 ml. H₂SO₄ (% 80'lik) eklenir. Bu işlem ile çözeltinin rengi turuncudan pembeye dönüşür. Çözeltiler damıtık su ile 10 ml.'ye tamamlanır ve soğurma değeri 535 nm. de ölçülür. Bu dalga boyu değeri gerçekleştirilen dalga boyu taraması sonucunda saptanmıştır.

535 nm.'de farklı derişimlerdeki glukoz çözeltileri için soğurma değerleri saptanmış ve böylece çalışma doğrusu [Şekil (II-1)] elde edilmiştir.



Şekil (II-1): Çalışma doğrusu

T= 37°C, Bekletme süresi = 60 dk.

(Korelasyon katsayısı=0.9965)

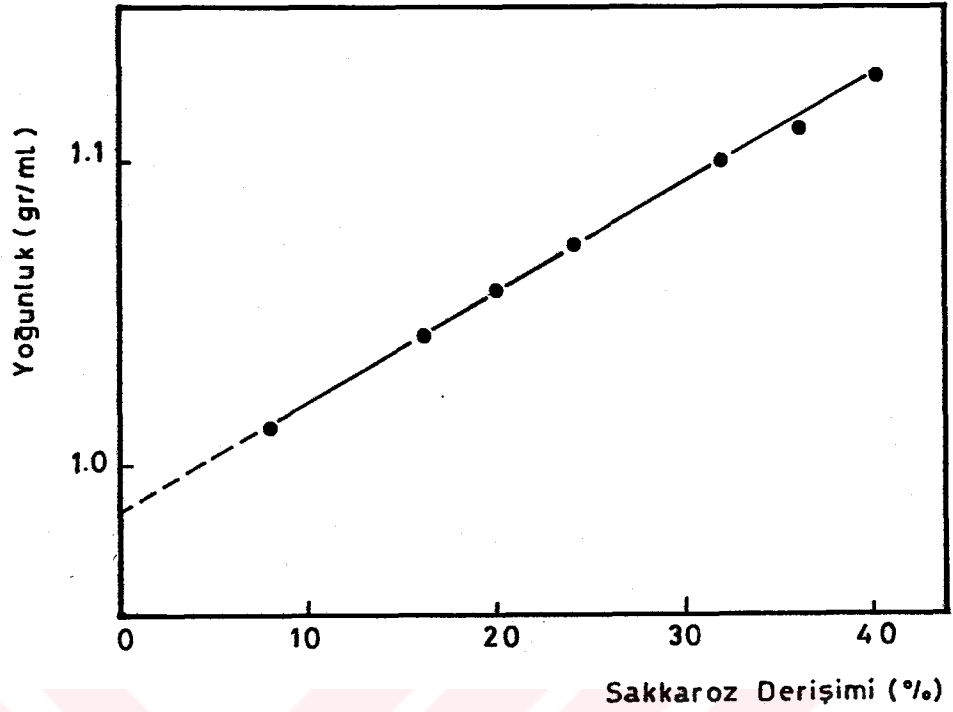
EK - IIIIII.1- Sakkaroz Çözeltilerinin 55°C'daki Yoğunluklarının Ölçülmesi

Yoğunluk ölçümleri piknometre ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen yoğunluk değerleri Çizelge (III-1)'de verilmiştir.

Çizelge (III-1): Sakkaroz çözeltilerinin 55°C'daki yoğunlukları

Sakkaroz Derişimi		Yoğunluk (55°C'da)
(%)	(mol/lt)	(g/ml)
8	0.2304	1.0152
16	0.4486	1.0430
20	0.5768	1.0589
24	0.6546	1.0720
32	0.8492	1.1019
36	1.0282	1.1137
40	1.1390	1.1297

Çizelge (III-1) değerleri yoğunluk kş. sakkaroz derişimi (%) olarak çizildiğinde Şekil (III-1) elde edilir.



