

ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentezlenen, biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki maddelere '**enzim**' denir. Küçük bir grup katalitik RNA moleküllerinin (ribozim) haricinde tüm enzimler protein yapısındadırlar. Protein yapısında olduklarından proteinlerdeki amino asitlerin dizilişi, enzimlerin belirli bir konformasyonu almasında ve üç boyutlu yapı kazanmasında büyük öneme sahiptir. Enzimlerin bu üç boyutlu yapısı, katalitik aktivitesinde ve özgül olmasında etkilidir.

Enzimlerin katalizleme gücü diğer kimyasal katalizörlere göre oldukça fazladır. Tepkime hızını 10^6 - 10^{16} defa arttırabilirler. Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerde yan ürün meydana gelmez ve tepkime verimi %100'dür.

1.1. Enzim Katalizi

Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayırt edici özelliği, enzim üzerinde '**aktif merkez**' denen bir cep sınırları içinde meydana gelmesidir. Aktif merkez, enzim molekülü üzerinde, substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgedir; substratı tutar ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Substratın ürüne dönüşmesiyle oluşan enzim-ürün kompleksinden enzimin ayrılmasıyla ürün serbestleşir.

7.1. Enzim Aktivitesi

Bir enzimatik tepkimenin hızı, **enzimin etkinliği** veya **enzimin aktivitesi** ile ilişkilidir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürüne haline dönüştürür.

Enzim aktivitesini göstermek için kullanılan birimler şunlardır;

Enzim ünitesi (U) : 25°C 'de, optimum şartlarda, 1 dakikada, $1\ \mu\text{M}$ substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite: 1 mg protein başına enzim ünitesidir. U/mg protein şeklinde hesaplanır. Enzimin saflık derecesini gösterir.

Molar aktivite (turnover sayısı): Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne çevrilen substrat molekülü sayısıdır.

Katal: Optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

1.3. Enzim Kinetiği

Deneysel parametrelerdeki değişmelerle enzimatik tepkimelerin hızları arasındaki ilişkileri ifade eder. Bir enzimatik tepkimenin hızı, enzim etkisiyle birim zamanda (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Optimum pH, 25°C sıcaklık ve doymuş substrat konsantrasyonlarında bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait '**dönüşüm (turnover) sayısı**' denir ve kısaca ' **k_{cat}** ' sembolü ile gösterilir.

Enzim	Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)
Katalaz	H ₂ O ₂	40,000,000
Karbonik anhidraz	HCO ₃ ⁻	1,000,000
Asetilkolinesteraz	Asetilkolin	14,000
β -Laktamaz	Benzilpenisilin	2,000
Fumaraz	Fumarat	800
ATPaz	ATP	0.4

1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, etki ettikleri reaksiyon çeşidine göre 6 gruba ayrılır.

1. Oksidoredüktazlar

Oksidasyon-redüksiyon, yani yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu enzim grubuna örnek olarak; laktat dehidrogenaz, katalaz, polifenol oksidaz enzimleri verilebilir.

Bu enzimler, oksijenle solunum yapan tüm canlı hücrelerde bulunur ve yüksek bir aktiviteyle çalışır, çünkü oksijenli solunumda sürekli H₂O₂ meydana gelir, bu madde hücre için son derece toksik

olup ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Enzim, H₂O₂'i suya indirgemek için bazı maddeleri elektron vericisi olarak kullanır. İnsanda bu tepkime için tercih edilen elektron vericisi, molekül ağırlığı 85,000-88,000 dalton aralığında olan glutatyondur (GSH). Katalaz, herbiri 57,500 daltonluk dört adet, özdeş alt birimden meydana gelmiştir. Yapısında hem grubu ve buna bağlı ferrik demir (Fe³⁺) bulunmaktadır. Bundan dolayı, sitokromlar gibi siyanür tarafından büyük oranda inhibe olur. Katalaz bilinen en aktif enzimlerden biri olup, turnover sayısı 4x10⁷'dir.

