

KMB310 KİMYA MÜHENDİSLİĞİ LABORATUVARI II

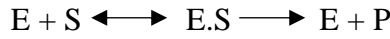
DENEY ADI: ENZİM KİNETİĞİ

Deneyin Amacı: Katalaz enzimi varlığında gerçekleşen hidrojen peroksitin parçalanma reaksiyonuna ait Michaelis–Menten sabitlerinin ve kinetik parametrelerin hesaplanması.

Teorik Bilgi: Enzimler protein veya protein benzeri maddelerdir. Biyolojik tepkimeler enzim olmadan yaşamın sürmesi için gereken hızda olamazlar. Enzimler genellikle küçük miktarlarda bulunurlar ve tepkime süresince ne tükenir ne de kimyasal tepkimenin dengesini etkilerler [1]. Enzimlerin önemli bir özelliği spesifik olması, yani bir enzimin genellikle sadece bir tip tepkimeyi katalizlemesidir [2].

Bu deney kapsamında ekmek mayasının içerdiği katalaz enziminin H₂O₂ parçalama kabiliyetinin H₂O₂ konsantrasyonu değişimi incelenecektir. Hidrojen peroksit canlılardaki hidroliz ve dehidroliz reaksiyonlarında küçük miktarlarda ortaya çıkan toksik bir maddedir. Genel olarak tüm peroksitler yaşayan organizmalara zarar verir. Bu nedenle canlılarda bu maddeye karşı savunma da kullanılan katalaz enzimi bulunmaktadır. Katalaz enzimi hidrojen peroksitin parçalanmasında oldukça etkili bir enzimdir.

Enzim kinetiği yaygın şekilde Michaelis–Menten kinetik eşitliğine bağlı olarak hesaplanır. Michaelis–Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en basit ve en iyi modellerinden biridir. Basit bir enzimatik reaksiyon aşağıdaki gibi yürümektedir [2].



Bu enzimatik reaksiyon modeli için enzim reaksiyon hızını betimleyen Michaelis–Menten kinetik denklemi Eşitlik 1'deki gibidir. Bu denklemde reaksiyon hızı (V), bir substrat ([S]) konsantrasyonu cinsinden ifade edilir:

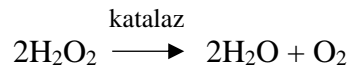
$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

V_{max} ve K_m değerleri Michaelis-Menten kinetikleri ile tanımlanan enzim tepkimelerini karakterize eder. Burada, V_{max} sistemden elde edilebilecek en yüksek reaksiyon hızıdır, enzimi doyurucu substrat konsantrasyonunda bu hıza ulaşılır. Michaelis sabiti K_m, reaksiyon hızının V_{max}'ın yarısı olduğu substrat konsantrasyonudur. Genelde tek substratlı biyokimyasal reaksiyonların Michaelis–Menten kinetiğine uyduğu varsayılır. V_{max} ve K_m sabitlerinin belirlenmesi için tipik yöntem, farklı substrat konsantrasyonlarında ([S]) bir seri enzim ölçümü yapılması ve reaksiyon ilk hızının (V₀) ölçülmesidir. Burada 'ilk' teriminden kasıt, reaksiyon hızının başlangıçtan sonraki nispeten kısa bir süre içinde ölçülmesidir, bu süre zarfında enzim-substrat kompleksinin oluşmuş olduğu ama substrat konsantrasyonunun yaklaşık

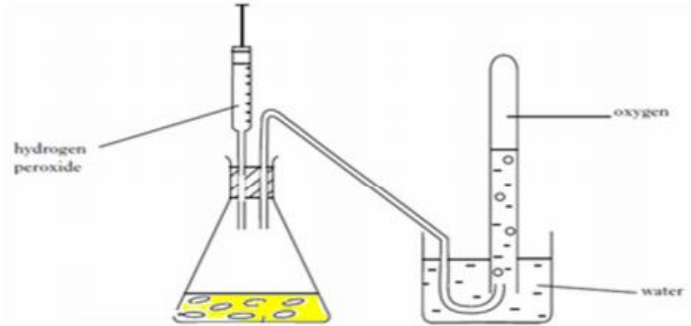
sabit olduğu ve dolayısıyla denge veya kararlı hal yaklaşımının geçerli olduğu varsayılır. Reaksiyon hızını konsantrasyona göre grafiğe geçirilince ve Michaelis-Menten denklemi ile doğrusal olmayan regresyon yapılarak K_m ve V_{max} parametreleri elde edilebilir. Bununla birlikte parametrelerin bulunmasında daha kesin bir yöntem lineerleştirilmiş Michaelis-Menten denklemini kullanmaktır. Farklı lineerleştirme yöntemleri olsa da en yaygın kullanılan yöntem Eşitlik 2’de verilen Lineweaver– Burk eşitliğidir [3].

