

BİYOKİMYA UYGULAMA LABORATUVARLARINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

- 1-Laboratuvarlarda mutlaka beyaz önlükle çalışılmalıdır. Saçlar kısa ya da uzun ise arkadan toplanmış olmalıdır. Tırnaklar kısa olmalıdır. Elde yara kesiği varsa su geçirmez bant ile kapatılmalıdır.
- 2-Temizliğe ve laboratuvar düzenine uyulmalıdır. Kullanılan malzeme tekrar yerli yerine yerleştirilmelidir.
- 3-Hiçbir kimyasal maddeye elle dokunulmamalı ve koklanmamalıdır.
- 4-Ayıraç şişeleri sürekli kapalı tutulmalıdır.
- 5-Yeni hazırlanan reaktiflerin üzerine etiketleme yaparak hazırlama tarihi, hazırlayanın adı-soyadı ve biliniyorsa son kullanma tarihi yazılmalıdır.
- 6-Reaktifler ve kimyasal maddeler uygun şartlarda saklanmalıdır.
- 7-Bozulan ve son kullanma tarihi geçen reaktifler kullanılmamalıdır.
- 8-Çalışma sırasında kirli ve temiz maddeler birbirine karıştırılmamalıdır.
- 9-Bütün çalışmalarda distile su kullanılmalıdır.
- 10-Her çalışmadan sonra eller sabunlu su ile yıkanmalıdır.
- 11-Yanıcı ve tahriş edici maddelerin cilt ile temasında gecikmeden bol su ile yıkayıp görevlilere haber verilmelidir.
- 12-Laboratuvar ortamında sigara içilmemeli, herhangi bir şey yenilmemelidir.
- 13-Laboratuvar ortamında son derece sakın ve sessiz çalışılmalıdır.
- 14-Malzeme ve cihazlar kullanılırken son derece özen gösterilmeli; her bir cihaz usulüne uygun tarzda dikkatlice kullanılmalıdır.
- 15-Çalışma sırasında laubali hareketlerden, gürültü ve şakalaşma gibi tavırlardan kaçınılmalıdır.
- 16- Ayıraç şişesi kullanılırken etiketli kısmı avuç içine gelecek şekilde tutulmalı ve ayıraç şişesinin kapağı da aynı elde tutulmalı, tezgaha bırakılmamalıdır. Ayıraç 45° eğimle deney tüpüne yavaşça az miktarda (yaklaşık bir kurşun kalem kalınlığında) alınmalıdır. Yanlışlıkla fazla alınan ayıraç kesinlikle ayıraç şişesine boşaltılmamalıdır. Fazla alınan ayıracı arkadaşımızla paylaşabiliriz.
- 17- Deney sırasında tüpümüze alınan ayıraçların toplam miktarı tüpün 1/3'ünü geçmemelidir. Aksi taktirde kaynatma ve karıştırma işlemlerinde kazalara yol açabilir.
- 18- Yanıcı ve kendiliğinden tutuşabilen alkol, eter ve kloroform gibi ayıraçların bulunduğu şişeler hiçbir zaman yanan bunzen bekin yanında bulundurulmamalı ve açılmamalıdır.
- 19- Yoğun asit ve alkalilerin üzerine hiçbir zaman su ilave edilmez. Önce bir miktar su alınmalı ve daha sonra asit ya da alkali ilave edilmelidir. Aksi taktirde sıçrama ve aşırı ısınmaya bağlı patlama gelişebilir.
- 20- Deney tüpüyle çıplak ateşte kaynatma işlemi yapılacaksa, mutlaka maşa kullanılmalı ve deney tüpü aleve 45° eğimle tutulmalıdır. Tüp, ara sıra alevden uzaklaştırılarak karıştırılmalıdır. Direkt tüpün dip kısmından ısıtılırsa ani sıçrama ve patlama oluşabilir. Ayrıca kaynatma sırasında deney tüpünün ağız kısmını daima boşluğa doğru çevirmeliyiz. Kendimize ya da arkadaşlarımıza doğru kaynatma işlemini yaparsak ani sıçramalardan dolayı kazalar meydana gelebilir.
- 21- Beklerin alevi soluk mavi renkli olmalıdır. Bekin hava alan kısmı kapalıysa bu alev parlak kırmızı olur ve deney tüplerinde is oluşturur. Deney sonrası beklerin vanaları kapatılarak laboratuvar terk edilmelidir.
- 22- Deney sonrası tüplerdeki ayıraçlar kesinlikle direkt lavabolara dökülmemelidir. Önce musluk açılmalı ve bol su ile birlikte atıklar yavaşça lavaboya dökülmelidir. Deney tüpleri fırça ve deterjanla temizlenmeli, durulanmalı ve ters vaziyette tüp sporuna yerleştirilmelidir. Tezgahlar silinmeli ve eller sabunlanarak laboratuvar terk edilmelidir.
- 23- Deney sonuçları düzenli olarak laboratuvar defterine kaydedilmeli ve kitap bilgileriyle karşılaştırılarak pekiştirilmelidir.

LABORATUVAR KAZALARINDA İLK YARDIM

Kimyasal maddelerin yutulması veya dökülüp deri ile teması gibi olası laboratuvar kazalarında, soğukkanlı davranılarak laboratuvar sorumlusuna durum hemen bildirilmeli ve aşağıdaki önlemler alınmalıdır:

a) Asit yanıkları: Asitlerin ele dökülmesi veya yüze sıçraması durumunda, asitin sıçradığı yer önce bol su ile yıkanmalı, sonra bikarbonat çözeltisi ile, daha sonra yeniden bol su ile yıkanmalıdır. Asitlerin göze sıçraması durumunda da göz bol su ile yıkanmalı, sonra %1'lik sodyum bikarbonat çözeltisi ile banyo yaptırılmalı ve mutlaka göz doktoruna başvurulmalıdır.

b) Baz yanıkları: Bazların neden olduğu yanıklarda yanan yer önce bol su, sonra %1'lik asetik asit çözeltisi ve sonra yeniden bol su ile yıkanmalıdır.

c) Brom yanıkları: Önce seyreltik amonyakla, sonra da alkolle veya benzenle yıkanıp bağlanır.

d) Fosfor yanıkları: Önce %1'lik bakır sülfat çözeltisi ile yıkanmalı ve sürekli değiştirilen %1'lik bakır sülfat çözeltisi emdirilmiş sargı bezi ile ıslatılmalıdır.

e) Yutulan maddelerle olan zehirlenmeler: Eğer asit yutulmuş ise, önce bol su sonra magnezya sütü veya sodyum bikarbonat (ya da soda) çözeltisi içirilmelidir. Yutulan baz ise önce bol su, sonra sirke (ya da %1'lik asetik asit çözeltisi) veya limon suyu (yada sitrik asit çözeltisi) içirilmelidir. Yutulan madde bir ağır metal tuzu ise süt veya yumurta akı içirilmelidir. Arsenik, antimon, bakır, kurşun, civa, gümüş, veya diğer metaller yutulmuşsa tuzlu su gibi kusturucular kullanılarak mide boşaltılır. Yutulan maddelerden zehirlenme söz konusu ise hemen %5'lik bakır sülfat çözeltisi içirilmelidir. Kusturma şiddeti çok yüksek olan bu çözelti ile zehirli madde hemen mideden atılır.

Deneyler sırasında kullanılan kimyasal maddelere ait tehlike ve risk işaretlerine dikkat edilmelidir. Belli başlı tehlike işaretleri aşağıdaki gibidir:

KİMYASAL MADDELERE AİT ETİKETLERDEKİ TEHLİKE VE RİSK İŞARETLERİ

Eski Etiket

Tehlike İbaresesi

Risk ve Güvenlik İfadeleri (R- / S- ifadeleri)

Tehlike Sembolü

Yeni Etiket

Uyarı İbaresesi

Risk Piktogramları

Risk ve Önlem Durumları (H- / P- durumları)

Eski Etiket Tehlike Sembolleri (Tehlikeli Kimyasallar Yönetmeliği)

Tehlike İbaresesi	Referans Harf	Sembol
Patlayıcı	E	
Çok kolay alevlenir	F+	
Kolay alevlenir	F	
Oksitleyici	O	
-	-	-
Aşındırıcı	C	
Çok toksik	T+	
Toksik	T	
Zararlı	Xn	
Tahriş edici	Xi	
-	-	-
Çevre için tehlikeli	-	
-	-	-

Yeni Etiket Risk Piktogramları (EU GHS Düzenlemeleri)

Risk Kategorileri	Uyarı İbaresesi	Risk Piktogramı
Patlayıcı	Tehlike Uyarı	
Alevlenir sıvılar	Tehlike Uyarı	
Oksitleyici sıvılar	Tehlike Uyarı	
Basınç altındaki gazlar, Sıkıştırılmış gazlar	Uyarı	
Cildi tahriş edici	Tehlike Uyarı	
Metal aşındırıcı	Tehlike Uyarı	
Akut zehirlilik	Tehlike Uyarı	
Akut zehirlilik	Uyarı Uyarı	
Cildi tahriş edici	Uyarı Uyarı	
Karsinojenlik	Tehlike Uyarı	
Sucul çevre için zararlı	Uyarı	
Ozon tabakası için zararlı	Tehlike	Piktogram Yok

BİYOKİMYA LABORATUVARINDA KULLANILAN BAŞLICA ARAÇ VE GEREÇLER

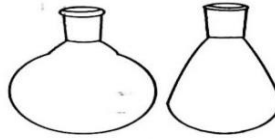
Beher : Katı ve ve sıvı kimyasalların deney ortamına aktarılmasında ve birçok laboratuar işleminde kullanılan kaba dereceli cam kaplardır.



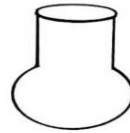
Erlen: Çözeltilerin karıştırılmasında ve titrasyon işlemlerinde kullanılan kaba dereceli cam kaplardır.



Balon: Karıştırma, kaynatma ve distilasyon işlemlerinde kullanılan kaba dereceli cam kaplardır.



Yuvarlak ve armudi
rodajlı balonlar



Geniş ağızlı
balon

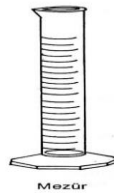


Düz dipli balon

Balon Joje: Çözelti hazırlamak için kullanılan hassas camdan yapılmış hacmi belli kaplardır.



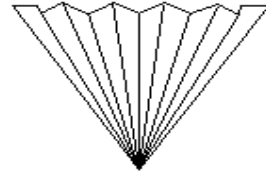
Mezür: Belli hacimde sıvıları almak ve çözelti hazırlamada kullanılan hassas dereceli silindir kaplardır.



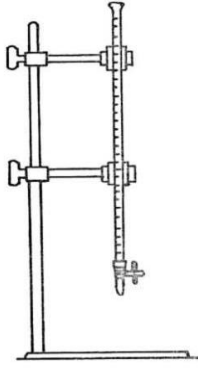
Huni ve süzgeç kağıdı: Süzgeç kağıdı ile birlikte çeşitli katı ve sıvı karışımlarının süzülmesinde kullanılan cam malzemelerdir.



Huni



Büret: Titrasyon yapmada kullanılan dereceli cam malzemedir.



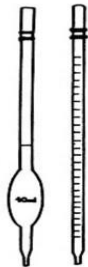
Spor büret
kıskaçı, Büret



Demir spor (statif): Büret ya da diğer cam malzemeleri sabitlemede kullanılan standlardır.



Pipet: Küçük miktarlardaki sıvıları almak için kullanılan dereceli cam malzemelerdir.



Pipetler



Puar (üç yollu): Pipet yardımıyla sıvı çekmek için kullanılır.



Otomatik pipet: Küçük hacimlerde sıvıları çekmek için hassas analizlerde kullanılan sabit, ya da ayarlanabilir hacimli pipetlerdir.



Tüp Sporu: Deney tüplerinin yerleştirildiği standlardır.



Piset: Deneylerde kullanılan saf suyun az miktarlarda ilave edilmesinde ve çözelti hazırlarken çözeltinin istenilen hacme tamamlanması işlemlerinde kullanılan plastik malzemelerdir.



Deney ve santrifüj tüpleri: Deneyleri yapmada ve santrifüj işlemlerinde kullanılan çeşitli hacimlerde (kısa ve uzun) tüplerdir.

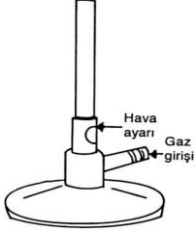


Vida kapaklı tüp düz deney tüpü konik tabanlı santrifüj tüpü Eppendorf tüpü

Reaktif Şişeleri: Ayıraçları saklamada kullanılan dayanıklı camdan yapılmış kapaklı şişelerdir. Beyaz ve amber renkli olanları, vida kapaklı otoklavlananları ve damlalıklı olanları vardır.



Bunzen Beki: Laboratuvaradaki ısıtma ve kaynatma işlemlerinde kullanılır.



Amyant Tel: Isıtma işlemlerinde bek üzerine konulan ısıyın eşit dağılmasını sağlayan tellerdir.



Amyant tel



kil üçgen (ısıtmada kullanılır.)

Spatül: Katı kimyasalları tartım için aktarmada kullanılır.



Pastör Pipeti: Cam ya da plastikten yapılan, küçük hacimlerde sıvıları aktarmada kullanılır.



Baget: Karıştırma işlemlerinde kullanılan cam çubuklardır.



Havan: Katı maddeleri birbirine karıştırmada ve parçalama işlerinde kullanılır.



Manyetik Balık: Çözelti hazırlamada kullanılan mıknatıstan yapılan karıştırma işlemlerinde kullanılan malzemedir.



Parafilm: Tüplerin, ya da ağzı açık diğer cam malzemelerin ağzını kapatmada kullanılan esnek bir malzemedir.



Tüp, şişe ve büret fırçası: Cam malzemelerin temizlenmesinde kullanılır.



BİYOKİMYADA SIKÇA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Çözücü (solvent) denen dağıtıcı bir faz ile bir veya birçok dağıtılmış fazdan (çözünen, solüt) oluşan sıvı karışıma **çözelti (solüsyon)** denir. Çözünen madde konsantrasyonuna göre çözeltiler üç gruba ayrılır:

1) Dilüe çözeltiler (seyreltik çözeltiler): Çözünmüş madde miktarının az olduğu çözeltilerdir (konsantrasyonu düşük çözeltiler).

2) Konsantre çözeltiler (derişik çözeltiler): Çözünmüş madde miktarının fazla olduğu çözeltilerdir (konsantrasyonu yüksek çözeltiler).

3) Doymuş çözeltiler (satüre çözeltiler): Çözünmüş madde miktarının maksimum olduğu çözeltilerdir. Bir çözeltinin konsantrasyonu, çözeltinin belirli bir hacmi içinde çözünmüş olan madde (substrat) miktarıdır. Çözelti konsantrasyonu ifade etmek için yüzde(%) molarite(M), normalite(N) gibi ifadeler kullanılır.

YÜZDE ÇÖZELTİLER

Yüzde çözeltiler ağırlık/hacim, hacim/hacim ve ağırlık/ağırlık diye 3 gruba ayrılır.

1-Ağırlık (weight)/hacim (volüm) (w/v): Bu tip çözeltiyi hazırlarken katı kimyasaldan gr cinsinden tartılır ve distile su ile son hacme tamamlanır.

Ör: 500ml % 5 NaOH çözeltisini hazırlayınız?

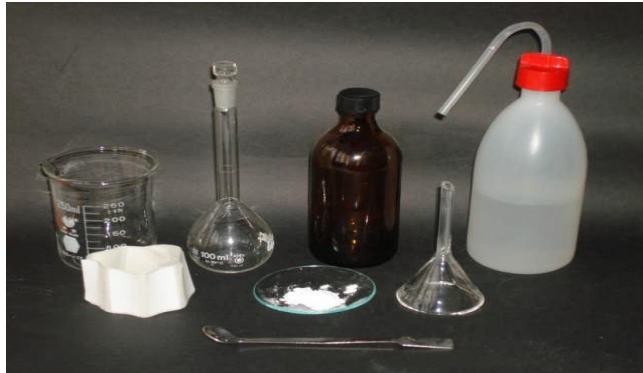
5gr NaOH 100ml hacme d.su ile tamamlanırsa %5'lik NaOH hazırlanır,

X gr NaOH 500 ml

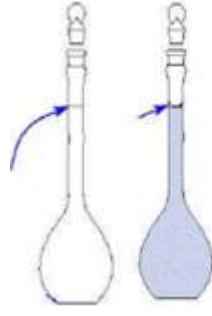
X= $\frac{500 \times 5}{100}$ = 25 gr NaOH tartılır.

100

500 ml'lik balon jojeye bir miktar distile su konur ve üzerine 25 gr NaOH ilave edilir ve d. su ile 500ml çizgisine kadar tamamlanır. Balon jojenin ağzı kapatılır ve karıştırılır. (Resim1, 2, 3 ve 4). Daha sonra reaktif şişesine boşaltılır, üzeri etiketlenir (%5 NaOH, tarih ve isim yazılır) ve buzdolabında saklanır.



Resim 1. Çözelti hazırlamada kullanılan malzemeler



Göz hizasında, sıvı seviyesi berrak çözeltilerde menisküsün altında, renkli çözeltilerde ise menisküsün üstünde olacak şekilde tamamlanır.

Resim 2. Balon jojede hacim tamamlama



Resim 3. Balon jojenin çalkalanarak çözeltinin karıştırılması



Resim 4. Çözeltinin etiketlenen ayıraç şişesine konarak saklanması.

2- Hacim (volüm)/hacim (volüm) (v/v): 100 ml çözeltide çözünen maddenin ml cinsinden miktarıdır. Burada **çözücü ve çözünen miktarı hacim birimleri ile** verilir. Birimi, **mililitre, litre, metreküp(m³)** vb.olabilir.

Ör: 150ml %20'lik (v/v) sulu etil alkol çözeltisi nasıl hazırlanır?

100ml çözeltide 20ml etil alkol varsa

150ml çözeltide X? ml etil alkol olur

X= $\frac{150 \times 20}{100}$ = 30ml etil alkol alınır.

100

30 ml etil alkol alınır balon jojeye aktarılır, bir miktar d. su ile karıştırılır ve son hacim 150 ml'ye tamamlanır.

Ör: İçinde hacimce % 50 etil alkol bulunan 500 ml çözelti, % 96'lık etil alkolden nasıl hazırlanır?

$$\% .V1 = \% . V2$$

$$\%50 . 500 = \%96 . X$$

X= 260,42 ml %96'lık etil alkolden alınır, balon jojeye konur ve d. su ile 500ml'ye tamamlanır.

3- Ağırlık (weight)/Ağırlık (weight) (w/w): 100 g çözeltide, çözünmüş maddenin gram cinsinden miktarıdır. Çözünen ve çözücü miktarı kütle birimleri olarak verilir. Birimi; **gram, miligram, kilogram** vb. olabilir.

Ör. 250 ml % 10'luk (w/w) KCl çözeltisi nasıl hazırlanır?

Eğer çözelti, su ile hazırlanacaksa suyun yoğunluğu ($d = 1.0 \text{ g/cm}^3$) olduğundan kütlesi hacmine eşittir. Çözünen maddeye X dersek;

100 ml KCl çözeltisi için 10g KCL gerekiyse

250 ml KCl çözeltisi için Xg KCl gerekir.

$$X = \frac{250 \times 10}{100} = 25 \text{ gr KCl tartılır.}$$

$$100$$

250-25 = 225g d. su alınır. Balon jojede 25g KCl suyun bir miktarında çözülür ve geriye kalan su ilave edilir ve karıştırılır.

MOLAR ÇÖZELTİLER

Molarite, en çok kullanılan ve hazırlanması en kolay olan derişim birimlerinden biri olmakla birlikte en önemli dezavantajı sıcaklığa bağımlı oluşudur. Sıcaklık nedeniyle sıvı hacmindeki genleşme derişimi değıştirir. Bu nedenle çözelti hazırlandıktan sonra eğer ısınma olmuşsa oda sıcaklığına kadar soğutulması ve hacim kontrolünün yapılması gerekir.

Molarite, 1 L çözeltideki mol sayısıdır.

Molaritenin ölçüm birimi mol/litre ve sembolü M'dir.

1 M çözelti deyince çözeltinin 1 litresinde 1 mol çözünen bulunduğu anlaşılır.

1 M=1 mol/L=1000 mM=1000000 µM

1 mM=1 mmol/L= 0,001 M

1µM=1 µmol/L= 0,001 mM

1 mol glukoz=180 g glukoz

1 mol NaCl=58,5 g NaCl

1mol CaCl₂=111 g CaCl₂

Ör: 500 ml 0,1 M NaOH çözeltisi hazırlamak için gerekli olan NaOH miktarını hesaplayınız ?
(NaOH M.A = 40g)

Molaritenin tanımından yola çıkarak orantı ile çözersek,

1M	1000ml (1L) NaOH hazırlamak için	40g (1 mol) NaOH gereklidir.
1M	500ml NaOH için	40/2= 20g NaOH gerekir.
0,1 M	500 ml NaOH için	20/10= 2 g NaOH gerekir.

2 gr NaOH tartılır, balon jøjeye bir miktar d. su ilave edilir, üzerine 2 gr NaOH konur ve karıştırılır. Distile su ile hacmi 500 ml'ye tamamlanır.

Ör: 250 ml 0,3 M HCl çözeltisi hazırlamak için yoğunluğu 1.19 g/cm³(g/ml) ve % 37'lik olan derişik HCl'den ne kadar alınmalıdır? Hesaplayınız. (HCl M.A. = 36,5 g)

1M	1000ml HCl asit çözeltisi hazırlamak için	36,5g (1 mol) HCl gerekir.
1M	250 ml HCl çözeltisi için	9,125g gerekir.
0,3M	250ml HCl çözeltisi için	2,74 g HCl gerekir.

HCl asit sıvı olduğı için ml olarak alabiliriz. Bu yüzden ağırlıktan hacme geçeriz;

$d = m/V$ formülünde yerine koyarsak; $1,19 = 2,74/V$ $V = 2,3\text{ml}$ HCl alırız. Fakat elimizdeki HCl %37 saflıkta olduğı için şöyle bir orantı daha yaparız;

%100 HCl olsaydı 2,3ml HCl alırdık
%37 HCL'den X ml alırız.

$X = \frac{100 \times 2,3}{37}$ X = 6,22ml HCl alınır.

Balon jojenin içine bir miktar d. su konur 6,22 ml HCl ilave edilir. Karıştırılır ve son hacim 250 ml'ye d. su ile tamamlanır. **Kesinlikle asit üzerine su ilave edilmez!**

Molar ve % konsantrasyonların birbirine çevrilmesi için aşağıdaki eşitlikten yararlanılır:

$\text{mol/L konsantrasyon} \times \text{molekül ağırlığı} = \text{g/L konsantrasyon}$

NORMAL ÇÖZELTİLER

Normalite, 1 L çözeltideki ekivalan ağırlık sayısıdır. Normalitenin ölçüm birimi Eq/litre ve sembolü N'dir. Bir başka ifadeyle normalite, bir maddenin eşdeğer gramını (maddenin mol ağırlığının veya formül ağırlığının valansına ya da etki değerine bölünmesiyle bulunur.) bir litresinde bulunduran çözeltilerdir.

Etki değeri (tesir değeri), bileşiğin asit, baz ya da tuz oluşuna göre değişir. Asitlerin değeri taşıdıkları hidrojen sayısına (HCl'de 1, H₂SO₄'de 2 gibi), bazların değeri de taşıdıkları hidroksil grubu sayısına (NaOH'de 1, Ba(OH)₂ 'de 2) göre, tuzların ise anyon ve katyonların herhangi birinin toplam yük sayısına (AlCl₃ 'de Al +3 ve Cl-3 değerlikli olduğundan tesir değeri 3'dür.) göre hesaplanır.

Ör: 0,2 N 250ml NaOH çözeltisi nasıl hazırlanır?

NaOH molekül ağırlığı =40g/mol

Tesir değeri: Asitlerde proton (H⁺) sayısı, bazlarda (OH⁻) iyonu sayısı ve tuzlarda pozitif yüklü iyon sayısı. Buna göre,

NaOH'ın tesir değeri=1'dir.

Eşdeğer-gram sayısı (veya ekivalent) = mol ağırlığı /tesir değeri = 40/1 = 40g

40g NaOH alınıp 1 litre çözeltide çözünseydi bu çözelti 1 N'lik olurdu. 0,2 N için, 0,2x40=8g NaOH gerekirdi, fakat 250ml'lik çözelti olduğu için;

1000ml için 8g NaOH gerekiyorsa

250ml için X gr NaOH gerekir.

X=2g NaOH alınıp 250ml'lik bir balon jodede bir miktar d. suda çözülür ve 250ml'ye tamamlanır.

Ör: 250ml 0,1N H₂SO₄ çözeltisi nasıl hazırlanır? (d= 1,84g/ml, %98, M.A= 98g)

H₂SO₄ 'ün Eşdeğer gramı = 98 (Molekül ağırlığı) / 2 (tesir değeri) = 49g

1N 1000ml H₂SO₄ çözeltisi için 49g H₂SO₄ gereklidir.

1N 250ml H₂SO₄ çözeltisi için 12,25g H₂SO₄ gereklidir.

0,1 N 250ml H₂SO₄ çözeltisi için 1,225g H₂SO₄ gereklidir.

H₂SO₄ sıvı olduğundan, d= m/V 1,84g/ml = 1,225g/V V= 0,665 ml H₂SO₄ alınır. Fakat elimizdeki H₂SO₄ çözeltisi %98'lik olduğundan,

%100 H₂SO₄'den 0,665ml alırsak

%98'lik H₂SO₄'den X ml alırız.

X= 100 x 0,665/ 98 X= 0,68ml H₂SO₄ alınır. Balon jojeye bir miktar d. su ilave edilir ve 0,68ml H₂SO₄ ilave edilir ve hacim 250 ml'ye tamamlanır.

ÇÖZELTİLERİN SEYRELTİLMELERİ VE ÇÖZELTİ KARIŞIMLARI

Seyreltilen çözeltilerin ilk volüm(V_1), ilk konsantrasyon(C_1), seyreltikten sonraki volüm(V_2) ve seyreltikten sonraki konsantrasyon(C_2)'ları arasında, $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ şeklinde bir bağıntı vardır. Konsantre bir çözeltilerden belli volümde ve belli konsantrasyonda seyreltik çözeltilerin hazırlanması için konsantre çözeltilerden alınacak miktarı hesaplamada bu bağıntı kullanılır.

Örnek: % 98'lik alkol ile 250 mL % 70'lik alkol çözeltisi hazırlamak için,

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 98 = 250 \times 70$$

$$V_1 = 2507098x$$

$V_1 = 178,57$ mL % 98'lik alkol alınır ve toplam volüm 250 mL olacak şekilde distile su ile karıştırılır.

Bir maddenin volümü V_1 ve konsantrasyonu C_1 olan çözeltisi ile volümü V_2 ve konsantrasyonu C_2 olan çözeltisi karıştırıldığında da karışımın volümü(V_{1+2}) ve konsantrasyonu(C_{1+2}) ile karışımı oluşturan çözeltilerin volüm ve konsantrasyonları arasında $(V_{1+2}) \times (C_{1+2}) = V_1 \times C_1 + V_2 \times C_2$ şeklinde bir bağıntı vardır.

Örnek: 200 ml 0,2 M ve 300 ml 0,5 M NaOHçözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilen yeni çözeltinin molaritesi nedir?

$$V_1 M_1 + V_2 M_2 = V_T M_T$$

$$200 \times 0,2 + 300 \times 0,5 = (200 + 300) \times M_T$$

$$M_T = 0,38M$$

Örnek: 200 ml 0,3 M HClçözeltilisini 0,5 M yapabilmek için 1 M'lık asit çözeltisinden ne kadar eklenmelidir?

Bu sorunun çözümü için çözelti formüllerinden yararlanılabilir.

$$M_1V_1 + M_2V_2 = M_TV_T$$

$$M_1 = 0,3 \text{ M } V_1 = 200 \text{ ml } M_2 = 1,0 \text{ M } V_2 = ?$$

$$0,3 \times 200 + 1,0 \times V_2 = 0,5 (200 + V_2)$$

$$60 + V_2 = 100 + 0,5 V_2$$

$$V_2 - 0,5 V_2 = 100 - 60$$

$$0,5 V_2 = 40$$

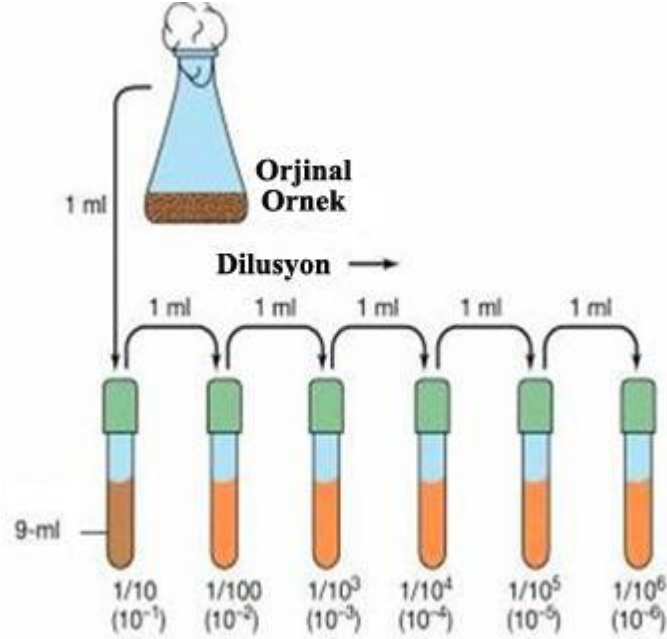
$$V_2 = 80 \text{ ml}$$

O halde 200 ml'lik 0,3 M HClçözeltilisine 1,0 M HCl çözeltisinden 80 ml eklenirse elde edilen çözelti 0,5 molar ve eldeki çözeltinin toplam hacmi 280 ml olur.

