

## ***Aspergillus niger*'den Ürikaz Enziminin Üretilmesi ve Aktiviteye Etkili Bazı Faktörlerin Belirlenmesi**

Figen ERTAN

Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı,  
Edirne - TÜRKİYE

Erol AKSÖZ

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı,  
Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 21.10.1998

**Abstract :** Bu çalışmada, *Aspergillus niger*'den, ürikaz enziminin üretilmesi, üretim koşulları ve enzim aktivitesi üzerine etki eden bazı faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

*A. niger*'den ürikaz enziminin üretilmesi ve bunu etkileyen faktörler araştırıldığında, üretim süresinin 3 gün, üretim sıcaklığının 30°C, başlangıç pH' ın 6.0 ve indüktör derişiminin % 0.1 olduğu koşullarda ürikaz aktivitesi maksimum olarak saptanmıştır. Üretim ortamına eklenen amonyumlu bileşiklerin enzim sentezini inhibe ettiği, MgSO<sub>4</sub>'in ise enzim sentezi üzerinde önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulguların ışığı altında, *A. niger*' in iyi bir ürikaz kaynağı olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** *A. niger*, ürikaz, ürik asit, üretim

### **Production of Uricase Enzyme from *Aspergillus niger* and Determination of Some Factors Affecting the Activity**

**Özet :** This study was undertaken to obtain uricase enzyme from *Aspergillus niger* and also to determine the production conditions and the effects of some factors on enzyme activity.

The results of the experiments, in consideration of the production of the uricase enzyme and the factors affecting the production, demonstrated that enzyme activity was maximum when the production time was 3 days at a temperature of 30°C with the initial pH at 6.0 and inductor concentration at 0.1%. It was determined that ammonium compounds, which were added to the production medium, inhibited enzyme synthesis, and that MgSO<sub>4</sub> has an important role in enzyme synthesis. These results revealed that *A. niger* may be a beneficial source of uricase enzyme.

**Key Words:** *A. niger*, uricase, uric acid, production

## Giriş

Değişik canlı gruplarında, pürin katabolizmasının son ürünü türden türe farklılık göstermekle birlikte, adenin ve guaninin ürik aside kadar yıkımı bütün hayvan türlerinde ortak bir metabolik yol izler (1).

İnsanlarda pürin bazlarının yıkımı sonucunda oluşan son ürün tamamen okside olmuş bir pürin bazı olan ürik asittir. Ürik asit 5.75'ten yüksek pH'larda monosodyum tuzu olan ürat formunda bulunur. Sodyum üratın serumda çözünürlüğünün ortadan kalktığı duruma hiperürisemi adı verilir (2). Serum ürat miktarlarının bilinmesi, özellikle hastalığın teşhisinde önem taşımakta ve ürik asit tayini zorunlu olmaktadır. Pürin katabolizmasında, ürik asidin allantoin oksidasyonundan sorumlu olan ürikaz (ürat oksidaz, E.C. 1.7.3.3) serum ürik asit konsantrasyonunu saptamada, klinik teşhis enzimi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (3,4,5). Klinik biyokimya ve tedavide potansiyel olarak kullanılabilen ürikaz, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve özellikleri çalışılmıştır (6, 7,8).

Ürikaz enzimi klinikte sadece teşhis enzimi olmayıp, aynı zamanda ürik asit metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak meydana gelen hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ürikaz, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında yer almıştır (9).

Ayrıca ürikaz enzimi, kozmetik sanayinde saç boyama ve dalgalandırmada kullanılmıştır. Ürikaz gerek saç boyamasında gerekse dalgalandırmada çok olumlu sonuçlar vermiştir (10,11). Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır (12,13,14,15).

Bu çalışmada, ürikaz enziminin *Aspergillus niger* V.Tiegh'den tek tip besiyeri kullanılarak üretilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, azot kaynağı olarak sadece ürik asit içeren, içeriği çok basit ve hazırlanması kolay bir besiyeri kullanıldı. Üretimi ve enzim aktivitesini etkileyen parametreler araştırılarak, enzimin optimum üretim koşulları saptandı. Ürikaz kaynağı olarak, doğada yaygın bulunabilmesi, üretiminin kolay olması, endüstride kullanım alanının geniş oluşu gibi özelliklerinin yanısıra, sahip olduğu ürikaz enziminin klinikte uygulanabilirliğinin araştırılmaması olması nedeniyle *A.niger* tercih edilmiştir.

## Materyal ve Metot

**Kullanılan ortamlar:** Stok fungus kültürlerinin üretimi için Czapek Dox Agar kullanıldı. Stok fungus kültürleri daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklandı. Ayda bir pasaj edilerek yenilendi.

Ürikaz eldesi için, Yokoyama ve ark., (1988)'nin kullandığı indüksiyon ortamı, yeniden düzenlenerek azot kaynağı olarak sadece ürik asit içeren ortam kullanıldı (16).

Tek aşamalı ürikaz eldesinde kullanılan besiyerinin içeriği:

Glukoz . . . . .	% 3
MgSO <sub>4</sub> 7.H <sub>2</sub> O . . . . .	% 0.1
KCl . . . . .	% 0.1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	% 0.3
Ürik asit . . . . .	% 0.1

Ortamın pH derecesi çalışmanın özelliğine göre 1 N HCl ve 1 N NaOH çözeltileri ile istenen pH değerlerine dengelendi. Hazırlanan üreme ortamları 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle otoklavda steril edildi.

**Ortamlara ekim ve üremenin ölçülmesi:** 500 ml'lik erlenmayerlerde 100 ml olacak şekilde hazırlanan steril üreme ortamlarına spor sayısı  $5.3 \times 10^4$  / ml olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim yapılan ortamlar değişen deney koşullarına göre farklı sıcaklık ve sürelerde, 150 r.p.m çalkalama hızına sahip etüvlerde üretime bırakıldı. Üreme yaş ağırlık cinsinden ölçüldü. Bu amaçla 100 ml'lik besiyerinde üreyen miçeller süzülerek toplandı ve hassas terazide gram cinsinden tartılarak gr/ 100 ml olarak belirtildi.

