



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ürenin Üreaz enz. kat. hidr. kınt. in.

Yüksek Lisans Tezi

Oktay Asutay

361  
73

Kim-4000 TC

YILDIZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

361  
73

60

# ÜRENİN ÜREAZ ENZİMİ KATALİZLİ HİDROLİZİNİN KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kimyager Oktay ASUTAY

İstanbul — 1988

YILDIZ ÜNİVERSİTESİ  
GENEL KİTAPLIĞI

R 361

Kot : .....  
Alındığı Yer : .....  
Tarih : .....  
Fatura : .....  
Fiatı : .....  
Ayniyat No : .....  
Kayıt No : .....  
UDC : .....  
Ek : .....

73

Fen Bilimleri Enst.

12/12/1990

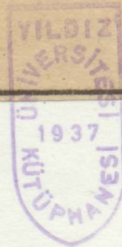
4000 TL

1/28

47396

54

378.242



YILDIZ ÜNİVERSİTESİ

D.B. No 45055

YILDIZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜRENİN ÜREAZ ENZİMİ KATALİZLİ HİDROLİZİNİN  
KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

73

(Yüksek Lisans Tezi)

Kimyager Oktay ASUTAY

İstanbul — 1988

# İÇİNDEKİLER

## I. GENEL BİLGİ

	Sayfa
1.1.Enzimlerin Tarihsel Gelişimi	1
1.2.Enzimin Yapısı	2
1.2.1. Molekül Ağırlığı	3
1.2.2. Protein Yapısı	3
1.2.2.1.Primer Yapı	4
1.2.2.2.Sekunder Yapı	4
1.2.2.3. Tersiyer Yapı	5
1.2.2.4. Kuaterner Yapı	5
1.2.3.Aktif Merkez	5
1.2.4.Koenzimler	6
1.2.5.Molekül Başına Aktif Merkez ve prostetik Grup Sayısı	6
1.3.Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	7
1.3.1.Adlandırma	7
1.3.2.Sınıflandırma	8
1.4.Enzimlerin Etki Mekanizması	9
1.5.Enzim Mekanizması	9
1.6.Enzim Kinetiği	9
1.6.1. Tek Substratlı Enzim Reaksiyonlarında başlangıç Hız İfadesinin Türetilmesi	10
1.6.1.1.Sürekli Hal İşlemi	10
1.6.1.2.Determinant Yöntemi	12
1.6.2.Enzim Kinetiği Üzerine Sıcaklık Etkisi	15
1.6.2.1.Hız Sabitlerinin Ayrılması	17
1.6.2.2. Tek Substratlı Reaksiyonlar İçin Aktivasyon Enerjileri	17
1.7.Enzim Kinetiği Deneylerinin Dizaynı	21
1.7.1.Substrat Derişiminin Seçimi	22
1.7.2.Enzim Saflığı ve Kararlılığı	23
1.7.3.Substrat Saflığı	23
1.7.4. Tamponlama Aracının Seçimi	24
1.7.5.Sıcaklık Kontrolü	25
1.7.6.Başlangıç Hız Verilerinin Hesaplanması	25

	Sayfa
<b>2.MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>26</b>
2.1.Kullanılan Maddeler	26
2.2.Kullanılan Çözeltiler	26
2.3.Kullanılan Araçlar	26
2.4.Yöntem	26
2.4.1.İletkenlik Deneylerinin Geliştirilmesi	27
2.4.2.Deneyin Yapılışı	28
2.4.3.İletkenlik/Zaman Eğrilerinden $V_o$ 'ın Hesaplanması	28
<b>3.SONUÇLAR VE TARTIŞMA</b>	<b>30</b>
3.1.Michaelis Sabitinin Bulunması	30
3.2.Reaksiyon Hızlarına Sıcaklığın Etkisi	33
3.2.1.Optimum Sıcaklığın Bulunması	33
3.3.Sonuç	35
<b>EKLER</b>	
Ek-1 . Tablolar	36
Ek-2.. Grafikler	45

## ÖZET

Enzimler reaksiyonların hızlarını  $10^8 - 10^{12}$  kat arttıran çok etkin katalizörlerdir. Kimya endüstrisinde daha üretken proseslerin geliştirilmesinde enzimler ve özellikle tutulmuş enzimler kullanılır. Bir enzimle çalışılırken enzimin katalize ettiği reaksiyonun hızının maksimum düzeyde olması için gerekli koşulların sağlanması gerekir. Bu koşullar kullanılacak enzim miktarı, substrat miktarı, optimum sıcaklık ve optimum pH dır. Aktivatör ve inhibitörün etkisininde incelenmesi gerekir.

Bu çalışmada ürenin üreaz enziminin katalitik etkisi ile hidrolizlenmesi reaksiyonunda hız değişiminin maksimum olduğu Michaelis sabitinin ( $K_m$ ) bulunması ve reaksiyon hızının maksimum olduğu sıcaklık değerinin bulunması amaçlanmıştır. Lineweaver - Burk diyagramı kullanılarak Michaelis sabitinin değeri  $3.447 \times 10^{-3}$  mol/l bulunmuştur. Reaksiyon için optimum sıcaklık  $62^\circ\text{C}$  dir.

## SUMMARY

Enzymes are catalysts which increase reaction rates  $10^8$ - $10^{12}$  fold. In the chemical industry enzymes are especially immobilized enzymes are used to develop processes with high efficiency. In enzyme catalyzed reactions the conditions necessary to obtain the maximum reaction rate should be provided. Such conditions are dependent on enzyme concentration, substrate con., optimum temperature and optimum pH.

The aim of this study is to determine the Michaelis constant ( $K_m$ ) and the optimum temperature of the enzymatic hydrolysis of urea using the enzyme urease.  $K_m$  was determined by using the Lineweaver - Burk plot and was calculated to be  $3.447 \times 10^{-3}$  mol/l. The optimum temperature was found to be  $62^\circ\text{C}$ .

# I. GENEL BİLGİ

## 1.1.ENZİMLERİN TARİHSEL GELİŞİMİ

Enzimler canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların çok ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları düzenleyen spesifik katalizör olarak tanımlanabilir. İnsanların varoluşundan bu yana enzimlerden yararlanma olayı bilerek veya bilmeyerek süregelmiştir.Örneğin daha ilk çağlarda enzimler peynir,ekmek,şarap gibi besin maddelerinin yapımında kullanılmıştır.

Enzimlerin fonksiyonu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmacaların mide suyunun eti erittiği gösterilerek kanıtlandı.1811 de Kirchoff buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü belirledi.1830 yılında Robiquet ve Boutron ile Chalaud amidalin'in acı badem tarafından hidrolizlendiğini buldular.1833 de Payen ve Persöz ilk enzim tanımını nişastayı şekere çeviren ısıya dayanıklı bir madde için yaptılar ve bu maddeye ayıran anlamında "diastaz" adını verdiler.Diastaz malt ekstraksiyonunun alkolle çökeltilmesiyle ele geçen karışımın içinde bulunur.1834 yılında Schwan pepsini oldukça saf olarak elde etmeyi başardı ve bunu diğer enzimler izledi. 19. yüzyılın ikinci yarısında enzim tanımı üzerine tartışmalar çıktı.Liebig'e göre fermentasyon benzeri prosesler kimyasal maddelerin etkisiyle oluyordu.Pasteur'a göre ise fermentasyon olayını yalnızca yaşayan hücreler yapıyordu."Organize fermentler" adı mikroorganizmalar için, "organize olmayan fermentler" adı da bu gün kullandığımız enzimler için kullanıldı.Bu yetersiz isimlendirmelerden sonra 1878 yılında Kühne "enzim " sözcüğünü ilk kez kullandı.1897 yılında Buchner'in mayalanma ile alkol elde edilmesinin hücresiz ortamda da gerçekleştiğini bulması enzimolojide önemli bir aşama oldu.Çağdaş enzim kimyası çalışmaları enzim katalizli reaksiyonlarla ilgili Michaelis-Menten varsayımı ve 1926 yılında Sumner'in kristalik formda bir enzimi(ürez) izole etmesinden sonra başladı [1]. O zamana kadar fermentasyonda aktif

maddenin mayanın kendisi olduğuna inananlar yanında, bu maddenin mayanın içinde bulunan bir safsızlık olduğunu söyleyenler vardı. Sözü edilen aktif maddenin protein yapısında olduğu veya proteinlerle ele geçen bir safsızlık olduğu varsayılmıyordu.

İlk enzim saflaştırmalarının çoğunu 1922 - 1928 yılları arasında Willstätter ve arkadaşları yaptı [2]. Bu yıllarda Dixon ve Kodamo oksidazı saflaştırdılar. Bu çalışmalarda tam bir saflık sağlanamadı. İlk enzim saflaştırmaları oldukça eleştirildi. Enzimin inert bir protein kristali içinde adsorbe edilmiş bir safsızlık olduğu önerildi. Sonradan saf olarak izole edilen bütün enzimlerin protein yapısında olduğu kanıtlandı. Üreazın kristallendirilmesinden sonra 1930'lu yıllarda tripsin, kimotripsin ve pepsinin saf olarak kristallendirilmesi Northrop ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirildi [2]. 1943 yılına kadar yaklaşık 25 enzim, 1950 ye kadar yaklaşık 100 enzim kristal formda elde edildi. Enzimlerin saflaştırılmasından sonra molekül kütleleri ve yapıları araştırıldı. Proteinlerin saflaştırılmasına ilişkin fiziksel ve kimyasal tekniklerin geliştirilmesiyle protein yapısında olan enzimlerin aminoasit sırası ortaya çıkarıldı. 1953 yılında F. Sanger molekül kütlesi 5733 olan insülinin aminoasit sırasını belirledi. Bundan beş yıl sonra molekül kütlesi 13683 olan sığır pankreası ribonükleazının amino asit sırası belirlendi. 1969 yılında ise Merrifield ve çalışma arkadaşları "katı fazda sentez kinetiği" tekniğini kullanarak ribonükleazı kimyasal yöntemlerle sentezlemeyi başardılar ve bu çalışmayla 1984 Nobel Kimya Ödülü'nü kazandılar [1].

## 1.2. ENZİMİN YAPISI

Enzimin yapısı; onun molekül ağırlığı, protein yapısı, enzimin katalitik özelliğinin sorumlusu aktif merkezin kimyasal davranışı ve molekül başına aktif merkez sayısı, prostetik grubun yapısı ve onun proteine bağlanış şeklini içerir.

### 1.2.1. Molekül Ağırlığı

Saf enzimlerin molekül ağırlığı proteinlerinki gibi fiziksel yöntemlerle tayin edilir. Tablo 1.1 de bazı enzimlerin molekül ağırlıkları verilmektedir:

Hidrojenaz	9000
Peroksidaz (şalgam)	34000-41000
$\alpha$ -amilaz ( malt)	59000
Lipoamid dehidrogenaz (sığır kalbi)	100000
Glukozfosfat izomeraz (maya)	145000
Katalaz ( bakteri)	232000
Üreaz (soya fasulyesi)	480000
Propiyonil-KoA karboksilaz (domuz kalbi)	700000
Glutamat dehidrogenaz (karaciğer)	1000000
Piruvat dekarboksilaz (buğday)	>1000000

Tablo 1.1 Bazı Enzimlerin Molekül ağırlıkları

Düşük molekül ağırlığına sahip enzimler yüksek molekül ağırlıklı enzimlere kıyasla ısıya daha dayanıklıdırlar. Yüksek molekül ağırlıklı enzimler dönüşümlü olarak iki veya dört eşit parçaya ayrılır. Doğal enzimlerin birkaçının iki, üç veya dört benzer alt birimden oluştuğu gözlenmiştir. Monomerik formlar bazen aktif bazen de inaktif durumda olabilirler.  $\alpha$ -kimotripsin orta düzeydeki derişimlerde çoğunlukla dimer halinde ve sulandırmayla dönüşümlü olarak ayrışarak bir monomer oluşturur.  $\alpha$ - kimotripsin yüksek derişimlerde trimer halinde dir.

### 1.2.2. Protein Yapısı

Protein dört alt yapıyla tanımlanabilir. Aminoasitlerin diziliş sırasına "primer yapı" denir. Aminoasit zincirinin düz zincir şeklinde veya katlanmış olması proteinin "sekunder yapısı" dır.

Katlanmış durum " $\alpha$ -heliks yapısı" dır."Tersiyer yapı" $\alpha$ -heliksini nasıl kıvrıldığını belirler."Kuaterner yapı" enzimin alt birimlerini tanımlar.

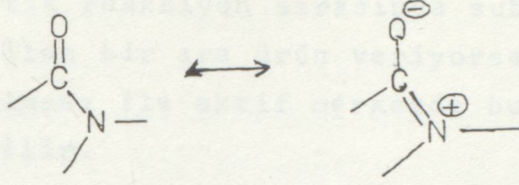
#### 1.2.2 .1. Primer yapı

Proteinler doğada bulunan 20 çeşit aminoasidin polipeptidleşmesiyle oluşmuşlardır.Çeşitli proteinlerin primer yapısı kimyasal yöntemlerle ortaya çıkarılabilir.Dinitrofluorobenzen en çok kullanılan reaktiflerdendir.Bu molekül polipeptidin ucundaki amino grubuna bağlanır.Bu aşamadan sonra ürün hidrolizlenir.Dinitrofluorobenzen amino grubunun bulunduğu aside bağlı olarak kalır.Bu asid kimyasal analizle ayrılarakkimliği saptanır.Polipeptid zincirinin ucundaki karboksilli asidin tanınması için karboksipeptidaz enzimi ile reaksiyona sokulur.Karboksipeptidaz enzimi proteinden karbon-uç amino asidini ve ona bağlı olan diğer asidlerin az bir kısmını uzaklaştırır.Ayrılan asid bundan sonra teşhis edilir.Enzim peptidle uzun süre etkileştirildiğinde zamanın bir fonksiyonu olarak serbest kalan aminoasidlerin kimliği aydınlatılırsa zincirin sonuna yakın birçok aminoasidin sırası ortaya çıkarılabilir.

#### 1.2.2 .2. Sekunder Yapı

Polipeptid zincirinin " $\alpha$ -heliks" ve " $\beta$ -açılmış" olmak üzere iki şekli vardır.Bunlardan  $\alpha$ -heliks yapısı görünüm olarak düzgün vidaya benzer.Vidanın dişleri  $\alpha$ -heliks yapısında aminoasid zincirine karşın gelir.Buyapı,karbonil oksijeni ile amino grubu arasında hidrojen köprü bağları yapılmasına maksimum olanak sağladığından  $\beta$ -açılmış yapısına kıyasla daha kararlıdır.Peptid grubunun bağları X ışını kırınımı yöntemiyle ölçülmüş; $\alpha$ -karbonunu içeren C-C bağı ve C-N bağının uzunlukları tekli bağ uzunluklarıyla benzerlik gösterirken karbonil karbonu ile azot arasındaki bağ uzunluğu tek bağ uzunluğundan daha az bulunmuştur.Bu verilere göre C-N bağının çift bağ karakterinde olması gerekir.Çift bağın oluşması için de bu iki atomla birlikte oksijen atomunda aynı

düzlemde bulunması gerekir.



Sonuç olarak peptid grubunun düzlemsel bir yapısı vardır.

#### 1.2.2.3. Tersiyer Yapı

Polipeptid zincirinin hepsi daha kararlı olan  $\alpha$ -heliks yapısını seçseydi enzim molekülü ince çubuk görünümünde olurdu. Yapılan fizikokimyasal ölçümler enzim molekülünün küresel olduğunu göstermektedir. Bu küreselliğin nedeni,  $\alpha$ -heliksin belirli yerlerde kıvrılma göstermesi,  $\alpha$ -heliks yapısının az olması veya hiç olmaması olabilir. Tersiyer yapı bozulduğunda enzim denature olur ve aktivitesini yitirir.

#### 1.2.2.4. Kuaterner Yapı

Birçok enzim aminoasit dizilişi ve tersiyer yapı olarak birbirinin aynı veya benzeri birkaç polipeptid zincirinden oluşmuştur. Böyle enzimler buldukları ortamın özelliğine göre bu alt birimlerine ayrışabilir. Her bir alt birim "izoenzim" olarak adlandırılır.

#### 1.2.3. Aktif Merkez

Enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu amino asitlerin gruplaşmasından oluşmuş oyuk şeklinde bir yerdir. Reaksiyon sı- substrat ve koenzim buraya bağlanır. Aktif merkezin yerinin belirlenmesinden sonra aktif merkezde reaksiyona giren fonksiyonel grupların saptanması gerekir. Bu işlem için üç yöntem vardır: 1) Aktif merkezde bulunan R grupları değiştirilerek aktivitedeki

değişme incelenir.

- 2) Enzimatik reaksiyon sırasında substrat aktif merkezle izole edilebilen bir ara ürün veriyorsa, bu ara ürünün yapısının aydınlatılması ile aktif merkezde bulunan aminoasitler ortaya çıkarılabilir.
- 3) Substrat benzeri ve aktif merkezle dönüşümsüz olarak bağlanan reaktifler kullanılarak aktif merkez tutuklanabilir. Sonra çeşitli yollarla parçalanarak substrat benzeri reaktiflerin bağlı olduğu aminoasit belirlenebilir.

#### 1.2.4. Koenzimler

Aktif merkeze aktiflik özelliğini veren gruptur. Koenzim protein kısmına yapışmış ise "prostetik grup" olarak adlandırılır. Organik karakterde olan prostetik grupta metal de bulunabilir. Enzimin protein kısmına "apoenzim" de denir. Apoenzime bağlı olmayan metal iyonları da aktiviteye neden olabilir. Bu özelliğe sahip metal iyonlarına "aktivatör" veya "kofaktör" denir. Katalitik aktiviteyi arttıran, enzimin üç boyutlu yapısını kararlı kılan, enzimi otolize karşı koruyan metal iyonları olduğu gibi bunların tam tersini yapan metal iyonları da vardır.

#### 1.2.5. Molekül Başına Aktif Merkez ve Prostetik Grup Sayısı

Aktif merkezlerin sayısı prostetik grupların sayısından biraz fazladır. Aktif merkez ile yalnızca prostetik gruplar değil, kimyasal doğası benzer gruplar da birleşebilir. Salt bu grupların sayısı gözönüne alındığında maksimum aktif merkez sayısı elde edilir. Prostetik grup sayısı biri spektroskopik diğeri kimyasal olmak üzere başlıca iki yöntem ile tayin edilir. Spektroskopik yöntemde enzimlerin yapısında bulunan ve absorpsiyon yapabilen grupların molar absorbtivite katsayıları, enzimden ayrı olduklarında ve enzimle birleşmiş konumda olmaları halinde aynı oluyorsa absorpsiyon bandlarının şiddeti böyle grupların molar derişimini verir. Flavin grupları bu kosa uyar. Haem grupları için başka yöntemler kullanmak gere-

kir. Bunun için standart haem çözeltileri hazırlayıp derişim -soğurma grafiklerinden tayin etmek istenilen örneğin soğurma değeri grubun derişimini verir. Bir başka yol haem grupları proteinden ayrılıp başka bir bileşiğe çevrilip bileşiğin standart çözeltisiyle karşılaştırılabilir. Bu bileşik ferrohaemochrome dir (2). Prostetik grup metal içeriyorsa kimyasal tayin yöntemleri kullanılabilir. Bu durumda enzimin saflık derecesi önem kazanır. Çünkü proteinler çözeltiden kolaylıkla metal alabilirler .Öyleki saflandırılmış enzim aktifleştirici metalden başka birkaç metal içerebilir. Bu yöntemler verilen toplam proteine ilişkin prostetik grup miktarını verir. Eğer enzim saf ise bundan grup başına moleküler ağırlıkta edilecektir. Bu, enzim için minimum ağırlık olacaktır. Eğer gerçek molekül ağırlığı fiziksel yöntemlerle tayin edilirse molekül başına prostetik grup sayısı gerçek molekül ağırlığının minimum enzim ağırlığına bölünmesiyle elde edilir.

### 1.3. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI VE SINIFLANDIRILMASI

#### 1.3.1. Adlandırma

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ve International Union of Biochemistry (IUB) tarafından 1967 de oluşturulan komisyon enzimlerin adlandırılmasında genellikle kısa ve lalgın olarak kullanılan bir isim, sistematik isim ve sınıflandırma numarası önermiştir. 1. Enzimlerin isimlendirilmesinde ve sınıflandırılmasında temel ilkeler vardır. Bunlar 1) Bütün enzimler -az sonekini alırlar. Birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri de "-az sistem" şeklinde isimlendirilir. Örneğin piruvat - dehidrogenaz sistemi gibi.

