

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN ÜREAZ ENZİMİNİN  
İMMOBİLİZASYONU VE ÜRE TAYİNİNDE VE HİDROLİZİNDE  
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**AYLİN TÜRKSEVER TETİKER**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Figen ERTAN**

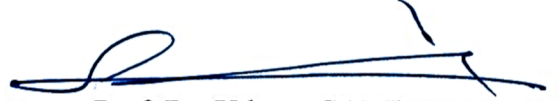
**EDİRNE-2016**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Figen ERTAN  
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ



Prof. Dr. Aysun ERGENE



Prof. Dr. Elif DEMİRKAN



Prof. Dr. Hülya YAĞAR



Prof. Dr. Figen ERTAN



Tarih: 01/04/2016

**T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

01/04/2016

Aylin TÜRKSEVER TETİKER



Doktora Tezi

Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Üreaz Enziminin İmmobilizasyonu Ve Üre Tayininde Ve Hidrolizinde Uygulanabilirliğinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

Bu tez çalışmasında üç farklı kaynaktan izole edilen üreaz enzimi aljinata immobilize edilerek hayvan yemlerinde üre tayininde kullanıldı. Kaynak olarak yüksek üreaz aktivitesinde sahip bitki, fungus ve bakteri türleri kullanıldı. Üreaz aktivitesi Nessler metoduna göre ölçüldü. Bitki kaynağı, bir nohut çeşidi olan *Cicer arietinum*, fungus kaynağı *Aspergillus fumigatus*, bakteri kaynağı ise *Proteus mirabilis* olarak belirlendi.

Bitki, fungus ve bakteri kaynaklarının her üçü için de süre, sıcaklık, termal kararlılık, optimum pH, pH kararlılığı, substrat konsantrasyonu, yüklenen enzim miktarı, aljinat konsantrasyonu, tekrar kullanılabilirlik, depo kararlılığı gibi çeşitli parametreler araştırılarak bu bulgular serbest enzim ile karşılaştırıldı. Protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İmmobilize üreaz enzimleri içeriği farklı olan hayvan yemlerinde üre tayininde kullanıldı.

*Cicer arietinum* üreazı ile yapılan çalışmalarda immobilizasyon verimi % 88.5 olarak belirlendi. Optimum süre 40 dakika, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin her iki enzim formu için de benzer olduğu, immobilizasyonun enzimin sıcaklık ve pH istemini değiştirmedeği gözlemlendi. Optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve 7.0 olarak bulundu. İmmobilizasyonun enzimin termal ve pH kararlılığını iyi yönde etkilediği saptandı. Optimum immobilizasyon koşullarında hazırlanan boncuklar 5 tekrar kullanım sonunda ilk aktivitelerinin yaklaşık % 60'ını korudu. Depolama kararlılığı çalışması sonucunda serbest enzim 4. günde aktivitesinin tamamına yakını kaybederken immobilize enzimin aktivitesinin % 88'ini korudu. Serbest ve immobilize üreazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.42 mM ile 5 U mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> ve 1.33 mM ile 10 U mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> olarak bulundu.

*Aspergillus fumigatus* ile yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda immobilizasyon veriminin % 82.5 olduğu bulundu. Optimum süre 30 dakika, optimum sıcaklık 40 °C, optimum pH 7.0 olarak bulundu. Fungus üreazı immobilizasyon sonrasında termal ve pH kararlılığını serbest enzime göre daha iyi korudu. Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında immobilize üreazın 5 döngü sonunda aktivitesinin % 44'ünü koruduğu gözlemlendi. Depo kararlılığı çalışmasında serbest enzim 7. günün sonunda aktivitesinin sadece % 18'ini korurken immobilize enzim % 66'sını korudu. Serbest üreaz ve aljinat boncuklarda tutuklanan üreazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri sırasıyla 1 mM ile 8.33 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> ve 0.44 mM ile 4.16 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> olarak bulundu.

*Proteus mirabilis* ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının sonucunda immobilizasyon verimi % 85 olarak hesaplandı. Optimum pH her iki enzim formu için 7.0 olarak bulundu. pH 7.0 ve 8.0'de serbest ve immobilize üreaz benzer şekilde kararlılıklarını korudular. Optimum sıcaklık serbest ve immobilize üreazlar için 40 °C olarak belirlendi. İmmobilize enzimin termal stabilitesi serbest enzime göre daha iyi bulundu. Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, immobilize enzimin 12 kullanım sonunda aktivitesinin % 55'ini hala koruduğu bulundu. Serbest enzimin depolama kararlılığı çalışmasında 10. günde aktivitesinin tamamına yakını kaybederken immobilize üreaz ise % 53'ünü koruduğu gözlemlendi. Serbest ve immobilize enzimlerin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 2 mM, 40 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> ve 0.4 mM, 35 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> olarak hesaplandı.

Hayvan yemlerinde üre miktarını belirlemek amacıyla içeriği bilinen yemlerde immobilize bitki, fungus ve bakteri üreazları ile üre tayini yapılarak bulgular karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda immobilize üreazlar ile hayvan yemlerinde üre tayin edilebileceği sonucuna varıldı. Son olarak immobilize üreazların üre hidrolizinde kullanılabilirliği araştırıldı.

Yıl : 2016

Sayfa Sayısı : 111

Anahtar Kelimeler : İmmobilizasyon, üreaz, aljinat, üre tayini, *Cicer arietinum*, *Aspergillus fumigatus*, *Proteus mirabilis*.

Doctoral Thesis

Immobilization of urease enzyme from different sources and investigation of usability in determination and hydrolysis of urea

Trakya University Institute of Natural Sciences  
Biology Department

## ABSTRACT

In this study, urease enzyme was isolated from three different sources and immobilized in calcium alginate beads for determination of urea amounts in animal feeds. As a source, plants, fungal, and bacterial species with high urease activity were used. Urease activity was measured by the Nessler's method. *Cicer arietinum* was determined as a source of plant, *Aspergillus fumigatus* was determined as a source of fungi and *Proteus mirabilis* was determined as a source of bacteria.

Plant, fungi and bacteria sources for various parameters, such as effect of thermal stability, temperature, optimum pH and pH stability, substrate concentration, reuse and storage stability were investigated and the results of the investigation were compared with the soluble enzyme. Protein determination was performed using the Bradford method. Immobilized urease enzyme was tested for the determination of urea amounts in various animal feeds.

In studies with *Cicer arietinum* urease; the activity yield of immobilization was calculated as 88.5 %. Optimum temperature and pH were found to be similar for both soluble and immobilized enzymes. It was observed that immobilization did not change pH and temperature prompt of the enzyme. pH and optimum temperature were found to be 7.0 and 50°C respectively. Improved thermal and pH stability of urease were achieved by immobilization. The  $K_m$  value for immobilized urease was found to be higher than that of the free enzyme. Immobilization of beads at optimum conditions enabled up to 5 repeated use of enzyme and maintained 58 % of their initial activity. In storage stability assays, almost all of the activity of the free enzyme lost at fourth day. It is observed that the immobilized enzyme retained 88 % of its activity after fourth days. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated from Lineweaver-Burk plot as 0.42 mM ile 5

U mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> and 1.33 mM ile 10 U mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> for free and immobilized enzyme, respectively.

According to results of the optimization study with *Aspergillus fumigatus*. The immobilization efficiency was calculated as 82.5 %. Optimum incubation time, optimum temperature and optimum pH were determined 30 min, 40°C and pH 7.0 for both enzymes. It was found that thermal stability and pH stability of immobilized enzyme was better than that of the free enzyme. In reusability study, immobilized enzyme maintained 44 % of its initial activity after 5 repeated use of enzyme. In storage stability study, free enzyme retained 18 % of its initial activity within 7 days. Immobilized enzyme conserved 66 % of its initial activity for 7 days. Free and immobilized enzyme K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values were calculated to be 1.0 mM , 8.33 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> and 0.44 mM ile 4.16 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup>, respectively.

According to results of the optimization study with *Proteus mirabilis*. Immobilization yield was calculated as 85 %. Optimum pH for free and immobilized urease was found to be 7.0. Immobilized and free urease enzymes protected their stability at pH 7.0 and 8.0 in a similar way. Optimum temperature was found to be 40 °C for free and immobilized urease. Thermal stability of the immobilized urease enzyme was significantly better than the free enzyme. In reusability assays, immobilized enzyme maintained 55 % of its initial activity after 12 repeated use of enzyme. In storage stability study, almost all of the activity of the free enzyme lost at tenth day . It is observed that the immobilized enzyme retained 53 % of its activity after tenth days. Free and immobilized enzyme K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values were calculated to be 2 mM, 40 U/ mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> and 0.4 mM, 35 U/mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup>, respectively.

In order to determine of the amount of urea in different animal feed known of the content urea determination assays were carried out using immobilized ureases and results were compared. In this study showed that immobilized urease allowed measurement of the urea levels in the animal feeds. Finally, the availability of immobilized urease for hydrolyzes urea were evaluated.

Year : 2016

Number of Pages : 111

Keywords : Immobilization, urease, alginate, entrapment, urea assay, *Cicer arietinum*, *Aspergillus fumigatus*, *Proteus mirabilis*.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimiyle her zaman yanımda olan değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Figen ERTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Trakya Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a, Sayın Doç. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR'e, sonikasyon işlemi için sonikatör cihazının kullanılmasındaki yardımlarından dolayı, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları A.B.D Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Figen KULOĞLU'na, Bacillus ve fungus türlerinin teminindeki yardımları için Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Elif Demirkan'a ve Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e, hayvan yemleri ve bitki tohumlarının teminindeki yardımlarından dolayı Sayın Mehmet Akif İNCEOĞLU'na, bitki tohumlarının teminindeki yardımlarından dolayı Edirne Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne, Edirne'deki dostlukları ve bilimsel destekleri için Sayın Araş. Gör. Gamze ALTINTAŞ ve Sayın Bilim Uzm. Burçak TUNÇAKIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin her aşamasında uzakta olmasına rağmen kendini yanımda hissettirerek yardımlarını esirgemeyen ağabeyim Dr. Cengiz TÜRKSEVER'e, sabrı ve manevi desteği için değerli eşim Gökhan TETİKER'e, beni bugünlere getiren her zaman yanımda olan canım anneme, babama ve kardeşim Aycan TÜRKSEVER'e teşekkürü borç bilirim

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) biriminin mali desteğiyle gerçekleştirilmiştir (TÜBAP- 2013/147).

Edirne, 2016

Aylin TÜRKSEVER TETİKER



# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimlerin Önemi ve Sınıflandırılması.....	3
2.1.1. Enzimlerin Özellikleri.....	4
2.1.1.1 Aktif Bölgeler.....	4
2.1.1.2. Katalitik Etkinlik.....	6
2.1.1.3. Kofaktörler ve Koenzimler.....	7
2.1.1.4. Enzim İnhibisyonu.....	8
2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	10
2.2.1. Sıcaklık.....	10
2.2.2. Zaman.....	10
2.2.3. pH.....	11
2.2.4. Enzim Konsantrasyonu.....	12
2.2.5. Substrat Konsantrasyonu.....	13

2.2.6. Diğer Faktörler.....	13
2.3. Enzim Kinetiği.....	13
2.3.1. Michaelis Menten Denklemi.....	14
2.3.2. Lineweaver-Burk Grafiği.....	15
2.4. Üreaz Enzimi ve Özellikleri.....	15
2.4.1. Üreaz Enziminin Moleküler Yapısı.....	16
2.4.2. Üreaz Katalizi ve Aktivitesinde Nikel İyonlarının Önemi.....	17
2.5. <i>Cicer arietinum</i> ve Bitkisel Üreazlar.....	18
2.6. <i>Proteus mirabilis</i> ve Bakteriyal Üreazlar.....	19
2.7. <i>Aspergillus fumigatus</i> ve Fungal Üreazlar.....	20
2.8. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları.....	22
2.8.1. Üre Konsantrasyonu Tayini.....	22
2.8.2. Böbreklerden Ürenin Uzaklaştırılması.....	22
2.8.3. Alkollü İçeceklerden Ürenin Uzaklaştırılması.....	23
2.8.4. Ağır Metal İyonları Analizi.....	23
2.8.5. Arginin Analizi.....	23
2.8.6. İmmunoglobulin G Ölçümleri.....	24
2.9. Üreaz Enziminin Substratı Olarak Üre.....	24
2.10. Üre Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.....	25
2.11. Üre Sentezi.....	26
2.12. Üre Siklusu Defektleri.....	28
2.13. Hayvancılıkta Yemlerin Önemi ve Rasyon Hazırlama.....	29
2.14. Ruminantlarda Azot Metabolizması.....	32
2.15. Ruminantların Beslenmesinde Ürenin Önemi.....	33
2.15.1. Ürenin Toksik Etkisi.....	35

2.16. Enzim İmmobilizasyonu.....	35
2.17. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar.....	36
2.18. İmmobilize Enzimlerin Özellikleri.....	37
2.19. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	37
2.19.1. Bağlama Yöntemleri.....	38
2.19.1.1 Taşıyıcıya Bağlama.....	38
2.19.1.2 Kovalent Bağlama.....	38
2.19.1.3. İyonik Bağlama.....	39
2.19.1.4. Adsorpsiyon.....	39
2.19.1.5. Çapraz Bağlama.....	39
2.19.2. Tutuklama Yöntemleri.....	40
2.19.2.1. Polimerde Tutuklama.....	40
2.19.2.2. Jelde Tutuklama.....	40
2.19.2.3. Mikrokapsülleme.....	40
2.20. İmmobilizasyon İçin Taşıyıcı Seçimi.....	41
2.20.1. Doğal Bir Taşıyıcı Olarak Aljinat.....	41
2.20.2. Kitosan.....	43
2.20.3. Karragenan.....	43
2.20.4. Selit.....	44
<b>BÖLÜM 3: MATERYAL ve METOD.....</b>	<b>46</b>
3.1. Materyaller.....	46
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	46
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....	46
3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler.....	47

3.1.4. Üreaz Kaynaklarının Temini.....	48
3.2. Metod.....	48
3.2.1. Bitkisel Kaynaklı Üreaz İzolasyonu .....	48
3.2.2. Fungus İçin Kullanılan Besiyeri.....	48
3.2.3. Fungal Üreaz Üretim Ortamının Hazırlanması.....	49
3.2.4. Üreaz Üretim Ortamlarına Fungus Sporlarının Ekilmesi.....	49
3.2.5. Fungal Enzim İzolasyonu.....	49
3.2.6. Bakteriyel Üreaz Üretim Ortamlarının Hazırlanışı ve Üretimi.....	50
3.2.7. Bakteriyel Üreaz İzolasyonu.....	50
3.2.8. Üreaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	51
3.2.9. Bradford Metodu ile Kantitatif Protein Tayini.....	52
3.2.10. Enzim İmmobilizasyonu.....	52
3.2.11. Üreaz Enzimlerinin Aljinata İmmobilizasyonu.....	53
3.2.11.1. Üreaz Enzimlerinin Kitosana İmmobilizasyonu.....	53
3.2.11.2. Üreaz Enzimlerinin Selite İmmobilizasyonu.....	53
3.2.12. Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu.....	54
3.2.12.1. Aljinat Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi.....	54
3.2.12.2. Yüklenen Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi.....	54
3.2.12.3. İnkübasyon Süresinin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	54
3.2.12.4. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	55
3.2.12.5. pH Kararlılık Çalışması.....	55
3.2.12.6. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	55
3.2.12.7. Termal Kararlılık Çalışması.....	55
3.2.12.8. Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	56

3.2.13. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği.....	56
3.2.14. Depo kararlılığı.....	56
3.2.15. Hayvan Yemlerinde Üre Tayini.....	56
3.2.16. Üre Hidrolizi.....	58
BÖLÜM 4: SONUÇLAR.....	59
4.1. Uygun Üreaz Kaynağı Belirleme Çalışmaları.....	60
4.2. Uygun İmmobilizasyon Yöntemi Belirleme Çalışmaları.....	60
4.3. Protein Miktar Tayini.....	61
4.4. Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu.....	62
4.4.1. Aljinat Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi.....	62
4.4.2. Yüklenen Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi.....	64
4.4.3. İnkübasyon Süresinin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	66
4.4.4. pH'ın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	68
4.4.5. pH Kararlılığı.....	70
4.4.6. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	72
4.4.7. Termal Kararlılık Çalışmaları.....	74
4.4.8. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi .....	78
4.4.9. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği.....	80
4.4.10. İmmobilize ve Serbest Üreaz Enziminin Depo Kararlılığı.....	82
4.5. İmmobilize Üreazlar İle Hayvan Yemlerinde Üre Tayini.....	85
4.6. İmmobilize Üreazlar İle Üre Hidrolizi.....	86
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	88
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	111

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

**Tris** : Tris (hidroksimetil) aminometan

**K<sub>m</sub>** : Michaelis Menten sabiti

**V<sub>max</sub>** : Maksimum hız

**k<sub>cat</sub>** : Turnover sayısı

**PDA** : Potato dextrose agar

**EC** : Enzim Komisyonu

**NPN** : Protein olmayan azot

**BSA** : Sığır Serum Albümini

**[S]** : Substrat konsantrasyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Anahtar Kilit Modeli.....	5
Şekil 2.2. Uyarılmış Uygunluk Modeli .....	6
Şekil 2.3. Katalizör Varlığında ve Yokluğunda Aktivasyon Enerjisi.....	7
Şekil 2.4. Koenzim, Kofaktör, Apoenzim ve Holoenzim Yapısı.....	8
Şekil 2.5. Kompetitif, Nonkompetitif, Unkompetitif İnhibisyon Mekanizmaları.....	9
Şekil 2.6. Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi.....	10
Şekil 2.7. Zamanın Reaksiyon Hızına Etkisi.....	11
Şekil 2.8. pH'ın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	12
Şekil 2.9. Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi.....	12
Şekil 2.10. Substrat Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi.....	13
Şekil 2.11. Lineweaver-Burk Grafiği.....	15
Şekil 2.12. Üreaz Reaksiyonu.....	16
Şekil 2.13. Üreaz Enzimin Üç Boyutlu Yapısı.....	17
Şekil 2.14a. <i>Cicer arietinum</i> Çiçek.....	19
Şekil 2.14b. <i>Cicer arietinum</i> Tohum.....	19
Şekil 2.15. <i>Proteus mirabilis</i> .....	20
Şekil 2.16. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	21
Şekil 2.17. Üre Döngüsü.....	27
Şekil 2.18. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	38
Şekil 2.19. Aljinat Polimerinin Yapısı.....	42

Şekil 2.20. Yumurta Kutu Modeli.....	42
Şekil 2.21. Kitin ve Kitosanın Yapısı.....	43
Şekil 2.22. Kappa, İota ve Lambda Karragenan.....	44
Şekil 4.1. Bradford Yöntemine Göre Protein Standart Grafiği.....	61
Şekil 4.2a. <i>Cicer arietinum</i> Üreaz Aktivitesine Aljinat Konsantrasyonunun Etkisi.....	62
Şekil 4.2b. <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreaz Aktivitesine Aljinat Konsantrasyonunun Etkisi.....	63
Şekil 4.2c. <i>Proteus mirabilis</i> Üreaz Aktivitesine Aljinat Konsantrasyonunun Etkisi....	63
Şekil 4.2d. Aljinat (%3) İle Elde Edilen Boncuklar.....	64
Şekil 4.3a. <i>Cicer arietinum</i> Üreaz Aktivitesine Yüklenen Enzim miktarının Etkisi....	64
Şekil 4.3b. <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreaz Aktivitesine Yüklenen Enzim Miktarının Etkisi.....	65
Şekil 4.3c. <i>Proteus mirabilis</i> Üreaz Aktivitesine Yüklenen Enzim Miktarının Etkisi....	65
Şekil 4.4a. <i>Cicer arietinum</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının Optimum İnkübasyon Süreleri.....	66
Şekil 4.4b. <i>Aspergillus fumigatus</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının Optimum İnkübasyon Süreleri.....	67
Şekil 4.4c. <i>Proteus mirabilis</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının Optimum İnkübasyon Süreleri.....	67
Şekil 4.5a. Serbest ve İmmobilize <i>Cicer arietinum</i> Üreazlarının pH'a Bağlı Aktivite Değişimleri.....	68
Şekil 4.5b. Serbest ve İmmobilize <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreazlarının pH'a Bağlı Aktivite Değişimleri.....	69



<b>Şekil 4.5c.</b> Serbest ve İmmobilize <i>Proteus mirabilis</i> Üreazlarının pH'a Bağlı Aktivite Değişimleri.....	69
<b>Şekil 4.6a.</b> <i>Cicer arietinum</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının pH Kararlılıkları.....	70
<b>Şekil 4.6b.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının pH Kararlılıkları.....	71
<b>Şekil 4.6c.</b> <i>Proteus mirabilis</i> Serbest ve İmmobilize Üreazlarının pH Kararlılıkları.....	71
<b>Şekil 4.7a.</b> Serbest ve İmmobilize <i>Cicer arietinum</i> Üreazlarının Sıcaklığa Bağlı Aktivite Değişimleri.....	72
<b>Şekil 4.7b.</b> Serbest ve İmmobilize <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreazlarının Sıcaklığa Bağlı Aktivite Değişimleri.....	73
<b>Şekil 4.7c.</b> Serbest ve İmmobilize <i>Proteus mirabilis</i> Üreazlarının Sıcaklığa Bağlı Aktivite Değişimleri.....	73
<b>Şekil 4.8a.</b> <i>Cicer arietinum</i> Serbest Enzim Termal Stabilite.....	75
<b>Şekil 4.8b.</b> <i>Cicer arietinum</i> İmmobilize Enzim Termal Stabilite.....	75
<b>Şekil 4.8c.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> Serbest Enzim Termal Stabilite.....	76
<b>Şekil 4.8d.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> İmmobilize Enzim Termal Kararlılığı.....	76
<b>Şekil 4.8e.</b> <i>Proteus mirabilis</i> Serbest Enzimin Termal Kararlılığı.....	77
<b>Şekil 4.8f.</b> <i>Proteus mirabilis</i> İmmobilize Enzimin Termal Kararlılığı.....	77
<b>Şekil 4.9a.</b> <i>Cicer arietinum</i> Serbest ve İmmobilize Üreaz Enzimlerinin Lineweaver-Burk Grafiği.....	78
<b>Şekil 4.9b.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> Serbest ve İmmobilize Üreaz Enzimlerinin Lineweaver-Burk Grafiği.....	79

<b>Şekil 4.9c.</b> <i>Proteus mirabilis</i> Serbest ve İmmobilize Üreaz Enzimlerinin Lineweaver-Burk Grafiği.....	79
<b>Şekil 4.10a.</b> Aljinat Boncuklara İmmobilize Edilen <i>Cicer arietinum</i> Üreazının Tekrar Kullanılabilirliği.....	81
<b>Şekil 4.10b.</b> Aljinat Boncuklara İmmobilize Edilen <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreazının Tekrar Kullanılabilirliği.....	81
<b>Şekil 4.10c.</b> Aljinat Boncuklara İmmobilize Edilen <i>Proteus mirabilis</i> Üreazının Tekrar Kullanılabilirliği.....	82
<b>Şekil 4.11a.</b> <i>Cicer arietinum</i> Üreazı İçin Depo Kararlılığı.....	83
<b>Şekil 4.11b.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreazı İçin Depo Kararlılığı.....	84
<b>Şekil 4.11c.</b> <i>Proteus mirabilis</i> Üreazı İçin Depo Kararlılığı.....	84

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Üre Siklusunda Genetik Defektler.....	29
<b>Tablo 3.1.</b> Kör, Kontrol ve Örnek Tüplerinin Hazırlanması.....	51
<b>Tablo 3.2.</b> Üre Tayini Tablosu.....	57
<b>Tablo 3.3.</b> Hayvan Yemlerinin İçerikleri.....	57
<b>Tablo 4.1a.</b> Taranan Bitki Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri.....	59
<b>Tablo 4.1b.</b> Taranan Fungus Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri.....	60
<b>Tablo 4.1c.</b> Taranan Bakteri Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri.....	60
<b>Tablo 4.2.</b> Enzim İmmobilizasyon Verimleri.....	61
<b>Tablo 4.3.</b> Enzim Örneklerinin Kinetik Özellikleri.....	80
<b>Tablo 4.4a.</b> <i>Cicer arietinum</i> Üreazı ile Üre Tayini.....	85
<b>Tablo 4.4b.</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> Üreazı ile Üre Tayini.....	86
<b>Tablo 4.4c.</b> <i>Proteus mirabilis</i> Üreazı ile Üre Tayini.....	86
<b>Tablo 4.5.</b> İmmobilize Üreazlar ile Üre Hidrolizi.....	87

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir ve katalizledikleri reaksiyonun hızını  $10^3$ - $10^{17}$  defa hızlandırmaktadırlar. Son yıllarda enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel kullanımlarının yaygınlaşması nedeniyle bilim adamları enzimleri daha kullanışlı hale getirme yönünde çalışmalar yapmaktadırlar [1].

Bilindiği üzere enzimler suda çözünen ve substratlarına özgü katalizörlerdir. Sulu ortamda gerçekleştirilen endüstriyel çalışmalarda serbest enzimlerin aktivitelerini yitirmeden geri kazanılması mümkün değildir. Ayrıca serbest enzimlerin aktivitelerini kaybetmeden reaksiyon ortamından uzaklaştırılması olanaksız olduğundan, enzimlerin tekrar kullanılabilmesi söz konusu değildir. Bunun sonucunda enzim çalışmalarının maliyeti oldukça yükselmektedir. Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine uygulanamazlar. Bütün bu problemleri çözebilmek ve enzimleri endüstriyel alanda daha kullanışlı ve çekici hale getirebilmek için son yıllarda enzim immobilizasyonu çalışmaları hız kazanmıştır [2, 3, 4].

İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre sıcaklık ve pH değişimlerinde yüksek katalitik aktivite gösterirler ve kararlılıklarını korurlar. Ayrıca reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılmaları sayesinde tekrar tekrar kullanılabilirler ve böylece reaksiyon ortamındaki kirliliği azaltmasında önemli rol oynarlar [5, 6].

İmmobilizasyon için pek çok yöntem mevcuttur, bu yöntemler arasında kalsiyum aljinat jelde tutuklama yöntemi biyoyumluluğu, toksik olmaması, ılımlı koşullar altında immobilizasyonun gerçekleşerek enzime zarar vermemesi ve ucuz bir yöntem olması yönüyle pek çok avantaja sahiptir. Aljinatın enzim tutuklamasında kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur [7, 8, 9, 10, 11, 12].

Üreaz (Üre amidohidrolaz; E.C. 3.5.1.5.) hidrolazlar sınıfına giren üreyi amonyak ve karbondioksit hidroliz eden nikel bağlı bir metalloenzimdir [13]. Üreaz enzimi bitkiler, bakteriler ve funguslarda bulunmaktadır [14]. Üreazın en önemli görevi organizmanın azot kaynağı olarak üreyi kullanmasını sağlamaktır. Bitkisel üreazlar azot metabolizmasında rol alır ve savunma proteini olarak görev yaparlar. Buna ek olarak bitkisel üreazların antifungal ve insektisidal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalara dayanarak üreaz enziminin, predatörlere ve fitopatojenlere karşı bitkiyi koruyan bir savunma aracı olduğu düşünülebilir [15]. Üreaz pozitif bakteriler ve funguslar insan ve hayvan hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynar. Ör: *H. pylori*, *Y. enterocolitica*, *C. neoformans* [16].

Biyoteknolojik çalışmalarda üreaz enzimine ilgi giderek artmaktadır. Biyolojik sıvılarda üre miktarının hesaplanması, diagnostik kitler olarak, kan üre tayininde biyosensör olarak, yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılması, gıda endüstrisinde üreyi, meyve suyu ve alkollü yiyecek ve içeceklerden uzaklaştırma, atık sulardan üre temizleme gibi çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip olması üreaz enziminin araştırmacıların ilgi odağı olmasının en önemli nedenleri arasındadır [17, 18, 19, 20].

Üreaz enziminin çeşitli taşıyıcılara immobilize edildiği çalışmalar mevcuttur [21, 22, 23]. Bu çalışmada *Cicer arietinum*, *Aspergillus fumigatus* ve *Proteus mirabilis*'den izole edilen üreaz enzimleri ilk kez sodyum aljinat jel boncuklar içine immobilize edildi. İmmobilize ve serbest enzimlerin çalışma koşulları optimize edildi ve birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu amaçla, enzimlerin süre, sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, pH kararlılığı, termal kararlılık, depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik gibi özellikleri araştırıldı. Ayrıca immobilize enzimlerin üre tayininde ve hidrolizinde kullanılabilirliği araştırıldı.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. Enzimlerin Önemi ve Sınıflandırılması

Canlılığın devam edebilmesi için gereken en önemli öğeler; canlının kendisini kopyalaması ve kimyasal reaksiyonları yüksek bir verimlilik ile biyolojik ortamda katalizleyebilmesidir. Yaşayan organizmalar bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için çevrelerindeki enerjiyi kullanırlar. Bir çok canlı yakıt maddesi olarak sukrozu kullanır. Normal şartlarda sukroz  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'ya parçalanmadan da depolanabilir. Oysa organizmaların sukrozu tüketmesiyle birlikte kimyasal enerji saniyeler içinde elde edilir. Bunun sebebi katalizörlerin varlığıdır. Katalizörler olmadığında kimyasal reaksiyonların gerçekleşme hızları yaşamsal olarak uygunluk göstermez. Biyolojik sistemlerde bulunan katalizörler 'enzim' olarak adlandırılan özelleşmiş polimer yapıda bileşiklerdir [24].

Enzimlerin varlığı ilk kez 18. yüzyılın sonlarında midede etin sindirilmesiyle ilgili araştırmalarla tanımlanmıştır. Daha sonra nişastanın tükürük ile parçalanması konusu ile devam etmiştir. 1926 yılında James Sumner'in üreaz enzimini ilk kez saf halde izole etmesi ve protein olduğunu göstermesi enzimlerle ilgili çalışmalara hız kazandırmıştır [25].

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları hızlandıran ve çoğunlukla protein yapılı özelleşmiş bileşiklerdir. Enzimatik kataliz yokluğunda reaksiyonlar o kadar yavaş ilerler ki yaşamsal koşullarda tepkimelerin gerçekleşmesi olanaksızdır. Hücrelerde binlerce farklı enzim bulunur ve bu enzimlerin etkinlikleri hücrede birçok reaksiyondan hangilerinin gerçekleşeceğini belirler.

Enzimler genellikle katalizlediği substratın sonuna -az eki getirilerek isimlendirilir. Örneğin, üreyi parçalayıp amonyak ve  $\text{CO}_2$ 'e hidrolize eden enzime üreaz denir. Fakat bu tanıma uymayan birçok enzim de mevcuttur (pepsin, tripsin). Yeni enzimlerin sürekli literatüre eklenmesiyle Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim

Komisyonu (ECIUB), enzimleri sistematik olarak sınıflandırmayı önerdi. Bu sisteme göre enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre altı sınıfa ve alt sınıflara ayrılmıştır [26].

- 1) Oksidoredüktazlar: yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler.  
Ör: Alkol dehidrojenaz
- 2) Transferazlar: Fonksiyonel grupları bir substrattan diğerine transfer ederler.  
Ör: Kreatin kinaz
- 3) Hidrolazlar: Molekül içi bağların su girişi ile koparılmasını sağlarlar.  
Ör: Asetilkolin esteraz
- 4) Liyazlar: Grupların nonhidrolitik veya nonoksidatif olarak ayrılması reaksiyonlarını katalizlerler.  
Ör: Pirüvat dekarboksilaz
- 5) İzomerazlar: Molekül içi değişikliklerle izomer oluşturma reaksiyonlarını katalizlerler. Ör: Trioz fosfat izomeraz
- 6) Ligazlar: ATP enerjisiyle iki substrat molekülünün bağlanmasını sağlarlar.  
Ör: Aminoasıl-tRNA sentetaz [1].

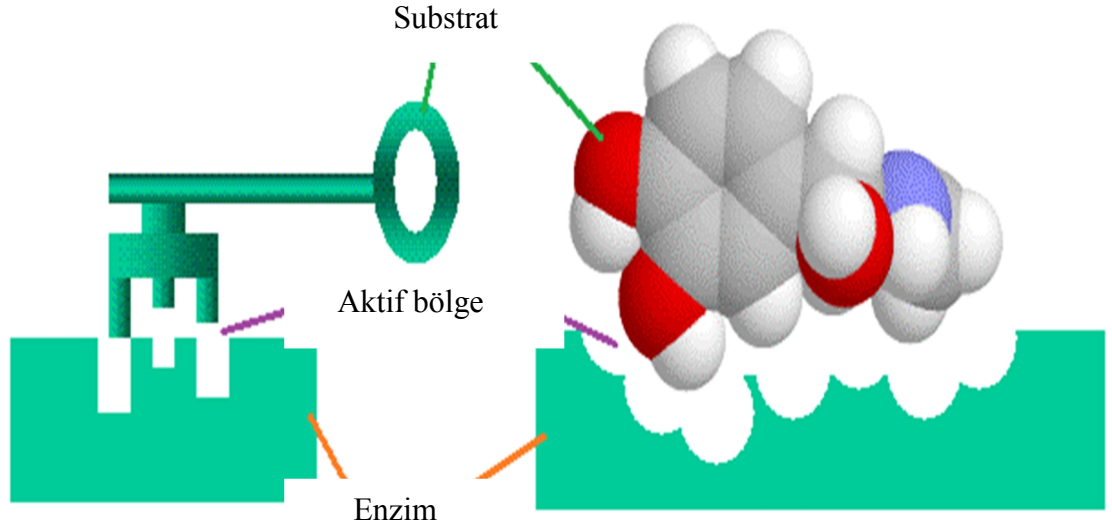
## **2.1.1. Enzimlerin Özellikleri**

### **2.1.1.1. Aktif Bölgeler**

Bir enzim molekülünde aktif bölge adı verilen özel bir cep veya yuva bulunur. Aktif bölgede en az bir aminoasidin özel bir görevi vardır. Ayrıca bu bölgede çeşitli kofaktör ve koenzimler de bulunmaktadır. Aktif bölge, substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksini meydana getirir. Enzim-substrat kompleksi daha sonra enzim ve ürüne dönüşür. Pek çok durumda substrat iyonik bağlar ve hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimlerle aktif bölgede tutulur. Aktif bölgede bulunan aminoasitlerin yan zincirleri substratın ürüne dönüşümünü kataliz eder ve sonrasında ürün bu bölgeden ayrılır. Enzim başka bir substratı kabul etmek için serbest kalır. Bu döngü çok hızlı gerçekleşir. Bir tek enzim saniyede binlerce substrat molekülünü etkileyebilir. Bir enzimin aktif bölgesi belirli bir tepkime türüne aracılık edecek bir mikroçevre oluşturur. Örneğin enzimin aktif bölgesi asidik yan zincirlere sahip aminoasitler içermektedirse, bu bölge düşük pH'a sahiptir ve bu sayede substrata H<sup>+</sup> aktarımı kolaylaşır [27]. Aktif bölgeye enzim-substrat bağlanmasını açıklayan iki model öne sürülmektedir.

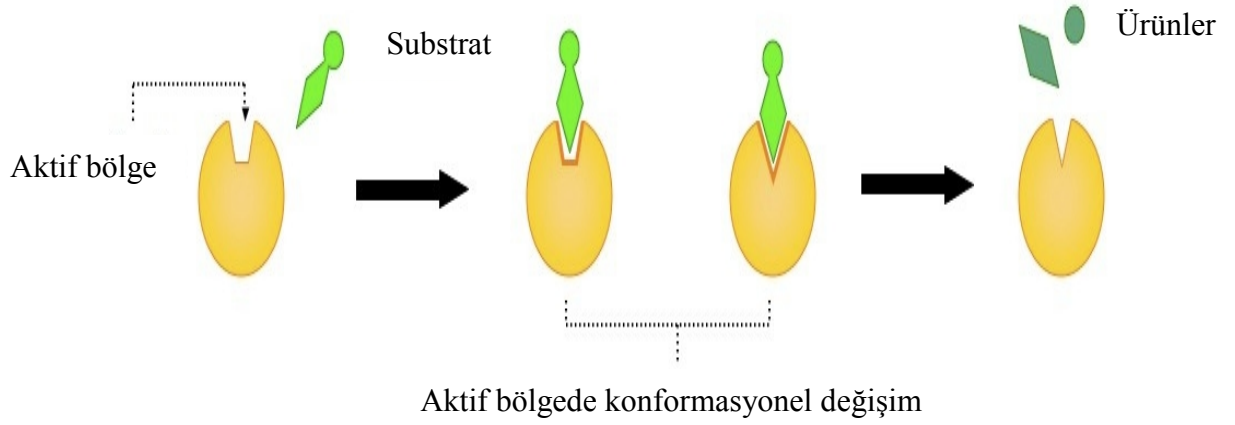
Anahtar-Kilit Modeli (Fischer modeli): Bu modelde substrat aktif yüzeye bir anahtarın kilide uyduğu gibi tam olarak bağlanır. Yani enzimin aktif merkezindeki bölge ile substrat birbirini tamamlar.

Uyarılmış Uygunluk Modeli (Koshland modeli): Bu modelde aktif merkez esnek yapıdadır. Enzimin tersiyer yapısında konformasyonel bir değişim meydana gelir ve aktif bölge substrat moleküllerinin bağlanması için uygun bir konuma gelir [28].



