

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SBF-2

SOYA FASÜLYESİ(Glycine max) ve JACKBEAN(Canavalia
ensiformis) ÜREAZLARININ KISMEN SAFLAŞTIRILMASI ve
ÖZELLİKLERİ

M.Ferit GÜRSU
Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Fırat Üniversitesi Merkez Kütüphanesi
0067810
255.07.02.03.00.00/08/0067810
TIP YL/3

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
KÜTÜPHANE VE DOKÜMANTASYON
DAİRESİ BAŞKANLIĞI
Doküman No : 51.743

ELAZIĞ-1989

E. .
Y. . .
SAB. . .

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz- larının Aktivitelerinin pH'ya Bağlı Değişimi.....	26
Şekil 2_a: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz Enzimleri Aktivitelerinin Isıya Bağlı Değişimi.....	27
Şekil 2_b: Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreazın Akti- vasyon Enerjisinin(E_a) Saptanması.....	28
Şekil 3: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz- larının Aktivitelerinin Zamana Bağlı Değişimi.....	30
Şekil 4: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz- larının Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Değişimi.....	31
Şekil 5: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz- larının Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendi- rilmesi.....	32
Şekil 6 : Tiyoürenin Kısmen Safılaştırılan Soya Fasülyesi Üreazı- nın Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	34
Şekil 7: Tiyoürenin Kısmen Safılaştırılan Soya Fasülyesi Üreazı- nın Aktivitesine Değişik Substrat Yoğunluklarının Etkisi.....	35
Şekil 8: Tiyoüre Varlığında Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştı- rılan Üreaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluğuna Bağlı - Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.....	36

Şekil 9: Hidroksiürenin Kısmen Safılaştırılan Soya Fasülyesi Üreazı Tarafından Hidrolizi.....	38
Şekil 10: Hidroksiürenin Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	39
Şekil 11: Hidroksiüre Varlığında(8 mM) Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.....	40
Şekil 12: Nikel İyonlarının Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreazın Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	42
Şekil 13: N-Etilmalemitin Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	43
Şekil 14: pCMBa'ın Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	44
Şekil 15: İkinci Yöntemle Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Enzimleri Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Değişimi.....	49
Şekil 16: Jackbean ve Soya Fasülyesinden İkinci Yöntemle Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimlerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.....	50
Şekil 17: Jackbean ,Soya Fasülyesi ve Ticari Üreaz Derişimleri-nin Aktiviteye Etkisi.....	51

Şekil 18: Değişik Düzeylerde Saflaştırılan Üreazların Bert- helot Reaksiyonu Sonucu Oluşturdukları Renklerin Spektrumları.....	52
---	-----------

TABLÖLAR

Tablo 1: Jackbeanden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.....	23
Tablo 2: Soya Fasülyesinden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.....	24
Tablo 3: Metal İyonlarının Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	41
Tablo 4: Jackbeanden Üreazın İkinci Yöntemle Kısmen Saflaştırılması.....	46
Tablo 5: Soya Fasülyesinden Üreazın İkinci Yöntemle Kısmen Saflaştırılması.....	47

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I.GİRİŞ.....	1
I.1-Üreaz Enziminin Moleküler Yapısı.....	1
I.2-Üreazın Dayanıklılığı.....	5
I.3-Üreaz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Çalışmalar.....	5
I.4-Üreaz Aktivitesinin Ölçüm Metodları.....	9
I.5-Üreazın İnhibitörleri.....	10
I.6-Araştırmamızın Amacı.....	12
II.MATERYAL ve METOD.....	14
II.1-Materyal.....	14
II.2-Kimyasal Maddeler.....	14
II.3-Cihazlar.....	14
II.4-Protein Ölçüm Metodları.....	14
II.5-Glukoz Tayin Metodu(o-toluidin yöntemi)...	16
II.6-Üreaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi(Berthe- lot).....	17
II.7-Üreaz Saflaştırmada Kullanılan Ayırıcılar..	18
II.8-Soya Fasülyesi(Glycine max) ve Jackbean (Canavalia ensiformis) Üreazlarının Kısmi Olarak Saflaştırılmasında İzlenen Yöntem..	19

	<u>Sayfa</u>
III-BULGULAR.....	22
III.1-pH'nin Etkisi.....	25
III.2-İnkübasyon Isısının Etkisi.....	25
III.3-Zamanın Etkisi.....	29
III.4-Substrat Yoğunluğunun Etkisi.....	29
III.5-Tiyoürenin Etkisi.....	33
III.6-Hidroksiürenin Hidrolizi.....	37
III.7-Metal İyonlarının Etkisi.....	37
III.8-Enzimin Fonksiyonel Sülhidril Grupları- nın Varlığının Gösterilmesi.....	41
III.9-Üreaz Saflaştırma Tekniğinin Düzenlenmesi	45
III.10-Substrat Yoğunluğunun Etkisi.....	48
III.11-Enzim Derişiminin Etkisi.....	48
III.12-Kısmen Saflaştırılan Üreazların Berthe- lot Reaksiyonu Sonucu Oluşturdukları Ürü- nün Spektrumu.....	53
IV-TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	54
V-KAYNAKLAR.....	61

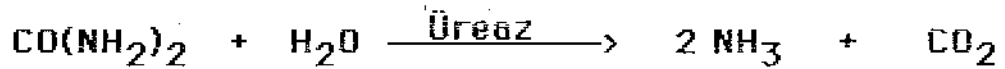
Soya Fasülyesi(*Glycine max*) ve Jackbean(*Canavalia ensiformis*) Üreazlarının Kısmen Saflaştırılması ve Özellikleri.

1-GİRİŞ

Üreaz doğal olarak baklağillerde , *Proteus vulgaris* ve *Bacillus pasteurii* gibi bazı mikroorganizmalarda önemli ölçüde bulunan fakat yüksek sınıf canlılarda bulunmayan bir enzimdir(1,2,3).

Günümüzde Üreaz,tropikal ve nemli topraklarda yetiştirilen Jack bean(*Canavalia ensiformis*) den saflaştırılmakta ve kullanılmaktadır(4). Jackbean Üreaz,1926 yılında Sumner tarafından oldukça basit bir yöntemle saflaştırılmıştır(5).

Uluslararası Biyokimya Birliği(I.U.B.) enzimi EC.3.5.1.5. olarak kodlamıştır.Buna göre enzimin sistematik adı"Ureoamidohidrolaz" ve katalize ettiği reaksiyon;



şeklinde olduğu gösterilmiştir(5,6).

1.1-ÜREAZ ENZİMİNİN MOLEKÜLER YAPISI

Jackbean üreazı kristal olarak izole edilen ilk enzimdir.Üreaz için rapor edilen ilk moleküler kütle 480000 daltondur. Ancak son zamanlarda 590000 olduğu bildirilmiştir.Bu değerler 30000-97000 arasında yer alan monomerler için rapor edilmiştir(7).

Takishima ve arkadaşları Üreazın herbiri 90770 dalton olan 6 aktif alt birimden oluştuğunu bildirmişlerdir(7).Mamiya ve arkadaşları Üreaz monomerlerinin molekül ağırlığını 90790 olarak bulmuş ve hekzamerin toplam molekül ağırlığını 544790 olarak hesaplamıştır(8).

Dixon ve arkadaşları ise Üreazın her bir alt biriminin moleköl ağırlığını ≈ 95000 olarak bulmuştur(9).Blakeley ve arkadaşları,sedimentasyon çalışmalarından enzimin moleköl ağırlığını 590000 ± 30000 olarak ifade etmiştir(10).

Bailey ve Boulter ultrasantrifügasyon yöntemi ile yaptıkları incelemelerde,Jackbean Üreazının incelenen bütün fraksiyonlarında büyük ve değişken sayılara sahip terkiplerin mevcudiyetini göstermiştir.Buna göre;

- a) A_1 Üreaz: Mol ağırlığı 190000-262000 olan Üreaz monomerleri.
- b) α - Üreaz:Mol ağırlığı 480000 olan Üreaz monomerlerinin meydana getirdiği polimerler.
- c) α -Üreaz monomerlerinin tetramer seviyesi altındaki polimerlerdir(11,12).

Fishbein ve Nagarajan, α - Üreazdan pH 3.5-4.5 daki titrasyonu ile A_1 Üreazın üretimini göstermiştir.Buna göre A_1 Üreazın mol ağırlığı 240000 olarak bulunmuştur(12).

Jackbean(*Canavalia ensiformis*) ve Soya fasülyesi(*Glycine max*) Üreazlarının birbirine benzer alt birimlere sahip olduğu bildirilmiştir (13).

Takishima ve arkadaşları,Jackbean Üreazının her alt biriminin 640 aminoasit diziliminden oluşduğunu ve içerisindeki 25 histidin artığının 13 tanesinin 479-607 aminoasit dizilimi arasında kalan bölgede toplandığını bildirmişlerdir(7,8).

Jackbean Üreazı,aynı zamanda nikel içeren metallo enzimlerin ilk örneğidir.Spektrofotometrik çalışmalar nikel iyonunun kataliz esnasında temel role sahip olduğunu göstermiştir(7,10).

Üreazın her alt biriminin(96600 gr/mol) nikel içeriği $2+0.12$ gr/mol 'e tekabül etmektedir(9,10).Enzim molekülü üzerinde amino asit sırasının 479-607 arasında kalan bölgenin Ni bağlayan kısmı ihtiva ettiğini göstermektedir. Spektral çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre Üreazın her alt biriminin Ni iyonu Kordinasyon sayısının 6 olduğu ve belki de kısmen histidinlere bağlandığı şeklindedir(7;8).

Üreaz,her alt biriminde iki nikel atomuna sahip ve toplam 12 nikel atomu içeren bir nikel metalloenzimdir(8).

3 boyutlu yapıya sahip metalo proteinlerin çoğundaki metal bağlayan amino asit artıkları zincirde yanyana bulunduğundan bu histidine zengin olan bölge enzimin metal bağlayan kısmını ihtiva edebilir.

Bir protein içerisinde -SH gruplarının varlığı ilk defa Jackbean üreaz için tanımlanmıştır.Enzim içerisindeki -SH gruplarının varlığı 2 şekilde sınıflandırılmıştır.

a)**Açık olanlar:** Bunlar natif konformasyonda titre edilebilirler.

b) **Saklı(Gömülü)olanlar:**Ancak denatüre oldukları zaman titre edilebilirler.

Her üreaz molekülünde 27-35 reaktif açık sistein olduğu rapor edilmiştir(7). Açık olan -SH grupları 2 şekilde sınıflandırılır.

1)5-5 ditiobis 2 nitro benzoik asit ve 2,2-diprididildisülfid gibi -SH ajanlarla hiçbir aktivite kaybı olmaksızın kolayca reaksiyona giren ve yüksek reaktiviteye sahip olan inesansiyel grup.

2)Çok daha kolayca reaksiyona giren ve kolayca inaktivasyona uğrayan düşük reaktiviteye sahip enzimatik aktivite için gerekli (esansiyel) olan grup(14).

Üreazın yaklaşık 84 sülfhidril grup içerdiği ve sülfhidril grupların ancak 6-8 kadarının enzimatik aktivite için gerekli olduğu Norris ve Brocklehurst tarafından bildirilmiştir(15).

Enzimatik aktivite için gerekli görülen Sistein-592 yukarıda bildirilen histidince zengin bölgede yerleşmiştir.Bu verilere dayanarak esansiyel Sistein artıklarının üreazın çalışma mekanizmasında genel bir rol oynadığı kabul edilmektedir(7,8).

Birinci grup -SH grupları enzimin ditioteritol ve 2.merkaptoetanol ile muamelesiyle tamamen aktif hale getirilirler(8).

Gömülü(saklı) olan -SH grupları sadece yapısal değişimlerden sonra titre edilebilirler(7,15).Bunlar ise 6 M Guanidumklorür(GuHCl) ile denatürasyon sonucu açığa çıkarlar(14,16).

Tiol gruplarının titrasyonu ile anlaşıldığı gibi bu enzimin her alt biriminin enzimatik aktivite için gerekli(esansiyel) bir tiol grubu içerdiği görülür (15). Geniş anlamda yaptığımız bu sınıflandırma birçok araştırma ile uygunluk göstermektedir.Araştırmacılar üreaz molekülünün 29 Sistidin ve 47 Sistein artığı içerdiği sonucuna varmışlardır(14). Bu tiol grupları katalitik aktivite için nikel kadar önemli bulunmuştur(7).

Jackbean ve Soya fasülyesi üreazlarının benzer amino asit diziliminden oluştuğu bildirilmiştir(17).Çeşitli araştırmalardan ortaya çıkan yegane sonuç soya fasülyesi üreazının metiyonin içeriği bakımından Jack bean üreaza benzemesidir(7,8,13,17).

Araştırmacılar Soya Fasülyesi ve Jackbean üreazlarının Metiyonin içeriklerinin birbirine çok benzediklerini ortaya koymuşlardır.Soya fasülyesi metiyonin içeriği ≈ 2.04 mol ve Jackbean metiyonin içeriği ≈ 1.99 mol olarak bulunmuştur.Bu sonuç ise benzer alt birim büyüklüklerinin ışığı altında pek de şaşırtıcı olmadığı anlaşılmaktadır(17).

1.2-ÜREAZIN DAYANIKLILIĞI

Saf üreaz çok dayanıklı değildir.Gorin ve Chin'e göre üreaz kristalleri + 4 C⁰ de Aseton-Sitrat çözeltisinde saklandığında bir ayda aktivitesinin % 5'inden daha azını kaybeder(18).

20 mM Fosfat-EDTA çözeltisinde bir ayda aktivitesinin yaklaşık % 10'unu (19), %1 EDTA içeren fosfat tamponunda saklandığında +4 C⁰ de bir hafta içerisinde aktivitesinin yaklaşık % 5 kadarını kaybeder.Ancak bu şekilde iki haftadan daha uzun süre saklanamaz(6).

Kristaller % 50 gliserol içerisinde saklandığı zaman bir ayda aktivitesinde büyük bir kayıp olmaksızın + 4 C⁰ de bir kaç ay aktif kalmaktadır,fakat kullanmadan bir kaç saat önce 0.004 M H₂S içeren fosfat tamponu(pH 7) içinde çözünmeleri gerekir(18).

Kahane ve arkadaşlarına göre Ureaplasma Uralyticum'dan saflaştırılan üreaz -70 C⁰ de % 50 gliserol içerisinde en az 3 ay dayanıklı kalmaktadır(20).

Aksu ve Yücel,üzerine toluen eklenerek ağzı kapalı şişede ve buzdolabında saklanan enzim preparatlarının en az bir ay süreyle hiç bir aktivite azalması göstermeden saklanabileceğini açıklamışlardır(21,22).

1.3-ÜREAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Üreaz üretiminde enzimin saflık derecesine göre değişik teknikler uygulanmaktadır.Enzim saflaştırma tekniklerinin gelişmesine paralel olarak,üreaz saflaştırma işlemleri de gelişmiştir.

Üreaz kristalize olarak elde edilen ilk enzimdir ve 1926 yılında Sumner tarafından oldukça basit bir yöntemle saflaştırılmıştır.

Sumner,Jackbean ununu 22 C⁰ da % 31.6(v/v) sulu aseton çözeltisinden 4-10 dakika ekstrakte etmiş,elde ettiği filtratı 2-2.5 C⁰ da bekleterek üreazın kristalizasyonunu sağlamıştır(23).

Dounce,sitrat-aseton çözeltisinden ilk defa üreazın rekristalizasyonunu sağlamıştır(24).Bu temel işlem,Gorin ve arkadaşları tarafından daha da geliştirilmiştir. Gorin ve Mamiya 28 C⁰ de sulu aseton ekstraktlarına merkapttoetanol ilave ederek üreazın çözünebilirliğini göstermiştir(23,25).

Blakeley ve arkadaşları % 1'lik merkapttoetanol içeren % 30'luk aseton çözeltisi ile 39 C⁰ 'de 5 dakika ekstrakte etmiş,daha sonra elde ettiği filtratı -4 C⁰ 'de 48 saat bekleterek üreazın kristalizasyonunu sağlamıştır(23).

Hanabusaya göre örneklerin az miktarda üreaz aktivitesine sahip olması ve bazı örneklerde olağan miktarlarda enzim bulunmasına karşın asetonla ekstraksiyondaki güçlükler,Sumner'in yönteminin uygulanmasını güçleştiriyordu(26,27).

Blakeley ve arkadaşlarına göre + 4 C⁰ 'de 1mM EDTA ve 1mM merkapttoetanol içeren fosfat tampon çözeltisinde(pH 7.1) ekstrakte edilen üreaz,üç kere rekristalize edilmiş daha sonra bir takım yabancı maddelerden ve kirliliklerden kurtarılarak zenginleştirilmesi için amonyum sülfat ile presipite edilmiştir. Diyalize edildikten sonra Sephadex G-200 kolonlarından geçirilerek özgül aktivitesi 4580 ünite/mgr olan üreaz elde etmişlerdir(10).

Gorin ve arkadaşlarına göre,üreaz ekstraktı elde etmek için kullanılan çözeltiye 2.merkapttoetanolün ilavesi enzimin saf olarak elde edilmesini arttırmaktadır(25).Gorin ve arkadaşlarının bu bulgusu Blakeley ve arkadaşları tarafından doğrulanmaktadır(23).

Takishima ve arkadaşları üreazın muhtemel kirliliklerden kurtulması için vakum altında liyofilize etmişlerdir(9).

Hill ve Elliot,soğukta ve CM(Karboksimetil) Sellüloz kolonlarından elde edilen bazı fraksiyonlarda üreazın kristalizasyonunu sağlamış ve daha sonra Nişasta Gel ve Kağıt Elektroforezi uygulayarak ana çözeltiden üreaz fraksiyonlarını izole etmiştir(28).

Ureplasma Urealyticumdan üreaz,affiniti kromatografi,gel filtrasyon yöntemleri ile ileri düzeyde saflaştırılmıştır(20,29).

Lynn,maleat tamponunda homojenize ettiği üreaz süspansiyonunu iyon değişim kromatografisi,poliakrilamit jel elektroforezi ve sephadex G-200 kolonlarından geçirerek 5300 Sumner Ünite enzim elde etmiştir(30).

Polacco ve arkadaşları, çalışmalarını Soya fasülyesi üreazı üzerinde yoğunlaştırmıştır.Soya fasülyesi; hücre kültürü,tohum ve yapraklarına fenilmetilsülfonilflorid içeren tamponda homojenizasyon ve daha sonra 10 000 gx de santrifüjasyon işlemi uygulanmış ve tohum üreazının bazı özellikleri belirlenmiştir(31).

Davies ve Shih, Soya fasülyesi ekstraktını %40-55 amonyum sülfat ile doyurmuş,daha sonra gece boyunca diyalize ederek, DEAE- Sellüloz kromatografisi ve gel filtrasyon ile saflaştırılmış ve aynı şartlarda Jackbean tohumlarından elde edilen üreaz ile karşılaştırmıştır.Jackbean üreaz ve soya fasülyesi üreazı aynı reaksiyon stokiometrisini vermişlerdir(32).

Polacco ve Havir,soya fasülyesini Tris-Maleat(pH 7.6) tamponunda homojenize ettikten sonra 16 000 gx de 10 dakika santrifüje etmiş daha sonra elde ettiği süpernatantı 60 C⁰ da su banyosunda 1 saat

bekletmiştir. Süpernatantı, amonyum sülfat ile %20 oranında doyurmuş ve 16 000 gx de santrifüje ederek pelet kısmını atmıştır. Süpernatantı tekrar amonyum sülfat ile %55 oranında doyurmuş ve daha sonra 2-Merkaptoetanol içeren Tris-Maleat (pH 7) tamponunda karşı 24 saat diyalize etmiş ve santrifüje ederek denatüre proteinler uzaklaştırmıştır. Süpernatantı -20 C⁰ deki asetonun 1/2 volümü ile muamele etmiş ve DEAE-Sellüloz kolonlarından geçirerek kısmen saf üreaz elde etmişlerdir (17).

Carlson ve arkadaşları çok aktif üreazın saflaştırılmasını aşağıdaki 3 aşamada gerçekleştirmiştir.

1-Etanol ile ekstraksiyonu

2-Kovalent kromatografisi

3-Jel filtrasyonu

Buna göre, Jackbean %36 etanol, 0.1 M KCl ve 1 mM EDTA içeren 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) tamponunda homojenize edilmiş daha sonra Bücher hunisi yardımıyla filtre edilmiştir. Süpernatant agaroz-2 piridildisülfid içeren kolonlardan (1x8 cm.) geçirilmek suretiyle başlangıçtaki örnek % 72 verimle 280 misli saflaştırılmıştır. Örnekler daha sonra 20 mM Ditiotritol içeren 0.05 M Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözülmüştür (33).

