

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIVI İNSAN ATIKLARINDA ÜRE HİDROLİZİNE ETKİ
EDEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Çevre Müh. Selin TOPÇUOĞLU
(501051719)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25 Aralık 2006
Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Ocak 2007**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Olcay TÜNAY
Diğer Jüri Üyeleri Doç.Dr. Emine UBAY ÇOKGÖR (İTÜ)
Prof.Dr. Semiha ARAYICI (İ.Ü)**

ŞUBAT 2007

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimi ile tüm desteğini, ilgisini esirgemeyen ve çalışmanın her aşamasında hoşgörü ve anlayışı ile yanımda olan saygıdağer danışman hocam Prof. Dr. Olcay TÜNAY'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tüm tez çalışmam boyunca, desteğini, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında yön gösteren çok değerli hocam Prof.Dr. N. Işık Kabdaşlı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince verdiği destek, bilgi paylaşımı ve tüm yardımları için değerli hocam Dr. Tuğba Ölmez'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Çevre Y. Müh. Burcu Vardar, Çevre Y. Müh. Mehmet Tatlı BALI ve Çevre Y. Müh. Zeynep ATALAY'a candan teşekkür ederim.

Beni bugünlere kadar sabırla taşıyan annem Günseli TOPÇUOĞLU ve babam Hayri TOPÇUOĞLU'na verdikleri karşılıksız sevgi, emek, sabır, destek için sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımda çok değerli bir yeri olan biricik kardeşim Semral TOPÇUOĞLU'na bana verdiği hertürlü destek için teşekkür ederim.

Anlayışı ve sabrı için sevgili arkadaşım Eser ATALAS'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. İDRAR BİLEŞİMİ	2
2.1 İdrarın Ayrı Toplanması ve Değerlendirilmesi	2
2.2. Üre Hidrolizi ve Bu Konuda Yapılmış Çalışmalar	6
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	20
3.1 Deneysel Çalışmaların Planlanması	20
3.2 Deneysel Çalışma Düzeni	22
3.2.1 Materyal	22
3.2.2 Metod	23
3.3 Deneysel Çalışma Sonuçları	23
3.3.1 Optimum üreaz konsantrasyonunun tespiti için yapılan ön deneysel çalışmalar	25
3.3.1.1 1000 mg N/lt üre çözeltisi 10 mg üreaz/ lt ile hidrolizi	25
3.3.1.2 1000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi	26
3.3.1.3 3000 mg N/lt üre çözeltisi 10 mg üreaz/ lt ile hidrolizi	27
3.3.1.4 3000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi	28
3.3.1.5 6000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi	29
3.3.1.6 Optimum üreaz konsantrasyonunun seçilmesi	30
3.3.2 İdrarın içinde bulunan tuzların etkisinin incelendiği deneyler	33
3.3.2.2 6000 mg N/lt üre çözeltisine KCl ve NaCl tuzlarının ilavesi	34
3.3.2.3 6000 mg N/lt üre çözeltisine tüm tuzların ilavesi	36
3.3.2 pH'ın etkisinin incelendiği pH kontrollü ve kontrolsüz yürütülen deneyler	38
3.3.2.1 pH kontrolsüz üre hidrolizi	38
3.3.2.2 pH Kontrollü Üre Hidrolizi	39
3.3.3 Üreaz konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneyler	40
3.3.3.1 10 mg üreaz/lt	40

3.3.3.2 15 mg üreaz/lt	41
3.3.3.3 25 mg üreaz/lt	41
3.3.4 Üre konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneyler	42
3.3.4.1 870 mg N/lt üre konsantrasyonu içeren idrar numunesi	42
3.3.4.2 2600 mg N/lt üre konsantrasyonu içeren idrar numunesi	43
3.4 Deneysel Çalışmanın Değerlendirilmesi	46
3.4.1 Sentetik ve idrar numunesinde yürütülen deneylerin birbirleri ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi	46
3.4.2 Kinetik değerlendirme	49
3.4.2.1 Sentetik numunelerde kinetik değerlendirme	49
3.4.2.2 İdrar numunesinde kinetik değerlendirme	52
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	57
EKLER	59
ÖZGEÇMİŞ	79

KISALTMALAR

KOI : Kimyasal Oksijen İhtiyacı
AKM : Askıda Katı Madde

TABLO LİSTESİ

	<u>SayfaNo</u>
Tablo 2.1 İdrarın kompozisyonu	4
Tablo 3.1 İdrarın tipik bileşimi	22
Tablo 3.2 Literatürden elde edilen Km ve substrat değerleri	23
Tablo 3.3 Sentetik numunelerde yapılan ön deneyler.....	33
Tablo 3.4 KCl ve NaCl tuzlarının ilave edildiği reaksiyon sonuçları.....	36
Tablo 3.5 Yapılan tüm deneylerin birlikte gösterimi.....	38
Tablo 3.6 pH kontrollü ve kontrolsüz yürütülen reaksiyonların karşılaştırılması.....	39
Tablo 3.7 Farklı üreaz konsantrasyonunda sürdürülen reaksiyon sonuçları....	41
Tablo 3.8 Seyrelmiş ve seyrelmemiş idrar numunesinde hidroliz reaksiyonu.	45
Tablo 3.9 870 mg N/litre üre içeren seyreltilmiş idrar numunesinde ve 1000 mg N/litre sentetik üre çözeltisinde hidroliz reaksiyonunun karşılaştırılması.....	47
Tablo 3.10 2600 mg N/litre üre içeren seyrelmiş idrar numunesi ve 3000 mg N/litre sentetik çözeltide hidroliz reaksiyonu.....	45
Tablo 3.11 Sentetik üre çözeltisi, gerçek idrar numunesi, sentetik idrar.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1 1000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	25
Şekil 3.2 1000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi.....	26
Şekil 3.3 1000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	26
Şekil 3.4 1000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi.....	27
Şekil 3.5 3000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	27
Şekil 3.6 3000 mg N /lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi.....	28
Şekil 3.7 3000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	28
Şekil 3.8 3000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi.....	29
Şekil 3.9 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	29
Şekil 3.10 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi...	30
Şekil 3.11 1000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 ve 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonlarında yürütülen deneylerin karşılaştırılması.....	31
Şekil 3.12 3000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltinin 10 ve 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonlarında yürütülen deneylerin karşılaştırılması.....	31
Şekil 3.13 3000 mg N/lt ve 6000 mg N/lt üre konsantrasyonlarında sentetik çözeltilerin 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda hidrolizi.....	32
Şekil 3.14 KCl ve NaCl tuzlarının etkisinin araştırılması.....	34
Şekil 3.15 Farklı NaCl konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	35
Şekil 3.16 Tuzlarla yapılan hidroliz reaksiyonlarının, üre çözeltisi ve	

	sentetik idrar numunesi ile karşılaştırılması.....	37
Şekil 3.17	II. İdrar numunesi ile yürütülen pH kontrollü-kontrolsüz hidroliz reaksiyonu.....	40
Şekil 3.18	İdrar Numunesinin 25-15-10 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda hidrolizi.....	42
Şekil 3.19	870 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunesinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	43
Şekil 3.20	2600 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunesinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda reaksiyon süresince hidrolizi...	43
Şekil 3.21	9400 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunesinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	44
Şekil 3.22	4700 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunesinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda tüm reaksiyon boyunca hidrolizi.....	45
Şekil 3.23	1000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik ve 870 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunelerinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda hidrolizi.....	47
Şekil 3.24	3000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik ve 2600 mg N/Lt üre konsantrasyonunda idrar numunelerinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda hidrolizi.....	48
Şekil 3.25	Sentetik üre çözeltisi, gerçek idrar numunesi ve sentetik idrar numunelerinde yürütülen hidroliz reaksiyonlarının karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.26	6000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik üre çözeltisinin 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda 360 dakika boyunca hidrolizi.....	50
Şekil 3.27	6000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltiye 5087 mg/Lt konsantrasyonunda NaCl ilavesi ile elde edilen çözeltide 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyonun 360 dakika boyunca hidrolizi.....	51
Şekil 3.28	6000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltiye 9877 mg/Lt NaCl ilavesi ile elde edilen çözeltide 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyonun 360 dakika hidrolizi....	51
Şekil 3.29	6000 mg N/Lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltiye 1921 mg/Lt KCl ve 8361 mg/Lt NaCl ilavesi ile elde edilen çözeltide 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyonun 360 dakika boyunca hidrolizi.....	52
Şekil 3.30	II. İdrar numunesinde 25 mg üreaz/Lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyonun 360 dakika boyunca hidrolizi.....	53

SIVI İNSAN ATIKLARINDA ÜRE HİDROLİZİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Günümüzde evsel atıksuların arıtımında en önemli sorun nutrient giderimidir. Biyolojik yöntemler ile nutrient giderilmesi hem maliyeti arttırmakta, hem de geri kazanımı güçleştirmekte veya imkansız hale getirmektedir. Bu nedenle insan atıklarının kaynağa ayrı toplanması önem kazanmıştır. İnsan idrarı ayrı bir akım halinde toplandığında, kalan atıkların arıtımı da kolaylaşmakta, idrar akımında ise geri kazanma mümkün hale gelmektedir. Evsel atıksularda, toplam azot yükünün %80'i ve toplam fosfat yükünün ise %60'ının idrardan geldiği düşünülecek olursa idrarın çok önemli miktarda nütrient içeriği olduğu görülmektedir.

İdrar içinde bulunan üre, üreaz enzimi ile hidroliz olmakta, karbamat ve amonyum iyonu formuna dönüşmektedir. Hidroliz boyunca amonyağın açığa çıkması ile pH yükselmektedir. Üre hidrolizi ile ilgili araştırmaların başlamasının en önemli sebebi, arıtma tesislerine yüksek konsantrasyonda N girdisi yapan idrarın, hidrolizine etki eden ve hidroliz hızını yavaşlatan etkenlerin ve inhibisyon mekanizmalarının tespit edilmesidir.

Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında literatürde yapılmış çalışmalar toplanmış, dizayn açısından önemli esasları oluşturacak üre hidroliz prosesi tez çalışması çerçevesinde incelenip bir sonuca varmak hedeflenmiştir. Çalışmada 15 kadın ve erkekten karışık olarak toplanmış gerçek ve sentetik numuneler üzerinde yürütülen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. İnsan idrarında üre dışında bulunan diğer temel bileşenler adım adım ilave edilerek bunların hidroliz kinetiğine etkisi araştırıldı. Daha sonra, gerçek idrar numunesinde, yine sisteme üreaz enzimi ilave ederek üre hidroliz reaksiyonu yürütüldü ve kinetik değerlendirmeler sentetik numune sonuçları ile karşılaştırıldı.

FACTORS EFFECTING UREA HYDROLYSIS IN ANTROPOGENIC NUTRIENT SOLUTION

SUMMARY

One of the incentives for the segregation of human waste is nutrient recovery. Segregated human urine which is also termed anthropogenic nutrient solution (ANS) is rich in terms of nitrogen and phosphorus. Segregation of ANS makes the remaining household wastewater easy-to-treat, avoiding the expensive and complex systems of nitrogen and phosphorus treatment. ANS contains % 80 of total nitrogen and %60 of total phosphorus of the domestic waste water.

The enzyme urease catalyzes the hydrolysis of urea. The products of the reaction are ammonia and carbamate, the latter spontaneously decomposing to ammonia and carbonic acid. By the increasing of the concentration of ammonia the pH value increases. The most important reason of starting the urea hydrolysis studies is determinations of inhibition mechanisms and the matters effects urea hydrolysis rate of ANS which gives high concentration to the wastewater treatment plant.

In case of the thesis study the theoretical evaluations of the literature data was done and the important parameters of the ure hydrolysis process investigated and aimed to get a result. Experimental study conducted on real and artificial samples. Real samples collected from an average 15 people evenly distributed between sexes to make up a representative mixture. Experimental results got after series of experiment was compared literature data. At second stage of the experimental study, components of the ANS was added step by step to artificial sample and then conducted hydrolysis of urea in this solution. After that by the addition of urease enzymatic ure hydrolysis is studied in the antropogenic nutrient solution. The kinetic analysis of the experimental results were done and evaluated by in comparison with the literature data.

