

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KAMERA İLE YENİ BİR KOLORİMETRİK ÜREAZ AKTİVİTE TAYİN
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

DOKTORA TEZİ

Hacer DOĞAN

EYLÜL 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KAMERA İLE YENİ BİR KOLORİMETRİK ÜREAZ AKTİVİTE TAYİN
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

Hacer DOĞAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 / 09 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 27 / 09 / 2024

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Kamera İle Yeni Bir Kolorimetrik Üreaz Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi Ve Uygulanması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır

Öncelikle çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen ve bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşılama için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin takibi süresince emeklerini esirgemeyen tez jüri üyeleri, Sayın Prof. Dr. Celal DURAN’a ve Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER’e teşekkür ederim.

Ayrıca bilimsel, enstrumantal ve kimyasal katkılarından dolayı Hitit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Öğretim Üyeleri Sayın Doç. Dr. Erol ALVER ve Sayın Doç. Dr. İbrahim BİLİCİ hocalarıma ve Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden görevli Öğr. Gör. Ömer KAYIR’a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında benden yardımını esirgemeyen Öğr. Gör. Melek KAYA’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmam boyunca bana anlayış gösteren ve destek veren canım aileme, araştırmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Hacer DOĞAN

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Kamera ile Yeni Bir Kolorimetrik Üreaz Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 27/09/2024

Hacer DOĞAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	2
1.2.1. Enzimlerin Yapısı	3
1.2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	5
1.2.3. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler	6
1.2.4. Enzim İnhibisyonu ve İnhibisyon Çeşitleri.....	8
1.3. Üreaz	12
1.3.1. Üreaz Enzimi ve Özellikleri	13
1.3.2. Üreaz Enziminin Moleküler Özellikleri	15
1.3.3. Enzimatik Tepkime Mekanizması Nikel İyonunun Rolü.....	15
1.3.4. Bitki Metabolizmasında Üreazların Rolü.....	17
1.3.5. Üreaz Enzimi İçin İnhibitörler	17
1.3.6. Üreaz Enzimi Kullanım Alanları.....	19
1.3.7. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri.....	20
1.4. Renk Analizi ile Biyoaktivite Çalışması	22
1.5. “Image J” Renk Ölçüm Programı.....	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	24
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	24
2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	25
2.4. Yöntemin Geliştirilmesi	25

2.5. Optimizasyon.....	28
2.6. Validasyon.....	41
2.7. Çeşitli Numunelerde Geliştirilen Yöntem ile Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
3.1. Enzim Derişimi.....	45
3.2. Substrat Derişimi.....	46
3.3. Fenol Kırmızıı Derişimi.....	46
3.4. AgNO ₃ Derişimi.....	47
3.5. pH- UV-Vis Absorbans Değerlendirmesi.....	48
3.6. Mikroplaka-Işık Kaynağı Etkisinin Değerlendirilmesi.....	49
3.7. Mikroplaka-Işık Kaynağı Arasındaki Mesafenin Değerlendirilmesi.....	52
3.8. Işık Kaynağının Parlalığının Değerlendirilmesi.....	54
3.9. Mikroplaka-Kamera Arasındaki Mesafenin Değerlendirilmesi.....	57
3.10. Reaksiyon Sıcaklığının Değerlendirilmesi.....	59
3.11. Mikroplaka Tipinin Etkisinin Değerlendirilmesi.....	60
3.12. Ortam Işığının Etkisinin Değerlendirilmesi.....	61
3.13. Farklı Reaksiyon Kaplarında Ölçüm Alınması.....	63
3.14. LOD- Limit of Detection (Tespit Limiti) – LOQ- Limit of Quantification (Tayin Limiti).....	64
3.15. Tekrarlanabilirlik.....	65
3.16. Günlerearası Tekrarlanabilirlik.....	66
3.17. Sağlamlık.....	67
3.18. Gerçek Örnek Uygulamaları.....	68
4. SONUÇLAR.....	70
5. ÖNERİLER.....	75
6. KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİş	

Doktora Tezi

ÖZET

KAMERA İLE YENİ BİR KOLORİMETRİK ÜREAZ AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

Hacer DOĞAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2024, 79 Sayfa

Sentetik ve doğal bileşiklerin ve karışımların biyoaktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan yöntemler, onların çeşitli amaçlarla kullanılabilirliğinin araştırılmasında önemli araçlardır. Günümüzde antioksidan ve enzim inhibisyonu gibi birçok biyoaktivitenin belirlenmesinde yeni yaklaşımlarla yöntemler geliştirilmiş ve uygulanmaktadır. Spektrofotometrik ölçüm yöntemlerini pratikleştirmek amacıyla spektrofotometre cihazı ihtiyaç olmadan yeni kolorimetrik yaklaşımlar geliştirilmekte ve uygulanmaktadır.

Bu doktora tezinde de literatürde var olan fenol kırmızısı kullanımı yaklaşımına dayalı yeni bir kolorimetrik üreaz aktivite tayin yöntemi geliştirilmiş, validasyonu ve inhibisyon ölçümü amacıyla doğal ve sentetik numunelere uygulanması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem mikrolaka, ışık parlaklığı, sıcaklık, mikrolaka-kamera arası mesafe gibi parametreler açısından optimize edilmiş, yöntemin validasyonu yapılmıştır. Valide edilmiş yöntemde ideal ortam ve şartları 25°C’de kutu içerisinde, ışık kaynağı 0 cm’de ve parlaklığı %60, mikrolaka-kamera uzaklığı 25 cm ve düz dipli mikrolaka kullanılması olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yeni kolorimetrik yöntemle yeşil çay ekstraktı ve 2 adet sentetik bileşiğin %inhibisyon değerleri spektrofotometrik yöntemle kıyaslamalı olarak başarılı bir şekilde belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktivite, Kamera, Üreaz İnhibisyonu, Kolorimetrik Yöntem, Image J programı

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A NEW COLORIMETRIC UREASE ACTIVITY DETERMINATION METHOD USING CAMERA

Hacer DOĞAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2024, 79 Pages

The methods used to measure the bioactivities of synthetic and natural compounds and mixtures are important tools in investigating their usability for various purposes. Today, new approaches and methods have been developed and applied in determining many bioactivities such as antioxidants and enzyme inhibition. In order to make spectrophotometric measurement methods practical, new colorimetric approaches that eliminate the need for a spectrophotometer device are being developed and applied.

In this doctoral thesis, a new colorimetric urease activity determination method based on an approach existing in the literature with the use of phenol red has been developed, its validation and application to natural and synthetic samples for the purpose of inhibition measurement have been carried out. The developed method has been optimized in terms of parameters such as plate, light brightness, temperature, plate-camera distance, and the method has been validated. In the validated method, the ideal environment and conditions have been determined as 25°C in a box, light source at 0 cm and brightness at 60%, plate-camera distance at 25 cm and using a flat bottom plate. With the newly developed colorimetric method, the % inhibition values of green tea extract and 2 synthetic compounds were successfully determined in comparison with the spectrophotometric method.

Key Words: Bioactivity, Camera, Urease Inhibition, Colorimetric Method, Image J
Software

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Enzim substrat ilişkisi ve substrat – ürün dönüşümü.....	3
Şekil 2. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat derişiminin etkisi	7
Şekil 3. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon	9
Şekil 4. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk grafiğı	10
Şekil 5. Yarışmasız (unkompetitif) inhibisyon	11
Şekil 6. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik bir reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi.....	11
Şekil 7. Yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyon	12
Şekil 8. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi.....	12
Şekil 9. Üreaz kristallerinin ilk fotomikrografi.....	13
Şekil 10. Üreazın kataliz reaksiyonu	14
Şekil 11. Üreazın yapısal alt birimleri	15
Şekil 12. Bitkilerdeki üre metabolizması.....	16
Şekil 13. Nessler yöntemi reaksiyon mekanizması.....	20
Şekil 14. İndofenol oluşum mekanizması.....	21
Şekil 15. Çift enzim yöntemi reaksiyon mekanizması.....	21
Şekil 16. Image J programının göstergesi.....	23
Şekil 17. pH'ya bağı renk değışiminin mikrolplakadaki görüntüsü	28
Şekil 18. Kutu içerisinde görüntü	29
Şekil 19. Kağıt üstü görüntü	29
Şekil 20. Tablet üstü görüntü	29
Şekil 21. Işık kaynağı ile taban arası 0 cm iken mikrolplaka görüntüsü	30
Şekil 22. Işık kaynağı ile taban arası 2 cm iken mikrolplaka görüntüsü	31
Şekil 23. Işık kaynağı ile taban arası 6 cm iken mikrolplaka görüntüsü	31
Şekil 24. Kamera 15 cm yukarıda iken mikrolplaka görüntüsü.....	32
Şekil 25. Kamera 20 cm yukarıda iken mikrolplaka görüntüsü.....	32
Şekil 26. Kamera 25 cm yukarıda iken mikrolplaka görüntüsü.....	33
Şekil 27. Işık kaynağının parlaklığı %60.....	33
Şekil 28. Işık kaynağının parlaklığı %80.....	34

Şekil 29.	Işık kaynağının parlaklığı %100	34
Şekil 30.	Farklı enzim derişimleri.....	35
Şekil 31.	Farklı substrat derişimleri	36
Şekil 32.	Reaksiyon sıcaklığı (25, 35 ve 45 °C)	37
Şekil 33.	Düz dipli mikrolaka görüntüsü	37
Şekil 34.	Yuvarlak dipli mikrolaka görüntüsü.....	37
Şekil 35.	Perde açık iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü.....	38
Şekil 36.	Perde kapalı iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü.....	39
Şekil 37.	Kutu içerisinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü	39
Şekil 38.	Oda koşullarında kağıt üzerinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü	39
Şekil 39.	Oda koşullarında tablet üzerinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü	39
Şekil 40.	Farklı borik asit derişimlerinin ependorf içerisinde görüntüsü.....	40
Şekil 41.	Farklı borik asit derişimlerinin UV küvet içerisinde görüntüsü	40
Şekil 42.	0,15 mM borik asit tekrarlı çalışması	41
Şekil 43.	0,15 mM borik asit mikrolaka tekrarlanabilirlik çalışması.....	42
Şekil 44.	0,15 mM borik asit ependorf tekrarlanabilirlik çalışması.....	42
Şekil 45.	0,15 mM borik asit küvet tekrarlanabilirlik çalışması	42
Şekil 46.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik 1. gün çalışması.....	42
Şekil 47.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik 2. gün çalışması.....	42
Şekil 48.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik 3. gün çalışması.....	43
Şekil 49.	Sağlamlık 25°C çalışması	43
Şekil 50.	Sağlamlık 26°C çalışması	43
Şekil 51.	Sağlamlık 27°C çalışması	43
Şekil 52.	Farklı enzim derişi grafiğı	45
Şekil 53.	Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi - absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı.....	46
Şekil 54.	Farklı derişimlerde fenol kırmızısı için absorbans-süre grafiğı.....	47
Şekil 55.	Farklı derişimlerde ilave edilen AgNO ₃ -süre grafiğı.....	47
Şekil 56.	pH- UV-Vis absorbans değışimi grafiğı	48
Şekil 57.	pH- Image J mean (Yeşil) değışimi grafiğı	48
Şekil 58.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	49
Şekil 59.	Mavi renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	50

Şekil 60.	(R+G+B)/3 renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	50
Şekil 61.	Yeşil renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	51
Şekil 62.	Mavi renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	51
Şekil 63.	(R+G+B)/3 renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	52
Şekil 64.	Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	52
Şekil 65.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	53
Şekil 66.	Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	53
Şekil 67.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	53
Şekil 68.	Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişim- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı (Mikroplaka - ışık kaynağı arasındaki mesafe).....	54
Şekil 69.	Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişim için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	55
Şekil 70.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	55
Şekil 71.	Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	55
Şekil 72.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	56
Şekil 73.	Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı (Işık kaynağının parlaklığı).....	56
Şekil 74.	Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	57
Şekil 75.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	57
Şekil 76.	Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	58
Şekil 77.	Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	58
Şekil 78.	Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı (Mikroplaka - kamera arasındaki mesafe).....	59
Şekil 79.	Kontrolün farklı sıcaklıklar için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	59

Şekil 80.	Kontrol körünün farklı sıcaklıklar için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	60
Şekil 81.	Kontrolün farklı mikropalakalardaki standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	60
Şekil 82.	Kontrol körünün farklı mikropalakalardaki standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	61
Şekil 83.	Kontrolün 100 mM substrat derişimde perde açık ve perde kapalı için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	61
Şekil 84.	Kontrol körünün 100 mM substrat derişimde perde açık ve perde kapalı için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	62
Şekil 85.	Kontrolün tüm substrat derişimi perde açık ve perde kapalı için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	62
Şekil 86.	Kontrol körünün tüm substrat derişimi perde açık ve perde kapalı için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	62
Şekil 87.	Kontrolün için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	63
Şekil 88.	Kontrol körünün için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	64
Şekil 89.	Borik asitin farklı reaksiyon kaplarındaki ölçüm sonucu standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	64
Şekil 90.	Borik asitin a) spektrofotometrede ve b) farklı reaksiyon kaplarındaki ölçüm grafikleri	63
Şekil 91.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik için UV-Vis ve Image J grafikleri.....	66
Şekil 92.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik için kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	66
Şekil 93.	Günlerarası Tekrarlanabilirlik için kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri.....	66
Şekil 94.	Sağlamlık için UV-Vis ve Image J grafikleri	67
Şekil 95.	Kontrol sağlamlık için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	67
Şekil 96.	Kontrol körü sağlamlık için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri	67
Şekil 97.	Yeşil çay ekstraktının %75'lik çözeltisinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	68
Şekil 98.	Yeşil çay ekstraktının spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % derişim- % inhibisyon grafiğı	68
Şekil 99.	5 mM pTSA sentetik maddesinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri	69
Şekil 100.	5 mM 4CTSA sentetik maddesinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri	69

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bitki kaynaklı bazı üreaz inhibitörleri	18
Tablo 2. Denemelerde kullanılan cihazlar	24
Tablo 3. Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.....	24
Tablo 4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	25
Tablo 5. Kontrol ve kontrol körü pipetleme prosedürü	26
Tablo 6. AgNO ₃ derişim belirlemek için pipetleme prosedürü	27
Tablo 7. Genel pipetleme prosedürü	28
Tablo 8. UV-Vis ve Image J LOD-LOQ tablosu	65
Tablo 9. Tekrarlanabilirlik tablosu.....	65

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
M	: Molar
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
$V_{\max}$	: Maksimum hız
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
[S]	: Substrat molar derişimi
[I]	: İnhibtör molar derişimi
kDa	: Kilodalton
°C	: Santigrat derece
Std sapma	: Standart sapma
inh	: İnhibisyon
mean	: Image J programının verdiği renk şiddeti değeri

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hayat, iyi organize olan ve yönetilen bir dizi kimyasal reaksiyona bağlıdır. Bu reaksiyonların bir kısmı doğası gereği yavaş gerçekleşirken bazıları da enzim denilen katalizörler varlığında oldukça yüksek hızlı gerçekleşir. Enzimlerin katalitik özellikleri bütün hayat formlarında; virüslerden insanlara kadar yaşam süreçlerini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle enzimler canlılık adına çok önemli fonksiyonları yerine getiren biyolojik katalizörlerdir (Copeland, 2000). Enzimlerin biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntıları ile incelenmesi ve yer aldıkları dokuların veya hücrelerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Dinç, 2006). Canlı organizmalarda yürüyen reaksiyonları, büyük bir seçicilik ve yüksek bir verim ile katalizlediklerinden dolayı enzimler üzerinde in vitro çalışmalar son yıllarda artmıştır (Ziyan, 1998). Günümüzde enzimler, kağıt ve temizlik endüstrisinde, tekstil, kozmetik, ilaç kimyasallarının sentezi, gıda ve diğer bazı önemli moleküllerin endüstriyel ölçekteki üretimi süreçlerinde ve diğer birçok alan için de vazgeçilmez olmuşlardır (Benjamin ve Pandey, 2000).

Üreyi karbondioksit ve amonyağa hidrolizini katalizleyen üreaz enzimi (E.C. 3.5.1.5.) çok spesifik bir enzimdir. Çeşitli bakteri, mantar ve bitkilerde bulunan üreaz enzimi tabiattaki üreaz döngüsünde önemli bir rol oynar (Krajewska, Zaborska, ve Leszko, 2001).

Biyolojik faaliyetler sonucu ürenin önemli miktarı oluşmaktadır. Her insan organizması yılda yaklaşık 10 kg üre üretmektedir. Üreaz varlığında ürenin hidrolizi 10^4 kat daha hızlı olurken, ürenin kendi kendine bozulması uzun bir süre alır. Üreaz belli hayvan ve insan patojenlerinde viral bir etki oluşturur. Üreaz, gastrit, peptik ülser gibi mide rahatsızlıkları başta olmak üzere taş oluşumunda katkıda bulunmaktadır. Üreaz inhibisyon çalışmaları tarımsal, medikal ve çevresel öneme sahiptir. Bu nedenle, üreaz inhibitörleri yeni antiülser ilaçlar için hedef olarak kabul edilmiş ve bu inhibitörler üzerine birçok çalışmalar yapılmıştır. Bitkilere ve bitki ekstrelerine olan ilgi giderek artmaktadır. Çünkü bitkilerin yapısında bulunan kimyasal maddeler, sentez edilen kimyasal maddelere göre yan etkileri daha az ve maliyetleri düşüktür (Dinç, 2006).

Enzimlerin geniş kullanım alanından dolayı, geliştirilecek yeni enzim aktivite tayin yöntemleri tüm bu kullanım alanlarına etki edecektir. Bundan dolayı bizde çalışmamızda yeni bir üreaz aktivite tayin yöntemi geliştirmeyi amaçladık. Bu tayin yönteminin klasik spektrofotometrik yöntemle göre daha pratik olması ve ayrıca bir spektrofotometreye ihtiyaç duymadan uygulanması temel hedefi oluşturmaktadır.

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

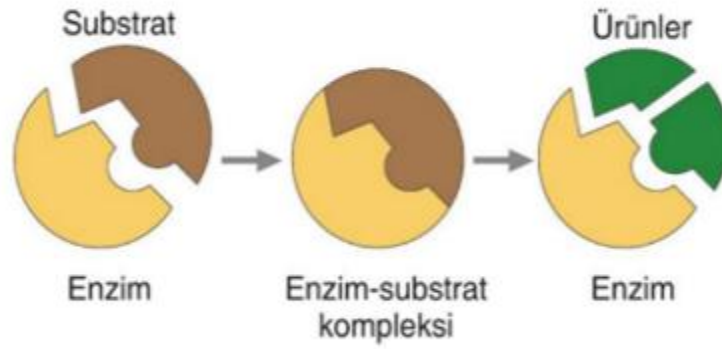
Enzimlerle ilgili pek çok konu aydınlatılmış olmasına rağmen, hala enzimlerin kataliz mekanizmaları ve yeni enzimlerin saflaştırılması, özelliklerinin aydınlatılması için araştırmalar yapılmaktadır. Enzimlerle ilgili biyokimya dalına “enzimoloji” denir.

Enzimler, protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir ve canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki reaksiyonların ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlarlar (Kalaycıoğlu, vd., 2006). Enzimlerin en önemli özellikleri özgün olmaları ve katalizleme güçleridir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2018).

1760-1825 yılları arasında sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlanması ilk enzim çalışmaları arasındadır. İlk kez 1835 yılında Berzelius nişastanın sindiriminde etkili olan bitkisel enzimler üzerinde, 1860 yıllarında ise Pasteur fermantasyon enzimleri üzerinde çalışmalar yapmıştır. 1926 yılında Amerikalı biyolog J.B. Sumner tarafından soya fasulyesi özütünden saf ve kristalize halde ilk enzim molekülü olan üreaz izole edilmiştir. 1930 ve 1936 yıllarında tripsin, kimotripsin ve pepsin enzimleri saflaştırıldı ve kristallerin protein yapısında olduğu doğrulanmıştır. Böylece enzimlerin protein yapısında olduğu kanıtlanmış oldu (Keha ve Küfrevioğlu, 2018).

Enzimler reaksiyon sırasında fiziksel ve kimyasal değişiklikler geçirirler ve reaksiyon tamamlandığında orijinal hallerine tekrar dönerler (Murray, vd., 1993). Enzimler tepkime hızlarında büyük bir artışı sağlayan çok etkili ve spesifik katalizörlerdir. Enzimle katalize edilen reaksiyonlar, edilmeyenlere göre 10^3 – 10^{17} daha hızlı gerçekleşir (Solomon, vd., 2002).

Etki ettikleri maddeler olan substratlar için enzimler oldukça spesifikler. Bazı enzimler tek bir molekül türü üzerine etki ederken bazıları da benzer yapıda bir grup substrata etki eder (Kalaycıoğlu, vd., 2006).



Şekil 1. Enzim substrat ilişkisi ve substrat – ürün dönüşümü

2000’den fazla farklı enzim olduğu günümüzde bilinmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2018). Enzimler ya ilk keşfedenlerin koydukları isimlerle ya da substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek adlandırılırlar. Örneğin; üreaz, lipaz, tripsin, fosfataz, ve pepsin.

1.2.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler, biyolojik sistemlerde tepkimeleri katalizleyen oldukça özelleşmiş proteinlerdir (Nelson ve Cox, 2020). Enerjinin bir formdan diğer bir forma dönüşümü enzimler tarafından sağlanır. Enzimleri şifrelemek için insan genomunun dörtte biri ayrılmıştır. Bu yaşamın devamının sağlanmasından enzimlerin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Berg, vd., 2014).

Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır. RNA moleküllerinin de biyokatalizör özelliğinin olduğunun bulunması ile kataliz özelliğinin sadece proteinlerin tekelinde olmadığı saptanmıştır. Farklı özelliklere sahip olan çok çeşitli molekülleri özgül olarak bağlayan katalizör özelliğine sahip olan protein sınıfı kimyasal katalizi gerçekleştirirler. Substratları en doğru şekilde bir araya getirmeyi, kimyasal bağların yapımını ve kırılmasını enzimler moleküllerdeki bütün güçleri kullanarak sağlarlar. Geçiş durumunu kararlı kılarak enzimler tepkimeyi katalizlerler. Gerçekleşmesi potansiyel olarak mümkün olan kimyasal tepkimeleri seçerek enzimler geçiş durumunu sağlar ve katalizi gerçekleştirirler (Berg, vd., 2014).

Canlı hücreler tarafından enzimler biyolojik koşullarda sentez edilmektedirler. Enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez, oldukça özel yapı kazanmış ve genellikle büyük protein molekülleridir. Genler tarafından belirlenen sıraya göre, proteinlerdeki amino asitlerin primer dizilişi olmaktadır. Enzimin belirli bir

konformasyonu ve kuaterner yapıyı kazanmasını, enzim proteininde bulunan amino asitlerin özel dizilişi sağlamaktadır. Metabolik olayların kontrolünü sağlamak ve enzimin biyolojik aktivitesi için enzim proteinlerinin yapısı gereklidir (Gözükara, 2011). Her biyokimyasal işlemin merkezinde enzimler bulunurlar. Sıraya koyulacak olursa sırasıyla enzimler; basamaklı tepkimelerin yüzlercesini katalizler, besin moleküllerini parçalar, kimyasal enerjiyi dönüştürür ve korurlar. Bunlarla birlikte ayrıca basit çıkış bileşiklerinden biyolojik makro molekülleri yaparlar (Nelson ve Cox, 2020).

Katalitik güçleri ve özgül olmaları enzimlerin en önemli özellikleridir. Enzimler katalizledikleri tepkimeleri milyon kat veya daha fazla hızlandırırlar. Birçok tepkime enzimler olmadan uygun hızlarda biyolojik sistemlerde gerçekleşemez. Katalizin gerçekleştiği enzimin bölümüne aktif bölge denir (Berg, vd., 2014).

Enzimler hem tepkimede kullandıkları substrat adı verilen tepkenlerine hem de katalizledikleri tepkimeye özgüdürler (Berg, vd., 2014). Enzimler kimyasal tepkimeleri olağanüstü derecelerde hızlandırırlar. Genellikle bir enzim bir kimyasal tepkimeyi veya birbirine çok yakın bir grup tepkimeyi katalizler. Bir enzimin ürünü diğer enzimin substratı olabilmektedir ve hücre metabolizmasının düzenlenmesinde bu karşılıklı etkileşimler etkin rol oynamaktadır (Gözükara, 2011).

Birçok enzimin aktivite gösterebilmesi için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelen kofaktör adı verilen küçük moleküllere ihtiyacı vardır (Gözükara, 2011). Kofaktörler, metaller ve koenzimler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Koenzimler küçük organik moleküllerdir (Berg, vd., 2014).

Katalitik olarak aktif olan enzime holoenzim, kofaktörü olmayan enzime ise apoenzim denir. Eğer koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin diyalize edilemeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif haline “apoenzim” denir. Enzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline “holoenzim” denir. Kısaca Apoenzim + kofaktör = holoenzim şeklindedir (Gözükara, 2011 ve Berg, vd., 2014).

Sitokrom oksidaz Cu^{+2} 'ye, DNA polimeraz Zn^{+2} 'ye ve üreaz Ni^{+2} 'ye kofaktör olarak gereksinim duyar. Süksinat dehidrogenaz FAD'e, piruvat karboksilaz biotin'e ve glutamik oksaloasetik transaminaz ise koenzim olarak piridoksal fosfat'a ihtiyaç duymaktadır (Gözükara, 2011). Enzime sıkı bağlı protein yapısında olmayan kofaktör prostetik grup adını alır. Eğer koenzim enzime gevşek bağlandı ise kosubstrat gibidir, çünkü substratlar gibi enzime bağlanırlar ve enzimden ayrılırlar. Vitamin kaynaklı birçok koenzim normal

substratlardan farklıdır ve enzim tarafından katalizlenen birçok tepkimede kullanılırlar. Genellikle aynı koenzimi kullanan enzimler benzer mekanizma ile enzimatik katalizi gerçekleştirirler (Berg, vd., 2014).

Bazı durumlarda enzim aktivite göstermek için birden fazla kofaktöre gerek duyabilir. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktörler ve koenzimler gevşek veya sıkı bağlıdırlar ve genellikle diyaliz ile enzimden ayırmak mümkündür. Enzime kovalent bağ ile bağlanmış kofaktör ve koenzimi diyaliz ile uzaklaştırmak mümkün olmaz. Kofaktörler bazen enzimin aktif bölgesinde katalitik grup olarak rol oynarken, bazen de substrat ve enzimin birbirine bağlanması için köprü vazifesi görürler (Gözükara, 2011).

1.2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Malcolm Dixon ve Edwin Webb “Enzymes” adlı kitaplarında bilinen tüm enzimlerin bir listesini derledi ve çok sayıda enzime rağmen, söz konusu reaksiyon türlerinin sayısının oldukça az olduğuna dikkatlerini çekti. Enzimler, katalizlenen reaksiyon tipine göre üç geniş gruba ayrıldı: hidrolize edici enzimler, transfer eden enzimler ve diğer enzimler. Malcolm Dixon ve Edwin Webb listesinde, numaralandırılmış 659 enzim içermektedir. Bunlar sırasıyla: hidroliz eden enzimler (1–221), transfer eden enzimler (222–579); ve diğer enzimler (580–659). Bu ana grupların her biri, substratların doğasına veya ilgili reaksiyon tipine göre alt gruplara ayrıldı. Bu, enzimlerin katalize edilen reaksiyonun doğasına göre gruplara ve alt gruplara ayrıldığı sistem, mevcut enzim sınıflandırması ve isimlendirme sisteminin başlangıcıydı (McDonald ve Tipton, 2014).

Uluslararası Biyokimya Birliği [şimdiki adı Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)] tarafından 1956'da enzim sınıflandırması ve terminolojisi sorunlarını ele almak için Uluslararası Enzimler Komisyonu kuruldu. Komisyon tarafından enzimler katalize edilen reaksiyon tipine göre altı gruba ayrılarak genişletildi, son zamanlarda da yedinci bir sınıf eklendi. Bu sınıfların her biri, her bir enzime benzersiz bir dört haneli kod, Enzim Komisyonu (EC) numarası verilerek alt bölümlere ayrıldı. İkinci basamak (alt sınıf), genellikle ilgili bileşik veya grubun türü hakkında bilgi içerir. Alt-alt sınıf olan üçüncü basamak, ilgili reaksiyonun türünü ayrıca belirtir. Dördüncü hane, bir alt-sınıf içindeki bireysel enzimi tanımlamak için kullanılan bir seri numarasıdır (McDonald ve Tipton, 2014).