SERİ DİLÜSYONLAR

Bir çözeltinin 1/2 oranında seyreltilmesi deyince 1 volüm çözelti ile 1 volüm seyreltme sıvısının karıştırılacağı anlaşılır; 1 volüm çözelti ile 2 volüm seyreltme sıvısının karıştırılması, 1/3 oranında seyreltme demektir. Seyreltme sıvısı genellikle sudur ve bu nedenle **seyreltme** işlemleri genellikle **sulandırma** veya **dilüsyon** olarak adlandırılırlar; seyreltme sıvısı da **dilüent** olarak adlandırılır.

Seri dilüsyonlarda her dilüsyondan sonra elde edilen yeni çözelti tekrar dilüe edilir ve bu işlem ardı ardına tekrarlanabilir. Örneğin; 0,5 mL serumun 0,5 mL fizyolojik NaCl çözeltisi ile karıştırılmasıyla serum 1/2 oranında dilüe edilmiş olur. 1/2 oranında dilüe serumdan 0,5 mL alıp 0,5 mL fizyolojik NaCl çözeltisi ile karışırsak tekrar 1/2 oranında dilüsyon yapmış oluruz. Art arda iki defa 1/2 oranında dilüsyon, toplam olarak $1/2 \times 1/2 = 1/4$ oranında dilüsyon demektir.



Orijinal örnekten seri dilüsyonların hazırlanması

KONSANTRASYONLARA HİDRASYON SUYUNUN ETKİSİ

Kristal şeklindeki bileşiklerde moleküle bağlı su, **hidrasyon suyu** olarak bilinir. Katı maddelerin çözeltilerini hazırlarken yapılacak hesaplamalarda kullanılan formüller, hidrasyon suyu olmayan maddelere göre yazılmıştır. Hidrasyon suyu olan kristal şeklindeki katı maddelerin çözeltilerini hazırlarken, formülle maddenin susuz haline göre gerekli miktarı bulduktan sonra, basit orantı ile kullanılacak kristalli hal için gerekli miktarı hesaplamak gerekir. Örneğin; 250 mL %10'luk CuSO_4 çözeltisini hidrasyon suyu olmayan bakır sülfattan (CuSO_4 , molekül ağırlığı 160) değil de 1 molekül hidrasyon suyu olan bakır sülfattan ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, molekül ağırlığı 178) ile hazırlayacaksak tartacağımız $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ miktarı,

İstenen konsantrasyon(%) / 100 x istenen volüm(mL) = g tartılacak solüt miktarı formülüne göre bulacağımız $10 / 100 \times 250 = 25$ g değildir;

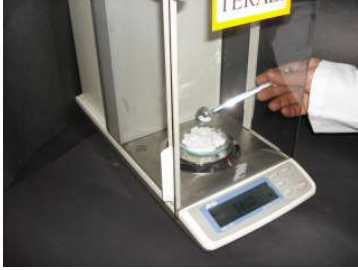
160 g CuSO_4 'ten 25 g almamız gerekirse

178 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'dan X = ? g gerekir basit orantısına göre

$$X = 178 \times 25 / 160$$

$$X = 27,81 \text{ g'dır.}$$

Şekillerle Çözelti Hazırlama Aşamaları



1-Çözünen maddenin tartımı



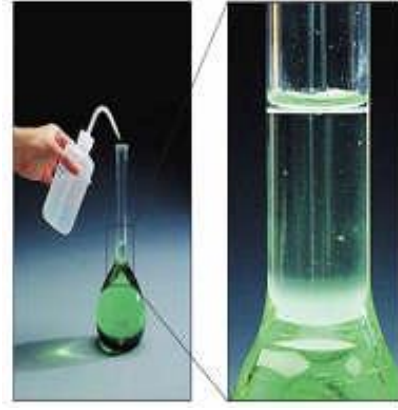
2- Balon joje, piset alınır.



3-Tartılan madde balon jojeye aktarılır.



4- Maddenin balon jojede çözdürülmesi.



5- Çözeltinin son hacminin tamamlanması



6-Çözeltinin reaktif şişesine aktarımı ve etiketlenmesi

Kimyasal maddeler

Bazı elementler A. No	Element adı	Sembol	Atom Ağ.	Değerlik
1	Hidrojen	H	1,008	+1
2	Helium	He	4,003	0
3	Lityum	Li	6,941	+1
6	Karbon	C	12,01	+2; +4; -4
7	Azot	N	14,01	+2; +3; +4; +5; -3
8	Oksijen	O	16,00	-2
9	Flüor	F	19,00	-1
11	Sodyum	Na	22,99	+1
12	Magnezyum	Mg	24,31	+2
13	Alüminyum	Al	26,98	+3
14	Silisyum	Si	28,09	+4
15	Fosfor	P	30,97	+3; +4; +5; -3
16	Kükürt	S	32,06	+2; +4; +6; -2
17	Klor	Cl	35,45	+1; +3; +5; +7; -1
19	Potasyum	K	39,10	+1
20	Kalsiyum	Ca	40,08	+2
23	Vanadyum	V	50,94	+2; +3; +4; +5
24	Krom	Cr	52,00	+2; +3; +6
25	Manganez	Mn	54,94	+2; +3; +4; +6; +7
26	Demir	Fe	55,85	+2; +3
27	Kobalt	Co	58,93	+2; +3
28	Nikel	Ni	58,70	+2; +3
29	Bakır	Cu	63,55	+1; +2
30	Çinko	Zn	65,38	+2
33	Arsenik	As	74,92	+3; +5; -3
34	Selenyum	Se	78,96	+4; +6; -2
35	Brom	Br	79,90	+1; +5; -1
42	Molibden	Mo	95,94	+2; +3; +4; +5; +6
47	Gümüş	Ag	107,87	+1
48	Kadmiyum	Cd	112,41	+2
50	Kalay	Sn	118,7	+2; +4
51	Antimon	Sb	121,75	+3; +5; -3
53	İyot	I	126,9	+1; +5; +7; -1
56	Baryum	Ba	137,3	+2
74	Wolfram	W	183,8	+6
76	Osmium	Os	190,2	+2; +3; +4; +6
78	Platinum	Pt	195,09	+2; +4
79	Altın	Au	196,97	+1; +3
80	Cıva	Hg	200,6	+1; +2
82	Kurşun	Pb	207,2	+2; +4
83	Bizmut	Bi	208,98	+3; +5
84	Polonyum	Po	209	+2; +4
88	Radyum	Ra	226,03	+2
92	Uranyum	U	238,03	+3; +4; +5; +6

Ölçü birimleri

Metrik sistemde birimler Nicelik

Volüm(Hacim)

Birim

Litre

Birim sembolü

L

Kütle

gram

g

Uzunluk

metre

m

Ölçü birimlerinin önüne gelebilen önekler

Önek adı

BİRİM

Sembol

10'un kuvveti olarak
değer

Giga

G

10^9

Mega

M

10^6

Kilo

k

10^3

Hekto

h

10^2

Deka

da

10^1

Desi

d

10^{-1}

Santi

c

10^{-2}

Mili

m

10^{-3}

Mikro

μ

10^{-6}

Nano

n

10^{-9}

Piko

p

10^{-12}

Femto

f

10^{-15}

mmol = milimol (10^{-3} mol)

μ mol = mikromol (10^{-6} mol)

nmol = nanomol (10^{-9} mol)

pmol = pikomol (10^{-12} mol)

eq = equivalent (maddenin molekül ağırlığının tesir değerliğine bölünmesiyle elde edilir.

Meq = miliequivalent (10^{-3} eq)

M = molarite

N = normalite

Ppm: parts per million (milyonda bir). Bir litrede veya kg da erimiş mg madde miktarıdır.

Ppb: parts per billion (milyarda bir). Bir litrede veya bir kiloda erimiş μ g madde miktarıdır.

Örneğin bazı element ve bileşiklerin gram olarak ekivalan ağırlıkları şöyledir:

Madde	Moleküler ağırlık (gram)	Valans	Ekivalan ağırlık (gram)
HCl	36,46	1	36,46
H ₂ SO ₄	98,08	2	49,04
H ₃ PO ₄	98,00	3	32,67
NaOH	40,00	1	40,00
Na ₂ CO ₃	106,00	2	53,00
NaCl	58,45	1	58,45
CuSO ₄	160,00	2	80,00
CaCl ₂	111,00	2	55,50
Na ⁺	22,99	1	22,99
K ⁺	39,10	1	39,10
Cl ⁻	35,45	1	35,45
Ca ²⁺	40,08	2	20,04
Mg ²⁺	24,31	2	12,155

ASİT-BAZ TİTRASYONU

Amaç: Volümetrik metot kullanarak, konsantrasyonu bilinmeyen asit ya da çözeltisinin konsantrasyonunun tayin edilmesidir.

Prensip: Genel olarak titrasyon adı verilen volümetrik yöntemle, konsantrasyonu kesin olarak bilinen bir çözelti (standart çözelti) ile bilinmeyen bir çözeltinin tamamen tepkimeye girmesi sonucu, bilinmeyen çözeltinin konsantrasyonunun bulunmasıdır.

Titrasyon: Konsantrasyonu bilinen bir çözelti (standart çözelti) ile bilinmeyen madde miktarının eşdeğerlik noktasına kadar karışımını sağlayarak, harcanan standart çözelti miktarından, bilinmeyen madde konsantrasyonunun bulunması yöntemidir. Titrasyon işlemi dönüm noktasına kadar devam eder.

Normalite: Bir litre çözeltide çözünmüş olan maddenin eşdeğer gram sayısıdır. Normalite, titrimetrik analizlerde kullanılan en uygun konsantrasyon birimidir.

Eşdeğerlik Noktası: Standart çözelti ile konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin eşdeğer gram sayılarının teorik olarak eşlendiği hacim oranlarıdır.

Titrasyon sırasında çözeltideki bazı fiziksel değişmelerin gözlenmesiyle deneysel olarak eşdeğerlik noktasına erişildiği tahmin edilir. Bu fiziksel değişmeler, titrasyonun tam dönüm noktasında

kendilerini göstermelidirler. Eşdeğerlik noktası ile dönüm noktası arasındaki standart çözelti hacim farkının çok küçük olması istenir.

Dönüm Noktası: Titrasyon esnasında, titrasyonun nötralize olduğu devredir. Yani, standart çözelti ile bilinmeyen çözelti arasında nötralizasyonun olduğu noktadır. Dönüm noktası indikatörler yardımıyla belirlenir.

Asit-Baz Titrasyonunda dönüm noktasında,

Eşdeğer gram asit = Eşdeğer gram baz

$$V_{\text{asit}} \times N_{\text{asit}} = V_{\text{baz}} \times N_{\text{baz}}$$

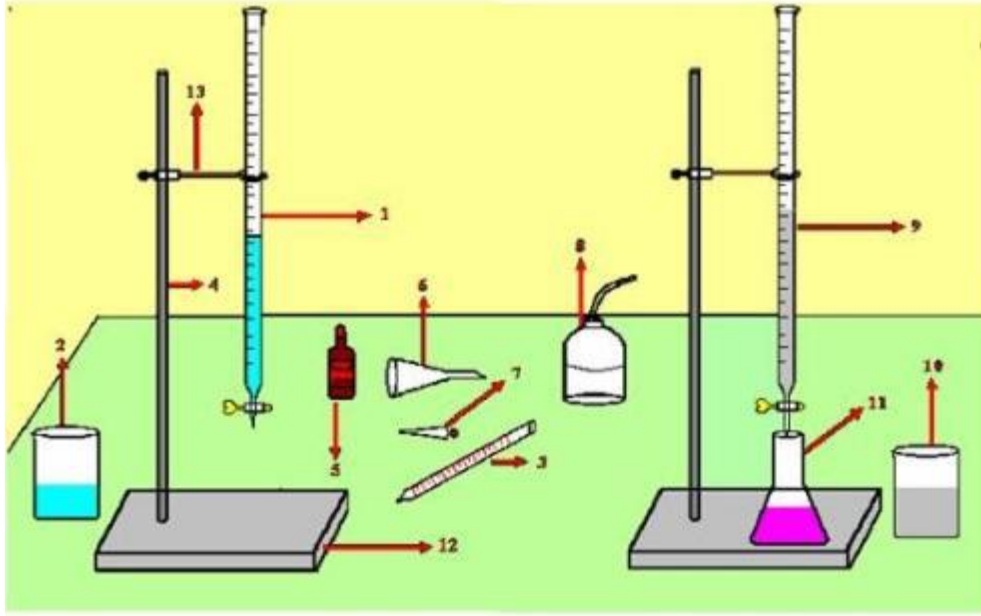
V= Asit veya bazın hacmi

N= asit veya bazın normalitesi

Asit-baz titrasyonda dönüm noktası indikatör adı verilen ve ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonuna göre renk değiştiren organik bileşikler kullanılarak gözlenir. Genellikle yüksek molekül ağırlığında bulunan kompleks organik bileşikler olan asit-baz indikatörleri, belirli pH aralıklarında renk değişimi gösterirler. Bazı indikatörler ve pH aralıkları aşağıdaki gibidir:

İndikatör	Renk Değişimi	Renk Değişiminin Gözlendiği pH Aralığı
Timol Mavisi	Kırmızı-Sarı	1,2-2,8
Bromofenol Mavisi	Sarı-Mavi	3,0-4,6
Kongo Kırmızısı	Mavi-Kırmızı	3,0-5,0
Metil Oranj	Kırmızı-Sarı	3,2-4,4
Bromokrezol Yeşili	Sarı-Mavi	3,8-5,4
Metil Kırmızısı	Kırmızı-Sarı	4,8-6,0
Bromotimol Mavisi	Sarı-Mavi	6,0-7,6
Turnusol	Kırmızı-Mavi	7,0
Krezol Kırmızısı	Sarı-Kırmızı	7,0-8,8
Timol Mavisi	Sarı-Mavi	8,0-9,6
Fenolftalein	Renksiz-Pembe	8,2-10,0
Alizarin Sarısı	Renksiz-Kırmızı	10,1-12,0

Deneyin Yapılışı:



Yukardaki gibi deney düzeneği kurulur. Büret (50ml), huni, erlen (250ml), pastör pipeti, indikatör, distile su, pipet, asit ve baz solüsyonları titrasyon işeminde kullanılır.

I.Kısım

Genellikle derişimi bilinmeyen çözelti erlene konur. Konsantrasyonu bilinen çözelti ise bürete doldurulur.

1- Büret, büret tutacağına sabitlenir. Konsantrasyonu bilinen standart asit çözeltisi büretin 0 (sıfır) çizgisine kadar doldurulur.

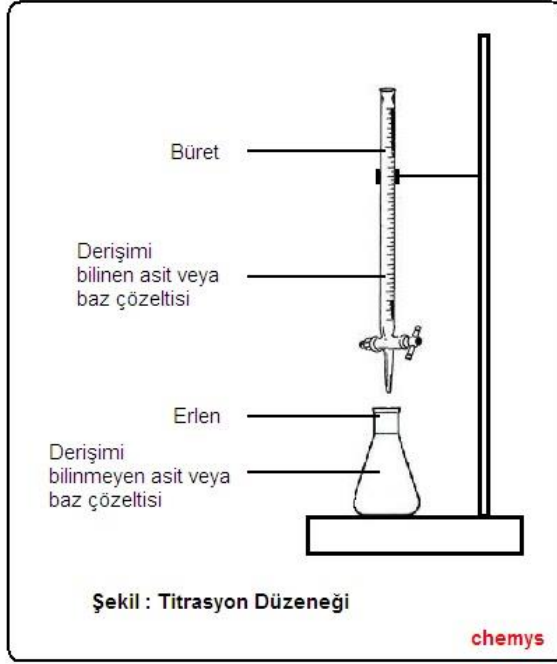
2- Konsantrasyonu bilinmeyen baz çözeltisinden 10ml alınarak bir erlene konur. Üzerine 25ml distile su ilave edilir ve 2-3 damla fenolftalein indikatörü damlatılır. Çözeltinin rengi pembe olur.

3- Sağ el ile erlen, sol el ile büret musluğu tutularak titrasyona başlanır. Büretten damlalar boşaltılırken, erlen süratle çalkalanarak, asit ve bazın tepkimeye girmesi hızlandırılır.

4- Dönüm noktasına yaklaştıkça, titrasyonun hızı yavaşlatılır. Standart asit çözeltisinin baz çözeltisi ile karıştığı noktada, indikatörün pembe rengi renksizleşmeye başlar. Ancak çalkalama ile tekrar pembe olur.

5- Tam dönüm noktasında ise tamamen renksizleşir ve bu noktada titrasyona son verilir. Renksizliğin 30-60 sn kadar kalıcı olması beklenir. Harcanan asit miktarı büretten kaydedilir.

6- Bu şekilde titre edildikten sonra, hesaplama yoluyla bilinmeyen baz çözeltisinin konsantrasyonu bulunur.



Resim 1.1: Titrasyon

II.Kısım

1- Standart baz çözeltisi ile konsantrasyonu bilinmeyen asit çözeltisi I. Kısımda anlatıldığı gibi titre edilir ve asit çözeltisinin konsantrasyonu bulunur.

Fenolftalein Çözeltisi: %95'lik etil alkolde %0,1 oranında hazırlanır. (0,005g fenolftalein alınır ve 25 ml'ye etil alkol ile tamamlanır.)

Titrasyon Yaparken Dikkat Edilecek Hususlar

Sağlıklı bir titrasyon yapabilmek için izlenmesi gereken bir işlem sırası ve uyulması gereken bazı kuralllar vardır. Bu kurallardan önemli olan bazıları aşağıda verilmiştir:

- Titrasyon için uygun ölçülerde analiz kapları seçilmeli ve kaplar temiz olmalıdır. Kullanılacak erlenin hacmi, titrasyon sonunda birikeceği tahmin edilen çözeltinin hacminin en az iki katı olmalıdır.
- Ayarlı çözelti ağzı kapalı ve üzeri etiketlenmiş olarak saklanmalı, sıcakta veya güneş ışığında bırakılmamalı, kullanılmadan önce mutlaka çalkalanmalıdır.
- Dönüm noktasını belirlemek için uygun indikatör seçilmeli ve fazlasının ilavesinden kaçınılmalıdır.
- Büret musluğunun sağlıklı çalışıp çalışmadığı, akıtıp akıtmadığı kontrol edilmeli, akıtıyorsa vazelin sürülerek giderilmeye çalışılmalıdır.
- Büret ayarlı çözelti ile doldurulmadan önce birkaç kez az miktarda ayarlı çözelti ile çalkalanmalıdır.
- Büretin uç kısmında hava kabarcığı kalmamış olmasına dikkat edilmelidir. Analize başlamadan önce büretin ucundaki damla temiz bir kaba dokundurulularak alınmalı, bu amaçla kâğıt veya pamuk kesinlikle kullanılmamalıdır.

- Ayarlı çözelti büretten damla damla ilave edilmeli ve bu sırada erlenmayer düzenli olarak çalkalanmalıdır.
- Titrasyona oluşan renk, en az 30 saniye kalıcı oluncaya kadar devam edilmelidir.
- Titrasyon sonunda sarfiyatın okunması, büretin çeperlerindeki sıvının akmasını sağlamak için 5-10 saniye sonra yapılmalı fakat kesinlikle daha sonraya bırakılmamalıdır.

KARBONHİDRATLAR

Karbonhidratlar yaşayan organizmalar için enerji depolarının ve metabolik ara ürünlerin evrensel bir kaynağıdır. Genel formülleri $[C(H_2O)]_n$ dir. Genel formülden yola çıkılarak karbohidratlar (ya da hidratlanmış karbon) olarak isimlendirilir. Karbonhidratlar aslında hidratlanmış karbon değildir, fakat karbonil grubu ($C=O$) içeren polihidroksi bileşiklerdir.

Bu bölümde yapılacak uygulamaların genel amacı:

- 1- Karbonhidratların farklı tipleri hakkında basit bilgileri edinmek,
- 2- Karbonhidratların farklı tipleri arasındaki farklılıkları ayırtetmek ve tanımlamaktır.

Karbonhidratların Sınıflandırılması

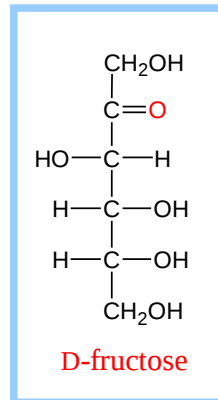
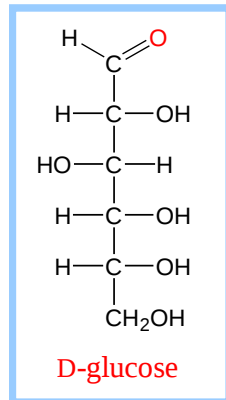
Karbonhidratlar 4 farklı özelliğine göre sınıflandırılır.

A. Şeker zincirindeki karbon atomlarının sayısına göre:

1. **Trioses:** 3 karbon atomu içerir (örneğin, gliseraldehit).
2. **Pentozlar:** 5 karbon atomu içerir.(Örneğin, riboz)
3. **Heksozlar:** 6 karbon atomu içerir.(Örneğin, glikoz)
4. **Heptozlar:** 7 karbon atomu içerir.(Örneğin, sedoheptuloz)

B.Şeker zincirindeki terminal fonksiyonel gruba göre,

1. **Aldozlar:** Terminal aldehyd grubu içerirler ($-CHO$) (ör, glukoz)
2. **Ketozlar:** Terminal keton grubu içerirler ($C=O$) (Ör, fruktoz)



C. Şeker monomerlerinin sayısına göre,

- 1- **Monosakkaritler:** Tek bir şeker ünitesi içerir (Ör. Glukoz ve fruktoz)
2. **Disakkaritler:** 2 monosakkarit ünitesinin bağlanmasıyla oluşan şekerler. Örneğin, sukroz ----glukoz+fruktoz
Laktoz-----glukoz + galaktoz
Maltoz-----glukoz +glukoz

3. Polisakkaritler: Birbirine bağlanan birçok monosakkarit ünitesinden kuruludur. Önemli polisakkaritler nişasta, selüloz ve glikojendir. Tüm bu polisakkaritler farklı şekillerde birbirlerine bağlanan glukoz ünitelerinden meydana gelir.

D. Şeker ünitelerinin indirgeyici özelliğine göre,

1. İndirgeyici şekerler: Tüm monosakkaritler ve çoğu disakkarit (ör. Laktoz ve maltoz) indirgeyici şekerlerdir.

2. İndirgeyici olmayan şekerler: Ör, sükroz.

Not: Bağ yapısına katılmayan serbest aldehit ya da keton grubu (serbest anomerik C atomu) içeren şekerler indirgeyicidir. Bu tanıma göre tüm monosakkaritler indirgeyici özelliğe sahiptir. Laktoz ve maltoz gibi disakkaritler de indirgeyicidir. Polisakkaritler ve sukroz indirgeyici değildir.

KARBONHİDRATLARIN KALİTATİF TESTLERİ

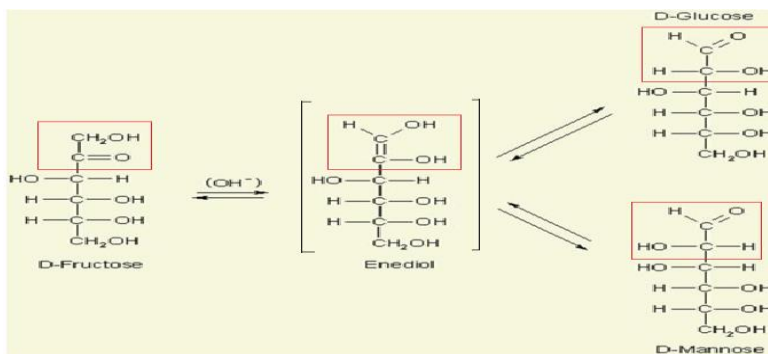
Karbonhidratların Reaksiyonları

Zayıf Alkalilerle; zayıf alkalilerle (0,05N NaOH) monosakkaritlerdeki serbest fonksiyonel grup tautomerize olur (1 ve 2 nolu karbonlar etrafında yeniden düzenlenme olur.) Buna aynı zamanda **Lobry de Bruyn Alberda Van Ekenstein dönüşümü** denir. Bu olay bir enol ara madde üzerinden gerçekleşir (enediol veya dienol). (şekil 1) Enediol güçlü redükleyici ajandır. Sükroz gibi serbest fonksiyonel grup içermeyen şekerler alkalilerle enolize olmaz ve kısmi olarak alkali solüsyonda stabildirler.

Güçlü Alkalilerle; güçlü alkalilerle kaynatıldıklarında karbonhidratların aldehit grubu karamelizasyon denilen rezin oluşturmak üzere polimerize olur. Bu nedenle glukoz indirgeyici özelliğini kaybeder. (Moore deneyi) Bu durum Na_2CO_3 içeren Benedict ayırıcının NaOH içeren Fehling ayıracına göre tercih edilme sebebidir.

Zayıf Asitlerle; zayıf asitlerin şekerler üzerine belirli bir etkileri yoktur.

Güçlü asitlerle; güçlü asitler şekerleri dehidrasyona maruz bırakarak furfural oluştururlar. Pentozlar furfuralleri, heksozlar hidroksimetil furfuralleri oluştururlar. Ketoheksozlar (früktoz gibi) aldohexozlardan (glikoz gibi) daha büyük miktarlarda furfural türevlerini oluştururlar. (An Easy Guide for Practical Biochemistry)



Şekil 1: Karbonhidratlar üzerine zayıf alkalilerin etkisi (Dienol dönüşümü)

A-Karbonhidratların Üzerine Güçlü Alkalilerin Etkisini Gösteren Test

MOORE DENEYİ:

Deneyin Prensipleri: Redükleyici şekerler, NaOH veya KOH varlığında ısıtılırsa sarı renk oluşur. Daha sonra renk koyulaşarak önce portakal rengi, sonra koyu kahverengi olur (Şekil 2). Renk değişimi ile birlikte karamel kokusu duyulur. Serbest redükleyici gruplar (serbest aldehit ya da keton) olmadığında redüksiyon olmaz, renk de oluşmaz. Moore testi ya da diğer adıyla polimerleşme testi, şeker çözeltisi üzerine az miktarda NaOH veya KOH ilavesi ile ısıtıldığında sarı, portakal rengi ve kahverengi bir renk meydana gelmesi esasına dayanır. Serbest aldehit veya keton grupları bulunan şekerlere özel bir testtir. Glukoz ya da fruktoz moleküllerinin açık/serbest olan aldehit ve keton gruplarından serbest hale geçen aldehitlerin polimerizasyonu sonucu renk şekillenir.

Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 2 ml glikoz çözeltisi (%1) ve 1 ml kadar %10'luk NaOH çözeltisi karıştırılır ve ısıtılırsa, karışımın rengi sarı olur. Daha sonra kahve rengine dönüşür ve karamel kokusu duyulur (polimerizasyon).



Şekil 2: Moore deneyi sonucu oluşan renk değişimi

Deneyin Amacı ve Önemi: Karbonhidratlar üzerine kuvvetli alkalilerin şekerlerin yapısını bozduğu ve polimerizasyona sebep olduğu bu deney ile anlaşılmaktadır. Böylece kuvvetli alkali ortamda gerçekleşen Fehling deneyinin neden zayıf alkali ortamdaki Benedict deneyine tercih edildiği ve daha duyarlı olduğu da netlik kazanmaktadır. (Karbonhidratlar alkalilerle hidroliz olur mu?)

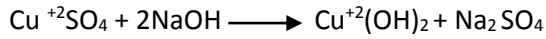
B-Karbonhidratların İndirgeyici Özelliklerine Dayanan Deneyler (Karbonhidratların Oksidasyonu)

Bu başlık altında yapacağımız üç deneyin de (Fehling, Benedict ve Barfoed) çalışma prensipleri aynı esasa dayanır. Sadece deney ortamları bakımından farklılıklar vardır. Fehling deneyi kuvvetli alkali ortamda, Benedict deneyi zayıf alkali ortamda ve Barfoed deneyi ise zayıf asidik ortamda gerçekleşmektedir.

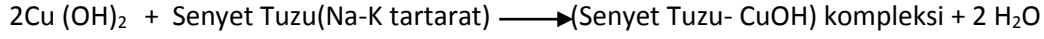
Deneylerin Ortak Prensipleri: İndirgeyici şekerler (serbest aldehit yada keton grubuna sahip şekerler) alkali ortamda ve ısı etkisi ile bakır (Cu), bizmut (Bi), gümüş (Ag) gibi ağır metal hidratlarını redüklemek özelliği gösterirler. Her üç deneyde de Cu^{+2} bir elektron alarak Cu^{+1} 'e indirgenir. Deney sırasında şekerler de oksitlenir ve şeker asitlerini (aldonik asit) oluştururlar. (Kısaca bir redoks tepkimesi meydana gelir.) Hangi şekerler indirgeyicidir? İndirgeyici olmayan şekerler hangileridir? Neden indirgeyici özellikleri yoktur? Ayrıca monosakkaritler zayıf asidik ortamda da indirgeyici özellik gösterirler (Barfoed deneyinde olduğu gibi).