1. GİRİŞ

İdrardaki ürenin hidrolizi, idrarın ayrı toplanması, toplandıktan sonra, depolanması ve arıtılması açısından son derece önemli ve zaman kısıtlayıcı olan bir prosestir. Dolayısı ile bu prosesin çeşitli açılardan incelenip değerlendirilmesi arıtma, bekletme, depolama açısından son derece önem taşımaktadır.

İdrar ayrı toplandığında üre hidroliz olmazsa amonyanın ve özellikle fosfatın arıtılması mümkün olmamaktadır. Membran kullanımı, kimyasal çöktürme gibi konvansiyonel yöntemler ve iyon değişimi gibi ileri arıtma yöntemleri kullanılsa bile ürenin idrardan ayrılması mümkün olmamaktadır. Dolayısı ile üre hidroliz prosesinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve toplama, depolama ve arıtma tesislerinde gerekli dizayn esaslarını verecek şekilde sistemin tanımlanması gerekmektedir. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında literatürde yapılmış çalışmalar toplanmış, dizayn açısından önemli esasları oluşturacak üre hidroliz prosesi tez çalışması çerçevesinde incelenip bir sonuca varmak hedeflenmiştir. Buna ilave olarak; idrar bekleme tanklarında birkaç saatliğine bekletilebilmektedir. Eğer idrar bekleme tanklarında daha fazla bekletilirse, sistem içindeki çepere yerleşmiş bakteriler üreaz salgıladıklarından idrar hidroliz olmakta, amonyak kaybı olmakta, pH yükselmekte, koku ve sinek gibi problemlerle karşılaşmaktadır. Bu sebeple, tez çalışmasındaki deneysel çalışmalar çerçevesinde üre hidrolizinde birkaç saatlik süreler esas alınmıştır.

2. İDRAR BİLEŞİMİ

2.1 İdrarın Ayır Toplanması ve Değerlendirilmesi

İnsanlar, azot, fosfor, potasyum gibi nütrientler içeren organik maddeleri tüketmektedirler. Organik formda bağlanmış kimyasal enerji, organik karbonun karbondioksite dönüştüğü solunum sistemi tarafından kullanılmakta ve CO₂ olarak dışarı atılmaktadır. Üre ve dihidrojen fosfat gibi maddeler ise, boşaltım sisteminde toplanmakta ve insan metabolizmasının bir atık ürünü olan idrar şeklinde atılmaktadır (Larsen ve Gujer, 1996).

İdrar temel olarak sodyum klorür (NaCl) ve üre [CO(NH₂)₂] bileşiklerinden oluşmaktadır. Bununla birlikte idrar; potasyum (K⁺), kalsiyum (Ca⁺), sülfat (SO₄⁻) ve fosfat içermektedir. Fosfor ortofosfat olarak (H₂PO₄⁻ yada HPO₄²⁻) bulunurken, potasyum ise katyon olarak (K⁺) bulunmaktadır. Temelde, taze idrarda toplam azot'un %80'i organik formda üre[CO(NH₂)₂] olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, idrar evsel atıksularda nütrient geri kazanımı için anahtar bir bileşen olmaktadır (Lind ve diğ., 2000).

Nütrient geri dönüşümü ve bu dönüşümün sürekliliğinin sağlanması son yıllarda eşzamanlı olarak gelişen bir konu olmuştur. Bununla birlikte de son yıllarda yapılan çalışmalar sıvı insan atıkları konusu üzerine yoğunlaşmıştır. İnsan idrarı %80 N, % 60 P içeriği ile son derece önemli bir nütrient kaynağı olmaktadır. İnsan idrarının arıtımı ve geri dönüşümü için kaynağında ayrı toplama, taşıma ve depolama gerekmektedir. Bu aşamadan sonra gelen ikinci aşamada ise idrarın içindeki bileşenlerin kullanılabilir forma dönüştürülmesi önem taşımaktadır. Bu proses iki kademeli olarak ifade edilebilir. İlk proses, idrarda üre içinde bulunan N kaynağının amonyağa dönüşümü olan hidroliz prosesi olarak ifade edilirken. İkinci proses ise, sütrüvit çöktürmesi ile amonyağın geri kazanımı prosesi olarak ifade edilebilmektedir (Kabdaşlı ve diğ., 2006).

Tablo 3.1.'de görüldüğü gibi, evsel atıksularda toplam azot yükünün %80'i ve toplam fosfat yükünün ise %60'ı idrardan gelmektedir. İdrar içeriğindeki azotun

büyük bir miktarı da üreden kaynaklanmakta (Jönsson ve diğ., 1997) ve nütrientlerin önemli bir miktarı, küçük bir idrar hacminde bulunmaktadır. İdrarda bulunan bu nütrientler tamamiyle arıtma tesisinde kullanılabilecek bir yapıda olmaktadır (Berndtsson, 2005). İdrarın ayrı toplanıp arıtılması atıksu arıtma tesislerinde çok önemli bir problemin ortadan kalkmasını sağlamakta (Wilsenach ve Loosdrecht, 2004) ve atıksu kompozisyonunda belirgin bir değişikliğe yol açmaktadır (Larsen ve Gujer, 1996). Böylece işlenebilir arazilere geri kazanılan nütrient miktarında önemli bir artış meydana gelmektedir. Ayrıca idrarın, tam olarak ayrı toplanması aynı zamanda biyolojik arıtma tesislerinde KOİ ve P parametrelerinin konsantrasyonunu düşürmektedir. Dolayısıyla, büyük yatırımlar gerektiren nitrifikasyon ve biyolojik nütrient giderimi proseslerine gerek kalmamakta (Larsen ve Gujer, 1996) ve bu da arıtma tesislerinin işletim maliyetlerinde düşüş sağlamaktadır. İçme sularının korunmasına getireceği faydalar düşünülecek olursa, idrarın ayrı toplanması ile önemli miktarda nütrientin sulara karışması engellenmektedir (Berndtsson, 2005).

İdrar toplanmasının yaygınlaşması, idrarın bahçelerde ve tarımda direkt olarak kullanılmasını sağlayacak teknolojiyi teşvik etmektedir. Bu gelişme kırsal kesimde nütrient kontrolünün temelini oluşturmaktadır (Larsen ve Gujer, 1996).

Tablo 2.1: İdrarın Kompozisyonu

Parametre	Birim	(Larsen ve Gujer, 1996)	(Adamsson, 2000)	(Udert ve diğ., 2003)
KOI	mg/lt	12000	-	-
Toplam Azot	mg/lt	-	11450(9100-21000)	-
TKN	mg/lt	9200	-	-
Üre-N	mg/lt	7700	9600 (6550-16100)	7700
Amonyak-N	mg/lt	-	500 (200-900)	480
Nitrat-N	mg/lt	-	12.5	-
Nitrit-N	mg/lt	-	<1	-
Toplam P	mg/lt	1000	850	-
İnorganik P	mg/lt	-	840	740
Organik P	mg/lt	-	9,2	-
HCO ₃ ⁻	mg/lt	<305	-	-
Klorür	mg/lt	-	4800 (2850-9550)	3800
SO ₄ ²⁻	mg/lt	-	3450 (3150-3950)	1500
Ca ²⁺	mg/lt	170	235 (<400)	190
Mg ²⁺	mg/lt	100	130 (60-200)	100
Na ⁺	mg/lt	4200	3450 (2200-7100)	2800
K ⁺	mg/lt	2200	2750 (1550-3900)	2200
Cl ⁻	mg/lt	3800	-	-
Fe	mg/lt	-	0,098-0,3	-
Mn	mg/lt	-	0,0014-0,098	

Organik gübrelerle karşılaştırıldığında, bitkiler tarafından direkt olarak kullanılabilir nütrientler ham idrarda oldukça fazla miktarda bulunmaktadır (Jönsson ve diğ., 1997). Ticari gübre kullanımının %35-45 oranında azaltılabilmesi, evsel atıksulardaki tüm nütrientlerin geri devrettirilebilmesi ile mümkün olmaktadır. İdrarın gübre olarak kullanılması ile ticari gübre kullanımında %20-25'lik oranda bir azalma görüleceği düşünülmektedir. Bu sebeple, insan idrarındaki nütrientlerin geri kazanımı ve tekrar kullanımlarının gelecekte ekolojik döngü açısından çok önemli olacağı düşünülmektedir (Lind ve diğ., 2000). Bununla birlikte, nütrient içeriği ile kıyaslandığında idrar içindeki ağır metal konsantrasyonunun oldukça düşük olduğunu, mg kadmiyum/ kg fosfor oranının 3.2 'den küçük olduğunu bildirmişlerdir.

Bu değerin, arıtma çamuru ve kimyasal gübrelerle karşılaştırıldığı zaman oldukça düşük bir seviyede olduğu görülmüştür. Ayrıca, idrardaki ağır metal içeriğinin de oldukça düşük olması, nütrient geri kazanımını ve idrarın gübre olarak kullanılmasını avantajlı kılmaktadır (Jönsson ve diğ., 1997)

İdrarın yeşil bitkiler algler için azot kaynağı olarak kullanılması ise diğer bir kullanım şeklidir (Adamsson, 2000). Ayrıca, idrarın geri kazanımının tek amacı nütrient geri kazanımı değildir. İdrarın ayrı toplanmasının diğer bir yararı ise, idrarla birlikte atıksuya idrarla birlikte karışacak diğer bileşenlerin önlenmesidir(Wilsenach ve Loosdrecht, 2004).

Jönsson ve diğ. (1997) idrar numunesinin, diğer atık su ürünleri ile kıyaslandığı zaman, az sayıda patojen barındırdığını ve barındırdığı bu patojenlerin toplama ve depolama sistemlerinde hızlı bir şekilde ölmeleri nedeniyle bir takım hijyenik avantajlara sahip olduğunu belirtmişlerdir.

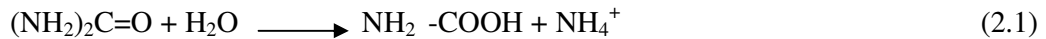
Evsel atıksulardaki azotun %80'i, potasyumun % 65'i ve fosforun %60'ı idrar kaynaklı olduğu için, nütrientlerin maksimum geri kazanımını ve döngüsünü sağlayacak, dolayısıyla da ekosistemde ötrofikasyonu azaltacak olan, idrar ayrı toplama sistemleri önerilmektedir (Lind ve diğ., 2000). İnsan idrarının kaynağa ayrılması, iki ayrı giderli tuvaletlerin kullanılması ile sağlanmaktadır. Tasarlanan bu tuvaletlerde, ayrı toplama işlemi, ön taraftaki giderden idrarın uzaklaştırılması, arka taraftaki giderden ise fekal atıkların uzaklaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Kaynağa ayırmak için dizayn edilen bu tuvaletlere iki ayrı atıksu borusu bağlanmıştır. Borulardan birisi ön kısımdan gelen idrar ve sifon suyu için, diğeri arka taraftan gelen fekal atıklar ve sifon suyu için düşünülmüştür. Ayrı toplanan idrar, toplama tankında depolanmaktadır ve yeterli miktara ulaştıktan sonra tarım alanlarında gübre olarak kullanılmaktadır. İdrar, ayrı toplama sisteminde borularda, hızlı bir şekilde amonyum ve karbon dioksit dönüşmekte ve eş zamanlı olarak pH'ı da 9 civarına yükselmektedir (Jönsson ve diğ., 1997). Diğer yandan, konvansiyonel toplama tanklarında üre hidrolizinin ayrı toplama sistemlerine nazaran daha yavaş gerçekleşeceği de vurgulanmaktadır (Kabdaşlı ve diğ., 2006). İdrar ayrı toplama sistemleri, emisyon ve nütrient geri kazanımı gibi faktörler düşünüldüğünde oldukça avantajlı olmaktadır. Atıksu arıtma sistemlerinin enerji verimlilik analizleri, idrar ayrı toplama sistemleri kullanıldığı zaman fosfor ve azot geri kazanım verimliliğinin maksimum seviyede olduğunu göstermiştir. Büyük miktarda idrarın taşınmasında,

özellikle hijyenik şartların sağlanmasında yaşanacak zorluklar sistem verimliliğini etkileyecek önemli bir engel olmaktadır. Enerji verimliliği düşünüldüğünde, idrar ayrı toplama sistemleri için temel problem taşıma ve depolama olmaktadır (Lind ve diğ., 2000).

