

## $\alpha$ -Amilaz Molekülündeki Bazı Grupların Enzim Aktivitesi Hakkında

About the Enzyme Activity of Some Groups in  $\alpha$ -Amylase Molecule

Nevzat ÖNER ve Nur ÜLGÜR-ALÇITEPE \*

Enzim aktivitesinin moleküldeki hangi gruplardan ileri geldiği uzun zamandan beri araştırma konusu olmuş ve bu alanda birçok çalışmalar yapılmıştır. Bilindiği gibi, enzimler protein yapısında ve çok dayanıksız maddelerdir. Bazı enzimlerde protein kısmından başka koenzim veya prostetik grup adı verilen ve protein yapısında olmayan etkili bir kısım vardır. Diğer bazı enzimlerde ise katalitik etki gösteren kısım, enzim proteininin polipeptid zincirindeki amino asitlerin belirli bazı gruplarıdır. Birçok araştırmacılar enzimdeki bu gibi etkili grupları tespit etmek maksadiyle kompetitif olmayan inhibitörler kullanmışlardır. Etkili oldukları ileri sürülen grupların kompetitif olmayan bir inhibitörle birleştirilmesi suretiyle enzimin katalitik etkisinin yok olduğu gösterilmiştir.

*Bacillus subtilis* (B.s.)  $\alpha$ -amilazının hidroksifenil grupları üzerinde çalışmış olan Yamamoto (1) enzimin bu gruplarını elementel iyod, fluorodinitrobenzen ve Folin'in fenol reaktifi ile bloke ettikten sonra aktivitenin yarı yarıya azaldığını görmüş ve buna dayanarak  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin enzimdeki tirozil bakiyelerinin hidroksifenil gruplarından ileri geldiğini öne sürmüştür. Conellan ve Shaw (2) yine B.s.  $\alpha$ -amilazının hidroksifenil grupları üzerinde çalışmışlar ve bu grupları N-asetil imidazol, maleik anhidrid ve tetranitrometan aracılığı ile bloke ederek Yamamoto'nun bulgularını teyid etmişlerdir. B.s.  $\alpha$ -amilazının aktif grupları üzerinde araştırmalar yapmış olan Di Carlo (3) enzimi parakloromerküribenzoik asid, elementel iyod ve Ag<sup>+</sup> iyonları ile muamele ederek —SH gruplarını maskeleymiş, enzim aktivitesinin kısmen kaybolduğunu görmüş ve kısmen inaktive edilmiş enzime HCN, H<sub>2</sub>S ve sistein ilâvesiyle aktivitesinin % 100'e çık-

\* Biokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

tığını tespit etmiştir. Araştırmacı bu deneylere dayanarak enzimin HCN ile reaktivasyonu dolayısıyla aktiviteden —SH gruplarının mes'ul olduğunu, tirozil gruplarının mes'ul tutulamayacağını ortaya koymuştur.

Diğer bazı araştırmacılar ise (4-6) yaptıkları çalışmalarla *B.s.*  $\alpha$ -amilazının hiç —SH grubu ihtiva etmediğini ileri sürmüşlerdir. Ono ve arkadaşları (7) aynı enzimde aktif grubun pH 3.6-9.4 dışında iyonize olduğunu tespit etmişler, fakat enzimin hiç —SH grubu ihtiva etmediğini ileri süren araştırmacıların bulgularına dayanarak, —SH gruplarını yok farzetmişler ve esas rolün aynı pH alanı dışında iyonize olan tirozil gruplarına ait olduğunu iddia etmişlerdir. Buna karşılık Toda ve Narita (8) aynı enzimde —SH grubunun mevcut olduğunu, fakat kalsiyum ile maskelenmiş bir halde bulunduğu için ancak kalsiyum iyonları bertaraf edildikten sonra renk reaksiyonu verdiğini göstermişler ve yine deneylere dayanarak —SH grubunun aktivitede önemli rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Yukarıda adı geçen çalışmalardan anlaşılacağı gibi *B.s.*  $\alpha$ -amilazının enzim aktivitesinin özellikle sistenin —SH ve tirozinin —OH gruplarından ileri geldiği öne sürülmektedir.

*Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazı ile maltoz arasındaki karşılıklı etki (9) gözönünde bulundurularak, bu çalışmada, aynı enzimin hidroksifenil grupları ile reaksiyon ortamına ilâve edilen glukoz arasında karşılıklı bir etkinin bulunup bulunmadığı, tirozil bakiyelerinin enzim aktivitesinde rolü olup olmadığı araştırıldı ve enzime sisten ilâvesiyle husule gelen aktivite değişikliği incelendi.

#### M A T E R Y E L ve M E T O D

Deneylelerimizde liyofilize *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazı (170 U/mg E. Merck AG. Darmstadt), nişasta (amylum soluble E. Merck AG. Darmstadt), D (+)-glukoz ve L(+)-sistein hidroklorür (E. Merck AG. Darmstadt) kullanıldı.

Renk reaksiyonları için Folin-Ciocalteu (10), Diazo (11) reaktifleri ile çalışıldı ve renk şiddetleri Beckman C tipi elektrokolorimetrede kıyaslandı. UV alanındaki spektrofotometrik ölçmeler DB tipi Beckman spektrofotometre ile yapıldı. Aktivite tayinlerinde Wohlgemuth metodu (12) kullanıldı. Enzim etkisinin 0.1 N HCl ile durdurulması ve iyod çözeltisinin hazırlanmasında Hopkins'e göre (13) çalışıldı.

A) Deneylerde kullanılan *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltileri:

- 1) % 0.100 ve % 0.050 lik çözeltiler.
- 2) % 0.001 lik çözelti, % 0.100 veya % 0.50 lik çözeltiden 0.5 M fosfat tamponu (pH 6.0) ile seyreltilerek hazırlandı.
- 3) 3 M konsantrasyonda glukoz ihtiva eden % 0.100 ve % 0.050 lik çözeltiler,  $\alpha$ -amilazın sudaki çözeltisine sulp glukoz ilâvesiyle hazırlandı.
- 4) 3 M konsantrasyonda glukoz ihtiva eden % 0.001 lik çözelti, 3 numaralı çözeltilerden 3 M glukoz ihtiva eden 0.5 M fosfat tamponu (pH 6.0) ile seyreltilerek hazırlandı.
- 5) 0.1 M konsantrasyonda sistein hidroklorür ihtiva eden % 0.001 lik çözelti, 1 numaralı çözeltilerden, 0.5 M fosfat tamponunda çözülmüş ve pH sı N NaOH ile 6.0 ya getirilmiş, 0.1 M sistein hidroklorür çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı.

B) *Basillus subtilis*  $\alpha$ -amilazı molekülündeki tirozil bakiyelerinin tayini için aşağıdaki ölçmeler yapıldı:

- 1) Glukoz ihtiva eden ve etmeyen % 0.050 lik *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilerinin UV alanındaki absorbanları, 279 m $\mu$  da, 1 cm tabaka kalınlığında, biri 3 M glukoz çözeltisine diğeri ise suya karşı ölçüldü.
- 2) Diazo reaksiyonu için, glukoz ihtiva eden ve etmeyen *B.s.*  $\alpha$ -amilazının % 0.100 lik çözeltilerinden 2 şer ml alınarak deney tüplerine kondu. Bunlara 3 er ml saf su ve 1.6 şar ml % 1.1 lik sodyum karbonat çözeltisi ilâve edilip buz içinde soğutuldu. Herbirine, belirli oranda karıştırılmış ve buz içinde soğutulmuş, Diazo çözeltisinden 1.5 ml ilâve edildikten sonra 60 dakika deepfreeze'de, buz içinde, bırakılarak reaksiyonun tamamlanması sağlandı. Bu müddetin sonunda deepfreeze'den çıkarılan tüpler oda temperaturüne getirildikten sonra renk şiddetleri Beckman C tipi elektrokolorimetrede, 524 m $\mu$  da ve 1 cm tabaka kalınlığında (biri 3 M glukoz çözeltisi, diğeri ise su ile hazırlanmış körlere karşı) ölçüldü.
- 3) Folin-fenol reaksiyonu için, glukoz ihtiva eden ve etmeyen % 0.100 lik *B.s.*  $\alpha$ -amilaz çözeltilerinden (A.1 ve A.3 çözeltileri) 2 şer ml alınarak zımparalanmış cam kapaklı mezürlere kondu. Bunlara 3 er ml % 20 lik sodyum karbonat çözeltisi, 4 er ml saf su ve 1 er ml

1/3 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ilâve edildi. Karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletilen çözeltilerin absorpsiyon değerleri Beckman C tipi elektrokolorimetrede, 660 m $\mu$  da ve 1 cm tabaka kalınlığında (biri 3 M glukoz çözeltisi diğeri ise su ile hazırlanmış körlere karşı) okundu.