1- FEHLİNG DENEYİ:

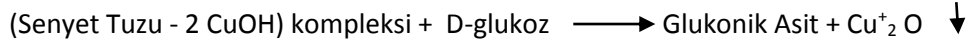
Deneyin Prensibi:



Mavi



Sarı

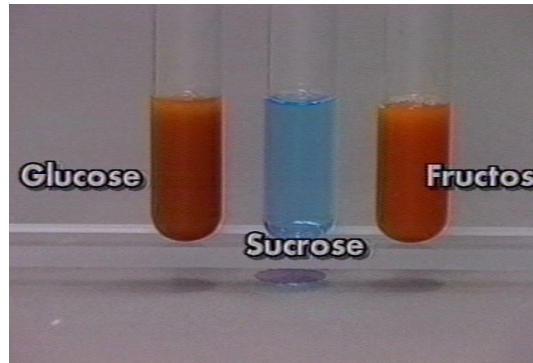


Kırmızı

Fehling A Ayıracı: %7'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

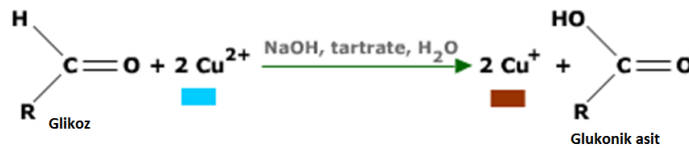
Fehling B Ayıracı: 250g NaOH veya KOH bir miktar suda çözülür ve üzerine 346g potasyum sodyum tartarat eklenerek su ile litreye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı: Fehling A ve Fehling B karıştırılarak Fehling ayıracı taze olarak hazırlanır. Fehling A ve Fehling B karıştırıldıktan sonra uzun süre dayanmaz. Bu nedenle ayrı şişelerde muhafaza edilir ve test öncesi eşit miktarda karıştırılarak kullanılır.



Şekil 3. Fehling deneyi glukoz ve fruktoz ile pozitif, sükroz ile negatif sonuç verir.

1ml Fehling A ve 1ml Fehling B ayıracından alınır ve 1ml karbonhidrat çözeltisi (glukoz, fruktoz, maltoz v.b) ilave edilerek kaynar su banyosunda ısıtır ve renk dönüşümü gözlenir. (Başlangıçta oluşan mavi renk önce yeşil sonra sarı ve daha sonra da tuğla kırmızısına dönüşür.) Isıtma işleminin sonunda oluşan tuğla kırmızısı bir tortu reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Kırmızı tortu iki değerli bakır iyonlarının (Cu^{+2}) bir değerli bakıra (Cu^+) indirgendiğini gösterir.



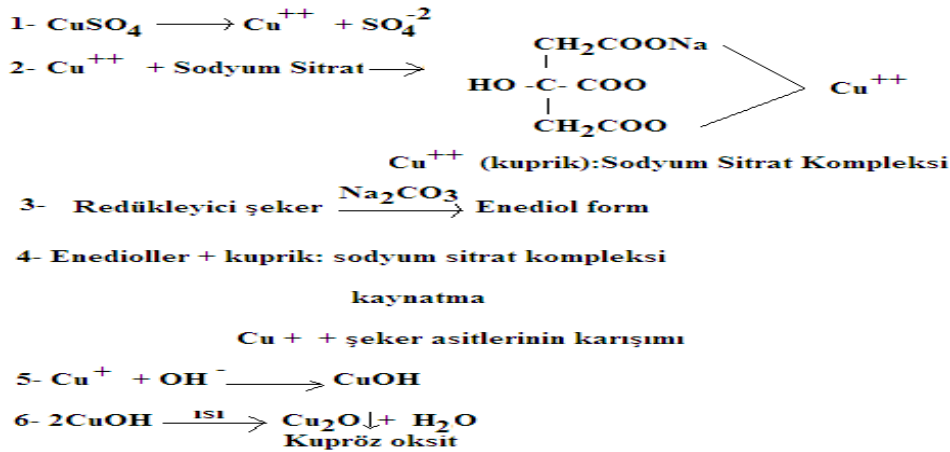
Fehling çözeltisinde bulunan NaOH alkali ortam oluşturur, potasyum sodyum tartarat (senyet tuzu) ise reaksiyon sırasında oluşan $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'in çökmesini önler ve eriyik halde kalmasını sağlar.

Deneyin Amacı ve Önemi: Serbest (bağ yapısına katılmayan) aldehit ya da keton grubu (sulu çözeltilerde serbest anomerik karbon atomu) içeren monosakkarit ve disakkaritlerin indirgeyici özelliğe sahip olduklarını göstermek ve bilinmeyen bir karışımdaki indirgeyici özelliğe sahip karbonhidratları belirlemek için yapılır. Fehling deneyi monosakkaritlerle (glukoz, fruktoz, galaktoz) ve indirgeyici disakkaritlerle (maltoz, laktoz) pozitif sonuç verir. Sakkaroz ise indirgeyici özelliğe sahip olmayan bir şeker olduğu için fehling deneyi ile negatif sonuç verir. Bu sebeple fehling deneyi aynı zamanda indirgeyici disakkaritler ile indirgeyici olmayan disakkaritleri ayırmak için de kullanılır.

Klinik olarak, idrarda şeker varlığının gösterilmesinde Fehling deneyinden yararlanılabilir. Üratlar ve kreatinin Fehling ayıracını redüklerler. Muhafaza etmek amacıyla idrara kloroform ilavesi de benzer yalancı pozitif sonuç verir.

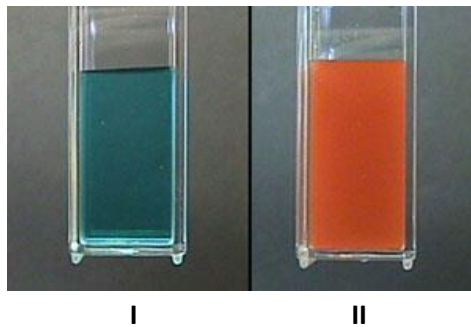
2-BENEDICT DENEYİ:

Deneyin Prensipleri: Orta düzeyde alkali ortamda indirgeyici şekerler, endiollerini oluşturmak için tautomerizasyona maruz kalır. Endioller kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını kupröz (Cu^+) iyonlarına indirger. Bakır hidroksit şekillenir. Isıtılınca CuOH , Cu_2O 'e dönüşür. Bakır oksit (Cu_2O) şekerin konsantrasyonuna bağlı olarak farklı renk tonlarında presipitat şekillenir.



Benedict Ayıracı: 173g sodyum sitrat ve 100g Na_2CO_3 (sodyum karbonat) yaklaşık 500ml suda çözülür. Tuzları uzaklaştırmak için ısıtılır ve gerekirse süzülür. 17,3 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100ml distile suda çözülür ve diğer çözeltileri karıştırarak ilave edilir, distile su ile litreye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı: 2ml Benedict ayıracına, 1ml glikoz çözeltisi (%1) eklenir. Kaynamakta olan su banyosunda 2 dak. kaynatılır. Soğutulur. Tuğla kırmızısı presipitat görülür.



Şekil 4. Benedict negatif (I), Benedict pozitif (II).

Deneyin Amacı ve Önemi:

Benedict testi Fehling testinden üstündür. Fehling ayıracında alkali ortamı sağlayan NaOH yerine Benedict ayıracında zayıf alkali olan sodyum karbonat geçer. Yine Fehling ayıracındaki Na-K tartarat yerine Benedict ayıracında sodyum sitrat geçmiştir. Her iki bileşik de $\text{Cu}_2(\text{OH})_2$ 'in çökmesini önler. Sodyum sitrat, kuprik (Cu^{+2}) iyonlarını bağlar ve redüksiyon için onu yavaşça bırakır. Böylece stabilize edici ajan olarak rol alır. Benedict semikantitatif ve çok daha duyarlı bir test olarak bildirilir,

RENK	ŞEKER VARLIĞI	REAKSİYON	ŞEKER MİKTARI
Mavi renk değişmez (presipitat yok)	yok	-	-
Yeşil presipitat	var	+	% 0,5
Sarı presipitat	var	++	%0,5- 1
Turuncu presipitat	var	+++	%1- 1,5
Kırmızı presipitat	var	++++	% 2
Tuğla kırmızısıpresipitat	var	+++++	%2 den fazla



Mavi-----Yeşil-----Sarı-----Turuncu-----Tuğla kırmızısı

Benedict testi diğer indirgeyici maddelerin varlığında da pozitif sonuç verir.(Askorbik asit, glutatyon, salisilatlar, ürik asit, glukuronidler ve homojentisik asit gibi)

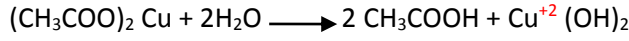
Neden Benedict Deneyi Fehling Deneyine tercih edilir?

Fehling ayıracındaki NaOH ' ın yerini % 10 luk Na_2CO_3 (sodyum karbonat) ve senyet tuzunun yerini de %20 sodyum sitrat almıştır. Benedict ayıracı Fehling ayıracına göre daha zayıf alkali bir ortamdır. Bu nedenle Benedict deneyi ile daha az miktardaki şekerin, Fehling de olduğu gibi güçlü alkali ortamda yıkımlanmadan daha doğru tespit edilme şansı doğar. Ayrıca benedict ayıracı daha stabildir.

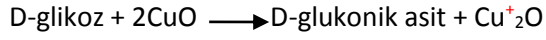
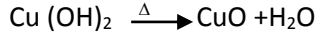
İdrarda glukozun varlığını göstermek için de Benedict deneyi Fehling deneyine göre daha duyarlıdır. Çünkü, Benedict ayıracında NaOH gibi güçlü alkali olmadığından yoğun alkali ve bakır varlığında (Fehling ayıracında olduğu gibi) idrarda bulunan fosfatların neden olduğu yeşilimsi beyaz çökelti oluşmayacak ve yalancı pozitif yanılışına yol açmayacaktır.

3-BARFOED DENEYİ:

Deneyin Prensipleri: Ilımlı asidik ortamda indirgeyici şekerler enediol forma tauomerizasyona uğrarlar. Enodioller kuprik (Cu^{+2}) iyonları kupröz (Cu^{+}) iyonlara indirger. Bakır hidroksit (CuOH) şekillenir. Isıtma esnasında CuOH bakır okside (Cu_2O) çevrilir. Cu_2O kırmızı presipitat oluşturur.



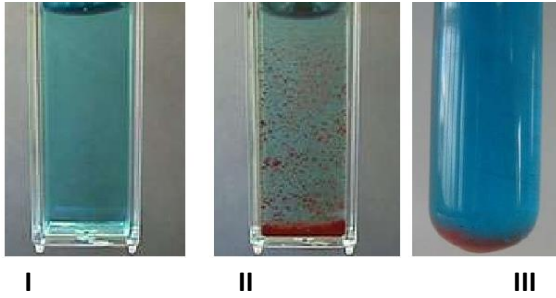
Bakır hidroksit



Bakır oksit

Barfoed ayırıcı: 66g bakır asetat (monohidrat) 800ml sıcak distile suda çözülür ve üzerine 10ml glacial asetik asit eklenir. Soğutulur ve distile su ile litreye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı: 2ml Barfoed ayırıcına 1ml kadar şeker çözeltisi (glikoz, laktoz ve sakaroz olarak ayrı ayrı yapılır.) Tüpler aynı anda kaynayan su banyosuna konur. Yaklaşık 2-3 dak. kaynatılır ve oda ısıda soğutulunca tüpün dibinde kırmızı tortu gözlenmesi şekerin monosakkarit olduğu anlamına gelir. **Barfoed deney ortamı zayıf asidik olduğu için sadece indirgeyici monosakkaritlerle pozitif sonuç verir.** Bu nedenle kaynatma süresine dikkat edilmelidir. Daha uzun süre kaynatılırsa (yaklaşık 10 dak sonra) disakkaritlerde de kırmızı tortu gözlemlenir. Çünkü uzun süreli kaynatma sonucu disakkaritler de hidrolize olur ve yalancı pozitif reaksiyon verir.



Şekil 5. Barfoed negatif (I), pozitif reaksiyon (II,III) (Biochemistry Laboratory, Geromil J. Lara, RMT, MSMT)

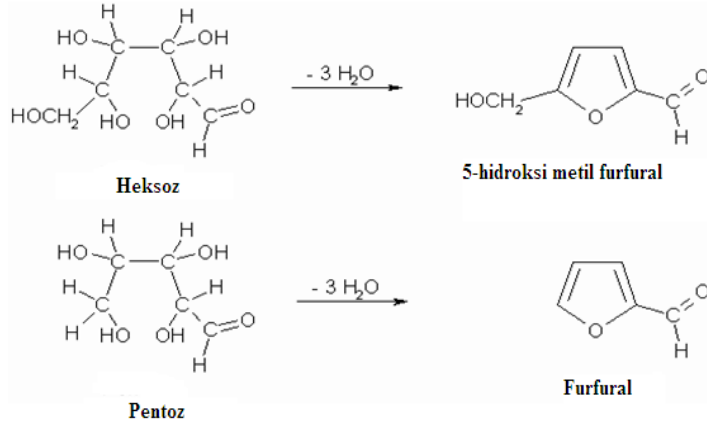
Deneyin Amacı ve Önemi: İndirgeyici özelliğe sahip ve konsantrasyonları aynı olan disakkaritleri monosakkaritlerden süre açısından ayırt etmeye yarar. Monosakkaritler zayıf asit ortamlarda redükleyici özellik gösterirken, disakkaritlerde bu özellik yok denecek kadar azdır. Bu nedenle Barfoed deneyinde disakkaritler uzun süre kaynatmakla ve asit etkisiyle belli bir süre sonra hidroliz olmaları sonucunda gecikmeli olarak ve çok az miktarda redükleme özelliği gösterirler.

ŞEKERLERİN ASİT ORTAMDAKİ DAVRANIŞLARI (FURFURAL OLUŞUMU)

Molish, Seliwanoff ve Bial Deneyleri

Deneylerin ortak prensibi:

Monosakkaritlerin dehidrasyonu yani yoğun asit ortamlarda kaynatılmakla monosakkarit molekülünün üç molekül su kaybetmesi olayı sonucunda pentozlardan **furfural**, heksozlardan **5-hidroksi metil furfural** meydana gelir. Bu türevler çeşitli polifenollerle birleşerek renkli ürünler veriler. Bunların renk ve spektroskopik özellikleri kullanılan polifenol ve şekerle ilgilidir. Bu reaksiyonlar (Molish, Seliwanoff ve Bial) değişik tür şekerlerin varlığını göstermeye hizmet eder.



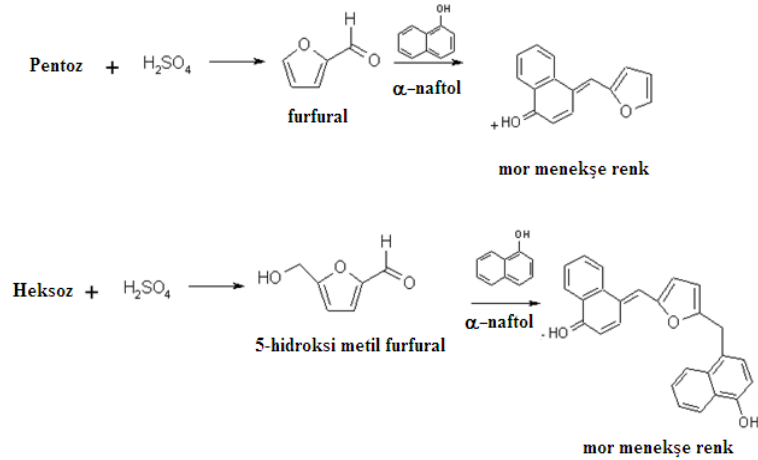
Şekil 6. Heksoz ve pentoz şekerlerden furfural oluşumu (Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK, ADÜTF Biyokimya AD, 2006)

Furfuraller polifenollerle tepkimeye girerek renkli kompleksler oluşturur. Deneylerde kullanılan fenol bileşikleri şunlardır:



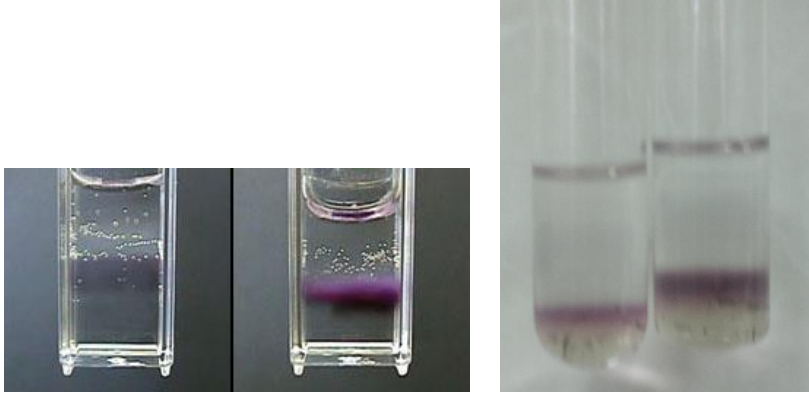
1-MOLİSCH DENEYİ:

Deneyin Prensibi: Karbonhidratlar konsantre H_2SO_4 ile muamele edildiğinde dehidre olarak, furfural ve hidroksi metil furfural türevlerini oluştururlar. Bu türevler α - naftol ile kondanse olarak mor renkli ürünler oluştururlar (Şekil 7). İster serbest isterse proteinlere bağlı olsun tüm şekerler (amino şekerler, şeker alkoller ve karboksilik asitler ve dihidroksi aseton hariç) bu deneyi pozitif (+) verirler. Oligo ve polisakkaritler önce asitle hidrolize olurlar. Sonra furfuraller ve türevleri oluşur. Bazı protein ve lipidler de molisch pozitif sonuç verir. Bu durumda bu bileşiklerin karbonhidrat üniteleri taşıdıkları anlamına gelir. Örn; albumin., glikolipidler ve glikoproteinler.



Şekil 7. Molish deneyinin reaksiyonları (Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK, ADÜTF Biyokimya AD, 2006)

Deneyin Yapılışı: 2 ml % 1'lik karbonhidrat çözeltisi, 1-2 damla Molish ayıracı (**Molish Ayıracı:** 1 g α -Naftol %95'lik etil alkol ile 100ml'ye tamamlanır.) karıştırılır. Test tüpü hafifçe eğilir ve 2 ml yoğun H_2SO_4 yavaşca tabaka oluşturacak şekilde ilave edilir. (45° açı ile tutularak dökülür). Temas yüzeyinde mor menekşe renk oluşması reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Ayıraçtaki kirlilikler yeşil bir halka oluşturur. Bu da testin negatif olduğunu gösterir. Ayrıca karbonhidrat olmadığında aşırı α -Naftol (Molish ayıracı) ilavesinden dolayı da yeşil halka oluşur. (Deneyi sakkaroz, maltoz ve laktoz ile de tekrarlayın. Sonuç nedir?)

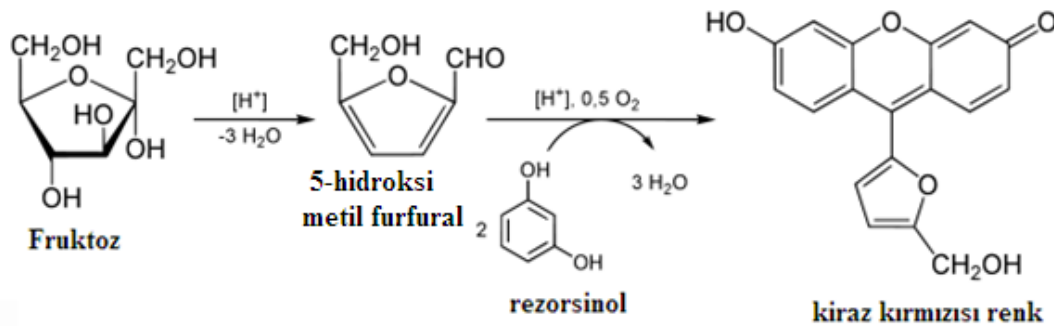


Şekil 8. Molish deneyi sonucu oluşan mor menekşe halka.

Deneyin Amacı ve Önemi: Bu test karbonhidratların genel testidir. Molish deneyi en az 5C'lu şekerlerle pozitif reaksiyon verir. Çünkü 5C'lu ve 6C'lu şekerler furfural ve türevlerini oluştururlar. Sülfürik asidin tüpe hızlı dökülmesi tüpün alt kısmında su-asit reaksiyonuna yol açar ve ısı oluşur. Bu ısı da karbonhidratların yanmasına neden olur ve siyah bir halka meydana gelir. Bunun için asit çok yavaş ve dikkatlice tabaka yapılarak ilave edilmeli, böylece bu ilişki en aza indirilmelidir.

2-SELİWANOFF DENEYİ:

Deneyin Prensipli: Karbonhidratlar Seliwanoff ayıracındaki HCl'in etkisiyle furfural türevlerini oluşturmak üzere dehidre olurlar. Keto şekerlerin furfural türevleri resorsinol ile birleşerek kiraz kırmızısı bir renk oluşturur (Şekil 9-10).

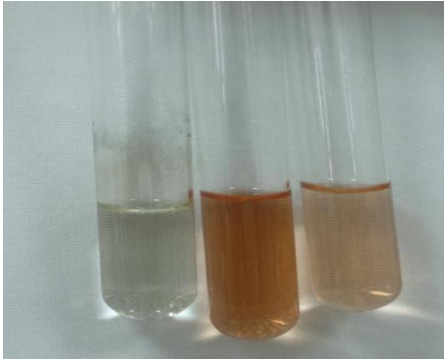


Şekil 9. Seliwanoff deneyinin prensibi (http://en.wikipedia.org/wiki/Seliwanoff%27s_test)

Deneyin Yapılışı: 2ml Seliwanoff ayıracına 1ml karbonhidrat çözeltisi (%1 fruktoz) ilave edilir. 30sn kaynatılır ve oda ısısında soğutulur. Kiraz kırmızısı renk meydana gelir. Böylece verilen şeker ketoz şekerdir denir. (Aynı deneyi, glukoz ve sukroz ile yapınız ve sonuçları kaydediniz.)

Not: Isıtma uzatıldığında glukoz da pozitif sonuç verir. Çünkü aldozlar çok ısıtılırsa HCl etkisi ile ketozlara dönüşür.

Seliwanoff Ayırıcı: 50mg rezorsinol, 33ml konsantre HC içinde çözülür ve 100ml'ye distile su ile dilüe edilir.



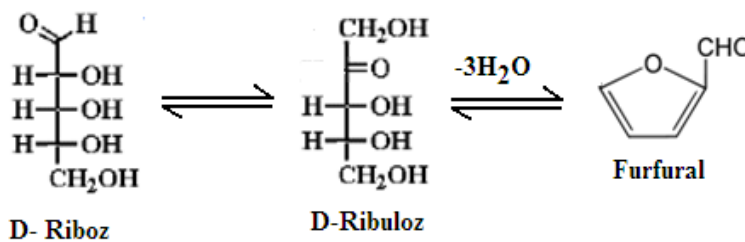
Şekil 10. Seliwanof deneyi, ortada früktoz ile (+), solda süktroz ile (hidroliz sonucu az pozitif) sağda glikoz ile (-) reaksiyon verir.

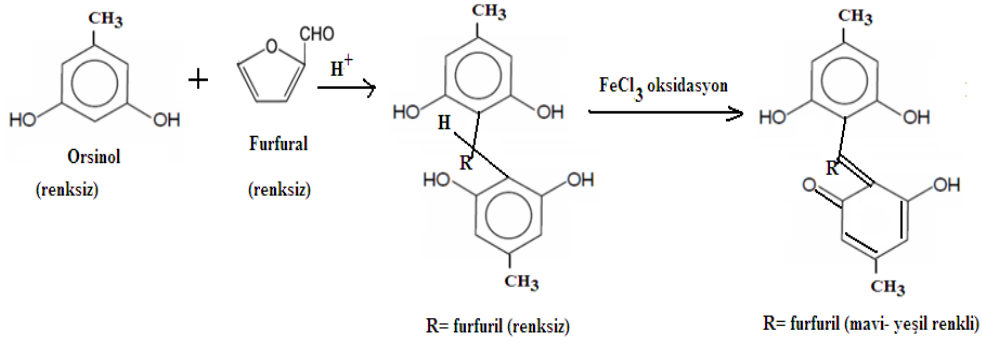
Deneyin Amacı ve Önemi: Bu deney sadece **ketoheksozlar için spesifik**dir. Aldoheksozlar ile ketoheksozların ayrılmasında kullanılır. Bu deney früktoz, süktroz ve diğer fruktoz içeren karbonhidratlar tarafından pozitif sonuç verir. Şayet kaynatma uzatılırsa HCl asidin katalitik etkisiyle glukozun fruktoza dönüşümü gerçekleşir ve benzer bir renk glukoz ya da maltozun varlığında da gelişebilir. Bu test %0,1 fruktoz için dahi çok duyarlıdır. Glukoz, fruktoz karışımında duyarlılık azalır. Bu test süktroz için indirekt bir test olarak kullanılır. Çünkü süktroz Seliwanoff ayırıcındaki HCl'in etkisiyle hidrolize olur. Serbest kalan fruktoz pozitif reaksiyon verir. (Şekil 10)

3-BİAL DENEYİ:

Deneyin Prensi: Pentozların genel tanınma deneyidir. Asidik şartlar altında 5C'lu şekerler (aldopentoz ve ketopentozlar) çabucak furfural'lere dehidre olur. Furfural Bial ayırıcı içindeki orsinol ve demir klorür ile reaksiyona girer ve mavi-yeşil renk meydana gelir (Şekil 10).

Altı karbonlu şekerler 5- hidroksi metil furfurala dönüşür ve orsinol ve demir klorür ile çok yavaş reaksiyon verir. Bu dönüşümün oranı ve renkteki farklılıklar heksozlar ile pentozların ayırımında kullanılır. Pentoz şekerler mavi-yeşil renkli, heksoz şekerler kırmızımsı kahverengi kompleksler oluştururlar. Beş karbonlu şekerler, altı karbonlu şekerlerden daha çabuk dehidre olurlar. Bunun sonucu olarak dehidrasyon ürününün orsinol ile reaksiyonu pentoz şekerlerde heksoz şekerlere göre daha hızlı şekillenir. Disakkaritler de Bial ayırıcı ile reaksiyon verir. Asit ortamda disakkaritler monosakkaritlere dönüşür, sonrasında da furfural ve hidroksi metil furfural oluşur.

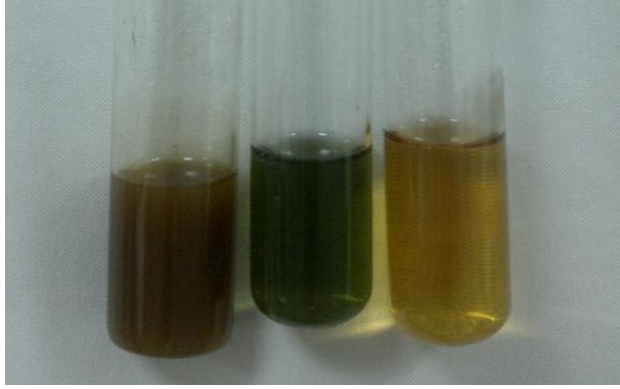




Şekil 11. Bial deneyinin reaksiyonları

(http://webpub.allegheeny.edu/dept/chem/chem%20234/07_Carbohydrate%20Lab.pdf)

Deneyin yapılışı: 2ml Bial ayırıcına 1ml %1'lik ksiloz çözeltisi eklenir ve kaynatılır. Mavi-yeşil renk oluşumu reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir (Şekil 11.) (Aynı deneyi glikoz ve sakaroz ile tekrarlayıp, sonuçları yorumlayın.)



Şekil 12. Ortadaki ksiloz şekeri ile Bial Pozitif, solda glikoz ile Bial negatif, sağdafrüktoz ile Bial negatif

Bial Ayırıcı: 1,5g orsinol 500ml yoğun HCl içinde eritilir ve üzerine %1'lik $FeCl_3$ çözeltisinden 1,5ml eklenir. Koyu renkli şişede saklanır.

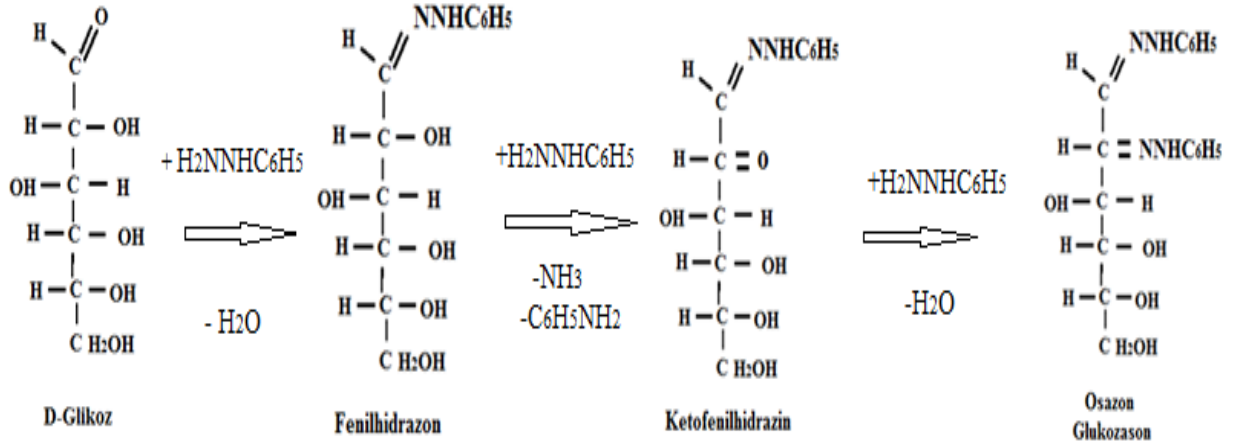
Deneyin Amacı ve Önemi: Bial deneyi **pentozları hegsozlardan ayırt etmek için kullanılır**. Bu ayırım ayıraç içinde bulunan orsinol ve demir (III) klorür varlığında meydana gelen farklı renklere göre yapılır. Pentozlardan oluşan furfuraller mavi- yeşil renk oluştururken, hegsozlardan oluşan furfuraller bulanık kahverengi renk oluştururlar.