2. Transferazlar

Bir molekülden diğerine fonksiyonel bir grubu aktaran enzimlerdir. Örnek; glutamik pirüvik transaminaz, fosforilaz vb.

3. Hidrolazlar

Bağlara su katılarak bağların koparılmasını (hidroliz) katalizleyen enzim grubudur. Örnek; amilaz, proteazlar, karbonhidrazlar, lipazlar vb.

4. Liyazlar

Bağları oksidasyon ya da hidrolizden başka yollarla koparan veya oluşturan enzimlerdir. Örnek; pirüvat dekarboksilaz, sitrat sentaz, adenilat siklaz vb.

5. İzomerazlar

Molekül içinde değişiklik yapan enzimlerdir. Örnek; triozfosfat izomeraz, glukoz-6-fosfat izomeraz vb.

6. Ligazlar (Sentetazlar)

Enerji kullanarak iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir. Örnek; DNA ligaz vb.

1.4.1. Amilaz

Nişastanın kısmen hidrolizi, ağızda çiğneme sırasında tükürük amilazı (α -amilaz) ile etkileşmesiyle başlar. Enzimin aktivitesi ortamın asidik veya bazikliğine (pH) göre değişir. Tükürükteki amilaz yalnız bazik ortamda etkilidir. Mide öz suyu çok asitli olduğundan amilaz bu ortamda etkin değildir. Nişastanın sindirimi

ince barsakta tamamlanır. Kısaca karbohidratları parçalayan esas enzim amilazdır, α ve β olmak üzere ikiye ayrılır.

1.5. Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Yöntemler

(1) **Spektrofotometrik yöntem**, pek çok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görünür ışıktaki veya ultraviyole ışıktaki absorpsiyon vermektir. Bu özellikten yararlanılarak substratın azalması veya ürünün oluşması gibi koenzimdeki değişiklikler tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem, diğer yöntemlere göre kolaylığı, basitliği ve hassas oluşu nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemde optik yoğunluk değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir. Birçok enzimin aktivite tayini bu yöntem ile yapılmaktadır.

(2) **Monometrik yöntem**, bir bileşeni gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemdir. Örneğin; oksidazlarla oksijen alınımı ve dekarboksilazlarla karbon dioksit salınımı bu yöntemle ölçülür.

(3) **Thunberg yöntemi**, çok sayıda dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak ölçülür. Metilen mavisi elektron alıcısıdır. Bu bileşiğin yükseltgenmiş durumu renkli, indirgenmiş durumu ise renksizdir. Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla reaksiyon ortamına belirli miktarda metilen mavisi ilave edilir. Renk kayboluncaya kadar geçen zaman belirlenir. Deney havanın oksijeninden korunmak için özel bir tüpte (thunberg tüpü) yapılır.

(4) **Elektrot yöntemi**, cam elektrotlarla oluşan ürünlerin ölçülmesi esasına dayanır.

(5) **Polimerik yöntem**, pekçok enzimin substratı optikçe aktiftir. Eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır. Eğer substrat ve ürünün ikisi de optikçe aktif değilse bu yöntemin kullanılması uygun değildir.

(6) **Kromatografik yöntem**, enzim substrat karışımlarından belli zaman aralıklarında örnekler alınır. Bu yöntemde, substrat ve ürün kromatografi kağıdında veya ince tabaka kromatografisiyle birbirinden ayırt edilir.

(7) **Kimyasal tayin yöntemi**, reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alınıp, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir.

1.6. Deneysel Çalışmalar

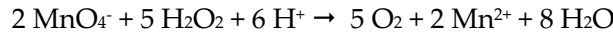
Deney 1.1. Katalazın Etkisi

Deneyin prensibi: H₂O₂' in katalaz ile parçalanma hızının incelenmesi.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 damla kan konur ve 5 mL su eklenir. Tüpteki karışıma 1-2 damla H₂O₂ damlatılır ve tüpte meydana gelen değişimler gözlenir.

