

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
KİM-YL-2009-0002**

**ÜREAZ ENZİMİNİN Ca-ALGINAT ÜZERİNE
İMMOBİLİZASYON KOŞULLARININ İNCELENMESİ**

Dila ÖRNEK ACAR

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER**

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Dila Örnek Acar tarafından hazırlanan “Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi” başlıklı tez, 05.02.2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Dila ÖRNEK ACAR

İmza :

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜREAZ ENZİMİNİN Ca-ALGINAT ÜZERİNE İMMOBİLİZASYON KOŞULLARININ İNCELENMESİ

Dila ÖRNEK ACAR

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

İmmobilizasyon terimi bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. İmmobilizasyon özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Böylece kontrollü bir enzimatik reaksiyon aracılığı ile substratın ürüne dönüşmesini gerçekleştirir. Bir başka deyişle, immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır.

Bu çalışmada soya fasülyesi ve Jack Bean üreaz enzimlerinin kalsiyum alginat doğal polimeri üzerine immobilizasyonu incelenmiştir. Bunun için önce ideal alginat ve kalsiyum klorür oranları tespit edildikten sonra serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametrelerindeki farklılıklar araştırılmıştır. Soya üreazı V_{max} ve K_m değerleri immobilizasyon sonucu düşme göstermiştir. Jack Bean üreazının ise immobilizasyon sonucu V_{max} değeri düşerken K_m değeri artmıştır. Serbest ve immobilize soya üreazının optimum pH değerleri özdeş (pH 7,0) bulunmuştur. Jack Bean üreazının optimum pH'ı ise immobilizasyon sonucu 1,0 pH birimi alkali bölgeye kaymıştır. Hem soya üreazı hem de Jack Bean üreazı immobilizasyon sonra optimum sıcaklıkta değişiklik göstermemiştir. Otuz gün sonunda immobilize Jack Bean üreazın başlangıç aktivitesinin % 56,7'sini koruduğu; soya üreazının ise % 59,0'ını koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar immobilizasyon işleminin enzimin kararlılığını büyük ölçüde artırdığını göstermektedir. Hazırlanan üreaz immobilize edilmiş alginat mikroküreleri kullanılarak idrarda ve dermatolojik üre preparatında üre tayini yapılmış ve sonuçların serbest enzimlerinkinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

2009, 52 sayfa

Anahtar sözcükler:

Üreaz, alginat, immobilizasyon, soya fasülyesi, Jack Bean

ABSTRACT
M Sc Thesis

**INVESTIGATION OF IMMOBILIZATION CONDITIONS OF UREASE ON
Ca-ALGINATE**

Dila ÖRNEK ACAR

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

Immobilization is a term used for the entrapment of an biologically active catalysts in a reactor or in an analytical system. Immobilized complex exhibits the physical characteristics of the solid support along with essential biochemical activity of the catalyst. Immobilization allows the fluid flow easily by building a nonsoluble complex on a special module. Thus, it converts the substrate into product by the help of a controlled enzyme reaction. In other words, immobilization is the application of heterogen catalyst principles to biological systems.

In this work, the immobilization of soy bean and Jack Bean urease onto natural alginate polymer was investigated. After the ideal alginate and calcium chloride concentrations were determined, the differentiation of kinetic parameters of the free and immobilized enzymes were investigated. Soy bean urease had lower V_{max} and K_m values after immobilization. On the other hand, Jack Bean urease had lower V_{max} but higher K_m after immobilization. Optimum pHs of free and immobilized soy bean urease were identical (pH 7,0), whereas optimum pH of the immobilized Jack Bean urease demonstrated 1,0 pH unit shift to the alkaline region compared to the free enzyme.

Both soy bean and Jack Bean urease's optimum temperature did not show any differentiation after immobilization. As for storage stability, it was determined that, after 30 days, immobilized Jack Bean and soy bean ureases retained 56,7 % and 59,0 % of their initial activity, respectively. These results varified that immobilization enhances enzyme stability to a great extent. Urease immobilized alginate microbeads were used to measure the amount of urea in urine and dermatological preparate and the results varified that there are no significant differences between the free and immobilized enzyme activities.

2009, 52 pages

Key Words:

Urease, alginate, immobilization, soy bean, Jack Bean

ÖNSÖZ

Tezimin gerçekleşmesindeki bilimsel, maddi ve manevi desteklerinden ve emeklerinden dolayı çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e şükranlarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarında ve deneylerimdeki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN ve Arş. Gör. Murat UYGUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmaya FBE-08004 No'lu araştırma projesi olarak maddi destek veren, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne, teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleştirilmesinde gösterdiği özveri ve desteklerinden dolayı sevgili eşim İnşaat Mühendisi Yıldray Acar'a ve çok sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dila ÖRNEK ACAR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
SİMGELERİN DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. İmmobilizasyon	3
1.3. Enzim İmmobilizasyonu	3
1.3.1. Enzim İmmobilizasyonu Teknikleri	5
1.3.1.1. Kovalent Bağlama	5
1.3.1.2. Adsorpsiyon	6
1.3.1.3. Çapraz Bağlama (Enzimlerin Birbirine Bağlanması)	6
1.3.1.4. Polimer Matrikste Tutuklama (Entrapment)	9
1.3.1.5. Mikrokapsülleme (Enkapsülasyon)	9
1.4. İmmobilize Enzimin Özellikleri	10
1.4.1. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi	10
1.4.2. İmmobilize Enzim Aktivitesine Sıcaklık Etkisi	10
1.4.3. İmmobilize Enzim Aktivitesine pH Etkisi	10
1.4.4. Aktiviteye Substrat Derişimi Etkisi	11
1.5. Enzim Kararlılığı	11
1.6. Alginat	11
1.7. Üreaz	15
1.7.1. Üreaz Enziminin Moleküler Özellikleri	16
1.7.2. Enzimatik Tepkime Mekanizması ve Nikel İyonunun Rolü	18
1.7.3. Üreaz Enzimi inhibitörleri	19
1.7.4. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları	20
1.7.5. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri	20
1.7.5.1. Nessler Yöntemi	20
1.7.5.2. Berthelot Yöntemi	21
1.7.5.3. Çift Enzim Yöntemi	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Deneylerde Kullanılan Enzimler	29
3.2.2. Bradford Yöntemi İle Protein Tayini	29
3.2.3. Üreaz Aktivitesi Tayini	31
3.2.4. Kalsiyum Alginat Mikro Kürelerinin Hazırlanması	32
3.2.5. Kinetik Parametrelerin Tespiti	32
3.2.6. Optimum pH'ın Belirlenmesi	33
3.2.7. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	33
3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığının Ölçülmesi	34

3.2.9. Uygulama	34
3.2.9.1. İdrarda Üre Tayini	34
3.2.9.2. Dermatolojik Üre Preparatında Üre Tayini	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1. Protein Tayinleri	37
4.2. Üreaz Aktivitesi Tayini	38
4.3. Uygun Alginat Derişiminin Tespiti	38
4.4. Kinetik Parametrelerin Tespiti	40
4.5. Optimum pH Tespiti	44
4.6. Optimum Sıcaklık Tespiti	45
4.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı Deneyi Sonuçları	47
4.8. Uygulamalar	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER DİZİNİ

M	D-Mannurik asit
G	L-Guluronik asit
KAU	<i>Klebsiella aerogenes</i> üreazı
BPU	<i>Bacillus pasteuril</i> üreazı
JBU	Jack Bean üreazı
SBU	Soya Fasulyesi üreazı
BUN	Kan üre azotu
BSA	Sığır serum albumin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri şeması	8
Şekil 1.2 Alginat polisakkaritindeki gluronik ve mannurik asit birimleri ve bunların polimerleri	13
Şekil 1.3 Ca ²⁺ iyonu ile şelatlaşma	14
Şekil 1.4 Üreazın kataliz reaksiyonu	15
Şekil 1.5 BPU üç boyutlu yapısı a) üstten görünüm, b) yandan görünüm	17
Şekil 1.6 BPU aktif merkezi	18
Şekil 1.7 BPU kataliz reaksiyon mekanizması	19
Şekil 1.8 İndefenol oluşum mekanizması	21
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart çalışma grafiği	37
Şekil 4.2 Berthelot yöntemi ile amonyak standart grafiği	38
Şekil 4.3 Serbest soya üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 4.4 İmmobilize soya üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 4.5 Serbest jack bean üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 4.6 İmmobilize jack bean üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 4.7 Soya üreazı aktivitesi üzerine pH'ın etkisi	44
Şekil 4.8 Jack Bean üreaz enzimi aktivitesi üzerine pH etkisi	45
Şekil 4.9 Serbest ve immobilize soya üreazı aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	46
Şekil 4.10 Serbest ve immobilize jack bean üreazı aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	46
Şekil 4.11 Serbest ve immobilize soya üreazının depo kararlılığı	48
Şekil 4.12 Serbest ve immobilize jack bean üreazının depo kararlılığı	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar	5
Çizelge 3.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan çözeltiler	30
Çizelge 3.2 Farklı pH değerlerinde serbest ve immobilize üreaz ile optimum pH'ın tespiti için hazırlanan çözelti bileşimleri	33
Çizelge 3.3 Farklı sıcaklıklarda serbest ve immobilize üreaz ile optimum sıcaklığın tespiti için hazırlanan çözelti bileşimleri	33
Çizelge 3.4 İdrarda üre analizi için kullanılan çözelti hacimleri	36
Çizelge 4.1 Bradford yöntemi ile protein tayini için elde edilen absorbans değerleri	37
Çizelge 4.2 Farklı alginat derişimlerinde soya üreazı ile immobilizasyon ve aktivite verimleri	39
Çizelge 4.3 Jack bean üreazı ile immobilizasyon sonuçları	40
Çizelge 4.4 Serbest soya üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları	40
Çizelge 4.5 İmmobilize soya üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları	41
Çizelge 4.6 Serbest jack bean üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları	42
Çizelge 4.7 İmmobilize jack bean üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları	42
Çizelge 4.8 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının kinetik sabitleri	43
Çizelge 4.9 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının aktivitelerinin pH'a bağlı olarak değişimi	44
Çizelge 4.10 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının optimum pH değerleri	45
Çizelge 4.11 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazları için farklı sıcaklıklara karşı aktivite ölçüm sonuçları	46
Çizelge 4.12 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının optimum sıcaklık değerleri	47

Çizelge 4.13 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının depo kararlılığı sonuçları	48
Çizelge 4.14 İdrar ve dermatolojik preperat örneklerinde üre tayini	49

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı dokuların bileşiminde az miktarda bulunan, fakat çok önemli rolleri olan organik katalizörlerdir. Yapılarını esas olarak proteinler oluşturduğu için, enzimlere metabolik proteinler de denmektedir. Canlı hücrenin bütün fonksiyonları enzimlerle sağlandığından; yaşam, bir anlamda birbirini izleyen enzimatik tepkimeler bütünü olarak da adlandırılabilir.

Biyolojik sistemlerde tepkimelerin kolay ve hızlı oluşmasına destek veren ya da bu işlevleri yürüten enzimler, reaksiyonları hızlandıran ve reaksiyon sonunda değişmeden çıkan katalizör maddelerdir. Katalizörlerin çok azı dahi çok iş görür ve bu moleküller tekrar tekrar kullanılabilir. Katalizörler reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek vücut sıcaklığında meydana gelmesini sağlar.

Enzimlerin insanlar tarafından endüstriyel alanda kullanılmaları çok eski devirlere kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, yoğurt, şarap, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde kullanılmışlardır. Örneğin; incir bitkisinden elde edilen sıvı ile süttten peynir elde etme uygulaması çok eskilerden beri bilinmektedir. Daha sonra bu sıvıda 'fisin' adı verilen bir enzim olduğu bulunmuştur.

Enzimler hakkında elde edilen önemli bilgilerin kronolojik sıralaması aşağıdaki gibidir (Gözükara, 1994).

- Enzimler hakkındaki ilk bilgiler 1570'li yıllarda elde edilmiştir. Pasteur ve Liebig gibi birçok ünlü araştırmacının katkıları ile enzimler hakkında pek çok temel bilgi sağlanmıştır.
- 1838 yılında alman kimyacı Berzelius, reaksiyon hızı üzerine etki yapan maddelere 'katalizör veya katalizatör' adını vermiştir.
- 1838'de Gagnard ve Schav adlı iki bilgin, birbirinden habersiz olarak fermantasyon olayını incelemiş ve bu olayın maya adı verilen bazı makro organizmalar aracılığıyla meydana geldiğini açıklamıştır.
- 1879'da Kühne, biyolojik reaksiyon hızlarına etki eden maddeleri ayırt etmek için Yunanca mayada bulunan anlamına gelen 'enzim' kelimesini önermiştir.

- 1883'de Poyen ve Perşon nişastanın çözümlenmesinde malt özütü içinde bulunan "diastaz enziminin" etkin olduğunu belirlemiştir.
- 1885'de Blumenthal, peynir yapımında kullanılmak üzere, ilk kez rennin enziminin özütünü, teknolojik boyutlarda üretmeyi başarmıştır.
- 1897'de Büchner, maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başararak, yeni bir araştırma alanı açmıştır.
- 1915'te Rahm, lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılarak, çok etken bir temizleyici olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.
- 1926'da James B. Summer, ilk kez üreaz enziminin kristallerini elde ederek, molekülün büyük bir kısmının protein olduğunu göstermiştir.
- 1930'da ise Northrop, Kuintz, Herriott ve Amson gibi bilimlerden oluşan bilim adamı grubu sırası ile pepsin, tripsin, kimotripsin ve karboksipeptinaz enzimlerini kristalize etmeyi başarmıştır.
- 1930'larda 80 adet enzim tanınırken, 1968'lerde bu rakam 1300'e 1982'de 2000'e yükselmiştir. Günümüzde ise 2500 enzimin var olduğu bilinmektedir ve yine enzimlerle ilgili çalışmalar süratle devam etmektedir (<http://www.odevsel.com/>).

Günümüzde enzimler endüstri, klinik, tıp ve eczacılık gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu enzimler bitkisel veya hayvansal kaynaklardan ya da makroorganizmalardan elde edilmektedir. Örneğin: proteini parçalayan enzimlerden olan papain papaya bitkisinden, fisin incir bitkisinden, nişastayı parçalayan α -amilaz çimlenmekte olan arpadan, tripsin büyük baş hayvanların pankreaslarından, lizozim yumurta akından, rennin veya proteaz enzimi süt emmekte olan buzağuların midesinden endüstriyel ölçekte üretilmektedir. Enzim kaynağı olarak makroorganizmalar; kolay çoğalabilmeleri, enzim oluşumunun kolay kontrol edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı potansiyel kaynak olarak düşünülürler. Bitkilerden elde edilen proteazların yanında, bakterilerden de proteaz, amilazlar ve glukoz-izomeraz gibi endüstriyel öneme sahip enzimler elde edilmektedir. Ayrıca glukoz oksidaz, katalaz, lipaz, laktaz vb. daha birçok enzim küf mantarlarından elde edilmektedir.

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu alan gıda endüstrisidir. Proteazlar ve amilazlar bu alanda en çok kullanılan enzimlerdir. Eczacılıkta da enzimler kullanılmaktadır. Bu alandaki en iyi örneği, hazım kolaylaştırıcı bazı ilaçların bileşimindeki besinlerimizin temel bileşenlerinden olan

proteini parçalayan proteaz, nişastayı parçalayan amilaz, yağları parçalayan lipaz ve laktozu parçalayan laktaz enzimleridir. Yapılan pek çok araştırma sonucunda, enzimlerin kullanım alanları giderek artmaktadır. Özellikle son yıllarda rekombinant-DNA teknolojisine paralel olarak yeni ve istenilen özellikteki enzim elde edilmesi mümkün olmaktadır, buna bağlı olarak da enzim kullanımı giderek yaygınlaşacaktır.

1.2. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon terimi bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. Biyokatalizör ister tek bir enzim olsun isterse enzim karışımı veya bir canlı hücre içindeki enzimler olsun, destek (taşıyıcı) materyali üzerinde veya içinde tutuklanmıştır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. İmmobilizasyon özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Böylece kontrollü bir enzimatik reaksiyon aracılığı ile substratın ürüne dönüşmesini gerçekleştirir. Bir başka deyişle, immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır. Son otuz yıldan beri enzimlerin immobilizasyonu, daha yakın yıllardan beri de hücrelerin immobilizasyonu teorik ve pratik önem kazanmıştır. İmmobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini birleştirir (Aktaş, 2004).

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler kimya, ilaç ve gıda endüstrilerinde biyokatalizör olarak, klinik ve kimyasal analizlerde ise spesifik ligandlar olarak kullanılır. Yüksek maliyetli enzimlerin kararlılıklarını korumak ve yeniden kullanabilmek olanaklarını sağladığı için immobilize enzimler çok ilgi görmektedir (Aktaş, 2004).