Ülkemizde üreazın saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Aksu ve Yücel, hiç bir saflaştırma işlemine tabi tutulmaksızın soya fasülyesini; doğrudan kahve değirmeninde un haline getirmiş ve ticari üreaz ile eşdeğer miktarda EDTA tamponunda çözerek yapılan çalışmalarında benzer sonuçlar alınmıştır (21,22). Aynı yöntem ve işlem laboratuvarlarımızda tekrarlanmış ve aynı sonuçlar alınamamıştır. Atalay, Aker ve Temel yaptıkları çalışmada ise soya fasülyesinden elde ettikleri üreazı Jack bean üreaz olarak tanımlamıştır (34).

Ticari olarak saflaştırılan üreaz, birbirinden çok farklı saflıklarda piyasaya sunulmuştur. Worthington, Merck, Sigma, Beckman, Miles ve Boehringer gibi uluslararası şirketler 2 Ünite/mgr saflıktan 2000 Ünite/mgr saflığa kadar değişen üreaz üretmişlerdir(35).

Araştırmamızda kullandığımız saflaştırma tekniğimiz, bazı farklılıkları ile yukarıda anlatılan tekniklere uymaktadır.

1.4-ÜREAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜM METODLARI

Üreaz aktivitesi değişik metodlarla ölçülmüştür. Bu metodların çoğunun ortak özelliği ürenin hidrolizi sonucu oluşan amonyakın kantitatif olarak saptanmasına dayanmaktadır(36). Bunlar;

1-Sumner'in Klasik Titrasyon Metodu:

Enzim, iki dakika substratla inkübasyona tabi tutulur. Reaksiyon asit ilavesi ile durdurulur. Daha sonra NaOH ile titre edilir ve aktivite hesaplanır.

Gorin ve arkadaşları daha sonra bu metodu modifiye etmişlerdir. Test örneklerine substrat ve fosfat tamponu(pH 7) içinde çözölmüş enzim kaynağı konulmuş 25 C⁰ da 5 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon HCl ile durdurulmuş daha sonra Brom krezol yeşili ve metil kırmızı içeren indikatör yardımıyla titre edilmiştir(5,6).

2-Katz'in, katyonik duyarlı cam elektrot ile amonyakın direkt potansiyometrik ölçüm metodu(37,38).

3-Ürenin hidrolizi sonucu oluşan amonyak, glutamik dehidrogenaz tarafından α -ketoglutarik asit ile glutamik asite dönüşür, aynı zamanda ortamdaki NADH oksidasyonu sonucu oluşan NAD⁺ ya bağlı olarak 340 nm' de absorbans değişimi ölçölür(39,40).

4-Nessler Reaksiyonu:

Inkübasyon sonucu oluşan amonyakın Nessler ayıracı ile direkt ölçümü (41).

5-Radyoaktif Metod:

Radyoaktif Ürein (^{14}C -Üre) Üreaz ile parçalanması sonucu oluşan ($^{14}\text{CO}_2$) nin yakalanması ve radyoaktivitesinin ölçülmesi(37,42).

6-Berthelot Reaksiyonu:

Üreaz tarafından ürenin hidrolizi sonucu oluşan amonyak, fenol ve hipoklorit ile indofenol kompleksine dönüşür(43,44).

Berthelot ve Nessler reaksiyonu, serumda ürenin ölçülmesi için kullanılmaktadır. Berthelot reaksiyonunun, Nessler reaksiyonuna göre, yaklaşık 10 kere daha duyarlı olduğu bildirilmiştir(45).

1.5-ÜREAZIN İNHİBİTÖRLERİ

Üreazı inhibe eden birçok kimyasal madde vardır. Üreaz; metil amonyak ve nitrat tarafından inaktive olur(6,13). Floridler, halojenler, boratlar, kinonlar, formaldehit, H_2O_2 , asetohidroksamik asit ve fosforamidat üreazı inhibe ederler(10,35).

Üre analogları(metilüre, fenilüre, paranitrofenilüre, hidroksiüre, tiyoüre, selenüre, semikarbazit, hidroksilamin, L-glutamin) ve aminoasit hidroksamatlar(asetohidroksamat, L-glisin hidroksamat, L-aspartil 4-hidroksamat, L-glutamil 5-hidroksamat) üreazın bilinen inhibitörleridir(33). Hidroksamik asitlerin üreazın nikel iyonlarına bağlanmasıyla inhibisyona neden olduğu sanılmaktadır(8).

Cıva, bakır, gümüş, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metal iyonları üreazı kolayca inaktive etmektedirler(6,36).

Kistiakowsky ve arkadaşları, gümüş iyonlarının üreazı tamamen (full) inaktive ettiğini bildirmişlerdir(46). Yine Kistiakowsky ve arkadaşlarına göre, Na^+ , K^+ , ve NH_4^+ üreaz üzerinde küçümsenemeyecek inhibitör özelliklere sahiptir(5).

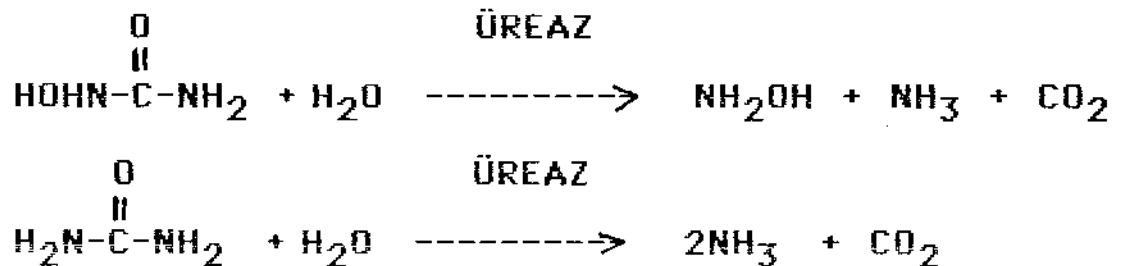
Saada ve Kahane, sühidril grupları içeren enzimin,parakloromer-küribenzoik asit ve N-etilmalemit tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir(20).

Üreazın N-Etilmalemit,parakloromerküribenzoik asit ve 5,5-di-thiobis(2-nitrobenzoik asit) tarafından titrasyonu sonucu enzim aktivitesinde düşüşler olduğu Andrews ve Reithel tarafından bildirilmiştir(14).

Belding ve Kern, bazı antibiyotiklerin üreazı inhibe ettiğini rapor etmiştir.Buna göre,Kloramfenikol,Eritromisin,Neomisin ve Penisilin'in aynı miktarlarının ilavesiyle,inhibisyon etkilerinin Oksitetrasikline nazaran daha az olduğu bildirilmiştir(47).

Mamiya ve arkadaşlarına göre üreazın fotooksidasyonunun katalitik aktivitesinin kaybolmasına yol açtığı bildirilmiştir.Buna göre,metilen mavisinin çok küçük derişimlerinde ve ışık altında %50'lere varan inhibisyon görölmüştür.Inhibisyon nedeni,üreaz üzerinde katalitik aktivitede önemli rolü bulunan histidinlerin fotooksidasyon ile pozitif yüklü amino grubunun ayrılarak serbest amonyum iyonlarına dönüşmesi olarak bildirilmektedir(8).Norris ve Brocklehurst'a göre ise, histidin imidazol gruplarının oksidasyonu ile ilgili olabileceği bildirilmiştir(5).

Fishbein ve arkadaşları,üreazın substrat ve substrat analoglarının inhibisyon etkileri ve stokiometrilerini incelemişlerdir.Buna göre bir üre analogu olan monohidroksiürenin($\text{HOHN}-\text{CO}-\text{NH}_2$) Jackbean üreazını inhibe ettiğini açıklamışlardır.Reaksiyon denklemi:



olarak gösterilmiştir. Diğer hidrolitik enzimler test edildiğinde bu reaksiyonu katalize etmediği görülmüştür. Hidroksiüre, üre yerine substrat olarak kullanıldığı zaman %95 düşük aktivite göstermiştir(48).

Yapılan çalışmalarda, monohidroksiüre ve diğer bir üre analogu olan asetohidroksamik asitin Jackbean üreazını non-kompetatif olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Asetohidroksamik asit ve hidroksiürenin inhibisyon etkisi oluşan hidroksil aminden ileri geldiği bildirilmiştir. Sistin ve diğer merkaptanların ilavesi Jackbean Üreaza eski aktivitesini geri kazandırmamıştır(49).

Monohidroksiüre dışında Dihidroksiürenin($\text{HOHN}-\text{CO}-\text{NH}_2$)de Jackbean Üreaza özgül olduğu Fishbein tarafından bildirilmiştir. Dihidroksiürenin inhibisyon etkisi non-kompetatif olarak bulunmuştur. 1 mol Dihidroksiürenin hidrolizinde 1 mol karbondioksit ve 2 mol hidroksil amin oluşmaktadır(50).

1.6-ARAŞTIRMAMIZIN AMACI

Giriş kısmında da belirtildiği gibi ülkemizde üreazın saflaştırılması ile ilgili çalışmalar yetersiz görülmektedir. Bazı baklagillerde özellikle Soya Fasülyesi ve Jackbean'de üreazın varlığı ve saflaştırılması araştırmamızın konusu olmuştur. Araştırmamızda göz önünde tutulan diğer noktalar:

1-Laboratuvarlarımız koşullarında Jackbean ve Soya Fasülyesi üreazlarının mümkün olan en yüksek düzeyde ve verimde saflaştırılması ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi,

2-Kısmen saflaştırılan üreazların maksimum aktivitesi için uygun şartların belirlenmesi,

3-Enzimin inhibisyonuna neden olan maddeler, koşullar ve üreazın spesifik gruplarının araştırılması,

4- Safılaştırılan üreazlardan etkin bir tarzda yararlanılma yollarının bulunması,

5-Enzimin maliyet avantajının artırılması ve ticari üreaz ile kıyaslayarak uygun şartlarda üretiminin sağlanması ve harcanan döviz kaybının askariye indirilmesi,

6-Şu anda kullanılan üreazlar kolaylıkla çözünmemekte ve özellikle spektrofotometrik yöntemlerde sorunlara neden olmaktadır.Bu çalışmada üreazın kolayca çözünebilir ve yüksek aktivite gösteren bir fraksiyon bulmak amaçlanmıştır.

II- MATERYAL ve METOD

II.1-Materyal:

Jackbean (*Canavalia ensiformis*) tohumları Florida Üniversitesi'nden (U.S.A) ,Soya fasülyesi (*Glycine max*), Bakla, Mercimek, Nohut, Culbant (Mürdümük), Fig, Beyaz Fasülye türleri, Burçak, Bezelye, Yonca, Korunga, Kengel ve Mısır tohumları Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Meyvecilik Üretim İstasyonu Müdürlüğü ve Bitki Koruma Elazığ Şube Müdürlüğünden temin edilmiştir.

II.2-Kimyasal Maddeler:

Araştırmada kullanılan kimyasal maddelerin tamamı analitik saflıktadır.

II.3-Cihazlar:

- 1-SB-5 Freeze Drier(Chemlab.Instruments Ltd.)
- 2-Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge
- 3-UV/Vis Spectrofotometer(Shimadzu UV-240)
- 4-Metabolik su banyosu
- 5-Deep freeze(Bosch)
- 6-pH-metre(Schott-Mainz)

II.4-Protein Ölçüm Metodları

II.4.1-Biüret Yöntemi

İki veya daha fazla peptid bağı içeren proteinlerin, alkali ortamda,bakır iyonları ile erguvani(mor) renk alma esasına dayanır (51).

Biüret Ayracı: 1.5 gr. Bakır sülfat ve 6 gr. sodyum potasyum tartarat 500 mililitre suda çözöldü.300 mililitre % 10(w/v) sodyumhidroksit ilave edildi.Toplam hacim 800 mililitre.

Standart Protein: 2.5 mg.BSA(Sığır serum albumin)/ml

METOD:

	Kör	Standart	Örnek
Üreaz süzöntüsü(ml)	-	-	1
Protein standartı(ml)	-	1	-
Distile su(ml)	1	-	-
Biüret ayıracı(ml)	4	4	4

iyice karıştırılır ve 30 dakika oda ısısında tutularak 540 nm'de okunur.

$$\text{Hesaplama(mg/ml)} = \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Standart Abs.}} \times 2.5 (\text{mgr/ml})$$

II.4.2-Lowry Yöntemi

Biyolojik örneklerde düşük düzeyde bulunan proteinlerin kantitatif ölçümü için basitleştirilmiş method(52).

Alkali Bakır Ayıracı:

10 gr. sodyum karbonat, 0.1 gr. potasyum tartarat ve 0.05 gr. bakır-sülfat 0.5 N NaOH içinde çözöldü ve 100 mililitreye tamamlandı.

Fenol Ayıracı:

Günlük olarak hazırlanır, 2N lık Folin Ciocalteu Phenol ayıracından 3.75 mililitre alındı ve distile suyla 67.5 mililitreye tamamlandı.

Standart Protein: 50 μ gr BSA(Sığır Serum Albumin)/ml.

METOD:

	Kör	Standart	Örnek
Üreaz süzöntüsü(ml)	-	-	1
Protein Standartı(ml)	-	1	-
Distile Su(ml)	1	-	-
Alkali Bakır Ayıracı(ml)	1	1	1

iyice karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında beklenir.

Fenol Ayıracı(ml)	4	4	4
-------------------	---	---	---

İyice karıştırılır ve 5 dakika 55 C⁰ de beklenir. Soğutulur ve 650 nm de okunur.

Hesaplama= $\mu\text{gr./ml} = \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Standart Abs.}} \times 50 \mu\text{gr./ml}$

II.5-Glukoz Tayin Metodu(o-Toluidin yöntemi):

Ortotoluidinin asetik asitdeki çözeltisi glukoz ile ısıtıldığında yeşil renkli bir ürün oluşturur. Oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Glukozun aldehit gurubu ayıracı ile glukozamin oluşturur. Tiyoüre dayanıklılığı arttırıcı olarak ayıracın içerisine ilave edilir(53).

O-Toluidin Renk Ayıracı:

940 mililitre glasiel asetik asit içinde 1.5 gr. tiyoüre çözünene kadar karıştırılır. Üzerine 60 mililitre saf o-toluidin eklenir.

Standart Glukoz:

1 gece 37 C⁰ de etüvde tutulmuş ve desikatörde soğutulmuş saf glukozdan 1 gram tartılır. Yeteri kadar 0.016 M benzoik asit çözeltisinde çözüldükten sonra 100 mililitreye tamamlanır. Standart 10 misli, sulandırılarak çalışma standardı elde edilir.

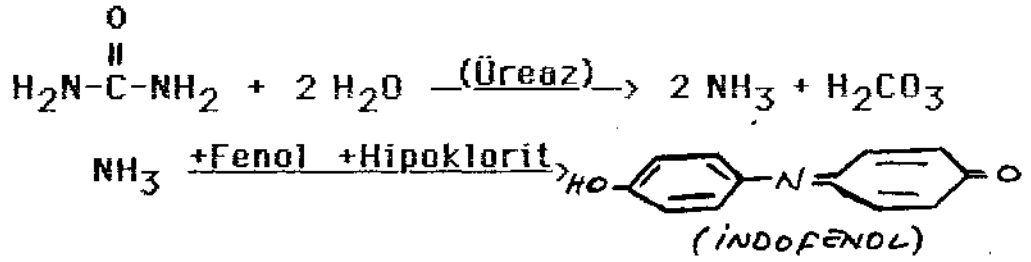
METOD:

	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>Örnek</u>
Üreaz Süzöntüsü(ml)	-	-	0.05
Standart(ml)	-	0.05	-
O-Toluidine Ayıracı(ml)	3	3	3

İyice karıştırılır, kaynamakta olan su banyosunda 12 dakika bekletilir. Süre sonunda tüpler 1 dakika kırılmış buz içinde soğutulur. 630 nm de köre karşı okunur.

Hesaplama: $\text{mg/100 ml Glukoz} = \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Standart Abs.}} \times 100 \text{mg/100 ml}$

11.6-ÜREAZ AKTİVİTESİNİN TAYİN YÖNTEMİ(BERTHELOT)



Üre,üreaz enzimi tarafından amonyum iyonu ve karbonata hidrolize olur. Gluşan amonyum iyonu bazik ortamda fenol ve sodyumhipoklorit ile mavi renkli indofenol kompleksine dönüşür(43,45,53).

Alkali Hipoklorit Ayıracı: %2.5 NaOH(w/v) çözeltisi üzerine 20 mililitre sodyumhipoklorit(piyasadaki çamaşır suları %5.25 klorür içerir) çözeltisi ilave edildi.

Fenol Ayıracı: %5 Fenol(w/v) çözeltisinde çözölmüş %0.26 sodyum nitroprussiat(w/v) çözeltisi.

50 mM EDTA-NaOH Tamponu(pH 6.5): 8.3 gram EDTA, 250 ml distile suda ve 200 mililitre gliserolde çözöldü.%4 lük NaOH ile pH sı 6.5'a getirildi. Enzim kaynağı olarak kullanılan fraksiyon 50 mM EDTA tamponunda çözöldü.

Benzoik Asit(0.0160 M): 2 gram benzoik asit 1 litre suda distile çözöläp 0.8 mililitre konsantre asetik asit eklenerek iyice karıştırdı.

Standart Üre(40 mM): 0.24 gram Üre 0.016 M bir miktar benzoik asitde çözöldü ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı.

METOD:

	Standart	Kör	Su Körü
Üre standartı(ml)	0.5	-	-
Üreaz süzüntüsü(ml)	0.5	0.5	-
Distile su(ml)	-	0.5	1

İyice karıştırılır, 37 C⁰ de 15 dakika metabolik su banyosunda tutulur. Süre sonunda,

Fenol(ml)	1	1	1
Alkali Hipoklorit(ml)	1	1	1 ilave edilir.

İyice karıştırılır, 37 C⁰ de 15 dakika metabolik su banyosunda tutulur. Soğutulur ve daha sonra,

Distile su(ml)	10	10	10 ilave edilir.
----------------	----	----	------------------

Karıştırılır ve distile su içeren körüne karşı 580 nm de okunur.

II.7- ÜREAZ SAFLAŞTIRMADA KULLANILAN AYIRAÇLAR:

100 mM Tris-HCl Tamponu (pH=7.6): 12.11 gram Tris(hidroksimetil) amino methan ve 4.388 gr. EDTA 800 mililitre distile suda çözülür, 0.7 mililitre 2-Merkaptoetanol ilave edildi. 100 mM HCl çözeltisi ile pH=7.6 ya getirildi ve 1000 mililitreye tamamlandı.

Ca.P Jel: 88.6 gr/litre CaCl₂·2H₂O çözeltisinden 150 mililitre alındı. Distile su ile 1600 mililitreye tamamlandı. Üzerine 152 gr/litre Na₃PO₄·12H₂O çözeltisinden 150 mililitre ilave edilerek karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı, 0.02 M lık asetik asit ile 7.4'e getirildi. Oluşan karışım karanlıkta 1 gece bekletildi. Çökelti 3-4 defa 10-15 litre distile su ile yıkandı. Yıkama esnasında üstteki sıvı kısım sürekli uzaklaştırıldı. Son defa 10 litre distile suyla yıkanarak 0 C⁰'de bekletildi(54).

66 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ Tamponu (pH=7.5): 15.22 gram K₂HPO₄·3H₂O distile suda çözülürken litreye tamamlandı. Litresinde 9.077 gram KH₂PO₄ içeren KH₂PO₄ çözeltisi ile pH 7.5 a getirildi.

25 mM Sitrik Asit-Sodyum Sitrat Tamponu (pH=6) : Litresinde 5.25 gram sitrik asit monohidrat çözeltisi hazırlandı. Litresinde 7.35 gram Trisodyumsitratdihidrat çözeltisi ile pH sı 6' ya getirildi.

30 mM EDTA-NaOH Tamponu (pH=6.5) : 5 gram EDTA disodyum tuzundan alınarak 200 mililitre Gliserol ve 250 mililitre distile suda çözüldü, % 4 lük NaOH(w/v) ile pH'sı 6.5 e getirildi.500 mililitreye tamamlandı.

11.8-Soya Fasülyesi(Glycine max) ve Jackbean(Canavalia Ensiformis) Üreazlarının Kısmi Olarak Safılaştırılmasında İzlenen Yöntem

Üreazın safılaştırılmasında,

1-Tamponda Homojenizasyon

2-60 C⁰ de 1 saat Isıtma

3-Tampona Karşı 1.Diyaliz

4-Ca.P.Jeline Absorbsiyon

5-Distile Suyu Karşı 2. Diyaliz

6-Liyofilizasyon

7-Rekristalizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Örneklerin Hazırlanması:Jackbean(Canavalia Ensiformis) ve Soya Fasülyesi (Glycine max) tohumları kahve değirmeninde çekilerek un haline getirildi. Safılaştırma işlemine 100' er gram tartılarak başlanmıştır.