Lind ve diğ. (2000) tarafından yapılan çalışmada, esas itibari ile dondurarak ve çözerek idrar hacminin azaltılmasına ve nütrientlerin geri kazanılmasına dayalı bir yöntem sunulmuştur. Çalışma genç ve orta yaşlı, sağlıklı beş insandan toplanan gerçek ve sentetik idrar numunesi ile yürütülmüştür. Her iki tip idrar numunesi pet şişelerde +8 °C'de buzdolabında yada -14 °C'de dondurucuda 72 saat süre ile saklanmıştır. Nütrientleri yoğunlaştırmak amacı ile yapılan bu iki tip dondurma ve eritme metodunun ilki havuzda dondurma eritme diğeri ise kolonda dondurma eritme metodudur. Sıcaklık, iletkenlik, pH, toplam N ve toplam P parametreleri ölçülmüştür. Havuzda dondurma-eritme metodunda numuneler dondurucuya konmuştur. 3-5 saat sonrasında -14 °C'de katı faz sıvı fazdan ayrılarak kolayca analiz edilebilmiş ve analizlerde pH, sıcaklık ve iletkenlik parametrelerine bakılmıştır. Donma prosesi sonrasında, erime prosesi de oda sıcaklığında (21 °C), donma prosesinde olduğu gibi NaCl tuzu ilavesi ile sürdürülmüştür. Alınan numunelerdeki iyonlar incelenmiştir. Kolonda donma-erime metodunda, erime prosesi dondurulmuş 11 ayrı pet şişede yürütülerek iyon ayrılışları gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, potasyum, azot ve fosfor gibi nütrientlerin konsantrasyonlarının ve etkili fraksiyonlarının dondurma ve eritme gibi basit bir prosesle gözlemlenebildiği ortaya konmuştur. Fosforun ve azotun % 80'den fazlası, %25'lik bir hacimde toplanabilmektedir. Dolayısıyla, bu metot idrarın toplanması ve taşınması konusunda ilerleme oluşturacak yeni bir yol olmuştur.

2.2. Üre Hidrolizi ve Bu Konuda Yapılmış Çalışmalar

Biyokimyasal sistem içinde üre üreaz enzimi ile hidroliz olmakta (2.1) ve pH 7.5'da üre üreaz ile karbamat ve amonyum iyonuna dönüşmektedir (Koizumi ve diğ., 1988). Hidroliz boyunca amonyağın açığa çıkması ile pH yükselmektedir (Udert ve diğ., 2003).

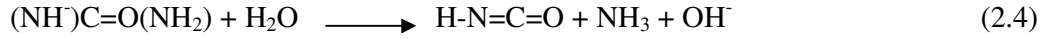


pH'ın 2'den küçük olduğu, kuvvetli asidik şartlarda ve üreazsız bir sistemde, protonik ürenin bozunma mekanizması



olarak ileri sürülmektedir (Koizumi ve diğ., 1988).

pH'ın 12'den büyük olduğu kuvvetli bazik şartlarda OH^- iyonuna bağlı iki kademeli reaksiyon olduğu belirtilmektedir (Koizumi ve diğ., 1988).



pH 2-12 aralığında, üre izosiyanik asit ($\text{H-N}=\text{C}=\text{O}$) ve amonyağa hidroliz olmaktadır. Reaksiyon hızı pH'a bağlı kalmamakta ve 38 °C'de $6 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ de sabit kalmaktadır. Bu reaksiyon üreaz ile sürdürülen reaksiyonlara nazaran 1014 kat daha yavaş gerçekleşmektedir. Deneysel olarak bu prosesin aktivasyon enerjisi 30 kcal/mol'den daha yüksek olarak bulunmuştur (Koizumi ve diğ., 1988).

Birçok enzimatik reaksiyonlar egzotermiktir. Katalizör olarak üreaz enziminin kullanıldığı üre hidrolizi, deneysel şartlara bağlı olarak termal bir etki sergilemektedir. Tampon sistemler ve pH enzimatik üre hidrolizinin molar entalpisi üzerine büyük etki yaratmaktadır. En yüksek entalpi değişimi pH 7.5'ta fosfat tamponunda -14,65 kcal/mol olarak ölçülmüştür (Kot ve diğ., 2000).

Üre hidrolizini gerçekleştiren üreaz enzimi, idrarda bulunan organizmalar tarafından üretilmektedir. Üreaz sentezini düzenleyen birçok mekanizma vardır. Azot kaynaklarının elde edilebilirliği, üre konsantrasyonu ya da pH gibi çevresel faktörler üreaz sentezini düzenleyici etki yapmakla birlikte, birçok bakteri üreaz sentezini kendiliğinden yapmaktadır (Udert ve diğ., 2003).

Üreazın bir uluslararası birimi 25 °C'de, dakikada 1×10^{-6} mol amonyak açığa çıkarmaktadır. Amonyak konsantrasyonunda meydana gelen artış çözeltinin pH'ında artışa sebep olmaktadır (Bibby ve Hukins, 1992).

Zerner (1991), 100 °C'de ürenin kuvvetli asit içinde reaksiyonunu inceleyerek, sulu çözeltilerde üre hidrolizinin etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda, protonlaşmış ürenin hidroliz olduğu görülmüş olsa da, sonuçları yetersiz bulunmuş ve ürenin sulu çözeltilerde eşzamanlı hidrolizi gözlenememiştir.

Udert ve diğ. (2003) yaptıkları çalışmada üre hidrolizi yapan bakterilerin üre toplama tanklarındaki ve borulardaki verimliliğini, üre hidrolizi ve çöktürmenin etkileşimi açıklamışlardır. Toplama tankındaki üre hidrolizini araştırmak için 4 reaktör

kullanılmıştır. Reaktörlerin birinde taze, diğer üçünde ise depolanmış idrar kullanılmış ve 25 °C’de 12 saat boyunca çalışma yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan taze idrar numunesi selüloz nitrat filtreden geçirilmiştir. Diğer üç reaktörden ilkinde arıtılmamış depolanmış idrar 0.45 x 10⁻⁶ m çapında filtreden geçirilip konmuştur, ikinci reaktöre santrifüj edilmiş depolanmış idrar ve üçüncü reaktöre ise filtrelenen idrar çamuru ve santrifüj edilmiş depolanmış idrar numunesi konmuştur. Borulardaki üre hidrolizi aktivitesi, 3 reaktör kullanılarak 25 °C’de 4.5 saat boyunca 45 dakikada bir numune alınarak izlenmiştir. Tüm deneyler 25-34 yaşları arasındaki altı kişiden alınmış, santrifüjden geçirilmiş taze idrar numunesi ile yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, toplama tankında hidrolize sebep olan nedenlerden biri üreaz faaliyeti gösteren bakteriler, diğeri ise serbest üreaz olarak tespit edilmiştir. Bu bakteriler çözelti fazında askıda bulunabildikleri gibi, tabana çökmüş olarak da bulunabilmektedirler. İdrar çözeltisinin KOİ içeriği 0.18 mg KOİ/ mg AKM olarak bulunmuştur. Üre hidrolizine sebep olan esas etkenin bulunması için, hiç bakteri içermeyen, arıtılmamış depolanmış idrar ve santrifüj edilmiş idrar ve idrar çamuru ile santrifüj edilmiş idrar kullanılmıştır. Toplama tankındaki üre hidrolizinin araştırılması için yapılan deney sonucunda yapılan değerlendirmede, amonyak üretiminin lineer olduğu regresyonla doğrulanmış ve amonyak sıyrılmasının ihmal edilebilir seviyede olduğu görülmüştür. Yapılan değerlendirmede, üre hidroliz hızının arıtılmamış depolanmış idrarda 1820 ± 110 mg N/lt.gün, santrifüj edilmiş idrarda 260 ± 30 mg N/ lt.gün, santrifüj edilmiş idrar ve idrar çamuru karışımında 230 ± 40 mg N/ lt.gün olduğu görülmüştür. Tüm hızların depolanmış idrar hacmi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Udert ve diğ. (2003) yaptıkları bu çalışmada, santrifüj edilmiş depolanmış idrar numunesinde, amonyak üretiminin gerçekleşmesini serbest üreazın bulunması sebebine bağlamışlar ve üre hidroliz aktivitesinin %14’ünün serbest üreazdan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak üre hidrolizinin esas sebebinin askıdaki bakteriler olduğunu görmüşlerdir. Santrifüj edilmiş depolanmış idrar ile karıştırılmış idrar çamuru numunesi ile elde edilen hız sonuçlarının, santrifüj edilmiş depolanmış idrar numunesinden elde edilen hız sonuçlarıyla benzer olması nedeniyle, idrar çamurunda üre hidrolizi yapan bakterilerin bulunmadığı kanısına varmışlardır.

Kabdaşlı ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada, gerçekte kendiliğinden olan üre hidrolizini temsil etmesi açısından arıtılmamış taze idrarı üreaz enzimi kullanmadan

kullanmışlardır. Bunu yanında sürdürdükleri diğer deneyde, hidrolizin hızlı olmasının sağlanması için, üreaz enzimi ilavesi ile çalışmışlardır. Literatürden alınan bilgiler çerçevesinde filtrelenmiş taze idrarda meydana gelen hidrolizin çok yavaş olduğu saptanmış ve deneysel çalışmalar üre hidrolizinin uzun zaman alacağı düşünülerek arıtılmamış idrar numunesinde pH 2-12 aralığında yürütülmüştür. Elde edilen her bir pH değeri için hidroliz hızları ve pH değişimleri kaydedilmiştir.

pH'2 de yürütülen deney sonuçlarında, bakteri büyümesinin durduğu ve bakterilerin öldüğü görülürken, 20 ve 240 saat arasında amonyak konsantrasyonunda yavaş bir artış görülmüştür. Bununla birlikte 3 hafta sonra reaksiyon hızlanmış ve normal pH değerine çıkmıştır.

pH 4'te yürütülen deneyden elde edilen sonuçlar, pH 2'de elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında oldukça yavaş bir hidroliz görülmüştür. pH 6'da yürütülen deneyde ilk 72 saat pH 4'te görülen deneye oldukça benzer bir trend izlemiştir, ancak sonra reaksiyon hızında düşüş görülmüştür. pH 10'da yürütülen deneyde ise, herhangi bir kimyasal ya da biyolojik hidroliz görülmemiştir. Kabdaşlı ve diğ. (2006) yaptıkları deneysel çalışmadan çıkarılan genel değerlendirmeye göre, pH 2 ve 12 arasında yürütülen üre hidroliz reaksiyonu pratik amaçlar için son derece yavaş olarak meydana geleceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada arıtılmamış üre numunesinde pH 2-7.5 aralığında yürütülen üre hidrolizinin oldukça yavaş meydana geldiği görülmüştür ve kabaca bir aylık bir periyotta %25 hidroliz gerçekleşmiştir. pH 10'un üstünde hiçbir hidroliz reaksiyonu gerçekleşmediği saptanmıştır.

Çalışmada üreaz enzim ilavesi ile yürütülen deney sonuçlarından Jack bean üreazı ile yürütülen enzimatik üre hidrolizinin 25 ve 49 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda çok etkili olduğu kanıtlanmıştır (Kabdaşlı ve diğ., 2006).

