

**ÜREAZIN ALJİNAT/KİTOSAN POLİELEKTROLİT VE  
POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT)/κ-KARRAGENAN  
İTERPOLİMER KOMPLEKSLERİNE İMMOBİLİZASYONU**

**FİLİZ KARA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006  
ANKARA**



**ÜREAZIN ALJİNAT/KİTOSAN POLİELEKTROLİT VE  
POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT)/κ-KARRAGENAN  
İTERPOLİMER KOMPLEKSLERİNE İMMOBİLİZASYONU**

**FİLİZ KARA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006  
ANKARA**

Filiz KARA tarafından hazırlanan Üreazın Aljinat/ Kitosan Polielektrolit ve Poli(Akrilamit-ko-Akrilik asit)  $\kappa$ -Karragenan İnterpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylıyorum.



Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK  
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU



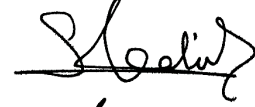
Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK



Üye : Doç. Dr. Dilek ŞOLPAN ÖZBAY



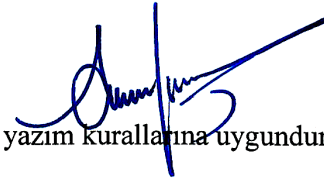
Üye : Doç. Dr. Bekir SARI



Üye : Doç. Dr. Tuncer ÇAYKARA



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



**ÜREAZIN ALJİNAT/KİTOSAN POLİELEKTROLİT VE POLİ  
(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT)/κ-KARRAGENAN İNTERPOLİMER  
KOMPLEKSLERİNE İMMOBİLİZASYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Filiz KARA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Ocak 2006**

**ÖZET**

Üreaz (üreaminohidrolaz E.C. 3.5.1.5) enzimi aljinat-kitosan polielektrolit kompleksine ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/κ-karragenan interpolimer komplekslerine hapsedilerek immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize üreaz üzerine pH, sıcaklık etkisi, depolama kararlılığı, tekrar kullanım ve termal kararlılık incelenmiştir. Serbest üreaz ve immobilize üreazlar için optimum pH sırasıyla 7,5 ve 8,0 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık ise serbest ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/κ-karragenan interpolimer kompleksine immobilize edilen üreaz için 55 °C, aljinat-kitosan polielektrolit komplekse immobilize edilen üreaz için 60 °C olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon ile Michaelis-Menten ( $K_m$ ) sabitinde bir azalma gözlenmiştir. 70 gün sonunda immobilize sistemler aktivitelerinin % 48 ve % 70 ini korumuşlardır.

Ayrıca, 5 gün içinde 20 kullanım sonunda aljinat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit)/ $\kappa$ -karragenan interpolimer komplekslerine immobilize edilen üreaz aktivitelerinin sırasıyla % 55 ve % 89 unu korumuşlardır. Serbest üreazın termal kararlılığının immobilizasyon sonucu arttığı gözlenmiştir.

**Bilim Kodu** : 201.1.117  
**Anahtar Kelimeler** : Üreaz, immobilizasyon, interpolimer kompleks,  
polielektrolit kompleks  
**Sayfa Adedi** : 59  
**Tez Yöneticisi** : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin Tümtürk

**IMMOBILIZATION OF UREASE TO ALGINATE-CHITOSAN  
POLYELECTROLYTE COMPLEXES AND INTERPENETRATING  
POLYMER NETWORKS OF POLY(ACRYLAMIDE-co-ACRYLIC ACID)  
/κ-CARRAGEENAN  
(M. Sc. Thesis)**

**Filiz KARA**

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
January 2006**

**ABSTRACT**

**Jack bean urease (urea aminohydrolase, E.C. 3.5.1.5) was entrapped into alginate-chitosan polyelectrolyte complexes and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/κ-carrageenan in immobilization of urease. The effects of pH, temperature, storage stability, reuse number and thermal stability on the free and immobilized urease were examined. For the free and immobilized urease in alginate-chitosan polyelectrolyte complexes and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/κ-carrageenan, optimum pH was found to be 7,5 and 8,0 respectively. Optimum temperature of the free, immobilized urease in poly(acrylamide-co-acrylic acid)/κ-carrageenan and alginate-chitosan polyelectrolyte complexes were also observed to be 55 and 60°C, respectively. Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ) values for both immobilized urease were observed smaller than free enzyme. The storage stability values of immobilized enzyme systems after 70 days were observed as 48% and 70%.**

**In addition, it was observed that, after 20<sup>th</sup> use in 5 days, the retained activities for immobilized enzyme in alginate-chitosan polyelectrolyte complexes and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/ $\kappa$ -carrageenan matrices were found to be 55% and 89%, respectively. Thermal stability of the free urease was also increased by a result of immobilization.**

**Science Code : 201.1.117**

**Keywords : Urease; immobilization; interpenetrating polymer networks; polyelectrolyte complex.**

**Page Number : 59**

**Adviser : Assit.Prof.Dr. Hayrettin Tümtürk**



## TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgisi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, yakın ilgi destek ve hoşgörüsüyle hep yanımda olan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK 'e çok teşekkür ederim.

Yardımlarını esirgemeyen sevgili Araş. Gör. Gökhan DEMİREL 'e teşekkür ederim.

Yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Ümmihan YILMAZ 'a ve Araş. Gör. Saliha ALYAR 'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim, dostluğunu hiç esirgemeyen değerli Nagehan KARACA 'ya, çalışmam boyunca anlayış ve arkadaşlıklarından dolayı Ayşe YAHŞİ, Berrin AKKAYA, Gül TUNÇ ve Uzman Ferhat ŞAHİN 'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman arkamda olan sevgili anne, babama ve tabii ki çok değerli kardeşim Gökhan Kara'ya teşekkür ederim.

Her zaman gösterdiği hoşgörü ve desteğiyle yanımda olan çok değerli eşim Serdar KARA ve tabii ki aşırı uslu çocuk Ahmet Serhat 'a çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. ENZİMLER VE İMMOBİLİZASYON HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Enzimlerin yapısı .....	3
2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması .....	4
2.1.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler .....	5
2.1.4. Enzimlerin endüstride kullanımları.....	6
2.1.5. Enzimlerin biyomedikal kullanımı.....	7
2.2. İmmobilizasyon Hakkında Genel Bilgiler .....	8
2.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri .....	9
2.2.2. İmmobilizasyon metodunun seçimi .....	18
3. ÜREAZ .....	19
3.1. Üreaz Enzimi ve Özellikleri.....	19
3.1.1. Üreaz enziminin moleküler özellikleri.....	21
3.1.2. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	21

	<b>Sayfa</b>
3.1.3. Enzimatik tepkime mekanizması ve nikel iyonunun rolü .....	23
3.1.4. Patojenlerde üreaz enziminin rolü.....	24
3.1.5. Üreaz enzimi için inhibitörler .....	24
3.1.6. Üreaz enziminin kullanım alanları .....	25
3.2. Doğal Polimerler .....	28
3.2.1. Aljinat.....	29
3.2.2. Kitosan .....	31
3.2.3. Karragenan .....	32
4. İNTERPOLİMER KOMPLEKSLERİ.....	34
4.1. İnterpolimer Komplekslerinin Sınıflandırılması .....	35
4.1.1. Polielektrolit kompleksler .....	35
4.1.2. Hidrojen bağlı kompleksler.....	35
4.1.3. Stereo kompleksler.....	35
4.1.4. Yük aktarım kompleksleri.....	36
5. DENEYSEL KISIM.....	37
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	37
5.2. Kullanılan Aletler.....	37
5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	37
5.4. Amonyum Sülfat Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması .....	38
5.5. Enzim İmmobilizasyonu .....	39
5.6. Aktivite Tayini .....	41
5.6.1. Aktiviteye pH Etkisi.....	41
5.6.2. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi .....	41

	<b>Sayfa</b>
5.6.3. Aktiviteye Substrat Derişiminin Etkisi .....	42
5.6.4. Depolama Kararlılığı.....	42
5.6.5. Tekrar Kullanılabilirlik .....	42
5.6.6. Termal İnaktivasyon.....	42
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	43
6.1. Aktiviteye pH nın Etkisi.....	43
6.2. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi .....	44
6.3. Aktiviteye Substrat Derişiminin Etkisi .....	46
6.4. Depolama Kararlılığı.....	49
6.5. Tekrar Kullanılabilirlik .....	50
6.6. Termal İnaktivasyon.....	51
7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	53
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması .....	5
Çizelge 2.1. En yaygın kullanılan taşıyıcılar .....	11
Çizelge 2.2. Taşıyıcıya bağlanmanın yarar ve sakıncaları .....	14
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon metodlarının karşılaştırılması.....	17
Çizelge 6.1. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın kinetik parametreleri .....	47

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri .....	10
Şekil 3.1. Üreazın kataliz reaksiyonu.....	20
Şekil 3.2. BPU üç boyutlu yapısı .....	22
Şekil 3.3. BPU aktif merkezi.....	22
Şekil 3.4. BPU kataliz reaksiyon mekanizması .....	23
Şekil 3.5. İndefenol oluşum mekanizması .....	26
Şekil 3.6. Yumurta-Kutu Modeli .....	31
Şekil 5.1. Amonyum sülfat kalibrasyon eğrisi .....	38
Şekil 5.2. P(AAm-ko-AA) oluşum reaksiyonu .....	40
Şekil 6.1. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın maksimum aktivitesinin pH ile değişimi .....	43
Şekil 6.2. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın maksimum aktivitesinin sıcaklıkla değişimi .....	45
Şekil 6.3. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın Linewear-Burk grafiği .....	48
Şekil 6.4. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın depolama kararlılığı.....	49
Şekil 6.5. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım sayıları .....	50
Şekil 6.6. Serbest ve immobilize edilen üreazın termal inaktivasyonu.....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\kappa$	Kappa
$\mu\text{m}$	Mikrometre
mM	Milimolar
$K_m$	Michaelis-Menten sabiti
UV	Ultraviyole
$V_{\text{mak}}$	Maksimum hız
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AA	Akrilik asit
AAm	Akrilamit
APS	Amonyumpersülfat
BAAm	N',N' –Metilen-bis-akrilamit
BPU	<i>Bacillus pasteurii</i> üreazı
B-R	Britton-Robinson
JBU	<i>Canavalia ensiformis</i> üreazı
KAU	<i>Klebsiella aerogenes</i> üreazı
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N, N, N',N' -Tetrametiletildiamin

## 1. GİRİŞ

Üreaz enzimi (E.C. 3.5.1.5) ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini katalizleyen çok spesifik bir enzimdir. Üreaz çeşitli bitki, bakteri ve mantarlarda bulunur. Tabiattaki azot döngüsünde önemli bir rol oynar.

Bu enzim diyaliz makinelerinde kandan ürenin uzaklaştırılmasında, klinik çalışmalarda kandaki ürenin miktarının hesaplanmasında ve atık sulardaki ürenin temizlenmesinde kullanılır.

Üreaz içeren bakterilerin sebep oldukları rahatsızlıkların tedavisi ve üre hidrolizinin zirai açıdan kontrol altına alınabilmesi için üreazın inhibitör çalışmaları da yoğun olarak yapılmaktadır (1).

İmmobilize üreaz ile membran yüzeyi kaplanarak ürenin amonyum ve bikarbonata dönüştürülüp ürün miktarının gözlenebileceği biyosensör çalışmaları yapılmaktadır (2).

Üreazın immobilizasyonu için en çok kullanılan destekler karboksimetil selüloz, poliüretan, polivinil piridin, iyon değiştirici reçineler, polipropilen, stirendivinil benzen sayılabilir (3). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda akrilonitril kopolimeri (3,4), poli(vinil alkol) (5), Ca-aljinat (6), polianilin (7), PNIPAAm (8), kitosan-poli(glisidil metakrilat) kopolimeri (9) kullanılarak üreaz immobilize edilmiştir.

Makromoleküler zincirler çözelti içinde ideal durum dışında bir takım etkileşimlere uğrayabilirler. Elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve yük aktarımı gibi ikincil bağlanma kuvvetlerinin sebep olduğu iki yada ikiden fazla farklı makromoleküler zincirin birleşmesiyle elde edilen bileşikler genellikle “*İnterpolimer Kompleksleri*” olarak adlandırılır (10).

Doğal bir polimerin sentetik bir polimer ile karıştırılması, polimerik komplekslerin hazırlanması için ilginç bir yol olarak görünmektedir. Sentetik ve doğal polimer



karışımları tekli bileşimlerinden daha iyi biyoyumluluk ve mekaniksel özellikleri ile polimerik materyallerin yeni bir sınıfını oluşturur (10,11).

Bu çalışmada üreazın immobilizasyonu aljinat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit)/ $\kappa$ -karragenen interpolimer kompleksleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon sonucu enzimin sıcaklık, pH ve termal dayanımının arttığı, depolama kararlılığı ve tekrar kullanımının olduğu görülmüştür.

## **2. ENZİMLER VE İMMOBİLİZASYON HAKKINDA GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri**

Enzimler, canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir (12). Bunlar reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirirler de reaksiyon tamamlandığında, tekrar kendi orijinal hallerine geri dönerler. RNA molekülleri ile katalizlenen birkaç olay bilinmekle beraber enzimlerin hemen tümü protein yapısındaki katalizörlerdir (13).

İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlandığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili bitkisel enzimler üzerinde çalışmış, 1860 yıllarında Pasteur fermantasyon enzimleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Fermantasyon ile ilişkilerinden dolayı başlangıçta verilen ferment adı 1878 yılında Kühne tarafından Yunanca'da "maya içinde" anlamına gelen enzim ismi ile değiştirilmiştir. 1926 yılında Sumner soya fasulyesi özütünden saf ve kristalize üreazı izole etmiştir. 1930 yılında Northop pepsin, tripsin, kemotripsini elde etmiştir. Saf enzimlerin elde edildiği bu önemli gelişmelerden sonra enzimlerin yapısı ve özelliklerine ilişkin ayrıntılı bilgilere ulaşılmıştır (14).

Enzimler çok etkili ve spesifik katalizörlerdir. Enzimle katalize edilen reaksiyonlar enzimle katalize edilmeyen reaksiyonlardan  $10^3 - 10^{17}$  defa daha hızlı cereyan ederler. Enzimler etki ettikleri maddeler olan substratları için oldukça spesifiklerdir. Bazı enzimler benzer yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları da tek bir molekül türü üzerine etki ederler. Bir çok enzim stereospesifite gösterir (15).

#### **2.1.1. Enzimlerin yapısı**

Enzimde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrat seçiciliğini sağlar.

Bazı enzimler sadece proteinden oluşurken, bazıları ise proteinin yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına “apoenzim”, protein olmayan kısmına “kofaktör” denir. Kofaktörler bir çok enzimin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir. Esansiyel iyonlar ve koenzimler (organik bileşikler) olarak ikiye ayrılırlar. Koenzim sıkıca bağlı ise “prostetik grup” adı verilir. Apoenzim ve koenzim birlikte “haloenzim” olarak adlandırılırlar. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur.

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu kısmı enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim bu merkeze bağlanır (15).