1. Oksidoredüktazlar

2. Transferazlar

3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar
7. Translokazlar

Sistematik isimler iki bölümden oluşur. İlki, substratın adını veya bimoleküler reaksiyon durumunda iki nokta üst üste ile ayrılmış iki substratın adını içerir. '-ase' ile biten ikinci kısım, reaksiyonun doğasını gösterir. Bir reaksiyon tipini belirten bir dizi jenerik kelime, kabul edilen veya sistematik isimlerde kullanılabilir: oksidoredüktaz, oksijenaz, transferaz (aktarılan grubun doğasını gösteren bir ön ek ile), hidrolaz, liyaz, rasemaz, epimeraz, izomeraz, mutaz, veya ligaz (McDonald ve Tipton, 2014).

1.2.3. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şunlardır:

- Ortam pH'sı
- Sıcaklık
- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- Zaman
- İnhibitör ve aktivatör

Ortam pH'sı: Her enzim için aktivitesinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde veya altında olduğunda enzim aktivitesi düşer. Ayrıca bütün enzimlerin pH- Aktivite eğrileri de aynı değildir (Keha ve Küfrelioğlu, 2018).

Bir enzimin pH-Aktivite ilişkisinde etkili olan bazı faktörler vardır. Bunlar;

- Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların pK'sı,
- Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK'sı,
- Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı,
- Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı.

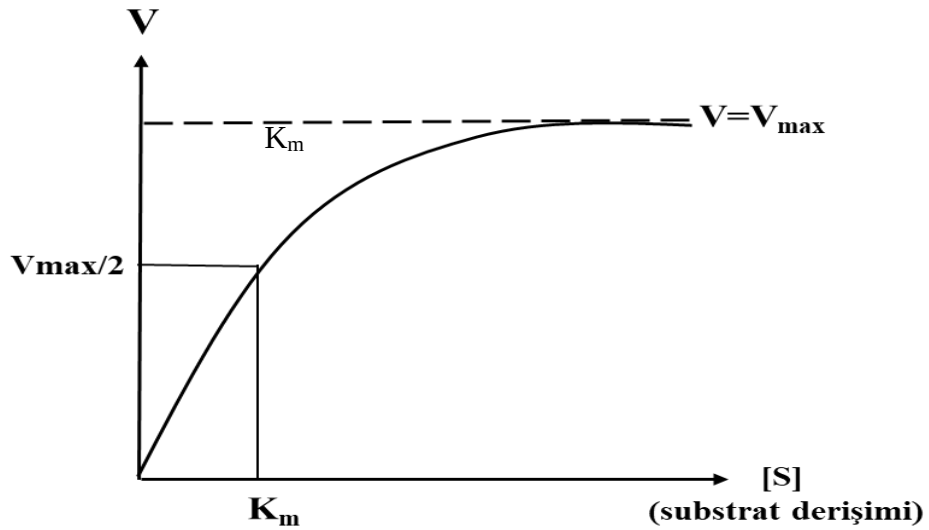
Bazı enzimlerin substrat ve optimum pH'sı şu şekildedir; pepsin enzimi- substratı hemoglobin ve optimum pH'sı 2,2, piruvat karboksilaz enzimi- substratı piruvat ve optimum

pH'sı 4,8, alkalin fosfataz enzimi- substratı gliserol 3- fosfat ve optimum pH'sı 9,5 (Keha ve Küfrevioğlu, 2018).

Sıcaklık: Kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla genellikle artar. Enzimlerde de artan sıcaklık ile enzimatik reaksiyon hızı artar, ancak 50-60 °C üzerine çıkıldığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenir. Bir enzim için 10 °C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığına Q10 denir. Bütün enzimlerin Q10 değeri 1,7 ile 2,5 arasında değişir (Keha ve Küfrevioğlu, 2018).

Enzim Derişimi: Enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzimatik reaksiyonun hızı enzim derişimine bağılı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim miktarı ne kadar fazla ise reaksiyon o kadar hızlı yürür. Substratın miktarının fazla olduğu koşullarda enzim derişimi reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır (Şahin, 2013).

Substrat Derişimi: Substrat derişimi arttıkça belli bir süre reaksiyon hızı doğrusal olarak artmaktadır. Reaksiyon hızı değişmeden devam ettiğinde enzim substratına karşı doygunluğa ulaşmıştır ve bu durumda enzimin maksimum çalıştığını gösterir. Bir enzimin maksimum hızı V_{max} ile ifade edilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağılı substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti (K_m) denir. K_m ne kadar küçük ise enzimin substrata ilgisi o kadar fazladır (Şahin, 2013).



Şekil 2. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat derişiminin etkisi

Zamanın Etkisi: Belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı o enzim reaksiyonunun hızını belirlemektedir. Substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında enzim çalışmaları çoğunlukla gerçekleştirilir. Bunun sebebi bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonda reaksiyon hızı giderek azalır. Reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi, enzimin zamanla inaktive olması ve substratın tükenmesi gibi faktörler buna neden olmaktadır. Enzim çalışmalarında bu faktörlerin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları reaksiyon başında yapılır (Şahin, 2013).

İnhibitör: Enzimlerde substratın bağlandığı ve değişikliğe uğratıldığı ve başka bir bileşiğe dönüştürüldüğü bölge olan aktif merkeze bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önleyen bileşenlere "inhibitörler" denir (Özmen, D., 2015). Temel olarak enzim inhibitörleri bir enzimle bağlanan ve onun biyoaktivitesini azaltan moleküllerdir. Bir patojeni öldürebilmekte, bir metabolik dengesizliği düzeltebilmekte veya enzim aktivitesini bloke etmektedirler. Bununla birlikte birçok ilaç molekülü yapısı enzim inhibitörleri içermektedir. İnhibitörlerin bağlanması, enzime aktif alandaki bir substratın bağlanmasını engelleyebilir ve enzimin kimyasal reaksiyonda aktivitesini azaltır (Kayacık, 2019).

İnhibitörler genel olarak ikiye ayrılırlar. Birinci grup, geri dönüşümlü inhibitörlerdir ve enzim yüzeyinin çeşitli kısımlarıyla birlikte nonkovalent etkileşimler oluştururlar. İkinci grup ise, geri dönüşümsüz inhibitörlerdir ve enzim yüzeyi üzerindeki farklı fonksiyonel gruplarla etkileşime girerler. Enzim aktivitesinin bloke edilmesini sağlayan enzimler pek çok ilacın yapısını oluşturmaktadır (Kayacık, 2019).

Bazı bileşenler ise enzim aktivitesini artırdıkları için aktivatör adını alırlar. Bilimsel araştırmalarda daha çok inhibitörler üzerine çalışmaların olduğu görülmektedir. Bu da enzimlerin inhibisyonunun özellikle hastalıklarla mücadele açısından daha önemli olmasıyla ilgilidir.

1.2.4. Enzim İnhibisyonu ve İnhibisyon Çeşitleri

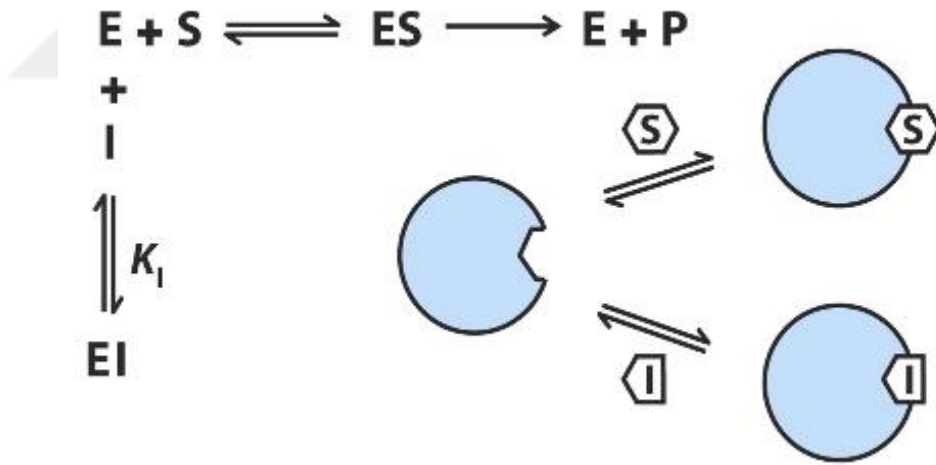
Enzim-substrat kompleksini sağlayan bölge, enzimin küçük bir bölgesini içermektedir. Enzimler, substratlarına göre büyük moleküllerdir. Enzimlerde substratın bağlandığı, başka

bir bileşiğe dönüştürüldüğü ve değişikliğe uğratıldığı bölgeye “aktif merkez” denir ve aktif merkez de en az bir amino asit özel bir rol oynar.

Enzimin aktif merkezine bağlanarak veya substratın bağlanmasını engelleyen ve enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önleyen bileşiklere “enzim inhibitörleri” ve bu olaya da “enzim inhibisyonu” denir (Özmen D., 2015).

Enzim ile inhibitör etkileşime girdiğinde enzimin katalitik etkinliği azalır. Enzimin aktif bölgesine tersinir olmayan bir inhibitör kovalent olarak bağlandığı zaman inhibitörün derişimi düşürölse bile katalitik etkinlikte kalıcı bir kayıp oluşturur. Enzimle tersinir bir inhibitör kovalent olmayan bir kompleks oluşturur ve bu katalitik etkinlikte geçici bir düşüşe neden olur. Enzimin katalitik etkinliği inhibitör kaldırıldığında normal seviyeye döner (Öner, 2022).

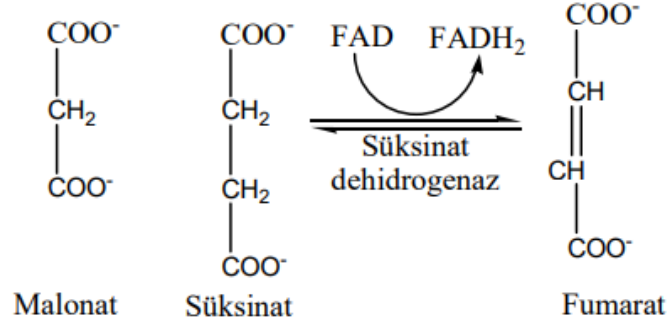
Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon: Yarışmalı inhibisyon dönüşümlü inhibisyonudur. Yapı bakımından yarışmalı inhibitör substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır (Korkmaz, vd., 2015).



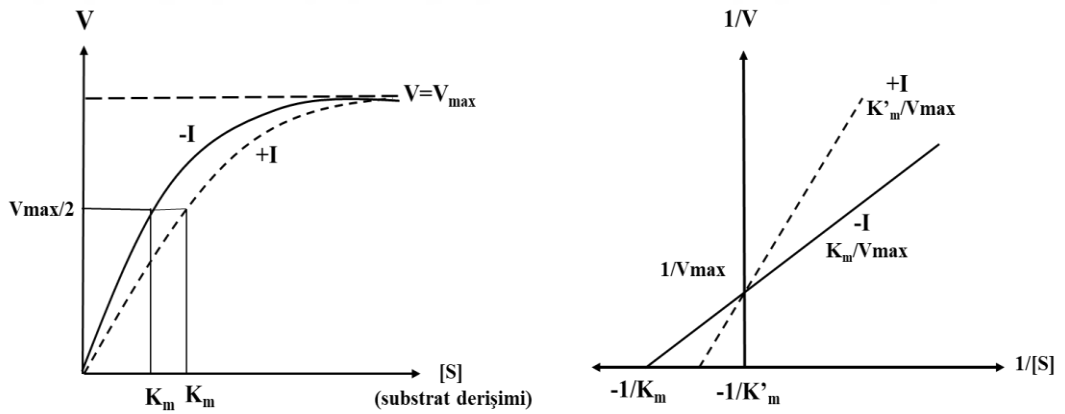
Şekil 3. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon (Nelson, vd., 2020)

Böylece inhibitör substratın enzime bağlanmasını engeller. Substrat derişiminin artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Enzimin V_{max} değeri değışmez. Hem enzim–inhibitör komplekslerinin hem de enzim–substrat ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğu için substrat derişiminin artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır. ES kompleksi oranını yarışmalı inhibitör kataliz hızını düşürerek azaltır bu da enzimin K_m değerin arttığını ifade eder (Korkmaz, vd., 2015).

Yarışmalı inhibisyonuna, malonatın süksinat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisi örnek olarak verilebilir. Yapı olarak süksinata benzeyen malonat enzimin aktif bölgesine bağlanır.

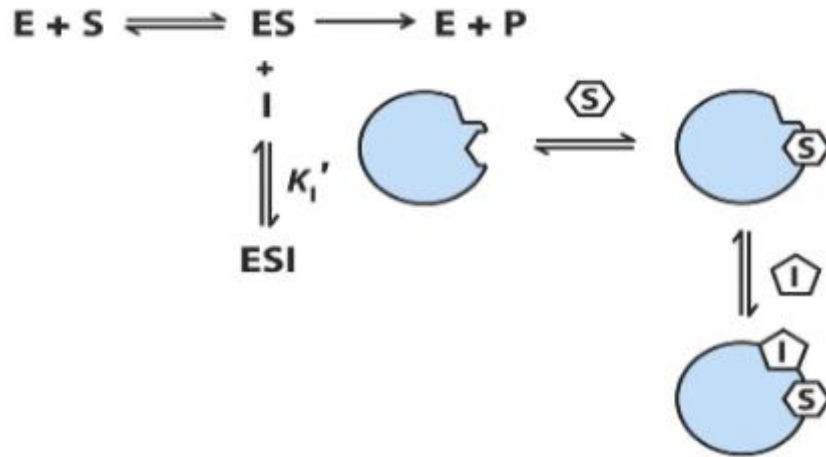


Farklı substrat ve inhibitör derişimlerinde yapılan enzimli reaksiyon hızlarının ölçümlerinden Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiğı çizilir. Michealis-Menten grafiğı $V = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_m + [S])$ eşitliğine göre, Lineweaver-Burk grafiğı ise $(1/V) = (K_m/V_{\max}) \cdot (1/[S]) + (1/V_{\max})$ eşitliğine göre çizilir.



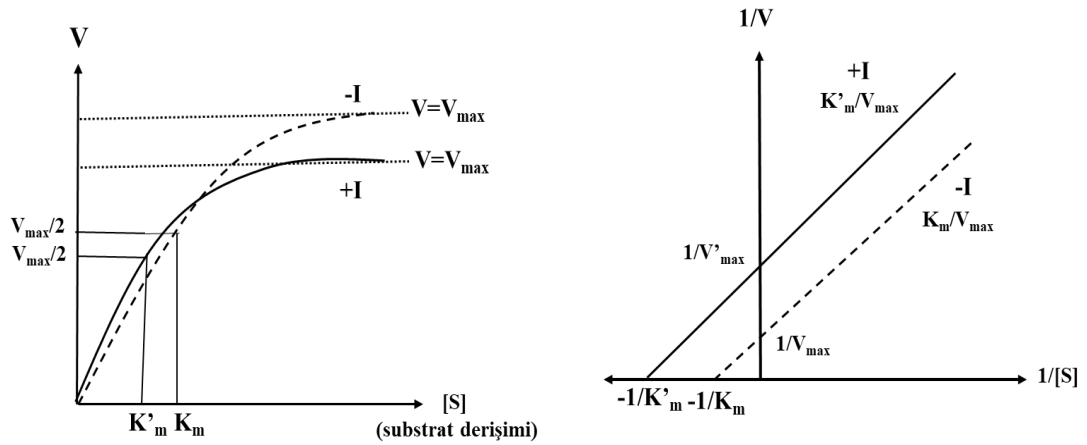
Şekil 4. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk grafiğı; $V_{\max}$ aynı kalırken K_m artar (Korkmaz, vd., 2015).

Yarışmasız (Unkompetitif) İnhibisyon: Bu inhibisyonda, inhibitör serbest enzime değil sadece enzim substrat kompleksine bağlanabilir. (Korkmaz, vd., 2015).



Şekil 5. Yarışmasız (unkompetitif) inhibisyon (Nelson, vd., 2020)

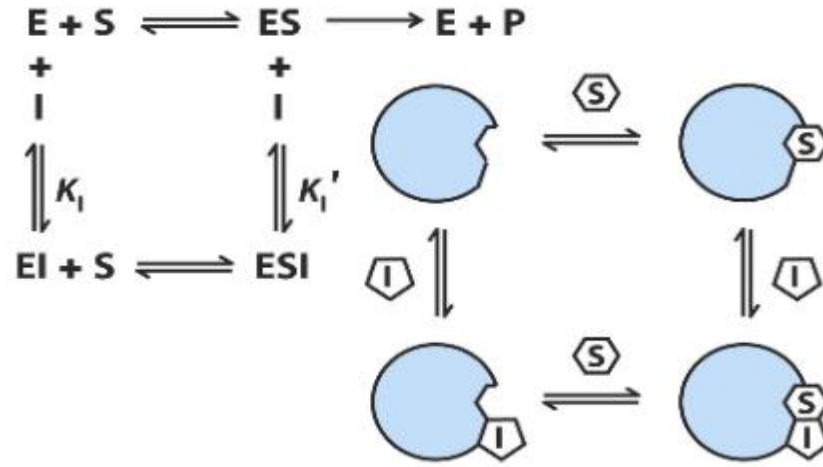
İnhibitör varlığında substrat derişiminin artmasıyla inhibisyon artabilir. Michealis-Menten grafiğı $V = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_m + [S])$ eşitliğine göre, Lineweaver-Burk grafiğı ise $(1/V) = (K_m/V_{\max}) \cdot (1/[S]) + (1/V_{\max})$ eşitliğine göre çizilir. Buna göre inhibitör varlığından ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_m azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından $V_{\max}$ da düşer



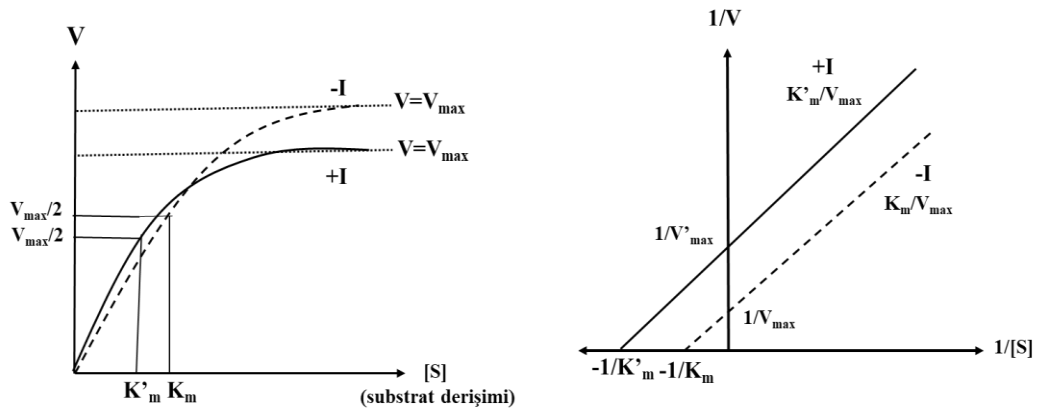
Şekil 6. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik bir reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi; $V_{\max}$ ve K_m aynı oranda azalır. $[I]$ artsa bile doğruların eğimi aynıdır.

Yarı Yarışmalı (Nonkompetitif) İnhibisyon: İnhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum; inhibitörün aktif bölge dışında bir yere bağlandığını,

bağlanmanın aynı bölgeye olmadığını gösterir. İnhibitör aktif bölgeye bağlanamadığından, substrat ile inhibitör arasında bir yarışma yoktur (Korkmaz, vd., 2015).



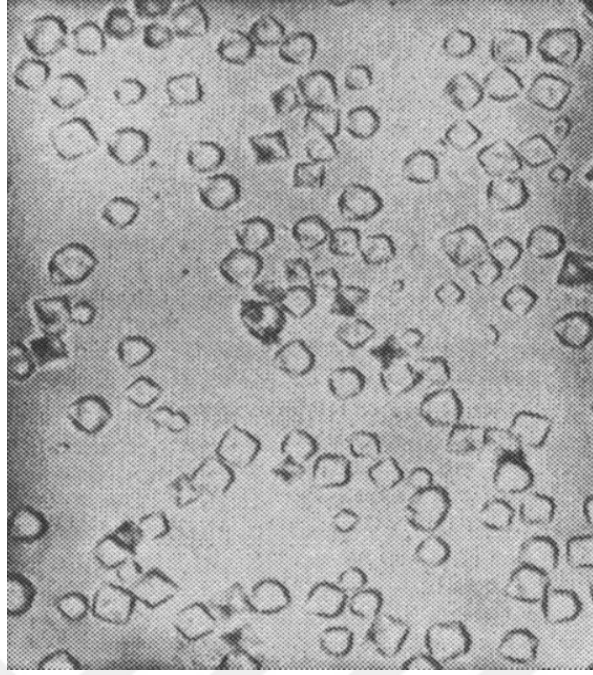
Şekil 7. Yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyon (Nelson, vd., 2020)



Şekil 8. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi; V_{max} azalırken K_m aynı kalır.

1.3. Üreaz

Üreaz, modern biyokimyanın gelişiminde temel bir yer tutar. Spesifik olarak üre ayrışmasını katalize eden üreaz, kristali protein formuna saflaştırılan ilk enzimdir (Bzura ve Koncki, 2019). James Sumner, 1926 yılında üreazın ilk kristalizasyonunu yayımladı (Copeland, 2000).



Şekil 9. Üreaz kristallerinin ilk fotomikrografı (728 x büyütme) (Sumner, 1926).

James Sumner'ın Jack bean'den izolasyonu ve kristalleştirilmesi enzimolojinin gelişiminde önemli yere sahiptir (Bzura ve Koncki, 2019). Sumner'ın üreazı kristalleştirmesi ve ilk makalesinden sonraki 20 yıl içerisinde 130'dan fazla enzim kristalleştirilmiştir (Copeland, 2000). Üreaz, biyokatalitik süreçlerin kinetik çalışmalarında, biyoteknolojik kullanımlar için yeni enzim immobilizasyon protokolleri üzerine araştırmalarda, modern analitik kimya için biyoanalitik sistemlerin ve biyosensörlerin geliştirilmesinde vb. yaygın olarak kullanılan bir model enzimdir (Bzura ve Koncki, 2019).

Üreaz, toplam hücre proteinlerinin %6'sını temsil eden büyük miktarlarda üretilir. Enzim, ürenin hidrolizini amonyağa ve karbamata katalize eder; karbamat kararsızdır ve kendiliğinden ikinci bir amonyak molekülüne ve karbonik aside bozunur (Stingl ve Reuse, 2005).

1.3.1. Üreaz Enziminin Özellikleri

Üreaz hidrolaz sınıfı bir enzimdir. 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı revizyonla Uluslararası Biyokimya Birliği (I.U.B. International Union Biochemistry) üreaz enzimini E.C. 3.5.1.5. olarak kodlamıştır.

Bu sıralamaya göre;

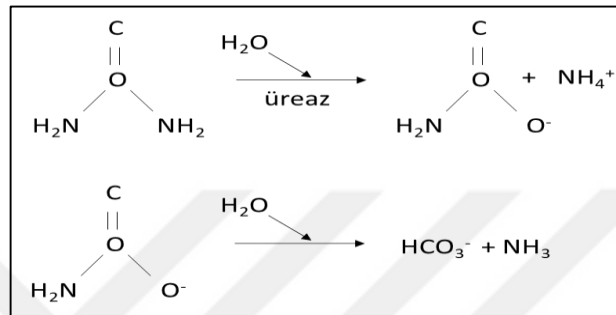
3: Tip no: Enzimin bir hidrolaz olduğunu

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

1: Alt grup no: Enzimin bir açilamidaz olduğunu

5: Sistematik ad: Enzimin sistematik adının “üre aminohidrolaz” olduğunu gösterir (Şahin, 2013).

Üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksit'e parçalanmasını katalizler. Katalizörsüz olarak gerçekleştirilen tepkime hızını üreaz 10^{14} kat artırmak suretiyle yapar (Kayastha ve Das, 1999).



Şekil 10. Üreazın kataliz reaksiyonu (Ciurci, vd., 1999)

Üreaz, bitkilerde, bakteri kültürlerinde ve hayvan çiftliklerinden elde edilen gübrelerde bulunur (Bzura ve Koncki, 2019).

Araştırılan en yaygın üreaz içeren kaynaklar şunlardır:

1- *Klebsiella aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*): Geviş getirenlerin sindirim sisteminde yaşayan ve azot metabolizmasında önemli rol oynayan bir bakteri olan üreaz (*Klebsiella a. üreazı*, KAU).

2- *Bacillus pasteurii*: Özellikle ziraat için çok önemlidir ve toprakta, sularda, pis sularda yaşar. Bitkiler için toprağı azotça zenginleştiren üreaz (*Bacillus p. üreazı*, BPU).

3- *Canavalia ensiformis*: Bir tür fasulye olan, bulunduğu bitkide topraktan azot emiliminin yeterli olmadığı durumlarda argininin azot deposu olarak kullanarak açığa çıkardığı üreyi içerdığı üreaz (*Canavalia ensiformis* üreazı, JBU) sayesinde amonyağa çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasına yardım eder.

4- *Helicobacter pylori* (HP): Midenin asidik yapısını etkileyerek ülser vb. rahatsızlıklara sebep olan ve insanlarda mide rahatsızlığına sebep veren bir bakteridir (Stefano, 2000).

1.3.2. Üreaz Enziminin Moleküler Özellikleri

Üreaz, bitkiler, bazı bakteriler ve mantarlar tarafından sentezlenen nikel bağlı bir metaloenzimdir. Üreazın varlığı, bitkiler, bakteriler, algler, mantarlar ve omurgasızlar dahil olmak üzere çok sayıda organizmada tespit edilmiştir. Bitki ve mantar üreazları çoğunlukla homoheksamerler α_6 iken, bakteriyel üreazlar tipik olarak heterotrimerlerdir $(\alpha\beta\gamma)_3$. Bakteriyel üreazlar, genellikle $(\alpha\beta\gamma)_3$ trimerleri oluşturan bir büyük (α 60-76 kDa) ve iki küçük (β 8-21 kDa, γ 6-14 kDa) olmak üzere üç farklı alt birimden oluşur. Mantar ve bitki üreazları özdeş alt birimlerden (her biri ~90 kDa) oluşur ve en yaygın olarak trimerler ve heksamerler olarak birleştirilir (Krajewska, 2009).

plant urease from jack bean <i>Canavalia ensiformis</i> [84]	N—	90.77 kDa	—C
plant urease from soybean <i>Glycine max</i> [82]		93.5 kDa	
plant urease from pigeonpea <i>Cajanus cajan</i> [83]		90 kDa	
plant urease from cotton seeds <i>Gossypium hirsutum</i> [36]		98.3 kDa	
fungal urease from [101] <i>Schizosaccharomyces pombe</i>		91.2 kDa	
fungal urease from <i>Coccidioides immitis</i> [102]		91.5 kDa	
bacterial urease from <i>Klebsiella aerogenes</i> [103]	γ 11.1 kDa	β 11.7 kDa	α 60.3 kDa
bacterial urease from <i>Proteus mirabilis</i> [104]	γ 11.0 kDa	β 12.2 kDa	α 61.0 kDa
bacterial urease from <i>Bacillus pasteurii</i> [105]	γ 11.1 kDa	β 14.0 kDa	α 61.4 kDa
bacterial urease from [106] <i>Ureaplasma urealyticum</i>	γ 11.2 kDa	β 13.6 kDa	α 66.6 kDa
bacterial urease from <i>Proteus vulgaris</i> [107]	γ 11.0 kDa	β 12.1 kDa	α 61.0 kDa
bacterial urease from <i>Staphylococcus xylosum</i> [108]	γ 11.0 kDa	β 15.4 kDa	α 61.0 kDa
bacterial urease from <i>Staphylococcus faecalis</i> [92]	γ 12 kDa	β 21 kDa	α 65 kDa
bacterial urease from [91] <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	γ 13.9 kDa	β 20.4 kDa	α 72.4 kDa
bacterial urease from <i>Providencia stuartii</i> [109]	γ 9 kDa	β 10 kDa	α 73 kDa
bacterial urease from <i>Helicobacter pylori</i> [99]		β 26.5 kDa	α 61.0 kDa

Şekil 11. Üreazın yapısal alt birimleri (Krajewska, 2009).