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak veya suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla, ya da suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen makrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. Enzim adlandırılmasında olduğu gibi immobilize enzimler için kullanılan terimlerde de bir kargaşa oluşmuş ve ‘suda

çözünmeyen enzim', 'bağlanmış enzim', 'matrikse bağlı enzim', 'tutuklanmış enzim' gibi terimler kullanılmıştır. 1971 yılında yapılan 3. Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1. Enzim Mühendisliği Konferansında "immobilize enzim" terimi önerilmiş, böylece modifiye enzimlerin isimlendirilmelerine açıklık getirilmiştir (Telefoncu, 1997).

İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime göre bir takım üstünlükleri vardır. Bunlar;

1. Süzme, santrifüjleme vb. yöntemlerle reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.
2. pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
3. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. Sürekli işlemlere uygulanabilir.
5. Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
6. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
7. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
8. Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.
9. Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis, self-digestion) olasılığı azalır.
10. Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Ancak, enzimi katı bir destek üzerine bağlamanın getirdiği dezavantajlar da vardır.

Bunlar:

1. İmmobilizasyon sırasında katalitik aktivitenin kaybı.
2. Kütle transferi problemleri.
3. Katalizör ve akışkanın fiziksel ve kimyasal olarak birbirinden ayrılmış olması.
4. İşlem süresinin uzaması.
5. İmmobilizasyon teknolojisinin ampirik yapısı.

Enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan özellikler; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, makroorganizmalara karşı direnç, ucuzluk, zehirsizlik, rejenere olabilme gibi özelliklerdir. Ayrıca, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalıdır. İmmobilizasyonda kullanılacak taşıyıcıların bir listesi Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Çizelge 1.1 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar (Telefoncu, 1997)

İnorganik maddeler	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	Selluloz	Polistiren
Silika jel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dextran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve allil polimerler
Titan dioksit	Karraagenan	Oxiranlar
Zirkonyum dioksit	Kollagen	Metakrilat
Nikel oksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleik anhidrid
Aktif karbon	Albümin	polimerleri
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Alginat	

1.3.1. Enzim İmmobilizasyonu Teknikleri

Etkin enzim immobilizasyonu aşağıda sıralanan çeşitli teknikleri kullanmak suretiyle elde edilebilir. Şekil 1.1'de enzim immobilizasyonu için uygulanabilecek tekniklere ilişkin bir Őema verilmektedir (Telefoncu, 1997).

1.3.1.1. Kovalent Bağlama

Bütün enzim moleküllerinin dış kısmında reaktif fonksiyonel gruplar bulunur. Bu fonksiyonel gruplar aracılığı ile enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması gerçekteştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Bir kimyasal reaksiyon normal olarak bir aktifleşmiş tür ile daha az reaktif bileşik arasında gerçekteşir. Enzim immobilizasyonunda genellikle aktive edilen destek maddesidir. Çünkü destek maddesi kuvvetli kimyasallara ve geleneksel organik reaktiflere karşı yeterince dayanıklıdır. Bu aktifleşmiş destek daha sonra ılımlı

koşullarda serbest enzimin sulu çözeltisi ile reaksiyona sokularak bağlanma gerçekleştirilir.

1.3.1.2. Adsorpsiyon

Yöntem, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, silika jel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim/adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağlıdır. Bu etmenlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimum koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon işleminin mekanizması genellikle çok karışık olup birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğini önceden saptanması çok güçtür.

1.3.1.3. Çapraz Bağlama (Enzimlerin Birbirine Bağlanması)

Bu yöntemde küçük moleküllü bi veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. İmmobilizasyon ve çapraz bağlanma derecesi, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsulfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

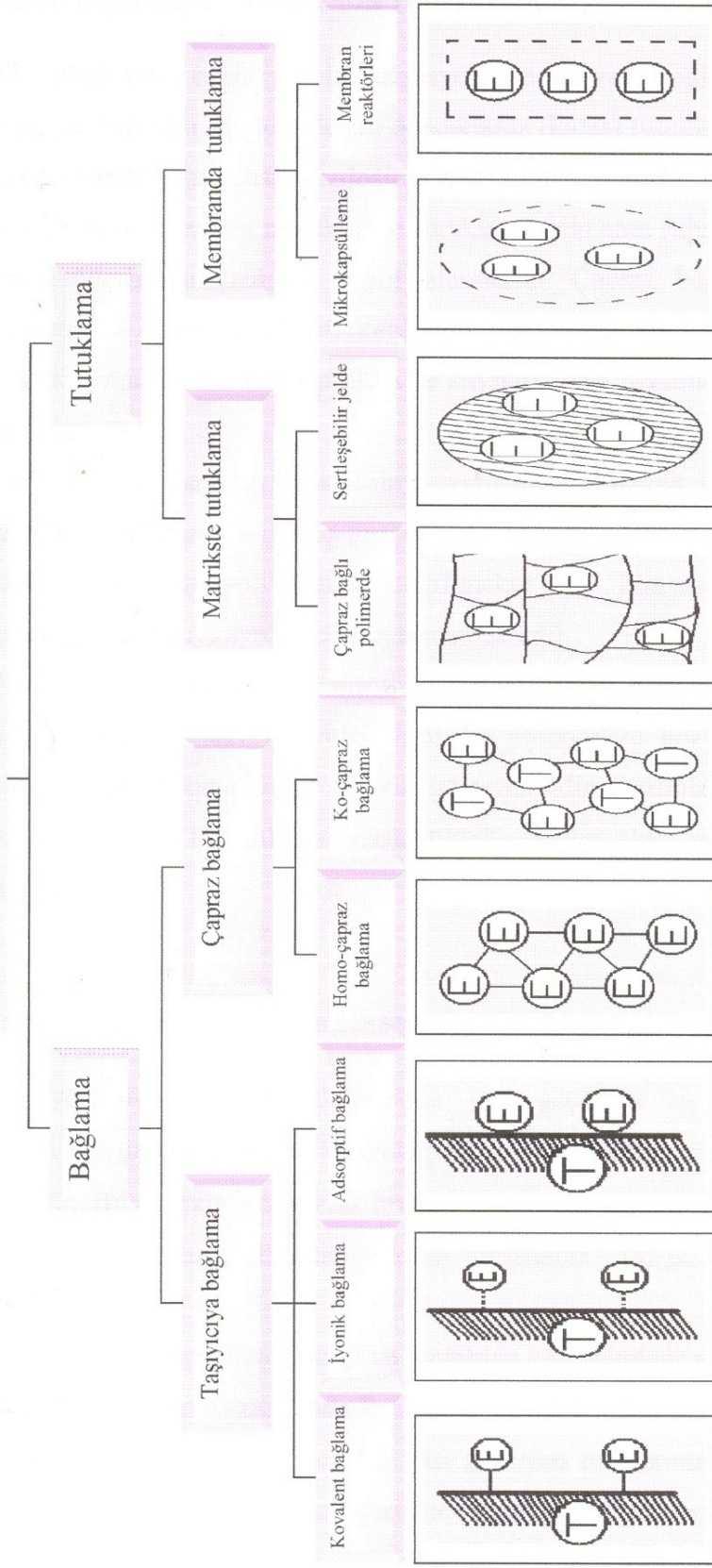
Çapraz bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir.

1. Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
2. Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,

3. Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
4. Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktivite edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

Çapraz bağlama reaksiyonları çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur.

Enzim immobilizasyon yöntemleri



Şekil 1.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri şeması

1.3.1.4. Polimer Matrikste Tutuklama (Entrapment)

Bu yöntemde enzim, polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Burada önemli olan optimal çapraz bağ yüzdesinin doğru saptanmasıdır. Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olunmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp, enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük molekülü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir. Enzimin tutuklandığı kafes çapından daha büyük bir substrat molekülünün enzim aktif merkezine ulaşması olanak dışıdır.

1.3.1.5. Mikrokapsülleme (Enkapsülasyon)

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması ile gerçekleştirilir. Makrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 µm arasında değişmektedir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu, sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran makrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir.

Sürekli makrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz makrokapsüllerde ise bir sıvı tabakadır. Immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

1.4. İmmobilize Enzimin Özellikleri

1.4.1. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi

Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktivitesinde düşme beklenir. Fakat hiç değişmediği veya arttığı örneklere de rastlanmaktadır (Kennedy ve Cabral, 1983). Enzim aktivitesindeki düşmenin başlıca sebepleri şunlardır:

1. Enzimin immobilizasyon sırasında denatüre olması
2. Aktif merkez üzerinden bağlanma sebebiyle denatüre olması
3. Birçok noktadan bağlanma sebebiyle inaktivasyon
4. Taşıyıcıya bağlı enzim molekülünün yanlış yönlendiği

Enzim immobilizasyonunun verimi aktivite hakkında bilgi vermez (Buchholz, 1979). Bağlı enzimin ne oranda aktif enzim molekülü içerdiği ancak 'aktif merkez titrasyonu' ile belirlenebilir.

1.4.2. İmmobilize Enzim Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

Doğal ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklık etkisi genellikle 'optimum eğrileri' çizilerek izlenir. Bu grafik bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Bağıl aktivite ise deney koşullarında elde edilen gerçek aktivitenin yine aynı koşullarda ulaşılan en yüksek aktiviteye oranıdır.

1.4.3. İmmobilize Enzim Aktivitesine pH Etkisi

Enzim, yüklü taşıyıcılarda immobilize edilirse enzim makroçevresi ile ölçüm yapılan çözelti bölgesi arasında H^+ ve OH^- gruplarının dağılımı bakımından önemli farklılıklar oluşur. Dolayısıyla immobilizasyondan sonra enzimin optimum pH değerinde kayma gözlenir. Polianyonik yapılu taşıyıcılarda immobilize enzimin optimum pH'sı bazik bölgeye, polikasyonik taşıyıcılarda ise asidik bölgeye kaymaktadır.

1.4.4. Aktiviteye Substrat Derişimi Etkisi

İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları serbest enziminkinden oldukça farklı olabilir. Bu farklılık enzim konformasyonundaki değişmeden, sterik etkilerden, makroçevre etkilerinden, iç ve dış difüzyon etkilerinden kaynaklanmaktadır.

1.5. Enzim Kararlılığı

İmmobilize enzim preparatının kararlılığı, endüstriyel üretim için en önemli kriterlerden biridir. İmmobilize enzimin kararlılığından anlaşılan belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Bu sırada makrobiyal yıkım ve termik, pH, veya kimyasal inaktivasyon nedenleriyle enzim aktivitesinde kayıplar olmaktadır. Bunların dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzim kaçışı da aktivite kaybına sebep olur. Ayrıca substrat çözeltilisindeki kirlilikler tarafından matriks gözeneklerinin tıkanması da immobilize enzimi etkisiz hale getirir.

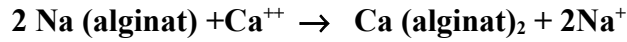
1.6. Alginat

Alginat, alginik asidin sodyum tuzu olan sodyum alginat şeklinde yaygın olarak bulunur. Deniz yosunları ve alglerin birçok türünden izole edilen lineer bir polisakkarittir. D-mannurik asit (M) ve L-guluronik asit (G) olmak üzere iki uronik asidin kopolimerini içerir. Alglerin iskelet sisteminin bir bileşeni olması nedeniyle güçlü bir yapıdır ve kıvrılabilme özelliğine sahiptir. şekil 1.2'de alginat polisakkaritindeki guluronik ve mannurik asit birimleri ve bunların polimerleri görölmektedir (<http://www.lsbu.ac.uk/water/>).

Alginik asit, oluşturduğu tuzun yapısına bağlı olarak suda çözünebilir veya çözünmeyebilir. Bilindiği üzere alginik asidin sodyum, diğer alkali metaller ve amonyum tuzları suda çözünür, fakat magnezyum dışındaki kalsiyum gibi çok değerlikli katyonların tuzları suda çözünmez.

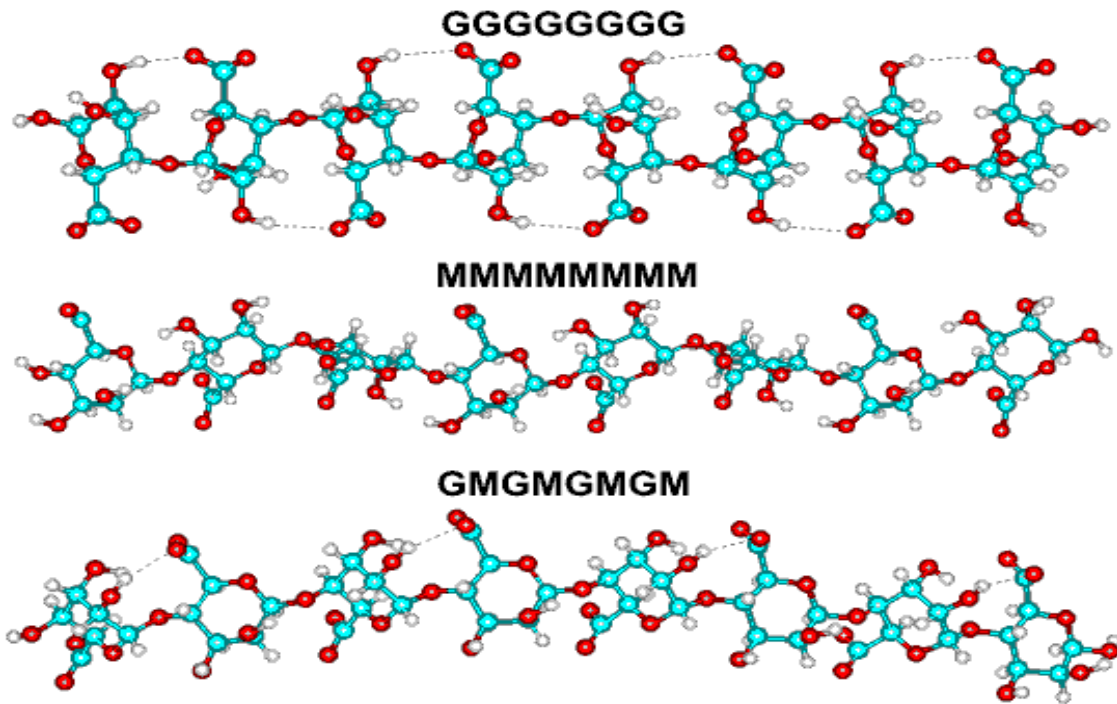
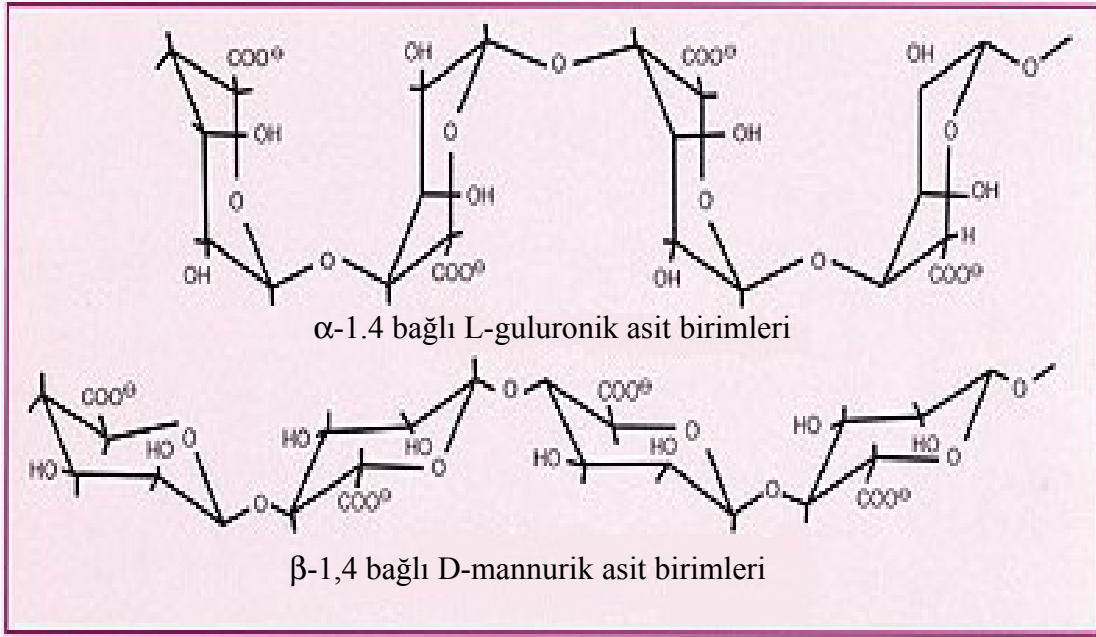
İki komşu guluronik asit birimleri bulunduğunda çok değerlikli katyonlar polimere bağlanır. Böylece çok değerlikli katyonlar, hem farklı polimer moleküllerinin hem de

aynı polimer zincirinin farklı kısımlarının çapraz bağlanmasından sorumludur. Jelleşme işlemi, ılımlı koşullar altında sodyum iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla basitçe yer değiştirmesiyle gerçekleşir. Yöntem, bir tip alginat verildiğinde değişmeyecek olan guluronik asit birimlerinin bulunabilirliğine bağlıdır, molekülün geçirgenliği ise immobilizasyon koşullarına bağlı değildir. Daha doğrusu, gözenek büyüklüğü başlangıç maddesinin seçimiyle kontrol edilir.