### **2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması**

Enzimler önceleri üzerine etkilerini gösterdikleri substratlara “-az” takısı eklenerek adlandırılmışlardır. Nişastayı hidroliz edenlere amilazlar, yağı hidroliz edenlere lipazlar ve proteinleri hidroliz edenlere de proteazlar denmiştir. Bundan kısa bir süre sonra benzer reaksiyonları katalizleyen enzimlere katalizledikleri kimyasal reaksiyon tipini gösteren isimler verilmiştir. Bunlar, dehidrojenazlar, oksidazlar, dekarboksilazlar, açılazlar vb diye isimlendirilmişlerdir.

Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) düzenlemesine göre enzimlerin katalizlediği kimyasal reaksiyon tipine ve reaksiyon metabolizmasına dayanılarak adlandırma ve sınıflandırma yapılmaktadır.

IUB sisteminin temel özellikleri şunlardır:

- 1- Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa bölünürler; bunların her birinin 4-13 alt sınıfı vardır.
- 2- Enzim adının iki kısmı vardır. İlki substrat veya substratların adıdır; “-az” ile sonlanan ikincisi katalize olunan reaksiyon tipini gösterir.

- 3- Söz konusu reaksiyonun doğasını aydınlatmak için eğer ek bilgi gerekli ise, parantez içinde verilebilir.
- 4- Her enzimin bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada reaksiyon tipini 1. sayı, vericinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir (13).

Bu gruplar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması (15).

Sınıf	İsim	Katalize ettiği reaksiyon tipi parantez içinde verilebilir.
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları
2	Transferazlar	İki molekül arasında bir atom veya grubun transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Substrattan hidroliz yolu dışındaki bir yolla bir grubun ayrılması
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP ve diğer nükleosid tri fosfatın yıkımı ile birlikte yeni bir bağın sentezi

### 2.1.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzimler biyolojik sistemlerde çok küçük miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle bu proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde gösterdiği aktivite miktarı ölçülür.

Bir ünite enzim: Standart koşullarda 1 mikromol ( $\mu\text{mol}$ ) substratı ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir.

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Ortamın pH sı
- Sıcaklık
- Enzim konsantrasyonu
- Substrat konsantrasyonu
- Zaman
- Reaksiyonun ürünü
- Çeşitli iyonların konsantrasyonu ve özellikleri
- Işık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi

Bu faktörlerin enzim tepkimesi üzerine olan etkilerini tayin etmek için farklı koşullar altında enzim reaksiyon hızını saptamak gerekir. Enzim aktivitesini ölçmek için kaybolan substrat miktarını yada ortamda birim zamanda oluşan ürün miktarını ölçmek gerekir. Her iki halde de enzim aktivitesi (V) olarak tanımlanmaktadır (16).

#### **2.1.4. Enzimlerin endüstride kullanımları**

Endüstriyel katalizör olarak enzimlerin klasik kimyasal katalizörlere göre aşağıdaki üstünlükleri vardır:

- İleri derecede substrat spesifikliğı, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu büyük ölçüde elimine eder ve sadece materyal maliyetini düşürmez aynı zamanda çevre sorunu da oluşturmaz.
- Bazı spesifik reaksiyonlar enzimler olmadan gerçekleştirilemez.
- Proses koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığı azalır ve prosesin korozyon etkilerini ve enerji gereksinimini düşürür.
- Reaksiyon hızı yüksek ve maliyet düşüktür.

Enzimler gıda, deterjan, deri ve tekstil endüstrilerinde önemli kullanım alanına sahiptirler. Gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonun uygun şekilde yapılıp yapılmadığını tespit için enzim tayinlerinden faydalanılır. Örneğin sütte bulunan alkali fosfataz enzimi, pastörizasyon için gerekli olan ısıda inaktive olur.

Dolayısıyla pastörizasyondan sonra ALP enzimi tayini, pastörizasyonun uygun yapılp yapılmadığını gösterir. Benzer şekilde gıdalardaki bakteriyel kontaminasyonun derecesi de gıdada normal olarak bulunmaması gereken enzimlerin tayini ile tespit edilebilir. Örneğin sütte çok az miktarda bulunan redüktazlar bakteriler tarafından büyük miktarda üretilirler. Redüktazlar anaerobik şartlarda metilen mavisinin renksiz loykometilen mavisine indirgenmesini katalize ettiklerinden kolayca tayin edilebilirler.

Buğdaylar çok rutubetli yerlerde muhafaza edilirlerse veya hasat zamanı yağmurlu geçerse buğday tohumlarında filizlenme meydana gelir. Tohumlarda  $\alpha$ -amilaz aktivitesi tayini filizlenmenin derecesini gösterir. Zira bu şekilde bekletilen tohumlarda  $\alpha$ -amilaz ve bazı proteolitik enzimlerde artış meydana gelir. Bu artış da nişasta ve proteinlerin yıkılmasına sebep olur.

Glukoz izomeraz enzimi etkisiyle glukozun fruktoza çevrilmesi de ekonomik olan bir tatlandırıcı elde etmek için ticari olarak uygulanan bir enzimatik işlemdir. Böyle bir işlemle tatlılık derecesi 70 olan glukozdan tatlılık derecesi 170 olan bir tatlandırıcı elde edilmiş olur. Bitkisel bir proteaz olan ve papaya meyvesinden elde edilen papain et yumuşatıcısı olarak kullanılır.

Deri ve tekstil endüstrisinde bakteriyel proteazlar deriden yünün gevşetilerek ayrılmasında kullanılır (15).

### **2.1.5. Enzimlerin biyomedikal kullanımı**

Yeryüzünde yaşam enzimlerle olasıdır. Bu nedenle enzimler biyomedikal bilim dallarının pek çok alanını etkilerler. Bazı hastalıklar enzimlerin sentezinde genetik yönden saptanmış anormalliklere bağlıdır. Bazı durumlarda örneğin kan sağlanmasının yetersiz olduğu durumlarda bazı enzimler plazmaya sızar. Plazmada bu tür enzim aktivitelerinin ölçümü tıbbi bozuklukların tanısında önemli bir kısmı oluşturur (13).

Günümüzde klinik biyokimya laboratuvarlarında yapılan analizlerin %10-15 kadarını enzimatik analizler oluşturmaktadır. Kalp, karaciğer, kas, hemotolojik ve kalıtsal hastalıklar enzimlerin kullanıldığı en yaygın tanı alanlarıdır. Bazı hastalıkların tedavisinde de enzim preparatlarından ilaç olarak yararlanılmaktadır.

## **2.2. İmmobilizasyon Hakkında Genel Bilgiler**

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklarca büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Dolayısıyla bu biyokatalizörlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir.

Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak bununla da serbest enzimin yanında yeni bir kirlilik unsuru oluşacaktır. Ürünlerin kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. Ayrıca serbest enzimin aktivitesini yitirmeden ortamdaki çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etkidir. Bir de serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine uygulanamazlar. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal tutturulması olarak tanımlanabilir.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin en önemli avantajları aşağıda özetlenmiştir.

- 1- İmmobilize enzimler, serbestçe hareket eden enzimlere göre daha büyük işlemsel avantajlara sahiptirler (enzimin kararlılığının artması, sürekli yada tekrarlanabilir kullanımın mümkün olması, enzimin ürünlerden kolayca ayrılabilir olması gibi).
- 2- İmmobilize enzimler ısı, pH ve organik reaktiflere karşı daha dayanıklıdır.
- 3- İmmobilize enzimler substrat ve ürünün inhibisyonuna karşı koyarlar ve enzimin aktivitesini uzun süre korumasını sağlarlar.
- 4- İmmobilize enzim sistemlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri seçimli olarak değiştirilebilir. Çeşitli düzenek ve proseslere uygulanabilirler.
- 5- Membrana bağlı enzimler *invivo* doğal sistemleri için model olarak seçilebilirler.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir.

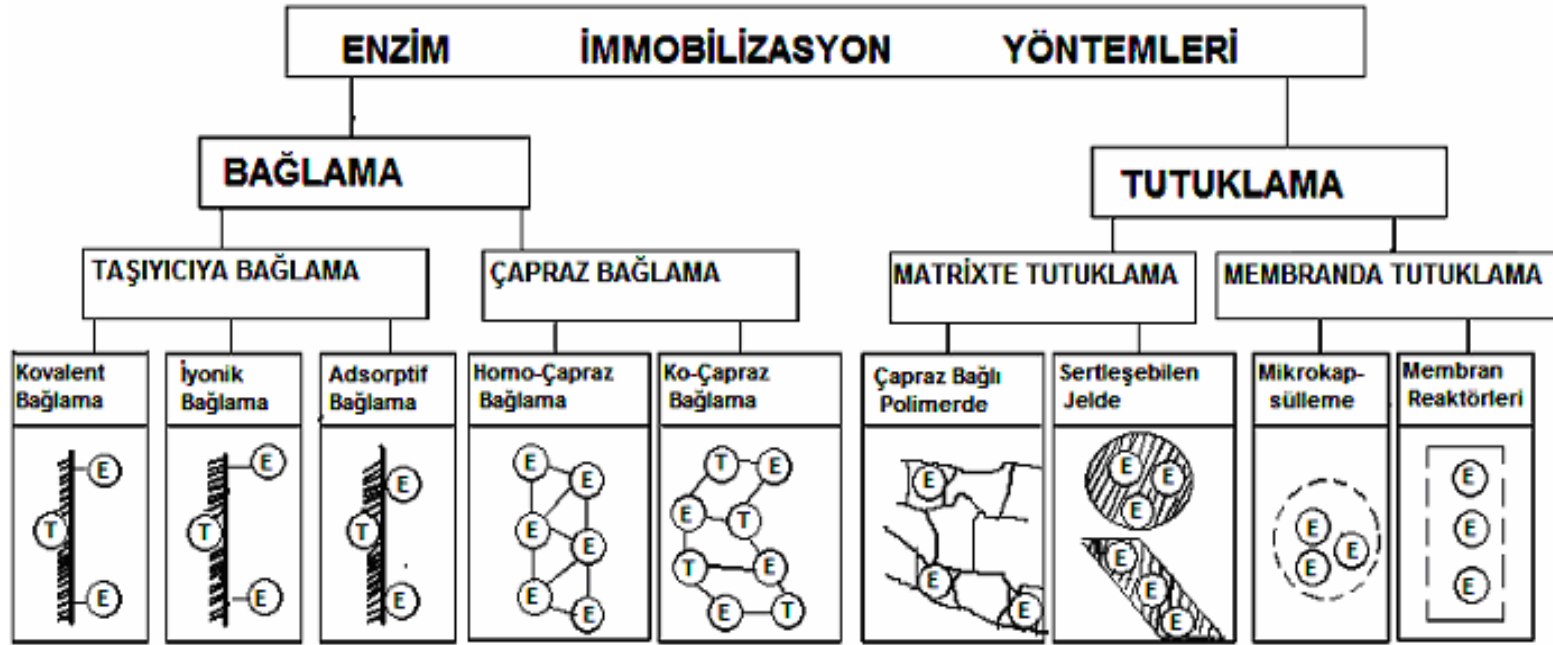
- 1- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesi azalabilir veya kaybolabilir.
- 2- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- 3- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

### **2.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri**

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. Bazı araştırmacılar hatalı olarak “immobilize” terimi yerine “tutuklanmış”, “çözünmez hale getirilmiş”, “bağlanmış” gibi terimleri kullanmaktadırlar. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup diğerlerini kapsarken diğerleri yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedirler.

Enzim immobilizasyonu için kullanılan çeşitli metodlar vardır. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.1 de gösterilmiştir.





## Bağlama yöntemleri

### *Taşıyıcıya bağlama*

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Taşıyıcının aranılan niteliklere sahip olması gerekir. Bunlar:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

Çizelge 2.1. En yaygın kullanılan taşıyıcılar (12)

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dekstran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve allil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollegen	Metakrilat türevleri
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar (12).

### Kovalent bağlama

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller. Kovalent bağlama, genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzimin immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir (17,18).

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme metodunun doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır (19).

Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşınmalıdır. Aktifleştirilmiş destek materyallerine kovalent bağla bağlanan enzimlerin fonksiyonel grupları, polipeptit zincirlerin  $\alpha$ -amino grupları, arjinin ve lisinin  $\alpha$ -amino grupları, glutamat ve aspartatinin  $\alpha$ -karboksil grupları ve zincirlerin  $\alpha$ -karboksil grupları (17,20), serin ve treaninin hidroksil grupları (21), tirozinin aromatik zincirleri, histidinimimidazol halkası, triptofanın indol halkası ve sisteinin sülfidril grupları gibi gruplardır. Immobilizasyon reaksiyonunda aktifleştiriciler enzimlerin bu fonksiyonel grupları ile ve taşıyıcıların içerdiği diazonyum tuzu, asit azid, izosiyanat, imin, imido-ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar ile kovalent bağ oluştururlar (17,20).

### İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlanma çok ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (12).

### Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu en eski ve basit bir immobilizasyon metodudur (19). Suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin immobilizasyonda çok kullanıldığını görmekteyiz.

Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmasına dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır.

En çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, nişasta, anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, silikajel ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir (22).

Taşıyıcıya bağlanmanın yarar ve sakıncaları da şunlardır;

Çizelge 2.2. Taşıyıcıya bağlanmanın yarar ve sakıncaları (12)

Yararları	Sakıncaları
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaktif taşıyıcıya enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.</li> <li>• Katı taşıyıcıya bağlı katalizatör kullanışlıdır (süzme ve santrifüjleme ile ayrılır)</li> <li>• Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.</li> <li>• Ürünleri kirletmez.</li> <li>• Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifiklikler kazanabilir.</li> <li>• Sürekli sistemlere uygundur.</li> <li>• Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber vb) imal edilebilirler.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzim immobilizasyon koşullarından etkilenebilir.</li> <li>• Bağlanma aktivite için zorunlu amino asit artıkları üzerinden gerçekleşebilir.</li> <li>• Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı işlemleri gerekli kılabilir.</li> </ul>

### *Çapraz bağlama*

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu metod üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulması zordur (23). Enzim aktivitesi reaksiyon süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu metodun en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki yada çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu metodun dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda

kullanılan çok fonksiyonlu maddeler diazobenzidin, 1,5-diflor-2,4-dinitro benzen, glutaraldehit, triklor-s-triazin, heksametilendiizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanolüen dir.

Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılıman koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnızca immunolojik testlerde kullanılmışlardır (12).

### Tutuklama yada hapsedme yöntemleri

Bu metod polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır (19). Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınları ile başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir (22,24,25). Polimerik matriks yapısı, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olmalıdır. Bu metod her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsedmek için çok genel kullanılabilir (19).

### *Membranda tutuklama*

Mikrokapsül ile hapsedme metodu, 1-100 mikron çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesini içerir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir. Enzimlerin mikrokapsüllenmesi için basit iki metod vardır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur. Faz ayrımı metodunda, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. İkinci metotta ise enzimin sulu bir çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikrodamlarının etrafında membran oluşturur.

Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllenmiş olur. En çok kullanılan membranlar naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilattır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme metodunda herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu metod ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır (26). Yüzey-hacim oranının büyük olması, mikrokapsül içerisinde oluşan enzim sustrat reaksiyonunu artırır. Bu metodun dezavantajları mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır.

#### *Matrikste tutuklama*

Kafes tipi hapsetme metodu, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu metod da enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer şebekesi oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisine sürekli olarak girip çıkabilir.