Tünay ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada, insan idrarında yapılan üre hidroliz proses gidişinin değerlendirilmesi yapılmış ve hidroliz reaksiyonunun ana parametrelerinin etkilerinin saptanması hedeflenmiştir. Gerçek şartlardaki üre hidroliz prosesi değerlendirilmeye çalışılmıştır ve bu doğrultuda deneysel çalışma kapsamında gerçek idrar numuneleri kullanılmıştır. 5 ve 10 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda çalışılmış ve buna ek olarak bir karşılaştırma yapabilmek amacı ile de 25 mg üreaz/lit enzimi konsantrasyonunda da deneyler yürütülmüştür. Deneyler

boyunca pH doğrulaması yapılmamıştır. Kontrolsüz şartlarla kıyaslanması ve ürün inhibisyonunun değeriendirilmesi açısından bir deney pH 7’de yürütölmüştür. Bir deneyde de 1’e 1 seyrelmiş numune kullanılmış ve buradan elde edilen sonuçlar kontrolsüz şartlarda yapılan deneylerle karşılaştırılırken aynı zamanda gerçek sistemleri yansıtmaları açısından da önem taşımıştır.

Tünay ve diğ.(2006) tarafından sürdürölen bu çalışmada 5mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda yürütölen deneyden elde edilen sonuçlardan ürenin % 40’ının bir günden daha az bir sürede hidroliz olduğu görölmüştür. pH’da adım adım değışim meydana geldiği saptanmış ancak pH’daki esas değışimin asidik şartlardan pH 9 a ulaşana kadar gerçekteştii saptanmıştır. 30. dakikadan itibaren özellikle de 50. dakikada numunede hidrojen iyonlarının artmasını sağlayacak ve pH’ın daha fazla artmasını engelleyecek olan struvit çöktürmesinin gerçekteşmesine elverişli bir hal aldığı görölmüştür. Sürdürölen hidroliz reaksiyonda enzim konsantrasyonu düşük olmasına rağmen proses yeterince hızlı bir şekilde gerçekteşmiştir.

10 mg üreaz /lt enzimi konsantrasyonunda yürütölen deneyde, proses hızlı bir şekilde gerçekteşmiştir ve 6 saatte 4000 mg /lt amonyak konsantrasyonuna ulaşmıştır. Amonyak konsantrasyonunun 5 mg üreaz /lt enzimi ile yürütölen deneylerle karşılaştırıldığında çok az değıştiği görölmüştür.

25 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda yürütölen deney sonuçları incelendiğinde, üre hidroliz prosesinin hızlı olduğu fakat 10 mg/lt üreaz konsantrasyonu ile yürütölen deney sonucu ile karşılaştırıldığında beklenen hızda olmadığı görölmüştür.

1’e 1 seyrelmiş numunede 10 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda yürütölen deneyde, reaksiyon hızı düşük olsa da, 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütölen seyreltilmemiş deneyin reaksiyon hızından çok da yavaş gerçekteşmemiştir. Bununla birlikte, seyreltilmemiş numune ile pH gidişatları kıyaslandığında pH’ın paralel olduğu görölmüştür.

pH 7’ye ayarlanıp 10 mg üreaz /lt enzimi konsantrasyonunda yürütölen deney prosesinin 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda pH ayarlaması yapılmadan yürütölen deney ile karşılaştırıldığında reaksiyonun daha hızlı gerçekteşceği görölmüştür. 100. dakikaya kadar her iki deneyde üre dönüşümleri aynı olmuştur, ancak 100. dakikadan sonra pH 7’de yürütölen deneyde üre dönüşümünün geciktiği görölmüştür. Bu gecikmenin pH 7 de amonyum iyonları nedeni ile meydana gelen

ürün inhibisyonu sonucu oluştuğu anlaşılmıştır. Deneysel çalışmada 5, 10, 15 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonlarında sürdürülen reaksiyonların 0. mertebe reaksiyon kinetiğine uyduğu ve eğrinin artan enzim konsantrasyonu ile yükseldiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, enzimatik üre hidroliz prosesinin kompleks bir proses olduğu ve hızın reaksiyon boyunca değişen bir çok faktöre bağlı olduğu görülmüştür. Enzim konsantrasyonunun hidroliz prosesinde etkili olduğunun vurgulandığı çalışmada, seyrelme oranına bağlı olarak üre hidroliz hızının da azalacağı saptanmıştır. Amonyak birikiminin sebep olduğu ürün inhibisyonunun prosesin tamamlanmasında etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, pH'ın hidroliz hızı açısından olduğu kadar ürün inhibisyonu açısından da önemli olduğu vurgulanmıştır (Tünay ve diğ., 2006).

Borulardaki üre hidrolizini tespit etmek amacıyla yapılan bir diğer deneysel çalışma neticesinde, amonyak üretimi sırasında pH değerinde artış olduğu gözlenmiştir. Yaklaşık 960×10^3 mg N /gün ürenin borularda, 180×10^3 mg N/ gün ürenin ise toplama tanklarında hidroliz olduğu saptanmıştır. Araştırmada, borulardaki üreaz aktivitesinin yer yer yüksek olduğu tespit edilirken, depolanmış idrarın önemli miktarda üre içermediği ve ürenin esas olarak toplama tankında hidroliz olduğu bildirilmiştir. Ölçülen üreaz aktivitesine göre, ürenin toplama tanklarında bir günden biraz fazla bir zaman içinde hidroliz olacağı anlaşılmıştır (Udert ve diğ., 2003).

Bibby ve Hukins (1992), yürüttükleri çalışmada üre hidroliz reaksiyonu boyunca pH'ta meydana gelen doğrudan değişimleri izlemişlerdir. Üreaz aktivitesi pH değerinden etkilendiği için, çözeltinin pH'ı 7.00 ± 0.02 değerine ayarlanmıştır. 25 °C'de yürütülen bu çalışmada, 0.1×10^{-4} lt üreaz 25×10^{-3} 'lük substrat çözeltisine ilave edilmiş ve reaksiyon 0.5 saniye aralıklarla numune alınarak 3 dakika sürdürülmüştür. Reaksiyon farklı üreaz aktivitelerinde 5 kez tekrarlanmıştır. 5 birim/ cm^3 gibi düşük üreaz aktivitelerinde, zamana karşı pH değişiminin lineer olduğu izlenmekle birlikte, yüksek üreaz aktivitelerinde reaksiyon sonuna doğru, bu değişimin lineerlikten saptığı tespit edilmiştir. 0.4 birim/ cm^3 standart üreaz aktivitesinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde R değerinin 0.994 civarında olduğu, tüm veriler beraber değerlendirildiğinde ise bu değerin 0.985 olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda, üreaz aktivitesindeki değişimin pH üzerine etkileri incelenmiş ve üreaz aktivitesinin pH ile değişiminin ikinci derece polinoma uyduğu görülmüştür. pH ve zaman arasındaki zayıf lineer korelasyona karşın, düşük bir R değeri tespit edilmiştir.

38 birim/ cm^3 'ü aşan yüksek üreaz aktivite değerlerinde pH değişimlerinin bir polinom ile ifade edilemediği belirtilmiştir. 0.6 – 38 birim/ cm^3 üreaz aktivite aralığında tüm verilerin lineer bir doğru göstermek için yetersiz olduğu belirtilmiştir.

Geniş bir pH aralığında ve kontrollü reaksiyon şartlarında enzimatik üre hidrolizi için kinetik ifadeyi belirlemek için yapılan bir çalışma aşağıda özetlenmiştir. Çalışmada, reaksiyon anında çözeltiye belli miktarlarda amonyum karbamat eklemesi ile ürün inhibisyonu araştırılmıştır. Reaksiyon pH'ı sürekli olarak izlenmiş ve tamponun olmadığı sistemde pH'ın anında 9.4'e ulaştığı gözlemlenmiştir. Bir set deney üreaz konsantrasyonunun incelemek amacı ile 25 °C'de, pH 7'de, 25×10^{-3} mol/litre üre konsantrasyonunda ve 20-200 mg/litre üreaz konsantrasyon aralığında yürütülmüştür. Deney sonunda, 0-200 mg/litre üreaz konsantrasyon aralığında üre hidroliz hızının üreaz enzimi miktarı ile arttığı gözlemlenmiş ve protein (denaturasyonu) bozulması tespit edilmemiştir. Serbest enzimin iyonlaşma sabiti substrat bağlarından etkilenmediği, enzimin üç farklı protonlaşma formunda dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Fidaleo ve Lavecchia, 2003).

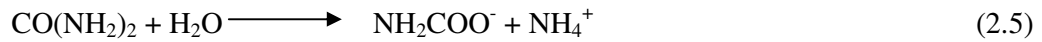
Altı set deney pH'ın etkisini incelemek amacıyla, pH 4-9 aralığında, 25 °C'de ve 100 mg/litre üreaz konsantrasyonunda ve farklı üre konsantrasyonlarında yürütülmüştür. pH 4-5'te asetat tamponu, pH 6-7'de fosfat, pH 8-9'da borat tamponu kullanılmıştır. Yapılan bu altı set deney sonucunda, kısa reaksiyon zamanlarında ürün inhibisyonunun kinetiğe önemsiz bir katkısının olduğu tespit edilmiştir. Her bir pH aralığında $V_{\max}$ ve K_m değerleri saptanmış ve pH'ın K_m 'ye olan etkisinin $V_{\max}$ 'a olan etkisinden çok daha az olduğu görülmüş ve pH 7'de reaksiyon hızının maksimum olduğu gözlemlenmiştir (Fidaleo ve Lavecchia, 2003).

Bir set deney 37 °C'de ve pH 7'de reaksiyonun aktivasyon enerjisini tahmin etmek için yürütülmüştür. Farklı iki set deney ise, 25 °C'de ve pH 7'de reaksiyon alanına farklı miktarlarda amonyum eklenerek ürün inhibisyonunun etkisinin gözlemlenmesi amacı ile yürütülmüştür. Eklenen üre miktarları bir sette 5×10^{-3} mol/litre iken, diğerinde 30×10^{-3} mol/litre olarak seçilmiştir. Deney sonuçlarının değerlendirilmesi ile non-kompetitiv ürün inhibisyonu gözlemlenmiştir. K_p değerinin tamponsuz sistemin K_p değerinden daha düşük bir değer aldığı görülmüş ve fosfat tamponunun, amonyum iyonlarının inhibisyon etkisini artırdığı rapor edilmiştir (Fidaleo ve Lavecchia, 2003).

Son dört set deneyi tahmin edilen kinetik ifadenin doğrulanması için yapmıştır. İlk iki deney tamponsuz sistemde yürütülürken, diğer iki deney ise tamponlu sistemde ve uzun zaman periyodunda yürütülmüştür. İlk deney 25 °C, 100 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda ve $0.7 \times 10^{-3} - 0.04$ mol/lt üre konsantrasyonunda diğeri ise, 37 °C’de 100 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda ve $8 \times 10^{-3} - 0.055$ mol/lt üre konsantrasyonunda yürütülmüştür. pH 9.4’te yürütülen bu iki set deney sonucunda elde edilen veri noktalarının tamponlu sisteme nazaran daha dağınık bir şekilde yayıldığı ancak yapılmış olan deney sonuçlarına uyduğu tespit edilmiştir. Tamponlu sistemde yapılan son iki deneyde, pH 5’te asetat tamponu ve pH 8’de borat tamponu kullanılarak, 25 °C’de, 100 mg/lt üreaz enzimi ve 20×10^{-3} mol/lt üre kullanılmıştır. Asetat tamponu ile sürdürülen reaksiyonda, aktif enzim fraksiyonunda başlangıç değerine göre artış gözlenirken, buna karşılık, borat tamponunun kullanıldığı reaksiyonda, aktif enzim fraksiyonunda düşüş gözlenmiştir. Yapılan bu dört set deney sonucunda, elde edilen tüm sonuçların anlamlı olduğu doğrulanmıştır (Fidaleo ve Lavecchia, 2003).