İyonik olarak bağlanmış jel yapısı, 0-100 °C arasında termostabildir, bu nedenle ısıtma jeli sıvılaştırmayacaktır. Bununla birlikte alginat jeli, yüksek derişimde sodyum, potasyum ya da magnezyum içeren bir çözeltiye daldırılarak kolaylıkla geri çözülebilir. 25:1 oranındaki sodyum kalsiyum miktarı, jel destabilizasyonunu önlemeye yardım edecektir. Gerçekte, alginat satıcılarınca substrat ortamında 3 mM kalsiyum iyonu bulunması tavsiye edilir.

Alginat yaygın olarak gıdada, farmakolojide, tekstilde ve kağıt endüstrisinde kullanılır. Bu ürünlerde kullanılan alginatın özellikleri; kalınlaşma, stabilize olma, jel oluşumu ve film oluşumudur. Farklı alginat kaynaklarından izole edilen alginat polimerlerinin özellikleri değişmektedir. Farklı algler veya aynı algin farklı kısımlarındaki madde, farklı kompozisyon ve düzende alginat monomeri verir. Yalnızca tek bir tip monomerden homopolimerik bloklar oluşabileceği [(-M-M-M-)(-G-G-G-)] gibi, farklı monomerlerden de oluşabilir (-M-G-M-G-M-). Farklı tipteki alginatlar, molekül kütlesine ilave olarak mannurik ve guluronik asidin bağıl bileşimine göre her uygulama için spesifik olarak seçilmelidir. Örneğin, kalınlaşma özelliği (viskozite özelliği) temel olarak polimerin molekül kütlesine bağlıdır, oysa jelleşme guluronik asit içeriği ile yakından ilgilidir. Böylece yüksek guluronik asit içeriği daha güçlü bir jelleşme ile sonuçlanır.



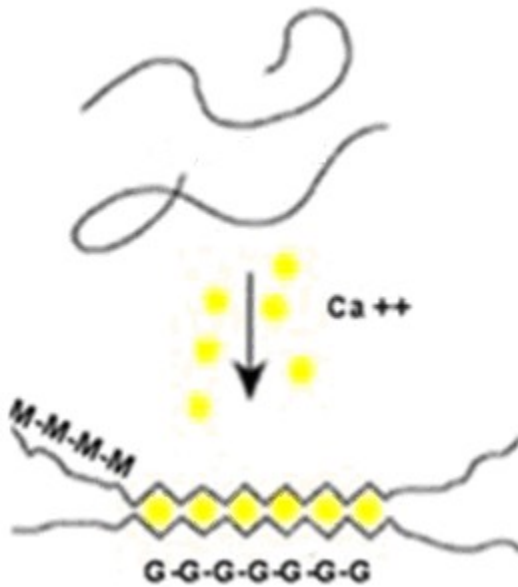
Şekil 1.2 Alginat polisakaritindeki guluronik ve mannurik asit birimleri ve bunların polimerleri

Biyoyumluluğu, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} gibi divalent katyonlar varlığında jelleşmesi bu polimerin uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Alginat jel bilyeleri hazırlamada en çok kullanılan iki değerlikli metal kalsiyumdur. Alginatın ucuz ve toksik etki göstermemesi, boncukların kolay bir şekilde

hazırlanabilmeleri gibi avantajları vardır. Alginat çözeltisinin ve CaCl_2 çözeltisinin konsantrasyonlarını artırmak daha sıkı çapraz bağlı jellerin oluşmasına neden olur. Fakat dikkat edilmesi gereken nokta yüksek konsantrasyonlu alginat çözeltisiyle çalışmanın zorluğudur.

Alginat toksik değildir ve biyokimyasal olarak inerttir. Biyolojik olarak aktif maddelerin enkapsülasyonuna uygundur ve ilaç salınım sistemleri gibi pek çok biyomedikal uygulamada kullanılır. Na^+ gibi monovalent katyonların varlığında çözünür. Ba^{2+} ve Al^{3+} gibi divalent katyonlarla çözünmeyen jel küreciklerini oluşturur. Ba^{2+} ve Al^{3+} iyonlarıyla güçlü çözünemeyen matriksler oluşturur. Ca^{2+} iyonlarıyla jel, film, küre, makrokapsüller oluşturur.

Kalsiyum iyonları alginatın mannurik asit ve guluronik asit birimleri için afiniteye sahiptirler. Bu birimlerle reaksiyona girerek kalsiyum-alginat kompleksi oluştururlar. Oluşturulan küreler gözenekli yapıdadır, substratların ve ürünlerin jelden difüzyonuna izin verir. Şekil 1.3’de alginat polimerinin Ca^{2+} iyonları ile ‘yumurta kutusu’ olarak adlandırılan formu oluşturması görülmektedir (Sunucu, 2007).



Şekil 1.3 Ca^{2+} iyonuyla şelatlaşma

1.7. Üreaz

Üreaz hidrolaz sınıfı bir enzimdir. 1926 yılında Sumner tarafından soya fasulyesinden kristal halde elde edilmiştir. Bu olay enzimoloji tarihinin önemli olaylarından biridir. İlk defa bir enzim saf olarak elde edilmiş ve enzimlerin protein yapısında oldukları kesin olarak anlaşılmıştır. Enzimin üç boyutlu yapısının analizi X ışınları kristallografisi ile 1930'lu yıllarda bulunmasına rağmen, yapının aydınlatılması ancak bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle 1967 yılında mümkün olmuştur (Kara, 2006).

Uluslararası Biyokimya Birliği (U.B. International Union Biochemistry) 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı revizyonla enzimi E.C. 3.5.1.5. olarak kodlamıştır. Bu sıralamaya göre;

3: Tip no: Enzimin bir hidrolaz olduğunu

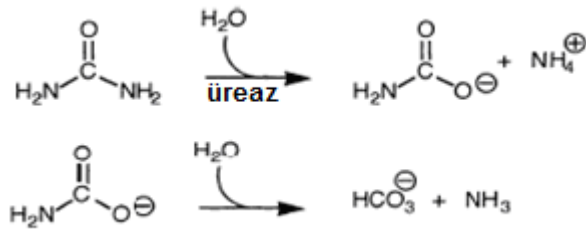
5: Grup no: Enzimin C-N bağlarına etkili olan amidaz grubuna dahil olduğunu

1: Alt grup no: Enzimin bir açilamidaz olduğunu

5: Sistematik ad: Enzimin sistematik adının “*üre aminohidrolaz*” olduğunu gösterir.

Üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksit'e parçalanmasını katalizler (Şekil 1.4). Bu tepkimeyi katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyon hızını yaklaşık bin kat artırmak suretiyle yapar. Normalde üre hidrolizi yavaş gerçekleşen bir işlemdir. Katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyonda oluşan ürünler amonyak ve siyanürik asittir.

Katalizör varlığında gerçekleşen reaksiyonda ise ürünler amonyak ve karbonik asittir. Son olarak karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür.



Şekil 1.4 Üreazın kataliz reaksiyonu

Üreaz enzimi en çok bitki, mantar ve bakterilerde bulunur. Üreyi azot ve karbondioksite parçalayarak azot sirkülasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca zirai gübrelemede ürenin hidrolizini hızlandırmada, insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıkların oluşmasında da önemli rol oynar.

En yaygın üreaz içeren kaynaklar şunlardır;

1- *Klebsiella aerogenes*: Geviş getiren hayvanların sindirim sisteminde yaşayan ve içerdiği üreaz (KAU) sayesinde azot metabolizmasında önemli rol oynayan bir bakteridir.

2- *Bacillus pasteurii*: Toprakta, sularda, pis sularda yaşar. Özellikle ziraat için çok önemlidir. İçerdiği üreaz (BPU) sayesinde bitkiler için toprağı azotça zenginleştirir.

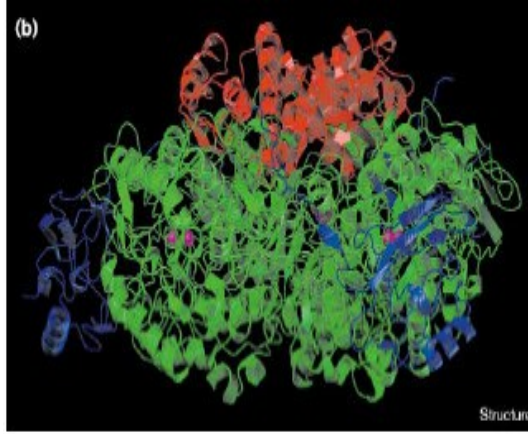
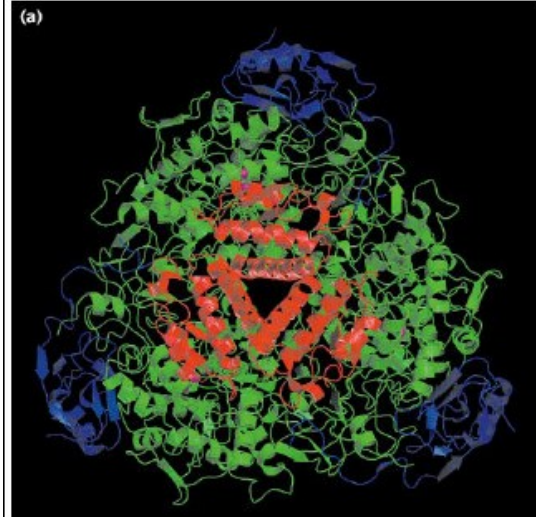
3- *Canavalia ensiformis* (jack bean): Bir tür fasulyedir. Bulunduğı bitkide topraktan azot emiliminin yeterli olmadığı durumlarda azot deposu olarak kullanılan argininin açığa çıkardığı üreyi içerdiği üreaz (JBU) sayesinde amonyağa çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasına yardım eder.

4- *Helicobacter pylori*: İnsanlarda mide rahatsızlığına sebep veren bir bakteridir. Midenin asidik yapısını etkileyerek ülser vb rahatsızlıklara sebep verir.

1.7.1. Üreaz Enziminin Moleküler Özellikleri

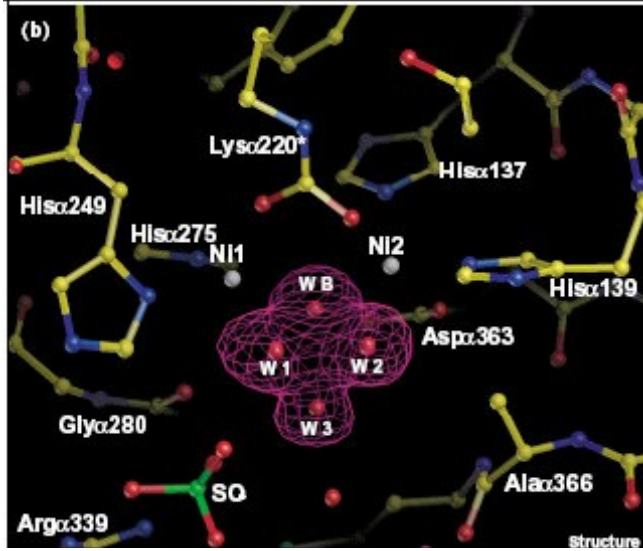
Üreaz (*Canavalia ensiformis*) 1926 yılında Sumner tarafından saf kristal enzim olarak elde edildikten ve bu kristallerin protein yapısında olduğu anlaşıldıktan 50 yıl sonra Dixon tarafından ilk nikel metaloenzim olarak kimlik kazanmıştır. Enzim α , β , γ olarak adlandırılan üç alt birimin oluşturduğu bir heteropolimerdir ve aktif merkezler α alt biriminde bulunur. Aktif merkezde iki nikel iyonu vardır ve bunlar enzimin aktivasyonunda çok önemli rol oynamaktadır.

BPU enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 1.5'de gösterilmektedir. Şekildeki yeşil, mavi, kırmızı kısımlar sırasıyla α , β , γ alt birimlerini göstermektedir. Aktif merkezde Ni iyonları ise pembe ile gösterilmiştir.



Sekil 1.5 BPU üç boyutlu yapısı a) üstten görünüm, b) yandan görünüm

Bilinen kaynaklardan elde edilen üreaz apoenzim değildir ve dolayısıyla aktifleşmek için Ni iyonlarına ihtiyaç duymaz. Aktif merkezde iki Ni iyonu ve bunlara bağlı gruplar bulunur. Araştırmalar sonucunda elde edilen BPU aktif merkez yapısı Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

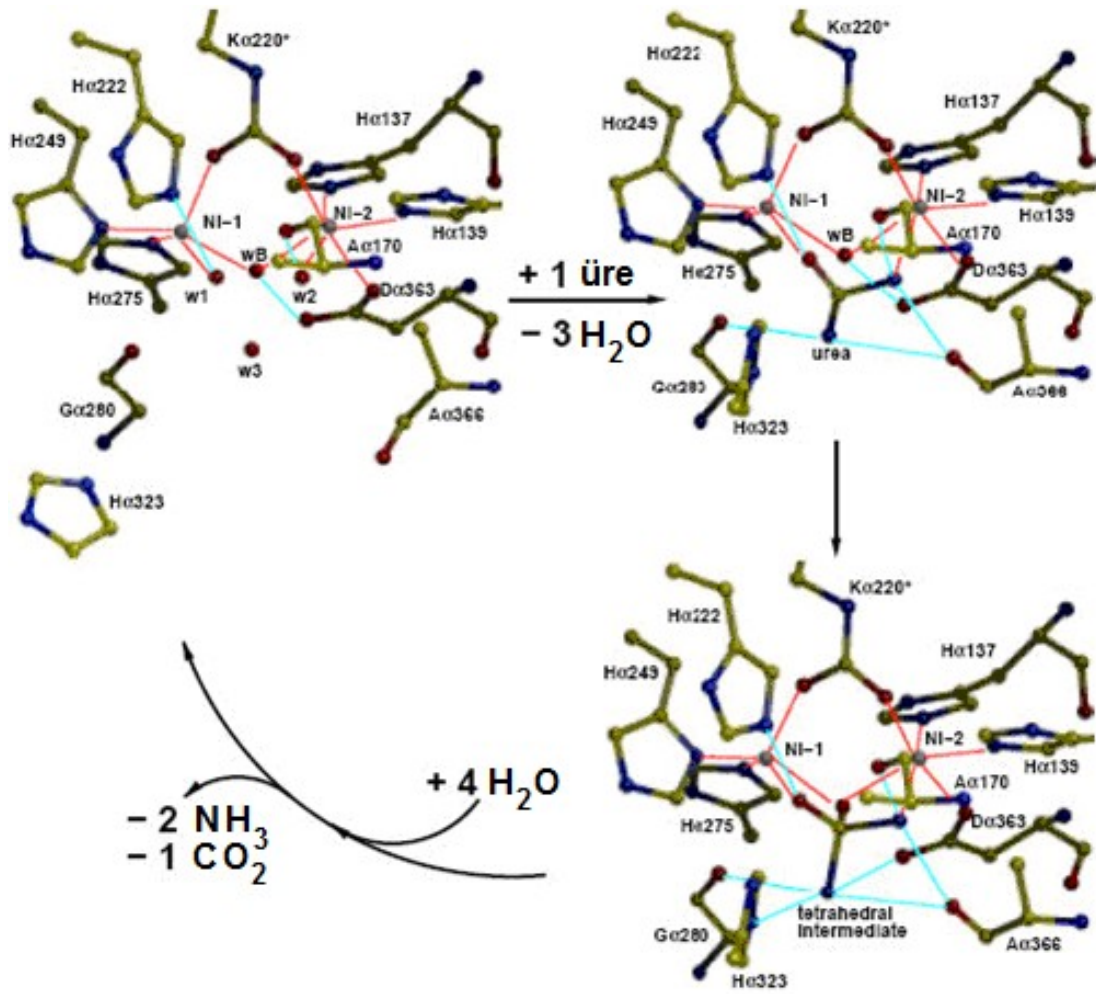


Şekil 1.6 BPU aktif merkezi

Şekil 1.6'da karbon, azot, oksijen, kükürt ve nikel atomları sırasıyla sarı, mavi, kırmızı, yeşil ve gri renkte gösterilmişlerdir.