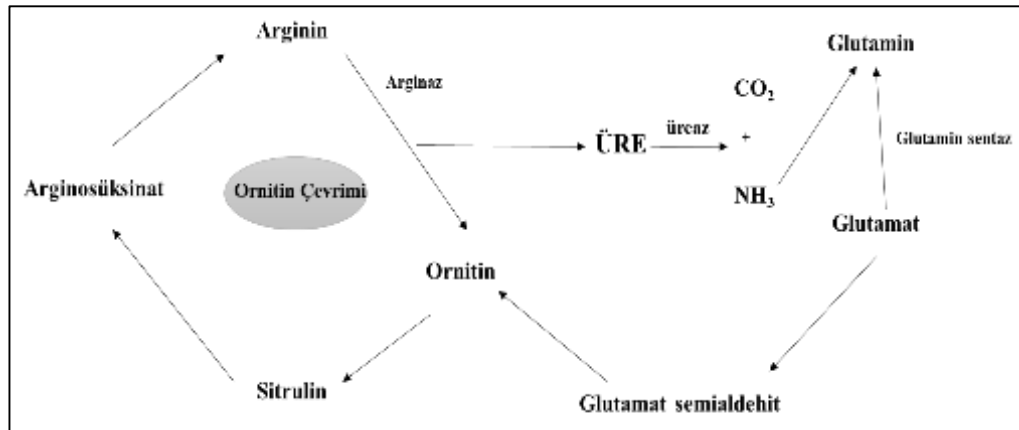
1.3.3. Enzimatik Tepkime Mekanizması ve Nikel İyonunun Rolü

Üreaz, tiyol açısından zengin ve nikel bağlı bir metaloenzimdir. Ni^{+2} iyonları ve sülfhidril grupları özellikle enzimin aktif bölgesindeki çoklu sistenil kalıntıları tüm üreazların katalitik aktivitesi için gereklidir (Tan, vd., 2013). Üreazın metaloenzim olduğu gösterildiğinden bu yana, nikel bağlı üreazlar birçok bakteri, mantar ve yüksek bitkiden izole

edilmiştir. Benzer yapılara ve kataliz mekanizmalarına sahiptirler. Bir üreaz apoenziminin aktive edilmesi gerekir. Bu işlem, nikeli üreaz oluşturan katalitik bölgeye dahil eden birkaç yardımcı proteinin katılımını gerektirir. Kristalize *K. aerogenes* üreazı, her bir katalitik alt birimi iki Nikel iyonlu aktif bölge içerir. Bu enzimde, bir nikel atomu iki histidin kalıntısına (His-246 ve His-272), ikinci nikel atomu ise üç kalıntıya bağlıdır: iki histidin (His-134 ve His-136) ve aspartik asit (Asp -360) (Sirko ve Brodizk, 2000).

1.3.4. Bitki Metabolizmasında Üreazların Rolü

Bitkilerde üre metabolizmasında arginaz, üreaz ve glutamin sentetaz olmak üzere üç anahtar enzim bulunmaktadır. Üreazlar organizmanın azot kaynağı olarak harici veya dahili olarak üretilen üreyi kullanmasına izin vermektir. Bitkilerdeki azot kaynağının önemli miktarı üreden gelmektedir. Ürede bulunan azot, üreaz ile hidrolize edilmediği sürece bitki tarafından kullanılamaz. Üreaz aktivitesinin ürünü olan amonyak, glutamin sentetaz tarafından organik bileşiklere dahil edilir. Üreaz, tüm bitki dokularında bulunur ve metabolik olarak türetilmiş ürenin dönüştürülmesinden sorumludur. Fizyolojik rolü bilinmemektedir, ancak bitki patojenlerine (toksik amonyak üretiminden dolayı) karşı korumada yer aldığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte üreaz, çimlenmede ve fidelerin azot metabolizmasında önemli bir rol oynar (Sirko ve Brodizk, 2000).



Şekil 12. Bitkilerdeki üre metabolizması (Sirko ve Brodizk, 2000).

1.3.5. Üreaz Enzimi İçin İnhibitörler

Üreazın inhibisyonları, çeşitli kullanımları nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bunlardan bazıları şu şekildedir: Üriner taş oluşumu, peptik ülser, piyelonefrit ve hepatik koma gibi insan patojenik durumlarını indükleyen bakteriyel üreaza (örn: *Helicobacter pylori*) karşı terapi, enzim inhibitörü olarak işlev gören maddeleri belirlemek için analitik bir teknik olarak ve toprakta ürenin hidrolizini kontrol ederek toprağı üre gübresi kullanımından sonra azot kaybından ve pH yükselmesinden korumak gibi nedenlerden dolayı üreaz inhibisyonları incelenmiştir (Upadhyay, 2012). Ayrıca üreaz inhibitörleri, idrar ve mide-bağırsak yollarının insan enfeksiyonlarını kontrol etmede de büyük öneme sahiptirler (Qin ve Cabral, 2002). Üreaz inhibitörleri genel olarak iki kategoriye ayrılabilir: hidroksiüre ve hidroksamik asitler gibi substrat benzeri inhibitörler ve reaksiyon mekanizmasını etkileyen inhibitörler. Kimyasal yapıya dayalı olarak ise üreaz inhibitörleri dört ana gruba ayrılabilir: 1) üreazın metal merkezi ile doğrudan reaksiyona giren tiyolat anyonları olduğu tiyol bileşikler, 2) üreazın aktif bölgesine bağlanmak için üre ile rekabet eden hidroksamik asit ve türevleri, 3) fosfordiamidatlar gibi etkili inhibitörler ve 4) Nikel ligant ve şelatları. Florür iyonunun ve bazı peptidlerin önemli bir inhibe edici özelliği vardır (Upadhyay, 2012).

Üreazın eser miktardaki ağır metallere karşı hassas olduğu bulunmuş ve alkali metallerin üreaz inhibisyonu yaptığına dair çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada gümüş iyonunun jack bean üreazını inhibe ettiği bildirilmiştir. Mn^{2+} , Pd^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} gibi metallerin de üreazı inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda metal iyonlarından üreazı inhibe etme sırası $Ag^{+2} \sim Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$ şeklindedir. Üreazın ağır metal iyonları tarafından inhibisyonunun yarışmalı inhibisyon olmadığı belirtilmiştir (Upadhyay, 2012).

Jackbean ve bakteriyel üreaz üzerinde yapılan bazı ön çalışmalarda, hidroksamik asidin spesifik, güçlü ve yarışmalı olmayan bir inhibitör olduğunu göstermiştir. Daha sonra, hidroksamik asit ve türevlerinin, hem bitki hem de bakteri üreazlarının geri dönüşümlü, yavaş bağlanan inhibitörleri olduğu bildirildi. Asetohidroksamik asit (AHA), bu sınıfta en yaygın olarak kullanılan inhibitördür. Kinetik ve denge verileri, hidroksamik asidin nikel iyonu için rekabet ettiğini ortaya koymuştur (Upadhyay, 2012).

1943'te, florürün ilk kez sığır rumen (işkembe) üreazının inhibitörü olduğunu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre florür inhibisyonunun, katalitik bölgedeki su

bağlama bölgesinin florür iyonu ile değiştirilmesini içerdiğini öne sürmüştür (Upadhyay, 2012).

Tiyol bileşikleri, üreaz enziminin yarışmalı inhibitörlerindendir. Sistein ve 3-merkaptopropiyonat gibi anyonik bir karboksil grubu içeren tiyol bileşikleri zayıf inhibitörlerken, pozitif yüklü bir β -amino grubuna sahip olan tiyoller, örneğin sisteamin, güçlü inhibitördür. Bir inhibitör olarak tiyollerin dezavantajı, etkilerinin spesifik olmamasıdır (Upadhyay, 2012).

Bitki kaynaklı üreaz inhibitörlerini kimyasal sınıflarına göre sınıflandırabilir. Bunlardan fenolik bileşikler bitkilerdeki pentoz fosfat ve fenilpropanoid yolunun türevleri olan ikincil metabolitlerdir. Ayrıca enzim inhibisyonu da dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik özellikler sağlarlar. Diğer bir grup ise alkaloidlerdir ve doğal olarak oluşan organik azot içeren bazların bir sınıfıdır. Alkaloidlerin insanlar ve hayvanlar üzerinde çeşitli ve önemli fizyolojik etkileri vardır. Terpenoidler, bitkilerde serbest veya proteinlere bağlı glikozitler veya esterler şeklinde bulunan geniş ve çeşitli bir organik bileşik sınıfıdır. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde de çeşitli fizyolojik etkiler gösterirler (Hassan ve Zemlicka, 2016).

Tablo 1. Bitki kaynaklı bazı üreaz inhibitörleri (Hassan ve Zemlicka, 2016)

Kimyasal Sınıf	Bileşik	Üreaz inhibisyonundan sorumlu gruplar
Diterpenoidler	3,7,15-Tri-O-acetyl-5Onicotinoil-13,14-dihidroksimyrsinol	-
Triterpenoidler	Zigofabosid A	Sülfat kısmı
Fenoller	Indigoferin-B and C	Alifatik zincir
Fenoller	Dalbergiofenol	Hidroksil grubu
Fenolik Asitler	Anakardik asit, ellagik asit, atranorin ve bergenin	Üreazın aktif bölgesindeki nikel iyonlarıyla etkileşime girer.
Stilbenler	Resveratrol	-
Stilbenler	2,3,4,4'Tetrahidroksidihidrotilbene	Hidroksil grubu
Kateşinler	Epigallokateşin gallat, gallokateşin gallat, gallokateşin ve epigallokateşin	-

Tablo 1'in devamı

Flavonlar	5,7,4'-Trihidroksi-3'-(3-hidroksimetilbutil)-3,6 dimetoksiflavon ve 5,7- dihidroksi-3'-(2-hidroksi-3- metil-3-butenil)-3,6,4'-trimetoksiflavon	Hidroksil grubu
Flavonlar	Kuersetin	Hidroksil grubu
Flavon O-glikozit	Baicalin	Üreazın aktif bölgesindeki tiyol grupları ile etkileşime girer.
Flavon O-glikozit	Scutellarin	Üreazın aktif bölgesindeki sülfhidril grupları ile etkileşime girer.
Flavon C-glikozit	Orientin	Şeker kısmı
Flavanonlar	Ponciretin	-
Isoflavonoidler	7,8,4'-Trihidroksiisoflavone	Hidroksil grubu
Isoflavonoidler	7,8,4'-Trihidroksi-2-isoflavene	Hidroksil grubu
Kumarinler	Kumarin glikozit	Şeker kısmı
Alkaloidler	3'-Hidroksiepiglukoisatisin ve epiglukoisatisin	Hidroksil/karbonil kısmı
Quinonlar	3-Methoksidalbergione	-
Sfingolipidler	Ofiamid A ve ofiamid B	Şeker kısmı
Sülfür bileşikler	İberin ve sülforafan	Sülfür kısmı
Sülfür bileşikler	Allicin	Üreazın aktif bölgesindeki SH grubuyla etkileşime girer.
Diğer bileşikler	2-Hexenal	-

1.3.6. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları

Üreazın farklı alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Tıp, gıda endüstrisi, gübre ve atık suları gibi yaygın kullanım alanlarıdır. Tıpta, klinik uygulamalarda üre ölçümü bazı metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde üreyi yiyecek ve

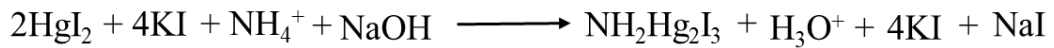
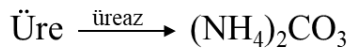
meyve sularından uzaklaştırmada kullanılır. Atık sulardaki ve gübredeki ürenin dönüştürülmesinde kullanılır (Çınar vd., 2017).

1.3.7. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri

Üreaz aktivitesini değerlendirmek için amonyak salınımı, CO₂ salınımı veya pH artışını izleyen testler olmak üzere çeşitli yöntemler mevcuttur. Her ne kadar üreaz substratının doğrudan spektrofotometrik tayini mümkün olsa da, üreaz için kullanılan yöntemler esas olarak amonyak için Weatherburn veya Nessler reaktifleri veya fenol kırmızısı veya bromotimol mavisi gibi pH indikatörleri kullanılarak üre ayrışmasının alkali ürünlerinin tespitine adanmış fotometriye dayanmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda, gümüş ve altın nanopartiküllerin oluşturduğu kompleksleri araştıran fotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Floresan üreaz analizleri için altın nanokümler uygulanmıştır. Kalorimetrik, potansiyometrik, radyometrik ve kemilüminesans bazlı üreaz analizlerinin yanı sıra enzimatik üre hidrolizi ürünlerinin kondüktometrik veya florometrik tespiti ile elektroforez de literatürde bildirilmiştir (Bzura ve Koncki, 2019).

Üreaz aktivite tayin yöntemlerinden yaygın kullanılan bazıları şunlardır:

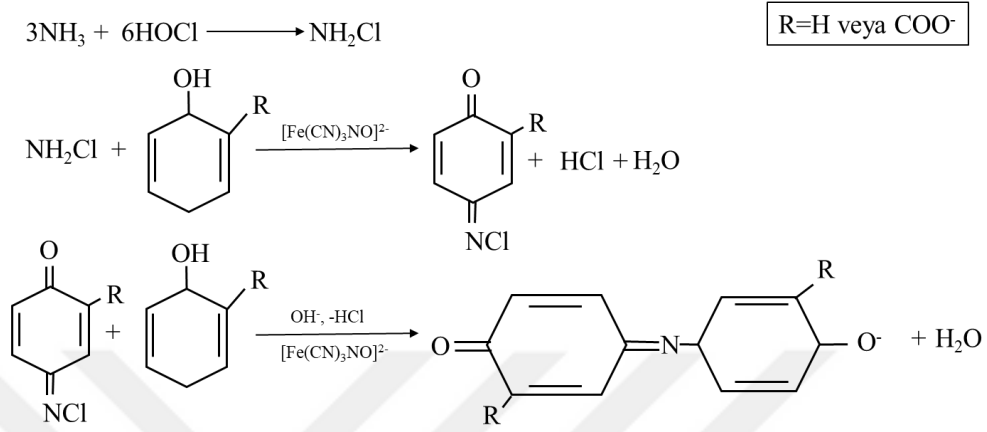
Nessler Yöntemi: Sabit zaman noktalı bir spektrofotometrik analiz olan Nesslerizasyon reaksiyonu, amonyağı KI ve Hgl (amonyak renk reaktifi) içeren Nessler reaktifiyle reaksiyona sokar. Fenol-hipoklorit testinde gözlemlenen yoğun mavi renk yerine (625 nm'de maksimum absorban), iki ila dört kat daha az yoğun turuncu renk gelişir. Yüksek hassasiyet gerekmediğinde ve hücrel bileşenlerin müdahalesi olmadığında bu test uygundur çünkü hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilebilir (Mobley ve Hausinger, 1989).



Şekil 13. Nessler yöntemi reaksiyon mekanizması

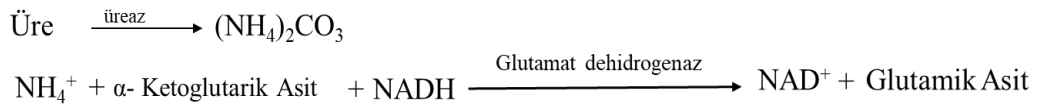
Weatherburn Yöntemi: Halen en yaygın olarak kullanılan amonyak tayin metodlarından ve Weatherburn tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemdir. Üreazın üreden belli koşullarda birim zamanda oluşturduğu amonyak miktarı dikkate alınarak üreaz aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum

nitroprosit eşliğinde üreazın, üre ile enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan NH_3 , fenol ile tepkimeye girerek mavi renkli bir çözelti oluşturmaktadır. 625 nm’de oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Kalfa, 2016).



Şekil 14. İndofenol oluşum mekanizması

Çift Enzim Yöntemi: Hastalık teşhisi için yapılan tetkiklerde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntem çift enzim yöntemidir. Ölçülebilir bir özelliğe sahip olmayan substrat veya ürün için ikinci bir enzim kullanılarak ölçülebilir bir sonuç elde edilmeye çalışılır. Üreazın ürünü amonyak ve karbondioksit aşağıdaki birinci reaksiyonda spektrofotometrik olarak ölçülemez. İkinci enzimatik reaksiyon sayesinde glutamat dehidrogenaz enzimi NADH ’ı koenzim olarak kullanır ve 340 nm’de reaksiyon takip edilerek tayin yapılır. (Kırkbir, 2018).



Şekil 15. Çift enzim yöntemi reaksiyon mekanizması

Potansiyometrik Yöntem: Amonyum iyonu üretimi, amonyum iyonu seçici bir elektrot kullanılarak doğrudan ölçülebilir ve potansiyometrik olarak test edilebilir. Bu yöntemin duyarlılığı düşüktür. Bu yöntem inhibitörlerden etkilenmez; ancak testte tampon kullanılmaz ve analiz sırasında çözeltinin iyonik gücü değişir, bu da bazı üreazların aktivitesini etkileyebilir (Mobley ve Hausinger, 1989).

Fenol Kırmızısı Yöntemi: Çözelti pH'ındaki değişiklikler kolorimetrik pH indikatörleri ile takip edilebilmektedir. Üre hidrolizi pH artışına neden olur ve bu değişim fenol kırmızısı gibi bir pH göstergesi varlığında spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir (Mobley ve Hausinger, 1989).

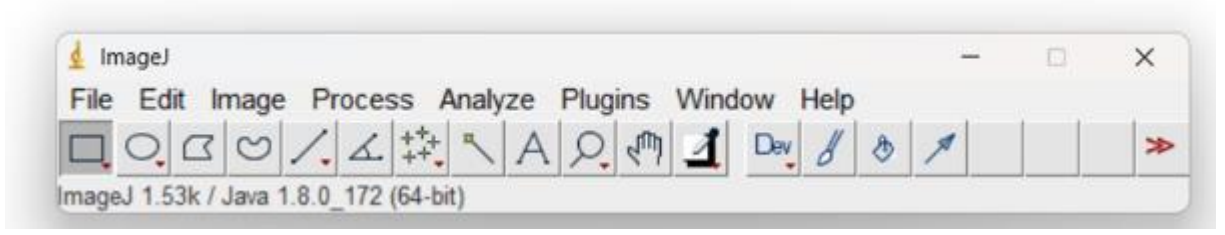
1.4. Renk Analizi ile Biyoaktivite Çalışmaları

Çalışma sonucunda oluşan görüntülerin bir bilgisayar ya da mikroskop ortamına aktarılarak, çalışma hangi amaçla değerlendirilmek isteniyorsa o amaca uygun bir görüntü analiz programı kullanılarak yapılması son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Görüntülerin analizleri bu programlar ile gerek yapısal olarak gerekse renk değeri olarak belirlenmektedir. Renk analizi yaparak maddenin biyoaktivite özelliğinin ortaya konulduğu doğrudan çalışmalar yeni gelişim göstermektedir (İskefiyeli, 2014).

Kolorimetrik yöntem kullanılarak fenolik bileşiklerin analizinde çalışmalar yapılmıştır. Molecularly Imprinted Polymer (MIP) membran üzerinde suyun yapısında bulunan fenolikler bileşiklerin analizi bu çalışmalara örnek verilebilir. Membran üzerin de fenolik bileşenlerin farklı absorbans değeri göstermesi ile bu bileşikler analiz edilmiştir (Sergeyeva vd., 2010). Diğer bir kolorimetrik çalışma da ise çalışmanın sonunda derişiminin artışıyla renk değerinin orantılı bir şekilde olduğu belirtilen, fenol, bisfenol A, katekol ve krisol gibi fenolikleri içeren bileşikler kağıt üzerine entegre edilen bir enzim üzerine numune uygulanmış olan çalışmadır (Ramis vd., 2012). Son zamanlarda yapılan diğer çalışmalar ise DPPH giderme ve FRAP gibi antioksidan tayin yöntemlerinin renk analizi ile geliştirilmesidir (İskefiyeli, 2014).

1.5. “Image J” Renk Ölçüm Programı

Son yıllarda yapılan analizlerin sonucunda elde edilen görüntülerin bilgisayarlara aktarılması ve üzerlerinde ölçüm yapılmasına olanak sağlayan programlar geliştirilmiştir. Bu programların çoğu oldukça pahalı programlardır. Bunun yanı sıra görüntü analizinde ve çeşitli ölçümlerde kullanılan mevcut çalışma için renk analizinde kullanılan Image J programı ücretsizdir. Farklı alanlarda analiz çeşitliliği ve ücretsiz olmasından dolayı çok çeşitli bilim dallarında kullanılan bir programdır.



Şekil 16. Image J programının göstergesi

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarları ve Hitit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü araştırma laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Denemelerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası ve Modeli
UV-Vis spektrofotometre	Thermo Scientific-Genesys 10s
Analitik terazi	Mettler Toledo MS204 Shimadzu ATX 224
pH metre	PH-013
Vorteks	Dragon Lab-MX-S
Mikropipet (1000 µL)	Jencons Sealpette Pro
Mikropipet (100 µL)	Hirschmann Labopette
Tablet	İpad-MD525TU/A- 4. Nesil
Kamera	İphone 12/ 12 megapiksel

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Kimyasalın Adı	Safılık Derecesi	Firması
Üre	%99	Isolab
AgNO ₃	%99	Sigma Alderich
Disodyum hidrojen fosfat	%99	Sigma Aldirch
Üreaz	1U/mg	Sigma
Fenol kırmızısı	-	Merck
Borik asit	%99,8	Uparc

2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Tablo 4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0,05 M Na ₂ HPO ₄	7,098 g Na ₂ HPO ₄ saf suda çözüldü pH'ı 6,8 ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
125 mM üre (H ₂ N-CO-NH ₂)	0,750 g üre 100 mL 0,05 M fosfat tamponunda çözülmüştür.
100 mM üre (H ₂ N-CO-NH ₂)	0,6006 g üre 100 mL 0,05 M fosfat tamponunda çözülmüştür.
75 mM üre (H ₂ N-CO-NH ₂)	0,450 g üre 100 mL 0,05M fosfat tamponunda çözülmüştür.
50 mM üre (H ₂ N-CO-NH ₂)	0,300 g üre 100 mL 0,05M fosfat tamponunda çözülmüştür.
25 mM üre (H ₂ N-CO-NH ₂)	0,150 g üre 100 mL 0,05M fosfat tamponunda çözülmüştür.
0,04 mg/mL Fenol Kırmızısı	4 mg fenol kırmızısı 100 mL üre (fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde çözülmüştür.
3 mg/mL üreaz	30 mg üreaz tartılıp, 10 mL 0,05 M fosfat tamponunda çözülmüştür. (Tartılan enzimin 1/3 oranında tampon çözeltisi ile hazırlanmıştır.)
5 µM AgNO ₃	İlk olarak 1 mM AgNO ₃ hazırlandı. 17 mg AgNO ₃ 100 mL saf suda çözüldü. Daha sonra ilk olarak 0,1 mM seyreltildi. 0,1 mM AgNO ₃ 'te 5 µM AgNO ₃ 'e seyreltildi.
50 mM Borik Asit	0,155 g üre 50 mL saf suda çözülmüştür. Borik asit ile yapılan çalışmalar bu hazırlanan borik asitten seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.4. Yöntemin Geliştirilmesi

Yöntem geliştirilmesi sırasında enzim derişiminin belirlenmesi, reaksiyon süresi, reaksiyonu durdurması için pipetlenen AgNO₃ derişimi ve pipetlenme zamanı, fenol kırmızısı derişimi gibi bazı parametreler çalışılmıştır. Image J programı için çekilen fotoğraflar kamera (telefon) ile çekildikten sonra JPG formatında bilgisayara ve Image J programına atılmıştır. Kullanılan kameranın çözünürlüğü 12 megapikseldir.

Enzim Derişimi (IU/mg): Bu çalışmada kullanılacak enzim derişimi belirlemek için 8 farklı enzim derişimi ile ön çalışma yapılmıştır. Bu enzim derişimleri sırasıyla 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 20

mg/mL şeklindedir. Enzim çözeltileri, tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH'sı 6,8, derişimi 0,050 M olan Na_2HPO_4 kullanılmıştır. Bununla birlikte substratta (üre) yine aynı tampon içerisinde 100 mM olarak hazırlanmıştır. Fenol kırmızısı ise hazırlanan üre çözeltisi içerisinde derişimi 0,04 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. 0. dakikadan başlayarak 40. dakikaya kadar 5 dakikalık aralar ile 570 nm'de absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan enzim derişimleri arasında çalışmamız için uygun olan enzim derişimi belirlenmiştir.

Tablo 5. Kontrol ve kontrol körü pipetleme prosedürü

	Kontrol (K)	Kontrol Körü (KK)
Enzim çözücüsü (tampon)	-	500 μL
Enzim	500 μL	-
İnhibitör çözücüsü (su)	500 μL	500 μL
15 dakika inkübasyon		
Substrat (üre) + fenol kırmızısı	500 μL	500 μL

Substrat Derişimi: Ön denemelerimizde 3 farklı substrat derişimi kullanılmıştır. Bu derişimler 31,25 mM, 62,5 mM ve 125 mM şeklindedir. Substrat olarak üre kullanılmıştır. Enzim çözeltisi (IU/mg) (3 mg/mL), tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH'sı 6,8, derişimi 0,05 M olan Na_2HPO_4 kullanılmıştır. Substrat çözeltileri de aynı tamponda farklı derişimde hazırlanmıştır. Fenol kırmızısı derişimi ise her substrat çözeltisi içinde 0,04 mg/mL'dir. 30. dakikada 570 nm'de absorbans okumaları gerçekleşmiştir.

Fenol Kırmızısı Derişimi: Yöntemimiz için en uygun fenol kırmızısı derişimini belirlemek için 3 farklı fenol kırmızısı derişimi seçilmiştir. Enzim çözeltisi (1U/mg) (3 mg/mL), tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH'sı 6,8, derişimi 0,05 M olan Na_2HPO_4 kullanılmıştır. Substrat çözeltisi de aynı tamponda 100 mM derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 mM substrat çözeltisi içinde 0,02 mg/mL, 0,04 mg/mL ve 0,08 mg/mL derişim olmak üzere 3 farklı fenol kırmızısı çözeltisi hazırlanmıştır.

AgNO_3 Derişimi: Yöntemimizde mikrolaka üzerinden fotoğraf çekimi yapılacağından belli bir süre sonra reaksiyonu durdurmamız gerekmiştir. Bunun içinde

AgNO₃ 4 farklı derişimi ile deneme yapılmıştır. Bu dört derişim 5 µM, 50 µM, 250 µM ve 500 µM şeklindedir. Enzim çözeltisi (300U/mg) (0,125 mg/mL), tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH'sı 6,8, derişimi 0,05 M olan Na₂HPO₄ kullanılmıştır. Substrat çözeltisi de aynı tamponda 100 mM derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 mM substrat çözeltisi içinde 0,04 mg/mL derişim olmak üzere fenol kırmızısı çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra substrat çözeltisi ilave edildikten 5 dakika sonra AgNO₃'ün farklı derişimleri pipetlenmiş ve AgNO₃ çözeltisinin kontrol çözeltisinde absorbansta nasıl bir değişim yaptığı 60 dakika boyunca takip edilmiştir.