OSAZON DENEYİ:

Deneyin prensibi: Serbest aldehit veya keton grubuna sahip tüm monosakkaridler, **fenilhidrazinle** ısıtıldıkları zaman, suda daha az eriyen, özel ergime sıcaklıkları ve şekilleri olan **sarı renkli kristaller** oluştururlar. Bunlara **osazon** denir. Bütün α -hidroksi karbonil bileşikleri ozazon teşkil etmek üzere fenilhidrazin ile reaksiyona girerler. Osazon oluşumu iki aşamada olur:

1-Önce bir molekül fenilhidrazin monosakkaridin aldehit grubuna bağlanır ve **fenilhidrazon** meydana gelir. Bunu takiben α -hidroksi grup bir karbonil gruba oksitlenir.

2-İkinci aşamada, oluşan diğer karbonil grubu bir başka fenilhidrazin molekülü ile birleşir ve **osazon** oluşumu tamamlanır.



Şekil 13. Osazon oluşumunun reaksiyonları (Fahrünisa Pamuk, Biyokimya, Gazi Kitabevi Yayınları, 2011)

Deneyin yapılışı:

Dört deney tüpünde ayrı ayrı ozazon ayırıcı taze olarak hazırlanır.

Ozazon Ayırıcı: 1 spatül ucu fenilhidrazin hidroklorid ve 2 spatül ucu sodyum asetat karıştırılır. Üzerine birkaç damla glacial asetik asit ilave edilir. (0,3 gr fenilhidrazin ve sodyum asetat karışımına 3 damla asetik asit eklenir.) Ayırıcın içindeki sodyum asetat ve asetik asit pH=5'in ayarlanması için tampon görevi görür. Bu pH'da ozazonlar oluşur.

Tüplerin üzerine glikoz, fruktoz, maltoz ve laktozun % 1'lik çözeltilerinden 2'şer ml ilave edilir, karıştırılır ve kaynamakta olan su banyosuna bırakılır. Çok sayıda sarı kristaller görülünceye kadar bu şekilde bekletilir. Kristalleşme görülen tüp su banyosundan alınır ve bir tüp standında soğumaya bırakılır (musluk suyu altında değil).

Bu arada, her şeker için kristalleşme süresi de kaydedilir. Soğudukça kristaller yoğunlaşır (ozazon). Bir pipet yardımıyla mikroskop lamı üzerine bu kristallerden bir miktar alınır ve mikroskopta incelenir. Kristallerin şekilleri çizilir. Glikoz (4-5 dak.) ve fruktoz (2 dak.) çabuk kristal verirler ve oluşan kristallerin şekli aynı olup **ekin demetleri** şeklindedir. Laktoz ve maltoz çok daha uzun süre (yaklaşık 30 dakika) kaynatılır, fakat kaynatma sırasında ozazon kristalleri oluşmaz. Kaynatma sonrası kendi halinde bir süre soğumaya bırakınca osazon kristalleri meydana gelir. Laktozazon düzensiz ince iğnecikler şeklinde kristalleşir (**at kestanesi**). Maltozazon ise geniş tabletler şeklinde kristalleşir (**ayçiçeği, papatya, yıldız**). Monosakkaritin 1.ve 2. karbon atomlarına fenil hidrazinin bağlanmasıyla karakteristik kristalli osazonlar oluşur. Glukoz, fruktoz ve mannoz, yalnızca 2. karbondaki konfigürasyon bakımından farklıdır; bu karbonlara fenil hidrazinin bağlanmasıyla farklılık ortadan kalkar; dolayısıyla glukoz, fruktoz ve mannoz, sarı renkli ekin demeti görünümünde aynı osazon kristallerini oluştururlar. Galaktozun 4.karbonundaki konfigürasyon farklıdır; 1.ve 2.karbon atomlarına fenil hidrazinin bağlanmasıyla farklılık ortadan kalkmaz; dolayısıyla galaktozun

oluşturduğu osazon kristalleri, diğerlerinden farklı olarak koyu sarı renkte at kestanesi görünümündedir.

Deney sırasında dikkat edilmesi gerekenler:

- Ayıraçlar doğru oranlarda alınmalıdır.
- Soğutma kendi halinde, tercihen suyun içinde yavaş yavaş yapılmalıdır.
- Şeker çözeltileri çok konsantre olmamalıdır. Çünkü konsantre çözeltilerde kristaller oluşmaz.



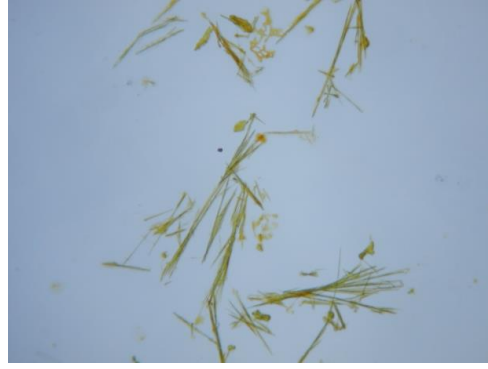
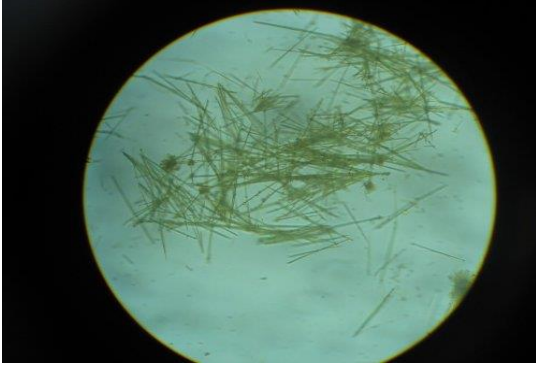
Şekil 14. Şekerlerin fenilhidrazin ile kaynatılması sonucu osazon oluşumu.

Deneyin Amacı ve Önemi:

Osazon yapısı monosakkaridin **1 ve 2. karbon** atomlarını içine almaktadır. Bu nedenle 3, 4, ve 5. karbon atomlarına bağlı grupların konumları birbirinden farklı olan şekerler farklı özellikte osazon oluşturacaklarından birbirlerinden kolayca ayrılabilirler. Örneğin glukosazon kristalleri **ekin demeti**, galaktosazon kristalleri **at kestanesi** görüntüsü verir ve bu osazonların erime sıcaklıkları da farklıdır. Buna karşılık 1 ve 2. karbonlara bağlı yapıları farklı, 3,4,5 karbon yapıları benzer olanlar, örneğin **glukoz, mannoz ve früktoz**, osazon deneyi ile ayırt edilemezler, çünkü hepsi **aynı tip osazon oluştururlar (iğne şeklinde)**. Ayrıca, şekerlerin osazon verme süreleri de farklıdır. Bu nedenle osazon kristallerinin teşekkülü için geçen sürenin saptanması bilhassa aynı osazonu teşkil eden birbirine yakın yapıdaki şekerlerin tanınmasında önemlidir.

Redükleyici şekerlerin hepsi fenilhidrazin ile osazon teşkil ederler. O halde sakkaroz osazon kristali oluşturmaz. Fakat 30 dak. kaynatılırsa hidrolize olur ve kristal oluşur. Hidrazonlar suda çözünür, fakat osazonlar suda çözünmezler. Monosakkaritlerin osazonları sıcak suda çözünmez ve kristal oluşturur. Disakkaritlerin osazonları sıcakta çözünür ve sadece soğutulunca kristalleri oluşturur.

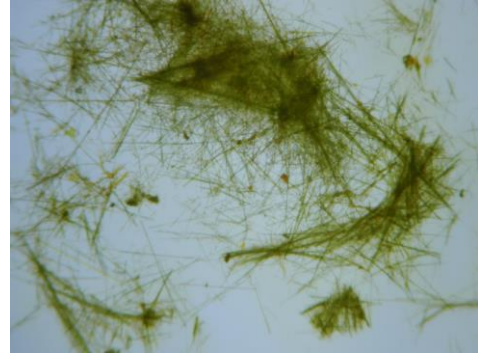
Kısacası osazon deneyi ile şekerler birbirinden oluşturdukları osazon kristallerinin şekillerine, kristal oluşum süresine, kristallerin sıcakta ya da soğukta oluşmasına göre ayırt edilebilirler. Ayrıca, gebeliğin son dönemi ve laktasyon periyodu sırasında idrardaki şekerin glikoz mu yoksa laktoz mu olduğunun ayırt edilmesinde kullanılır.



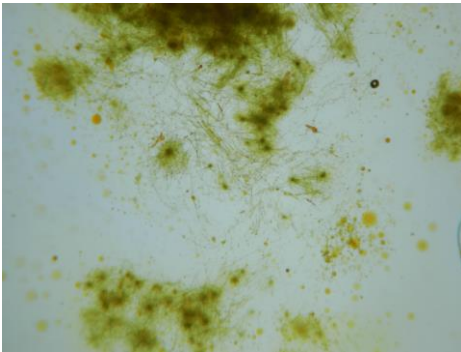
Glikoz ile oluşan osazon kristalleri (Glikozazon)



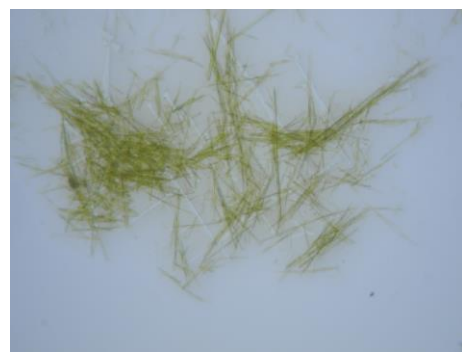
Sakkaroz ile oluşan osazon kristalleri



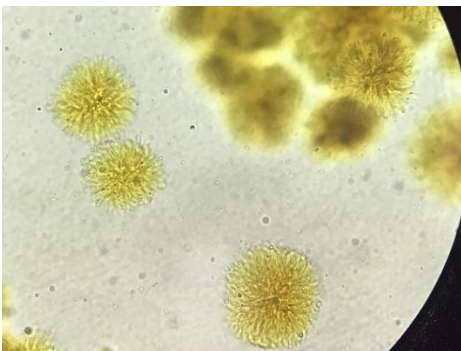
Ksiloz ile oluşan osazon kristalleri



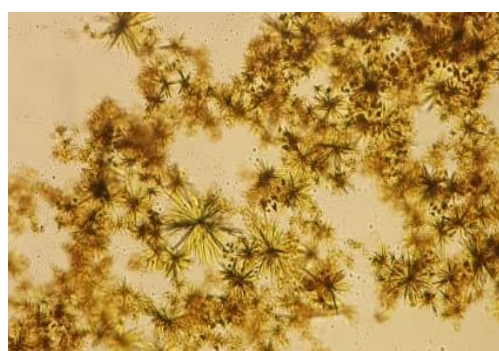
Laktoz ile oluşan osazon kristalleri



Früktoz ile oluşan osazon kristalleri



Laktoz ile oluşan osazon kristalleri



Maltoz ile oluşan osazon kristalleri

DİSAKKARİTLER

Disakkaridler, bir monosakkarid molekülü üzerindeki anomerik karbon hidroksil grubunun bir diğer monosakkarid molekülü üzerindeki bir hidroksil grubu ile reaksiyonlaşması sonucu oluşturulan bir O-glikozidik bağ vasıtasıyla birbirine bağlanmış iki monosakkarid molekülü ile oluşmuş bileşiklerdir. Molekülünde bir serbest anomerik karbon atomu bulunan disakkaridler, monosakkaridler gibi indirgeyici özellik gösterdikleri halde molekülünde bir serbest anomerik karbon atomu bulunmayan disakkaridler indirgeyici özellik göstermezler.

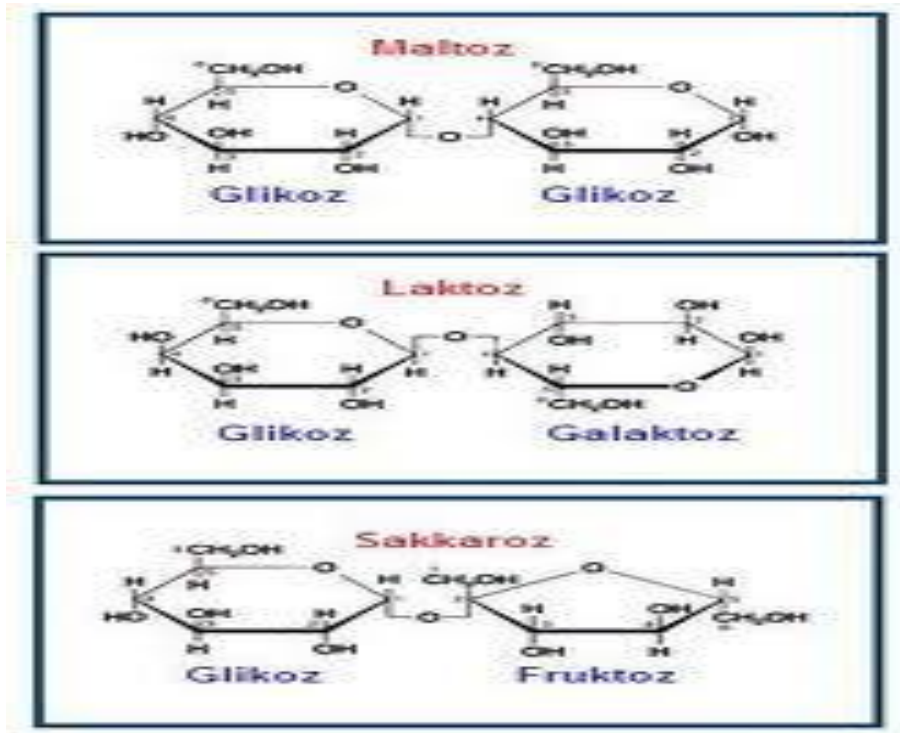
Laktoz: Süt şekeridir. Yeni doğanlar için enerji kaynağıdır. β -D glukoz ve β -D galaktoz dan oluşur. β -(1-4) glikozidik bağ ile bağlıdır. Laktaz tarafından sindirilir. (Laktaz laktoz intoleransında eksiktir). Laktoz gebelikte ve laktasyonda idrarda görülebilir.

Maltoz: α -D- glukozun 2 molekülünden oluşur. α -1-4 glikozidik bağlarla bağlıdır. Çimlenen tohumlarda ve maltta bulunur. İntestinal sıvıdaki maltazla sindirilir.

Sakkaroz (sükroz): α -D- glukoz ve β -früktozdan oluşur. Kaynağı şeker kamışı vb...’dir. β -1,2 glikozidik bağla bağlıdır. Sükrozdaki bağ glukoz ve fruktozun fonksiyonel grupları arasındadır. Bu nedenle sukrozun serbest fonksiyonel grubu yoktur ve indirgeyici bir şeker değildir. Hidroliz olunca bağ parçalanır ve indirgeyici şekerler meydana gelir. Sukraz ile sindirilir.

*Sakkarozun hidrolizi sonucu çoğu kez eşit miktarlarda glukoz ve fruktoz içeren karışım oluşur; bu karışım da **invert şeker** olarak bilinir.

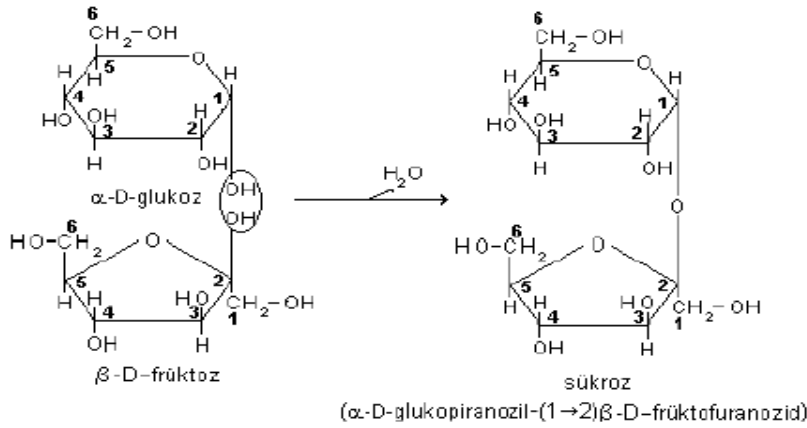
Trehaloz: İki glukoz molekülünün **Glc(α 1 $\rightarrow$ α 1)Glc** biçiminde kondensasyonu ile oluşmuş molekül yapısına sahip bir disakkariddir. Trehaloz, indirgeyici özellikte değildir.



DİSAKKARİDLERİN ÖZELLİKLERİYLE İLGİLİ DENEYLER

REDÜKLEYİCİ OLMAYAN BİR DİSAKKARİT'İN (SAKKAROZ) HİDROLİZİ

Deneyin prensibi: Hidroliz, bir molekülün su alarak kendini kuran alt moleküllere parçalanması olayıdır. Sakkarozun hidrolizi kimyasal olarak (asitle kaynatarak), yada enzimatik olarak (ekmek mayası, şarap mayası veya bira mayası gibi) gerçekleştirilir.



Şekil15. Sakkarazun hidrolizi

1. SAKKAROZ (SÜKROZ)'UN ASİTLE HİDROLİZİ :

Deneyin Yapılışı: Yaklaşık 5 ml sakkaroz eriyiği, 2.5 ml su ve 0.5 ml konsantre HCl ile karıştırılıp su banyosunda 10 dakika ısıtıldıktan sonra soğutulur ve NaOH ile nötralize edildikten sonra Fehling deneyini (+) verdiği görülür. Halbuki sakkaroz hidroliz öncesi Fehling, Benedict deneylerini vermez. Yani Fehling (-)'dir. Çünkü sakkaroz indirgeyici bir şeker değildir. Asitle ısıtma sırasında sakkaroz glikoz ve früktoz moleküllerine parçalandığından (hidroliz) redükleyici özellik kazanır. (Şekil)

2. SAKKAROZUN MAYA İLE HİDROLİZİ :

Deneyin Yapılışı: Sakkaroz asitle hidroliz edildiği gibi maya ile de hidroliz edilebilir. Birkaç ml sakkaroz eriyiği üzerine 1 ml ekmek mayası çözeltisi ilave edilerek bir müddet 37 °C (su banyosunda) bekletilir. Bu esnada enzimin etkisiyle sakkaroz glikoz ve früktoza parçalanır ve Fehling (+) verir.



Şekil 16. Sakkarozun hidrolizi. Soldaki sakkaroz ile Fehling (-), Ortadaki sakkarozun enzimatik hidroliz sonrası Fehling (++), sağdaki sakkarozun asitle hidroliz sonrası Fehling (+++).

POLİSAKKARİTLER

Çok sayıda monosakkarit birimlerinden oluşurlar. Hidrolize edilirse kendilerini oluşturan monosakkaritlere parçalanırlar. Polisakkarid aynı monosakkaridin polimeri ise **homopolisakkarit** adını alır. Bazı polisakkaridler başka grupları da içerirler. Bunlara da **heteropolisakkarit** denir.

Polisakkaridlerin sistematik isimlendirilmesinde, yapıya katılan monosakkaridin adının sonundaki “ose” eki kaldırılır yerine “an” eki konur. Mesela, “glikoz” genel olarak bir monosakkariti gösterirse bu şekilde bundan türeyen **glikan** bir polisakkarit ile sinonimdir. Bir D-mannose veya L-mannose’dan kurulmuş polisakkaride **mannan** denir. Bir glikan yapıtaşı olarak bir tip monosakkarid ihtiva ediyorsa buna **homoglikan** (homopolisakkarit) denir. İki veya daha fazla tip monosakkarid ihtiva ediyorsa buna da **heteroglikan** (heteropolisakkarit) denir.

Glikojen, amilopektin, amiloz, sellüloz ve dekstran monomer birim olarak D-glikoz ihtiva eden homopolisakkarit (homoglikan)’lerdir. Pektin, D-galakturonik asit, inulin, D-früktoz; kitin, D-N-asetil-glikozamin ihtiva eden homopolisakkarit (homoglikan)’lerdir. Bir çok polisakkarit sadece ihtiva ettikleri monosakkaridlerle değil aynı zamanda molekül ağırlıkları ve diğer yapısal özellikleri ile de birbirinden ayrılırlar. Nitekim bazı polisakkaridler düz zincir şeklinde, bazıları da oldukça dallanmış polimerlerdir. Her durumda monosakkarit birimlerini birbirine birleştiren bağlar daima glikozidik bağlardır. Bu bağlar α veya β olabilir ve birbirini takip eden birimler düz çizgi tarzında sıralanırlar veya polimerdeki dallanma noktalarındaki birimler arasında 1-2, 1-3, 1-4 veya 1-6 bağları ile birbirine bağlanırlar.

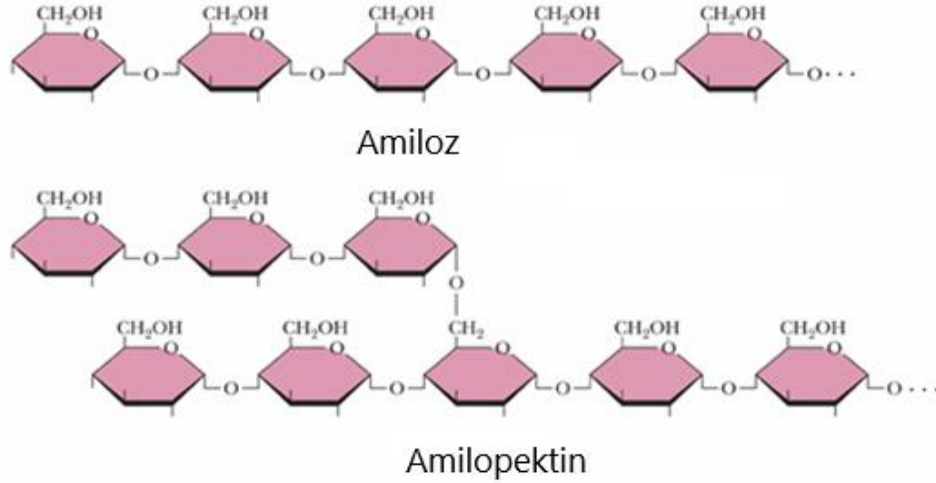
Nişasta bir bitki polisakkaritidir. Kaynakları patates, tohumlar, baklagiller ve yumrular gibi bitkilerin depo kısımlarıdır. Amiloz ve amilopektinden kuruludur. Bitkilerde beslenme için besinsel yedek vazifesi görür. Glikoz molekülleri sellülozda β -1,4 bağları ile birbirine bağlandıkları halde nişastada α -1,4 bağları ile birbirine bağlanmışlardır. Bundan dolayı, nişastanın kurulmasında tekrarlanan disakkarit birimi sellobioz olmayıp maltozdur. Amilozdaki bireysel glukoz üniteleri α -1-4 glikozidik bağlarla bağlanır. Amilopektinler α -1-6 glikozidik bağlarla bağlı, dallanmış noktalara sahiptir. Nişasta indirgeyici olmayan bir şekerdir.

Nişasta, birbirinden ayrılabilen iki tip bileşiğin karışımıdır. Uzun dallanmamış zincire sahip olan ve bu bakımdan sellüloza benzeyen kısmı amiloz adını alır. Nişastanın amiloz bölümü spiral yapmaya meyilli uzun zincirler şeklindedir. Amilopektin ise dallanmış zincirli bir polisakkariddir. Dalların ortalama uzunluğu türe göre değişir ve ortalama uzunluk 24-30 glikoz artığı ihtiva eder. Esas zincirin glikozidik bağı α -1,4, fakat dallanma noktalarında α -1,6 bağları vardır.

Nişasta soğuk suda erimez. İyot çözeltisi ile amiloz koyu mavi, amilopektin mavi menekşe renk verir. Nişasta ise iyot ile kompleks renk verir. Nişasta ya sulu mineral asitler veya özel enzimler aracılığı ile hidroliz olurlar.

Nişasta molekülleri başlıca üç çeşit enzim tarafından tam bir hidrolize tabi tutularak D-glikoz moleküllerine parçalanır. Bunlardan birincisi **α -amilaz** denilen enzimdir. α -amilaz enzimi hayvanların salya ve pankreas salgısında bulunur. Bu enzim α -1-4 bağlarına etki yaparak düz amiloz zincirlerini rastgele parçalar. Ortamda glikoz ve maltoz karışımı meydana gelir. Bitkilerde bulunan **β -amilaz**

amilazın indirgeme yeteneği olmayan zincir ucundaki bağlarına etki yaparak maltoz ünitelerinin meydana gelmesine yol açar. α ve β -amilazlar amilopektinide etkilerler. Ancak düz zincirleri dallanma noktalarına kadar çözebilirler. Ancak 1-6 bağlarına yakın olan 1-4 bağları ile 1-6 glikozid bağları özel bir enzim tarafından çözülebilirler. Bu enzimin adı “Dallanmayı Bozan Enzim” veya “ α 1-6 glikozidaz” dır. Nişasta enzimlerin etkisiyle maltoz ve sonuç olarak da glikoz ünitelerine parçalanır.



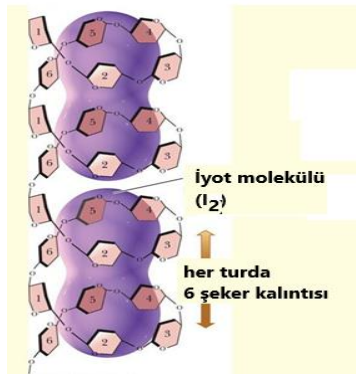
Şekil 17. Nişastanın yapısı (amiloz ve amilopektin ünitelerinden meydana gelir.)

POLİSAKKARİDLERİN ÖZELLİKLERİYLE İLGİLİ DENEYLER

İYOT TESTİ ve NİŞASTANIN HİDROLİZİ

1-İYOT TESTİ:

Deneyin prensibi: Bu test büyük polisakkarit moleküllerinin sahip olduğu absorpsiyon özelliğine dayalıdır. Polisakkaritler, mavi renkli kompleks oluşturmak üzere yüzeylerinde daha küçük iyot moleküllerini adsorbe ederler. Adsorpsiyon özelliği ısıtıldığında kompleksin dağılması ve bu nedenle rengin kaybolmasıyla sonuçlanır.



Şekil 18. Helikal bir yapı oluşturan Amiloz zincirinin ortasına I_2 molekülünün yerleşmesiyle mavi rengin oluşumu

Deneyin Yapılışı: 2 ml nişasta süspansiyonu alınır ve 2-3 damla iyot damlatılır. Mavi renk oluşur. Isıtıldığında renk kaybolur. Soğutulunca tekrar mavi renk kazanır.

Önemli notlar:

-Dekstrinlerden iyot ile kırmızı renk verenlere **eritrodekstrin**, renksiz olanlara **akrodekstrin** denir. **Amilodekstrin**, amilopektinin α (1-6) glikozidik bağlarının hidroliziyle oluşan düz zincirli bir dekstrin ya da kısa zincirli amiloz'dur ve İyotla mavi renk verir. **Limit dekstrin**, α (1-6) bağları hidroliz edilmemiş kısa zincirli dallanmış amilopektin artığıdır.

(**dekstrin**; nişasta ya da glikojenin HCl veya diğer asitlerle kuru ısıtılması ya da amilazlar gibi enzimlerle hidrolizi ile üretilen düşük moleküler ağırlıklı bir karbonhidrat grubudur. Dekstrinler α -(1-4) ya da α (1-6) glikozidik bağları ile bağlanmış D-glikoz birimlerinin polimer karışımlarıdır. Çok düşük viskoziteye ve çözünürlüğe sahiplerdir. Fırın ürünlerinde pasta ve tatlılarda renklendirici olarak kullanılırlar.)

-İyot testi polisakkaritler için spesifik bir testtir. **Glikojen ile iyot kahverengi renk verir.**

-Nişastanın amiloz bileşeni helikal bir yapıya sahiptir. İyotla muamele edildiğinde, iyot sarmalının içinde tutulur ve kompleks yoğun mavi renge sahip olur. Amiloz solusyonu ısıtıldığında helikal konformasyonu bozulur ve iyot bağlama kapasitesi kaybolur. Soğutulduğunda orjinal konformasyon yeniden sağlanır ve iyot bağlama kapasitesi yeniden düzelir (**Şekil 18**).

-Bazen az miktarlarda iyot ilave edildiğinde soğutulmayla renk tekrar oluşmayabilir. Çünkü ilave edilen iyot ısıtma ile buharlaşabilir.

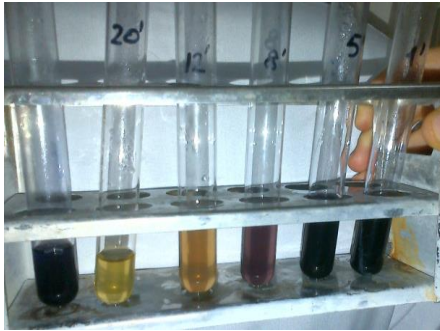
2- NİŞASTANIN ASİTLE HİDROLİZİ

Deneyin Prensipleri: Nişasta mineral bir asitle (HCl) hidroliz edilir ve hidroliz safhaları iyot ile verdiği değişik renklerden izlenir. Nişasta bir polisakkarittir ve indirgeyici özelliği yoktur. Bu nedenle deneyin başında Fehling (-)' dir. Hidroliz sonrası glikoz üniteleri meydana geleceği için Fehling (+) olur. Bu da nişastanın glikoz ünitelerinden oluştuğunu, asit ve ısının etkisiyle hidroliz olduğunu gösterir.