Şekil (III-1): Sakkaroz çözeltilerinin yoğunlukları
($T=55^{\circ}\text{C}$)
(Korelasyon katsayısı =0.9998)

III.2. Toplam Su ve Serbest Su Derişimlerinin Sakkaroz Derişimi İle Değişimi

Çizelge (III-2): Sakkaroz çözeltilerinin toplam su ve serbest su derişimleri ($T=55^{\circ}\text{C}$ 'da)

Sakkaroz Derişimi (mol/lt.)	Toplam Su Derişimi (mol/lt.)	Serbest Su Derişimi (mol/lt)
0.0361	54.4000	54.2175
0.0723	53.9833	53.6178
0.1084	53.5667	53.0187
0.1443	53.1444	52.4134
0.2169	52.3056	51.2091
0.2873	51.1167	49.6547
0.4333	49.7944	47.6014
0.5768	48.1222	45.9292
0.7194	46.4500	42.7950
0.8608	44.7722	40.3862
0.9450	43.7722	38.9492
1.0282	42.7667	37.5037
1.1390	41.4278	35.5798

III.3. Herhangi Bir Andaki Serbest Su Derişiminin Hesaplanması

Herhangi bir andaki serbest su derişimi; hidroliz tepkimesi ile tüketilen su derişimi ve sakkarozun tepkimeye girmesi ile serbest kalan su derişimine bağlı olarak aşağıdaki eşitlikle verilebilir:

$$[W_F]_t = [W_F]_0 - [W_S] + [W_S'] \quad \dots(\text{III-1})$$

Burada;

$[W_F]_t$: Herhangi bir andaki serbest su derişimi (M),

$[W_F]_0$: Başlangıçtaki (t=0) serbest su derişimi (M),

$[W_S]$: Hidroliz tepkimesi ile tüketilen su derişimi (M),

$[W_S']$: Tepkimeye giren sakkarozun serbest bıraktığı su derişimi (=5 $[W_S]$) (M),

olarak verilmiştir. Hidroliz tepkimesinde tüketilen 1 mol sakkaroz için 1 mol. su harcandığı ve 1 mol. D- Glukoz elde edildiği dikkate alınarak harcanan su derişimi $[W_S]$, oluşan D - Glukoz derişimine eşit alınabilir.

III.4. Çoklu Doğrusal Regresyon Analizi ile Hesaplanan $[W_F]/r$ Değerleri ve Deneysel Değerlerden Sapma Oranları

Sakkaroz Derişimi (M)	$[W_F]/r$, Deneysel (mol .Su/ Sakkaroz)	$[W_F]/r$, Hesaplanan (mol. Su/mol. Sakkaroz)	Sapma Oranları (%)
0.0361	19516.70	19609.20	4.83
0.0723	11080.20	11034.90	1.33
0.1084	8544.51	8199.25	0.27
0.1443	6861.38	6787.30	-3.20
0.2169	5267.34	5375.10	-2.35
0.2873	4703.93	4698.84	-0.91
0.4333	3808.11	4022.81	-5.64
0.5768	3677.87	3711.20	0.11
0.7194	3466.30	3547.85	-2.05
0.8608	3345.17	3452.21	1.08
0.9450	3427.42	3418.14	4.04
1.0282	3435.03	3389.93	-0.04
1.1390	3533.60	3370.84	-0.47

III.5. İnvertaz-Sakkaroz Sistemi İçin von-Neuman Testi Uygulaması

von-Neuman testi için gerekli v oranı,

$$v = d \left[\frac{n'}{n'-1} \right]$$

olarak verilir. Burada,

$$n' = n - k$$

ve

n = Deney sayısı

k = Bağımsız değişken sayısı

olarak tanımlanmıştır. İvertaz-sakkaroz hidroliz sistemi için $n= 13$, $k= 2$ ve çoklu doğrusal regresyon analizi sonucunda elde edilen Durbin-Watson katsayısı $d=1.51791$ dir. Bu değerler kullanıldığında $n' =13-2= 11$ ve $v=1.6697$ elde edilir.

v -oranı tablosundan (18) $p= 0.05$ önemlilik derecesi ile $V(11) = 1.2062$ ve $V^*(11) = 3.1938$ bulunur. $V(11) < 1.6897 < V^*(11)$ olduğuna göre otokorelasyon yoktur ve klasik doğrusal regresyondan sapılmamıştır.