2) Enzimler katalize ettikleri reaksiyon türüne uygun olarak isimlendirilir ve sınıflandırılır. Aynı fonksiyonu gösteren fakat farklı kaynaklardan elde edilen enzimler de genellikle aynı adı alırlar.

3) Eğer bir enzim birbirinden farklı türde birden fazla reaksi-

yon adımını katalizleyebiliyorsa katalizlediği ilk reaksiyonun adı esas alınır.

Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde izlenecek sıra önemlidir. Bu sıra dönüşüme uğratılan substrat adı + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki şeklindedir. Enzimlerin sistematik adının yanında dört kısımdan oluşan kod numarası vardır. Örneğin, alkol dehidrogenazın kod numarası 1.1.1.1 dir [2].

### 1.3.2. Sınıflandırma

IUPAC ve IUB'den oluşan komisyona göre enzimler katalize ettikleri reaksiyon tipine göre altı ana grupta toplanır [1].

1) Oksidoreduktazlar : Redoks reaksiyonlarını katalize ederler, -dehidrogenaz veya -reduktaz çerçeve ismiyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz ismini alırlar. Alkol dehidrogenaz, reduktaz, peroksidaz örnek verilebilir.

2) Transferazlar: Reaksiyona giren maddeler arasında grup taşınmasını sağlarlar. Örneğin formil transferazlar, amino transferazlar gibi.

3) Hidrolazlar: Hidroliz ve suyun katıldığı kondenzasyon reaksiyonlarını katalize ederler. Ester, eter, peptid, glikozid C-C, C-halojen, P-N bağlarının hidrolizini katalizlerler.

4) Liyazlar : Çift bağ oluşumu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalize ederler. Örnek olarak aldolazlar, dehidratazlar, karboksilazlar, amonyak liyazlar verilebilir.

5) İzomerazlar : Molekül içindeki yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını, grup transferini ve çift bağ oluşumunu katalize ederler. Örnek olarak aminoasit rasemazlar, glukoz fosfat-izomerazlar verilebilir.

Ligazlar : ATP ve benzer benzer yapıdaki bileşiklerde bulunan pirofosfat bağının parçalanmasıyla ortaya çıkan enerji vasıtasıyla reaksiyona giren iki maddenin birbirine bağlanmasını katalize ederler. Örnek olarak piruvat-dekarboksilaz

verilebilir.

#### 1.4. ENZİMLERİN ETKİ MEKANİZMASI

Enzimler katalize ettikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini ara madde katalizi prensibine göre düşürürler. Bu tür katalizde reaksiyon birkaç adımda yürür. Enzimler katalize ettikleri reaksiyonun hızını  $10^8$ - $10^{12}$  kat arttıırırlar. Böylesine hızlandırma yeteneğinin nedenleri şunlardır [1].

- 1) Reaksiyona giren maddelerin birbirine çok yaklaşması.
- 2) Substrat ve enzim molekülünün deformasyonu.
- 3) Enzim reaktif gruplarının ortak etkimesi.
- 4) Bazı durumlarda substratın kovalent bağlanması.

Enzimde bulunan aktif merkez bir yarık veya oyuk şeklindedir. Aktif merkezin bu yapısı substrat molekülüyle etkileşmesini maksimum düzeyde olmasını sağlar. Substratın aktif merkeze bağlanması kovalent bağlarla, hidrojen köprü bağlarıyla olabilir. Aktif merkezdeki aminoasit gruplarının hızlı  $H^+$  alışverişine olanak sağlaması substratın enzime yaklaşmasını kolaylaştırır.

#### 1.5. ENZİM MEKANİZMASI

Enzimatik reaksiyonda önce substrat enzimin aktif merkezine bağlanarak enzim-substrat (ES) ara kompleksini oluşturur. (ES) kompleksinin ayrışmasıyla ürün yada ürünler oluşur, enzim açığa çıkar.

#### 1.6. ENZİM KİNETİĞİ

**Enzimler** suda çözündükleri ve reaksiyona giren maddelerle aynı fazda oldukları için homojen katalizörler sınıfına girer. Enzim kinetiğinde reaksiyona giren maddeye substrat denir. Substrat sayısı bir, iki, üç veya daha çok olabilir. Reaksiyon ortamının sıcaklığı, pH'sı iyon şiddeti, hidrolik basıncı, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı enzim reaksiyonlarını

nın hızlarını önemli ölçüde etkiler. Örnek olarak tek substratlı enzim reaksiyonu incelenecektir.

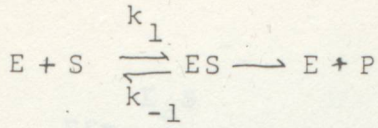
#### 1.6.1. Tek substratlı enzim reaksiyonlarında başlangıç hız ifadesinin türetilmesi

Enzimatik bir reaksiyonun hız eşitliği reaksiyona giren maddelerin derişimine dayanarak yapılan işlemi tanımlayan matematiksel bir ifadedir. Hız eşitliği gözlenen kinetik davranış ile mantıklı bir model arasında bağlantı görevini görür. Deneysel gözlemler mekanizmanın türü ve buna dayanarak alınacak hız ifadesine ilişkin ipuçları verir. Hız eşikliğinin türetilmesi reaksiyonun etkin olan parçalarının bir toplamıdır. Başlangıç hız eşitliğinin türetiminde zamanla değişmeyen belirli varsayımlar olmalıdır. Aslında bir varsayımlar çoğu kez eşitliği geçerli kılacak koşullardır. Başlangıç reaksiyon hızı, ürün oluşumunun zamana karşı lineer olduğu enzimik katalizin erken safhasındaki reaksiyon hızı olarak tanımlanır. Başlangıç hızı türetimine temel teşkil eden varsayımlar aşağıda belirtilmiştir:

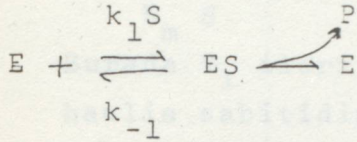
- 1) Enzim ve substrat bir kompleks oluşturur.
- 2) Substrat derişimi enzim derişiminden çok yüksektir. Söyleki, serbest substrat derişimi toplam substrat derişimine eşittir. Bu koşul oluşan ürün miktarının küçük olmasını gerektirir. Böylece geri reaksiyon veya ürün inhibisyonu gözardı edilir.
- 3) Reaksiyon sırasında PH, sıcaklık ve iyon şiddeti değişmemelidir.

#### 1.6.1.1. Sürekli hal işlemi

Sürekli hal durumunda değişik enzim ara ürünlerinin derişimi aslında değişmez bu durumda verilen ara ürün oluşum hızı onun yok olma hızına eşittir. Bu varsayımı ilk kez enzim kinetik eşitliğini türetmek için Briggs ve Haldane önerdi. Hız eşitliğini türetmek için ilk adım reaksiyon mekanizmasını yazmaktır. Reaksiyon mekanizması



veya



şeklinde yazılabilir. Burada S: substrat, E: enzim, P: ürün,  $k_1$  ileri doğru reaksiyonun hız sabiti,  $k_{-1}$  geri reaksiyonun hız sabiti  $k_2$  ikinci reaksiyonun hız sabitidir.  $k_1$  ve  $k_{-1}$  adımlarının her ikisi ES den E ye gitmektedir. İki adım Volkenstein ve Goldstein'in gösterdiği gibi bir adımda toplanabilir.

$$E = \frac{k_1 S}{k_{-1} + k_2}$$

Başlangıç reaksiyon hızı ;

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 (ES)$$

eşitliği ile verilir. Sürekli hal varsayımını uygulayarak

$$d(ES)/dt = k_1 S(E) - (k_{-1} + k_2) ES = 0$$

(ES) ifadesini saptamak için enzim korunma eşitliği

$$\text{Toplam enzim} = E_0 = E + ES$$

olması gerekir.

E:  $(E_0 - ES)$ 'nin (2) eşitliğinde yerine konmasıyla

$$ES = \frac{E_0 S}{[(k_{-1} + k_2)/k_1] S}$$

$$v = k_2(ES) = \frac{k_2 E_0 S}{[(k_{-1} + k_2)/k_1] S} \dots (4)$$

$$v = \frac{V_1 S}{K_m S}$$

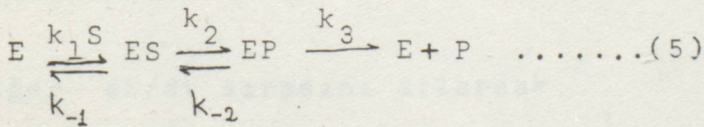
Burada  $V_1$  ileri doğru reaksiyonun maksimum hızı ve  $K_m$  Michaelis sabitidir. (2) eşitliğini sıfıra eşitlememek için de (2) ve (3) eşitliklerinin dışında bir eşitlik saptanabilir.

$$k_1 S E_0 - d(ES)/dt$$
$$d(ES) = \frac{k_1 S E_0 - d(ES)/dt}{k_1 S + k_{-1} + k_2}$$

Wong, sürekli hal yaklaşımının yalnızca  $d(ES)/dt$ 'nin  $k_1 E_0 S$ 'e kıyasla küçük olduğu durumlarda gerekli olduğunu gösterdi [5]. Reaksiyonun erken safhasında eğer  $S \gg E_0$  ise S'nin azalması nedeniyle ES'in değişim hızı bağıl olarak yavaş olacaktır. Bu durumda sürekli halin geçerliliğinin substrat/enzim oranının yüksek olduğu koşullarda geçerli olduğu görülür.

#### 1.6.1.2. Determinant yöntemi

Sürekli hal işleminde önerilen mekanizmaya bir EP ara-ürününün eklenmesiyle tanımlanan mekanizmayı gözönüne alalım. [5].



Üç eşitlik aynı zamanda aşağıdaki gibi verilir.

$$\begin{array}{l} dE/dt = \\ d(ES)/dt = \\ d(EP)/dt = \end{array} \begin{array}{|ccc|} \hline E & ES & EP \\ -k_1 S & k_{-1} & k_3 \\ \hline k_1 S & -(k_{-1} + k_2) & k_{-2} \\ \hline 0 & k_2 & -(k_{-2} + k_3) \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} = 0 \\ = 0 \\ = 0 \end{array}$$

Örneğin "E" için determinant veya dağıtım terimi yukarıdaki listelenmiş katsayılarından E kolonu çıkarıldıktan sonra hesaplanabilir. n ara ürünlü mekanizma için yalnızca n-1 eşitliğe gereksinme duyulur. Böylece d EP/dt terimini saf dışı bırakarak

$$(E) = \begin{vmatrix} k_{-1} & k_3 \\ -(k_{-1} + k_2) & k_{-2} \end{vmatrix} = k_{-1}k_{-2} + k_3(k_{-1} + k_2)$$

yazılabilir.

Eğer dE/dt sırasını atlarsak

$$(E) = \begin{vmatrix} -(k_{-1} + k_2) & k_{-2} \\ k_2 & -(k_{-2} + k_3) \end{vmatrix}$$

$$= k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2(k_{-2} + k_3) - k_2 k_{-2}$$

$$= k_{-1} k_{-2} + k_3 (k_{-1} + k_2)$$

Farklı eşitliklerin yazıdan çıkarılması çoğu kez farklı cebirsel hileleri gerektirir. ES ve EP ürünlerine aynı işlem yapılmasıyla

$$(ES) = k_1 \cdot (k_{-2} + k_3) \cdot S$$

$$(EP) = k_1 k_2 S$$

Hız eşitliği kolaylıkla elde edilebilir.

$$v/E_0 = \frac{k_3(EP)}{(E) + (ES) + (EP)}$$

$$= \frac{k_1 k_2 k_3 S}{k_{-1} k_{-2} + k_3 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_{-2} + k_3) S + k_1 k_2 S}$$

$$v = \frac{k_2 k_3 E_0 S / (k_2 + k_{-2} + k_3)}{\dots} \dots (6)$$

$$k_{-1} k_{-2} + k_3 (k_{-1} + k_2) / k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3)$$

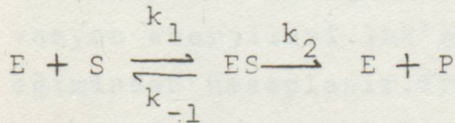
$$v = \frac{V_1 S}{K_m + S}$$

(6) eşitliği (4) eşitliği ile özdeştir. Aslında, eğer  $k_3 \gg k_2$  ve  $k_3 \gg k_{-2}$  ise (6) eşitliği (4) eşitliğine indirgenir. Hız eşitliğinin kısalığını korumak için elde edilen matematiksel şekli değiştirmeyecek şekilde belirli ara ürünler gözardı edilebilir.

### 1.6.2. Enzim Kinetiği Üzerine Sıcaklık Etkisi

Enzim katalizli reaksiyon belirli bir sıcaklık aralığında çalışıldığında reaksiyon hızı bir maksimumdan geçer. Hızın maksimum olduğu sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Eskiden enzim sistemine bağımlı olduğu düşünülürdü. Bugün PH, derişim ve diğer faktörlere bağımlı olarak değiştiği bilinmektedir. Budavranışın açıklanması ilk kez Tanmann tarafından verildi [5]. Buna göre sıcaklık etkisinin değişmesi iki sürece bağılıdır: Sıcaklık artışıyla reaksiyon hızının artması ve sıcaklıkla enzimin inaktivasyonu. Tipik bir enzim için  $30^\circ$ ye kadar olan sıcaklıklarda inaktivasyon çok yavaştır ve katalizlenmiş reaksiyonun hızı üzerine etkisi farke edilmez. Bu durumda hız sıradan reaksiyonlarda olduğu gibi sıcaklık artışıyla artar.  $30^\circ$  den yüksek sıcaklıklarda inaktivasyon çok daha önemli hale gelir ve aktif enzim derişimi reaksiyon sırasında düşer.

Enzim katalizli reaksiyonun hız yasası en az üç kinetik sabit içerir. Bunların her biri sıcaklığa bağılıdır. Michaelis-Menten mekanizması:



ve sürekli hal eşitliği

$$v = \frac{k_2 [E_0] [S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} \dots\dots\dots(7)$$

şeklinde yazılabilir. Burada ,

|E| enzim derişimi

|S| substrat derişimi

$k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  sabitlerinden her biri Arrhenius yasasına uyarlar ve her bir adım için  $E_{-1}$ ,  $E_1$  ve  $E_2$  gibi üç aktivasyon enerjisi vardır. Arrhenius yasası aşağıda gösterildiği gibi yazılabilir

$$k = A e^{-E/RT}$$

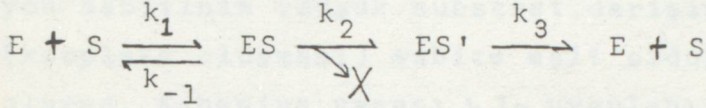
Burada R genel gaz sabiti , T mutlak sıcaklık E aktivasyon enerjisi ve A frekans faktörüdür. Aktifleşmiş kompleks teorisine göre eşitlik , çözümlenmiş reaksiyonlar için aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$k = \frac{k \cdot T}{h} e^{-\Delta G / RT} = e \frac{k \cdot T}{h} e^{\Delta S / R} e^{-E/RT} \dots\dots(8)$$

Burada  $k$  Boltzmann sabiti;  $h$  Planck sabitidir.  $\Delta G$  miktarı Gibbs aktivasyon enerjisidir, (eskiden aktivasyon serbest enerjisi olarak bilirdi) reaktantlardan aktifleşmiş kompleks oluştuğunda Gibbs enerjisindeki değişmedir.  $S$  entropideki değişmeye karşın gelen aktivasyon entropisi miktarıdır. Aktivasyon enerjileri  $\ln k$ 'nin  $1/T$  ye karşı çizilmiş grafiğinin eğiminden hesaplanır. Frekans faktörü ve aktivasyon entropisi herhangi bir sıcaklıkta  $k$  ve  $E$  değerinden hesaplanır. Buradan da anlaşılacağı gibi enzim katalizli reaksiyonların sıcaklığa bağımlılığına ilişkin ayrıntılı bir çalışma için her bir sabitin ayrılması gerektiği söylenebilir. PH kontrolünde dikkatli olunması gerekir. Çünkü sıcaklık, iyonlaşma derecesini etkiler.

### 1.6.2.1. Hız Sabitlerinin Ayrılması

Enzim mekanizmasında hız sabitlerinin ayırmak için yapılacak işlemleri açıklayan özel bir şema kullanılır.



Bu şema birçok enzim sistemine uygulanır. Biz bunu çift ara ürün mekanizması olarak adlandıracağız. Sabitlerin ayrılması için çeşitli yöntemler vardır. [5].

- 1) Geçiş hali çalışmaları, durdurulmuş-akım ve sıcaklık-atılma teknikleri kullanılarak sabitlerin ayrılması sağlanabilir.
- 2) Sürekli hal durumunda ES ve ES' derişimlerinin ölçülmesi  $k_2$  ve  $k_3$ 'ün bağıl değerleri üzerine bilgi verir. p-nitrofenil-tri metilasetat'ın kimotripsin katalizli hidrolizinde ES büyük ve ES' küçüktür. Şöyleki,  $k_2 \gg k_3$  dır. Bundan anlaşılacağı gibi yüksek substrat derişimlerinde  $v = v_{\max} = k_c [E]_0$  olduğunda katalitik sabit  $k_c, k_3$  ile özdeşleştirilebilir.
- 3) Hepsinde ES'ün aynı olduğu alternatif substratlarla yapılan çalışmalar  $k_2$  ve  $k_3$  'ün bağıl değerleri hakkında bilgi verebilir.
- 4) Alternatif nükleofillerle çalışma da  $k_2$  ve  $k_3$  'ü ayırmak için yardımcı olabilir.

### 1.6.2.2. Tek Substratlı Reaksiyonlar İçin Aktivasyon Enerjileri

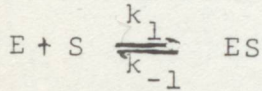
Çift ara ürünlü mekanizmaya sürekli hal varsayımı uygulanması düşük substrat derişimlerinde sınırlayıcı hızın varlığını ortaya koyar.

$$v_0 = k_0 [E]_0 [S] = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \cdot [E]_0 [S] \dots \dots \dots (9)$$

ikinci mertebeden hız sabiti  $k_0$ ,  $k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)$ 'ye eşittir ve Arrhenius yasası direkt olarak uygulanamaz iki özel durumda bu birleşik sabit yasaya uyar.

a)  $k_2 \gg k_{-1}$  olduğunda  $k_{-1}, k_2$  ile kıyaslandığında ihmal edilebiliyor ve  $k_0, k_1$ 'e eşit oluyor. Bu, toplam reaksiyon sabitinin (düşük substrat derişimlerinde) ilk aşamadaki (kompleks oluşması) sabite eşit olduğunu söyler. Eğer böyle olursa, Arrhenius yasası  $k_0$ 'a uygulanır ve başlangıç kompleks oluşumu için aktivasyon enerjisi  $E_1$  dir.

b)  $k_{-1} \gg k_2$ ,  $k_0$  sabiti şimdi  $k_2 k_1 / k_{-1}$  'e eşittir.  $k_1 / k_{-1}$  oranını kompleks oluşumu için denge sabitidir.



hız sabitlerinin sıcaklıkla değişimi

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{A_1 e^{-E_1/RT}}{A_{-1} e^{-E_{-1}/RT}} = \frac{A_1}{A_{-1}} e^{-E_1/RT} \dots\dots\dots(10)$$

Burada  $A$  ve  $A_{-1}$  sıcaklığa bağımlı olmayan frekans faktörü ve  $\Delta E$ ,  $E + S$  den  $ES$ ' e değişim için molekül başına enerji artışıdır.  $k_2$  Arrhenius yasasına göre sıcaklıkla eksponansiyel olarak değiştii için

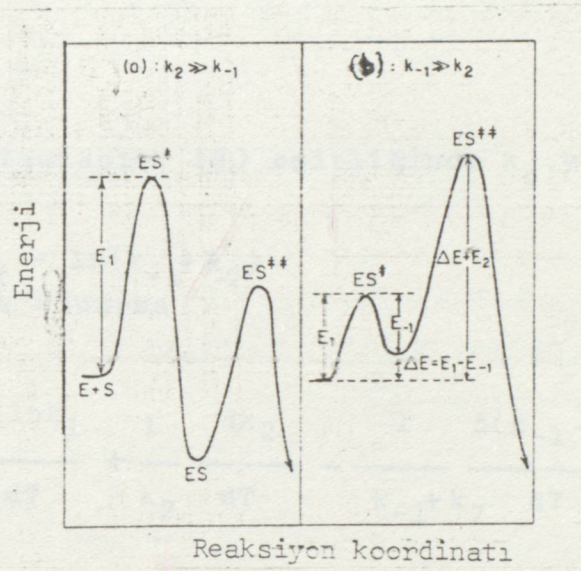
$$k_2 = A_2 e^{-E_2/RT}$$

dolayısı ile

$$\frac{k_1 k_2}{k_{-1}} = \frac{A_2 A_1}{A_{-1}} = e^{-(E_2 + E_1 - E_{-1})/RT} \dots\dots\dots(11)$$

$$= \frac{A_2 A_1}{A_{-1}} = e^{-(E_2 + \Delta E_1)/RT} \dots\dots\dots(12)$$

Başka bir deyişle Arrhenius yasası bu birleşik sabite uygulanmaktadır. Fakat aktivasyon enerjisi yalnızca başlangıç adımına karşın gelmez; ikinci adım için ( $ES \rightarrow ES' + X$ ) aktivasyon enerjilerinin birinci adım için ( $E+S \rightarrow ES$ ) toplam enerjideki artışların bir toplamıdır. Bu bağıntılar enerji diyagramlarıyla Şekil de gösterilmiştir.