Tablo 6. AgNO₃ derişimi belirlemek için pipetleme prosedürü

	Kontrol (K)	Kontrol Körü (KK)
Enzim Çözücüsü (Tampon)	-	500 µL
Enzim	500 µL	-
İnhibitör Çözücüsü (su)	500 µL	500 µL
	15 dakika inkübasyon	
Substrat (üre) + Fenol Kırmızısı	500 µL	500 µL
	5 dakika sonra	
AgNO ₃	500 µL	500 µL

pH- UV-Vis Absorbans Değerlendirmesi: Bu çalışmada enzimatik reaksiyon sonucu pH artışı meydana gelmektedir. pH artması ile birlikte UV-Vis spektrofotometre cihazında okunan absorbans değeri de artmaktadır. pH değiştikçe, pH 6,0'dan başlayarak pH 9,0'a kadar absorbanstaki değişimin nasıl olduğu gözlenmiştir. Çalışma yapılırken enzimsiz olarak sadece pH-absorbans değişimi takip edilmiştir. Ayrıca Image J programında Kırmızı (Red)- Yeşil (Green)- Mavi (Blue) (RGB) içinden Yeşil=Green formatta hesaplaması yapılmıştır. Şekil 17'de kuyucuk içindeki sayılar kuyucuk içerisindeki çözeltinin pH'sıdır.



Şekil 17. pH'ya bağlı renk değişiminin mikrolakadaki görüntüsü

2.5. Optimizasyon

Optimizasyon yapılırken bu tez için en çok önem arz eden mikrolaka, ışık kaynağı, kamera uzaklığı gibi parametreler dikkate alınmıştır.

Tablo 7. Genel pipetleme prosedürü

	Kontrol (K)	Kontrol Körü (KK)
Enzim Çözücüsü (tampon)	-	500 µL
Enzim	500 µL	-
İnhibtör Çözücüsü (su)	500 µL	500 µL
	15 dakika inkübasyon	
Substrat (üre) + Fenol Kırmızısı	500 µL	500 µL
	30 dakika sonra	
AgNO ₃	500 µL	500 µL

Optimizasyon çalışmaları ise şu şekildedir;

Mikrolaka - Işık Kaynağı Etkisi: Bu parametrede mikrolaka, kutu diye belirttiğimiz bir sistem içerisinde, oda koşullarında beyaz kağıt üzerinde ve oda koşullarında tablet üzerinde olmak üzere üç farklı ortam ışığı etkisi çalışılmıştır. Enzim çözeltisi (1U/mg) (3 mg/mL), tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH'sı 6,8,

derişimi 0,05 M olan Na_2HPO_4 kullanılmıştır. Substrat çözeltisi de aynı tamponda 100 mM derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 mM substrat çözeltisi içinde 0,04 mg/mL derişim olmak üzere fenol kırmızısı çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra substrat çözeltisi ilave edildikten 30 dakika sonra 5 μM AgNO_3 'ün pipetlenmiştir. Çalışma kontrol ve kontrol körü ile yapılmıştır. 3 çalışma içinde aynı çözeltiler kullanılmıştır.



Şekil 18. Kutu içerisindeki görüntü



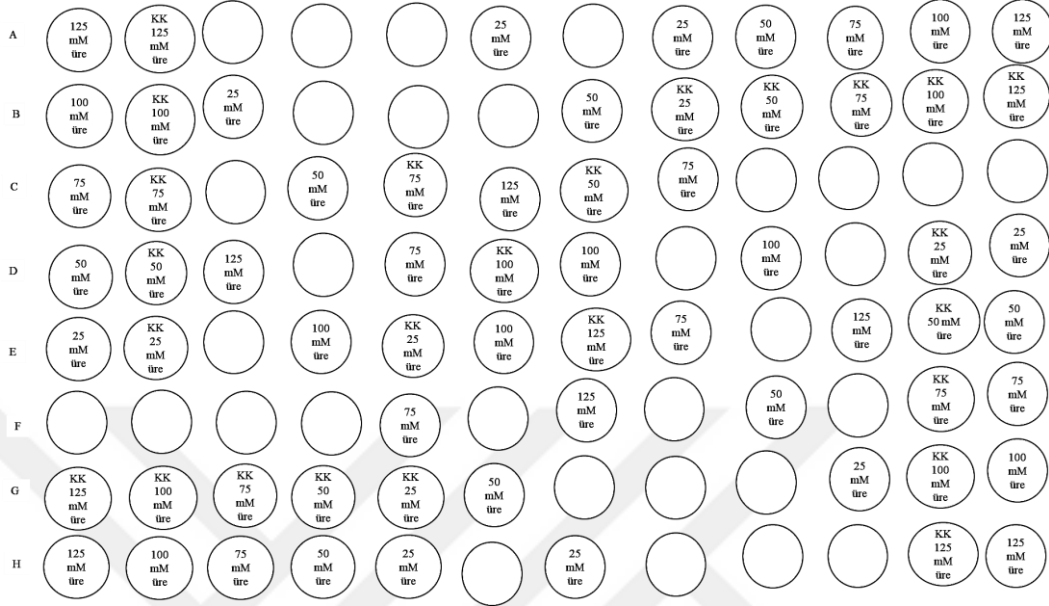
Şekil 19. Kağıt üstü görüntü



Şekil 20. Tablet üstü görüntü

Mikroplaka - Işık Kaynağı Arasındaki Mesafenin Etkisi: Bu parametrede mikroplaka, kutu diye belirttiğimiz bir sistem içerisinde raflar mevcuttur. Mikroplaka yerleştirilen raf ve sistem tabanın arası 8 cm.dir. Tabandan 3 farklı yükseklik olacak şekilde ölçümler alınmıştır. Bu ölçümlerde ışık kaynağı olarak kullanılan tablet tabana 0 cm olacak şekilde yerleştirildi, daha sonra tabandan 2 cm yükseklikte bir platform konularak tablet yerleştirildi ve son olarakta tabana 6 cm yükseklikte bir platform konularak ışık kaynağı yerleştirildi. Işık kaynağı tabana 0 cm, Işık kaynağı tabandan 2 cm yükseklikte ve ışık kaynağı tabandan 6 cm yükseklikte olmak üzere 3 ölçüm alınmıştır. Ayrıca çalışmada 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100

mM ve 125 mM olmak üzere 5 farklı substrat derişim ile çalışılmıştır. Şekil 21, Şekil 22 ve Şekil 23 pipetleme şablonu A'ya göre pipetlenmiştir.



Pipetleme Şablonu-A

K 125 mM:125 mM üre Kontrol, KK 125 mM:125 mM üre Kontrol Körü

K 100 mM:100 mM üre Kontrol, KK 100 mM:100 mM üre Kontrol Körü

K 75 mM: 75 mM üre Kontrol, KK 75 mM: 75 mM üre Kontrol Körü

K 50 mM: 50 mM üre Kontrol, KK 50 mM: 50 mM üre Kontrol Körü

K 25 mM: 25 mM üre Kontrol, KK 25 mM: 25 mM üre Kontrol Körü



Şekil 21. Işık kaynağı ile mikropilaka tabanı arası 0 cm iken mikropilaka görüntüsü



Şekil 22. Işık kaynağı ile mikroplaka tabanı arası 2 cm iken mikroplaka görüntüsü



Şekil 23. Işık kaynağı ile mikroplaka tabanı arası 6 cm iken mikroplaka görüntüsü

Sonuçlar değerlendirilirken 3 farklı mesafede 5 farklı derişimin paralellerinin (8 adet kontrol ve 5 adet kontrol körü) ortalamaları, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları kullanılmıştır. Bununla birlikte mikroplaka tamamını temsil etmesi adına mikroplaka farklı uzaklıktaki ve bölgedeki kuyucuklarına pipetlemeler yapılmıştır.

Mikroplaka - Kamera Arasındaki Mesafenin Etkisi: Bu parametrede mikroplaka, kutu diye belirttiğimiz bir sistem içerisinde raflar mevcuttur. Her rafın arası 5 cm.dir. Ancak ilk

raf yüksekliği mikrolakadan 10 cm yukarisından başlamaktadır. Işığ kaynağı 0 cm de iken bu ölçümler yapılmıştır. Bununla birlikte 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM ve 125 mM olmak üzere 5 farklı substrat derişimi ile çalışılmıştır. Şekil 24, Şekil 25 ve Şekil 26 pipetleme şablonu A'ya göre pipetlenmiştir.



Şekil 24. Kamera 15 cm yukarıda iken mikrolaka görüntüsü



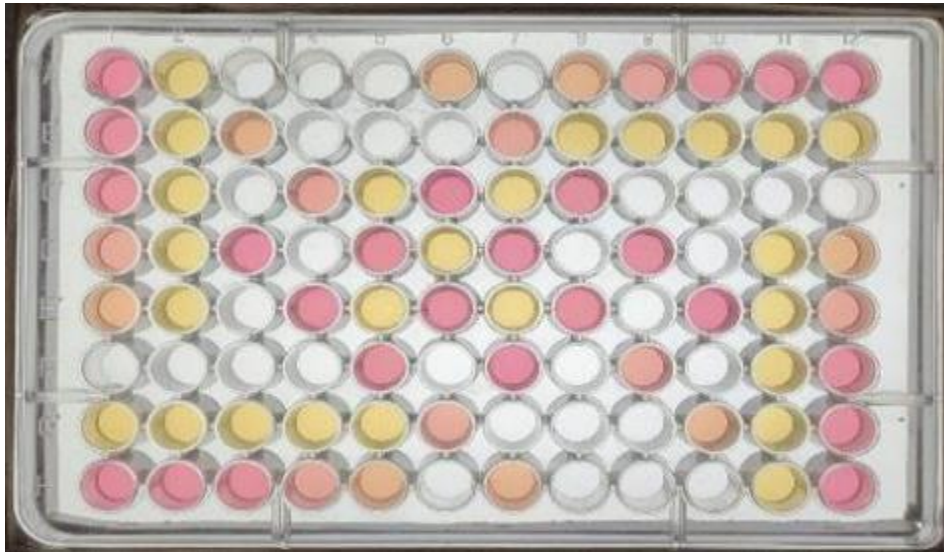
Şekil 25. Kamera 20 cm yukarıda iken mikrolaka görüntüsü



Şekil 26. Kamera 25 cm yukarıda iken mikroplaka görüntüsü

Sonuçlar değerlendirilirken 3 farklı mesafede 5 farklı derişimin paralellerinin (8 adet kontrol ve 5 adet kontrol körü) ortalamaları, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları kullanılmıştır. Bununla birlikte mikroplaka tamamını temsil etmesi adına mikroplaka farklı uzaklıktaki ve bölgedeki kuyucuklarına pipetlemeler yapılmıştır.

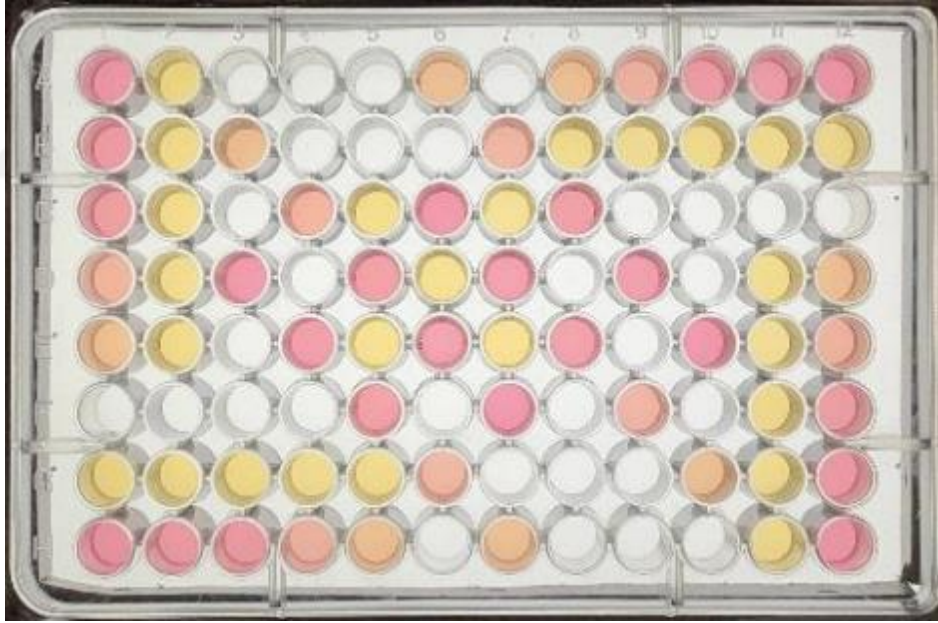
Işık Kaynağının Parlaklığının Etkisi: Işık kaynağı olarak kullanılan tablet ışık şiddeti %60, %80 ve %100 olmak üzere 3 farklı parlaklıkta ölçüm alınmıştır. Ölçümler kutu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kamera mikroplakadan 25 cm yukarıda iken fotoğraf çekilmiştir. Şekil 27, Şekil 28 ve Şekil 29 pipetleme şablonu A'ya göre pipetlenmiştir.



Şekil 27. Işık kaynağının parlaklığı %60



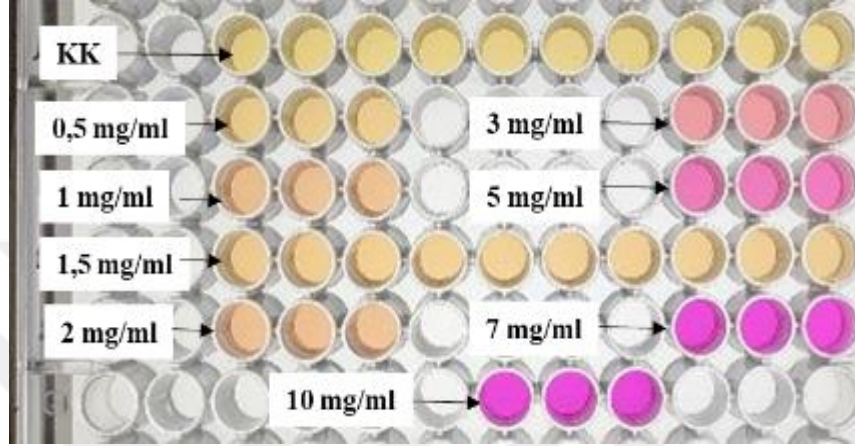
Şekil 28. Işık kaynağının parlaklığı %80



Şekil 29. Işık kaynağının parlaklığı %100

Sonuçlar değerlendirilirken 3 farklı mesafede 5 farklı derişimin paralellerinin (8 adet kontrol ve 5 adet kontrol körü) ortalamaları, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları kullanılmıştır. Bununla birlikte mikroplaka tamamını temsil etmesi adına mikroplaka farklı uzaklıktaki ve bölgedeki kuyucuklarına pipetlemeler yapılmıştır.

Enzim Derişimi: Yöntem geliştirilmesi sırasında 3 mg/mL enzim derişiminin uygun olabileceği karar verilmiş daha sonra 8 farklı enzim derişimi çalışılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Her enzim derişimi için tekrarlı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmaların standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır.



Şekil 30. Farklı enzim derişimleri

Substrat Derişimi: 5 farklı substrat derişim çalışılmıştır. Mikropilaka pipetlemesi şablon-B'ye göre yapılmıştır.

A	K 125 mM üre	N 1 mM BA	KK 125 mM üre					K 25 mM üre	K 50 mM üre	K 75 mM üre	K 100 mM üre	K 125 mM üre
B	K 100 mM üre	N 0,75 mM BA	KK 100 mM üre		K 100 mM üre			N 0,1 mM BA	N 0,25 mM BA	N 0,5 mM BA	N 0,75 mM BA	N 1 mM BA
C	K 75 mM üre	N 0,5 mM BA	KK 75 mM üre		KK 100 mM üre			NK 0,1 mM BA	NK 0,25 mM BA	NK 0,5 mM BA	NK 0,75 mM BA	NK 1 mM BA
D	K 50 mM üre	N 0,25 mM BA	KK 50 mM üre		KK 100 mM üre	K 100 mM üre				KK 25 mM üre	N 0,1 mM BA	K 25 mM üre
E	K 25 mM üre	N 0,1 mM BA	KK 25 mM üre		K 100 mM üre	KK 100 mM üre				KK 50 mM üre	N 0,25 mM BA	K 50 mM üre
F	NK 1 mM BA	NK 0,75 mM BA	NK 0,5 mM BA	NK 0,25 mM BA	NK 0,1 mM BA			KK 100 mM üre		KK 75 mM üre	N 0,5 mM BA	K 75 mM üre
G	N 1 mM BA	N 0,75 mM BA	N 0,5 mM BA	N 0,25 mM BA	N 0,1 mM BA			K 100 mM üre		KK 100 mM üre	N 0,75 mM BA	K 100 mM üre
H	K 125 mM üre	K 100 mM üre	K 75 mM üre	K 50 mM üre	K 25 mM üre					KK 125 mM üre	N 1 mM BA	K 125 mM üre

Şablon- B farklı substrat derişimleri için pipetleme şablonu

K 125 mM:125 mM üre Kontrol, KK 125 mM:125 mM üre Kontrol Körü

K 100 mM:100 mM üre Kontrol, KK 100 mM:100 mM üre Kontrol Körü

K 75 mM: 75 mM üre Kontrol, KK 75 mM: 75 mM üre Kontrol Körü

K 50 mM: 50 mM üre Kontrol, KK 50 mM: 50 mM üre Kontrol Körü

K 25 mM: 25 mM üre Kontrol, KK 25 mM: 25 mM üre Kontrol Körü

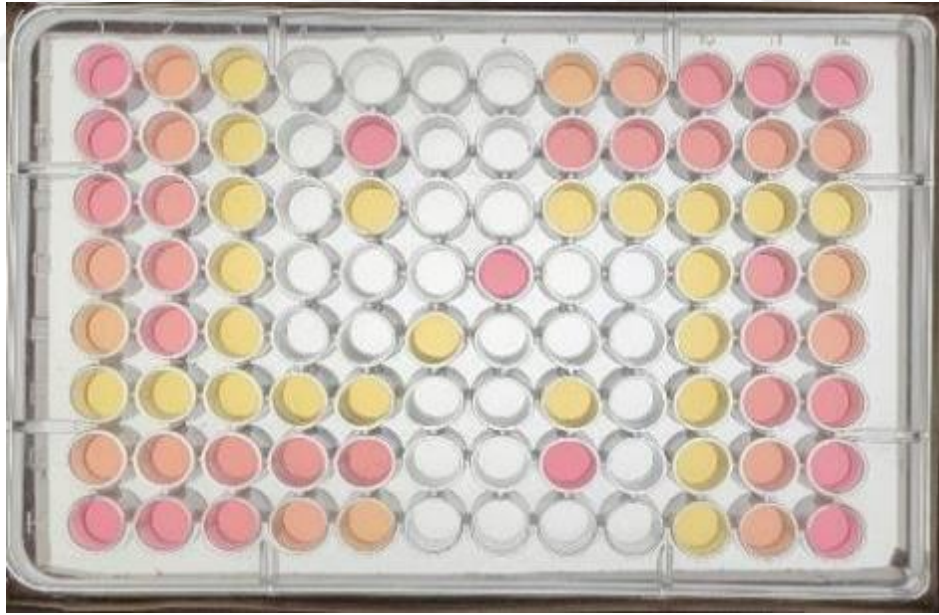
N 1mM BA: 1 mM borik asit numune çözeltisi, NK 1mM BA: 1 mM borik asit için numune körü

N 0,75 mM BA: 0,75 mM borik asit numune, NK 0,75 mM BA: 0,75 mM borik asit için numune körü

N 0,50 mM BA: 0,50 mM borik asit numune, NK 0,50 mM BA: 0,50 mM borik asit için numune körü

N 0,25 mM BA: 0,25 mM borik asit numune, NK 0,25 mM BA: 0,25 mM borik asit için numune körü

N 0,1mM BA: 0,1 mM borik asit numune, NK 0,1mM BA: 0,1 mM borik asit için numune körü



Şekil 31. Farklı substrat derişimleri

Reaksiyon Sıcaklığı: Reaksiyon ortamı 25°C, 35°C ve 45°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta deney gerçekleştirilmiştir. Çalışma kontrol ve kontrol körü ile yapılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat

içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Reaksiyon süresi tamamlandıktan sonra çözeltilerden mikropilaka pipetleme yapılmıştır. Image J de renk analizi ve UV’de okuma yapılmıştır.



Şekil 32. Reaksiyon sıcaklığı (25, 35 ve 45 °C)

Üç sıcaklık içinde, kontrol ve kontrol körü 10 paralel ile çalışılmış standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar hesaplanmıştır.

Mikropilaka Tipinin Etkisi: Düz ve yuvarlak olmak üzere iki farklı mikropilaka kullanılarak Image J de ölçümler yapılmıştır. Aynı kontrol körü ve kontrol çözeltileri ile çalışılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir.



Şekil 33. Düz dipli mikropilaka görüntüsü



Şekil 34. Yuvarlak dipli mikropilaka görüntüsü

İki mikrolaka tipi içinde, kontrol ve kontrol körü 10 paralel ile çalışılmış standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar hesaplanmıştır.

Ortam Işığının Etkisi: Ortam ışığının etkisi için iki farklı zamanda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların ilkinde mikrolaka kağıt üzerinde iken oda içerisinde perdelerin açık ve kapalı olması durumunda analizin nasıl etkilendiğidir. 5 farklı substrat (üre) derişiminin paralellerinin (8 adet kontrol ve 5 adet kontrol körü) ortalamaları, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları kullanılmıştır. Bununla birlikte mikrolaka tamamını temsil etmesi adına mikrolaka farklı uzaklıktaki ve bölgedeki kuyucuklarına pipetlemeler yapılmıştır. İkinci çalışmada ise mikrolaka kağıt üzerinde, tablet üzerinde ve kutu içerisinde olmak üzere üç farklı ışık ortamında çalışma yapılmıştır. Kutu içerisinde mikrolaka karanlık bir ortamda, kağıt ve tablet üzerinde ise oda koşullarındaki ışık ortamının değerlendirilmesi yapılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Şekil 35 ve Şekil 36 pipetleme şablonu A'ya göre pipetlenmiştir.



Şekil 35. Perde açık iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü



Şekil 36. Perde kapalı iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü



Şekil 37. Kutu içerisinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü

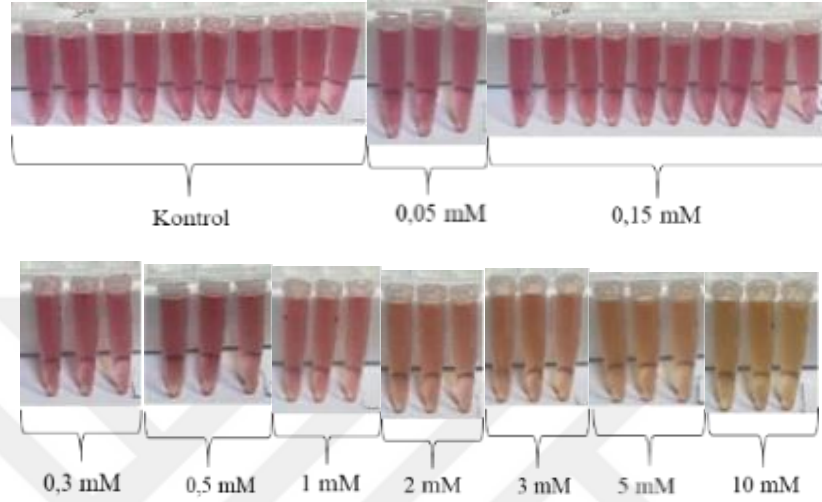


Şekil 38. Oda koşullarında kağıt üzerinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü

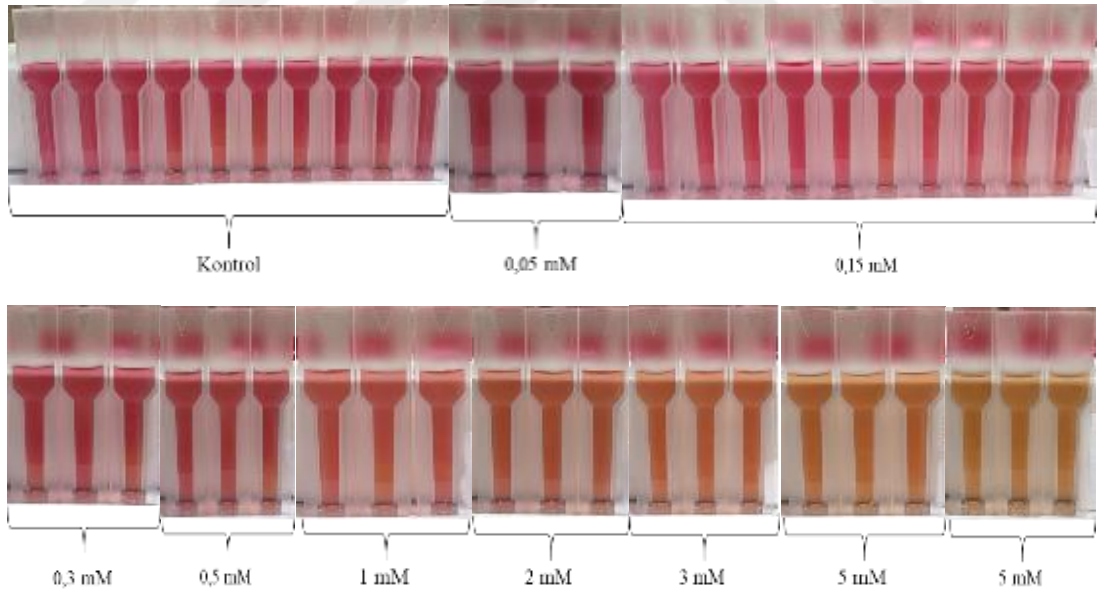


Şekil 39. Oda koşullarında tablet üzerinde iken fotoğrafı çekilen mikrolaka görüntüsü

Farklı Reaksiyon Kaplarında Fotoğraf Alınması (Küvet, Ependorf): Farklı derişimlerde hazırlanan borik asit ile yapılan çalışmada çözelti UV küvet ve ependorf içerisinde iken fotoğrafları çekilmiştir. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir.



Şekil 40. Farklı borik asit derişimlerinin ependorf içerisinde görüntüsü



Şekil 41. Farklı borik asit derişimlerinin UV küvet içerisinde görüntüsü

UV küvet ve ependorfta fotoğrafları çekilen borik asitin farklı derişimleri için Image J programından ölçümler alınmış ve her ikisi içinde standart sapma ve bağıl standart sapmalar hesaplanmıştır.

2.6. Validasyon

LOD (Tespit Limiti)- LOQ (Tayin Limiti): Tespit limitinin hesaplanmasında kullanılan yöntem tekrarlı çalışılan düşük derişimlerdeki borik asit testi sonucu hesaplanan standart sapma değerin 3 katının alınmasıdır. Tayin limitinin hesaplanmasında kullanılan yöntem ise tekrarlı çalışılan düşük derişimlerdeki borik asit testi sonucu hesaplanan standart sapma değerin 10 katının alınmasıdır. LOD ve LOQ çalışması için 0,15 mM derişimde borik asit tekrarlı olarak çalışılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Sanco, NMLK Validation Guide ve Eurachem Method Validation Guide bu hesaplamada referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 42. 0,15 mM borik asit 10 tekrarlı çalışması

Tespit Limiti (LOD) = 3 x standart sapma

Tayin Limiti (LOQ) = 10 x standart sapma

Tekrarlanabilirlik: Ölçüm tekrarlanabilirliği için borik asit kullanılmıştır. Elde edilen sonuç standart sapma olarak değerlendirilmiştir. Borik asit derişimi 0,15 mM'dır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Eurachem method validation guide ve sanco guide hesaplamada referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 43. 0,15 mM borik asit mikrolaka tekrarlanabilirlik çalışması

Ayrıca tekrarlanabilirlik çalışması için eppendorf ve küvette de tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır.