EK - - IV -IV.1. Deney VerileriA- Sakkarozun İvertazla Hidrolizi ile İlgili Deney Verileria) Sakkarozun Hidrolizinde pH Etkileri

Sakkaroz Derişimi : 0.5768 M. Karıştırma Hızı : 300 dev./dk.
 Toplam Su Derişimi : 48.1222 M. Tepkime Hacmi : 400 ml.
 Sıcaklık : 55 °C.

Deney No	pH	Başlangıç Tepkime Hızı ($\mu\text{mol. Sakkaroz l}^{-1} \text{ dk}^{-1}$) $\times 10^{-4}$
1	3.5	0.5208
2	4.0	0.9643
3	4.5	1.2418
4	5.0	1.1062
5	5.5	0.7101

Bu deneyler sonucunda elde edilen başlangıç tepkime hızı de-
 ğerleri kullanılarak Şekil (6-1) çizilmiştir.

b) Sakkarozun Hidrolizinde Sıcaklık etkileri

Sakkaroz Derişimi : 0.5768 M. Karıştırma Hızı : 300 dev./dk.
 Toplam Su Derişimi : 48.1222 M. Tepkime Hacmi : 400 ml.
 pH : 4.5

Deney No	Sıcaklık(°C)	Başlangıç Tepkime Hızı (μ mol. Sakkaroz $lt^{-1}dk^{-1}$) $\times 10^{-4}$
1	30	0.7813
2	40	0.8056
3	48	0.8123
4	50	0.8765
5	53	1.0548
6	55	1.2418
7	59	1.2048
8	62	1.0243

Bu deneyler sonucunda elde edilen tepkime hızı değerleri kullanılarak Şekil (6-2) çizilmiştir.

c) Sakkarozun Hidrolizinde Tepkiyen Derişiminin Etkileri

Sıcaklık : 55°C Karıştırma Hızı : 300 dev./dk.
pH : 4.5 Tepkime Hacmi : 400 ml.

Deney No	Sakkaroz Derişimi (M)	Toplam Su Derişimi (M)	Başlangıç Tepkime Hızı (μ mol.Sakkaroz $lt^{-1}dk^{-1}$) $\times 10^{-4}$
1	0.0361	54.4000	0.2778
2	0.0723	53.9833	0.4861
3	0.1084	53.5667	0.6205
4	0.1443	53.1444	0.7639
5	0.2169	52.3056	0.9722
6	0.2873	51.1167	1.0555
7	0.4333	49.7944	1.2500
8	0.5768	48.1222	1.2418
9	0.7194	46.4500	1.2346
10	0.8608	44.7722	1.2073
11	0.9450	43.7722	1.1360
12	1.0282	42.7667	1.0918
13	1.1390	41.4278	1.0069

Bu deneyler sonucunda elde edilen başlangıç tepkime hızı değerleri Şekil (6-3) - Şekil (6-8)'in çizilmesinde kullanılmıştır.