Şekil : Tek substratlı reaksiyonların ilerlemesine

ilişkin enerji diyagramı

a) durumunda  $k_2 \gg k_{-1}$  ve  $k_0 = k_1$  dir. Sistemin geçeceği en yüksek enerji engeli  $E+S \rightarrow ES$  reaksiyonu için aktifleşmiş kompleks  $ES^\ddagger$  'e karşın gelir. Ölçülen aktivasyon enerjisi düşük substrat derişimlerini kapsayan hız sabitine ve aynı zamanda başlangıç adımına karşın gelen  $E_1$  dir. Diğer yandan (b) durumunda en yüksek enerji engeli ikinci adım için  $ES \rightarrow ES' + X$  aktifleşmiş kompleks  $ES^\ddagger$  'e karşın gelir.

Bu düzeye ulaşmak için sistemin  $ES$  düzeyine ulaşması gerekir. Buradaki  $\Delta E$  enerjisi  $E+S$  inkinden daha yüksektir, fazladan  $E_2$ 'ye sahip olması gerekir ve  $k_0$  için aktivasyon enerjisi  $\Delta E + E_2$ 'ye karşın gelir. Bu durumda toplam hız ilk aşamanın hızına hiç bir şekilde bağılı değildir. Böylece verilen  $k_1$  ve  $E_1$  hakkında bilgi vermez. Bu değerler geçiş hali araştırmaları gibi özel teknikler kullanılarak elde edilebilir. Bu iki özel halin dışındaki durumlarda

$\log_{10} k_0$  ın sıcaklığın tersi ( $1/T$ ) 'ye karşı grafiğinin lineer olması zorunlu değildir. Fakat aktivasyon enerjileri hâlâ herhangi bir sıcaklıktaki eğimden hesaplanabilir. Herhangi bir sıcaklıktaki aktivasyon enerjisi

$$E_0 = RT^2 \frac{d \ln k_0}{dT} \dots\dots\dots(13)$$

eşitliği ile tanımlanır. (9) eşitliğinde  $k_0$  yerine değeri yazılarak

$$\ln k_0 = \ln k_1 \ln k_2 - \ln(k_{-1} + k_2) \dots\dots\dots(14)$$

ve (13) de yerine konursa

$$\frac{E_0}{RT^2} = \frac{d \ln k_0}{dT} = \frac{d \ln k_1}{dT} + \frac{1}{k_2} \frac{dk_2}{dT} - \frac{1}{k_{-1} + k_2} \frac{d(k_{-1} + k_2)}{dT} \quad (15)$$

$$\frac{d \ln k_1}{dT} + \frac{1}{k_2} \frac{dk_2}{dT} - \frac{1}{k_{-1} + k_2} \left( \frac{dk_{-1}}{dT} + \frac{dk_2}{dT} \right) \dots\dots\dots(16)$$

$$\frac{d \ln k_1}{dT} + \frac{k_{-1}}{k_{-1} k_2} \frac{d \ln k_2}{dT} - \frac{k_{-1}}{k_{-1} k_2} \frac{d \ln k_{-1}}{dT} \dots\dots\dots(17)$$

Ayrı ayrı aktivasyon enerjileri

$$E_1 = \frac{RT^2 d \ln k_1}{dT}, E_{-1} = RT^2 \frac{d \ln k_{-1}}{dT}, E_2 = RT^2 \frac{d \ln k_2}{dT} \dots\dots\dots(18)$$

ve dolayısıyla

$$E_0 = \frac{k_{-1}(E_1 + E_2 - E_{-1}) + k_2 E_1}{k_{-1} + k_2}$$

Toplam aktivasyon enerjisi  $E_0$ ,  $E_1$  ve  $E_1 + E_2 - E_{-1}$  değerlerinin ağırlıklı ortalaması olur. Ağırlık faktörleri  $k_2 / (k_{-1} + k_2)$  ve  $k_{-1} / (k_{-1} + k_2)$  dir.

### 1.7. ENZİM KİNETİĞİ DENEYLERİNİN DİZAYNI

Enzimik reaksiyonun başlangıç reaksiyon hızı evresi tipik olarak 10 saniyeden bir kaç yüz saniye arasında değişebilir. Böylece, enzim denemelerinde çok değişik metodlar kullanılabilir. Reaksiyonu başlatmak için enzim veya substratlardan birinin ilavesinden önce genellikle 0,05- 3,0 ml hacimde olan deney örneği termal dengeye ulaşması için bir kaç dakika reaksiyon sıcaklığında bekletilir ve az miktarda enzim reaksiyonu başlatmak için ilave edilir. Ürün derişimindeki artış veya substrat derişimindeki düşme sonra ölçülebilir. Temel amaçlar, reaksiyon ilerleyişini doğru bir şekilde kayıt etmek ve başlangıç hız evresini elde ederek şekilde bir reaksiyon başlatmaktır. Gerçek sistemlere hız eşitliğini uygulamak için matematiksel ifadeye yerleştirilmiş koşulların deneyde sağlanması gerekir. Ürün oluşması belirgin hale geldiğinde hız denklemleri oldukça kompleksleştigi için ilk hız varsayımı, bu denklemleri lineer hâle getirmek için kullanılır. Deneysel olarak başlangıç hızı reaksiyonun ilerleme eğrisine tanjant çizerek bulunur. Bunun için başlangıç hız evresinin kaydınının tamamıyla yapılmış olması gerekir. Böylece sürekli deneyler tek nokta analizli deneylere tercih edilir. Başlangıç hızı evresinin doğrusallığının sürekliliği denge sabitleri, enzimin ürün ve substratla kısmı doyması, ortamın tampon kapasitesi ve en az bulunan substrat derişiminin enzime bağıl olarak oranı gibi faktörlere bağlıdır.

$\frac{[S]_{\text{toplam}}}{[E]_{\text{toplam}}}$  100'den aşağı olursa hızlı denge durumu uzun

sürelili olmaz ve doğrusal olmayan başlangıç hız evresi gözlenir. Deneysel olarak başlangıç hızı evresi substrat derişiminin başlangıç değerinden %10'luk değişim gösterdiği zaman süresi olarak da tanımlanır.

### 1.7.1. Substrat Derişiminin Seçimi

Bir substratlı bir çok reaksiyon için substrat derişim aralığını seçmek sorun değildir. Öncelikle substrat inhibisyonundan sakınmak için Michaelis sabitine bağımlı olarak en geniş aralık seçilir. Yaklaşık bir  $K_m$  değeri sonra tayin edilir ve aralık son haline getirilir. En büyük hız değişimi  $K_m$  bölgesinde meydana gelir. Derişimin  $K_m$  sabitine bağlı olarak 0,2 katından 5,0 katına kadar değişmesi oldukça doyurucu sonuçlar verir. Maksimum hızın 0,14 'den 0,83'e değişmesiyle mantıklı bir  $K_m$  değeri edilebilir.(5) Başlangıçta en derişik olan örnek tampon çözeltisiyle 1/1, 1/3, 1/5, 1/7, 1/9, 1/11 şeklinde seyreltilebilir. Bu değerler Lineweaver-Burk grafiğinde apsiste 1/S olacağı için 1,3,5,7,9,11 gibi değerleri verir. Kofaktör gerektiren bir substratlı sistemler için çok substratlı durumlarda uygun reaktant derişimini seçmek daha zor olabilir. İki substratlı enzim reaksiyonunda hız iki bileşenin fonksiyonudur. Her birinin hıza olan bağlı katkısı başlangıç hız ifadesinde hız sabitleri değerleri vasıtasıyla tayin edilir. Eğer her bir substratın derişimi ayrı ayrı dissosiyasyon sabitlerinin beş katından fazla ise hızdaki değişmeler bağlı olarak küçük olacaktır ki bu istenmeyen bir olaydır.

### 1.7.2. Enzim Saflığı ve Kararlılığı

Enzimin ideal olarak saf ve dayanıklı olması istenir. Kullanılacak enzimin saflığından emin olmak için bazı testlerin yapılması gerekir. Enzim saflandırırken basit ısıtma işlemleri veya saklama sırasında soğutma enzimi aktif olmayan konformasyona sokabilir. Enzimin belirli bir kısmı inaktif olabilir. Bu durumda Michaelis sabiti veya maksimum hızı değişecek ve kinetik çalışmanın geçerliliği tehlikeye girecektir. Bu genellikle bir çok deneylerde göz ardı edilir.

### 1.7.3. Substrat Saflığı

Birçok biyokimyasal maddeler oldukça kararsızdır. Her bir substrattaki kirlilikler deneysel hataların kaynağı olarak göz önüne alınmalıdır. Enzimik analizler en güçlü saflık testlerinden biridir. Burada avantaj belirli enzimlerin stereo kimyasal spesifiklikleridir. Fakat alternatif substratlar aldatıcı sonuçlar verebilir. Substrattaki safsızlıklar enzimi zehirleyebilir. Örneğin bazı ticarî ATP enzimlerinde vanadat iyonlarının varlığı aktiviteyi etkiler, reaksiyonun hızı inhibitör derişimiyle değişir.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Burada  $V_o$  = maksimum hız

$K_m$  = Michaelis menten sabiti

$I$  = inhibitörün derişimi

$K_m$  = inhibitörün enzime bağlanmasına ilişkin denge sabiti

inhibitör substratın bir parçası olduğunda, örneğin,

$[I] = \alpha [S]$  olduğunda

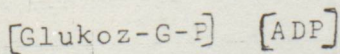
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m \alpha}{V_m K_i} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} \quad \text{yazılabilir.}$$

#### 1.7.4. Tamponlama Aracının Seçimi

Birkaç istisna dışında enzim katalizli sistemlerle çalışırken reaksiyon çözeltisinin tampon özelliği taşıması gerekir. Ne yazık ki, reaksiyon ortamının istenen pH'ı dar  $pK_a$  değerlerinin birbirine uyduramama zorluğu nedeniyle tampon oluşturucu madde seçimi tam anlamıyla yapılamaz. Birçok tampon, enzim çalışması için enzimle veya diğer reaksiyona giren maddelerle istenmeyen etkileşimlerde bulunması nedeniyle uygun değildir. Örneğin: Bazı araştırmacılar asidik koşullarda arsenat ve kokodilat (dimetil arsenik asit)'in yükseltgeme gücünü kabul ederler. Halbuki birçok fosfat esterleri fosfatın kendisi ve çeşitli karboksilli asitler doğal metabolitlerdir ve enzimin aktif merkezine bağlanabilirler. Borat tamponları da karbonhidratlarla ribonükleotidlerle ve birçok polialkollerle kompleks oluşturması nedeniyle istenmez. Böylece uygun tamponlama reaktiflerinin seçiminde dikkatli olunmalıdır.

Tampon çözeltisi seçimindeki sorun mümkün olduğu kadar çok tampon çözeltisi denemektir. Sonra en büyük aktiviteyi sağlayan tampon çözeltisi seçilir. Tampon çözeltisinin enzimle olumsuz etkileşimde bulunma olasılığını tayin etmek için istenilen pH'ın tekrar sağlanması koşuluyla sabit iyonik şiddetle seyreltmeler yapılabilir. Tampon seyreltmelerinin enzimin aktivitesini, sağlanan pH'ı ve iyonik şiddeti etkilememesi gerekir. Aktivite değişmelerine neden olan tamponun doğruluğundan şüphe edilmelidir.

Son olarak, birçok reaksiyonun denge konumu pH'a bağlıdır. ve planlanan reaksiyonun faaliyet alanını tamamiyle göz önünde bulundurmak akıllıca olur. Eğer hem ileri hem de geriye doğru reaksiyonun kinetiği inceleniyorsa bunun kolaylıkla başarılmasına izin veren pH seçilmelidir. Örneğin hekzokinaz reaksiyonu için kütle etkisi oranı



pH=6,5 da 490 dır.

Fakat  $pH=7,5$  da 4900 dur. Yüksek pH'da geriye doğru reaksiyonun hızını ölçmek oldukça zordur.

#### 1.7.5. Sıcaklık Kontrolü

Geçerli bir enzim deneyi ancak sıcaklık kontrolü sağlandığında elde edilebilir. Genellikle sıcaklığı kontrol edilebilen iyi bir banyo kullanılır. Banyonun herhangi iki bölgesi arasındaki sıcaklık farkı  $0,1^{\circ}$  den daha az olmalıdır. Termal dengeyi tam olarak kurmak için reaksiyonun gerçekleştirildiği kap banyo sıvısının içine daldırılır. Termal dengeye ulaşma süresi cam ve plastik kaplarla çalışıldığında birkaç dakika olabilir. Spektrofotometrelerle çalışırken termal denge örnek küvetinin oyuk duvarlarının içinden sabit sıcaklık banyosu suyunun geçmesiyle sağlanır.

#### 1.7.6. Başlangıç Hız Verilerinin Hesaplanması

Hız verileri, daima birim zamanda molaritedeki değişim şeklinde gösterilmelidir. Deney koşulları tanımlanmalı lineerliği sağlamak için özel işlemler ayrıntılarıyla anlatılmalıdır. Spesifik aktivite ve enzimin miktarı her bir deneyde belirtilmeli, her şekil üzerinde yazılarla açıklanmalıdır. Bu işlem özellikle kinetik çalışma arasında değişime uğrama olayı varsa kesinlikle yapılmalıdır. Araştırmacıların deneylerinde substratın maksimum azalma yüzdesini tayin edebilmeleri çok önemlidir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Maddeler

- 1) Üre, Riedel de Haen
- 2) Üreaz, 5U/mg, Merck Darmstadt
- 3) KCl, Merck

### 2.2. Kullanılan Çözeltiler

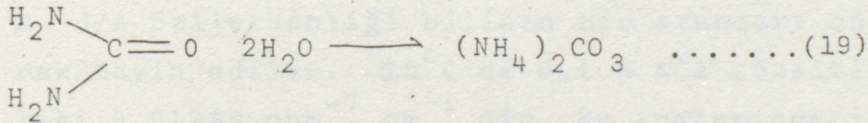
- 1)  $10^{-3}$  M,  $2 \times 10^{-3}$  M,  $3 \times 10^{-3}$  M,  $4 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M Üre Çözeltileri
- 2) 20mg/ml Üreaz Çözeltisi
- 3) 0,1 M KCl Çözeltisi

### 2.3. Kullanılan Araçlar

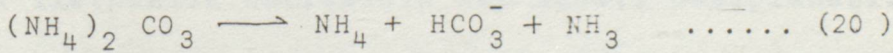
- 1) Konduktometre, Metroohm Herisau E 527
- 2) Termostatlı su banyosu, B.Braun Thermomix 1419
- 3) Manyetik karıştırıcı , Rührmag.

### 2.4. Yöntem

İncelenen ürenin hidrolizi reaksiyonu aşağıdaki gibi yazılabilir



Bununla beraber amonyum karbonatın sudaki çözeltisi kararlı değildir ve yaklaşık %80 oranında amonyum bikarbonat ve amonyaka ayrışır.



Üre çözeltisinin reaksiyon sırasında iyonik ürünlere hidrolize olması nedeniyle reaksiyon hızını bulmak için reaksiyon ürünü olan iyonların zamanın bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmesine izin veren bir metod seçilmelidir [6].

Örneğin iletkenlik ölçülmesi böyle bir yöntemdir.

$$\text{Üre (u)} \xrightarrow{\text{HOH}} \text{iyonik ürünler (p\pm)}$$
$$V = \frac{dC_u}{dT} \propto \frac{dC_p}{dT} \propto \frac{d\sigma}{dT} \dots\dots\dots(21)$$

Böylece zaman biriminde öziletkenlik ( $\sigma$ ) artışı öziletkenlik cinsinden hızı verir.

#### 2.4.1. iletkenlik Deneylerinin Geliştirilmesi

Çözeltinin elektrik iletkenliğinin ölçümü onun direncini tayin etmek demektir. Bunun için bir **Wheatstone** köprüsü kullanılır. Wheatstone köprüsünün bir kolu ölçüm hücresidir. Hücre, alanları A ve aralarındaki uzaklık d olan iki platin elektrottan ibarettir. d/A oranına hücre sabiti denir. Elektrotlarda elektroliz olayını önlemek için alternatif akım kullanılır. N sıcaklığa bağımlı olduğu için reaksiyon kabı sıcaklık kontrollü olmalıdır.  $\sigma$  (öziletkenlik) değeri aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır.

$$\sigma = R^{-1} \cdot d/A = R^{-1} \cdot Z \dots\dots\dots(22)$$

Burada R reaksiyon çözeltisinin direncidir. iletkenlik birimi  $\text{ohm}^{-1} \text{ m}^{-1}$  veya  $\mu\text{S cm}^{-1}$  ( $1 \mu\text{S} = 10^{-6} \text{ ohm}^{-1}$ ) kap sabiti Z d/A öziletkenliği bilinen bir standart çözelti kullanılarak tayin edilir.  $25^\circ\text{C}$  de 0,1 M KCl çözeltisinin öziletkenliği  $0,01288 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dir. Bu aralarındaki uzaklık 1 cm ve alanları  $1 \text{ cm}^2$  olan iki platin levhadan oluşan iletkenlik hücresi ile 0,1 m çözeltisinin iletkenlik değeri  $0,01225 \text{ ohm}^{-1}$  bulunmuştur. Bu verilere göre (22) eşitliği kullanılarak iletkenlik hücresinin kap sabiti hesaplanabilir.

$$Z = d/A = \frac{0,01228 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{0,01225 \text{ ohm}^{-1}} = 1,05142871 \text{ cm}^{-1}$$

#### 2.4.2. Deneyin Yapılışı

Reaksiyon kabı olarak 500 ml'lik boynu geniş bir erlen kullanıldı. Kullanılan iletkenlik hücresinin platin levhaları birbirine göre düşey konumda olmaları nedeniyle levhaların tamamen çözeltiye daldırılmasını sağlamak için 375 ml. reaksiyon çözeltisi kullanıldı. Reaksiyon çözeltisinin sıcaklığı çözeltiye daldırılan termometre ile ölçüldü. Çözeltiye daldırılan iletkenlik hücresi ve termometreyi sabit tutmak için erlenin ağzına üç delikli lastik tıpa kondu. Üçüncü delik 5 ml'lik plastik şırınga ile üreaz ilavesi için kullanıldı. Böylece üreaz ilavesi hızlı bir şekilde yapılmış oldu ve zaman kaybetmeksizin ölçüm yapılabilirdi. Bu başlangıç hız evresini yakalamak açısından önemlidir. Deneyde su banyosu ısısını kontrol etmek için Braun thermomix kullanıldı. Reaksiyon başlatıldıktan sonra ölçümler belirli bir iletkenlik değerine gelindiğinde dakika olarak zamanın okunmasıyla yapıldı, çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan suyun iletkenliğini düşürmek için bidistile su cihazından alınan saf su içine  $KMnO_4$  koyarak bir kez daha distillendi. Böylece suyun iletkenliğinin ölçümleri etkilememesi sağlandı. Bu özellikle iletkenlik hücresinin kap sabitinin tayininde önemlidir. Deney, Michaelis-Menten sabitinin tayini içine  $10^{-3}M$ ,  $2 \times 10^{-3}M$ ,  $3 \times 10^{-3}M$ ,  $4 \times 10^{-3}M$  ve  $5 \times 10^{-3}M$  üre çözeltileriyle yapıldı. Reaksiyon hızı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek ve optimum sıcaklığı saptamak için deney-  $3 \times 10^{-3}M$  derişimindeki çözeltide  $25^\circ$ ,  $40^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $70^\circ$  ve  $80^\circ C$  de gerçekleştirildi.