Fidaleo ve Lavecchia’nın (2003) yürüttükleri bu çalışmada, pH’a bağlı hız sabiti ve non-kompetitiv ürün inhibisyonu ifadeleri içeren modifiye edilmiş Michaelis-Menten denkleminin enzim kinetiğini iyi bir şekilde ifade ettiği tespit edilmiştir.

Hüttl ve arkadaşları (1994), farklı pH’larda ve tampon sistemlerinde yürüttükleri çalışmada, enzimatik üre hidrolizinin kalorimetrik ölçüm sonuçlarını sunmuşlardır. Çalışmada 88 U mg^{-1} aktivitesine sahip üreaz enzimi ve fosfat, hepes, mes ve tris tamponları kullanılmıştır. Kg tampon çözelti başına kullanılan üre konsantrasyonu $(2.4-25) \times 10^{-3}$ mol arasında tutulmuş ve deneysel çalışma 25.15 °C’de kalorimetre kullanılarak yapılmıştır. pH değerleri ve tampon sistemler optimum üreaz aktivitesi baz alınarak seçilmiştir. Çalışmada, üre hidrolizi sırasında meydana gelen zincir reaksiyonlar aşağıdaki gibi rapor edilmiştir.





TRIS tamponunun kullanıldığı üre hidroliz reaksiyonunda literatürde bahsedildiği gibi son ürünün amonyum karbamat olmadığı görülmüştür. Bunun yerine, üre hidroliz reaksiyonunun son ürünlerinin (7) ve (11) deki denklemde verildiği şekilde meydana geldiği rapor edilmiştir. (8)'den (12)'ye kadar olan reaksiyonların pH'a bağlı olduğu belirtilmiştir. Yapılan termokinetik değerlendirmeye göre, fosfat tamponunda pH 6.8'de ürenin hidroliz hızının oldukça düşük olduğu saptanmıştır (Hüttl ve diğ., 1994).

Krajewska ve diğ., (2002) $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, MES ve HEPES tamponlarında 5.36-8.21 pH aralığında, pH'ın enzime olan etkisini tespit etmek üzere yürüttükleri çalışmada, 33 brim/ mg protein aktivitesine sahip, III. tip jack bean üreazı, MES, HEPES, CHES tamponları, üre, Na_2EDTA ve NH_4NO_3 kullanmışlardır. pH ölçümü, kalomel elektrot ve pH metre kullanarak yapılmıştır. MES ve HEPES tamponlarının her birinde, 2×10^{-3} -0.05 mol/lit üre konsantrasyonu aralığında yürütülmüştür. Reaksiyon 25×10^{-3} lt (2.5×10^3 mg/lit) üreaz çözeltisi eklenerek başlatılmıştır. 2 sn. aralıklarla 5 dk. boyunca, reaksiyon potansiyeli kaydedilmiştir. Kaydedilen reaksiyon ilerleme eğrisi, kalibrasyon eğrisi kullanılarak zamana karşı NH_4^+ konsantrasyonu olarak çizilmiş ve başlangıç reaksiyon hızı hesaplanmıştır. Reaksiyon hızı, mol NH_4^+ / dk mg protein olarak ifade edilmiştir. NH_4^+ seçici elektrot, pH 5.36-9.97 aralığında, MES, HEPES VE CHES tamponlarına göre ayarlanmıştır. Çalışmada zaman, pH, Na_2EDTA 'nın varlığı, tampon konsantrasyonu ve tampon konsantrasyonunda meydana gelecek değişimler araştırılmıştır. pH'ın etkisi üç çeşit tampon çözeltinin 20×10^{-3} mol/lit'inde, MES için 5.36-7.17, HEPES için 6.50-8.21 ve CHES için 9.01-9.97 pH aralığında incelenmiştir.

Krajewska ve diğ., (2002) tarafından yapılan bu çalışmada, düşük tampon konsantrasyonu, NH_4^+ iyonlarının saptanmasında daha iyi etki göstermiştir. Ayrıca, tamponların aktivasyon ve inhibisyon gibi enzim kinetiğine olacak herhangi özel etkilerini, minimize edeceği için tampon konsantrasyonu 20×10^{-3} mol/lit olarak seçilmiştir. MES ve HEPES gibi sülfonat tamponlarının, nispeten reaktif olmadığının bilinmesine rağmen, yapılan bu pH çalışmasından önce, pH'ın üreaz ile etkileşimleri, enzim kinetik parametrelerini saptamak için 0.02-0.16 mol/lit tampon konsantrasyon aralığında kontrol edilmiştir. MES tamponunun, bu aralıkta reaktif olmadığı saptanmıştır, üreazın K_a değerinin -1.1 mol/lit olduğu durumda HEPES tamponunun

zayıf non-kompetitiv aktivasyon gösterdiği görülmüştür. Üreazın elde edilen kinetik parametreleri; Michaelis sabiti; K_m ve maksimum reaksiyon hızı V_{max} , pH'a karşı çizilmiştir. Bu grafiklerden, K_m 'nin 5.36-8.21 pH aralığında değişmezken, V_{max} 'ın iki noktada maksimuma ulaştığı pH-profilü görülmüştür. ilkinin pH 7.2 ve ikincisinin pH 6.5 civarında olduğu saptanmıştır.

Hüttl ve arkadaşları (1994), fosfat ve hepes tamponları için enzimatik üre hidrolizinin kinetik parametrelerini çıkarmışlardır. pH 7'de hepes tamponu için $K_m=(2.9 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ mol/l ve $V_{max}=(2.964-2.604) \times 10^{-3}$ mol/l.tk, fosfat tamponu için pH 6.86'da $K_m=(7.4 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ mol/l ve $V_{max}=(2.7-2.484) \times 10^{-3}$ mol/l.tk bulunmuştur. Fosfat tamponunun K_m değerinin Heps tamponundakinden yaklaşık olarak iki kat daha büyük olduğu görülmüştür. Seçilen tampon sistemlerindeki K_m değerleri ile pH değerlerinin literatüre uyduğu belirtilmiştir. Fosfat tamponu ($pK_s=7.21$) ile yürütülen reaksiyonla karşılaştırıldığında, Heps tamponunda ($pK_s=7.24$) enzimatik reaksiyon hızının yüksek olduğu ve K_m değerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Mes ve fosfat tamponlarında yapılan kolorimetrik ölçümlerde, reaksiyon sürelerinde önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. Mes tamponunda pK_s değerinin 6.08 olduğu görülmüştür. Bu değer sayesinde Mes tamponunda üreazın yüksek aktiviteye sahip olduğu belirtilmiş, dolayısıyla Mes tamponu ile birlikte kolorimetrik ölçüm yaparken ağır metal iyonlarının kullanılması önerilmiştir.

Krajewska ve Zaborska (1999) yaptıkları çalışmada, pH 5.80 - 8.07 aralığında fosfat tamponunun jack bean üreazı üzerine etkisini ve fosfat inhibisyonunun mekanizmasını araştırmışlardır. Çalışmada 33 birim/gr protein özel aktivitesi olan üreaz enzimi, 5.80, 6.02, 6.22, 6.45, 6.72, 6.96, 7.14, 7.35, 7.49, 7.62, 7.93 ve 8.07 pH değerlerine sahip ve 0.022-0.155 mol/l konsantrasyon aralığında fosfat tamponu kullanılmıştır. Reaksiyon 0.025 lt'lük üre-fosfat tamponu çözeltisinde ve 25 mg/lt üreaz konsantrasyonunda, 25 °C'de yürütülmüştür ve amonyak ölçümleri fenat yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Her bir pH değerinde ve fosfat tamponu konsantrasyonlarında üre hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızları ölçülmüş ve Michaelis-Menten denkleminin lineer olmadığı regresyon ile doğrulanmıştır. Elde edilen Michaelis sabiti K_m ve maksimum reaksiyon hızı V_{max} değerlerinden, tamponun inhibisyon hareketinin pH artışı ile düştüğü gözlenmiştir. 5.80-7.49 pH aralığında fosfat tamponunun üreaz üzerinde kompetitiv inhibisyon etkisi yarattığı tespit edilmiştir. 7.62'nin üzerindeki pH

değerlerinde tamponun enzim üzerinde zayıf inhibisyon etki yarattığı görülmüştür. 0.022 mol/lit fosfat tamponu ile yapılan deney sonucunda inhibisyon etkisinin H_2PO_4^- iyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir. H_2PO_4^- konsantrasyonu pH 7.2'ye kadar ne kadar düşük olursa, tamponun inhibisyon etkisinin de o kadar zayıf olacağı saptanmıştır. pH 7.2'de H_2PO_4^- iyonunun (deprotonated) protonlarına ayrışması ile birlikte, tamponun inhibisyon gücünü adım adım kaybettiği tespit edilmiştir. Çalışılan tüm pH değerlerinde ve fosfat konsantrasyonlarında mertebeler arasındaki kesişme noktasının pH 7'de olduğu görülmüştür. pH 7-8 aralığında H^+ ve OH^- iyonlarının üreaz üzerine non-kompetitiv inhibisyon etki yaptığı saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada, pH'ın 6.5'tan büyük olduğu durumda, üreazın H_2PO_4^- iyonu ile inhibisyonunun oldukça zayıf olmasının sebebi enzimin aktif gruplarının protonlarının ayrışması ve H_2PO_4^- iyonlarının reddedilmesi olarak açıklanmıştır. pH'ın 6.5'tan küçük olduğu durumda ise; enzimin aktif gruplarının proton forma dönüştüğü ve sonuç olarak H_2PO_4^- iyonunun serbestçe aktif tarafa ulaştığı ve inhibisyon etkisinin en kuvvetli kademesine geldiği belirtilmiştir (Krajewska ve Zaborska, 1999).

Oehlschlager ve diğ., (1998) ağır metallerin üreaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini kolorimetrik olarak incelemişlerdir. Sürdürülen bu çalışmada, inhibisyona sebep olan faktörler üzerinde çalışılmış, bunun için tampon sistem kullanılmıştır. İnhibisyona sebep olan etkenin enkübasyon zamanı araştırmanın konusu olmuştur. Çalışmada 260 birim/mg aktivitede üreaz, hepes, sitrat, bis-tris tamponları kullanılmış, her bir tampon için reaksiyon pH 6.6'da ve 25.15 °C'de yürütülmüştür. $(0.005-0.016) \times 10^{-3}$ mol/mg üre konsantrasyon aralığında çalışılmış, inhibitör olarak çinko, kadmiyum ve kurşunun iki değerlikli iyonları kullanılmıştır.

Amonyumun karbamatin birçok hidroliz ürününe dönüşümü tampon sistemine ve seçilen pH değerine bağlı olmaktadır. Heps tamponu ile yapılan çalışmalarda, seçilen ağır metal iyonlarının, inhibisyon şiddetinin farklı olduğu görülmüştür ve çalışmada, inhibisyon şiddetleri $\text{Zn}^{2+} < \text{As}^{3+} < \text{Cd}^{2+}$ olarak rapor edilmiştir. As^{3+} iyonunun kuvvetli inhibisyon etkisine karşı, 31×10^{-6} mg/lit konsantrasyonunda As^{5+} iyonunun üre hidrolizinin başlangıç hızını düşürmediği görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda Cd^{+2} iyonunun üreaz aktivitesine, non-kompetitiv inhibisyon etkisi yaptığı, As^{3+} iyonunun ise kısmen kompetitiv inhibisyon etkide bulunduğu ve enzimin maksimum reaksiyon hızına etki etmediği görülmüştür. İnhibitör

konsantrasyonundaki artışla birlikte, substratın enzime olan eğilimi azalmaktadır. Sitrat ve bis-tris tamponları ile yapılan deneylerde ise; seçilen ağır metal iyonlarının inhibisyon etkisinin reaksiyon parametrelerinde meydana getirdiği değişiklik araştırılmış ve ağır metal iyonlarının ve tampon çözeltilerin inhibisyon şiddetine etki ettiği bulunmuştur. Sitrat tamponunda, çinko iyonlarının azalan etkisi çinkonun kompleks bir yapı oluşturduğunu göstermiştir. Kimyasal olarak inert tampon sisteminin seçilmesi, araştırma metodunun hassasiyetini arttırmıştır. Yapılan bu araştırmada, üre hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızının inhibitör konsantrasyonu ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Oehlschlager ve diğ., 1998).