Enzim kimyasal modifikasyona uğramaz. Bu metod, farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevlerinin hazırlanmasına olanak verir. Enzim türevlerinin jelatinimsi doğası, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolanmasını sağlar. En yaygın Ca-aljinat, agar, poliakrilamit ve kollojen gibi polimerler matriks olarak kullanılır. Molekül kütlesi 15000'den fazla olan enzimler bu amaçla kullanılır. Substrat da büyük moleküllü olmamalıdır.

Bu metodun sahip olduğu avantajlar aşağıda verilmiştir.

- 1- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkiler.
- 2- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilir.

3- Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleştirilir (21,25,27).

Bu metodun dezavantajları çapraz bağlı polimer şebekesinden enzimin sızması, yalnızca küçük hacimli substratlar için uygun olması ve makromoleküler substratlar için çok düşük aktivite göstermesidir.

Çizelge 2.3. İmmobilizasyon metodlarının karşılaştırılması (28)

METOT	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
ADSORPSİYON	Enzim hiçbir değişikliğe uğramaz. Taşıyıcının yenilenmesi mümkündür. Ucuz ve basit bir tekniktir.	İyonik şiddetin değişmesi desorpsiyona neden olur. Enzim mikrobial, proteolitik ataklara maruz kalır.
TUTUKLAMA	Enzimde hiçbir değişiklik olmaz. Enzim mikrobiyal veya proteolitik etkilerden etkilenmez.	Difüzyon substrat dönüşümünü etkiler. Makromoleküler substratlar için etkili değildir. Sürekli enzim kaybedilmesinde gözenek büyüklüğünün etkisi vardır. Enzim genellikle inaktive olur.
KOVALENT BAĞLAMA	pH, zayıf kuvvetler tarafından ve substrat konsantrasyonundan etkilenmez.	Aktif bölge kolayca etkilenebilir ve maliyeti yüksektir.
ÇAPRAZ BAĞLAMA	Enzim sıkı bir şekilde bağlanır bu yüzden kaybolmaz.	Hazırlama esnasında enzim aktivite kaybeder. Makromoleküler substratlar için uygun değildir. Taşıyıcının yeniden kullanılabilirliği yoktur.



### 2.1.2. İmmobilizasyon metodunun seçimi

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

- 1- Enzim reaksiyonun yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- 2- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile reaksiyona girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif enzimin aktif ucuna nüfuz etmesin diye olabildiğince büyük olmalıdır.
- 3- Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
- 4- İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- 5- İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon metodunu seçmeden önce reaksiyonun doğası göz önünde bulundurulmalıdır.
- 6- Son olarak, destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

### 3. ÜREAZ

#### 3.1. Üreaz Enzimi ve Özellikleri

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 yapısı X ışınları kristallografisi ile 1930'lu yıllarda bulunmasına rağmen, ancak bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle 1967 yılında mümkün olmuştur (29).

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

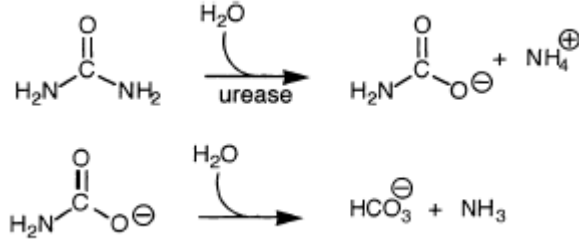
5: Grup no: Enzimin C-N bağlarına etkili olan amidaz grubuna dahil olduğunu

1: Alt grup no: Enzimin bir açilamidaz olduğunu

5: Sistemik ad: Enzimin sistemik adının “*üre aminohidrolaz*” olduğunu gösterir (30).

Üreaz ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanmasını katalizler. Bu tepkimeyi katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyon hızını  $10^{14}$  kat artırmak suretiyle yapar (31). 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 (32).



Şekil 3.1. Üreazın kataliz reaksiyonu (33)

Üreaz enzimi en çok bitki, mantar ve bakterilerde bulunur. Üreyi azot ve karbondioksite parçalayarak azot sirkülasyonunda önemli bir rol oynar (34). Ayrıca zirai gübrelemede ürenin hidrolizini hızlandırmada, insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıkların oluşmasında da önemli rol oynar.

Araştırılan en yaygın üreaz içeren kaynaklar şunlardır;

- 1- *Klebsiella aerogenes*: Geviş getirenlerin sindirim sisteminde yaşayan ve içerdiği üreaz (KAU) sayesinde azot metabolizmasında önemli rol oynayan bir bakteridir.
- 2- *Bacillus pasteurii*: Toprakta, sulara, pis sulara yaşar. Özellikle ziraat için çok önemlidir. İçerdiği üreaz (BPU) sayesinde bitkiler için toprağı azotça zenginleştirir.
- 3- *Canavalia ensiformis*: 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 (35).

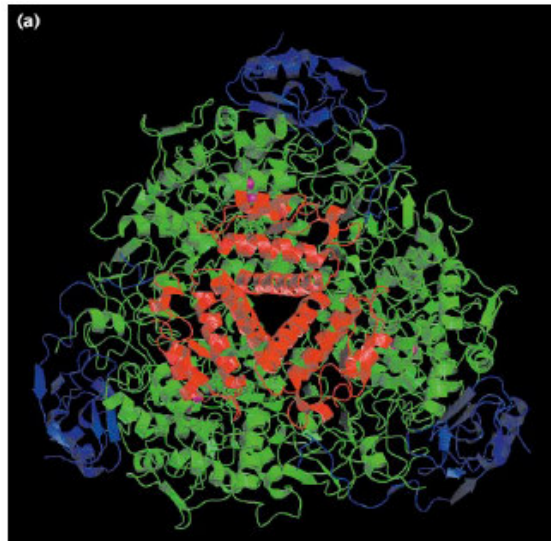
### 3.1.1. Üreaz enziminin moleküler özellikleri

Üreaz monomer olarak aktiftir ve multimerik yapıda genel olarak trimer yada heksamer olarak bulunur. Polipeptit zincirinin 840 amino asitten oluşan alt biriminin moleküler ağırlığı 90 777 kDa olarak not edilmiştir. Üreazın yaklaşık molekül ağırlığı 545 365 kDa olarak bulunmuştur (36).

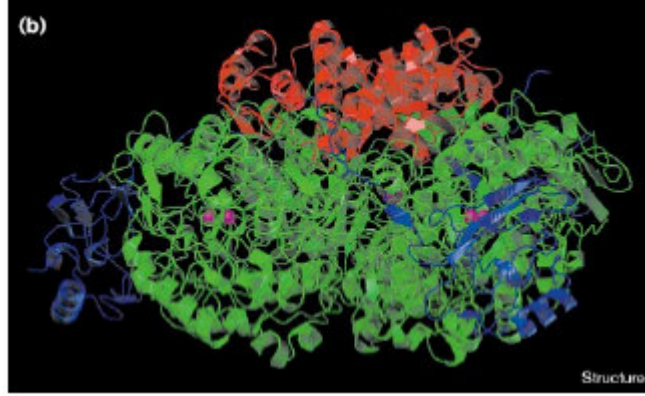
### 3.1.2. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı

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 (31). Enzim  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  olarak adlandırılan üç alt birimin oluşturduğu bir heteropolimerdir ve aktif merkezler  $\alpha$  alt biriminde bulunur. Aktif merkezde iki nikel iyonu vardır ve bunlar enzimin aktivasyonunda çok önemli rol oynamaktadır.

Enzimin üç boyutlu yapısı şekil 3.2 de gösterilmektedir. Şekildeki yeşil, mavi, kırmızı kısımlar sırasıyla  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  alt birimlerini göstermektedir. Aktif merkezde Ni iyonları ise pembe ile gösterilmiştir.



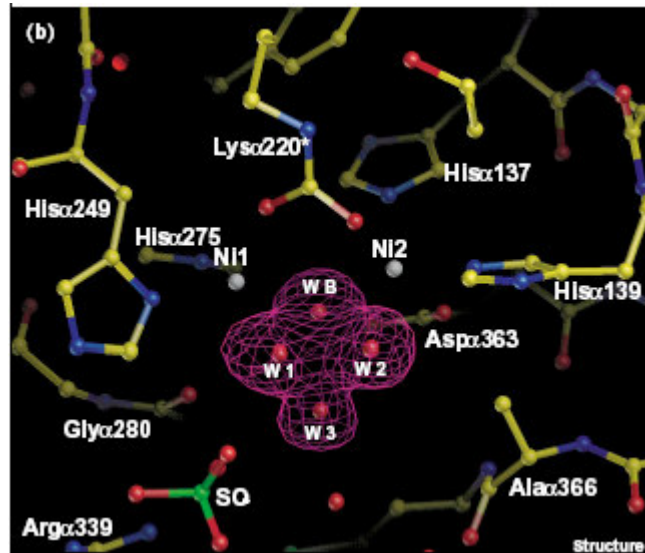
(a)



(b)

Şekil 3.2. BPU üç boyutlu yapısı a) üstten görünüm, b) yandan görünüm (37)

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 şöyledir;

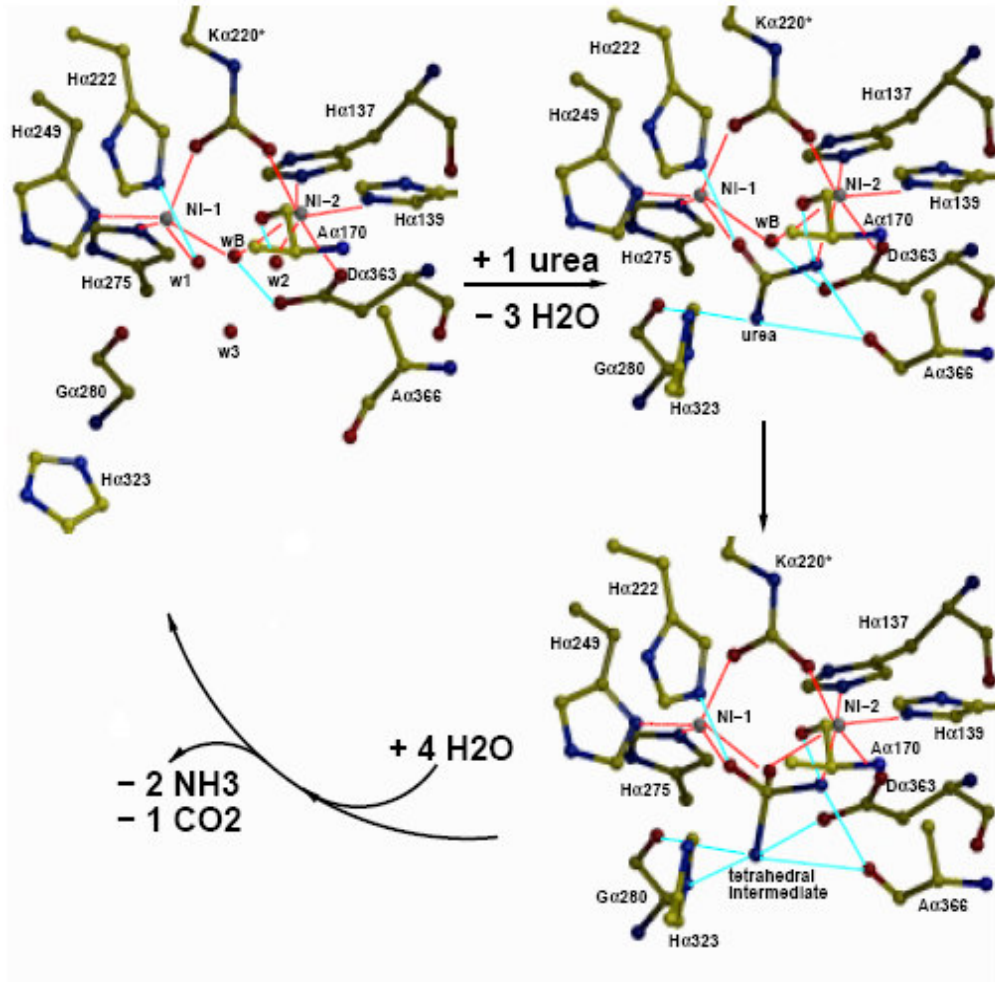


Şekil 3.3. BPU aktif merkezi (37)

Şekil 3.3 de karbon, azot, oksijen, kükürt ve nikel atomları sırasıyla sarı, mavi, kırmızı, yeşil ve gri renkte gösterilmişlerdir.

### 3.1.3. Enzimatik tepkime mekanizması ve nikel iyonunun rolü

Reaksiyon ve inhibisyon mekanizması tam netlik kazanmamıştır (35). Araştırmalar sonucu elde edilenlerle 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 (37).



Şekil 3.4. BPU kataliz reaksiyon mekanizması (35)

### 3.1.4. Patojenlerde üreaz enziminin rolü

*Proteus mirabilis*: İnsanlarda en çok taş oluşum sebeplerinden biri de *Proteus mirabilis* adındaki mikroorganizmadır. Salgıladığı üreaz enzimiyle üreyi parçalayarak amonyak oluşumuna ve alkali idrara neden olan *Proteus* en sık saptanan etkindir ve buna bağlı olarak sitrüt (magnezyum amonyum fosfat) ile kalsiyum fosfat taşları oluşur. Yine *Proteus mirabilis* mikroorganizmasının amonyak miktarını artırmasından dolayı böbreğin akut ve kronik iltahaplanmasına sebep olmaktadır (35).

*Helicobacter pylori*: Ülser ; mide veya duodenumun (onikiparmak barsağı) mide asidi ve sindirim sıvıları (pepsin gibi) tarafından harabiyeti sonucunda meydana gelen doku kaybıdır. Doku kaybı asit pepsinin etkisiyle daha derinlere inebilir enflamasyon denilen yara meydana getirir.

Birçok ülser *Helicobacter pylori* mikrobunun varlığı ile meydana gelir. Duodenal ülserlerde *Helicobacter pylorinin* varlığı %100'e yakın oranla yüksek bulunmuştur. *Helicobacter pylori* varlığı saptanan, ancak ülser görülmeyen kişilerin varlığından dolayı, *Helicobacter pylori* varlığı yanında başka faktörlerde (örneğin irsiyet) olması gerektiğini düşündürmektedir. *Helicobacter pylori* varlığının ülser yapması dışında müzmin gastrit yaptığı kesindir. Mide kanserlerine yol açtığı da iddia edilmektedir.

### 3.1.5. Üreaz enzimi için inhibitörler

Üre ziraat uygulamalarında en yaygın kullanılan gübredir. Bunda ucuz, kolay uygulanabilir ve yüksek miktarda azot içermesi önemli rol oynar. Toprakta yüksek üreaz aktivitesi bitkilerin amonyak zehirlenmesi ve pH artışıyla zarar görmesine sebep olduğu için problem oluşturur. Bazı topraklarda ise amonyak atmosfere verilir ve bu da çevre için tehdit oluşturan ve çözülmesi gereken bir sorundur (38).

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 (39-40).

Üreaz aktivitesini etkilediği bilinen inhibitörler hidroksiamik asit, L-askorbik asit, 2,2-dipiridil disülfid, ninhidrin, fosforamidaz, tioller, fosfatlar, borik ve boranik asit, ağır metal iyonları olarak sayılabilir (35).

### 3.1.6. Üreaz enziminin kullanım alanları

Üreazın kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir;

- Biyolojik sıvılarda ürenin miktarının hesaplanmasında
- Yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında
- Atık sulardaki ürenin temizlenmesinde
- Yiyecek endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılır (41).