**Enzim ekstraksiyonu:** *A. niger*'den ürikaz enziminin ekstraksiyonu Wang ve Marzluf (1980)'un *Neurospora crassa*'dan ürikaz ekstraksiyon metodu modifiye edilerek gerçekleştirildi (17).Yukarıda içeriği verilen besiyerinde üretimi takiben, miçeller çift katlı tül bent bezinden süzülerek toplandı. Toplanan miçeller üç kez distile su ile yıkandı ve ağırlıkları gram cinsinden tartılarak ölçüldü (yaş ağırlık). Daha sonra süzülüp sıkıştırılan miçel pedleri, -80°C'de bir gece boyunca donduruldu. Bu işlemden sonra miçeller oda ısısında çözüldü. Ağırlıklarının eşdeğer ağırlığında asitle yıkanmış deniz kumu ve 50 mM, pH 7.2 Tris - HCl tamponunda (gr / 1 ml) 0°C'de, porselen havanda 5 dakika süre ile ezilerek homojenize edildi. Homojenat çift katlı tül bent bezinden süzülerek 5.000 r.p.m'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası, dökeltide enzim aktivitesine bakıldı.

**Ürikaz aktivitesinin ölçülmesi:** Ürikaz aktivitesi, kaybolan substrat (ürik asit) miktarının hesaplanmasıyla ölçüldü. Enzim kaynağı olarak, ekstrakte enzim, substrat olarak da, 50 mM borat tamponunda (pH 8.5) hazırlanmış, 0.1 mM'lık stok ürik asit çözeltisi kullanıldı. Aktivite ölçümleri, 0.1 ml ekstrakte enzim, 1.5 ml stok ürik asit çözeltisi, 1.5 ml 50 mM, pH 8.5 borat tamponu ile hazırlanmış enzim-substrat karışımındaki absorbansın 290 nm'deki (ürik asit için  $E = 1.22 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ ) azalması izlenerek spektrofotometrik (Jenway 6105 UV/VIS Spectrophotometer) olarak gerçekleştirildi (16,18). 1 ünite ürikaz aktivitesi: 1 mikromol ürik asidi, dakikada, verilen deney koşullarında oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

#### Üretim koşullarının *A. niger* üremesine ve ürikaz aktivitesine etkisi

**Üretim süresinin ürikaz aktivitesine etkisi:** Üretim süresinin enzim aktivitesi ile ilgisini araştırmak amacıyla, *A. niger*'in üremesi farklı üretim sürelerinde ( 1, 2, 3, 4 ve 5 gün ) 30°C'de çalkantılı olarak, pH'ı 6.5 olan üretim ortamlarında gerçekleştirildi. Bu sürelerin sonunda,

ürrikaz enzimi ekstre edildi. Üreme ve enzim aktiviteleri ölçülerek, üretim süresi ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki saptandı.

**Üretim sıcaklığının ürikaz aktivitesine etkisi:** *A. niger*'in üretilmesi 25, 30, 35 ve 40°C'lik çalkantılı etüvlerde (150 r.p.m) pH'ı 6.5 olan üretim ortamlarında 3 gün süreyle gerçekleştirildi. Farklı sıcaklıklarda üretim sonrası, üreme ve enzim aktiviteleri ölçülerek, üretim sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi belirlendi.

**Üretim ortamı başlangıç pH'ının ürikaz aktivitesine etkisi:** Üretim ortamı başlangıç pH'ının ürikaz aktivitesine etkisini belirlemek için, değişen pH derecelerine (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5) dengelenen üretim ortamlarına ekim yapıldı ve 30°C'de çalkantılı (150 r. p. m) olarak 3 gün süreyle üretime bırakıldı. Üreme ve enzim aktiviteleri ölçülerek, üretim pH'ı ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki saptandı.

**Üretim ortamlarındaki farklı karbon kaynaklarının ürikaz aktivitesine etkisi:** *A. niger*'in üremesine ve ürikaz aktivitesine etkili olan faktörlerden biri de karbon kaynağının çeşididir. Enzim aktivitesi açısından en uygun karbon kaynağını belirlemek amacı ile % 3 oranında glukoz, fruktoz, sukroz, maltoz içeren üretim ortamları hazırlandı. Ortamlara ekimin yapılması ve üretime takiben, üreme ve aktivite ölçümleri yapıldı.

**Üretim ortamındaki indüktör (ürrik asit) derişiminin ürikaz aktivitesine etkisi:** Çalışmanın bu bölümünde, üretim ortamında tek azot kaynağı ve indüktör molekül olarak kullanılan ürik asit derişiminin ürikaz aktivitesine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, farklı ürik asit derişimlerine sahip (% 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150) üretim ortamları (pH 6.0) hazırlandı. 30°C'de çalkantılı (150 r. p. m) olarak 3 gün süreyle üretim sonrası, üreme ve aktivite ölçümleri yapılarak, indüktör derişimi ile aktivite arasındaki ilişki saptandı.

**Üretim ortamına eklenen amonyumlu bileşiklerin ürikaz sentezine etkisi:** Üretim ortamını azot kaynağı açısından zenginleştirmek ve amonyumlu bileşiklerin ürikaz sentezine etkisini araştırmak amacı ile % 0.1 oranında ürik asit içeren üretim ortamlarına, ayrı ayrı % 0.1 ve % 0.2 olmak üzere, amonyumdihidrojen fosfat, amonyum asetat ve amonyum sülfat eklendi. Bütün besiyerlerinin pH'sı 6.0'ya dengelendi. Ekim yapıldıktan sonra, 30°C'de 3 gün süreyle, çalkantılı olarak üretime bırakıldı. Üretim sonrası üreme ve aktivite ölçümleri yapıldı.