#### 2.4.3. İletkenlik/Zaman Eğrilerinden $V_0$ 'ın Hesaplanması

Deney sırasında belirli zaman aralıklarında okunan iletkenlik değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile reaksiyon eğrileri elde edilir. Reaksiyon hızı, başlangıç hız evresinin eğiminden bulunur.  $\frac{\Delta l/R}{\Delta t}$  değeri iletkenlik /zaman biriminde hız değeridir. Kimyasal kinetikte uygulanan zaman biriminde, derişimdeki değışmeyi esas alan hız ifadesini geliştirmek

için bilinen derişimlerde reaktant çözeltilerinden reaksiyon ürünlerinin iletkenliklerini tayin etmek zorunludur. Bunu sağlamak için farklı derişimlerdeki çeşitli üre çözeltileri üreaz enzimi ile tamamen hidrolize edildi. Son iletkenlik değerleri ölçüldü. Sonuçlar son iletkenlik değerlerinin ürün derişimleriyle ve dolayısıyla başlangıçtaki üre çözeltilerinin derişimleriyle lineer olarak arttığını gösterdi. Örneğin 266, 9577494  $\mu\text{S cm}^{-1}$  lik öziletkenlik değeri 0,002 mol/l hidrolize uğramış üre çözeltilisine karşın gelir. (21) ve (22) eşitliklerini kullanarak

$$V_0 = \frac{0,002}{266,9577494} \cdot \frac{\Delta(l/R)}{\Delta t} \cdot Z = 7,491822225 \times 10^{-6} \frac{\Delta(l/R)}{\Delta t} \cdot Z \dots(23)$$

elde edildi.

Reaksiyon hızlarının sıcaklığa bağımlılığını tayin etmek için reaksiyon ürünlerinin iletkenliğinin de sıcaklığa bağlı olduğuna dikkat etmek gerekir |6|.

$$\sigma_T = \sigma_{25} \left[ 1 + \frac{\alpha}{100} (T - 25) \right] \dots\dots\dots(24)$$

Eşitlik  $T=25^\circ\text{C}$  den T sıcaklığına kadar ölçülen öziletkenlik değerlerini gösterir,  $\alpha$  elektrolit çözeltilisinin sıcaklık katsayısıdır.

$$\frac{d\sigma}{dT} = 0,01757 / ^\circ\text{C}$$

$\alpha$ -değeri  $3 \times 10^{-3}$  M üre çözeltilisi tamamıyla hidrolize edildikten sonra  $25^\circ\text{C}$  dan başlayarak  $65^\circ\text{C}$  ye kadar beşer derece arttırılarak iletkenlikleri ölçüldü, bu bulgular aşağıda liste halinde verilmiştir.

$3 \times 10^{-3}$  M hidrolizlenmiş üre çözeltilisinin değişik sıcaklıklarda değerleri:

T(°C)	25	30	35	40	45	50	55	60	65
1/R(x10 <sup>-1</sup> μS)	37,7	40.7	44	47.5	51	54	57.5	61	64.2

$\sigma_{65}$  ve  $\sigma_{25}$  değerleri (24) eşitliğinde yerlerine konarak  $\alpha = 1.757$  bulunur.

(23) ve (24) eşiliklerinin birleştirilmesiyle 25°C dan farklı sıcaklıklarda  $V_o$  için geçerli olan bir ifade elde edilir.

$$V_{oT} = 7.491822225 \times 10^{-6} \left[ 1 + 0.01757 (T - 25) \right]^{-1} \frac{\Delta(1/R)}{\Delta t} \cdot Z$$

.....(25)

$V_{oT}$  yi hesaplamak için iletkenlik/zaman eğerisinin

başlangıç eğimi. ., Z alışan iletkenlik hücresinin kap sabiti ve T sıcaklığı denkleme yerine konmalıdır.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIşMA

#### 3.1. Michaelis Sabitinin Bulunması

Tablo: 3.1 de 25°C için verilen farklı derişimlerdeki iletkenlik değerleri çalışılan iletkenlik hücresinin kap sabiti ile çarpılarak oziletkenlik değerleri bulundu. Elde edilen oziletkenlik değerleri derişime karşı grafiğe geçirildi elde edilen grafik Şekil-16'de verildi. Grafiğin lineer-regresyonu yapılarak doğru denklemini bulundu.

$$y_{25} = 127117.7311 \cdot X + 12.72228$$

$$r_{25} = 0.99993$$

Bu doğrunun denkleminde yararlanarak herhangi bir derişime karşın gelen iletkenlik değeri bulunabilir.

x = 0.002 (mol/l) için y değeri

$$y = 127117.7311 \cdot X + 12.72228$$

$$y = 266.95774 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ bulunur.}$$

$$\text{Derişim-öziletkenlik bağlantısı} = \frac{0.002}{266.95774}$$

$$7.4918 \times 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot \mu\text{Scm}^{-1}$$

bulunur.

$$\text{Hız ifadesi } V_0 = 7.4918 \times 10^{-6} \frac{\Delta(1/R)}{\Delta t} \cdot Z \dots\dots\dots(3.1)$$

25°C de gerçekleştirilen bütün reaksiyonlar için bu denklem kullanılabilir. Örneğin substrat derişimi  $c = 1 \times 10^{-3}$  mol/l ile gerçekleştirilen reaksiyonun hızı hız ifadesinde (3.1)

$\frac{\Delta(1/R)}{\Delta t}$  ve Z sabiti yerine koyarak hesaplanabilir.

$\frac{\Delta(1/R)}{\Delta t}$  nin hesaplanması: Sözü edilen reaksiyonun iletken-

lik-zaman eğrisinin başlangıç hız evresinin eğimi lineer regresyon ile bulunur.

Bulunan değer

$$\frac{\Delta(1/R)}{\Delta t} = 0.16994 \mu\text{S/s}$$

Bu verilerle  $V_0$  hızı

$$V_0 = 1.33865 \times 10^{-1} \text{ mol/l.s} \text{ bulunur.}$$

Aynı yöntem ile  $2 \times 10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $4 \times 10^{-3}$  ve  $5 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltileri ile yapılan reaksiyonların hız değerleri Tablo:3.2 de verilmiştir.

Tablo: 3.2. Çeşitli derişimlerdeki max. hız değerleri.

$V_o$ (mol/l.s)	C (mol/l)	$1/V_o$ (l.s/mol)	$1/C$ (l/mol)
$1.33865 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-3}$	747018.7265	1000
$1.59571 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-3}$	626679.7135	500
$1.95698 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-3}$	510989.9707	333.33
$2.31198 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-3}$	432529.6215	250
$2.60226 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-3}$	384281.0862	200

Bu değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk diyagramından Şekil-17.  $K_m = 3.447 \times 10^{-3}$  mol/l olarak bulunmuştur.

### 3.2. Reaksiyon Hızlarına Sıcaklığın Etkisi

#### 3.2.1. Optimum Sıcaklığın Bulunması

Tablo: 3.1 de verilen bulgular kullanılarak 40,60,65,70 ve 80 derecedeki öziletkenlik-derişim grafiklerinin lineer regresyonu yapılarak bulunan doğru denklemleri aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned}y_{40} &= 159712.0219 \cdot X + 17.34857 \\y_{60} &= 207341.7416 \cdot X + 12.40685 \\y_{65} &= 219117.7431 \cdot X + 12.4 \\y_{70} &= 225159.673 \cdot X + 18.852 \\y_{80} &= 247936.4769 \cdot X + 17.85079\end{aligned}$$

Herbir sıcaklık için derişim-öziletkenlik bağıntısı bulunmuştur. (Tablo:3.3.) Tablo (3.3) teki değerler kullanılarak ve bölüm 3.1 de verilen yöntem ile reaksiyon hızları hesaplanmıştır. Elde edilen hız değerleri Tablo 3.4 ve Şekil-18 de verilmiştir. Sonuç olarak optimum sıcaklık  $62^\circ\text{C}$  bulunmuştur.

TABLO : 3.1

Değişik sıcaklıklarda iletkenlik değerlerinin toplu gösterimi.

T (°C)	1x10 <sup>-3</sup> M	2x10 <sup>-3</sup> M	3x10 <sup>-3</sup> M	4x10 <sup>-3</sup> M	5x10 <sup>-3</sup> M
25	134	252	377	493	618
30	145.2	273.5	407	535	670
35	159	294	440	575	724
40	172	315	475	620	779
45	184	338	510	662	832
50	194	357	540	706	895
55	206	376	575	749	945
60	216	396	610	790	1005
65	232	414	642	832	1065
70	242.5	436.84	675.44	874.25	1121.19
80	266.51	477.56	742.24	960.74	1232.96

Tablo 3.1  
1 x 10<sup>-3</sup> mol/l örneğin iletkenlik değeri değişik sıcaklıklarda  
hidroksine ilişkin bazı değerleri.

$\kappa \times 10^3$ (ohm <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	T (°C)	$\ln \kappa$ (ohm <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	1/T x 10 <sup>3</sup> (°K <sup>-1</sup> )
2.91608	25	-11.144	3.355
2.93824	30	-11.722	3.334
4.84832	35	-12.237	3.00
4.74217	40	-12.788	2.918
4.49920	45	-13.311	2.815
2.19242	80	-13.827	2.832

Tablo: 3.3

Değişik sıcaklıklarda derişim-öziletkenlik bağıntıları

Sıcaklık ( °C )	Bağıntı ( mol/ l.uS.cm <sup>-1</sup> )
40	5.93872 x 10 <sup>-6</sup>
60	4.68284 x 10 <sup>-6</sup>
65	4.43810 x 10 <sup>-6</sup>
70	4.49930 x 10 <sup>-6</sup>
80	3.89314 x 10 <sup>-6</sup>

Tablo : 3.4

3 x 10<sup>-3</sup> mol/l üre çözeltisinin değişik sıcaklıklarda hidrolizine ilişkin hız değerleri.

V <sub>0</sub> x 10 <sup>-6</sup> (mol/l.s)	T (°C)	lnV <sub>0</sub> (mol/l.s)	1/T x 10 <sup>3</sup> (°K <sup>-1</sup> )
1.95698	25	-13.144	3.355
2.83824	40	-12.772	3.194
4.84632	60	-12.237	3.00
4.74212	65	-12.259	2.958
4.49930	70	-12.311	2.915
2.19862	80	-13.027	2.832

### 3.3. Sonuç

- 1) Tablo 3.1'e göre sabit sıcaklıkta iletkenliğin derişim ile lineer olarak arttığı sabit derişimde iletkenliğin sıcaklık ile lineer olarak arttığı gözlemlendi.
- 2). Bulunan  $K_m$  değerlerinin literatür ile karşılaştırıldığında sonucun benzer olduğu görüldü.
- 3) Optimum sıcaklığın literatürde bulunan değer ile uyum gösterdiği gözlemlendi. Enzim kinetiği üzerine sıcaklığın etkisi bölümünde anlatıldığı gibi reaksiyon hızları sıcaklık artışıyla Arrhenius yasasına uyarak lineer bir şekilde arttığı optimum sıcaklığı geçtikten sonra optimum sıcaklıktan uzaklaştıkça hızlı bir şekilde düştüğü gözlemlendi. Enzimin  $80^{\circ}\text{C}$  deki reaksiyonun ilk evresinden sonra inaktif konuma geçtiği gözlemlendi. Bu durum  $62^{\circ}\text{C}$  lik optimum sıcaklığın kabul edilebilir bir sonuç olduğunu destekliyor.

3.4	3.47	11.2	22.00
4.0	3.30	11.8	27.00
4.5	4.12	12.3	30.00
5.0	5.02	13.0	45.00
5.5	5.54	13.2	50.00
6.0	6.65	13.4	120.00
6.5	7.49	13.7	125.00
7	8.22	13.8	130.00

DENEYSEL BULGULAR

TABLO : 3.4

$c = 1 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin 25°C de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)
1.1	0	8	10.50
1.3	0.11	8.5	12.03
1.4	0.17	9	13.25
1.7	0.34	9.5	15.01
2	0.53	10	16.43
2.5	1.28	10.8	20.00
3.0	2.06	11.2	22.00
3.5	2.47	11.9	27.00
4.0	3.30	12.2	30.00
4.5	4.12	13.02	45.00
5.0	5.02	13.3	60.00
5.5	5.54	13.5	90.00
6.0	6.45	13.4	120.00
6.5	7.39	13.4	130.00
7	8.38	13.4	150.00

TABLO : 3.5

$c = 2 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin 25°C de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu S$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu S$ )	t (dak.)
1.2	0	10	9.58
1.5	0.12	11	11.36
2	0.36	12	13.12
2.5	1.02	13	14.59
3	1.28	14	16.52
3.5	1.58	15	18.52
4	2.28	16	21.05
4.5	2.58	17	23.31
5	3.31	18	26.10
5.5	4.05	19	29.11
6	4.40	20	32.53
6.5	5.16	21	37.12
7	5.50	22	42.33
7.5	6.31	23	49.50
8	7.07	24.6	72.00
8.5	7.47	25.2	130.00
9	8.28	25.2	140.00
9.5	9.18		

TABLO : 3.6

$c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin 25°C de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)
1.4	0	16	13.37
1.9	0.18	17	14.50
2.5	0.43	18	16.06
3.0	1.04	19	17.24
3.5	1.27	20	18.49
4.5	2.13	22	21.50
5.0	2.38	23	23.28
5.5	3.03	24	25.06
6.0	3.28	25	26.43
6.5	3.52	26	28.32
7.0	4.18	27	30.40
7.5	4.45	28	32.58
8.0	5.13	29	35.25
8.5	5.38	30	38.08
9.0	6.07	32.2	45.00
9.5	6.38	35	60.00
10	7.06	36.8	80.00
11	8.08	37.6	100.00
12	9.11	37.7	140.00
13	10.14	37.7	145.00
14	11.21		
15	12.29		

TABLO : 3.7

$c = 4 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin 25°C da üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R (x10^{-1} \mu S)$	t (dak.)	$1/R (x10^{-1} \mu S)$	t (dak.)
1.1	0	177	12.31
1.5	0.13	18	13.31
2.	0.28	19	14.33
2.5	0.46	20	15.36
3	1.05	21	16.44
3.5	1.24	22	17.53
4	1.43	24	20.13
4.5	2.04	25	21.26
5	2.25	26	22.40
5.5	2.46	27	23.58
6	3.08	28	25.14
6.5	3.28	29	26.40
7	3.51	30	28.14
7.5	4.12	35	36.45
8	4.35	40	41.30
8.5	4.59	43	56.00
9.	5.23	45.8	70.00
9.5	5.47	47	80.00
10.	6.15	47.7	90.00
11	7.04	49.	120.00
12	7.57	49.2	135.00
13	8.49	49.3	165.00
14	9.42	49.3	190.00
15	10.38		

TABLO : 3.8

$c = 5 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin 25°C da üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu S$ )	t (dak.)
1.2	0	24	28.27
1.5	0.08	25	30.12
2	0.24	26	32.01
2.5	0.43	27	33.57
3	1.03	28	35.53
3.5	1.25	29	37.53
4.	1.47	30	40.01
4.5	2.10	32	44.20
5	2.36	34	49.03
5.5	3.02	35	51.26
6	3.28	36	54.04
6.5	3.54	39	62.00
7	4.23	40	64.45
7.5	4.51	41.9	70.00
8	5.23	43.5	75.00
9	6.25	45	80.00
9.5	7.01	47.5	90.00
10	7.42	49.8	100.00
11	8.55	51.7	120.00
12	10.15	53.2	120.00
13	11.35	56	140.00
14	12.57	57	150.00
15	14.22	58	160.00
16	15.44	58.7	170.00
17	17.10	59.2	180.00
18	18.42	59.7	190.00
19	20.05	60	200.00
20	21.39	60.4	210.00
21	23.18	60.9	220.00
22	24.50	61.3	250.00
23	26.44	61.8	290.00
		61.8	300.00

TABLO : 3.9

$c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin  $70^{\circ}\text{C}$  de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu\text{S}$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu\text{S}$ )	t (dak.)
7	0	27	4.26
8	0.08	28	4.44
9	0.18	29	5.04
10	0.28	30	5.26
11	0.39	35	7.22
12	0.49	40	9.49
13	1.01	45	12.54
14	1.12	50	17.50
15	1.24	51.7	20.00
16	1.37	56	30.00
17	1.49	59.7	40.00
18	2.02	61.4	50.00
19	2.16	62.5	60.00
20	2.31	63.3	75.00
21	2.47	63.9	90.00
22	3.02	64	105.00
23	3.20	64.2	120.00
24	3.34	64.3	135.00
25	3.51	64.3	150.00
26	4.08		

TABLO :3.10

$c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin  $55^{\circ}\text{C}$  de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu\text{S}$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu\text{S}$ )	t (dak.)
3	0	21	3.55
4	0.09	23	4.30
4.5	0.15	24	4.49
5	0.20	25	5.07
5.5	0.24	26	5.25
6.	0.30	27	5.45
6.5	0.35	28	6.05
7	0.41	29	6.27
7.5	0.46	30	6.49
8	0.52	35	8.54
8.5	0.57	40	11.27
9	1.03	45	14.33
9.5	1.10	50	19.17
10	1.15	55	26.32
11	1.29	59	37
12	1.42	61.5	50.00
13	1.54	62.5	60.00
14	2.09	63.4	70.00
15	2.20	63.9	80.00
16	2.36	64.1	90.00
17	2.50	64.3	100.00
18	3.07	64.4	110.00
19	3.22	64.4	120.00
20	3.32		

TABLO: 3.11

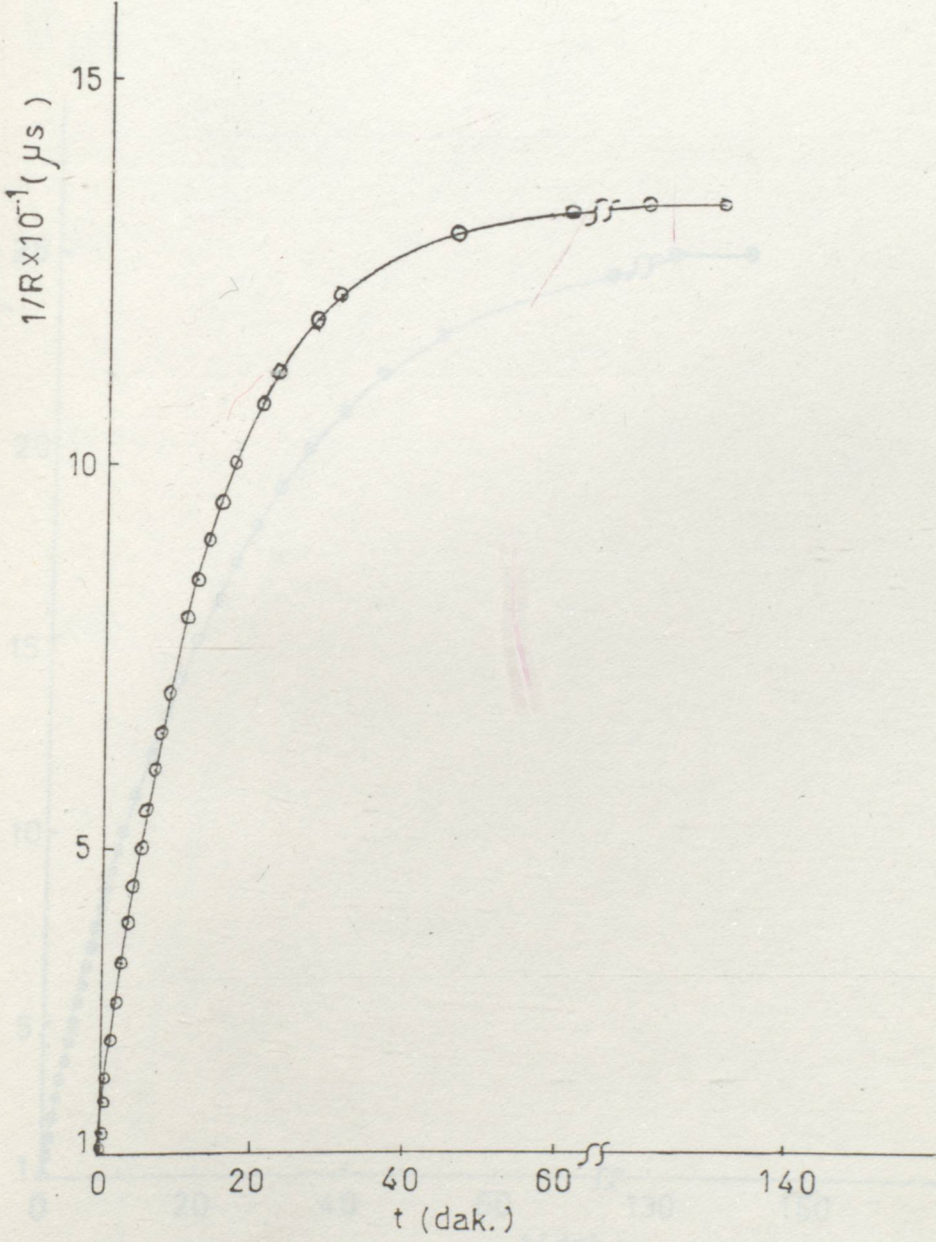
$c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l çözeltilisinin  $60^{\circ}\text{C}$  de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri .

$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu\text{S}$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1} \mu\text{S}$ )	t (dak.)
5.5	0	23	4.54
6	0.05	24	5.17
6.5	0.11	25	5.40
7.5	0.20	26	6.04
8	0.25	27	6.30
8.5	0.31	28	6.55
9	0.39	29	7.23
9.5	0.46	30	7.52
10	0.54	35	10.48
11	1.10	40	14.31
12	1.25	45	14.29
13	1.41	50	27.48
15	2.15	51	30.14
17	2.49	55	44.45
18	3.07	57.3	60.00
19	3.28	58.2	70.00
20	3.48	59	80.00
21	4.08	59.5	90.00
22	4.31	59.9	100.00
		60	107.00
		63.9	$\infty$

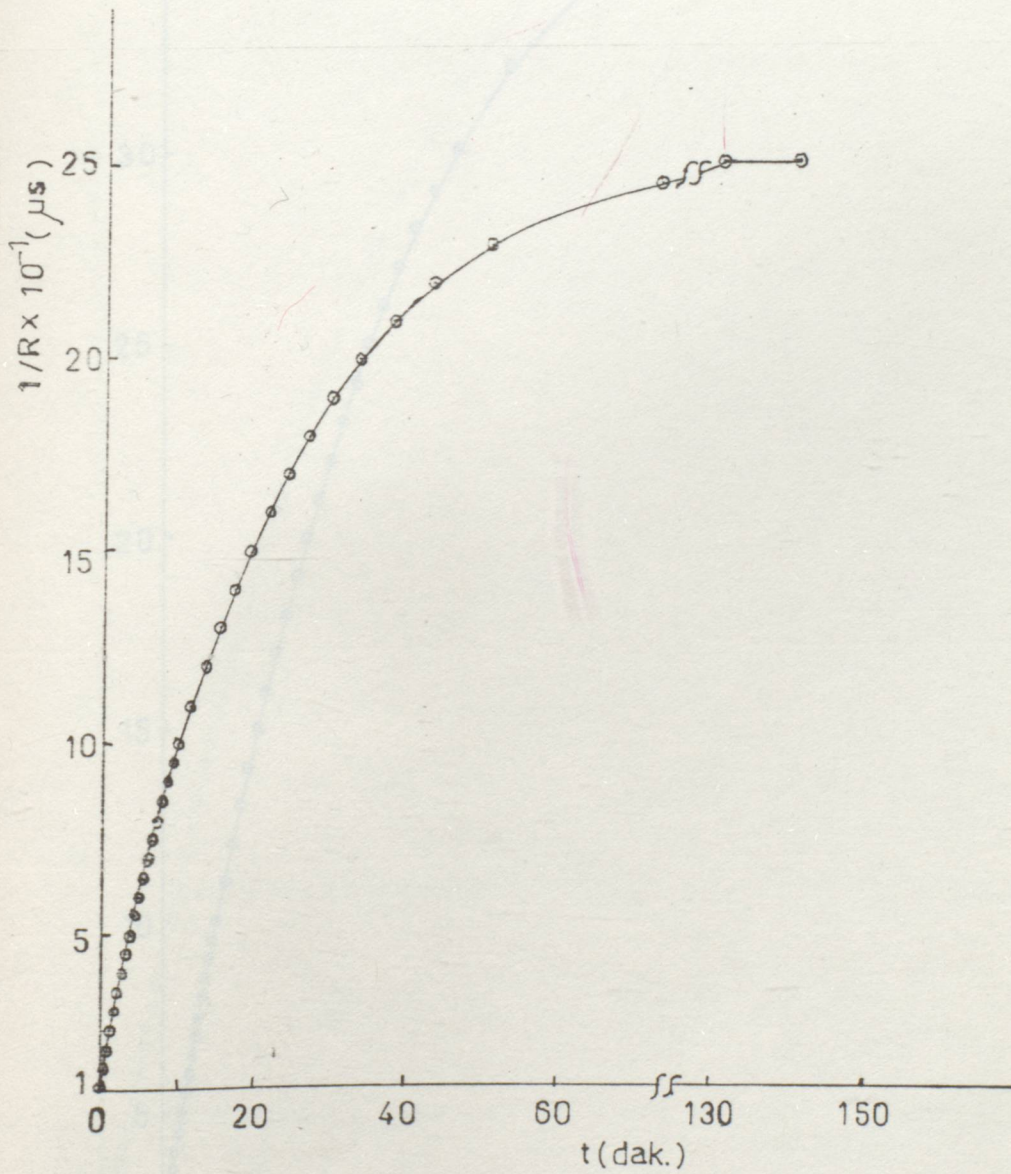
TABLO : 3.12

$c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l üre çözeltisinin  $40^{\circ}\text{C}$  de üreaz enzimi katalizli hidrolizine ilişkin zamana karşı okunan iletkenlik değerleri.

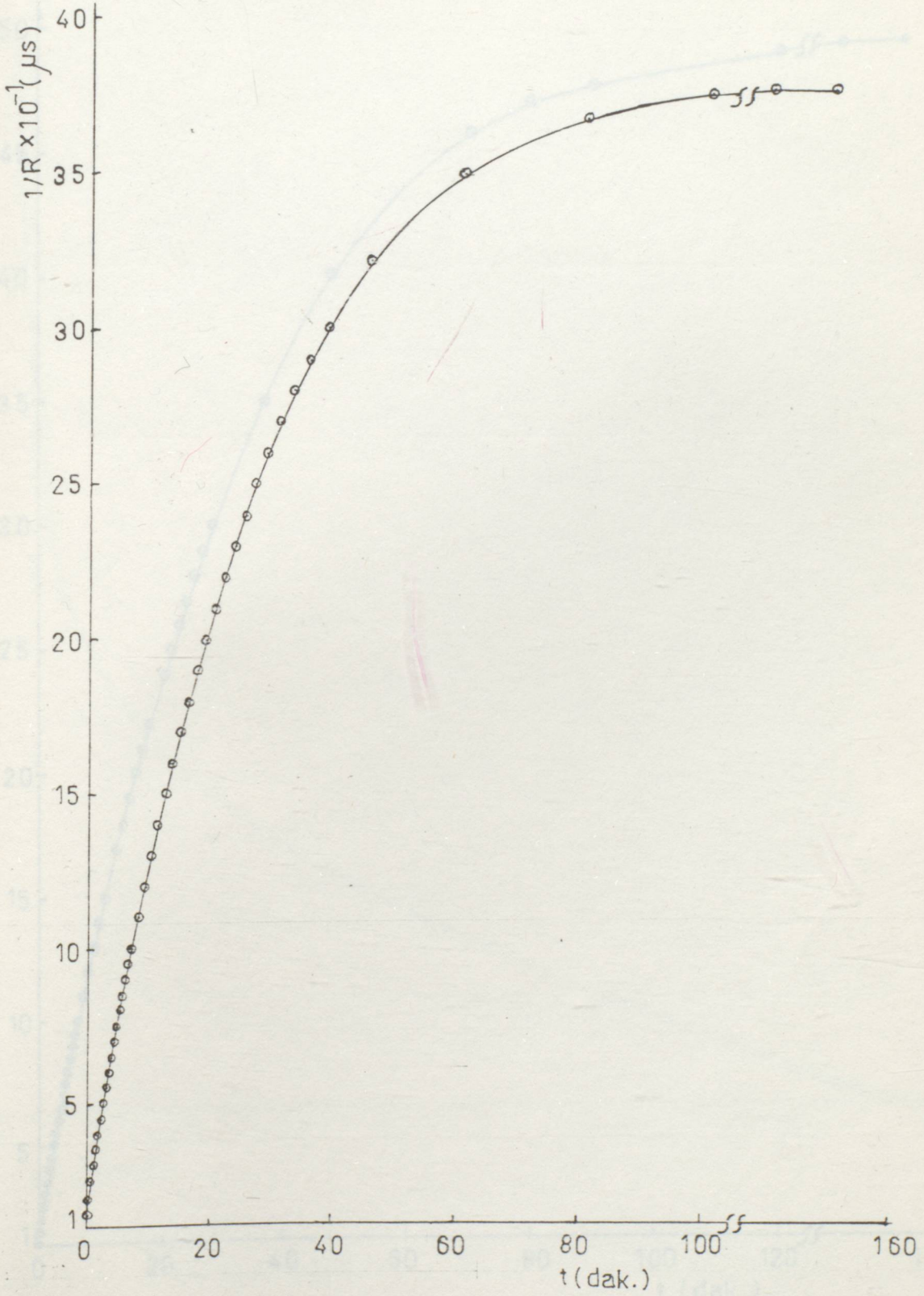
$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu\text{S}$ )	t (dak.)	$1/R$ ( $\times 10^{-1}$ $\mu\text{S}$ )	t (dak.)
2.5	0	18	12.25
3	0.11	19	13.27
3.5	0.22	20	14.31
4	0.35	21	15.34
4.5	0.50	22	16.39
5	1.07	23	17.45
5.5	1.25	24	18.48
6	1.45	25	19.50
6.5	2.05	26	20.55
7	2.25	27	22.02
7.5	2.46	28	23.10
8	3.10	29	24.23
8.5	3.33	30	25.38
9	4.01	35	32.33
9.5	4.25	43	49.30
10	4.51	45	57.00
11	5.48	46.7	65.00
12	6.42	47.3	75.00
13	7.37	48	90.00
14	8.31	48.7	$\infty$
15	9.31		
16	10.28		
17	11.26		



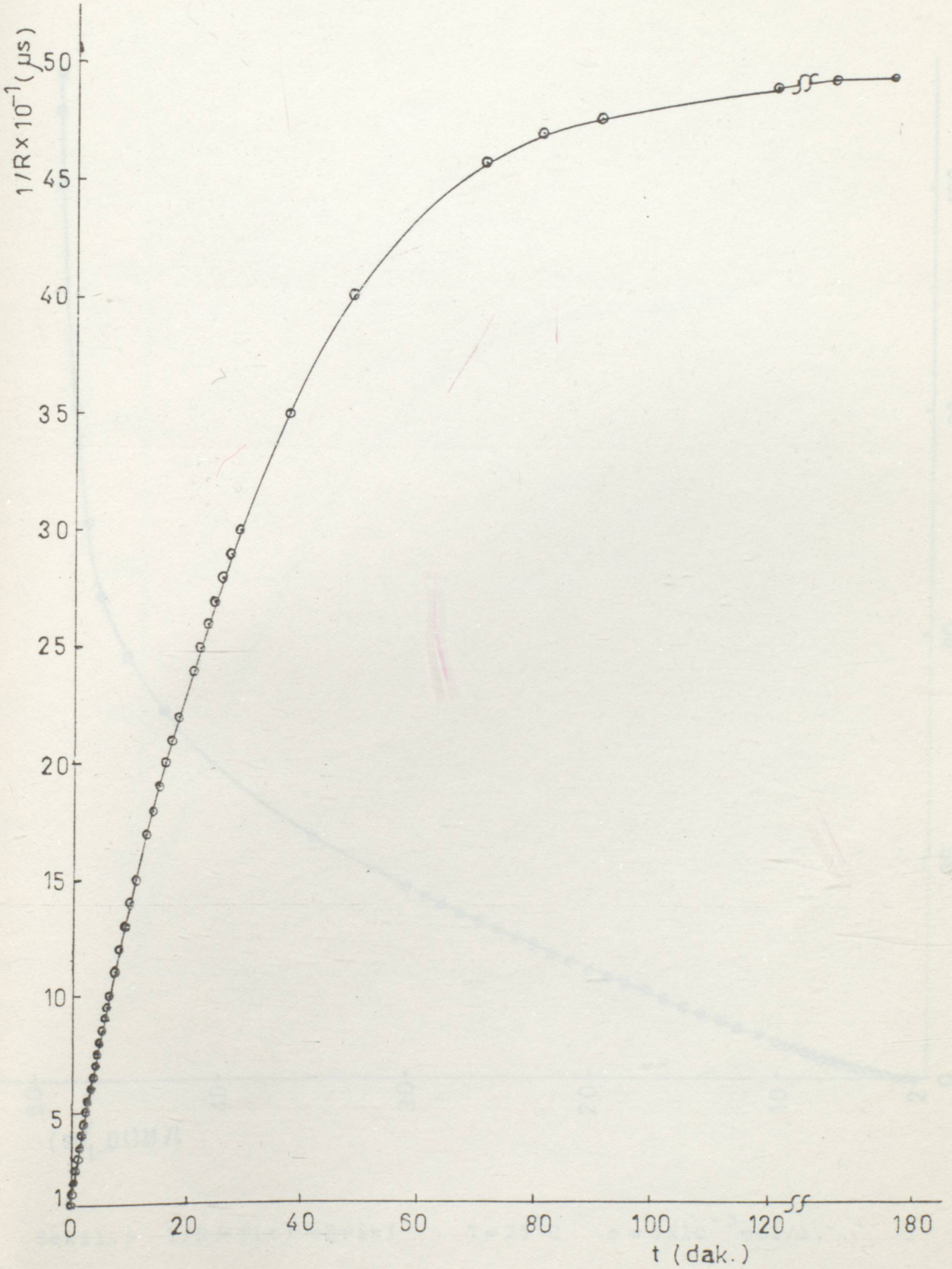
Şekil.1  $1/R=f(t)$  eğrisi.  $T = 25^{\circ}C$   $c = 10^{-3}$  mol/l.



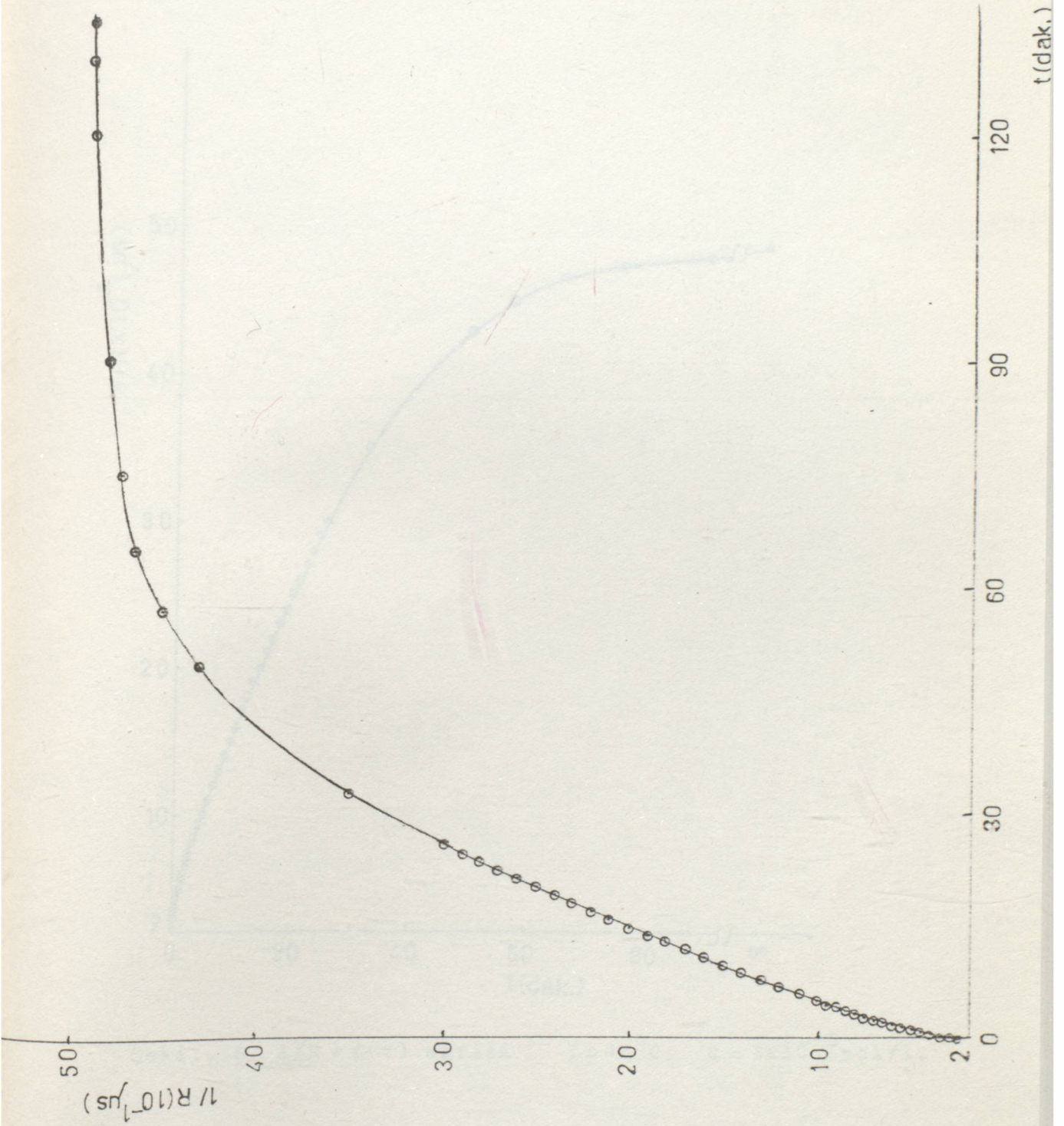
Şekil.2  $1/R = f(t)$  eğrisi.  $T = 25^{\circ}\text{C}$   $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$



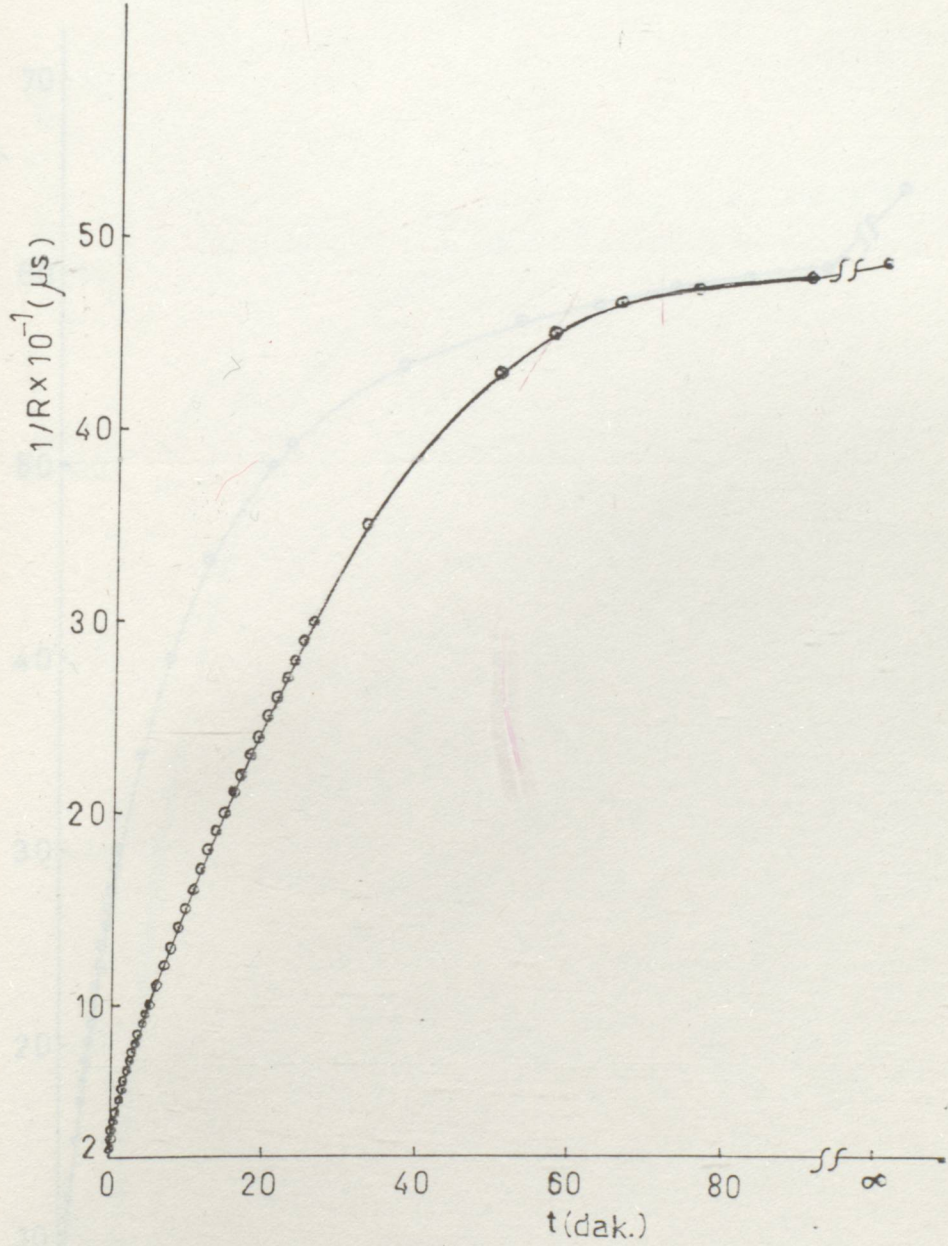
Şekil.3  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 25^{\circ}C$   $c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol/l.}$



