

## Lewatit Partikülüne Üreaz Enziminin İmmobilizasyonu

Ercan ÇINAR<sup>1</sup>, Selami ERCAN<sup>2</sup>, Nuri GÜLEŞÇİ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Öğr.Gör., Batman Üniv. Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü, [ercan.cinar@batman.edu.tr](mailto:ercan.cinar@batman.edu.tr)

<sup>2</sup> Yrd.Doç.Dr., Batman Üniv. Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü, [selami.ercan@batman.edu.tr](mailto:selami.ercan@batman.edu.tr)

<sup>3</sup> Yrd.Doç.Dr., Gümüşhane Üniversitesi, Kelkit Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,  
[nurigulesci@gumushane.edu.tr](mailto:nurigulesci@gumushane.edu.tr)

**Geliş Tarihi/Received:**

02.11.2017

**Kabul Tarihi/Accepted:**

30.11.2017

**Yayın tarihi/Published:**

27.12.2017

### ÖZ

Ticari olarak alınan Lewatit VP OC 1600 partiküllerine üreaz enzimi immobilizasyon tekniği uygulanarak partiküle immobilize edildi. Enzim immobilizasyonlarında araştırma parametrelerinden biri olan enzimin tekrar kullanılabilirliği immobilize olan partikülün kullanılması ve sonuçların alınması enzimin ticari alınan lewatit partiküller üzerine immobilize olduğunu gösterdi. Lewatit VP OC 1600, metakrilik esterlere dayanılarak küresel boncuk biçiminde macropor içeren ve divinilbenzen (DVB) ile çapraz bağlanmış polimerdir. Lewatit VP OC 1600'ün maksimum üreaz immobilize etme kapasitesi 480 mg.g<sup>-1</sup>'dir. Serbest ve immobilize olan enzimler, 7.5 ve 6.5 gibi farklı optimum pH'lar sergiledi. İmmobilize olan enzimin optimum sıcaklığı 60 °C'e kayarken, serbest enzim 50 °C olarak belirlendi. İmmobilize olan enzim ile serbest enzim yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldığında tutuklanan enzim serbest enzime göre sıcaklığa daha fazla direnç gösterdiği tespit edildi. Tutuklanan ve serbest enzimin kinetik parametreleri belirlendi. Buna göre, serbest enzimin substrata ilgisinin tutuklanan enzimin substrata olan ilgisinden düşük olduğu gözlemlendi. Tutuklanan enzimin, termostabilitesi, tekrar kullanılabilirliği ve depolama parametrelerinin serbest enzime kıyasla daha yüksek bir etkinlik gösterdiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim, Üreaz, İmmobilizasyon.

## Immobilization of Urease Enzyme in Lewatite Particle

### ABSTRACT

Urease enzyme was intended to commercially obtained Lewatit VP OC 1600 particles by available immobilization technique. Reusability is the one of research parameters in enzyme immobilization. Reusability of free enzyme and results showed that enzyme successfully immobilized to lewatit particles. Lewatit VP OC 1600 is a macroporous, DVB(divinylbenzene) -crosslinked polymer in spherical bead form, based on methacrylic esters. The maximum urease arrest capacity of Lewatit VP OC 1600 was 480 mg.g<sup>-1</sup>. Free and arrested enzymes exhibited different optimum pH's such as 7.5 and 6.5. Optimum temperature of the arrested enzyme shifted to 60 °C, while free enzyme was detected as the its 50 °C. When the arrested enzyme and the free enzyme were exposed to high temperatures, it was found that the arrested enzyme showed more resistance to temperature than the free enzyme. In determining the kinetic parameters of free and arrested enzymes, we observed that the interest of free enzyme to substrat is lower than interest of arrested enzyme to substrat. The arrested enzyme was defined to have a higher activity according to thermostability, reusability and storage parameters than free enzyme.

**Keywords:** Enzymes, Urease, immobilization

### 1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidirler. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli

olağanüstü katalitik güce sahiptir. Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar (Nelson ve vd., 2005).. Yeterli koşulların sağlanması koşuluyla etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları, enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme imkânı vermektedir. Enzimler endüstriyel amaçlı, analitiksel amaçlı, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarımı amaçlı geniş uygulama alanı bulmaktadırlar (Wiseman, 1986). Enzimler gıda, deterjan, deri ve tekstil endüstrilerinde önemli kullanım alanına sahiptirler. Gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonun uygun şekilde yapıp yapılmadığını tespit için enzim tayinlerinden faydalanılır (Kalaycıoğlu ve vd., 2000). Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. Immobilize enzimin serbest enzimlere göre üstünlükleri ise; Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

Karıştırma, çalkalama gibi çalışmalar (mekanistik) için uygundur (Coşkun, 2007). Enzim immobilize edilmesi için uygulanan yöntemlerden biri olan tutuklama yöntemidir. Bu yöntemde, enzim molekülü belirli bir ortamda durdurulmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matris içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemini diğer üç yöntemden ayıran en önemli özelliği bu teknikte enzim molekülünün diğer tekniklerde olduğu gibi herhangi bir taşıyıcıya kovalent veya non-kovalent olarak bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.1. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir (Şekil 1.1.). Bu enzimin bağıl olarak ucuzluğu, dayanıklılığı ve kolay izlenebilmesinin yanı sıra kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır(Baysal, 2000). Üreazın farklı alanlardaki kullanımlarını şu şekilde sıralayabiliriz; atık sularındaki ürenin temizlenmesinde, gıda endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılır. Bunun yanı sıra, gübre ve atık sularında bulunan ürenin dönüştürülmesinde kullanılmaktadır(George ve vd., 1997; Di Martino ve vd., 2003; Fahmy ve vd., 1998).

