

E4. Selüloz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

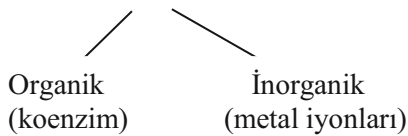
1. Genel Bilgi

Enzim

Kimyasal reaksiyonların hızlarını arttıran maddeler **katalizör** olarak adlandırılırlar. Katalizörler reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirirlerse de reaksiyon tamamlandığında tekrar kendi orijinal hallerine dönerler. **Enzimler** biyolojik katalizör olarak tanımlanabilirler. Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğinde olan protein yapısındaki maddelerdir. Bitki, hayvan ve mikroorganizmaların canlı hücreleri tarafından oluşturulan enzimler hücredeki işlevlerinin yanı sıra (in vivo) hücre dışında da yani in vitro koşullarda da aktivite göstermektedirler. Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem olan maddelerdir. Canlı dışında da aktivitelerini göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün enzimlerden gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Enzimlerin etki ettiği bileşiğe **substrat** denir ve her enzimin özgün bir substratı veya bazı enzimlerin özgün veya spesifik substratları vardır. Yani bazı enzimler sadece bir tip substrata etki edebilirken bazı enzimlerin etkilediği substrat tipi birden fazla olabilmektedir. RNA yapısında olan birkaç enzim molekülü bilinmekle birlikte, enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısındadır. Bazı enzimler, **kofaktör** denilen protein olmayan kısımlar da içerebilirler ki bunlar olmadan aktivite gösteremezler. Böyle enzimlerde, enzimin inaktif haldeki protein kısmına **apoenzim** ve kofaktör içeren aktif enzime ise **haloenzim** denir. Haloenzimlerde enzimin spesifikliğinden apoenzim, katalitik aktiviteden ise, kofaktör sorumludur. Kofaktörler; koenzimler, prostetik gruplar ve inorganik olarak gruplandırılabilirler. Kofaktör organik bir bileşik ise buna **koenzim** denilir. Eğer kofaktör enzim proteinine sıkı bağlı ise ve enzim proteinine zarar vermeden ayrılamıyorsa veya enzim proteininden basit diyaliz yöntemleri ile ayrılamıyorsa buna **prostetik grup** denilir.

Apoenzim + Kofaktör = Haloenzim



Katalizör görevi yapan birçok organik ve inorganik molekül bulunmaktadır. Bu nedenle, enzimler ile diğer katalizörler arasındaki farklılık ve benzerlikleri belirtmekte yarar vardır. Bütün katalizörler aşağıdaki ortak özelliklere sahiptirler.

1. Katalizörler reaksiyon hızını arttıran maddelerdir.
2. Katalizörler reaksiyon sonunda kaybolmazlar.
3. Katalizörlere sadece çok küçük miktarlarda ihtiyaç duyulur.
4. Katalizörler reaksiyonun denge noktasını değiştirmezler; sadece dengeye ulaşmak için gerekli olan süreyi kısaltırlar.

Bu ortak özelliklerin yanı sıra enzimler, kendilerini diğer katalizörlerden ayıran bazı farklılıklara da sahiptirler. Enzimlere özgü özellikler bunların etkinliği, spesifikliği ve kontrolleriyle ilgilidir.

1. Enzim etkinliği: Enzimler diğer katalizörlerden daha etkilidirler. Bu durum hidrojen peroksidin su ve oksijene parçalanması ile açıklanabilir. Bu reaksiyonu katalizleyen maddelerden birisi olan ferik iyonu (Fe^{+3}) reaksiyon hızını 30 000 kat artırır. Ferik iyonları bu reaksiyon için etkin bir katalizör olmasına karşın katalaz enzimi kadar etkili değildir. Katalaz enziminin varlığında reaksiyon 10^8 kat daha hızlı gerçekleşir.

2. Enzim spesifikliği: Katalizör olarak rol oynayan bir madde katalitik etkinliğin seçici olacağını garanti etmez. Kimya laboratuvarlarında karşılaşılan organik ve inorganik katalizörler çok sayıda farklı substrat üzerinde etkilidirler. Enzimleri bu tür katalizörlerden ayıran en önemli özellik onların hem **substrat yapısı** hem de **reaksiyon tipi** açısından son derece seçici olmalarıdır.

3. Enzim kontrolü: Enzimleri diğer katalizörlerden ayıran bir diğer özellik, enzimlerin katalitik etkinliğinin kontrol edilebilir olmasıdır. Birçok enzimin aktivitesi artırılabilir, azaltılabilir ve hatta tamamen durdurulabilir.

Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Enzimlerin doku ve hücrelerdeki konsantrasyonu son derece az olduğundan miktarlarını ölçmek çok güçtür. En iyi ölçme şekli enzimin katalitik aktivitesi ölçmektir. Dolayısıyla aktivite tayinlerinde ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Biyolojik maddelerde görev alan birçok enzim "Enzim Ünitesi" birimi ile ifade edilir. Buna göre; 1 dakika içerisinde 1 mikromol substratın belirli koşullar altında ürüne dönüşümünü sağlayan enzim miktarı "**bir ünite**" olarak kabul edilmektedir.