C) Enzim aktivitesi tayini için aşağıdaki deneyler yapıldı:

Kolorimetrik tayinlerde kullanılan % 0.100 lik  $\alpha$ -amilaz çözeltilerinden glukozsuz olanı 0.5 M fosfat tamponu (pH 6.0), glukozlu olanı ise 3 M glukoz ihtiva eden 0.5 M fosfat tamponu (pH 6.0) ile 100 defa seyreltikten sonra bunlara Wohlgemuth metodu tatbik edildi. Enzim çözeltisi 12 tüpte seyreltildi. Substrata (nişasta) etki ettirildikten sonra enzim reaksiyonunu durdurmak maksadiyle her tübe 5 er ml 0.1 N HCl ve renk teşekkülü için de 1 er ml iyod çözeltisi ilâve edildi. 0.1 M konsantrasyonda sistein hidroklorür ihtiva eden % 0.001 lik *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilisinde aynı şekilde aktivite tayini yapıldı ve meydana gelen mor veya mavi renkler sistein hidroklorür ihtiva etmeyen çözeltilerin renkleriyle, gözle kıyaslandı.

#### B U L G U L A R

Spektrumun UV alanında (279 m $\mu$  da) yapılan ölçmelerde glukozlu ortamdaki *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilisinin, glukozsuz ortamdaki *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilisine kıyasla daha düşük bir absorbans gösterdiği tespit edildi (Cetvel 1).

Cetvel 1. Glukozlu ve glukozsuz *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilerinin UV deki ve reaksiyonları tatbikinden sonraki absorbansları.

$\alpha$ -Amilaz ( <i>B.s.</i> )	UV	Diazo	Folin-fenol
Glukozsuz	0.43	0.13	0.45
Glukozlu	0.17	0.05	0.18

Gerek Folin-fenol ve gerekse Diazo reaksiyonlarında glukozlu ortamdaki *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilisinin, glukozsuz ortamdaki çözeltiliye kıyasla, absorpsiyon değerlerinin daha düşük olduğu görüldü (Cetvel 1).

Glukozlu ve glukozsuz ortamdaki *B.s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilerinin Wohlgemuth metodu ile tayin edilen aktiviteleri arasında bir fark görülemedi. Bununla beraber 0.1 M konsantrasyonda sistein hidroklorür ihtiva eden *B.s.*  $\alpha$ -amilaz çözeltisi ile yapılan aktivite tayininde enzimin aktivitesinde biraz artma müşahede edildi (Cetvel 2).

Cetvel 2. Glukozsuz, glukozlu ve sistein hidroklorürlü ortamda % 0,001 lik *B. s.*  $\alpha$ -amilazı çözeltilerinin Wohlgemuth metoduna göre aktiviteleri. (—, aktivite var; +, ++ aktivite azalmış; +++ aktivite yok.)

$\alpha$ -Amilaz ( <i>B.s.</i> )	T ü p s a y ı s ı											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Glukozsuz	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	+++	+++
Glukozlu	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	+++	+++
Sistein HCl'lü	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++

### T A R T I Ş M A

Bilindiği gibi protein çözeltileri UV ışığı absorbe eder ve en karakteristik absorbans 279 m $\mu$  dadır. Bu absorbsiyon özellikle triozil bakiyelerinin fenol grupları ile triptofanın indol gruplarından ileri gelmektedir. *B.s.*  $\alpha$ -amilazı, glukozlu ortamda, 279 m $\mu$  da, glukozsuz ortamdakine kıyasla aşağı yukarı 2.5 defa daha düşük bir absorbans göstermektedir (Cetvel 1). Müşahede edilen absorbans azalması, muhtemelen tirozil bakiyelerinin hidroksifenil grupları ile glukozun —OH grupları arasındaki karşılıklı etkiden ileri gelmektedir. Nitekim Ohnishi (9) maltoz ile muamele edilmiş ve edilmemiş *B.s.*  $\alpha$ -amilazında spektrofotometrik farkları incelemiş ve 279 m $\mu$  da husule gelen absorbans azalmasını tirozil ve triptofil bakiyeleri ile maltoz arasındaki karşılıklı bir etki ile izah etmiştir.