1-Tamponda Homojenizasyon:

Örnekler 100 mM Tris-HCl(pH=7.6) tamponunda iyice homojenize olana kadar karıştırıldı.Karıştırma işlemine aralıklı olarak 3 saat devam edildi ve 1 gece boyunca +4 C⁰ de bekletildi. 2 katlı tülbent-

ten süzöldü. Süzöntüden arta kalan tortu tekrar 100 mM Tris tamponunda yıkanarak iki katlı tülbentten süzöldü,süzöntüler birleştirildi. Süzöntü 16000 rpm'de ve + 4 C⁰ de 15 dakika santrifüje edilerek süpernatant alındı.Yüzen lipid tabakası iki katlı tülbentten süzölerek uzaklaştırıldı.

2- 60 C⁰ 1 saat Isıtma:

Süpernatant 60 C⁰ de 1 saat sallantılı metabolik su banyosunda bekletildi(27).Süre sonunda iki katlı tülbentten süzöldü. Süzöntü 20000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilerek süpernatant alındı.

3-Tampona Karşı 1.Diyaliz:

Süpernatant % 55 oranında (NH₄)₂SO₄ ile doyuruldu,Jackbean ve Soya fasülyesi için 165'er gram amonyumsülfat kullanıldı.30 dakika sürekli karıştırıldı ve 5 saat +4 C⁰ beklenildi. Doymuş çözelti 16000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Pelet kısmı 100 mM Tris-HCl (pH=7.6) tamponunda sürekli olarak karıştırılarak iyice çözöldü. + 4 C⁰ de 24 saat tampona karşı diyalize edildi.Tampon çözelti her 6-8 saatde bir değiştirildi.

4-Ca.P.Jeline Absorbsiyon:

Denatüre proteinler 16000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant enzimin absorbsiyonu için Ca.P. Jelinin uygun hacmiyle karıştırıldı.Diyalizatın iki hacmine karşılık jelin bir hacminin uygun olduğu bulunmuştur(26).Karışımın pH'sı 0.02 M Asetik asit çözeltisiyle 5.5 'e getirildi.1 saat karıştırılarak + 4 C⁰ de gece boyunca bekletildi.16000 rpm'de santrifüje edilerek pelet kısmı 3 defa 66 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ pH 7.5 tamponuyla yıkandı.8000 rpm'de santrifüje edilerek süpernatantlar toplandı.

5-Distile Suyu Karşı 2.Diyaliz:

Süpernatanta % 50 doyuma gelinceye kadar Amonyumsülfat ilave edildi. Jackbean için 40 gram,soya fasülyesi için 35 gram amonyumsülfat harcandı.30 dakika sürekli karıştırılıp doyuma gelinceye kadar + 4 C⁰ de bekletildi. Doymuş çözelti 16000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek pelet kısmı 100 mM Tris tamponunda çözöldü.24 saat distile suya karşı diyalize edildi. Distile su her 6-8 saatde bir değıştirildi.Denatüre protein 16000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek uzaklaştırıldı.Süpernatant alındı.

6-Liyofilizasyon

Süpernatant dondurulduktan sonra liyofilize edildi.Kuru liyofilizat elde edildi.

7-Rekristalizasyon:

Kurumuş liyofilizatın bir miktarı(Jackbean ve Soya fasülyesi için 250 mgr.) alınarak 30 mililitre gliserol içeren 30 mM EDTA tamponunda (pH=6.5) iyice çözöldü. Üzerine -10 C⁰ de ki Asetonun 0.6 Volumu devamlı karıştırılarak damla damla ilave edildi.2 saat oda ısısında bırakıldı.12000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek çözünmez presipitat 25 mM sitrat tamponunun(pH=6) 9 volumunu ve % 10 2.Merkaptoetanolün 1 volumunu içeren çözeltide iyice çözöldü.1 saat oda ısısında yavaşca karıştırıldı.12000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant çözünür Üreaz içerdiğinden alındı. Pelet 25 mM Sitrat tamponu(pH=6) ve %10 Merkaptoetanol 9:1oranı ile tekrar yıkandı.1 saat yavaşca karıştırılıp 12000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi ve iki süpernatant birleştirildi.Süpernatant -10 C⁰ de ki Asetonun 0.3 Volümü ile karıştırıldı.0-5 C⁰ de 1 gece boyunca kristallerin oluşması için bekletildi (30).Oluşan çökektiller küçük hunilerde süzöldü.Kristaller elde edildi.

III-BULGULAR

Jackbeanden üreazın kısmen saflaştırılması ile ilgili bulgular Tablo 1'de,soya fasülyesinden üreazın saflaştırılması ile ilgili bulgular ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi Jackbeanden %34.4 verimle başlangıçta özgül aktivitesi 1.144 Ünite/mgr. olan enzim, kısmi saflaştırma sonucunda özgül aktivitesi 105 misli arttırılarak 120 Ünite/mgr. kısmen saf üreaz elde edilmiştir.

Tablo 2'de ise soya fasülyesinden %26 verimle başlangıçta özgül aktivitesi 0.558 Ünite/mgr. olan enzim,kısmi saflaştırma sonucunda özgül aktivitesi 134 misli arttırılarak 75 Ünite/mgr. kısmen saf üreaz elde edilmiştir.

ÜNİTE: 1 μ mol Üreyi 37 C⁰ de ve dakikada parçalayan enzim aktivitesi olarak alınmıştır.

	Hacim(ml)	P R O T E İ N		E N Z İ M				G L U K O Z
		mgr/ml	Top.mgr.	Ünite /ml	Top.Ünite	Verim	Özgül Akt. Ünite/mgr	mgr/100 ml.
Tamponla Homojenizasyon	600	33.67	20202	38.54	23124	100	1.144	160.50
60 C ⁰ 'de 1 Saat Isıtma	460	23.50	10810	45.93	21127.8	91.3	1.954	199.91
Tampona Karşı 1.Diyaliz	200	17.36	3472	84.58	16916	73.1	4.872	16.58
Ca.P.Jeli İle Absorbsiyon	140	15.69	2196.6	111.14	15559.6	67.3	7.083	5.31
Distile Suyu Karşı 2.Diyaliz	75	13.73	1029.7	171.1	12832.5	55.5	12.461	-
Liyofilizasyon	12.8	9.70	124.2	874.66	11195.6	48.4	90.180	-
Rekristalizasyon	8.7	7.63	66.5	915.9	7969	34.4	120	-

Tablo 1 :Jackbeanden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.

	Hacim(ml)	P R O T E İ N		E N Z İ M				G L U K O Z
		mgr/ml	Top.mgr	Ünite/ml	Top.Ünite	Verim	Özgöl Akt. Ünite/mgr	mgr/100 ml.
Tamponla Homojenizasyon	600	29.8	17880	16.47	9982	100	0.558	96.10
60 C ⁰ 'de 1 Saat Isıtma	460	20.8	9568	19.27	8864.2	89	0.926	122.71
Tampona Karşı 1.Diyaliz	150	17.3	2595	46.93	7039.5	70.5	2.712	8.31
Ca.P.Jeli İle Absorbsiyon	110	12.56	1382	58.91	6480.1	64.9	4.688	2.56
Distile Suyu Karşı 2.Diyaliz	60	11.4	684	94.76	5685.6	56.9	8.312	-
Liyofilizasyon	7.25	10.15	73.5	414.13	3002.5	30.0	40.850	-
Rekristalizasyon	5	6.9	34.5	516.78	2583.9	25.9	75	-

Tablo 2:Soya Fasülyesinden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.

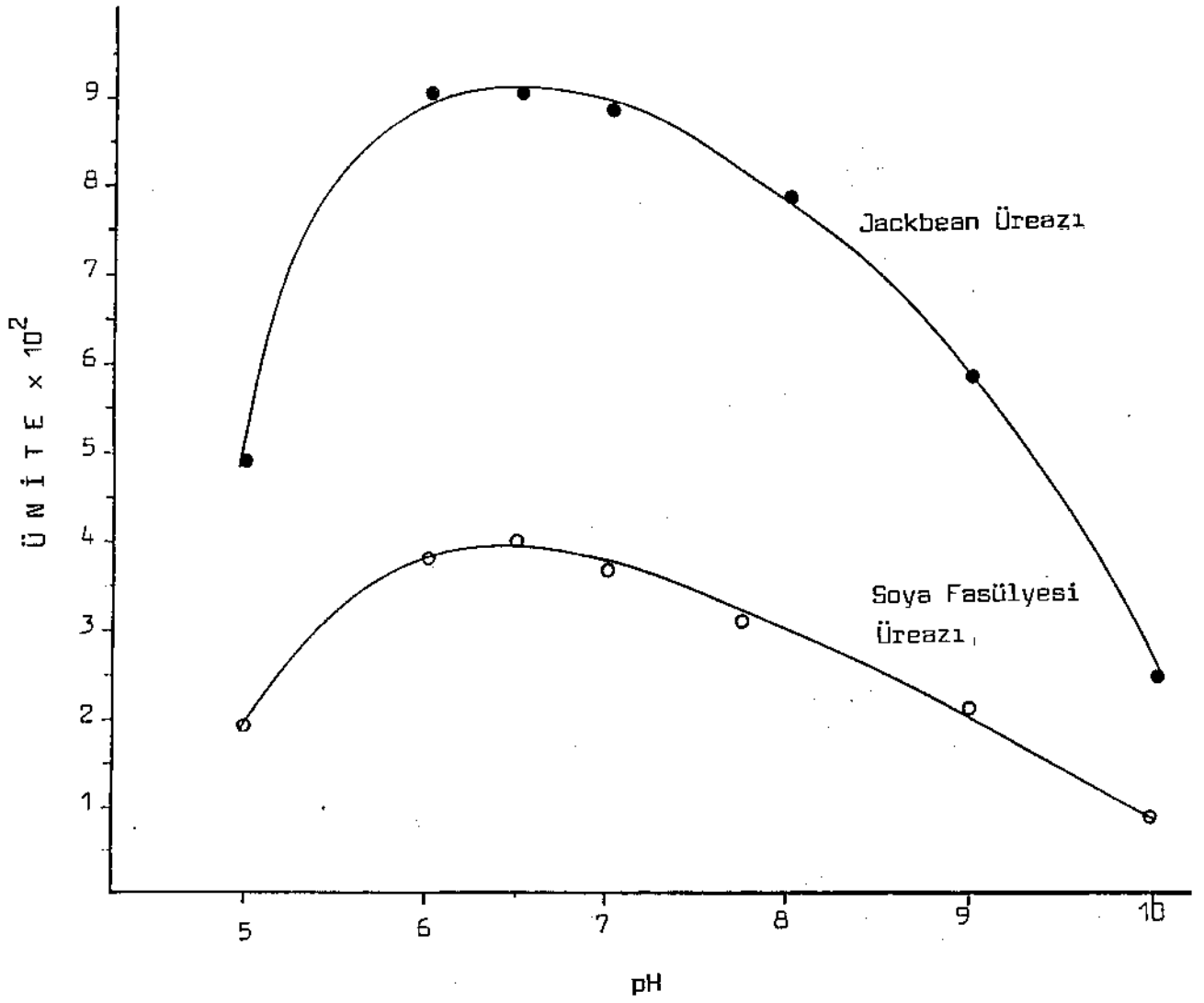
III.1- pH'nın Etkisi

pH'nın kısmen saflaştırılan Jackbean ve Soya fasülyesi Üreaz enzimleri aktivitelerinin üzerine etkisini araştırmak için 5'den 10'a kadar değişen pH'larda uygun tampon çözeltiler hazırlanmıştır. pH 5-6 için 50 mM Sitrik asit-sodyum sitrat, pH 6.5-7-8 için 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ve pH 9-10 için 50 mM Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Tampon çözeltilerinin 100 ml.sinde 0.24 gram Üre çözülerek 40 mM Üre derişiminde substratlar hazırlanmıştır. Enzim karışımı substratların pH larına uygun şekilde hazırlanmıştır. Jackbean Üreazından 0.1 mgr/ml ve Soya fasülyesi Üreazından 0.2 mgr/ml enzim karışımı olarak kullanılmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi pH 6-7 arasında enzim en yüksek aktiviteyi göstermektedir. pH 6.5 de erişilen maksimum aktivite, pH'nın yükselmesi ile enzim aktivitesinde düşmeye neden olmaktadır. Araştırmamız boyunca optimal pH 6.5 olarak alınmıştır. Fosfat tamponu bu pH için daha uygun olarak görülmüştür.

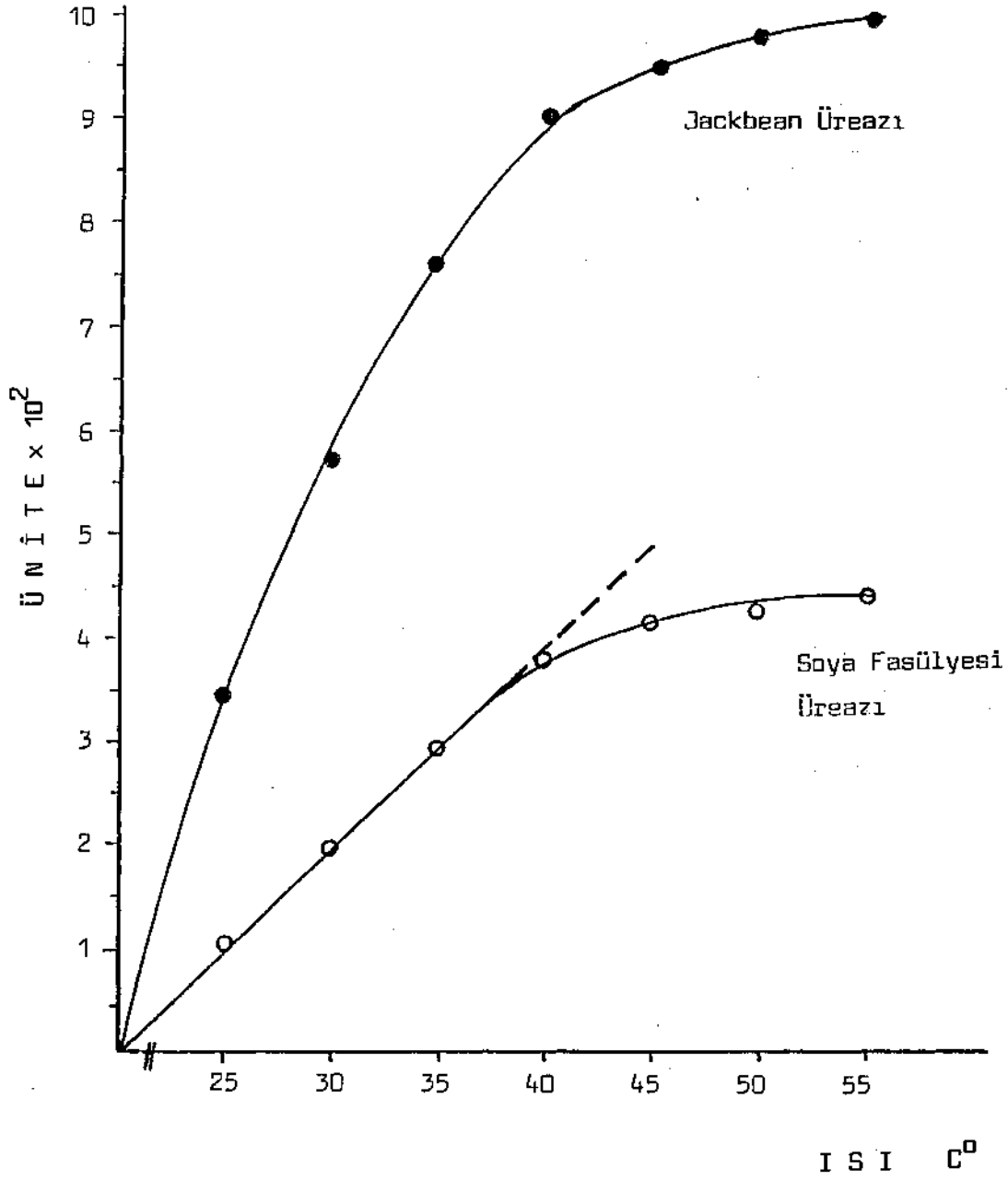
III.2-İnkübasyon Isısının Etkisi

Soya fasülyesi ve Jackbeanden kısmen saflaştırılan Üreazların optimal inkübasyon ısılarını saptamak amacıyla 25-30-35-40-45-50-55 $^{\circ}\text{C}$ ısı koşullarında enzim aktivitesi ölçülmüş ve şekil 2_a'da gösterilmiştir. Her iki enzimde de enzim aktivitesi 37 $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar doğrusal ve doğrusallığa yakın bir şekilde artmıştır. Soya fasülyesi Üreazında 37 $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar doğrusal olan artış bu ısı derecesinden sonra doğrusallıktan sapmıştır. Soya fasülyesi Üreazının inkübasyon ısısının 37 $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar doğrusal olarak artışından yararlanılarak Aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliğinden hesaplanmış ve 10.71 kcal/mol olarak bulunmuştur (şekil 2_b).

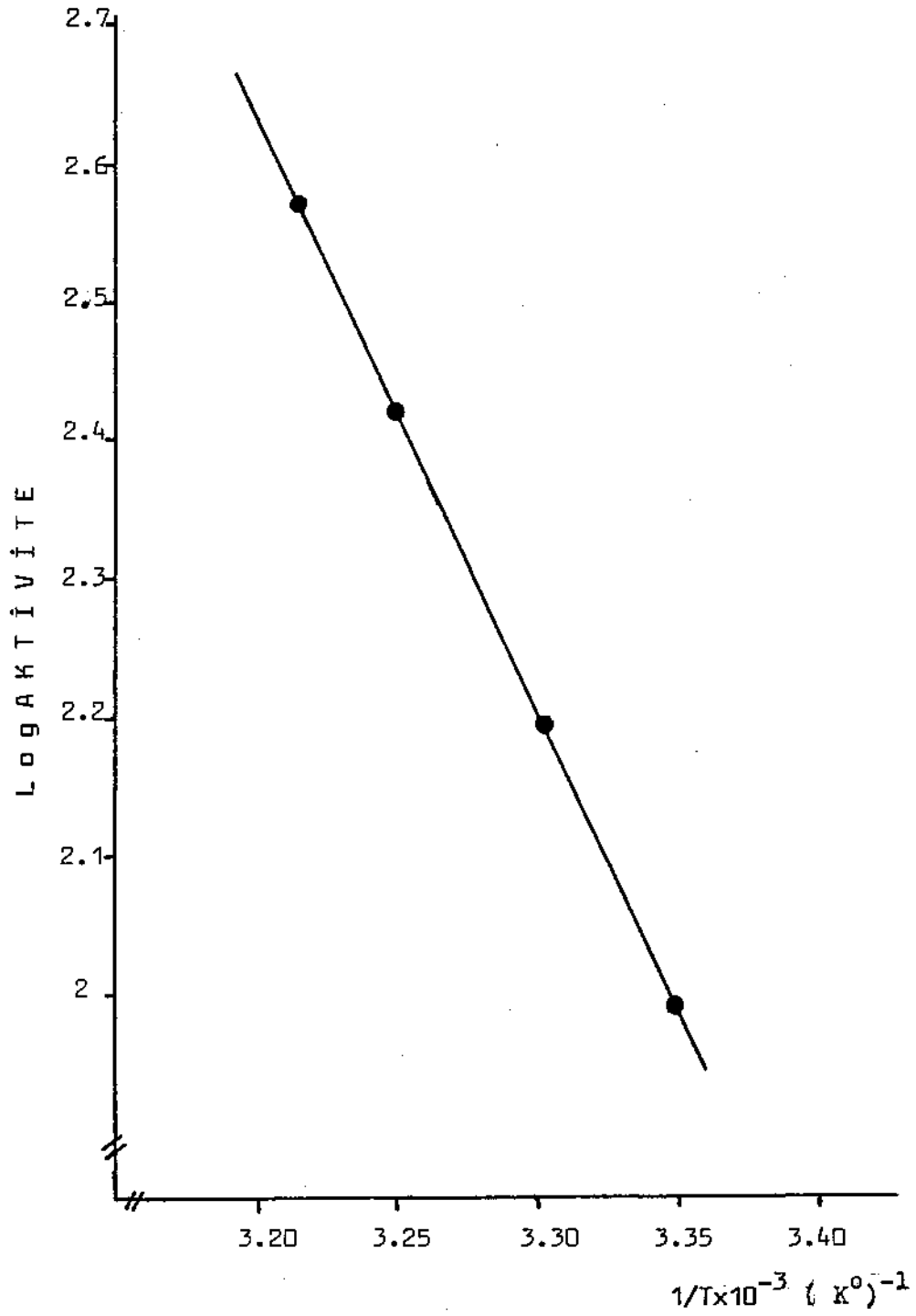
Arrhenius eşitliği: $\log \text{Aktivite} = -E_a / 2.3 R.T + C$



Şekil 1: Kismen Sıfırlanılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreazlarının Aktivitelerinin pH'ya Bağlı Değişimi.