2. Materyal ve Yöntem

Selüloz enzim aktivitesi substrat olarak filtre kağınının kullanılması ile ölçülmüştür.

Substrat: Whatman No.1 filtre kađı (1x6 cm)(≈ 50 mg)

Metod:

1. Hacmi en az 25 mL olan bir test tüpüne 1 mL 0,05M Na-sitrat (pH 4,8) tamponu ilave edilir.
2. Sitrat tamponunda seyreltilmiş enzimden 0,5 mL eklenir.
3. Filtre kağı şeridi merdiven şeklinde bükülerek sıvının içerisine atılır. Filtre kağı tam olarak sıvının içerisine batmazsa, cam bir çubuk yardımıyla itilebilir.
4. Karışım $50^{\circ}C$ 'de 60 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrasında tüplere 3 mL DNS ilave edilip karıştırılır.
6. Tüpler kaynayan su içerisinde 5 dk. Süreyle kaynatılır. Tüm örnekler, enzim körleri, glikoz standartları ve spektro sıfır beraberce kaynatılmalıdır. Kaynatma sonrasında tüpler soğuk su banyosuna aktarılır.
7. Tüpler soğutulduktan sonra içerisine 20 mL saf su ilave edilir ve tüp içeriği iyice karıştırılır.
8. Pulp tamamen dibe çöktüğünde (en az 20 dk. snr.), oluşan renk spektro sıfıra karşı 540 nm'de spektrofotometrede ölçülür.

Spektro 0	Enzim kör
1,5 mL sitrat tamponu	1 mL sitrat tamponu
3 mL DNS	0,5 mL seyreltilmiş enzim
5 dk kaynatma + 20 mL saf su	3 mL DNS
Filtre kađı var	5 dk kaynatma + 20 mL saf su
	Filtre kađı yok

Standartlar	Enzim
1 mL sitrat tamponu	1 mL sitrat tamponu
0,5 mL standart	0,5 mL seyreltilmiş enzim
3 mL DNS	3 mL DNS
5 dk kaynatma + 20 mL saf su	5 dk kaynatma + 20 mL saf su
Filtre kâğıdı var	Filtre kâğıdı var

Glikoz Standartlarının Hazırlanması

Stok çözelti: 10 mg/mL konsantrasyonda glikoz çözeltisi

Dilüsyonlar:

1 mL glikoz stok çöz. + 0,5 mL tampon = 1:1,5 = 6,7 mg/mL (3,35 mg/0,5mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 1 mL tampon = 1:2 = 5,0 mg/mL (2,5 mg/0,5mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 2 mL tampon = 1:3 = 3,3 mg/mL (1,65 mg/0,5mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 4 mL tampon = 1:5 = 2,0 mg/mL (1,0 mg/0,5mL)

3. Sonuçların değerlendirilmesi,

1. Glikoz konsantrasyonuna (mg/0,5mL olarak) karşı 540 nm'de ölçülen absorbans değerleri aritmetik grafiğe işlenerek glikoz standart kurvesi çizilir.

2. Standart kurve kullanılarak her bir enzim örnek tüpünden açığa çıkan glikoz miktarı hesaplanır (enzim körünün absorbansı çıkarıldıktan snr).

3. Reaksiyon sonunda 2 mg glikoz oluşumunu sağlayacak enzimin konsantrasyonu belirlenir. Filtre kâğıdı selüloz aktivitesini hesaplamak için, 50 mg filtre kağıdından 60 dk.'da oluşan 2 mg indirgen şeker (glikoz olarak) değeri esas alınmıştır (% 4 dönüşüm). Açığa çıkan indirgen şekerin miktarı, analiz karışımındaki enzim miktarının lineer bir fonksiyonu olmadığı için; yani, aynı sürede enzim miktarı 2 kat arttırıldığında, oluşan indirgen şekerin miktarı 2 kat artmadığından % 4 oranda dönüşüm noktası esas alınmıştır. Analiz bu koşullarda gerçekleştirildiğinde hidroliz hızının lineer olduğu ve son ürün inhibisyonundan etkilenmediği varsayılmaktadır.

Enzim konsantrasyonu = 1/Dilüsyon = Enzimin dilüsyondaki hacmi / Dilüsyonun toplam hacmi

4. FPU reaksiyonunda 2 mg glikoz açığa çıkararak enzim miktarı (kritik enzim konsantrasyonu = mL/mL) 0,37 Ünite içerir.

$$FPU = \frac{0,37}{2 \text{ mg glikoz oluşturan enzim konsantrasyonu}} \text{U/mL}$$

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{2 \text{ mg glikoz} \frac{1 \mu\text{mol glikoz}}{0,18 \text{ mg glikoz}} \frac{1}{60 \text{ dk}} \frac{1}{0,5 \text{ mL}}}{\frac{1}{Dilüsyon}}$$

Kaynaklar

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, 59 (2), 257-268.