1.7.2. Enzimatik Tepkime Mekanizması Ve Nikel İyonunun Rolü

Araştırmalar sonucu elde edilen bilgilere göre enzimin katalizlediği reaksiyonlarda aktif merkezdeki nikel iyonunun çok önemli rol oynadığı, reaksiyonun bu iyonlar üzerinden gerçekleştiği ve bu reaksiyon mekanizmasında iki Ni iyonunun farklı görevleri olduğu düşünülmektedir. Bunlardan biri üreyi bağlar ve aktifleştirir diğeri ise nükleofilik su molekülünü bağlar ve aktifleştirir. Kataliz mekanizması şematik olarak Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7 BPU kataliz reaksiyon mekanizması

1.7.3. Üreaz Enzimi İnhibitörleri

Üre zirai uygulamalarda en yaygın kullanılan gübredir. Bunda ucuz, kolay uygulanabilir ve yüksek miktarda azot içermesi önemli rol oynar. Toprakta fazla miktarda üreaz bulunması bitkilerin amonyak zehirlenmesi ve pH yükselmesiyle zarar görmesine sebep olduğu için problem oluşturur. Bazik topraklarda ise amonyak atmosfere verilir ve bu da çevre için tehdit oluşturan ve çözülmesi gereken bir sorundur. İnsanlarda ve hayvanlarda üreaz içeren patojenlerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilebilmesi ve çevreye verilen bu olumsuz etkilerin onarılabilmesi için üreaz inhibitör çalışmaları oldukça önemlidir.

Üreaz aktivitesini etkilediği bilinen inhibitörler hidroksumik asit, L-askorbik asit, 2,2-dipiridil disülfid, ninhidrin, fosforamidaz, tioller, fosfatlar, borik ve boranik asit, ağır metal iyonları olarak sayılabilir.

1.7.4. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları

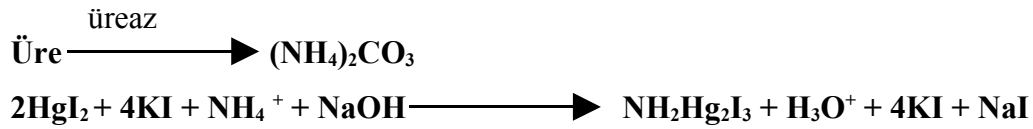
Üreazın kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- **Biyolojik sıvılarda ürenin miktarının hesaplanmasında:** Üre insan vücudunda üretilen amonyakın atılma metabolizmasının bir ürünü olup, idrarla atılır. Ürenin yapımı ve atılımında karaciğer ve böbrekler rol oynar. Fonksiyon bozukluklarında kanda üre birikir. Kanda veya diğer biyolojik örneklerde üre analizinin gerçekleştirilmesinde üreaz enzimi kullanılır.
- **Yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında:** Böbrek fonksiyonlarının yeterli olmadığı durumlarda diyaliz işlemi için yapay böbrek makinesi kullanılır. Bu makineden hastanın kanı geçirilirken ürenin hızla uzaklaştırılması için üreaz enzimi kullanılır.
- **Atık sulardaki ürenin temizlenmesinde:** Atık sulardan ürenin uzaklaştırılması için uygulanan biyolojik arıtma sistemlerinde üreaz içeren makroorganizmalar kullanılır.
- **Yiyecek endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılır:** Gıda üretimlerinde herhangi bir nedenle oluşan üreyi uzaklaştırmak için üreaz kullanılır.

1.7.5. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri

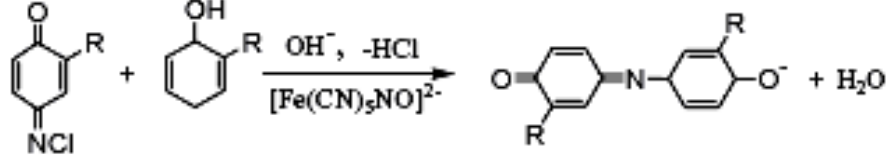
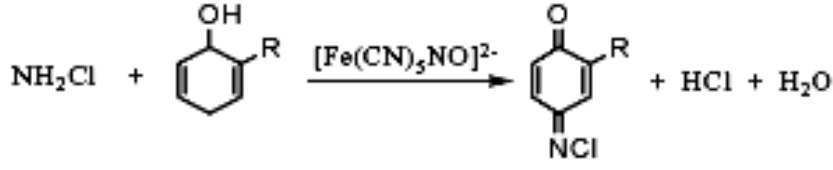
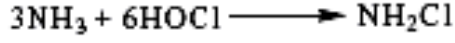
1.7.5.1. Nessler Yöntemi

Nessler reaktifi çözeltilerdeki düşük miktarda amonyanın tayini için kullanılan bir reaktiftir. İlk kez 1856'da Julis Nessler tarafından önerilmiş ve günümüze kadar bazı modifikasyonlara uğramıştır (Nichols ve Willits, 1934). Çözeltide sarı renk oluşumu amonyak varlığını gösterir. Yüksek amonyak dönüşümlerinde kahverengi çökelek oluşur. Reaktif, sulu potasyum iyodür ve potasyum hidroksit içinde Civa(II) iyodürün yaklaşık % 1,4'lük çözeltisinden oluşur (K_2HgI_4) Üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan NH_3 Nessler belirteci ile açık sarı koyu turuncu arasında renk oluşturmakta, oluşan bu renk de spektrofotometrik olarak tayin edilmektedir.



1.7.5.2. Berthelot Yöntemi

Berthelot reaktifi fenol ve hipokloritin alkali çözeltisidir. İlk kez öneren Marcellin Berthelot olduğu için bu isimle anılır. Amonyak tayini için kullanılır ve amonyak ile kolorimetrik tayine izin verecek şekilde mavi renk oluşturur. Fenol yerine salisilat da kullanılabilir. Kanda üre tayinlerinde (BUN) bu çözelti kullanılır. Üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan NH_3 sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprosit katalizörü eşliğinde fenol ile tepkimeye girerek mavi renkli indofenolu oluşturur ve rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılıdır (Şekil 1.8). Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

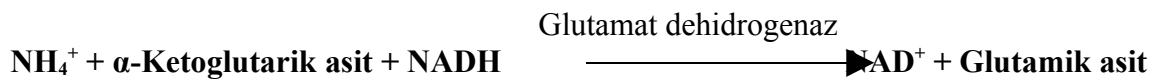
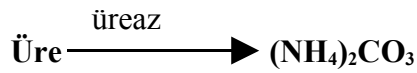


(R = H or COO⁻)

Şekil 1.8 İndofenol oluşum mekanizması

1.7.5.3. Çift Enzim Yöntemi

Hastalık teşhisi için yapılan tetkiklerde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntem çift enzim yöntemidir. Bir enzimatik tayinde substrat veya ürün ölçülebilir bir özelliğe sahip değilse ikinci bir enzim kullanılarak ölçülebilir bir büyüklük edilmeye çalışılır. Aşağıdaki tepkimelerde birinci enzim olan üreazın ürünü amonyak ve karbondioksit olup spektrofotometrik olarak ölçülemez. Takip eden ikinci enzimatik reaksiyonda glutamat dehidrogenaz enzimi NADH'ı koenzim olarak kullanır. Reaksiyon 340 nm'de takip edilerek tayin yapılır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Üreaz (EC 3.5.1.5; üre amidohidrolaz) ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini katalizleyen yaklaşık 480 000 Da molekül ağırlığında bir metaloenzimdir (Dixon et al., 1975). Üreaz bitki, mantar ve bakterileri kapsayan geniş bir organizma çeşitliliğinde bulunur (Mobley ve Hausinger, 1989; Polacco ve Havir, 1979; Hirayama et al., 2000; Cox et al., 2000). Üreazın esas substratı üre olmasına rağmen, enzim daha zayıf olarak asetamid, formamid, N-metilüre, semikarbazit ve hidroksiüre gibi substratların hidrolizini de katalizler (Dixon et al., 1980a). Üre hidrolizinde bitki ve makrobiyal kaynaklı üreazlar 0,1 den > 100 mM üreye kadar K_m değerleri gösterirler. Örneğin, jack bean üreazı (JBU) 2,9 mM değerinde K_m 'e sahiptir (Mobley ve Hausinger, 1989). Üre bitkilere gübre olarak verildiğinde üreaz aktivitesi sayesinde bitkiler tarafından kullanılabilir hale gelir. Üre dünyada en çok kullanılan azot gübresi olduğundan bu maddenin enzimatik hidrolizi tarımsal açıdan büyük öneme sahiptir. İlaveten, üreaz

Helicobacter pylori tarafından indüklenen patolojilerin temel nedeni olarak bilinmektedir. Üreaz bakterinin düşük mide pH'ında yaşayabilmesini sağlar ve bu nedenle gastrik ve peptik ülserlerin patogeneğinde bazen kansere kadar gidebilen bir rol oynar (Moblely et al., 1995). Tarımda ürenin gübre olarak kullanılması sırasında yüksek üreaz aktivitesi sonucu atmosfere büyük miktarlarda amonyağın salınması önemli çevre sorunlarına ve ekonomik problemlere neden olur (Follmer, 2008). Bitkilere azot sağlaması açısından önemlidir. Tarım ve tıpta makrobiyal üreazların kullanımının fazla olmasının yanında bu enzimin yapısı ve katalitik mekanizması da daima araştırma konusu olmuştur. Çünkü üreaz üre hidrolizi reaksiyonu hızını 10^{14} kat artırır ve hidrolitik enzimler içinde aktif merkezinde nikel bulunduran tek enzimdir (Estiu et al., 2006).

Biyokimyasal olarak en iyi karakterize edilmiş üreaz jack bean (*Canavalia ensiformis*) üreazıdır (JBU). JBU kristalize edilebilen ilk enzimdir ve enzimlerin protein yapısında olduğunun kanıtlanmasında tarihsel bir rolü vardır. Sumner 1926'daki "Üreaz enzimin izolasyonu ve karakterizasyonu" başlıklı çalışması ile 1946'da Kimya dalında Nobel ödülüne layık görülmüştür. Bu çalışma modern enzimolojinin temel yapıtaşlarından birisidir. JBU aynı zamanda nikel içerdiği tespit edilen ilk enzim olup (Dixon et al., 1975) bitkilerde tespit edilmiş tek nikel içeren metaloenzimdir (Polacco ve Holland, 1993). Buna karşılık ne JBU'nun ne de diğer bitki üreazların üç boyutlu yapısı aydınlatılamamıştır. Yüksek oranda heterojenitesi, çözünürlüğünün düşük olması ve yüksek polidispersitesi X-ışını kristalografisi ile yapısının aydınlatılması önündeki engelleri oluşturur. Ayrıca JBU'nun *Canavalia ensiformis*'te birden fazla izoformda bulunması da homojen kristallerin elde edilmesi önünde engeldir. Bu nedenlerle bitki üreazlarının üreolitik katalizinin moleküler mekanizmasına ait bilgiler bakteriyel üreazların üç boyutlu yapısı üzerine kurulmaktadır (Follmer, 2008)

JBU ~ 90 kDa'luk identik altünitelerden oluşan hegzamerleri oluşturmak üzere bir araya gelen homotrimerlerden oluşur. Subünite başına iki nikel iyonu bulunur (Takishima et al., 1988). Bakteriyel üreazlarda JBU'a benzer şekilde kompleks altünitelerin ya trimerler yada hegzamerler halinde birleşmesi ile oluşurlar. Ancak fungal ve bitki (jack bean ve soya fasulyesi gibi) üreazları 90 kDa'luk homo-oligomerik proteinler iken, bakteriyel üreazlar iki- veya üç-altüniteli komplekslerin multidimerleridir (Moblely et al., 1995).

Bitkiler ve bakteriler arasındaki uzak filogenetik ilişkiye rağmen bakteri üreazları ile JBU arasında % 50'nin üzerinde amino asit dizilimi benzerliği vardır. Bu durum ortak evrimsel orijinden geldiklerini düşündürmektedir. Bu durum ve reaksiyon kinetiklerindeki benzerlikler bilinen tüm üreazların ortak yapı ve katalitik mekanizmaya sahip olduklarını düşündürdüğünden bitki üreazlarını anlamak için bakteriyel üreazlardan elde edilen sonuçlar değerlendirilmektedir (Follmer, 2008).

JBU 90 kDa'luk monomer başına 2 eşdeğer nikel içerir. Ancak jack bean'den elde edilen bir üreaz izoenzimi olan kanatoksinin metal içeriği X-ışını emisyon tekniği ile incelendiğinde monomer başına bir çinko ve bir nikel atomu içerdiği gösterilmiştir. Düşük nikel içeriği düşük üreaz aktivitesini açıklamaktadır (Follmer et al., 2002, 2004b). Öte yandan düşük Ni içeren veya Ni içermeyen ortamlarda çoğaltılan jack bean veya soya fasulyesi bitkilerinin üreaz aktivitesi büyüme ortamındaki Ni derişimi azalmasına bağlı olarak düşmüştür. Buna karşılık apoprotein sentezinin nikelden bağımsız olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar Ni kofaktörünün aktivite için gerekli fakat protein biyosentezi için gerekli olmadığını göstermektedir.

Üreazların temel görevi organizmaların dışarıdan aldığı veya içinde ürettiği üreyi azot kaynağı olarak kullanmasını sağlamaktır. *Leguminosae* ailesinin pek çok çeşidi tohumlarında yüksek üreaz aktivitesine sahiptir. Çimlenme sırasında üreaz enzimi arjinaz enzimi ile birlikte tohum protein stoklarının kullanılmasını sağlar. Ancak, üreazların fizyolojik görevi bazı bitkilerde hala bilinmemektedir. Örneğin; *Helicobacter pylori*'nin üreaz genini taşıyan transgenik tütün bitkisinde üreolitik aktivite iki kat, amonyak düzeyi sekiz kat artarken bitkinin büyümesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Follmer, 2008).

Soya fasulyesinde üreazların gerekliliği hala tartışılmaktadır (Goldraij et al., 2003). Soya fasulyesi Eu4 geni tarafından kodlanan ve tüm dokularında sentezlenen bir eşsiz üreaz içermektedir. Bunun yanında soya fasulyesi gelişmekte olan embriyoda embriyo-spesifik üreaz içerir. Bu üreazın aktivitesi tüm dokularda gözlenen üreazın 1000 katı olup olgun tohumlarda bulunmaz (Goldraij et al., 2003). Üreaz-negatif soya fasulyesi mutantlarında veya üreaz inhibitörü varlığında büyüyen soya fasulyesi bitkisinde üre birikmesi tespit edilmiştir.

1981 yılında Carlini ve Guimaraes jack beanden kanatoksini izole etmişlerdir. Kanatoksin fare veya sıçanlara enjekte edildiğinde convulsiyona ve ölüme neden olan bir toksin proteindir. Sonraki yıllarda kanatoksinin üreazın bir izoformu olduğu gösterilmiştir (Follmer et al., 2001). JBU'dan farklı olarak kanatoksin 95 kDa altünitelerin bir homodimeridir (Carlini ve Guimaraes, 1981). Daha sonra *C. ensiformis*'te bir üreaz izoformu daha tespit edilmiştir. Bu farklı üreazların bitkilerde fonksiyonunun ne olduğu ve bu enzimlerin üreolitik aktiviteden farklı fizyolojik özellikler taşıyıp taşımadıkları araştırma konusu olmuştur (Follmer, 2008).

Üreazların sergilediği farklı aktiviteler arasındaki ilişkileri ortaya koymak için üreazların böcek öldürücü (insektisit) aktiviteleri incelenmiştir (Follmer et al., 2004b,c). Araştırmada hem bitki hem de bakteri kaynaklı enzimler incelenmiş ve sadece bitki üreazlarının insektisit özelliği olduğu tespit edilmiştir. JBU kanatoksinden biraz daha az toksik buna karşılık soya fasulyesi üreazından daha toksik bulunmuştur. Üreazların öldürücü olmaları yanında sağ kalan böceklerde de zayıflamaya ve gelişme geriliğine neden oldukları gözlenmiştir. Bitki üreazlarının insektisit özelliği üreaz inhibitörleri ile muamele edildiklerinde kaybolmadığından insektisit ve üreolitik aktivitelerin birbiriyle bağlantılı olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç insektisit aktivitesinin sadece bitki üreazlarına özgü bir özellik olduğunu ve bu özelliğin proteinlerin savunma mekanizmasındaki rollerinin bir göstergesi olduğunu bildirmektedir.

Kanatoksin fare ve sıçanlara intraperitoneal olarak verildiğinde toksik etki göstermektedir. Buna karşılık oral olarak verildiğinde inaktiftir. İnsektisit aktivitesinde gözlemlendiği gibi üreaz inhibitörleri ile muamele edildiğinde toksik aktivitesi devam etmektedir. Öte yandan, JBU ve SBU intraperitoneal olarak fare ve sıçanlarda toksik etki göstermektedir. Bu durumda üreaz aktivitesi ile diğer aktiviteler arasında bir korelasyon olmadığı gibi intraperitoneal uygulamalarda memelilere toksik etki gösteren izoformu kanatoksinidir. Kanatoksin aynı zamanda düşük dozlarda verildiğinde gonadotropin ve insulin seviyelerini yükseltmektedir.