Şekil 44. 0,15 mM borik asit eppendorf tekrarlanabilirlik çalışması

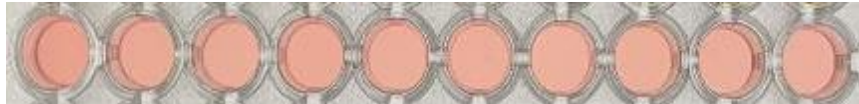


Şekil 45. 0,15 mM borik asit küvet tekrarlanabilirlik çalışması

Günlerarası Tekrarlanabilirlik: Günlerarası Tekrarlanabilirlik için kontrol çalışması ardışık 3 gün tekrarı yapılmıştır. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Elde edilen sonuç standart sapma ve bağıl standart sapma olarak değerlendirilmiştir. Eurachem method validation guide ve sanco guide hesaplamada referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 46. Günlerarası Tekrarlanabilirlik 1. gün çalışması



Şekil 47. Günlerarası Tekrarlanabilirlik 2. gün çalışması



Şekil 48. Günlerarası Tekrarlanabilirlik 3. gün çalışması

Sağlamlık: Sağlamlık çalışması için 25°C, 26°C ve 27°C olmak üzere ardışık 3 sıcaklıkta deney gerçekleştirilmiştir. Substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. Elde edilen sonuç standart sapma ve bağıl standart sapma olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 49. Sağlamlık 25°C çalışması



Şekil 50. Sağlamlık 26°C çalışması



Şekil 51. Sağlamlık 27°C çalışması

2.7. Çeşitli Numunelerde Geliştirilen Yöntem ile Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi

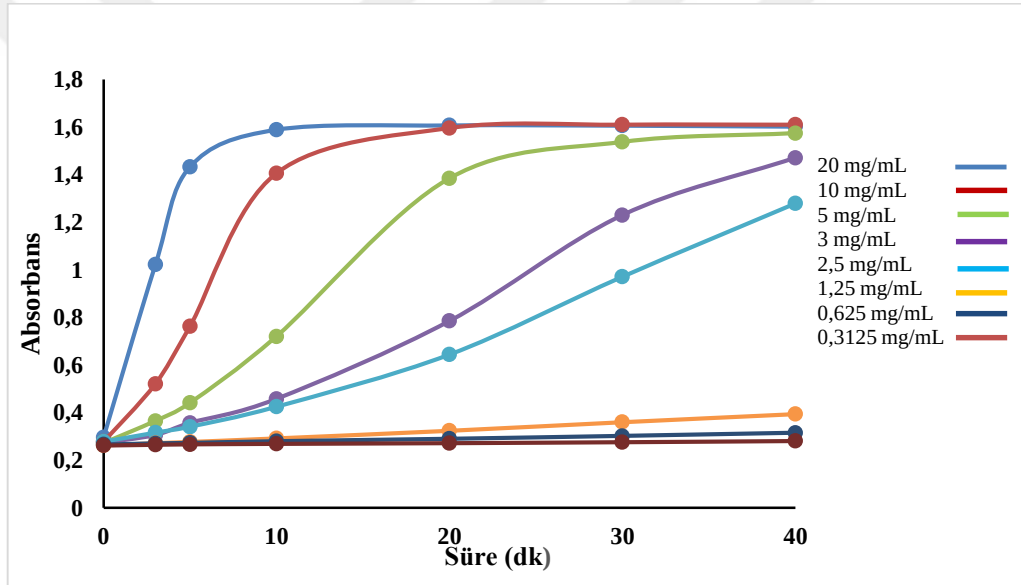
Geliştirilen yöntem yeşil çay ekstresi ve K.T.Ü Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Olcay Bekircan tarafından sentezlenen iki adet yeni tiyadiazol ile çalışılmıştır. Yeşil ay ekstresi için 20 gr yeşil çay 200 mL saf suda 3 saat boyunca bir manyetik karıştırıcı üzerinde ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt 0,22 µm şınga filtreden geçirilmiştir ve analiz edilene kadar +4 °C’de saklanmıştır.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Enzim Derişimi

Yöntem geliştirilirken 8 farklı derişim enzim çözeltisi kullanılmıştır. Süre geçtikçe absorbans artmıştır. Yüksek enzim derişimlerinde kısa sürede maksimum absorbansa ulaşılmıştır. Maksimum absorbansa ulaşıldıktan sonra absorbansa değerleri sabit kalmış ve değerlerin sabit olduğu görölmüştür. Düşük enzim derişimlerinde ise absorbansta çok fazla değişiklik olmamıştır. Bu çalışma kontrol ve kontrol körü şeklinde yapılmıştır. Grafik, süreye karşı absorbans olarak çizilmiştir.

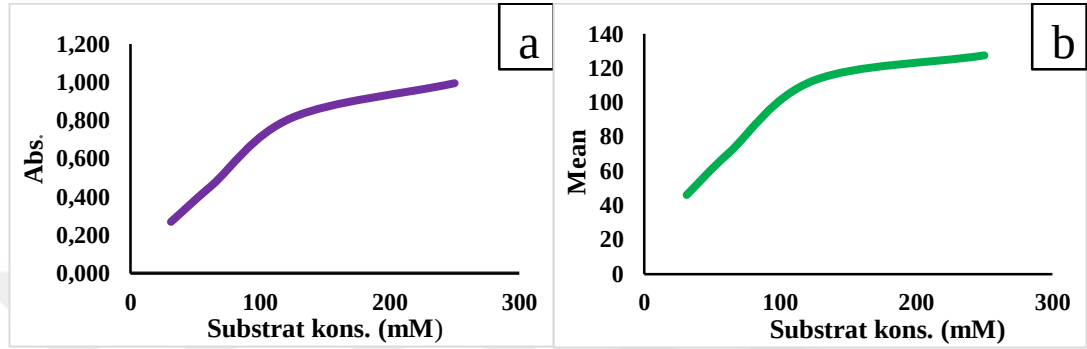


Şekil 52. Farklı enzim derişimi grafiği

Absorbans değerleri ve süreler birlikte değerlendirildiğinde geliştirdiğimiz yöntemde enzim derişimi olarak 3 mg/mL olarak belirlenmiştir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda da bizim çalışmamızda olduğu gibi üreaz aktivitesi arttıkça absorbans çok hızlı artmıştır. Xie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, üreaz yokluğunda rengin sarı olduğu, üreazın artmasıyla rengin sarıdan turuncuya ve kırmızıya doğru kademeli olarak değiştiği net bir renk değişimi gözlenmiştir (Xie vd., 2018). Jannah ve Kim'in yaptığı çalışmada ise üreaz konsantrasyonu arttıkça pH'ın arttığını ifade etmişlerdir (Jannah ve Kim, 2019)

3.2. Substrat Derişimi

Yöntem geliştirilirken farklı substrat derişimi kullanılmıştır. Bu çalışma kontrol ve kontrol körü şeklinde yapılmıştır. Grafik, substrat (üre) derişimine karşı absorbans ve Image J ile elde edilen renk mean değeri olarak çizilmiştir.



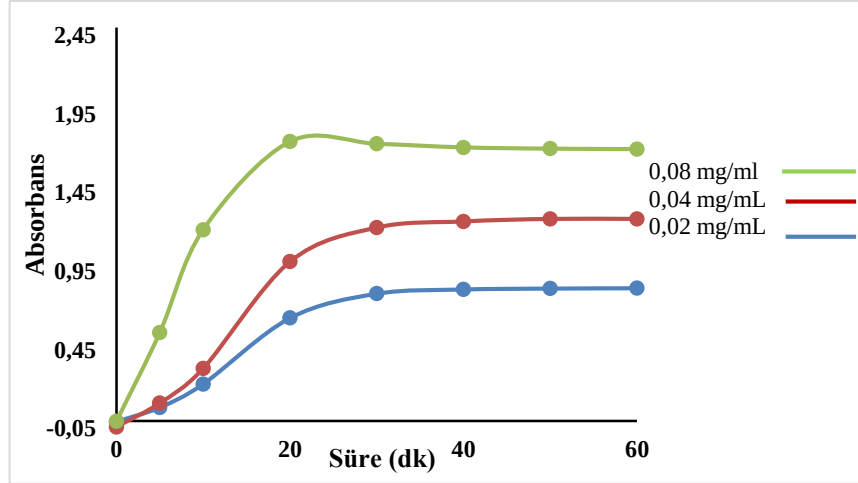
Şekil 53. Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişim- absorbans ve b) substrat (üre) derişim- mean grafiği

Literatür araştırmaları da göz önünde bulundurularak yaptığımız çalışmada bizim çalışmamız için en uygun substrat derişiminin 100 mM olduğunu tespit ettik. Bunu değerlendirirken substrat ile enzim reaksiyona girdiğinde 30. dakikada okuduğumuz absorbans değeri için en uygun olan substrat derişiminin 100 mM olduğuna karar verilmiştir.

Tavares ve arkadaşları değışen üre derişimine karşı yaptığı çalışmanın sonucunu üre derişimi arttıkça renk koyuluğu artmış ve bu durum üreaz aktivitesinin maksimum aktiviteye ulaşana kadar kademeli olarak artmıştır şeklinde ifade etmişlerdir (Tavares, vd., 2021).

3.3. Fenol Kırmızısı Derişimi

Çalışmamızdaki renk dönüşümü takibi, fenol kırmızısının pH değışimine bağlı olarak sarıdan pembeye dönüşen renk değışimi ile sağlanmışır. Literatüre bakıldığında bu yöntem için en uygun fenol kırmızısı derişiminin 0,04 mg/mL olduğu görülmüştür. Çalışmamız için en uygun fenol kırmızısı derişimini için 3 farklı derişim ile deneme yapılmıştır. Bu çalışma kontrol ve kontrol körü şeklinde yapılmıştır. Süreye karşı absorbans grafiği çizilmiştir.

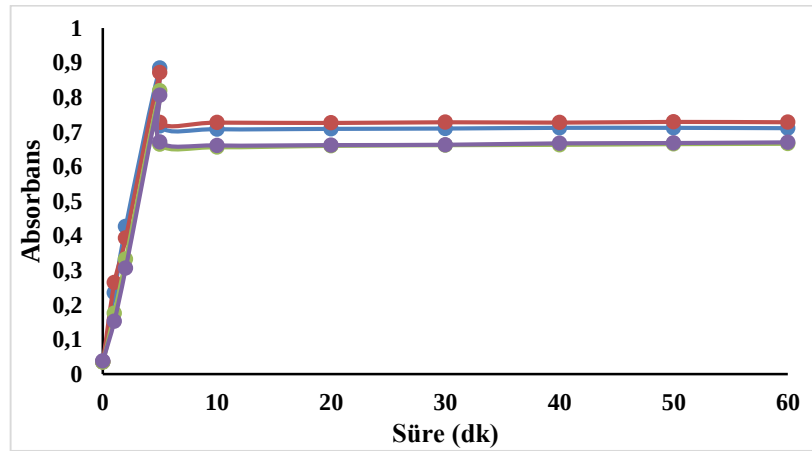


Şekil 54. Farklı derişimlerde fenol kırmızısı için absorbans-süre grafiğı

Absorbans değerleri ve süreler birlikte değerlendirildiğinde geliştirdiğimiz yöntemde fenol kırmızısı derişimi olarak 0,04 mg/mL olarak belirlenmiştir.

3.4. AgNO₃ Derişimi

Çalışmamızda renk dönüşümü takibi yapılmıştır. Ancak çalışma enzimatik devam eden bir reaksiyon olduğu için belirli bir sürede reaksiyonu durdurmamız gerekmiştir. Bunun için iyi bir üreaz inhibitörü olan AgNO₃ kullanılmıştır. Farklı derişimlerde AgNO₃ pipetlendikten sonra süreye karşı verdiği absorbans değerleri takip edilmiştir. Bu çalışma kontrol ve kontrol körü şeklinde yapılmıştır.

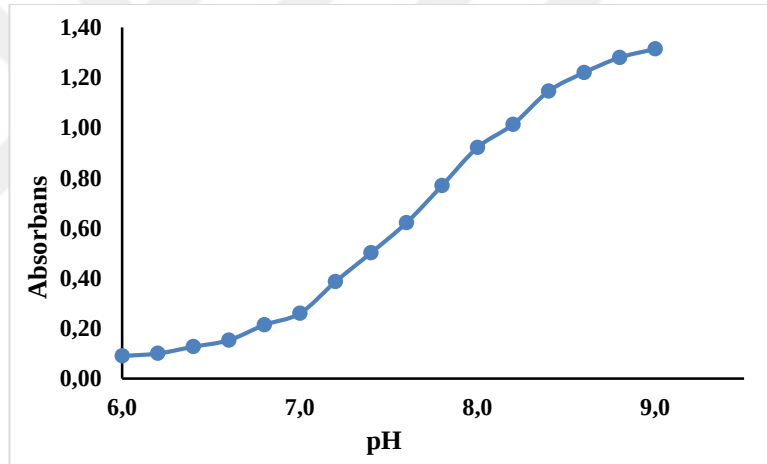


Şekil 55. Farklı derişimlerde ilave edilen AgNO₃ için absorbans-süre grafiğı

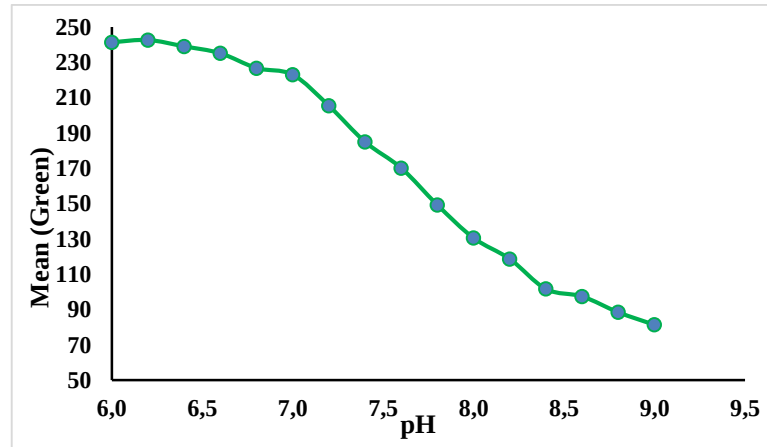
Grafikten de anlaşıldığı üzere kullandığımız en düşük AgNO_3 derişiminin reaksiyonu durdurduğu görülmüştür. 5. dakikada AgNO_3 ilave edildikten sonra seyrilmeye bağı olarak absorbansta düşme meydana gelmiştir. Tüm kontrol, kontrol körü, numune ve numune körü için aynı prosedür uygulanacağından, en düşük AgNO_3 derişiminin absorbanı sabitlediğinden $5 \mu\text{M}$ AgNO_3 pipetlenmesine karar verilmiştir. Yüksek çözünürlüklü kolorimetrik immünosensör geliştirmek için yapılan çalışmada farklı metaller ile denemeler yapılmış üreaz için en etkili metal inhibitörün Ag^{+2} olduğu tespit edilmiş (Xie vd., 2018).

3.5. pH- UV-Vis Absorbans ve Renk Değeri Değerlendirmesi

pH arttıkça renk sarıdan pembeye doğru koyulaşmıştır. pH'a bağı renk değışimi hem absorban olarak değerlendirilmiş hem de Image J programında değerlendirilmiştir.



Şekil 56. pH- UV-Vis absorbans değışimi grafiğı

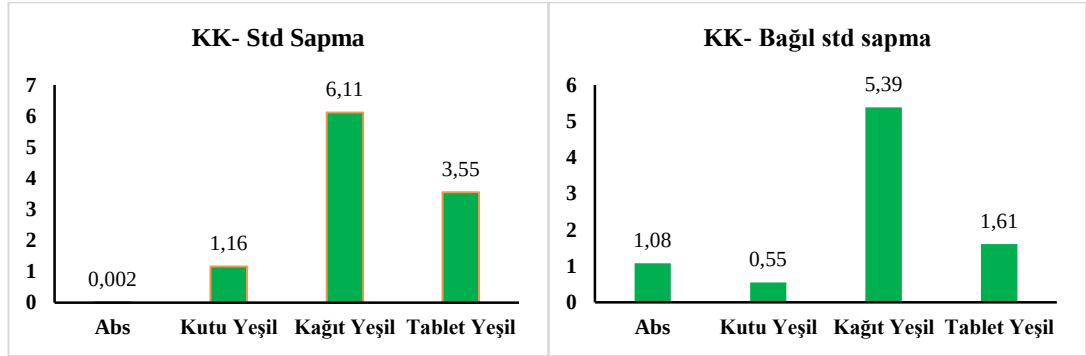


Şekil 57. pH- ImageJ mean (Yeşil) değışimi grafiğı

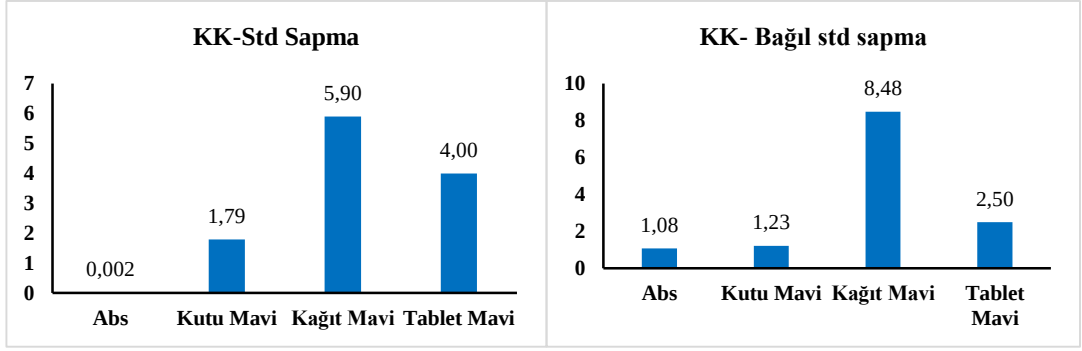
pH'daki değişikliğe bağlı absorbans ve mean değerinde nasıl bir değişim olduğunu belirlemek için bu çalışma yapılmıştır. pH artıp renk koyulaştıkça UV-Vis'de absorbans değeri artmıştır. Image J programında ise tersi bir durum söz konusu olup pH artıp renk koyulaştıkça Mean değerinde azalma olmuştur. Her iki grafikte de sigmoidal davranış görülmüştür.

3.6. Mikroplaka - Işık Kaynağı Etkisinin Değerlendirilmesi

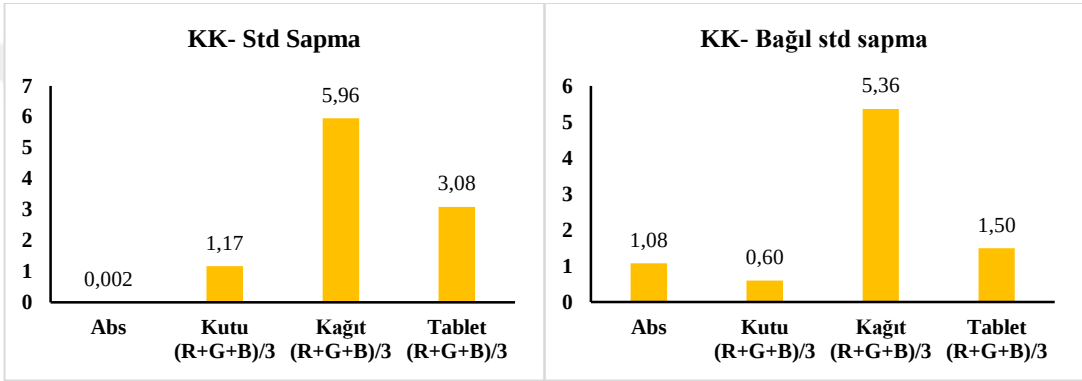
Mikroplaka, ortam ışığı etkisi değerlendirmek için kutu içerisinde, oda koşullarında beyaz kağıt üzerinde ve oda koşullarında tablet üzerinde olmak üzere farklı ortamlarda fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar, Image J programında 3 farklı renk platformlarında değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu renk platformları Yeşil=Green, Mavi=Blue ve (R+G+B)/3 şeklindedir. Bu değerlendirilmeler yapılırken standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri kullanılmıştır. Ayrıca spektrofotometrede absorbans değerleri alınıp standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Kontrol (K) ve kontrol körü (KK) için her renk platformu ve ortam için ayrı ayrı standart sapmalar (std sapma) ve bağıl standart sapmalar (bağıl std sapma) hesaplanmıştır.



Şekil 58. Yeşil renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

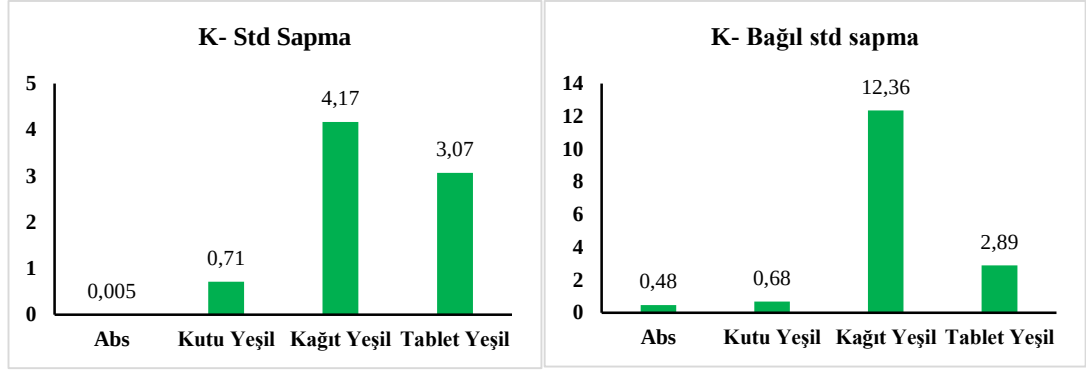


Şekil 59. Mavi renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

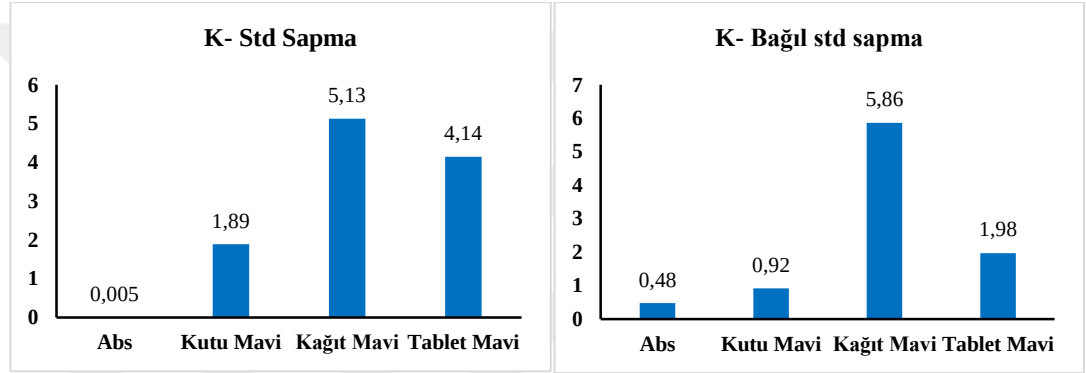


Şekil 60. (R+G+B)/3 renk platformunda kontrol körünün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

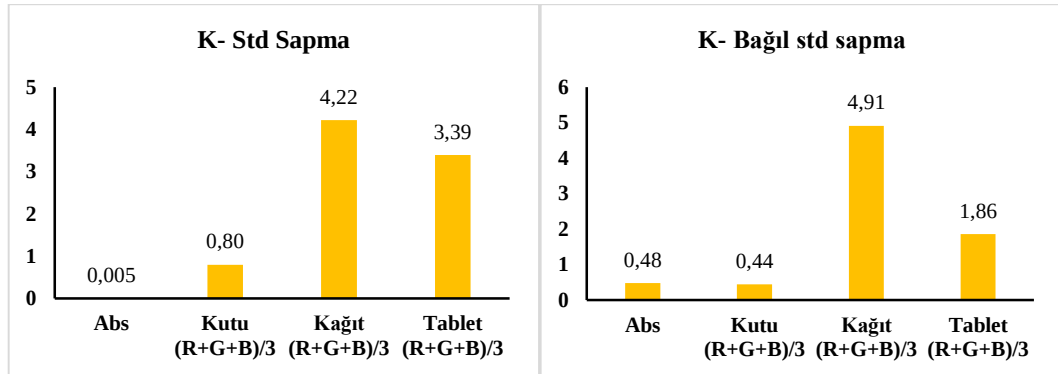
Kontrol körü için hem renk platformu hem de ortam ışığı etkisi açısından değerlendirilmiştir. Renk platformlarına göre standart sapmalar değerlendirildiğinde en düşük standart sapmanın Yeşil platformunda olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde bağıl standart sapmalarda da Yeşil platformu en düşük değere sahiptir. Bunlara bağlı olarak platform olarak bizim çalışmamız için Yeşil platformunun daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca ortam ışığı etkisi açısından değerlendirildiğinde ise kutu diye isimlendirdiğimiz sistem hem standart sapma hem de bağıl standart sapma açısından daha uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 61. Yeşil renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 62. Mavi renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 63. (R+G+B)/3 renk platformunda kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

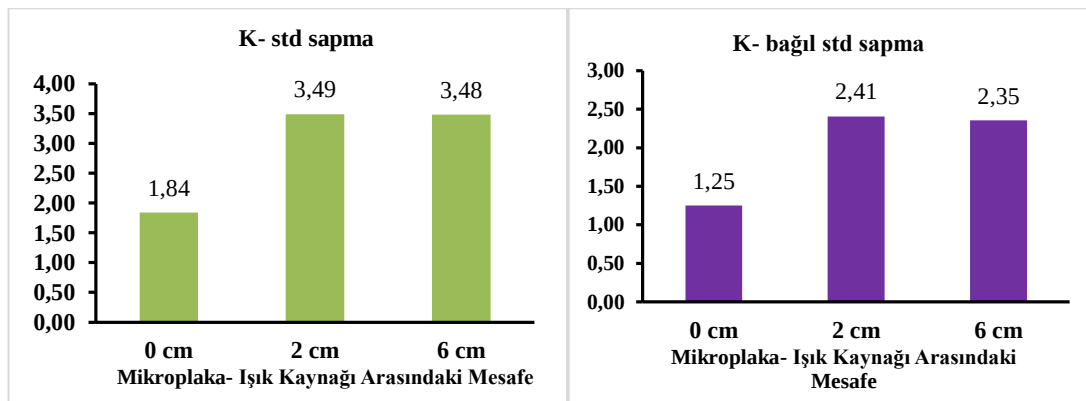
Kontrol hem renk platformu hem de ortam ışığı etkisi açısından değerlendirilmiştir. Renk platformlarına göre standart sapmalar değerlendirildiğinde en düşük standart sapmanın Yeşil platformunda olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde bağıl standart sapmalarda da ise

$(R+G+B)/3$ platformu en düşük değere sahiptir. Hem kontrol körü hem de kontrol açısından ikili bir değerlendirme yaptığımızda ise Yeşil platformunun yöntemimizde değerlendirme platformu olarak daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ortam ışığı etkisi açısından değerlendirildiğinde ise kutu diye isimlendirdiğimiz sistem hem standart sapma hem de bağıl standart sapma açısından daha uygun olduğu tespit edilmiştir.

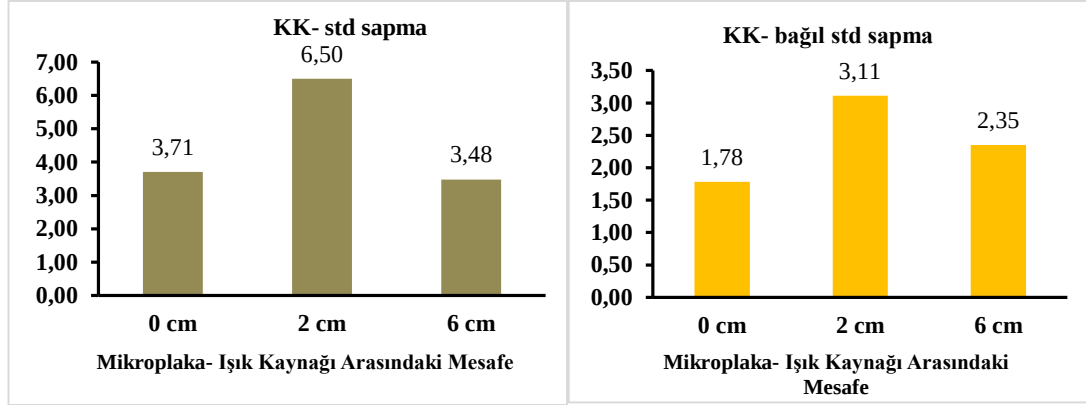
Mikroplaka - ışık kaynağı etkisi için genel bir değerlendirme yaptığımızda en uygun ortamın kutu içerisinde ve Image J programında Yeşil renk platformu olduğuna karar verilmiştir. Bundan sonraki renk değerlendirmesi çalışmaları kutu içerisinde yapılmıştır.