**Üretim ortamına eklenen MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> ve FeSO<sub>4</sub>'ün ürikaz sentezine etkisi:** Çalışmanın bu bölümünde, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> ve FeSO<sub>4</sub>'ün *A. niger*'de ürikaz sentezine etkileri araştırıldı. Bu amaçla, % 0.05, 0.1 ve 0.2 olacak şekilde metal tuzları üretim ortamlarına eklendi. Üretim sonrası, üreme ve aktivite ölçümleri yapılarak, denenen metal tuzlarının enzim aktivitesine etkileri saptandı.

***A. niger*'in ürik asitli ortama adaptasyonunun ürikaz aktivitesine etkisi:** *A. niger*'i saklamak ve sıvı besiyerlerine (üretim ortamı) ekimin yapılması için kullanılan Czapek Dox Agar yerine, içeriği yukarıda verilmiş olan üretim ortamına % 1.5 oranında agar eklenerek katı besiyeri hazırlandı. Tek azot kaynağı olarak ürik asit içeren bu besiyeri (ürrik asitli agar) stok fungus

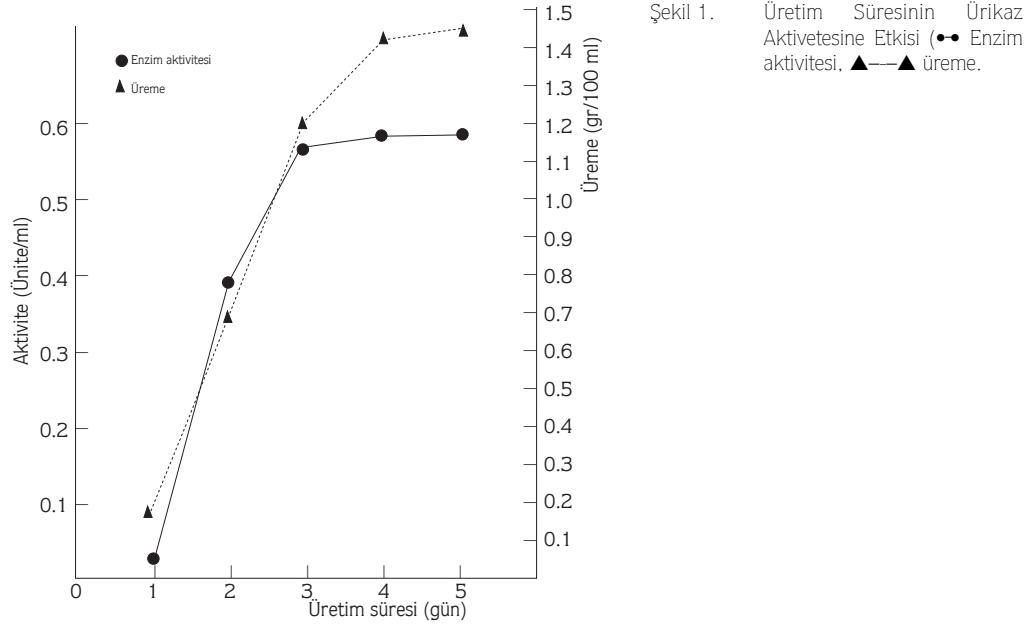
kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı. *A. niger*'in ürik asitli agarlara peşpeşe pasajı yapılarak ürik asitli ortama adaptasyonu gerçekleştirildi. Ürik asitli agar üzerinde üretilen *A. niger* ile Czapek Dox Agar üzerinde üretilen *A. niger* üretim ortamlarına ekildi. 30°C'de, çalkantılı olarak, 1 - 4 gün süreyle üretime bırakıldı. Üretim sonrası üreme ve aktivite ölçümleri yapılarak, değerler birbirleriyle karşılaştırıldı.

## Bulgular

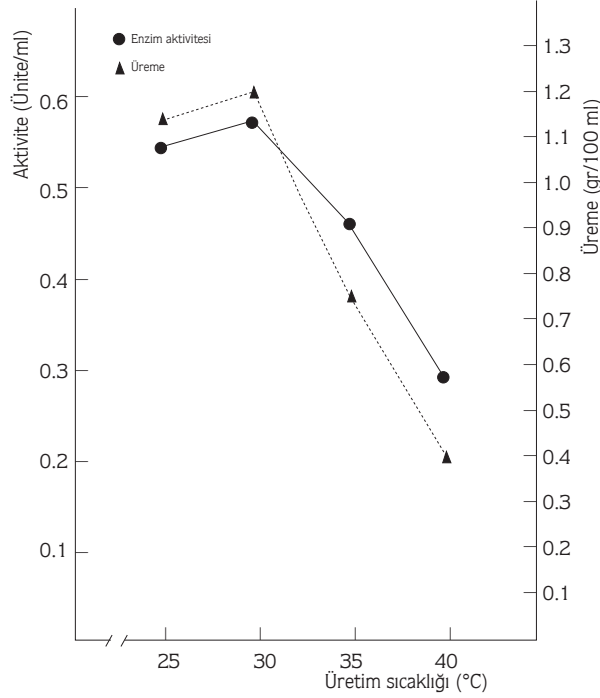
### Üretim koşullarının *A.niger* üremesine ve ürikaz aktivitesine etkisi.

Üretim süresinin ürikaz aktivitesine etkisi: 30°C'de çalkantılı olarak üretime bırakılan örneklerde üremenin 3. gününde maksimum ürikaz aktivitesi (0.570 U/ml) ölçüldü. Üretim süresinin ürikaz aktivitesine etkili olduğu ve üretim süresinin bu süreden daha fazla gerçekleştirildiğinde ise, ürikaz aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmediği belirlendi (Şekil 1).