İlk öncelikli amaç bu değinilen kapsamda enzim ucuz ve çabuk olaşılan ve de suda çözünmeyen bir materyale immobilize etmek.Burdanda çevre kirliliği, geri dönüşüm sanayilerinde ve özellikle sağlık alanında kullanılabilir düzeye getrip optimum koşullarını belirlemektir

### İlgili Çalışmalar

Üreaz enzimi yeni bir akrilik (Amino butil akrilat-etilen metakrilat kopolimeri) enzim taşıyıcısı üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin özellikleri belirlenerek birbirleri ile karşılaştırmış. Sonuç olarak immobilize enzimlerin orijinal aktivitelerinin %56'sını koruduğunu bulunmuş. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hızın ( $V_{max}$ ) serbest enzim için daha düşük iken, immobilize üreaz için daha yüksek olduğunu bildirilmiş. Immobilize enzimin pH değişikliklerine karşı aktivitesini önemli ölçüde koruduğunu, immobilize üreazın çok iyi depolama kararlılığına ve tekrar kullanımına sahip olduğunu, 70°C'de immobilize enzimin aktivitesini kaybettiğini değinmiş(Krajewska ve Leszko, 1990).

Üreaz poli (akrilik asit) (PAA) ile poli (1-vinil imidazol) (PVI) kompleksleşmesi ile elde edilen bir polimer ağı içinde immobilize edilmiş, polimer ağ hazırlanmasını FT-IR spektroskopisi ile izlenmiş. Immobilize üreaz için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ),  $V_{max}$  ve temel özelliklerini ( $pH_{opt}$ ,  $pH_{stability}$ ,  $T_{opt}$ ,  $T_{stability}$ , tekrar kullanılabilirlik ve depolama kararlılığı) belirlenmiş. Serbest üreazın  $V_{max}$  değerinin ( $0.01807 \mu M \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) immobilize üreazdan ( $0.07491 \mu M \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) daha küçük olduğu bulunmuş. Serbest ve immobilize üreaz için  $K_m$  değerlerini sırasıyla, 4.1 mM ve 27.8 mM olarak hesaplanmış. Serbest ve immobilize üreaz için optimum sıcaklık değişimlerini 30°C ile 90°C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiş ve serbest enzimin optimum sıcaklığını 55°C immobilize enzimin optimum sıcaklığını ise 60°C olarak belirlenmiş(Şenel ve vd., 2010).

Üreaz enzimi polietilenimin (PEI) ve kitosan (CHI) ile modifiye edilmiş poliakrilonitril (PAN) membranları üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirilmiş. PEI ve CHI ile modifikasyon PAN membranı üzerine adsorbe olan üreaz miktarını etkilemezken, aktiviteler sırayla 2 ve 1.5 kat artış gösterilmiş. Membranların üreye karşı gösterdikleri kinetik performans aşağıdaki şekilde bulunmuş: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAN membranları üzerine üreaz adsorpsiyonu sonucu membranların hidrolik geçirgenliklerinin önemli oranda değişmediğini, üreaz immobilizasyonu için en iyi destek malzemesinin PAN+PEI+CHI membranı olduğunu belirlenmiş(Alsoy ve vd., 2008).

Agar tabletler üzerine güvercin bezelyesi (Cajanus cajan) üreazı immobilize edilmiş. %5 agar (w/v) destek üzerine yapılan immobilizasyonda 0.019 mg protein/agar tablet bağlanmış ve %51.7 arasında bir optimum immobilizasyon saptanmış. Çözünür ve immobilize üreaz optimum pH'ını 7.3 ve 7.5, optimum sıcaklığını 30°C ve 60°C olarak belirlenmiş ve immobilizasyon sonucu termal stabilitenin iyileştiğini bildirilmiş. Immobilizasyon sonrası  $K_m$  değerinin 3.23 mM' dan 5.07 mM' a yükseldiğini, çözünür ve immobilize üreazın yarılanma ömrünün (4°C, pH 7'de) sırasıyla 21 ve 53 gün olduğunu bulunmuş (Mulagalapalli ve vd., 2007).

Üreaz (üreaminohidrolaz E.C. 3.5.1.5) enzimini aljinatkitosan polielektrolit kompleksine ve poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/κ-karragenan interpolimer komplekslerine hapsederek immobilize edilmiş ve immobilizasyon ile Michaelis-Menten (Km) sabitinde bir azalma olduğunu belirlemiştir. 70 gün sonunda immobilize enzimlerin aktivitelerinin %48 ve %70 ini koruduğunu, ayrıca 5 gün içinde 20 kullanım sonunda aljinat-kitosan polielektrolit kompleksine ve poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/κ-karragenan interpolimer komplekslerine immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sırasıyla %55 ve %89'unu koruduğunu bildirmiştir. Enzimin optimum sıcaklık, optimum pH ve termal kararlılığının immobilizasyon sonucunda arttığı rapor edilmiştir (Kara, 2006).

## 2. YÖNTEM

### 2.1. Lewatit partiküllerin Üreaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

Üreaz enziminin immobilizasyonunda kullanılacak olan magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi (Alptekin ve ark., 2009).

### 2.2. Üreaz enziminin Lewatit partiküllerin üzerine İmmobilizasyonu

Üreaz enziminin lewaitit partiküllerin üzerine immobilizasyonu Sahoo ve vd., (2011) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır.

### 2.3. Total Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve vd., (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli kaideye dikkat etmek gerekir ki bu reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklıdır. Tarif edilen bu redüklenme ise pH 10'da gerçekleşmektedir. Bundan dolayı folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine hemen ilave edilmeli ve derhal şiddetle karıştırılmalıdır. Bu suretle fosfomolibdat fosfotungstat reaktifi parçalanmadan önce indirgenme olayı gerçekleşir. Standart çözelti olarak albümin çözeltisi kullanılmıştır. Total protein tayininde kullanılacak çözeltiler: Bunun için içerikleri bildirilen

A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4.0 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2) Çözelti B: 0.5 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3) Çözelti C: 50 mL Çözelti A ve 1 mL Çözelti B karıştırılarak hazırlanmıştır.