3.7. Mikroplaka - Işık Kaynağı Arasındaki Mesafenin Değerlendirilmesi

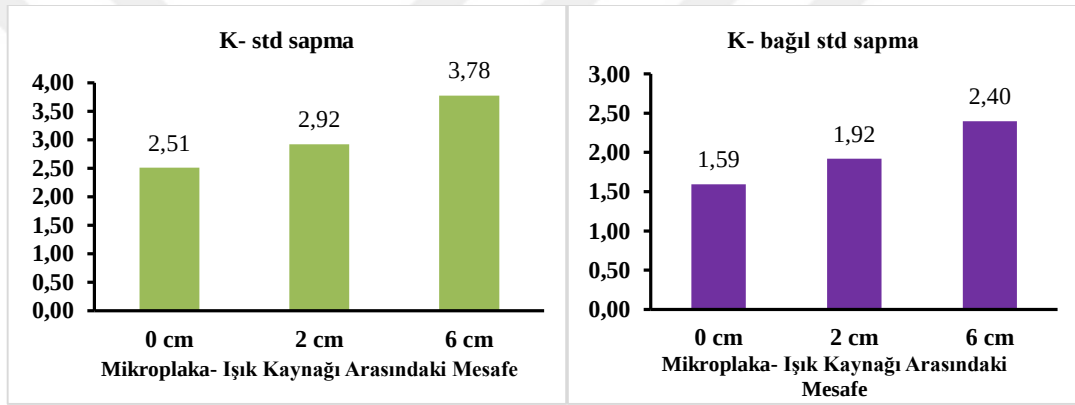
Mikroplaka yerleştirilen raf ve sistem tabanın arası 8 cm.dir. Tabandan 3 farklı yükseklik olacak şekilde ölçümler alınmıştır. Tabaanın zeminine tablet altına platform koyulmadan zemine direkt koyulması 0 cm olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra tablet altına 2 cm ve 6 cm'lik platform koyularak ölçümler alınmıştır. Her üç yükseklik için 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM ve 125 mM olmak üzere 5 farklı substrat derişimi ile çalışılmıştır. Değerlendirme yapılırken 100 mM standart sapması (std sapma) ve bağıl standart sapması (bağıl std sapma) ve 5 farklı derişiminin ortama standart sapması ve bağıl standart sapması kullanılmıştır. Her iki değerlendirmede de kontrol (K) ve kontrol körü (KK) için Image J programında Yeşil renk platformu standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır.



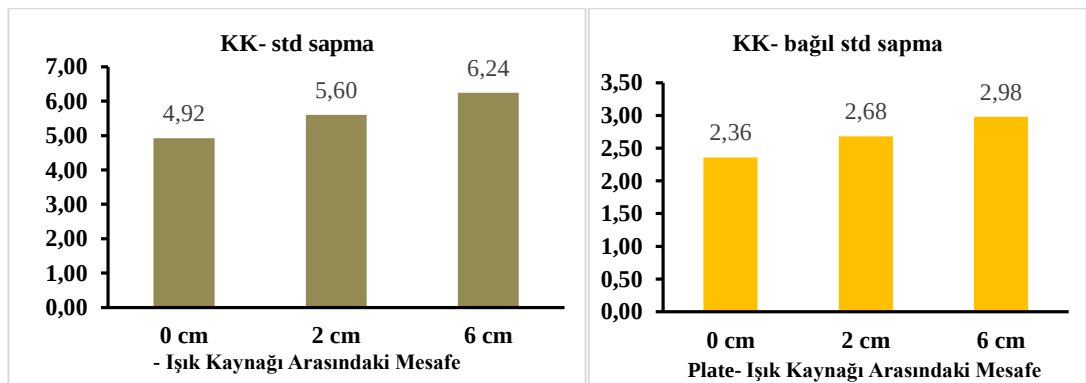
Şekil 64. Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 65. Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 66. Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

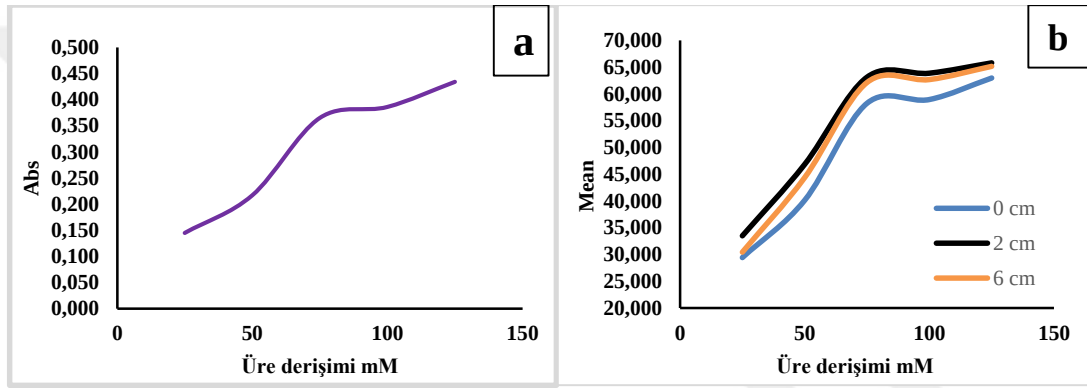


Şekil 67. Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

100 mM substrat (üre) derişimi için kontrol standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde en uygun mikroplaka - ışık kaynağı arasındaki mesafenin 0 cm olduğu

görülmüştür. 100 mM substrat (üre) derişimi için kontrol körü standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde ise en uygun mikrolaka - ışık kaynağı arasındaki mesafenin standart sapmaya göre 6 cm, bağıl standart sapmaya göre ise 0 cm olduğu görülmüştür.

Tüm substrat (üre) derişimleri için kontrol standart ve bağıl standart sapma için değerlendirildiğinde en uygun mikrolaka - ışık kaynağı arasındaki mesafenin 0 cm olduğu görülmüştür. Kontrol körü, standart ve bağıl standart sapma tüm substrat (üre) derişimleri için değerlendirildiğinde ise en uygun mikrolaka - ışık kaynağı arasındaki mesafenin 0 cm olduğu görülmüştür.



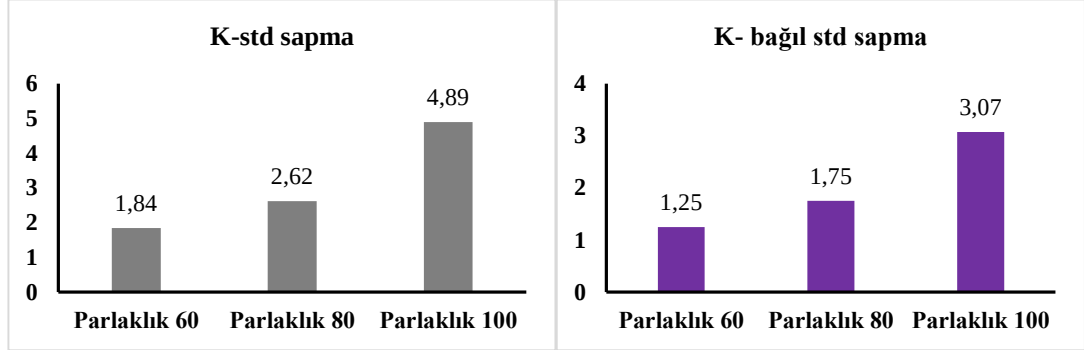
Şekil 68. Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı (Mikrolaka - ışık kaynağı arasındaki mesafe)

Mikrolaka - ışık kaynağı arasındaki mesafe için genel bir değerlendirme yaptığımızda en uygun mesafenin Image J programında Yeşil renk platformunda 0 cm olduğuna karar verilmiştir.

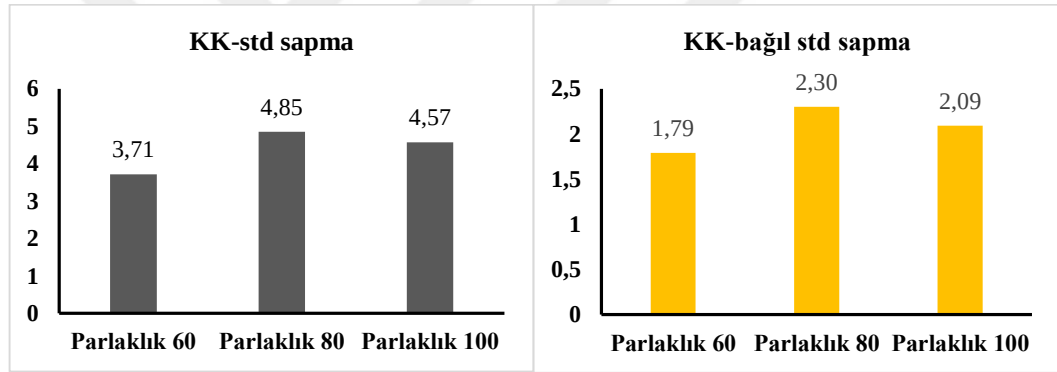
3.8. Işık Kaynağının Parlaklığının Değerlendirilmesi

Işık kaynağı olarak kullanılan tablet ışık şiddeti %60, %80 ve %100 olmak üzere 3 farklı parlaklıkta ölçüm alınmıştır. Her üç parlaklık şiddeti için 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM ve 125 mM olmak üzere 5 farklı substrat derişimi ile çalışılmıştır. Değerlendirme yapılırken 100 mM standart sapması (std sapma) ve bağıl standart sapması (bağıl std sapma) ve 5 farklı derişimin ortalama standart sapması ve bağıl standart sapması kullanılmıştır. Her iki değerlendirmede de kontrol (K) ve kontrol körü (KK) için Image J programında Yeşil renk platformu standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır. Işık şiddeti %60, %80

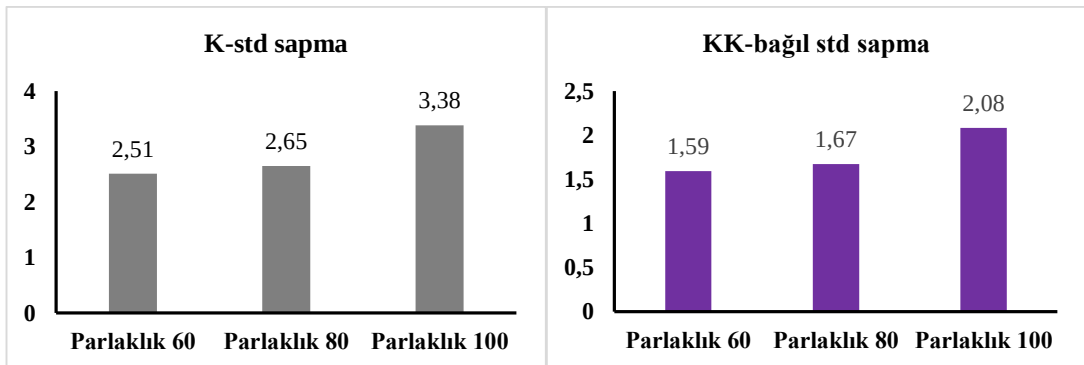
ve %100 grafikler üzerinde sırasıyla parlaklık 60, parlaklık 80 ve parlaklık 100 olarak ifade edilmiştir.



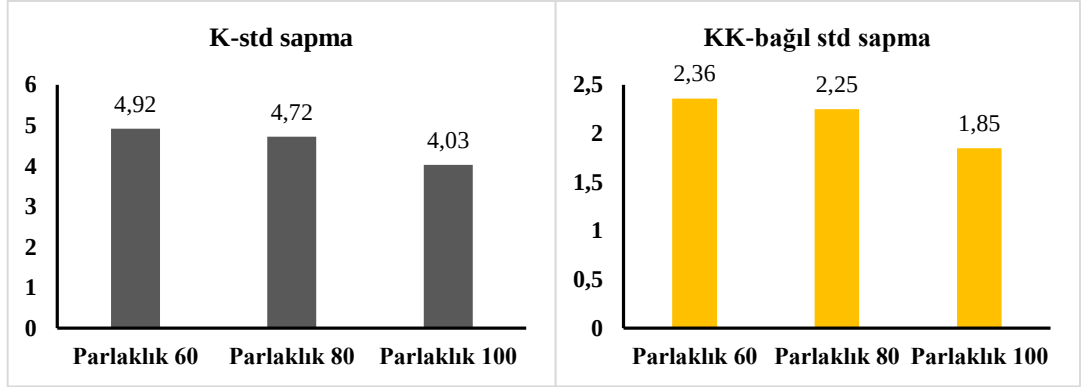
Şekil 69. Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 70. Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



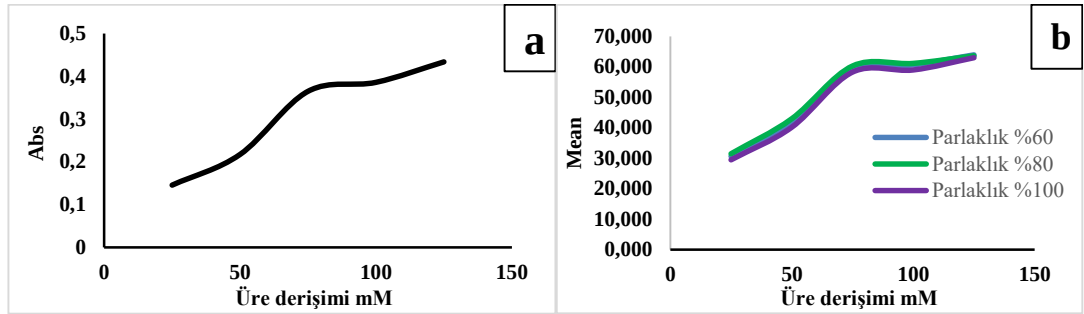
Şekil 71. Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 72. Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişimi için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

100 mM substrat (üre) derişimi için kontrol ve kontrol körü için standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde ışık kaynağının parlaklığının %60 en uygun parlaklık olduğu görülmüştür.

Tüm substrat (üre) derişimleri için kontrol ve kontrol körü için standart ve bağıl standart sapma için değerlendirildiğinde en uygun ışık kaynağının parlaklığının %100 olduğu görülmüştür.

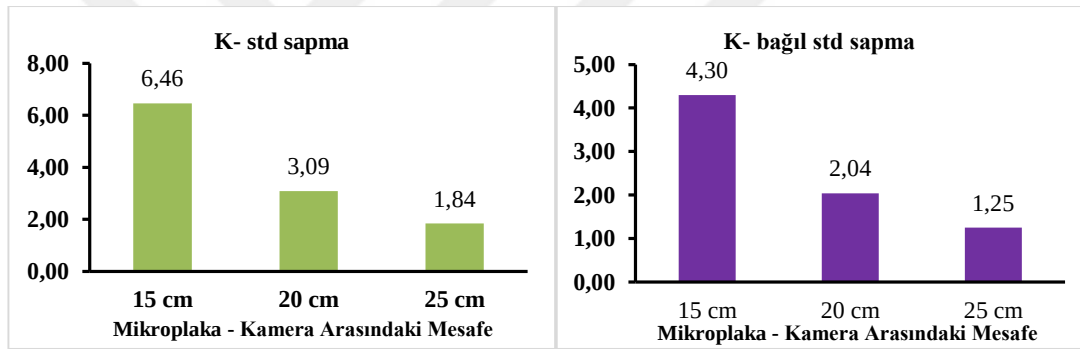


Şekil 73. Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiği (Işık kaynağının parlaklığı)

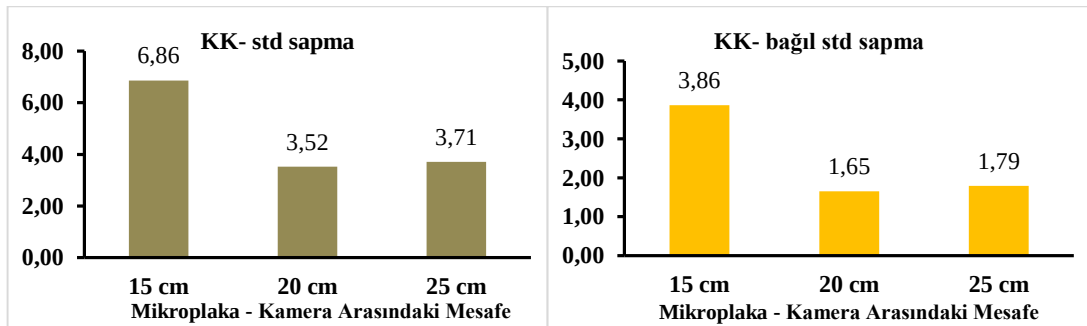
Işık kaynağının parlaklığı için diğer parametreler ile birlikte genel bir değerlendirme yaptığımızda Image J programında Yeşil renk platformunda en uygun parlaklığın parlaklık %60 olduğuna karar verilmiştir.

3.9. Mikroplaka - Kamera Arasındaki Mesafenin Değerlendirilmesi

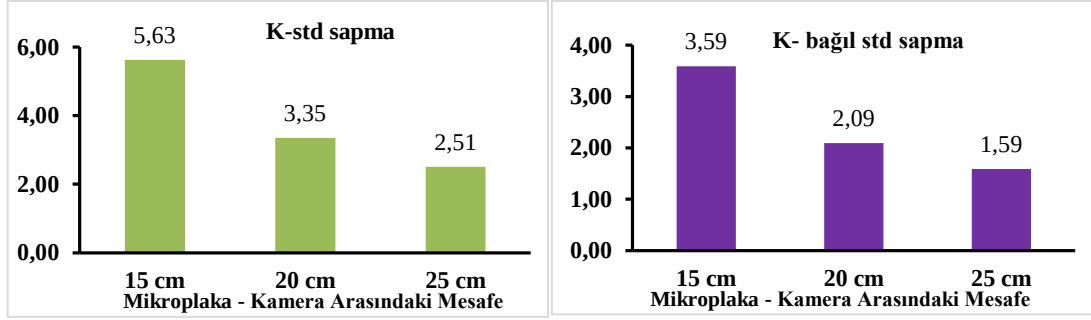
Mikroplaka - kamera arasındaki mesafede kutu içerisindeki her rafın arası 5 cm.dir ve ilk raf yüksekliği mikroplakadan 10 cm yukarısından başlamaktadır. 3 farklı mesafede ölçüm alınmıştır. Bu ölçümler kamera 15 cm, 20 cm ve 25 cm yukarıda şeklindedir. Her üç mesafe için 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM ve 125 mM olmak üzere 5 farklı substrat derişimi ile çalışılmıştır. Değerlendirme yapılırken 100 mM standart sapması (std sapma) ve bağıl standart sapması (bağıl std sapma) ve 5 farklı derişiminin ortama standart sapması ve bağıl standart sapması kullanılmıştır. Her iki değerlendirmede de kontrol (K) ve kontrol körü (KK) için Image J programında Yeşil renk platformu standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır. Mikroplaka - kamera arasındaki mesafe grafikler üzerinde sırasıyla 15 cm, 20 cm ve 25 cm olarak ifade edilmiştir.



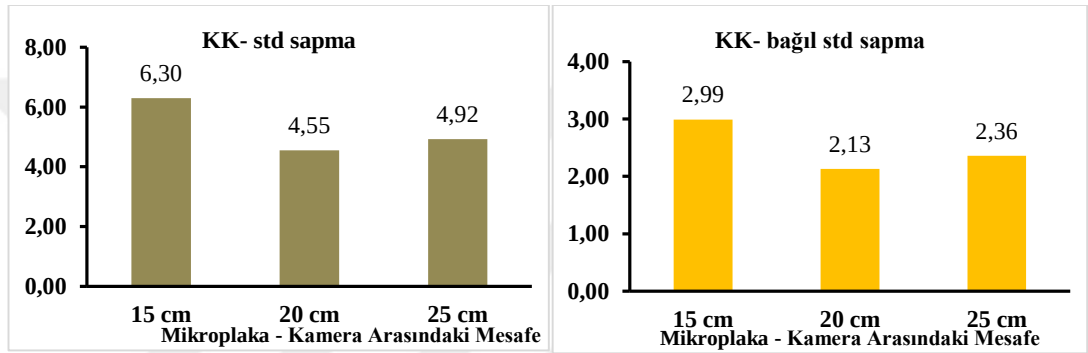
Şekil 74. Yeşil renk platformunda kontrolün 100 mM substrat derişim için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 75. Yeşil renk platformunda kontrol körünün 100 mM substrat derişim için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



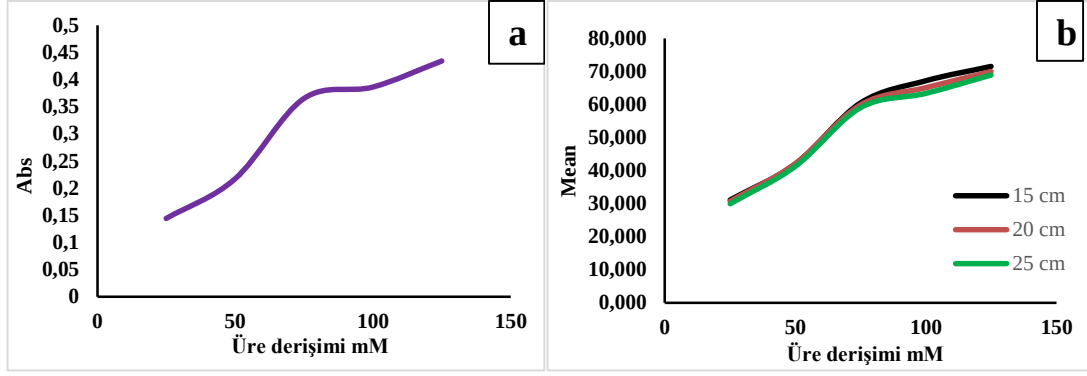
Şekil 76. Yeşil renk platformunda kontrolün tüm substrat derişim için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 77. Yeşil renk platformunda kontrol körünün tüm substrat derişim için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

100 mM substrat (üre) derişimi için kontrol için mikroplaka - kamera arasındaki mesafe standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde mikroplaka - kamera arasındaki mesafe olarak 25 cm en uygun mesafe olduğu görülmüştür. Kontrol körü için aynı değerlendirme yapıldığında ise 20 cm en uygun değerdir. Kontrol körü için standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri 20 ve 25 cm için yakın değerlerdir.

Tüm substrat (üre) derişimleri için kontrol standart ve bağıl standart sapma için değerlendirildiğinde 100 mM substrat derişiminde olduğu gibi mikroplaka - kamera arasındaki mesafenin 25 cm olduğu görülmüştür. Kontrol körü için yapılan hesaplamalarda aynı şekilde 100 mM ile kontrol körü değerleri ile benzerlik göstermiştir. Kontrol körü için 20 cm en uygun değerdir ancak 20 ve 25 cm için standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri yakın değerlerdir.

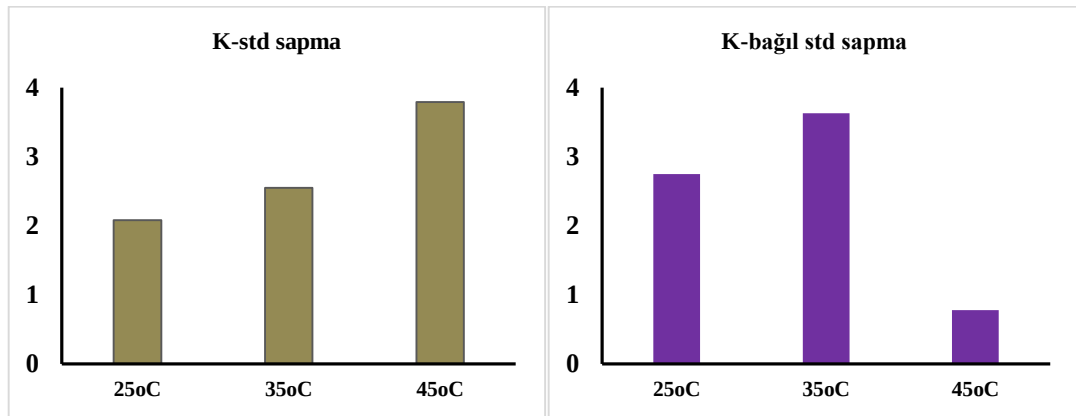


Şekil 78. Farklı derişimlerde a) substrat (üre) derişimi- absorbans ve b) substrat (üre) derişimi- mean grafiğı (Mikroplaka - kamera arasındaki mesafe)

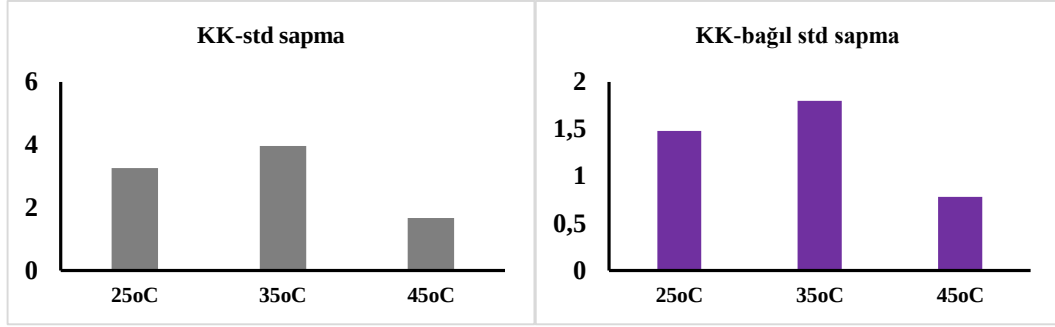
Mikroplaka - kamera arasındaki mesafe için diğer parametreler ile birlikte genel bir değerlendirme yaptığımızda Image J programında Yeşil renk platformunda en uygun mesafenin 25 cm olduğuna karar verilmiştir.

3.10. Reaksiyon Sıcaklığının Değerlendirilmesi

Sıcaklık değerlendirilmesi için 3 farklı reaksiyon sıcaklığı ile çalışılmıştır. Bu sıcaklıklar 25°C, 35°C ve 45°C şeklindedir. 10 paralel şeklinde kontrol ve kontrol körü ile çalışılmış ve her sıcaklık için ayrı ayrı standart sapma ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır.



Şekil 79. Kontrolün farklı sıcaklıklar için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



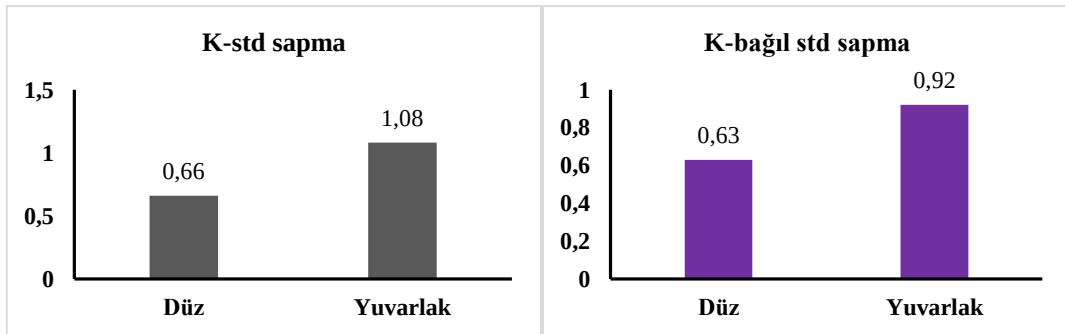
Şekil 80. Kontrol körünün farklı sıcaklıklar için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

Kontrol için reaksiyon sıcaklığı standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde en uygun sıcaklığın 25°C olduğu görülmüştür. Kontrol körü için bu sıcaklık 45°C'dir.