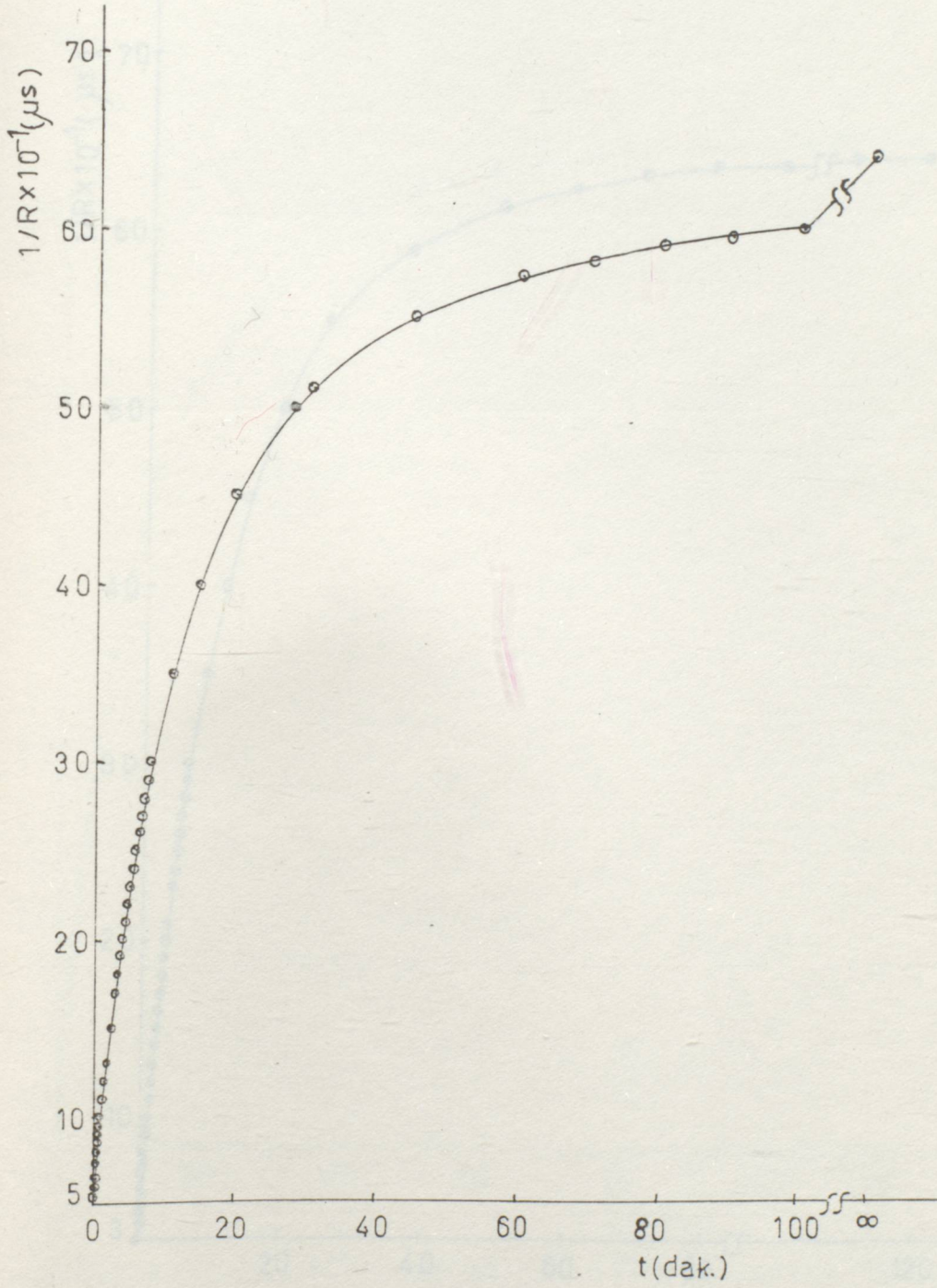
Şekil.4  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 25^{\circ}C$   $c = 4 \times 10^{-3}$  mol/l.



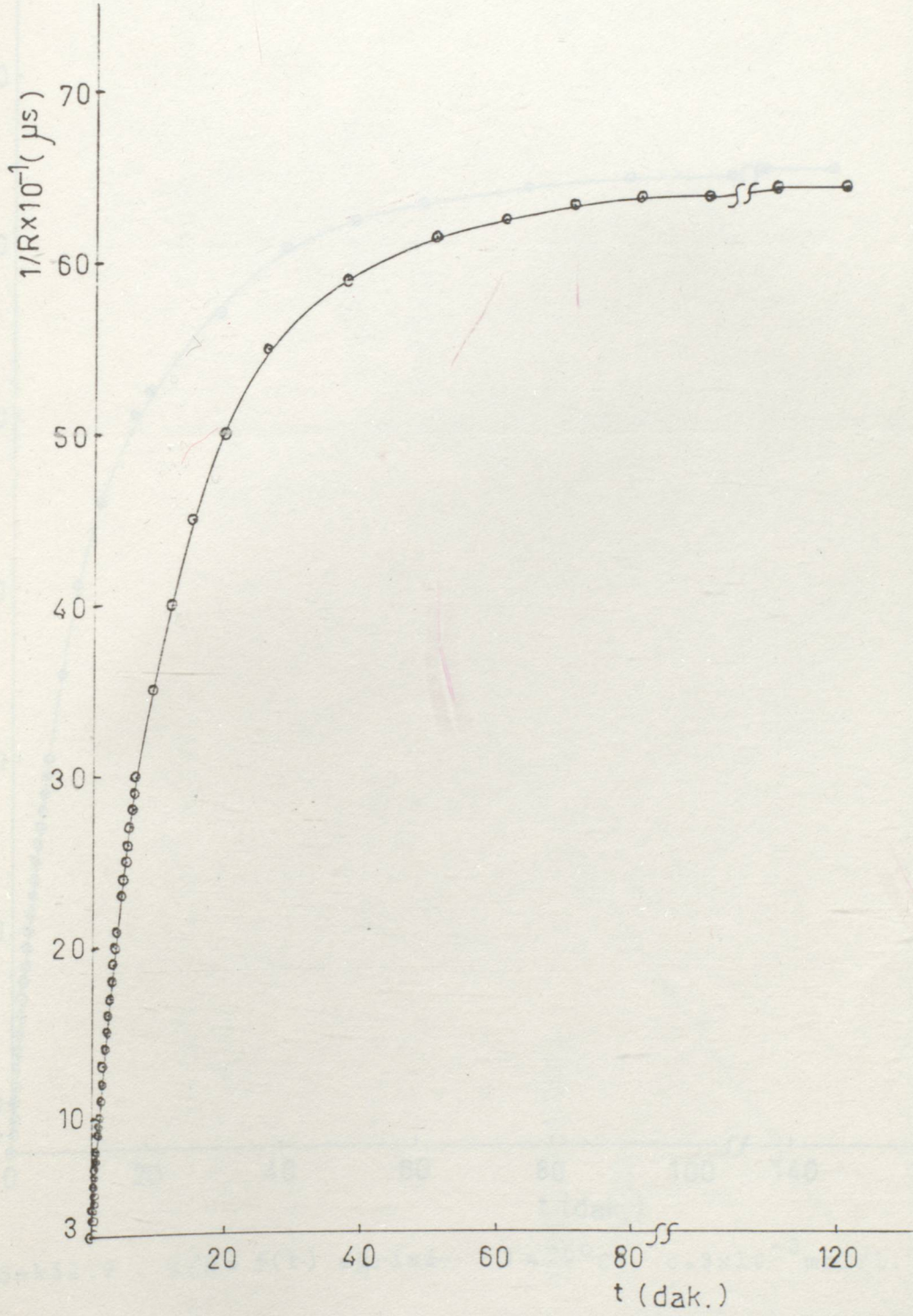
Şekil.5  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 25^{\circ}C$   $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol/l.}$



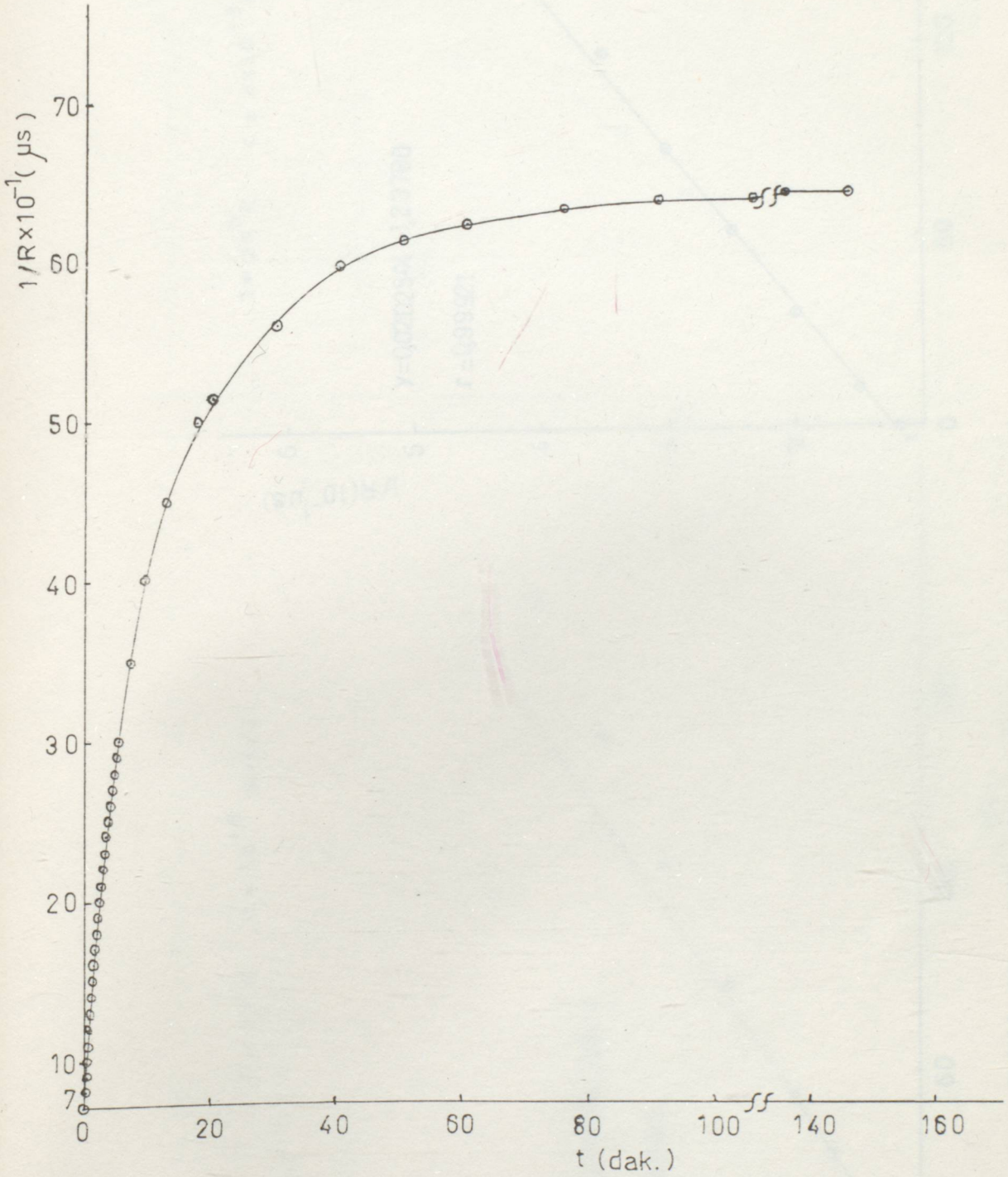
Şekil. 6  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 40^{\circ}C$   $c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l.



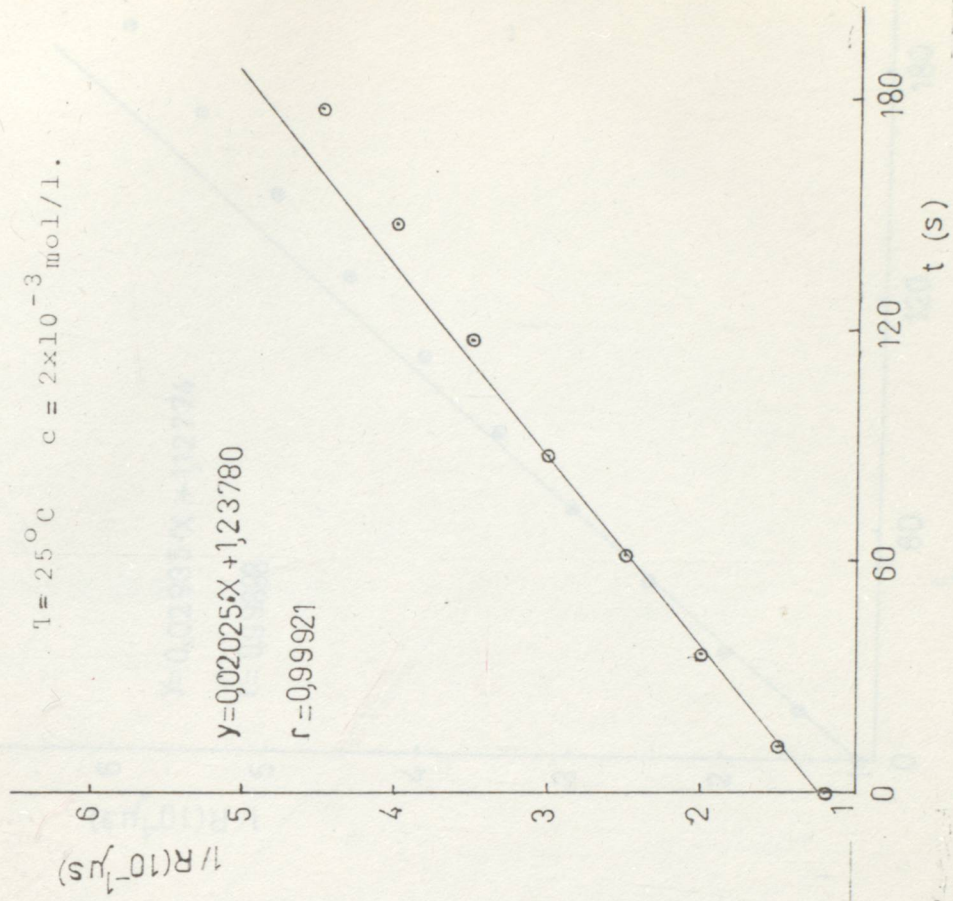
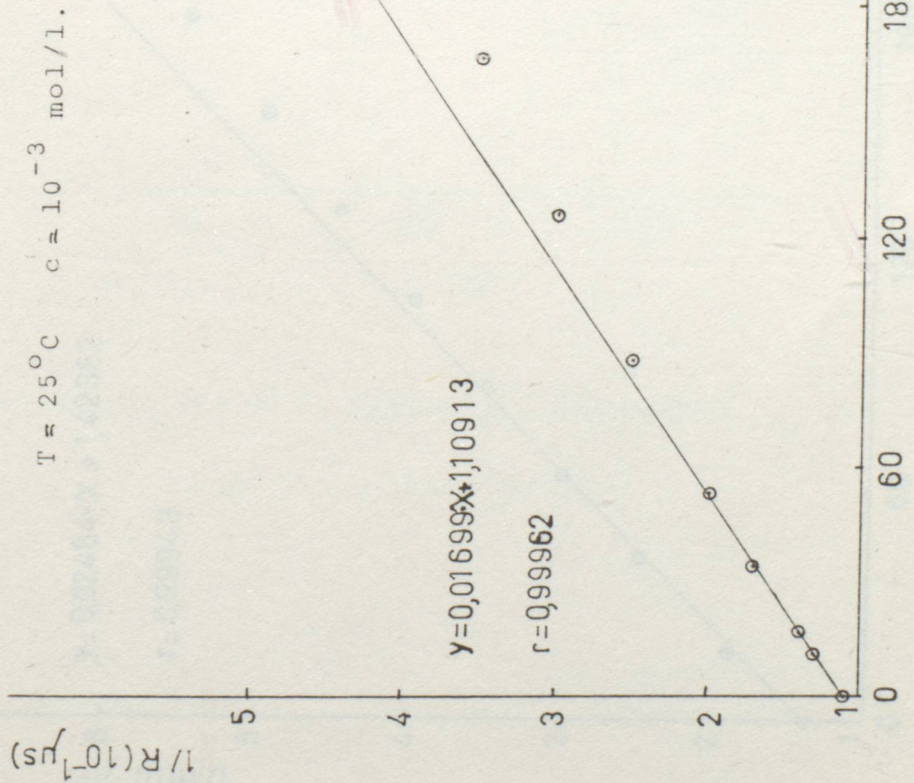
Şekil.7  $1/R = f(t)$ . eğrisi  $T = 60^{\circ}\text{C}$   $c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol/l.}$



Şekil.8  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 65^{\circ}C$   $c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l.

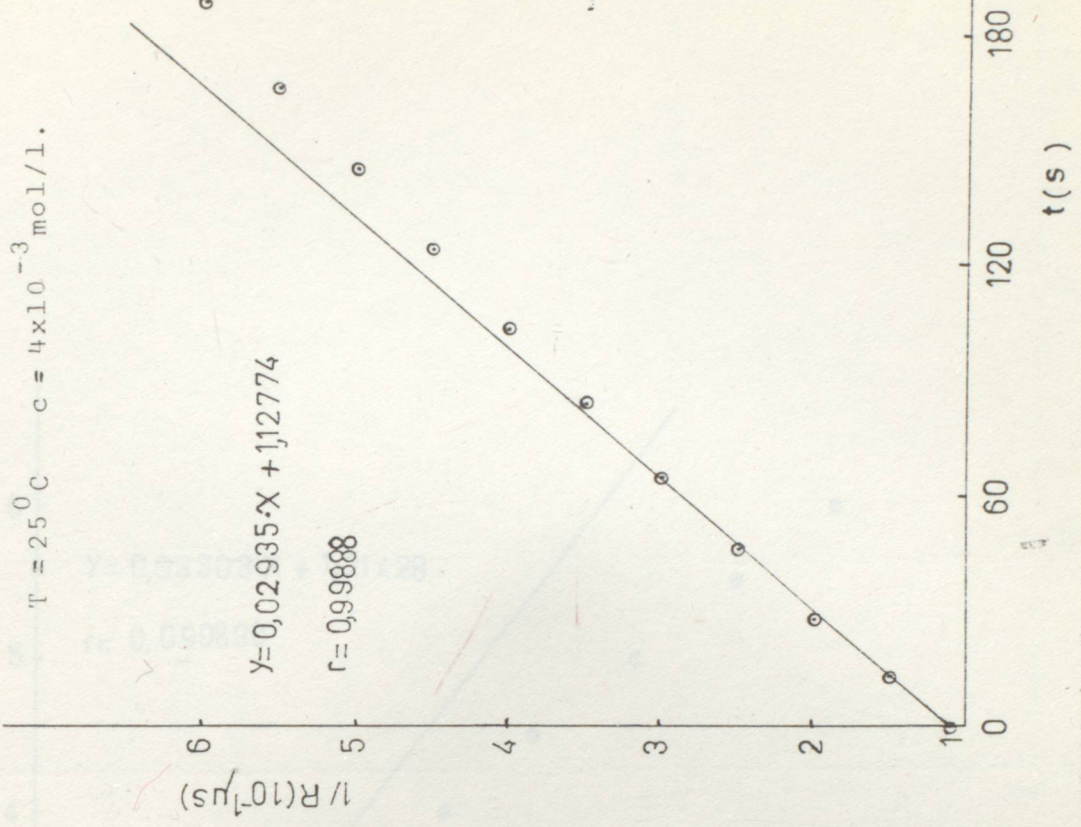


Şekil.9  $1/R = f(t)$  eğrisi  $T = 70^{\circ}C$   $c = 3 \times 10^{-3}$  mol/l.