Deney 1.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Deneyin prensibi: Enzimin aktivitesi, kimyasal analiz yöntemi kullanılarak belirlenir. Bu yöntemde, tepkime sonunda enzim tarafından ürüne dönüştürülmeyen H₂O₂ miktarı, titrasyon yolu ile belirlenecektir. H₂O₂ yüksek oranda oksitleyici bir ajan olduğundan, indirgen bir madde olan permanganat (MnO₄²⁻) iyonu ile redoks tepkimesine girer ve sonuçta H₂O₂ suya yükseltgenirken, permanganat iyonu da indirgenerek Mn²⁺ oluşur. Tepkimenin stokiyometrik dengesi, 5 mol H₂O₂' ye 2 mol permanganat şeklindedir.



Deneyin yapılışı: Yöntemde permanganat iyonu kaynağı olarak 0.005 M (5 mM) KMnO₄ çözeltisi kullanılır. Bu madde koyu bordo haldedir. Permanganat, peroksit ile tepkimeye girip, Mn²⁺ yükseltgenince, renk kaybolur. Aktivitenin tayininde bu prensip temel olarak alınır.

I. Aşama: Tüplerin hazırlanması

Çözeltiler / mL	Kör	Tüp I	Tüp II	Tüp III
6 N H ₂ SO ₄	2	-	-	-
0.02 M fosfat tamponu	10	10	10	10
0.05 M H ₂ O ₂	2	2	2	2
Saf su	1	1	1	0.5
5×10 ⁻⁵ M KCN	-	-	-	0.5
Enzim kaynağı	0.5	0.5	-	0.5
Kaynatılmış enzim kaynağı	-	-	0.5	-

Tüpler buz üzerinde 5 dk bekletilir.

6 N H ₂ SO ₄	-	2	2	2
------------------------------------	---	---	---	---

Tepkime bitiminde titrasyon işlemine geçilir. Permanganat çözeltisi damla damla tepkime karışımına ilave edilir. Tepkime karışımı sürekli çalkalanarak, peroksit ile permanganatın hızla tepkimeye girmesi sağlanır. Ortamdaki peroksit miktarı sabit olduğundan bir süre sonra permanganat ile tepkimeye girecek peroksit kalmayacak ve permanganat, rengini tepkime karışımına vererek, ortamın pembeleşmesini sağlar.

Ortamda sabit pembe renk oluşunca titrasyon işlemine son verilir ve harcanan permanganat miktarı belirlenerek aşağıda verilen tabloya kaydedilir. Ardından ikinci tüpün titrasyon işlemine geçilir. Aynı şekilde tüm tüplerin titrasyon işlemleri gerçekleştirilerek, harcanan permanganat miktarları tabloya kaydedilir.

II. Aşama: Enzim aktivitesinin hesaplanması

Katalaz aktivitesi; 1 mL tam kan için 0° C'de ve bir dakikada enzim tarafından kullanılan µmol substrat (hidrojen peroksit) olarak ifade edilir.

Bu tanıma göre enzim aktivitesinin hesaplanması için öncelikle her tüpte kullanılan substrat (H₂O₂) miktarını bulmak gerekir.

Tepkimenin başlatılması için her tüpe 0.05 M H₂O₂ çözeltisinden 2 mL eklenir. Hesaplamaları yapabilmek için başlangıçtaki H₂O₂ konsantrasyonunun bulunması gerekir, bu değer 0'ıncı dakikada inhibe edilen kör tüpündeki değerdir. Eğer enzim tepkimeye girmişse I., II. ve III. tüplerde belirlenecek H₂O₂ konsantrasyonunun kör tüptekine göre daha az bulunması gerekir.

Titrasyon işleminde permanganat ile tepkimeye giren peroksit, 5 dakikalık inkübasyon süresince ürüne dönüşmeden kalan peroksittir. Bu peroksitin miktarını bulmak için öncelikle titrasyonda kullanılan KMnO₄'in mol sayısını bulmak gerekir.