Üreazların bir diğer fark edilen özelliği de bitki üreazları (JBU, kanatoksin ve SBU) ve bakteriyel üreazların memeli kanı plateletlerini aktive etmeleridir (Follmer et al., 2004c). İnsektisidal aktivite ve memelilerde toksisite özellikleri gibi platelet aktivasyonu özellikleri de üreolitik aktiviteden bağımsızdır. Bu özelliğin bakteriyel enfeksiyonların

patojenezi açısından anlamı henüz aydınlatılamamıştır. Buna rağmen bitki üreazlarının özelliklerinin araştırılması kaynak makroorganizmada bu proteinlerin fizyolojik rollerinin aydınlatılması özellikle fitopatojenlere karşı tamamen farklı olduğu düşünülen bir mekanizmayla bitkiyi koruması amonyak üretiminden çok farklı ve üzerinde durulması gereken bir özelliktir (Follmer, 2008).

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Bu enzimin bağıl olarak ucuzluğu, dayanıklılığı ve kolay izlenebilmesinin yanı sıra, kan ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Literatürde karboksimetilselüloz, poliüretan köpük, akrilik taşıyıcılar gibi birçok farklı taşıyıcı kullanılarak üreazın immobilize edildiği çalışmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Biyoreaktör uygulamaları için poliüretan köpük üzerine BSA ve glutraldehit ile üreaz immobilizasyonu % 50 aktivite verimi ile sonuçlanmıştır (Onyelizi, 1988). Aminlenmiş bütül asilatetilen dimetakrilat kopolimerine kovalent olarak immobilize edilen üreaz % 56 aktivite verimi ile çalışmış ve 3 hafta sonra aktivitesini % 70 korumuştur (Krajewski ve Zaborska, 1990). Polivinil alkol membrana UV ışık ile bağlanması sonucu üreazın % 15,7 gibi düşük aktivite gösterdiği (Krystema, 1991); buna karşılık kitosan membran üreazının glutraldehit ile muamele edildikten sonra bağlanması % 94 aktivite ile sonuçlanmış (Krajewski ve Zaborska, 1990) ve bu son uygulamanın kandan ve diyalizattan üre uzaklaştırılması için kullanılabilmesi belirtilmiştir. Disikloheksil karbodiimid ile aktive edilmiş karboksi metil selüloz üzerine üreaz immobilize edilmiş ve 3 ay sonunda aktivitesini % 85 koruduğu saptanmıştır (Dumitriu, 1989). Dimetil aminlenmiş naylon üzerine ve gözenekli boncuk ve silika jel üzerine de üreaz başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir (Wojcik, 1991). Adsorpsiyon ve iyonik bağlama ile Amberit IRA-938 üzerine üreaz immobilizasyonu da gerçekleştirilmiştir (Hamarat, 2000).

Üreaz enziminin tarımda, sanayide ve tıptaki geniş uygulamaları bu enzimin daha etkin ve daha ekonomik kullanılması için tekniklerin araştırılmasına neden olmuştur. Bu tekniklerin başında enzimin bir destek üzerine immobilizasyonu gelmektedir. Üreazın immobilizasyonu üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Polimer membranlar

immobilizasyon için sıklıkla kullanılmaktadır, Godjevargova ve Dimov (1997) üreazı 2-metilaminoetil metakrilat ile modifiye edilmiş akrilonitril kopolimerden hazırlanmış membran üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin pH'ı serbest enzime göre 0,5 birim alkali bölgeye kaymıştır. Optimum sıcaklık 30 °C'den 45 °C'ye kaymış, termal kararlılık ise serbest ve immobilize enzimler için özdeş bulunmuştur. Sentezlenen membranın klinikte üre aktivitesini ölçmek üzere test-strip şeklinde kullanılabilceği denenmiş ve önerilmiştir.

Üreaz, kitosan-poli(glisidil metakrilat) kopolimerine immobilize edilmiştir. İmmobilize üreaz aktivitesinin yaklaşık % 82'sini korumuştur. Serbest ve immobilize üreazın optimum pH'ı değişmezken, immobilize enzimin optimum sıcaklığı daha yüksek bulunmuştur. İmmobilizasyonun enzimin termal, pH ve depo kararlılığını iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Chellapandian ve Krishnan, 1998).

Toprakta bitkilerden ve makroorganizmalardan kaynaklanan üreaz enzimi bolca bulunur. Topraktaki üreolitik aktivitenin büyük bölümü topraktaki organik ve mineral kolloidleri üzerinde üreazın immobilizasyonu yolu ile stabilize olması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Üreazın toprak üzerindeki immobilizasyonunun adsorpsiyon, kinetik ve kararlılık özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmalarda en çok kullanılan üreaz JBU'dur. Alkali topraklarda üreaz immobilizasyonunu incelemek için hidroksiapatit üzerine immobilizasyonu çalışılmış ve optimum pH'ın 7'den 8'e kaydığı, kinetik parametrelerden V_{max} 'ın ve K_m 'in azaldığı tespit edilmiştir (Marzadori et al., 1998). İmmobilizasyon işlemi enzim kararlılığını 2 kat, proteolitik hidrolize karşı kararlılığı ise 7 kat artırmıştır.

Polianilin de üreaz immobilizasyonu için bir destek maddesi olabileceği araştırılmıştır (Laska et al., 1999). İmmobilize üreazın kinetik parametrelerinden K_m 'in yükseldiği V_{max} 'ın ise pratik olarak değişmediği saptanmıştır, bunun yanında depo kararlılığının serbest enzime göre iyileştiği gözlenmiştir.

Polielektrolit kompleksleşmesi yoluyla poli(metilen ko-guanidin) membranları ile kaplanmış alginat kürelere üreaz immobilizasyonu çalışılmıştır (Hearn ve Neufeld, 2000). Bu çalışmada, immobilizasyon sonrası % 70 kütle, % 31 aktivite verimi elde edilmiş ve kaplama için kullanılan ko-guanidin derişimi arttıkça aktivitenin düştüğü

gözenmiştir. Kaplama işlemi glukoz varlığında gerçekleştirildiğinde ise aktivite kaybının gözlenmediği rapor edilmiştir.

Poliester nonwoven destek maddesi olan poli(N-izopropilakrilamid-co-N-akriloksisuksinimid-co-2-hidroksietil metakrilat) hidrojelinin üzerine çapraz bağlanmasıyla elde edilen kompozit membrana üreaz immobilizasyonu incelenmiştir (Chen ve Chiu, 2000). İmmobilizasyon sonrasında üreazın termal stabilitesinin arttığı ve sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir.

Ticari poliakrilonitril oyuk fiberlerin yüzeyi hidrolize edilip glüteraldehit kullanılarak kovalent olarak üreaz bağlanması sonucu immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonucu üreaz aktivitesinde hafifçe yükselme tespit edilmiş ve klasik diyaliz makinesinden daha hızlı üre uzaklaştırılabileceği bildirilmiştir (Yang ve Lin, 2001).

Bu çalışmada üreaz enziminin alginat doğal polimeri üzerine immobilizasyonunun karakterizasyonu ve doğal örneklerle uygulanabilirliği araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneylerde, Velp (Multistirrer 15) çoklu magnetik karıştırıcı, Hettich (Universal 32R) santrifüj, Hanna (pH 211) pH metre, Hereaus (Function Line) etüv, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, IKA (MS2) vorteks, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, Bandelin Sonorex (RK255H) ultrasonik banyo, Ohaus (PA 214-C) 0,1 mg duyarlıkta terazi, Indesit Nofrost Buzdolabı ve Brand (Transferpette) otomatik pipetler kullanıldı.

Alginic asit sodyum tuzu medium viscosity, kalsiyum klorür dihidrat, sodyum nitro prussid, üre, amonyum klorür, Commassie Brilant Blue G-250, Sığır serum albumin (BSA), fenol, sodyum hidroksit, EDTA disodyum tuzu, Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; Jack Bean üreaz (EC 3.5.1.5) Fluka (Buchs, İsviçre)'den temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Enzimler

Bu çalışmada soya fasulyesi üreazı ile Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) üreazı kullanıldı. Soya fasulyesi üreazı piyasada satılan yağsız soya unundan 2 g alınarak 50 mL saf su ile soğukta 2 saat süre ile karıştırıldı. 4000 x g'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant ayrıldı. Süpernatanda protein ve enzim aktivitesi tayinleri yapıldı ve bu enzim çözeltisi stok olarak kullanıldı.

Jack bean üreazı ise piyasadaki satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.2.2. Bradford Yöntemi İle Protein Tayini

Çalışma boyunca tüm protein tayinleri Bradford'a (1976) göre yapıldı. Bu yöntemde bir organik boyar madde olan Commassie Brilliant Blue G-250'nin proteini renklendirme özelliğinden yararlanılır. Commassie Brilliant Blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyadır. Boya, kırmızı ($A_{\max}=465$ nm) ve mavi ($A_{\max}=595$ nm) formlarda bulunur. Kırmızı form çözeltideki haldir. Boya proteine bağlanınca mavi renk oluşur. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlıdır. İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar stabil kalır. Bradford yöntemi ile protein tayini yapılırken aşağıdaki işlemler uygulandı.

Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinin hazırlanması :

100 mg Commassie Brilliant Blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Üzerine 100 mL % 85'lik fosforik asit ilave edildi. Filtre kağıdı ile süzülerek saf su ile 1L'ye tamamlandı.

Stok ve standart protein çözeltilerinin hazırlanması :

100 µg BSA, 0,15 M'lık NaCl çözeltisi ile 1000 µL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltilerden Çizelge 3.1'e göre standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan çözeltiler

Standart derişimi (µg/ 1,5 mL)	Stok BSA çözeltisi hacmi (µL)	0,15 M NaCl hacmi (µL)
10	100	1400
20	200	1300
30	300	1200
40	400	1100
50	500	1000

60	600	900
70	700	800
80	800	700
90	900	600

Yukarıda hazırlanan standart çözeltilerinden 1,5 mL alınarak üzerlerine 1,5 mL Commassie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek köre karşı 595 nm’de absorbands değerleri 3 mL’lik plastik küvetlerde okundu. Kör olarak 1,5 mL 0,15 M NaCl ve 1,5 mL Commassie Brilant Blue G-250 karışımı kullanıldı. Her deney 3 kez tekrarlandı ve ortalama alındı. BSA derişimine karşı ölçülen absorbands değerleri kullanılarak çalışma grafiği çizildi.

3.2.3. Üreaz Aktivitesi Tayini

Serbest ve immobilize üreaz aktiviteleri Berthelot yöntemine (Berthelot, 1859) göre ölçüldü. Bu yöntem için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

Fenol reaktifi: A- 1 g fenol/10 mL saf su

B- 25 mg sodyumnitroprussid / 50 mL saf su

A ve B çözeltileri eşit hacimde karıştırılarak “fenol reaktifi” oluşturuldu.

Alkali hipoklorid: A- % 5 NaOH

B- litrede 26 g NaOCl bulunan ticari hipoklorid

A ve B eşit hacimde karıştırılarak “alkali hipoklorid” reaktifi oluşturuldu.

Fosfat Tamponu : 0,05 M, pH 7,0 olacak şekilde ayarlandı.

Üre çözeltisi : Fosfat tamponunda 6,6 mg / 10 mL derişiminde (0,11M) hazırlandı.

Üreaz çözeltisi : Fosfat tamponunda 1 mg/mL derişiminde hazırlandı.

Amonyum Klorür Standartları : Fosfat tamponunda 0,20 mmol/mL NH₄Cl stok çözeltisi kullanılarak 0,001-0,020 µmol/mL konsantrasyon aralığında hazırlandı.

Yöntem:

1,95 mL üre çözeltisine, 50 µL üreaz çözeltisi eklenerek 5 dakika 37°C'lik su banyosunda karıştırılarak bekletildi. 500 µL fenol reaktifi ve 500 µL alkali hipoklorid reaktifi eklenerek vortekslendi ve 55°C lik su banyosunda 5 dakika bekletildi. Oluşan rengin 630 nm'deki absorbansı üreaz içermeyen köre karşı ölçüldü. Oluşan amonyak miktarı üre yerine NH₄Cl kullanılarak çizilen standart çalışma grafiği yardımıyla bulunarak aşağıda verilen formülden spesifik aktivite hesaplandı.

Spesifik Aktivite (U/mg) = (µmol Amonyak)/t (dak) x mg protein

İmmobilize enzimlerin aktivite ölçümlerinde üreaz çözeltisi yerine 5 adet immobilize enzim makroküresi kullanıldı ve spesifik aktivite hesaplandı.

3.2.4. Kalsiyum Alginat Makro Kürelerinin Hazırlanması

Farklı yüzde (w/v) bileşimlerinde (% 1,0; % 2,0; % 3,0) hazırlanan sodyum alginatın sudaki çözeltisi, 1 mg/mL üreaz içeren stok çözeltinin 500 µL'si ile karıştırıldıktan sonra, farklı yüzde (w/v) bileşimlerinde (% 1,0; % 2,0; % 3,0) hazırlanan CaCl₂'ün sudaki çözeltisine 2,5 mL hacimli bir medikal enjektör yardımı ile damlatılarak enzim içeren makro küreler elde edildi. Makro küreler 15-20 dakika magnetik karıştırıcı ile karıştırılıp yaklaşık 24 saat buzdolabında bekletilerek olgunlaştırıldıktan sonra süzülüp saf su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Makrokürelerden 5'şer adet tüp içine yerleştirilerek Berthelot yöntemine göre enzim aktivitesi ölçüldü. Süzüntüde Bradford yöntemi ile protein tayini yapılarak makro kürelerdeki protein miktarı hesaplandı.

Soya üreazı da yukarıda anlatıldığı gibi alginat jelde immobilize edildi.

3.2.5. Kinetik Parametrelerin Tespiti

Serbest ve alginata immobilize olmuş üreaz enzimi aktivitesinin tespiti için substrat olarak üre (5-150 mM) kullanıldı. Üre çözeltileri pH'ı 7,0 fosfat tamponunda hazırlandı. Enzim aktivite tayinleri Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.2.6. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 5,0 asetat tamponu; 6,0–8,0 fosfat tamponu; 9,0 karbonat tamponu) 50 mM'lık derişimlerde tampon çözeltiler hazırlandı. Serbest ve immobilize üreazın spesifik aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek spesifik aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite grafikleri çizilerek serbest ve immobilize üreaz enzimleri için optimum pH değerleri belirlendi. Kullanılan çözeltiler bileşimleri Çizelge 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3.2 Farklı pH değerlerinde serbest ve immobilize üreaz ile optimum pH'ın tespiti için hazırlanan çözeltiler bileşimleri

	Serbest	İmmobilize		
pH	Enzim hacmi(μ L)	Makro küre sayısı	Üre hacmi (μ L)	Üre final derişimi (mmol/mL)
5	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
6	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
7	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
8	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
9	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$

3.2.7. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 35, 45, 55, 65, °C) pH 7,0 fosfat tamponu kullanılarak 0,11 M'lık üre substratı ile üreaz aktiviteleri ölçüldü. Üreaz aktivite ölçümleri için kullanılan çözeltiler hacimleri ve makroküre sayıları ile substrat derişimleri Çizelge 3.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Farklı sıcaklıklarda serbest ve immobilize üreaz ile optimum sıcaklığın tespiti için hazırlanan çözeltiler bileşimleri

	Serbest	İmmobilize		
--	---------	------------	--	--

Sıcaklık, °C	Enzim hacmi (µL)	Makro küre sayısı	Üre hacmi (µL)	Üre final derişimi (mmol/mL)
4	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
15	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
25	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
35	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
45	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
55	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$
65	50	5	1950	$7,15 \times 10^{-3}$

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığının Ölçülmesi

Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazının depo kararlılığı, +4 °C'de 3 gün aralıklarla toplam 30 gün Berthelot yöntemine göre aktivite ölçmek suretiyle test edildi. Serbest ve immobilize enzimlerin başlangıç aktiviteleri 100 kabul edilerek belli süreler sonunda ölçülen enzim aktiviteleri % aktivite olarak hesaplandı.