4) Folin Ciocalteu reaktifi: Folin Ciocalteu reaktifi saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5) Standart protein çözeltisi: 100 mL'de 14 mg sığır albümini olacak şekilde saf su içerisinde hazırlanmıştır.

6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin- Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriklerinin absorbanları köre karşı 750 nm'de okunmuş ve bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu grafiğin yardımıyla enzimin protein içeriği ile immobilize kısmının hesaplamasında kullanılmıştır.

## 2.4. Üreaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Serbest ve immobilize üreaz enzim aktivitesi Nessler's metoduna göre ölçülmüştür (Rao ve vd., 1995). Üreaz etkisi ile açığa çıkan amonyak Nessler ayıracı ile tepkimeye sokulmuş ve oluşan renkli bileşiğin renk şiddeti 505 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

## 2.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

### 2.5.1. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Serbest ve immobilize üreazın aktivitesi farklı pH'larda (4.5 asetat, 5.5 sitrat, 6.5, 7.5, 8.5 ve 9.5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçülerek aktivite hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

### 2.5.2. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest ve immobilize üreazların aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve tampon derişimi için farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) belirlenmiştir.

### 2.5.3. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreazın aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize üreaz için geri dönüşüm sayısı ve katalitik etkinlik parametreleri hesaplanmıştır.

### 2.5.4. Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılıklarının belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreaz 3 farklı sıcaklıkta (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

### 2.5.5. Serbest ve immobilize üreazın depolama kararlılıklarının belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür.

### 2.5.6. İmmobilize Üreazların tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi

İmmobilize üreazların tekrar kullanımı ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1.1x5 cm) ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. 300 mg immobilize üreaz enzimi üzerine 3 mL fosfat tamponunda (50 mM pH 5.5) hazırlanmış substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon için 10 dakika bekledikten sonra kolon musluğu açılarak alınan süzüntüye 1 mL Nessler ayıracı ilave edilmiş ve reaksiyon absorbansı 505 nm'de okunmuştur. İmmobilize enzim 5 mL tampon ile yıkandıktan sonra üzerine yeniden tampon ve substrat çözeltisi yüklenmiştir. Bu işlemler 6 kez tekrarlanmıştır.

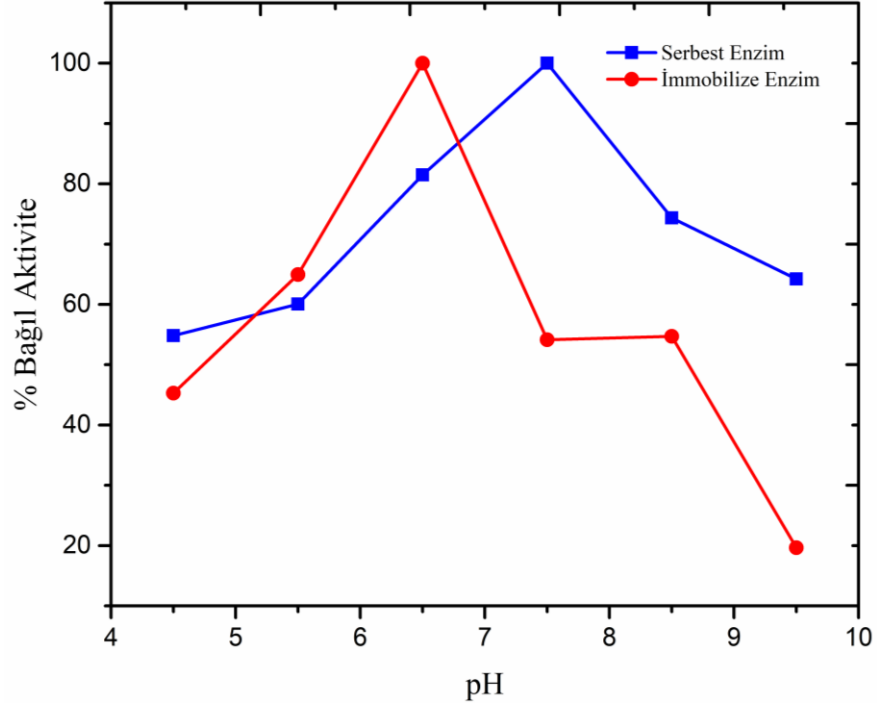
## 3. BULGULAR

Bu çalışmada üreaz enziminin aktifleştirilmiş lewattit partiküllerin üzerine immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize üreaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) belirlenen optimum koşullardaki aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır.

### 3.1. Serbest Üreazın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

#### 3.1.1. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili bulgular

Serbest üreaz ve immobilize üreaz aktivitesi farklı pH'larda (4.5 asetat, 5.5 sitrat, 6.5, 7.5, 8.5 ve 9.5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçülerek aktivite hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

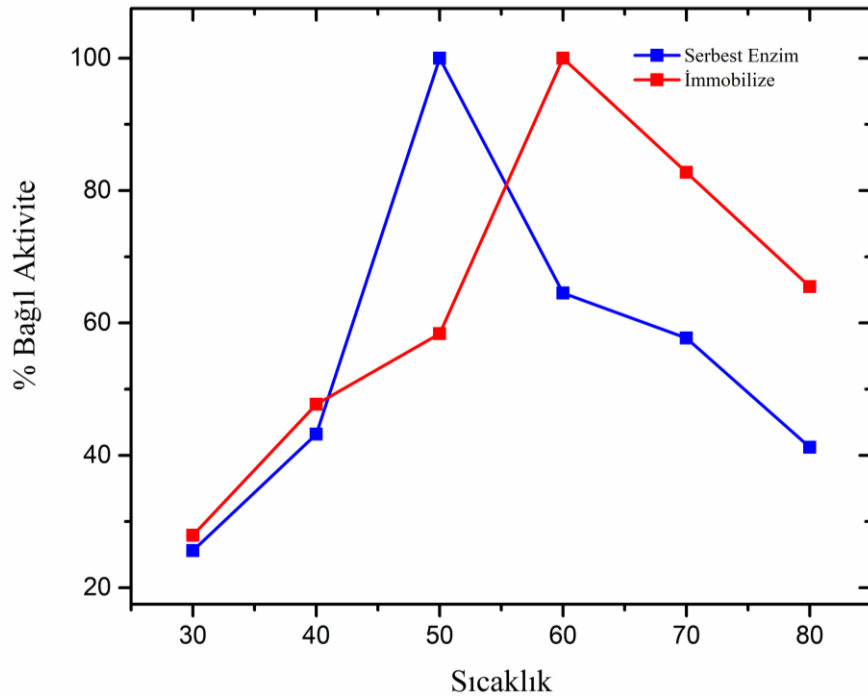


Şekil 3.1. Serbest üreaz ve immobilize üreaz aktivitesi farklı pH'lardaki grafiği