Üretim sıcaklığının ürikaz aktivitesine etkisi: Üç gün süreyle üretilen *A.niger* kültürlerinden enzim ekstraksiyonu yapılarak, enzim aktivitesi ve fungus üremesi ölçüldü. Üretim sıcaklığının hem fungus üremesi hem de enzim aktivitesi üzerine oldukça etkili olduğu saptandı. 30°C'de üreme 1.19 gr/100ml, enzim aktivitesi 0.568 U/ml iken 40°C'de, fungus üremesi 0.41 gr/100ml, enzim aktivitesi ise 0,286 U/ml olarak ölçüldü (Şekil 2). Optimum üreme sıcaklığı 30°C olarak belirlendi.



Şekil 1. Üretim Süresinin Ürikaz Aktivitesine Etkisi (●-● Enzim aktivitesi, ▲-▲ üreme).

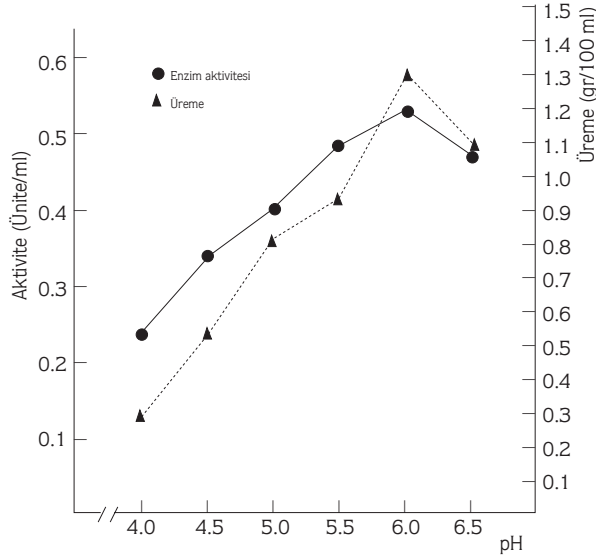


Şekil 2. Üretim Sıcaklığının Ürikaz Aktivitesine Etkisi (●-● Enzim aktivitesi, ▲-▲ üreme).

**Üretim ortamı başlangıç pH'sının ürikaz aktivitesine etkisi:** Değişen pH değerlerine dengelenen üretim ortamlarında 30°C'de çalkantılı olarak gerçekleştirilen üretim sonrası üreme ve enzim aktiviteleri ölçüldü. pH değeri 4 olan besiyerindeki üreme 0.380 gr/ 100ml ve enzim aktivitesi 0.270 U/ml olarak ölçülürken pH değeri 6 olan besiyerinde üreme 1.36 gr/ 100 ml ve maksimum enzim aktivitesi 0.620 U/ml olarak ölçüldü (Şekil 3).

**Üretim ortamındaki farklı karbon kaynaklarının ürikaz aktivitesine etkisi:** Üretim ortamındaki farklı karbon kaynaklarının ürikaz aktivitesine etkisi araştırıldığında, hem üreme hem de enzim aktivitesi açısından sukroz (üreme 2.18 gr/100ml ; aktivite 0,800 U/ml), glukoz (üreme 2.05 gr / 100 ml; aktivite 0.780 U/ml) ve fruktoz (üreme 2.16 gr/100ml; aktivite 0.798 U/ml) uygun karbon kaynakları olarak saptandı. Maltoz içeren üretim ortamlarında ise üretim sonrası enzim aktivitesinin diğer karbon kaynaklarına göre daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 1).

**Üretim ortamındaki indüktör (ürik asit) derişiminin ürikaz aktivitesine etkisi:** Yüzde, 0.050, 0.075, 0.1, 0.125 ve 0.150 oranında ürik asit içeren ve pH'sı 6.0 olan üretim ortamlarında üretimi yapılan *A.niger* kültürlerinde enzim aktivitesi ölçüldü. Maksimum enzim aktivitesi % 0.1 oranında ürik asit içeren ortamda kültüre edilen örnekte saptandı (enzim aktivitesi 0.910 U/ml; üreme 2.26 gr/100m) (Şekil .4)