*B.s.*  $\alpha$ -amilazının glukozlu ortamda verdiği Folin-fenol ve Diazo reaksiyonlarındaki renk şiddetlerinin, glukozsuz ortamdaki reaksiyonlarına kıyasla 2.5 defa kadar daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Cetvel 1). Aynı şekilde bu absorbans azalmasının da enzimde bulunan tirozil bakiyeleri ile glukozun —OH grupları arasında mevcut karşılıklı bir etki dolayısıyla, tirozil bakiyelerinin renk verememesinden ileri geldiği düşünülebilir. Nitekim Debourge ve Creac'h (14) de tiro-

zin ve hidrokisiprolinle yaptıkları deneylerde, bu amino asitlerle bazı monosakkarid ve polihidrik alkoller arasında bir kompleksin teşekkül ettiğini tespit etmişlerdir.

*B.s. α-amilazının* enzim etkisinde esas rolü oynadıkları ileri sürülen tirozil gruplarının hidrokisilleri ile glukoz arasındaki karşılıklı bir etki dolayısıyla, enzim aktivitesinde de bir azalma müşahade edilmesi beklenirdi. Halbuki çalışmamızda glukozla muamele edilmiş enzim aktivitesinin, glukozsuz ortamdakinin aynı kaldığı görüldü. Bu durum *B.s. α-amilazının* katalitik etkisinde, enzimin adı geçen karşılıklı etkiye rağmen aktivitesini muhafaza etmesinden ziyade, tirozil bakiyelerinin hidrokisifenil gruplarının rolü olmaması ile izah edilebilir. Nitekim Di Carlo (3) iyodla inaktive edilmiş *B.s. α-amilazının*, bir —SH aktivatörü olan HCN ile tam olarak reaktive edilebildiğini tespit etmiş ve bu bulguya dayanarak tirozil bakiyelerinin değil sistenil bakiyelerindeki —SH gruplarının enzim aktivitesi bakımından esas rolü oynadığını belirtmiştir. Esasen *B.s. α-amilazını* inaktive etmek için literatürde adı geçen elementel iyod ve maleik anhidrid (3), fluorodinitrobenzen (15) ve tetranitrometan (16) sadece tirozil bakiyelerinin hidrokisifenil grupları ile değil, sistenil bakiyelerinin —SH grupları ile de aşağı yukarı aynı şartlarda reaksiyon verebilen reaktiflerdir. Folin-Ciocalteu reaktifi ile aktivitenin kaybolmuş olması ise, bu reaktifin,  $Ca^{2+}$  iyonları ile çökelti verdiği gözönüne alınırca, muhtemelen *B.s. α-amilazının* aktivite göstermesinde gerekli olan  $Ca^{2+}$  iyonları ile birleşmesinden ileri gelmektedir. Buna göre, adı geçen reaktiflerin tirozil bakiyelerinin fenol hidrokisilleri ile birleşmeleri sonucunda enzimin inaktive olduğunu ileri sürenlerin izahları tatminkâr olmamaktadır. Nitekim Di Carlo'dan başka (3) Toda ve Narita da (8) *B.s. α-amilazının* enzim etkisi bakımından —SH gruplarının esas rolü oynadığını belirtmişlerdir. Moleküllerinde aktif —SH grubu taşıyan enzimler  $H_2S$ , sisten ve HCN gibi indirgen maddelerle aktive edilebilirler. Bu çalışmada da enzime sisten ilâvesiyle *B.s. α-amilazında* bir aktivite artması tesbit edilmiştir (Cetvel 2). Sisten ilâvesiyle *B.s. α-amilazında* görülen aktivite artması, molekülde —SH gruplarının varlığına ve bu grupların enzim aktivitesi bakımından muhtemelen esas rolü oynadığına işaret etmektedir.