Deneyin Yapılışı: 100ml'lik erlene %1'lik nişasta süspansiyonunun 20ml'si alınır ve 2N HCl (1/4 oranında dilüe edilen yoğun HCl)'in 5ml'si eklenir. Karışım 5 tüpe, 5ml konarak paylaştırılır. Kaynar su banyosuna konur. Tüpler sırasıyla 1dak., 5dak, 8 dak, 12 dak, 20 dak. bekletilir ve süre sonunda kaynar sudan çıkarılır. Soğutulduktan sonra, tüplere 1-2 damla iyot (0,7 g iyot, 0,5 g KI üzerine 5ml distile su ilave edilir, karıştırıldıktan sonra üzerine %95'lik etil alkolden 95ml ilave edilir. Koyu renkli şişede saklanır.) damlatılır ve aşağıdaki tablodaki gibi değerlendirilir. 20 dak. da hidroliz tamamlandıktan sonra 5dak. daha kaynatılarak maltoz ve glikoz ünitelerinin oluşumu sağlanır. Deney sonunda 1dak. tüpe ve 25 dak. tüpe Fehling deneyi yapılarak sonuçlar değerlendirilir.

Tablo 1. Nişastanın hidroliz basamakları

Bekleme süresi (dakika)	İyotla verdiği renk	Fehling sonucu renk	deneyi oluşan	İndirgeyici özelliğin derecesi	Oluşan ürün
1	Mavi	Mavi		İndirgeyici değil	Nişasta
5	Mor menekşe	Yeşil		(+)	Amilodekstrin
8	Kırmızı menekşe	Kırmızı		(++)	Amilo ve Eritrodekstrin
12	Kırmızı	Kırmızı		(+++)	Eritrodekstrin
20	Renksiz	Kırmızı		(++++)	Akrodekstrin
25	Renksiz	Kiremit kırmızısı		(+++++)	Maltoz + Glukoz



I



II

Şekil 19. Nişastanın asitle hidrolizinin iyot testi ile gösterilmesi (I), Nişastanın hidrolizi sonucu Fehling (+) (II).

2-NİŞASTANIN TÜKRÜK (AMİLAZ) İLE HİDROLİZİ

Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 5 ml kadar nişasta süspansiyonu alınır. Üzerine 1 damla iyot çözeltisi veya dilüe lügol) eklenerek mavi rengin oluşması sağlanır. Daha sonra bu karışım ikinci bir tüpte toplanmış olan tükürük üzerine eklenip karıştırılır ve 37 °C'lik bir su banyosunda kendi haline bırakılır. Rengin hızla açıldığı gözlenir.

Tükürükteki amilaz etkisiyle nişasta molekülünün parçalanmaya başlaması iyot ile olan bağının çözülmesine ve rengin açılmasına neden olur. Daha ileri derecede bir hidrolizde mavi renk tamamen kaybolur.

Tükürükteki amilaz aktivitesinin bireysel farklılığı, ısıнын iyi ayarlanamaması gibi nedenlerle deney sürelerinin değişebileceği unutulmamalı ve bu yüzden de herkesin kendi bulgularını dikkate alması ve kaydetmesi daha doğru olacaktır.



Şekil 20. Nişastanın tükürük ile hidrolizi sonucu iyotdan kaynaklanan mavi rengin kaybolması

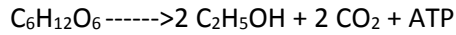
Tablo 2. Karbonhidratların deneylerde verdiği sonuçlar

TEST $\Rightarrow$ K.H. $\downarrow$	Molish	İyot	Benedict	Barfoed	Seliwanoff
Glikoz	+	-	+	+	-
Fruktoz	+	-	+	+	+
Laktoz	+	-	+	-	-
Maltoz	+	-	+	-	-
Sükroz	+	-	- (Asit hidrolizi sonrası +)	-	- (Asit hidrolizi sonrası +)
Niştasta	+	+	- (Asit hidrolizi sonrası +)	-	-

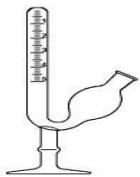
3-FERMANTASYON

Bazı şekerler maya ile karıştırılırsa CO₂ ve etil alkol meydana gelir. Bu reaksiyona fermantasyon denir ve oksijen kullanılmaz. Olay anaerobik bir parçalanmasıdır. Fermantasyon hassas bir yöntem olup bununla % 0.05 g şekeri kesin olarak göstermek mümkündür.

Deneyin Prensipleri: Şekerlerin oksijensiz ortamda maya etkisi ile etil alkol ve CO₂'e parçalanması ve açığa çıkan bu ürünlerin belirli testlerle kontrol edilmesi esasına dayanır.



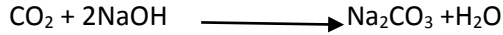
Deneyin Yapılışı: Deney Einhorn fermantasyon tüpleri ile yapılır. Bir deney tüpüne glikoz çözeltisi ve bir mercimek büyüklüğünde maya (ekmek mayası, şarap mayası, bira mayası vs...) konur ve iyice karıştırılır. Fermantasyon tüpü bu karışımla doldurulur. Tüpün kapalı kolunda hava kalmayacak şekilde ayarlanır. Açık ağız pamuk tıpa ile kapatılır. Ilık bir yerde bekletilir. Maya etkisi ile şeker etil alkol ve CO₂ 'e parçalanır. Oluşan CO₂ kapalı kolda toplanır. Bunun hacmi ölçülmek suretiyle şeker miktarı hesaplanabilir.



Şekil 21. Einhorn fermantasyon tüpü

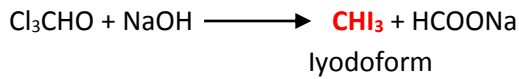
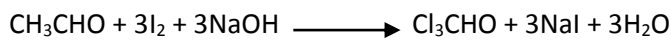
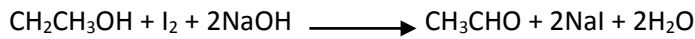
1-CO₂ Oluşumunun Gösterilmesi

Fermentasyon tüpüne %50'lik NaOH'den birkaç damla eklenip tüpün ağzı baş parmakla sıkıca kapatılarak kuvvetlice çalkalanırsa, aşağıdaki denklem uyarınca CO₂ ile NaOH birleşir ve Na₂CO₃ oluşur ve CO₂ gazının yerinde oluşan vakum etkisiyle baş parmağın tüpün içine doğru çekildiği hissedilir.

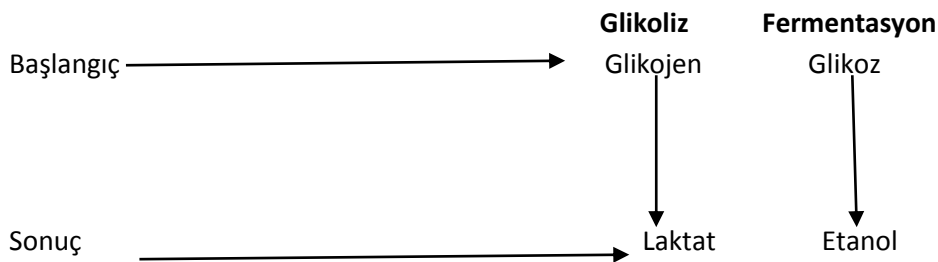


2-Etil Alkolün Gösterilmesi

Fermentasyonda etil alkol olduğu tüpe lügol (ya da iyot) çözeltisinden birkaç damla eklemekle sarı renkte özel kokulu (hastane kokusu) iyodoform (CHI₃) oluşumundan anlaşılır.



Canlı organizmalarda fermentasyonun karşılığı glikolizdir. İkisi arasındaki ayırım başlangıç ve sonuç reaksiyonlarının farklı oluşudur.

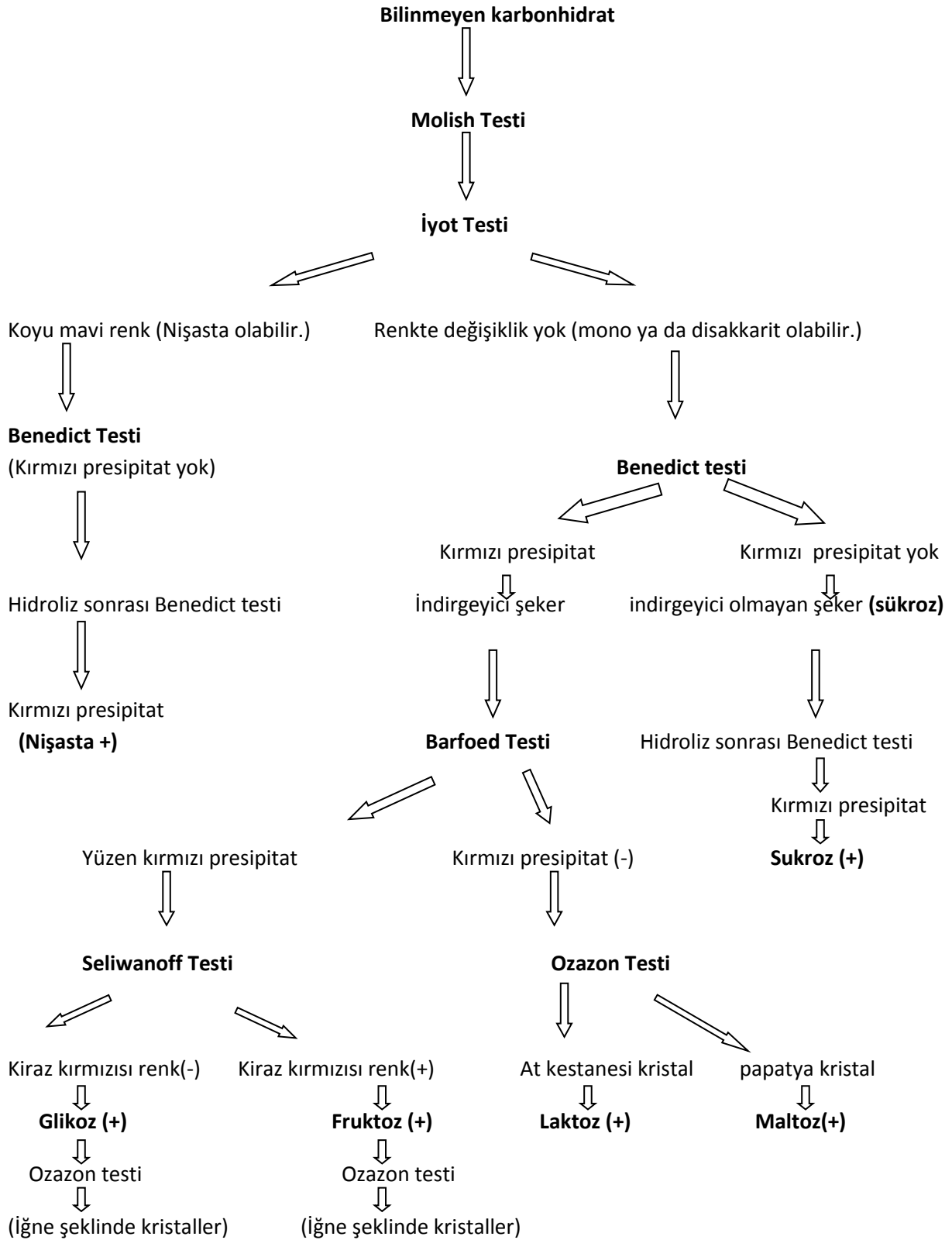


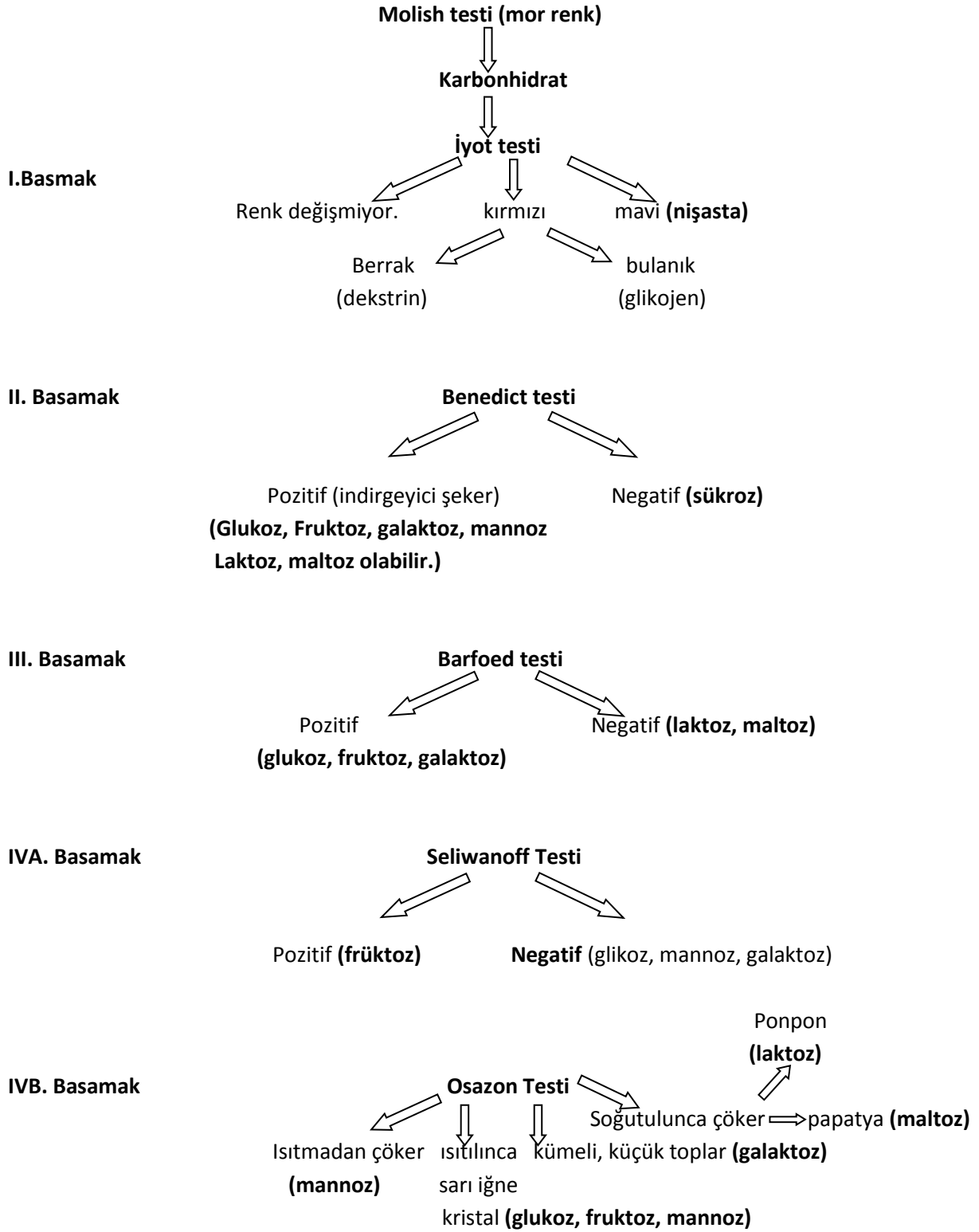
Laktat bir karbonhidrat değildir. Yüzme, koşma gibi durumlarda düzeyi yükselir ve kramplar şekillenir.

D-glikoz (dekstroz) ve D-früktöz (levüloz) bira mayası ile doğrudan, sakkaroz ve maltoz hidroliz sonucu, galaktoz ise yaklaşık 6 saat sonar az miktarda CO₂ meydana getirerek fermente olurlar. Arabinoz, ksiloz, riboz, ribuloz ve benzeri pentozlar ve laktoz bira mayası ile fermente olmazlar.

BİLİNMEYEN BİR KARBONHİDRATIN TANIMLANMASI

Şu ana kadar yapılan deneyler kullanılarak bilinmeyen bir maddenin karbonhidrat olup olmadığını, karbonhidrat olduğu takdirde, hangi tür karbonhidrat olduğu da tahmin edilebilir. Elimizde mevcut olan, katı veya çözelti halindeki bilinmeyen bir maddenin karbonhidratlar yönünden genel bir analizi yapılacağı zaman şemada (**Şekil 22-23**) verilen yol izlenir. Analize geçmeden önce, madde katı veya toz halinde ise çözündürülmelidir. Çözündüğü zaman polisakkaritlerin berrak hakiki bir çözelti vermediği (süspansiyon veya kolloid çözelti verdikleri) unutulmamalıdır.





Şekil 23. Bilinmeyen karbonhidratın tanımlanması

LİPİDLER

Lipidler genel olarak suda erimeyen, eter, kloroform, benzen ve aseton gibi organik çözücülerde eriyebilen organik biyomoleküllerdir. Lipidlerin, insan organizmasında, depo ve yapısal fonksiyonu önemlidir. **Trigliseritler**, enerji yedeğini oluşturmak üzere depolanırlar ve depo lipidler olarak bilinirler. Membranların ve steroid hormonların, vitamin D gibi bazı önemli maddelerin yapısını oluşturan fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterol yapısal lipidler olarak bilinirler.

Lipidlerin organizmada başlıca şu fonksiyonları vardır:

- Hücre membranlarının yapı taşı olarak bulunurlar.
- Metabolizma için gerekli hücresel yakıt maddesi olarak depo edilirler.
- Metabolizma için gerekli yakıtın taşınabilir şeklini oluştururlar.
- Böcekler ve bakterilerin hücre duvarlarını, bazı bitki yaprakları ve cilt için koruyucu madde olarak görev yaparlar.
- Canlılarda deri altı izolasyon maddesi ve önemli iç organlara destek olmak, koruyuculuk yapmak gibi görevleri vardır.

Lipidler organizmaya büyük oranda dışarıdan alınırlar. Az bir kısmıda doğrudan doğruya organizmada sentezlenebilir.

Lipidleri tanımlamak diğer organik maddeler olan karbonhidratlar ve proteinler kadar kolay değildir. Çok değişik yapıda birçok madde lipidler sınıfı içinde anılırlar. Karbonhidratların yapı taşı monosakkaritler, proteinlerin yapıtaşı aminoasitlerdir. Lipilerde ise bu anlamda bir yapı taşı yoktur. Ancak lipidler için ortak nokta **yağ asitleridir**. Tüm lipidler yağ asidi taşımazlar ama lipidler sınıfından kabul edilebilmeleri için en azından yağ asitleri ile esterleşebilir karakterde olmaları gereklidir. Lipidlere genel anlamda **Yağlar** da denir. Ama lipidlerin sınıflandırılması içinde yağlar sınıfı da bulunur. Lipidlerin sınıflandırılması için bir çok tanım yapılmıştır. En çok Bloor' un tanımı tercih edilir. Buna göre bir maddeye lipid diyebilmek için şu 3 özelliği taşıması gerekir.

- 1) Suda erimez, eter, kloroform, benzen ve aseton gibi yağ eriticilerinde eriyebilir nitelikte olmalıdır.
- 2) Canlı organizma tarafından kullanılabilir yapıda olmalıdır.
- 3) Yağ asitlerinin esterleri yada yağ asitler ile esterleşebilir özellikte olmalıdır.

LİPİDLERİN SINIFLANDIRILMASI

- I) YAĞ ASİTLERİ
- II) GLİSERİN TAŞIYAN LİPİDLER
 - A)NÖTRAL YAĞLAR
 - B)FOSFOGLİSERİTLER
- III) GLİSERİN TAŞIMAYAN LİPİDLER
 - A) SFİNGOLİPİDLER
 - Seramidler
 - Sfingomiyelinler
 - Glikosfingolipidler
 - B) ALİFATİK ALKOLLER VE MUMLAR
 - C) TERPENLER
 - D) STEROİDLER

IV) DİĞER SINIF BİLEŞİKLERE BAĞLI LİPİDLER

- A) LİPOPROTEİNLER
- B) PROTEOLİPİDLER
- C) FOSFATİDOPEPTİDLER
- D) LİPO-AMİNO ASİTLER
- E) LİPOLİSAKKARİTLER

Yağ Asitleri: Genel formülü $R-COOH$ olan genelde uzun zincirli monokarboksilik asitlerdir. Doğada bulunan yağ asitleri düz zincirli olup, genellikle çift sayıda karbon atomuna sahiptirler. Ancak tek sayıda karbon atomu taşıyan yağ asitleri de bulunur. Genellikle taşıdıkları karbon sayısı 2-34 arasında değişir.



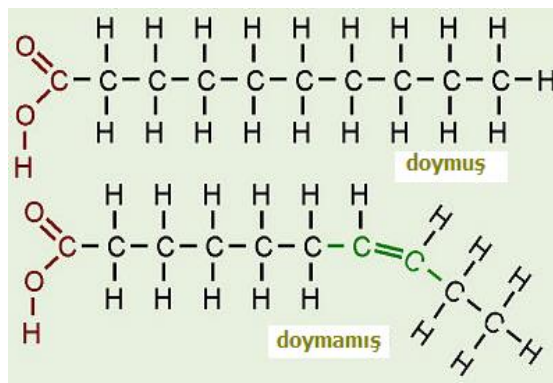
Şekil 24. Bir yağ asidinin genel formülü

Yağ asitleri monokarboksilik asitlerdir. Yani zincirlerinde tek bir karboksil grubu ($COOH$) yer alır. Yine yapıları içerisinde çift bağa sahip olabilirler. Birden fazla çift bağa sahip olan yağ asitleri de mevcuttur. Yağ asitleri çift bağları doyurularak doymuş hale getirilebilirler. Yağ asitleri **doymuş yağ asitleri** ve **doymamış yağ asitleri** olarak iki grupta incelenir.

Doymuş yağ asitlerinden asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit uçucu yağ asitleri olarak bilinir ve ruminant metabolizmasında önemli bir yer tutar. Doymuş yağ asitlerinden, hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri 16 karbonlu **palmitik asit** ve 18 Karbonlu **stearik asittir**.

Doymamış yağ asitlerinden, hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri 16 karbonlu ve tek doymamış bağa sahip **palmitoleik asit** ve 18 karbonlu ve yine tek doymamış bağa sahip **oleik asittir**. 18 karbonlu ama iki doymamış bağa sahip **linoleik asit**, ve 20 karbonlu dört doymamış bağa sahip **araşidonik asittir**.

Doğada en çok bulunan yağ asitleri: Oleik asit, palmitik asit, miristik asit ve stearik asit'dir. Önemli yağ asitlerinin çoğu 18 karbonludur.



Esansiyel Yağ Asitleri

Hayvansal organizmada ancak bir tek çift bağılı yağ asitleri sentezlenebilmektedir. Birden fazla doymamış bağıya sahip olan linoleik, α -linolenik ve araşidonik asitler hayvansal organizmada sentez edilemez ve mutlaka dışarıdan alınması gereklidir. İşte organizmada sentezlenemeyen ve besinlerle/rasyonla birlikte alınması gerekli olan **linoleik, linolenik ve araşidonik asitlere** esansiyel yağ asitleri denir. Bu yağ asitlerinin organizmaya yeterli miktarlarda alınamaması sonucunda büyüme durur, dermatitis oluşur. Böbreklerde harabiyet ve hematüri (kan işeme) görülür. Esansiyel yağ asitleri verilirse bu belirtiler kaybolur.

Linoleik asit mısır yağı, yer fıstığı, pamuk yağı ve soya fasülyesi yağı gibi tohum yağlarında, linolenik asit ise bunların dışında keten tohumu yağında bulunmaktadır. Araşidonik asit ise aynı kaynaklarda, ancak yer fıstığı yağında daha fazla miktarda bulunmaktadır.

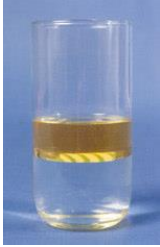
Tablo 3. Dokularda bulunan bazı yağ asitleri

ÖZEL İSİM	SİSTEMATİK İSİM	C SAYISI	ÇİFTE BAĞ SAYISI	ÇİFTE BAĞ(LAR)IN YERİ	DOYMAMIŞ YAĞ ASİDİ SINIFI
Laurik asit	Dodekanoik asit	12	0		
Miristik asit	Tetradekanoik asit	14	0		
Palmitik asit	Heksadekanoik asit	16	0		
Palmitoleik asit	Heksadekanoik asit	16	1	9	Omega-7
Stearik asit	Oktadekanoik asit	18	0		
Oleik asit	Oktadekanoik asit	18	1	9	Omega-9
Linoleik asit	Oktadekadienoik asit	18	2	9, 12	Omega-6
Linolenik asit	Oktadekatrienoik asit	18	3	9, 12, 15	Omega-3
γ -Homolinolenik asit	Eikozatrienoik asit	20	3	8, 11, 14	Omega-6
Araşidonik asit	Eikozatetraenoik asit	20	4	5, 8, 11, 14	Omega-6
EPA	Eikozapentaenoik asit	20	5	5, 8, 11, 14, 17	Omega-3
DHA	Dokozaheksaenoik asit	22	6	4, 7, 10, 13, 16, 19	Omega-3

LİPİDLERİN KALİTATİF TESTLERİ

1- Fiziksel Test: Kağıdın üstüne az miktarda yağ damlatılır. Kağıda yapışan yağın kaygan bir leke oluştuğu görülür. Çünkü yağ su gibi kağıdı ıslatmaz.

2- Yoğunluk Testi: Lipidler sudan daha hafiftir. Bir deney tüpüne 5 ml su konur ve 1 damla yağ ilave edilir. Yağ yoğunluğu daha az olduğu için suyun üzerinde yüzer.

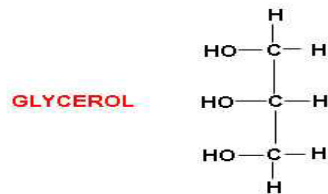


Şekil 25. Yağın sudan daha az yoğun olduğunun gösterilmesi

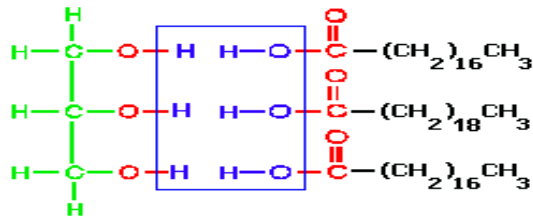
3. Çözünürlük: Su, soğuk alkol, kloroform'da 2-3 damla zeytinyağının çözünürlüğü test edilir. Yağ suda ve soğuk alkolde çözünmezken kloroform, eter ve benzende çözünür.

4. Akrolein Deneyi (Gliserol testi)

Gliserol, tatlı, kıvamlı, sıvı ve üç hidroksilli bir alkoldür. Su ve etil alkolle her oranda karışabilir. Eter, kloroform ve benzolde çözünmez. Gliserol, bir çok madde için çok iyi bir çözücüdür. Su çekici ve nemlendirici özelliğe sahip olduğundan kozmetik ve ilaç yapımında kullanılır. Gliserol hafif alkalik ortamda demir tuzlarının katalitik etkisi altında hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksitlenirse gliseraldehit ve dihidroksiaseton meydana gelir.



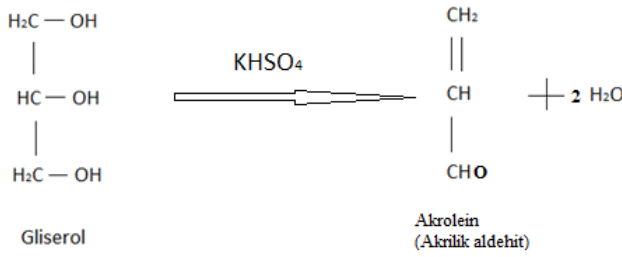
Nötral lipidler oluşurken 1 mol gliserol ile 3 yağ asidi ester bağlarıyla birbirine bağlanır ve 3 mol su açığa çıkar.



Şekil 26. Triasilgliserolün meydana gelişi.

Deneyin Prensipleri: Gliserin anhidr potasyum hidrojen sülfat ($KHSO_4$) ile muamele edilirse ısının da etkisiyle 2 mol su kaybederek doymamış bir aldehit olan akroleine dönüşür. Akrolein (akrilik aldehid) iğneleyici karakteristik bir kokuya sahiptir.

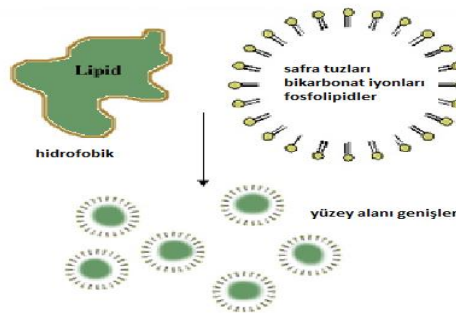
Deneyin Yapılışı: Deney için bir deney tüpüne 1-2 spatül ucu (1.5 g) anhidr potasyum hidrojen sülfat ve 1,2 damla gliserin konur ve tüp ısıtılır. Akroleinin iğneleyici karakteristik kokusu duyulur.



Akrolein deneyi, gliserin yerine herhangi bir yağ ile tekrarlandığında akrolein kokusu alınırsa, o yağın hakiki yağ olduğu, diğer bir ifade ile gliserin ve yağ asitlerinin esteri olduğu anlaşılır. Kısaca yağların tanınma deneyidir.

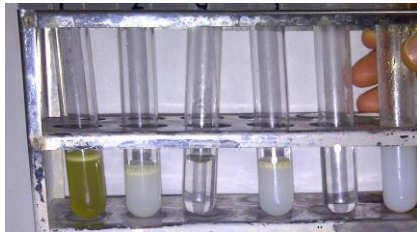
5. Emülsiyon Teşkili Deneyi

Deneyin Prensibi : Emülsiyon hem çözünen hem de çözen ortamın sıvı olduğu kolloidal bir çözeltidir, fakat karışmazlar. Sıvı yağlar su ile kaba ve stabil olmayan emülsiyon oluştururlar. Misel oluşturarak sudan uzaklaşırlar. Ancak, sabun, deterjan, protein, safra vb. emülgatör (emülsiyon yapıcı) maddelerin varlığında elde edilen yağ-su emülsiyonu, emülsiyon yapıcı madde miktarına bağlı olarak oldukça dayanıklıdır.



Şekil 27. Yağların safra, fosfolipid ve bikarbonat ile emülsiyon oluşturması

Deneyin Yapılışı : 4 deney tüpü alınır ve bunlardan 1. tüpe su, 2. tüpe su ve birkaç damla seyreltik (%1) Na_2CO_3 çözeltisi, 3. tüpe su ve birkaç damla deterjan çözeltisi 4. tüpe ise su ve birkaç damla safra çözeltisi eklenir. 4 tüpe de iğser damla yağ eklenir. Tüpler emülsiyon teşekkülü yönünden incelenir ve sıralanır.