**Şekil 2.1.** Anahtar Kilit Modeli [29].

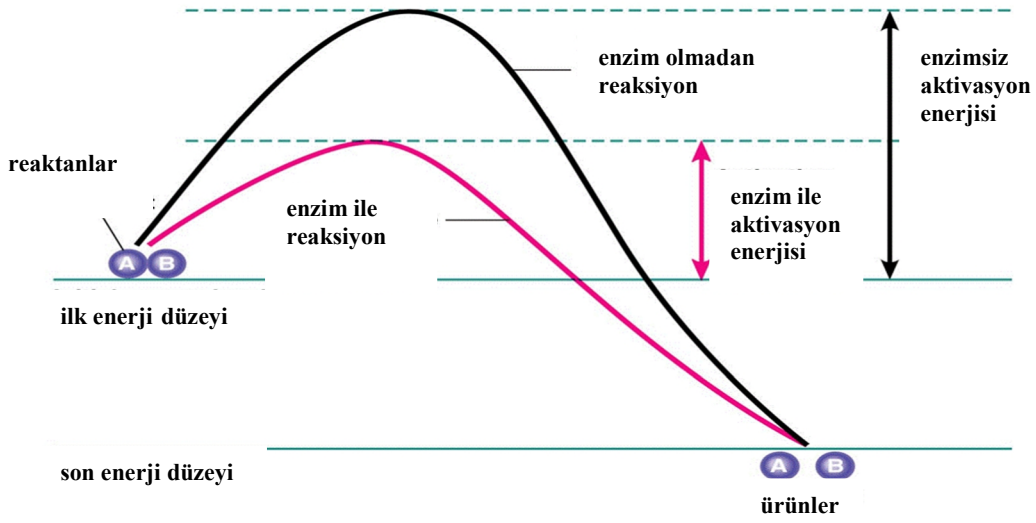




**Şekil 2.2.** Uyarılmış Uygunluk Modeli [30].

### 2.1.1.2. Katalitik Etkinlik

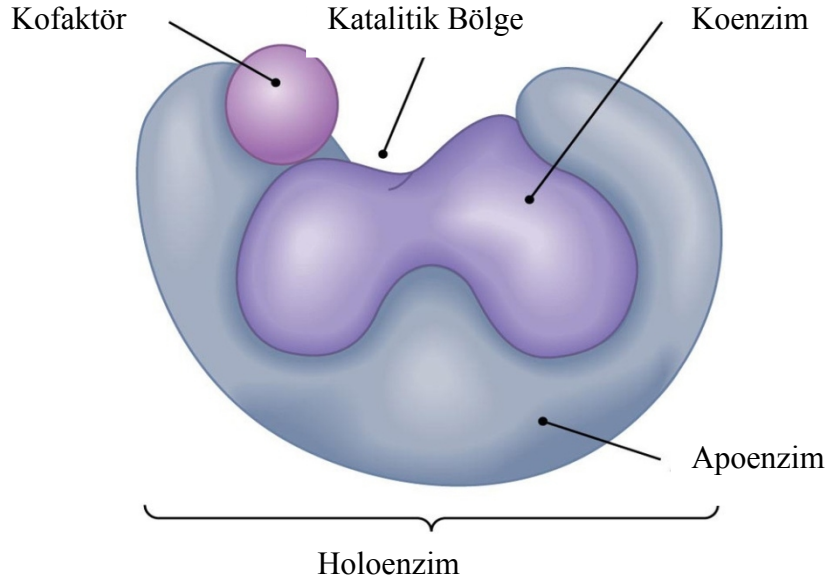
Enzimler kimyasal reaksiyonların hızını kendileri tüketilmeden ve kalıcı bir değişikliğe uğramadan arttırlar ve bu görevi reaktanlar ve ürünler arasındaki kimyasal dengeyi değiştirmeden yerine getirirler. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmeyenlere göre  $10^3$  ile  $10^{17}$  kez daha hızlı gerçekleşir. Her enzim molekülü saniyede 100-1000 substrat molekülünü ürüne dönüştürebilme özelliğine sahiptir. Katalizör yokluğunda reaksiyonun meydana gelebilmesi için yüksek aktivasyon enerjisine ihtiyaç vardır, enzim varlığında ise aktivasyon enerjisi düşer ve reaksiyon daha hızlı gerçekleşir [27].



**Şekil 2.3.** Katalizör varlığında ve yokluğunda aktivasyon enerjisi [31].

### 2.1.1.3. Kofaktörler ve Koenzimler

Bir enzimin aktivite gösterebilmesi gerekli olan, protein yapıda olmayan ve genellikle metal iyonlarından meydana gelen yan gruplara ‘kofaktör’ adı verilir. Örneğin DNA polimeraz enzimi kofaktör olarak  $Zn^{+2}$ ’ye ihtiyaç duyarken üreaz enzimi ise  $Ni^{+2}$ ’e gereksinim duymaktadır. Enzimlerin aktivitelerini gösterebilmeleri için gerekli olan kompleks organik moleküllere ‘koenzim’ adı verilir. Piruvat karboksilazın koenzimi biotin iken, glutamik oksaloasetik transaminaz enziminin koenzimi ise piridoksal fosfattır. Koenzimler fonksiyonel grupların ve spesifik atomların transfer edilmesinde rol oynamaktadırlar. Enzimler aktivite gösterebilmek için hem koenzime hem de kofaktöre gereksinim duyabilir. Kofaktör ve koenzim bazen enzime kovalent olarak bağlanabilir. Bu şekilde enzimin yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanmış protein yapıda olmayan bu gruplara ‘prostetik grup’ denir. Enzim kofaktörü ve koenzimi ile birlikte ve katalitik olarak tamamen aktif durumda ise enzimin bu yapısına ‘holoenzim’ denir. Eğer kofaktör ve koenzim enzimden ayrılarak enzim inaktif hale gelirse enzimin proteinden oluşan inaktif şekline ‘apoenzim’ adı verilir [1].



**Şekil 2.4.** Koenzim, Kofaktör, Apoenzim ve Holoenzim Yapısı [32].

#### 2.1.1.4. Enzim İnhibisyonu

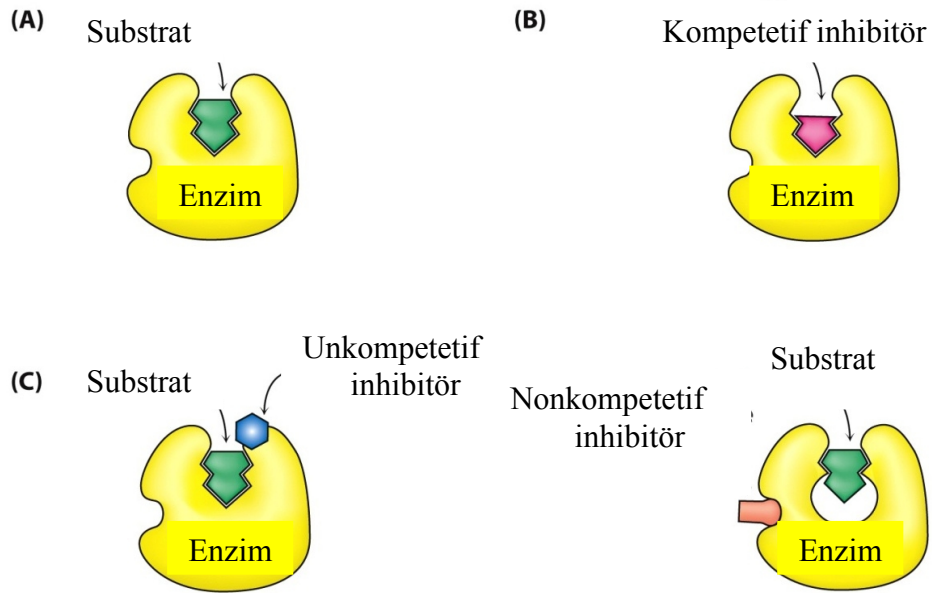
Enzim inhibitörleri enzimatik reaksiyonları yavaşlatarak veya durdurarak katalizleyen moleküler ajanlardır. Enzimler canlı hücrelerin çoğunda kimyasal tepkimeleri katalizler. Enzimler bu özelliklerinden dolayı bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasındadır. Örneğin, aspirin (asetilsalisilat) ağrı oluşumunda yer alan prostoglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder. Ayrıca enzim inhibisyonu çalışmaları enzim mekanizmaları hakkında ve bazı metabolik yolların tanımlanmasında katkı sağlamaktadır. Enzim inhibisyonu, geri dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz (irreversible) olarak iki şekilde meydana gelmektedir.

Geri dönüşümlü inhibisyon: Geri dönüşümlü inhibisyon yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) veya karışık (unkompetitif) şekilde olabilir. Yarışmalı inhibisyonda; yarışmalı inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat molekülüyle yarışır. İnhibitör aktif bölgeye bağlanarak substratın bağlanmasını engeller. Bu inhibisyon şeklinde, inhibitör enzime geri dönüşümlü olarak bağlandığı için ortama substrat ilave edilerek reaksiyon substrat lehine kaydırılabilir. Yarışmalı inhibisyon mekanizması metanol almış hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Karaciğerde bulunan alkol dehidrogenaz enzimi pek çok dokuya zarar vererek (körlük meydana gelebilir) metanolü formaldehite dönüştürür. Bu tip durumlarda hastaya alkol dehidrogenaz enziminin diğer substratı olan etanol verilmektedir. Etanol, metanol ile

etkin bir biçimde yarışarak formaldehit oluşumu yavaşlar ve böbreklerden metanol zararsız bir şekilde atılır [32].

Geri dönüşümlü inhibisyonun diğer tipleri olan yarışmasız inhibisyonda inhibitör enzime aktif merkezin dışında bir noktadan bağlanır. Yarışmasız inhibisyonda inhibitörler genellikle enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olurlar. Karışık inhibisyonda ise inhibitör enzim substrat kompleksine bağlanarak enzimi inhibe eder.

**Geri dönüşümsüz inhibisyon:** Bu grupta yer alan inhibitörler enzim ile birleşerek kararlı kovalent bir yapı meydana getirirler. Geri dönüşümsüz inhibitörlerin özel bir sınıfı intihar inaktivatörleridir. Bu bileşikler enzimin aktif bölgesine bağlanana kadar reaktif değildirler. Reaksiyon sonunda inhibitör ürüne dönüşmez ve enzime geri dönüşümsüz olarak bağlanarak reaktif bir bileşiğe dönüşür. İyi tasarlanan bir intihar inaktivatörü tek bir enzim için özgüdüdür ve enzimin aktif bölgesine ulaşana kadar reaktif değildir. Bu yaklaşım ilaç tasarımlarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca bu yaklaşım temel alınarak üretilen ilaçlar çok az yan etki üstünlüğüne sahip olabilir [28, 32].

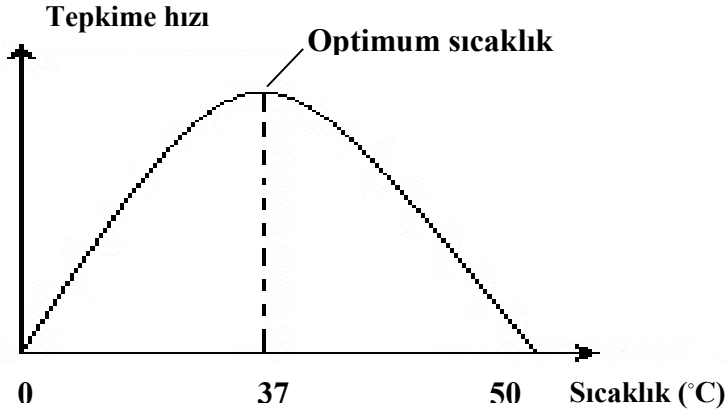


**Şekil 2.5.** Kompetitif, nonkompetitif, unkompetitif inhibisyon mekanizmaları [34].

## 2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

### 2.2.1. Sıcaklık

Bir enzimin en iyi çalıştığı (en yüksek aktivite gösterdiği) sıcaklığa ‘optimum sıcaklık’ denir. Bu sıcaklıkta tepkime hızı en üst düzeydedir. Enzimatik bir reaksiyonun hızı belirli bir düzeye kadar, yükselen sıcaklığa bağlı olarak artar. Bunun sebebi sıcaklık artışıyla birlikte moleküllerin hızlı hareket etmesinden dolayı substratın enzimin aktif bölgesiyle daha sık çarpışmasıdır. Ancak sıcaklık optimum sıcaklığın üzerine çıktığında tepkime hızı aniden düşer. Artan sıcaklıkla birlikte aktif konformasyonu kararlı halde tutan hidrojen bağları, iyonik bağlar ve diğer zayıf etkileşimler kırılarak enzim molekülü denatüre olur. Hayvansal enzimler optimum sıcaklığa 35-40 °C arasında ulaşırken bitkisel kaynaklı enzimlerin optimum sıcaklığı 50-60 °C arasındadır. Bu sıcaklıkların üzerinde enzimler hızlıca denatüre olduğundan dolayı enzim aktivitesi azalmaktadır. Çoğu enzim 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Ancak bazı termofilik bakterilerden izole edilen enzimler 85 °C'de bile aktivitelerini koruyabilmektedirler [35, 36].



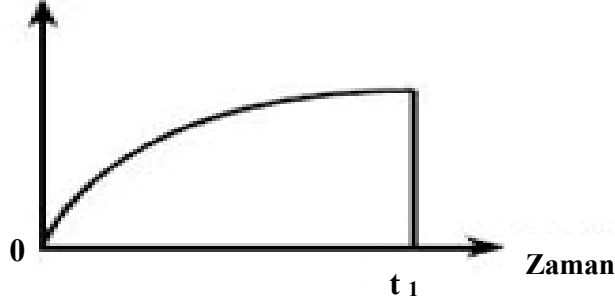
Şekil 2.6. Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi [37].

### 2.2.2. Zaman

Enzimatik reaksiyonların hızı belirli bir zamanda üretilen ürün miktarı ile belirlenmektedir. Bir ünite enzim; standart koşullarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarı olarak tanımlanır. Buradan yola çıkarak başlangıçta ortamdaki enzim ve substrat miktarına bağlı olarak ürün oluşumu artacaktır. Ancak

zamanla reaksiyon hızı ve ürün oluşumu azalır, çünkü reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin ortamda fazla birikmesi enzimi denatüre edebilir, enzim tarafından kullanılan substrat miktarı azalır veya tükenebilir. Ayrıca ürün birikimi ortam pH'ını değişmesine neden olarak optimum şartların bozulmasına yol açabilir [28].

### Reaksiyon hızı

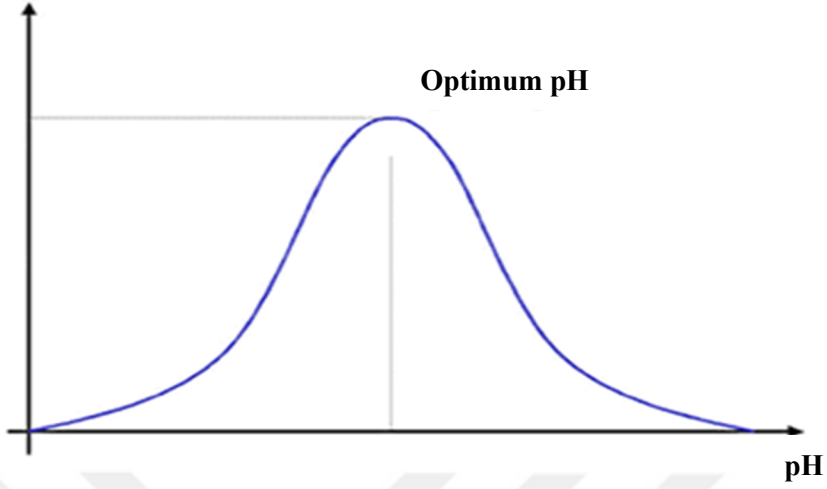


Şekil 2.7. Zamanın Reaksiyon Hızına Etkisi [38].

### 2.2.3. pH

Ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonu enzimatik reaksiyonların hızını etkiler. Bir enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerine o enzimin optimum pH'ı denir. Bu değerin üzerinde veya altındaki pH değerlerinde enzim aktivitesi azalır. Ekstrem pH değişimlerinde ise enzim inaktivasyonu ya da denatürasyonu meydana gelebilir. Bundan dolayı enzim çalışmalarında pH'ı sabit tutmak için tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Enzimlerin optimum pH değerleri birbirlerine göre farklılık gösterebilir. Birçok enzimin optimum pH'ı 6-8 arasında değişmektedir. Ancak midede bulunan pepsin enzimi birçok enzimin denatüre olabileceği pH 2.0'de en iyi çalışır. İnce bağırsakta bulunan sindirim enzimi tripsinin optimum pH'ı ise 8.0'dır [39].

## Reaksiyon hızı



Şekil 2.8. pH'in Enzim Aktivitesine Etkisi [40].

### 2.2.4. Enzim Konsantrasyonu

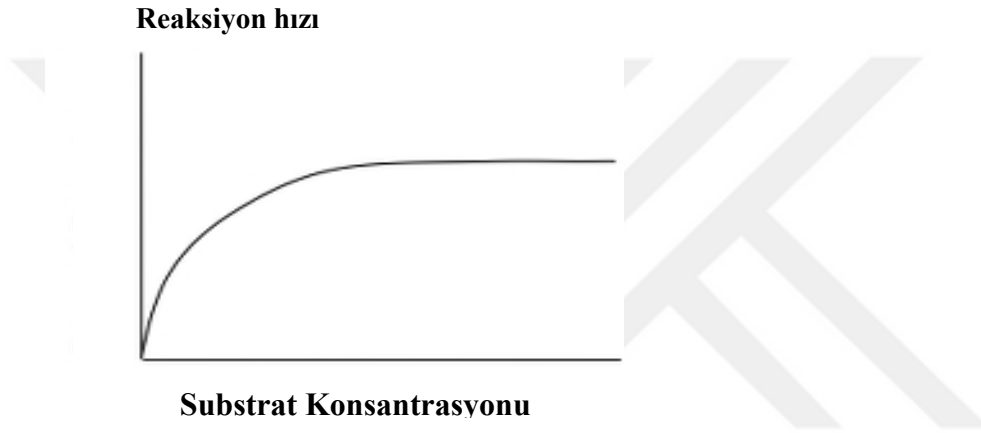
Enzimatik reaksiyonlarda eğer ortamdaki substrat miktarı fazla ise, reaksiyonun hızı enzim miktarı ile doğru orantılı olarak değişir. Ortamda ne kadar fazla çalışan enzim molekülü bulunursa reaksiyon da o derece hızlı yürüyebilir. Fakat enzimin lokalize olduğu bölgelerde substrat miktarı yetersiz ise, enzim miktarı yüksek olsa bile reaksiyon istenilen hızda meydana gelmez. Reaksiyon ortamında substratın yeterli miktarda bulunduğu koşullarda, reaksiyon hızı ile enzim konsantrasyonu linear bir şekilde artmaktadır [28].



Şekil 2.9. Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi [41].

### 2.2.5. Substrat Konsantrasyonu

Ortamdaki enzim konsantrasyonu ve diğer koşulların sabit kalması durumunda, substrat konsantrasyonu ve reaksiyon hızı arasındaki ilişki hiperbolik bir eğri oluşturur. Yani belli bir noktaya kadar reaksiyon hızı artar daha sonra substrat konsantrasyonu artsa bile hız değişmez. Başlangıçta artan substrat, enzim ile bağlanarak enzim-substrat kompleksini oluşturur. Maksimum kapasiteye ulaşıldığında enzimde substratı bağlayan bütün bölgeler dolu olduğundan, substrat eklense bile enzim-substrat kompleksi oluşturamayacağı için enzimatik tepkimenin hızı değişmemektedir [27].



Şekil 2.10. Substrat Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi [42].

### 2.2.6. Diğer Faktörler

Enzimatik reaksiyonların hızına pek çok faktör etki edebilir. Bunlar, reaksiyon sonunda oluşan ürünler, ortamda bulunan iyonların özellikleri ve konsantrasyonları, ışık, allosterik etki, hormonlar, biyokimyasal faktörler ve fiziksel faktörler olarak söylenebilir.

## 2.3. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızlarını ve bu hızları etkileyen faktörlerin sistematik çalışmasını inceleyen, ayrıca fiziksel ve kimyasal çevre farklılıklarında enzim fonksiyonundaki değişimleri inceleyen bir alandır. Enzim kinetiği enzimatik katalizin biyolojik öneminin miktar olarak ifade edilmesidir. Enzim kinetiği



hakkında elde edilen veriler bizlere metabolik olayların kontrolünde ve sürdürülmesinde önemli bilgiler verir.

Enzimler tarafından katalizlenen en basit reaksiyonlar tek bir substratın tek bir ürüne dönüştüğü reaksiyonlardır ve bu tip reaksiyonlara unimoleküler reaksiyonlar denir. Bu tip reaksiyonlarda enzim substrat kompleksinin oluştuğu ve geri reaksiyonların önemsiz olduğu şartlar aranır. Bu tip reaksiyonların hızı iki farklı yaklaşımla türetilmektedir. Bunlardan birincisi, hızlı denge yaklaşımı (Michaelis-Menten) diğeri ise sürekli hal yaklaşımıdır (Briggs-Haldane). Hızlı denge yaklaşımında enzim, substrat ve enzim substrat kompleksinin çok hızlı şekilde dengeye ulaştığı ve enzim substrat kompleksinin ürüne dönüşümünün daha yavaş olduğu kabul edilir. Herhangi bir andaki hız enzim substrat kompleksine bağlıdır ve toplam enzim ve enzim substrat kompleksi arasında dağılmıştır.

Sürekli hal yaklaşımında; eğer enzim substrat kompleksinin ürüne parçalanma hızı enzim ve substrata ayrışma hızından büyükse enzim, substrat ve enzim substrat kompleksi bir denge haline ulaşamaz. Fakat enzim katalitik miktarda kullanılmışsa, enzim ve substratın karıştırılmasından sonra, enzim substrat kompleksi konsantrasyonunun sabit kaldığı sürekli bir hale ulaşılır. Sürekli hal durumuna ulaşıldığında enzim substrat kompleksinin oluşum ve bozunma hızları birbirine eşit olur [1].

### 2.3.1. Michaelis Menten Denklemi

Michaelis-Menten denklemi reaksiyonun hızının substrat konsantrasyonuyla değişimini gösteren bir denklemdir.

$V_0$ : İlk hız

$V_{max}$ : Maksimum hız

$$V_0 = V_{max} [S] / K_m + [S]$$

$K_m$ : Michaelis sabiti

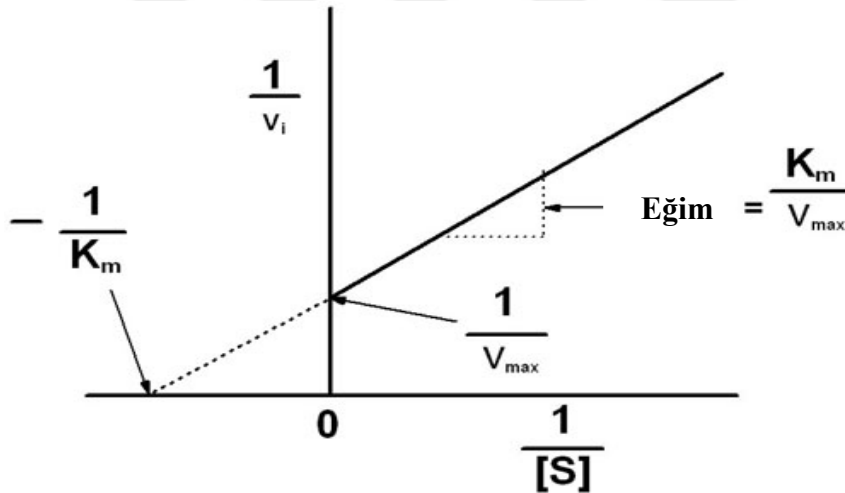
[S]: Substrat konsantrasyonu

Michaelis-Menten denklemine göre,  $K_m$  değeri belli bir enzime ve substrata özgüdür ve o enzimin substratına olan ilgisini gösterir.  $K_m$  değeri sayısal olarak reaksiyon hızının  $\frac{1}{2}V_{max}$ 'a eşit olduğu andaki substrat konsantrasyonudur.  $K_m$  değeri küçükse, enzimin substratına ilgisi yüksektir. Yani  $\frac{1}{2} V_{max}$  hızına erişmek için düşük konsantrasyonda substrat yeterli olmaktadır.  $K_m$  değeri yüksek ise enzimin substratına

İlgisi az demektir, çünkü enzimi yarı yarıya doyurmak için yüksek konsantrasyonda substrat gerekmektedir. Michaelis-Menten kinetiğine göre tüm substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Enzim konsantrasyonu yarıya indirildiğinde reaksiyonun hızı da yarıya düşmektedir [43].

### 2.3.2. Lineweaver-Burk Grafiği

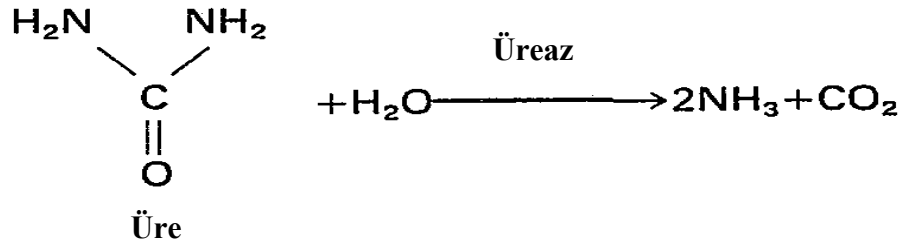
Substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızı grafikte gösterilecek olursa, hiperbolik eğri yüksek substrat konsantrasyonlarında yukarı doğru eğim gösterir ve  $V_{max}$ 'a erişim zamanını saptamak mümkün olmayabilir. Fakat  $1/V_0$  ve  $1/[S]$  olarak çizilirse düz bir çizgi elde edilir. Bu grafiğe Lineweaver-Burk grafiği denir. Bu grafik  $K_m$  ve  $V_{max}$  hesaplamalarında ayrıca enzim inhibitörlerinin etki mekanizmalarının saptanmasında kullanılır [33].



Şekil 2.11. Lineweaver-Burk Grafiği [44.]

### 2.4. Üreaz Enzimi ve Özellikleri

Üreaz, nikel bağlı, hidrolaz sınıfı bir metaloenzimdir. İlk olarak 1926 yılında Sumner tarafından soya fasulyesinden kristalize edilmiştir. Böylece ilk kez bir enzim saf olarak elde edilmiş ve enzimlerin protein yapıda olduğu kanıtlanmıştır.



**Şekil 2.12.** Üreaz Reaksiyonu [45].

1972 yılında Uluslararası Biyokimya Birliğinin aldığı karar ile üreaz enzimi E.C. 3.5.1.5. olarak kodlanmıştır.

Bu sıralamaya göre;

- 3: Tip no : hidrolaz sınıfı bir enzimdir
- 5: Grup no: Amidaz grubudur (C-N bağlarına etki eder)
- 1: Alt grup no: Enzim bir açilamidazdır
- 5: Sistemik ad: Enzimin sistemik adı 'üre aminohidrolaz'dır.

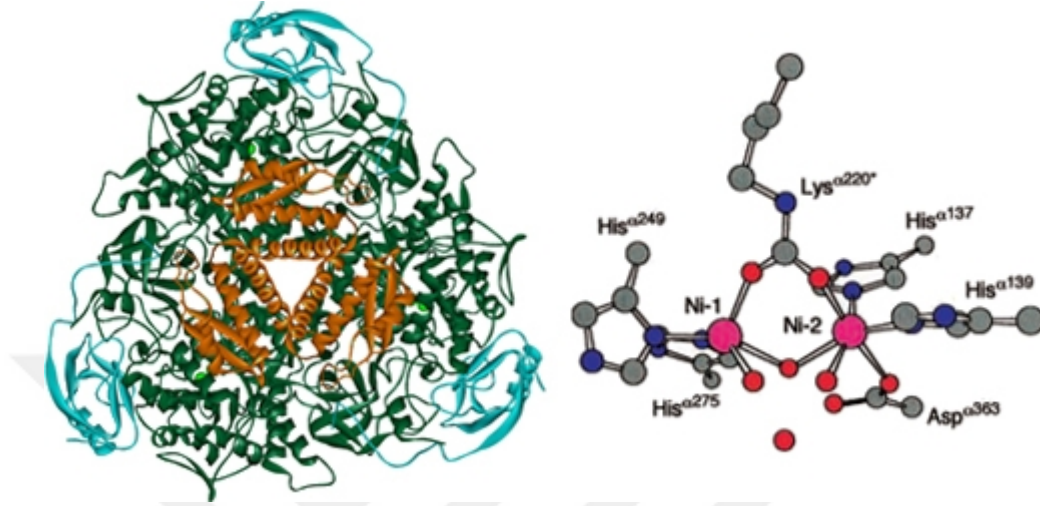
Üreazın temel rolü, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalayarak organizmanın bu ürünleri azot kaynağı olarak kullanmasına izin vermektir. Ayrıca açığa çıkan amonyak topraktaki mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından da kullanılır.

Üreaz enzimi, üreyi hidroliz ederek amonyak ve karbondioksit oluşumunu katalizler. Başlıca, bitkiler, bakteriler ve funguslar tarafından sentezlenmektedir. Hayvanlar ve insanlar üreaz enzimi sentezleyemezler [46]. Şimdiye kadar yapılan bitkisel üreaz çalışmalarında en iyi karakterize edilen *Canavalia ensiformis* üreazıdır [47]. Buna göre bu bitki topraktan azot emiliminin yetersiz olduğu durumlarda argininin açığa çıkardığı üreyi üreaz enzimi sayesinde amonyaka çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasını sağlar. Üreaz ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda genellikle kristal yapısı, [48] üreaz inhibitörleri [49, 50] ve aktif nikel merkezi üzerine odaklanılmıştır [51].

#### 2.4.1. Üreaz Enziminin Moleküler Yapısı

Üreazlar buldukları canlı sınıfına göre farklı kuaterner yapı göstermelerine rağmen benzer kataliz mekanizmalarına sahiptirler. Fungal ve bitkisel üreazlar 90 kDa subüniteli homo oligomerik yapıya sahipken, bakteriyel üreazlar ise 2 ya da 3 subüniteli

multimerik yapıya sahiptir. Enzimde alfa, beta, gama olarak adlandırılan 3 alt birim bulunur ve aktif merkezler alfa alt biriminde bulunur. Aktif merkezde bulunan iki nikel iyonu enzim aktivasyonunda büyük önem taşır [52].



Şekil 2.13. Üreaz enzimin üç boyutlu yapısı [53].

#### 2.4.2. Üreaz Katalizi ve Aktivitesinde Nikel İyonlarının Önemi

Yapılan çalışmalarda, üreazın metaloenzimler arasında nikel içeren ilk enzim olduğu bulunmuştur [54]. Üreaz enziminin aktif merkezinde bulunan iki nikel iyonunun, enzim aktivasyonunda önemli rol oynadığı ve reaksiyonun bu nikel iyonlarının farklı görevleri yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Üreaza bağlı nikel iyonlarından bir tanesi üreyi bağlayarak aktifleştirir, diğeri ise nükleofilik su molekülünü bağlayarak aktifleştirir [55].

Üreaz katalizi için birçok mekanizma önerilmiştir [55, 56]. En fazla kabul gören mekanizma Ciruli ve arkadaşları tarafından önerilen nikel iyonlarının farklı rolleri üzerine olan yaklaşımdır [55]. Daha sonra *Klebsiella aerogenes* ile yapılan bir çalışmaya göre, üre birinci nikel atomuna karbonil oksijeni ile koordine olurken ikinci nikel atomuna ise hidrolitik su bağlanır. Bu durumda iken dört üre protonu proteinle hidrojen bağı oluşturur. Üç proton oksijen atomlarına, dördüncü ise hidrojen akseptörü olarak sistein 319 kalıntısına hidrojen bağı ile bağlanmıştır. İkinci nikel atomunun OH<sup>-</sup> tarafı üredeki karbonilin karbonuna saldırır ve tetrahedral dehidrate üre meydana gelir. Hidrate üre oluşumunda üre azotu histidin 320 kalıntısı ile etkileşir ve protonlanır. Bu

reaksiyon sonunda tetrahedral bir merkez meydana gelerek, amonyum iyonu ortamdan uzaklaşır ve bağlı karbamat ise enzimden disosiyeye edilebilir hale gelir [57].

## 2.5. *Cicer arietinum* ve Bitkisel Üreazlar

Nohut (*Cicer arietinum*), baklagiller (Fabaceae) familyasının *Faboideae* alt familyasına ait *Cicer* cinsinden bir baklagil türüdür. İnsanlar tarafından kültüre edilen ilk bitkilerdendir. Tanelerinde yüksek miktarda protein ve karbonhidrat depolanması nedeniyle insanların diyetinde önemli yer tutar [58]. *Cicer arietinum*'un soğuk hava ve kuraklık gibi ekstrem şartlara dayanıklı olması ve köklerindeki azot bağlayıcı (*Rhizobium*) bakteriler sayesinde hava azotunu toprağa bağlaması tarımsal açıdan önemli özellikleridir.

Üreaz enzimi, özellikle baklagillerde bulunur. Soya fasülyesi, mısır, nohut, fındık, Meksika fasülyesi ve kavun çekirdeğinden elde edilebilir [59, 60]. Kullanılan organik çözücüler, sıcaklık ve pH gibi etkilerden dolayı, bitkisel kaynaklardan izole edilen enzimler düşük stabilitelere sahiptirler ve aktivitelerini hızlıca kaybetmektedirler. Bitkilerde üreaz enzimi azot biyoyararlanımında ve bitkiyi patojen organizmalara karşı korumada rol alır. Yapılan çalışmalarda bitkisel üreazların insektisidal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Buna karşın bakteriyel üreazlarda insektisidal aktivite bulunmamıştır. Ayrıca üreaz enziminin antifungal aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir. Bu çalışmalara bakarak, üreaz enzimi bitkileri predatörler ve fitopatojenlere karşı koruyan bir cephaneliktir diyebiliriz [15]. Üre gübre olarak bitkilere verildiğinde üreaz aktivitesi sayesinde bitkiler tarafından rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca üre dünyada en fazla kullanılan azot gübresi olduğundan, ürenin enzimatik hidrolizi tarımsal açıdan önem teşkil etmektedir. Biyokimyasal olarak en iyi karakterize edilen üreaz *Canavalia ensiformis* üreazıdır. Bu bitkiden izole edilen üreaz enzimi kristalize edilebilen ilk enzimdir ve bu sayede enzimlerin protein yapısında olduğunun kanıtlanmasında önemli rolü vardır. Sumner isimli bilim adamı 1946 yılında Üreaz enzimi ile ilgili yaptığı çalışmalar sonucunda kimya alanında Nobel Ödülü'ne layık görüldü. *Canavalia ensiformis* üreazı nikel içeriği tespit edilen ilk enzimdir. Ayrıca bitkilerde bulunan tek nikel içerikli enzim olma özelliğine sahiptir [48, 61]. Fungal, bitkisel ve bakteriyel üreazların moleküler yapıları karşılaştırıldığında, fungal ve bitkisel üreazlar 90 kDa'luk homooligomerik proteinler iken bakteriyel üreazlar ise iki veya üç altüniteye sahip

komplekslerin multidimerleridir [62]. Bitkisel ve bakteriyel üreazlar arasında aminoasit dizilimi açısından yüksek benzerlik bulunmaktadır. Ayrıca reaksiyon kinetiklerindeki benzerliklerden dolayı tüm üreazların ortak yapı ve katalitik mekanizmaya sahip oldukları düşünülmektedir. Bundan dolayı bitkisel üreazları anlamak için bakteriyel üreazlardan elde edilen veriler de kullanılmaktadır [63]. 1981’de Guimares ve Carlini isimli bilim adamları soya fasülyesinden üreazın izoformu olan kanatoksini ilk kez izole etmişlerdir. Kanatoksin fare ve sıçanlara enjekte edildiğinde toksik etki gösterir. Ayrıca soya fasülyesi üreazından farklı olarak 95 kDa altüniteden oluşan homodimerik yapıdadır. Üreazlar ile yapılan diğer bir çalışmada ise bitki ve bakteri üreazlarının kan plateletlerini aktive ettiği gösterilmiştir [13]. İnsektisidal aktivite ve kan plateletlerini aktive etme ve toksisite gibi özelliklerinin üreolitik aktiviteden bağımsızdır [47].



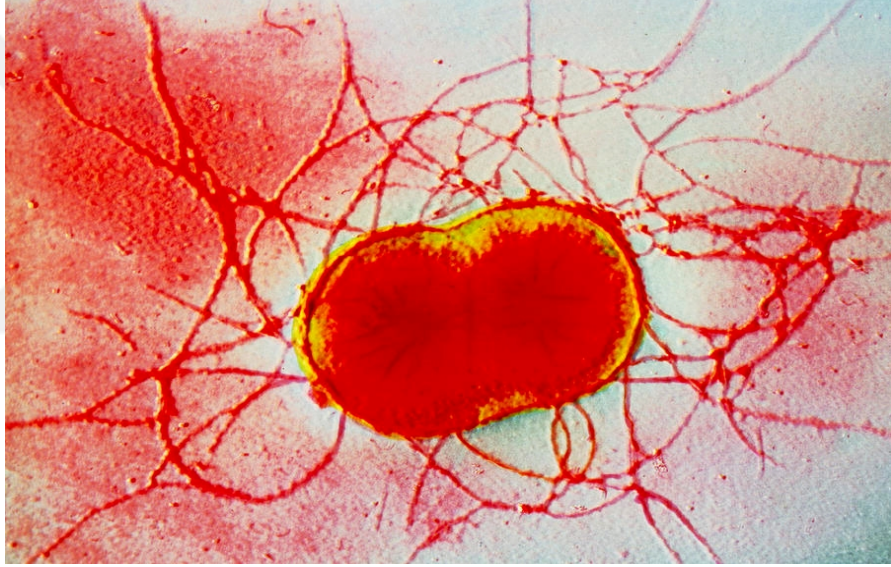
Şekil 2.14a. *Cicer arietinum* Çiçek [64].

Şekil 2.14b. *Cicer arietinum* Tohum [65].

## 2.6. *Proteus mirabilis* ve Bakteriyel Üreazlar

Üreaz pozitif bakteriler ve funguslar insan ve hayvan hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynar. Ör: *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium neoformans* [16]. Bakteriyel üreazlar da bitkisel üreazlar gibi kompleks altünitelerin trimerler ya da hegzamerler şeklinde birleşmesiyle oluşurlar. *Proteus mirabilis* Enterobacteriaceae familyasına ait fakültatif anaerobik bir bakteri türüdür. Başta üriner sistem enfeksiyonları olmak üzere, nozokomiyal enfeksiyonlarda, organ apselerinde ve sepsisemi görülen hastalardan sıklıkla izole edilmektedir [66]. *Proteus mirabilis* yüksek üreaz aktivitesine sahiptir ve bu da patojenitesinin önemli bir

göstergesidir. Üreaz pozitif olması sayesinde yerleştiği dokuda üreyi parçalayarak toksik bir madde olan amonyak ve karbondioksit üretir [67]. Böylece ortam pH'ını alkali yönde değiştirerek kendisine yaşam alanı yaratmış olur. Üreaz pozitif bir bakteri olan *H. pylori* ise düşük mide pH'ında hayatta kalarak gastrit ve mide ülserlerinin oluşumunda önemli rol oynar [68]. Üreaz enzimi sayesinde ortamda bulunan üreyi amonyak ve karbondioksite dönüştürerek ortam pH'ını yükseltir. Yükselen pH ile birlikte G hücrelerinden gastrin hormonu salgılanır ve midede asit sekresyonu artarak zamanla gastrit oluşumuna katkıda bulunur. Önemli üreaz pozitif bakteriler arasında *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*'yi sayabiliriz [69].