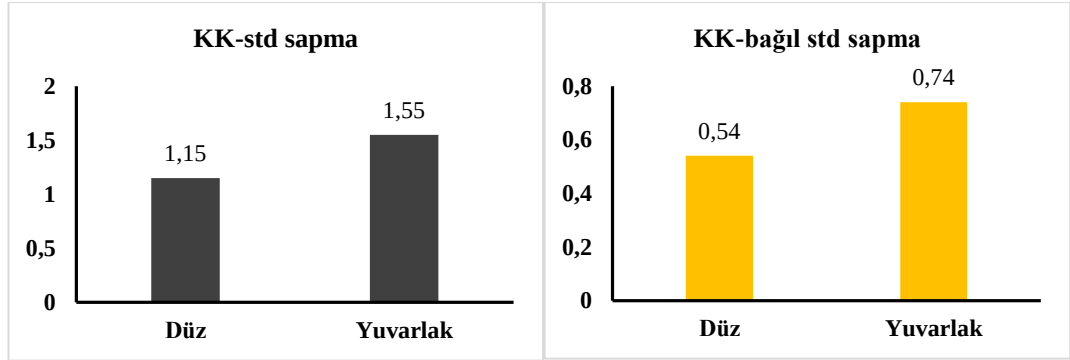
Reaksiyon sıcaklığı için diğer parametreler ile birlikte genel bir değerlendirme yaptığımızda numunelerde üreaz aktivitesi ya da üreaz inhibitör aktivitesi çalışmalarında kontrol benzeri enzimli reaksiyon karışımlarının yoğun kullanılması nedeniyle Image J programında Yeşil renk platformunda en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir. Yöntem oda sıcaklığında güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

3.11. Mikroplaka Tipinin Etkisinin Değerlendirilmesi

Düz ve yuvarlak tabanlı olmak üzere iki farklı mikroplaka ile çalışılmıştır. Bu çalışmada mikroplaka tabanın analiz sonucuna etkisine bakılmıştır. Bunun için 10 paralelli kontrol ve kontrol çözeltileri kullanılmıştır. Her iki taban tipi için ayrı ayrı standart sapma ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır.



Şekil 81. Kontrolün farklı mikroplakadaki standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

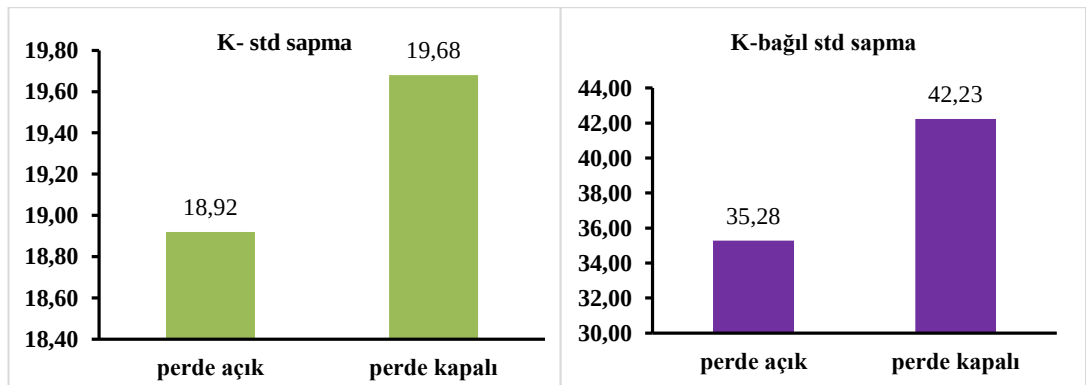


Şekil 82. Kontrol körünün farklı mikrolakadaki standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

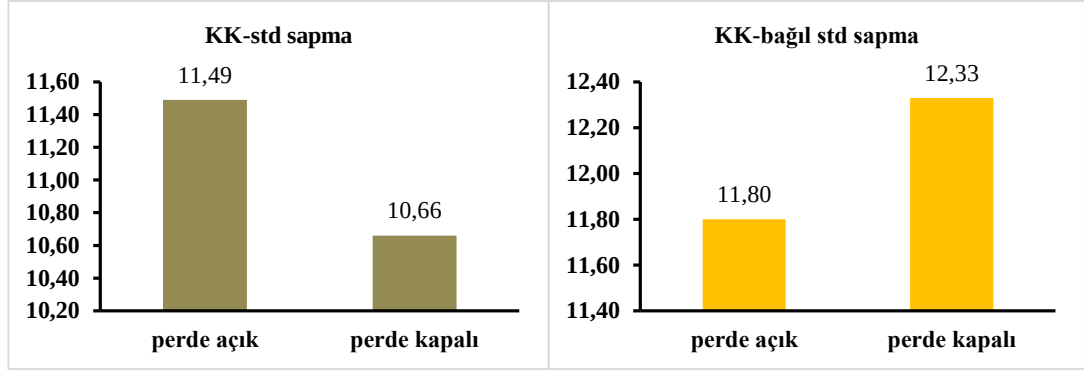
Image J programında Yeşil renk platformunda, kontrol ve kontrol körü için mikrolaka tipi standart ve bağıl standart sapma açısından değerlendirildiğinde en uygun mikrolakanın düz tabanlı mikrolaka olduğu görülmüştür.

3.12. Ortam Işığının Etkisinin Değerlendirilmesi

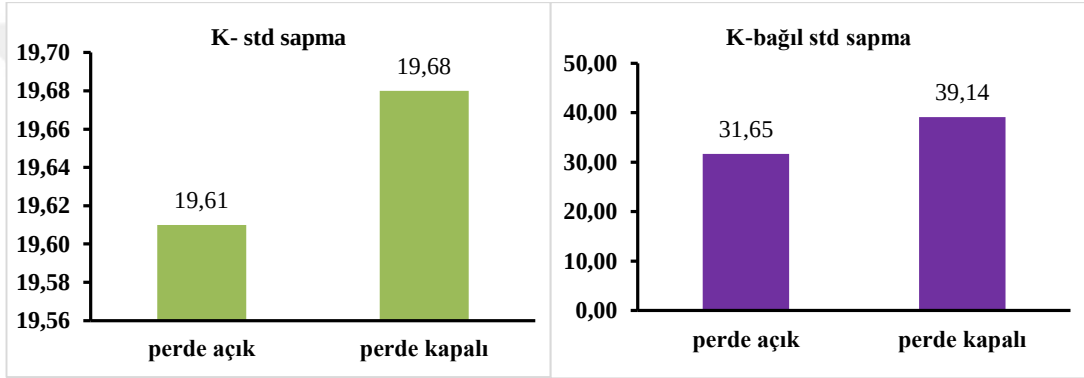
Ortam ışığı etkisi değerlendirilirken iki farklı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan ilki beyaz bir kağıt üzerinde laboratuvar perdeleri açık ve kapalı olmak üzere fotoğrafları çekilip 100 mM substrat derişimi ve 5 farklı substrat derişimlerinin ortalama standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Tüm hesaplamalar kontrol ve kontrol körü için ayrı ayrı hesaplanmıştır.



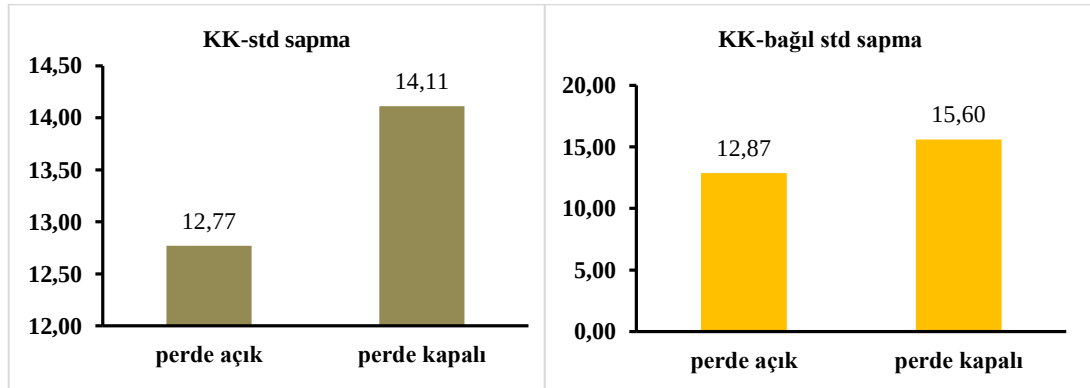
Şekil 83. Kontrolün 100 mM substrat derişimde perde açık ve perde kapalı için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 84. Kontrol körünün 100 mM substrat derişiminde perde açık ve perde kapalı için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



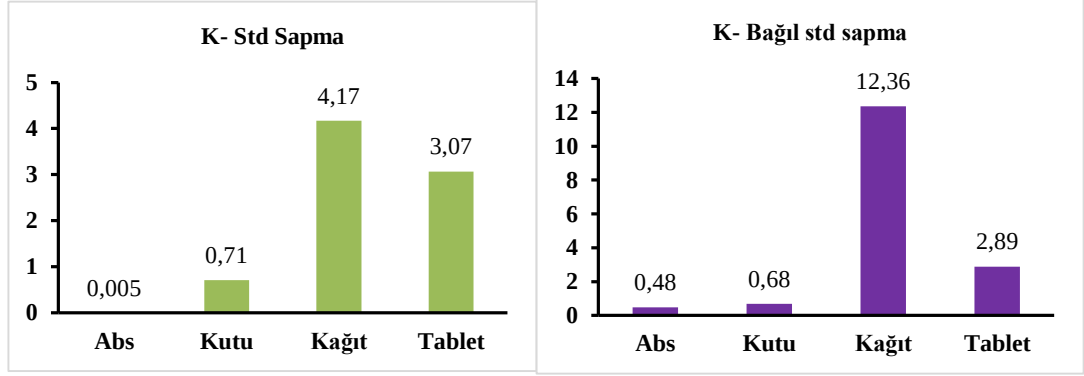
Şekil 85. Kontrolün tüm substrat derişimi perde açık ve perde kapalı için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



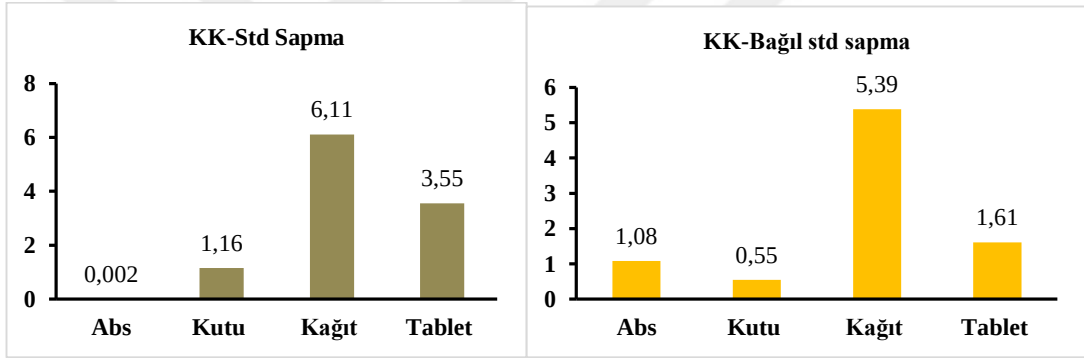
Şekil 86. Kontrol körünün tüm substrat derişimi perde açık ve perde kapalı için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

İkinci yapılan çalışmada ise kutu diye isimlendirdiğimiz kapalı ortam, mikrop-lakanın direkt tablet üstü ve mikrop-lakanın kağıt üstü şeklinde fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Bu

çalışmada aynı çözeltiler kullanılmış ve kontrol ve kontrol körü için 10 paralel çalışma yapılmıştır.



Şekil 87. Kontrolün için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 88. Kontrol körünün için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

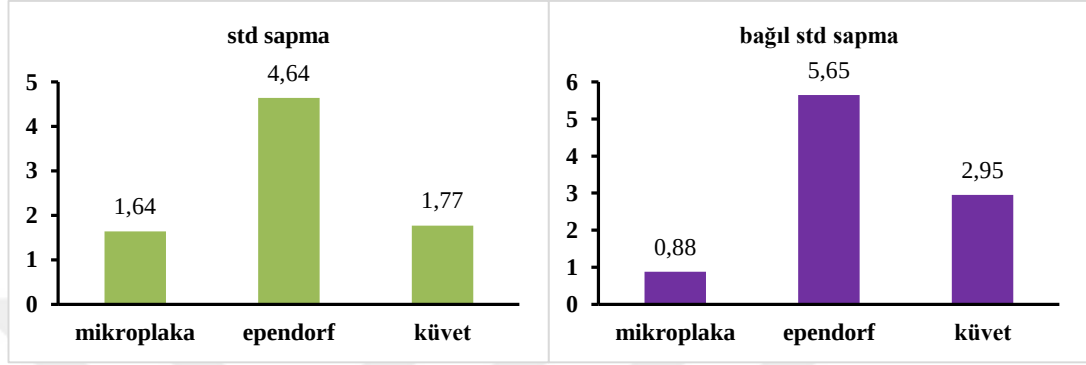
İlk çalışma olan kağıt üzerinde perde açık ve perde kapalı standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar göz önünde bulundurulduğunda hem 100 mM substrat (üre) derişimi hem de tüm derişimler için en uygun ortam perde açık ikendir. Bu çalışmada kontrol körleri içinde perde açık çalışması daha uygundur.

İkinci çalışmada ise kutunun en uygun ortam olduğu görülmüştür. Standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar, en uygun kutu olmak üzere sırasıyla kutu, tablet ve kağıt üzerinde yapılan çalışmaların uygunluğunu göstermiştir.

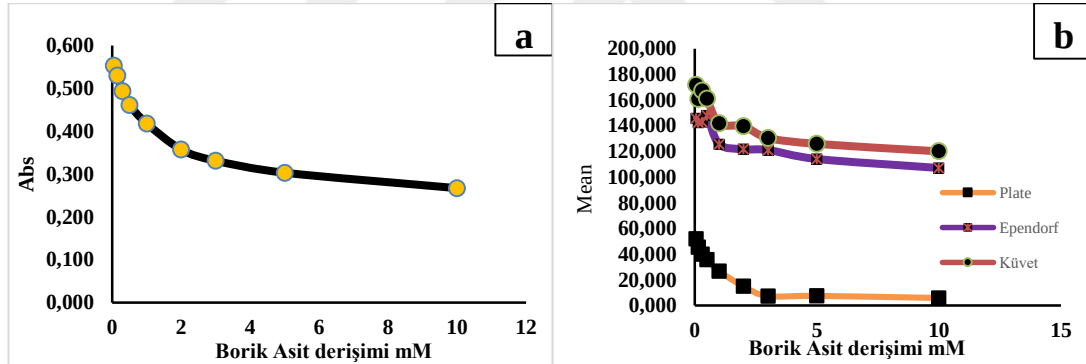
3.13. Farklı Reaksiyon Kaplarında Ölçüm Alınması (Küvet, Ependorf)

Bu çalışmanın amacı mikroparka bulunmadığı ortamlarda küvet veya ependorf içerisindeki çözeltiler için en uygun reaksiyon kabının belirlenmesidir. Bunun için borik

asitin farklı derişimlerdeki küvet ve ependorf içerisinde fotoğrafları çekilmiştir. Çalışmamızın temelinde mikrolaka bulunduğu için mikrolaka, küvet ve ependorfun birlikte karşılaştırılması yapılmıştır. Karşılaştırma yapılırken farklı derişimlerdeki borik asitlerin standart sapma ve bağıl standart sapmaları kullanılmıştır.



Şekil 89. Borik asitin farklı reaksiyon kaplarındaki ölçüm sonucu standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



Şekil 90. Borik asitin a) spektrofotometrede ve b) farklı reaksiyon kaplarındaki ölçüm grafikleri

Image J- Yeşil platformunda yapılan hesaplamalar sonucunda tezin temelini oluşturan mikrolakadan sonra fotoğraf çekimi için Standart sapma ve bağıl standart sapmalara göre en uygun ortam küvetler olmuştur.

3.14. LOD- Limit of Detection (Tespit Limiti) – LOQ- Limit of Quantification (Tayin Limiti)

LOD ve LOQ için enzimli ve substratlı karışımda inhibitör olarak 0,15 mM borik asit kullanılmıştır. Çalışma 10 paralelli olarak yapılmıştır.

Tablo 8. UV-Vis ve Image J LOD-LOQ tablosu

Parametreler	UV (Abs)	Renk Değeri (Mean)
Ortalama	0,529	172,49
Standart Sapma (s)	0,011	2,63
%Bağıl Standart Sapma	2,170	1,53
3s	0,034	7,90
10s	0,115	26,33
LOD (%İnh)	5,9	4,2
LOQ (%İnh)	19,8	13,8

Borik asit numune körlerinde absorbansta çok fazla değişiklik yapmamaktadır. Bunun sebebi borik asit ilk protonunu pH 9,2’te vermektedir. Örneğin; 50 mM borik asitin pH değeri 6,3 ölçülmüştür. Yeni geliştirilmiş yöntemle üreaz inhibitörü ölçümlerinde %inhibisyon LOD ve LOQ değerleri spektrofotometrik yöntemle göre daha düşük bulunmuştur.

3.15. Tekrarlanabilirlik

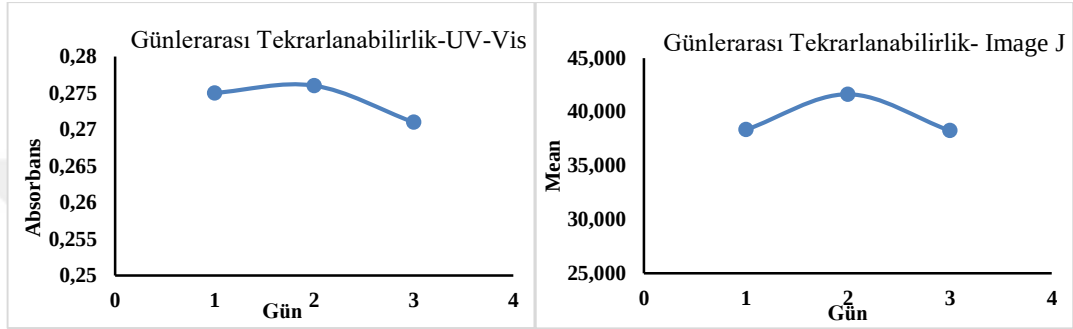
0,15 mM borik asit 10 paralelli olarak çalışılmıştır. Bu derişim için UV-Vis, mikropilaka, ependorf ve küvette alınan ölçümler için tekrarlanabilirlik tablosu oluşturulmuştur. Tekrarlanabilirlik kontrol limitleri standart sapmanın 3 katı ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında hesaplanan tekrarlanabilirlik kontrol limiti içinde olduğu görülmüştür.

Tablo 9. Tekrarlanabilirlik tablosu

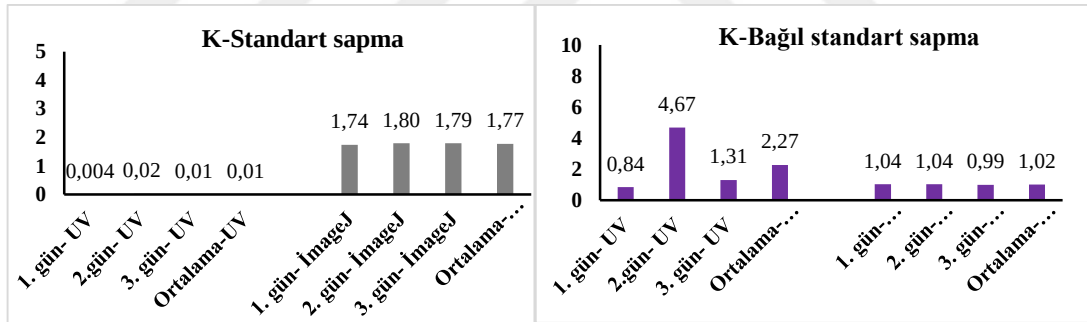
Deney Ortamı	Ortalama	Std Sapma	Bağıl std sapma	3* Std sapma	ort+(3*std sapma)	ort-(3*std sapma)
UV	0,529	0,01	2,17	0,03	0,564	0,495
Mikropilaka	172,492	2,63	1,53	7,90	180,391	164,592
Ependorf	75,506	5,59	7,40	16,76	92,263	58,750
Küvet	57,031	4,05	7,10	12,15	69,185	44,877

3.16. Günlerarası Tekrarlanabilirlik

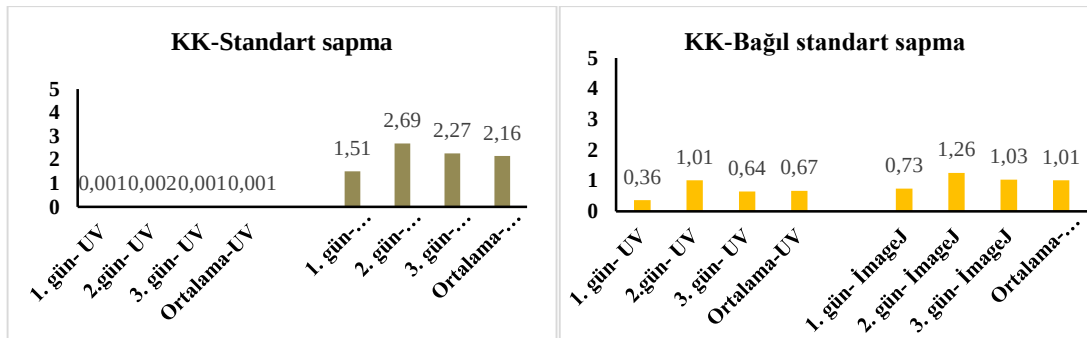
Günlerarası Tekrarlanabilirlik için 3 gün ardışık bir şekilde çalışma yapılmıştır. Bu değerlendirmelerde substrat (üre) derişimi olarak 100 mM kullanılmıştır. Fenol kırmızısı derişimi 100 mM substrat içerisinde 0,04 mg/mL şeklindedir. 10 paralel ile çalışılmış aynı çözeltiler kullanılmıştır. 3 gün için ayrı ayrı standart sapma ve bağıl standart sapma ve 3 günü ortalama standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır.



Şekil 91. Günlerarası Tekrarlanabilirlik için UV-Vis ve Image J grafikleri



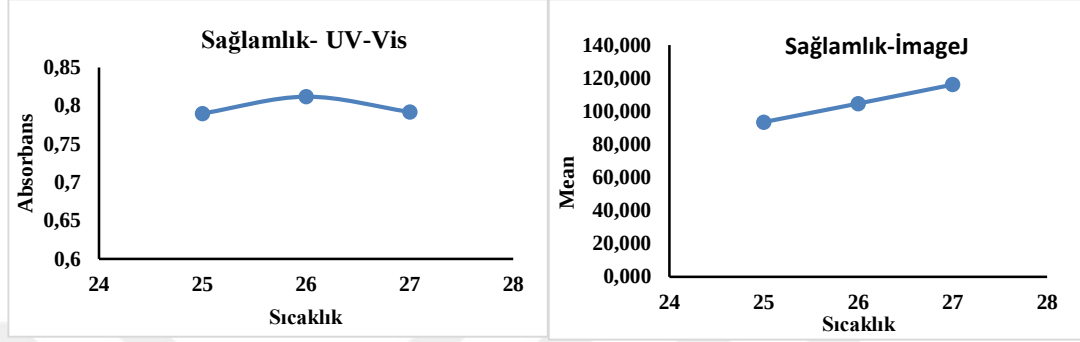
Şekil 92. Günlerarası Tekrarlanabilirlik için kontrolün standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



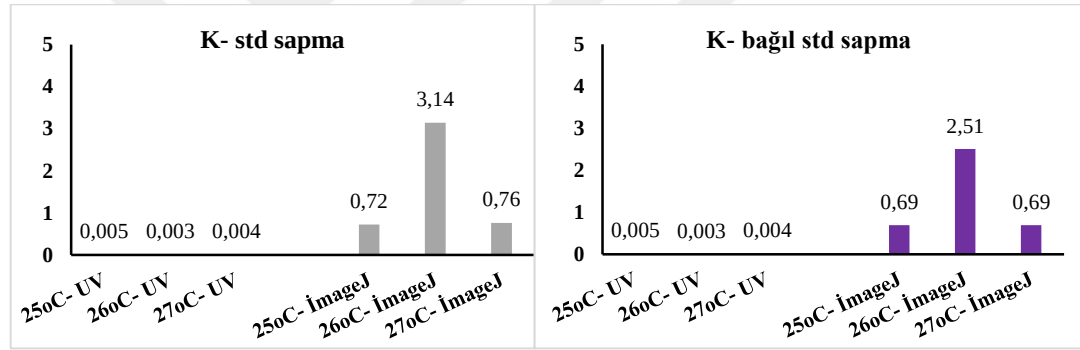
Şekil 93. Günlerarası Tekrarlanabilirlik için kontrol görünüm standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

3.17. Sağlamlık

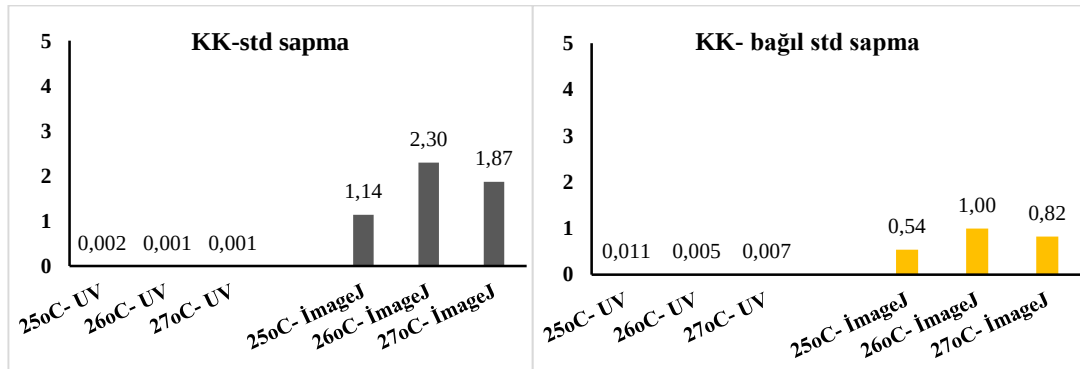
Sağlamlık çalışması için ardışık 3 sıcaklık kullanılmıştır. Bu sıcaklıklar 25°C, 26°C ve 27°C şeklindedir. Kontrol ve kontrol körü 10 paralel olarak çalışılmıştır.



Şekil 94. Sağlamlık için UV-Vis ve Image J grafikleri



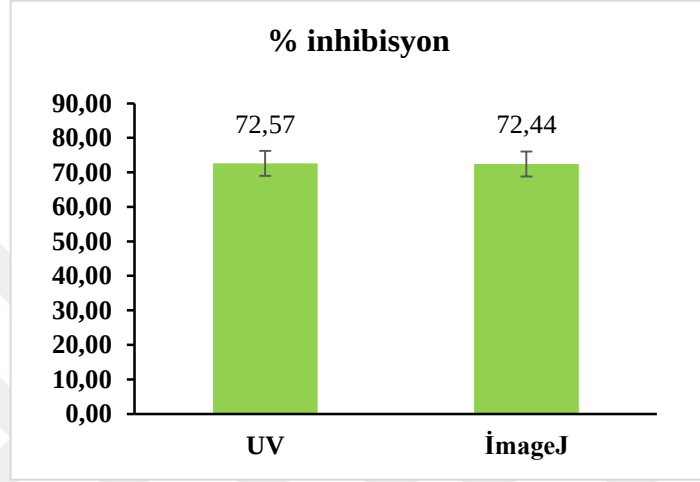
Şekil 95. Kontrol sağlamlık için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri



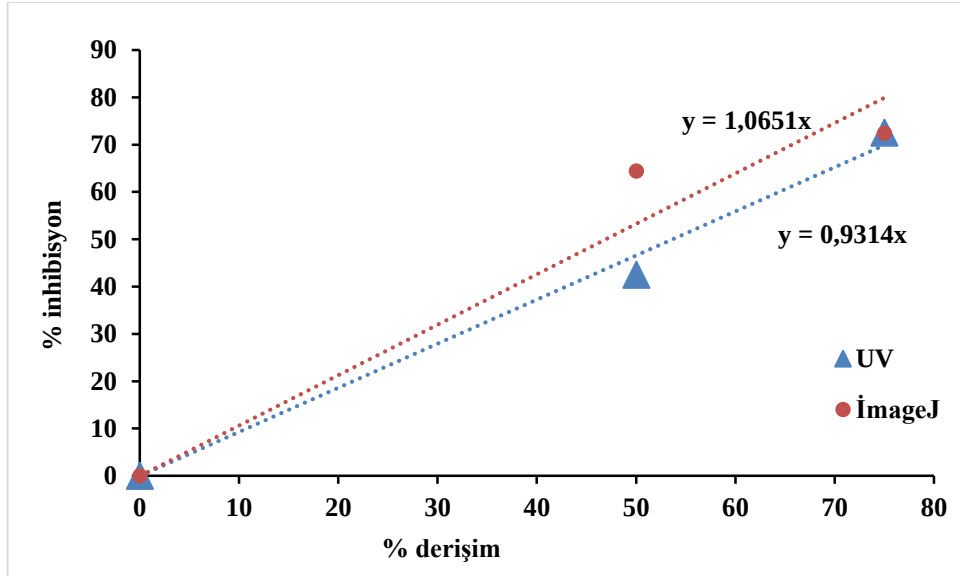
Şekil 96. Kontrol körü sağlamlık için standart sapma ve bağıl standart sapma grafikleri

3.18. Gerçek Örnek Uygulamaları

Yeşil çay ile farklı derişimlerde yapılan çalışmanın sonucu spektrofotometrede ve Image J programı ile değerlendirilmiştir. Stok çözelti %100 kabul edilmiş seyreltmeler bu çözeltiye göre yapılmıştır. Su ile seyreltilen %75'lik çözeltide her iki yöntemde inhibisyon hesaplaması yapılmıştır.