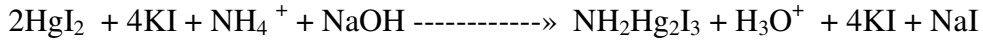
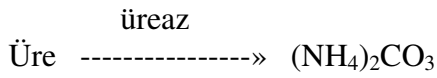
Biyolojik sıvılarda ürenin miktarının hesaplanmasında: Üre vücudumuzda metabolik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ve böbreklerden idrar yoluyla sürekli atılan en önemli toksik maddelerden biridir (41). Amino asitlerin başlıca  $\alpha$ -amino asidinden türeyen amonyak insanlara potansiyel olarak toksik etkilidir. Amonyanın neden olduğu toksik etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Vücut bu toksik olan amonyaktan toksik olmayan üreyi meydana getirir. Amonyanın üreye çevrilişi ve üre döngüsündeki metabolik yolun normal işleyişi sağlığın korunması için esastır. Bazı sirozlu bireylerde ve ağır hepatitli hastalarda karaciğer fonksiyonları ciddi bir şekilde etkilendiğinden amonyak kanda birikir ve klinik semptom ve belirtilere yol açar. Amonyak zehirlenmesinin semptomları, konuşmanın peltekleşmesi, görmede bulanıklığı ağır vakalarda koma ve ölümü kapsar. Tedavi, kan amonyak düzeyini düşürmek üzere tasarlanan tedbirleri kapsar (13).

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Bu enzimin bağlı olarak ucuzluğu, dayanıklılığı ve kolay izlenebilmesinin yanı sıra kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır.

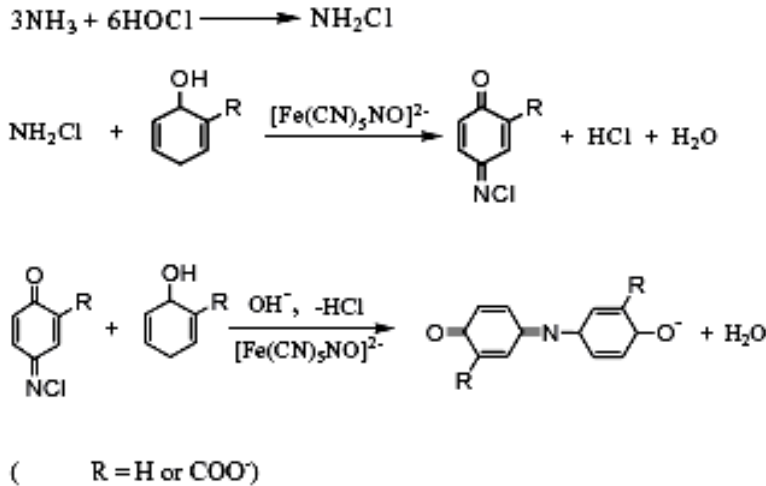


Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (42). Klinik üre tayinlerinde en çok kullanılan yöntem berthelot yöntemidir ancak başta spektrofotometrik olmak üzere birçok üre tayin yöntemi vardır. Üre analizinde kullanılan spektrofotometrik yöntemler şunlardır;

Nessler Yöntemi; Üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan  $\text{NH}_3$  nessler belirteci ile açık sarı koyu turuncu arasında renk oluşturmakta, oluşan bu renk de spektrofotometrik olarak tayin edilmektedir.

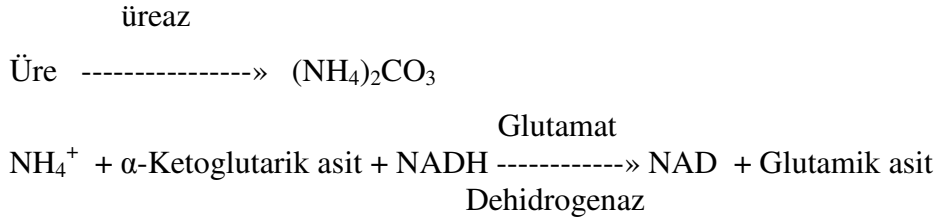


Berthelot Yöntemi; Üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan  $\text{NH}_3$  sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprosit katalizörü eşliğinde fenol ile tepkimeye girerek mavi renkli indefenolu oluşturur ve rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 3.5. İndefenol oluşum mekanizması

Çift Enzim Yöntemi; Hastalık teşhisi için yapılan tetkiklerde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntem çift enzim yöntemidir (43).



Günümüzde, özellikle klinik çalışmalarda basit ve kolay uygulanabilir ölçüm tekniklerine ilgi giderek artmaktadır. Bu nedenle de enzim ve madde kullanımını aza indirecek biyosensörlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (44). Üreazın biyokatalizör olarak üre biyosensörlerinde kullanımının geliştirilmesi biyokimya ve klinik analizcilerin ilgisini çekmeye devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda genel prensip immobilize ürez ile membran yüzeyi kaplanarak oluşturulan biyosensörlerde ürenin amonyum ve bikarbonata dönüştürülerek ürün miktarını gözlemektir (45).

Yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında: Böbrek bir boşaltım organıdır. Vücutta biriken üre, ürik asit gibi metabolizma atıklarını dışarı atarak elektrolit ve su kaybını düzenler. İnsan vücudu günde yaklaşık 1,4 litre suyu idrar yoluyla atar. Bu şekilde vücut idrarda bulunan zararlı madde olarak adlandırılan çeşitli kimyasal maddeleri atmış olur. Bu zararlı maddelerin vücuttan atılmasıyla böbrekler organizmadan zararlı zehirli maddelerin atılması gibi hayati öneme sahip işlevini yerine getirir. Böbrek fonksiyonlarının göstergesi olarak kandaki üre ve kreatinin seviyesi önemlidir. Böbreğin fonksiyonunu yerine getiremediği durumlarda kanda üre birikir. Böbrek yetmezliği çeken hastalarda ürenin fazlasının ortamdan uzaklaştırılması büyük bir problemdir. Böbreğin fonksiyonlarını yürütemediği durumlarda hasta hayatının devamını sağlamak için bu fonksiyonları üstlenen çeşitli yapay böbrek sistemleri geliştirilmiştir.

Geleneksel yapay böbrekler hacimli, ağır, karmaşık ve pahalı, taşınması ve uygulaması zor, hastanın hareketini engelleyicidir. Mikrokapsüllenmiş üreazın kullanımıyla böbrek fonksiyonları zarar görmeden hastanın kanındaki üre seviyesini

değiştirmeyi sürdürebilecek daha kullanışlı, taşınabilir ve kolay uygulanabilir böbrek makinesi geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (31).

Atık sulardaki ürenin temizlenmesinde: Üre diyaliz çözeltilisinde bulunan bir atıktır. Her kullanımda yaklaşık 100 ile 300 litre diyaliz suyu oluşur. Hem çevrenin korunması hem de bu suyun tekrar kullanılabilmesi için ürenin bu ortamdan uzaklaştırılması gerekir (8).

### **3.2. Doğal Polimerler**

Doğal polimerler, biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan polimerlerdir. Proteinler (örneğin kollojen, jelatin, elastin, aktin vb), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin, vb) ve Polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerlerdir. Yaşayan organizmaların karmaşık yapılarından dolayı üretim maliyetleri yüksek ve yeterince büyük ölçeklerde üretilmemeleri, karşılaşılan başlıca sorunlardır. Doğal polimerler, sahip oldukları işlevsel özellikler nedeniyle değişik kullanım alanlarına sahiptirler. Kalınlaştırıcı, jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı, yapıştırıcı ve biyomalzeme olarak kullanılabilirler. Doğal polimerlerle ilgili olarak öncelikle çözüme kavuşturulması gereken sorun yeni ürünlerin sentezlenmesinin araştırılmasıdır. Öte yandan, doğal polimerler nanoteknolojide ve biyomimetik (doğayı taklit eden) malzemelerin sentezlenmesinde anahtar rolü oynamakta ve lipit tübülleri (yağ borucukları) ve protein lateksler gibi biyopolimerik yapıların geliştirilmesi, doğal polimerlerle ilgili pazar şansını önemli oranda yükseltmektedir. Doğal polimerler özellikle spesifik uygulamalarda ihtiyaç duyulan boşlukları doldurmakta, ancak bazı sentetik polimerlerin çok ucuza üretilme şansı doğal polimerlerin kullanımını etkilemektedir. Fermentasyon ve saflaştırma teknolojilerinde elde edilen gelişmeler ve ucuz doğal hammaddelerin sağlanması sonucu, petrol bazlı sentetik polimerlerin yerine doğal polimerlerin kullanımını olanaklı hale getirecektir. Doğal polimerler, biyomalzeme alanının vazgeçilmez kaynaklarıdır. Biyolojik ortamdaki makromoleküllerin benzeri veya aynısı olduklarından, canlı vücuduyla temas ettiklerinde zehir etkisi, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar vermezler. Ancak, elde edildikleri kaynağa bağlı olarak

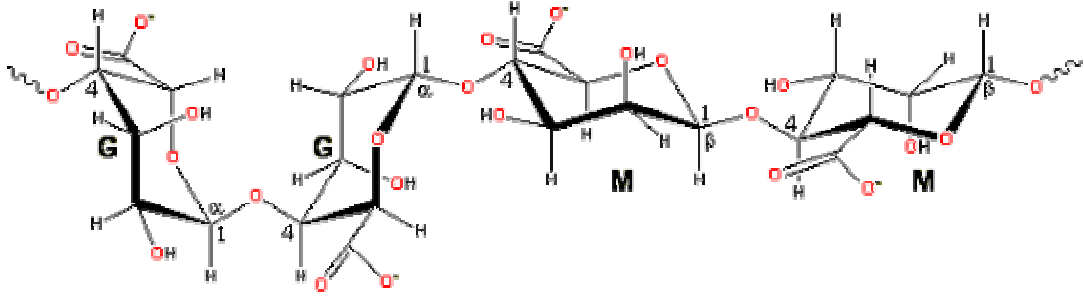
bileşimlerinin değişmesi, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve bu nedenle şekillendirilmelerindeki güçlük ve tüm bunların ötesinde immünojenik olmaları (bağışıklık tepkisine yol açmaları) önemli dezavantajlarıdır. Enzim varlığında yapılarının bozunması, yani biyobozunur oluşlarıysa geçici uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler açısından avantajdır.

### 3.2.1. Aljinat

Aljinat özellikle Kuzey Atlantik kayalık kıyılarında çok yaygın bulunan kahverengi deniz alglerinin önemli bir polisakkarididir. 1,4 bağlı  $\beta$ -D- mannopiranozil üronat ve  $\alpha$ -L- glunopranozil üronat ihtiva eder (46). Farklı seviyelerde de olsa, bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur (47). Aljinatın yapısı ve molekül ağırlığı kullanılan algin cinsine, yaşına, bölümlerine ve aljinatın ekstraksiyon işlemlerine göre değişir (48). Açık denizlerde yaşayan *L. Hyperbore* alginin gövdesinde dokulara yüksek mekaniklik veren gulunorik asit yüksek miktarda bulunurken aynı algin su yüzeyinde duran ince uzun yaprakları daha esnek bir yapı sağlayan düşük guluronik asit içeriği ile karakterize edilen aljinata sahiptir.

Aljinat alglerde kalsiyum tuzu şeklinde bulunur. Ticari olarak piyasaya daha çok sodyum aljinat formunda sunulmaktadır. Sodyum aljinat gıda endüstrisinde jel yapıcı, stabilizatör ve koyulaştırıcı madde olarak çok kullanılır. Ayrıca aljinat jeller protein, ilaç, hücrelerin salımı ve tutuklanması, doku ve organların onarımı için matriks olarak da kullanılırlar.

Aljinik asit,  $\beta$ -D-mannuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asidin 1,4 glikozit bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir kopolimerdir. Mannuronik asit-gulunorik asit oranı türe, mevsime ve algin yetiştiği yere göre değişir. Aljinatlar  $\beta$ -1,4-D-mannuronik asit (M bloğu) ve  $\alpha$ -1,4-L-guluronik asit (G bloğu) ve karışık bloklardan (MG) oluşur (49).

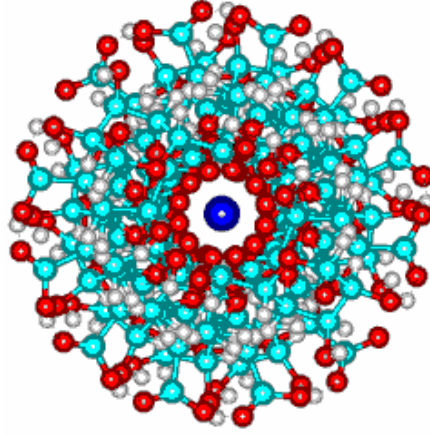


### Aljinatın tekralanan birimlerinin yapısı

Genelde G bloğu oranı yüksekse aljinatlar basınca daha dayanıklı fakat kırılğan jeller oluştururlar. G bloğu oranı düşükse aljinatlar basınca az dayanıklı ama esnek karakterde jeller oluştururlar.

Aljinik asitin sodyum, potasyum, amonyum tuzları ve propilen glikol ester türevlerinin suda kolaylıkla çözünebilmesine karşı, aljinik asit ve kalsiyum tuzunun sudaki çözünürlüğü son derece sınırlıdır. Sodyum aljinat kokusuz, tatsız bir toz olup suda çözüldüğünde viskoz koloidal bir çözelti oluşturur (49).

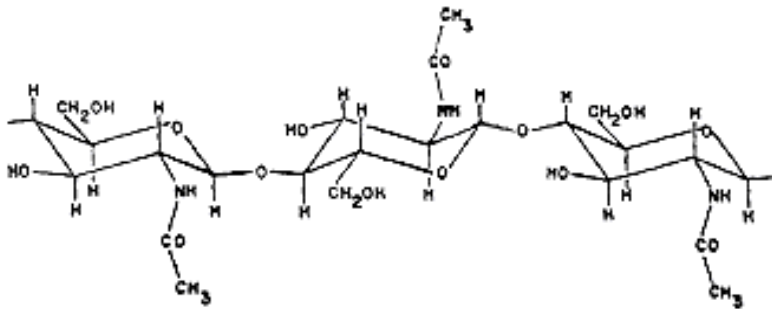
Biyouyumluluğu, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  gibi divalent katyonlar varlığında jelleşmesi bu polimerin uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Aljinat jel bilyeleri hazırlamada en çok kullanılan iki değerlikli metal kalsiyumdur. Aljinatın ucuz ve toksik etki göstermemesi, boncukların kolay bir şekilde hazırlanabilmeleri gibi avantajları vardır. Aljinat çözeltisinin ve  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinin konsantrasyonlarını artırmak daha sıkı çapraz bağlı jellerin oluşmasına neden olur. Fakat dikkat edilmesi gereken nokta yüksek konsantrasyonlu aljinat çözeltisiyle çalışmanın zorluğudur. Ca-aljinat jelleri oluşumunda  $\alpha$ -L-guluronik asit (G) yapılarına bağlı kalsiyum iyonlarının bağlanmasıyla oluşur. Oluşum Yumurta-Kutu modeliyle şekil 3.12 de gösterilmektedir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonları ile aljinat zinciri iyonik çapraz bağ oluştururlar.