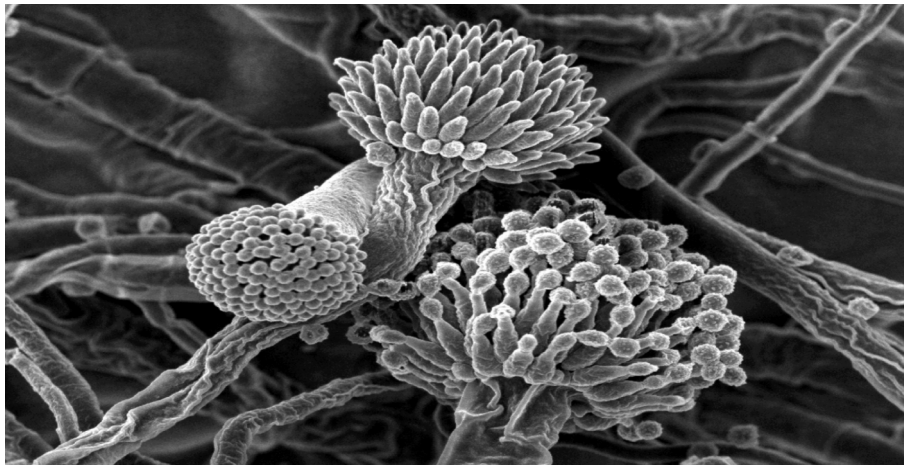
**Şekil 2.15.** *Proteus mirabilis* [70].

## 2.7. *Aspergillus fumigatus* ve Fungal Üreazlar

*Aspergillus*'lar Deuteromycota'daki hifomisetler arasında Moniliaceae ailesinde sınıflandırılır. Eşeyli üreyenleri Ascomycota'da Eurotiales takımında *Emericella*, *Eurotium*, *Neosartoria* ve diğer cinslerde yer almaktadır. *Aspergillus* türlerinin sınıflandırılması morfoloji ve kültür özelliklerindeki farklılıklara dayanır. Biyokimyasal yöntemlerin tanım değeri daha düşüktür. *Aspergillus*'ların hücre duvarlarında N-asetilglukozamin, glukoz, galaktoz ve mannoz bulunmaktadır. Moleküler biyoloji ve genetik yaklaşımların güvenilirliği daha fazla olsa da henüz bilgi birikimi yeterli



değildir [71, 72]. Tür tayini için, konidili başların şekli ve rengine, sterigmata sayısına, konidyoforların rengi ve yapısına, vezikül ve dinlenme hücrelerinin biçimine dikkat edilir. Fungusların gelişme hızı patojeniteleriyle doğru orantılıdır. En hızlı gelişen tür *Aspergillus fumigatus*'dur. Bu türün 37°C'deki çimlenme hızı besiyerine bağlı olarak 5-12 saattir. *In vitro* uygun nem ve sıcaklık ortamında bırakılan konidyumlar ilk hacimlerinin yaklaşık 4-8 katı kadar şişer. *Aspergillus* konidyumları solunum yoluyla alındığı zaman akciğerdeki alveollere ulaşabilecek kadar küçük yapıya sahiptir (2-5 µm) ve dokulara kolay bir şekilde nüfuz edebilirler. Konidyumlarda bulunan hidrofobik yapıdaki protein tabaka sayesinde ekstrem şartlara dayanabilme özelliğine sahiptir. Bu tabakanın konağın savunma mekanizmalarına karşı koymakta da rol oynayabileceği düşünülmektedir [73]. *Aspergillus fumigatus* dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunur. Hif denen ipliksi yapılardan meydana gelen saprofitik funguslardır. Doğada saman ve çürüyen bitki artıklarında yaşarlar [74]. İnsanlarda, hayvanlarda ve özellikle kuşlarda ciddi bir solunum hastalığı olan Asperjilloza yol açarlar [75]. *Aspergillus* türlerinin ticari önemi de büyüktür. Dünyada sitrik asit üretiminin büyük bir bölümü *Aspergillus niger* ile sağlanır. Ayrıca kendisinden veya başka bir canlıdan sentezlenen enzimlerin üretimi de gerçekleştirilebilir ör: Glukoz oksidaz, lizozim, üreaz, amilaz vb. Funguslar üreaz aktiviteleri sayesinde azot döngüsünde önemli rol oynarlar [76, 77]. *Fusarium nivale* ve *A. fumigatus* ile yapılan bir çalışmada ağır metaller ve vitaminlerin üreaz aktivitesi üzerine etkileri araştırılarak demir, selenyum, çinko, kobalt ve bakır'ın üreaz aktivitesini anlamlı olarak azalttığı, tiamin ve biotin'in ise her iki fungus türünde de üreaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir [78].



Şekil 2.16. *Aspergillus fumigatus* [79].



## **2.8. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları**

Üreaz enzimi biyolojik sıvılarda bulunan üre miktarlarının ölçümünde diagnostik kit olarak kullanılmaktadır. Yine kan örneklerinde üre tayininde üreaz biyosensörlerinden faydalanılmaktadır [17]. Yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında, gıda endüstrisinde meyve suyu ve alkollü içeceklerden ürenin giderilmesinde, endüstride atık sulardan üre temizleme gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptir [4].

### **2.8.1. Üre Konsantrasyonu Tayini**

Biyolojik, çevresel, medikal ve endüstriyel sıvılarda üre tayini son derece önem taşımaktadır. Üre hidrolizi sonucunda açığa çıkan amonyak ve karbondioksit pH değişimlerine, reaksiyonun sıcaklığının ve iyonik bileşiminin değişmesine neden olur. Bu değişimleri tayin etmek için pek çok üre tayin metodu geliştirilmiştir. Serbest üreaz enziminin her zaman stabil olmaması ve fazla miktarda kullanılması immobilize üreazların kullanılmasına neden olmuştur. Immobilize üreazların kullanıldığı tayin yöntemleri şu şekilde sıralanabilir; amperometrik, potansiyometrik, optik, kondüktometrik, kalorimetrik, spektrofotometrik ve iyon değişimi likit kromatografisi [80].

### **2.8.2. Böbreklerden Ürenin Uzaklaştırılması**

Üre, böbrek rahatsızlıklarında vücuttan uzaklaştırılması gereken vücut tarafından sentezlenen bir azotlu bileşiktir. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. Serumdaki normal değeri % 20 - 40 mg aralığındadır. Ürenin idrarla dışarı atılmayıp kanda birikmesi durumuna 'üremi' denir. Üremi böbrek yetmezliğinde son dönemde meydana gelerek şuur kaybı ve komaya neden olarak ölüme götürebilen bir hastalıktır [81]. Üreaz enzimi vücut sıvılarındaki üreyi amonyuma dönüştürür. Amonyum iyonlarının belli bir değerden fazla olması da insan sağlığını tehdit eden bir durumdur. Diyaliz sistemlerinde üreazın kullanımı amonyumu da uzaklaştırıcı bir yöntemdir. Yapay böbrekte üreaz üreyi amonyuma dönüştürdüktan sonra zirkonyum fosfat – zirkonyum oksit iyon değişim sistemi ile diyalizattaki amonyum uzaklaştırılır [2, 82]. Yapılan bir çalışmada üreaz içeren yapay hücrelerin in

vivo ortamda vücut sıvılarında bulunan üreyi amonyuma dönüştürdüğü gözlenmiştir [83].

### **2.8.3. Alkollü İçeceklerden Ürenin Uzaklaştırılması**

Alkollü içeceklerden özellikle şarapta bulunan üre, karsinojenik bir madde olan etil karbamatin öncül maddesidir ve depolama sırasında açığa çıkar [84]. Alkollü içeceklerin pH aralığı pH 3.2 – 4 arasında değiştiği için üre uzaklaştırma yöntemi için asit üreazları kullanılır [85]. Asit üreazları ilk kez *Lactobacillus*, *Morganella* ve *Bifidobacterium* bakterilerinde bulunmuştur [86, 87]. Ürenin alkollü içeceklerden üreaz enzimi ile uzaklaştırılması Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde içki endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu işlem uzun sürdüğü için sürekli uygulamaya izin vermemektedir. Üreazın böbrek taşı oluşumuna sebebiyet vermemesi için inaktive edilerek ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu problemler nedeniyle serbest enzim yerine immobilize üreaz reaktörleri tercih edilmektedir [88].

### **2.8.4. Ağır Metal İyonları Analizi**

Üreaz enzimi ağır metal iyonları analizinde de kullanılmaktadır. Bu yöntemde ağır metal iyonlarının üreaz enzimini inhibe etme özelliğinden yararlanır. Ağır metal iyonları bu inhibitör etkiyi enzimin aktif merkezindeki sülfhidril gruplarına bağlanarak metal-sülfhidril yapılar oluşturarak sağlar [89]. Yapılan bir çalışmada  $Cd^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının üreaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir. Atık sularda, yer altı ve yüzey sularında ve içme sularındaki ağır metal iyonlarının tayininde bu metod kullanılmaktadır [2].

### **2.8.5. Arginin Analizi**

Glikojenik bir aminoasit olan arginin bazı hormonal hastalıkların tedavisinde ve bazı klinik tedavilerde ilaç olarak kullanılır. Arginin arginaz enzimi ile hidroliz edilerek üre meydana getirir bu nedenle önemli bir üre kaynağıdır. Arginin analizlerinde üreaz enziminin kullanımı genellikle ürenin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Meme doku arginazının bazı biyokimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ortamdaki ürenin uzaklaştırılması için meme doku örnekleri

supernatantına jack bean üreazı ilave edilmiştir [90]. Yapılan diğer bir çalışmada ise üreaz temelli bir biyosensör yapılarak arginin analizi gerçekleştirilmiştir [91].

### 2.8.6. İmmunoglobulin G (IgG) Ölçümleri

İmmun yetmezliklerin tanısında, pekçok immün durum ve infeksiyonun tanımlanmasında, IgG sınıfı antikorlar değerlendirilir. Bakteriyel ve viral etkenlere karşı plazma hücreleri tarafından üretilirler. İmmunoglobulin ve IgG alt gruplarının ölçümünde, ELİSA, radyal immunonefolometri ve immunodiffüzyon gibi farklı immunolojik yöntemler kullanılmaktadır [92]. Yapılan bir çalışmada *H. pylori* üreazına karşı artan IgG düzeyleri ELİSA yöntemiyle tayin edilmiştir [93]. Ayrıca *H. pylori* pozitif gastrit hastalarıyla yapılan bir çalışmada IgG'nin biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir [94].

İmmunoglobulin tayini için selüloz asetat diyaliz membranından geliştirilen pH sensörlerinden yararlanır. Bu yöntemde selüloz asetat membran farklı bir membranla daha kaplanarak farklı metabolit tayinlerinde de kullanılabilir. Üreaz enzimi bu membrana immobilize edildiğinde üre tayininde kullanılabilir. Ayrıca üreaz enzimi immunokimyasal reaksiyonla membrana immobilize edildiğinde, buna immunosensör adı verilir ve immunglobulin tayininde kullanılır [95].

### 2.9. Üreaz Enziminin Substratı Olarak Üre

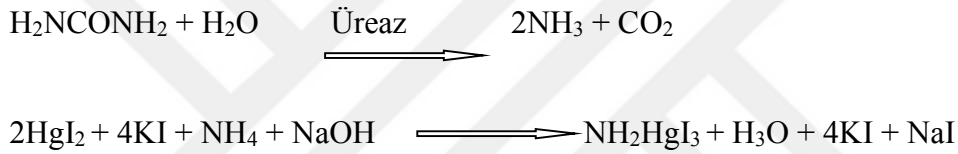
Karbonik asidin diamidi olan üre organik bir bileşiktir ve formülü  $H_2N-CO-NH_2$ 'dir. Üre böbrekler yoluyla idrar ile vücuttan uzaklaştırılan bir protein ürünüdür. Ayrıca suda eriyebilme özelliğine sahip azotlu bir maddedir. Üre, fizyolojik öneme sahip bir bileşiktir. Memeli vücudundaki proteinlerin yıkılması sonucu oluşan amonyak, karaciğerde üreye dönüştürülür. Üre kana geçerek idrarla dışarıya atılır. Ayrıca ter, süt ve gözyaşında da az miktarda üre bulunmaktadır. Üre düzeylerindeki artış böbrek fonksiyonlarındaki bir bozukluğun mesajını vermektedir. Bununla birlikte kalp yetmezliğinde, su ve tuz alımındaki anormalliklerde, protein tüketiminde, bağırsak kanamalarında, ateş yüksekliğinde, miyokard enfarktüsünde, stres durumlarında ve kontrolsüz yapılan diyetlerde artmaktadır [96].

Üre, üreaz enzimi ile  $NH_4^+$  ve  $CO_2$  parçalanır. Ürenin medikal, çevresel ve biyolojik sıvılardaki analizleri son derece önem taşımaktadır. Üre hidrolizi ile açığa

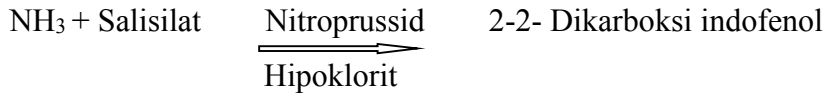
çıkan  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{CO}_2$  ortamda sıcaklık ve pH değişimlerine neden olmaktadır. Üre dünyada en sık kullanılan azot gübresi olduğundan enzimatik hidrolizi tarımsal açıdan büyük öneme sahiptir. Üre bitkilere gübre olarak verildiğinde üreaz enzimi sayesinde bitkiler tarafından kullanılabilir [97].

## 2.10. Üre Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler

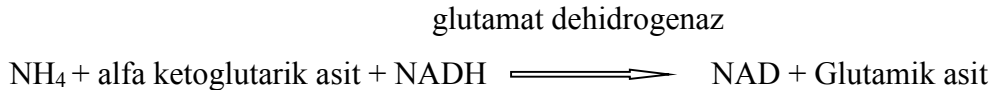
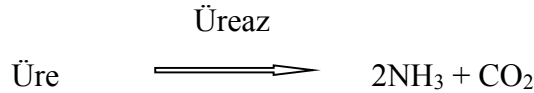
Nesslerizasyon: Nessler yöntemi 1856'da Julius Nessler tarafından uygulanmış ve günümüze kadar bazı değişimlere uğramıştır. Nessler reaktifi; sulu potasyum iyodür ve potasyum hidroksit içine civa iyodür'ün eklenmesiyle elde edilir. Üreazın üre ile reaksiyonu sonucu oluşan amonyak nessler reaktifi ile sarı ile turuncu arasında renk oluşturur ve bu renk spektrofotometrik olarak 425 nm dalga boyunda tayin edilir [98].



Berthelot Yöntemi: Üreazın üreyi hidroliz etmesiyle oluşan amonyak sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprosit katalizörü eşliğinde fenol ile reaksiyona girerek mavi renkli indofenolü oluşturur ve rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür [99].



Çift Enzim Yöntemi: Bu yöntem en çok hastalıkların teşhisinde kullanılır



## 2.11. Üre Sentezi

Canlılar vücutlarından uzaklaştırdıkları azotlu son ürünün yapısına göre üç gruba ayrılırlar.

1. Amonyotelik canlılar: Azot fazlasını vücuttan amonyak olarak atarlar. Bu canlılar suda yaşarlar ve amonyağı kolaylıkla suya bırakarak uzaklaştırırlar.

2. Ürikotelik canlılar: Kuşlar ve sürüngenler ürikotelik canlılar sınıfına dahildir. Yani azotlu son ürün ürik asittir.

3. Üreolitik canlılar: İnsanları da kapsayan üreolitik canlılarda amonyak karaciğerde üreye dönüştürüldükten sonra atılır.

Üre karbon, oksijen, hidrojen ve nitrojenden meydana gelen küçük bir organik molekül olup kanın ve diğer vücut sıvılarının ortak bir unsurudur. Üre sentezi başlıca karaciğer ve böbrek korteksinde meydana gelir. Bu sentezin amacı amonyağı vücuttan uzaklaştırarak bikarbonatı tüketmek ve böylece pH dengelenmesini sağlamaktır. Üre sentezinde son ürün olan ornitin baştan ikinci reaksiyonun substratı olduğundan bu reaksiyon dizisi bir döngü oluşturur. Bu döngü ilk kez 1937 yılında Hans Krebs ve Kurt Henseleit tarafından gösterilmiştir. Reaksiyon beş basamaktan oluşur. İlk iki reaksiyon mitokondride gerçekleşirken diğer üç reaksiyon sitozolde meydana gelir. Son ürünlerden üre sitozolden kana verilerek böbreklerden atılır. Ornitin ise mitokondriye döner ve tekrar üre döngüsüne katılır.

Üre Döngüsü Basamakları:

1. Karbamoil fosfat oluşumu: Bu reaksiyonda toplam 2 molekül ATP harcanarak karbamoil fosfat sentaz I'in kataliziyle karbamoil fosfat oluşur. Karbamoil fosfata katılan amonyak glutamatın oksidatif deaminasyonu ile meydana gelir. Bu amonyaktan elde edilen azot atomu sonrasında üre molekülünün azotlarından birini oluşturur. Ayrıca karbamoil fosfat sentaz I'in aktive edilmesi için N-asetilglutamat gereklidir.

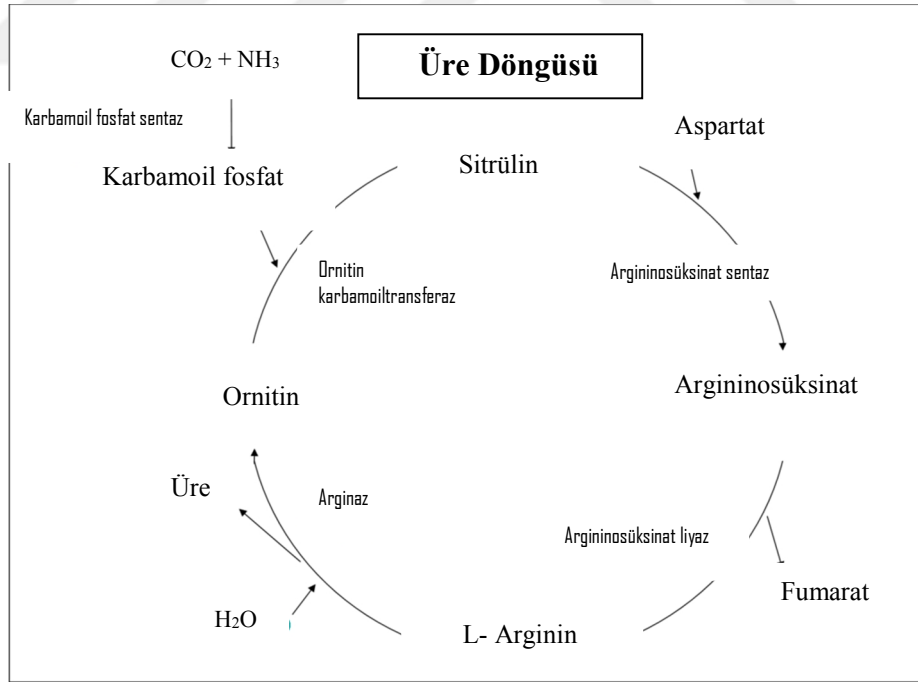
2. Sitrülin sentezi: Sitrülin ve ornitin üre döngüsüne katılan esas amino asitlerdir. Bu amino asitler için genetik kodon olmadığı için hücresel proteinlerin yapısına katılmazlar. Karbamoil fosfat mitokondride ornitinle birleşerek sitrülin oluşturulmuş fosfat ayrılır. Reaksiyon sonucu meydana gelen sitrülin daha sonra sitozole geçer.

3. Argininosüksinat sentezi: Sitrülin, sitozole ornitin-sitrülin antiport taşıyıcı ile geçerek aspartat ile birleşir ve argininosüksinatı oluşturur. Aspartatın  $\alpha$ - amino grubu

üre molekülünün ikinci azot atomunu sağlar. Bu reaksiyon sonucunda bir molekül ATP harcanır ve  $PP_i$  açığa çıkar. Böylece üre oluşurken üçüncü ve son ATP molekülü de harcanmış olur.

**4. Argininosüksinatın parçalanması:** Argininosüksinat parçalanarak fumarat ve arginine dönüşür. Reaksiyon sonucunda oluşan arginin üre molekülünün prekürsörüdür. Fumarat ise malata dönüşerek mitokondriye girer ve TCA döngüsüne katılır. Ayrıca malat okzaloasetata okside olarak aspartat veya glukozu dönüşebilir.

**5. Argininin ornitin ve üreye parçalanması:** Argininin ornitin ve üreye parçalanması arginaz enzimi katalizinde gerçekleşir. Arginaz sadece karaciğerde sentezlenir. Bundan dolayı diğer dokular arginin sentezleyebilseler de sadece karaciğer argininini parçalayarak üre sentezleyebilir. Argininin parçalanması sonucu karaciğerde oluşan üre kana geçerek böbreklere taşınır ve süzülüp idrarla atılır. Karaciğerde sentezlenen ürenin bir kısmı kandan bağırsaklara difüzyon yoluyla geçerek bakteriyel üreaz ile  $CO_2$  ve  $NH_3$ 'a parçalanır. Oluşan amonyağın bir bölümü feçesle atılır diğer kısmı da kana reabsorbe edilir [100].



**Şekil 2.17.** Üre Döngüsü [101].

## 2.12. Üre Siklusu Defektleri

Üre sentezindeki duraklamalar siklus ara maddelerinin ve amonyağın kanda birikmesiyle sonuçlanır. Nadir olarak enzimlerin her birinde genetik defekt bildirilmiştir. Bu eksiklikler otozomal resesif olarak aktarılır. Kusurlu enzimin substratı ince tabaka kromatografisiyle gösterilerek tanı konulur. Argininosüksinat liyaz ve sentetaz eksikliğinin prenatal tanısında amniyon sıvısından elde edilen hücreler kullanılır. Ortak laboratuvar bulgusu, özellikle yemeklerden sonra kanda amonyak düzeyinin yükselmesidir. Yenidoğanda görülen geçici hiperamonyemi genetik bozukluklardan daha sık görülür. Yenidoğanda meydana gelen yüksek amonyak düzeyi birkaç günde normale döner ve beslenmeyle tekrar yükselmez.

Üre siklusu defektlerinin tedavisi, azot alımını minimuma indirerek azotun üreden başka metabolitlerle uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Tedavide, diyetle protein azaltılması, fazla amonyağın uzaklaştırılması ve defekt nedeniyle sentezlenemeyen ara ürünlerin dışarıdan alınması sağlanır. Tedavide kullanılan levüloz, kolondaki bakteriler tarafından laktik aside dönüştürülür ve amonyağın amonyum şeklinde feçesle atılması sağlanır. Ayrıca yine tedavi amacıyla verilen sodyum benzoat, hippurat oluşturarak glisini uzaklaştırır. N-asetil glutamat sentaz eksikliğinde ise N-karbamoilglutamat verilir [101].

Hastalık	Defektli Enzim	Laboratuvar Bulgusu	Semptomlar
Hiperamonyemi Tip 1	Karbamoilfosfat sentetaz 1	Hiperamonyemi	Letarji, kusma, hipotermi, hiperventilasyon
Hiperamonyemi Tip 2	Ornitin transkarbamoilaz	Hiperamonyemi Ornitinemi Orotik asidüri	İlımlı klinik bulgular
Klasik sitrölinemi	Argininosüksinat sentetaz	Sitrölinemi Epizodi hiperamonyemi	Kusma, letarji, ataksi, konvüsiyon
Argininosüksinik asidüri	Argininosüksinat liyaz	Sitrölinemi Arginino süksinik asidüri	Sitrölinemiye benzer epizodik semptomlar
Hiperargininemi	Arginaz	Argininemi Lizinemi Ornitinemi	Mental gerilik
N-asetilglutamatsentaz eksikliği	AGA sentaz	Hiperamonyemi Hiperornitinemi Hipoglisemi	Koma, asidoz, diyare

**Tablo 2.1.** Üre Siklusunda Genetik Defektler [103].

### 2.13. Hayvancılıkta Yemlerin Önemi ve Rasyon Hazırlama

Hayvanlara verilecek yemler genel olarak kaba yemler ve kesif yemler olarak iki ana başlıkta incelenebilir. Kaba yemler; mera ve çayırlar, baklagiller (korunga, yonca, fiğ), her çeşit kuru otlar, yumru ve kök yemler ve diğer silo yemlerinden oluşmaktadır. Kesif yemler; yulaf, arpa, mısır gibi taneli yemler, pamuk tohumu küspesi, ayçiçeği küspesi gibi yağlı tohum küspeleri, bongalit, muhtelif kepek gibi değirmen artıkları. Balık unu, et unu, kemik unu gibi hayvansal yemler. Kuru pancar posası ve melas gibi fabrika artıkları, tuz, vitaminler ve diğer mineral maddeler olarak sıralanabilir. Hayvanların protein ve enerji ihtiyaçlarını doğru bir şekilde karşılayabilmek için kaba ve kesif yemlerden dengeli bir rasyon hazırlayarak verilmelidir. Rasyon; hayvanlara 24 saat içinde besin maddesi ihtiyaçlarına göre hazırlanarak verilmesi gereken toplam kaba ve kesif yem miktarıdır [104].

Hayvanlardan istenen verimin elde edilebilmesi için doğru şekilde ve yeterli miktarda beslenmeleri gerekir. Özellikle kanatlı hayvanların ve çiftlik hayvanlarının dengeli beslenmesini sağlamak için günlük besin ihtiyaçlarının doğru hesaplanması ve



hayvanlara düzenli periyotlarda verilmesi gerekir. Hayvanların besin maddelerine olan ihtiyaçları cins, yaş ve canlı ağırlıklarına göre değişir. Hayvancılıktaki en önemli konulardan biri az miktarda ve ucuz yemlerle en fazla hayvansal protein elde etmektir. Bu da hayvanların dengeli hazırlanan rasyonlarla beslenmesiyle olur. Rasyon hazırlarken öncelikle hayvanların tüm ihtiyaçları belirlenir. Sonrasında piyasada bulunan en ucuz yem maddeleri temin edilerek içerikleri hesaplanır ve rasyon hazırlanır [105].

Çiftlik hayvanlarının yem ihtiyaçları; verim payı ve yaşama payı olmak üzere iki ana başlık altında incelenir. Hayvanlar yedikleri yemin bir kısmını yaşamlarını sürdürmek için bir kısmını da verimli olabilmek için kullanmaktadırlar. Hayvanların yaşamlarını sürdürebilmeleri için yedikleri yemlerin besin öğelerinin toplamına “yaşama payı ihtiyacı” denir.

Yaşamak için kullanılan yemlerin önemi;

- 1) Vücut sıcaklığını sabit tutmak için; insanların ve hayvanların vücut sıcaklıkları genellikle sabittir. Ancak soğuk hava şartlarında vücut sıcaklığını sabit tutabilmek için daha fazla enerji gerekmektedir. İnsanların vücut sıcaklığı 36,5 °C iken sığırların vücut sıcaklığı 38,5 °C ve tavukların vücut sıcaklığı ise 41 °C dir.
- 2) Deri, kıl ve tırnakların yenilenmesi için
- 3) İç salgı bezlerinin çalışmasında
- 4) Kalp, Mide ve iç organların çalışmasında
- 5) Solunum, idrar ve kan dolaşımı için önemlidir.

Hayvanlar arasında her türün kendine özgü bir vücut yapısı bulunmaktadır ve her türün vücut gelişimi farklılık gösterir. Gelişme çağındaki olan ve yetersiz beslenen genç hayvanlar erginlik performansına girememektedirler. Hayvanlardan iyi ürün almak isteniyorsa gençlik dönemlerinde dengeli ve yeterli beslenmeleri gerekir. Hayvanlardaki kilo artışı her zaman gelişim anlamına gelmeyebilir çünkü vücuttaki yağ artışına bağlı olarak da kilo artışı meydana gelebilir. İstenen gelişim kasların, organların ve dokuların gelişmesidir. Bütün bu gelişimin doğal ve düzenli olarak meydana gelebilmesi için gelişme çağındaki hayvanların yeterli ve düzenli beslenmeleri gerekmektedir. Gelişme hayvanın türüne, ırkına, yaşına ve canlı ağırlığına göre değişiklik gösterir [106, 107].

Genç hayvanların yaşama payı enerji ihtiyaçlarının yanı sıra doku ve organlarının yenilenmesi için ayrıca enerji ihtiyaçları da bulunmaktadır. Hayvanın canlı ağırlığı arttıkça enerji ihtiyacı da artış gösterir. Büyümenin en hızlı olduğu yaşlarda protein ihtiyacı da yüksektir, büyüme yavaşladığı zaman protein ihtiyacı azalır. Yeterli protein alınması doku ve organların onarımı açısından önemlidir. Protein sindirimi sonucunda açığa çıkan ve ince bağırsaklarda absorbe edilen aminoasitler, gelişme, büyüme, sağlık, laktasyon, verim, gibi olayların devamlılığı açısından önem taşımaktadır [108]. Kas ve organların gelişimi yanında kemik gelişimi de önemlidir. Bu sebeple gelişme döneminde fosfor, vitamin D ve kalsiyum alımının düzenli ve dengeli olması önemlidir. Besin maddesi ihtiyacı hesaplanırken, kemiklerdeki kül oranı, kandaki Ca ve P düzeyi ölçülür. Protein miktarının yanı sıra proteinin kalitesi de önem taşımaktadır. Yeterli esansiyel amino asit içermeyen karma yemlerle beslenen hayvanlarda dölleme oranının düştüğü, yavru atmaların görüldüğü ve doğan yavruların düşük kiloya sahip oldukları gözlenmektedir [109].

Mineral maddelerin hayvanların üremesi üzerine önemli etkileri bulunur. Yemlerde kullanılan mineral maddelerin hayvanların verim performansını arttırdığı, mastitisten kaynaklanan verim düşüklüğünün önlenebileceği, süt kalitesi ve üretimi üzerine olumlu etkilerinin olduğu, organik mineral kullanılmasının somatik hücre sayısını azalttığı ve bağışıklık sistemi üzerine etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [110, 111]. Özellikle, Ca ve P yetersizliğinde kısırılık meydana gelebilir ve yavru atmaları ortaya çıkabilir. Yetersiz iyot alımında döl tutma oranının düştüğü, zayıf yavru elde edildiği, guatr oluştuğu, manganca yetersiz rasyonla beslenen boğalardan elde edilen sperm miktarının azaldığı, hareketliliklerinin azaldığı ve bundan dolayı dölleme gücünün düştüğü gözlenmektedir [112]. Vitamin E eksikliğinde ise dölleme aksamalar, erkeklerin testislerinde dejenerasyon oluşumu ve kısırılık oranı artmaktadır.

Laktasyon, süt veren hayvanların doğumdan sonra süt vermeye başladığı ve en son süttten kesildiği döneme verilen isimdir. İneklere onlardan elde edilen süt miktarına göre ek yemleme yapılmaktadır. Özellikle doğum sonrasındaki ilk dönemlerde hayvanın proteinden zengin yemlerle beslenmesi daha fazla süt elde edilmesini sağlayacaktır [113]. Verim durumuna göre hesaplama yapılırken, elde edilen süttün yağ oranı da hayvana verilecek ek yemin miktarını değiştirir. İneklere verimlerine göre yem

verileceği zaman ineğin günlük verdiği sütte bulunan yağ oranı llr ve yüzde yağ oranı hesaplanarak ek besleme yapılır.

Hayvanlara rasyon hazırlarken, hayvanın tüm özellikleri göz önünde bulundurularak gerekli enerji ve protein ihtiyaçları hesaplanır. Ayrıca yem maddelerinin protein ve enerji miktarları hesaplanır. Bu veriler yardımıyla yemlerin rasyon yapımında hangi lde kullanılacağı hesaplanır. Hayvan yemlerindeki toplam protein miktarına “ham protein”, hayvana verilen toplam yemde bulunan proteinden, hayvanın idrar ve dışkı ile attığı protein farkına ise “hazım olabilir protein” denir [114].

Besi hayvanlarının günlük canlı ağırlık artışları ve canlı ağırlıklarına göre günlük enerji ve protein ihtiyaçları belirlenir [115]. Süt ineklerinin verim payı ihtiyacı, günlük elde edilen süt ve sütte bulunan yağ oranına göre değişmektedir. Buna göre her hayvana farklı oranlarda yem verilir. Süt inekleri de diğer hayvanlar gibi beş temel besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Bunlar; enerji, protein, vitaminler, mineral maddeler ve sudur. Bunları arasında en önemlisi sudur. Suyun en önemli faktör olmasının nedeni, vücudun % 70’i, sütün % 87’sinin sudan meydana gelmesidir. Süt yoluyla vücuttan atılan suyun dışında idrarla, terlemeyle ve dışkı yoluyla da su atılır. Hava sıcaklığının arttığı zamanlarda atılan su miktarı daha da artmaktadır. Süt inekleri özellikle uygun sıcaklıkta ve temiz içme sularına ihtiyaç duyarlar. Ortalama olarak 500 kg ağırlığa sahip süt veren bir inek günde yaklaşık 150 litre su tüketebilir [116].

#### **2.14. Ruminantlarda Azot Metabolizması**

Tüm proteinlerin yapısında azot bulunur, ancak üre gibi azot kaynakları protein içermezler. Bu sebeple bu tür bileşiklere protein niteliğinde olmayan azotlu maddeler (NPN) denir. Ruminantlar tek mideli hayvanlardan farklı olarak protein niteliğinde olmayan azotlu bileşiklerden de yararlanabilirler. Bu bileşikler, ruminantların rumeninde çok değerli proteinlere dönüştürülebildiğinden, endüstriyel olarak üretilen NPN veya bazı yem maddeleri de hayvanlara verilebilmektedir [117].

Yem proteinleri ruminantlar tarafından tüketilerek rumende bulunan mikroorganizmalar yoluyla amino asitler ve peptitler üzerinden amonyağa parçalanırlar [118]. Yemlerle alınan NPN bileşiklerinin rumende parçalanmasıyla amonyak açığa çıkmaktadır. Rumende protein yıkılmasıyla oluşan amonyakın büyük bir kısmı bakteriyel protein sentezinde kullanılırken, bir kısmı da rumen duvarından emildikten

sonra karaciğer tarafından üreye dönüştürülür. Karaciğerde meydana gelen ürenin yaklaşık % 50'si tükürük ve kan yoluyla tekrar rumene gelir. Ruminantların üre gibi NPN bileşiklerine uyum sağlamasında yararı olan bu fizyolojik mekanizmaya "Rumino-hepatik azot dolaşımı" adı verilmektedir [119].

Ruminantlar rumenlerinde yaşayan mikroorganizmalar sayesinde yemlerde bulunan azotu proteine (mikrobiyal protein) çevirebilirler. Rumende meydana gelen mikrobiyal protein sentezinde ana kaynak amonyaktır. Rumen bakterileri protein sentezi için gereken amonyağı yemde bulunan proteinlerden ya da NPN bileşiklerinden elde ederler. Çiftlik hayvanlarını beslemede kullanılan pek çok yemde düşük oranda da olsa NPN bulunur. Genellikle kaba yemler de bulunan NPN oranı daha yüksektir. Örneğin mısır silajındaki toplam azot miktarının % 50 kadarı NPN şeklindedir. Yonca samanındaki azotun % 10-20 kadarı NPN bileşiklerinden meydana gelmektedir.

Rumende meydana gelen amonyak, bakterilerin üreyebilmesi için gereken başlıca azot kaynağıdır. Bakteriler tarafından rumendeki amonyağın kullanılması, bakterilerin sayısına, büyüme hızına ve yeterli enerjinin bulunmasına bağlıdır. Selüloz ve nişastanın sindiriminden sorumlu olan rumen bakterileri de diğer bakteriler gibi amonyağı azot kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Rumende oluşan mikrobiyal proteinler, daha sonra abomasum ve ince bağırsaklara geçer ve amino asitlere yıkılarak hayvanın amino asit ihtiyacının karşılanmasında kullanılır.

Amonyak ve ürenin en önemli NPN kaynakları olduğu ve sığırların ve süt ineklerinin beslenmesinde NPN kullanılmasının iki önemli nedeni bulunmaktadır. Birincisi rasyonda bulunan rumende parçalanabilir protein miktarının düzenlenmesine yardımcı olmak. Diğer neden ise doğal protein kaynaklarıyla kıyaslandığında NPN'lerin daha ekonomik olmasıdır [108].

## **2.15. Ruminantların Beslenmesinde Ürenin Önemi**

Ruminantların NPN bileşiklerini azot kaynağı olarak kullanabilecekleri düşüncesi, yaklaşık yüz yıl önce ortaya konularak ruminantlar üzerinde buna ilişkin yoğun çalışmalar yürütülmüştür. İzotopla işaretlenmiş üre yedirilen koyunlarda üre azotunun vücut proteinlerinin sentezinde kullanıldığı ortaya konmuştur. Ürenin hayvan yemlerinde kullanılmasına ışık tutmak amacıyla yapılan çalışmalarda, konsantre yem içeriğine % 2 oranında ilave edilmesi durumunda en iyi şekilde değerlendirildiği

düşünülmektedir [120, 121]. Davis ve arkadaşları rasyonun % 30, % 50 ve % 70'ini üre ile hazırlayarak yaptıkları araştırmada yüksek üre içerikli rasyonların hayvan sağlığına zararlı olmadığını göstermişlerdir [122]. Rasyona ilave edilen ürenin kuru madde tüketimine hiç etkisi olmadığını gösteren çalışmalar [123, 124] yanında, kuru madde tüketimini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [125, 126]. Rasyona katılan ürenin selülozun sindirimine olumlu etki ettiği bir çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir [127, 128]. Yapılan çalışmalarda çeşitli rasyonlara farklı oranlarda katılan ürenin süt verimi üzerine önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir [122, 129]. Farklı çalışmalarda da rasyona üre ilavesi ile rumen uçucu yağ asitleri konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir [130, 131]. Süt ineklerine rasyon ile verilen ürenin yem tüketimi, süt verimi, ürenin kan ve idrardaki oranı ve süt bileşimlerine etkilerini incelemek amacıyla yürütülen çalışmanın sonuçlarına bakıldığında süt ineklerine rasyonda % 2 düzeyine kadar ürenin protein kaynağı olarak kullanılabilceği, herhangi bir toksik etki yapmadığı ve diğer kriterler yönünden de anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak süt verimi, sütteki yağ ve protein oranı bakımından % 1 oranında rasyona ilave edilen ürenin daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir [120].

Rasyonlara katılan üre miktarlarının artmasıyla birlikte ruminal amonyak düzeyleri de artmaktadır. Üre içeren rasyonlarla beslenen hayvanlarda rumendeki amonyak düzeylerinin, bitkisel protein içeren rasyonlar ile beslenenlere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Protein sentezinde kullanılan amonyak miktarını etkileyen faktörlerden birisi de amonyağın serbest kalma hızıdır. Protein ve NPN bileşiklerinin hızla yıkılmaları sonucu rumende amonyak yoğunluğunun aniden artması sonucunda amonyağın büyük bir kısmı bakteriler tarafından kullanılamaz ve rumen duvarından emilir.