3.2.9. Uygulama

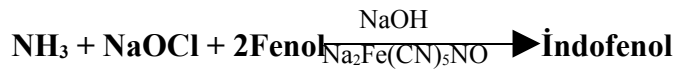
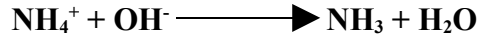
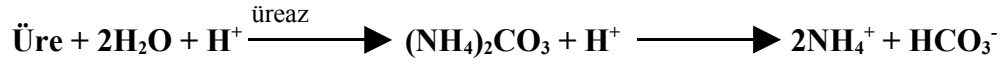
3.2.9.1. İdrarda Üre Tayini

Üre, amino asitlerin deaminasyonu sonucu oluşan amonyaktan karaciğerde sentezlenir. Bu metabolik yol vücuttaki fazla azotun atılması için en temel yoldur. Ürenin vücut sıvılarındaki miktarı üre azotu olarak tayin edilir. Ürenin molekül kütlesi 60 Daltondur ve molekül yapısında 2 azot atomu bulundurur. Bu nedenle ölçülen üre azotu değeri 60/28 veya 2,14 değeri ile çarpıldığında örnekteki miktarı hesaplanmış olur.

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için günümüzde serumda ölçülen en önemli parametre serum üre azotudur. Ayrıca her zaman olmasa da idrarda da üre analizi yapılmaktadır. İdrar örneğinde üre tayini yapılacak ise ürenin bakteriler tarafından bozunmasını önlemek için ya taze idrar kullanılmalı ya da idrar örneği buzdolabında saklanmalıdır.

İdrarda üre tayininin temel prensibi üreazın amonyum karbonat ile hidrolizlenmesi sonucu oluşan amonyağın alkali ortamda fenol ve sodyum hipoklorid ile mavi indofenol bileşiğinin oluşturması esasına dayanır. Bu reaksiyonda sodyum nitropurissid katalizör

olarak kullanılır (Tietz, 1976). Mavi rengin şiddeti örnekteki üre miktarı ile doğru orantılıdır. Analizlenecek örneğin idrar olması durumunda üreaz ile muameleden önce idrarda bulunan üre kaynaklı olmayan amonyakın uzaklaştırılması için örnek permutit ile önceden muamele edilir. Reaksiyonun denklemleri aşağıdaki gibidir:



Reaktifler:

1. Deneyleerde kullanılacak su amonyaksız olmalıdır.
2. Fenol-nitropurissid çözeltisi 10 g fenol ile 0,050 g sodyum nitropurissid 1 litrelik balon jofede amonyaksız su içinde çözülecek hazırlandı. Çözelti 5 °C'de saklanmak koşulu ile 2 ay boyunca dayanıklıdır.
3. Alkali hipoklorid çözeltisi 5 gram sodyum hidroksit 500 mL suda çözüldü, soğutuldu ve 0,42 g sodyum hipoklorid ilave edilerek çözelti hacmi 1 L'ye tamamlandı. Renkli şişede buzdolabında saklanan çözelti iki ay dayanıklıdır.
4. Sodyum etilendiamintetraasetat (EDTA) çözeltisi: 10 g EDTA disodyum tuzu 800 mL suda çözüldü ve 1 M Sodyum hidroksit kullanılarak pH'ı 6,5'e ayarlandı ve çözelti 1 L'ye tamamlandı. EDTA'nın görevi üreaz aktivitesi ile girişim yapabilecek katyonları bağlamaktır.
5. Üreaz stok çözeltisi: 0,2 g üreaz 10 mL suda çözüldü ve 10 mL gliserin eklendi. Buzdolabında saklandığında çözelti 4 ay dayanıklıdır.
6. Üreaz çalışma çözeltisi: 1 mL stok üreaz çözeltisi 100 mL EDTA çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı. Buzdolabında üç hafta dayanıklıdır.
7. Üre stok çözeltisi: 1,717 g kuru üre 50 mL suda çözüldü ve 0,1 g sodyum azid ilave edilerek 100 mL'ye tamamlandı. Sodyum azid koruyucu olarak katılmaktadır. Buzdolabında 6 ay dayanıklıdır. Bunun yerine amonyum sülfat çözeltisi de kararlı olma avantajı nedeniyle standart olarak kullanılabilir.

İdrarda üre tayini için işlem sırası:

1. 0,5 g kadar permutit 25 mL'lik mezüre konarak 2 kere su ile yıkandı ve su uzaklaştırıldı.
2. 1 mL idrar örneğine 5 mL su ilave edildi ve 5 dakika karıştırıldı. Hacim 25 mL'ye tamamlanarak karıştırıldı ve permutitin çökmesi beklendi.
3. Test tüplerine Çizelge 3.4'deki karışımlar ilave edildi.

Çizelge 3.4 İdrarda üre analizi için kullanılan çözelti hacimleri

Çözelti	Kör	Standart	Bilinmeyen
Üreaz çözeltisi	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Seyrelmiş idrar örneği	0	0	10 µL
Üre standart çözeltisi	0	10 µL	0

4. Tüpler 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
5. Tüplere hızlıca ve birbiri ardı sıra 5 mL fenol nitro purissid ve 5 mL alkali hipoklorid çözeltileri karıştırılarak ilave edildi.
6. Tüpler 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi.
7. Kör referans olarak kullanılarak 560 nm'de absorbans ölçüldü.

İdrardaki üre azotu miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$(A_{\text{bilinmeyen}}/A_{\text{standart}}) \times 25 \times 50 = \text{mg üre azotu}/100 \text{ mL}$$

3.2.9.2. Dermatolojik Üre Preparatında Üre Tayini

Üre içeren preparatlar dermatolojide kalınlaşmış derinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu preparatların içerdiği üre miktarının tayini için bu çalışmada hazırlanan üreaz enzimlerinin kullanılabilirliği araştırıldı. Bunun için 2 g eczaneden temin edilmiş preparat tartılarak 25 mL saf su ile 1,5-2 saat karıştırıldıktan sonra çökmeye bırakıldı ve üstteki sıvı, üre örneği olarak kabul edilerek idrar örneğinde yapılan üre analizine benzer şekilde analizlendi. Bu deneyde permutit ile muamele basamağı uygulanmadı.

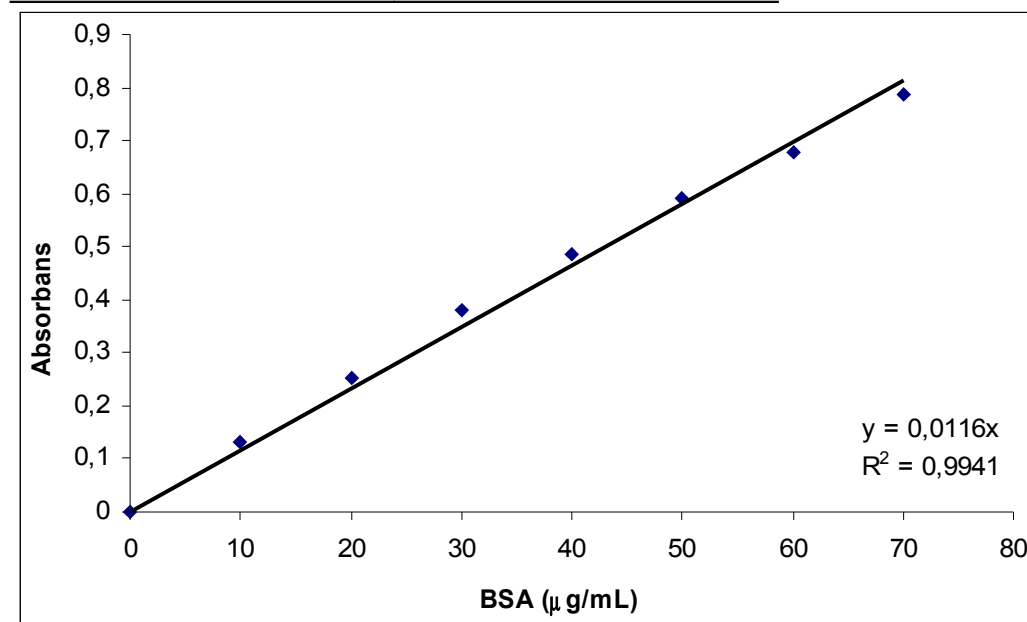
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Tayinleri

Tüm çalışma boyunca protein tayini için kullanılan Bradford yöntemi ile elde edilen standart BSA çözeltilerinin absorpsanları Çizelge 4.1’de; bu değerler kullanılarak elde edilen çalışma grafiği Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Bradford yöntemi ile protein tayini için elde edilen absorpsan değerleri

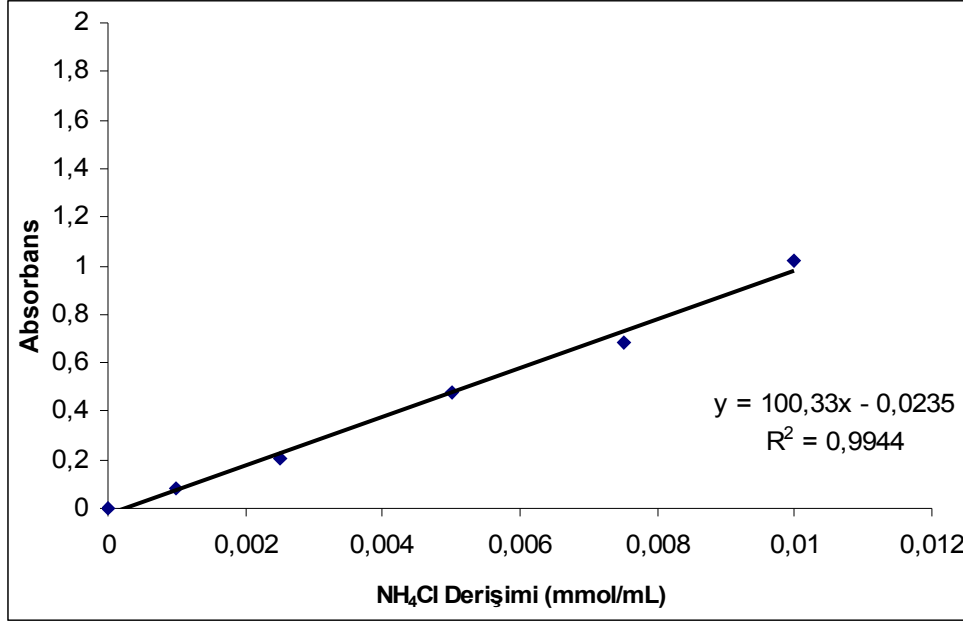
Standart BSA çözeltisi ($\mu\text{g} / 1,5 \text{ mL}$)	Absorbans (A_{ort}) n = 3
0	0,000
10	0,131
20	0,254
30	0,379
40	0,485
50	0,592
60	0,679
70	0,788



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart çalışma grafiği

4.2. Üreaz Aktivitesi Tayini

Berthelot yöntemine göre ölçülen üreaz aktivitesi deneylerinde kullanılan standart çalışma grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2
Berthelot
yöntemi ile üre
tayini için
amonyak
standart
çalışma grafiği

4.3. Uygun Alginate Derişiminin

Tespiti

Farklı derişimlerdeki alginate ve CaCl₂ çözeltileri ile immobilizasyon ve aktivite verimleri hesaplandı.

İmmobilizasyon verimlerinin hesaplanması için bilinen enzim derişimi ile alginate makro küreleri hazırlandıktan sonra süzüntüde protein tayini yapıldı. Makro kürelerdeki immobilize protein miktarı:

$$\text{İmmobilize protein miktarı} = \text{Toplam protein miktarı} - \text{Süzüntüdeki protein miktarı}$$

$$\% \text{ İmmobilizasyon verimi} = \left(\frac{\text{Makro kürelerdeki protein miktarı}}{\text{Toplam protein miktarı}} \right) \times 100$$

formüllerinden hesaplandı.

Aktivite verimlerinin hesaplanması için başlangıçtaki serbest enzimlerin Berthelot yöntemine göre aktiviteleri ölçüldükten sonra belli sayıda makro küre alınarak immobilize enzimin aktivitesi yine Berthelot yöntemine göre ölçüldü.

$$\% \text{ Aktivite verimi} = \left(\frac{\text{Makro kürelerdeki aktivite}}{\text{Serbest enzimin aktivitesi}} \right) \times 100$$

formülünden hesaplandı.

Bu hesaplamalar soya ve jack bean üreaz enzimleri için ayrı ayrı yapıldı. Soya üreazı için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Farklı alginat derişimlerinde soya üreazı ile immobilizasyon ve aktivite verimleri

Bileşimler	%1’lik (w/v) alginat + %1’lik (w/v) CaCl ₂	%2’lik alginat + %2’lik (w/v) CaCl ₂	(w/v) %3’lük (w/v) alginat + %3’lük (w/v) CaCl ₂
Oluşan makro küre sayısı	234	225	212
İmmobilizasyon verimi, %	50,8	53,36	50,86
Aktivite verimi, %	44,8	45,6	47,7

Alginat ve CaCl₂ çözeltilerinin başlangıç derişimlerinin oluşturulan makrokürelerin kararlılığına etkisinin büyük olduğu bilinmektedir. Düşük derişimlerde hazırlanan makrokürelerin yumuşak olması nedeniyle deformasyon görülmekte ve immobilizasyon verimi sızdırma nedeni ile düşük olmaktadır. Öte yandan yüksek derişimler ile hazırlanan makrokürelerin ise çok rijit yapılar olması nedeniyle difüzyon engeli olduğu bilinmektedir.

Çizelge 4.2’deki sonuçlardan; % 2 (w/v) alginat ve % 2 (w/v) CaCl₂ derişimlerinin kullanıldığı kombinasyonlarda aktivite veriminin düşük olmasına karşılık immobilizasyon veriminin daha yüksek olması nedeniyle sonraki çalışmalarda % 2 (w/v) alginat ve % 2 (w/v) CaCl₂ kullanılmasına karar verildi. Bu kombinasyon kullanılarak çalışılan jack bean üreazı immobilizasyon sonuçları Çizelge 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.3 Jack bean üreazı ile immobilizasyon sonuçları

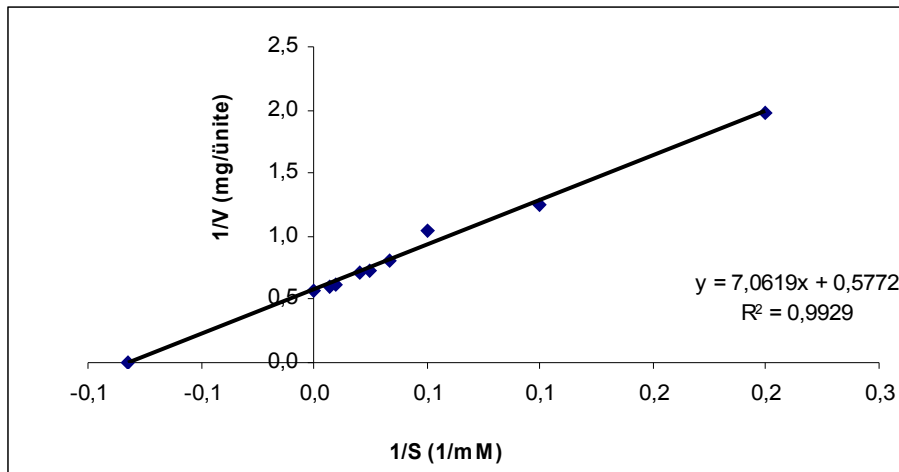
Bileşim	%2’lik (w/v) alginat çözeltisi + %2’lik (w/v) CaCl ₂ çözeltisi
Oluşan makro küre sayısı	225
İmmobilizasyon verimi	% 91,26
Aktivite verimi	% 78,7

4.4. Kinetik Parametrelerin Tespiti

Kinetik parametrelerin tespiti için üre substratı kullanılarak elde edilen sonuçlar serbest soya üreazı için Çizelge 4.4'de; immobilize soya üreazı için Çizelge 4.5'de; jack bean üreazı için Çizelge 4.6'da ; immobilize jack bean üreazı için Çizelge 4.7'de görülmektedir. Bu çizelgelerdeki değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.3; Şekil 4.4; Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da görülmektedir.