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

Bu deneyde maya içerisinde bulunan katalaz enziminin kinetiği üzerinde çalışılacaktır. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijen oluşumunu sağlar.



Deney Düzenegi:



Şekil 1. Deney düzenegi

Deneyin Yapılışı:

1. Beherde 6 g maya/500 mL su karışımı hazırlanır.
2. Substrat olarak kullanılacak %3, %2, %1,5, %1 ve %0,5 derişime sahip H_2O_2 çözeltileri hazırlanır.
3. 80 mL maya karışımından alınarak erlene aktarılır ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilir.
4. 20 mL H_2O_2 çözeltilisi alınarak maya karışımının üzerine eklenir ve kronometre başlatılır.
5. 5 saniyede bir açığa çıkan O_2 hacmi okunarak not edilir.

Veriler ve Hesaplamalar:

1. Deney sırasında okunan O₂ hacimleri Tablo 1’de sunulur.

Tablo 1. Deneysel sonuçlar

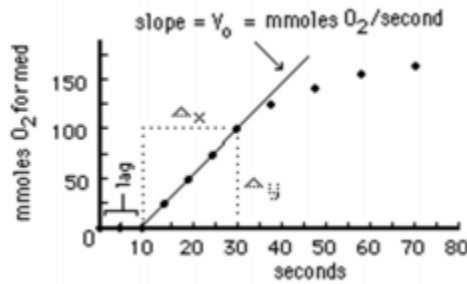
Süre (s)	O ₂ hacmi (mL)				
	%3	%2	%1,5	%1	%0,5

2. İdeal gaz yasası kullanılarak oluşan gazın molü hesaplanır ve Tablo 2’de sunulur.

Tablo 2. Reaksiyon sonunda açığa çıkan O₂ miktarları

Süre (s)	O ₂ molü (mmol)				
	%3	%2	%1,5	%1	%0,5

3. Her bir substrat derişimi için oluşan O₂’nin zamana bağlı değişimi Şekil 2’deki gibi grafikte gösterilir.



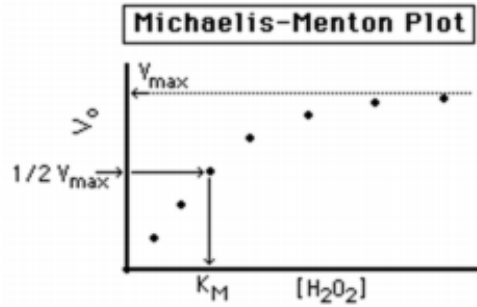
Şekil 2. O₂ konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi

4. Çizilen grafiklerden her bir substrat derişimi için ilk hız (V₀) değerleri hesaplanarak Tablo 3’de sunulur.

Tablo 3. Farklı substrat konsantrasyonlarına karşılık hız değerleri

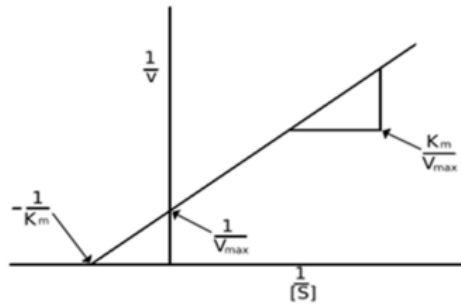
[S], H ₂ O ₂ kons.	V ₀ , Hız	1/[S]	1/V ₀

5. Substrat konsantrasyonlarına karşılık ilk hız değerleri Şekil 3'deki gibi grafikte gösterilir. K_m ve V_{max} hesaplanır.



Şekil 3. İlk hızların konsantrasyona bağlı değişimi ve K_m - V_{max} hesabı

6. Lineweaver-Burk Grafiği çizilir. K_m ve V_{max} hesaplanır.



Şekil 4. Lineweaver-Burk grafiği ile K_m - V_{max} hesabı

NOT: Deneye gelirken kuru maya getirmeyi unutmayınız!

Kaynaklar:

1. Peter N. Campbell and Anthony D. Smith, Biochemistry Illustrated An Illustrated Summary of the Subject for Medical and Other Students of Biochemistry, 3rd edition, Chapter 3: Structure and Function of Enzymes.
2. H.Scott Fogler, Temel Kimyasal Tepkime Mühendisliği, Çeviri; Prof. Dr. Satılmış Basan, Bölüm 7: Enzimatik Tepkimelerin Temelleri.
3. Pamela C. Champe and Richard A. Harvey, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 2nd edition, Chapter 4: Enzymes.