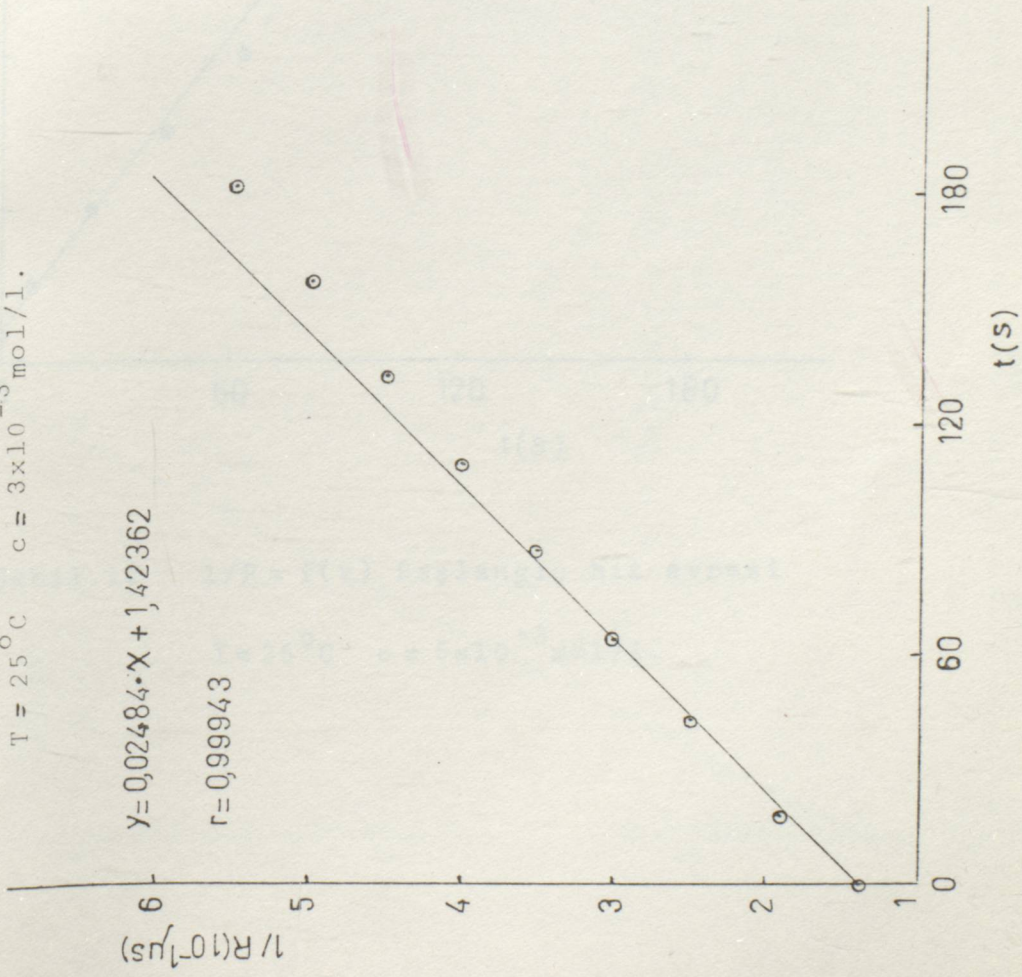


Şekil.10  $1/R = f(t)$  başlangıç hız evresi

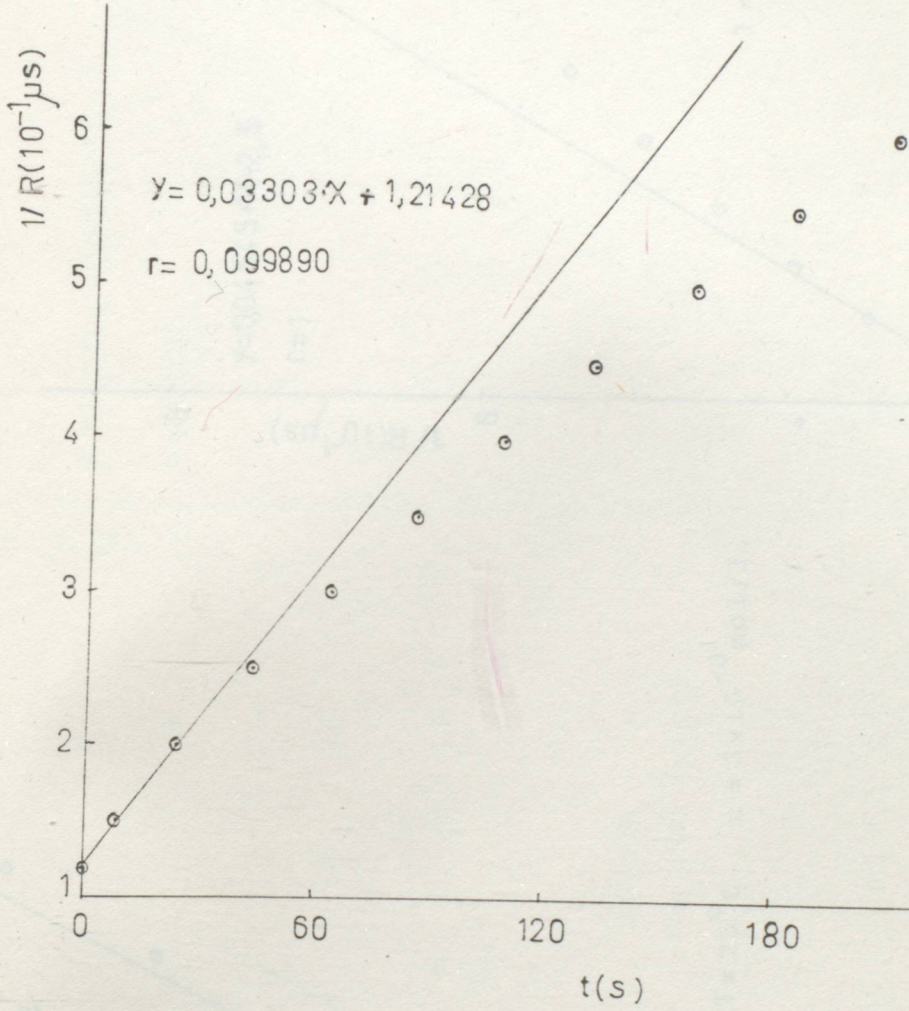
T = 25°C c = 4x10<sup>-3</sup> mol/l.



T = 25°C c = 3x10<sup>-3</sup> mol/l.

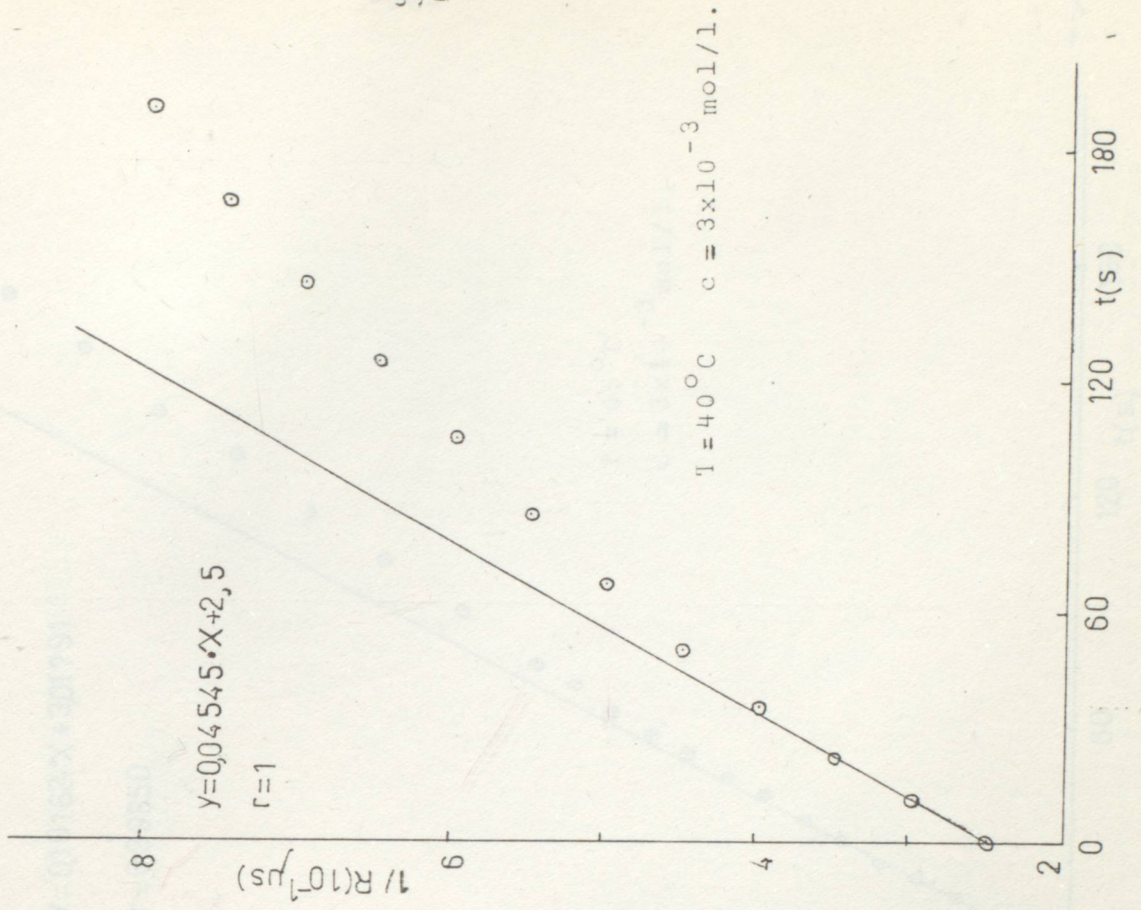
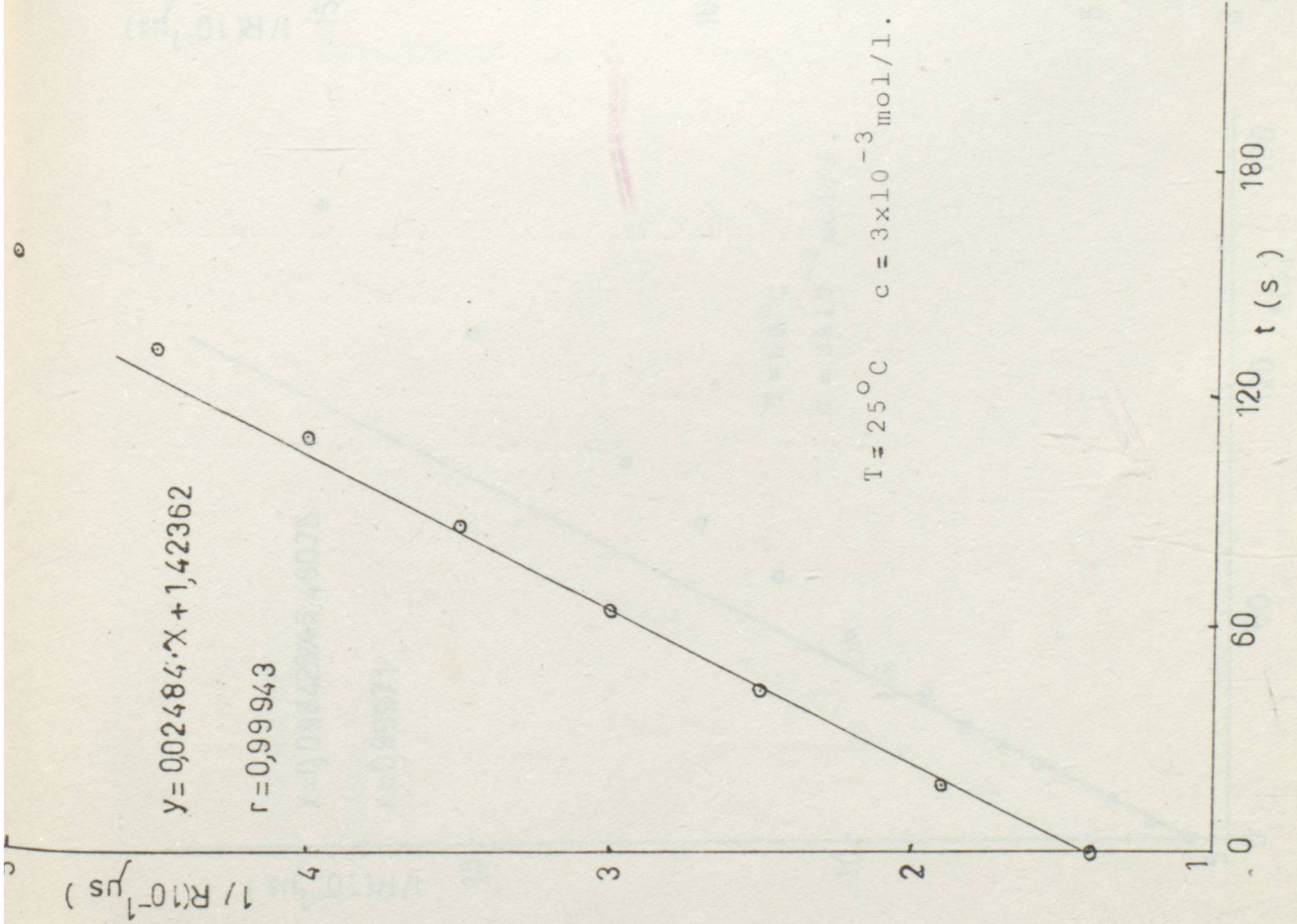


Sekil.11 1/R = f(t) Başlangıç hız eğresi

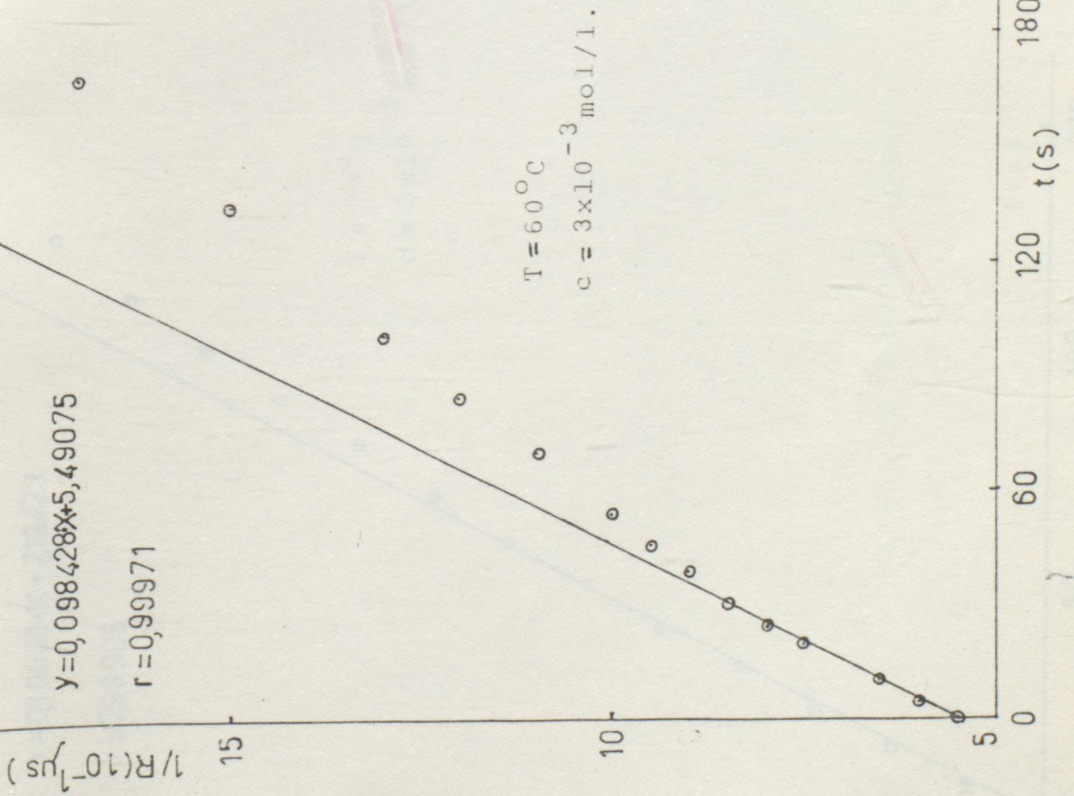
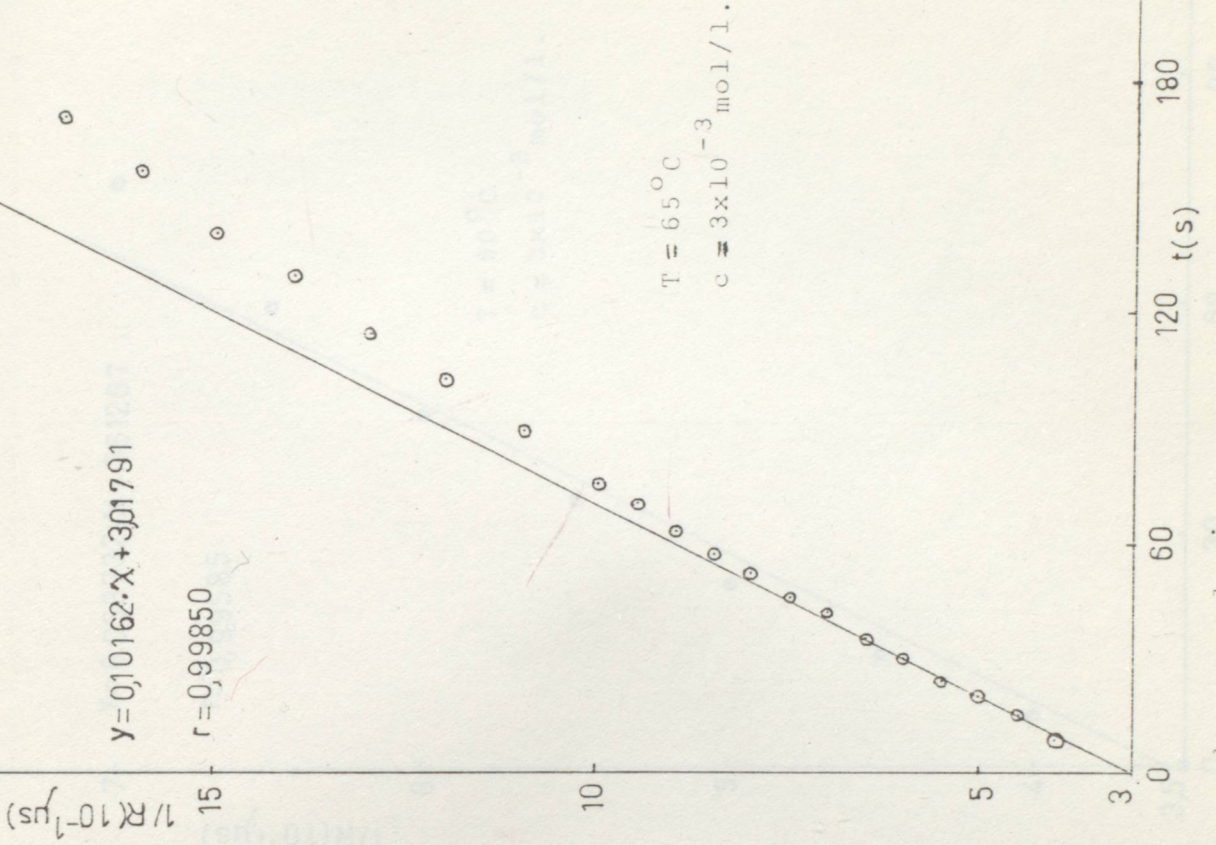