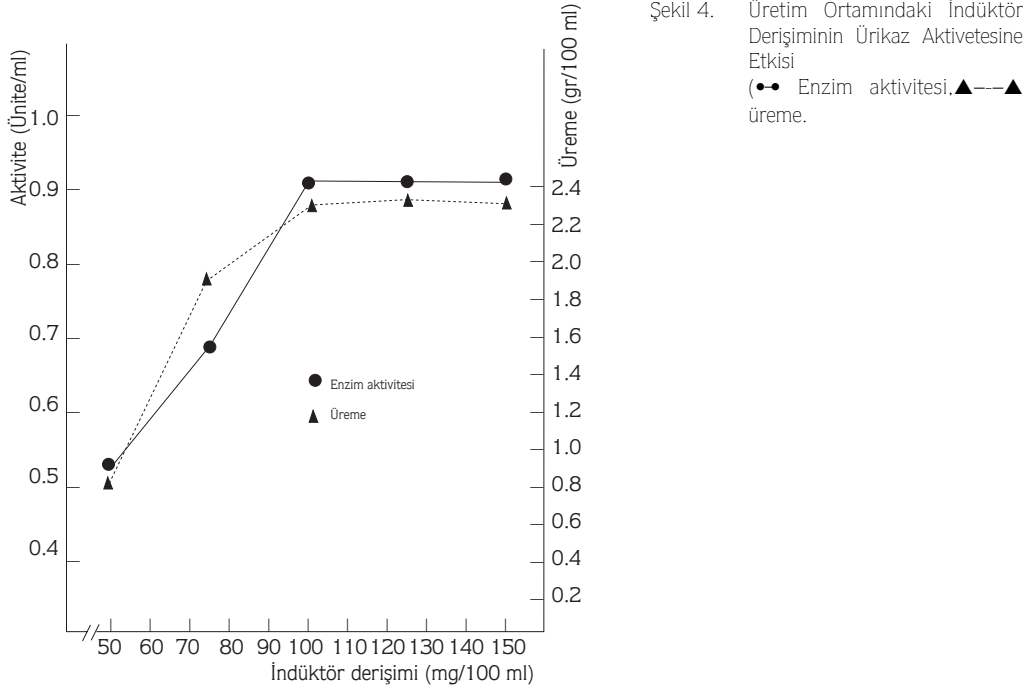


Şekil 3. Üretim Ortamı Başlangıç pH'nın Ürikaz Aktivitesine Etkisi (●-● Enzim aktivitesi, ▲-▲ üreme).

Karbon kaynakları	Üreme (gr/100 ml)	Enzim aktivitesi (U/ml)
Sukroz (% 3)	2.05 ± 0.054	0.780 ± 0.027
Glukoz (% 3)	2.18 ± 0.025	0.800 ± 0.017
Fruktoz (% 3)	2.16 ± 0.030	0.798 ± 0.014
Maltoz (% 3)	1.45 ± 0.029	0.543 ± 0.009

Tablo 1. Üretim Ortamındaki Farklı Karbon Kaynaklarının Ürikaz Aktivitesine Etkisi.

Üretim ortamına eklenen amonyumlu bileşiklerin ürikaz sentezine etkisi: Tablo 2.'de belirtildiği gibi, üretim ortamına eklenen amonyumlu bileşiklerin ürikaz sentezi üzerine etkili olduğu saptandı. % 0.1 ve % 0.2 olmak üzere farklı iki dozda denenen amonyumlu bileşiklerin fungus üremesini engellemediği, ancak ürik asit kullanımını ve ürikaz sentezini olumsuz yönde etkilediği belirlendi. Amonyumlu bileşik içermeyen besi yerinde üretilen *A. niger*'in ürikaz aktivitesi 0.989 U/ ml iken % 0.1 Amonyum asetat içeren besi yerinde üretilen *A. niger*'in aktivitesi 0.075 U/ ml % 0.2 Amonyum asetat içerenin ise 0.050 U/ ml olarak saptandı. Denenen üç farklı amonyumlu bileşiğin (Amonyum dihidrojen fosfat, Amonyum asetat ve Amonyum sülfat) % 0.1 ve % 0.2'lik dozların enzim aktivitesi üzerine inhibitör etki yaptığı saptandı (Tablo 2).



Tablo 2. Üretim Ortamına Eklenen Amonyumlu Bileşiklerin Ürikaz Sentezine Etkisi.

Amonyumlu bileşikler	Üreme (gr/100 ml)	Enzim aktivitesi (U/ml)	% İnhibisyon
Amonyum dihidrojen fosfat (% 0.1)	2.307±0.07	0.775±0.02	22.0±0.02
Amonyum dihidrojen fosfat (% 0.2)	3.240±0.09	0.534±0.03	46.1±0.03
Amonyum asetat (% 0.1)	0.700±0.04	0.075±0.04	92.42±0.04
Amonyum asetat (% 0.2)	0.827±0.03	0.050±0.06	94.95±0.01
Amonyum sülfat (% 0.1)	1.968±0.06	0.450±0.02	54.50±0.02
Amonyum sülfat (% 0.2)	2.861±0.09	0.220±0.03	77.80±0.03
*Kontrol	2.550±0.02	0.989±0.04	-

\*Kontrol grubu sadece % 0.1 ürik asit içeriyor.



Üretim ortamına eklenen  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$  ve  $FeSO_4$ 'ün ürikaz sentezine etkisi: Daha önce yapılmış çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilmiş ürikaz enzimi üzerine etkili olduğu belirtilen  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$  ve  $FeSO_4$ 'ün *A.niger* ürikazı üzerine etkileri, çalışmanın bu bölümünde araştırıldı. Belirtilen metal tuzları üç farklı dozda (% 0.05, 0.1 ve 0.2) besiyerlerine eklendi.  $CuSO_4$  ve  $FeSO_4$  içeren besiyerlerinin üç farklı dozunda da fungus üremesi gerçekleşmedi.  $CuSO_4$  ve  $FeSO_4$  fungus üremesine engel oldu. Bu nedenle enzim aktivitesi ölçülemedi. % 0.1  $MgSO_4$  içeren besiyerlerinde ise enzim aktivitesinin (0.576 U/ml),  $MgSO_4$  içermeyen besiyerlerindeki (0.035 U/ml) oldukça fazla olduğu saptandı.  $MgSO_4$ 'ün ürikaz sentezinde önemli bir role sahip olduğu belirlendi (Tablo 3).

*A. niger*'in ürik asitli ortama adaptasyonunun ürikaz aktivitesine etkisi: *A. niger*'in tek azot kaynağı olarak sadece ürik asit içeren katı besiyerinde peş peşe üretimi yapılarak adaptasyonu sağlandı. Katı vasat olarak Czapek Dox Agar'da üretilen *A. niger*'in ürikaz aktiviteleri karşılaştırıldı. Ürik asitli ortamda üretilen *A. niger*'in ürikaz aktivitesi, üremenin 2. gününde 0.948 U / ml iken, ürik asitli ortama adapte edilmemiş *A. niger*'in ürikaz aktivitesi üremenin 3. gününde 0.750 U / ml olarak ölçüldü. Ürik asitli ortama adaptasyon üretim süresi açısından olumlu bir etki göstermiştir (Tablo 4).