Şekil 2_a: Kısmen Saflaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreaz Enzim-
leri Aktivitelerinin Isıya Bağlı Değişimi.



Şekil 2_b:Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreazın Aktivasyon Enerjisinin(E_a) Saptanması.

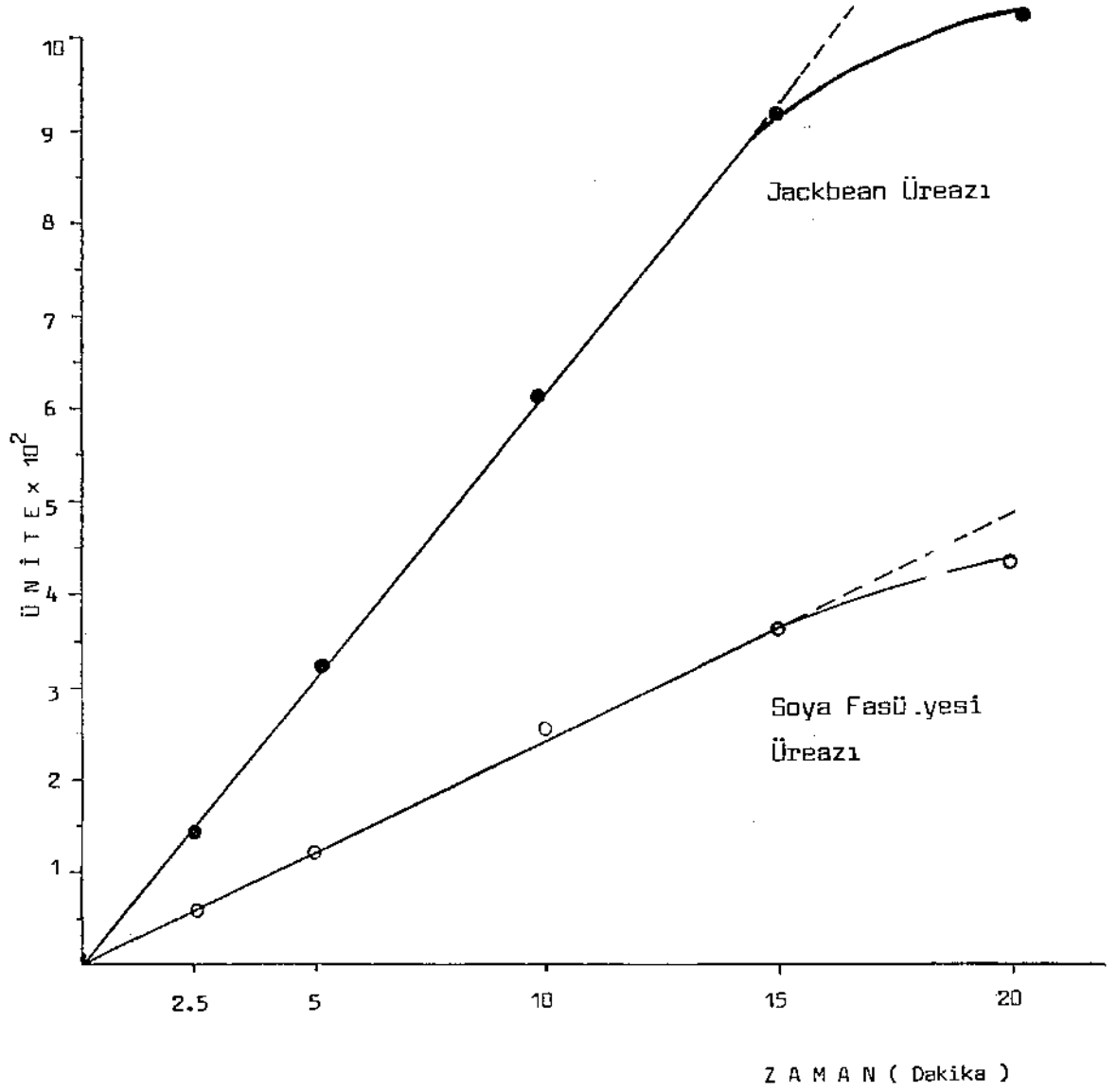
III.3-Zamanın Etkisi

Enzimatik reaksiyonun hızı,değişik zaman aralıklarında ölçülmüş ve şekil 3'de de görüldüğü gibi 15. dakikaya kadar doğrusal(linear) olarak artmıştır.15.dakikadan sonra doğrusallıktan saptığı görülmüştür. İnkübas-yon zamanının enzim aktivitesindeki doğrusallığın kayboluşunun sebebi araştırılmıştır.Enzimler 37 °C'de belirtilen zaman aralıklarında metabolik su banyosunda tutulmuş ve daha sonra enzim aktivitesi ölçülmüş-tür.Taze enzim ile yaşlanmış(bekletilmiş) enzimin verdiği sonuçlar ara-sında farklılık bulunamamıştır

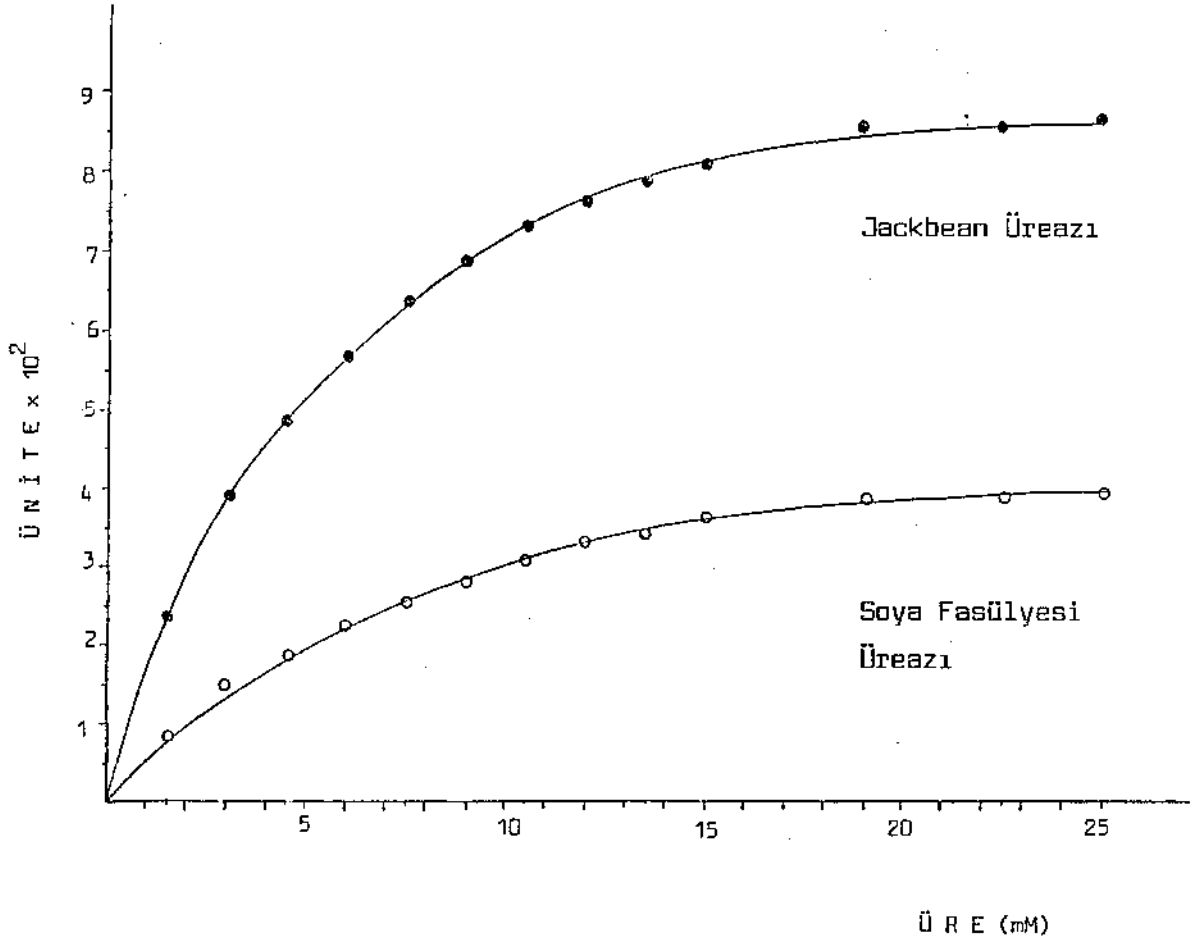
III.4-Substrat Yoğunluğunun Etkisi

Farklı substrat yoğunluklarında, kısmen saflaştırılmış Jackbean ve soya fasülyesi üreazlarının aktivitelerine etkisi şekil 4'de gösteril-miştir. Saflaştırılan üreazların substrat yoğunluğu grafiği Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır.4 mM üre derişimine kadar enzim aktivitesi doğrusal olarak artarken 20 mM üre derişiminde doyuma erişmektedirler (şekil 4).

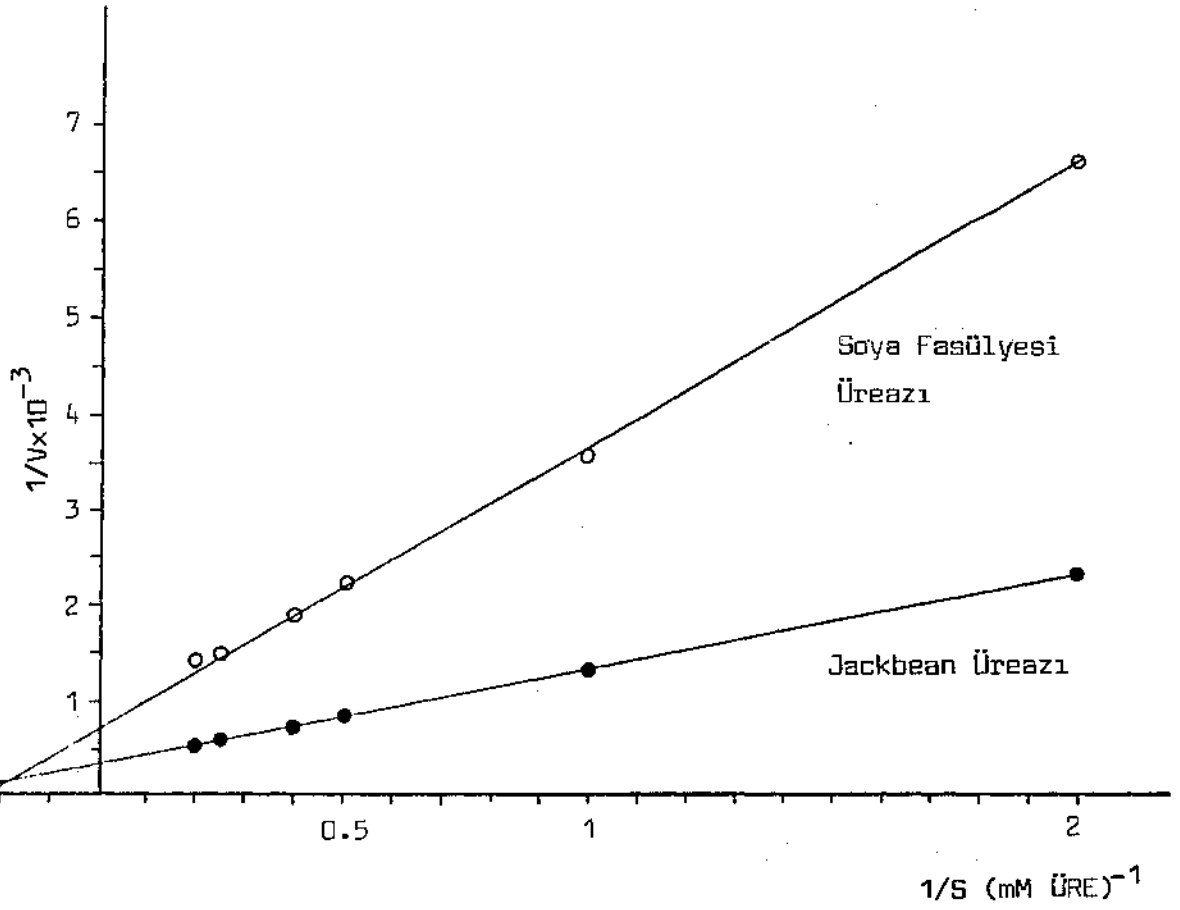
Enzimlerin aktivitelerinin substrat yoğunluklarına bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk yöntemiyle değerlendirilmiş Jackbean üreazı-nın üreye karşı olan Km'i 3.22 mM,soya fasülyesi üreazının üreye karşı olan Km'i ise 4.35 mM üre bulunmuştur(şekil 5). Enzimlerin Km'leri şekil 4 deki sonuçların değerlendirilmesi ile saptanmıştır.



Şekil 3: Kismen Sıfırlanmış Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreazlarının Aktivitelerinin Zamana Bağlı Değişimi.

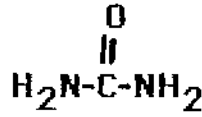


Şekil 4: Kısmen Safılaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreazlarının Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Değişimi.

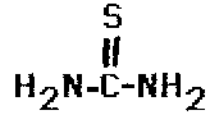


Şekil 5: Kısmen Saffaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Üreazlarının Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.

III.5-Tiyoürenin Etkisi

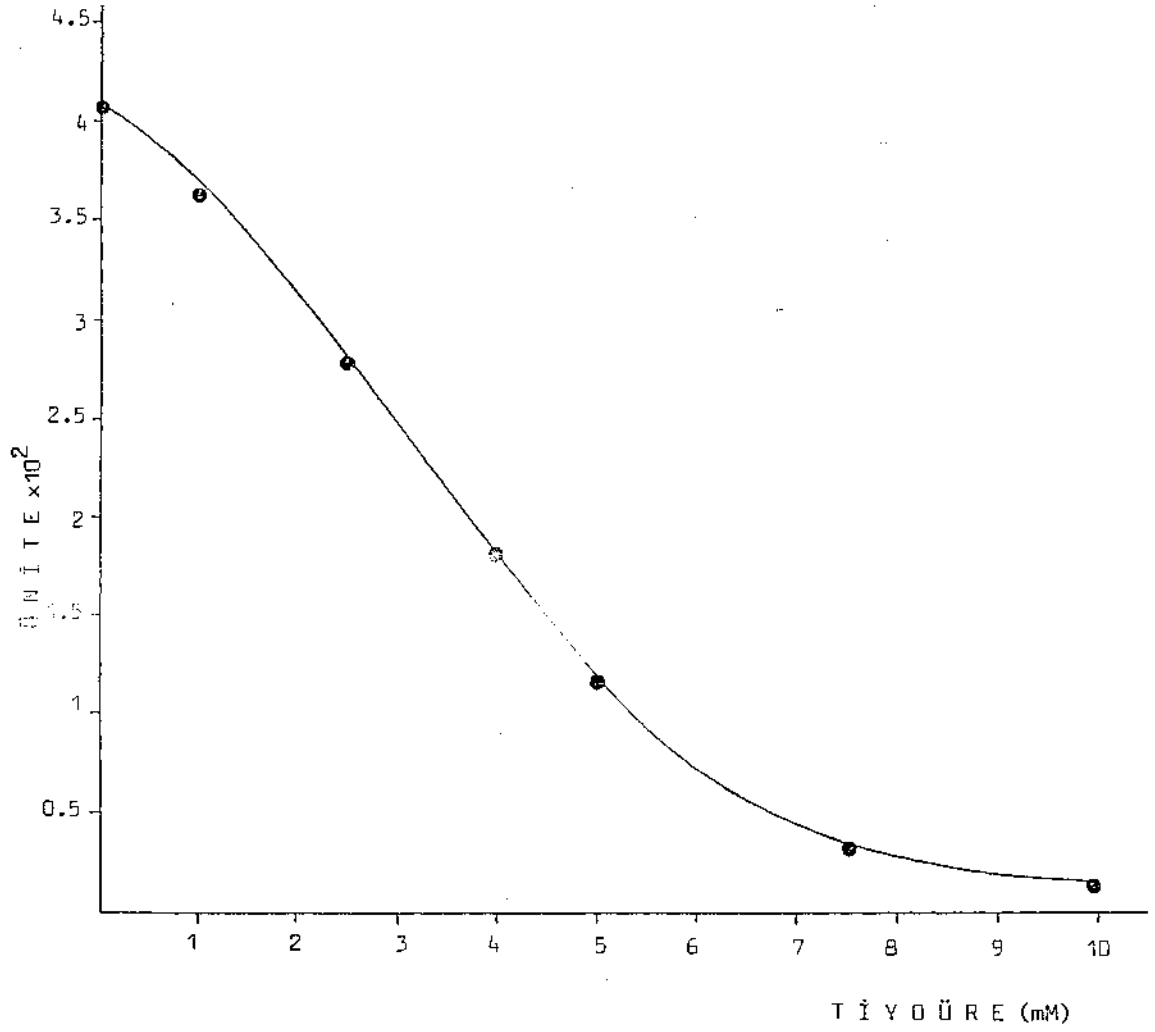


(üre)

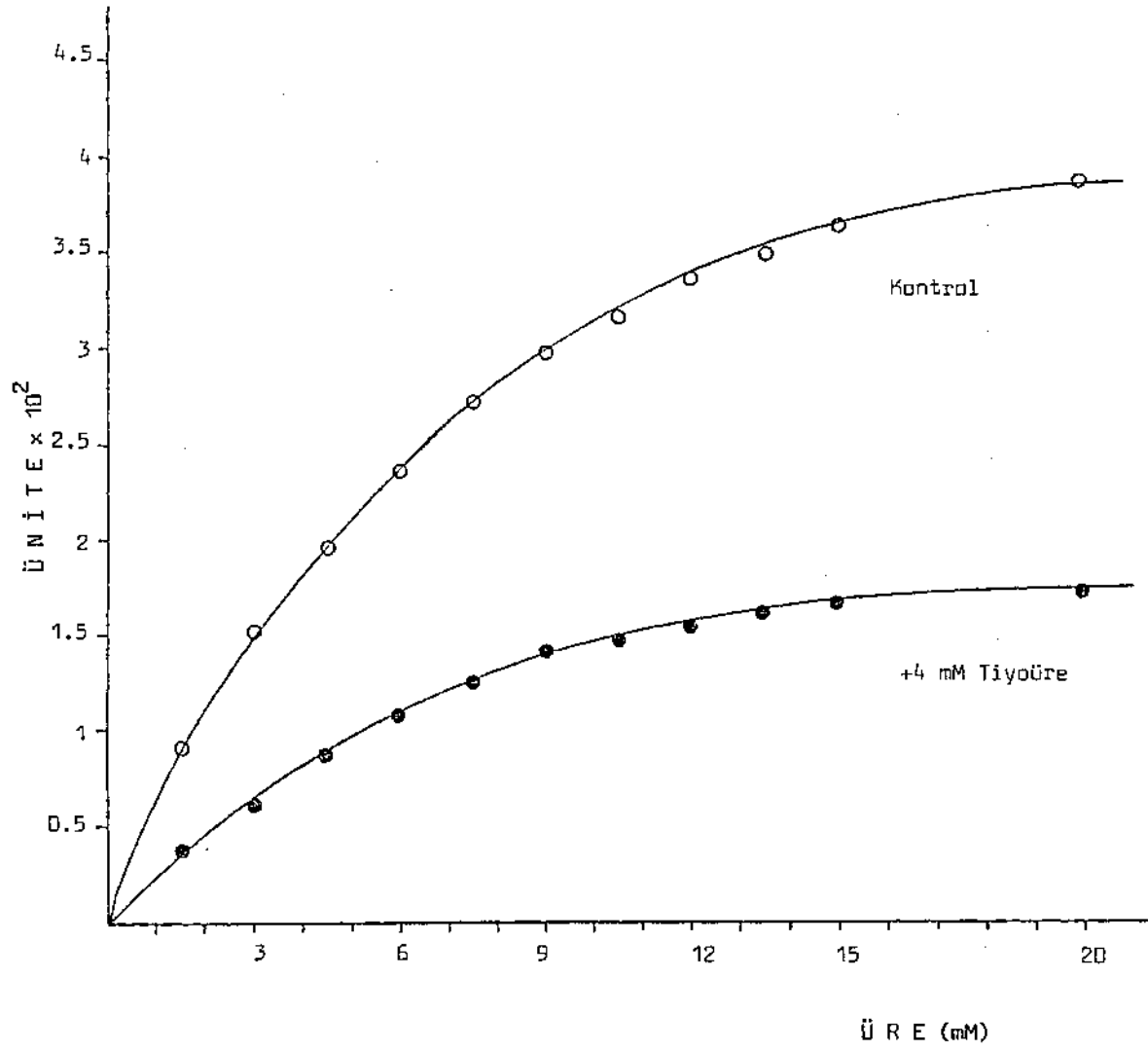


(tiyoüre)