Yem maliyetleri süt, et, ve yapağı üretiminde önem teşkil etmektedir. Yem maliyetlerini azaltmak için öncelikle üre olmak üzere farklı NPN bileşikleri rasyonlarda pahalı protein kaynaklarının yerine kullanılabilir. NPN bileşikleri tahıllarla, konsantre yemlerle ya da kaba yemlerle karıştırılarak hayvanlara verilebilir [132, 133].

İlave edilen üreden maksimum fayda sağlanabilmesi ve olabilecek toksik etkilerin önlenmesi için üreli yemlerin hazırlanmasında bazı hususlara özen gösterilmesi gerekmektedir.

Buna göre üre;

- Yeme homojen olarak karıştırılmalıdır
- Hayvanların üreli yeme alışma periyodu dikkate alınmalıdır
- Melas ve tahıl yemleri gibi kolay çözünebilir enerji kaynaklarıyla beraber kullanılmalıdır
- Yüksek enerjili ve düşük protein içeren yemler ile birlikte verilmelidir
- Rasyonlarda yeterli miktarda mineral maddeler bulunmalıdır.

Üre, higroskopik yapıda bir bileşik olduğundan topaklanma meydana gelebilir. Bunun için yemin her noktasında eşit miktarda üre bulunmasına dikkat edilmelidir. Ruminantların üreden en iyi şekilde yararlanabilmeleri için rumen bakterilerinin bu bileşiklere alıştırılması gerekir. Bunun için bir adaptasyon süresi gereklidir ve üreli yemler hayvanlara alıştırılarak verilmelidir. Ayrıca üre hayvanın mineral madde ihtiyacını da karşılayabilecek bir rasyonla verilmelidir [134].

#### **2.15.1. Ürenin Toksik Etkisi**

NPN bileşiklerinin ruminant rasyonlarında hayvan sağlığına zarar vermeden kullanılabilmesi için gerekli şartları belirlemek amacıyla bir çok araştırma gerçekleştirilmiştir [122, 124]. Azot kaynağı olarak üre kullanılan rasyonlarla beslenen hayvanlarda, kandaki amonyak miktarının aniden yükselmesi üre zehirlenmesinin bir göstergesidir [135]. Üre, ruminantlara yüksek enerjili rasyonlar ile beraber verildiğinde toksik değildir ve hayvan tarafından daha iyi değerlendirilmektedir. Üre zehirlenmesi yüksek düzeyde üre kullanımı ile ilgili bir problemdir. Üre zehirlenmeleri, hazırlanan yemin homojen karıştırılmaması veya rasyona eklenecek üre miktarının yanlış hesaplanmasından kaynaklanmaktadır. Rasyona uygun miktarda üre katıldığında ve homojen bir şekilde karıştırıldığında herhangi bir problem görülmemektedir [136]. Üre zehirlenmesi sık soluma, huzursuzluk, aşırı salivasyon, tremorlar, inkoordinasyon, şişkinlik ve tetani ile karakterizedir [137]. Üre zehirlenmesi görülen hayvanlarda rumen pH'sı ve kan amonyak düzeyinde ani bir artış gözlenmektedir. Rumen pH'sı 8 civarına çıktığında rumenin normal fonksiyonları durmaktadır. Kan amonyak düzeyinin 5 mg/100 ml üzerine çıkması halinde ise hayvanlar genellikle ölmektedir [138].

#### **2.16. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimler, biyoteknoloji, ilaç, gıda ve tekstil gibi çeşitli alanlarda farklı amaçlar için kullanılmaktadırlar. Ancak enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız yapıda olması bilim adamlarını enzimleri daha kullanışlı hale getirmek için araştırmalara yöneltmiştir. Bundan dolayı son yıllarda immobilize enzimler araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir [139].

İmmobilizasyon; suda çözünmeyen bir taşıyıcıya enzimlerin kimyasal veya fiziksel olarak bağlanması, enzimin suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona katılması ve suda çözünmeyen bir matrikste tutuklanmasıdır [140].

İmmobilize enzimler adlandırılırken daha önce, ‘bağlanmış enzim’, ‘suda çözünmeyen enzim’, ‘matrikse bağlı enzim’, ‘tutuklanmış enzim’ gibi terimler kullanılmıştır. Ancak 1971 yılında 3. Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1. Enzim Mühendisliği konferansında ‘immobilize enzim’ önerilerek kabul edilmiştir.

Enzim immobilizasyonu için doğal ya da sentetik pek çok membran kullanılabilir [141, 142, 143, 144]. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer bir madde olabilir. Ayrıca taşıyıcı şu özellikleri taşımalıdır; hidrofilik karakter, mekanik stabilite, gözenekli yapı, kimyasal ve termal stabilite, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, ucuzluk, zehirsizlik, rejenere olabilme [145].

## **2.17. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar**

### Organik Taşıyıcılar:

- 1) Doğal polimerler:
  - Polisakkaritler: selüloz, dekstranlar, agar, kitin, agaroz, aljinat
  - Proteinler: kollojen, albumin
  - Karbon
- 2) Sentetik polimerler:
  - Polistiren
  - Diğer polimerler: poliamidler, poliakrilamidler, vinil ve allil polimerler, poliakrilat polimetakrilatlar

### İnorganik Taşıyıcılar:

- Doğal mineraller: Bentonit, silika
- İşlem materyalleri: Cam (gözeneksiz ve kontrol edilmiş gözenekli), gözenekli metal oksitler ve metaller [146].

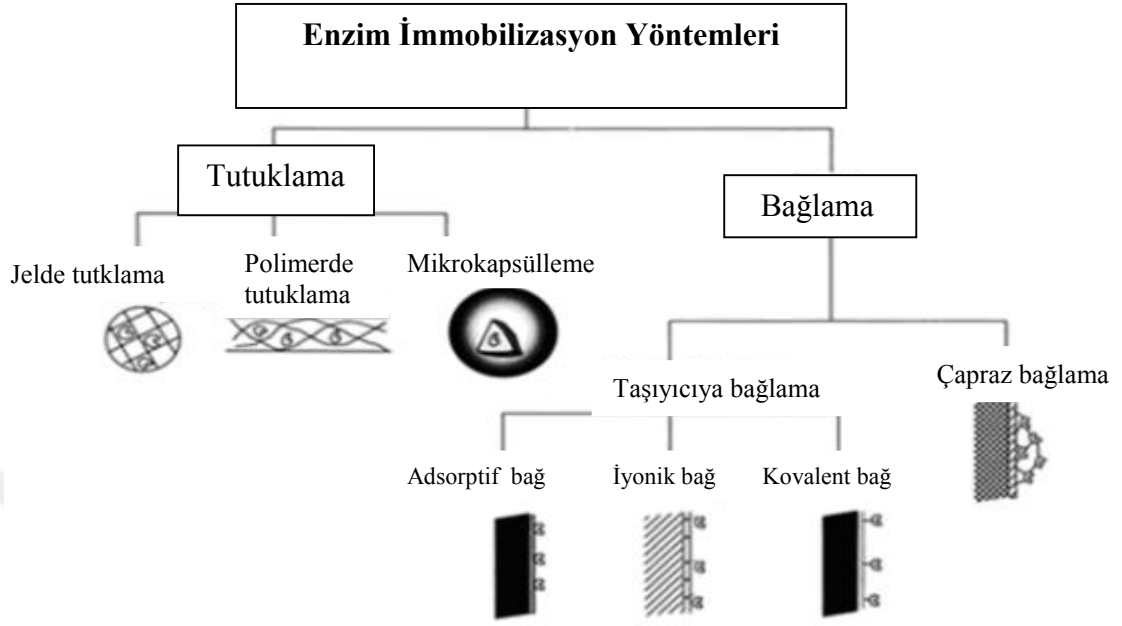
## 2.18. İmmobilize Enzimlerin Özellikleri

- Serbest enzimlere göre daha kararlı yapıya sahiptirler.
- Tekrar tekrar kullanılabilirler.
- Reaksiyonun sonunda ortamdaki kolay bir şekilde uzaklaştırılabildikleri için ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir sorun meydana gelmez.
- pH, sıcaklık gibi çevresel koşullara daha dayanıklıdırlar.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.
- Çalkalama, karıştırma gibi işlemlerde enzim zarar görmez [147].

## 2.19. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler immobilize edilirken yumuşak koşullarda çok dikkatli olunmalıdır. Aksi halde enzimin aktif merkezi zarar görebilir ve aktivite kaybına neden olabilir. Yüksek sıcaklık, organik çözücüler, yüksek tuz konsantrasyonu, kuvvetli asidik ya da alkali ortam enzimin denatüre olmasına neden olabilir. Enzim immobilizasyon metotları farklı şekillerde sınıflandırılabilir [148, 149].





Şekil 2.18. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri [150].

## 2.19.1. Bağlama Yöntemleri

### 2.19.1.1. Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcıya bağlama yönteminde, enzim taşıyıcıya kimyasal (iyonik veya kovalent) veya fiziksel olarak (adsorptif) bağlanır. Taşıyıcı, enzimin yapısına göre seçilir. Ayrıca, partikül büyüklüğü, yüzey toplamı, taşıyıcının kimyasal yapısı da dikkate alınır. Enzimin immobilizasyondan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısıyla yakından ilgilidir [151].

### 2.19.1.2. Kovalent Bağlama

Bu yöntemde enzim ile taşıyıcı arasında kovalent bağ oluşumu meydana gelir. Bu bağ, taşıyıcıdaki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasit artıklarına ait fonksiyonel gruplar arasında meydana gelir. Yöntemin gerçekleşmesi oldukça zordur. Enzim ile taşıyıcı arasındaki kuvvetli bir bağlanma olduğundan enzim aktivitesinde artış gözlemlenebilir [152]. Taşıyıcı materyale enzimin kovalent olarak bağlanması iki aşamada gerçekleştirilir. Birinci aşamada taşıyıcı özel reaktiflerle aktifleştirilir, ikinci aşamada

ise enzimin kovalent bağlanması gerçekleştirilir. Kovalent bağlamada en fazla yer alan fonksiyonel gruplar arasında amino (NH<sub>2</sub>) grupları (arginin, histidin, lizin), karboksil (COOH) grupları (aspartik asit ve glutamik asit), hidroksil (OH) grupları ( tirozin, treonin ve serin) ve sülfidril (SH) grupları (sistein) örnek verilebilir [153, 154].

### **2.19.1.3. İyonik Bağlama**

Bu bağlama yönteminde enzim suda çözünmeyen taşıyıcıya iyonik olarak bağlanır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağdan daha zayıftır. Bu nedenle enzim kaçıışı meydana gelebilir. Bu yöntemde dietilaminoetil türevleri, karboksimetil türevleri ve trietilaminoetil türevleri destek materyali olarak kullanılır. Enzimin konformasyonel değişimi çok az olduğundan enzim aktivitesi oldukça yüksektir. İyonik bağlama metodu basit ve geri dönüşümlüdür. Ancak, bu metod ile enzimin hem güçlü bağlandığı hem de aktivitesini koruduğu koşulları bulmak zordur [155].

### **2.19.1.4. Adsorpsiyon**

Bu yöntemde enzim destek materyaline Van Der Waals etkileşimleri, iyonik bağ ve hidrojen bağı gibi elektrostatik etkileşimlerle bağlanır. Taşıyıcı suda çözünmeyen ve adsorpsiyon özelliklerine sahiptir ve enzim ile uygun koşullarda bağlanır ve immobilizasyon işlemi gerçekleşir. Bu yöntem hızlı, ucuz ve basit olmasıyla avantaj sağlar, ancak enzimle taşıyıcı arasındaki bağ kuvvetli olmazsa, serbest enzim reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletebilir [156].

### **2.19.1.5. Çapraz Bağlama**

Enzim molekülleri bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktifler ile bağ meydana getirerek suda çözünmeyen kompleksler oluştururlar. İmmobilizasyon ve çapraz bağlanma derecesi, protein ve reaktif konsantrasyonuna pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır [157]. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu basit bir yöntem olmasına rağmen, enzimlerdeki fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların oluşturulması oldukça zordur. Enzim aktivitesi reaksiyon süresi, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, enzim

konsantrasyonu ve çapraz bağlayıcı maddeler gibi faktörlere ve bu faktörler arasındaki dengeye bağlıdır [158].

## **2.19.2. Tutuklama Yöntemleri**

### **2.19.2.1. Polimerde Tutuklama**

Bu yöntemde polimer yapıdaki taşıyıcı enzimin dışarı çıkışına izin vermezken, substratın girişine izin verir. İmmobilize enzim küre, silindir veya tabaka gibi istenilen formda elde edilebilir. Taşıyıcı matrikste tutuklama yöntemi endüstriyel uygulamalarda sıkça kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntem çeşitli fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevlerinin hazırlanmasına olanak verir. Enzim tutuklamak için en yaygın kullanılan matrisler silika jel, poliakrilamid ve polivinil alkolüdür [159].

### **2.19.2.2. Jelde Tutuklama**

Jelde tutuklama yönteminde enzim yarı geçirgen membran ile üç boyutlu olarak sarılır. Bu yöntem substratı makromoleküller olan enzimler için uygun değildir çünkü membran substratın geçişine izin vermez ve reaksiyon gerçekleşemez. Bu yöntemlerin kombinasyonlarında immobilizasyon yöntemi olarak kullanılabilir [160].

### **2.19.2.3. Mikrokapsülleme**

Mikrokapsülleme yönteminde, enzim molekülleri yarı geçirgen polimer membranlar içinde hapsedilmektedir [155]. Mikrokapsüllemeye herhangi bir kimyasal bağlanma meydana gelmediğinden immobilize enzim aktivitesi serbest enzime yakındır [161]. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey hacim oranına ulaşıldığı için mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonu olasılığı artmaktadır. Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasını engellerken, küçük substrat ve ürünlerin giriş çıkışına izin verir. Bu yöntemin dezavantajlarından biri mikroenkapsülasyon sırasında enzimin bazen inaktive olabileceği için yüksek enzim konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmasıdır. Bunun yanı sıra, enzimi hapsedebilmek için, gözenek boyutunun çok düşük olması gerekmektedir [155, 162].

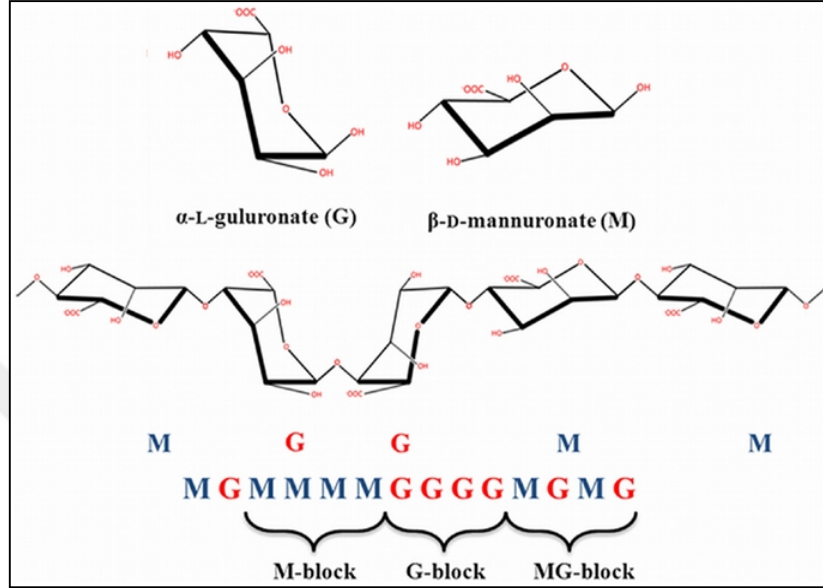
## **2.20. İmmobilizasyon İçin Taşıyıcı Seçimi**

İmmobilizasyon için taşıyıcı belirlerken, maliyet, güvenilirlik, kararlılık ve aktivitenin korunması gibi konulara dikkat edilmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında bir bağlanma söz konusuysa bu bağlanmanın aktif merkezi etkilememesine dikkat edilmelidir. İmmobilizasyon yöntemi seçilirken özellikle enzim aktivitesinin en yüksek düzeyde korunduğu yöntem seçilmelidir. Kovalent bağlama ile immobilizasyon yönteminde enzim taşıyıcıya çok sıkı bağlandığından aktivite ve kararlılık büyük ölçüde korunmaktadır [152].

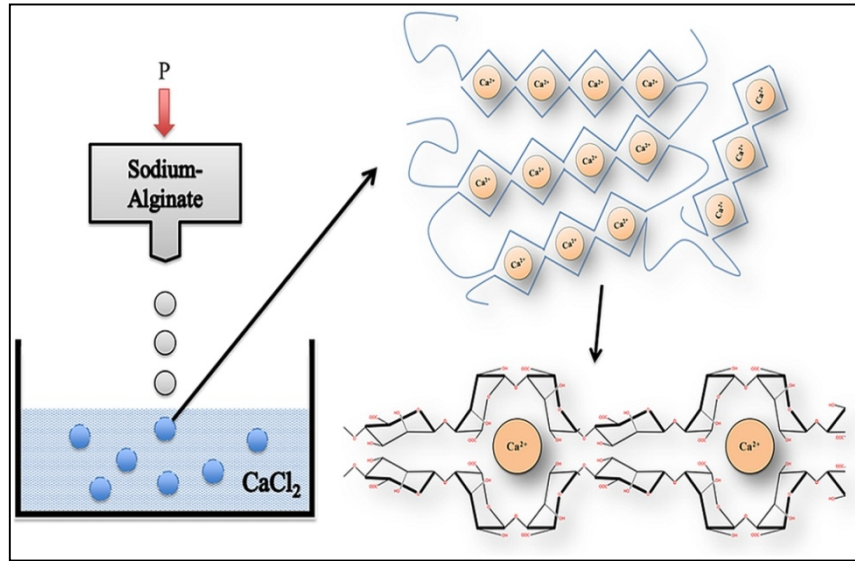
### 2.20.1. Doğal Bir Taşıyıcı Olarak Aljinat

Aljinat ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.E.C Stanford tarafından tanımlanmıştır. *Azotobacter vineelandi* gibi toprak bakterilerinde ve bazı *Pseudomonas* türlerinde de aljinat benzeri hücre dışı polimerik maddeler belirlenmiştir. Ancak aljinat doğada genel olarak kahverengi deniz alglerinde bulunmaktadır [163]. Aljinat, kahverengi deniz alginin kuru maddesinin yaklaşık % 40'ını oluşturur ve hücre içi matrikste sodyum, kalsiyum, magnezyum, stronsiyum ve baryum iyonları içeren bir jel halinde bulunur [10]. Aljinik asit,  $\alpha$ -L-guluronikasit ve  $\beta$ -D-mannuronik asidin 1,4 glikozit bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir kopolimerdir (Şekil 2.19). Mannuronik ve guluronik asit oranı algin türüne, mevsime ve yetiştiği yere göre değişebilir. Aljinatlar  $\beta$ -1,4-D-mannuronik asit bloğu ve  $\alpha$ -1,4-L-guluronik asit bloğu ve karışık bloklardan meydana gelir. Genellikle G bloğu oranı yüksekse aljinatın basınca dayanıklılığı artar fakat kırılabilir jeller meydana gelir. G bloğunun oranı düşükse aljinatın yapısı basınca dayanıksız fakat jelin yapısı esnektir. Aljinat'ın alg dokularındaki rolünün esneklik ve dayanıklılık vermek olduğu düşünülmektedir. Aljinik asidin sodyum tuzlarının biyoteknolojik çalışmalarda immobilizasyon materyali olarak kullanımının yanı sıra yüksek emme gücü sayesinde sanayi alanında, su tutucu, viskoziteyi arttırıcı, stabilize edici olarak da kullanılır [164, 165]. Ayrıca protein, ilaç, hücrelerin salımı ve tutuklanması, doku ve organların onarımı için matriks olarak da kullanılırlar [166]. Biyouyumluluğu, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve kalsiyum ve magnezyum gibi kationlar varlığında jelleşmesi bu polimerin uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Kalsiyum aljinat jelinin oluşumu yumuşak koşullarda gerçekleştiği için canlı hücrelerin immobilizasyonu için de çok uygundur. İmmobilizasyon yönteminde sodyum aljinat ile karıştırılan enzim veya hücreler  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılarak oluşan

Ca-aljinat jel kürecikler içine hapsedilir. Jel oluşumu sırasında sodyum iyonlarıyla kalsiyum iyonları yer değiştirir ve bu şekilde suda erimeyen Ca-aljinat kürecikler meydana gelir [167, 168].  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarıyla aljinat zinciri iyonik çapraz bağ oluştururlar. Bu oluşum yumurta kutu modeliyle gösterilmektedir ( Şekil 2.20).



Şekil 2.19. Aljinat Polimerinin Yapısı [169].

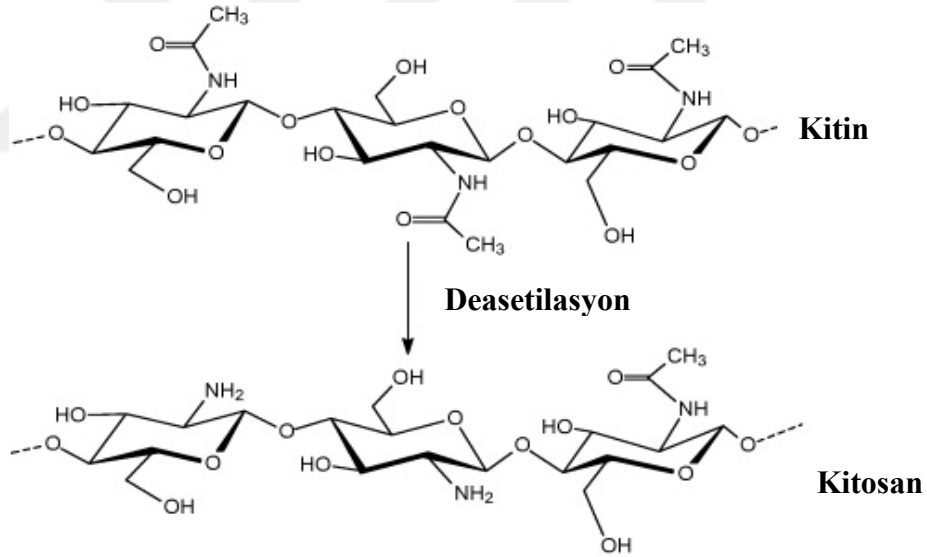


Şekil 2.20. Yumurta Kutu Modeli [170].

### 2.20.2. Kitosan

Doğrusal ve uzun yapıya sahip bir polisakkarit olan kitin genel olarak yengeç, karides, midye gibi deniz canlılarının kabuklarında bulunur. Ayrıca çekirge, sinek ve bazı böceklerin kabuklarında yer alır. Kitin tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca kitin sülfatlar antikoagülan olarak kullanılırlar. Kitosan, kitinin alkali deasetilasyonu ile meydana gelen amorf yapıya sahip bir polisakkarittir. (Şekil 2.21) Kitosan üretimi için hammadde olarak kitin kullanılır. Yapısında bulunan serbest amin grupları ve hidroksil grupları sayesinde fonksiyonel gruplu polimerlerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Kitosan ABD ve Japonya’da ticari olarak tonlarca üretilmektedir.

Kitosan, ilaç üretiminde, biyomedikal mühendisliğinde, gıda ve tekstil endüstrisinde, kozmetik, kağıt üretimi, atık su işlemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir [171].

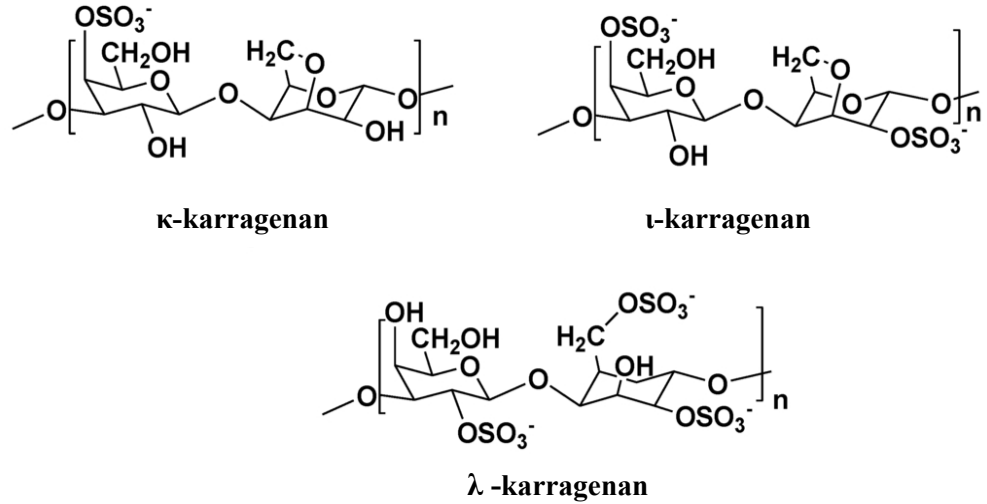


Şekil 2.21. Kitin ve Kitosanın Yapısı [172].

### 2.20.3. Karragenan

Karragenan yaygın olarak *Gigartina mamillosa* ve *Chondrus crispus* adlı kırmızı alglerden elde edilen lineer bir polisakkarittir. Bu algler Amerika’nın kuzey doğu kıyılarında ve Kuzey İrlanda da yetişir. Karragenan *kappa* ( $\kappa$ ), *iota* ( $\iota$ ) ve *lambda* ( $\lambda$ ) olmak üzere üç farklı formda bulunur (Şekil 2.22).

Kappa formu (1,3)-β-D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro-α-D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşur. İota formu (1,3)-β-D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro-α-D-galaktopiranoz-2-sülfat birimlerinden oluşur, λ-karragenan ise (1,3)-β-D-galaktopiranoz-2-sülfat-(1,4)-α-D-galaktopiranoz-2,6-disülfat birimlerinin tekrarlanmasıyla meydana gelir [173]. Karragenan antikoagülan etkilidir, ayrıca göğüs yumuşatıcı ve emülsiyon yapıcı etkisi bulunmaktadır. Gıda sanayiinde, dondurma, ekmek ve konserve yapımına kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır [174].



Şekil 2.22. Kappa, İota ve Lambda Karregenana [175].

#### 2.20.4. Selit

Selit *Diyatome* denilen tek hücreli mikroskobik alglerin fosilleşmiş silisli kabuklarından elde edilir. Ayrıca selite ‘diyatoma toprağı’ veya ‘diyatomit’ de denilmektedir. *Diyatome*’ların iskeleti silika denen doğal bir maddeden oluşur. Bu canlılar yüzyıllar boyunca göllerde, okyanuslarda ve nehirlerde birikirler ve silika olarak insanlar tarafından kullanılırlar. Dünyada bulunan diatomit rezervi mevcut istatistik bilgilere göre 1 milyar ton civarındadır. Dünya diatomit rezervinin 200 milyon ton civarındaki bir kısmının ülkemizde bulunduğu düşünülmektedir. Silika doğada kum,

mika, kuartz ve kil yapısında bulunur saf olarak bulunmaz. Ayrıca oksijen ve su ile reaksiyona girerek silikondioksit oluşturur. Silikondioksit ise amorf ve kristal form oluşturur. Sıvı emme kapasitesi çok yüksek olan selit, işlenmemiş halde ağırlığının 3-4 katı, kalsinasyondan sonra ise ağırlığının yaklaşık 5-10 katı kadar su emebilir. Porozif bir yapıda olması nedeniyle spesifik yüzey alanı oldukça yüksektir. Selit enzim ve proteinlerin bivalent katyonlarına bağlanabilmesi, ucuz olması ve immobilizasyon için uygun fiziksel yapısı nedeniyle pek çok immobilizasyon çalışmasında kullanılmaktadır [176, 177]. Avrupa ve Amerika'da selit katkı ve izolasyon maddesi olarak uzun yıllar kullanılmıştır. Ayrıca günümüzde pestisit üretiminde, filtrasyon işlemlerinde, hafif yapı malzemesi ve seramik hammaddesi olarak kullanılmaktadır [178].





## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan sodyum aljinat Fluka, BSA (sığır serum albumini) Sigma firmalarından, diğer malzemeler Merck, Aldrich, Sigma, Fluka, Pharmacia Fine Chemicals firmalarından temin edildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Ependorf tüpü

Spor (Tüp taşıyıcı)

Petri (steril)

Beher (500 ml)

Santrifüj tüpü

Pipet ucu

Kalaycı pamuğu

Sartorius minisart single filtre

Milex syringe filter units, disposable, durapore PVDF pore size 0,45 micro meter, filter diam 33mm, Y-irradiated

Terazi (Sartorius)

pH metre (Hanna)

Çalkalamalı su banyosu (DAIHAN)

Sonikatör (Bandelin UW/2200)

Manyetik karıştırıcı (IDL)

Etüv (Sanyo)

Buzdolabı (ev tipi)  
Derin dondurucu (-80) (Wise Cryo)  
Vortex (IDL)  
Blender (Waring)  
Santrifüj (Heraeus)  
Spektrofotometre (UV/VIS CECİL)

### 3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler

Üreaz aktivitesi tayini için hazırlanan Nessler reaktifi:

Çözelti 1: 10 gr civa iyodür ( $HgI_2$ ) ve 7 gr potasyum iyodür (KI) 40 mL distile suda çözüldü.

Çözelti 2: 16 gr NaOH 50 mL distile suda çözümlenerek  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de soğutuldu.

Çözelti 1 ve çözelti 2 yavaş bir şekilde karıştırılarak 100 mL'ye tamamlandı.

Tampon hazırlamak için gereken çözeltiler:

- 50 mM Tris çözeltisi
- 50 mM HCl çözeltisi
- 50 mM Borik asit
- 50 mM NaOH
- 0.1 M Asetik asit
- 0.1 M NaOH

Protein tayini için hazırlanan çözeltiler:

- Sığır serum albümini (% 0.1)
- Bradford reaktifi

Bradford Reaktifi: Comassie Brilliant Blue G-250 (50 mg) içine 50 mL orto-fosforik asit ve 25 mL etanol eklenerek 10 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti Whatman no:1 filtre kağıdı ile süzüldü. Koyu renkli şişede  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı

### 3.1.4. Üreaz Kaynaklarının Temini

Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesinden çeşitleri Noyan, Yunus 90, Akman, Önceler, Yunus olmak üzere 5 çeşit fasulye, Edirne Tarımsal Araştırma Enstitüsünden Gökçe, Hisar, ILC-95, Sovhozni-14, Myles olmak üzere 5 çeşit nohut, Havsa Ziraat Odası'ndan mısır (Cadız) ve Horoz çeşidi fasulye örnekleri temin edildi. Çalışmada kullanılan fungus türleri Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edildi, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus ocraceus*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus fumigatus* türleri taranarak en yüksek üreaz aktivitesine sahip olan tür seçildi. Bakteriyal üreaz çalışmaları için ise topraktan izole edilmiş 2 farklı *Bacillus sp.* türü Uludağ Üniversitesi'nden ve klinik izolatlardan olan *E.coli*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.* ve *Proteus mirabilis* ise Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Bitkisel Kaynaklı Üreaz İzolasyonu

Elde edilen bitki tohum örnekleri Waring marka blender ile kırık parçalar haline getirildi. pH 7.0 tris HCl tamponunda 24 saat bekletildi, daha sonra manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı ve süzme işleminin ardından soğutmalı santrifüjde 12000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatant kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

### 3.2.2. Fungus İçin Kullanılan Besiyeri

Temin edilen fungus örnekleri PDA (potato dextrose agar) besiyerine ekilerek 25 °C'de 5 gün inkübe edildi ve elde edilen fungus kültürleri çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi. Stok kültürler pasaj yapılarak yenilendi.

### 3.2.3. Fungal Üreaz Üretim Ortamının Hazırlanması

Funguslardan üreaz üretimi için, tek azot kaynağı olarak üre içeren aşağıda içeriği verilen sıvı üreaz üretim besiyerleri üre içermeyecek şekilde hazırlandı [18]. 250 mL erlene 50 mL olacak şekilde hazırlanan besiyerleri 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril

edildi. Daha sonra milipor filtre ile steril edilmiş üre çözeltisi % 2 olacak şekilde besi ortamlarına eklendi.

Glukoz.....	20 gr
Üre.....	2.26 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	13.3 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.348 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.5 gr
CaCl <sub>2</sub> .....	0.3 gr
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.032 gr

#### **3.2.4. Üreaz Üretim Ortamlarına Fungus Sporlarının Ekilmesi**

PDA besiyerinde üretilen fungus sporları % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile süspanse edildi. 250 mL'lik erlenmayerlere 50 mL olacak şekilde hazırlanan üreaz üretim besiyerlerine 10<sup>5</sup> spor/ mL olacak şekilde ilave edilerek ekim yapıldı. Daha sonra ekim yapılan besiyerleri çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de 130 rpm'de 5 gün boyunca üremeye bırakıldı.

#### **3.2.5. Fungal Enzim İzolasyonu**

Üreaz üretim besiyerlerinde üremeleri tamamlanan fungus miçelleri çift katlı tülbentten süzülerek 2 şer kere distile su ile yıkandı ve sıkıştırılarak süzüldü. Miçellerin yaş ağırlıkları gram cinsinden tartıldı. Daha sonra miçeller – 80 °C'de bir gece boyunca donduruldu. Ertesi gün miçeller oda sıcaklığında çözüldü ve pH 7.0 Tris HCl tamponu eklenip porselen havanda buz içinde ezilerek homojenize edildi. Elde edilen homojenat çift katlı tülbentten süzüldü ve 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı [179].

#### **3.2.6. Bakteriyel Üreaz Üretim Ortamının Hazırlanışı ve Üretimi**

Çalışmalar sırasında kullanılan bakteri örnekleri Nutrient agar içeren yatık agarlarda üretildi ve kullanılmaya kadar +4 °C'de saklandı. Bakteriyel üreaz üretim ortamları aşağıda içeriği verildiği gibi hazırlandı [180]. Üre içermeyen besiyerleri

otoklavda 15 dakika süreyle steril edildi. Üre ise milipor filtre ile steril edildikten sonra 250 mL'lik erlenmayerlerde toplam hacim 50 mL olacak şekilde eklendi. Bakteri örnekleri % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile süspanse edilerek  $5.3 \times 10^4$  / mL hücre içerecek şekilde ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de 130 rpm'de 48 saat boyunca üremeye bırakıldı.

#### Üretim Ortamı İçeriği (500 mL için):

Glukoz.....	10 gr
Üre.....	2.5 gr
Pepton.....	5 gr
Yeast ekstrakt.....	2.5 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.025 gr
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.032 gr

#### **3.2.7. Bakteriyel Üreaz İzolasyonu**

Üretimi tamamlanan bakteri örnekleri santrifüj edilerek besiyerinden ayrıldı (15 dakika 12000 rpm). Elde edilen bakteri örnekler distile su ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Bu kez üzerlerine 2.5 mL Tris-HCl pH 7.0 tamponu eklendi ve baget ile karıştırıldı, bu karışım bir erlenmayerde toplandı ve sonikatörün gücü % 60'a ayarlanarak 5 kez 1'er dakika sonike edilerek hücreler parçalandı. Son olarak santrifüj işlemi (15 dk 12000 rpm) yapıldı ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı [180].

#### **3.2.8. Üreaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

Bitki, fungus ve bakteri olmak üzere üç farklı kaynaktan izole edilen üreaz enzimlerinin aktivite tayinleri Nessler metoduna göre yapıldı [181]. Çalışmamızda 50 mM pH 7.0 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak % 1'lik (w/v) üre çözeltisi kullanıldı.

Bitki için 1 mL serbest enzim (fungus için: 500 µL, bakteri için 100 µL) ya da 0.5 gr immobilize enzim, 2.5 ml üre ve 2.5 ml Tris-HCl tamponu kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım bitki için 50 °C’de 40 dakika (fungus için: 40 °C’de 30 dakika, bakteri için 40 °C’de 40 dakika) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µL Nessler reaktifi eklenerek 10 dakika beklendi ve örneklerin absorbans değerleri köre karşı 425 nm de spektrofotometrede ölçüldü. Enzim aktiviteleri amonyum kalibrasyon eğrisi kullanılarak U/mL cinsinden hesaplandı. Kör, kontrol ve örnek tüpleri Tablo 3.1’deki gibi hazırlandı. Bir ünite enzim; standart koşullarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarı olarak tanımlandı.

**Tablo 3.1.** Kör, Kontrol ve Örnek Tüplerinin Hazırlanması

	Kör Tüpü	Kontrol Tüpü	Örnek Tüpü
Tampon (pH 7.0 Tris-HCl)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Üre (%1)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Bitki Üreazı	-	1 mL	1 mL
Fungus Üreazı	-	500 µL	500 µL
Bakteri Üreazı	-	100 µL	100 µL
Nessler Reaktifi	100 µL	100 µL	100 µL

### 3.2.9. Bradford Metodu ile Kantitatif Protein Tayini

Çalışmada *Cicer arietinum*, *Aspergillus fumigatus* ve *Proteus mirabilis* üreazlarının izolasyonu ve aljinata immobilizasyonu basamaklarında protein tayinleri Bradford Metodu’na göre yapıldı. Bradford yönteminde Commassie Brilliant Blue G-250’nin protein renklendirme özelliğinden yararlanır. Bu organik boyar madde negatif yüklüdür ve proteindeki pozitif yüklere bağlanır. Boya proteine bağlandığında mavi bir renk meydana gelir [182].

Bradford metodu için gerekli çözeltilerin hazırlanması:

Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi: Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinin hazırlanışı çözelti hazırlama kısmında anlatıldığı gibi hazırlandı.

Stok ve standart protein çözeltilerinin hazırlanması: % 0.1'lik BSA çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanarak protein standart grafiği çizildi. Standart grafik için % 0.1'lik BSA'dan sırasıyla 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl alınarak son hacimleri distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Protein tayini yapılacak örneklerden de 100'er µl çekilerek her birine 5 mL Bradford reaktifi eklenerek vortekslendi. Örnekler ve standart protein çözeltileri 10 dakika beklenecek şekilde tekrar vortekslendi ve absorbans değerleri 595 nm'de okundu. Kör olarak 100 µl distile su kullanıldı. Standart protein çözeltilerinin optik dansite değerleri ile konsantrasyonlarını gösteren grafik çizildi. Bu grafik yardımıyla protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin optik dansite değerlerinden protein miktarları belirlendi.