Şekil 3.1'de görüleceği gibi serbest üreaz için optimum pH 7.5 , immobilize üreaz pH 6.5 olarak belirlenmiştir.

#### 3.1.2. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili bulgular

Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın daha önce belirlenmiş olan optimum pH'ları 6.5 ve 7.5 10 mM üre çözeltisi kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 3.2.).

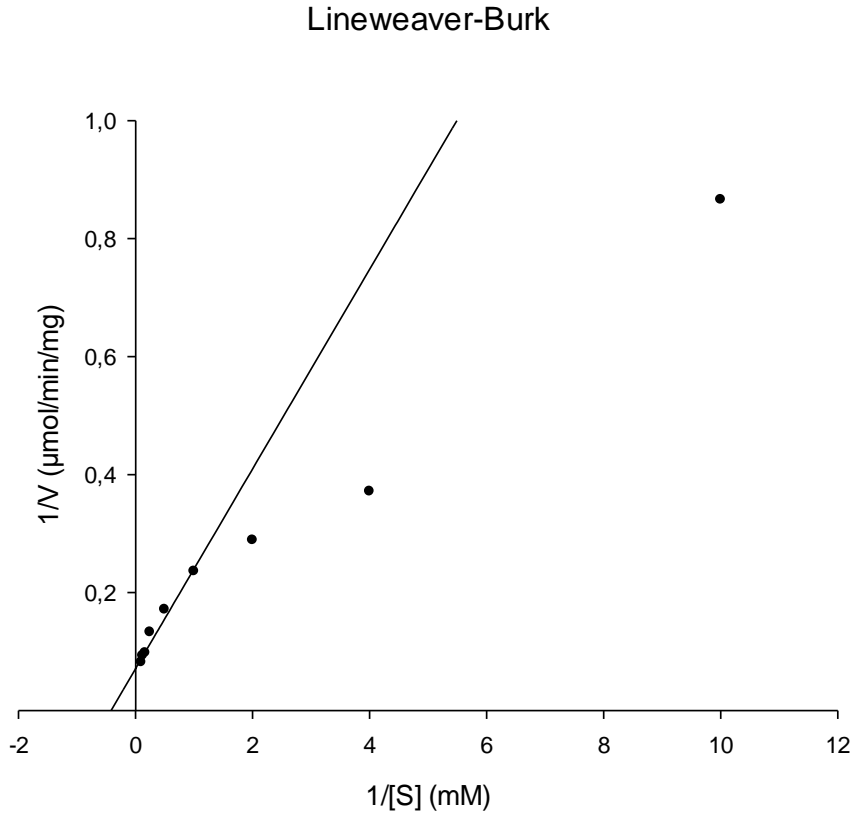


Şekil 3.2. Serbest üreaz ve immobilize üreaz aktivitesi farklı sıcaklıklardaki grafiği

Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın optimum çalışma sıcaklıkları 50°C ve 60°C olarak belirlenmiştir. Serbest üreaz için aktivasyon enerjisi ise 54.9 kJ/mol olarak belirlenmiştir.

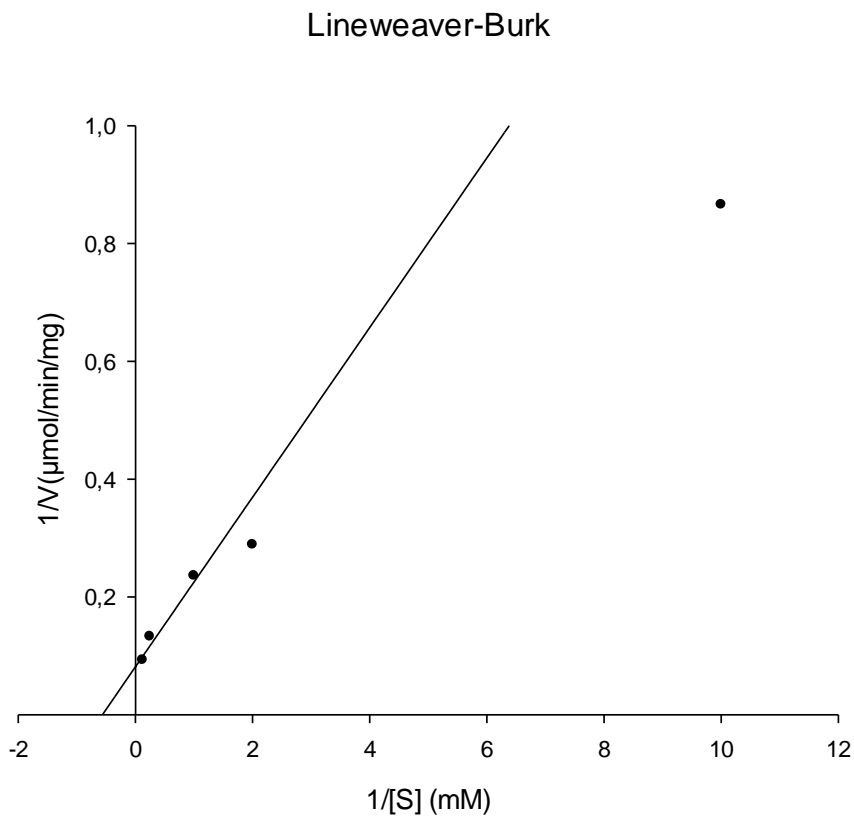
### 3.1.3. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine kinetik parametreleri ile ilgili bulgular

Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın aktiviteleri belirlenen optimum şartlarda Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ve kinetik parametreleri sırasıyla serbest enzim için  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 2.4 mM, 14.1 U/mg protein hesaplanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Serbest üreaz için Lineweaver-Burk grafiği

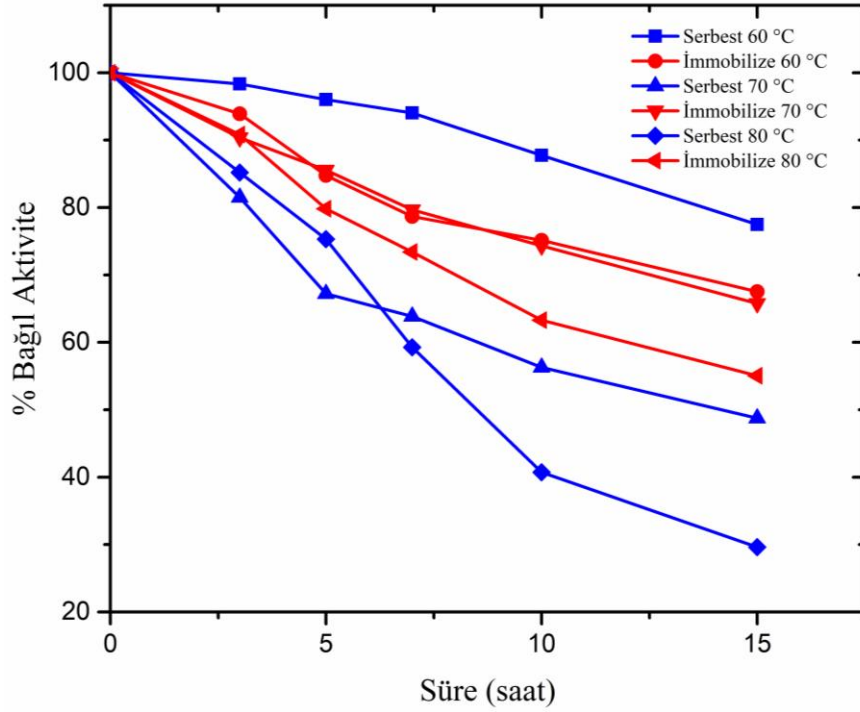
İmmobilize edilmiş enzim için ise  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri 1.8 mM, 12.3 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. İmmobilize edilmiş üreaz için Lineweaver-Burk grafiği

### 3.1.4. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine termal kararlılıkları ile ilgili bulgular

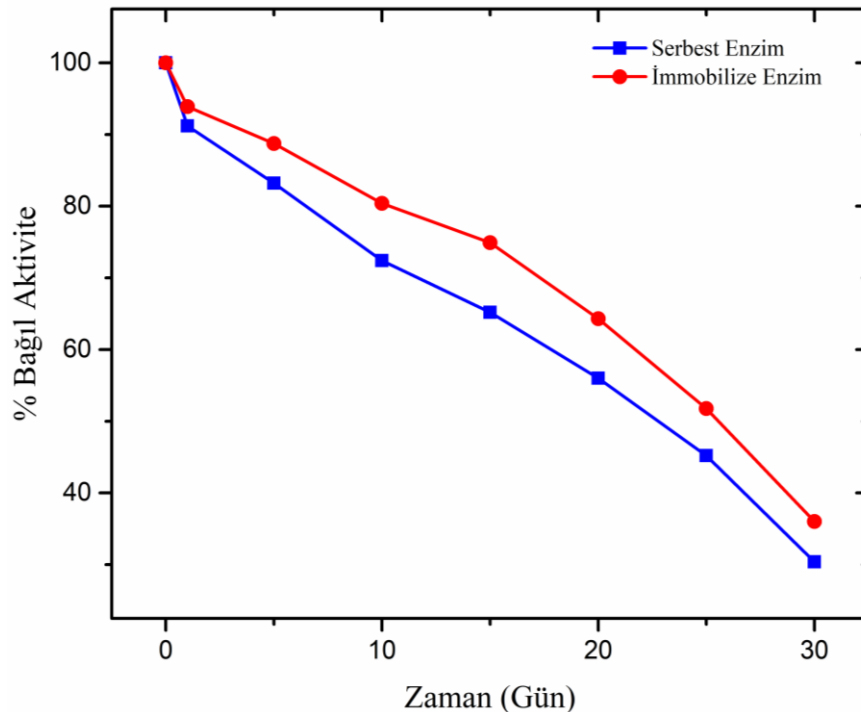
Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın 3 farklı sıcaklıklarda (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir. 15 saat inkübasyon süresi sonunda serbest üreazın 60, 70 ve 80 °C'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla %70, %38 ve %23'ü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5.). İmmobilize edilmiş üreaz için ise 67, 65 ve 55 °C'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla %70, %38 ve %23'ü koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın 60, 70 ve 80°C'deki aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

### 3.1.5. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine depolama kararlılıkları ile ilgili bulgular

Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın 4°C ve oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında üreaz aktivitesi ölçülmüş sırasıyla serbest üreazın 4°C ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %30.4'ünü korudukları belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş üreazın ise 4°C ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %36.01'ini korudukları belirlenmiştir (Şekil 3.6.).