Üreaz inhibitörleri enzimin aktivitesini farklı yollarla bozabilmektedirler. Literatürde, borik asit ve boronik asidin nikel iyonları ile kompleks yaptığı bildirilmiştir (Kot ve diğ., 2000).

Literatürde, pH 7’de fosfat tamponunun kompetitiv inhibisyon, sitrat tamponunun un-kompetitiv inhibisyon etki gösterdiği, Tris, Hepes ve Mes tamponlarının ise, inhibisyon etkisi göstermediği rapor edilmiştir. Fosfat tamponu üreaz kinetik çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır ve pH 7’de üreaza kompetitiv inhibisyon etkisi göstermektedir. Kompetitiv inhibisyon kısmen karışık bir inhibisyon tipidir. pH 7.48’de fosfat tamponu üreaz üzerine inhibisyon etkisi göstermemektedir ve bu inhibisyon türünün pH’ta meydana gelecek yükseliş ile artacağı belirtilmiştir. Fosfat tamponunda üreaz üzerine inhibisyon etkisi yapan HPO_4^{2-} iyonu ve H_2PO_4^- iyonu olduğu rapor edilmiştir. Nötr pH’larda fosfat tamponu jack bean üreazı üzerine oldukça zayıf bir inhibisyon etki yapmaktadır. Fosfat tamponu ile yapılan kinetik çalışmalarda pH değişimlerine dikkat etmek gerekmektedir, çünkü tamponun pH’ının, konsantrasyonunun ve iyonik gücünün değişimi bağımsız olarak meydana gelmemektedir (Krajewska ve Zaborska, 1999).

Birçok ağır metal üreaz aktivitesini inhibe etmekte ve hidroliz kinetiğine etki etmektedir. Üreazın ağır metallere karşı yüksek hassasiyeti, ağır metallerin etkilerinin termal olarak saptamasına olanak sağlamaktadır (Oehlschlager ve diğ., 1998).

Genelde, önce başlangıç reaksiyon hızları tespit edildiği için, inhibisyon sabitleri farklı metotlarla saptanmaktadır (Juszkiewicz ve diğ., 1998).

Juszkiewicz ve diğ., (1998) tarafından yapılan bir çalışma, 0.010 mol/lit üre içeren fosfat tamponunda 25 °C’de, pH 7’de yürütülmüştür. Reaksiyon 33 birim/mg protein özel aktiviteye sahip 0.5×10^{-3} lt hacminde üreaz eklenmesi ile başlatılmıştır. Deneylerde 0.3×10^{-3} ve 0.8×10^{-3} mol/lit konsantrasyonda 2-merkaptetanol inhibitörü içeren ve hiç 2-merkaptetanol inhibitörü içermeyen çözeltilerde sürdürülmüş, reaksiyon boyunca sıcaklık değişimleri 2 saniye zaman aralıkları ile kaydedilmiştir. Elde edilen veriler zamana karşı sıcaklık değişimi olarak grafiğe dökülmüş 3 ayrı konsantrasyonun da dördüncü derecen polinoma uyduğu görülmüştür. 2-merkaptetanol inhibitörü içeren ve içermeyen sistemlerde yapılan analizler sonucunda inhibisyon sabiti K_i saptanmıştır. İnhibitör içeren ve içermeyen deney datalarının dördüncü dereceden polinomal eğrileri lineerleştirilmiş ve üç farklı konsantrasyon için de V_{max} değeri 0.168-0.156 mol/lit.dk olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar 2-merkaptetanol inhibitörünün üreaz üzerine kompetitif inhibisyon etkide bulunduğu bildirilmiştir. 2- merkaptetanol inhibitörünün inhibisyon sabiti 0.0528-0.0516 mol/lit olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu çalışmada, kolorimetrik metodun, reaksiyon ilerleme eğrisinin çizilmesini sağlayacak verilerin kaydedilmesinde sağladığı kolaylık bakımından uygun, fakat metodun deney süresine olan hassasiyeti nedeniyle uygun olmadığı rapor edilmiştir. Kuvvetli bir inhibitörün olduğu sistemde reaksiyon süresi uzamakta ve sıcaklık kaybı kontrol edilememektedir. Bu nedenle inhibitörün olmadığı sistemde reaksiyon eğrisi, inhibitörün olduğu sisteme kıyasla daha geniş bir aralıkta devam etmiştir.

Kot ve diğ., (2000) 25 °C’de pH 7.0’de fosfat tamponu kullanarak reaksiyon yürütmüşlerdir. Reaksiyonda başlangıç üre konsantrasyonu, 10 mmol dm^{-3} olarak alınmış ve reaksiyon 0.5×10^{-3} lt üreaz 0.1 lt hacminde hazırlanan üre çözeltilisine ilave edilerek başlatılmıştır. Çalışmada inhibitörlü ve inhibitörsüz sistemde yürütülmüştür. İnhibitörün kullanılmadığı reaksiyonda toplam ürenin reaksiyon başlatıldıktan 15 dakika sonra hidroliz olduğu görülmüştür. İnhibitörlü sistemde inhibitör olarak kullanılan üç farklı tiyol inhibitörünün farklı iki konsantrasyonu inhibitörsüz sistemle karşılaştırılmıştır. 0.05×10^{-3} ve 0.1×10^{-3} mol/lit β - merkaptetilamin, 2×10^{-3} ve 3×10^{-3} mol/lit tiyoglikolik asit ve 1×10^{-3} ve 2×10^{-3} mol/lit tiyolasetik asidin kullanıldığı her bir reaksiyon verilerinin dördüncü dereceden polinoma uyduğu görülmüş ve her bir inhibitörün üreaz üzerine kompetitif inhibisyon etkisi yaptığı rapor edilmiştir. Elde edilen inhibisyon sabitleri karşılaştırıldığında, β -merkaptetilamin inhibitörünün β -

amino grubu ile yüklü olması nedeni ile güçlü, β -merkaptetanölün orta dereceli, anyonik karboksil grubu içeren tiyoglikolik asidin ise zayıf bir inhibitör olduğu açıklanmıştır. Tiyol inhibitörleri ile yapılan deney sonuçlarına göre, tiyoasetik asidin zayıf bir inhibitör olduğu, thioasetik asidin metil grubunun nikel iyonlarını bağlamada engel teşkil etmeyeceğı bildirilmiştir. Esas olarak üreaz için gerçek inhibitör çeşitlerinin tiyolat anyonları olduğu ve protonlaşmış tiyollerin aktif olarak inhibisyon etki göstermedikleri, tiyollerin direkt olarak nikel iyonlarının aktif tarafına tutundukları tespit edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmaların Planlanması

Tez çalışması kapsamında çeşitli gruplarda deneyler yürütülmüştür. Öncelikli olarak idrar numunesinde çalışılacak optimum üreaz konsantrasyonunun saptanması açısından bir seri ön deney yürütülmüştür. Ön deneylerde, gerçek sistemlerdeki dönüşüm zamanını, üreaz konsantrasyonu ve ortam şartlarını göze alarak ortamda bulunan serbest üreaza göre, pH ve sıcaklık bakımından gerçek dönüşüme uygun bir ortam sağlanmıştır. Bu ön çalışma kapsamında üre hidrolizi önce sentetik numunelerde incelenmiştir. Yapılan bu deneylerde 1000, 3000, 6000 mg N/lt konsantrasyonda üre içeren sentetik çözeltide 20°C'de ve pH 7'de 10 ve 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Deneysel çalışma kapsamında 5 ve 96 U/mg aktivitede üreaz enzimi kullanılmıştır. Sentetik numunelerde yapılan bu deneyler daha sonra idrar numunesi ile yapılacak deneylerle karşılaştırma yapmak açısından da önem taşımaktadır.

Tablo 3.1'de idrarın tipik bileşimi verilmiştir, bu bileşim içinde bulunan tuzların anyon ve katyonların proses üstünde etkili olması söz konusudur. Dolayısı ile bu tuzların tek tek ve kombinasyonlar halinde üre hidrolizine etkisinin belirlenmesi idrarda gerçekleşen üre hidroliz olayın açıklaması açısından önem taşımaktadır. Yapılan bir grup deneyde 6000 mg N/lt konsantrasyonda üre içeren sentetik çözelti içine idrar numunesi içinde bulunan tuzlardan tablodaki konsantrasyonları esas alarak belirlenen kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda eklenip 20 °C'de ve pH 7'de bir grup deney yürütülmüştür. Farklı kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda eklenen $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$, NH_4Cl , KCl , $Na_2SO_4 \cdot 10(H_2O)$, Na_2HPO_4 , $NaCl$ tuzları ile yürütülen deneylerde Na^+ , K^+ , PO_4^- ve Ca^{2+} iyonların etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, bu tuzların idrar bileşiminde bulunan konsantrasyonlarından yola çıkarak 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik üre çözeltisine bu tuzlar adım adım eklenerek sentetik idrar numunesi elde edilmiştir. Elde edilen bu sentetik idrar numunesinde hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar gerçek idrar

numunesi ile sürdürülen hidroliz reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve reaksiyon farklılıklarının sebeplerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler gerçek sistemi yansıtmaları açısından pH kontrolsüz olarak yürütülmüştür. Sürdürülen üre hidroliz reaksiyonlarında pH değişiminin reaksiyonunun ilk anlarında hızlı olduğu daha sonraları ise yaklaşık sabit bir değerde kaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, reaksiyonun ilk anlarında meydana gelen amonyak dönüşümünün de önemli bir düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, bir de tampon sistem kullanılarak dönüşüm hızının pH kontrollü sistemde değerlendirilmesi ve pH kontrolsüz sistemlerdeki dönüşüm hızı ile karşılaştırılması sağlanmıştır.

Tampon sistemler yüksek konsantrasyonda etkili olmakta ve çoğu tampon sistem üre hidrolizine inhibitör etki yaratmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda pH kontrolü amacı ile kullanılan tris sistemlerin üre hidroliz reaksiyonu üzerine etkisi tam olarak belirlenememiştir. Bununla birlikte; Hüttl ve arkadaşları (1994) yaptıkları çalışmada, fosfat tamponunun hidroliz reaksiyonu üzerine önemli ölçüde inhibisyon etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sebeple, yukarıda amacı açıklanan pH kontrollü deneylerde, hidroliz reaksiyonu üzerine inhibisyon etkisi nispeten az olan borat tampon kullanılması uygun görülmüş ve sabit pH'ta hidroliz hızının ölçümü için 20 °C'de pH 9'da yürütülen deneyde borat tampon kullanılmıştır.

Yapılan bu deneylerin akabinde gerçek idrar numunesinde bir grup deney yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar sentetik üre çözeltisi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Gerçek idrar numunesi ile yürütülen ilk deneylerde aynı idrar numunesinde, 20 °C'de ve pH 7'de 10, 15, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda çalışılmış ve farklı üreaz konsantrasyonunda elde edilen verimler karşılaştırılırken, bunun yanı sıra ön deneylerde belirlenen ve tez çalışmasında kullanılacak optimum üreaz konsantrasyonunun etkinliği de doğrulanmıştır.

Diğer bir grup deneyde, toplanan idrar numunesi 870 ve 2600 mg N/lit üre konsantrasyonuna seyreltilmiş ve 20 °C'de ve pH 7'de 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar 1000, 3000 mg/lit sentetik üre çözeltisi ile yapılan deney sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda, gerçek sistemlerde idrarın sifon suyu ile birebir seyreltiği belirtilmiştir. Deneysel çalışma kapsamında yapılan son grup deneyde,

gerçek sistemlerle kıyaslama yapabilmek maksadı ile 20 °C’de ve pH 7’de 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda idrar numunesine 1’e 1 seyrelme yaparak ve seyrelme yapmadan hidroliz reaksiyonları yürütülmüştür ve seyrelmiş ve seyrelmemiş idrar numunesi reaksiyon sonuçları karşılaştırılmıştır.