### **3.2.10. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzim immobilizasyon çalışmaları en uygun enzim kaynağı olarak belirlenen örnekler ile gerçekleştirildi. Buna göre bitkisel kaynak *Cicer arietinum*, fungal kaynak *Aspergillus fumigatus*, bakteriyel kaynak ise *Proteus mirabilis* olarak belirlendi. Bundan sonra belirtilen tüm yöntem ve parametreler bu üç kaynağın enzimleri için gerçekleştirildi. Uygun immobilizasyon yöntemini (desteğini) belirlemek amacıyla 3 farklı yöntem (destek) kullanıldı. En yüksek verimin aljinatta elde edildiği belirlendi.

### **3.2.11. Üreaz Enzimlerinin Aljinata İmmobilizasyonu**

- Tüm enzim kaynakları için eşit miktarlarda üreaz enzimi ve sodyum aljinat çözeltileri kullanılarak son hacim % 3 olacak şekilde enzim-aljinat karışımı hazırlandı.
- Elde edilen karışım bir medikal enjektör yardımıyla buz içerisine oturtulmuş CaCl<sub>2</sub> (% 3; w/v) çözeltisi içine damlatıldı. Bu sayede enzim içeren aljinat boncuklar elde edildi.
- Boncuklar manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 50 dakika olgunlaşmaları için buzdolabında bekletildi.

- Olgunlaşan boncuklar süzülerek, soğuk Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.0) ile yıkandı.
- Serbest enzim ve süzüntülerin protein tayini Bradford metoduna göre yapıldı [182]. İmmobilizasyon verimi aşağıda verilen formülden hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = a_{\text{imm}} / a_{\text{ser}} \times 100$$

$a_{\text{imm}}$  = İmmobilize enzim spesifik aktivite ( U/ mg protein)

$a_{\text{ser}}$  = Serbest enzim spesifik aktivite ( U/ mg protein)

### 3.2.11.1. Üreaz Enzimlerinin Kitosana İmmobilizasyonu

Kitosan üzerine immobilizasyon çalışmasında sırasıyla;

- 200 mg kitosan 8 mL (% 1) asetik asit içinde çözüldü.
- Üzerine 2 mL enzim çözeltisi eklendi.
- Karışım 30 dakika +4 °C’de buzdolabında bekletildi.
- Çözelti enjektör ile 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda hazırlanan % 0.4’lük pentasodyum trifosfat damlatma çözeltisine damlatıldı.
- Meydana gelen boncuklar 75 dakika bu çözeltide bekletildi.
- Sertleşen boncuklar süzülerek 2 kere tamponla yıkandı.
- Boncuklarda aktivite tayini gerçekleştirildi [183].

### 3.2.11.2. Üreaz Enzimlerinin Selite İmmobilizasyonu

- 1.5 gram Selit tartıldı ve 10 mL enzim çözeltisi içinde 90 dakika buz üzerinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
- 10 mL soğuk aseton ilave edilerek 45 dakika bekletildi.
- Filtre kağıdından süzme işlemi yapıldı.
- İmmobilize enzim 10 mL soğuk aseton ile yıkanarak süzme işlemi gerçekleştirildi.
- Aseton evaporatörde uçurularak süzüntü protein tayini için saklandı.
- İmmobilize enzim süzgeç kağıdında bekletilerek iyice kuruması sağlandı ve aktivite tayini yapıldı [184].



### **3.2.12. Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu**

#### **3.2.12.1. Aljinat Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi**

İmmobilizasyon sırasında kullanılan aljinat miktarının bitki, fungus ve bakteri üreazlarının aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 10 mL enzim çözeltileri için sırayla % 1, 2, 3, 4'lük oranlarda ve yine sırasıyla 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 gr sodyum aljinat tartılarak enzim çözeltileri içinde çözüldü. Bir enjektör kullanılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki % 3'lük 50 mL CaCl<sub>2</sub> çözeltisine damlatıldı. İmmobilize boncuklar 1 saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek tampon ile yıkandı. Süzüntü protein tayini için saklandı. Boncukların üreaz aktivitesi tayin edildi.

#### **3.2.12.2. Yüklenen Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi**

Aljinat küreciklere immobilize edilen enzim miktarının enzim aktivitesine etkisini araştırmak için, direkt ve farklı oranlarda dilüe edilmiş enzim çözeltileri % 3'lük sodyum aljinat ile yavaşça karıştırılarak çözüldü. Bir medikal enjektör ile % 3'lük 50 mL CaCl<sub>2</sub> çözeltisine damlatılarak aljinat boncuklar elde edildi ve 1 saat buzdolabında +4 °C'de bekletildi. Bu aşamadan sonra *Cicer arietinum* üreazı için optimum sıcaklık olan 50 °C'de ve optimum süre olan 40 dakika inkübe edilerek aktivite tayini yapıldı. Sırasıyla *Aspergillus fumigatus* üreazı için 40 °C'de 30 dakika inkübasyon ile aktivite tayini yapılırken *Proteus mirabilis* üreazı için ise optimum şartlar olan 40 °C'de 40 dakika inkübe edilerek aktivite tayini yapıldı.

#### **3.2.12.3. İnkübasyon Süresinin Enzim Aktivitesine Etkisi**

Farklı kaynaklardan izole edilen serbest ve immobilize enzim örneklerinin üreaz aktivitelerinin zamana bağılı değişimini araştırmak amacıyla değişik sürelerde inkübe edilerek (10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika) aktivite tayini gerçekleştirildi. İnkübasyon şartları bitki için 50 °C'de, fungus ve bakteri için 40 °C'de pH 7.0 olarak gerçekleştirildi.

#### **3.2.12.4. pH'ın Enzim Aktivitesine Etkisi**

Serbest ve immobilize üreaz enziminin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi araştırmak amacıyla farklı pH'larda hazırlanmış tampon çözeltileri kullanılarak aktivite tayini

yapıldı. (Asetat tampon: pH 5.0, Tris-HCl tamponu: pH 6.0, 7.0, 8.0 ve Borat tamponu: pH 9.0, 10.0). Substrat olarak pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlanmış % 1'lik üre çözeltisi kullanıldı. Aktivite ölçümleri sonunda enzim aktiviteleri bağıl aktivite olarak hesaplandı. İnkübasyon şartları bitki için 50 °C'de 40 dakika, fungus için 40 °C'de 30 dakika, bakteri için 40 °C'de 40 dakikadır.

### **3.2.12.5. pH Kararlılık Çalışması**

Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılıklarını belirlemek için, tüm enzim örnekleri farklı pH'larda substrat içermeyen tamponlarda +4 °C'de 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda enzim aktiviteleri ölçülerek pH kararlılıkları belirlendi.

### **3.2.12.6. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi**

Farklı inkübasyon sıcaklıklarının serbest ve immobilize üreaz enzimleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla substrat olarak % 1'lik üre çözeltisi kullanılarak bitki, bakteri ve fungus üreazlarına göre farklı sıcaklık aralıklarında (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 °C) enzim aktiviteleri ölçüldü. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri kaydedildi ve üreaz aktiviteleri bağıl aktivite olarak hesaplandı.

### **3.2.12.7. Termal Kararlılık Çalışması**

*Cicer arietinum*, *Aspergillus fumigatus* ve *Proteus mirabilis*'den izole edilen üreaz enzimlerinin termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla serbest ve immobilize enzim örneklerinin 30-60 °C arasında enzim kaynağına göre farklılık gösteren sıcaklıklarda substrat içermeyen pH 7.0 Tris-HCl tamponunda farklı sürelerde (10, 30 ve 60 dakika) bekletilerek gerçekleştirildi. Bu çalışma sonucunda aktivite tayinleri Nessler yöntemine göre yapılarak serbest ve immobilize üreazların termal kararlılıkları belirlendi.

### **3.2.12.8. Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Üç farklı kaynaktan izole edilen üreaz enzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.40, 0.48, 0.56, 0.64, 0.72, 0.82 mmol) üre çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler ile enzim substrat karışımları hazırlanarak enzim aktiviteleri ölçüldü. İmmobilize ve serbest üreaz enzimlerinin  $K_m$  ve

$V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplandı. Enzimlerin  $V_{max}$  ve aktivite tayininde kullanılan enzim miktarlarından (mg/mL protein) faydalanılarak  $k_{cat}$  değerleri ve  $k_{cat}/K_m$  katalitik etkinlikleri belirlendi.

### 3.2.13. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Aljinata immobilize edilen *C. arietinum*, *A. fumigatus* ve *P. mirabilis* üreazlarının tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için 0.5 gr boncuk kullanılarak immobilize enzimlerin aktivitesi arka arkaya birkaç kez ölçüldü. Her ölçüm sonrası boncuklar distile su ile yıkandı ve tekrar aktivite tayini gerçekleştirildi.

### 3.2.14. Depo Kararlılığı

+4 °C'de depolanan serbest ve immobilize formdaki tüm üreaz enzimlerinin aktiviteleri düzenli aralıklarla ölçüldü. Her iki enzimin de kalan enzim aktivite değerleri karşılaştırıldı. Aktivite tayinleri optimum inkübasyon koşullarında gerçekleştirildi.

### 3.2.15. Hayvan Yemlerinde Üre Tayini

Hayvan yemlerindeki üre miktarını belirlemek amacıyla içeriği farklı 10 mg/kg üre içeren 4 farklı yem kullanıldı. Bu yemler A, B, C, D harfleriyle sembolize edildi. Yem örnekleri 10 mg üre içerecek şekilde Tris-HCl tamponunda çözüldü ve partiküller santrifüj ile uzaklaştırıldı. Elde edilen yem çözeltilerinin üre tayini için aşağıdaki tablodan ve formülden yararlanıldı. Hazırlanan standart ve örnek tüpleri Nessler reaktifi ile muamale edildi. Elde edilen absorban değerleri aşağıdaki formül kullanılarak % mg üre miktarı hesaplandı.

Üre miktarı (mg): Örnek absorbanı x standart konsantrasyonu / Standart absorbanı.

Her bir yemden hazırlanan çözeltilerdeki üre miktarı immobilize *C. arietinum*, *A. fumigatus*, *P. mirabilis* üreazları kullanılarak tayin edildi. Çalışmada kullanılan yem örneklerinin içerikleri Tablo 3.3'de verildi.

**Tablo 3.2.** Üre Tayini Tablosu

	Numune Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
Yem	0.5 mL	–	0.5 mL
Üre	–	0.5 mL	
Tampon	3 mL	3 mL	3 mL
İmmobilize Üreaz	0.3 gr	0.3 gr	0.3 gr
Nessler Reaktifi	100 µL	100 µL	100 µL

**Tablo 3.3.** Hayvan Yemlerinin İçerikleri

Yem Çeşidi	Analitik Bileşenler (%)	Katkı maddeleri (kg başına)
A	% 16.0 ham protein, % 11 ham selüloz, % 2.6 ham yağ, % 8.5 ham kül, % 0.3 kül, % 2 üre	Vitamin A 5000 IU, vitamin D3 700 IU, mangan sülfat 78 mg/kg, demir sülfat 211 mg/kg, çinko oksit 48 mg/kg, bakır sülfat 11 mg/kg, iyot 0.5 mg/kg.
B	% 14 ham protein, % 12.1 ham selüloz, % 4.3 ham yağ, % 0.43 sodyum, % 2 üre	Vitamin A 9600 IU, vitamin D3 1920 IU, iyot 0.8 mg/kg, kobalt 0.15 mg/kg, bakır 10 mg/kg, mangan 50 mg/kg, çinko 50 mg/kg, selenyum 0.15 mg/kg
C	19% ham protein, % 8.2 ham selüloz, % 3.9 ham yağ, % 8.0 ham kül, % 0.4 sodyum	Vitamin A 12000 IU, vitamin D3 3000 IU, mangan sülfat 50 mg/kg, demir 123 mg/kg, çinko 53 mg/kg, bakır 9 mg/kg, iyot 0.2 mg/kg
D	% 20 ham protein, % 11.1 ham selüloz % 5.0 ham yağ, % 9.2 ham kül, % 0.32 sodyum	Vitamin A 10000 IU, vitamin D3 2000 IU, iyot 0.8 mg/kg, kobalt 0.15 mg/kg, bakır 10 mg/kg, mangan 50 mg/kg, çinko 50 mg/kg, selenyum 0.15 mg/kg

### 3.2.16. Üre Hidrolizi

Bitki, fungus ve bakteri immobilize üreazlarının üreyi hidroliz etme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, ürenin 0.01 gramı 100 mL Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözüldü. Bu çözeltinin 20 mL'si boş bir tüpe ilave edildi ve 1,5 gr boncuk

(immobilize üreaz) eklendi. Sırasıyla 20, 30, 40 dakika inkübasyon sonunda bu çözümlerden pipet yardımıyla 2,5 mL çekilerek başka tüpe alındı ve Nessler reaktifi eklenerek absorbanlar 425 nm’de okundu. Üre hidroliz oranları yüzde olarak hesaplandı.



## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR

#### 4.1. Uygun Üreaz Kaynağı Belirleme Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle uygun üreaz kaynaklarının taranmasıyla ilgili çalışmalar yapıldı. Bu amaçla 12 farklı bitki türünden üreaz izolasyonu gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri ölçüldü. Böylece en yüksek enzim aktivitesine sahip bitkisel kaynak seçimi yapıldı. Aynı şekilde fungal ve bakteriyel kaynak seçimi için de taramalar yapıp uygun fungus ve bakteri örneği belirlendi. Bu çalışmaların sonucunda uygun bitki kaynağı olarak Gökçe çeşidi nohut bitkisi (*C. arietinum*), fungus *A. fumigatus*, bakteri kaynağı ise *P. mirabilis* olarak belirlendi (Tablo 4.1.a.b.c).

**Tablo.4.1a.** Taranan Bitki Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri (Gökçe nohut çeşidinin aktivitesi % 100 kabul edilerek hesaplandı)

Fasulye	Bağıl Aktivite (%)	Nohut	Bağıl Aktivite (%)
Noyan	28	Gökçe	100
Yunus 90	9	Hisar	18
Akman	6	ILC-195	83
Önceler	5	S-14	17
Yunus	18	Myles	18
Horoz	84	Cadız (Mısır)	28

**Tablo. 4.1b.** Taranan Fungus Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri

Fungus Türü	Bağıl Aktivite (%)
<i>Aspergillus niger</i>	79
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100
<i>Aspergillus ocraceus</i>	32
<i>Aspergillus flavus</i>	21
<i>Aspergillus flavipes</i>	55

**Tablo. 4.1c.** Taranan Bakteri Kaynaklarının Üreaz Aktiviteleri

Bakteri Türü	Bağıl Aktivite (%)
<i>Proteus mirabilis</i>	100
<i>Klebsiella sp.</i>	87
<i>Bacillus sp.</i>	-
<i>Bacillus sp.</i>	-
<i>E. coli</i>	-
<i>Serratia</i>	-

#### 4.2. Uygun İmmobilizasyon Yöntemi Belirleme Çalışmaları

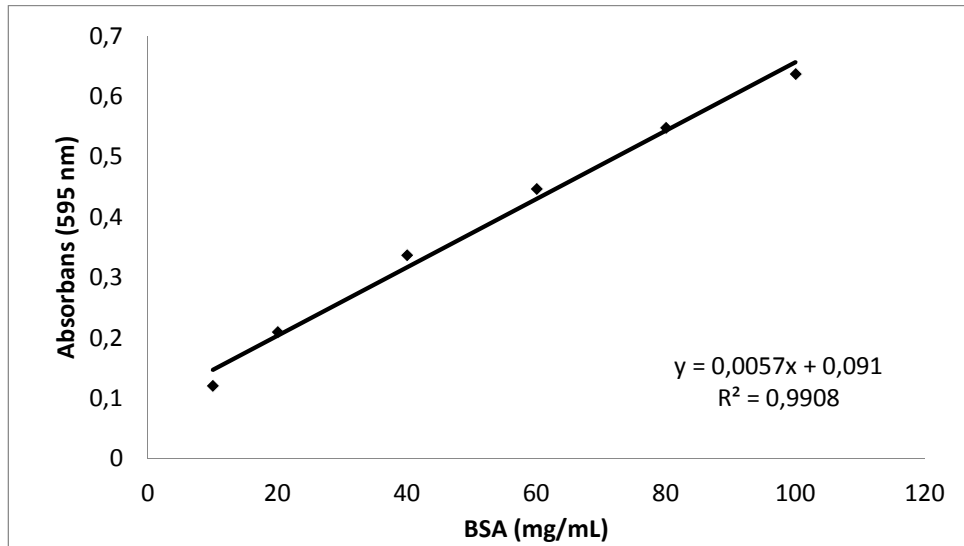
Çalışmanın bu bölümünde ise belirlenen bitkisel, fungal ve bakteriyel üreazların immobilizasyonu için uygun yöntemin (desteğin) belirlenmesi amaçlandı. Bunun için enzim örnekleri selit, aljinat ve kitosan kullanılarak immobilize edildi. Immobilize boncukların enzim aktiviteleri ve protein miktarları tayin edilerek her bir yöntem için immobilizasyon verimi hesaplandı. En yüksek immobilizasyon verimi aljinat ile yapılan immobilizasyonda saptandı ( Tablo 4.2). Bundan sonraki immobilizasyon çalışmalarına aljinat ile devam edildi.

**Tablo. 4.2.** Enzim İmmobilizasyon Verimleri

İmmobilizasyon Verimi (%)	Aljinat	Selit	Kitosan
<i>Cicer arietinum</i>	% 88.50	% 46.92	% 69.84
<i>Aspergillus fumigatus</i>	% 82.00	% 64.13	% 78.40
<i>Proteus mirabilis</i>	% 85.00	% 54	% 68

### 4.3. Protein Miktar Tayini

Farklı kaynaklardan izole edilen serbest enzim örneklerinin ve immobilizasyon işlemi sırasında oluşan yıkama çözeltilerindeki protein miktar tayinleri Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi. Bu amaçla standart protein olarak BSA kullanıldı. BSA'nın farklı konsantrasyonları hazırlanarak elde edilen standart grafik yardımı ile tüm örneklerin protein miktarları mg/mL olarak hesaplandı (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Protein Standart Grafiği

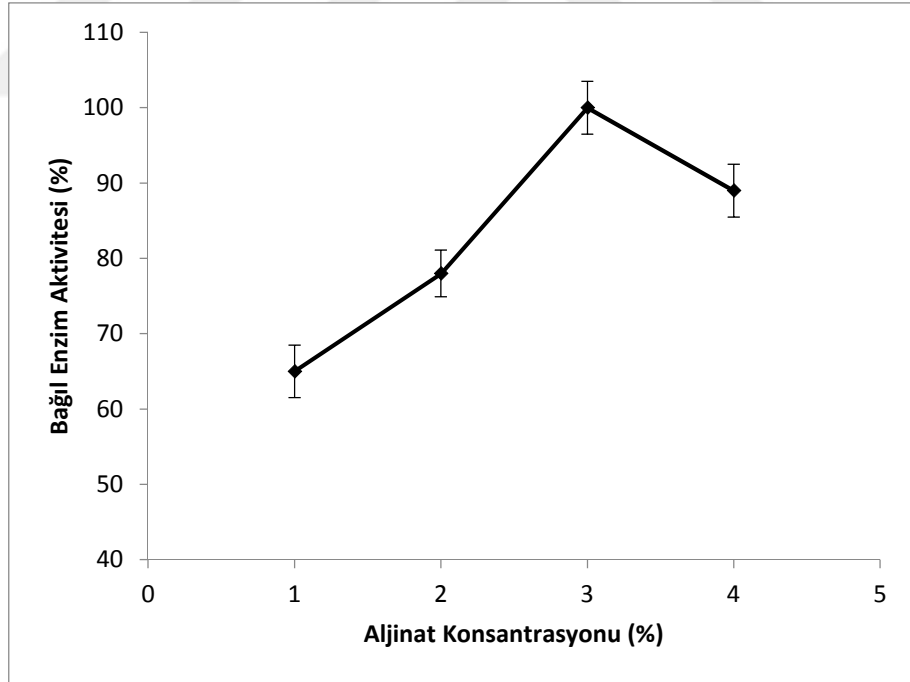


#### 4.4. Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu

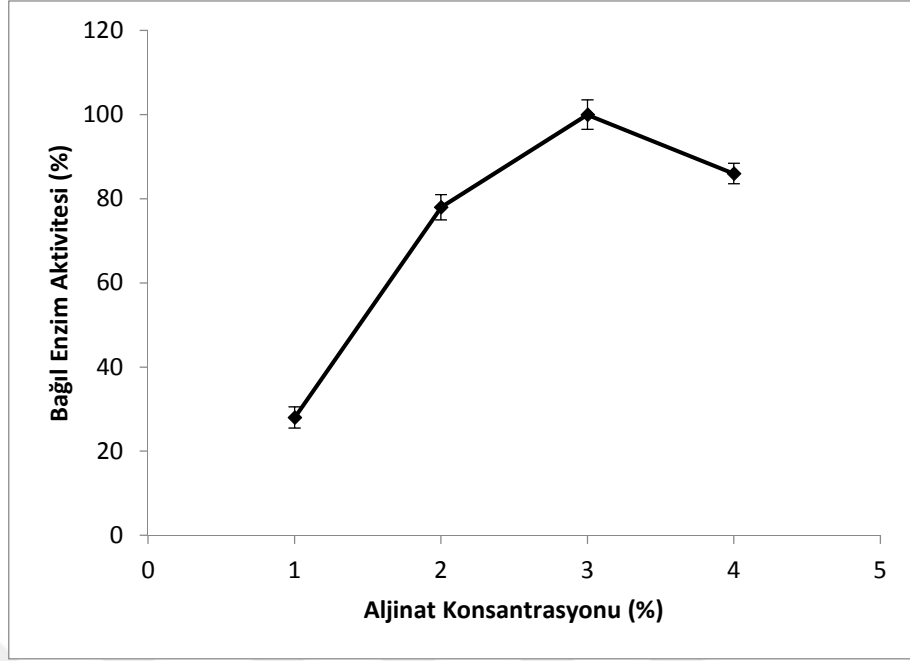
Optimizasyon çalışmaları kapsamında özellikle immobilize enzimlerin aktivitesinde etkili olan aljinat miktarı, yüklenen enzim miktarı, tekrar kullanılabilirlik ve depo kararlılığı çalışıldı. Hem serbest hem de immobilize enzimlerin aktivitesine sıcaklık, pH, süre, substrat konsantrasyonu gibi parametrelerin etkileri araştırıldı.

##### 4.4.1. Aljinat Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi

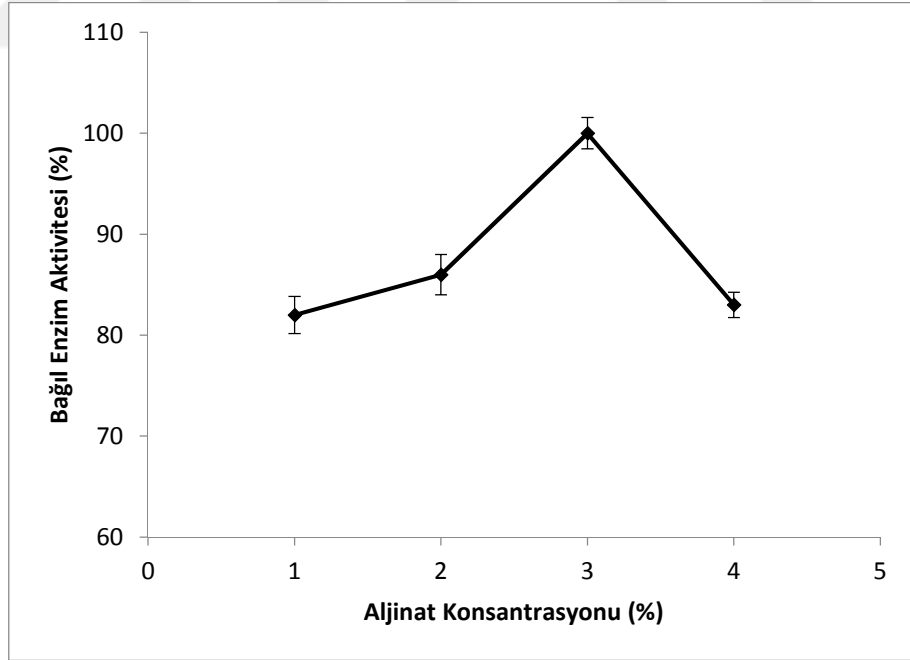
Aljinat miktarının enzim aktivitesine etkisini araştırmak amacıyla *C. arietinum*, *A. fumigatus*, *P. mirabilis* üreazları farklı miktarlarda (% 1-4) aljinat içeren çözeltiler kullanılarak immobilize edildi. Tüm enzim örneklerinin % 3'lük aljinat ile hazırlanan boncuklarda maksimum aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.2.a.b.c.d).



Şekil 4.2a. *Cicer arietinum* üreaz aktivitesine aljinat konsantrasyonunun etkisi

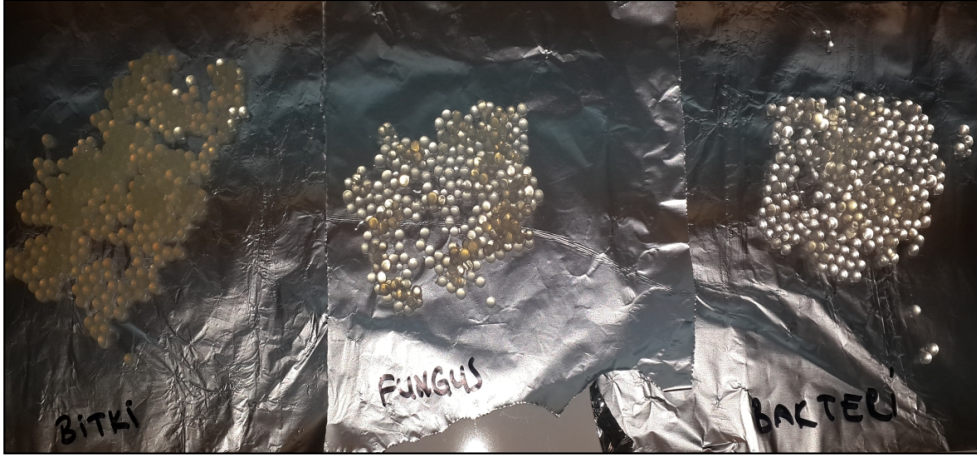


Şekil 4.2b. *Aspergillus fumigatus* üreaz aktivitesine aljinat konsantrasyonunun etkisi



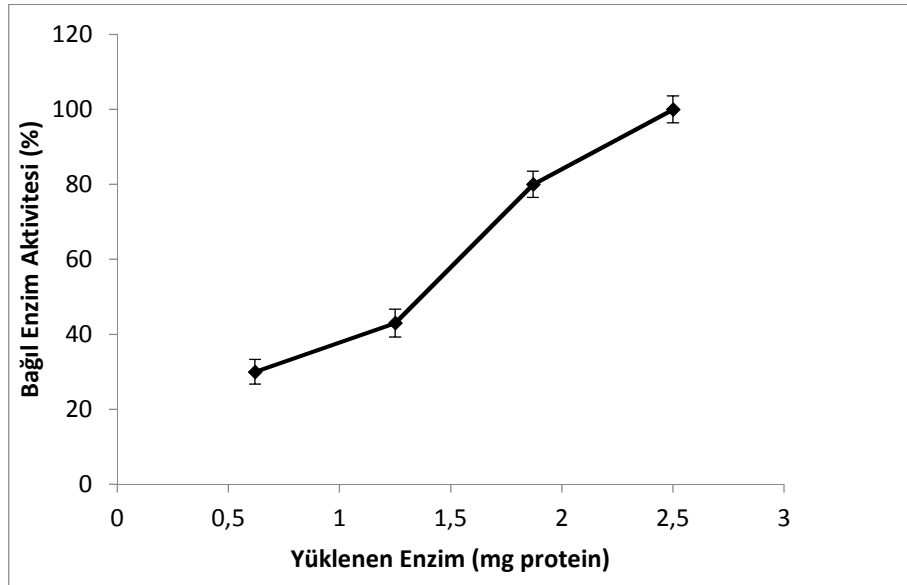
Şekil 4.2c. *Proteus mirabilis* üreaz aktivitesine aljinat konsantrasyonunun etkisi

Şekil 4.2d. Aljinat (% 3) ile elde edilen boncuklar

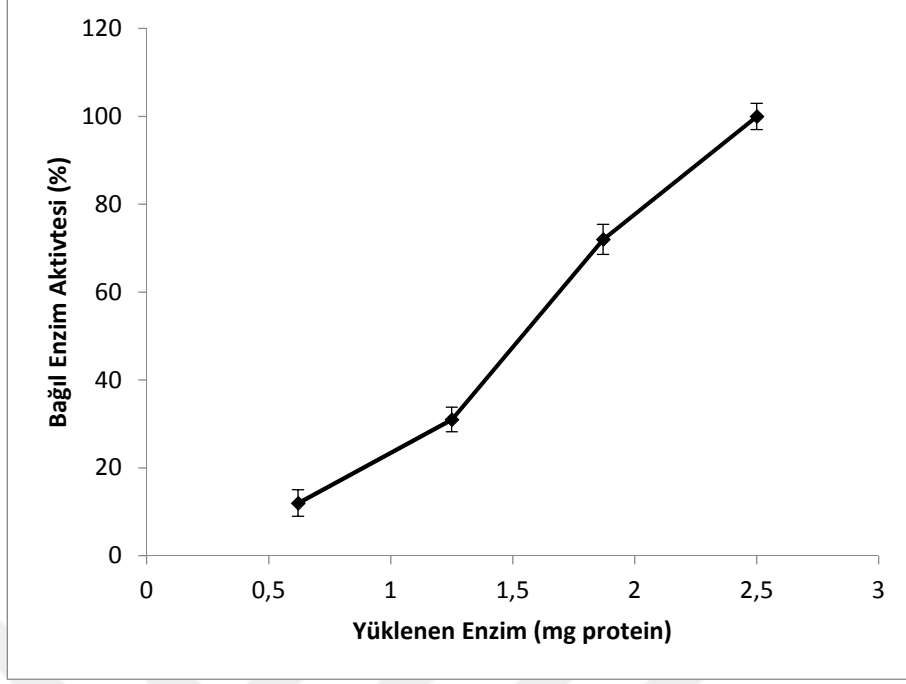


#### 4.4.2. Yüklene Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi

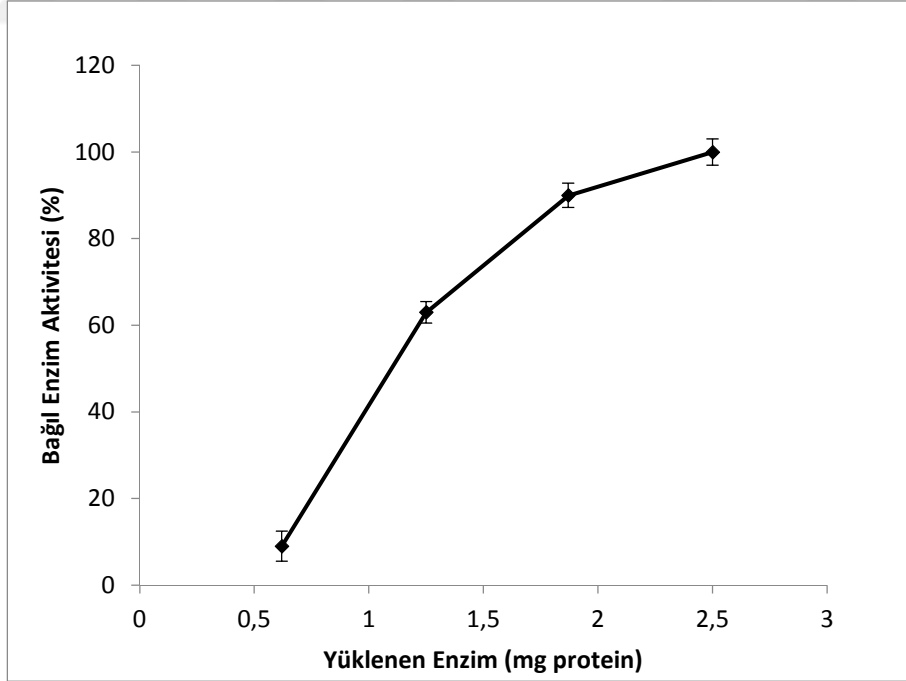
Aljinat boncuklara yüklene enzim miktarı da enzim aktivitesine etkili faktörler arasındadır. Bu nedenle farklı konsantrasyonlarda (0.62, 1.25, 1.87, 2.5 mg protein) enzim çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler ile aljinat boncuklar oluşturuldu. Her bir konsantrasyonun enzim aktiviteleri ölçüldü. Tüm enzim örnekleri için boncuklara yüklenebilen en yüksek konsantrasyon olan 2.5 mg enzim içeren aljinat boncukların en yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.3.a.b.c).



Şekil 4.3a. *Cicer arietinum* üreaz aktivitesine yüklene enzim miktarının etkisi



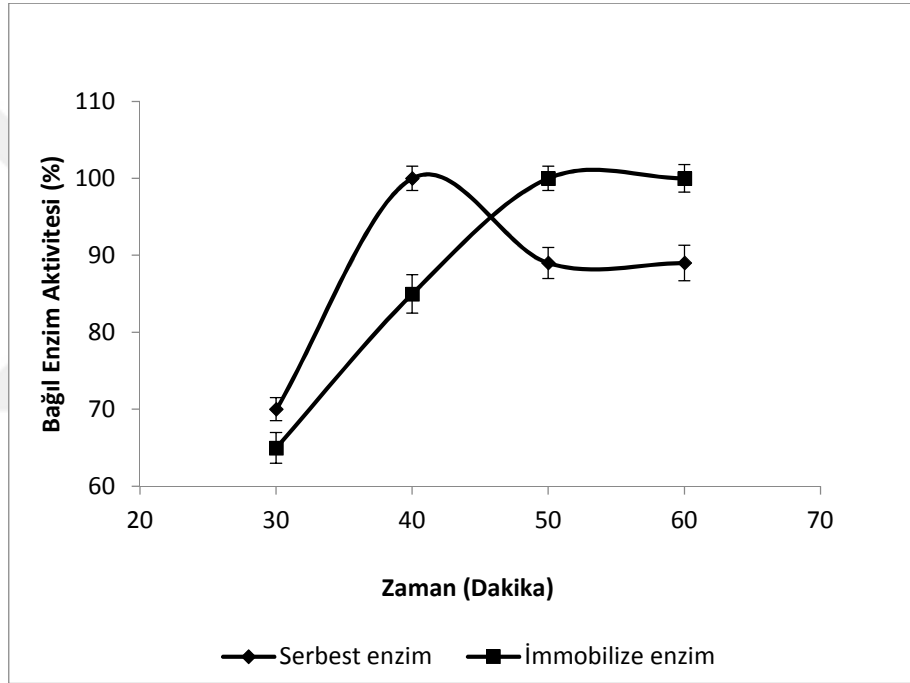
Şekil 4.3b. *Aspergillus fumigatus* üreaz aktivitesine yüklenen enzim miktarı etkisi



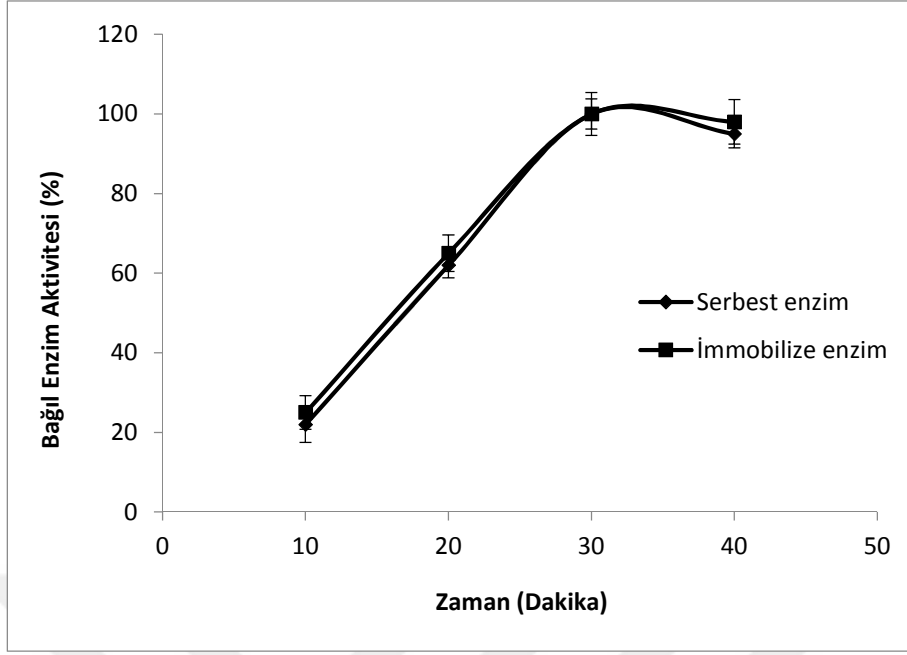
Şekil 4.3c. *Proteus mirabilis* üreaz aktivitesine yüklenen enzim miktarı etkisi

#### 4.4.3. İnkübasyon Süresinin Enzim Aktivitesine Etkisi

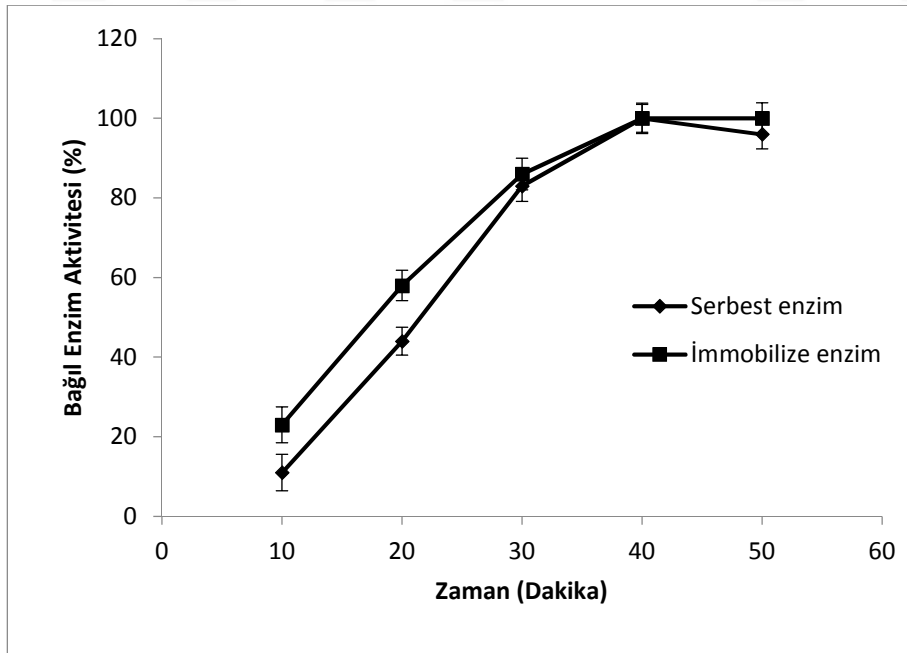
Farklı kaynaklardan izole edilen serbest ve immobilize üreaz enzimleri farklı sürelerde inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmanın sonunda serbest *C. arietinum* üreazı'nın en yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon süresi 40 dakika iken immobilize üreazın ise 50 dakika olduğu bulundu. *A. fumigatus* serbest ve immobilize üreazlarının en yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon süresi 30 dakika, *P. mirabilis*'in her iki formunun da optimum inkübasyon süresinin 40 dakika olduğu belirlendi (Şekil.4.4.a.b.c).