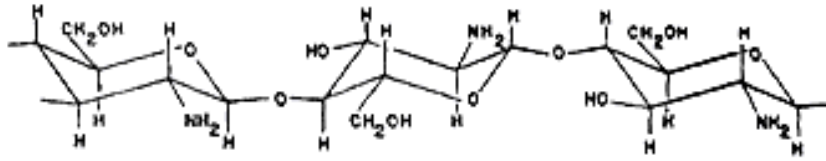
Şekil 3.6. Yumurta-Kutu Modeli (49)

### 3.2.2. Kitosan

Kitin; uzun ve doğrusal yapıya sahip bir polisakkarittir. Yapısı, selüloza çok benzer. Kitin, genel olarak yengeç, karides, midye gibi bazı deniz kabuklularının, istiridye kabuğu, mürekkep balığı iskeleti gibi bazı deniz yumuşakçalarının ve sinek, çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alır. Kitinin ticari olarak kullanımı, beraberinde bulunan proteinlerin uzaklaştırılmasındaki güçlükler nedeniyle sınırlıdır. Kitin ve ksantat karışımları lif şeklinde çekilebilir, bu nedenle de tekstil endüstrisi için potansiyel bir malzeme olarak görünmektedir. Kitinin, heparin ile olan ilişkisi nedeniyle kitin sülfatlar kan pıhtılaşmasını önleyici (antikoagülan) olarak kullanılırlar. Kitosan, kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen amorf yapıda bir poliaminosakkarit ve doğal olarak meydana gelebilen birkaç katyonik polielektrolitten biridir. Kitosan üretiminde hammadde olarak kitin kullanılır.



kitinin yapısı



### Kitosanın yapısı

Japonya ve ABD'de ticari olarak üretilmektedir. Flonac ticari adıyla yengeç kabuklarından üretilen kitosan polimerinin 2000 yılı üretimi 1250 ton/yıl dır. Kitosan bir çok organik reaksiyon ile kolayca modifiye olabilir. Yapısındaki serbest amin grupları ve hidroksil gruplarından dolayı fonksiyonel gruplu polimerlerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Yapısındaki amin gruplarından dolayı sulu asidik ortamda çözünür özelliğe sahiptir (50).

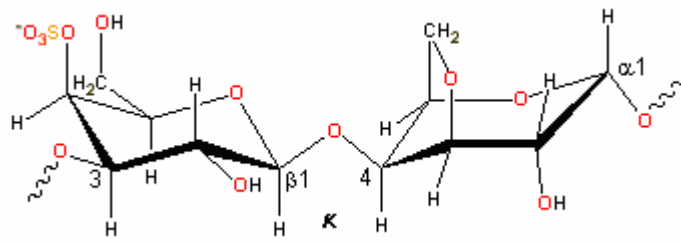
Kitosanın uygulama alanları oldukça fazladır. Bunlar ilaç ve biyomedikal mühendisliği (yanık tedavisi, yumuşak ve sert kontak lensler), kağıt üretimi, kozmetik, gıda ve tekstil endüstrisi, atık su işlemleri gibi uygulama alanlarını kapsar.

### 3.2.3. Karragenan

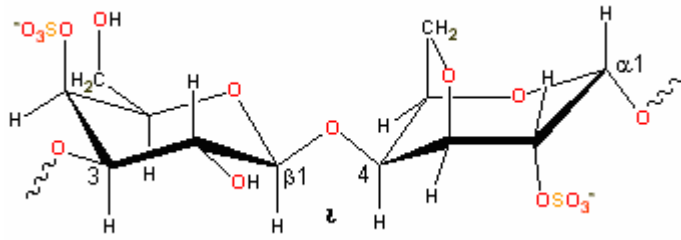
Deniz Kadayıfı, İrlanda Yosunu (Irish Moss) olarak adlandırılır. En yaygın *Chondrus crispus* ve *Gigartina mamillosa* adlı kırmızı alglerden elde edilen bir lineer polisakkarittir. Bu algler Kuzey İrlanda ve Amerika'nın Kuzey Doğu sahillerinde yetişir. Algler yaz veya sonbaharda su seviyesinin hemen altındaki kayalar üzerinden toplanır. Sahilde birkaç defa suyla yıkanıp, tekrar güneşte kurutulularak elde edilir. Beyazımsı, kırmızımtrak veya sarımsı renkte, 5-15 cm uzunlukta parçalar halinde bulunur. Hafif kokulu ve tuzlu lezzettedir. Soğuk suda şişer. Soğuk suda % 47' si, sıcak suda % 75' i çözünür. % 5' lik çözültisi suyu pelteleştirir.

Karragenan 3 değişik formda bulunur. Bunlar *kappa* ( $\kappa$ ), *iota* ( $\iota$ ) ve *lambda* ( $\lambda$ ) karragenandır.  $\kappa$ -Karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür.

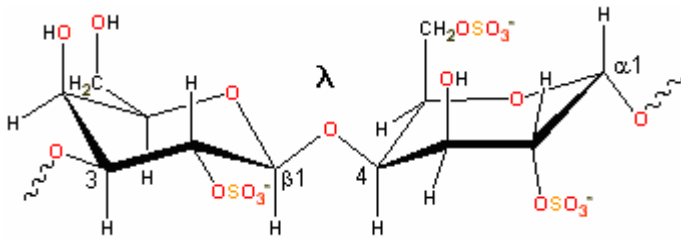
En sık rastlanan  $\kappa$ -karragenan (1,3)- $\beta$ -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşur.  $\iota$ -karragenan (1,3)- $\beta$ -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galaktopiranoz-2-sülfat birimlerinin ve  $\lambda$ -karragenan ise (1,3)- $\beta$ -D-galaktopiranoz-2-sülfat-(1,4)- $\alpha$ -D-galaktopiranoz-2,6-disülfat birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuştur (51).



$\kappa$ -karragenan yapısı



$\iota$ -karragenan yapısı



$\lambda$ -karragenan yapısı

Karragenan emülsiyon yapıcı, göğüs yumuşatıcı ve antikoagülan etki gösterir. Gıda sanayiinde, ekmekten dondurma ve konservelere kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir.



#### 4. İNTERPOLİMER KOMPLEKSLERİ

Makromoleküler zincirler çözelti içinde ideal durum dışında bir takım etkileşimlere uğrayabilirler. Elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve yük aktarımı gibi ikincil bağlanma kuvvetlerinin sebep olduğu iki yada ikiden fazla farklı makromoleküler zincirin birleşmesiyle elde edilen bileşikler genellikle “*İnterpolimer Kompleksleri*” olarak adlandırılır (10).

İnterpolimer kompleksleri dermatolojik sistemlerde, kan torbaları yapımında, yara kapaticılarda, diş hekimliği materyallerinde, göz hekimliği, kontrollü ilaç salımı, antikanser bileşikleri ve proteinleri, doğal veya endüstriyel su arıtma sistemleri mevcut maddelerin son özelliklerinin modifikasyonu, genetik modifiye ediciler vb ile ilgili uygulamalarda kullanılmaktadır. Özellikle medikal alanlarda kullanıldıkları için bu tip kompleks polimerlerin biyoyoumluluğu önem taşımaktadır.

Doğal bir polimerin sentetik bir polimer ile karıştırılması, polimerik komplekslerin hazırlanması için ilginç bir yol olarak görünmektedir. Sentetik ve doğal polimer karışımları tekli bileşimlerinden daha iyi biyoyoumluluk ve mekaniksel özellikleri ile polimerik materyallerin yeni bir sınıfını oluşturur. Örnek olarak; nişasta/ Poli(vinilalkol), kitosan / Poli(etilen oksit) verilebilir.

İnterpolimer kompleksi oluşumunu etkileyen en önemli faktörler;

- pH
- Polimer zincir uzunluğu, stereo regülaritesi
- Termodinamik özellikleri (entalpi, entropi)
- Seçimlilik ve yer değiştirme reaksiyonları
- Katı hal özelliklerindeki değişimler
- İyonlarla etkileşim özellikleri

şeklinde sıralanabilirler.

## **4.1. İnterpolimer Komplekslerinin Sınıflandırılması**

İnterpolimer komplekslerini genel olarak etkileşim kuvvetlerine göre dört gruba ayırmak mümkündür.

1. Polielektrolit kompleksler
2. Hidrojen bağı kompleksler
3. Stereo kompleksler
4. Yük transfer kompleksleri

### **4.1.1. Polielektrolit kompleksler**

Polielektrolit kompleksler zıt yüklü polielektrolitlerin coulomb kuvvetlerinden kaynaklanan etkileşimler sonucu oluşurlar. Genellikle polikasyonlar ve polianyonların sulu çözeltilerinin karıştırılmasıyla yada uygun fonksiyonel gruplar içeren monomerlerin polimer kalıpları üzerine polimerizasyonu ile oluşurlar. Polielektrolit komplekslerin oluşumu bileşenlerin karakteristik özelliklerinden ve kimyasal çevreden etkilenir. Bu tür kompleksleşmeye örnek olarak kitosan ve karboksimetilselüloz, poli(akrilik asit) ve metilselüloz, poli(etilen glikol) ve poli(metakrilik asit) verilebilir.

### **4.1.2. Hidrojen bağı kompleksler**

Hidrojen bağı içeren kompleksler proton alan ve proton veren birimler taşıyan polimerlerin birleşimlerinden oluşur. Hidrojen bağlanma etkileşimi ile oluşan interpolimer kompleks çalışmalarına örnek olarak poli(karboksilik asit) ve polivinil alkol, poli(akrilik asit) ve hidrokispropilselüloz gösterilebilir.

### **4.1.3. Stereo kompleksler**

Stereo kompleksler genel olarak Van der Waals kuvvetleri ile izotaktik ve sindiyotaktik polimer çift türlerinin etkileşimi sonucunda gözlenir. Bu kompleksler

yüksek düzeyde özel yapısal düzenlilik gösterirler. Polar organik çözücülerde kompleks bir çözelti olarak elde edilir ve kompozisyonun (izotaktik / sindiyotaktik birimlerinin mol oranı) yaklaşık 1/2 kadardır. Tersine apolar çözücülerde kompleks jel olarak elde edilir ancak kompozisyonu yine 1/2 dir.

#### **4.1.4. Yük aktarım kompleksleri**

Yük aktarım kompleksleri elektron alan ve elektron veren polimerlerin yer aldığı sistemlerde yük transferleri sırasında meydana gelen etkileşimler yoluyla oluşur. Tekrarlanan birim oranı hemen hemen eşittir. Bu tür komplekslerin oluşumu üzerine sadece birkaç teorik çalışma yapılmıştır. Bunlar da poli(akrilik asit)–metal–poli(akrilamit) burada kullanılan metal iyonları  $Er^{3+}$  ve  $La^{3+}$  dir. Diğer bir örnekte ise poli(N-vinil-2-pirolidon), poli(akrilik asit) ve  $Cu^{2+}$  arasında interpolimer kompleksi oluşturulmuştur (11).

## 5. DENEYSEL KISIM

### 5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kitosan, Sodyum aljinat, Üre  $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ , Üreaz (üre amidohidrolaz E.C. 3.5.1.5): Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

Akrilamid (AAm)  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{CONH}_2]$ , Akrilik asit (AA)  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}]$ , Amonyumpersülfat (APS)  $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ , N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)  $[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ , N, N'-Metilen-bis-akrilamid (BAAm)  $[(\text{C}_2\text{H}_3\text{CONH})_2\text{CH}_2]$ , Asetik asit  $[\text{CH}_3\text{COOH}]$ , Fosforik asit  $[\text{H}_3\text{PO}_4]$ , Borik asit  $[\text{H}_3\text{BO}_3]$ , Trikloro asetik asit (TCA)  $[\text{CCl}_3\text{COOH}]$ , Amonyum sülfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , Potasyum iyodür  $[\text{KI}]$ , Civa(II)klorür  $[\text{HgCl}_2]$ , Potasyum hidroksit  $[\text{KOH}]$ : Merk AG firmasından temin edildi.

Kappa karagenan: Fluka firmasından temin edildi.

### 5.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre : UNICAM UV/Vis Spektrofotometre

pH metre : Orion pH metre 420A

Çalkalamalı su banyosu : ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

### 5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Nessler reaktifi: 5 g KI 5 mL saf suda; 20 g KOH 40 mL saf suda; 2,4 g  $\text{HgCl}_2$  40 mL saf suda çözüldü. KI çözeltisine yavaş yavaş  $\text{HgCl}_2$  çözeltisinden çok az miktarda kalıcı kırmızı çökelek oluşana kadar ilave edildi. Bu çözeltiye KOH eklendi 100 mL ye saf suyla tamamlandı ve bir gece bekletilerek süzüntü kullanıldı (52).

Britton-Robinson (B-R) tamponu: 2,3 mL buzlu asetik asit, 2,7 mL fosforik asit ve 2,4720 g borik asit 3 katı saf suyla sulandırılarak hacim 1,0 L ye saf suyla

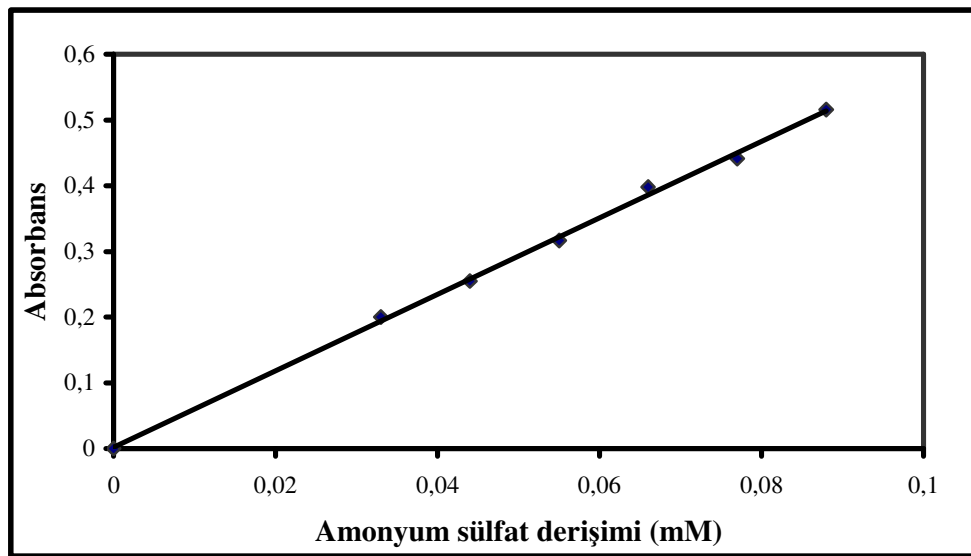
tamamlandı. Bu çözeltilerden 50 mL alınarak 2,0 M NaOH ile pH 5,0-10,0 arasında ayarlandı.

TCA çözeltisi: %10 luk (m/v) TCA çözeltisi saf suyla hazırlandı.

Üre (substrat) çözeltisi ve üreaz enzim çözeltisi pH 7,5 B-R tamponu kullanılarak hazırlandı.

#### 5.4. Amonyum Sülfat Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla çeşitli konsantrasyonlardaki (0.02-0,1M) saf su kullanılarak hazırlanan amonyum sülfat çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan bu çözeltilerden Nessler metoduna göre (31) 1,0 mL alınarak üzerlerine 1,0 mL tampon (pH 7,5 ) ve 1,0 mL TCA eklendi. Oluşan bu çözeltilerden 1,0 mL alındı ve 50 mL lik balon jöjeye koyuldu. Üzerine 1,0 mL Nessler reaktifi eklenip hacim 50 mL ye saf suyla tamamlandı. 391 nm de aynı şekilde hazırlanan ancak amonyum sülfat içermeyen blank çözeltilerine karşı absorbans değerleri ölçüldü.  $\text{NH}_4^+$  derişimlerine karşı gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmek suretiyle kalibrasyon grafiği hazırlandı (Şekil 5.1).