Şekil 28. Emülsiyon teşekkülü deneyi

6. Dayanıklı ve dayanıksız emülsiyon hazırlanması

Deneyin Prensipleri: Serbest yağ asitleri ve Na_2CO_3 varlığında oluşan sabun etkisiyle yağ-su emülsiyonu dayanıklıdır.

Deneyin Yapılışı: Dört deney tüpü alınır ve bu tüplere aşağıda gösterildiği şekilde maddeler konur.

Madde	1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	4.Tüp
Su	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Na_2CO_3	1 damla	-	1 damla	-
HCl	-	1 damla	-	1 damla
Acılaşmış Zeytinyağı	1 damla	1 damla	-	-
Asitsiz Zeytin Yağı	-	-	1 damla	1 damla

Bütün tüpler iyice çalkalanır. 1. Tüpte süt manzarasında dayanıklı emülsiyon oluşmasına karşılık diğer tüplerde birkaç dakika sonra bir ayrılma meydana gelecektir.



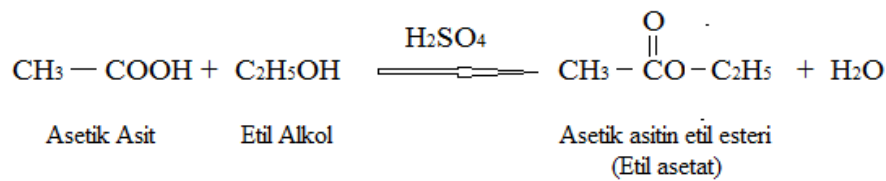
Şekil 29. Dayanıklı ve dayanıksız emülsiyon oluşumu

Asitsiz zeytinyağı, zeytinyağının birkaç spatül dolusu ince toz halindeki $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ile çalkalandıktan sonra kuru bir filtreden geçirilmesi ile hazırlanır.

Acılaşmış zeytinyağı serbest yağ asitleri ihtiva eder. Bunlar ise alkali ile (Na_2CO_3) sabun teşkil ederler. Oluşan sabun polar ucu ile su moleküllerine, apolar ucu ile de yağ moleküllerine yaklaşır ve geçimsiz bu iki molekülü geçimli hale getirir (emülgatör etki).

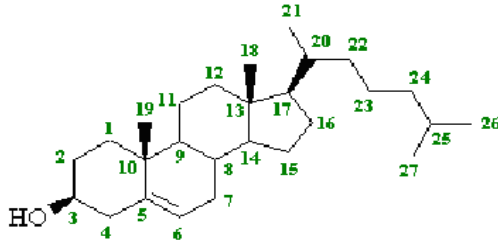
7. Ester Teşkili Deneyi

Deneyin Prensipleri: Triaçilgliseroller yağ asitlerinin gliserol ile yaptıkları esterlerdir. Bu deney ile yağ asitlerinin esterleşme özellikleri gösterilecektir. Bir katalizör varlığında asitler alkolle birleşerek esterleri oluştururlar.



Deneyin Yapılışı : Bir deney tüpüne 1 ml etil alkol, 1 ml asetik asit ve 1 ml yoğun sülfirik asit konup birkaç dakika beklenir. Karışım, içerisinde su bulunan bir behere dökülürse, asetik asit ile etil alkol arasında ester bağı oluşması nedeniyle asetik asitin iğneleyici kokusunun yerini asetik asidin etil esterinin hoş, meyve esansı kokusuna bıraktığı gözlenir.

Kolesterol, hayvansal kökenli bir steroid'dir. İlk kez 1775 yılında insan safra taşından izole edilmiştir, insan safrasında bol miktarda bulunur.



Şekil 30. Kolesterol'ün yapısı

KOLESTEROLÜN BİYOFONKSİYONLARI

- Kolesterol, impulsların oluştuğu ve taşındığı beyin ve sinir sisteminde yalıtıcılık görevi görür.
- Kolesterol, insan ve hayvanlarda hücre membranları ve subsellüler partiküllerin yapısal elemanlarından. Kolesterol, hayvansal dokularda en çok beyin, sinir dokusu, adrenal bezler ve yumurta sarısında hem serbest halde hem de esterleşmiş halde bulunur.
- Kolesterol, antihemolitik etkiye sahiptir.
- Serbest kolesterol, mikrozomlardaki bazı enzimlerin regülasyonuna katkıda bulunur.
- Kolesterol oksitlenir ve konjuge çift bağ içerirse deride bulunan 7-dehidroksikolesterol meydana gelir. 7-dehidroksikolesterol UV ışığa maruz kalırsa **kolekalsiferol** (vitamin D3) oluşur.
- Kolesterol, steroid hormonların ve safra asitlerinin ön maddesidir.

KOLESTEROLÜN ÖZELLİKLERİ

Kolesterol beyaz kristalli, tatsız ve kokusuz bir maddedir. Kolesterol, organik çözücülerde, sıcak alkolde, sıvı ve katı yağlarda çözünür. Kolesterolün elektrik iletkenliği çok azdır.

-Kolesterol molekülünde 3 nolu karbondaki hidroksil grubu, yağ asitleriyle esterleşir ve **kolesterol esterlerini** oluşturur

-Kolesterolün renk reaksiyonu verici özellikleri vardır. Kolesterolün reaktiflerle verdiği kırmızı ya da yeşil renkler, halokromlar adını alırlar. Bunlar, kolesterolün polimerleşerek yüksek molekül ağırlıklı doymamış hidrokarbonların oluşmasına bağlanmaktadır.

KOLESTEROL DENEYLERİ

1-Salkowski Deneyi:

Deneyin Prensipleri: Güçlü asitlerin varlığında, kolesterol dehidrasyona uğrar ve daha sonra dimer bir kompleks oluşturur. Bu kompleks sülfonasyonla yeşil renk ve kırmızı renk oluşturur.

Yapılışı: Bir deney tüpüne 2 ml kolesterolün kloroformdaki (%1) çözeltisinden konur. Üzerine dikkatli olarak 2 ml konsantre H_2SO_4 tabakalandırılır. Tabakaların temas yerinde kloroform kırmızıya boyanır, asit ise sarı-yeşil fluoresan gösterir.

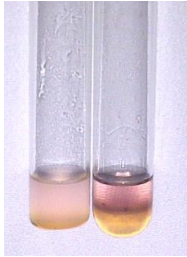


Şekil 31. Salkowski deneyi sonucu oluşan kırmızı ve yeşil halka

2-Liebermann-Burchard Deneyi:

Deneyin Prensibi: Kolesterol, anhidrasetik asit ve sülfirik asitle renk tepkimesi verir ve mavimsi-yeşil, gül renkli bir bileşik oluşturur. Kısaca renkler kolesterolün sülfonasyonu, asetilasyonu ve yeniden düzenlenmesi ile meydana gelir.

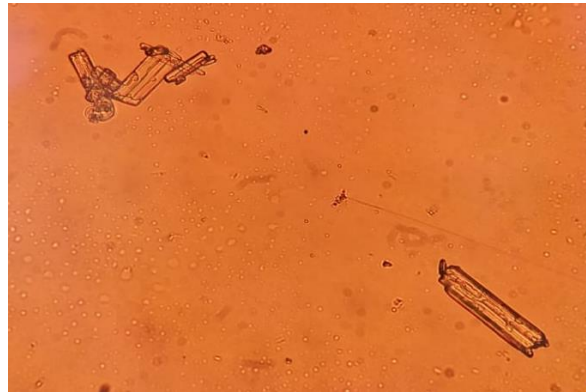
Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 1 ml kolesterolün kloroformdaki (%1) çözeltisinden konur. Tüpteki çözelti üzerine 10 damla asetik asit, 3 damla konsantre H_2SO_4 eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra karanlıkta bekletilince mor-menekşe ve sonunda gül rengi bir renk kolesterol varlığını gösterir.



Şekil 32. Liebermann-Burchard deneyi sonunda mor-menekşe ve gül rengi halka

3- Kolesterol kristallerinin mikroskopta incelenmesi

1ml %40'lık etil alkole birkaç parça kolesterol eklenir. Hafifce ısıtılır. Birkaç damla su ilave edilir ve soğutulur. Çökelti mikroskopta incelenir. Köşeleri kırık rombik şekilli kolesterol kristalleri gözlenir.

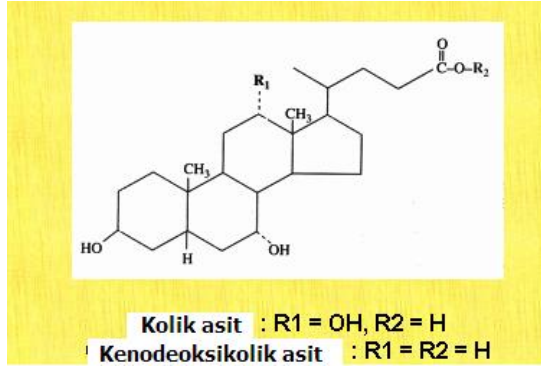


Şekil 33. Mikroskopta kolesterol kristallerinin görünümü

SAFRA ASİTLERİ

Safra asitleri, 24 karbonlu steroidlerdir; kolanik asidin oksi türevleridirler.

Safra asitleri, yapılarındaki steran halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu ve 5 karbonlu yan zincirlerinde bir karboksil grubu içerirler.



Kolic asit (3,7,12-Trihidroksikolanik asit) ile kenodeoksikolik asit (3,7-Dihidroksikolanik asit), **primer safra asitleri** olarak bilinirler.

Deoksikolik asit (3,12-Dihidroksikolanik asit) ile litokolik asit (3-Hidroksikolanik asit) **sekonder safra asitleri** olarak bilinirler.

İnce bağırsaktaki safra asitlerinin %90'ı ileumdan emilerek portal dolaşım yoluyla karaciğere gelirler ve safra ile tekrar ince bağırsağa atılırlar. Safra asitlerinin ince bağırsağa atıldıktan sonra emilerek karaciğere dönmeleri ve tekrar ince bağırsağa atılmaları, **enterohepatik dolaşım** olarak tanımlanır.

Safra Renkli Maddeler (Hemoglobin Yıkım Ürünleri)

70kg ağırlığındaki bir insanın kan dolaşımında yaklaşık 750g hemoglobin vardır ve her gün yaklaşık 6,25 ml'si üretilir ve yıkılır. Hemoglobinin yıkım ürünleri bilirubin ve biliverdin gibi safra pigmentleridir. Safra pigmentleri metilen ya da metin gruplarıyla birbirine bağlı 4 pirol halkasından meydana gelir. Onlar, karaciğer, dalak ve kemik iliğinin RES hücrelerinde biliverdine bağlı alfa metin köprüsünün yıkımıyla oluşan protoporfirinden köken alırlar. Biliverdin ilk safra pigmentidir ve insan safrasındaki temel pigmenti olan bilirubine kolayca indirgenir. Bilirubin albümine bağlanarak plazmadan karaciğere taşınır. Karaciğerde glukuronik asitle konjuge olarak bilirubin diglukuronid ve daha az olarak da bilirubin monoglukuronide dönüşür. Konjuge bilirubin safra aracılığıyla karaciğerden ince barsaklara akıtılır. Burada bakteriyel enzimlerle sterkobilinojene ve ürobilinojene indirgenir. Ürobilinojenin bir kısmı ürobiline ve sterkobilinojen de sterkobiline okside olur. Barsaklarda okside olmayan ürobilinojen karaciğere döner (enterohepatik dolaşım) ve yeniden safraya salgılanmak üzere bilirubine okside olur.

Ürobilin, sterkobilin gibi barsaklarda normal şartlarda şekillenir. Sterkobilin feçes ile atılır ve feçese kahverengi renk verir.

3-Rosin Deneyi:

Deneyin Prensipleri: Bilirubin'in oksitlenerek biliverdine dönüşmesi esasına dayanır.

Deneyin Yapılışı: Çok sulandırılmış safra, %1'lik iyot eriyiği (0,7 g iyot, 0,5 g KI üzerine 5ml distile su ilave edilir, karıştırıldıktan sonra üzerine %95'lik etil alkolden 95ml ilave edilir. Koyu renkli şişede saklanır.) ile tabaka yapılırsa 1 dakika içinde temas yüzeyinde bilirubinin oksidasyonu sonucu yeşil renkte halka oluşur.



Şekil 37. Rosin deneyi sonucu, iyot tabakasının altında oluşan mavi yeşil halka

B- SAFRA ASİTLERİ TAYİNİ

Pettenkofer Deneyi:

Deneyin Prensipleri: Pentozların yoğun sülfirik asit etkisi ile su kaybetmesiyle oluşan furfural ve heksozların su kaybetmesiyle oluşan 5-hidroksimetil furfuralin, safra asitleriyle kırmızı renkli kompleks oluşturması prensibine dayanır.

Deneyin Yapılışı: Fizyolojik tuzlu su ile sulandırılmış safra eriyiğinden 1 ml alınır ve içerisinde birkaç sakkaroz kristali eritildikten sonra üzerine yoğun sülfürik asit ile tabaka yapılır. Bir kaç dakika içinde kiraz kırmızısı bir renk oluşur.



Şekil 38. Pettenkofer deneyi sonucu oluşan kiraz kırmızı halka

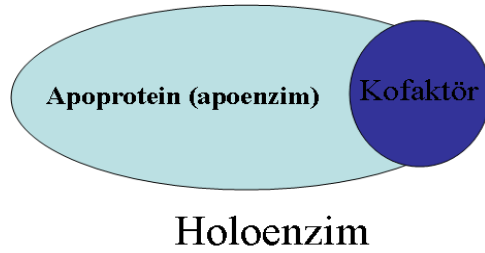
Deneylerin Amacı ve Önemi: Fouchet, Gmelin ve Rosin deneylerinin ortak amacı bilinmeyen bir sıvıda ya da idrarda bilirubin varlığını göstermektir. Normal şartlarda idrarda bilirubin bulunmaz. İdrarda bilirubinin varlığı patolojik bir durumdur. (Tıkanma sarılığı, hepatit). Pettenkofer Deneyinin amacı da aynı şekilde idrarda safra asitlerinin varlığını göstermede kullanılır. Yani idrara ya da biyolojik sıvılara safra karışmış ise bu deneyle pozitif sonuç verir.

ENZİMLER

Enzimler, kendisi parçalanmadan veya değişikliğe uğramadan kimyasal reaksiyonu katalizleyen moleküllerdir; biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleri, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Laboratuvar ortamında çok yüksek veya çok düşük basınç, pH ve sıcaklıkta oluşan kimyasal değişme ve reaksiyonlar, canlı hücrelerin bozulmadan kalabildikleri dar basınç, pH ve sıcaklık aralığında, ancak enzimler aracılığıyla gerçekleştirilebilirler.

Küçük bir grup katalitik RNA moleküllerinin haricinde tüm enzimler protein yapısındadırlar. Katalitik aktiviteleri genellikle proteinin doğal yapısında olmasına bağlıdır. Eğer bir enzim denatüre olur veya alt ünitelerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur.

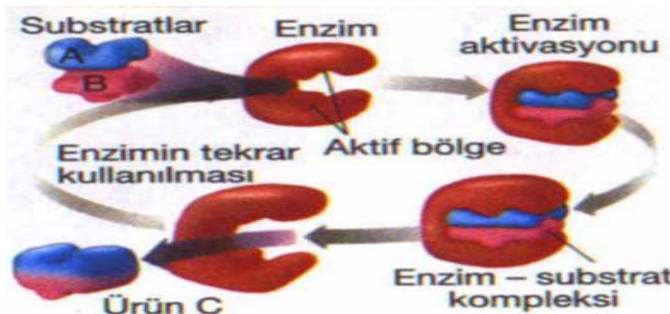
Bazı enzimler aktivite göstermek için bir veya daha fazla anorganik iyon veya kompleks organik veya metallorganik bileşiklere ihtiyaç gösterirler. Bu iyon ya da bileşiğe **kofaktör** adı verilir. Kofaktör, ya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla **inorganik iyon** ya da **koenzim** denen kompleks bir moleküldür. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile çok sıkı bir şekilde bağlanmış ise **prostetik grup**, çok sıkı bağlanmamış ve dissosiyeye olabiliyorsa **koenzim** adını alır. Katalitik olarak etki gösteren tam enzime **holoenzim** denir. Holoenzimin protein kısmına ise **apoenzim** adı verilir.



Enzimin etki ettiği bileşiğe **substrat** adı verilir. Enzimin katalizlediği reaksiyonu proteinin tamamı değil, sadece “**aktif bölge**” adı verilen belirli bir bölgesi etkiler.

Enzim aktiviteleri, **enzim ünitesi** cinsinden verilir.

1 enzim ünitesi, optimal şartlarda (optimal ısı ve optimal pH) 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim aktivitesidir; buna uluslararası ünite adı verilir. Günümüzde enzim ölçüm birimi olarak genelde bu ünite kullanılır; IU veya kısaca U şeklinde kısaltılır.



Şekil 39. Enzimatik reaksiyon basamakları

Enzimlerin sınıflandırılması;

1. Oksidoredüktazlar

2. Transferazlar

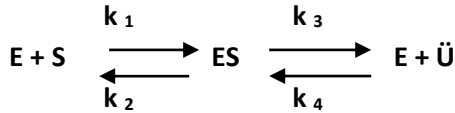
3. Hidrolazlar

4. Liyazlar

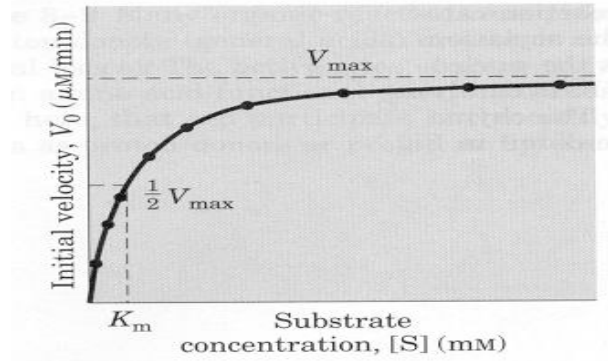
5. İzomerazlar

6. Ligazlar

E=Enzim, S= Substrat, ES= Enzim-Substrat kompleksi ve P= Ürün olmak üzere enzim reaksiyonu şu şekilde özetlenebilir



Bir enzimatik reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonuna **“Michaelis-Menten sabiti”** denir ve K_m ile gösterilir. *Enzimatik bir reaksiyon için K_m , başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun ($[S]$) bir fonksiyonu kabul ederek grafik çizmek suretiyle deneysel olarak saptanabilir*



Şekil 40. Bir enzimatik reaksiyonun substrat $[S]$, hız (V) grafiği

K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_m değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimal hız sağlar. K_m değeri 10^{-6} M (10^{-3} mM) ve daha düşük olan enzimler yüksek affiniteli enzimlerdir ki bunların metabolizmada büyük önemi vardır.

K_m değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir.

Enzimatik bir reaksiyonun hızı;

- Substrat konsantrasyonuna,
- Enzim konsantrasyonuna,
- Isıya,
- pH'ya,
- Ortamda inhibitör bulunup bulunmadığına,
- Diğer faktörlere bağlıdır.

Enzimatik ölçümler için uygun biyolojik materyaller:

Biyolojik sıvılar: Kan, BOS, amniyon sıvısı, idrar, seminal sıvı, eritrositler, lökositler, doku biyopsi örnekleri, doku hücre kültürleri'dir.

Kan enzimlerinin aktivite tayinlerinde dikkat edilecek noktalar

- 1-Kan, antikoagülansız tüpe (düz tüp) alınmalıdır.
- 2-Kan genellikle venden alınır.
- 3-Kan alırken hemolizden kaçınmalıdır.
- 4-Kan, pıhtılaşmasından hemen sonra santrifüj edilerek serum ayrılmalıdır.
- 5-Günlük taze kan kullanılması en iyisidir.

ENZİMLERİ TANIMLAMA DENEYLERİ

1-KATALAZ DENEYİ:

Deneyin prensibi: Eritrositlerin katalaz aktivitesi vardır. Katalaz enzimi, hidrojen peroksidi (H_2O_2), su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) parçalayarak hücre membranları için zararlı olan H_2O_2 'i zararsız hale dönüştürür. Enzim aktivitesi oluşan ürünün (oksijenin) gözlenmesiyle tespit edilir. Buna göre, deneyde meydana gelen reaksiyon şu şekildedir;



Substrat Enzim Ürün

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1-2 damla kan, 2-3 ml su ile sulandırılır. Karışım iki tüpe paylaştırılır. Tüplerden birisi kısa süre kaynatılır. Sonra soğutulur. Daha sonra her iki tüpe birlikte birkaç damla %3 H_2O_2 eklenir. Deney tüpleri, moleküler oksijenden ileri gelen köpürme yönünden kontrol edilir.



Şekil 41. Solda katalaz aktivitesi sonucu oluşan gaz çıkışı, en sağda ise ısıtıldıktan sonraki görünümü.

Deneyin Amacı ve Önemi: H_2O_2 kendiliğinden fakat yavaş olarak su ve moleküler oksijene parçalanmaktadır. Katalaz enzimi, H_2O_2 ' in su ve moleküler oksijene parçalanmasını hızlandırır. (organik katalizör). Hızlandırılmış bu olayda moleküler oksijenin çıkışı, kabarcıklar veya köpürme ile belli olur. Böylece eritrositlerdeki katalaz aktivitesi gösterildi. Isı ile bu aktivitenin ortadan kalktığı gözlemlendi.

	H ₂ O oluşumu	O ₂ oluşumuna bağlı köpürme
Kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına getirilmiş kan + H ₂ O ₂	yok	yok
Oda sıcaklığındaki kan + H ₂ O ₂	var	var

Not: Deney kan yerine bir parça patates kullanılarak tekrarlanırsa gaz çıkışı gözlenir, çünkü patatestede katalaz enzimi vardır.

Kan veya patates ısıtıldıktan sonra deney yapılırsa gaz çıkışı gözlenmez, çünkü ısıtma ile bir protein olan katalaz enzimi denatüre olur ve özelliklerini kaybeder.

NÜKLEİK ASİTLER

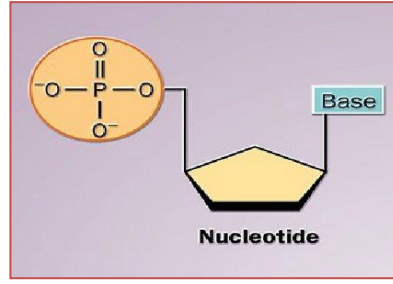
Nükleik asitler her hücrede bulunan genler ve kalıtsal faktörlerle ilgili protein sentezinin anahtar maddeleridir. İlk kez hücre çekirdeğinden izole edildiği için adına “**nüklein**” yada “**nüklein maddesi**” denmiştir. Bunlar sadece hücre çekirdeğinde değil hücrenin diğer kısımlarında özellikle ribozomlarda, mitokondrilerde ve sitoplazmada da bulunurlar.

Nükleik asitler, nükleotidlerin polimerleridir ve bir hücrede meydana gelen herşey için önceden planlanlayıcıdır. Başlıca nükleik asitler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)’dır. Nükleik asitler kalıtsal bilgileri depolar ve aktarırlar, hücrelerin en önemli ve en büyük molekülleridir.

DNA ve RNA molekülleri birçok bakımdan birbirlerine benzemektedir. Genel yapı bakımından birbirinin benzeridirler. Ancak bir takım farklılıklar vardır ve bunları şu şekilde sıralayabiliriz.

1. DNA’nın yapısında deoksiriboz şekeri, RNA’nın yapısında riboz şekeri bulunur.
2. DNA’nın yapısında adenin, timin, sitozin ve guanin bulunur. Yani DNA’daki timin yerine RNA’da urasil bazı girmektedir.
3. DNA hemen hemen her zaman çift sarmal yapıda bulunur. İstisna olarak bazı virüslardaki DNA tek sarmaldır. RNA’lar hemen hemen her zaman tek zincir halinde bulunurlar. Nadir hallerde örneğin, tRNA yapısında kısmi çift sarmal yapı meydana getirirler.
4. DNA her zaman kalıtsal özelliği taşıyan molekül olarak ödev yapmaktadır. RNA’lar çoğu zaman yapısal ödev yapmakta veya protein sentezinde genetik bilginin DNA’dan proteine aktarılmasında aracı rolü oynamakta ve ancak çok nadir hallerde bazı virüslarda kalıtsal bilgiyi taşıyan bir molekül olarak hareket etmektedirler.

Proteinlerdeki polipeptid zincirleri gibi nükleik asitler de nükleotidlerden kurulur. Nükleotidler, **1:1:1 oranında azotlu baz, pentoz ve fosfat** olmak üzere üç karakteristik komponente sahiptirler. Azotlu baz ve pentozun birbirine β -N-glikozit bağıyla bağlanmasıyla nükleozid oluşur, nükleozide fosfatın bağlanmasıyla nükleotid (mononükleotid, nükleozid monofosfat) oluşur.

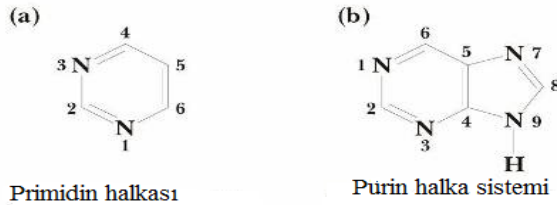


1. Azotlu Bazlar

Nukleik asitlerin yapısında yer alan bazlar pirimidin ve purin bazlar olarak başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Pirimidinler yapılarında iki azot (N) bulunan ve altıgen bir halkaya sahip bileşiklerdir. Yapıdaki numaralama sistemi halkanın altında bulunan azottan başlar ve saatin işleyiş yönüne doğru devam eder. Nukleik asit yapısında sıklıkla yer alan üç **pirimidin** bilinmektedir ve bunlar **sitozin, urasil ve timindir**. Bunlardan timin ve sitozin nükleik asitlerden DNA yapısında, urasil ve sitozin ise RNA yapısında yer almaktadır.

Purinler altıgen pirimidin halkasına beşli bir imidazol halkasının bağlanması ile purin bazlarının ana halkasal yapısı oluşur. Purin ana halkasal yapısında numaralama pirimidin altıgen halkasında bulunan yukarıdaki azottan başlar ve saatin işleyiş yönünün aksine devam eder ve imidazol halkasında ise tekrar saatin işleyiş yönünde numaralama devam eder. Nukleik asitin yapısında başlıca iki **purin** bazı bulunmaktadır ve bunlar **adenin ve guanindir**.

Daha az sıklıkla rastlanan purin bazları ise **ksantin, hipoksantin ve ürik asittir**. Doğal olarak meydana gelen bu purin bazları daha çok purin metabolizmasında rol oynamaktadırlar.

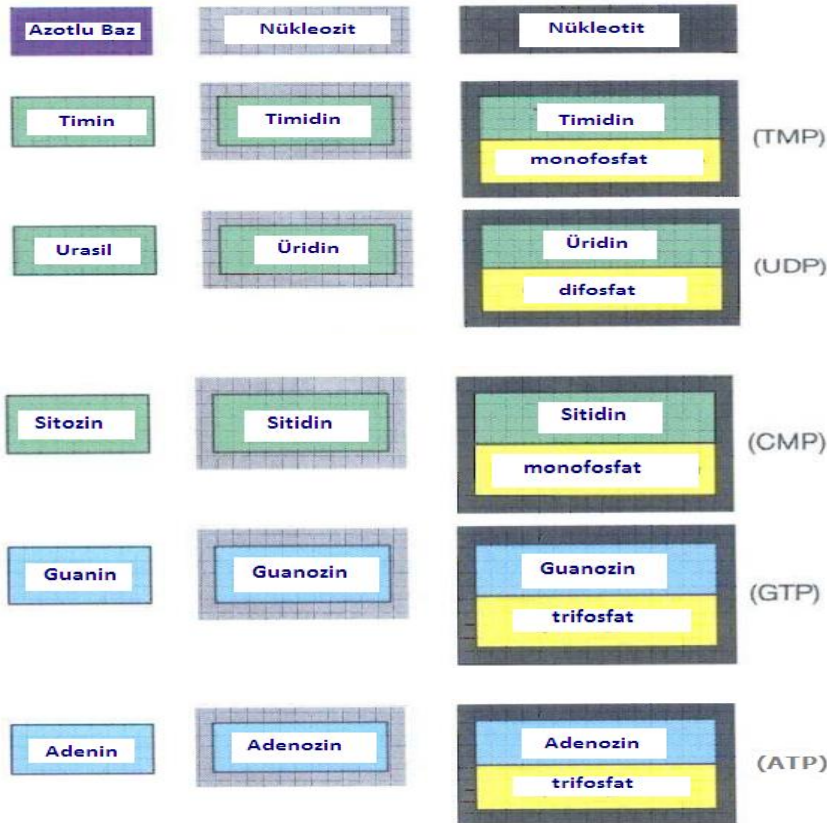
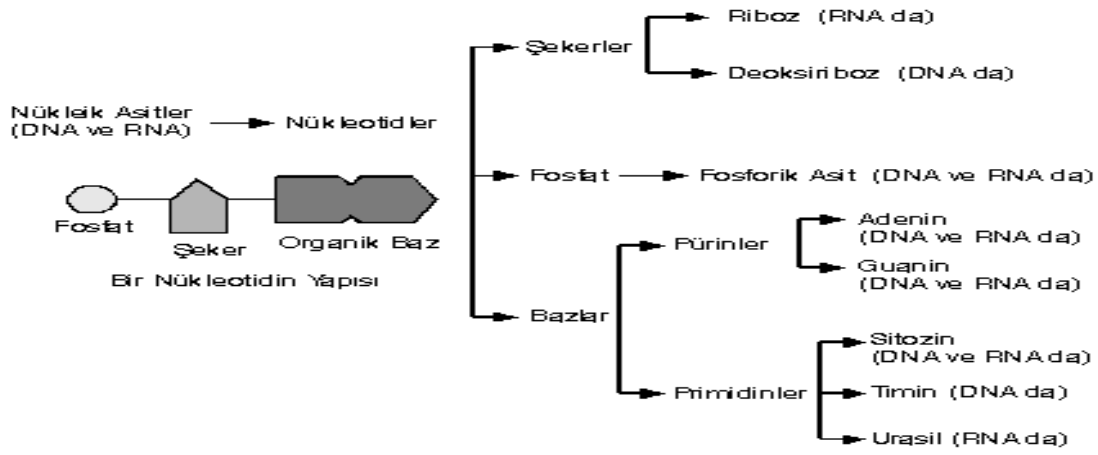


2. Pentoz

Nükleotidlerdeki pentozlar, **D-riboz ve 2-deoksi-D-Ribozdur**. Her iki pentoz tipi de nükleotidlerde β -furanos formunda bulunurlar. Bir purin veya pirimidin bazının riboz veya deoksiriboz şekerinin 1. karbonuna bağlanması ile nükleozitler meydana gelmektedir. O halde iki sınıf nükleozit bulunmaktadır. Bazların riboz şekerine bağlanması ile **ribonükleozitler**, deoksiriboz şekerine bağlanması ile de **deoksiribonükleozitler** ortaya çıkmaktadır.