d) Su Derişiminin Ürün İnhibisyonuna Etkisi

Sıcaklık : 55°C

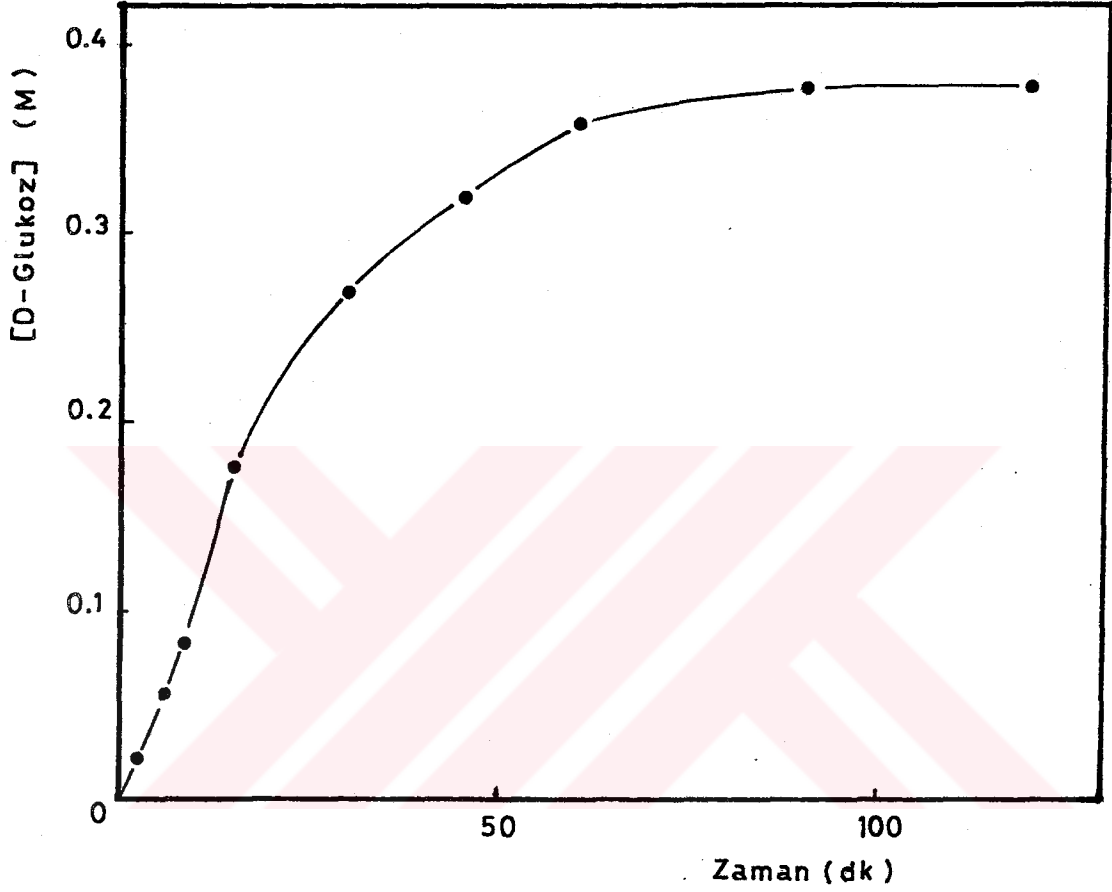
pH : 4.5

Deney No	D-Fruktoz Derişimi (M)	Sakkaroz Derişimi (M)	Başlangıç Tepkime Hızı ($\mu\text{mol.Sakkaroz.lit}^{-1}\text{dk}^{-1}$) $\times 10^{-4}$
1	0.1462	0.0723	0.4065
2		0.1443	0.7327
3		0.1873	1.1900
4	0.3000	0.0723	0.3829
5		0.1443	0.6024
6		0.2873	0.9259
7	0.3500	0.0723	0.2747
8		0.0900	0.3333
9		0.1443	0.5376
10		0.2873	0.8475
11	0.4000	0.0723	0.2431
12		0.1443	0.4902
13		0.2873	0.7423
14	0.4386	0.0723	0.2008
15		0.1443	0.3846
16		0.2873	0.6667

Elde edilen başlangıç tepkime hızı değerleri kullanılarak Şekil (6-10) çizilmiştir.

B- İnvertazın Deaktivasyonu ile İlgili Deney Verileri

İnvertazın deaktivasyonu ile ilgili çalışmalar sırasıyla 0.2169, 0.2873, 0.4333 ve 0.5768 M. Sakkaroz derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde D-Glukoz analizi (Bkz. EK.: II.1) yapılarak D-Glukoz kş. zaman değişimleri elde edilmiştir. Örneğin, 0.5768 M.Sakkaroz derişimi için bu değişim Şekil (IV-1)'de verildiği biçimdedir.



Şekil (IV-1) : D-Glukoz-Zaman Değişimi

$[S]_0 = 0.5768 \text{ M.}$, $\text{pH} = 4.5$, $T = 55^\circ\text{C}$

Karıştırma Hızı = 300 dev./dk.,

Tepkime Hacmi = 400 ml.