% $MgSO_4$	Üreme (gr/100 ml)	Enzim aktivitesi (U/ml)
-	0.276 ± 0.03	0.035 ± 0.07
0.05	1.260 ± 0.04	0.473 ± 0.05
0.10	1.480 ± 0.04	0.576 ± 0.03
0.20	1.390 ± 0.02	0.559 ± 0.04

Tablo 3. Üretim Ortamına Eklenen  $MgSO_4$ 'ün Ürikaz Sentezine Etkisi.

Tablo 4. *A. niger*'in Ürik Asitli Ortalama Adaptasyonunun Ürikaz Aktivitesine Etkisi.

Üretim Süresi (Gün)	Czapek Dox Agarda Üreme (gr/100ml)	Czapek Dox Agarda Enzim Aktivitesi (U/ml)	Ürik asitli Agarda Üreme (gr/100ml)	Ürik asitli Agarda Enzim Aktivitesi (U/ml)
1	0.225 ± 0.02	0.197 ± 0.03	0.621 ± 0.05	0.410 ± 0.04
2	0.675 ± 0.05	0.375 ± 0.02	2.045 ± 0.07	0.948 ± 0.02
3	1.784 ± 0.04	0.750 ± 0.04	2.300 ± 0.04	0.951 ± 0.06
4	2.000 ± 0.03	0.756 ± 0.07	2.520 ± 0.03	0.954 ± 0.02

## Tartışma

Ürikaz enzimi hücre içi karakterli ve indüklenebilir bir enzim olduğundan, yapılan pek çok mikrobiyal kaynaklı çalışmada, önce biyokütle (mikroorganizma) üretilmiş daha sonra, enzim indüksiyonu için farklı bir ortama aktarılmıştır (19,20). Bu tip çalışmalarda üretim ve indüksiyon farklı ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem genelde başarıya ulaşmış olmakla birlikte, iki farklı besiyerinin hazırlanmasındaki maliyet, zaman, aktarım sırasındaki yıkama ve uzun santrifügasyon aşamaları, araştırmacılara çalışma zorlukları yaratmaktadır. Diğer bir grup çalışmada ise, besiyerine hem indüktör molekül olan ürik asit hem de besiyerini zenginleştirmek ve üremeyi desteklemek amacıyla diğer azot kaynakları eklenmiştir (21,22). Birincisine kıyasla daha basit bir yöntem olmasına karşın, bu yöntemde mikroorganizma öncelikle diğer azot kaynaklarını kullanmakta, ayrıca ortamda bulunan amonyumlu bileşikler ürik asidin hücre içine alınışını engellemektedir. Bu nedenle, üreme iyi olsa bile enzim aktivitesi düşmektedir (23).

Bu çalışmada ise, azot kaynağı olarak sadece ürik asit içeren, içeriği çok basit ve hazırlaması kolay bir besiyeri kullanılarak ürikaz enzimi üretilmiştir. Üretimi ve buna bağlı olarak enzim aktivitesini etkileyen parametreler araştırıldı.

Üretim süresinin ürikaz aktivitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada, maksimum ürikaz aktivitesi *A.niger* üremesinin 3.gününde 0.570 Ünite/ml olarak saptandı (Bkz.Şekil 1). Bu bulgu *N. crassa* ve *C. utilis*'le yapılmış tek aşamalı üretim sonuçlarına benzerlik göstermektedir (21,22). Yapılan farklı çalışmalarda, iki aşamalı (farklı iki besiyeri kullanılarak) üretimde üretim süresi daha kısa olarak bulunmuştur. Ancak, enzim aktiviteleri açısından bir karşılaştırma yapıldığında, bu çalışmada bulunan enzim aktivitesinin diğer çalışmaların enzim aktivitelerine oldukça yakın yada yüksek değerlerde bulunması üç günlük üretim süresini bir dezavantaj olmaktan çıkartmaktadır. Ayrıca üretim süresinin seçiminde, çalışılan mikroorganizmanın cinsi de belirleyici bir faktördür (16,24).

Uygun üretim sıcaklığının araştırıldığı çalışmada, maksimum ürikaz aktivitesi, 30°C'de 0.568 Ünite/ ml olarak ölçüldü (Bkz. Şekil 2.). Üretim sıcaklığının hem fungus üremesine hem de enzim aktivitesine oldukça etkili olduğu belirlendi. *N. crassa* (17) ve *C. tropicalis*'ten (25) eldesinde üretim sıcaklığı 30°C olarak bildirilmiştir. Lehejckova ve ark., (1986) ürikaz aktiviteli mikroorganizmaları inceledikleri araştırmalarında üretim sıcaklığı olarak bakteriler için, 37°C'yi, diğerleri (küfler) için 28°C'yi seçmişlerdir (19). *Streptomyces*'in farklı türlerinden ürikaz üretiminin yapıldığı bir başka çalışmada yine üretim sıcaklığı 28°C'dir (26). Mısır topraklarından izole edilen *Streptomyces albogriseolus*'dan ürikaz eldesinde üretim sıcaklığı olarak 30°C belirtilmiştir (27).

Üretim ortamı başlangıç pH'nın enzim aktivitesi ve fungus üremesi üzerine etkisi araştırıldığında, her ikisinin de maksimum olarak ölçüldüğü pH değeri 6.0 olarak bulundu (Bkz. Şekil 3.). *C. tropicalis* ürikazı ile yapılan bir çalışmada üretim ortamı başlangıç pH'nın 5.2 olduğu belirtilmiştir (25). Bu çalışmada, maksimum üretim pH'ı olarak bulunan değer (pH:6.0), önceki çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir (16,28).

Tablo 1.'de de görüldüğü gibi, glukoz, sukroz ve fruktoz *A. niger*'den ürikaz eldesinde uygun karbon kaynağıdır. Bu bulgu, *C. utilis*'in ürikaz oluşturması için kültür şartlarının araştırıldığı bir çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir (28).