## Ö Z E T

*B. subtilis*  $\alpha$ -amilaz çözeltisinin glukozlu ortamda UV (279 m $\mu$ ) absorpsyonu ve Folin-fenol ve Diazo reaktifleri ile verdiği renk reaksiyonlarının şiddetleri glukoz ihtiva etmeyen enzim çözeltisine kıyasla daha düşük bulundu. Bu durum glukoz molekülü ile enzimdeki tirozil bakiyeleri arasında karşılıklı bir etkinin bulunması ile izah edilebilir. Bu karşılıklı etki tirozil bakiyelerinin karakteristik reaksiyonlarını vermesine engel olduğu halde glukozlu ortamda aktivitenin aynen devam etmesi, enzimin tirozil bakiyelerindeki —OH gruplarının aktivitede rolü olmadığı kanısını uyandırmaktadır. Bundan başka, glukozsuz ortama —SH gruplarının aktivatörü olan, sistein ilâvesiyle enzim aktivitesinde bir artma müşahade edilmesi enzimin sisteinil bakiyelerindeki —SH gruplarının aktivitede rol oynadığını göstermektedir. *B.s.*  $\alpha$ -amilazındaki tirozil ve sisteinil bakiyelerinin enzim aktivitesindeki rolü tartışılmıştır.

## S U M M A R Y

The UV absorbtivity, Folin and Diazo colour reactions of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase (3.2.1.1) solution containing glucose were less intensive than those of the same enzyme solution which did not contain glucose. These findings were attributed to the existence of an interaction between glucose molecules and the tyrosyl residues of the enzyme. Although the tyrosyl residues because of that interaction were not able to give their characteristic reactions, the surviving of the enzyme activity suggests that the phenolic groups of the tyrosyl residues are not involved in the enzymatic activity. Furthermore, the observation of increasing activity due to the addition of cysteine to the *B.s.*  $\alpha$ -amylase solution without glucose indicates that the —SH groups of the cysteinyl residues are responsible for the enzyme activity. The roles of the tyrosyl and cysteinyl residues of *B.s.*  $\alpha$ -amylase in the enzymatic activity were discussed.

## L İ T E R A T Ü R

1. Yamamoto, T., Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **19**, 121 (1955). - Ref. Radley, J. A., Starch and its Derivatives, 440, Chapman and Hall Ltd., London, (1968).
2. Conellan, John, M., Shaw, D., J. Biol. Chem., **245**, 2845 (1970).
3. Di Carlo, F. J., Redfern, S., Arch. Biochem., **15**, 343 (1947).
4. Fischer, E. H., Stein, E. A., The Enzymes, **4**, 313, Academic Press, (1960). - Ref. Radley, J. A., Starch and its Derivatives, 454, Chapman and Hall Ltd., London, (1968).
5. Junge, J. M., Stein, E. A., Neurath, H., Fischer, E. H., J. Biol. Chem., **234**, 556 (1959).
6. Akabori, S., Okada, Y., Fujiwara, S., Sugae, K., J. Biochem., Tokyo, **43**, 741 (1956). - Ref. Radley, J. A., Starch and its Derivatives, 454, Chapman and Hall Ltd., London, (1968).
7. Ono, S., Hiromi, K., Yoshikawa, Y., Bull. Chem. Soc. Japan, **31**, 957 (1958).
8. Todo, H., Narita, K., J. Biochem., Tokyo, **63**, 302 (1968). - Ref. C. A., **68**, 102125r (1968).
9. Ohnishi, M., *ibid.*, **68**, 933 (1970).
10. Falin, O., Ciocalteu, V., J. Biol. Chem., **73**, 627 (1927).
11. Koessler, K., Hanke, M. T., *ibid.*, **39**, 497 (1919).
12. Wohlgemuth, J., Klin. Wschr., **2**, 1253 (1929).
13. Hopkins, R. H., Bird, R., Biochem. J., **76**, 257 (1960).
14. Debourge, J. C., Creac'h, P. V., Procès-Verbaux, Séances Soc. Phys. Nat., **64**, 271 (1963).
15. Wallenfels, K., Streffer, C., Biochem. Z., **346**, 119 (1966).
16. Riordan, J. F., Sokolowsky, M., Vallee, B. L., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 4104 (1966).

(Redaksiyona verildiği tarih: 10 Mart 1972)