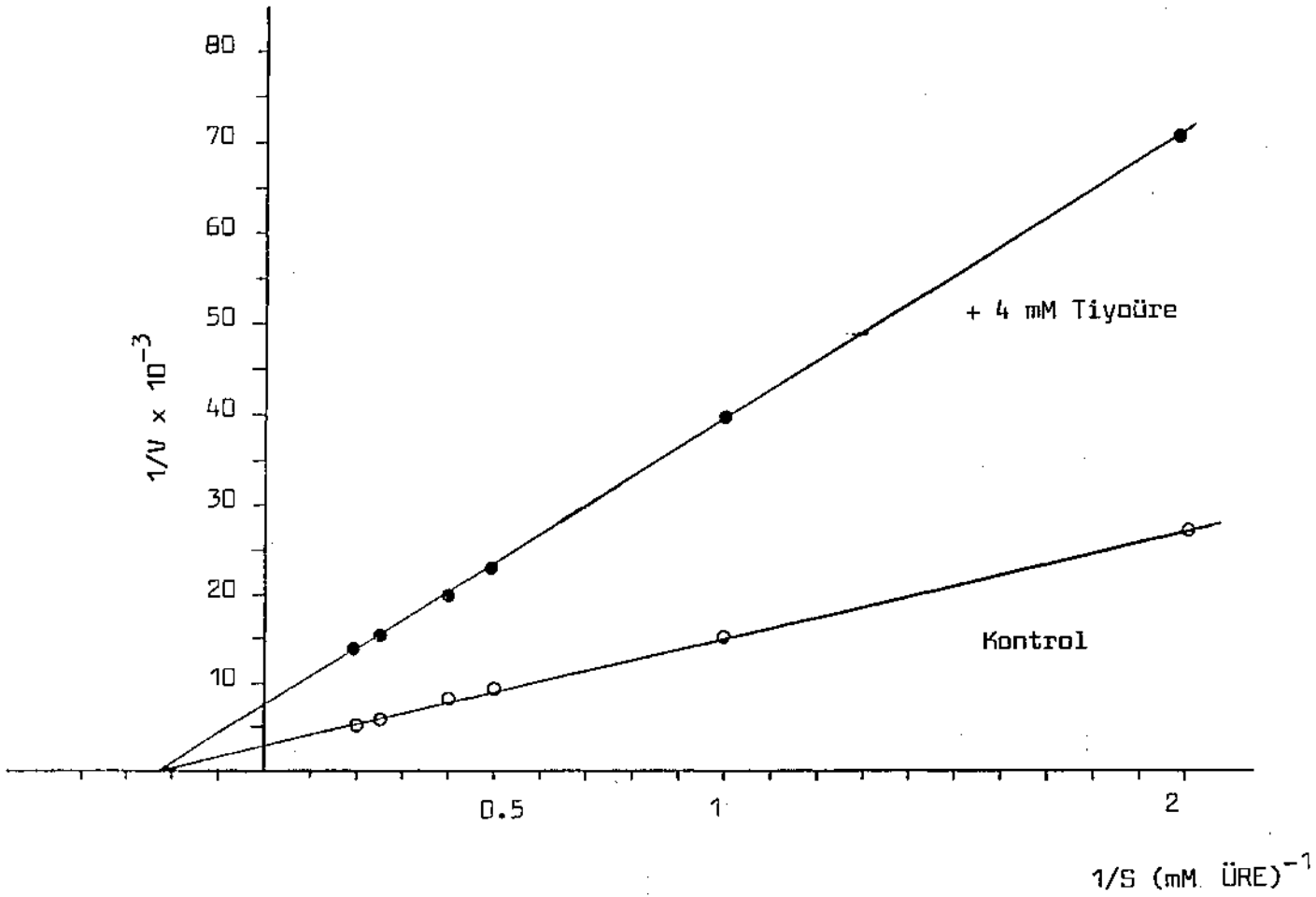
Kimyasal yapı olarak üreye çok benzeyen tiyoüre molekülü yukarıda gösterilmiştir.Tiyoüre, üre yerine substrat olarak kullanılmış ve alınan sonuçlarda enzimin tiyoüreye özgül olmadığı görülmüştür.İnkübasyon ortamına değişik konsantrasyonlarda tiyoüre ilave edildiğinde üreaz aktivitesinde belirgin bir düzeyde düşüş olduğu bulunmuştur.10 mM tiyoüre derişiminde maksimum inhibisyon görülmüştür(şekil 6).Tiyoürenin inhibisyon etkisinin araştırılması için 4 mM tiyoüre derişiminde ve farklı substrat yoğunluklarında enzim aktivitesi ölçülmüştür(şekil 7).Sonuçlar Lineweaver-Burk yöntemine göre değerlendirilmiştir.Tiyoürenin neden olduğu inhibisyonda üreazın üreye karşı olan V_{max} 'i değişmekte fakat K_m 'i değişmemektedir.Tiyoüre non-kompetatif inhibisyona neden olmuştur (şekil 8).



Şekil 6 :Tiyoürenin Kısmen Saflaştırılan Soya Fasülyesi Üreazının Akti-
vitesi Üzerine Etkisi.

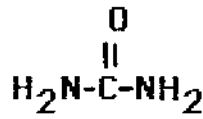


Şekil 7: Tiyoürenin Kısmen Safılaştırılan Soya Fasülgesi Üreazının Aktivitesine Değişik Substrat Yoğunluklarının Etkisi

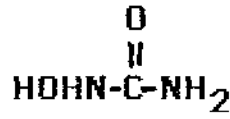


Şekil 8: Tiyoüre Varlığında Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.

III.6-Hidroksiürenin Hidrolizi



(Üre)



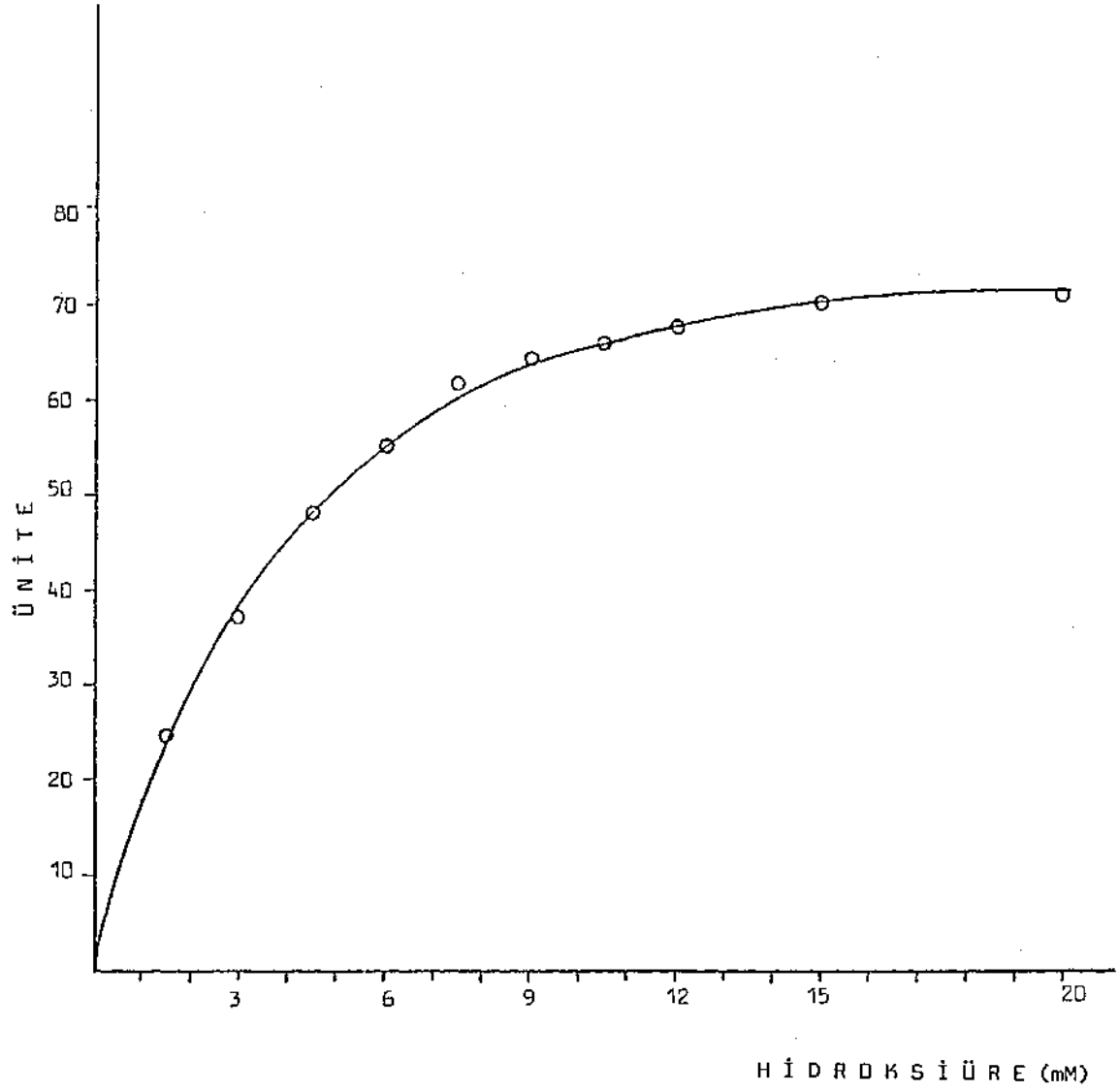
(Hidroksiüre)

Kimyasal yapı olarak üreye çok benzeyen diğer bir molekül ise hidroksiüre molekülüdür. Bu sebepten hidroksi üre, üre yerine substrat olarak kullanılmış ve alınan sonuçlarda enzimin hidroksiüreye 1/7 oranında düşük aktivite ile özgül olduğu görülmüştür. Hidroksiürenin farklı konsantrasyonlarında hidrolizi sonucu 67 Üniteye varan enzim aktivitesi bulunmuştur (şekil 9). Ancak inkübasyon ortamına hidroksiüre ilave edildiğinde enzim aktivitesinde düşüşler meydana gelmiştir. Hidroksiürenin neden olduğu inhibisyon araştırılmış, 8 mM hidroksiüre derişiminde ve farklı üre konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri ölçülmüştür (şekil 10).

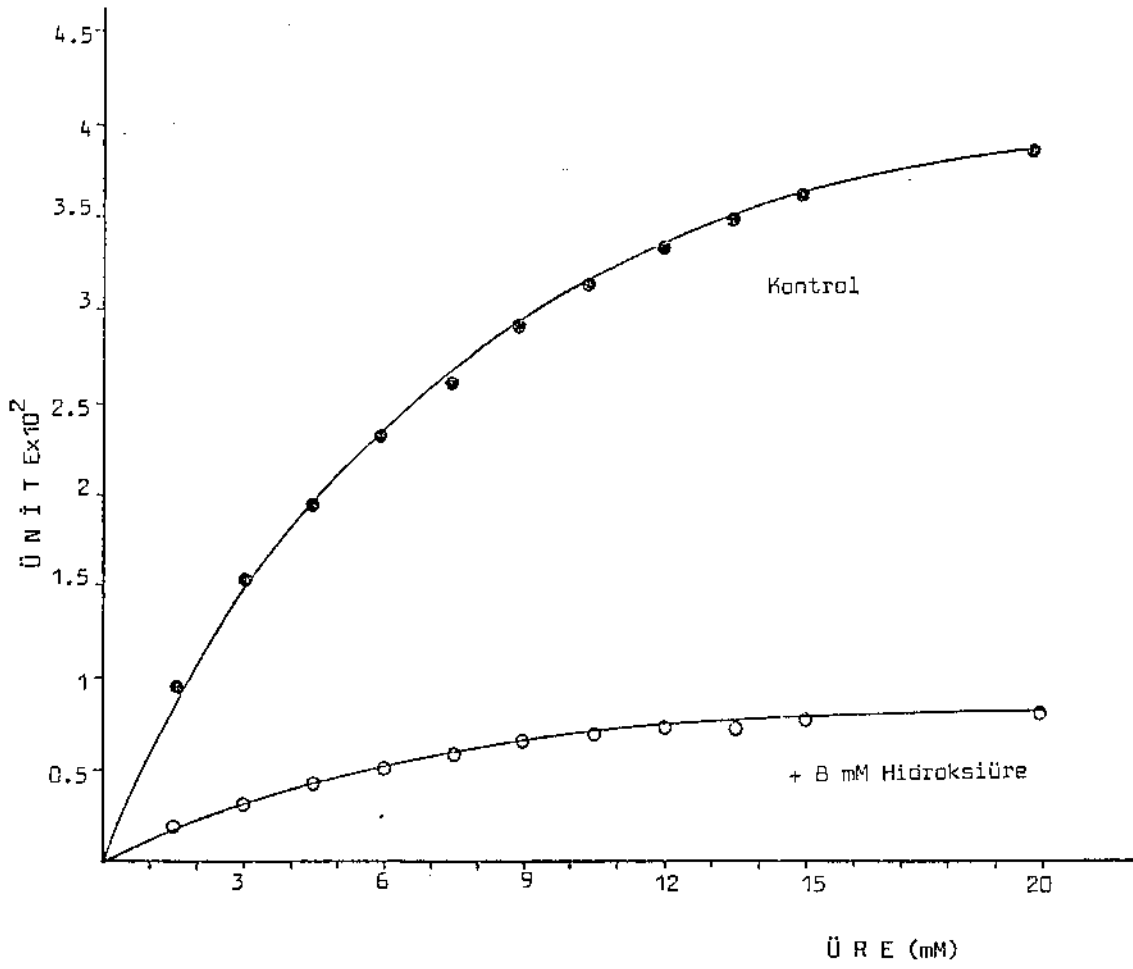
Sonuçlar Lineweaver Burk yöntemine göre değerlendirilmiştir. Aynı şekilde hidroksiürenin üreaz üzerindeki engelleyici etkisinin kinetik açıdan türü incelenmiş ve hidroksiüre de tiyoüre gibi non-kompetatif inhibisyona neden olmuştur (şekil 11).

III.7-Metal İyonlarının Etkisi

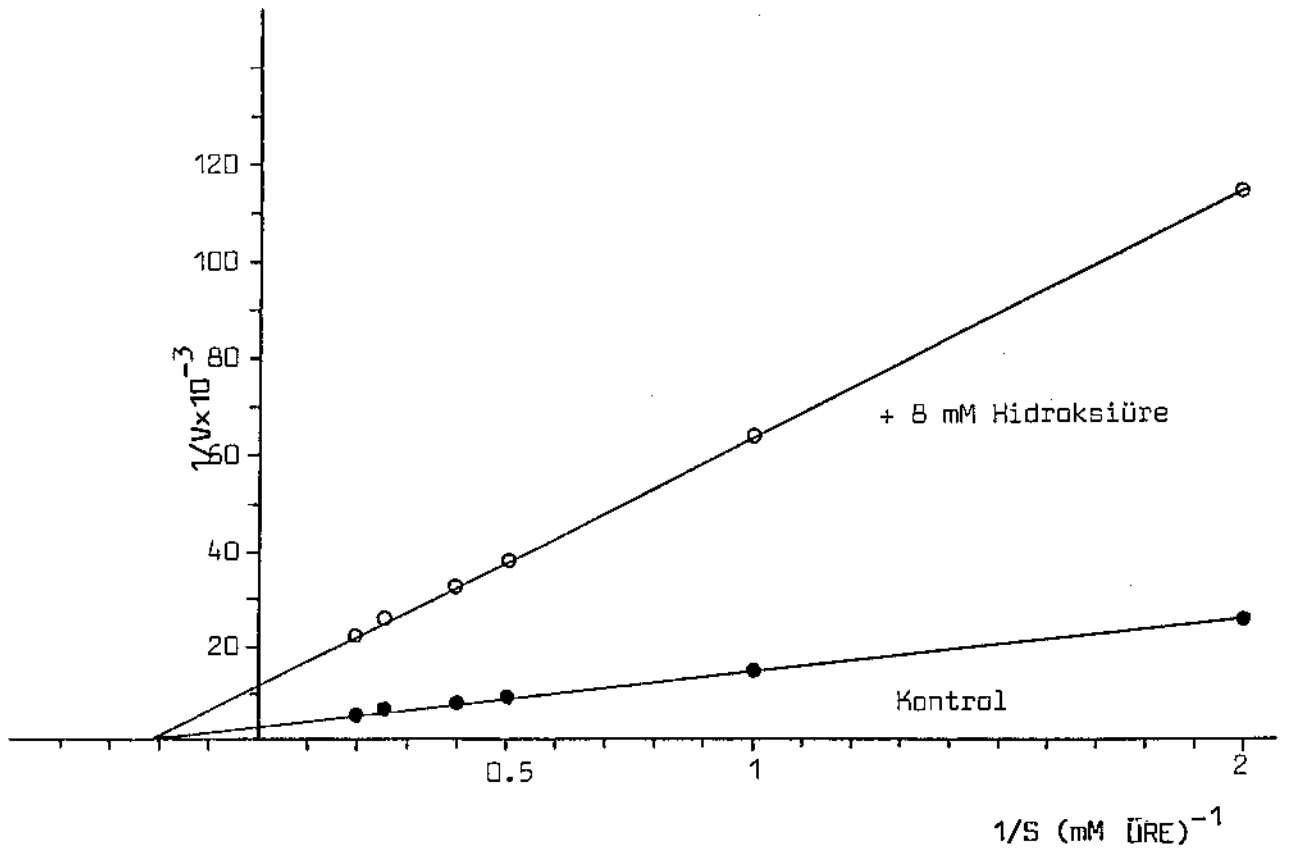
Metal iyonlarının Soya fasülyesinden kısmen saflaştırılan üreaz enzimi aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için inkübasyon ortamına 2 mM metal iyonu ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiş ve aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 9: Hidroksiürenin Kısmen Saflaştırılan Soya Fasülyesi Üreazı Tarafından Hidrolizi.



Şekil 10: Hidroksiürenin Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 11: Hidroksiüre Varlığında (8 mM) Soya Fasülgesinden Kısmen Saf-
laştırılan Üreaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluğuna Bağlı
Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendiril-
mesi.