Şekil.12  $1/R = f(t)$  Başlangıç hız evresi

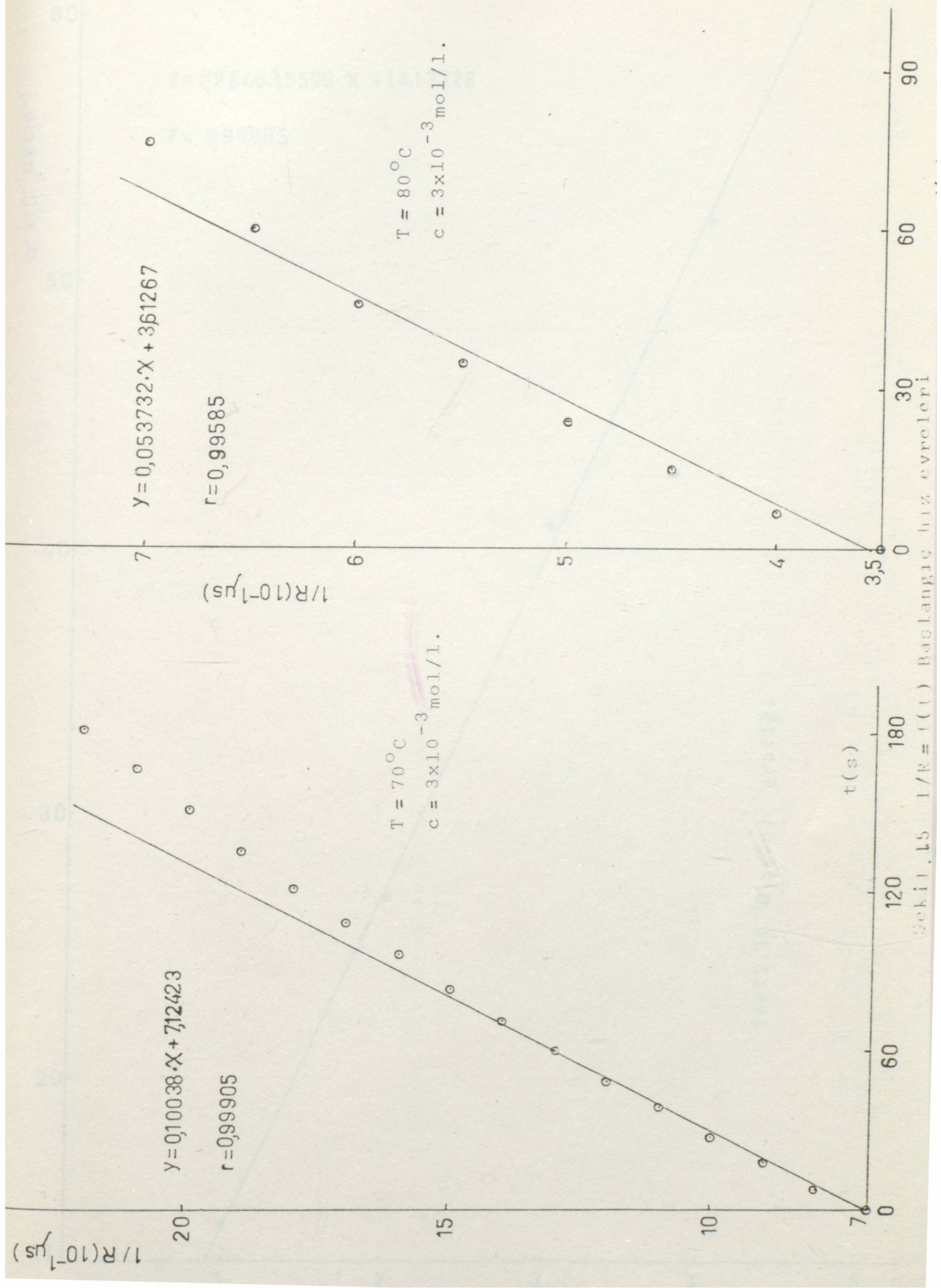
$T = 25^{\circ}C$   $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol/l.}$



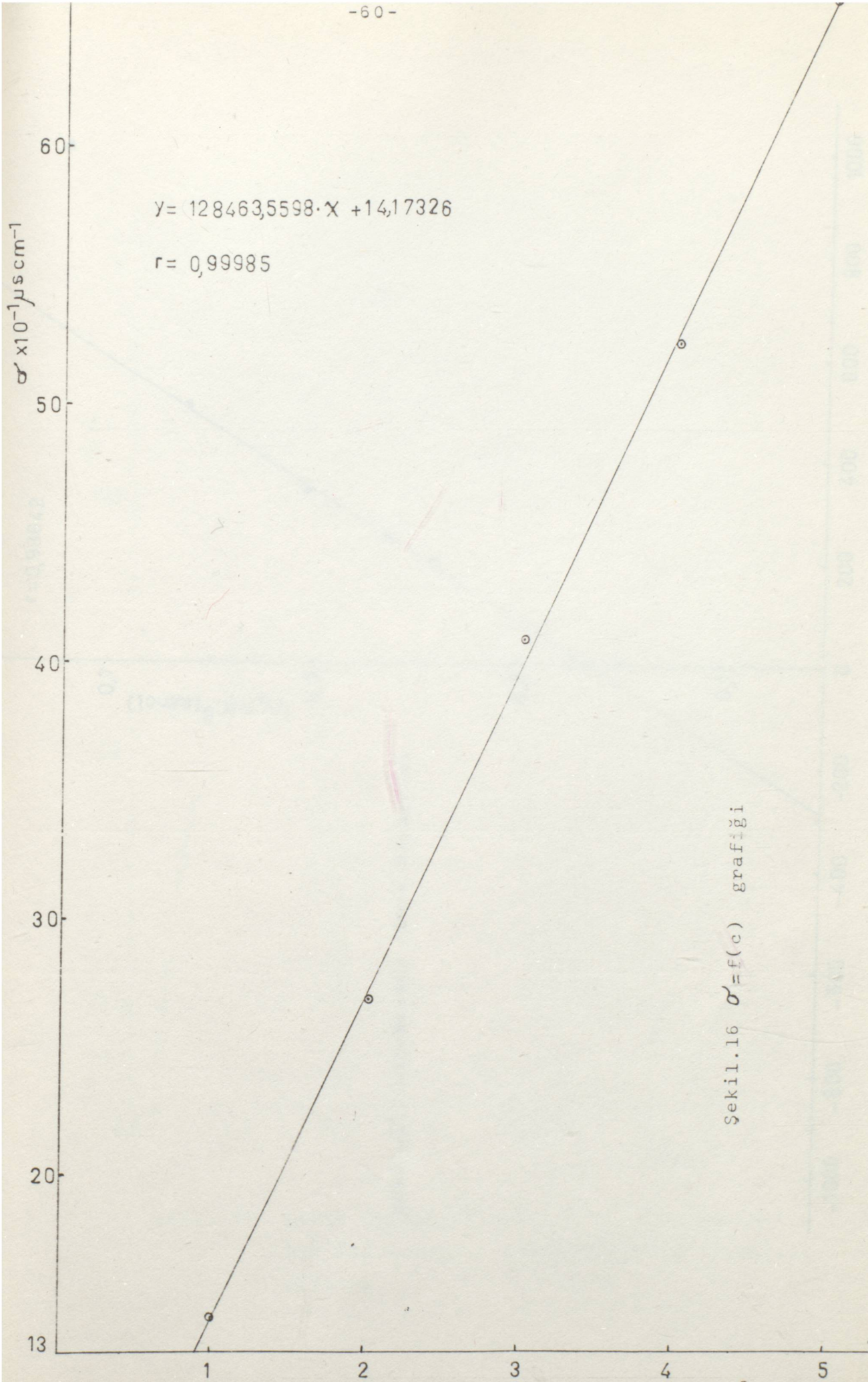
Şekil.13 1/R = f(t) Başlangıç hız evreleri



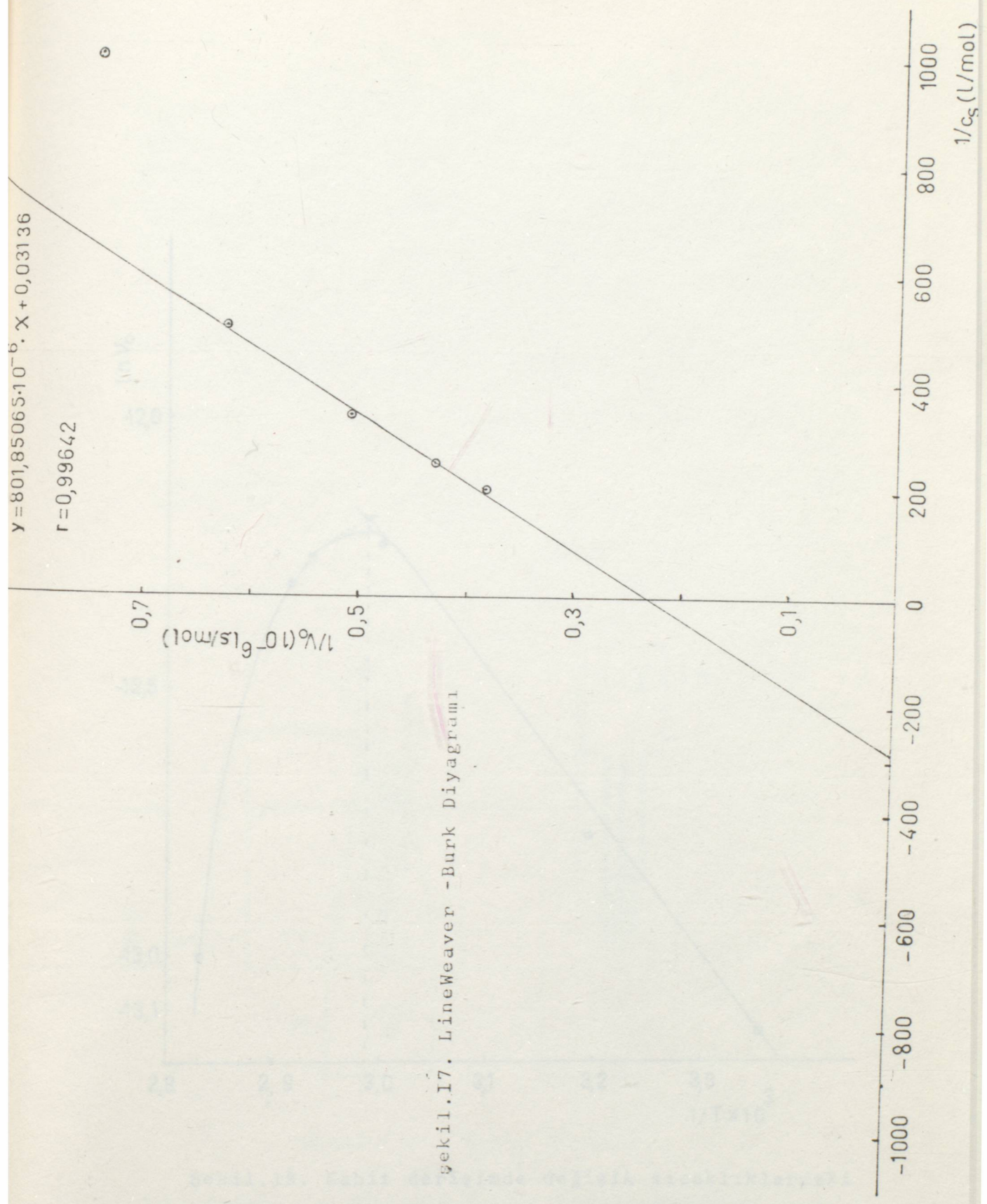
Şekil.14  $1/R = f(t)$  Başlangıç hız evreleri



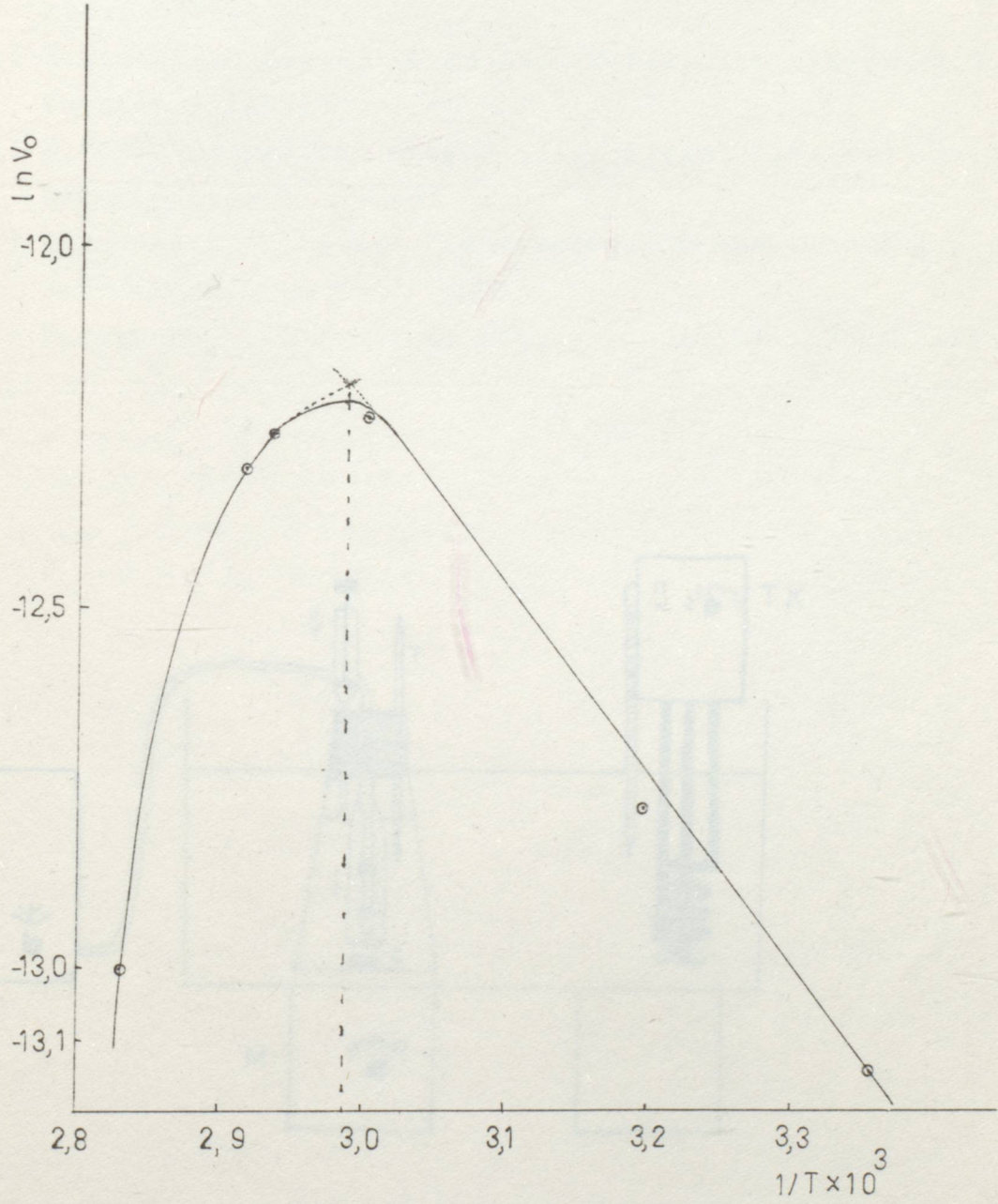
Şekil.15 1/R = f(t) Başlangıç hızı eşitleri



Şekil.16  $\sigma = f(c)$  grafiği



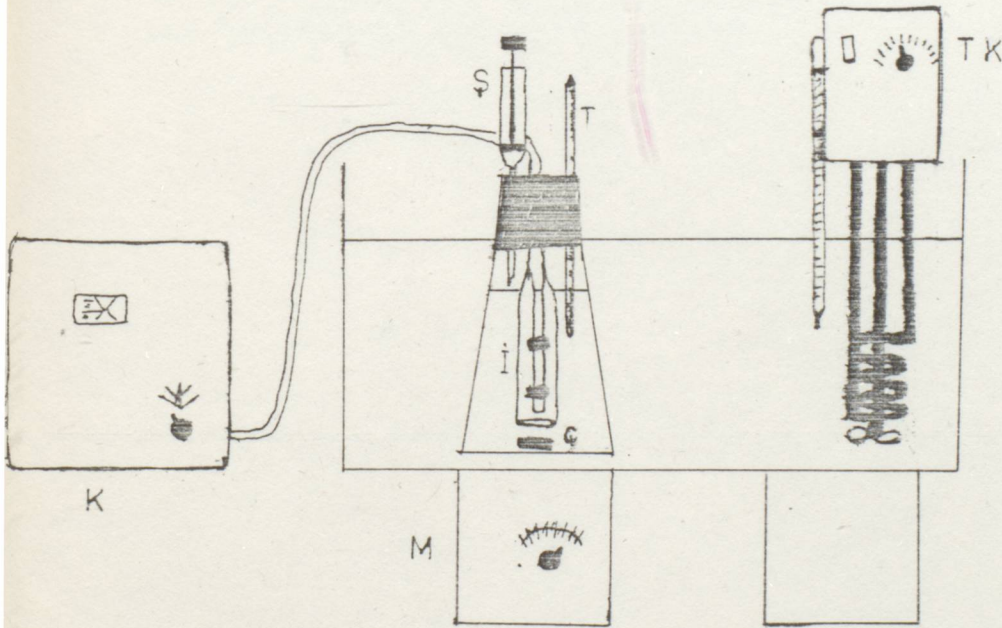
Şekil.17. LineWeaver -Burk Diyagramı



Şekil.18. Sabit derişimde değişik sıcaklıklardaki hız değerlerinin sıcaklığa karşı çizilmiş grafiği

## KAYNAKLAR

- 1) Trösel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yarı Okulu, 12 Eylül- 3 Ekim 1988 Çeşne-İzmir/TÜRKİYE  
Ed. S. Nispetoğlu
- 2) H. Dixon and J. D. Webb, "Enzymes", Second Edition, Academic Press (1958)
- 3) E. N. Fiksen, S. Şenvar, E. Edgüer, "Üniversite Kimyası" 4. B. Yayıncılık (1978)
- 4) B. Fakir "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)" Birikim Yayıncılık (1976)
- 5) R. H. Fessenden, D. Kaplan "Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism", Academic Press (1987)
- 6) P. Graywolf, "Biochemical Education" 11 (4) 170-2, 1984



Şekil. 19 . Deney düzeneği

- |                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| K: Konduktometre        | i: İletkenlik hücresi       |
| M: Manyetik karıştırıcı | ç: Manyetik çubuk           |
| S: Şiringa              | TK: Termostatlı karıştırıcı |
| T: Termometre           |                             |

## KAYNAKLAR

- 1) Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu 22 Eylül- 3 Ekim 1986 Çeşme-İzmir/TURKEY  
Ed. A. Telefoncu
- 2) M.Dixon and E.C.Webb , "Enzymes", Second Edition, Academic Press (1964)
- 3) B.H.Mahan, C.Şenvar , E.Edgüer, "Üniversite Kimyası" H.Ü. Yayınları (1976)
- 4) B.Pekin "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)" Birinci Kitap, Kısım:1 (1979)
- 5) D.L.Purich, O.Kaplan "Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism", Academic Press (1983)
- 6) P.Grunwald Biochemical Education 12 (4) 170-3 1984

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başlatılıp tamamlanmasının her aşamasında yardım ve desteklerini gördüğüm Sayın Hocam Doç.Dr.Süheyla Uzman'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmanın gerek deneysel gerekse yazılma işlemleri sırasındaki yardım ve katkılarından dolayı Çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi belirtmeyi bir borç bilirim.

## ÖZGEÇMİŞ

1960 Aydın doğumluyum. İlk,orta ve lise öğrenimimi sırasıyla Atatürk İlkokulu,Dikili ortaokulu ve Dikili lisesi'nde tamamladım.1983 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimyagerlik Bölümü'nden mezun oldum.1984 yılında Yıldız Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü 'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladım.Bu görevi halen Organik Kimya Anabilim Dalı'nda sürdürmekteyim.