Şekil 4.4a. *Cicer arietinum* serbest ve immobilize üreazlarının optimum inkübasyon süreleri



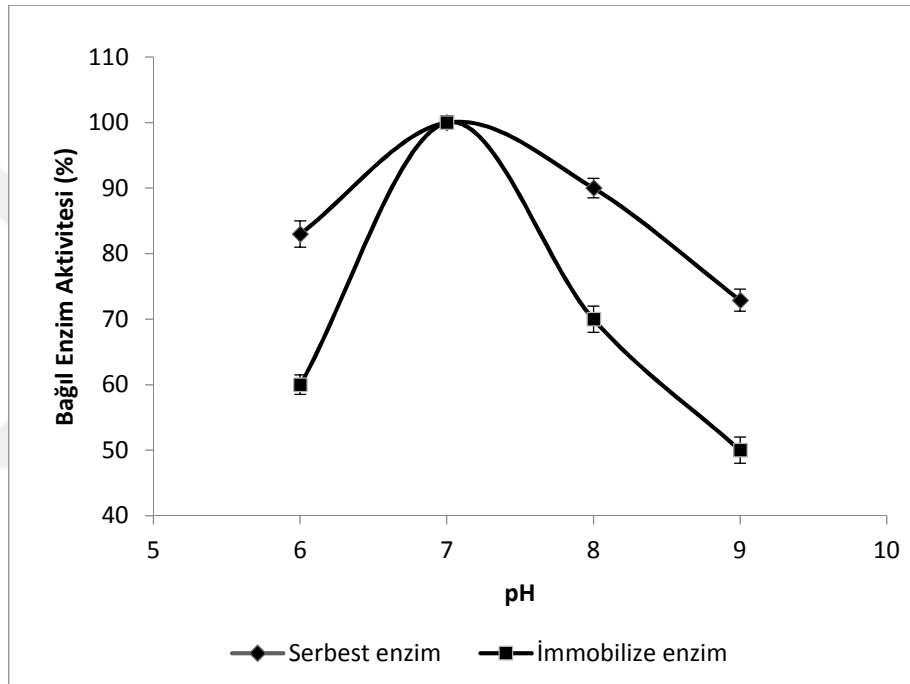
Şekil 4.4b. *Aspergillus fumigatus* serbest ve immobilize üreazlarının optimum inkübasyon süreleri



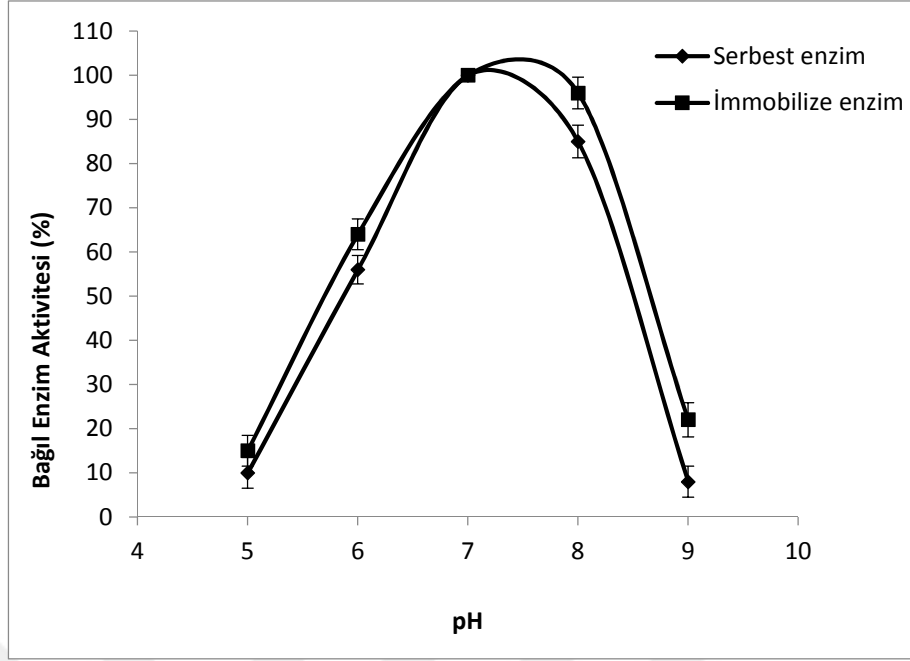
Şekil 4.4c. *Proteus mirabilis* serbest ve immobilize üreazlarının optimum inkübasyon süreleri

#### 4.4.4. pH'in Enzim Aktivitesine Etkisi

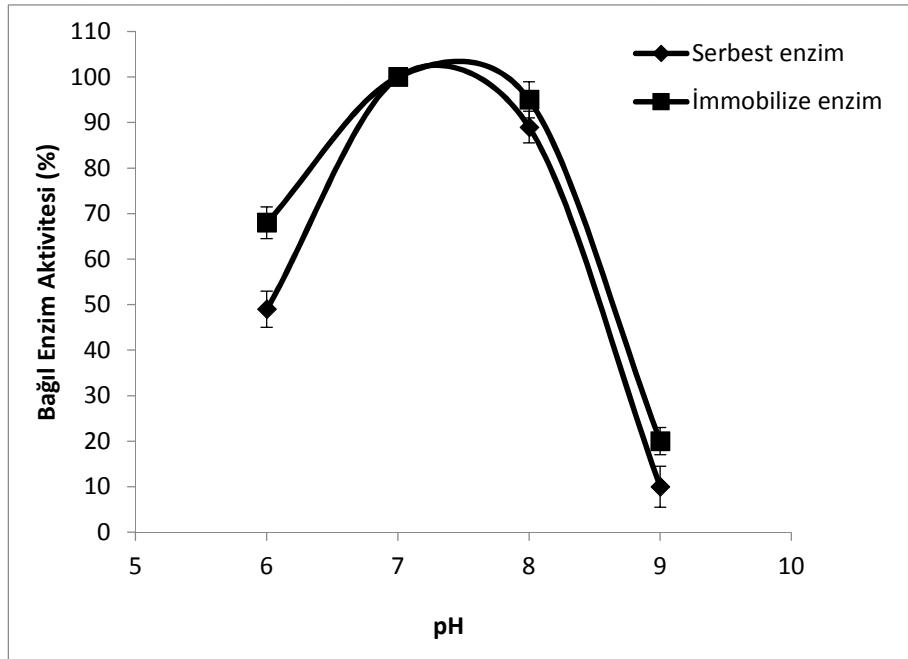
Her iki enzim formunun aktivitesi üzerine pH'in etkisi farklı pH'larda hazırlanmış tampon çözeltileri kullanılarak araştırıldı. (Tris-HCl tamponu pH 6.0, 7.0, 8.0 ve Borat tampon: pH 9.0, 10) Bu çalışmada *C. arietinum*, *A. fumigatus* ve *P. mirabilis* serbest ve immobilize üreazlarının optimum pH'ları 7.0 olarak bulundu (Şekil.4.5.a.b.c).



Şekil 4.5a. Serbest ve immobilize *Cicer arietinum* üreazlarının pH'a bağlı aktivite değişimleri



Şekil 4.5b. Serbest ve immobilize *Aspergillus fumigatus* üreazlarının pH'a bağlı aktivite değişimleri

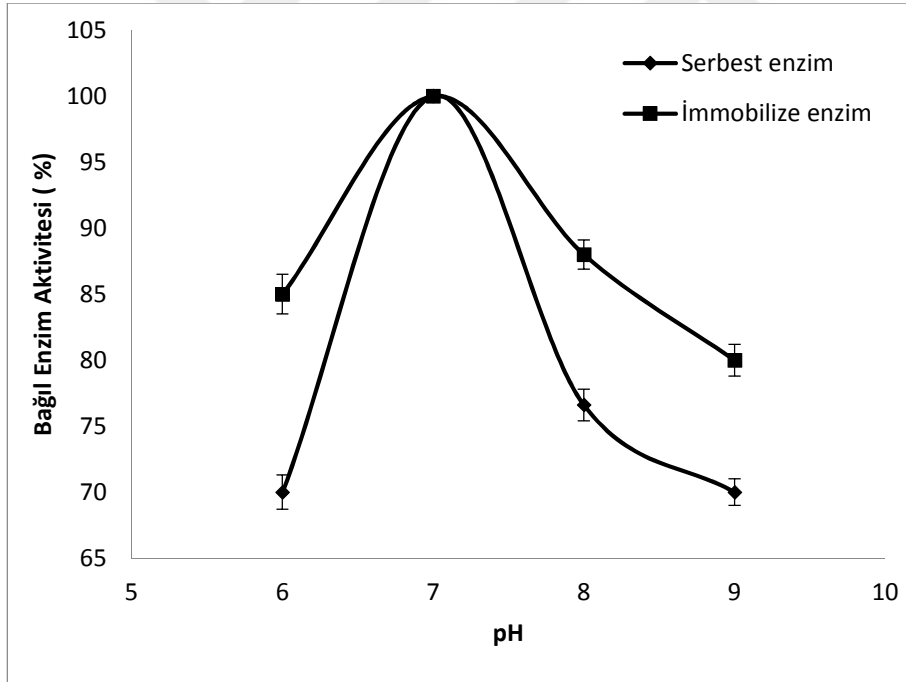


Şekil 4.5c. Serbest ve immobilize *Proteus mirabilis* üreazlarının pH'a bağlı aktivite değişimleri

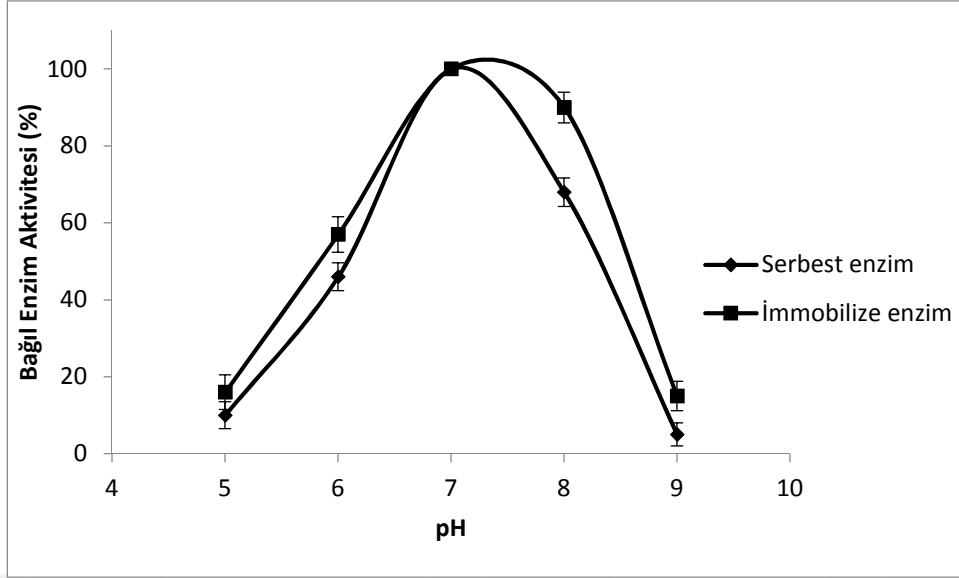


#### 4.4.5. pH Kararlılığı

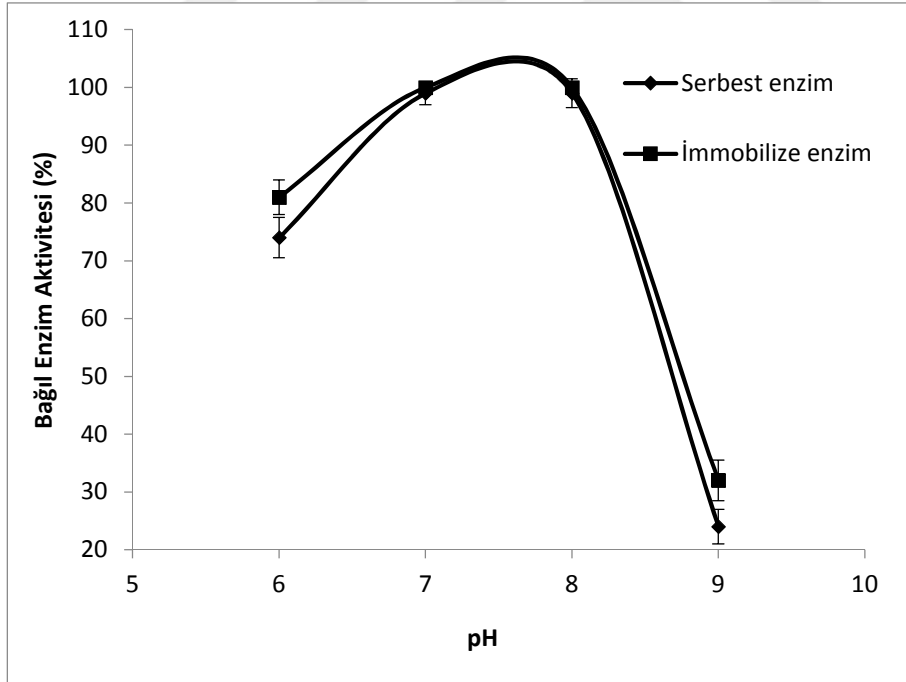
Bitki, bakteri ve fungus üreazlarının farklı pH'lardaki kararlılıklarını belirlemek için, enzim çözeltileri farklı pH'larda substrat içermeyen tamponlarda +4 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra enzim aktiviteleri ölçülerek pH kararlılıkları belirlendi. Bu çalışmada nohut üreazının her iki formunun da pH 7.0'de kararlı olduğu bulundu (Şekil 4.6.a). Üreazın immobilize edilmesiyle pH profili üzerinde dikkat çekici bir değişim meydana gelmediği gözlemlendi (Şekil 4.6.b). Fungus çalışmasına baktığımızda serbest ve immobilize üreaz enzimi pH 7.0'de en yüksek aktiviteyi gösterdi. Ancak immobilize enzim farklı pH aralıklarında serbest enzime göre daha kararlı bir yapı gösterdi. Bakteri üreazının pH kararlılık çalışması sonucunda serbest ve immobilize üreaz enzimi pH 7.0 ve 8.0 arasında kararlılığını korudu (Şekil 4.6.c).



Şekil 4.6a. *Cicer arietinum* serbest ve immobilize üreazlarının pH kararlılıkları



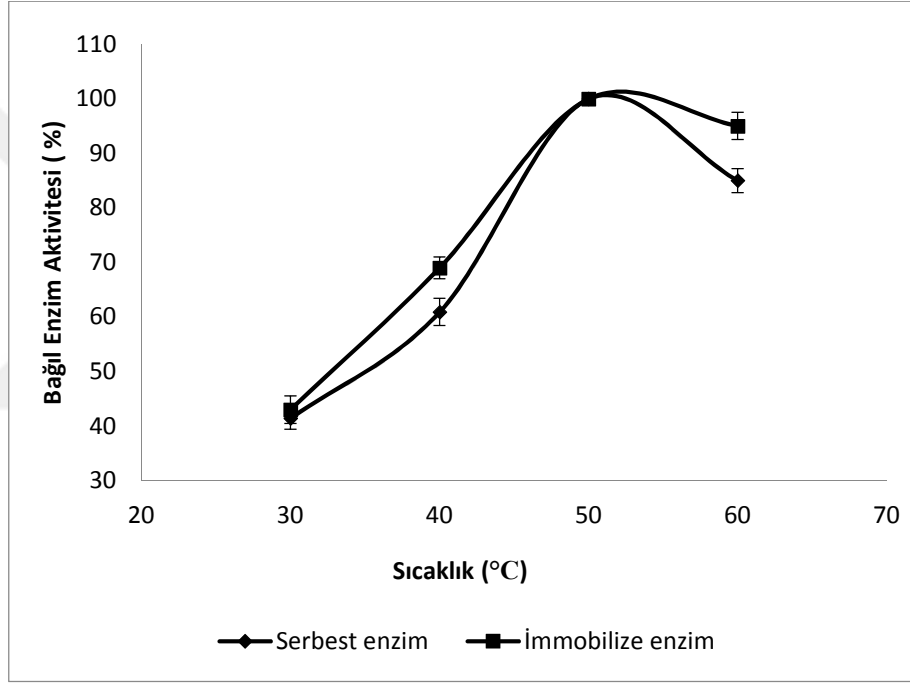
Şekil 4.6b. *Aspergillus fumigatus* serbest ve immobilize üreazlarının pH kararlılıkları



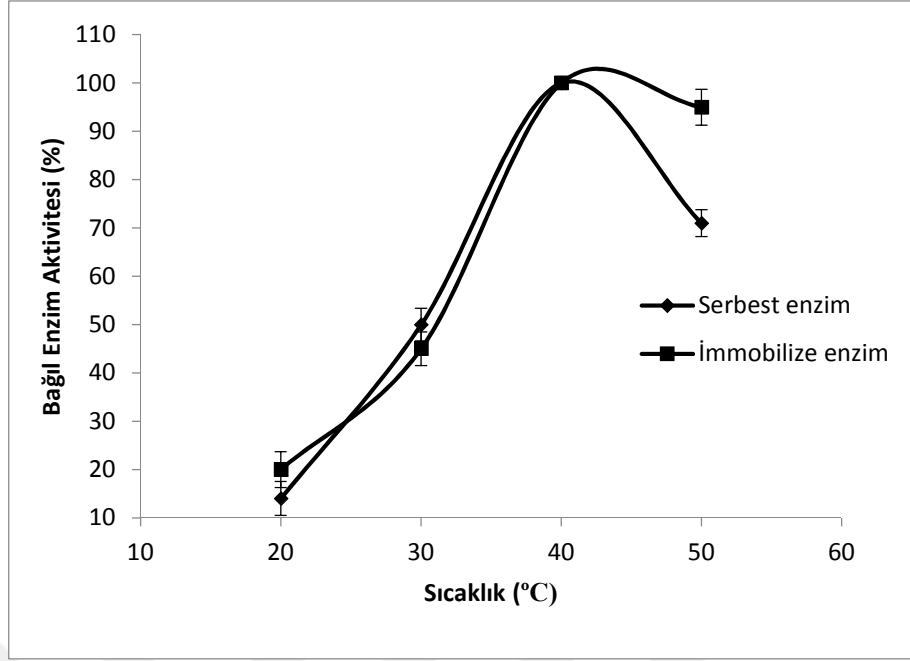
Şekil 4.6c. *Proteus mirabilis* serbest ve immobilize üreazlarının pH kararlılıkları

#### 4.4.6. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi

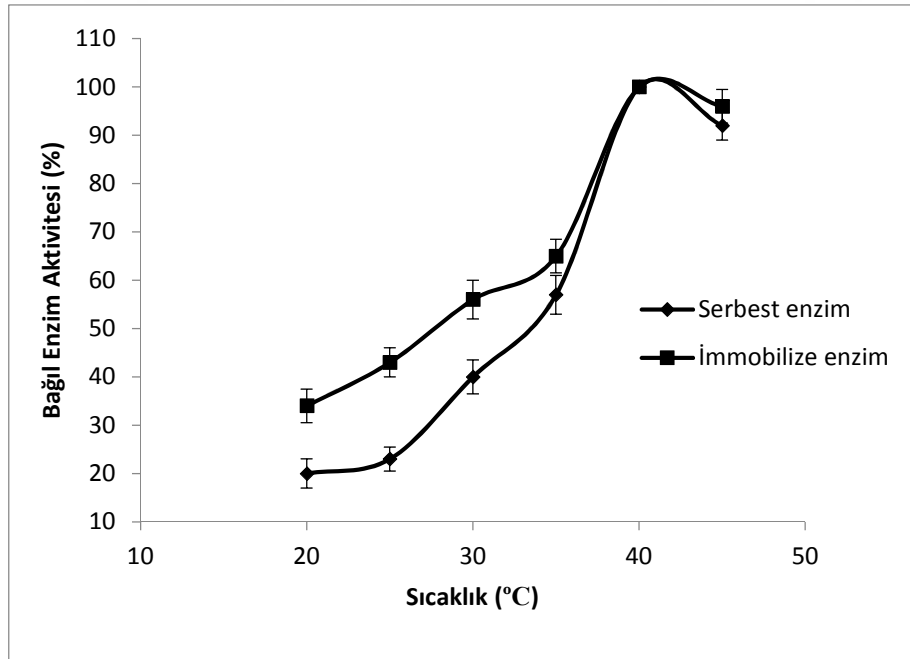
Sıcaklığın serbest ve immobilize üreaz aktivitesine etkisi, reaksiyon karışımının farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60 °C) inkübe edilmesi sonucu elde edilen ölçümler ile saptandı. Çalışmamızda serbest ve immobilize nohut üreazının optimum sıcaklık değerlerinin 50 °C olduğu belirlendi (Şekil 4.7.a.b.). Fungus ve bakteri üreazlarının serbest ve immobilize formlarının optimum sıcaklıkları ise 40 °C olarak bulundu (Şekil 4.7.c).



Şekil 4.7a. Serbest ve immobilize *Cicer arietinum* üreazlarının sıcaklığa bağlı aktivite değişimleri



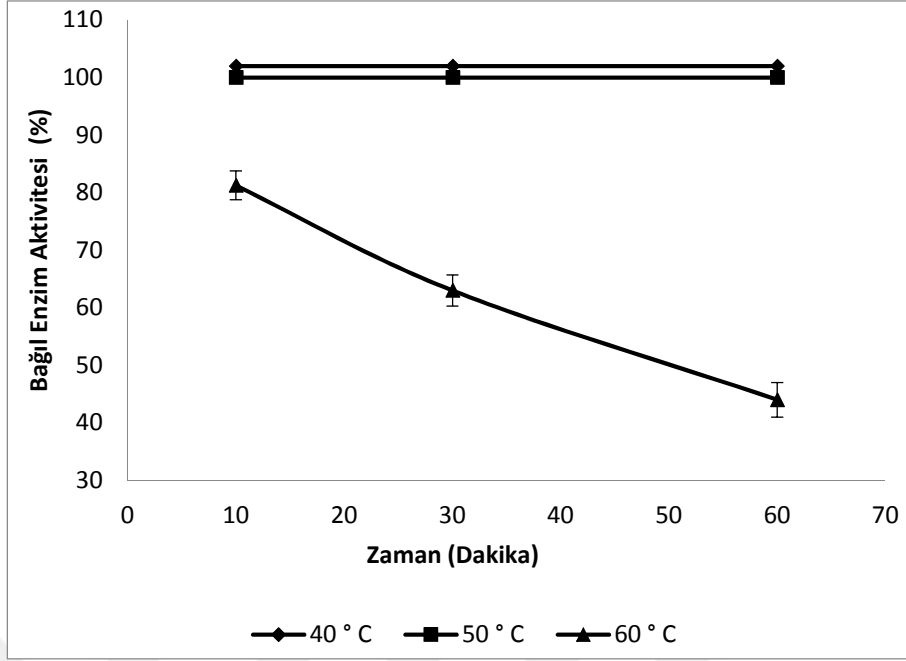
Şekil 4.7b. Serbest ve immobilize *Aspergillus fumigatus* üreazlarının sıcaklığa bağlı aktivite değişimleri



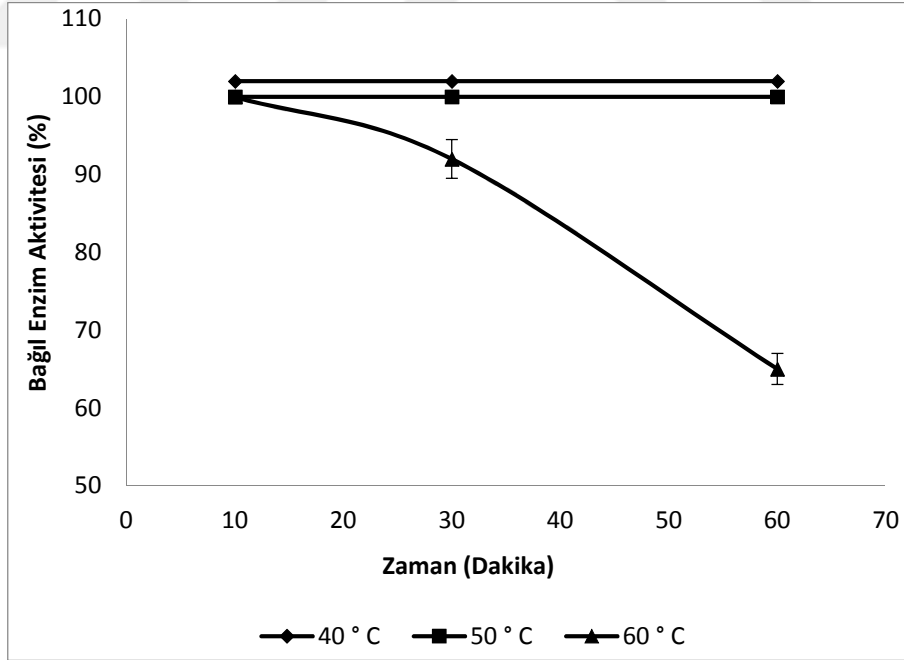
Şekil 4.7c. Serbest ve immobilize *Proteus mirabilis* üreazlarının sıcaklığa bağlı aktivite değişimleri

#### 4.4.7. Termal Kararlılık Çalışmaları

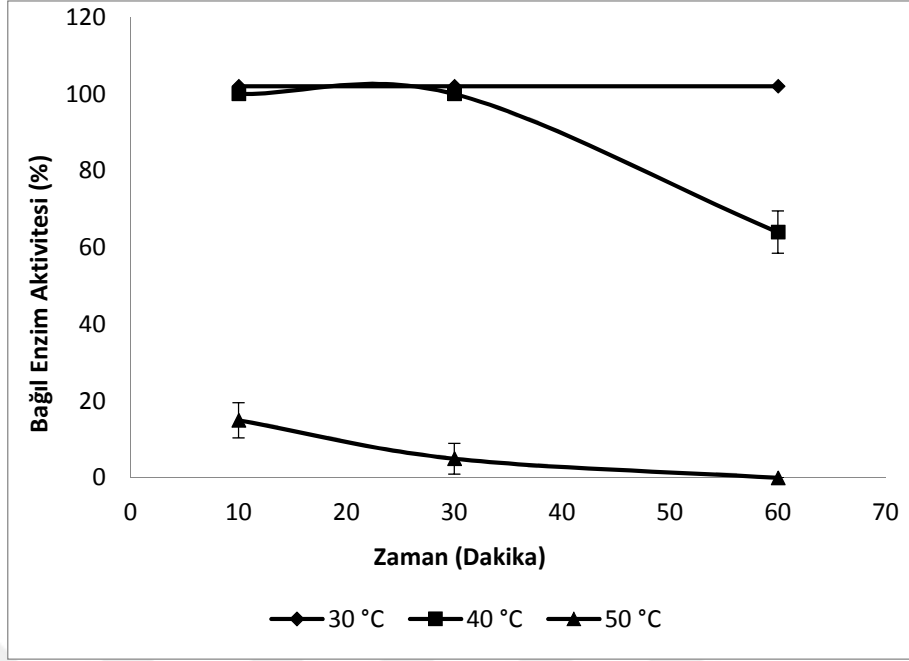
Her iki enzim formunun termal stabilite çalışmaları enzim örneklerinin 40-60 °C arasındaki sıcaklıklarda substrat içermeyen pH 7.0 Tris-HCl tamponunda farklı sürelerde (10, 30 ve 60 dk) bekletilmesiyle gerçekleştirildi. Bitki üreazı çalışmasında her iki enzim formunun da 40 ve 50 °C'de 60 dakika boyunca bekletildiğinde başlangıç aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. İmmobilize enzim 60 °C'de 30 dakika beklediğinde başlangıç aktivitesinin % 92 sini korurken serbest enzim aktivitesinin % 63'ünü koruyabildi (Şekil 4.8.a.b). Fungus ile yapılan çalışma sonuçlarına göre serbest enzim 30 °C'de tüm bekleme sürelerinde aktivitesinin tamamını korudu. 40 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda da aktivitesinin tamamını korurken, 40 °C'de 60 dakika bekleme sonucu aktivitesinin % 36'sını kaybetti. İmmobilize enzimin ise 30 °C ve 40 °C de tüm bekleme gruplarında kararlı olduğu gözlemlendi. Fungal serbest enzimin 50 °C'de 10 ve 30 dakika bekletilmesi sonucu başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 85 ve % 95'ini kaybettiği, ancak immobilize enzimin aynı değerler için aktivite kaybı % 20 (10 dk) ve % 60 (30 dk) olarak belirlendi. (Şekil 4.8.c.d) Bakteri üreazının termal kararlılık çalışmasında serbest enzim 30 ve 35 °C'de tüm bekleme gruplarında stabilite gösterdi. 40 °C'de 10 dakika inkübasyon sonunda da stabildi. Serbest enzim 40 °C'de 30 dakika bekleme sonucu aktivitesinin % 10'unu kaybetti. İmmobilize enzim ise 40 °C de 30 dakika bekleme sonucu aktivitesinin % 100'ünü korudu. 45 °C'de 10 dakika bekleme grubunda ise immobilize enzim aktivitesinin % 80'ini korurken serbest enzim ise % 56'sını koruyabildi (Şekil 4.8.e.f).



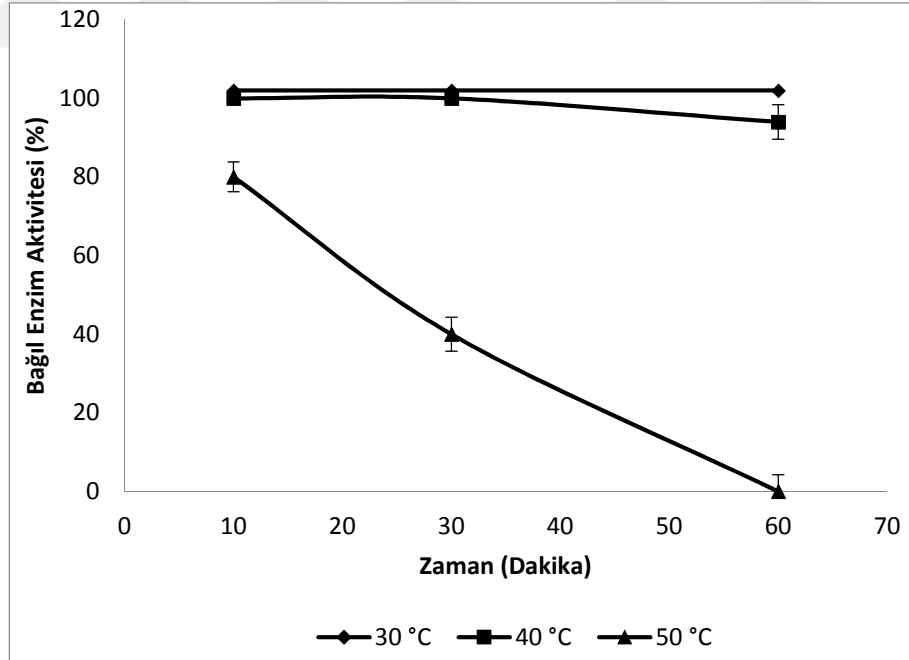
Şekil 4.8a. *Cicer arietinum* serbest enzim termal stabilite



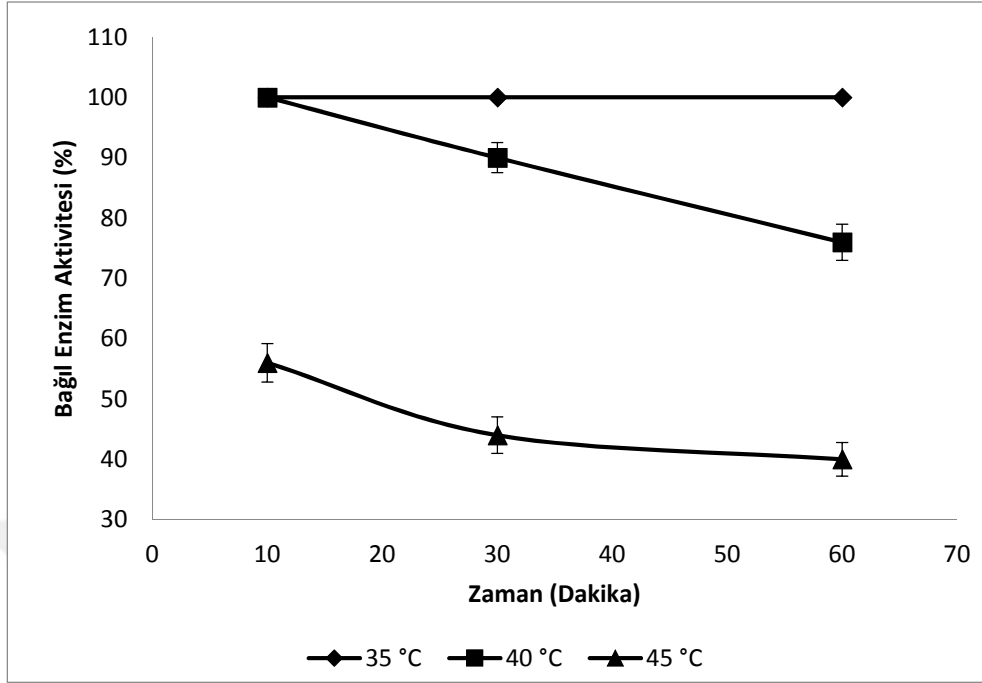
Şekil 4.8b. *Cicer arietinum* immobilize enzim termal stabilite



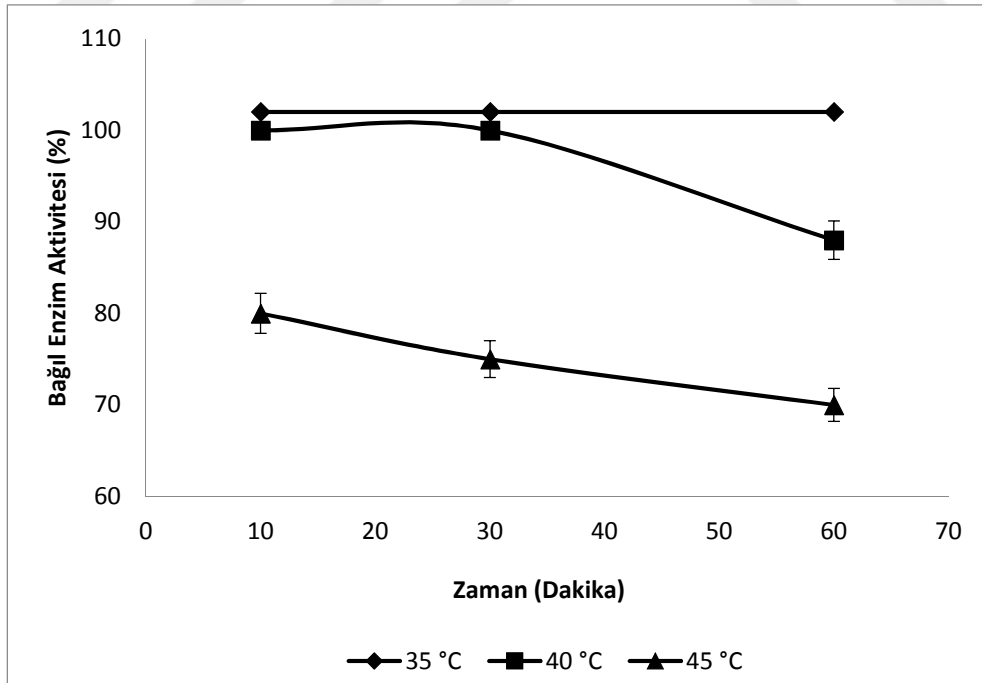
Şekil 4.8c. *Aspergillus fumigatus* serbest enzim termal kararlılığı