Deney sonucunda bir tüpte enzim tarafından kullanılan substrat miktarı, 1/1000 kez seyreltilmiş kan örneğinin 0,5 mL'sinin, 0° C'deki enzim aktivitesine eşittir. Tam kan için belirtilen aktiviteyi hesaplamak için gerekli hesaplamalar yapılır.

$$\text{Katalaz aktivitesi } (\mu \text{ mol}) = \mu \text{ mol H}_2\text{O}_2 \times 2 \times 100 / 5$$

Kaynatmadan ve KCN'den kaynaklanan % inhibisyon değerleri, I nolu tp için hesaplanan aktivite değerleri %100 kabul edilerek bulunur.

	Kr	Tp I	Tp II	Tp III
Kullanılan KMnO ₄ (mL)				
Titrasyonda kullanılan KMnO ₄ (µmol)				
Titrasyonda kullanılan H ₂ O ₂ (µmol)				
Enzimin kullandığı H ₂ O ₂ (µmol)				
Orijinal enzim aktivitesi (µmol)				
% inhibisyon değerleri	-	-		

Çözeltiler:

Enzim kaynağı: 1:100 oranında seyreltilmiş insan kanı.

Isıtılmış enzim kaynağı: Kaynar su banyosunda ısıtılmış, 1:100 oranında seyreltilmiş kan.

Fosfat tamponu: 13.97 g K₂HPO₄ ve 2.69 g KH₂PO₄ bir miktar saf suda çözülerek litreye tamamlanır (pH 7.4) ve +4° C'de saklanır.

0.05 M H₂O₂ (substrat): 0.43 mL H₂O₂ alınır ve tampon çözelti ile 100 mL'ye tamamlanır.

0.005 M KMnO₄: 0.080 g KMnO₄ 100 mL saf suda çözülür.

Deney 1.3. Serumda Amilaz Tayini

Deneyin prensibi: Nişastanın hidrolizinden yararlanarak, serum amilaz düzeyinin spektrofotometrik ölçüm sonucu belirlenmesi.

Deneyin yapılışı: Kr ve örnek tüpler aşağıdaki tabloya göre hazırlanır.

Çözeltiler / mL	Kr	rnek
Serum	-	0.1

Tampon	1.0	1.0
Nişasta	1.0	1.0
Renk ayıracı	5.0	5.0

Tüpler iyice karıştırılır ve 37⁰C'de su banyosunda 20 dk bekletilir.

Su banyosunda çıkarılan tüplerin oda sıcaklığına gelmesi için 10 dk bekletilir ve spektrofotometrede 580 nm'de okumalar yapılır ve aşağıdaki formüle göre amilaz miktarı hesaplanır.

$$\text{Amilaz miktarı (U/L)} = \text{Örnek OD} \times 15.500$$

Çözeltiler:

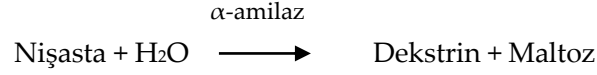
%0.1'lik Nişasta: 0.1 g nişasta tartılır ve 5 mL saf su ile süspansiyon haline getirilir üzerine 30 mL kaynar saf su ilave edilir ve iyice karıştırılır (Bulanıklık olduğu takdirde yeniden hazırlanmalıdır). Soğumaya bırakılır, saf su ile 100 mL'ye tamamlanır (Polietilen şişede soğukta saklanır. Kullanmadan önce iyice karıştırılmalıdır).

Tampon çözelti: 1.938 g Tris (hidroksimetil) aminometan [C₄H₁₁NO₃] saf suda çözülür ve üzerine 0.497 g NaCl eklenir ve iyice çözüldükten sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH 7.5 ayarlanır (Çözelti 15-25⁰C'de polietilen şişede saklanmalıdır). (Ma (Tris (hidroksimetil) aminometan=121.14 g/mol).