	%Aktivite		%Aktivite
Kontrol	100.0	Co ⁺⁺	38.7
Ag ⁺	0.25	Mg ⁺⁺	41.5
Cu ⁺⁺	11.2	Zn ⁺⁺	49.3
Hg ⁺	20.5	Ni ⁺⁺	50.0
Fe ⁺⁺⁺	32.5	* Ni ⁺⁺	115.0
Mn ⁺⁺	33.0	Cr ⁺⁺	69.5
Ca ⁺⁺	34.0	Pb ⁺⁺	75.0
Ba ⁺⁺	35.0	Sn ⁺⁺	81.0
Cd ⁺⁺	37.0		

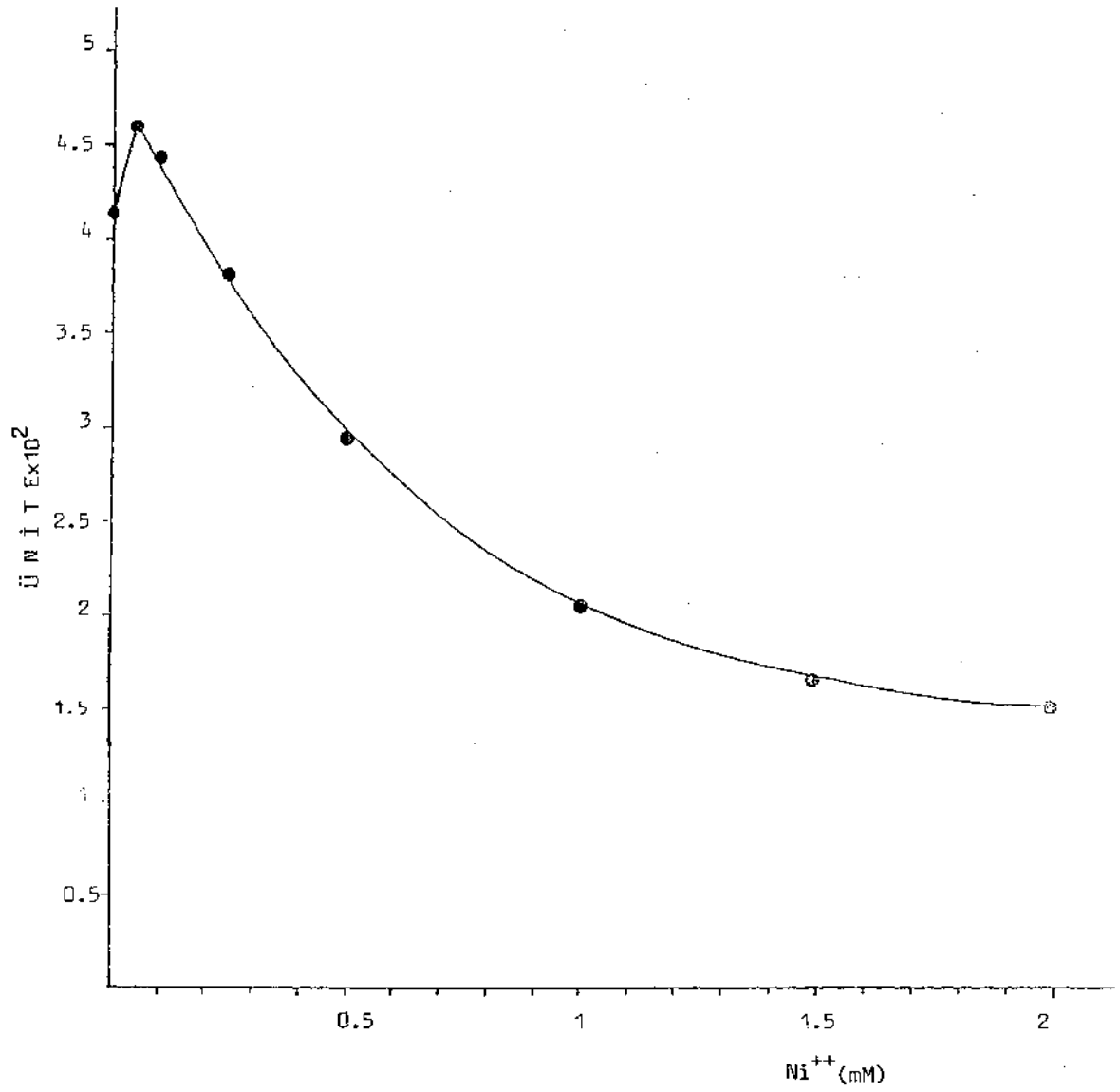
Tablo 3 : Metal iyonlarının Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

*Nikel konsantrasyonu 0.05 mM dir.

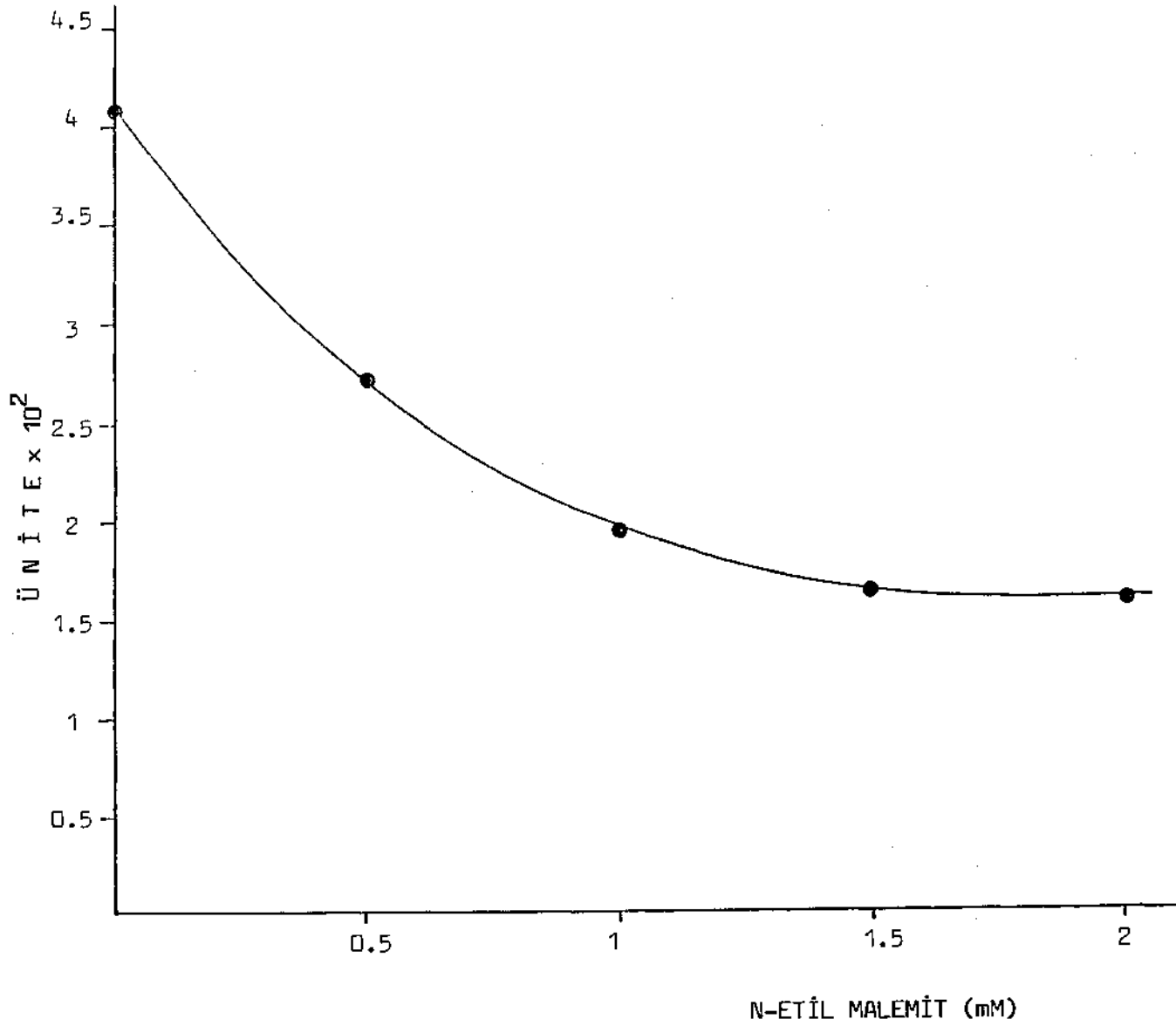
Bu konsantrasyonda çalıştığımız hiçbir metal iyonu üreaz aktivitesini arttırmamıştır. Kalay, kurşun, krom, nikel ve çinkonun inhibisyon etkileri gümüş, bakır, civa, demir, mangan, kalsiyum, baryum, kadmiyum, kobalt ve magnezyuma oranla daha düşük olduğu görülmüştür. Farklı nikel konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin düzeyi hesaplanmış ve 0.05 mM nikel konsantrasyonunda enzim aktivitesi %15 oranında artmıştır. 2 mM nikel konsantrasyonunda ise enzim aktivitesi %50 oranında azalmıştır (şekil 12).

III.8-Üreazın Fonksiyonel Sülfhidril Gruplarının Varlığının Gösterilmesi

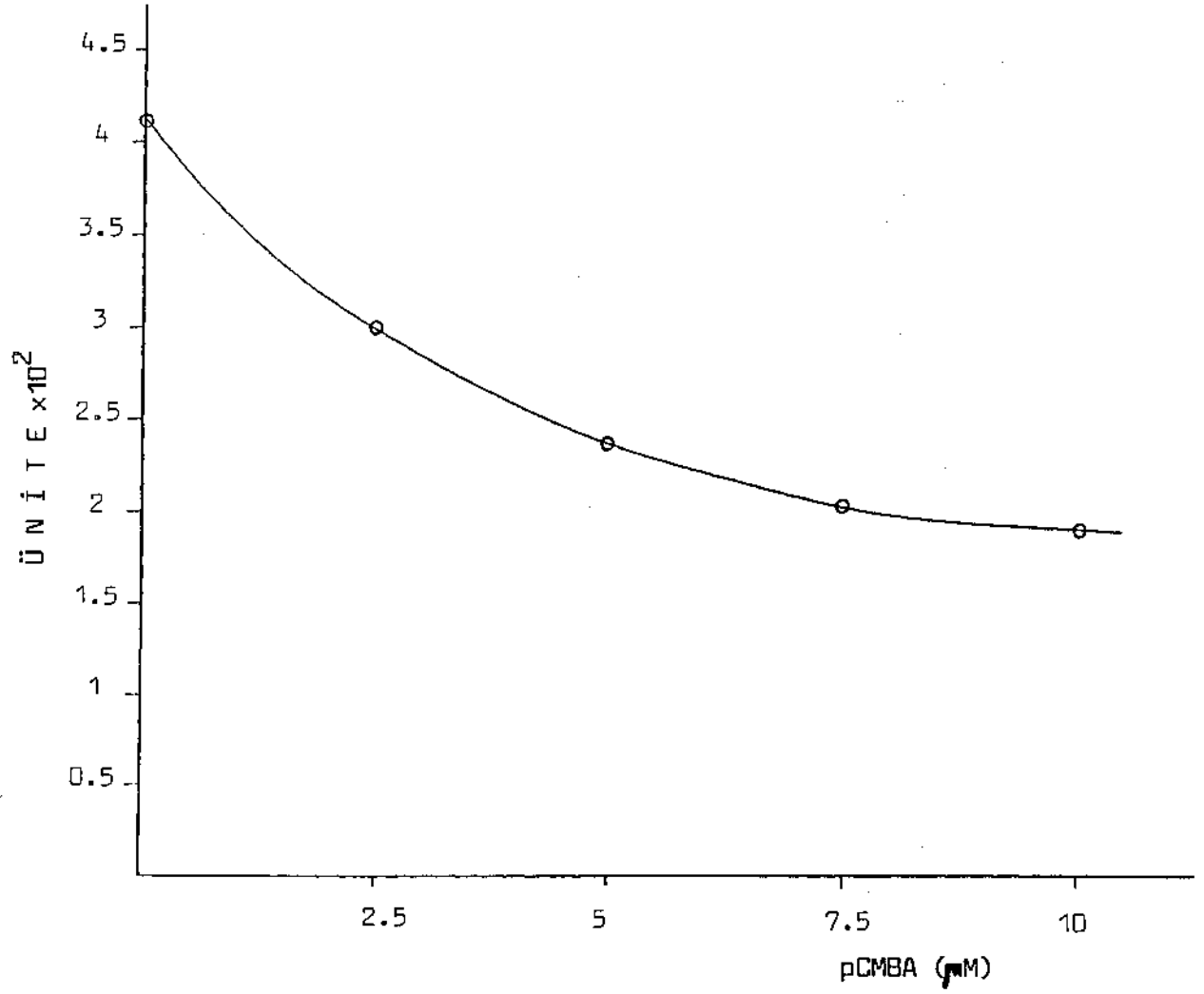
Soya fasülyesinden kısmen saflaştırılan üreaz enzimi üzerine N-etilmalemitin ve parakloromerküribenzoik asitin etkisi şekil 13 ve 14 'de görülmektedir. 2 mM N-etilmalemit konsantrasyonu enzim aktivitesini % 56 düşürürken, 10 µM parakloromerküribenzoik asit enzim aktivitesini %49 oranında düşürmektedir. Bu sonuç enzim yapısındaki serbest -SH gruplarının varlığını göstermektedir.



Şekil 12: Nikel İyonlarının Soya Fasülyesinden Kısmen Sıflaştırılan Üre-
azın Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 13:N-Etilmalemitin Soya Fasülyesinden Kısmen Safleştirilmiş Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 14: pCMBA'nın Soya Fasülyesinden Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisi.

III.9- Üreaz Safılaştırma Yönteminin Düzenlenmesi:

Önceki safılaştırma işleminden elde edilen üreaz kolay çözünmemekte ve safılaştırma yönteminin uzun olması nedeniyle maliyet yükselmektedir. Amacımız kolay çözünen, dayanıklı ve maliyet avantajı yüksek üreaz elde etmektir. Bundan dolayı üreazın kolay çözünen fraksiyonunu elde edene kadar safılaştırma yöntemi yeniden düzenlenmiştir. Buna göre;

- 1-Tamponda homojenizasyon
- 2-60 C⁰ de 1 saat ısıtma
- 3-Distile Suya Karşı Diyaliz
- 4-Liyofilizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Jackbean üreazının birinci diyaliz sonrası liyofilizasyon işlemine kadar kısmen safılaştırılması ile ilgili bulgular Tablo 3'de, Soya fasülyesinden üreazın birinci diyaliz sonrası liyofilizasyon işlemine kadar kısmen safılaştırılması ile ilgili bulgular ise Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3'de görüldüğü gibi, Jackbeandan %49.1 verimle başlangıçta özgül aktivitesi 1.071 Ünite/mgr. olan enzim kısmi safılaştırma sonucunda özgül aktivitesi 45.8 misli artırılarak 49.1 Ünite/mgr. kısmen saf üreaz elde edilmiştir.

Tablo 4'de ise, soya fasülyesinden %49.6 verimle başlangıçta özgül aktivitesi 0.59 Ünite/mgr. olan enzim kısmi safılaştırma sonucunda özgül aktivitesi 37.2 misli arttırılarak 22.05 Ünite/mgr. kısmen saf üreaz elde edilmiştir.

ÜNİTE: 1 μ mol Üreyi 37 C⁰ de ve dakikada parçalayan enzim aktivitesi olarak alınmıştır.

	Hacim(ml)	P R O T E İ N		E N Z İ M				G L U K O Z
		mgr/ml	Top.mgr	Ünite/ml	Top.Ünite	Verim	Özgül Akt. Ünite/mgr	mgr/100 ml
Tamponla Homojenizasyon	265	32.1	8506.5	34.4	9116	100	1.071	215.67
60 C ⁰ 'de 1 Saat Isıtma	207	18.2	3767.4	40.5	8383.5	92	2.225	217.77
Distile Suyu Karşı Diyaliz	47.5	13.7	650.7	107.2	5092.0	56	7.825	19.16
Liyofilizasyon	9.7	9.4	91.2	461.7	4478.7	49.1	49.10	2.80

Tablo 4:Jackbeanden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.

	Hacim	P R O T E İ N		E N Z İ M				G L U K O Z
		mgr/ml.	Top.mgr.	Ünite/ml	Top.Ünite	Verim	Özgöl Akt. Ünite/mgr.	mgr/100 ml.
Tamponla Homojenizasyon	280	31.2	8736	18.5	5180	100	0.593	85.71
60 C ⁰ 'de 1 Saat Isıtma	215	21.8	4687	22.1	4751.5	91.7	1.013	92.33
DistileSuya Karşı Diyaliz	43	17.3	743.9	70.3	3022.9	58	4.063	9.7
Liyofilizasyon	10.8	10.8	116.6	238.2	2572.5	49.7	22.05	1.7

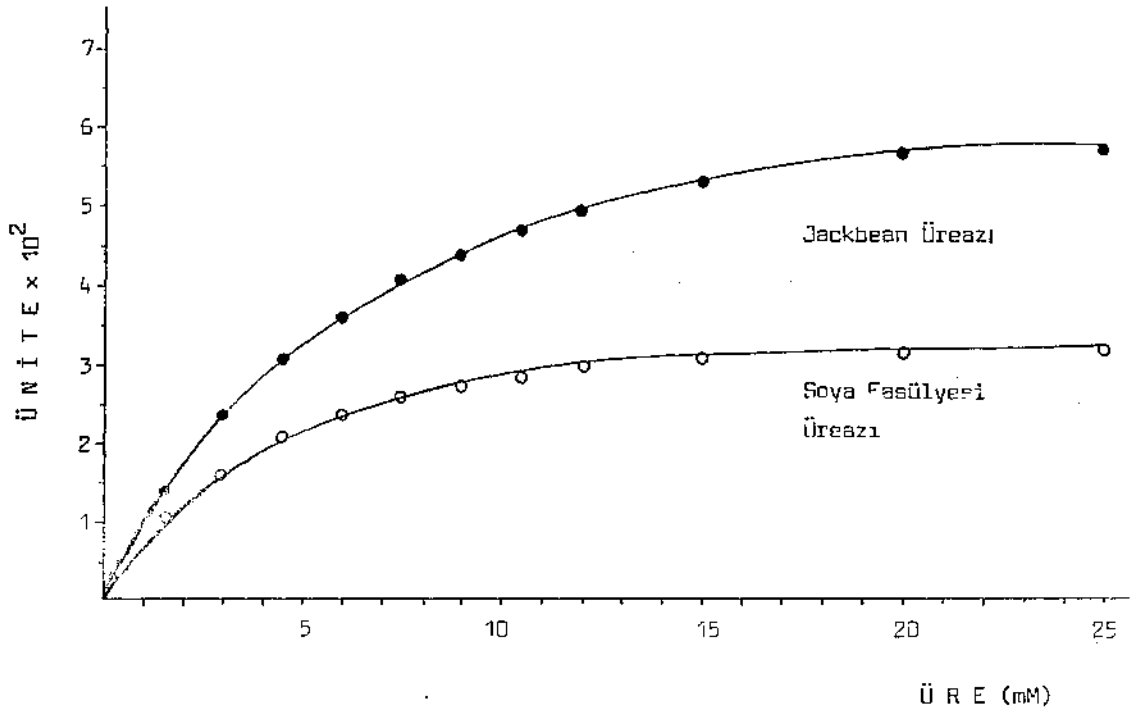
Tablo 5:Soya Fasülyesinden Üreazın Kısmen Saflaştırılması.

III.10-Substrat Satürasyonu

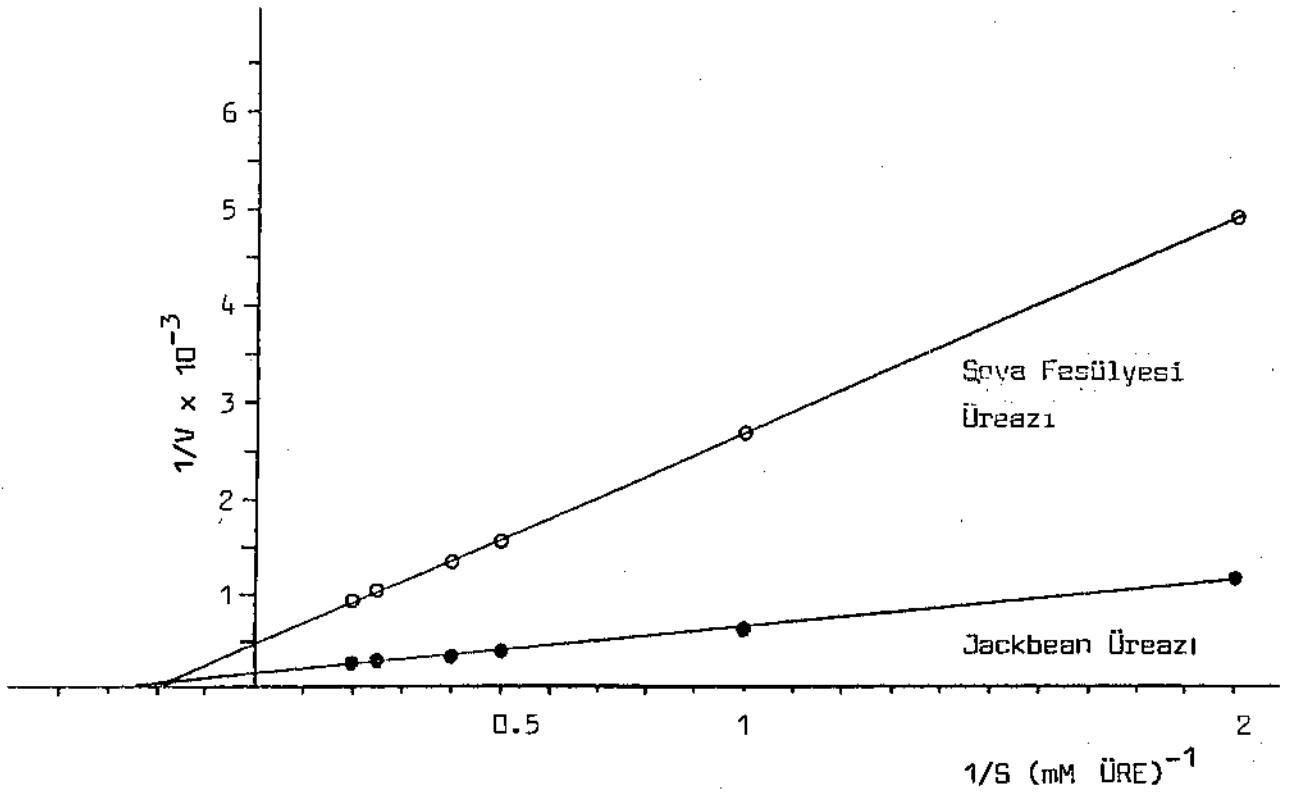
Farklı substrat yoğunluklarında,kısmen saflaştırılmış Jackbean veSoya fasülyesi üreazlarının aktivitelerine etkisi şekil 15'de gösterilmiştir.25 mM'a kadar değişen üre konsantrasyonlarında enzim aktivitesi 3 mM'a kadar doğrusal olarak gitmiş daha sonra doğrusallıktan sapmıştır. Enzim 20 mM üre konsantrasyonunda doyuma erişmiştir.Saflaştırılan her iki enzim Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır.Kısmen saflaştırılan enzimlerin üreye karşı olan Km'leri şekil 15'den faydalanılarak çizilen Lineweaver-Burk egrisinden hesaplanmıştır.Km değerleri daha önce saflaştırılan üreazların üreye karşı olan Km değerleri ile benzerlik göstermiştir(şekil16).