Şekil 4.8d. *Aspergillus fumigatus* immobilize enzim termal kararlılığı



Şekil 4.8e. *Proteus mirabilis* serbest enzimin termal kararlılığı

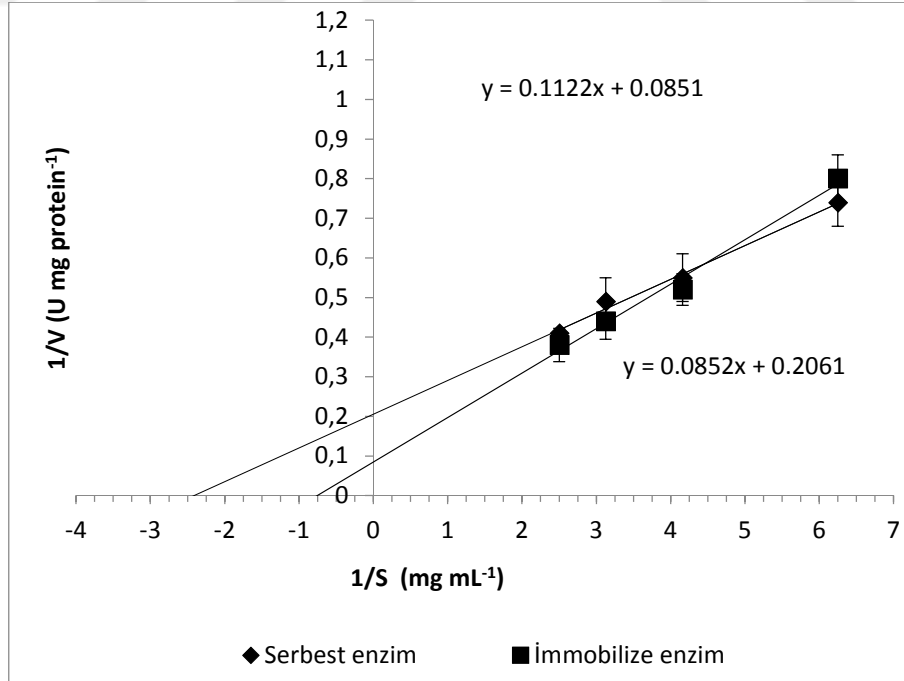


Şekil 4.8f. *Proteus mirabilis* immobilize enzimin termal kararlılığı

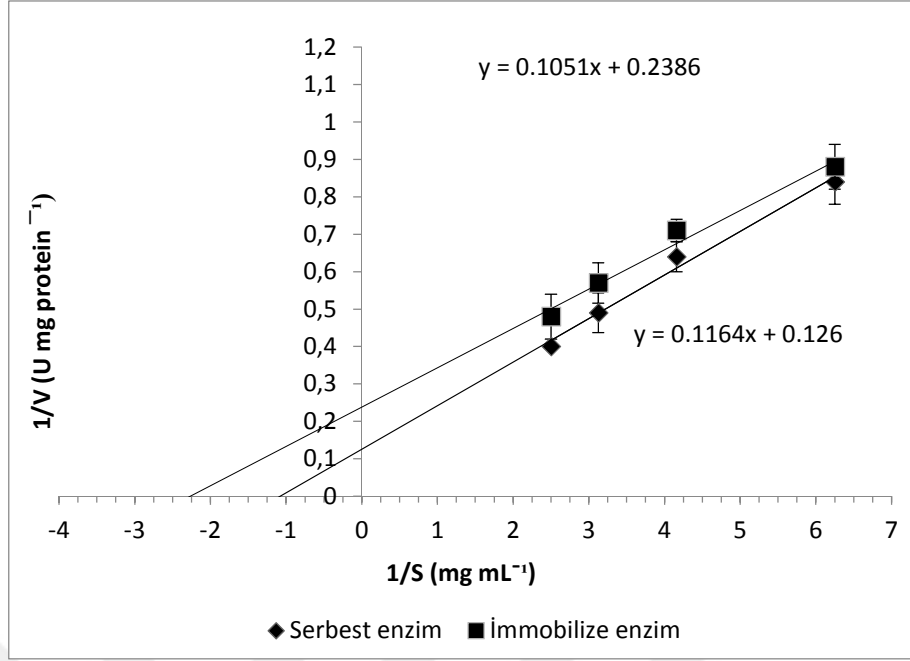


#### 4.4.8. Enzimlerin Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

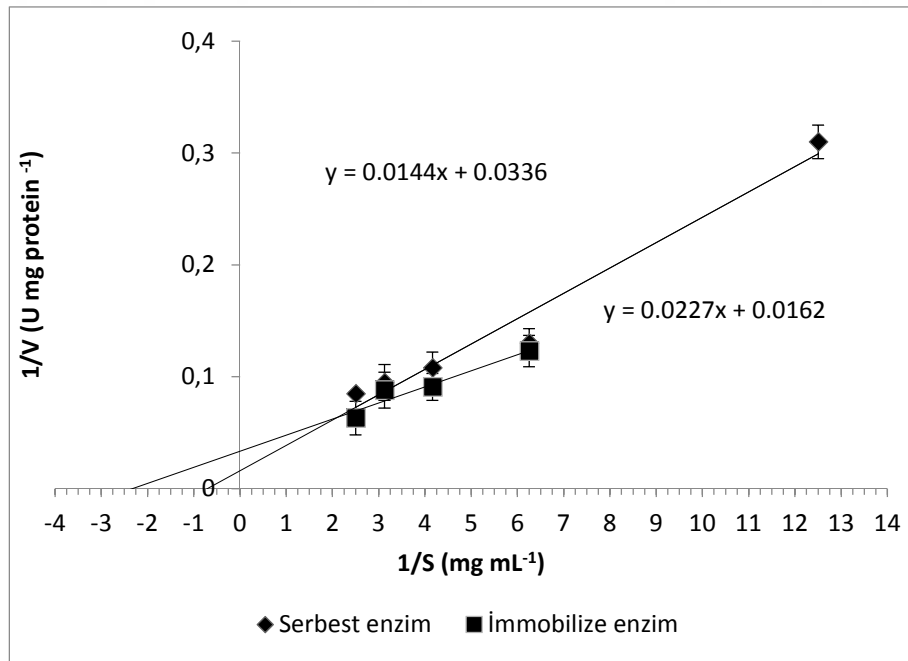
Serbest ve immobilize üreazların  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini hesaplamak için farklı konsantrasyonlarda substrat (üre) çözeltileri kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiğinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Buna göre *C. arietinum* üreazı çalışmasında serbest enzimin  $K_m$  değeri 0.42 mM, immobilize enzimin  $K_m$  değeri ise 1.33 mM olarak bulundu. İmmobilize enzimin  $V_{max}$  değeri (10 U/mL dk) serbest enziminkinden (5 U/mL dk) 2 kat yüksek bulundu (Şekil 4.9.a). *A. fumigatus* üreazı ile yapılan çalışmada serbest enzimin  $K_m$  değeri 1.0 mM, immobilize enzimin  $K_m$  değeri ise 0.44 mM olarak bulundu. serbest enzimin  $V_{max}$  değeri 8,33 U/mL dk iken immobilize enzimin ki ise 4,16 U/mL dk belirlendi (Şekil 4.9.b). *P. mirabilis* üreazı ile yapılan çalışmada ise serbest enzimin  $K_m$  değeri 2 mM, immobilize enzimin  $K_m$  değeri ise 0.4 mM olarak bulundu. İmmobilize enzimin  $V_{max}$  değeri 35 U/mL dk iken serbest enzimin ki 40 U/mL dk olarak belirlendi (Şekil 4.9.c). Tüm enzim örneklerinin  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  değerleri tablo 4.3’de verildi (Tablo 4.3)



Şekil 4.9a. *Cicer arietinum* serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.9b. *Aspergillus fumigatus* serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.9c. *Proteus mirabilis* serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafiği

**Tablo 4.3.** Enzim Örneklerinin Kinetik Özellikleri

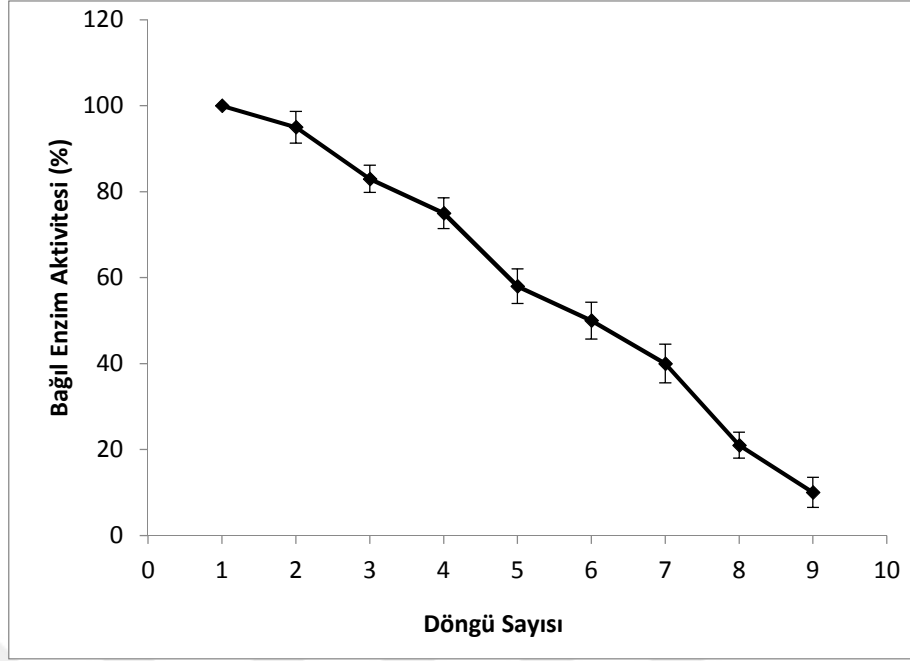
Enzim kaynağı	$K_m$	$V_{max}$	$k_{cat}$	Katalitik etkinlik ( $k_{cat}/K_m$ )
<i>C. arietinum</i> (serbest enzim)	0.42	5	0.083	0.197
<i>C. arietinum</i> (immobilize enzim)	1.33	10	0.100	0.075
<i>A. fumigatus</i> (serbest enzim)	1	9.09	2.3	2.3
<i>A. fumigatus</i> (immobilize enzim )	0.44	4.16	1.2	2.7
<i>P. mirabilis</i> (serbest enzim)	2	40	7.8	2.4
<i>P. mirabilis</i> (immobilize enzim)	0.4	35	7.0	17.5

#### 4.4.9. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

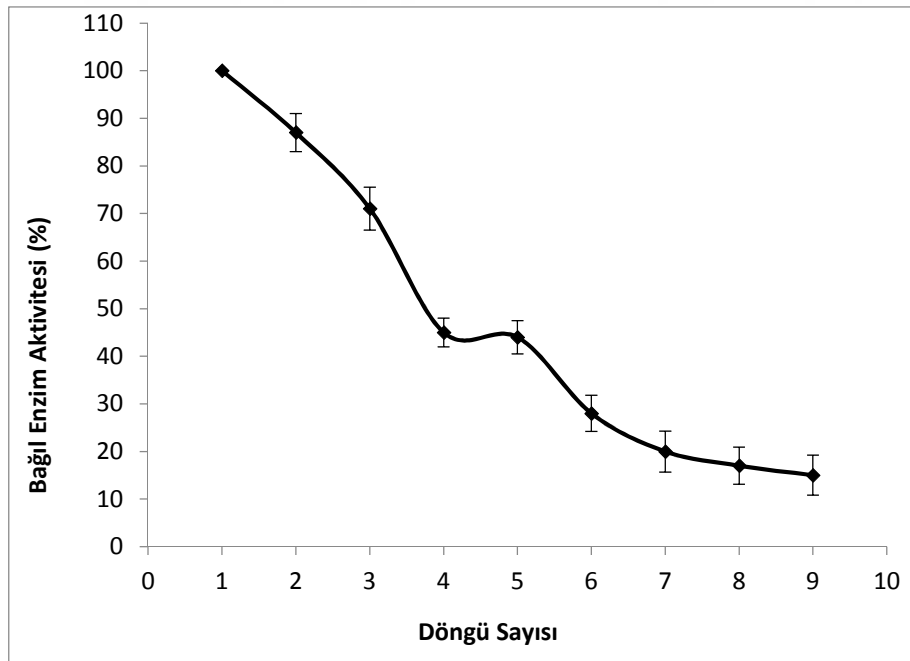
Elde edilen immobilize *C. arietinum* üreazının tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için, 0.5 gram boncuk tartılarak substratlı tampon ile (pH 7.0 Tris-HCl, % 1 üre) 50 °C'de 40 dakika inkübe edildi. Enzim aktivite değeri hesaplandı. Bu çalışmada 9 kere arka arkaya aynı boncukların aktivite tayini yapıldı ve 5 ölçüm sonunda immobilize enzimin aktivitesini yaklaşık % 60 oranında koruduğu belirlendi. Ayrıca 7. ölçüm sonunda immobilize enzimin aktivitesinin % 40'ını hala koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.10.a).

İmmobilize fungus (*A. fumigatus*) üreazının optimum şartlarda aynı boncuklarla 9 kez arka arkaya enzim aktivitesi ölçüldü. Beşinci ölçüm sonunda enzimin aktivitesinin % 56'sını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 4.10.b).

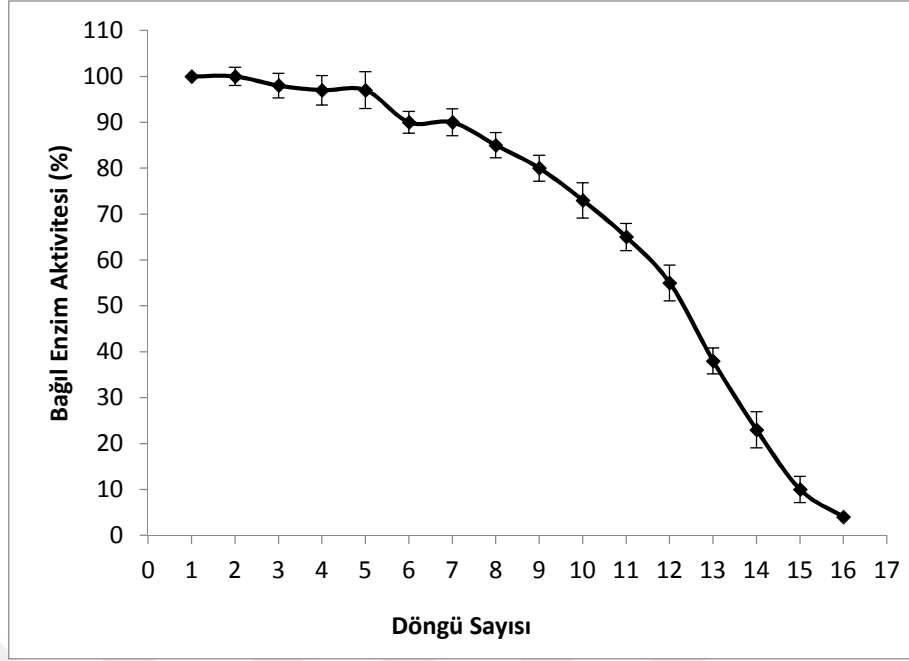
Aljinat boncuklara tutuklanmış bakteri (*P. mirabilis*) üreazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla, aynı boncukların optimize edilmiş şartlarda 16 kere aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bulgulara göre, 8 ölçüm sonrasında başlangıç aktivitesini yaklaşık % 85 oranında koruduğu, 12. ölçümde ise yaklaşık % 55'ini koruduğu belirlendi (Şekil 4.10.c).



**Şekil 4.10a.** Aljinat boncuklara immobilize edilen *Cicer arietinum* üreazının tekrar kullanılabilirliği.



**Şekil 4.10b.** Aljinat boncuklara immobilize edilen *Aspergillus fumigatus* üreazının tekrar kullanılabilirliği.



**Şekil 4.10c.** Aljinat boncuklara immobilize edilen *Proteus mirabilis* üreazının tekrar kullanılabilirliği.

#### 4.4.10. İmmobilize ve Serbest Üreaz Enzimlerinin Depo Kararlılığı

Üç farklı kaynaktan izole edilen serbest ve immobilize enzim örneklerinin depo kararlılığını araştırmak amacıyla tüm örneklerin başlangıç aktiviteleri ölçüldü ve +4 °C’de substratsız ortmada aktivite ölçüm tamponunda 24 saat beklemeye bırakıldı. Her 24 saatte bir enzim aktiviteleri ölçülerek serbest ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları belirlendi.

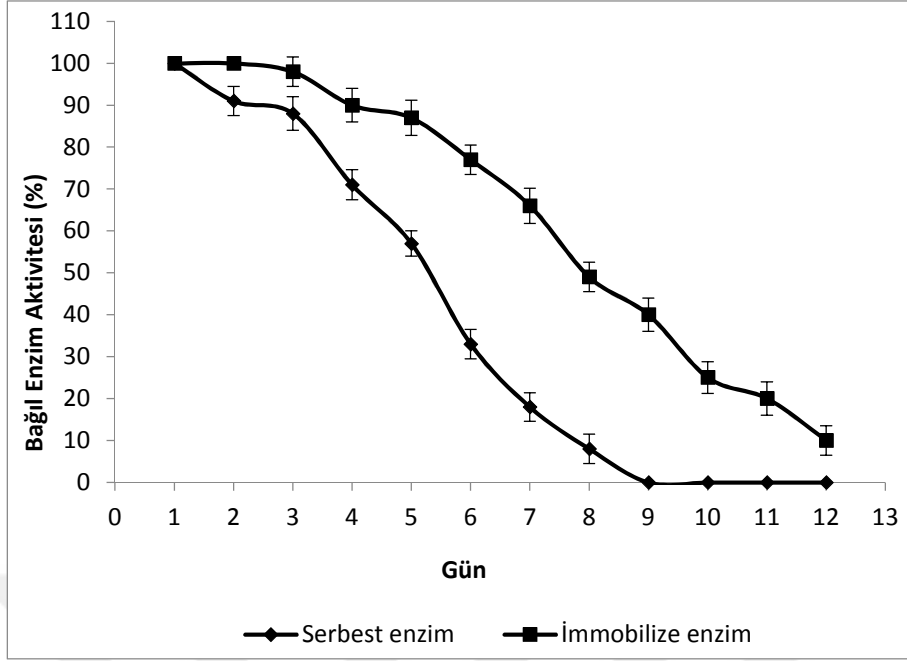
*C. arietinum* serbest üreazının 2. gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 40’ını kaybettiği, 4. günün sonunda ise ancak % 6-6.5’luk bir aktivite gösterdiği saptandı. İmmobilize üreaz enziminin ise 3 gün boyunca başlangıç aktivitesinin tamamını koruduğu, 7. günün sonunda da yaklaşık % 40’lık bir aktivite sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.11.a).

*A. fumigatus* immobilize üreazının başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 90’ını beş gün boyunca koruduğu, serbest enzim aktivitesinin neredeyse sıfırlandığı, 9. günde ise % 40’lık bir aktivite gösterdiği saptandı (Şekil 4.11.b).

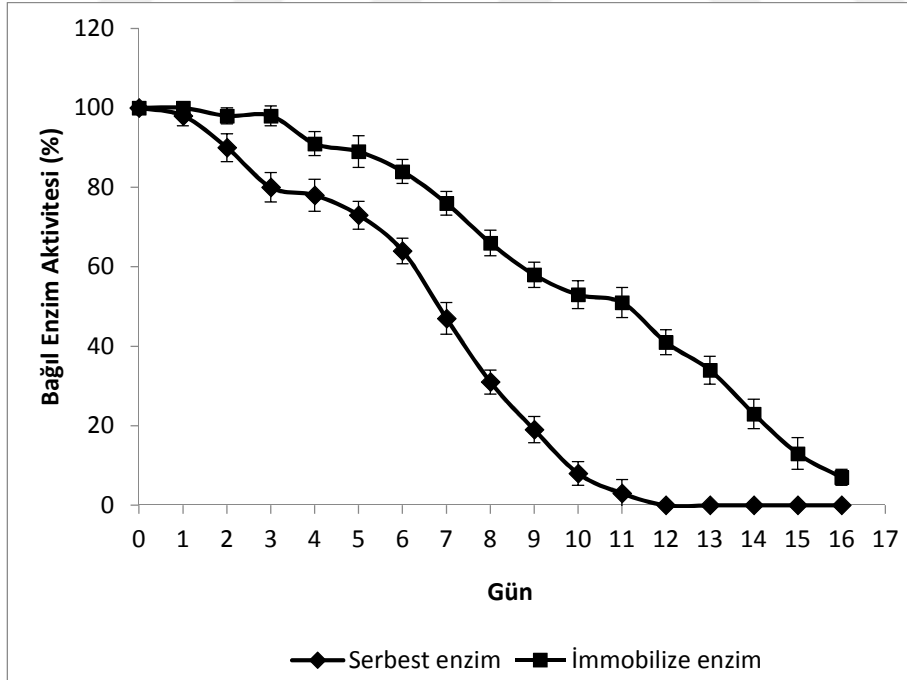
*P. mirabilis* immobilize üreazının başlangıç aktivitesinin 3 gün boyunca yaklaşık % 100'ünü koruduğu, serbest enzim aktivitesinin neredeyse sıfırlandığı, 11. günde ise hala % 51'lik aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.11.c).



Şekil 4.11a. *Cicer arietinum* üreazı için depo kararlılığı



Şekil 4.11b. *Aspergillus fumigatus* üreazı için depo kararlılığı



Şekil 4.11c. *Proteus mirabilis* üreazı için depo kararlılığı

#### 4.5. İmmobilize Üreazlar İle Hayvan Yemlerinde Üre Tayini

İmmobilize üreaz enzimleri kullanılarak hayvan yemlerindeki ürenin tayini için, içeriği bilinen birbirinden farklı 4 hayvan yemi kullanıldı. A, B, C ve D olarak sembolize edilen hayvan yemlerinde teorik olarak 10 mg üre içerdiği belirlenen çözeltiler elde edildi. Bu çözeltiler immobilize üreaz enzimleri ile muamele edilerek üre miktarları ölçüldü.

*C. arietinum* immobilize üreazı ile A, B ve C yemlerindeki üre miktarları yaklaşık 8 mg olarak birbirlerine oldukça yakın değerlerde belirlendi. D yeminde ise teorik değere daha yakın olarak 9.11 mg olarak ölçüldü. (Tablo 4.4a)

*A. fumigatus*'dan immobilize edilen üreaz enzimi ile B ve C yemlerindeki üre miktarları 9.10 ve 9.62 mg ile teorik değere oldukça yakın, A ve D yemlerinde ise 12.8 ve 11.7 mg olarak bir miktar daha yüksek tayin edildi. (Tablo 4.4b)

*P. mirabilis* immobilize üreazı ile tüm yemlerde yaklaşık 9-10 mg'lık değerlerle ile teorik miktara en yakın değerlerde ölçüldü. (Tablo 4.4c)

**Tablo 4.4a.** *Cicer arietinum* Üreazı ile Üre Tayini

Yem Çeşidi	Üre Miktarı (mg)
A	8.00
B	8.05
C	8.70
D	9.11



**Tablo 4.4b.** *Aspergillus fumigatus* Üreazı ile Üre Tayini

Yem Çeşidi	Üre Miktarı (mg)
A	12.80
B	9.10
C	9.62
D	11.70

**Tablo 4.4c.** *Proteus mirabilis* Üreazı ile Üre Tayini

Yem Çeşidi	Üre Miktarı (mg)
A	9.24
B	10.30
C	9.36
D	10.83

#### 4.6. İmmobilize Üreazlar İle Üre Hidrolizi

Üre hidroliz deneyleri bitki, bakteri ve fungus immobilize üreazları ile aynı şekilde bölüm 3’de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Buna göre *C. arietinum* üreazı ilk 20 dakika inkübasyon sonunda ürenin % 30’unu hidroliz etti. Ayrıca 40 dakika sonunda ürenin % 87’sini hidroliz ettiği hesaplandı. *A. fumigatus* üreazı ilk 20 dakikada ürenin % 40’ını hidroliz etti. Ayrıca 40 dakika sonunda ürenin % 98’ini hidroliz ettiği hesaplandı. *P. mirabilis* üreazı ise ilk 20 dakika inkübe edilmesinin sonunda ürenin % 50.44’ını hidroliz etti. Ayrıca 40 dakika sonunda ürenin % 92.7’sini hidroliz ettiği hesaplandı (Tablo 4.5).

**Tablo. 4.5.** İmmobilize Üreazlar ile Üre Hidrolizi

Üre hidroliz oranı (%)	20. dk	30. dk	40. dk
<i>C. arietinum</i>	% 30	% 69	% 87
<i>A. fumigatus</i>	% 40	% 74	% 98
<i>P. mirabilis</i>	% 50.44	% 71	% 92.7

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Enzimler en fazla uygulama alanı bulunan genellikle protein yapısında olan biyomoleküllerdir. Tüm canlı sistemler enzim moleküllerini içermektedir. Metabolizmanın sürekliliğinin sağlanmasında ve regülasyonunda sayısız enzim molekülü görev almaktadır. Enzimler farklı biyolojik sistemlerden izole edilerek, in vitroda çok çeşitli amaçlar için kullanılabilirler. Enzim immobilizasyonu yüksek maliyetli enzimlerin kararlılıklarını koruduğu ve yeniden kullanılabilme olanağı sağladığı için son yıllarda oldukça ilgi görmektedir [185].

Bu tez çalışması kapsamında, tıp ve endüstride oldukça yaygın ve önemli kullanım alanları olan üreaz enzimi ile çalışılmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde çeşitli bitki, fungus ve bakteri örneklerinden üreaz üretimi ve izolasyonu yapılarak uygun kaynakların belirlenmesi sağlandı. Üreaz eldesi için bitkisel, fungal ve bakteri kaynakları belirlendikten sonra elde edilen enzimler için farklı immobilizasyon yöntemleri denenerek en yüksek verimde çalışan immobilizasyon yöntemi belirlendi (Tablo 4.2). Bu ön çalışmaların sonucunda üreaz üretimi için bitkisel kaynak *Cicer arietinum*, fungal kaynak *Aspergillus fumigatus*, bakteri ise *Proteus mirabilis* olarak seçildi (Şekil 4.1abc). Enzim immobilizasyon yöntemi olarak da aljinat jele tutuklama yöntemi uygun yöntem olarak saptandı. Aljinat için immobilizasyon verimleri, bitki için % 88.5, fungus için % 82 ve bakteri için % 85 olarak bulundu (Tablo 4.2). Çalışmamızda immobilizasyon verimleri üç kaynak için de birbirine yakın değerler olarak bulundu. Tüm örneklerde yüksek katalitik aktivite ve immobilizasyon yüzdesi gözlemlendi.

İmmobilizasyon tekniklerinden biri olan tutuklama tekniği bir boşluğa veya ağ içine enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi olarak tanımlanabilir. Üreaz immobilizasyonunda taşıyıcı olarak çeşitli doğal ve sentetik materyaller kullanılmıştır.

Son yıllarda üreaz enziminin immobilizasyonu için doğal veya sentetik taşıyıcılar kullanılmıştır, ayrıca tüp membranlara tutuklanıp teknik ve terapötik amaçlı kullanılmaktadır. Doğal polimerler olan sodyum aljinat [9], kitosan [2, 186], karragenan, jelatin [187], hidroksilapatit ve akrilonitril kopolimer membranlara immobilize edilmiştir [188]. Aljinata tutuklama yönteminin kolaylığı, toksik etkisinin olmaması, immobilize edilen enzime zarar vermemesi, enzim kaçışını önleyen, substrat girişine izin veren gözenekli yapıya sahip olması, biyouyumluluğu nedeniyle biyoteknolojik ve endüstriyel çalışmalarda tercih edilmektedir [10].

Çalışmanın ikinci bölümünde *C. arietinum*, *A. fumigatus* ve *P. mirabilis*'den izole edilen üreaz enzimleri sodyum aljinat jelde immobilize edildi. Immobilize enzimlerin optimum inkübasyon süresi, optimum sıcaklık, termal kararlılık, optimum pH, pH kararlılığı, substrat konsantrasyonu, tekrar kullanılabilirlik, depo kararlılığı  $K_m$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerleri gibi çeşitli parametreler araştırılarak bu bulgular serbest enzim örneklerinin değerleri ile karşılaştırıldı.

İmmobilizasyon materyali olarak kullanılan aljinat konsantrasyonu enzimin başarıyla tutuklanabilmesi için önemli bir parametredir. Çünkü aljinat ile  $Ca^{+2}$  iyonları arasındaki çapraz bağ oluşumu sayesinde jel yapısı meydana gelmektedir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda aljinat konsantrasyonu % 2-4 arasında değişmektedir [189, 190, 191]. Bu çalışmada da bitki, fungus ve bakteri üreazları sırasıyla % 1, 2, 3 ve 4'lük konsantrasyonlardaki aljinat jeller kullanılarak immobilize edildi. Aljinat konsantrasyonunun üreaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmalar sonucunda her 3 kaynak için de optimum aljinat konsantrasyonu önceki çalışmalara paralel olarak % 3 olarak bulundu (Şekil 4.2a-Şekil 4.2b ve Şekil 4.2c).

Aljinat boncuklara yüklenen enzim miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla direkt enzim ve farklı oranlarda dilüe edilmiş enzimler ile çalışma yapıldı ve bu çalışmanın sonucunda daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak [149], enzim miktarı arttıkça katalitik aktivitenin de arttığı gözlemlendi (Şekil 4.3a – 4.3b ve 4.3c).

İnkübasyon süresi enzim aktivitesinin hesaplanmasında önemli bir faktördür. Çünkü enzimatik bir reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürün miktarıyla

belirlenmektedir. Enzimler inkübasyona bırakıldıklarında reaksiyon hızı belli bir süre için zamana bağlı olarak artar, ancak bu sürenin üzerine çıktığında reaksiyon hızı yavaşlamaktadır. Bu yavaşlamanın sebepleri; reaksiyon sonucu oluşan ürünler zamanla denatüre olabilirler, substrat kullanıldığı için azalır veya tükenebilir, ya da enzim zamanla inaktive olabilir şeklinde sıralanabilir [192]. Pervin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada bitkisel üreaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon süresi 30 dakika olarak bulundu [193]. Serbest ve immobilize enzimlerin inkübasyon süresi çalışmasında, farklı sürelerde inkübe edilen *C. arietinum* üreazı en yüksek aktiviteyi serbest formda 40 dakikada immobilize formda ise 50 dakika inkübe edildiğinde gösterdi (Şekil 4.4a). Farklı sürelerde inkübe edilen *A. fumigatus* üreazı ise en yüksek aktiviteyi serbest ve immobilize formlarda benzer şekilde 30 dakika inkübe edildiğinde gösterdi (Şekil 4.4b). *Proteus mirabilis* üreazı ile yapılan inkübasyon süresi çalışması sonucunda optimum inkübasyon süresi serbest ve immobilize formlarda 40 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.4c).

pH enzim aktivitesinde önemli bir rol oynar. Reaksiyon ortamının pH'ı enzimin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli etkiye sahiptir. Enzimin aktif merkezinin işlevini yerine getirebilmesi ve konformasyonunu koruması için iyonik formda olması gerekir. Immobilize enzimlerde optimum pH kullanılan matrikse ve enzimin yüküne bağlı olarak değişir. Birçok mikroorganizmada asidik pH'da aktif olan üreaz enziminin optimum pH aralığı 4.5 – 9.0 arasında değişir [194]. Immobilizasyon ile enzimler daha ılımlı çalışma koşullarına sahip olurlar ve çalışma pH aralıkları değişebilir [195, 196, 197]. Bu çalışmada *C. arietinum*, *A. fumigatus* ve *P. mirabilis* üreazlarının her iki formu için de optimum pH 7.0 olarak bulundu (Şekil 4.5a-4.5b ve 4.5c). pH kararlılığı çalışmasında *C. arietinum* üreazının immobilize edilmesiyle pH profili üzerinde dikkat çekici bir değişim meydana gelmedi (Şekil 4.6a). *A. fumigatus* ile yapılan çalışmada serbest ve immobilize üreaz enzimi pH 7.0'de en yüksek aktiviteyi gösterdi (Şekil 4.6b). Ancak immobilize enzim farklı pH aralıklarında serbest enzime göre daha kararlı bir yapı gösterdi. *P. mirabilis* üreazının pH kararlılık çalışması sonucunda serbest ve immobilize enzimlerin her ikisi de pH 7.0 ve 8.0 arasında kararlılığını korudu (Şekil 4.6c). Yapılan pH kararlılık çalışmalarına baktığımızda aljinata immobilize enzimlerin geniş bir pH aralığında maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur [198].

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini koruyarak daha kararlı bir yapı gösterdikleri bilinmektedir [149]. Genellikle optimum sıcaklık aralıklarının dışında enzimlerin yapısının denatüre olması nedeniyle aktivite kaybedecekleri düşünülür. İmmobilizasyon ile enzimlerin üç boyutlu yapısı korunarak sıcaklık değişimlerine daha dayanıklı olmaları sağlanır.

Üreaz enziminin optimum sıcaklık derecesi izole edilen kaynağa göre değişmektedir. Reddy ve arkadaşlarının *Cajanus cajan* üreazı ile yaptıkları bir çalışmada serbest ve immobilize üreazların optimum sıcaklığı sırasıyla 47 °C ve 67 °C olarak bulunmuştur [23]. Bir fungus türü olan *Rhizopus oryzae*'dan izole edilen üreaz enziminin optimum sıcaklığı ise yapılan bir çalışma sonucunda 55 °C olarak belirlenmiştir [4]. Bakteriyel üreazlarla yapılan bir çalışmada ise *Enterobacter sp.* üreazının optimum sıcaklığının 35 °C olduğu bildirilmiştir [20]. Bu tez çalışmasında serbest ve immobilize *C. arietinum* üreazının optimum sıcaklık değerleri Reddy ve arkadaşlarının çalışmasına yakın bir değer olarak 50 °C olarak bulundu (Şekil 4.7a). *A. fumigatus* ve *P. mirabilis* üreazlarının serbest ve immobilize formlarının optimum sıcaklıkları benzer şekilde 40 °C olarak bulundu (Şekil 4.7b ve 4.7c). Çalışılan enzim immobilizasyon yönteminin enzimlerin optimum sıcaklıklarını değiştirmediği gözlemlendi.

Termal kararlılık çalışmaları immobilize enzim araştırmalarında önemli bir yer tutar. Genellikle immobilize enzimler serbest formlarına göre sıcaklık değişimlerine, denatürasyona ve çevresel etkenlere daha dirençlidirler. İmmobilizasyon işlemi enzimlerin üç boyutlu yapılarının korunmasını sağlar ve enzimlere termal stabilite kazandırır [198]. Bu çalışmada da literatürdeki çalışmalara paralel olarak; serbest ve immobilize üreazlar 40 ve 50 °C'de 60 dakika bekletildiğinde başlangıç aktivitelerinin tamamını korudular. İmmobilize nohut üreazı 60 °C'de 30 dakika beklediğinde başlangıç aktivitesinin % 92'sini korurken serbest enzim aktivitesinin % 63'ünü koruyabildi (Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b). Fungus stabilite çalışmalarında ise serbest enzim 30 °C'de tüm bekleme gruplarında kararlılığını korudu. 40 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda da stabildi. 40 °C'de 60 dakika bekleme sonucu aktivitesinin % 36'sını kaybetti. İmmobilize enzim ise 30 °C ve 40 °C de tüm bekleme gruplarında stabilite gösterdi. 50 °C'de 10 dakika beklediğinde ise immobilize enzim aktivitesinin % 79'unu korudu (Şekil 4.8c ve Şekil 4.8d). Bakteri üreazı ile yapılan termal kararlılık çalışmasında serbest enzim 30 ve 35 °C'de tüm bekleme gruplarında kararlılığını

korudu. 40 °C’de 10 dakika inkübasyon sonunda da stabildi. Serbest enzim 40 °C’de 30 dakika bekleme sonucu aktivitesinin % 10’unu kaybetti. İmmobilize enzim ise 40 °C de 30 dakika bekleme sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. 45 °C’de 10 dakika bekleme grubunda ise immobilize enzim aktivitesinin % 80’ini korurken serbest enzim ise % 56’sını korudu (Şekil 4.8e ve Şekil 4.8f). Bu çalışma sonucunda bitki, bakteri ve fungusdan izole edilen üreaz enziminin aljinat jelde tutuklanmasının enzimlerin termal kararlılığını olumlu yönde etkilediği gözlemlendi.

Üç farklı kaynaktan izole edilen serbest ve immobilize enzim örneklerinin kinetik özellikleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Buna göre *C. arietinum* immobilize enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri yükselirken,  $k_{cat}$  değeri ise (0.1) serbest enzimin  $k_{cat}$  değerine (0.083) oldukça yakın olduğu bulundu. *A. fumigatus* immobilize enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri serbest enzime göre azalırken, katalitik etkinlikleri ( $k_{cat}/K_m$ ) 2.3 ve 2.7 olarak birbirine yakın değerlerde bulundu. *P. mirabilis* immobilize enziminin  $K_m$  değeri serbest enziminkinden oldukça düşük bulunmasına rağmen,  $k_{cat}$  değerlerine bakıldığında immobilize enzimin 7.0, serbest enzimin 7.8 olduğu belirlendi. Katalitik etkinlik açısından değerlendirildiğinde *C. arietinum* ve *A. fumigatus* üreazlarının katalitik etkinliklerinin dikkate değer bir değişim göstermediği ancak *P. mirabilis* immobilize enziminin katalitik etkinliğinin 2.4’den 17.5’e çıktığı gözlemlendi. Ancak  $k_{cat}$  değerlerinin hemen hemen aynı olduğu belirlendi. Bu bulgulardaki farklılıkların enzimlerin saflaştırmadan immobilize edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İmmobilize enzimler bazı nedenlerden dolayı farklı kinetik özellikler gösterebilir. İmmobilizasyon işlemi enzimin yapısında konformasyonel değişimlere neden olabilir. İmmobilize enzim serbest ortamındakinden farklı bir ortama taşınmıştır ve bu da kinetik özelliklerini etkileyebilir. Ayrıca çözelti ve destek materyali arasında bir bölünme söz konusu olduğu için enzimin çevresindeki substrat konsantrasyonu toplam çözelti hacminden önemli derecede farklılık gösterebilir [149, 199].

Enzimler serbest formda iken yeniden kullanılabilirlikleri mümkün değildir. Bu nedenle endüstride kullanılan bazı önemli enzimler immobilize edilerek kullanılmaktadır. Aljinat boncuklara immobilize edilen *C. arietinum* üreazının tekrar kullanılabilirlik çalışmasında 9 kez arka arkaya aynı boncuklar ile aktivite tayini yapıldı

ve 5 kullanım sonunda boncukların aktivitesini yaklaşık % 60 oranında koruduğu belirlendi. Ayrıca 7. kullanım sonunda hala aktivitenin % 40'ının korunduğu belirlendi. (Şekil 4.10a). İmmobilize *A. fumigatus* üreazının tekrar kullanılabilirlik çalışmasında 11 kere arka arkaya aynı boncukların aktivite tayini yapıldı ve 5 döngü sonunda immobilize enzimin aktivitesini % 44 oranında koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.10b). Aljinat boncuklara immobilize edilen *P. mirabilis* üreazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için 16 kere aynı boncuklarla aktivite tayini yapıldı ve elde edilen bulgulara göre, 8 ölçüm sonunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesini % 85 oranında koruduğu, 12. ölçüm sonunda ise yaklaşık % 55'ini koruduğu belirlendi (Şekil 4.10c). Aljinat boncuklara immobilize edilmiş farklı kaynaklı üreaz enzimlerinden bakteri üreazının yeniden kullanılabilirliğinin bitkisel ve fungal kaynaklardan daha iyi olduğu belirlendi.

Serbest enzimler genellikle depolamaya uygun değildir ve büyük oranda aktivite kaybı yaşarlar [199]. İmmobilizasyon işlemi ile enzimde aktivite kaybı minimuma indirilerek enzimin uzun süre depolanması amaçlanmaktadır [148]. Jack bean üreazı ile yapılan depo karalılığı çalışmasında serbest üreaz enzimi aktivitesinin tamamını 14 günde kaybederken, immobilize üreazın ise yaklaşık 50 gün sonunda aktivitesinin tamamını kaybettiği bildirilmiştir [200]. Bu çalışmada ise immobilize *C. arietinum* üreazı 3 gün boyunca başlangıç aktivitesinin tamamını korudu. Serbest enzim aktivitesini büyük ölçüde kaybetti (Şekil 4.11a). İmmobilize *A. fumigatus* üreazı 2 gün boyunca başlangıç aktivitesinin tamamını korudu. Beşinci günde hala aktivitesinin % 88'ini koruduğu görüldü. Serbest enzim 5. günün sonunda aktivitesinin % 43'ünü kaybetti [201]. (Şekil 4.11b). *P. mirabilis* üreazı ise 3 gün boyunca başlangıç aktivitesinin tamamına yakını korudu. sekizinci günün sonunda hala aktivitesinin % 76'sını koruduğu gözlemlendi. Serbest enzim ise 8. günün sonunda aktivitesini % 47'sini koruyabildi (Şekil 4.11c). İmmobilize enzim örnekleri serbest formlarına göre daha iyi depolama özelliği gösterdi. Sonuç olarak immobilize bitki, fungus ve bakteri üreazları yapılan araştırmalara paralel olarak serbest formlarına göre depolama yönünden daha kararlı bulundu.