Renk ayıracı: 0.01494 g KI **bir miktar** suda çözüldükten sonra üzerine 0.01269 g I₂ eklenerek 100 mL'ye tamamlanır. 15-25⁰C'de saklanır. 1/100 oranında su ile seyreltilerek kullanılır. Bu çözelti 1 ay oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanabilir.

Deney 1.4. α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Deneyin prensibi: α -Amilaz nişasta molekülünün α -1,4-glikozidik bağlarını gelişi güzel parçalar ve oligosakkaritleri oluşturur. Uzun süre enzim etkisi sonucu oligosakkaritleri de parçalayarak maltoz oluştururlar.



Deneyin yapılışı:

I. Aşama: α -Amilaz aktivitesinin bulunması

- (1) α -Amilaz aktivitesinin bulunması için aşağıda verilen çizelgeye göre kör ve örnek tüpü hazırlanır.

Çözeltiler / mL	Kör	Örnek
Saf su	0.50	0.45
Nişasta çözeltisi	0.50	0.50
Enzim çözeltisi	—	0.05

Tüpler karıştırılır, oda sıcaklığında 5 dk bekletilir

Tüplere 1 mL renk ayırıcı eklenip karıştırılır ve kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir.

Soğuyan tüplere 5'er mL saf su eklenip karıştırılır ve köre karşı 546 nm'de absorbanslar okunur.

II. Aşama: Standart kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Çözeltiler / mL	Kör	1	2	3	4	5
Saf su	1.00	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50
Maltoz standardı	—	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Renk ayırıcı	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Tüpler çalkalanıp, kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir ardından çıkarılıp, soğutulur.

Tüplere 5'er mL saf su eklenip karıştırılır. Spektrofotometrede köre karşı 546 nm'de absorbens okunur.

Maltoz konsantrasyonlarına karşı absorbenslar grafiğe geçirilerek maltoz standart kalibrasyon eğrisi elde edilir. Maltoz standart eğrisinden örnek için okunan absorbens değerine karşı gelen konsantrasyon bulunur. Özgül aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Özgül aktivite} = [\mu\text{mol maltoz}/5 \times 0.05 \text{ (U/mL)}] / \text{mg protein (U mg/protein)}$$

Çözeltiler:

10 mM maltoz standartı: 0.171 g maltoz 50 mL saf suda çözülür.

α -amilaz çözeltisi: 1 mg α -amilaz 1 mL 0.05 M pH 7.0 fosfat tamponunda çözülür.

0.05 M fosfat tamponu (pH 7.5): 2.94 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.33 g NaH_2PO_4 tartılır 500 mL'ye saf su ile tamamlanır.

%0.1'lik Nişasta çözeltisi: 500 mg nişasta 50 mL saf suda hafifçe ısıtılarak çözülür.

Renk ayırıcı: 1 g 3,5 dinitrosalisilik asit, 20 mL 2 N NaOH, 50 mL saf suya 30 g Na-K tartarat ilave edilip, 100 mL'ye tamamlanır.

KAYNAKLAR

- (1) A. Atalay, Deneysel Biyokimya, H.Ü.FF. Yayınları Ders Kitapları Dizisi: 5, 95 - 99, 1978.
- (2) E. Gözükara, Biyokimya, Ofset Repromat Basımevi, 572 - 719, 1989.
- (3) Y. Kikuchi and N. Sasaki, Site-specific cleavage of natural mRNA sequences by newly designed hairpin catalytic RNAs., Nucleic Acid Research, 19(24): 6751 - 6755, 1991.
- (4) H. F. Noller, V. Hoffarth and L. Zimniak, Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures., Science, 256: 1416 - 1419, 1992.
- (5) Dr. H. Nursevin Öztıp, Dr. Ferda Candan T.C. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Biyokimya Laboratuvarı.
- (6) Fahrünnisa P. 2000. Biyokimya, Ankara.
- (7) <http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/358.pdf>

(8) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/Amylopektin_Sessel.svg

(9) R.H. Garrett, C.M. Grisham, 2009, Biochemistry.