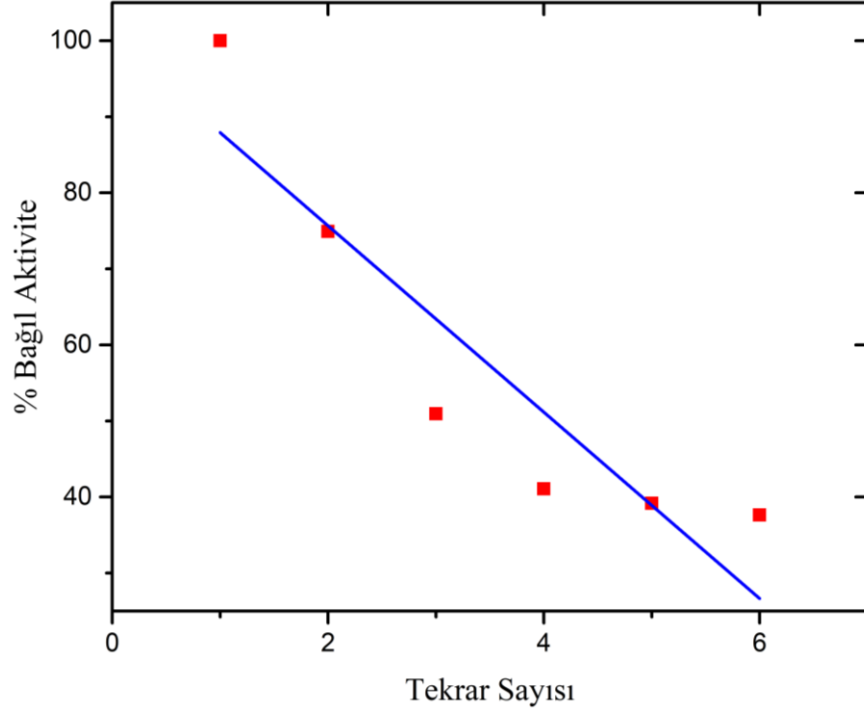




**Şekil 3.6.** Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın 4°C'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi

### 3.1.6. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine tekrar kullanım kararlılıkları ile ilgili bulgular

Lewatit partiküllerine immobilize edilen üreazın tekrar kullanım kararlılığı 300 mg örnekler alınarak 6 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda immobilize edilen üreazın başlangıç aktivitesine oranla yaklaşık olarak sırasıyla %37.64'ünü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7.).



**Şekil 3.7.** Serbest üreaz ve immobilize edilmiş üreazın 4°C'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi

## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimler arasında ağırlıklı olarak üreaz enzimi yerini korumaktadır. Bu enzimin bağıl olarak ucuzluğu, dayanıklılığı, kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Baysal, 2000). Şimdiye kadar üreaz, birçok analitik ve biyomedikal amaç için immobilize edilmiştir. Immobilize üreazın detoksifikasyon için kandan ürenin uzaklaştırılması, diagnostik amaçlı biyosensörlerde (Chang, 1976; Petersson, 1988; Yang ve Lin, 2001) ya da yapay karaciğer makinelerinin diyaliz yenileme sistemlerinde kullanıldığı bildirilmiştir (Krajewska ve ark., 1989). Ayrıca immobilize üreazın bioreaktör sistemi içerisinde atık sularda ürenin amonyak ve karbondioksit dönüştürülmesinde (George ve ark., 1997), ya da gıda endüstrisinde meşrubat ve yiyeceklerden ürenin uzaklaştırılması gibi işlemlerde kullanıldığı bildirilmiştir (Elçin, 1995; Amine ve ark., 2006). Üreazın immobilizasyonu için en çok kullanılan destekler karboksimetil selüloz, poliüretan, polivinil piridin, iyon değiştirici reçineler, polipropilen, stirendivinil benzen sayılabilir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda üreazın akrilonitril kopolimeri, poli(vinil alkol), Ca-aljinat, polianilin, PNIPAAm, kitosan-poli(glisidilmetakrilat)

kopolimeri kullanılarak immobilize edildiği bildirilmiştir (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Rejikumar ve Devi, 1998; Laska ve ark., 1999; Chen ve Chiu, 2000; DeGroot ve Neufeld, 2001; Godjevargova ve Gabrovska, 2003). Bu çalışmada üreaz enzimi lewatif partiküllerine immobilize edilmiştir. Destekte yapılan modifikasyonlardan sonra destekteki fonksiyonel grupların sayısı desteğe bağlanan enzim moleküllerinin miktarını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Lin ve Yang, (2003), üreaz enzimini poliakrilonitril boş liflerin yüzeyine hidroliz ve kovalent bağlama yöntemini kullanarak glutaraldehit ara kolu üzerinde immobilize etmişlerdir. Gabrovska ve vd., (2007), poli(akrilonitril)kitosan kompozit membranlara üreaz enzimini glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişler ve amino gruplarının miktarının kitosan konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.. Sonuçlar üreazın lewatif üzerine immobilizasyonu ile maksimum aktivitenin asidik pH'ya (6.5) doğru kaydığını göstermektedir. Literatürde poli(hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat) filmde yapılan üreaz immobilizasyon çalışmalarında serbest üreazın optimum pH'sının 7.0 olduğu ve immobilize üreazın optimum pH'sının asidik bölgeye doğru (pH 6.0) kaydığı veya optimum pH'ın değişmediği bildirilmiştir (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Bayramoğlu vd., 2003). Serbest enzim ve immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar sırasıyla 50 ve 60 °C olarak belirlenmiştir. Bayramoğlu vd., (2005), poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-N-metakrilol-Lhistidinmetilester) mikrokürelere immobilize ettikleri üreaz için optimum sıcaklığı 50 °C olarak bildirmişlerdir. Godjevargova ve Dimov, (1997), 2- metilaminoetilmetakrilat ile modifiye edilmiş akrilonitril kopolimerden hazırlanmış membran üzerine immobilize ettikleri üreazın optimum sıcaklığının 45 °C, Fahmy vd., (1998) ise dietilaminoetil-sellüloza immobilize edilen *Citrullus vulgaris* üreazı için optimum sıcaklığın 65 °C olduğunu bildirmişlerdir. Serbest enzim ve lewatif partiküllerine immobilize edilen üreazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Km, Vmax değerleri sırasıyla 2.4 mM, 14.1 U/mg protein, ve 2, 1.8 mM, 12.3 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Baran, (2008), serbest enzimle karşılaştırıldığında aljinata immobilize olan üreazın Km değerinde bir artış olduğunu rapor etmiştir. Serbest enzimin Km, Vmax, değerlerini sırasıyla 0,18 mM ve 121,9 U/mg, aljinata immobilize edilen üreazın Km, Vmax, değerlerini sırasıyla 2,18 M ve 33,3 U/mg, PLL kaplı aljinata immobilize edilen üreazın Km, Vmax, değerlerini ise sırasıyla 1,85 mM ve 25,77 U/mg olarak bildirmiştir.