3. Fosfat

Nükleotitleri, nükleozitlerin fosfat esterleri olarak tanımlayabiliriz. Nükleotidlerdeki fosfat, fosforik asittir (H_3PO_4). Fosfat grubu 5 karbonlu riboz şekerinin 2., 3. ve 5. karbonlarına bağlı hidroksil grupları ile ester bağ yaparak nükleotitleri oluştururlar.



Şekil 42. DNA ve RNA'nın yapısına giren nükleozit ve nükleotitler

NÜKLEİK ASİT DENEYLERİ

Nükleik Asit Deneylerinde Ön İşlemler:

Kasta nükleoproteinler halinde bulunan nükleik asitlerin gösterilmesi için hidroliz işlemiyle protein ve nükleik asit kurucularının ayrılması gerekir. Bunun için bir deney tüpünün içine 0.5 g kas ve 8-10 ml % 10'luk Trikloro asetik asit (TCAA) konur. Kaynar su banyosunda 10 dakika kaynatılır. RNA'nın hidroliz ürünleri H_3PO_4 , riboz, adenin, guanin, sitozin ve urasil ve RNA'nın hidroliz ürünleri ise H_3PO_4 , deoksiriboz, adenin, guanin, sitozin ve timin'dir. Süzülerek çöken proteinler ayrıldıktan sonra, elde edilen süzüntüdeki nükleik asit bileşenleri aşağıdaki testlerle gösterilir.

1-FOSFAT VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ (AMONYUM MOLİBDAT İLE)

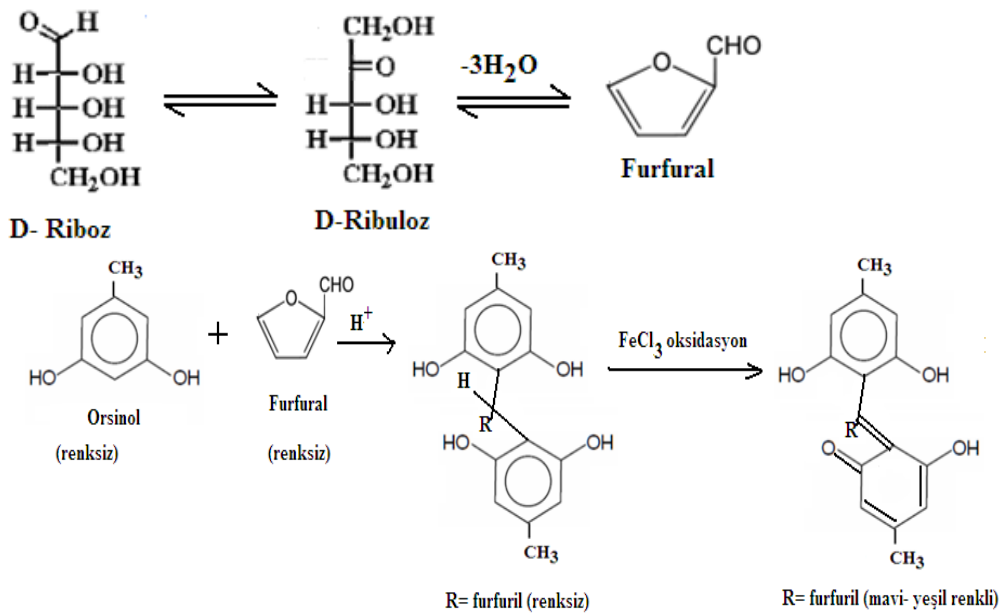
Deneyin prensibi: Fosfat iyonları amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat çökeliği verirler.

Deneyin yapılışı: Bir tüpe elde edilen hidrolizattan 1 ml alınır ve üzerine 1 ml amonyum molibdat ilave edilir, kaynatılır. Oluşan sarı çökelek fosfat iyonlarının varlığını gösterir.

Amonyum molibdat çözeltisinin hazırlanışı: 45 g amonyum molibdat 150 ml distile suda çözülür. Üzerine 250ml derişik HNO_3 'in 500ml distile sudaki çözeltisi damla damla ilave edilir ve distile su ile litreye tamamlanır.

2-PENTOZ VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ

Deneyin prensibi: Pentozlar kuvvetli asit ortamda ısıtıldıkları zaman furfuralleri verirler. Furfuraller de Bial ayırıcı içindeki fenol bileşiği olan orsinol ile mavi-yeşil renkli bileşikler oluşturur. Bu reaksiyonu nükleotidlerde bulunan pentozlardan **sadece riboz** vermektedir.



Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 1 ml hidrolizat alınır. Üzerine 2 ml Bial ayırıcı ilave edilir ve çıplak alevde ısıtılır. Yeşil rengin görülmesi pentoz varlığını gösterir.



Şekil 43. Nükleik asitlerin varlığının gösterilmesi, sağda fosfat varlığının gösterilmesi, solda Bial deneyi ile riboz varlığının gösterilmesi.

3- PÜRİN BAZLARININ GÖSTERİLMESİ (GÜMÜŞ NİTRAT İLE)

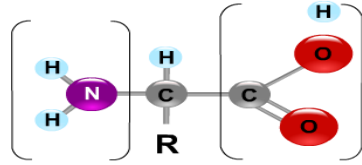
Deneyin prensibi: Pürin bazları gümüş tuzları ile çözünmeyen beyazımsı çökelek oluştururlar.

Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 2 ml hidrolizat alınır. İçerisine bir parça kırmızı turnusol kağıdı atılır. Turnusol kağıdının rengi kırmızıdan maviye dönünceye kadar damla damla amonyak ilave edilir. Daha sonra deney tüpüne 1-2 ml %2,6 AgNO₃ konur. Oluşan beyazımsı çökelek purinlerin varlığını gösterir.

PROTEİNLER

Proteinler, yapılarında karbon, oksijen, azot ve hidrojen yanında iz miktarlarda kükürt, fosfor, demir, çinko ve bakır ve benzeri maddeler içeren, hayat için son derece gerekli organik bileşikleridir. Tüm biyolojik olayların yönetiminde çok önemli rol oynarlar. Katalizleme (enzim), taşıma (hemoglobin, transferrin, albumin) ve depolama gibi.

Proteinlerin yapı taşı **amino asitlerdir**. Proteinlerde bulunan amino asitler monomer, proteinler ise polimerlerdir. Amino asitler C, H, O ve N içerirler. Aralarında iki tanesi sistein ve metiyonin ayrıca S (kükürt)' de içerir.



Şekil 44. Bir amino asidin genel formülü

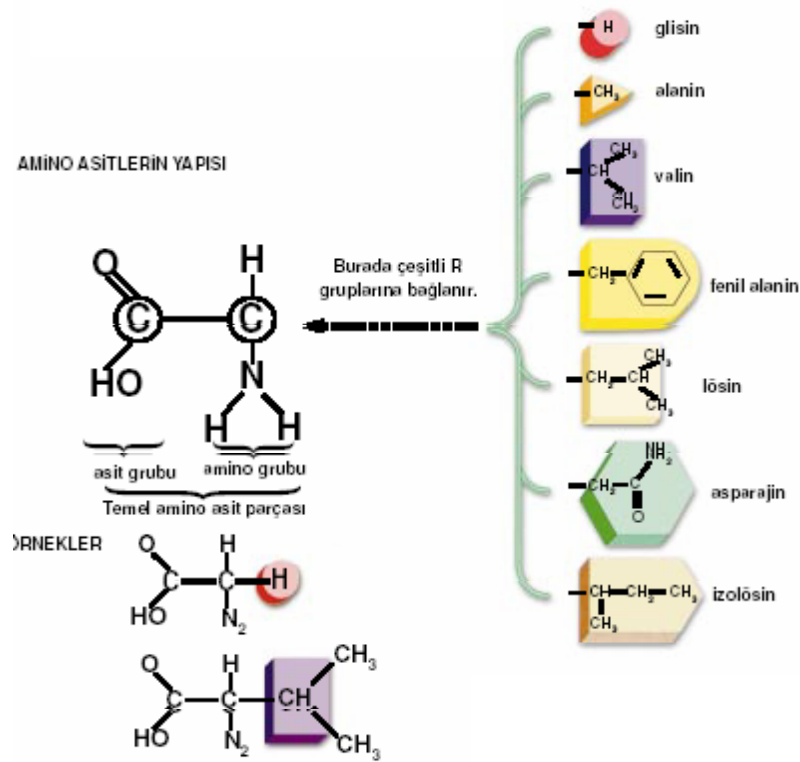
Amino asitler, yapılarında hem amino (-NH₂, bazik grup) hem de karboksil grubu (-COOH, asidik grup) taşıyan bileşiklerdir. Bu gruplar aynı karbon atomuna bağlıdır. Bu nedenle **alfa amino asitler** denir.

Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Amino asitlerin standart amino asit diye bilinen 20 tanesi, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir. Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler.

Tablo 4. Standart amino asitler ve kısaltmaları

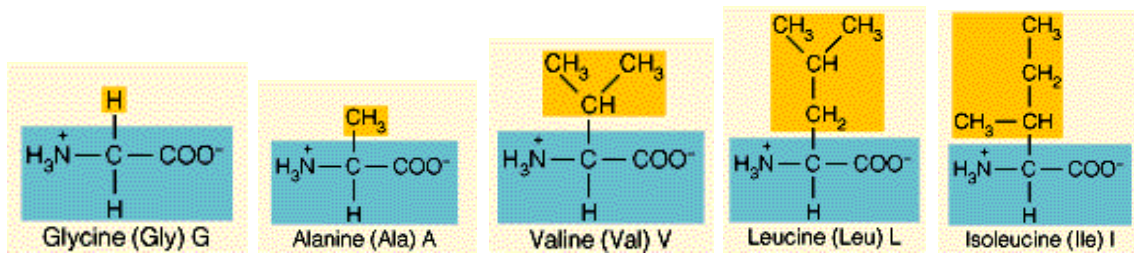
Amino asit	Kısaltma		Amino asit	Kısaltma	
Glisin	Gly	G	Treonin	Thr	T
Alanin	Ala	A	Sistein	Cys	C
Valin	Val	V	Metiyonin	Met	M
Lösin	Leu	L	Asparajin	Asn	N
İzolösin	Ile	I	Glutamin	Gln	Q
Prolin	Pro	P	Aspartat	Asp	D
Fenilalanin	Phe	F	Glutamat	Glu	E
Tirozin	Tyr	Y	Lizin	Lys	K
Triptofan	Trp	W	Arjinin	Arg	R
Serin	Ser	S	Histidin	His	H

AMİNO ASİTLERİN YAPISI



Standart amino asitler, R yan gruplarının özelliklerine polarite veya biyolojik pH'da su ile etkileşmeye eğilim özelliklerine göre sınıflandırılırlar:

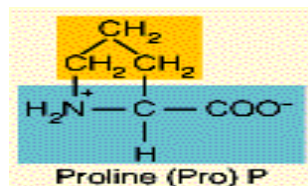
1-ALİFATİK ZİNCİRLİ AMİNO ASİTLER



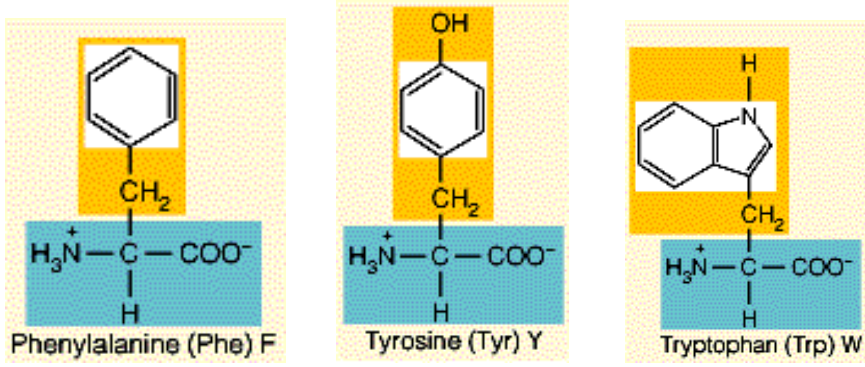
Hidrofobiklik artar

2- SIKLIK AMİNO ASİT

Alifatik amino asitlere benzer. Yan zinciri halkalı olmasına rağmen alifatiktir. Bununla birlikte halka yapı esnek olmadığından proteinlerin kıvrılma katlanma bölgelerinde bulunmaz.



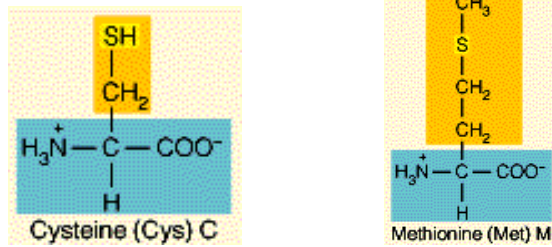
2-AROMATİK ZİNCİRLİ AMİNO ASİTLER



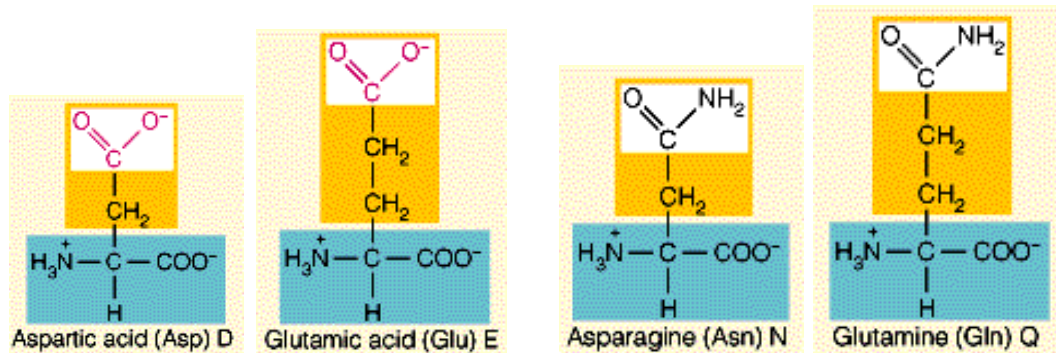
3-YAN ZİNCİRİNDE HİDROKSİL GRUBU TAŞIYAN AMİNO ASİTLER



4- YAN ZİNCİRİNDE TİYOL GRUBU TAŞIYAN AMİNO ASİTLER



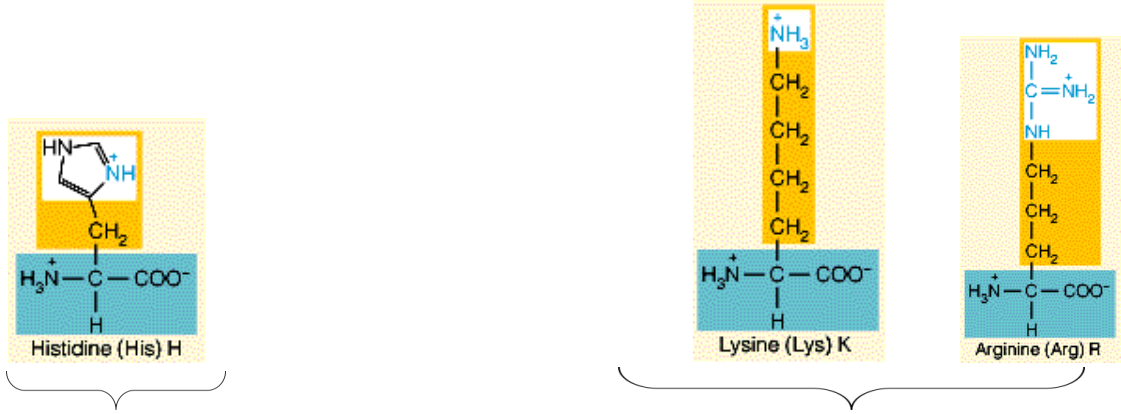
6- ASİDİK (NEGATİF YÜKLÜ) YAN ZİNCİRLİ AMİNO ASİTLER VE AMİDLERİ



pH 7'de (-) yük taşıyan amino asitler

Yüksüz yan zincirlere sahiptirler, ancak zayıf polar özelliktedirler.

7- BAZİK (POZİTİF YÜKLÜ) YAN ZİNCİRLİ AMİNO ASİTLER



En az bazik amino asit.

Fizyolojik pH'da proton alışıverşi yapabilir.

Enzimatik reaksiyonlarda önemli rol oynar.

Fizyolojik pH'da daima (+) yüklüdür.

BAZİKLİK ARTAR



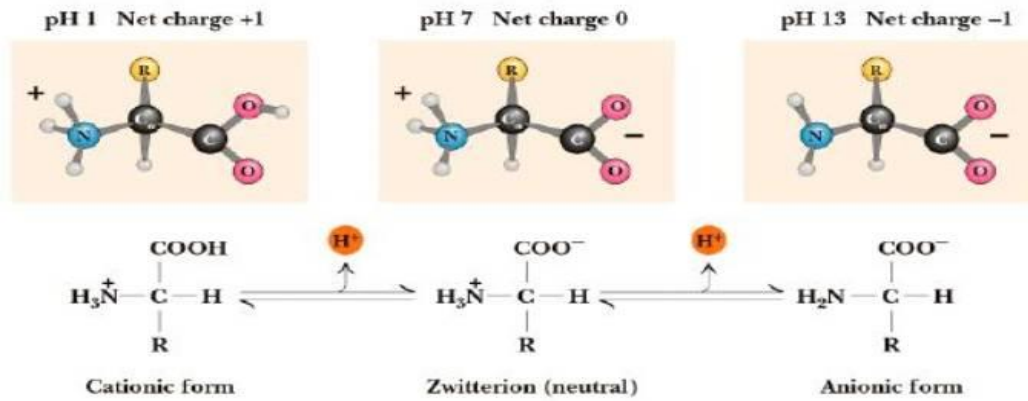
Glisinden (Gly, G) başka bütün standart amino asitlerde α -karbon atomu asimetriktir. Glisinden başka bütün standart amino asitler optikçe aktif iki stereoizomere veya enantiyomere sahiptirler. Protein molekülündeki amino asitler, L-stereoizomerlerdir.

Hem asidik (-COOH) hem de bazik (-NH₂) gruplara sahip moleküllere **Amfoter moleküller** denir. Amfoter bileşiklerin molekülleri iç tuz oluşturabilirler. Buna **Zwitterion** denir.

Proteinlerin Amfoter Özelliği:

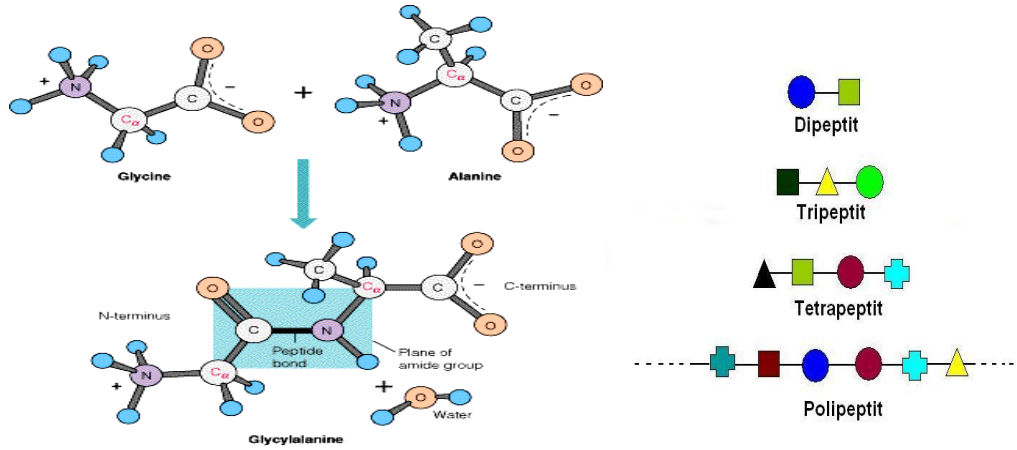
Proteinler yüzeylerinde pozitif ve negatif elektrik yükler taşıyan polielektrolitlerdir. Yüklerin tam sayısı amino asitin kompozisyonuna ve ortamın pH'sına bağlıdır. İsoelektirik nokta pH'da (pI) pozitif ve negatif yüklerin sayıları eşittir. pI proteinden proteine değişir.

Bir standart amino asit, kendisi için karakteristik olan izoelektrik nokta değerine eşit pH ortamında net elektrik yük taşımaz ve elektriksel alanda göç etmez; izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında bazik anyon şeklindedir ve elektriksel alanda anoda göç eder, izoelektrik nokta değerinden düşük pH ortamında asit katyon şeklindedir ve katoda göç eder.



Şekil 45. Amino asitlerin farklı pH'lardaki yük dağılımları

Peptitler ve peptit bağları: Amino asitler, bir amino asidin alfa karboksil grubu ile diğer bir amino asidin alfa amino grubu arasında kurulan bir amit bağı ile birbirlerine kovalent olarak bağlanabilirler. Bu bağa **peptit bağı** denilir.



Şekil 46. Peptit bağının gösterilmesi

PROTEİNLERİN KALİTATİF ANALİZLERİ

Proteinlerin reaksiyonları,

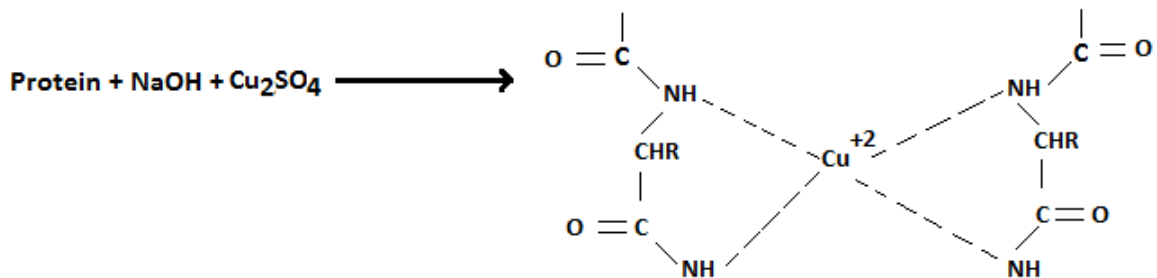
- 1- Proteinlerin renk reaksiyonları
- 2- Proteinlerin presipitasyon reaksiyonları

1-PROTEİNLERİN RENK REAKSİYONLARI:

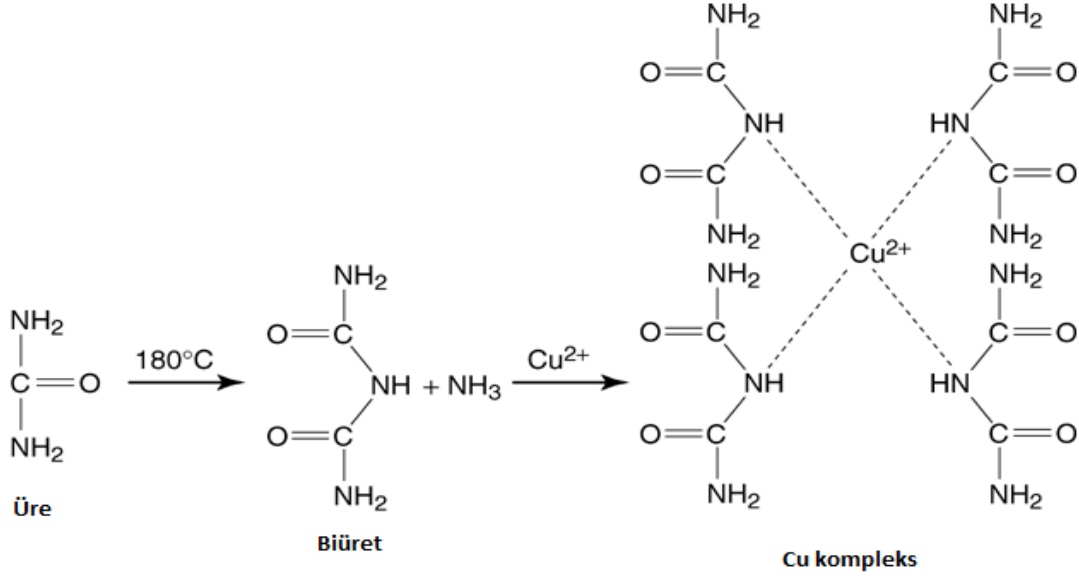
1- BİÜRET DENEYİ:

Deneyin Prensibi: Alkali ortamda bakır iyonları peptit bağlarındaki azot ile mor renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin adı “biüret”tir. Bakır sülfat, mor renk vermek üzere proteinlerdeki peptit bağlarıyla şelat yapan bakır hidrokside çevrilir.

Biüret reaksiyonu en az iki peptit bağının varlığında gerçekleşir. Bu nedenle serin, threonin ve histidin dışındaki amino asitler ve dipeptitler Biüret reaksiyonunu vermezler.



Şekil 47. Biüret reaksiyonu sonucu oluşan bakır peptit kompleksi



Şekil 48. Üre'nin ısıtılmasıyla oluşan bakır üre kompleksi

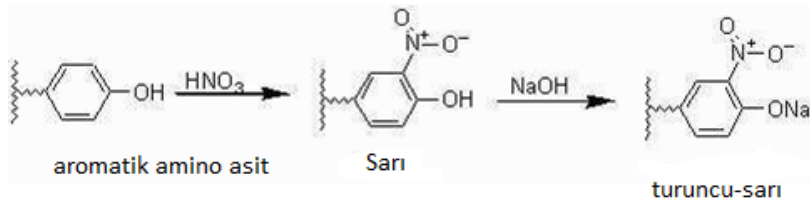
Deneyin Yapılışı: 1 ml protein çözeltisi ve 1 ml % 10'luk NaOH çözeltisi karıştırılır. Üzerine birkaç damla %1 lik Cu_2SO_4 (Fehling A'daki bakır sülfatın 1/10 dilüsyonu ile hazırlanır.) çözeltisi eklenir. **Mor menekşe** renk meydana gelir ve peptit bağlarının varlığı gösterilir.

Deney sırasında dikkat edilecek noktalar: Dilüe bakır sülfatdan 2 damladan fazla ilave edilmemelidir. Aksi takdirde mor renk yerine mavi renk ($\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'in aşırı olması yüzünden) meydana gelir. MgSO_4 ve $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ bu testi interfere eder. Bu nedenle, test bu tuzları içeren solüsyonlarda yapılmamalıdır. Ayrıca bakır sülfat toksik ve iritandır. Göze, deriye ve elbiselere temas ettirilmemelidir.

Deneyin Önemi ve Amacı: Proteinler için genel bir testtir. Reaksiyon, 180°C 'de ısıtıldığında bu teste cevap veren 2 mol ürenin kondenzasyonu ile biüret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) (şekil 46) şekillendiği için böyle isimlendirilmiştir. Pozitif reaksiyon için en az 2 peptit bağının yani 3 amino asidin bulunması şarttır. Bu test, bir peptit bağından fazlasını içeren tüm bileşikler, ör. proteinler ve onların hidrolitik ürünleri (metaproteinler, proteozlar, peptonlar, polipeptitler, dipeptit ve amino asitler hariç) için pozitiftir. Bu test, tek bir azot ya da karbon atomu aracılığıyla ya da direkt olarak iki karbamil (-CONH_2) grubu içeren maddeler için de pozitiftir. Bu nedenle non-proteinler, ör. oxamid ve biüret pozitif sonuç verir. **Bu deney proteinlerin kantitatif hesaplanmasında da kullanılabilir.** Kreatin gibi insolubl proteinler Biüret testini negatif verirler. **Biyolojik materyallerde proteinlerin tanınmasında kullanılan hassas ve yaygın bir testtir.**

2-KSANTOPROTEİN DENEYİ:

Deneyin Prensipleri: Artan ısıda güçlü nitrik asit ile muamele edildiğinde tirozin ve triptofandaki benzen halka sistemi sarı bir presipitat oluşturur. Sarı presipitat alkali ortamda iyonize olarak turuncu renge dönüşür. Tirozin ve triptofan taşıyan birçok protein bu reaksiyonu pozitif verir.



Şekil 49. Ksantoprotein deneyinin reaksiyonları

Deneyin Yapılışı: 1 ml protein çözeltisi ve 0.5-1 ml derişik HNO_3 (nitrik asit) ilave edilir. Deney tüpünde irreverssibl denatürasyona bağılı olarak beyaz bir çökelek oluşur. Tüp ısıtılırsa oluşan nitrozo bileşikleri nedeniyle renk sararır ve çökelek ısıyla pıhtılaşır. Tüp soğutulduktan sonra üzerine 2 ml yoğun NaOH veya NH_3 eklenirse sarı renk **portakal sarısına** dönüşür.