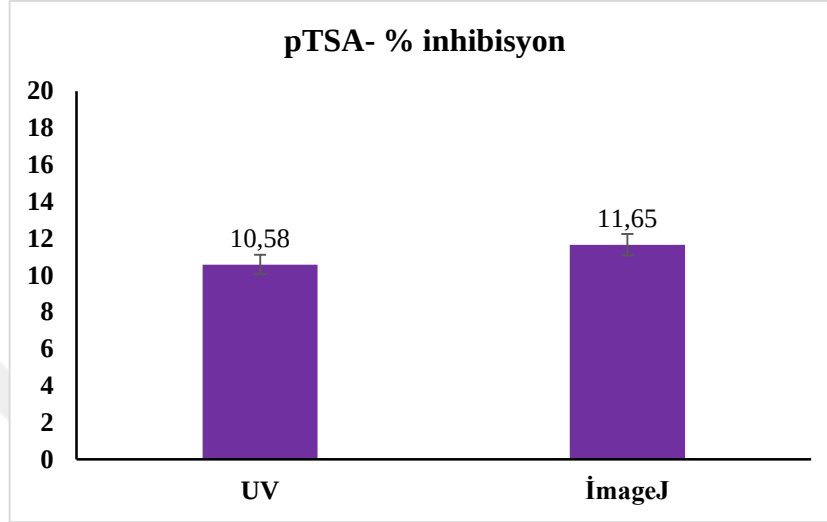
Şekil 97. Yeşil çay ekstraktının %75'lik çözeltisinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri



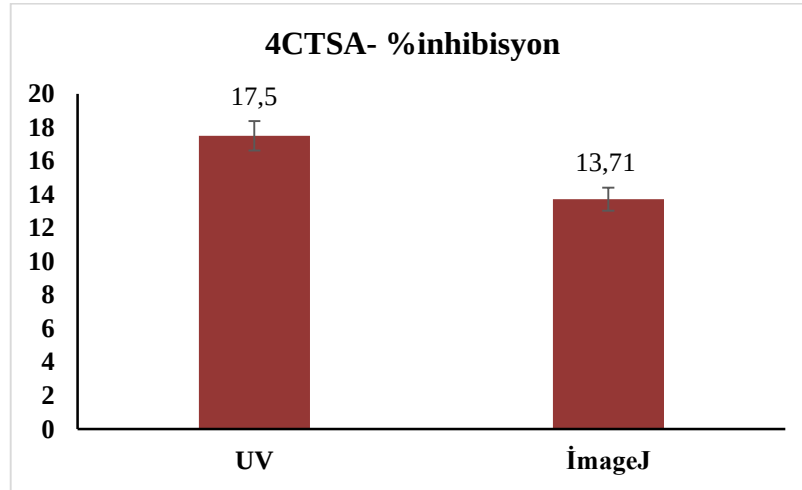
Şekil 98. Yeşil çay ekstraktının spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % derişim- % inhibisyon grafiğı

Çizilen bu grafiği göre %50 inhibisyon yaptırın % derişim değeri hesaplanmıştır.

Sentetik numuneler 5 mM derişimde hazırlanmıştır. Daha sonra her iki numune içinde spektrofotometrede ve Image J programı ile değerlendirilmiş ve % inhibisyonları hesaplanmıştır.



Şekil 99. 5mM pTSA sentetik maddesinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri



Şekil 100. 5mM 4CTSA sentetik maddesinin spektrofotometre ve Image J ile hesaplanan % inhibisyon değerleri

4. SONUÇLAR

Bu çalışma hâlihazırda bulunan bir yöntemin daha ekonomik ve pratik bir yolla yapılmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile daha az kimyasal ve daha ucuz ekipman ile deney sonuca ulaşılmıştır. Yapılan yöntemin geliştirilmesi, optimizasyon ve validasyon çalışmalarında olumlu sonuçlara ulaşılmıştır.

Xie ve arkadaşları yaptıkları deneylerde, enzimatik çoklu renk üretimine ve akıllı telefonla basit sinyal okumaya dayalı önerilen kolorimetrik platformun uygulanabilirliğini doğrulamıştır. Yine bizim çalışmamızda olduğu gibi Xie ve arkadaşları da kıllı telefon ve Image J ile elde edilen değişim eğilimi UV-vis spektrumlarından gözlemlenenlerle iyi bir uyum içinde olduğunu göstermiştir (Xie, vd., 2018).

Yöntem geliştirilmesinde enzim derişimi çalışmasında farklı enzim derişimleri çalışılmış ve bizim çalışmamıza en uygun olan enzim derişimi süre ve verdiği renk şiddeti açısından değerlendirildiğinde en uygun derişimin 3 mg/mL'dir. Substrat derişimi belirlenirken farklı substrat derişimleri ile çalışılmış ayrıca literatür referans alınarak en uygun substrat (üre) derişiminin 100 mM olduğu bulunulmuştur. Yöntemin temelinde bulunan fenol kırmızısı derişimi belirlenirken ilk olarak literatür taraması yapılmıştır. Bu araştırma sonucunda çalışmalarda fenol kırmızısı derişimi 0,04 mg/mL olduğu görülmüştür. Çalışmamızın temelinde renk değerlendirmesi olduğu fenol kırmızısının farklı derişimi ile de deneme yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu literatür ile uyumlu olarak en uygun derişimin 0,04 mg/mL olduğu görülmüştür. Reaksiyonu belli bir sürede durdurmak için AgNO_3 kullanılmıştır. AgNO_3 'ün çözeltiye pipetleme zamanı ve derişimi üzerine çalışmalar yapılmıştır. AgNO_3 pipetlendiğinde çözeltide seyrelme olduğu için renkte açılma olmasına rağmen renk sabit kalmıştır. AgNO_3 derişimlerinden reaksiyonu durdurarak çözelti rengini stabil tutan derişim olarak 5 μM , süre olarak ise substrat pipetlemesinden 30 dakika sonra için AgNO_3 'ün pipetlemesinin bizim çalışmamız için en uygun derişim ve süre olduğu görülmüştür. Renk şiddetinin değişmesinin temelinde pH değişimi olduğu için pH ile renk şiddetinin nasıl değiştiği gözlenmiştir. Bunu yaparken önce spektrofotometrede pH-Abs grafiği çizilmiştir, daha sonra ise aynı çalışma mikrolaka ile yapılmış ve pH-Mean grafiği çizilmiştir. pH-Abs grafiği gibi pH-Mean grafiğinde de pH'a bağlı renk dönüşümünün benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Optimizasyon yapılırken mikrolaka, ışık kaynağı, kamera uzaklığı gibi farklı parametreler çalışılmıştır. İlk olarak mikrolaka - ışık kaynağı etkisine bakılmıştır. Burada

kutu diye isimlendirdiğimiz sistem, oda ışığında mikropilaka kağıt üstünde ve tablet üstünde olmak üzere üç farklı etki bakılmıştır. Image J programında bulunan farklı renk platformlarında Yeşil, Mavi ve (R+G+B)/3 veriler girilerek kör ve kontrol körü için standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. En düşük standart sapma değeri olan kontrol körü için Yeşil renk platformunda 1,16, bağıl standart değeri 0,55 olarak bulunmuştur. Aynı çalışma için en düşük kontrol standart sapması Yeşil renk platformunda 0,71 iken, en düşük kontrol bağıl standart sapma 0,44 ile (R+G+B)/3 renk platformuna aittir. Ancak sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde en uygun renk platformunun Yeşil, oda ışığı kağıt üstü, oda ışığı tablet üstü ve kutu değerlendirildiğinde ise kutunun bu çalışma için en uygun olduğu görülmüştür. Daha sonraki hesaplamaların hepsinde Yeşil renk platformu kullanılmıştır. Mikropilaka -ışık kaynağı arasındaki mesafe belirlenirken 5 farklı substrat derişimi ile 0,2 ve 6 cm uzaklıklar ile belirlenmiştir. 5 farklı substrat derişiminin ortalama kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük 0 cm’de 2,51 ve 1,59 iken, kontrol körü için standart sapma ve bağıl standart sapmaları sırasıyla en düşük 0 cm’de 4,92 ve 2,36 şeklindedir. 100 mM üre derişimi için kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük 0 cm’de 1,84 ve 1,25 iken, kontrol körü için standart sapma en düşük 6 cm de 3,48 ve bağıl standart sapması ise 0 cm’de 1,78 şeklindedir. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde en uygun mikropilaka-ışık kaynağı arasındaki mesafe 0 cm’dir. Işık kaynağının parlaklığı için ışık kaynağı olarak kullanılan tabletin ışık parlaklığı %60, %80 ve %100 olmak üzere üç farklı parlaklık değerlendirilmiştir. 5 farklı substrat derişiminin ortalama kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük %60 parlaklıkta 2,51 ve 1,59 iken, kontrol körü için standart sapma en düşük %100 parlaklıkta 4,03 ve bağıl standart sapmaları yine %100 parlaklıkta 1,85’tir. 100 mM üre derişimi için kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük %60 parlaklıkta 1,84 ve 1,25, ve 100 mM üre derişimi için kontrol körü için standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük %60 parlaklıkta 3,71 ve 1,79 şeklindedir. En uygun parlaklık değeri %60 parlaklıktır. Mikropilaka - kamera arasındaki mesafede kutu içerisinde mikropilakadan 15 cm, 20 cm ve 25 cm olmak üzere üç farklı yükseklik seçilmiştir. 5 farklı substrat derişiminin ortalama kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük 25 cm mesafede 2,51 ve 1,59’dur, kontrol körü için bu mesafe 20 cm olup standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla 4,55 ve 2,13 şeklindedir. 100 mM üre derişimi için kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması sırasıyla en düşük 25 cm mesafede 1,84 ve 1,25’tir. Kontrol körü için ise tüm kontrol köründe olduğu gibi bu mesafe 20 cm olup standart sapma ve bağıl standart

sapması sırasıyla 3,52 ve 1,65 olarak bulunmuştur. Kontrol körleri için 20 cm ve kontrol için 25 cm standart sapma ve bağıl standart sapmaları düşük olsa da 25 cm'deki standart sapma ve bağıl standart sapma değerlerinin daha düşük olduğu görülmüş bunun için mikrolaka - kamera arasındaki mesafe 25 cm olarak seçilmiştir. Reaksiyon sıcaklığı için 25°C, 35°C ve 45°C üç farklı sıcaklık kullanılmıştır. 100 mM substrat derişiminde 10 paralel ile çalışılmıştır. Kontrol için standart sapma ve bağıl standart sapma sırasıyla 25°C'de 2,08 ve 2,75 olarak bulunmuştur. Kontrol körü için ise 45°C'deki standart sapma ve bağıl standart sapmaları 1,67 ve 0,78 olmak üzere daha küçüktür. Yöntemin daha pratik ve uygulanabilir olması için en uygun sıcaklık olarak 25°C belirlenmiştir. Mikrolaka tipinin etkisi için düz ve yuvarlak dipli olmak üzere iki farklı mikrolaka kullanılmıştır. Kullanılan iki mikrolakanın hem kontrol hem de kontrol körü standart sapma ve bağıl standart sapmaları birbirine yakındır ancak düz diplinin değerleri daha düşüktür. Kontrolün standart sapmaları düz ve yuvarlak dipli mikrolaka için sırasıyla standart sapmaları 0,66 ve 1,08, bağıl standart sapmaları ise 0,63 ve 0,92 şeklindedir. Düz ve yuvarlak dipli mikrolaka için, kontrol körünün sırasıyla standart sapmaları 1,15 ve 1,58, bağıl standart sapmaları ise 0,54 ve 0,74'tür. Yuvarlak diplinin standart sapma ve bağıl standart sapmasının büyük çıkmasına en önemli etken fotoğraf çekiminde yuvarlak diplide gölge oluşumudur. Ortam ışığı etkisi değerlendirilirken iki farklı çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada mikrolaka kağıt üzerine konulup laboratuvar perdeleri açık ve kapalı şekilde fotoğrafları çekilmiş ve yine farklı substrat derişimlerinin ve 100 mM substrat derişimi için standart sapma ve bağıl standart sapmalar hesaplanmıştır. Kağıt üzerinde yapılan bu çalışmada 5 farklı substrat derişiminin ortalama kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması kontrol için perde açık iken 19,61, perde kapalı iken 19,68 ve bağıl standart sapmaları ise 31,65 ve 39,14'tür. Kontrol körleri için bu değerler standart sapmalar perde açık iken 12,77 perde kapalı iken 14,11 ve bağıl standart sapmaları ise sırasıyla 12,87 ve 15,60 şeklindedir. 100 mM üre derişimi için kontrol standart sapma ve bağıl standart sapması perde açık ve kapalı iken 18,92 ve 19,68'dir, bağıl standart sapmaları ise 35,28 ve 42,23'tür. Bu değerler kontrol körü için perde açık iken 11,49, perde kapalı iken 10,66 ve bağıl standart sapmaları ise 11,80 ve 12,33'tür. Ortam ışığı etkisinin diğer çalışması olan kutu, kağıt ve tablet üstü çalışmalarında 100 mM üre derişiminde 10 paralel ile yapılan çalışmada standart sapma ve bağıl standart sapmaların değerlendirilmesi sonucu en uygun ortamın sırasıyla kutu, tablet üstü ve kağıt üstü olduğu görülmüştür. Kontrollerin standart sapmaları 0,71, 3,07 ve 4,17 şeklinde iken bağıl standart sapmaları 0,68, 2,89 ve 12,36'dır. Kontrol körleri için bu değerler standart sapmalar 1,16,

3,55 ve 6,11 şeklindedir, bağıl standart sapmaları ise 0,55, 1,61 ve 5,39'dur. Perde açık veya kapalı iken mikropilaka altında bir ışık kaynağı olmadan alınan sonuçların diğer ortamlara göre alınan sonuçlara göre çok verimli olduğunu söyleyemeyiz. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde kutunun bu çalışma için en uygun ortam olduğu sonucuna varılmaktadır. Farklı reaksiyon kaplarında ölçüm alınması bunun için mikropilaka bulunmadığı ortamlarda ependorf veya spektrofotometre küveti içerisindeki sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için üreaz inhibitörü olarak bilinen borik asitin farklı derişimleri kullanılmış ve mikropilaka, ependorf ve küvet için ortalama standart sapma ve bağıl standart sapmalar hesaplanmıştır. Mikropilaka için standart sapma 1,64, ependorf için 4,64 ve küvet için 1,77'dir. Bağıl standart sapmalar ise mikropilaka için 0,88, ependorf için 5,65 ve küvet için 2,95'tir. Bu sonuçlara göre mikropilakanın bulunmadığı durumlarda ependorf kadar yüksek standart sapma ve bağıl standart sapma değerine sahip olmayan küveti analiz sonucu değerlendirilmesi için kullanabiliriz.

Validasyon çalışmalarında LOD-LOQ, tekrarlanabilirlik, günlerarası tekrarlanabilirlik ve sağlamlık çalışmaları yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri yeni geliştirilen kolorimetrik yöntem (%4,1 ve %13,8) ve spektrofotometrik yöntem (%5,9 ve %19,8) için kıyaslamalı olarak değerlendirildiğinde yeni yöntemle daha düşük inhibisyon değerlerinde ölçüm yapılabileceği görülmektedir. İnhibitörlerin IC₅₀ değerleri (%50 inhibisyon) her iki yöntemle güvenle ölçülebilir. Ancak K_i değerlerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemde %20 inhibisyon, yeni kolorimetrik yöntemde %14 inhibisyon gösteren inhibitör derişimlerinin altında çalışılmamalıdır. Tekrarlanabilirlik, hem spektrofotometrede yapılan analiz için hem de mikropilaka için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bununla birlikte ependorf ve spektrofotometre içinde tekrarlanabilirlik değerlendirilmesi yapılmıştır. Tüm çalışmalar tekrarlanabilirlik içerisinde. Günlerarası Tekrarlanabilirlik için tek derişimde 10 paralel 3 farklı günde çalışılmış ve üç günün standart sapmaları bağıl standart sapmaları ve tüm günlerin ortalamaları hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlere günler arası Tekrarlanabilirlik açısından bu üç gün birbirleri ile uyumludur ve sonuçlar uygundur. Sağlamlık için ise aynı gün içerisinde ardışık üç sıcaklıktaki (25°C, 26°C, 27°C) değişim gözlenmiştir. Spektrofotometrede ve Image J değerleri birbirleri ile paralel davranış göstermiştir. Yapılan bu çalışmaya göre en uygun sıcaklık 25°C'dir.

Yeni geliştirdiğimiz yöntemde en ideal ortam ve şartlar şu şekildedir: 25°C'de kutu içerisinde ışık kaynağı 0 cm'de ve parlaklığı %60, mikropilaka-kamera uzaklığı 25 cm ve düz dipli mikropilaka kullanılmasıdır. Renk değerlendirilmesi yaparken en uygun Image J

renk platformu Yeşil 'dir. Image J 'de hesaplama yaparken $w=54$, $h=54$ ve $Area=2292$ değerleri kullanılmıştır.

Gerçek numuneler numune olarak yeşil çay ekstraktı ve sentetik maddeler kullanılmıştır. Yeni geliştirilen yöntem bu iki tip numunenin üreaz inhibisyon seviyesini ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Yeşil çay ekstraktı ile yapılan çalışmada %75 derişimdeki % inhibisyon değerleri spektrofotometre ile 72,57 bulunurken Image J programı ile 72,44 olarak hesaplanmıştır. İki yöntem arasında bu derişim arasında hesaplanan % inhibisyonları standart sapması 0,096 olarak hesaplanmıştır. % derişim- % inhibisyon grafiğine %50 inhibisyon değeri iki yöntem ile de hesaplanmış bu yeşil çay ekstraktı için % derişim olarak verilmiştir. Bu değerlerde spektrofotometre cihazı ile yapılan yöntem için 54 iken Image J ile yapılan hesaplamada 47 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre iki yöntem arasında uyumluluk olduğu görülmüştür. 5 mM, pTSA numunesinin %inhibisyon sonuçları spektrofotometre ile yapılan yöntem ile 10,58 bulunurken Image J programı ile 11,65 olarak hesaplanmıştır. 4CTSA numunesinin 5 mM'lık derişimi için %inhibisyon sonuçları spektrofotometre ile yapılan yöntem ile 17,5 bulunurken Image J programı ile 13,71 olarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler göz önünde bulundurulduğunda iki yöntem arasında uyumluluk vardır. Ancak sonuçlara göre yeşil çay ekstraktındaki uyumun sentetik numunelere göre daha fazla olduğu görülmektedir.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada yeni geliştirilen üreaz aktivite tayin yöntemi hâlihazırda bulunan bir yöntemin daha ekonomik ve pratik bir yolla yapılmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile daha az kimyasal, daha ucuz ekipman ve daha kısa süre ile deneyin gerçekleştirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çıkan sonuçlara bakıldığında geliştirilen yöntem uygulanarak spektrofotometre kullanmadan üreaz aktivite testinin rahatlıkla yapılabileceği görülmüştür. Dolayısıyla spektrofotometreye gerek duymadan sadece mikropilaka, fotoğraf makinesi / kamera / cep telefonu ve renk ölçüm programı (Image J) kullanılarak üreaz testi her laboratuvar ortamında ve laboratuvar bulunmayan ortamlarda kolaylıkla yapılabilir. Bununla birlikte farklı bir ölçüm programı olan Adobe Color, Image J programı yerine kullanılabilir.

Gelecekte geliştirilen yöntem ile yapılan çalışmaların değerinin artması ve tez kapsamında bu yöntem kullanılarak yapılan çalışmaların olumlu sonuç vermesinden dolayı daha sonraki zamanlarda bu yöntemin uygulanmasında ki karşılaşılabilecek sorunlar ortadan kaldırılarak daha kapsamlı çalışmalar yapılacaktır. Benzer çalışma gıda ve ilaç analizi gibi çalışmalar için geliştirilebilir ve bu yaklaşımla başka renkli enzim aktivite tayin yöntemleri denenebilir.

Yeni geliştirilen yöntem çeşitli numunelerde hem üreaz aktivitesi ölçümlerinde hem de üreaz inhibisyon kapasitesi ölçümlerinde güvenle kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Benjamin, S. & Pandey, A., 2000. Panorama of lipases in bioindustry, *Biotech International*, 5, 11-13.
- Berg, J. M., Tymoczko, J., & L., Stryer, L., 2014. Biyokimya, Palme Yayınevi.
- Bzura, J. & Koncki, R., 2019. A mechanized urease activity assay, *Enzyme and Microbial Technology*, 123: 1-7.
- Ciurci, S., Benini, S. & Mangana, S. 1999. Structural Properties of Nickel Ions in Urease, *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192:331-335.)
- Copeland, R.A., 2000. Enzymes: a practical Introduction to structure, mechanism, and data analysis, New York.
- Çınar, E., Ercan, S., & Güleşçi, N., 2017. Lewatit Partikülüne Üreaz Enziminin İmmobilizasyonu, *Batman University Journal of Life Sciences*, 7:2/2
- Dinç, Y., 2006. Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Gözükara, M. E., 2011. Biyokimya, 5. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi.
- Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, 2015, Sante (Sanco)/11945.
- Hassan, S.T.S., & Zemlicka M., 2016. Plant-Derived Urease Inhibitors as Alternative Chemotherapeutic Agents, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 349, 507–522.
- İskefiyeli Z., 2014. Damlatma İle Yeni DPPH ve FRAP Antioksidan Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi Ve Uygulanması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Jannah, F. & Kim, J., 2019. pH-sensitive colorimetric polydiacetylene vesicles for urease sensing, *Dyes and Pigments*, 169, 15-21.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., & Tiftik, A.M., 2006. Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 975-591-131-6.
- Kalfa, A., 2016. Yeni Sentezlenmiş Bazı Triazol Bileşiklerinin Üreaz İnhibisyonu Potansiyellerinin Kinetik Olarak Ve Moleküler Modellemeyle İncelenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Kayacık, Ö., 2019. *Pulicaria Dysenterica*'dan Elde Edilen Özütlere Antioksidan Özellikleri Ve Enzim İnhibitör Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Kayastha, A. M. & Das, N. 1999. A Simple Laboratory Experiment for Teaching Enzyme Immobilization with Urease, *Biochemical Education*, 27:114-117.
- Keha, E. & Küfrevioğlu, Ö.İ., 2018. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Kırkibir, Z., G., 2018. Yeni Sentezlenmiş 1,2,4- Merkaptotriazol Bileşiklerinin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin In Vitro Ve In Silico Olarak İncelenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Korkmaz, H., Tıncıklı, N., Özen, T. & Güder, A., 2015. Biyokimya-I Ders Notları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Krajewska, B., 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59: 9–21.
- Krajewska, B., Zaborska, W. & Leszko, M. 2001. Inhibition of Chitosan-immobilized Urease by Slow-Binding inhibitors: Ni^{2+} , F^- and Acetohydroxamic Acid, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14:101- 109.
- McDonald, A., G., & Tipton, K., F., 2014. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties, *The FEBS Journal*, 281:583–592.
- Mobley, L., T., & Hausinger, R., P., 1989. Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization, *Microbiological Reviews*, 53:1, 85-108.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Ersoz, B., Dikmen, N., Menten, G., & Özgönen, T., 1993. Harper'ın Biokimyası, Barış Kitabevi, 978-975-953-311-3.
- Nelson, D., L., & Cox, M., M., 2020. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayınevi, Ankara.
- Öner, E., 2022. Nitril Fonksiyonellenmiş N-Heterosiklik Karben Öncülleri ve Karben Kompleksleri Sentezi: Enzim İnhibisyon, Antikanser Aktivite ve DNA Bağlanma Özellikleri, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Mersin.
- Özmen, D., H., 2015. Hiyaluronidaz Enzim İnhibitörleri, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Qin, Y., & Cabral, J., M.S., 2002. Properties and Applications of Urease, *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 (1), 1–14.
- Ramis S., Alkasir J., Ornatska M. & Andreescu S., 2012. Colorimetric Paper Bioassay for the Detection of Phenolic Compounds, *Analytical Chemistry*, 84, 9729- 9737.

- Sergeyeva T.A., Gorbach L. A., Slinchenko O.A., Goncharova L.A. Piletska O.V., Broyko O.O., Sergeeva L.M. & Elska G.V., 2010. Towards Development of Colorimetric Test Systems for Phenols Detection Based on Computationally Designed Molecularly Imprinted Polymer Membranes, *Materials Science and Engineering C*, 30, 431- 436.
- Sirko, A., & Brodizk, R., 2000. Plant ureases: Roles and regulation, *Acta Biochimica Polonica*, 47:4, 1189–1195.
- Solomons, G.T.W., Fryhle, C.B., Okay, G., & Yıldırım, Y., 2002. Organik Kimya, Literatür Yayıncılık, 975-8431-87-0.
- Stefano, B., 2000. Structure and Function Relationship of Urease and Cytochrome c-553 from *Bacillus Pasteurii*, The University of York Faculty of Science, A Thesis the Degree of Doctor of Philosophy pp.16-36.
- Stingl, K., & Reuse D., H., 2005. Staying alive overdosed: How does *Helicobacter pylori* control urease activity?, *International Journal of Medical Microbiology*, 295:307–315.
- Sumner, J.B., 1926. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease, *Journal of Biological Chemistry*, 69: 435-441.
- Şahin, Y., 2013, Giresun Yöresindeki Bazı Yenilebilir Bitkilerin Farklı Çözücülerdeki Ekstrelerinin Anti-Üreaz Aktivitelerinin İncelenmesi, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Giresun.
- Tan, L., Su, J., Wu, D., Yu, X., Su, X., Su, Z., He, J., Wu, X., Kong, S., Lai, X., Lin, J., & Su, Z., 2013. Kinetics and Mechanism Study of Competitive Inhibition of Jack-Bean Urease by Baicalin, *The ScientificWorld Journal*, 2013:9.
- Tavares, M.C., Oliveira, K. A., Fatima, A., Coltro, W.K.T., & Santos, J.C.C., 2021. Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors, *Talanta*, 230-122301.
- The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2014, Eurachem.
- Upadhyay, L.S.B., 2012. Urease inhibitors: A review, *Indian Journal of Biotechnology* 11(4):381-388.
- Validation of chemical analytical methods, 2009, NmkI Procedure.
- Xie, W., Lei, L., Tian, M., Zhang, Z., & Liu, Y., 2018. A high-resolution colorimetric immunoassay platform realized by coupling enzymatic multicolor generation with smartphone readout, *Analyst*, 143, 2901-2907

Ziyan, E., 1998. Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus Communis*)'ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.



ÖZGEÇMİŞ

Çorum Anadolu Lisesi'nde öğrenimini tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt yaptırdı. 2011 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Bir yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yabancı dil eğitimi aldı ve aynı Üniversite de Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı. 2015 yılında Yüksek Kimyager ünvanıyla mezun oldu. 2018 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı ve halen eğitimi devam etmektedir. 2017 yılında Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezinde Öğr. Gör. olarak çalışmaya başladı ve halen görevini devam ettirmektedir. İngilizce bilmektedir.