Serbest ve lewatif üzerine immobilize edilen üreazın farklı sıcaklıklardaki (60, 70 ve 80 °C) ve inkübasyon süresinde kalan aktivite miktarları 15 saat sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla serbest üreazın aktivitesinin %70, %38 ve %23'ünü koruduğu, lewatif üzerine immobilize edilen üreazın ise sırasıyla %67, %65 ve %55 oranında aktivitelerini korumaktadır. poli-L-lizin (PLL) kaplı immobilize enzimin optimum deney koşullarında bir saat sonunda 70 °C'de aktivitesinin %60'ını koruduğunu, aynı koşullarda serbest üreazın aktivitesine bakıldığında %90 oranında aktivite kaybı olduğunu rapor etmiştir. Enzimin konformasyonel yapısı immobilizasyondan etkilenir. Bu konformasyonel sınırlamalardan dolayı, immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek termal kararlılığa sahiptir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir yada hiç değişmez. Genellikle kovalent bağlı, suda çözünmez enzimlerin ısıya ve denatüre edici ajanlara karşı serbest forma göre daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Literatürde immobilize üreazın termal kararlılık çalışmalarında, 40 °C'ye kadar % bağıl aktivitesini koruduğu, 65°C gibi yüksek sıcaklıklarda ise serbest enzim %87 aktivite kaybederken, immobilize enzimlerin %48 aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Bayramoğlu vd., 2003).

Serbest ve lewatif üzerine immobilize edilen üreazın depolama kararlılıkları sırasıyla %30.4, %36.01 olduğu belirlenmiştir ve immobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, lewatif üzerine immobilize olan üreazın serbest enzime kıyasla daha iyi depolama kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde immobilize üreazın çok iyi depolama kararlılığına sahip olduğunu bildirilmiştir (Krajewska ve Leszko, 1990). (Chellapandian ve Krishnan,

1998; Laska vd., 1999), üreaz enzimini kitosan-poli(glisidil metakrilat) (GMA) desteğine epoksi gruplar üzerinden kovalent olarak bağlayarak immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve immobilize enzimin 60 gün sonunda 4°C'de %73, 25 °C'de %58.05 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Lewatit üzerine immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıkları 300 mg için 6 kullanımdan sonra kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık %37.64 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada immobilize üreazın serbest üreaza kıyasla tekrar kullanım kararlılığının daha iyi olduğu, her iki ara kolun tekrar kullanım kararlılığının birbirine yakın olduğu saptanmıştır. Immobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi enzimin endüstride kullanılması açısından önemli bir faktördür. Artan kararlılık immobilize enzimi serbest enzimden daha avantajlı hale getirmektedir (Lei vd., 2007). Immobilize üreazın çok iyi tekrar kullanımına sahip olduğunu bildirmiştir (Krajewska ve Leszko, 1990). Baran Teke, (2008), aljinat boncukta ve Poli-L-lizin (PLL) kaplı aljinat boncukta immobilize edilen üreazın tekrar kullanılabilirliğini araştırmış ve PLL kaplı aljinat boncukta immobilize edilen üreazın aktivitesinin ilk üç ölçümde değişmediğini, üçüncü ölçümden sonra azalma gösterdiğini, 12. ölçüm sonrası başlangıç aktivitesinin %88'nini, 20. Ölçümde %68'ini koruduğunu, aljinatta ise 12. ölçüm sonrası enzimin başlangıç aktivitesinin %53'ünü koruduğunu bildirmiştir. Lin ve Yang, (2003), poliakrilonitril boş liflerin yüzeyine hidroliz ve kovalent bağlama yöntemini kullanarak glutaraldehit ara kolu üzerinde immobilize edilen üreazın 15. yeniden kullanım sonrasında aktivitesinin %86'sını koruduğunu bildirmişlerdir.

Lewatit üzerine enzim immobilizasyonu diğer desteklerle kıyaslandığında basit hazırlama prosedürü, düşük maliyet ve magnetik nanopartiküle bağlı enzimin kimyasal kararlılığının yüksek olması nedeniyle çeşitli avantajlar sunmaktadır. Düşük maliyet, geri kazanım ve tekrar tekrar kullanılabilmesi endüstriyel önemi olan enzimlerin immobilizasyonu için önemlidir.

### Kaynakça

- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:124-131.
- ALSOY ALTINKAYA, S., YEMENİCİOĞLU, A., YÜREKLİ, Y., 2008. Enzim immobilize edilmiş membranların hazırlanması ve karakterizasyonu: Membran performanslarının belirlenmesi. 101s
- AMINE, A., MOHAMMADI, H., BOURAİS, I., PALLESCHİ, G., 2006. Enzyme inhibitionbased biosensors for food safely and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron*, 21:1406-1423.
- BARAN TEKE, A., 2008. Farklı yöntemlerle üreaz/alanindehidrogenaz enzim çiftinin immobilizasyonu ve sistemin kan üre düzeyini düşürebilme olanaklarının araştırılması. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir*, 162s.
- BAYRAMOĞLU, G., ALTINOK, H., BULUT, A., 2003. Preparation and application of spacer-arm-attached poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) films for urease immobilization. *Reactive & Functional Polymers*, 56:111-121
- BAYRAMOĞLU, G., YALÇIN, E., ARICA, M.Y., 2005. Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni (II) complexed poly (HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization. *Process Biochemistry*, 40:3505-3513
- BAYSAL, H., 2000. Üreaz içeren enzim komplekslerinin hazırlanması ve kullanım olanaklarının araştırılması. *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir*, 42-47
- CHANG, T.M.S., 1976. Microencapsulation of enzymes and biologicals. *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, 201-218.