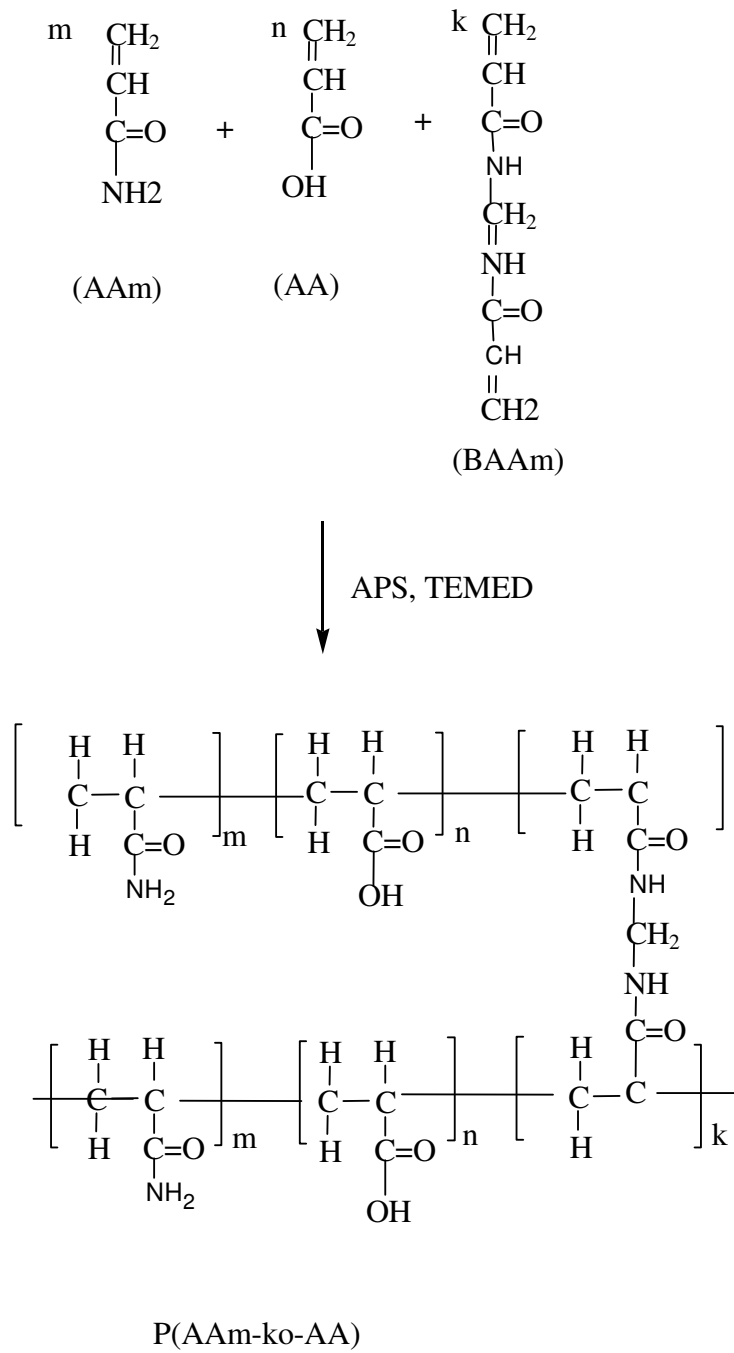
Şekil 5.1. Amonyum sülfat kalibrasyon eğrisi

## 5.5. Enzim İmmobilizasyonu

Aljinat/kitosan polielektrolit kompleksinin hazırlanması: Oda sıcaklığında 0,5 g kitosan ağırlıkça % 1,0 asetik asit içeren 50 mL saf suda ve 0,5 g Na-aljinat 50 mL saf suda çözülerek hazırlandı. Kitosan çözeltisi aljinat çözeltisine eklendi ve 6 saat manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Bu işlemden sonra enzim çözeltisi (6,0 mL) bu çözeltiye eklendi ve 1 saat karıştırıldı. Homojen karışım 0,27 M lık  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılarak 2 mm çapında A-K küreleri elde edildi. Polimerik küreler iki defa saf suyla yıkandı ve 0,027 M  $\text{CaCl}_2$  içerisinde 4 °C da 24 saat bekletildi. İşlemler için küreler 4 °C da tampon içinde saklandı (53).

Poli(Akrilamit-ko-Akrilik asit)/ $\kappa$ -Karragenan (IPN) in hazırlanması: P(AAm-ko-AA) /karragenan çapraz bağlı serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. Bisakrilamit (BAAm) çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı. APS ve TEMED radikal başlatıcı sistemi olarak kullanıldı.

Oda sıcaklığında 20 mL saf suya AAm (2,85g), AA (2,0 mL),  $\kappa$ -karragenan (1,0 g), BAAm (0,15 g), APS (10,0 mg), enzim çözeltisi (6,0 mL) ve TEMED (1,0 mL) eklenerek karıştırıldı. Bu karışım petri kabına koyularak polimerizasyonun gerçekleşmesi beklendi. Elde edilen jeller küp şeklinde eşit olarak kesildi ve saf suda 1 saat buzdolabında bekletildi. Sonra 3 defa saf suyla yıkandı ve kullanılmak üzere 4 °C da tampon içinde saklandı (54).



Şekil 5.2. P(AAm-ko-AA) oluşum reaksiyonu

## 5.6. Aktivite Tayini

Üreaz enziminin aktivite tayini Nessler metoduna göre yapıldı (31). 1,0 mL B-R tamponu (pH 7,5) uygun miktarda enzim ( 0,1 mL üreaz çözeltisi, 0,5 g A-K ve 0,5 g P(AAm-ko-AA)\karragenana immobilize üreaz) üzerine 1,0 mL üre (0,2 M) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon çalkalamalı su banyosunda 55 °C da ve 30 dakikada gerçekleştirildi. 30 dakika sonunda 1,0 mL TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan bu 3,0 mL lik çözeltilerden 1,0 mL 50 mL lik balon jojeye alındı, üzerine 1,0 mL Nessler reaktifi eklenerek hacim saf suyla 50 mL ye tamamlandı. Oluşan sarı- turuncu kompleksin UV spektrofotometresinde 391 nm de hazırlanan blank çözeltilisine karşı absorpsiyon değerleri ölçüldü. Aktivite, zamana karşı ölçülen absorpsiyon değerlerinden ve amonyum sülfat kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Hız (v)} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{391}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{391}} \quad [5.1]$$

Bu eşitlikte  $\Delta c$ , g/mL olarak üre derişimi değişimini,  $\Delta A_{391}$  391 nm de ölçülen absorpsiyon değişimini,  $\Delta t$  ise reaksiyonun gerçekteştiği zamanı gösterir.

### 5.6.1. Aktiviteye pH Etkisi

Serbest ve immobilize üreazın aktivitesine pH etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH larda (5,0 -10,0) B-R tamponu hazırlandı ve kısım 5.6.1 de anlatıldığı gibi yalnız sıcaklık 35 °C olmak üzere aktiviteler tayin edildi.

### 5.6.2. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (30°C – 70°C) kısım 5.6.1 de anlatıldığı gibi aktiviteler tayin edildi.



### **5.6.3. Aktiviteye Substrat Derişiminin Etkisi**

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla çeşitli derişimlerde (0,5–0,05 M) hazırlanan substrat çözeltileriyle kısım 5.6.1 de anlatıldığı gibi aktiviteler tayin edildi.

### **5.6.4. Depolama Kararlılığı**

Serbest üreazın depolama kararlılığını incelemek amacıyla B-R tamponunda (pH 7,5) hazırlanan enzim çözeltisi 4 °C da saklandı. İmmobilize edilen üreazın depolama kararlılığını incelemek amacıyla ise 4 °C da polimerler B-R tamponu içinde saklandı. Belirli aralıklarla alınan örneklerle 5.6.1 de anlatıldığı gibi aktiviteler tayin edildi.

### **5.6.5. Tekrar Kullanılabilirlik**

Hapsedilerek immobilize edilen üreazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 5.6.1 de anlatıldığı gibi yalnız sıcaklık 35 °C olmak üzere aktivite tayin edildi.

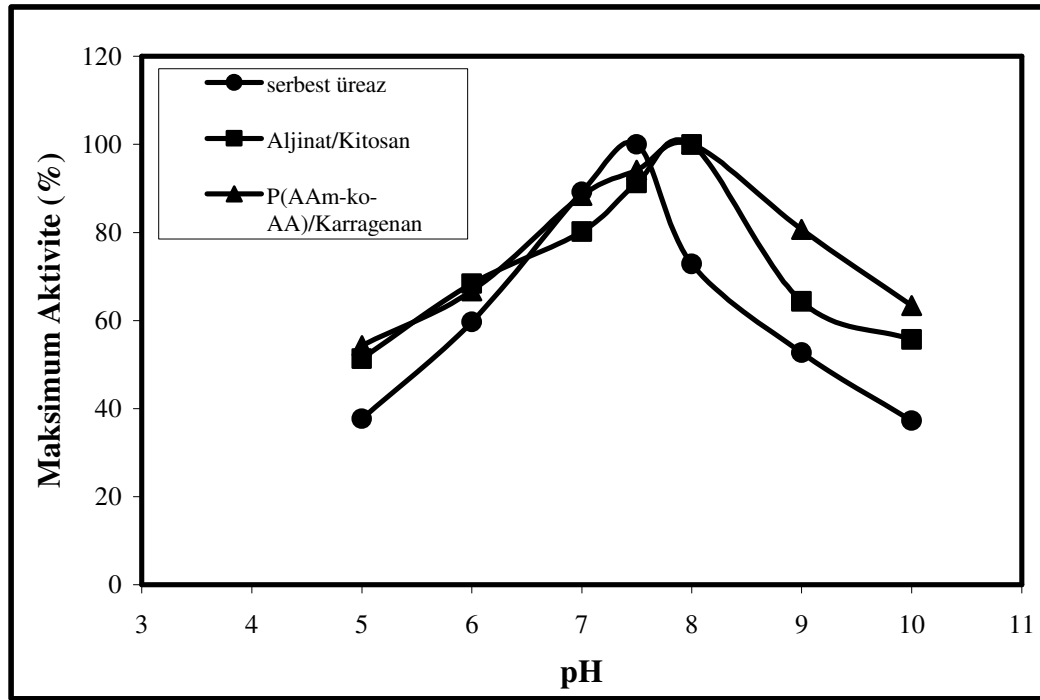
### **5.6.6. Termal İnaktivasyon**

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (65 °C ve 75 °C da) farklı zaman aralıklarında (30 - 70 dakika) inkübe edilen üreazların kısım 5.6.1 de anlatıldığı gibi aktiviteleri tayin edildi.

## 6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 6.1. Aktiviteye pH'nın Etkisi

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktivite değerlerinin pH ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 6.1 de verilmiştir. Serbest üreaz için optimum pH 7,5 ve aljinat/kitosan ve P(AAm-ko-AA) /karragenan polimerlerine immobilize edilen üreaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Elde edilen maksimum aktivitelerin pH ile değişimi Şekil 6.1 de gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın maksimum aktivitesinin pH ile değişimi

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktivitesi pH ile değişme gösterir. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda reaksiyon hızı maksimumdur. Bu nedenle serbest enzimler için reaksiyon hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir. Genellikle

enzimlerin optimum pH sı 3 - 8 arasındadır. Pek çok enzimin optimum pH değeri 7 civarındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sifıra kadar düşebilir.

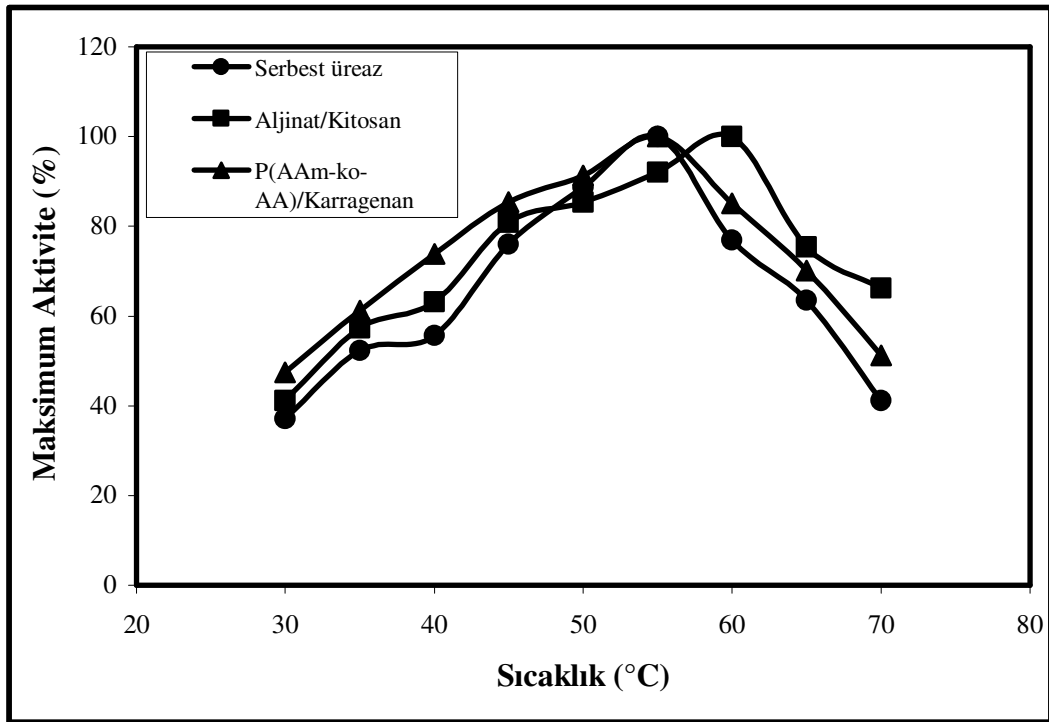
Şekil 6.1 de görüldüğü gibi serbest enzimin optimum pH sı 7,5 iken immobilize enzimlerin optimum pH sı 8,0 olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon sonucunda bazik bölgeye 0,5 lik bir kayma söz konusudur. Poliiyonik matriksler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin mikro çevresi ile reaksiyonun ana çözeltisi arasında protonların farklı konsantrasyonlarda bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken polikatyonlar bunları iter. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH ana çözülden farklı olur. pH daki kayma aynı zamanda enzim reaksiyonunun tipine ve matriksin yapısına da bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeniyle de ana çözeltinin pH sı reaksiyonun meydana geldiği matriks çevresininkinden oldukça farklı olabilir. Ayrıca enzim ile polimerik destek arasında oluşabilecek çeşitli etkileşim kuvvetlerin de (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH yı etkilediği gözlenmektedir.