III.11-Enzim Derişiminin Etkisi

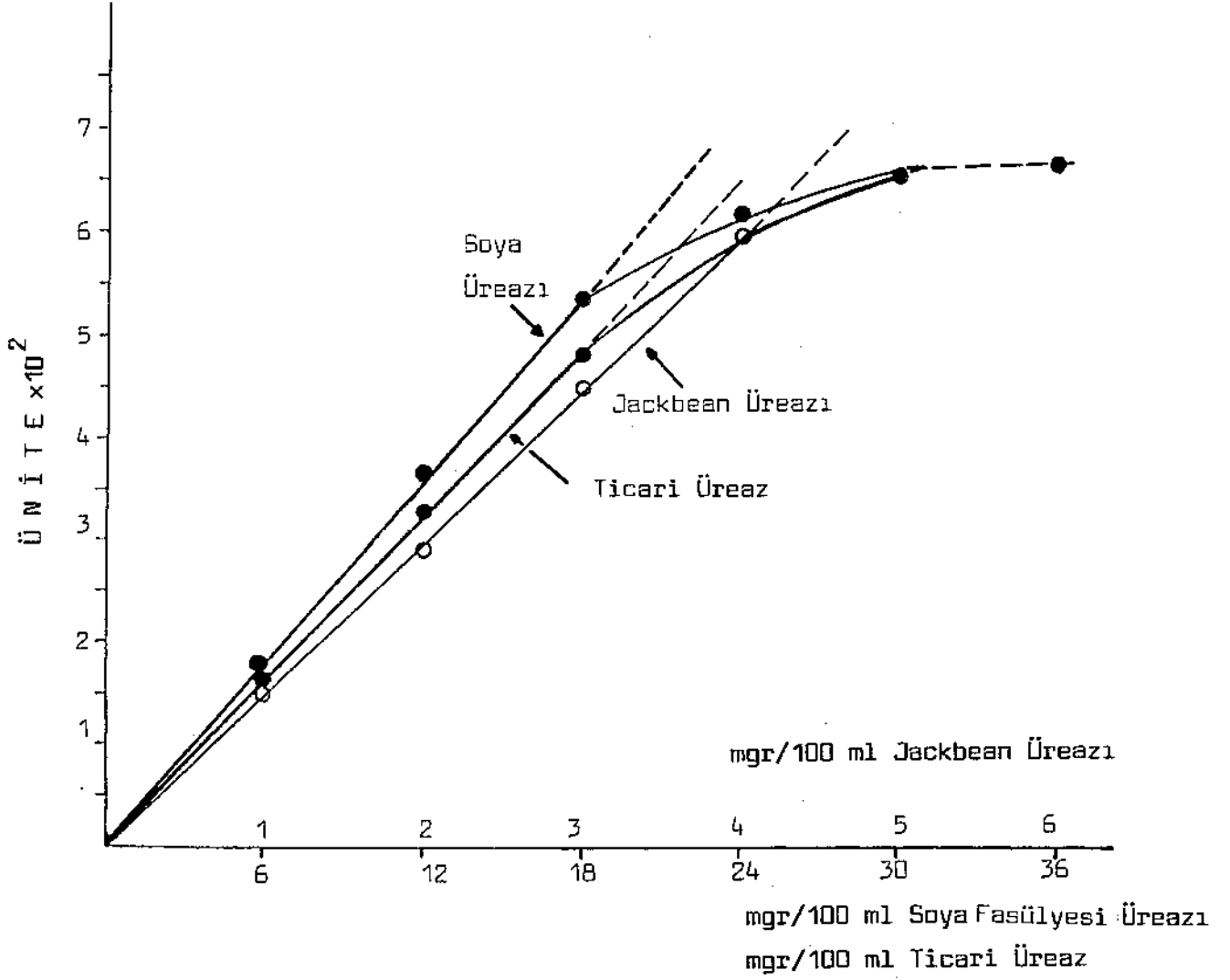
Ticari üreaz,Soya fasülyesi ve Jackbean üreazları belirli enzim derişimlerinde ,substrat konsantrasyonu sabit tutularak aktiviteleri hesaplanmıştır.Ticari üreaz ve Soya fasülyesi üreazı 18 mgr/100 ml. derişimine kadar doğrusal olarak artmış ancak bu derişimden sonra doğrusallıktan sapmıştır(şekil 17). 24 mgr/100 ml. derişimden sonra enzimatik ortamdaki aynı miktarda substratın parçalanması nedeniyle enzim aktivitesi aynı kalmıştır.Bu şartlarda kısmen saflaştırılan Jackbean üreazının,ticari üreaz ve Soya fasülyesi üreazına nazaran 6 kat daha saf olduğu görülmektedir.



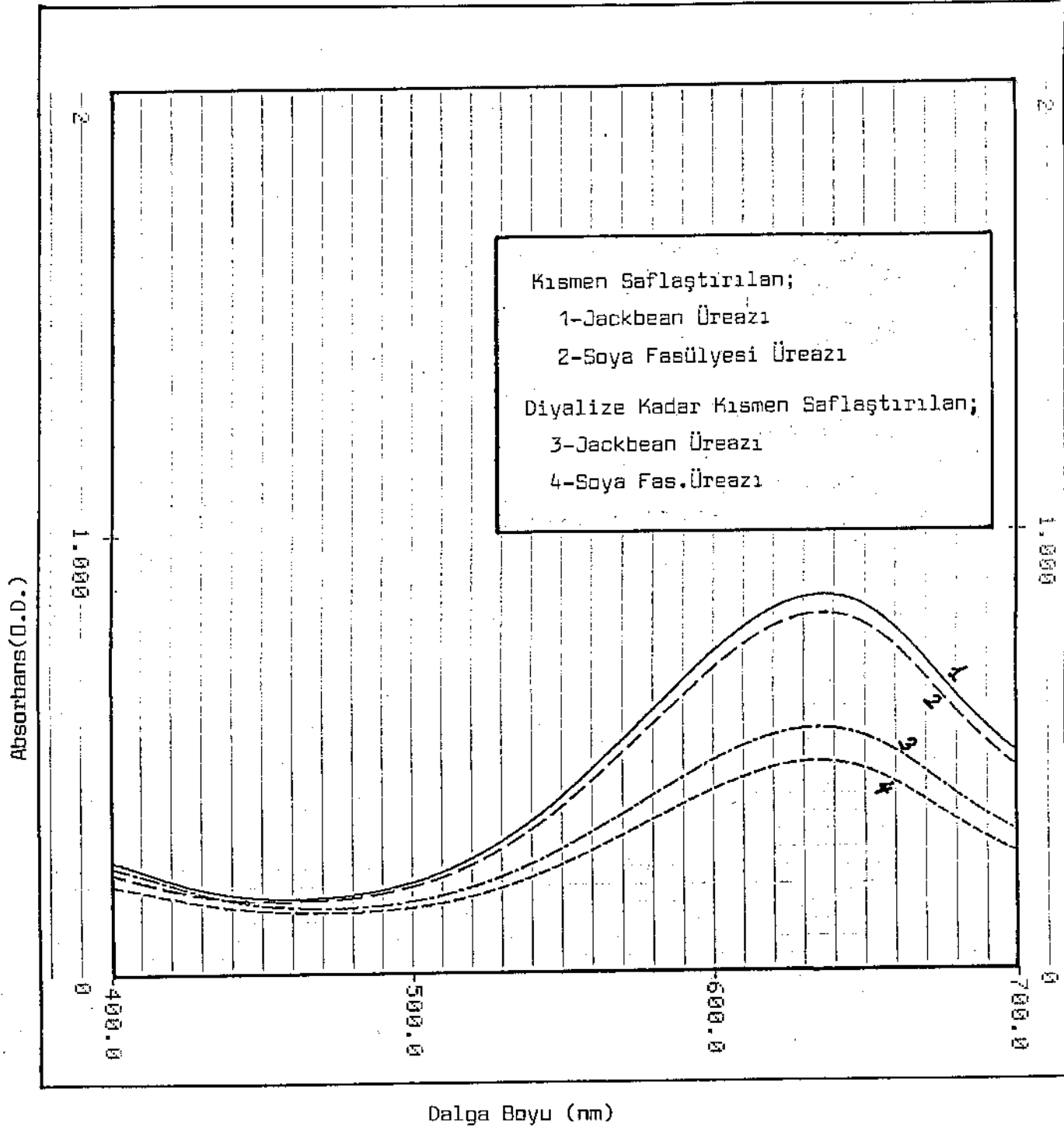
Şekil 15: İkinci Yöntemle Kısmen Saflaştırılan Jackbean ve Soya Fasülyesi Enzimleri Aktivitelerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Değişimi.



Şekil 16: Jackbean ve Soya Fasülyesinden İkinci Yöntemle Kısmen Safılaştırılan Üreaz Enzimlerinin Substrat Yoğunluğuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.



Şekil 17: Jackbean ,Soya Fasülyesi ve Ticari Üreaz Derişimlerinin Akti-
viteye Etkisi.



Şekil 18:Değişik Düzeylerde Safılaştırılan Üreazların Berthelot Reaksiyonu Sonucu Oluşturdukları Renklerin Spektrumları.

III.12-Kısmen Safılaştırılan Üreazlarının Berthelot Reaksiyonu Sonucu Oluşturdukları Ürünün Spektumu

Safılaştırılan üreazların Berthelot reaksiyonu sonucu oluşturdukları renklerin spektrumları şekil 18'de görölmektedir. Spektrumun en yüksek noktası 635 nm olarak bulunmuştur. Her fraksiyonun ve enzim kaynağının maksimum absorpsiyonu aynı dalga boyunda olmaktadır. Alınan spektrumlar; fraksiyonlar ve enzim kaynakları arasındaki farkların tamamen aktivitelerinden kaynaklandığını ortaya koymaktadır.

IV-TARTIşMA ve SONUÇLAR

Çalışmamızın ilk kısmında Elazığ ve Çevresinde yetiştirilen baklagil tohumları (Soyafasülyesi,bakla,mercimek,nohut,culbant,fig fasülye türleri,burçak,bezelye,yonca,korunga,kengel ve mısır) kahve değirmeninde un haline getirilmiş tamponla homojenizasyon,60 C⁰ de 1 Saat ısıtma ve liyofilizasyon kademesine kadar kısmi olarak saflaştırılmıştır.Saflaştırılan baklagillerde enzim aktivitesi ölçüldüğünde sadece soya fasülyesinde belirgin bir enzim aktivitesine raslanmıştır.Ticari olarak enzimin üretimi Jackbeanden yapıldığı için soya fasülyesine uygulanacak kısmi saflaştırma işlemine kontrol olarak Florida Üniversitesinden (U.S.A.) Jackbean getirilmiştir.

Çalışmamızın ikinci kısmında,enzimin kısmi olarak saflaştırılmasında en uygun saflaştırma tekniğı araştırılmıştır.Özellikle üreaz konusunda pH' nin etkisi önemli bulunmuştur.Enzimin uygun bir tamponda homojenize edilmesi gerektiğı distile su ile homojenizasyonunda 8-10 oranında enzim kaybının arttığı gözlenmiştir.Bundan dolayı homojenizasyon için en uygun olarak 2-Merkapto-etanol içeren 100 mM Tris-HCl(pH=7.6) tamponu kullanılmıştır.Diğer proteinleri uzaklaştırmak için enzim çözeltisi 60 C⁰de 1 saat bekletilmiştir.Proteinler amonyumsülfat ile doyurulmuş ve tampona karşı diyalize edilerek; enzimin kalitesini önemli oranda etkileyen glukoz ve diğer moleküller uzaklaştırılmıştır.Enzim solüsyonunun amonyumsülfat ile doyurulmasında ilave edilen miktar, nanoğramlar tarafından belirlenen miktarlar üzerinden yapılmıştır(54).

Glukozun yüksek miktarı 1.Diyalizle Jackbean için % 91.7 düşerken, Soya fasülyesi için % 93.2 oranında düşmüştür.

Enzimin kısmi olarak saflaştırılmasında diyalizden sonra Ca. P.jeli ile absorpsiyon işlemi uygulanmıştır.Enzimin absorpsiyonu için kuru ağırlıktaki fosfat jelinin 50 mg,diyalizattaki proteinin her 100 mg. yeterli olduğu bulunmuştur.Böylece diyalizatın iki hacmine karşılık,jelin bir hacmi uygun olarak kullanılmıştır(26).Üreazın Ca.P. Jeli ile yıkanması esnasındaki enzim kaybı en askeriye indirilmiştir.Ca.P. jelinin iyi karıştırılmamasında enzim kaybının arttığı gözlenmiştir.Üreaz enzim kaybı en fazla rekristalizasyon aşaması esnasında olduğu görülmüştür.Oda sıcaklığındaki asetonun ilavesi enzimin denatürasyonuna sebep olduğu bundan dolayı -10 C⁰'deki Asetonun devamlı karıştırılmak süreyle ve damla damla ilave edilmesi gerektiği anlaşılmıştır.

Her bir üreazın kısmi saflaştırma işlemi kesintisiz bir çalışma ile 2.5-3 hafta gerektirmiştir.Süre sonunda Jackbean'den % 34.4 verimle,başlangıçta özgül aktivitesi1.144 Ünite/mg. olan özgül aktivite 105 misli arttırılarak 120 Ünite/mg. olan kısmen saf enzim elde edilmiştir.

Soya fasülyesi üreazı % 26 verimle,başlangıçta özgül aktivitesi 0.558 Ünite/mg. olan özgül aktivitesi 134 misli arttırılarak 75 Ünite/mg. olan kısmen saf enzim elde edilmiştir.Enzim her türlü tıbbi kullanıma elverişli ve dayanıklı bulunmuştur.Saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri incelenmiştir.

Soya fasülyesi üreazının üreye karşı olan Km'i 4.35 mM Üre ve Jackbean üreazının üreye karşı olan Km'i ise 3.22 mM Üre olduğu saptanmıştır.

Blakeley ve arkadaşları ürenin Jackbean üreazı ile hidrolizini 38 C⁰ ve pH 7 de 0.5-50 mM arasında değişen üre konsantrasyonlarında inceledikleri zaman Km'i $3.28 \cdot 10^{-3}$ M olarak bulmuşlardır (23).

Çalışmalarımızda soya fasülyesi ve Jackbean üreazının optimal pH'sı 6.5 olarak saptanmıştır. Kullanılan tampon, çözeltiye göre değişmekle birlikte üreazın optimal pH'sının 6-8 arasında değiştiği bildirilmiştir(40). Fishbein ve Nagarajanın benzer yolla elde ettikleri üreaz pH 11.3 de tamamen denatüre olmaktadır(12). Bizim çalışmalarımız pH 3 ve 10.5 de enzimin hiç bir aktivite gösteremediğini ortaya koymuştur.

Lehninger üreazın optimal pH 6.4-6.9 olarak bildirmiştir(55). Aktivasyon enerjisi (Ea) ise 7.2 kcal/mol olarak bulmuştur (23).

Çalışmalarımızda optimal inkübasyon ısısı 37 C⁰ ve inkübasyon zamanı 15 dakika olarak bulunmuştur.

Jackbean üreazının bir tiol enzimi olduğu literatürlerde geçmektedir. Soya fasülyesinden kısmen saflaştırılan üreaz üzerinde yaptığımız çalışmalarda; 50 μ M pCMB $\approx$ 49 ve 10 mM N-etilmalemit $\approx$ 56 oranında enzimi inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.

Soya fasülyesinden kısmen saflaştırılan üreaz üzerine tiyoürenin(H₂NCSNH₂) etkisi incelenmiştir. Enzimatik ortama tiyoüre ilave edildiği zaman alınan sonuçlarda enzimin tiyoüreği parçalamadığı görülmüştür. 10 mM tiyoüre varlığında $\approx$ 96'ya yaklaşan bir inhibisyon görülmüştür. Tiyoürenin inhibisyon etkisi incelenmiş ve non-kompetatif olarak bulunmuştur. Tiyoüre varlığında enzimin Vmax'ı değişmekte fakat Km'i değişmemektedir.

Jackbean üreazı enziminin monohidroksiüre(H₂NCONHOH) ve dihidroksiüreye(HOHNCONHOH) özgün olduğu bazı literatürlerde geç-

mektedir.Bizim bu konuda soya fasülyesinden kısmen saflaştırılan üreaz üzerinde yaptığımız çalışmalarda hidroksiüreye çok az oranda özgün olduğu bulunmuştur.Üre yerine aynı şartlarda enzimetik ortama hidroksiüre ilave edildiğinde %84.5 düşüş görülmüştür.Hidroksiürenin etkisi non-kompetatif olarak bulunmuştur.

Metal iyonlarının enzimi inhibe ettiği bilinmektedir.Bu konuda yaptığımız çalışmamızda metal iyonlarının inhibisyon etkileri

Ag > Cu > Hg > Fe > Mn > Ca > Ba > Cd > Co > Mg > Zn > Ni > Cr > Pb > Sn sırasını takip ettiği bulunmuştur.Soya fasülyesi üzerine Ni^{++} iyonları etkisi araştırıldığında 0.05 mM Ni^{++} konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin % 15 arttığı görülmüştür.Enzim daha yüksek 2 mM Ni^{++} konsantrasyonunda aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. 0.05 mM nikel konsantrasyonlarında aktivitesinin artması,düşük nikelli topraklarda yetiştirilen ve Jackbeanden saflaştırılan üreazın yüksek aktivitesi ile ilgili olacağı fikrine varılmıştır(56,57).

Çalışmamızın diğer bir kısmında enzimin maliyet avantajını arttırmak ve ticari üreaz ile kıyaslayarak enzimin uygun şartlarda üretimini sağlamak amaçlanmıştır.Jackbean ve Soya fasülyesi üreazlarına tamponla homojenizasyon, 60 C⁰ de 1 saat ısıtma,Distile suya karşı diyaliz ve liyofilizasyon işlemleri tekniği ile kısmen saflaştırma uygulanmıştır.

Önceki saflaştırma işleminde diyaliz sonrası enzim aktivite ölçümünde körlerin renklendiği görülmüş ve buna tedbir olarak diyaliz süresi 48 saate çıkartılmıştır.Diyaliz +4 C⁰ de ve distile suya karşı yapılmış,distile su 6-8 saatde bir sürekli olarak değiştirilmiştir.Enzimin kalitesini önemli olarak etkileyen Glukoz, diyaliz sonunda Jackbean için % 91.2 ,Soya fasülyesi için ise % 89.5 oranında düşürülmüştür.Bu işleme paralel olarak Jackbean için

başlangıçta özgül aktivitesi 1.071 Ünite/mg. olan özgül aktivite % 49 verimle 45.8 misli arttırılmış 49.1 Ünite/mg. olan kısmen saflaştırılmış enzim elde edilmiştir.Soya fasülyesi için ise, başlangıçta özgül aktivitesi 0.59 Ünite/mg. olan özgül aktivite % 49.6 verimle 37.2 misli arttırılarak 22.05 Ünite/mg. olan kısmen saf üreaz elde edilmiştir.Enzim her türlü tıbbi kullanıma elverişli ve dayanıklı bulunmuştur.

Soya fasülyesi saflaştırma üreazının Jackbean saflaştırma üreazı ile paralel sonuçlar verdiği görülmüştür. Enzimin kinetik özellikleri incelendiğinde daha önce toplu saflaştırılan enzimlerin özellikleri (pH,Zaman ve Isı) ile benzer sonuçlar alındığı görülmüştür.Soya fasülyesinde elde edilen üreazın üreye karşı olan Km'i 4.35 mM Üre ve Jackbeandan elde edilen üreazın üreye karşı olan Km'i ise 3.22 mM Üre olarak bulunmuştur.Bu sonuçların daha önceki saflaştırılan üreazların Km değerleri ile benzer olduğu görülmüştür.