- CHELLAPANDIAN, M., KRISHNAN, M.R.V., 1998. Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry*, 33:595-600
- CHEN, J., CHIU, S., 2000. Apoly(N-isopropylacrylamide-co-Nacryloxysuccinimide-co- 2-hydroxyethyl methacrylate) composite hydrogel membrane for urease immobilization to enhance urea hydrolysis rate by temperature swing. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:359-367
- ÇOŞKUN, G., 2007. Glutatyon-S-Transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Ege Üniversitesi Doktora Tezi, İzmir*, 118s
- DEGROOT, R.A., NEUFELD, J.R., 2001. Encapsulation of urease in alginate beads and protection from-chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:321-322
- DI MARTINO, S., EL-SHERIFF, H., DIANO, N., MAIO, A. D., GRANO, V., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., MATTEI, A., MITA, D.G., 2003. Urea removal from agricultural waste waters by means of urease immobilized on nylon membranes grafted with cyclohexyl-methacrylate. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46:613-629
- ELÇİN, Y.M., 1995. Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres. *Biomaterials*, 16:1157-1161.
- FAHMY, A.S., BAGOS, V.B., MOHAMMED, T.M., 1998. Immobilization of Citrullus vulgaris urease on cyanuric chloride DEAE-cellulose ether: preparation and properties. *Biores. Technology*, 64:121-129
- GABROVSKA, K., GEORGIEVA, A., GODJEVARGOVA, T., STOILOVA, O., MANOLOVA, N., 2007. Poly(acrylonitrile)chitosan composite membranes for urease immobilization. *Journal of Biotechnology*, 129:674-680.
- GEORGE, S., CHELLAPANDIAN, M., SIVASANKAR, B., JAYARAMAN, K., 1997. A new process for the treatment of fertilizer effluent using immobilized urease. *Bioprocess Eng.*, 16:83-85.
- GODJEVARGOVA, T.S., DIMOV, A., 1997. Immobilization of urease onto membranes of modified acrylonitrile copolymer. *Journal of Membrane Science*, 135:93-98.
- GODJEVARGOVA, T., GABROVSKA, K., 2003. Immobilization of urease onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Biotechnology*, 103:107-111.
- KARA, F., 2006. Üreazın aljinat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/κ-karragenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu. *Gazi Üniversitesi, Doktora Tezi*, 59s.
- KALAYCIOĞLU, L., SERPEK, B., NİZAMLIOĞLU, M., 2000. Biyokimya Kitabı. *Nobel Yayın Dağıtım, Ankara*, 213-247s
- KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., ZABORSKA, W., 1989. Membrane-immobilized urease for possible use in dialysate regeneration system of artificial kidney. *Environ Protec Eng.*, 15:173-180.
- KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., 1990. Urease immobilization on aminated butyl acrylate ethylenedimethacrylate copolymer. *Die Angewandte Makromolekularen Chemie*, 179:21-33.
- LASKA, J., WŁODARCZYK, J., ZABORSKA, W. 1999. Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6: 549-553
- LEI, Z., BI, S., HU, B., YANG, H., 2007. Combined Magnetic and Chemical Covalent Immobilization of Pectinase on Composites Membranes Improves Stability and Activity. *Food Chemistry*, 889-896

- LIN, C., YANG, M., 2003. Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease: storage and operation properties. *Biomaterials*, 24:1989-1994.
- LOWRY, OH., ROSENBAUGH, N., FARR, L., RANDALL, R., 1951. Protein measurement with theophyllin-phenol reagent. *J., Biol., Chem.*, 183:265–275.
- MULAGALAPALLI, S., KUMAR, S., KALATHUR, R.C.R., KAYASTHA, M.A., 2007. Immobilization of Urease from Pigeonpea (*Cajanus cajan*) on Agar Tablets and Its Application in Urea Assay. *Appl Biochem Biotechnol*, 142:291–297.
- NELSON, D.L., COX, M.M., 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. (NEDRET, K. editör). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayıncılık, Ankara*, 1152s.
- PETERSSON, B. A., 1988. Enzymatic determination of urea in undiluted whole blood by flow injection analysis using an ammonium ion-selective electrode. *Analytica Chimica Acta*, 209:239-248
- RAO, M.S., CHELLAPANDIAN, M., KRISHNAN, M.R.V., 1995. Immobilization of urease on gelatin-poly(HEMA) copolymer preparation and characterization. *Bioprocess Engineering*, 13:211–214.
- REJIKUMAR, S., DEVI, S., 1998. Preparation and characterization of urease bound on crosslinked poly(vinyl alcohol). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4:61-66
- SAHOO, B., KUMAR SAHU, S., PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method For The Immobilization Of Urease On Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69:95–102
- MEHMET ŞENEL, EMRE ÇEVİK, M. FATİH ABASIYANIK, AYHAN BOZKURT, 2010. Üreaz Enziminin Poli(Vinil İmidazol)/Poli(2-Akrilamido-2-Metil-1Propansülfonik Asit) Sistemi İçerisine Immobilizasyonu. 3. *Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi*, Kocaeli Üniversitesi – Kocaeli 12 – 14 Mayıs.
- TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. *Yüksek Lisans Yazokulu. 21–27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye*, 446 s
- WISEMAN, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd Edit., *John Wiley & Sons, Chichester, England*
- YANG M. C., LIN C. C., 2001. Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease. *Biomaterials*, 22(8):91-896.