Ürikazın izole edildiği çalışmalarda indüklenebilir karakterde, peroksizomal bir enzim olduğu rapor edilmiştir. Enzimin sentezlenmesinde, ortamda ürik asidin yada bazı indüktörlerin varlığı gerekmektedir (29, 30,31). Bu bağlamda, üretim ortamındaki tek azot kaynağı ve aynı zamanda indüktör molekül olan ürik asit derişiminin üreme ve enzim aktivitesine etkisi araştırıldığına ise, % 0.1'lik ürik asit derişiminin en uygun değer olduğu saptandı. Yapılan farklı çalışmalarda, indüktör derişimi, *C. utilis* ürikazı için % 0.1 olarak saptanmıştır (22,28,32). *N. crassa* ürikazı için bu derişim 2 mM (17,21), *Chlamydomonas reinhardtii* ürikazı için ise 1mM (24) olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada, *A. niger* ürikazı için optimum indüktör derişimi (% 0.1), *Candida utilis* için belirtilen indüktör deritimi ile tam bir benzerlik göstermektedir.

Mikrobiyal ürikaz enziminin indüklenebilir sentezinde bir lag periyodunun yer aldığı, lag periyodunun ise substrat ile hücre duvarının etkileşimine bağlı olduğu belirtilmiştir. Hücre tarafından ürik asidin biriktirilmesinin aktif transportu gerektirdiği açıklanmıştır (33). *C. utilis* 'de amonyum iyonlarının ürik asit transportunu inhibe ettiği (23), yaygın bir şekilde, özellikle *N. crassa* için azot kaynağı olarak kullanılan amonyağın *N.crassa*'da ürikaz sentezini baskıladığı (34) belirtilmiştir. Bu bilgilerin ışığı altında, *A. niger*'de, ürikaz sentezine amonyumlu bileşiklerin etkisi araştırıldığına denenen üç farklı amonyumlu bileşiğin *A. niger* ürikaz sentezi üzerine de inhibitörük etki meydana getirdiği bulundu (Bkz. Tablo 2.).

Tanaka ve ark., (1977) (25) *Candida tropicalis*'ten ürikaz üretimi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, enzim oluşumu için  $MgSO_4$ 'ın ortamda bulunması gerektiğini savunmuşlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmaya göre enzim oluşumunu en fazla  $MgSO_4$ 'ın etkilediğini,  $FeSO_4$  ve  $CuSO_4$ 'ın ise enzim aktivitesinde önemsiz bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. *A. niger*'de ürikaz oluşumu üzerine  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$  ve  $CuSO_4$ 'ın etkileri araştırıldığına,  $FeSO_4$  ve  $CuSO_4$  içeren besiyerlerinde fungus üremesi gerçekleşmedi.  $MgSO_4$  içeren besiyerlerinde ölçülen aktivite değerleri,  $MgSO_4$  içermeyen besiyerlerinde ölçülen aktivite değerleri ile karşılaştırıldı (Bkz. Tablo 3).  $MgSO_4$ 'ın enzim sentezinde önemli bir rol oynadığı saptandı. Benzer çalışmalarda da  $MgSO_4$ 'ın ürikaz sentezi için önemli olduğu vurgulanırken,  $FeSO_4$  ve  $CuSO_4$ 'ın böyle bir öneme sahip olduğu belirtilmemiştir (16,19,26).

Özetle, *A. niger*'den tek aşamalı ürikaz üretiminde üretim süresinin 3 gün, üretim sıcaklığının 30°C, başlangıç pH'ın 6.0 ve indüktör derişiminin % 0.1 olduğu koşullarda ürikaz aktivitesinin maksimum, sukroz, glukoz ve fruktozun uygun birer karbon kaynağı olduğu, amonyumlu bileşiklerin enzim sentezini inhibe ettikleri,  $CuSO_4$  ve  $FeSO_4$ 'ın üremeyi engellediği,  $MgSO_4$ 'ın ise enzim aktivitesi ve üreme üzerine olumlu bir etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Bu çalışma kapsamında, pürin metabolizması bozukluklarında teşhis ve tedavide önemli bir yere sahip olan ürikaz enzimi *A.niger*'den tek tip besiyeri kullanılarak elde edilmiş ve aktiviteye

etkili bazı faktörler belirlenmiştir. Elde edilen bulguların ışığı altında *A. niger*'in iyi bir ürikaz kaynağı olduğu saptanmıştır. Enzim eldesi, basit ve ekonomik bir yöntemle gerçekleştirilmiş olup, bu yöntemin endüstriyel ölçekli üretimde uygulanabilirliği, biodisk fermentörler kullanılarak araştırılabilir. *A. niger* ürikazının, günümüzde ürik asit tayininde kullanılan biyosenzorlerin yada diyagnostik kitlerin yapımında yer alması olasıdır.