3.2 Deneysel Çalışma Düzeni

3.2.1 Materyal

Enzimatik üre hidrolizinin yürütüldüğü deneysel çalışmalarda 97 U/mg ve 5 U/mg aktivitede jack bean üreaz enzimi kullanılmıştır. Üre çözeltisi çalışılacak konsantrasyona göre belirlenen miktarlarda ürenin distile suda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Deneysel çalışmada kullanılan idrar numunesi ise genç ve orta yaşlı, sağlıklı 20 kadın ve erkekten alınmıştır. Toplanan idrar numuneleri bozulmayı engellemek için +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Her bir ayrı numunenin numune karakterizasyonu yapılmıştır ve literatür değerlerine uyduğu görülmüştür (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: İdrarın Tipik Bileşimi

Parametre	1.İdrar numunesi	2. İdrar numunesi	3. İdrar numunesi
TKN	6500 mg/lt	6520 mg/lt	9400 mg/lt
PO ₄ -P	480 mg/lt	740 mg/lt	690 mg/lt
Mg	-	91 mg/lt	-
Ca	-	3000 mg/lt	-
K	-	1100 mg/lt	-
NH ₃ -N	402 mg/lt	428 mg/lt	1400 mg/lt
Na	-	3000 mg/lt	-
Cl	-	5700 mg/lt	6000 mg/lt
NO ₃	-	230 mg/lt	-
SO ₄	-	1570 mg/lt	1500 mg/lt
pH	6.54 mg/lt	6.57 mg/lt	6.64

Kontrollü pH ortamında yürütülen hidroliz reaksiyonunda pH kontrolü, üreaz enzimi üzerine diğer tamponlara nazaran en az inhibisyon etkiyi yaratan, borat tampon ile yapılmıştır. Borat tampon pH’ı 9’a tamponlamaktadır. Deneysel çalışmada borat tampon (Na₂B₄O₇.10H₂O) 500 ml idrar numunesi içine 38 gr’ının ilave edilip çözülmesi ile kullanılmıştır. Sentetik idrar çözeltisi oluşturulurken ve gerçek idrar numunesi içinde bulunan iyonların etkisinin incelendiği deneylerde idrar bileşiminde bulunan anyon ve katyonlardan yola çıkarak belirlenen konsantrasyonlarda

MgCl₂6H₂O, CaCl₂2(H₂O), NH₄Cl, KCl, Na₂SO₄10(H₂O), Na₂HPO₄, NaCl tuzları sentetik çözeltiye eklenmiştir.

3.2.2 Metod

Hazırlanan sentetik üre ve gerçek idrar numuneleri 20 °C’de pH 7’ye ayarlandıktan sonra üreaz enzimi ilavesi ile hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. Sentetik üre çözeltisi; distile suda ürenin çözülmesi ile elde edilmiştir. İdrar numuneleri ise yaklaşık 20 kadın ve erkekten karışık olarak toplanmış ve numune karakterizasyonu yapılmıştır. Numune karakterlerinin literatürde geçen idrar karakterizasyonu ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Enzimatik üre hidroliz reaksiyonu mantar kapaklı kavanozda, kapalı sistemde yürütülmüştür. Numuneler 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 dakika gibi zaman aralıklarında şırınga ile alınmıştır. Alınan numunelerde pH ölçülmüş, pH ölçümünün ardından üreaz enzimi aktivitesinin yok etmek için 1:1 HCl ile pH 3’e düşürülerek kapalı numune kaplarında saklanmıştır. Saklanan numunelerde amonyak ölçümleri “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” da belirtilmiş distilasyon titrasyon metoduna göre yapılmıştır.

3.3 Deneysel Çalışma Sonuçları

Literatürde üreaz enzimi ile yapılmış hidroliz reaksiyonu çalışmalarından elde edilmiş Michaelis Menten K_m değerlerinin substrat konsantrasyonu yanında ihmal edilebilir seviyede olduğu görülmüştür (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Literatürden Elde Edilen K_m ve Substrat Değerleri

Eklenen Tampon	K_m (mg/l)	S (mg/l)
Bovine Serum Albumin	2.2	1200
Ovalbumin	2.04	1200
Fosfat	1.92	1200

Substrat konsantrasyonu yüksek olduğunda, K_m değerinin S değeri yanında ihmal edilmesi halinde M. Menten 0. merteye reaksiyon kinetiğine dönüşmektedir.

Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışma sonuçlarının Michaelis Menten kinetiğine tam olarak uyum sağlamadığı görülmüştür. Reaksiyon kinetiği 1. ve 2. mertebe kinetiklerine de uyumlu bulunmamıştır. Buna karşın reaksiyon 0. mertebeye daha iyi bir uyum göstermiştir. Bu durum yukarıda açıklanan sebeplerden ötürü normal bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Diğer yandan deneysel çalışmada elde edilen sonuçların Michaelis Menten kinetiğine tam bir uyum göstermemesinin bir sebebi de deney koşullarının sabit olmamasıdır. Deneysel koşullarının sabit olmamasında pH değişiminin büyük rolü olmuştur. Bununla birlikte, çalışılan substrat konsantrasyonunun yüksek olması ürün inhibisyonuna sebep olmuş ve bu durum da Michaelis Menten kinetiğinden sapmaya sebep olmuştur. Bu sebepten dolayı, tez çalışması kapsamında Michaelis Menten kinetiğinin uygulaması yapılmamıştır. Deney sonuçları 0. mertebe reaksiyon kinetiği baz alınarak yorumlanmıştır. Ancak, deneysel sonuçlar 0. mertebe reaksiyon kinetiğine oldukça iyi bir yaklaşıklıkla ifade edilebilmekle birlikte, sonuçların koşullara bağlı olarak belirgin sapma gösterdiği de görülmüştür. Bu sapmaların en genelde halde açıklaması aşağıda yapılmıştır.

Yapılan deneylerde zamana karşı substrat konsantrasyonundaki değişime bakıldığında, çoğu deneyde ilk 6 saatlik izlemede 0. mertebeye iyi bir uyum görülmüştür. Bunun böyle olmasının sebebi substrat konsantrasyonu yüksek iken hızların daha fazla olmasıdır. K_m değerlerinin küçük olması sebebi ile çoğunlukla reaksiyon başlangıçlarındaki uyum sonraları sapma göstermiştir.

Sapmaların oluşmasının en önemli sebebi pH ve ürün konsantrasyonudur. pH hem K_m 'yi hem maksimum hızı etkilemektedir. Fakat literatürde de belirtildiği gibi K_m üzerine olan etkisi son derece azdır. Buna mukabil maksimum hız üzerine olan etkisi daha fazladır. Bu etki pH 7'den 9'a doğru çıktıkça hız sabitinin azalması şeklinde etkili olmaktadır. Dolayısı ile deneylerin pH değişimini değerlendirdiğimizde, reaksiyon süresince pH 7'den 9'a doğru çıktığı için reaksiyon hızı azalacağı ve k sabitinin değişiminden dolayı sapmaların olacağı söylenebilmektedir.

Ürün konsantrasyonu bazında bir değerlendirme yaparsak; ürün konsantrasyonu arttıkça, üreaz reaksiyonları için belirtilen ancak kantitatif değer verilmeyen ürün inhibisyonunun şiddetlenmesi ile hidroliz hızında azalma olacağı söylenebilmektedir.

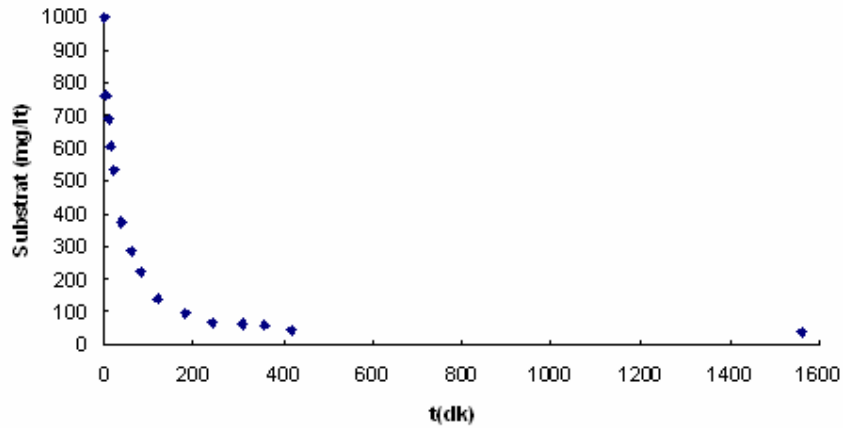
3.3.1 Optimum üreaz konsantrasyonunun tespiti için yapılan ön deneysel çalışmalar

Deneysel çalışmalara başlamadan önce deneylerin yürütüleceği üre ve üreaz konsantrasyonlarını tespit etmek amacı ile bir ön çalışma yapılmıştır. Hazırlanan sentetik numunelerde yürütülen bu ön deneylerde üre konsantrasyonları 1000, 3000, 6000 mg N/lt olarak seçilmiş ve reaksiyonlar 10 ve 25 mg üreaz /lt konsantrasyonlarında yürütülmüştür.

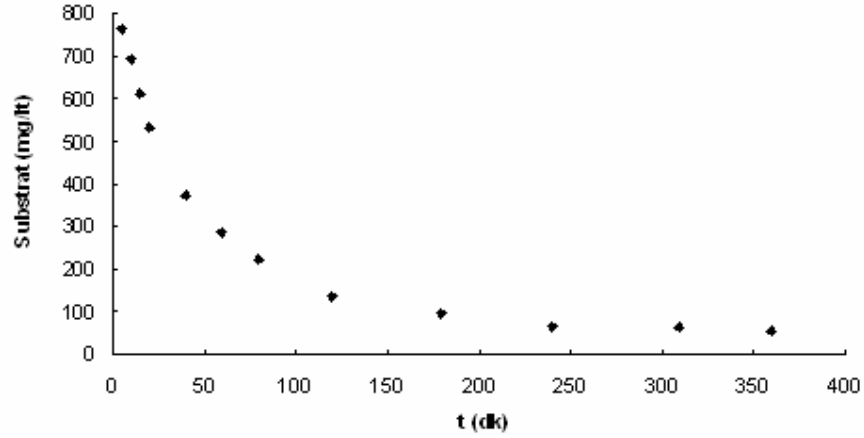
3.3.1.1 1000 mg N/lt üre çözeltisi 10 mg üreaz/ lt ile hidrolizi

1000 mg N /lt içeren üre çözeltisinde 10 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda 20 °C’de pH 7’de 1560 dakika sürdürülen reaksiyonda 1000 mg/lt N’un 960 mg N/lt’si hidroliz olmuş ve % 96 verim elde edilmiştir (Şekil 3.1). 360 dakika sonunda ise N’un %94’ünün hidroliz olduğu görülmüştür. İlk 5 dakikada reaksiyon hızının yüksek olduğu görülürken zamanla reaksiyon hızının düştüğü saptanmıştır (Şekil 3.2).

Deney 1000 mg N/lt üre konsantrasyonda yürütüldüğü için substrat konsantrasyonu düşüktür. Zamanla pH’da meydana gelen değişim izlendiğinde 360 dakika sonra pH’ın 9.3 mertebesine ulaştığı görülmüştür. Reaksiyon başında reaksiyon alanında bulunan substrat konsantrasyonu düşük olduğu için ve 10 mg üreaz/lt konsantrasyonu başlangıçta ortamda hızlı bir dönüşüm sağlamadığı için ürün inhibisyonu diğer deneylere göre daha küçük düzeylerde dir. Dolayısıyla reaksiyon % 96 verimle tamamlanmıştır.