Üreazın immobilizasyonda optimum pH değerlerindeki kaymanın asidik ve bazik bölgelere doğru olduğu literatürde de verilmiştir. Rejikumar ve Demi'nin yaptığı çalışmada üreaz immobilizasyonu için matriks olarak poli(vinil alkol) kullanılmıştır. Serbest üreaz ve immobilize üreaz için optimum pH 8 olarak bulunmuştur (5). Chellapandian ve Krishnan'ın yaptığı çalışmada ise üreaz kitosan-poli(glisidil metakrilat) desteği kullanılarak immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize üreaz için optimum pH 7,5 olarak bulunmuştur (9).El-Sherif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da üreaz naylon membran kullanılarak immobilize edilmiştir. Serbest enzim için optimum pH 7,5 immobilize enzim için ise pH 8 olarak bulunmuştur (38).

## **6.2. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi**

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktivite

değerlerinin sıcaklık ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 6.2 de verilmiştir. Serbest üreaz ve P(AAm-ko-AA)/ karragenan polimerlerine immobilize edilen üreaz için optimum sıcaklık 55 °C ve aljinat/kitosan polimerlerine immobilize edilen üreaz için optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artması moleküllerin kinetik enerjisini artırdığından tüm kimyasal reaksiyonların, bu arada biyokimyasal reaksiyonların da hızlarını artırır. Genelde sıcaklığın 10 °C artmasıyla, reaksiyon hızları da yaklaşık olarak iki kat artar. Biyokimyasal reaksiyonlarda da aynı durum gözlenmekle birlikte protein yapısında bulunan enzimler, belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlarlar. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozular. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktivitesini yitirir.



Şekil 6.2. Serbest ve immobilize edilen üreazın maksimum aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir ve optimum sıcaklıkta artış

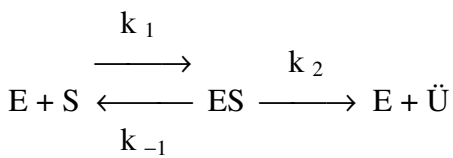
gözlenebilir. Dolayısıyla enzim katalitik aktivitesini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olabilir.

Üreazın immobilizasyonunun da optimum sıcaklık değerlerindeki kaymanın daha yüksek yada daha düşük sıcaklıklara kaydığı literatürde verilmiştir . Örneğin Rejikumar ve Demi'nin yaptığı çalışmada optimum sıcaklık serbest üreaz için 50°C ve immobilize üreaz için ise 70°C olarak bulunmuştur (5). Chellapandian ve Krishnan'ın yaptığı çalışmada ise optimum sıcaklık serbest üreaz için 60°C ve immobilize üreaz için ise 70°C olarak bulunmuştur (9). El-Sherif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da optimum sıcaklık serbest üreaz için 70°C ve immobilize üreaz için ise 75°C olarak bulunmuştur (38).

### 6.3. Aktiviteye Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest üreazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve çeşitli substrat derişimlerinde (3,33 – 1,33 M) hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{mak}$  değerleri Çizelge 6.1 de verilmiştir.

Enzim-substrat (ES) reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir.



Bu eşitlikte; E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi,  $\ddot{U}$ =ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad [6.1]$$

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad \text{Lineweaver-Burk Bağıntısı} \quad [6.2]$$

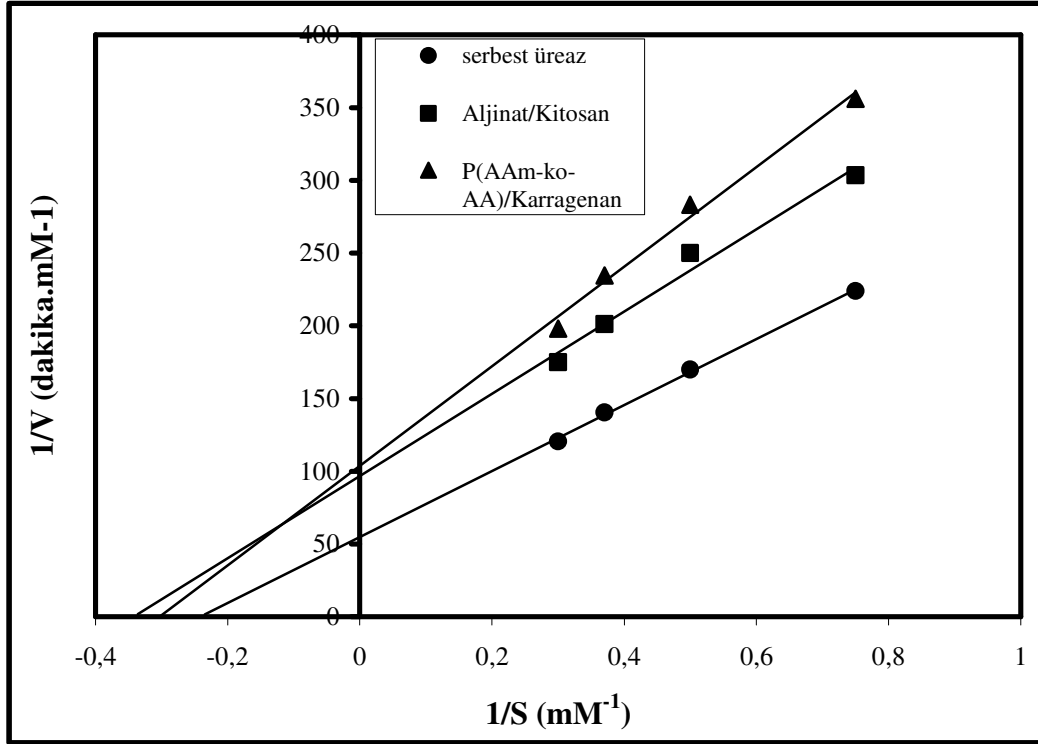
Bu eşitliklerde;  $V$  = başlangıç hızı,  $V_{\text{mak}}$  = maksimum hız,  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  [6.3]

Michaelis sabiti,  $S$  = substrat derişimi olarak belirtilir.

Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 6.3 de verilmiştir. Grafikten  $V_{\text{mak}}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplanmış ve Çizelge 6.1 de verilmiştir. Hapsedilerek immobilize edilen enzim sistemlerinde difüzyonel etkiler sebebiyle  $V_{\text{mak}}$  ve  $K_m$  değerlerinde değışiklikler gözlenmiştir.

Çizelge 6.1. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın kinetik parametreleri

Destek	$K_m$ (mM)	$V_{\text{mak}}$ (mM.dakika <sup>-1</sup> )
Serbest üreaz	4,5	0,0182
Aljinat/kitosan	3,03	0,0104
P(AAm-ko-AA)/karragenan	3,30	0,0099

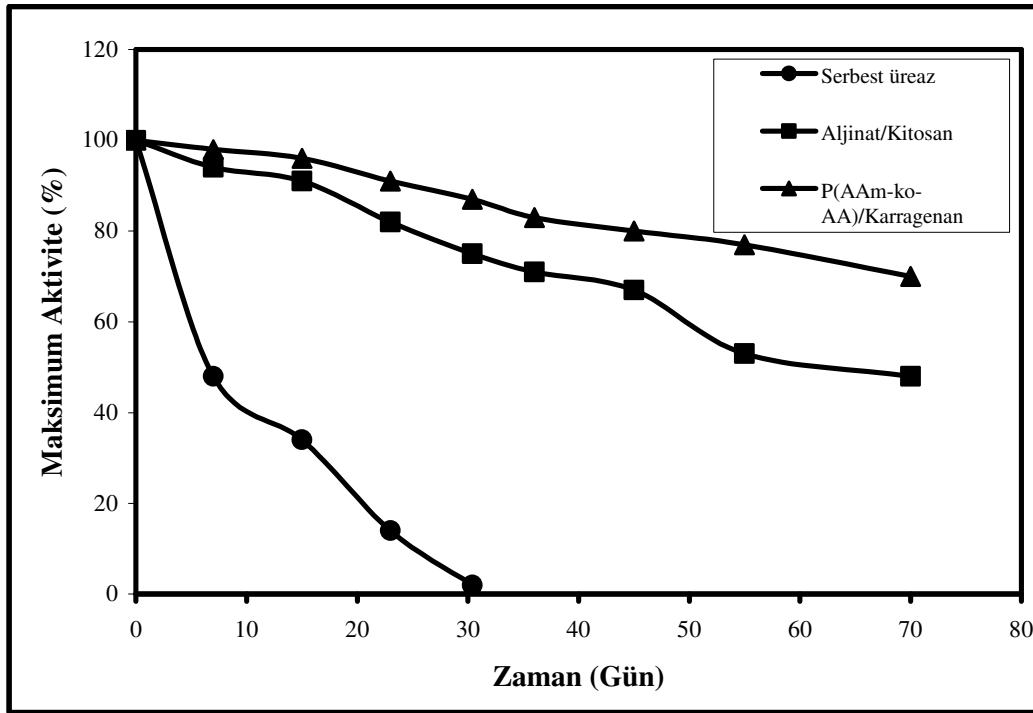


Şekil 6.3. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın Lineweaver-Burk grafiği

Genellikle immobilizasyon sonucunda  $K_m$  değerlerinde artma gözlenir . Örneğin Chellapandian ve Krishnan'ın yaptığı çalışmada  $K_m$  değerleri serbest üreaz için 3,23 mM immobilize üreaz için ise 6,7 mM olarak bulunmuştur (9). El-Sherif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da  $K_m$  değerleri serbest ve immobilize üreaz için sırasıyla 19,5 Mm ve 50,0 mM bulunmuştur (38). Yapılan bu çalışmada iki immobilize enzim için  $K_m$  değerlerinde de azalma gözlenmiştir. Immobilizasyon ile enzimlerin  $K_m$  değerlerinde azalma gözlendiği literatürde vardır. Marzadori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada üreazın immobilizasyonu için hidroksiapatit destek olarak kullanılmıştır. Bulunan  $K_m$  değerleri serbest ve immobilize üreaz için sırasıyla 7,4 mM ve 6,9 mM dır (55). Buradaki değişimin sebebi enzim ve polimerik destek arasındaki etkileşim olabilir. Immobilize enzimlerin  $V_{mak}$  değerlerinde de azalma gözlenmiştir. Immobilize enzimler için enzim-substrat kompleksi sterik engellemeler nedeniyle daha zor oluşur bu da  $V_{mak}$  değerlerinin serbest enzime göre daha düşük olmasına neden olur.

#### 6.4. Depolama Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimlerin depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla serbest enzim ve immobilize enzimler de 4 °C da buzdolabında saklanmıştır. Belirli periyotlarla alınan örnekler incelenmiştir. Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Bu değişimin sebebi ortamın sıcaklığı, iyon şiddeti ve pH gibi faktörlerdir. İmmobilizasyon işlemiyle enzimlerin depolama kararlılıkları artar. Maksimum aktivitenin depolanma süresi ile değişimi Şekil 6.4 de gösterilmiştir.



Şekil 6.4. Serbest ve hapsedilerek immobilize edilen üreazın depolama kararlılığı

Yapılan çalışmalarda serbest enzimin aktivitesinin belirtilen depolama şartlarında 7. günde % 50 sini kaybetmiştir. Aljinat/kitosan ve P(AAm-ko-AA)/karragenan polimerlerine immobilize edilen üreaz ise aynı zamanda sırasıyla % 94 ve % 98 lik aktiviteye sahiptir. Serbest enzim aktivitesini 30 gün sonra tamamen yitirirken 70

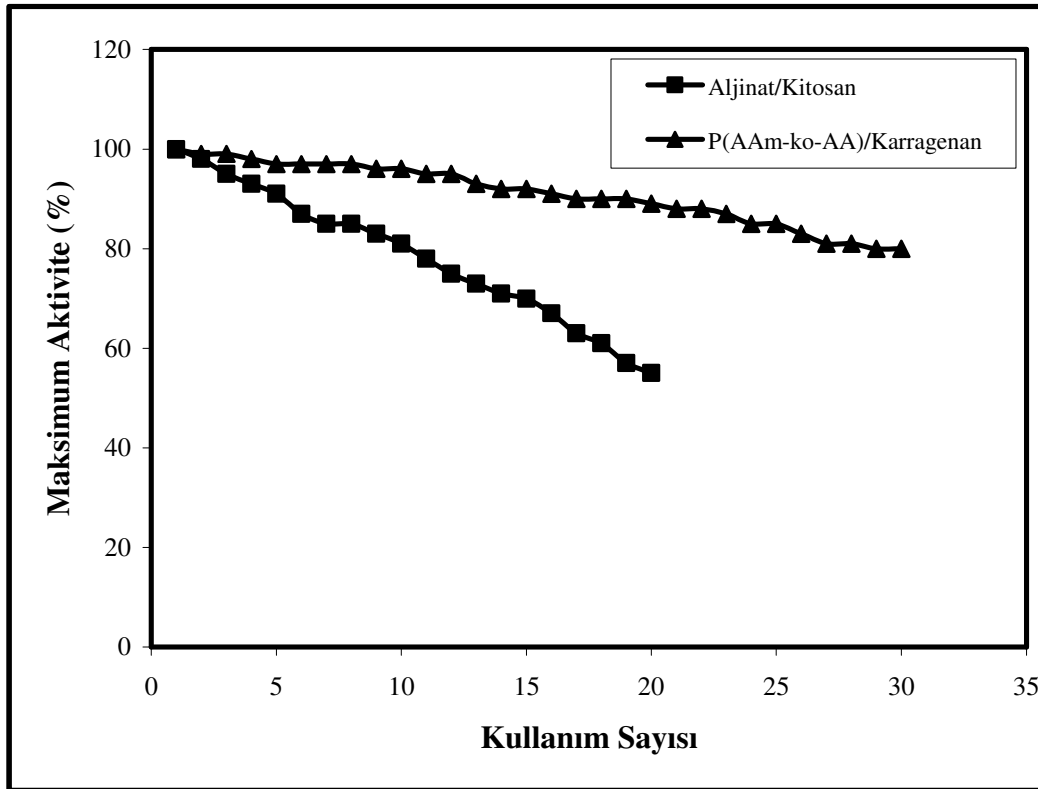


gün sonunda aljinat/kitosan aktivitesinin % 48 korurken P(AAm-ko-AA)/karragenan aktivitesinin % 70 ini korumuştur.

Literatürde de immobilizasyonla depolama kararlılığının arttığı verilmiştir . Örneğin Rejikumar ve Demi'nin yaptığı çalışmada serbest enzimin 45 gün sonunda aktivitesinin %10 unu ve immobilize enzimin ise aktivitesinin %60 ını koruduğu gözlenmiştir (5): Laska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise üreaz polianiline immobilize edilmiştir ve 26 gün sonunda serbest enzimin aktivitesinin %5 ve immobilize enzimin aktivitesinin ise %40 ını koruduğu gözlenmiştir (7).

### 6.5. Tekrar Kullanılabilirlik

Serbest üreaz bir kez, immobilize enzim ise aktivitesini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. Tekrar kullanım sayıları Şekil 6.5 de verilmiştir.