## Kaynaklar

1. Fujiwara, S., Ohashi, H., Noguchi, T., Comparison of intraperoxisomal localization from and properties of amphibian *Rana catesbeiana* uricase with those of other animal uricases. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 1, 23 - 26. 1987.
2. Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Harper'in Biyokimyası. (Çev: G.Menteş, B. Ersöz), İstanbul, 1993, Barış Kitabevi, 422 - 439.
3. Liu, J., Li, G., Liu, H., Zhou, X., Purification and properties of uricase *Candida sp.* and its application of uric acid analysis in serum, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 47, 1, 57 - 63, 1994.
4. Yeldandi, A.V., Wang, X., Alvares, K., Kumar, S., Rao, M.S., Reddy, J.K., Human urate oxidase gene: Cloning and partial sequence analysis reveal a stop codon within the fifth exon., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171, 2, 641 - 646. 1990.
5. Bhargava, A. K., Lal, H., Pundir, C.S., Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase, *J. Biochem., Biophys., Methods.* 39,3,125-136,1999.
6. Mahler, J.L., A new bacterial uricase for uric acid determination, *Analyt. Biochem.*, 38, 65 - 84, 1970.
7. Kinsella, J.E., German, B., Shetty, J., Uricase from fish liver: Isolation and some properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 B, 621 - 624. 1985.
8. Montalbini, P., Redondo, J., Caballero, J., Pineda, M., Uricase from leaves: Its purification and characterization from three different higher plants, *Planta*, 202, 3, 277-283, 1997.
9. Pawlotsky, Y., Hyperuricemia and gout: therapeutic indications. *Rev. Prat.*, 44, 2, 206 - 209, 1994.
10. Tsujino, Y., Yokoo, Y., Skato, K., Hair coloring and waving using oxidase, *J. Soc. Cosm. Chem.*, 42, 4, 273 - 282, 1992.
11. Nakagawa, S., Oda, H., Anazawa, H., High cell - density cultivation and high recombinant protein production of *Escherchia coli* strain expressing uricase. *Bio. Biotech. Biochem.*, 59, 12, 2263 -2267, 1995.
12. Kan, J.Q., Zhou, F., Mu, S.L., Shi, Y.J., Effect of alpha, alpha'- bipyridine on activity of the polyaniline uricase electrode, *Sens., Act., B- Chem.*, 30,1, 7-10, 1996.
13. Miland, E., Ordieres, A.J.M., Blanco, P.T., Smyth, M.R., Fagain, C.O., Poly (o - aminophenol) - modified bienzyme carbon - paste electrode for the detection of uric acid, *Talanta*, 43, 5, 785 - 796, 1996.
14. Hasebe, Y., Nawa, K., Ujita, S., Uchiama, S., High sensitive flow detection of uric acid based on an intermediate regeneration of uricase. *Analyst.*, 123, 8, 1775-1780, 1998.
15. Nakaminami, T., Ito, S., Kuwabata, S., Yoneyama, H., Uricase-catalysed oxidation of uric acid artificial electron acceptor and fabrication of amperometric uric acid sensors with use of a redox ladder polymer, *Anal. Chem.*, 71, 10, 1928-1934, 1999.

16. Yokoyama, S., Ogawa, A., Obayashi, A., Rapid extraction of uricase from *Candida utilis* cells by use of reducing agent plus surfactant. *Enzy. Microb. Technol.*, 10, 52-55, 1988.
17. Nahm, B., H., Marzluf, G., A., Induction and de novo synthesis of uricase a nitrogen - regulated enzyme in *Neurospora crassa*, *J. Bacteriol.*, 169,5,1943-1948,1987.
18. Sidal (Ertan), F., Aksöz, E., *Candida utilis* C-468'in üremesine ve ürikaz aktivitesine etki eden bazı parametrelerin incelenmesi, *Biyokimya Dergisi*, XVII, 1, 77-90, 1992.
19. Lehejckova, R., Demnerova, K., Kralova, B., Screening of microorganisms with uricase activity, *Biotech. Lett.*, 8, 5, 341 - 342,1986.
20. Ramana, V., V., Sastry, K.S., Chromium- uric acid complexes as growth substrates and inducers of uricase in *Neurospora crassa*, *J. İnorg. Biochem.* 50, 2, 107-117,1993.
21. Wang, L.C., Marzluf, G.A., Purification and characterization of uricase, a nitrogen regulated enzyme from *Neurospora crassa*, *Biochem. Biophys.* 201, 185-193,1980.
22. Kralova, B., Lehejckova, R., Demnerova, K., Dobransky, T., Extraction of uricase from *Candida utilis*, *Biotech. Lett.*, 8, 99-102, 1986.
23. Roush, A. H., Domnas, A. J., The active transport and metabolism of purines in the yeast, *Candida utilis*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 54, 275 -286, 1959.
24. Alamillo, J.M., Cardenas, J., Pineda, M., Purification and molecular properties of urate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochem. Biophys. Acta.* 1076, 203-208, 1991.
25. Tanaka, A., Yamamura, M., Kawamoto, S., Fukui, S., Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as a substrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 342 - 346, 1977.
26. Demnerova, K., Kralova, B., Lehejckova, R., Adamek, V., Purification of uricase by different strains of *Streptomyces*. *Biotech. Lett.*, 8,8, 577-578,1986.
27. Ammar, M.S., Elwan, S. H., El-Shahed, A. S., Uricolytic *Streptomyces albogriseolus* from an Egyptian soil: 1. Taxonomy and uricase production and properties, *Egyp. J. Microbiol.*, 22,2, 261 - 280,1988.
28. Liu, J. and Li, G., Culture conditions for uricase of *Candida utilis*, *Acta Microbiol. Sinica.*, 29, 1, 45-50,1989.
29. Roush, A. H., Saeed, M., Purification and properties of induced uricase from the yeast *Candida utilis*, *Fed. Proc.*, 22, 292,1963.
30. Fluri, R., Kinnghorn, J. R., Induction control of purine catabolism in *Schizosaccharomyces pombe*, *Curr. Gen.* 9, 7, 573 - 578, 1985.
31. Lepatois, P., Douarin, B., Loison, G., High-level production of a peroxisomal enzyme: *Aspergillus flavus* uricase accumulates intracellularly and is active in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* 122, 1, 139-145,1993.
32. Adamek, Y., Kralova, B., Suchova, M., Valentova, O., Demnerova, K., Purification of microbial uricase, *J. Chrom.*, 497, 268 - 275, 1989.
33. Roush, A. H., Domnas, A.J., Induced biosynthesis of uricase in yeast, *Science.* 124, 125 - 126, 1956.
34. Wang, L.C. and Marzluf, G.A., Nitrogen regulation of uricase synthesis in *Neurospora crassa*, *Mol. Genet.*, 176, 385 - 392, 1979.