Ürenin büyükbaş hayvan yemlerinde protein ilavesi olarak kullanıldığı ve vücut ağırlığı üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Ayrıca ürenin fazla miktarının toksik



etkileri üzerine çalışmalar bulunmaktadır [113, 120, 202]. Bu tez çalışmasında immobilize bitki, fungus ve bakteri üreazları kullanılarak içeriği bilinen (Tablo 3.3) 4 farklı büyükbaş hayvan yeminde üre tayini yapıldı. Farklı yem çeşitlerindeki teorik üre miktarına en yakın ölçümleri veren immobilize enzim örnekleri, A, B ve D yemleri için *P. mirabilis* üreazı C yemi için ise *A. fumigatus* üreazı olarak belirlendi (Tablo 4.4a - 4.4b ve 4.4c).

Üre, üreaz enzimi sayesinde hızlı bir şekilde  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$ 'ye hidrolize olmaktadır. Aktaş'ın toprak örnekleriyle yaptığı çalışmaya göre topraktaki üre üreaz enzimi ile hidrolize edilmektedir. Ayrıca sıcaklık arttıkça hidroliz de artmaktadır [203]. Karaca ve arkadaşlarının yaptığı üreaz aktivitesi ve amonyak çıkışı belirleme çalışmasında, üre ilaveli toprak numunelerinin amonyak çıkışı üresiz numunelere göre 5 kat fazla bulunmuştur [204]. Üre hidrolizi çalışmasında bitkisel üreazın inkübasyonun 20. dakikasında ürenin % 30'unu hidroliz ettiği gözlemlendi. Ayrıca 40 dakika sonunda ürenin % 87'sini hidroliz ettiği hesaplandı. Fungus üreazı ise ilk 20 dakikada ürenin % 40'ını hidroliz etti. Ayrıca 40 dakika sonunda ürenin % 98'ini hidroliz ettiği gözlemlendi. *P. mirabilis* üreazı ise ilk 20 dakika inkübasyon sonunda ürenin % 50.44'ünü hidroliz etti. Ayrıca 40. dakika sonunda ürenin % 92.7'sini hidroliz ettiği kaydedildi (Tablo 4.5). Bu çalışmanın sonucunda bakteriyel üreazın bitki ve fungus üreazlarına göre üreyi daha hızlı hidroliz etme özelliğine sahip olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında 3 farklı kaynaktan (*C. arietinum*, *A. fumigatus*, *P. mirabilis*) izole edilen üreaz enzimleri aljinat jellere başarıyla immobilize edilerek optimum çalışma koşulları belirlendi. Literatürde daha önce bu 3 farklı kaynaktan izole edilen üreaz enziminin aljinata immobilize edilmesiyle ilgili çalışmaya rastlanmadı. Daha sonra immobilize üreaz enzimi içeriği farklı büyükbaş hayvan yemlerinde üre tayininde kullanıldı. Yapılan literatür araştırmasında hayvan yemlerinde üre tayiniyle ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Son olarak immobilize üreazların üre hidrolizinde kullanılabilirliği araştırıldı.

Elde edilen bulguların ışığı altında, bitki fungus ve bakteri kaynaklı üreaz enzimlerinin aljinat jelde immobilizasyonunun enzim aktiviteleri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı görüldü. Tam tersi tüm enzim örneklerinin yeniden kullanım, depolama ve termal kararlılık gibi özelliklerinin iyileştiği belirlendi. *C. arietinum* üreazının yüksek sıcaklıkta aktif olması onun diğer kaynaklara göre sıcaklık açısından

daha üstün bir özelliği olduğu bildirilebilir. *P. mirabilis* üreazının ise depolama, yeniden kullanım, üre tayini ve hidrolizinde daha başarılı olduğu belirlendi. İmmobilize edilen tüm enzim örnekleri üreazın geleneksel kullanım alanlarının dışında hayvan yemlerinde üre tayininde başarıyla kullanıldı. Ayrıca üre hidroliz yetenekleri de belirlendi.



## KAYNAKLAR

- [1] Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B., *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayınları, İstanbul, 2007.
- [2] Tunalı S., *Fındıktan (Corylus maxima Miller) üreazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 2008.
- [3] Franssen M., Steunenberg P., Scott E., Zuillhof H., Sanders J., *Immobilised enzymes in biorenewables production*, Chem. Soc. Rev, 42, 6491-6533, 2013.
- [4] Neveen S., Geweely I., *Purification and Characterization of Intracellular Urease Enzyme Isolated from Rhizopus oryzae*, Biotechnology, 5, 358-364, 2006.
- [5] Gabrovska K., Georgieva A., Gonjevargova T., Stoilova O., Manolova N., *Poly(acrylonitrile) composite membranes for urease immobilization*, Journal of Biotechnology, 129, 674-680, 2007.
- [6] Albayrak N., Yang Y., *Immobilization of Aspergillus oryzae  $\beta$ -galactosidase on tosylated cotton cloth*, Enzyme and Microbial Technology, 31, 371-383, 2002.
- [7] Ertan F., Yağar H., Balkan B., *Optimization of  $\alpha$ -amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads*, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 37, 195- 204, 2007.
- [8] Yağar H., Ertan F., Balkan B., *Comparison of some properties of free and immobilized  $\alpha$ -amylase by Aspergillus sclerotiorum in calcium alginate gel beads*, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 38, 13-23, 2008.
- [9] Kumar S., Dwevedi A., Kayastha M., *Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications*, Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic., 58, 138-145, 2009.
- [10] Göksungur Y., Güvenç U., *Cell immobilization in calcium alginate and biotechnological applications*, Food, 27, 6, 511-518, 2002.
- [11] Konsoula Z., Liakopoulou M., *Thermostable  $\alpha$ -amylase production by Bacillus subtilis entrapped in calcium alginate gel capsules*. Enzyme Microb. Tech, 39, 690-696, 2006.
- [12] Catana R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S., Fernandes P., *Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis*, Food Chem, 91, 517-520, 2005.

- [13] Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G., Olivera-Severo D., Carlini C., ***Jackbean, Soybean and Bacillus pasteurii ureases biological effects unrelated to ureolytic activity***, Eur. J. Biochem., 271, 1357-1363, 2004.
- [14] Sirko A., Brodzik R., ***Plant ureases: Roles and regulation***, Acta Biochimica polonica, 47, 1189-1197, 2000.
- [15] Becker –Ritt A.B., Martinelli A.H., Mitidieri S., Feder V., Wasserman G.E., MH. Vainstein M.H., Oliveira J.T., Fiuza L.M., Pasqualli G., Carlini C.R., ***Antifungal activity of plant and bacterial ureases***, Toxicon., 50, 7, 971-983, 2007.
- [16] Olivera D., Wasserman G., Carlini C., ***Urease display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease producing bacteria?***, Brazilian Journal of Medical And Biological Research., 39, 851-861, 2006.
- [17] Dindar B., Karakuş E., Abasıyanık F., ***New urea biosensor based on urease enzyme obtained from Helicobacter pylori***, Appl Biochem Biotechnol., 165, 5-6, 2011.
- [18] Ghasemi M., Bakhtiari M., Fallahpour M., Noohi H., Moazami N., Amidi Z., ***Screening of urease production by Aspergillus niger strain***, Iranian Biomedical Journal., 8, 1, 47-50, 2004.
- [19] Sujoy B., Aparna A., ***Enzymology, Immobilization and Applications of Urease Enzyme***, Int. Res. J. Biological Sci, 2, 6, 51-56, 2013.
- [20] Liu J., Xu Y., Zhao GA., ***Optimization production of acid urease by Enterobacter sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine***. Bioprocess Biosyst Eng, 35, 4, 651-7, 2012.
- [21] Kara F., Demirel G., Tümtürk H., ***Immobilization of urease by using chitosan and poly(acrylamide-co-acrylic acid) /kappa-carragenan supports***, Bioprocess Biosyst Eng., 29, 3, 203-211, 2006.
- [22] Krishna B., Singh A., Patra S., Dubey V., ***Purification, characterization and immobilization of urease from Momordica charantia seeds***, Process Biochemistry., 46, 1486-1491, 2011.
- [23] Reddy R., Srivastava P., Kayastha P., ***Immobilization of pigeonpea (Cajanus cajan) urease on DEAE-cellulose paper strips for urea estimation***, Biotechnol. Appl. Biochem., 39, 323- 327, 2004.
- [24] Cooper G., Hausman E., ***Hücre Moleküler Yaklaşım***, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2006.

- [25] Balasubramanian A., Ponnuraj K., *Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure*, J. Mol. Biol, 400, 274–283, 2010.
- [26] Champe P.C., Harvey R.A., *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1997.
- [27] Campbell N.A., Reece J.B., *Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008
- [28] Gözükara E.M., *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2001.
- [29] <http://thebiologs.blogspot.com.tr/2013/11/enzymes-cape-unit1.html>
- [30] <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-1-molecules-of-life/biochemical-processes/enzymes.html>
- [31] <http://http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/Slide2.GIF>
- [32] <http://www.biochemreview.weebly.com>
- [33] Nelson D.L., Cox M.M., *Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.
- [34] <http://www.oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/lecture/enzymesoutline.html>
- [35] Peterson M.E., Daniel M.R, Danson M.J, Eienthal R., *The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters*, Biochem. J, 402, 331–337, 2007.
- [36] Conant R. T., *A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition*, Soil Biology and Biochemistry 47, 2012.
- [37] [http://alevelnotes.com/content\\_images/i71\\_gcsechem\\_18part2.gif](http://alevelnotes.com/content_images/i71_gcsechem_18part2.gif)
- [38] <http://www.metetunc.com/FileUpload/op53950/File/2001-ossoru4.jpg>
- [39] Leake J. R., Read D. J., *Proteinase Activity In Mycorrhizal Fungi I. The Effect Of Extracellular pH On The Production And Activity Of Proteinase By Ericoid Endophytes From Soils Of Contrasted Ph*. New Phytologist, 2, 243-250, 1990.
- [40] [http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/finans/Ders\\_Notlari/Ders\\_Notlari/Enzimler/pH.jpg](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/finans/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Enzimler/pH.jpg)
- [41] <http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/25932/=18.13.jpg?revision=1>
- [42] [http://leavingbio.net/ENZYMES\\_files/image025.gif](http://leavingbio.net/ENZYMES_files/image025.gif)
- [43] İnan Y., Gül M., *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2001.
- [44] <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/lineweaver-burk-plot.jpg>
- [45] <http://www.worthington-biochem.com/urc/images/reaction.jpg>

[46] Mobley L.T, Hausinger R., *Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization*, Microbiological reviews, 53, 85-108, 1989.

[47] Follmer C., Wassermann G.E., Carlini C.R., *Separation of Jack bean (Canavalia ensiformis) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity*, Plant Science, 167, 241-246, 2004.

[48] Dixon N.E., Gazzola C., Blakeley R.L., Zerner B., *Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel*, J. Am. Chem. Soc, 97, 4131-4133, 1975.

[49] Andrews R.K., Dexter A., Blakeley R.L., Zener B., *Jack bean urease (EC 3.5.1.5). On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid*, J. Am. Chem. Soc., 108, 7124-7125, 1986.

[50] Odake S., Morikawa T., Tsuchiya M., Imamura L., Kobashi K., *Inhibition of Helicobacter pylori urease activity by hydroxamic acid derivatives*, 17, 10, 1329-32, 1994.

[51] Burne RA., Chen YY., *Bacterial ureases in infectious diseases*, **Microbes Infect**, 2, 5, 533-42, 2000.

[52] Krajewska B., *Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59, 9-21, 2009.

[53] [http://bioinorg.agrsci.unibo.it/Images/urease\\_native01.jpg](http://bioinorg.agrsci.unibo.it/Images/urease_native01.jpg)

[54] Hefnawy M., Sakran M., Ismail A., Aboelfetoh E.F., *Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating Pisum Sativum L. seeds*, BMC Biochem, 15, 15, 2014.

[55] Ciurli S., Benini S., Rypniewski W.R., Wilson K.S., Miletto S., Mangani S., *Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms*, Coordination Chemistry Reviews, 192, 331–355, 1999.

[56] Dixon N.E., Riddles P.W., Gazzola C., Blakeley R.L., Zerner B., *Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds*, Can J Biochem., 58, 12, 1335-44, 1980.

[57] Pearson M.A., Michel L.O., Hausinger R.P., Karplus P.A., *Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited Klebsiella aerogenes urease*, Biochemistry, 36, 26, 8164-72, 1997.

[58] Smithson J. B., Thompson J. A., Summerfield R. J., *The Grain Legumes. Chickpea (Cicer arietinum L.)*, Collins Professional and Technical Books, 8, 312-391, 1985.

- [59] Uz M., Yemenicioğlu A., Altınkaya S., Bülbul H., *Üreazın Soya fasülyesinden kısmi saflaştırılması, selüloz asetat membranlarına immobilize edilmesi ve kinetik performanslarının belirlenmesi*. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi sözlü sunumlar
- [60] Tarek M. M., Magda A. M., Saleh A. M., Afaf S. F., *Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits*, 68, 3, 215–223, 1999.
- [61] Polacco J.C., Holland M.A., *Roles of urease in plant cells*, Int. Rev. Cytol, 145, 65-103, 1993.
- [62] Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P., *Molecular Biology of microbial ureases*, Microbiol. Rev, 59, 451-480, 1995.
- [63] Follmer C., *Insight into the role and structure of plant ureases*, Phytochemistry, 69, 18-28, 2008.
- [64] <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/97799.jpg>
- [65] <http://carawangroup.net/wp-content/uploads/2013/12/Chick-peas.jpg>
- [66] Salih O. M., Omar A. E., Elsayed E. H., Asaad K., *Ahmed E. S., Enzyme from new proteus mirabilis strain*, Journal of Advanced Scientific Research, 5, 4, 2014.
- [67] Breitenbach J.M., Hausinger R.P., *Proteus mirabilis urease Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids*, Biochem. J, 250, 917-920, 1988.
- [68] Graham D.Y., *Therapy of Helicobacter pylori: Current status and issues*. Gastroenterology, 118, 2-5, 2000.
- [69] Altındış M., Özdemir M., *Helicobacter pylori and diagnosis*, The Medical Journal of Kocatepe 2, 1-12, 2003.
- [70] <https://userscontent2.emaze.com/images/dff485f6-40fe-4e45-9aa880a5fb485303/50f6b684-50a2-4c4f-958f-eb64b466a7d3image2.jpg>
- [71] Kwon C. K. J., Bennett J.E., *Medical Mycology*. Philadelphia; Lea and Fabinger, 1992.
- [72] Latgé JP. *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 2, 310-350, 1999.
- [73] Kantarcıoğlu A.S., Yücel A., *Aspergillus cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, patogenezi, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri*, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 34, 140-157, 2003.
- [74] Öz Y, Akşit F, Aslan M, Kaşifoğlu N, Kiraz N, *Klinik Aspergillus izolatları: Tür dağılımı ve antifungal duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesi*, Ankem Derg, 26, 2, 69-73, 2012.
- [75] Paullatge J, *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*, Clinical Microbiology Reviews, 12, 2, 310-350, 1999.

- [76] Mackay E.M., Pateman J.A., *The regulation of urease activity in Aspergillus nidulans*, Biochemical Genetics, 7, 763-776, 1982.
- [77] Fellbauma C., Gachomoa E., Beesettyb Y., Choudharib S., Strahanc G., Pfefferc P., Kiersd E., Bücking H., *Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis*, Proc Natl Acad Sci, 109, 7, 2666–2671, 2012.
- [78] Ali M. I. A., Tahany M. A., Amany H., Amal A. H., *Effect of heavy metals and vitamins on urease production and activity by Aspergillus fumigatus and Fusarium nivale*. Egyptian Journal Of Physiological Sciences, 15, 49-62, 1993.
- [79] <https://62e528761d0685343e1cf3d1b99a743ffa4142d9d7f1978d9686.ssl.cf2.rackcdn.com/files/26175/article/area14mp/2gj7w5xc-1372179603.jpg>
- [80] Turna Ö., *Aminoasit biyosensörlerinin geliştirilmesi*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 2006.
- [81] Altunören O., Kaya B., Sayarlıoğlu H., Gökçe M., Doğan E., *Diabetic Uremic Basal Ganglia Involvement in a Patient who Treated with Regular Dialysis*, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 19, 3, 221-223, 2010.
- [82] Yingjie Q., Cabral M.S., *Review: Properties and Applications of Urease*, Biocatalysis and Biotransformation, 20, 1, 2009.
- [83] Kayastha A.M., Das N., *A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation.*, Biochemical Education, 27, 114-117, 1999.
- [84] Fujinawa S., Todoroki H., Ohashi N., Toda J., Terasaki M, *Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine*, Journal of Food Science 5,4, 2006.
- [85] Andrich L., Esti M., Moresi M., *Urea Removal in Model Wine Solutions by Immobilized Acid Urease in a Stirred Bioreactor*, Conference Paper, 17, 2009.
- [86] Ough C. S., Trioli G., *Urea Removal from Wine by an Acid Urease*, Am. J. Enol. Vitic 39, 4, 303-307, 1988.
- [87] Kakimoto S., Sumino Y., Kawahara K., Yamazaki E., Nakatsui I, *Purification and characterization of acid urease from Lactobacillus fermentum*, Appl Microbiol Biotechnol, 32, 5, 538-43, 1990.
- [88] Andrich L., Esti M., Moresi M., *Urea degradation in some white wines by immobilized acid urease in a stirred bioreactor*, J Agric Food Chem. 58, 11, 6747-53, 2010.



- [89] Samborska A., Stepniewska Z., Stepniewski W., ***Influence of different oxidation state of chromium on soil urease activity***, Geoderma, 122, 317-322, 2004.
- [90] Özçelik M., Özdemir N., ***Koyun meme doku arjinazının bazı biyokimyasal özellikleri***, Turk J Vet Anim Sci, 27, 719-725, 2003.
- [91] Sheliakina M., Arkhypova V., Soldatkin O., Saiapina O., Akata B., Dzyadevych S., ***Urease-based ISFET biosensor for arginine determination***, Talanta, 121, 18-23, 2014.
- [92] Baskın Y., Yiğitbaşı T., Afacan G., Akgün F., Dere R., ***Sağlıklı bireylerde immunoglobulin (IGA, IGG, IGM) ve IGG alt grupları referans aralıkları***, Türk Biyokimya Dergisi, 35, 4, 325–332, 2010.
- [93] Mizukami T., Osawa T., Niwa M., Oya A., Masubuchi N., Takahashi S., ***An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against urease of Helicobacter pylori***, Rinsho Byori, 42, 11, 88-93, 1994.
- [94] Amir H. R., Fadhil A., Abbudi A., Razak H.A., ***Screening of H. pylori Positive Patients for the Potential Presence of Atrophic Gastritis through Studying the Gastric Panel and Anti- Helicobacter Antibodies***, International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences, 3, 1, 2015.
- [95] Sansubrino A., Mascini M., ***Development of an optical fibre sensor for ammonia, urea, urease and IgG.*** Biosens Bioelectron, 9, 3, 207-216, 1994.
- [96] Timothy W. M., Hostetter T.H., ***Uremia***, N. Engl J Med, 357, 1316-1325, 2007.
- [97] Follmer C., ***Insights into the role and structure of plant ureases***, Phytochemistry, 69, 18-28, 2008.
- [98] Sharma M., Kumar V., Kumar J., Pundir C., ***Preparation of reusable enzyme strips using alkylamine and arylamine glass beads affixed on plastic strips for urea determination***, Indian Journal of Chemical Technology, 16, 357-360, 2009.
- [99] Patton C., Crouch S., ***Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia***, Anal Chem, 49 (3), 464–469, 1977.
- [100] Watford M., ***Mini-Series: Modern Metabolic Concepts: The Urea Cycle***, Biochemistry and molecular biology education , 31, 289–297, 2003.
- [101] [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/6/64/Urea\\_cycle\\_1.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/6/64/Urea_cycle_1.png)
- [102] Kıyıkım E., Aydın A., ***Çocukluk Çağında Hiperamonyemiye Yaklaşım***, Genç Pediatristler Dergisi, İstanbul, 2015.

- [103] Nakamura K., Kido J., Mitsubuchi H., Endo F., **Diagnosis and treatment of urea cycle disorder in Japan**, Pediatrics International, 56, 506-509, 2014.
- [104] Görgülü M., **“Büyük ve Küçükbaş Hayvan Besleme”**. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitapları Genel Yayın, Adana, 2002.
- [105] Doğan İ., Doğan N., Akcan A., **Rasyonel ve Ekonomik Hayvan Beslemede Hedef Programlamadan yararlanma**, Turk J Vet Anim Sci, 24, 234-238, 2000.
- [106] Yıldız M.İ., Soysal E.K., **Tekirdağ İlinde Yetiştirilen Karacabey Merinosu x Kıvırcık Melezi Kuzularda Büyüme Eğrisinin Farklı Modellerle Belirlenmesi**, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 6,1, 2009.
- [107] Şenel S., **Hayvan Besleme**. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. İstanbul, 1986.
- [108] Cappellozza B., **Protein nutrition for cattle**. Oregon State University. Beef103, 2013.
- [109] Clark J H., Klusmeyer T. H., Cameron M R., **Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows**, J. Dairy Sci., 75, 2304-2323, 1992.
- [110] Spears J.W., **Organic Trace Minerals in Ruminant Nutrition**, Science, 58, 151-163, 1996.
- [111] Boland M.P., **Trace Minerals in Production and Reproduction in Dairy Cows**, Advances in Dairy Technology, 15, 319-330, 2003.
- [112] İmİK H., Coşkun., Aytaç M., Tiftik A., **Rasyona katılan vitamin ve iz mineral karmalarının kuzularda besi performansı, kan plazması, yapığı kalitesi ve sindirilme derecesi üzerine etkileri**, Vd. mi. Derg, 14, 151-160, 1998.
- [113] Ayaşan T., **Importance of Milk Urea Nitrogen in Dairy Cow Nutrition**, Journal Of The Faculty Of Agriculture GOU, 26, 2, 27-33, 2009.
- [114] Güney M., Karşlı A., **Süt İneklerinin Protein Fraksiyonlarına Tepkileri**, YYÜ Tar Bil Derg, 24, 3, 317- 324, 2014.
- [115] Kutsal A., Hocaoglu G., Öznacar R., Oktay E., **Rasyonel ve Ekonomik Hayvan Beslemede Dogrusal Programlamadan Yararlanma**. Lalahan Zootekni Arastırma Enstitüsü Dergisi, Cilt. XIV, 27-37, 1974.
- [116] Akman N., **Pratik Sığır Yetiştiriciliği**. Türk Ziraat Mühendisleri Birliği Vakfı Yayını, 10, 0-4, 1993.

- [117] Sarı M., Çerçi İ H., Önel A G., Deniz S., Azman M A., Bolat D., *Hayvan besleme ve beslenme hastalıkları*. Medipress Matbaacılık ve Yayıncılık Ltd. Şti, Malatya, 2008.
- [118] Hedqvist H., *Metabolism of soluble proteins by rumen microorganisms and the influence of condensed tannins on nitrogen solubility and degradation*. Doctoral thesis. ISBN 91-576-6780-2, 2004.
- [119] Sarıtaş İ., *Çiftçi koşullarındaki süt sığırlarında süt verimi, süt üre azot düzeyi ve vücut kondüsyon skoru ile üreme performansı arasındaki ilişkiler*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- [120] Pirincci H., *The Research on the Effect of Using Urea in Ratio of Dairy Cattle*, Food and feed science – technology, 1, 1303-3107, 2002.
- [121] Panday D., *Urea as a non-protein nitrogen sources for ruminants*, Alltech Young Scientist competition, 2010.
- [122] Davis L.G., Lassiter C.A., Seath D.M., Rast J., *An evaluation of urea and dicyandiamide for milking cows*, J. Anim. Sci, 15, 515, 1966.
- [123] Brown P.B., Hansard S.L., Thrasher D.M., Robertson G.L., *Diammonium phosphate and urea in beef cattle rations*, J. Anim. Sci, 25, 261, 1966
- [124] Oltjen R.R., Nelson A.E., Tilman A.D. *Ruminant studies with diammonium phosphate and urea*, J. Anim. Sci, 22, 36, 1963.
- [125] CampIing N., Freer M., Balch C.C., *Factors affecting the voluntary intake of food by cows*, British J. Nutrition 16, 115, 1962.
- [126] Satapathy N., Leffel E.C., *Effect of urea on intake and utilization of barley straw and on ruminal volatile fatty acids in lambs*, The Indian Veterinary Journal, 43, 1069, 1966.
- [127] Belasco I.J., *Comparison of urea and protein meals as nitrogen surces for rumen microorganism: Urea utulization and cellulose digestion*. J. Anim. Sci, 13, 739, 1954.
- [128] CampIing N., *M. Freer and C.C. Balch, Factors affecting the voluntary intake of food by cows*. British J. Nutrition 16, 115, 1962.
- [129] Camboll T., Loosli J.K., Warner R.G., Tansaki I., *Utilization of biuret in ruminants*, j.Anim. Sci, 22, 139, 1963.
- [130] Satapathy N., Leffel E.C., *Effect of urea on intake and utilization of barley straw and on ruminal volatile fatty acids in lambs*, The Indian Veterinary Journal, 43, 1069, 1966.

- [131] Stewart W.E., Stewart D.G., Schultz L.H., ***Rates of volatile fatty acids production in the bovine Rumen***, J. Anim. Sci,17, 723, 1958.
- [132] Cassel E.K., ***Using Non-Protein Nitrogen to Control Feed Cost***, Extension Extra, August, 1996.
- [133] Tadele Y., Amha N., ***Use of Different Non Protein Nitrogen Sources in Ruminant Nutrition: A review***, Advances in Life Science and Technology, 29, 24-81, 2015.
- [134] Lanyasunya T.P., H. Wang., S.A. Rong., P.K. Abdulrazak., J.O. Kaburu., T.A. Makori., D.M. Mwangi., ***Factors Limiting Use of Poultry Manure as Protein Supplement for Dairy Cattle on Smallholder Farms in Kenya***, International Journal of Poultry Science 5 1, 75-80, 2006.
- [135] Kaya S., Yavuz H., ***Yem ve yem hammaddelerinde bulunan olumsuzluk faktörleri ve hayvanlara yönelik etkileri: organik nitelikli olumsuzluk faktörleri***, A.Ü. Vet. Fak. Derg. 40, 4, 586-614, 1993.
- [136] Şenel H.S., Dilmen S., ***İnek rasyonlarındaki ürenin rumen uçucu yağ asitlerine etkisi ve bunun süt ve süt yağı ile ilişkisi***, A. O.Veteriner Fakültesi Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüsü.
- [137] Antonelli A.CG., Torres A.S., Soares P.C., Mori C.S., Sucupira M.C.A., Ortolani E.L., ***Ammonia poisoning causes muscular but not liver damage in cattle***, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, 59, 8-13, 2007.
- [138] Overton T.R., J.K. Drackley., Abbamonte C.J., Beaulieu A.D., Emmert L.S., Clark J.H., ***Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminant***, J. Dairy Sci, 81, 91, 1998.
- [139] Datta S., Christena L., Rajaram Y., ***Enzyme immobilization: an overview on techniques and support***, 3 Biotech, 3, 1-9, 2013.
- [140] Ateş S., ***İmmobilize enzimler ve besin endüstrisinde kullanılması***, Gıda, 18, 2, 129-130, 1993.
- [141] Rosa CC., Cruz HJ., Vidal M., Oliva AG., ***Optical biosensor based on nitrite reductase immobilised in controlled pore glass***, Biosens Bioelectron, 17, 45–52, 2002.
- [142] Wu SC., Lia YK., ***Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization***, J Mol Catal B-Enzym, 54, 103–108, 2008.
- [143] Wang HY., Hettwer DJ., ***Cell immobilization in j-carrageenan with tricalcium phosphate***, Biotechnol Bioeng, 14, 1827–1838, 1982.
- [144] Klein MP., Scheeren CW., Lorenzoni ASG., Dupont J., Hertz PF., ***Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization***, Process Biochem 46, 1375–1379, 2011.

- [145] Singh B.D., *Biotechnology expanding horizons*. Kalyani, India, 2009.
- [146] Brena B.M., Batista- Viera F., *Immobilization of Enzymes. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition Edited by: J. M. Guisan c Humana Press In, 2, 15– 30, 2006.
- [147] Zaborsky O., *Adsorption Immobilized Enzyme*, Ed. by Weast, R.C., CRCPress, 37–44, 1973.
- [148] Acar D, *Üreaz enziminin Ca-aljinat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi*, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [149] Kocatürk S., *Enginar polifenol oksidazının alginat ve karragenan jellerde immobilizasyonu ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enzstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [150] <http://www.syncozymes.com/images/immobi.JPG>
- [151] Gupta M., Mattiasson B., *Unique applications of immobilized pro-teins in bioanalytical systems. In: Methods of Biochemical Analysis*, 36, 1–34, 1992.
- [152] Kennedy J.F., *Handbook of enzyme technology, in Principles of Immobilization of Enzymes*, Prentice Hall Ellis Harwood, New York, 1995.
- [153] Quirk R.A., Chan W.C., Davies J.B., *Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid)*, Biomaterials, 22, 865–872, 2001.
- [154] Yang Y., Porte M.C., Marmey P., El Haj A.J., Amedee J., Baquey C., *Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation*, Nucl. Instrum. Meth. Phys, 207, 165–174, 2003.
- [155] Costa S.A., Azevedo H.S., Reis R.L., *Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications*, 1936-C017. Fm, 17, 301–324, 2004.
- [156] Woodwar J., 1985. *Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. In: Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, IRL, Oxford, UK, 3–17, 1985.
- [157] Eldin M.S.M., *Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles*, J. Mol. Catal. B – Enzym, 10, 445, 2000.
- [158] Jansen E.F., Tomimatsu Y., Olsan A. C., *Cross-linking of W-chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde*, Arch. Biochem. Biophys, 144, 394–400, 1979.
- [159] Fraser J.E., Bickerstaff G.F., *Entrapment in Calcium Alginate methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 61-65, 1991.

- [160] Guilbault G.G., Nabi Rahni M.A., *Immobilized Enzyme Electrode for the Determination of Oxalate in Urine. Handbook of enzymatic analysis*. Anal. Chem. 58, 3, 523–526, 1977.
- [161] Chang T.M.S., *Microencapsulation of enzymes and biological methods in enzymology*, Academic Press Inc, 44, 201-218, 1976.
- [162] Rosevear A., Kennedy J.F., Cabral J.M.S., *Immobilized Enzymes and Cells*, Adam Hilger, Philadelphia, 1987
- [163] Kloareg, B., Quatrano, R.S., *Structure of the cell walls of marine algae and ecological physiological functions of the matrix polysaccharides*, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 26, 259–315, 1988.
- [164] Draget K.I., Moe S.T., Skjåk-Braek G., Smidsrød O., Phillips G.O., Williams P.A., *Alginates in: Food polysaccharides and their applications*, CRC Press, 14, 159–1178, 2006.
- [165] Skjåk-Braek G., *Alginates: biosynthesis and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications*, Biochemical Society Transactions, 20, 1, 27-33, 1992.
- [166] Fertah M., Belfkira A., Dahmane E., Taourirte M., Brouillette F., *Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan Laminaria digitata Brown seaweed*, Arabian Journal of Chemistry, 2014.
- [167] Elçin YM., *Encapsulation of urease enzyme in xanthan–alginate spheres*, Biomaterials, 16, 1157–1161, 1995.
- [168] Flores-Maltos A., Rodríguez-Durán LV., Renovato J., Contreras JC., Rodríguez R., Aguilar CN., *Catalytic properties of free and immobilized Aspergillus niger tannase*, Enzyme Res, 2011.
- [169] [http://www.frontiersin.org/files/Articles/107649/fbioe-02-00026/HTML/image\\_m/fbioe-02-00026-g003.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/107649/fbioe-02-00026/HTML/image_m/fbioe-02-00026-g003.jpg)
- [170] [http://www.frontiersin.org/files/Articles/107649/fbioe-02-00026/HTML/image\\_m/fbioe-02-00026-g004.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/107649/fbioe-02-00026/HTML/image_m/fbioe-02-00026-g004.jpg)
- [171] Demir A., Seventekin N., *Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları*, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2, 92-103, 2009.
- [172] [http://www.mdpi.com/catalysts/catalysts000914/article\\_deploy/html/images/catalysts-03-00914-g001-1024.png](http://www.mdpi.com/catalysts/catalysts000914/article_deploy/html/images/catalysts-03-00914-g001-1024.png)
- [173] Dessai P. D., Dave A. M., Devi S., *Entrapment of lipase into carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system*, Journal of molecular catalysis b: enzymatic, 31, 143-150, 2004.

[174] Necas J., Bartosikova L., *Carrageenan: a review*, Veterinarni Medicina, 58, 4, 187–205, 2013.

[175]<http://www.altrafine.com/blog/wp-content/uploads/2014/11/lambda-for-creamy-sensation.jpg>

[176] Fadyloglu S., *Immobilization and characterization of ficin*, Nahrung, 45, 143-146, 2001.

[177] Huang X L., Catignani G L, Swaisgood H E., *Comparison of the properties of tyroisin immobilized on Celite derivatives*, J Biotechnol, 53, 21-27, 1997.

[178] Çetin M., Taş B., *Biyolojik orijinli tek doğal mineral: diyatomit*, Tubav Bilim Dergisi, 2, 28-46, 2012.

[179] Bakhtiari M.R., Faezi M.G., Fallahpour Masoud., Noohi A. N., Amidi Z., *Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by Aspergillus Niger PTCC5011*, Process Biochemistry, 41, 3, 547-551, 2006.

[180] Stephanie D., Himpsl C., Lockatell V., Hebel J.R., Johnson D., Mobley L.T., *Identification of virulence determinants in uropathogenic Proteus mirabilis using signature-tagged mutagenesis*, Journal of Medical Microbiology, 57, 1068–1078, 2008.

[181] Kumar S, Kayastha A., *Soybean (Glycine max) urease: Significance of sulfhydryl groups in urea catalysis*. Plant Physiology and Biochemistry, 48, 746-750, 2010.

[182] Marion M., *Bradford*, Anal Biochem, 72, 248–254, 1976.

[183] Yavuz G., *Kitosan Nanoparçacıklarının sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 2008.

[184] Sugahara V.H., Silva G. V., *Immobilization of Beauveria bassiana Lipase on Silica Gel by Physical Adsorption*, Brazilian Archives of Biology And Technology, 57, 6, 842-850, 2014.

[185] Aktaş D., Karagözler A., *Investigation of immobilization of bovine and plant carbonic anhydrase within calcium alginate beads*, Ege Uni. J. of faculty of Sci, 36 (1-2), 1-17, 2012.

[186] Krajevská B., Lezsko M., Zaborska W., *Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties*, J.Chem Technol Biotechnol., 48, 3, 337-350, 1990.

[187] Sungur S., Elçin M., Akbulut U., *Studies on immobilization of urease in gelatin by cross-linking*, Biomaterials, 13, 795-800, 1992.

- [188] Godjevargova T., Gabrovska K., ***Immobilization of urease onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes***, *Journal of Biotechnology*, 103, 107-11, 2003.
- [189] Konsoula Z., Liakopoulou M., ***Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis****. *Proc. Biochem*, 41, 343-349, 2005.
- [190] Konsoula Z., Liakopoulou K.M., ***Thermostable  $\alpha$  –amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules***, *Enzyme Microb. Tech*, 39, 690-696, 2006
- [191] Dey G., Singh B., Banerjee R., ***Immobilization of  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313***. *Braz. Arch. Biol. Techn*, 46, 2, 167-176, 2003.
- [192] Fullbrook P. D, "Practical Limits and Prospects (Kinetics). ", Godfrey T, West S, ***"Industrial Enzymology"***, Second Edition, Stockton Press, New York, 483-500, 1996.
- [193] Pervin S., Kumar S.N., Jahan G.S., Khan M.H., Karim R., Sarkar B.C., Shaha R.K., ***Partial purification and characterization of urease from germinating chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed***, *RRBS*, 3, 1, 27-33, 2009.
- [194] Polacco J.C., Havir E.A., ***Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture***, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 1707-1715, 1979.
- [195] Das N., Kayastha H., Srivastava P.K., ***Purification of characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L) seeds***, *Phytochemistry.*, 61, 5, 513-521, 2002.
- [196] Prakash O.M., Mahe T., Hasan S.H., and Pandey R.K., ***Factorial design for the optimization of enzymatic detection of cadmium in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste***, *Bioresource Technology*, 99, 7565-7572, 2008.
- [197] Tai Li., Mobley H., ***Expression of Catalytically Active Recombinant *Helicobacter pylori* Urease at Wild-Type Levels in *Escherichia coli****. *Infection and Immunity*, 2563-2569, 1993.
- [198] Munjal N., Sawhney S.K., ***Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamid, and gelatin gels***, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 613-619, 2002.
- [199] Sahin F., Demiral G., Tümtürk H., ***A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase***, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 148-153, 2005.



[200] Enas N., Hamza A.H., Mahmoud R.H., *Characteristics of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems*, Braz. arch. biol. technol. 58, 2, 147-153, 2015.

[201] Turksever A., Ertan F., *Determination of Some Properties of Free and Immobilized Urease from Aspergillus fumigatus and Its Application in Urea Assay*, JCSP. (Yayına kabul edildi), 2016.

[202] Hossain M., Khan M., Akbar M., *Nutrient digestibility and growth of local bull calves as affected by feeding urea and urease enzyme sources treated rice straw*, Bang. J. Anim. Sci, 39,1, 97-105, 2010.

[203] Aktaş M., *Bitki besleme ve toprak verimliliği*, A.Ü. Zir. Fak. Ders Kitabı, Ankara, 1995.

[204] Karaca A., Baran A., Haktanır K., *The effect of compaction on urease enzyme activity, carbon dioxide evaluation and nitrogen mineralization*, Tr J Agric, 24, 43-441, 2000.

## ÖZGEÇMİŞ

13.06.1982 yılında İstanbul'da dünyaya geldim. İlk ve orta öğrenimimi Tekirdağ'da tamamladım. Yüksek öğrenimimi 2004 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladım. Ardından İstanbul Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsünde Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Eğitimini tamamladım. Daha sonra Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisansı yaptım. 2009 yılından itibaren Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Moleküler Biyoloji alanında doktora eğitimime devam etmekteyim.