Kısmen saflaştırılan bu üreazlar suda ve EDTA tamponunda çözünür nitelikde bulunmuştur.Yapılan çalışmalarda suda çözünen üreaz standartının renk vermediği görülmüştür.Bundan dolayı enzimin EDTA tamponunda çözülmesi gerektiği anlaşılmıştır.

EDTA tamponunda çözülen üreazların etkisi serumda denenmiş ve ticari üreaz ile benzer sonuçlar alınmıştır.Ticari üreaz,Soya fasülyesi üreazı ve Jackbean üreazı enzim derişimi ve aktiviteleri göz önüne alındığı zaman rutin deneylerde 30 mg./100 ml kullanılan ticari üreaz ile saflaştırdığımız Jackbean üreazının gliserol içeren EDTA tamponunda çözünen 5 mg./100 ml'lik çözeltisi eşit sonuçlar

vermiş ve bu üreazın ticari üreaza göre 6 kat daha saf olduğu anlaşılmıştır.Bundan dolayı Jackbean, bölgemiz şartlarında yetiştirilmeye çalışılmaktadır.

Soya fasülyesinden üretilen Üreaz ise Ticari Üreaz ile eşdeğer miktarda yani 30 mg./100 ml kullanılması halinde eşit sonuçlar alındığı görülmüştür.Dolayısıyla Ticari olarak Jackbean'den üretilen ve döviz karşılığı sağlanan bugünkü fiyatı 152 500 TL olan Üreazın eşdeğer saflıkdaki liyofilizatını laboratuvarlarımızda Soya fasülyesinden elde edilmiştir.Aynı zamanda üretilen bu Üreaz tamponda tam olarak çözünmekte ve çözünmeyen partiküllerin tüplere dağılımından ileri gelen hatalar önlenmiş bulunmaktadır. Bu safhadaki Jackbean Üreaz ise 6 kat daha saf olarak görülmektedir.Elde edilen Jackbean Üreazı ve Soya fasülyesi Üreazı gliserol içeren EDTA tamponunda dayanıklı bulunmuştur.

30 mg./100 ml Soya fasülyesi Üreazı,Ticari Üreaz ve 5 mg./100ml Jackbean Üreazı eşit sonuçlar vermiş ve rutin laboratuvarlarda kullanılır nitelikte bulunmuştur.Son elde edilen enzimlerin maliyeti hesaplandığında 5000 TL civarında olduğu görülmüştür.

Kısmen saflaştırılan enzimlerin maliyeti,kullanılan demirbaş malzemeler,araçlar,su,elektrik ve emek hariç sadece sarf malzemeleri açısından yaklaşık olarak 20000 TL olarak hesaplanmıştır.Soya fasülyesinden saflaştırılan Üreaz ile aynı saflıktaki ticari Üreazın maliyeti(döviz karşılığı olarak) 40000 TL'nin,Jack beanden saflaştırılan Üreaz ile aynı aynı saflıktaki ticari Üreazın maliyeti(döviz karşılığı olarak)100 000 TL'nin üzerinde bulunmuştur(58).

Enzimin maliyetinin düşük ve saflığının yüksek olması Biyokimya Laboratuvarlarımızda uygulanan şekliyle üreaz gereksinimini karşılanabileceği anlaşılmıştır.Elde edilen üreaz Ticari üreazla kıyaslanamayacak derecede maliyet avantajı sağlamaktadır.

Çalışmamız, üreaz ve benzeri tıbbi preparatların ülkemizde de üretilebileceğini kanıtlaması açısından önem taşımaktadır.

V-KAYNAKLAR

- 1-J.C.Polacco,A.L.Thomas,P.J.Bledsoe, **"A Soybean Seed Urease-Null Produces Urease In Cell Culture"**, Plant Physiol.69,1233- 1240, 1982.
- 2-A.D.Larson,R.E.Kallio, **"Purification and Properties of Bacterial Urease"**, J.Bact.68,67-73,1954.
- 3-T.Gibson, **"An Investigation of the Bacillus Pasteuri Group II.Special Physiology of the Organisms"**, J.Bact.28,313- 322, 1934.
- 4- Tropical Legumes Resources for the Future,National Academy of Sciences,Washington,D.C.,54-59,1979.
- 5-C.C.Chin,G.Gorin, **"Some Observations on the Assay Method of Sumner"**,Analytical Biochemistry 17,60-65,1966.
- 6-G.Gorin,C.C.Chin, **"A New Method of Assay and Spesific Enzymic Activity"**,Analytical Biochemistry 17,49-59,1966.
- 7-K.Takishima,T.Suga,G.Mamiya, **"The Structure of Jack Bean Urease, The Complete Amino Acid Sequence,Limited Proteolysis and Reactive Cysteine Residues"** , Eur.J.Bidchem.175,151-165,1988.
- 8-G.Mamiya,K.Takishima,M.Masakuni,T.Kayumi,K.Ogawa,T.Sekita, **"Complete Amino Acid Sequence of Jack Bean Urease"**,Proc.Japan.Acad 61,ser.B ,1985.
- 9-N.E.Dixon,R.C.Blakeley,B.Zerner, **"Jackbean Urease(EC.3.5.1.5). I.A Simple Dry Ashing Procedure for the Microdetermination of Trace Metals in Proteins.The Nickel Content of Urease"**,Can. Journal of Biochem.,Vol:58,No:6,469-473,1980.

- 10-R.L.Blakeley,N.E.Dixon,B.Zerner, **"Jack Bean Urease"**,*Biochimica et Biophysica Acta.* 744,219-229,1983.
- 11-C.J.Bailey,D.Boulter, **"The Subunit Structure of Jack Bean Urease"**, *J.Biochem.*113,669-677,1969.
- 12-W.N.Fishbein,K.Nagarajan, **" Production of the Urease Half-Unit at Alkaline pH "**, *J.Biochem.*140,505-506,1972.
- 13-J.C.Polacco,R.B.Sparks,E.A.Havir, **"Soybean Urease-Potential Genetic Manipulation of Agronomic Importance"** ,Vol. 1,241-259, 1988.
- 14-A.T.Andrews,F.J.Reithel, **"The Thiol Groups of Jack Bean Urease"** , *Archives of Biochemistry and Biophysics* 141,538-546,1970.
- 15-R.Norris,K.Brocklehurst, **"A Convenient Method of Preparation of High-Activity Urease from Canavalia Ensiformis by Covalent Chromatography and an Investigation of its Thiol Groups with 2,2-Dipyridyl Disulphide as a Thiol Titrant and Reactivity Probe"** , *Biochem.J.* 159,245-257,1976.
- 16-F.J.Reithel,J.E.Robins,G.Gorin, **" A Structural Subunit Molecular Weight of Urease."** , *Archives of Biochemistry and Biophysics* 108, 409-413,1964.
- 17-J.C.Polacco,E.A.Havir, **" Comparions of Soybean Urease Isolated from Seed and Tissue Culture"** , *The Journal of Biological Chemistry*,Vol 254,No:5,1707-1715,1979.
- 18-Worthington Biochemical Corp.,**"Worthington Enzymes"** ,4-67,New Jersey,1971.
- 19-M.Dixon,E.C.Webb, **"Enzymes"** , Third Edition,Academic Press Inc., 263,566,New York,1979.

- 20-A.B.Saada,I.Kahane, **"Purification and Characterization of Urease from Ureaplasma Urealyticum"** , Zbl.Bakt.Hyg.A.269,160-167,1988.
- 21-G.Yücel,T.A.Aksu, **"Berthelot Reaksiyonu ile Kan Üre Azotu Ölçümünde Modifikasyonlar"** , Biyokimya Dergisi,VI(3).S:208-212,1981
- 22-T.A.Aksu,G.Yücel, **"Soya Fasüylesi Üreazının Ticari Üreaz ile Enzimatik Açidan Karşılaştırılması ve Uygulamadaki Yeri"** , Tıp Fak.Dergisi,Cilt 1,Sayı 1(Aynı Basım),S:19-22,1982.
- 23-R.L.Blakeley,E.C.Webb,B.Zerner, **"Jack Bean Urease(EC.3.5.1.5).A New Purification and Reliable Rate Assay"** , Biochem.1984-1990,1969.
- 24-A.I.Dounce, **"An Improved Method For Recrystallizing Urease"** , Letters to the Editors,307-308,1941.
- 25-G.Gorin,G.Mamiya, **"Urease V.Some Observations on the Procedure for its Isolation"** , Biochim.Biophys.Acta,105,380-382,1965.
- 26-K.Hanabusa, **"High-Yield Crystallization of Urease from Jack Bean"** , Nature,Vol.189,551-553,1961.
- 27-K.Hanabusa, **"Preparation of Urease Crystal from Jack Bean"** Nature,Vol 198,1078,1962.
- 28-R.M.Hill,A.Elliott, **"Properties of Urease Fractions Separated on CM-cellulose"** , Arrhives of Biochemistry and Biophysics 113,405-413,1966.
- 29-A.B.Saada,V.Deutsch,I.Kahane, **"Interaction of a monoclonal antibody with the urease of Ureaplasma Urealyticum"** , FEMS Microbiology Letters 55,187-190,1988.

- 30-K.R.Lynn, **"Some Properties and Purification of Urease"**, Biochim. Biophys.Acta. 146,205-218,1967.
- 31-J.C.Polacco,R.G.Winkler, **" Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme? "** Plant Physiol 74,800-803,1984.
- 32-H.M.Davies,L.M.Shih, **"Urease from Leaves of Glycine Max and Zea Mays" ,** Phytochemistry, Vol 23, No:12, 2741-2745 ,1984.
- 33-J.Carlsson, I.Olsson, R.Axen, H.Drewin,**"A new Method for the preparation of Jack-bean Urease Involving Covalent Chromatography"** Acta.Chem.Scand B30, No: 2 , 1976.
- 34-A.Aker,I.Temel,A.Atalay, **"Purification of Urease from Jack Bean and Investigation Its Kinetics"** , Marmara Medical Journal,Vol.1, No:3,15,1988.
- 35-N.S.Norkus,N.P.Kubasik, H.E.Sinc,**"Four Commercial Urease Reagents and a Laboratory-Prepared Reagent Compared for Analysis of Blood Urea Nitrogen with the Beckman Analyser"**,Clin.Chem. 22/5, 683-685 ,1976.
- 36-A.Kaplan, **"Determination of Urease Activity"** , Methods of Biochemical Analysis, Vol 17, 320-321.
- 37-J.R.Herrera,J.Gonzalez,**"A Continuous Method for the Measurement of Urease Activity"**Analytical Biochemistry 31,366- 374, 1969.
- 38-S.A.Katz, **"Direct Potentiometric Determination of Urease Activity"**Anal.Chem.36,2500-2501,1964.
- 39-Worthington Biochemical Corp.,**"Worthington Enzymes"** ,338-340, New Jersey,1988.

- 40-**P.S.Kerr, D.G.Blevins, B.J.Rapp, D.D.Randall, "Soybean Leaf Urease: Comparison With Seed Urease", Plant Physiol. 57:339-345,1983.**
- 41-**W.N.Fishbein, K.Nagarajan, "Urease Catalysis and Structure VII. Factors Involved in Urease Polymerization and its Kinetic Pattern",Archives of Biochemical and Biophysics 144,709-714,1971.**
- 42- **T.Inokuchi,M.Yamada,K.Nakamura,"Measurements of Urease Activity in Papal Hemolymph of Silkworm,Bambyx mori; Using ¹⁴C-Urea"Jap.J.Appl.Ent.Zool.28:43-48,1984.**
- 43-**R.J.Creno,R.E.Wenk,P.Bohlag,"Automated Micrommeasurement of Urea Using Urease and Berthelot Reaction" , A.J.C.P.,Vol. 54:826-832,1970.**
- 44-**B.W.Wilson,"Automatic Estimation of Urea Using Urease and Alkaline Phenol"Vol 12,No:6 ,360-368,1966.**
- 45-**The Wako Urea NB Test,"In Vitro Enzymatic Colorimetric Method for quantitative Determination of Urea Nitrogen in Serum and Plasma",1-6,1988.**
- 46-**J.F.Ambrose,G.B.Kistiakowsky,A.G.Kridl,"Inhibition of Urease by Silver Ions",Contribution from the Gibbs Chemical Laboratory,Harvard University,Cambridge Mass.Vol.73,1232-1236,1950.**
- 47-**M.E.Belding,F.Kern,"Inhibition of Urease by Oxytetracycline" , J.Lab.Clin.Med.,Vol.61,No:4,560-566,1963.**
- 48-**W.N.Fishbein,T.S.Winter,J.D.Davidson,"Urease Catalysis I.Stoichiometry,Spesificity and Kinetics of a Second Substrate:Hydroxyurea", The Journal of Biological Chemistry,Vol.240,No:6,2402-2406,1964.**

- 49-W.N.Fishbein,P.P.Carbone., **"Urease Catalysis II.Inhibition of the Enzyme by Hydroxyurea,Hydroxylamine and Asetohydroxamic Acid"** ,The Journal of Biological Chemistry,Vol.240,No:6,2407-2415, 1964.
- 50-W.N.Fishbein., **" Urease Catalysis III.Stoichometry,Kinetics and Inhibitory Properties of a Third Substrate:Di-hydroxyurea"**, The Journal of Biological Chemistry,Vol. 244,No:5,1188-1193,1969.
- 51-A.G.Gornal,C.J.Bardawill,M.M.David.,**"Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction"**, J.C.Biol. 177,751,1949.
- 52-O.H.Lowry,N.J.Rosenbrough,R.J.Randall.,**"Protein Measurement With the Folin Reagent"** , J.Biol.Chem. 193,265-275,1951.
- 53-M.D.Bauer,P.G.Ackermann,G.Toro., **"Clinical Laboratory Methods"** , The C.V.Mosby Company,472-487,Saint Louis,1974.
- 54-R.M.C.Dawson,D.C.Elliott,W.H.Elliott,K.M.Jones.,**"Data for Biochemical Research"** , Oxford University Press,475-505,1969.
- 55-A.L.Lehninger.,**"Principles of Biochemistry"** , The Johns Hopkins University,Worth Publishers,Inc.,208-244,1982.
- 56-D.A.Dalton,H.J.Evans,F.J.Hanus., **"Stimulation by Nickel of Soil Microbial Urease Activity and Urease and Hydrogenases Activities in Soybeans Grown in a Low-Nickel Soil"** , Plant and Soil 88, 245-258,1985.
- 57-Y.Watanabe,H.Sarumaru,N.Shimada.,**"Distribution of Urease in the Higher Plants"** , Tech.Bull. Fac. Hort. Chiba Univ. 32,37-43,1983.
- 58-Boehringer Mannheim., **"Biochemicals Catalogue"** , 306,West Germany,1987.

ÖZET:

Üreaz, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalar.

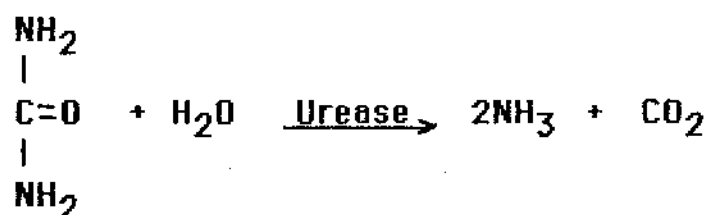


Üreaz, kandaki ürenin ölçümü için klinik biyokimya laboratuvarlarında uzun zamanlardan beri kullanılmaktadır. Kısmen saflaştırılmış ve ticari değeri olan üreaz tropikal bir bitki olan Jackbean' den(Canavalia ensiformis) elde edilmektedir. Bu nedenle kısmen saf olan Jackbean üreazı ithal edilmekte ve döviz harcanmasına sebep olmaktadır. Üreazın diğer bir dezavantajı da kolay çözünmemesi ve çözünmeyen partiküllerin spektrofotometrik ölçümlerde sorunlar ortaya çıkarmasıdır. Bu dezavantajları göz önüne alarak üreazı en azından kısmen, bölgemizde bol bulunan Soya fasülyesinden(Glycine max) saflaştırmaya karar verdik. Bu çalışmada üreazı, Soya fasülyesinden ve Jackbeandan kısmen saflaştırdık ve biyokimyasal özelliklerini inceledik.

Bu çalışmadaki amacımız, her ikiside oldukça iyi çözünen, kısmen saflaştırılmış Soya fasülyesi ve Jackbean üreazlarının biyokimyasal özelliklerini göstermektir.

SUMMARY:

Urease breakdown urea to ammonia and carbondioxide.



It has been used in the clinical biochemistry laboratories for a long time for the determination of urea in blood. The commercially available urease, which is partially purified, is obtained from a tropical plant, Jackbean (Canavalia ensiformis). Since the partially purified Jackbean urease is imported, it causes the spending of the foreign currency. Another disadvantage with urease is that, it does not dissolve readily, therefore in spectrophotometric measurements the problems arise due to the presence of undissolved particules. By taking these disadvantages into consideration, we decided to purify urease, at least partially from Soybean (Glycine max) which is found abundantly in our region. In this work we purified urease from Soybean and Jackbean partially, and elucidated their biochemical properties.

Our aim in this study is to show the biochemical properties of the partially purified Soybean and Jackbean ureases which are both quite dissolvable.

TEŞEKKÜR

Tezimin her safhasında yakın ilgi ve alakalarını esirgermeyen sayın hocam Prof.Dr.Şendoğan GÜLEN'e içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım ile yakından ilgilenen kürsümüz öğretim üyeleri, sayın Doç.Dr. Yüksel ÖZDEMİR ve sayın Doç.Dr. Sema OZAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

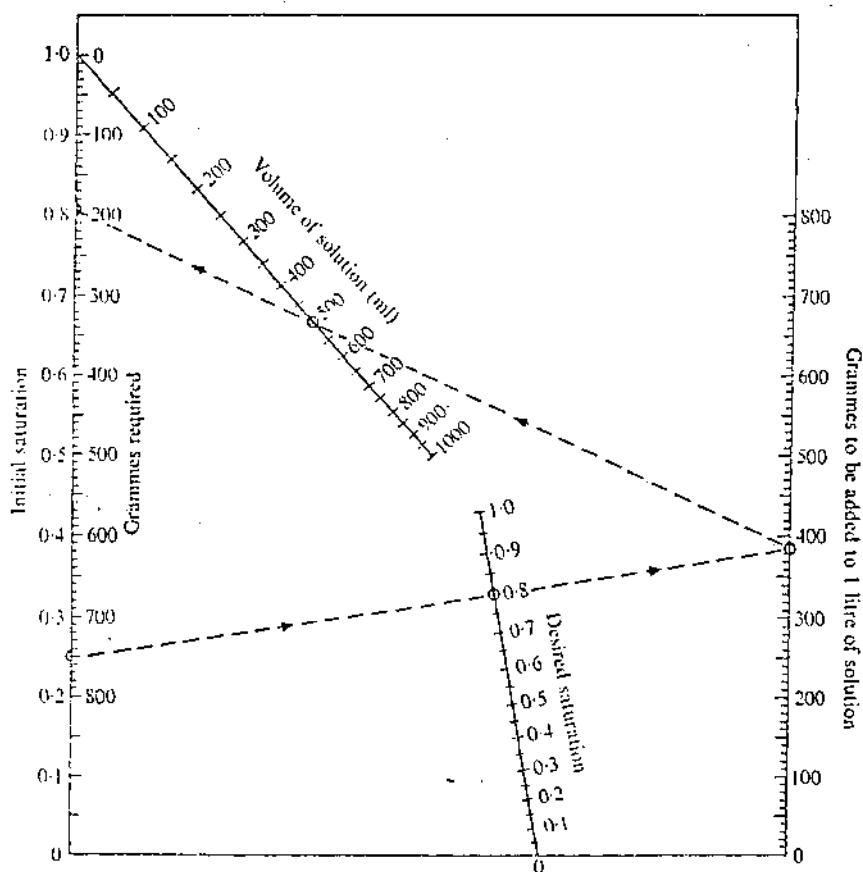
Elazığ 1965 doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1981-1982 öğretim yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümüne girdim. 1986 yılında mezun oldum. Bir süre Elazığ Şeker Fabrikasında çalıştıktan sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde Kimyager olarak çalışmaya başladım. 1987 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzman kadrosuna geçtim. Halen bu anabilim dalında görevime devam etmekteyim.

25. Preparation and Composition of Biochemical Reagents

1. REAGENTS USED IN PROTEIN FRACTIONATION

(a) AMMONIUM SULPHATE

Nomogram for ammonium sulphate additions



A straight line through the initial saturation and the desired saturation gives the amount of solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to be added to 1 l of the solution. A line from this point passing through the volume of the solution gives the amount required. All saturations are relative to full saturation at room temperature (760 g to 1 l of water).

From M. Dixon, *B.J.* 54, 457 (1953). Reproduced by kind permission of Professor M. Dixon, F.R.S., and the Biochemical Society.)