Çizelge 4.4 Serbest soya üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları

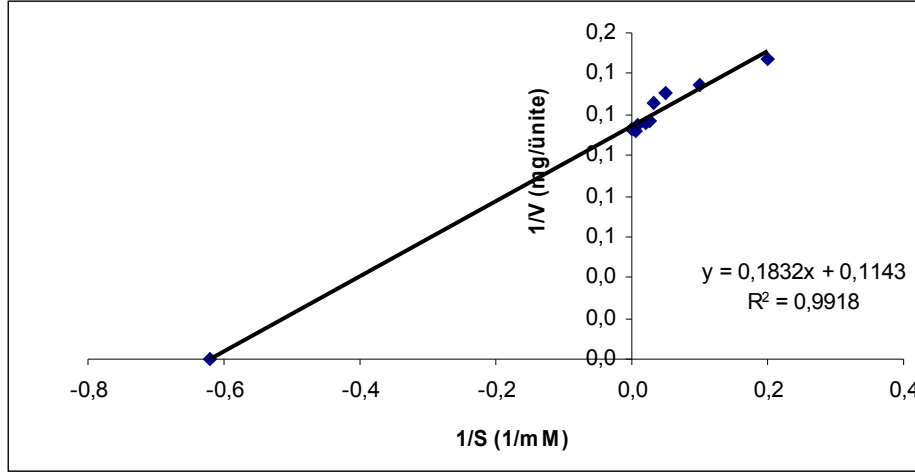
S (mM)	1/S (1/mM)	V (U/mg)	1/V
5	0,2000	0,505	1,980
10	0,1000	0,795	1,258
20	0,0500	0,951	1,052
30	0,0333	1,247	0,802
40	0,0250	1,365	0,733
50	0,0200	1,412	0,708
100	0,0100	1,612	0,620
150	0,0067	1,65	0,606



Şekil 4.3 Serbest soya üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.5 İmmobilize soya üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları

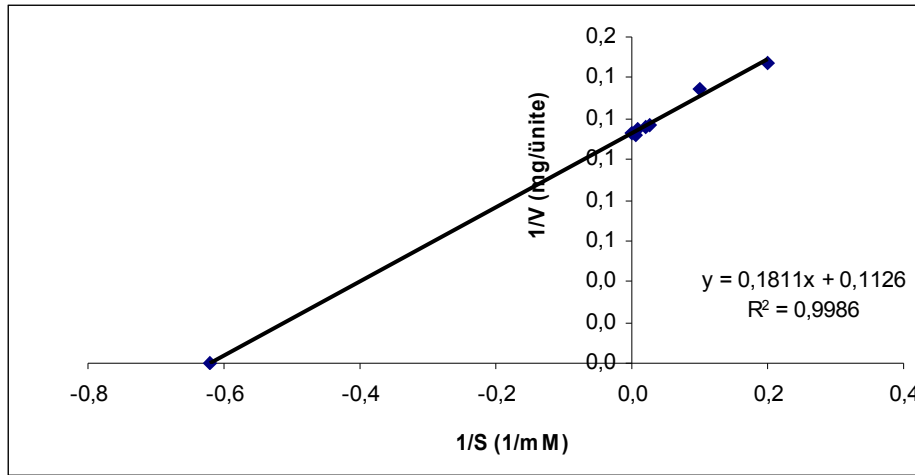
S (mM)	1/S (1/mM)	V (U/mg)	1/V
5	0,2000	0,34	2,941
10	0,1000	0,46	2,174
20	0,0500	0,468	2,137
30	0,0333	0,513	1,949
40	0,0250	0,517	1,934
50	0,0200	0,521	1,919
100	0,0100	0,508	1,969
150	0,0067	0,527	1,898



Şekil 4.4 İmmobilize soya üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.6 Serbest jack bean üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları

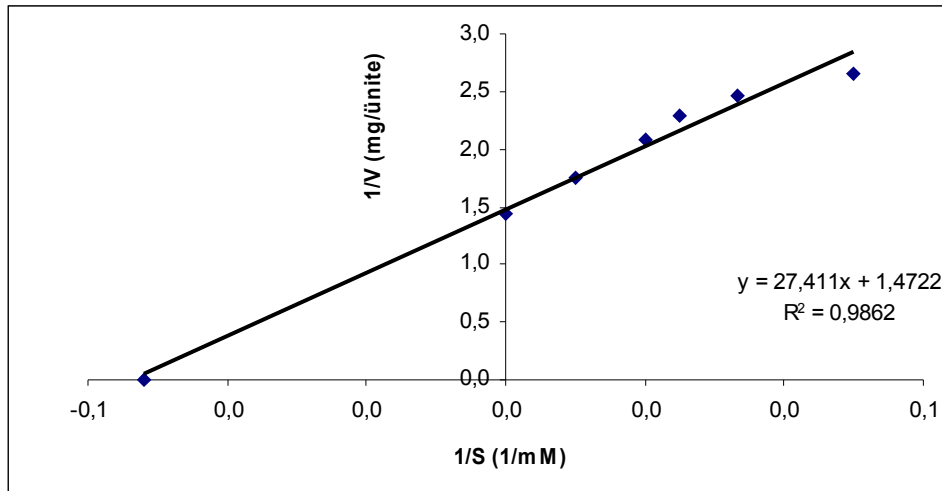
S (mM)	1/S	V (U/mg)	1/V
5	0,200	6,8	0,147
10	0,100	7,44	0,134
20	0,050	7,67	0,130
30	0,033	7,91	0,126
40	0,025	8,54	0,117
50	0,020	8,63	0,116
100	0,010	8,73	0,115
150	0,007	8,91	0,112



Şekil 4.5 Serbest jack bean üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.7 İmmobilize jack bean üreazının kinetik parametrelerinin tespiti için deney sonuçları

S (mM)	1/S	V (U/mg)	1/V
5	0,200	0,331	3,021
10	0,100	0,354	2,825
20	0,050	0,377	2,653
30	0,033	0,406	2,463
40	0,025	0,436	2,294
50	0,020	0,482	2,075
100	0,010	0,572	1,748
150	0,007	0,712	1,404



Şekil 4.6 İmmobilize jack bean üreazına ait Lineweaver-Burk grafiği

Yukarıdaki Lineweaver-Burk grafiklerinden okunan V_{max} ve K_m değerleri Çizelge 4.8'de özetlendi.

Çizelge 4.8 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının kinetik sabitleri

Enzim	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)
Serbest Soya Üreazı	1,73	12,19

İmmobilize Soya Üreazı	8,75	1,66
Serbest Jack Bean Üreazı	8,88	1,61
İmmobilize Jack Bean Üreazı	0,68	18,62

Bitki ve makrobiyal kaynaklı üreazların üre substratı kullanılarak kinetik parametreleri ölçüldüğünde K_m değerlerinin 0,1 ile 100 mM üre arasında değiştiği bilinmektedir (Mobley ve Hausinger, 1989). Bu çalışmada her iki enzim için tespit edilen K_m değerleri rapor edilen bu sınırların içindedir. Öte yandan immobilizasyon işleminin genellikle enzimlerin K_m değerlerinde artmaya neden olduğu; yani katı bir destek üzerine immobilize olmuş enzimlerin substrata olan ilgisinin azaldığı bilinmektedir. Bu çalışmada immobilize Jack Bean üreazının K_m değeri çok artmıştır. Bu da serbest enzime göre immobilize enzimin substrata olan afinitesinin düştüğünü göstermektedir. Öte yandan immobilize soya üreazının K_m değeri serbest soya üreazının K_m değerinden çok küçüktür. Daha az sayıda olmakla beraber immobilizasyon işleminin enzimin substrata olan ilgisini artırdığı durumlar da vardır. Enzimlerin serbest ve immobilize haldeki V_{max} değerleri karşılaştırıldığında ise soya üreazı için immobilizasyon işlemi sonrası V_{max} değerinde yaklaşık 5 katı artma; Jack Bean üreazı için ise yaklaşık 13 kat azalma tespit edilmiştir. İmmobilizasyon işleminde enzim ile substratın buluşması engellenebileceğinden V_{max} 'ta azalma genellikle gözlenen bir durumdur. Öte yandan V_{max} 'ın immobilizasyon işlemi sonrası arttığı az sayıda örnek de vardır.

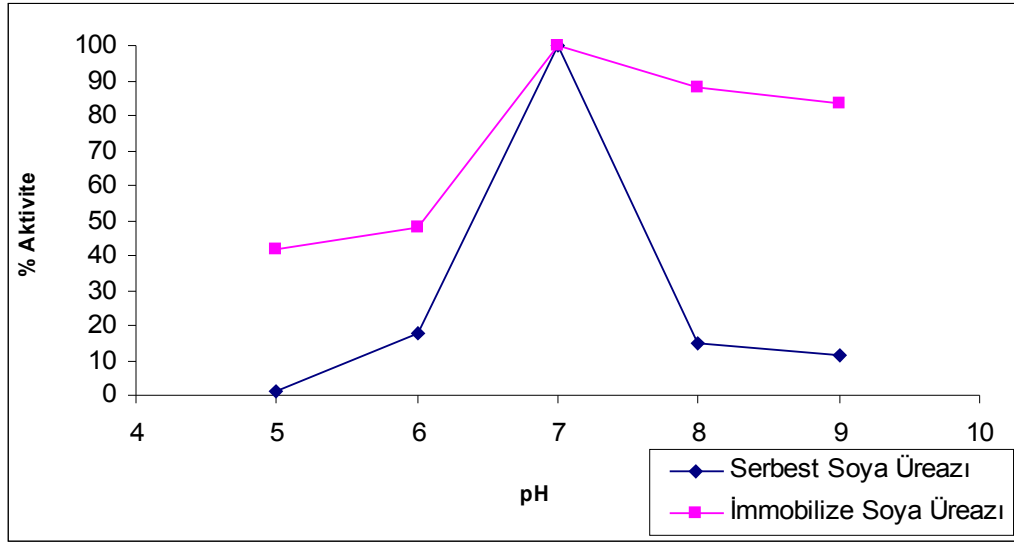
4.5. Optimum pH Tespiti

Serbest ve immobilize soya unu ve üreaz için farklı pH'lara karşı ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.9'de verilmiştir.

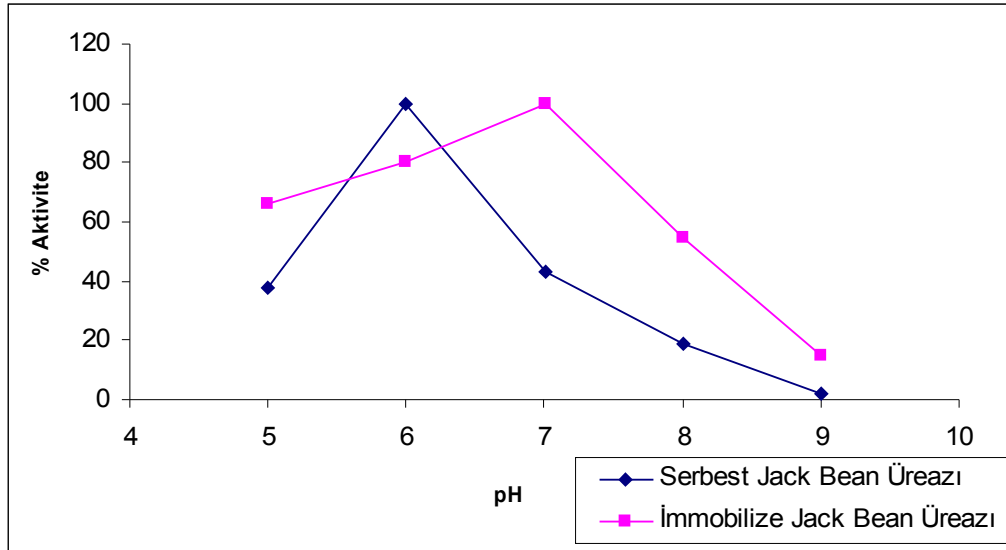
Çizelge 4.9 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının aktivitelerinin pH'a bağlı olarak değişimi

pH	Soya Üreazı		Jack Bean Üreazı	
	% aktivite (serbest)	% aktivite (immobilize)	% aktivite (serbest)	% aktivite (immobilize)
5	1,141	41,7	37,87	66,13
6	17,92	48,05	100	80,29
7	100	100	42,92	100
8	14,6	88,05	18,93	54,86
9	11,6	83,3	1,93	14,7

Tablolardaki değerlerin kullanılmasıyla hazırlanan % aktivite-pH grafikleri Şekil 4.7 ve 4.8'de görölmektedir.



Şekil 4.7 Soya üreazı aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



Şekil 4.8 Jack Bean üreaz enzimi aktivitesi üzerine pH etkisi

Çizelge 4.10 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının optimum pH değerleri

Enzim	Optimum pH
Serbest Soya Üreazı	7,0
İmmobilize Soya Üreazı	7,0
Serbest Jack Bean Üreazı	6,0
İmmobilize Jack Bean Üreazı	7,0

Çizelge 4.10'da göröldüğü üzere soya üreazının immobilizasyonu optimum pH'ında bir değişikliğe neden olmamıştır. Öte yandan immobilize Jack Bean üreazının optimum

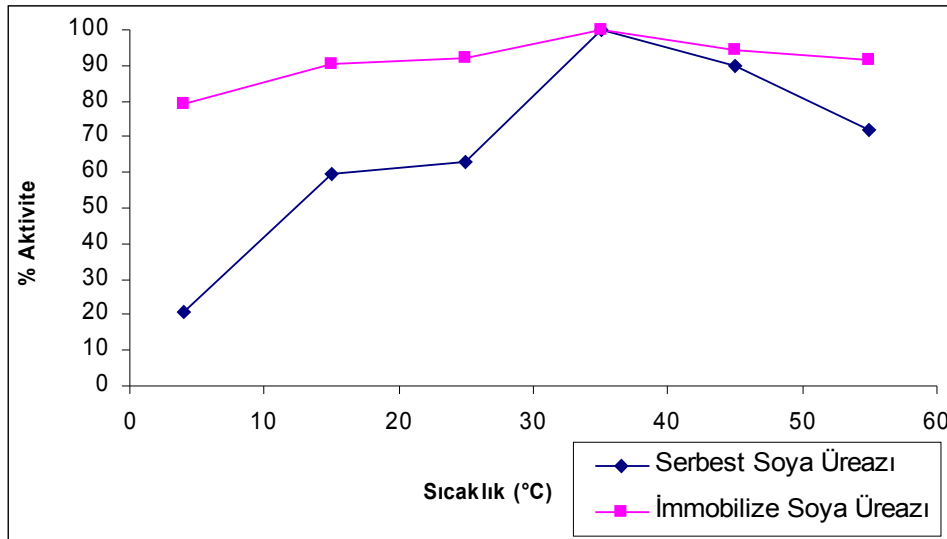
pH'ı immobilizasyon işlemi sonucu 1,0 pH birimi alkali bölgeye kaymıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen üreaz enzimlerinin farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu optimum pH'ın alkali bölgeye kaydığı (Godjevargova ve Dimou, 1997) veya optimum pH'ın değişmediği çalışmalar (Chellapandian ve Krishnan, 1998) vardır.

4.6. Optimum Sıcaklık Tespiti

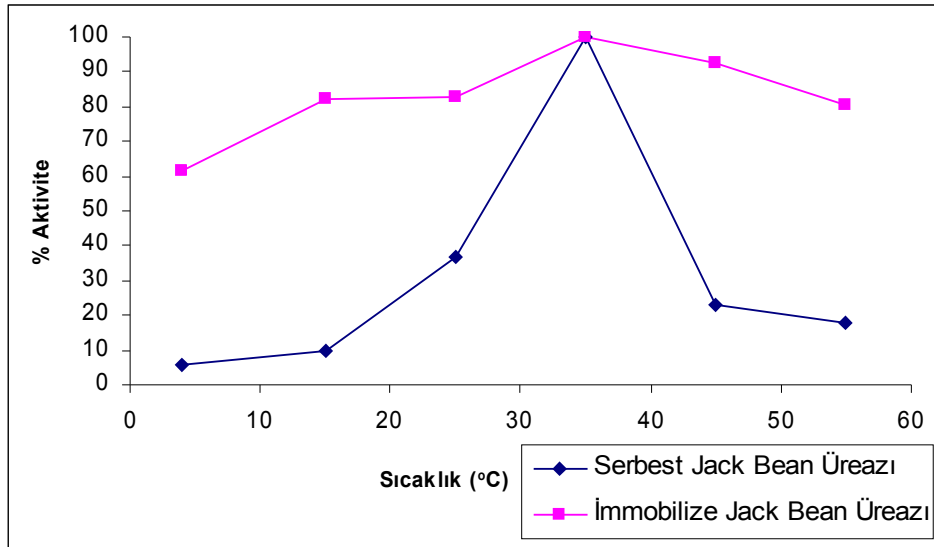
Serbest ve immobilize soya üreazı ve jack bean üreazı için farklı sıcaklıklara karşı elde edilen aktivite deneylerinin sonuçları Çizelge 4.11 'de görülmektedir.

