



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
ZİRAAT FAKÜLTESİ
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji 14

1. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ BELİRLENMESİ



✓ Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki **enzim miktarı**, enzimin katalitik aktivitesinden yararlanılarak belirlenir. Bu işlemin yapılabilmesi için enzim hakkında şu bilgilerin bilinmesi gerekmektedir.

1. Katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi.
2. Enzimin aktivite için kofaktör veya metal iyonuna ihtiyaç gösterip göstermediği.
3. Substrat ve varsa kofaktör için K_m değerleri. (K_m , maksimum hızın yarısına ulaşıldığı andaki substrat konsantrasyonunu ifade eder.)
4. Enzimin optimum pH'sı.
5. Enzimin optimum sıcaklığı.
6. Substratın kayboluş veya ürünün teşekkül hızının tesbit edilebileceği basit bir analitik metot.

1. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ BELİRLENMESİ



- ✓ Enzimler optimum sıcaklık, PH ve iyonik şiddette etkilerini gösterirler.
- ✓ Enzim aktivitesi çalışmalarında substrat konsantrasyonu doygunluğun **üzerinde** olmalıdır.
- ✓ Kofaktörlü enzimlerle ilgili tayinlerde, koenzim ve metal iyonu konsantrasyonları da doygunluğun **çok üzerinde** olmalıdır.
- ✓ Bu şartlar altında, sistemde hızı sınırlayan tek faktör **enzim konsantrasyonudur**. Yani hız, enzim miktarıyla **doğru orantılıdır** ve çözeltideki enzim seviyesini direkt olarak verir.
- ✓ Enzimli reaksiyonlarda **ürünün** oluşma hızının ölçülmesi, genellikle substratın harcanma hızına göre daha hassas sonuçlar vermektedir.

1. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ BELİRLENMESİ



- ✓Çünkü, tayinlerde substrat konsantrasyonu oldukça yüksek, harcanan miktar ise buna oranla çok düşüktür. Aradaki farkı belirlemek ise imkansızdır. Bu tip reaksiyonlarda, reaksiyon ürünleri özel kimyasal veya spektroskopik yöntemlerle ölçülebilir.
- ✓Spektroskopik yöntemler, reaksiyon boyunca ölçüm yapabilmek ve elde edilen verileri grafik üzerine aktarabilmek imkanlarından dolayı daha avantajlıdır.
- ✓Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi **enzim ünitesi (birimi)** cinsinden verilir. Bütün enzimleri kapsayacak bir ünite tarifi olmamasına rağmen, 25°C'de ve optimum şartlar altında 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına **1 enzim ünitesi (EU)** denilmesi genel olarak kabul edilmiştir.

1. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ BELİRLENMESİ



- ✓ Ayrıca, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi sayısına **spesifik (özgül) aktivite** (EU/mg protein) denilmektedir. Spesifik aktivite enzim saflığının ölçüsüdür. Spesifik aktivite, enzim izolasyonu esnasındaki aşamalarda, artarak saf haldeki bir enzimde maksimum ve sabit bir değere ulaşılır.
- ✓ Bir enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne çevrilen substratın molekül sayısına molar veya moleküler aktivite diğer bir deyimle **Turnover sayısı** denir. Örnek olarak, Turnover sayısı; karbonik anhidraz için 600 000/sn, asetil kolin esteraz için 25 000/sn, DNA polimeraz için 15/sn, Lizozim için 1/2 sn'dir.

Basic Concepts in Biochemistry, A Student's Survival Guide, H. F. Gilbert, McGraw-Hill Health Professions Division, 2000.

Biochemistry, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer W. H. Freeman and Company and Sumanas, Inc, 2005.

Color Atlas of Biochemistry, J. Koolman, K. H. Roehm, Georg Thieme Verlag, 2005. Harper's Illustrated Biochemistry, R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2003.

Enzyme Technology, Martin Chaplin and Christopher Bucke, Cambridge University Press, 1990.

Principles of Biochemistry, H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, Pearson Prentis Hall, 2006.