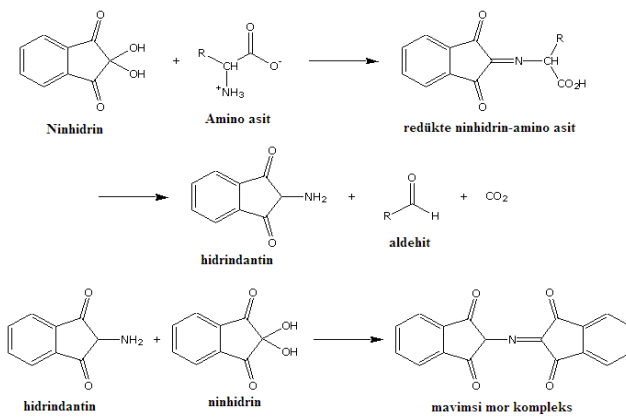
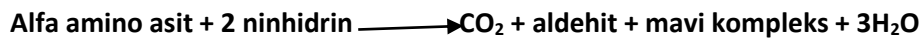
Deneyin Önemi ve Amacı: **Aromatik amino asitler için spesifik bir testtir.** Sarı renk, benzen halkası içeren amino asitlerin nitro türevlerinin oluşumuna bağılı olarak oluşur. Bu reaksiyon nitrik asitle deride sarımsı lekelerin oluşumunun da temelini oluşturur. Bu şartlar altında fenilalaninin nitrasyonu oluşmaz ve tek başına fenilalanin zayıf pozitif sonuç verir.

3-NİNHİDRİN DENEYİ:

Deneyin Prensibi: Ninhidrin sarı renklidir, amino asit ile mavi renge döner. Ninhidrin **serbest α -amino grupları** ile reaksiyona girer. Bu grup tüm amino asitlerde, protein ya da peptitlerde bulunur. Ninhidrin deneyi ile mikrogram (μg) miktarlarda amino asitler belirlenebilir. Aşırı ninhidrin ilavesinde renk mora döner. Renk yoğunluğu amino asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ninhidrin, mavimsi-mor renkli bir kompleks oluşturmak üzere serbest amino asitler ile reaksiyona girer. Ninhidrin güçlü okside edici bir ajandır ve alfa amino asitlerin oksidatif dekarboksilasyonu sonucu bir aldehit meydana getirir. Böylece indirgenen ninhidrin (hidrindantin) daha sonra amonyak ile reaksiyona girer ve bir diğer ninhidrin molekölü mavimsi mor renk oluşturur. Sırasıyla şu reaksiyonlar oluşur:

- 1- Alfa amino asit + ninhidrin $\longrightarrow$ redükte ninhidrin (hidrindantin) + aldehit + CO_2 + NH_3 + H_2O
- 2- Hidrindantin + NH_3 + ninhidrin $\longrightarrow$ mavimsi mor renkli kompleks

Özet olarak;



Şekil 50. Ninhidrin deneyinin reaksiyonları

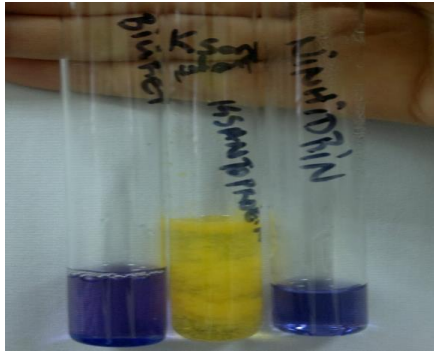
Deneyin Yapılışı: 1 ml amino asit çözeltisi (%0,1'lik fenilalanin, tirozin v.b) alınır ve üzerine 5 damla % 0,1 ninhidrin eriyiği (asetonda hazırlanır) ilave edilir. Karışım 2 dakika kaynatılır. Mavi-mor renk (**menekşe**) rengi oluşursa reaksiyon pozitifdir. Protein çözeltisinin pH'sı 7 olursa daha güzel bir renk oluşur. Serbest amino asitlerin varlığını gösterir.

Deney sırasında dikkat edilecek noktalar: Ninhidrin-aseton çözeltisi alev alıcı, toksik ve irritandır. Bunzen bekiden uzakta tutulmalıdır. Göz, cilt ve elbiselerle temas ettirilmemelidir.

Deneyin Amacı ve Önemi: Bu test tüm alfa amino asitler için pozitifdir. Prolin ve hidroksi prolin imino asitlerdir ve bunların alfa amino grubu yoktur. Bu nedenle onlar ninhidrin ile sarı bir renk verir. Asparajin ve glutamin gibi amid gruplu amino asitler kahverengi renk oluşturur. **Ninhidrin testi bir çözeltideki proteinin varlığını doğrulamak için ilave bir test olarak kullanılabilir.** Bu test serbest amino ve karboksil grupları içeren tüm amino asitler için pozitifdir. Bu nedenle proteinler, peptonlar, peptitler için pozitifdir. Şayet verilen bir çözeltide Biüret testi negatif ise ve ninhidrin testi pozitif ise bu durum verilen çözeltide serbest amino asitlerin bulunduğuna işaret eder. **Ayrıca bu test, kromatografide amino asitleri belirlemek için kullanılır. Ninhidrin adli tıpta parmak izini belirlemede çok yaygın olarak kullanılır. Parmak izinden dökülen proteinlerdeki aminler ninhidrin ile karakteristik mor menekşe renk verir.**



Şekil 51. Ninhidrin ile boyalı parmak izi



Şekil 52. Proteinlerin renk reaksiyonları (sağdan sola biüret, ksantoprotein ve ninhidrin)

2-PROTEİNLERİN ÇÖKTÜRME REAKSİYONLARI

Proteinler değişik boyut, şekil ve yükde büyük moleküllerdir. Biyolojik açıdan önemli proteinlerin çoğu suda erirler. Proteinlerin suda erimelerini sağlayan sebepler şunlardır:

- 1- Proteinlerin çözünürlükleri, moleküldeki polar hidrofilik ve nonpolar hidrofobik grupların dağılımına ve oranına bağlıdır. Protein molekülünün iç kısmında hidrofob amino asitler, dış kısmında hidrofilik amino asitler bulunur. Hidrofilik amino asitlerin su molekülleri ile etkileşimleri sonucu proteinler eriyebilirler.

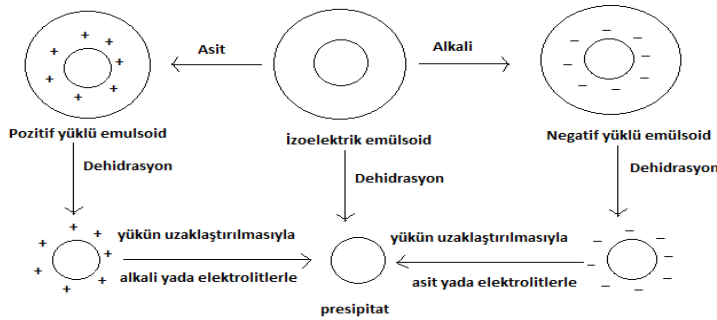
- 2- Proteinleri oluşturan amino asitlerin yan zincirleri (+) ve (-) yük taşırlar. Fizyolojik pH'da net yük çoğunlukla (-)'dir. Bu şekilde proteinler iyon gibi (ör: NaCl) suda eriyebilirler. Proteinler izoelektrik noktalarında (+ yük = - yük) suda erimezler. Çünkü net yükleri sıfır (0)'dır.

Proteinler aköz ortamlarda koloidal sistemler şekillendirirler. Koloidal sistem 1-200 mmikron çapa sahip partikülleri bulunduran sistemlerdir. Solüsyondaki proteinin stabilitesi yük ve hidrasyonun (partiküllerin etrafındaki su molekülleri) derecesine bağlıdır. Proteinin polar grupları ($-NH_2$, COO^- , OH^-) etraflarında hidrasyon tabakası oluşturmak için suyla ilişkiye girer. Kollodlerin çeşitleri;

- Suspansoidler: Suspansoidler molekülün yüzeyindeki elektriksel yüklerle stabilize edilir.
- Emülsoidler: 1-Molekülün yüzeyindeki elektrik yükleri, 2- Molekülün etrafındaki hidrasyon tabakası ile stabilize edilir.

Proteinler presipite edirler;

- Hidrasyon tabakası uzaklaştırılarak,
- Elektriksel yüklerin nötralizasyonu,
- Denatürasyon (natif proteinlerin yapısının bozulması, biyolojik aktivitesinin kaybı)
- Proteinleri izoelektrik noktalarına ayarlayarak. (çünkü izoelektrik noktalarında proteinler yüksüzdür ve çökerler.



Şekil 53. Proteinlerin çöktürülmesinin temel mekanizmaları

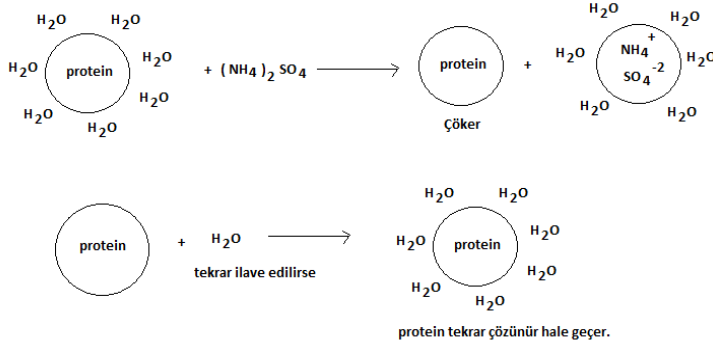
Proteinlerin Presipitasyonunun Önemi;

- Presipitasyon, kan plazması, BOS gibi biyolojik sıvılardaki proteinleri ayırmada kullanılır. Üre, şeker, kreatinin gibi kimyasal bileşenleri analiz etmeden önce bu analizleri bozacağı için proteinler presipite edilerek uzaklaştırılır.
- Presipitasyon, protein karışımından özel bir proteini ayırmak için (ör. amonyum sülfat ile doyurularak serumdan albüminin presipitasyonu) kullanılır.
- $HgCl_2$ (süblime) dezenfektan olarak kullanılır. (bakteri proteinlerini çöktürerek o bölgede sabitlediği için.)
- Bazı hastalıklarda idrara protein karışır. Bu protein gözle görülemez, fakat idrara protein çöktürücü madde eklenirse protein çöker.

A- TUZLARLA PROTEİNLERİN PRESİPİTASYON

1-AMONYUM SÜLFAT İLE ÇÖKTÜRME

Deneyin Prensipleri: Protein presipitasyonuna yol açan yüzey yüklerinin nötralizasyonu ile hidrasyon tabakasının adsorbsiyonuna yol açan amonyum sülfat gibi nötral tuzlar ilave edilir. Oluşan presipitat üzerine birkaç damla su eklenirse tortu tekrar çözünür. (**reversibl denatürasyon**)



Şekil 54. Amonyum sülfat ile proteinlerin çöktürülmesi

Deneyin Yapılışı: 2ml plazma ya da serum (NaCl ile sulandırılmış) ve 2 ml doymuş amonyum sülfat (4M) karıştırılır. 5 dak. bekletilir. Beyaz bir presipitat oluşur. Böylece globulinler çöker. Karışım süzülür. Süzüntüye erimeyinceye kadar toz halinde amonyum sülfat ilave edilir. Bu kez de albümin çöker. Üzerine distile su eklenince tekrar çözünür hale geçer (reversibl denatürasyon).



Şekil 55. Amonyum sülfat ile albüminin çöktürülmesi (I), su ilavesiyle tekrar çözünür hale dönüşmesi (reversible denatürasyon) (II)

Sonuç olarak, Proteinin çözünürlüğü ortamın iyonik konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle, tuzların küçük miktarlarının varlığı protein ilişkisinin azalmasına neden olarak proteinin solubulitesini artırır. Buna **salting-in** denir. **Protein saflaştırmada ve aşı üretiminde bu yöntemden yararlanılır.** Proteinin yüzey alanına bağlı olarak gerekli tuz miktarı değişkendir. **Yüksek molekül ağırlıklı bir proteini presipite etmek için gerekli tuz miktarı daha azdır.** Albümin gibi daha küçük moleküller relatif olarak büyük yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle etrafında daha çok su molekülü tutar ve presipitasyon için daha yüksek konsantrasyonda tuz gerektirir. Bu nedenle albümin doymuş amonyum sülfat ile presipite olur. Kazein ve jelatin yarı-doymuş amonyum sülfat ile presipite olur. Çünkü yüksek moleküler ağırlığa sahiptir.

B-İZOELEKTRİK PRESİPİTASYON

1- KAZEİNİN PRESİPİTASYONU:

Deneyin Prensibi: Proteinlerin çözünürlüğü izoelektrik pH'larında minimumdur. Çünkü protein molekülleri bu pH'da elektriksel olarak nötraldir.

Deneyin Yapılışı: 2ml kazein (süt) ve 3 damla bromkrezol moru (ya da yeşili) indikatör olarak damlatılır (mavi renk oluşur) ve karıştırılır. %1 asetik asit damla damla ilave edilir (sarı renk oluşuncaya kadar). Sarı renk görülünce pH=4.6'ya yakın demektir. Sonuçta lor gibi presipitat oluşur. pH=4,6'da kazein çökmüştür.



Şekil 56. Sütteki kazeinin çöktürülmesi

Önemli noktalar: Molekülün yük taşımadığı pH izoelektrik nokta ya da izoelektrik pH(pI) olarak bilinir. İzoelektrik pH'da,

Net yük sıfırdır.

Elektriksel alanda hareket etmez.

En az çözünürlüktedir.

Tampon kapasitesi ve viskozitesi minimumdur.

Presipitasyon maksimumdur.

Bromkrezol yeşilin pH aralığı 4-4,6'dır.

Kazeinin izoelektrik pH'sı 4,7'dir.

İnsan albümininin izoelektrik pH'sı 4,7'dir.

Proteinler izoelektrik noktada çok az çözünürler yani çökerler.

Kazein pH=4,6 izoelektrik noktada presipite olur ve yüksek asidik ya da alkalik solüsyonlarda yeniden çözünür.

Süt kesildiğinde, kazein beyaz bir lor oluşturur. Çünkü fermentasyonda laktik asit oluşur. Laktik asit kazeinin pH'sını izoelektrik noktaya düşürür ve kazein presipite olur. Süpernatant süt serumu olarak isimlendirilir.

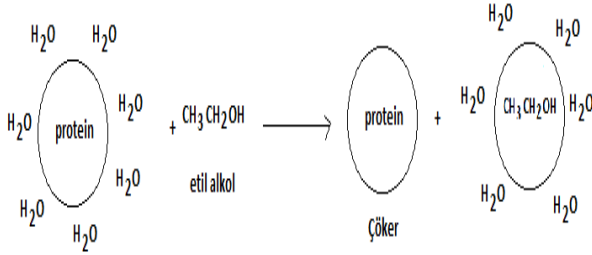
C-ORGANİK SOLVENTLERLE PRESİPİTASYON

1- ETİL ALKOL İLE PRESİPİTASYON

Deneyin Prensibi: Solüsyondaki protein suyla hidrojen bağları oluşturur. Aseton, eter, ya da etanol gibi organik solventler sulu protein çözeltilerine ilave edilirse, solüsyondaki proteinleri saran su moleküllerinin konsantrasyonunu azaltır ve bu nedenle hidrojen bağlarının sayısı azalır. Ortamın dielektrik sabitesi de agregasyon, presipitasyon ve proteinlerin denatürasyonuna sebep olarak azalır. Soğuk organik çözücülerle proteinler reversibl olarak çöktürülebilir.

Deneyin Yapılışı: 1 ml protein ve 2 ml etanol karıştırılır. Beyaz presipitat şekillenir. (alkol ile proteinleri presipite etmek için protein elektrolit formda olmalıdır. Bu tuzlu suda proteini çözerek yapılır.) Bu karışımın yarısı diğer tüpe alınır ve üzerine birden bire bir miktar su eklenirse tortunun eridiği görülür. Diğer yarısı bir süre bekletilip daha sonra su ilave edilir. Bu kez denatüre proteinin

erimediği görülür. Çünkü organik eriticiler proteinleri yavaş yavaş denatüre ederler. Denatürasyon +4 °C'de yavaştır. Oda ısısında hızlıdır.



Şekil 57. Etil alkol ile presipitasyonun mekanizması



Şekil 58. Etil alkol ile proteinlerin çöktürülmesi

D-ALKALİ AYIRAÇLARLA PRESİPİTASYON

1- ESBACH AYIRACI İLE PRESİPİTASYON

Deneylerin Ortak Prensipleri: Alkaloidlerin negatif yüklü iyonları, protein üzerindeki pozitif yükü nötralize ederek presipitasyonla sonuçlanan denatürasyona neden olur.

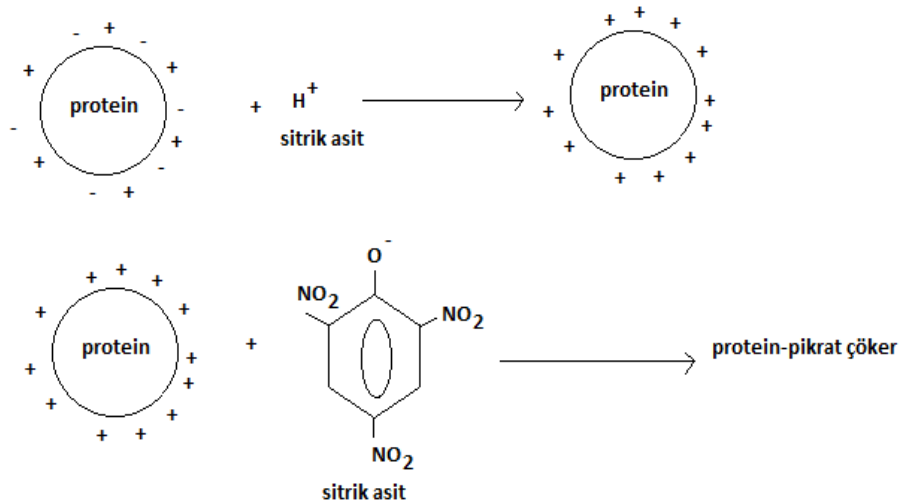
- Tungstik asit, fosfotungstik asit, TCAA, pikrik asit, sülfosalisilik asit ve tannik asit güçlü protein çöktüren ajanlardır. Bu asitler, şayet proteinler net pozitif yük taşıyorsa ortamın pH'sını düşürür. Protein katyonlar negatif yüklü iyonlarla protein-tungstat, protein-pikrat gibi yoğun kümeli presipitat oluşturmak üzere elektrostatik olarak kompleks oluştururlar.

-Sülfosalisilik asit ile çöktürme idrarda protein varlığını göstermede kullanılır. Ayrıca BOS'daki proteinleri tanımlamada kullanılır.

-Kan bileşenleri fotometrik olarak hesaplanacağında proteinler analizleri engeller. Bu durum alkali ayıraçlarla proteinlerin çöktürülmesi sonucu ortadan kaldırılır.

Deneyin Yapılışı:

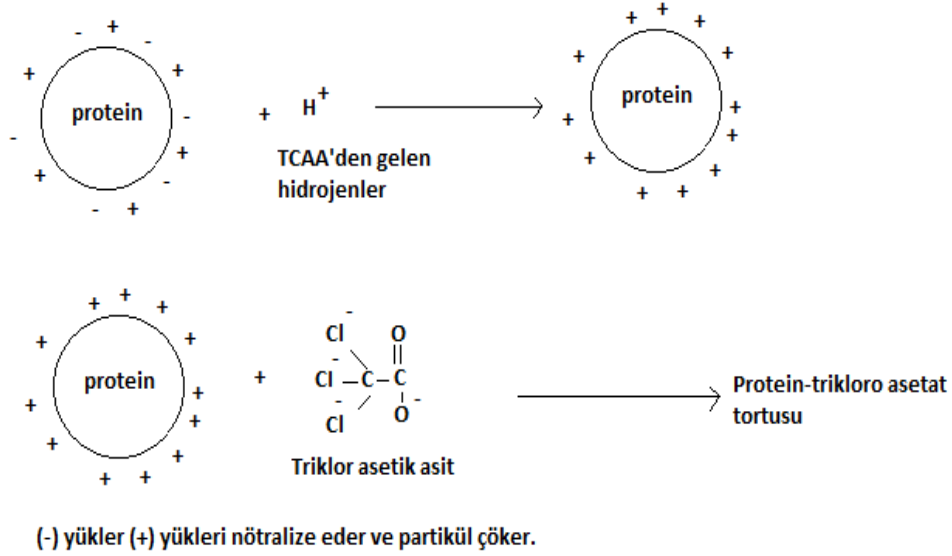
-1ml protein çözeltisi üzerine 1 ml Esbach ayıracı (pikrik asit ve sitrik asit karışımı) eklenir ve sarı presipitat oluşur.



Şekil 59. Esbach ayıracı ile proteinlerin presipitasyon mekanizması

2- TRİKLORO ASETİK ASİT (TCAA) İLE PRESİPİTASYON

Deneyin Yapılışı: 1ml protein ve damla damla %10 TCAA (triklor asetik asit) ilavesiyle beyaz presipitat oluşur.



Şekil 60. TCAA ile proteinlerin presipitasyonun mekanizması

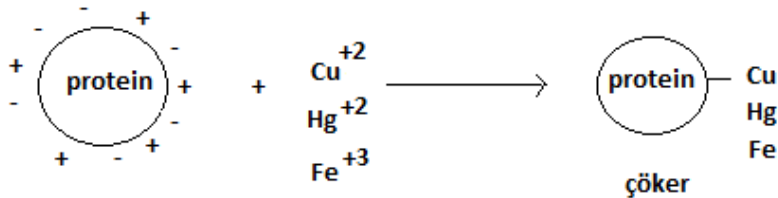


Şekil 61. TCAA ve Esbach ayırıcı ile proteinlerin çöktürülmesi

E-AĞIR METAL İYONLARIYLA PRESİPİTASYON

1- $CuSO_4$ İLE PRESİPİTASYON

Deneyin Prensipleri: Proteinler, izoelektrik nokta pH'larında zwitterion (iç tuz) formundadırlar. Yani (+) ve (-) yükleri bir birine eşittir. İsoelektrik noktanın üzerindeki pH'da (genellikle alkali ortamda) negatif yüklü iyonlar (anyonlar) olarak bulunur. Böyle bir solüsyona ağır metallerin tuzları ilave edilirse, pozitif yüklü metal iyonları protein anyonları ile insolubl (suda çözünmeyen) tuzlar oluşturabilir ve metal proteinatlar çökerler. Bu nedenle ayıraç ilave etmeden önce proteini alkali yapmak gerekir.



Şekil 62. $CuSO_4$ ile proteinlerin presipitasyon mekanizması

Deneyin Yapılışı: 1ml proteine %10 CuSO_4 damla damla ilave edilir. Mavi presipitat oluşur. Protein bakır gibi ağır metallerle presipite olur.



Şekil 63. CuSO_4 ile proteinler çöktürüldü (I), daha fazla CuSO_4 ilavesinde proteinler tekrar çözünür hale geçti (II).

Önemli Noktalar,

- Demir, bakır, çinko, kurşun, kadmiyum, civa tuzları toksiktir. Çünkü gastrointestinal kanaldaki normal proteinleri presipite eder.
- Bu testin prensibinden ağır metal zehirlenmelerinin tedavisinde yararlanılır.
- HgCl_2 dezenfektan madde olarak kullanılır. Bakteri proteinlerini çöktürerek denatüre eder.
- Bu prensibin temelinde çiğ yumurta beyazı civa zehirlenmesinde antidot olarak kullanılır ve sonra emetik verilerek albümine bağlanan Hg^{++} iyonları uzaklaştırılır.
- Şayet örnek çözelti önemli ölçüde alkali ise, testi bozan metal hidroksitlerin oluşumundan sakınmak için pH'sı 7-7,5'a ayarlanmalıdır.
- Ağır metal iyonlarının aşırı ilavesinden sakınılmalıdır. Bu durumda protein molekülleri tarafından metallerin absorpsiyonu yüzünden presipitat yeniden çözünür. Çünkü proteinler (+) yük kazanırlar.

F-ISI VE ASİTLERLE PRESİPİTASYON

1-ISI VE ASETİK ASİTLE PRESİPİTASYON

Isıyla proteinin yapısı bozulur ve pıhtı şeklinde denatüre olur. Pıhtının daha fazla presipite olması için asetik asit ilave edilerek çöktürülür.

Deneyin Yapılışı: Test tüpünün $\frac{3}{4}$ 'üne albümin alınır. Eğik vaziyette ateşe tutulur. Albümin çözeltisinin üst kısmı kaynatılır. Alt kısmı kontrol olarak kullanılır. %1'lik asetik asit damla damla ilave edilir. Isıtılan üst kısımda beyaz pıhtı görülür. Asetik asit ilavesiyle yoğunlaşır. Isının varlığında albümin gibi proteinlerin koagüle olduğu görülür.



Şekil 64. Isı ve asetik asit ile proteinlerin çöktürülmesi

2-YOĞUN HNO₃ İLE PRESİPİTASYON (HELLER HALKA DENEYİ)

Deneyin Yapılışı: 1ml protein çözeltisi üzerine yavaşça yoğun HNO₃ tabaka oluşturacak şekilde akıtılır. Beyaz halka oluşur. Bu beyaz halka denatüre proteindir.

Deneyin Prensibi: Yoğun asit COOH ve NH₂ gruplarının iyonizasyonunu etkiler ve iyonik bağların kopmasına, böylece denatürasyona sebep olur. Asit ortamda proteinler katyonlar şeklinde bulunur ve pozitif yüklü protein nitrat gibi anyonlarla reaksiyona girebilir.



Şekil 65. Yoğun HNO₃ ile proteinlerin çöktürülmesi

Önemli Noktalar,

- Proteinler spesifik yapısal organizasyonlara sahiptir.
- Bir protein ısıtıldığında protein moleküllerindeki bağların kırılması ve konformasyonundaki değişiklikler yüzünden fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri değişir. Bir polipeptit zincirin konformasyonunun primer yapı etkilenmeden gelişigüzel hale getirilmesine **denatürasyon** denir. Denatürasyon işlemi sırasında konformasyonu sağlayan bağlar bozulur. Sekonder yapılarıdaki bozulmalar **irreversibl**, tersiyer ya da quarterner yapıdaki bozulmalar genellikle **reversibldir**. Denatürasyonda kovalen bağlar (peptit ve disülfid bağı) hariç diğer bağlar kopar. Denatürasyona sebep olan durumlar şunlardır: ısı, ekstrem pH, oksidasyon-redüksiyon, çalkalama, radyasyon, üre, guanidin.
- Bununla birlikte, koagüle proteinler, izoelektrik pH'larında ısıtıldıklarında, protein subünitelerinin çözünürlüğünü (kuaterner yapının bozulması) polipeptit zincirlerin kıvrımının açılmasını (tersiyer ve sekonder yapının bozulması) ve kıvrımı açılan polipeptit zincirlerin bir araya gelmesini (koagülasyon) içeren bir seri değişiklikler oluşur.
- Denatürasyon bazen geriye dönüşümlüdür, fakat koagülasyon irreversibl bir olaydır. Bazı proteinler ısıtıldığında, denatüre olduğu halde hala solubl'dür. Bu proteinler izoelektrik pH'ya getirilerek presipite edilebilirler.
- Proteinler ısıtılınca kolayca denatüre olurlar. Denatüre proteinler natif proteinlerden daha az solubl'dür.
- Albümin ve globülin ısıyla, izoelektrik noktasında ya da yakınında kolayca koagüle olur. Asetik asidin ilavesinde, pH'da azalma oluşur. pH albümin ve globülinin izoelektrik pH'sına yaklaştığında solüsyon önceden ısıtıldığı için koagülasyon kendiliğinden oluşur.

Asetik asit neden ilave edilir?

- Maksimum presipitatu sağlamak için elverişli pH sağlamak için,
- Oluşan presipitatin proteinlerden mi yoksa fosfatlardan mı ileri geldiğini ayırtetmek için,
- Presipitat asetik asidin ilavesinden sonra sabitleşir ve yoğunlaşırsa proteindir. Şayet bulanıklık kaybolursa fosfatların varlığına işaret eder.

KAYNAKLAR

- 1- Karagöl, H., Altıntaş, A., Fidancı, U.R., Sel., T. **Temel Biyokimya Uygulamaları**, Medisan Yayınevi, 2007.
- 2- Malhotra, VK., **Practical Biochemistry for Students**, 4nd Edition, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2003.
- 3- Ronjna, C., **Practical Clinical Biochemistry, Methods and Interpretations**, 3 rd Edition, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2006.
- 4- Shanthi, D., **An Easy Guide for Practical Biochemistry**, , Jaypee Brothers Medical Publishers, 2010.
- 5- Shivaraja, S, Ganesh, M.K, Hemavathi, A., **Laboratory Manual for Practical Biochemistry**, Jaypee Brothers Medical Publishers, First Edition 2008.
- 5- <http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/>
- 6- <http://www.mustafaaltinisik.org.uk>
- 7- <http://ebrar.wordpress.com/2007/04>
- 8- Milli Eğitim Bakanlığı (MESLEKİ EĞİTİM VE ÖĞRETİM SİSTEMİNİN GÜÇLENDİRİLMESİ PROJESİ), Gıda Teknolojisi, Çözelti Hazırlama 1, Ankara 2008.
- 9- Aktümsek A. Nurulloğlu Z..Ü, Pratik Biyokimya, 2. Baskı, 2007, Nobel yayın dağıtım.