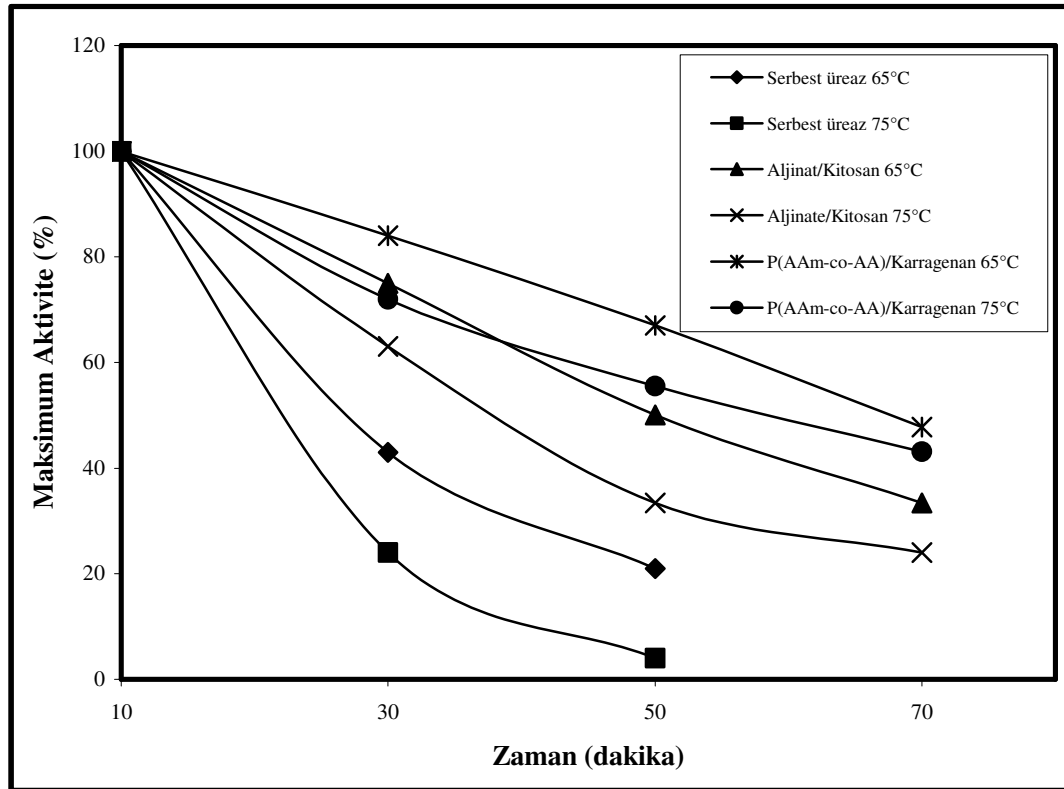


Şekil 6.5. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım sayıları

Biyoteknolojik ve biyomedikal çalışmalar için tekrar kullanım kapasitesi oldukça önemlidir. Aljinat/kitosan ve P(AAm-ko-AA)/karragenan polimerlerine immobilize edilen üreazın tekrar kullanım sayıları ilk 5 gün içinde yapılan deneyler sonunda sırasıyla 20 ve 30 kullanıma kadar çalışılmıştır. Aljinat/kitosan polimerine immobilize edilen üreazın 20 kullanımda aktivitesinin % 55 ini koruduğu ve P(AAm-ko-AA)/karragenan polimerine immobilize edilen üreazın 20 kullanımda ise aktivitesinin % 80 ini koruduğu gözlenmiştir.

İmmobilizasyonla kullanım sayısının geliştirildiği literatürde verilmiştir. Örneğin Kayastha ve Reddy'nin yaptığı çalışmada üreaz arilamin ve alkilamine immobilize edilmiştir. İmmobilize üreazların 30 kullanımda sırasıyla aktivitelerinin %20 ve %40 ını koruduğu gözlenmiştir (56).

## 6.6. Termal İnaktivasyon



Şekil 6.6. Serbest ve immobilize edilen üreazın termal inaktivasyonu

Şekil 6.6 da farklı sıcaklık ve zaman aralıklarındaki serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktivitesinin zamanla değişimi gösterilmiştir. 65 °C da serbest ve aljinat/kitosan ve P(AAm-co-AA)/karagenan polimerlerine immobilize edilen üreazın aktivitelerinin 50 dakikalık inkübasyon sonunda sırasıyla % 21, % 50, % 60 ını koruduğu gözlenmiştir. 75 °C da ise serbest ve aljinat/kitosan ve P(AAm-ko-AA)/karagenan polimerlerine immobilize edilen üreazın aktivitelerinin 50 dakikalık inkübasyon sonunda sırasıyla % 4, % 33,4 ve % 60 ını koruduğu gözlenmiştir. İmmobilizasyon ile enzimlerin yapıları korunduğu için immobilize enzimler serbest enzime göre daha yavaş inaktive olmuşlardır.

## 7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Serbest üreaz için optimum pH 7,5 iken aljinat/kitosan ve P(AAm-ko-AA)/karragenan polimerlerine immobilize edilen üreaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur.
2. Serbest üreaz ve P(AAm-ko-AA)/karragenan interpolimer kompleksine immobilize edilen üreaz için optimum sıcaklık 55 °C ve aljinat/kitosan polielektrolit kompleksine immobilize edilen üreaz için optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur.
3. Serbest üreaz için hesaplanan  $K_m$  değeri 4,5 mM, P(AAm-ko-AA)/karragenan interpolimer kompleksine immobilize edilen üreaz için hesaplanan  $K_m$  değeri 3,30 mM, aljinat/kitosan polielektrolit kompleksine immobilize edilen üreaz için hesaplanan  $K_m$  değeri 3,03 mM dir.
4. Serbest üreaz için hesaplanan  $V_{mak}$  değeri 0,0182 mM.min<sup>-1</sup>, P(AAm-ko-AA)/karragenan interpolimer kompleksine immobilize edilen üreaz için hesaplanan  $V_{mak}$  değeri 0,0104 mM.min<sup>-1</sup> , aljinat/kitosan polielektrolit kompleksine immobilize edilen üreaz için hesaplanan  $V_{mak}$  değeri 0,0099 mM.min<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.
5. Serbest enzim aktivitesini 30 gün sonra tamamen yitirirken 70 gün sonunda aljinat/kitosan aktivitesinin % 48 korurken P(AAm-ko-AA)/karragenan aktivitesinin % 70 ini korumuştur.
6. Çalışılan immobilize enzimlerinin tekrar tekrar kullanılabilirliği vardır.

## KAYNAKLAR

1. Krajewska, B., Zaborska, W., Leszko M., "Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow-binding inhibitors: Ni<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup> and acetohydroxamic acid", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14:101-109 (2001).
2. Singhal, R., Gambhir, A., Pandey, M.K., Annapoorni, S., Malhotra, B.D., "Immobilization of urease on poly(N-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir Blodgett films for application to urea biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 17:697-703 (2002).
3. Godjevargova, T., Dimov, A., "Immobilization of urease onto membranes of modified acrylonitrile copolymer", *Journal of Membran Science*, 135:93-98 (1997).
4. Godjevargova, T., Gabrovska, K., "Immobilization of urease onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes", *Journal of Biotechnology*, 103:107-111 (2003).
5. Rejikumar, S., Devi, S., "Preparation and characterization of urease bound on crosslinked poly(vinyl alcohol)", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4:61-66 (1998).
6. DeGroot, A., Neufeld, R., "Encapsulation of urease in alginate beads and protection from  $\alpha$ -chymotrypsin with chitosan membranes", *Enzyme and Microbial Technology*, 29:321-322 (2001).
7. Laska, J., Włodarczyk, J., Zaborska, W., "Polyaniline as a support for immobilization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6:549-553 (1999).
8. Chen, J., Chiu, S., "A poly(N-isopropylacrylamide-co-Nacryloxysuccinimide-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 (2000).
9. Chellapandian, M., Krishnan M., "Chitosan-poly (glycidly methacrylate) copolymer for immobilization of urease", *Process Biochemistry*, 33:595-600 (1998).
10. Tsuchida, E., Takeoka, S., "Interpolymer complexes and their ion-conduction", *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, Eds: Dublin/Bock/Davis/Schuls/Thies, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 183-185 (1994).

11. Alaslan, A., "Poli(N-Vinil-2-Prolidon)/Kitosan İnterpolimer Komplekslerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üni. Fen Bil. Ens.*, 5-11 (2004).
12. Telefoncu, A., "Enzimoloji", *Tübitak*, Aydın, 193-243, 353-383 (1997).
13. Murray, R.K., Granner D.K., Mayes P.A., "Harper'ın Biyokimyası", Menteş G., Ersöz B., *Barış Kitabevi*, 73-74, 341-349 (1993).
14. Kutay, F., "Enzimler", İnsan Biyokimyası, Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y., *Palme Yayıncılık*, 197-220 (2002).
15. Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamlıoğlu M., "Biyokimya", *Nobel Yayın Dağıtım*, 213-247 (2000).
16. Gözükar E. M., "Biyokimya II", *Nobel Tıp Kitapevleri*, 605-615 (2001).
17. Glick, D., "Methods of Biochemical Analysis.", *JohnWiley and Sons*, 135-201 (1979).
18. Srere, P. A., Uyeda, K., "Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices", *Methods in Enzymology*, Mosbach, K., *Academic Press*, Inc., New York, 11-19 (1976).
19. Dumitriu, S., Popa, M., Dumitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", *J. Bioactive and Compatible Polymers.*, 3: 243-312 (1988).
20. Isao, K., "Immobilization of biofunctional substances", *Radiat. Phy. Chem.*, 18:343 (1980).
21. Allan, S.F., "Review of the use of radiation", *Radiat. Phys. Chem.*, 18:323-342 (1985).
22. Carr, P.W., Bowers, L.D., "Support considerations", *Chemical Analysis*, 56:167-170 (1980).
23. Jansen, E.F., Tomimatsu, Y., Olsan, A.C., "Cross-linking of  $\alpha$ -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde", *Arch. Biochem. Biophys.*, 144:394-400 (1979).
24. Cinderalla, M., Canteralla, L., Alfani, F., "Entrapping of acid phosphatase in HEMA: Preparation and kinetic properties", *British. Poly. J.*, 20:477 (1988).
25. Arıca, Y.M., Hasırcı V.N., "Immobilization for the production of membranes", *Biomaterials.*, 8:489-495 (1987).

26. Chang, T.M.S., "Microencapsulation of enzyme and biological methods in enzymology", Mosback, K., *Academic Press Inc.* , New York, 201 (1976).
27. Kaetsu, I., Kamura, M., Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", *Biotech. Bioeng.*, 21:847 (1979).
28. Alaylı, A., "Karbonik anhidraz enziminin farklı destek materyalleri üzerine immobilizasyonunun araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üni. Fen Bil. Ens.*, Erzurum, 7-20 (2002).
29. Hamarat, Ş., "Immobilization of urease and research into its applications", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üni. Fen Bil. Ens.*, İzmir, 1-10 (1995).
30. Boz, B.G., "Üreaz enziminin polianaline immobilizasyonu ile üreye duyarlı enzim mikroelektrodunun hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üni. Fen Bil. Ens.*, Ankara, 1-20 (2001).
31. Kayastha, A. M., Das, N., "A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease", *Biochemical Education*, 27:114-117 (1999).
32. Blakeleyand, R., L., Zerner, B., "Jack bean urease: the first nicel enzyme", *J. of Mol.Cat.*, 23:263-292 (1984).
33. Ciurci, S., Benini, S., Mangana, S., "Structural properties of nickel ions in urease", *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192:331-335 (1999).
34. Krajewska, B., Zaborska, W., "Leszko, M., Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow-binding inhibitors", *Journal of Moleculer Catalysis B:Enzymatic*, 14:101-109 (2001).
35. Stefano, B., "Structure and function relationship of urease and cytochrome c-553 from *Bacillus Pasteurii*" , A thesis the degree of doctor of philosophy, *The Universty of York Faculty of Science*, 16-36 (2000).
36. Takashima, K., Suga, T., Mamiya, G., "The structure of jack bean urease the complete amino acid sequence limited proteolysis and reactive cystein residues", *Eur. J. Biochem*, 175:151-165 (1988).
37. Ciurci, S., Benini, S., Mangana, S., "A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme", *Structure*, 7:205-216 (1999).
38. El-Sherif, H., Martelli, P.L., Casadio, R., Portaccio, M., "Urease immobilization on chemically grafted nylon membranes part1: isothermal characterization", *Journal of Moleculer Catalysis B:Enzymatic*, 14:15-29 (2001).

39. Khan, K. M., Iqbal, S., Lodhi, M. A., "Biscoumarin: new class of urease inhibitors; economical synthesis and activity", *Biorganic & Medicinal Chemistry*, 12:1963-1968 (2004).
40. Amtul, Z., Rasheed, M., Choudhary, M. I., "Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319:1053-1063 (2004).
41. Akgöl, S., Yalçınkaya, Y., Arıca, Y., "Reversible immobilization of urease", *Process Chemistry*, 38:675-683 (2002).
42. Baysal, H., "Üreaz içeren enzim komplekslerinin hazırlanması ve kullanım olanaklarının araştırılması", Doktora Tezi, *Ege Üni. Fen Bil. Ens.*, İzmir, 42-47 (2000).
43. Şehitoğulları, A., "Preparation of the potentiometric immobilized urease electrode and urea determination", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üni. Fen Bil. Ens.*, İzmir, 1-20 (1996).
44. Lakard, B., Herlem, G., Labachelierie, M., "Miniaturized pH biosensor based on electrochemically modified electrodes with biocompatible polymers", *Biosensors and Bioelectronics*, 19:595-606 (2004).
45. Singhal, R., Gambhir, A., Pandey, M. K., et. all, "Immobilization of urease on poly(N-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir-Blodgett films for application to urea biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 17:697-703 (2002).
46. Salamone, J.C., "Polymeric Materials Encyclopedia", *CRC Pres*, New York, 149-154 (1996).
47. Kierstan, M.P.J., Bucke, C., "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate", *Biotechnology and Bioengineering*, 19:387-397 (1997).
48. Tanaka, H., Matsumura, M., Veliku, I.A., "Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads", *Biotechnology and Bioengineering*, 26:53-58 (1984).
49. Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F., Muller, G., "Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SDS) from calcium alginate gel beads", *European Polymer Journal*, 40:2709-2715 (2004).
50. Wan, Y., Creber, K.A.M., Peppley, B., Bui, V.T., "Ionic conductivity of chitosan membranes", *Polymer*, 44:1057-1065 (2003).
51. Meunier, V., Nicola, T., Durand, D., "Structure and kinetics of aggregating  $\kappa$ -caragenan studied by light scattering", *Macromolecules*, 33:2497-2504 (2000).



52. Svehla, G., Vogel's Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis", *Longman*, London, ISBN0-582-44367-9 (1979).
53. Tapia, C., Escobar, Z., Costa, E., "Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57:65–75 (2004).
54. Demirel, G., Özçetin, G., Şahin, F., Tümtürk, H., Aksoy, S., Hasırcı, N., "Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase", *Reactive & Functional Polymer*, In press, (2005).
55. Marzadori, C., Miletti, S., Gessa, C., Ciurli, S., "Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: urease immobilization in alkaline soils", *Soil Biol. Biochem.*, 30:1485-1490 (1998).
56. Reddy, K., Kayastha, A., "Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use", *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 38: 104-112 (2006) .

## ÖZGEÇMİŞ

Filiz KARA 1979 yılında Ankara da doğdu. İlköğrenimini Yeşilöz İlkokulunda, ortaöğrenimini Mehmet Akif Ortaokulunda tamamladı. Lise öğrenimini ise Ankara Aydınlıkçevler Lisesinde (Yabancı Dil Ağırlıklı) tamamladı ve 1997 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2002 yılında mezun oldu ve aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Evli ve bir çocuk annesi.