Çizelge 4.11 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazları için farklı sıcaklıklara karşı aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık	Soya Üreazı		Jack Bean Üreazı	
	% Aktivite (serbest)	% Aktivite (immobilize)	% Aktivite (serbest)	% Aktivite (immobilize)
4	20,96	79,47	6,03	61,61
15	59,33	90,67	10,05	82,02
25	62,84	92,27	37,02	83,01
35	100	100	100	100
45	89,83	94,4	23,11	92,28
55	71,63	91,47	17,75	80,21



Şekil 4.9 Serbest ve immobilize soya üreazı aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi



Şekil 4.10 Serbest ve immobilize jack bean üreazı aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Çizelge 4.12 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının optimum sıcaklık değerleri

Enzim	Optimum Sıcaklık, °C
Serbest Soya Üreazı	35
İmmobilize Soya Üreazı	35
Serbest Jack Bean Üreazı	35
İmmobilize Jack Bean Üreazı	35

Üreaz optimum sıcaklığı düşük olan enzimlerden birisidir. Serbest enzimin optimum sıcaklığı kaynağına bağlı olarak 25 ile 40 °C arasında değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan soya ve Jack Bean üreazlarının optimum sıcaklığı 35 °C olarak tespit edilmiş ve immobilizasyonun optimum sıcaklığı değiştirmedığı gözlenmiştir. Godjevargova ve Dimov (1997), 2-metilaminoetilmetakrilat ile modifiye edilmiş akrilonitril kopolimerden hazırlanmış membran üzerine immobilize ettikleri üreazın optimum sıcaklığının 30 °C'den 45 °C'ye kaydığını rapor etmişlerdir. Immobilizasyon sonrasında üreazın termal stabilitesinin arttığı ve sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklılık kazandığı (Chen ve Chiu, 2000)'da rapor edilmiştir. Öte yandan sunulan bu çalışmada optimum sıcaklıkta immobilizasyon sonucunda bir değişiklik gözlenmemiştir.

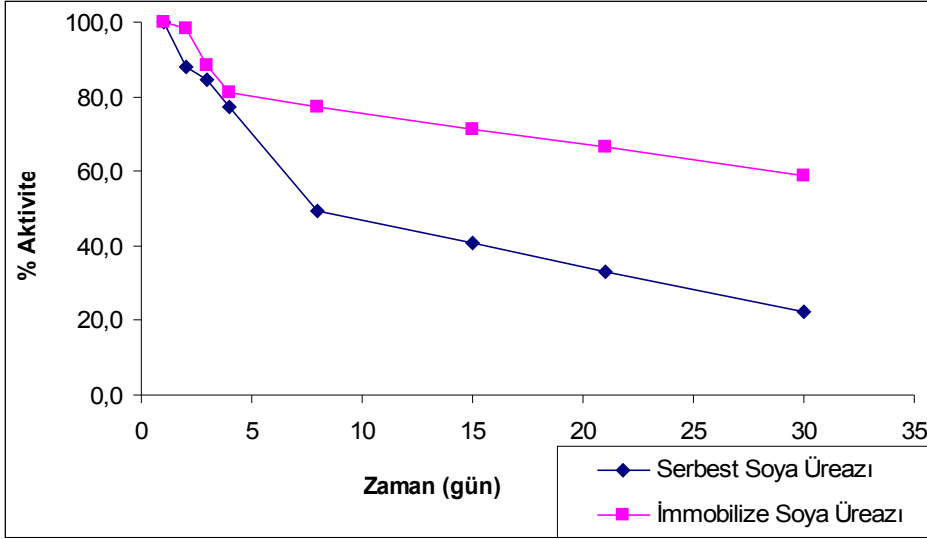
4.7. Serbest Ve İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı Deneyi Sonuçları

Serbest ve immobilize enzimleri depo kararlılığının belirlenmesi için +4 °C'de bekletilen serbest ve immobilize enzim örneklerinin aktiviteleri 30 günlük süre boyunca izlenmiştir. Hesaplanan sonuçlar Çizelge 4.13'de; bu sonuçlar kullanılarak çizilen depo kararlılığı grafikleri Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

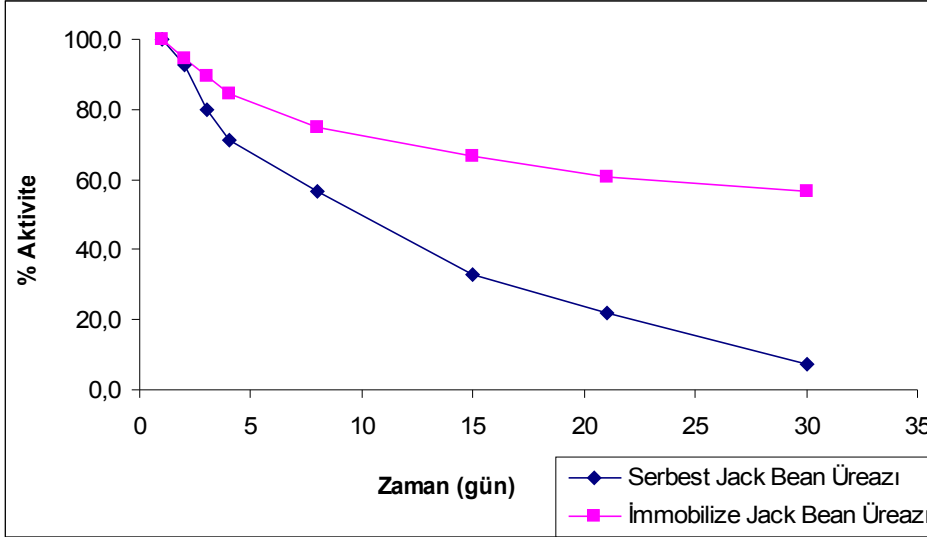
Çizelge 4.13 Serbest ve immobilize soya ve Jack Bean üreazlarının depo kararlılığı sonuçları

Depolama Zamanı (gün)	Soya Üreazı		Jack Bean Üreazı	
	% Aktivite (Serbest)	% Aktivite (İmmobilize)	% Aktivite (Serbest)	% Aktivite (İmmobilize)
1	100,0	100,0	100,0	100,0
2	88,0	98,1	92,5	94,6
3	84,5	88,2	79,7	89,3
4	77,2	81,0	71,3	84,4
8	49,4	77,4	56,8	75,0
15	41,0	71,1	33,0	66,5
21	32,9	66,6	21,8	60,7
30	22,3	59,0	7,2	56,7

İmmobilizasyonun enzimin depo kararlılığını genellikle iyileştirdiği bilinmektedir (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Laksa et al., 1999). Bu çalışmada da hem soya üreazının hem de Jack Bean üreazının immobilizasyon sonrası depo kararlılıklarının arttığı gözlenmiştir. Depo kararlılığı enzim immobilizasyonun en önemli avantajlarından birisidir. Özellikle immobilizasyon çalışmalarında en fazla kullanılan enzim olan Jack Bean üreazın immobilizasyon sonucu depo kararlılığının çok arttığı Çizelge 4.13'de görülmektedir.



Şekil 4.11 Serbest ve immobilize soya üreazının depo kararlılığı



Şekil 4.12 Serbest ve immobilize jack bean üreazının depo kararlılığı

4.8. Uygulamalar

Serbest ve immobilize enzimler kullanılarak gerçek örneklerde ölçülen üre miktarları Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 İdrar ve dermatolojik preparat örneklerinde üre tayini

Örnek	Serbest Soya	İmmobilize	Serbest Jack	İmmobilize Jack
	Üreazı ile ölçülen üre (µmol/mL)	Soya Üreazı ile ölçülen üre (µmol/mL)	Bean Üreazı ile ölçülen üre (µmol/mL)	Bean Üreazı ile ölçülen üre (µmol/mL)
İdrar	$4,84 \times 10^{-3}$	$4,38 \times 10^{-3}$	$4,13 \times 10^{-3}$	$4,11 \times 10^{-3}$
Dermatoloji k preparat	$5,12 \times 10^{-3}$	$6,57 \times 10^{-3}$	$4,92 \times 10^{-3}$	$5,98 \times 10^{-3}$

Bu çalışmada araştırma konusu olan soya ve Jack Bean üreazlarının gerçek örneklerdeki üre miktarının tayininde kullanılabilirliği idrar ve dermatolojik preparatlarla denenmiştir. İmmobilize enzimler kullanılarak örneklerde tespit edilen üre miktarları ile serbest enzimler kullanılarak tespit edilen üre miktarları birbirine çok yakındır. Bu sonuç immobilize enzimlerin serbest enzimler kadar aktivitelerini koruyabildiğini öte yandan immobilizasyon işleminin de avantajlarına sahip olduklarını göstermektedir.

5. Sonuç Ve Öneriler

- Üreaz enziminin tarımda, sanayide ve tıptaki uygulamaları bu enzimin daha etkin ve daha ekonomik kullanılması için tekniklerin araştırılmasını gerektirmektedir.
- Üreaz çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Bu çalışmada soya fasulyesi ve bir diğer fasulye çeşidi olan Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) üreazları kullanılmıştır.
- Üreazın immobilizasyonu için doğal ve sentetik polimer küreler veya membranlar kullanılmıştır. Doğal polimerlerin biyobozunur olma avantajlarına karşı sentetik polimerlerin bileşimlerinin kontrol edilebilir olması tercih nedeni olabilir.
- Bu çalışmada kullanılan soya üreazı ile Jack Bean üreazının immobilizasyon ve aktivite verimleri karşılaştırıldığında Jack Bean üreazının daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Soya üreazı yağsız soya unundan laboratuvarımızda hazırlanan homojenat şeklindedir. Jack Bean üreazı ise ticari olarak satılan saf enzimdir. Immobilizasyonda saflaştırılmış enzimin kullanılması verimi artırmaktadır. Öte yandan enzim saflaştırılması pahalı ve zahmetli bir iştir. Bu nedenle homojenatın safsızlıklarının sorun yaratmayacağı *in vitro* sistemlerde soya unu üreazının kullanılması önerilebilir.
- Immobilize enziminin K_m değerinin serbest enziminkinden daha büyük olması genellikle beklenen sonuçtur. Ancak daha az sayıda olmakla beraber tersi durumların rapor edildiği çalışmalar da vardır. Bu çalışmada da soya unu üreazının K_m değeri immobilizasyon sonrası düşmüştür. Bunun yanında, enzimin V_{max} değeri de immobilizasyon sonrası yaklaşık 5 kat artmıştır. Bu sonuçlar soya unu üreazının immobilizasyon için uygun bir materyal olduğunu göstermektedir.
- Öte yandan immobilizasyon çalışmalarında kullanılan üreaz kaynağı genellikle Jack Bean'dir. Bu enzimin bu çalışmada tespit edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri çok daha yüksektir. Bitkisel kaynaklı enzimlerde kaynağın bolluğu bir avantajdır. Bu nedenle üreaz immobilizasyonu için Jack Bean üreaz da hem kaynağının bolluğu ve hem de yüksek verim nedeniyle bir avantaj olabilir.
- Immobilizasyon çalışmalarında immobilize enzimin gerçek örneklerde verdiği sonuçlar önemlidir. Bu çalışmada iki gerçek örnek: idrar ve üre içeren dermatolojik preparat kullanılarak üre tayini yapılmış ve serbest ve immobilize

enzimlerin sonuçları birbirine yakın bulunmuştur. Bu durumda depo kararlılığı nedeniyle bu tip analizlerde immobilize üreazın kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Aktaş, D. 2004. Sığır karbonik anhidraz enziminin alginate üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 11-16.
- Berthelot, M.P.E. 1859. Violet d'aniline. **Repert. Chim. Appl.**, 1: 284.
- Buchholz, K. 1979. Characterization of Immobilized Biocatalysts. In: Dechema monographs. 84: 1-32.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon.**, 19: 667-675.
- Chellapandian, M., Krishnan, M.R.V. 1998. Chitosan-poly(glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. **Process Biochemistry**, 33: 595-600.
- Chen, J-P., Chiu, S-H. 2000. A poly(N-isopropylacrylamide-co-N-acryloxysuccinimide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) composite hydrogel membrane for urease immobilization to enhance urea hydrolysis rate by temperature swing. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 359-367.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., Perfect, J.R. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun.**, 68: 443-448.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. **J. Am. Chem. Soc.**, 97: 4131-4133.
- Dixon, N.E., Riddles, P.W., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1980a. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. **Can. J. Biochem.**, 58: 1335-1344.
- Dumitriu, 1989. Bioactive polymers 56: Urease immobilization on carboxymethyl-cellulose. **Biotech. Bioeng.**, 283-290.
- Estiu, G., Suarez, D., Merz Jr., K.M. 2006. Quantum mechanical and molecular dynamics simulations of ureases and Zn beta-lactamases. **J. Comput. Chem.**, 27: 1240-1262.

- Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, 69: 18-28.
- Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B, Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A., Carlini, C.R. 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant from urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochem. J.**, 360: 217-224.
- Follmer, C., Carlini, C.R., Yoneama, M.L., Dias, J.F. 2002. PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B**, 189: 482-486.
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wassermann, G., Olivera-Severo, D. Carlini, C.R. 2004c. Jack bean, soybean and *B. pasteurii* urease: biological effects unrelated to ureolytic activity. **Eur. J. Biochem.**, 271: 1357-1363.
- Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R. 2004b. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science**, 167: 241-246.
- Godjevargova, T., Dimov, A. 1997. Immobilization of urease onto membranes of modified acrylonitrile copolymer. **Journal of Membrane Science**, 135: 93-98.
- Goldraj, A., Beamer, L.J., Polacco, J.C. 2003. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. **Plant Physiol.**, 132: 1801-1810.
- Gözükara, E.M. 1994. Biyokimya. Evin Matbaası, Malatya
- Hamarat, Ş. 2000. Üreaz içeren immobilize enzim komplekslerinin hazırlanması ve kullanım olanaklarının araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 43-44, İzmir.
- Hearn, E., Neufeld, R.J. 2000. Poly(methylene-co-guanidine) coated alginates as an encapsulation matrix for urease. **Process Biochemistry**, 35: 1253-1260.
- Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., Nakamura, M. 2000. Purification and properties of urease from leaf of mulberry, *Morus alba*. **Phytochemistry**, 53:325-330.

<http://www.lsbu.ac.uk/water/>

<http://www.odevsel.com/>

- Kara, F. 2006. Üreazın alginat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilat-ko-akrilik asit)/k-karrogenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 10-28, Ankara.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. 1983. Immobilized enzymes in solid phase biochemistry: analytical synthetic aspects, Ed. By W.H. Scouten, J. Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Krajewska, M.L., Zaborska, W. 1990. Urease immobilization on aminated butyl acrylate ethylenedimethacrylate copolymer. **Die Angewandte Makromolekulare Chemie**, 179: 21-33.
- Krysteva, M.A. 1991. Covalent binding of synthetic membrans containing acrylamide units using, formaldehyde. **Biotech. Appl. Biochem.**, 13: 106-111.
- Laska, J., Wlodarczyk, J., Zaborska, W. 1999. Polyaniline as a support for urease immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 6: 549-553.
- Marzadori, C., Miletto, S., Gessa, C., Ciurli, S. 1998. Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: urease immobilization in alkaline soils. **Soil. Biol. Biochem.**, 30: 1485-1490.
- Mobley, H.L., Hausinger, R.P. 1989. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. **Microbiol. Rev.**, 53: 85-108.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.**, 59: 451-480.
- Nichols, M.L., Willits, C.O. 1934. Reactions of Nessler's Solution. **J. Am. Chem. Soc.**, 56: 769-774.
- Onyelizi, F.N. 1988. The enzyme coupling process in urease immobilization on o-alkylated nylon tubes. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 16: 255-262.
- Polacco, J.C., Havir, E.A. 1979. Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. **J. Biol. Chem.**, 254: 1707-1715.

- Polacco, J.C., Holland, M.A. 1993. Roles of urease in plant cells. **Int. Rev. Cytol.**, 145: 65-103.
- Sunucu, G., Mumcu, D. 2007. İmmobilize katalaz ile sütte peroksit giderimi. Özel Ege Lisesi, İzmir.
- Takishima, K., Suga, T., Mamiya, G. 1988. The structure of jack bean urease. The complete amino-acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. **Eur. J. Biochem.**, 175: 151-165.
- Telefoncu, A. 1997. Enzimoloji Lisans üstü yaz okulu notları. Ege Üniversitesi, İzmir
- Tietz, N.W. 1976. Fundamentals of Clinical Chemistry. pp. 989-994. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Wojcik, A. 1990. Immobilization of enzymes to porous-bead polymers and silica gels activated by graft polymerization of 2,3-epoxypropyl methacrylate. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 48: 287-301.
- Yang, M-C., Lin, C-C. 2001. Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease. **Biomaterials**, 22: 891-896.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Dila ÖRNAK ACAR

Doğum Yeri ve Tarihi: MALATYA/1980

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

1. Acar, D.Ö., Uygun, M., Uygun, D.A., Karagözler, A.A. Malatya ve Aydın Yöresi Kiraz Ağacı Yapraklarının Bazı Antioksidan Özellikleri. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.

2. Karagözler, A.A., Acar, D.Ö. Soya Fasülyesi Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. 22. Ulusal Kimya Kongresi, 6-10 Ekim 2008, KKTC-Mağusa.

c) Katıldığı Projeler

1. Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FBE-08004. Proje araştırmacısı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Yok

İLETİŞİM

E-posta adresi: dilaornek@hotmail.com

Tarih: 15/01/2009