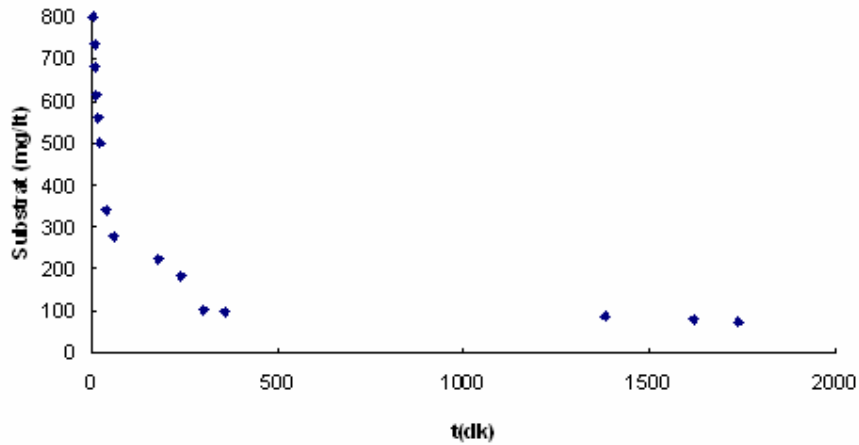
Şekil 3.1: 1000 mg N /lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 mg üreaz /lt Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi İyon Boyunca Hidrolizi



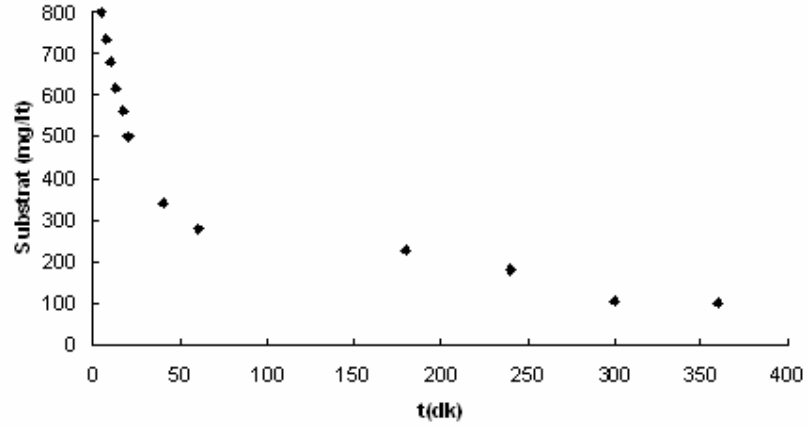
Şekil 3.2: 1000 mg N /lt üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 mg üreaz /lt Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

3.3.1.2 1000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi

1000 mg N /lt içeren üre çözeltisine 25 mg üreaz/lt eklenerek gerçekleştirilen reaksiyonda, 20 °C’de pH 7’de 1740 dakikalık izleme sonrasında N’un 929 mg/lt’sinin dönüştüğü görülmüş % 93 verim elde edilmiştir (Şekil 3.3). İlk 5. dakikaya kadar dönüşümün yüksek olduğu saptanmış, ancak zamanla reaksiyon hızında düşüş görülmüştür. 360 dakika sonunda, hidroliz olan üre konsantrasyonunun 900 mg N/lt olduğu saptanmış %90 verim elde edilmiştir (Şekil 3.4).



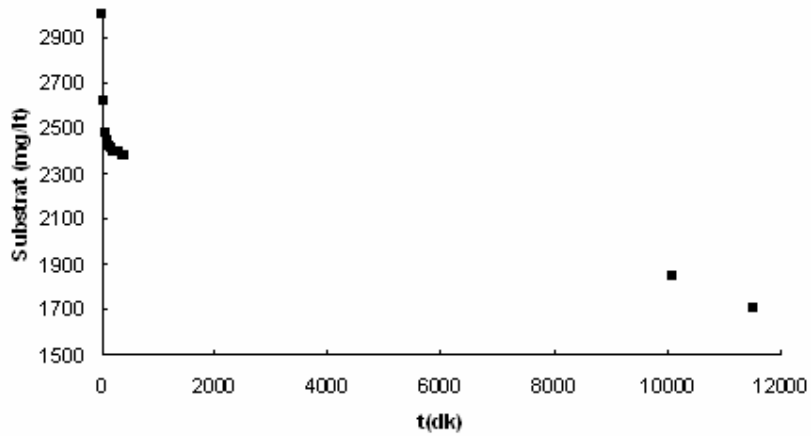
Şekil 3.3: 1000 mg N /lt üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi



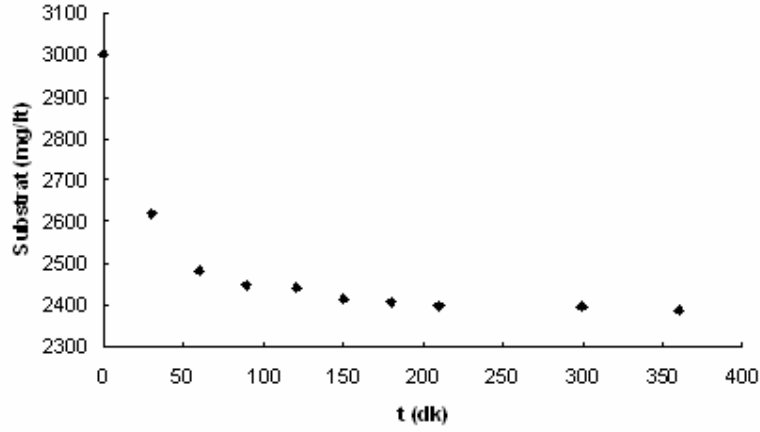
Şekil 3.4: 1000 mg N /lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

3.3.1.3 3000 mg N/lt üre çözeltisi 10 mg üreaz/ lt ile hidrolizi

3000 mg N/lt içeren sentetik üre çözeltisinde 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonu ile 20 °C'de pH 7'de yürütülen deney sonuçları incelendiğinde, 11520 dakikalık izleme sonucunda 1287 mg N/lt üre çözeltisi hidroliz olmuş, %43'lük verim elde edilmiştir (Şekil 3.5). 360 dakikada 616 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve 360. dakikadaki reaksiyon verimi %20 olarak bulunmuştur (Şekil 3.6).



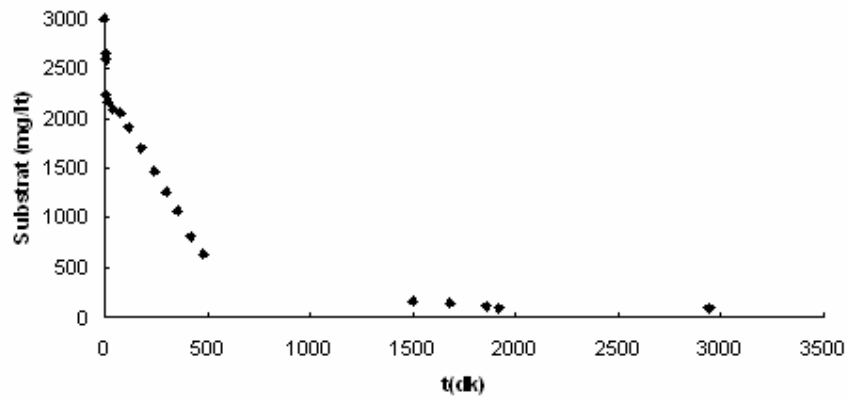
Şekil 3.5: 3000 mg N /lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi



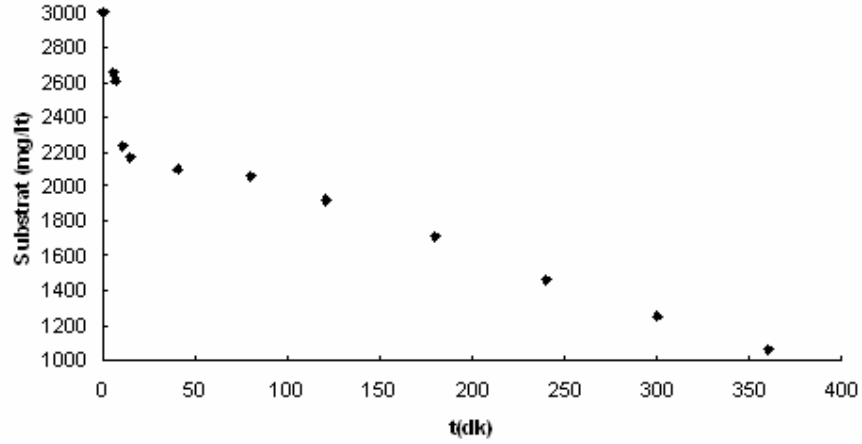
Şekil 3.6: 3000 mg N /lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi 3000 mg/lit N Üre Çözeltisinin 10 mg/lit Üreaz İle 360 Dakika Hidrolizi

3.3.1.4 3000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi

3000 mg N/lt içeren sentetik üre çözeltisinde 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonu ile 20 °C’de pH 7’de yürütülen deney sonuçları incelendiğinde, 2940 dakika sonunda 2904 mg N/lt ürenin dönüştüğü görülmüş ve reaksiyon verimi %97 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.7). Elde edilen sonuçlarda 1920’inci dakikadan sonra üre konsantrasyonunda bir değişim olmadığı görülmüş ve reaksiyonun 1920’inci dakikada durduğu saptanmıştır. 360. dakikada elde edilen hidroliz verimi 1936 mg N/lt ürenin hidrolizi ile %65 olarak bulunmuştur (Şekil 3.8).



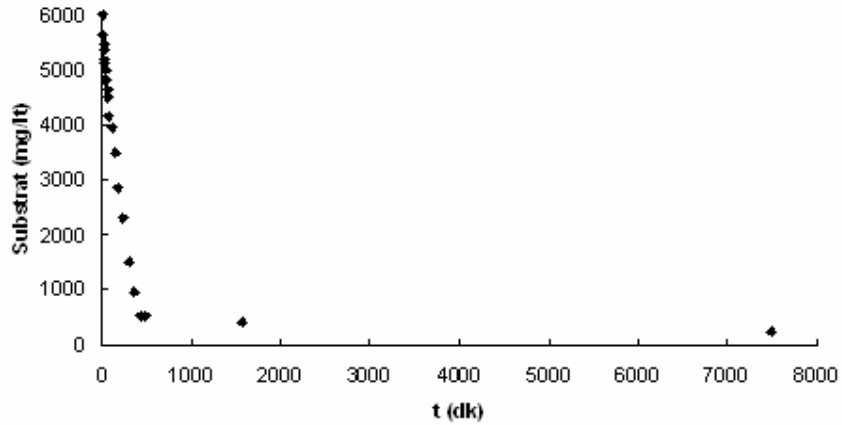
Şekil 3.7: 3000 mg N/lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi



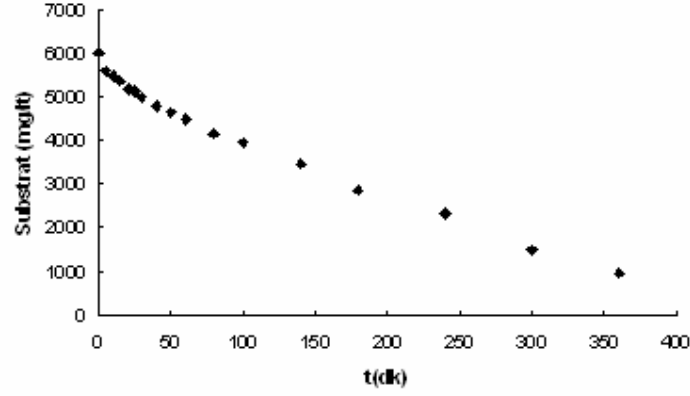
Şekil 3.8: 3000 mg N/lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltilinin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

3.3.1.5 6000 mg N/lt üre çözeltisi 25 mg üreaz/ lt ile hidrolizi

Gerçek idrar numunesinde elde edilecek verimleri önceden kestirebilmek ve bir karşılaştırma sağlayabilmek amacı ile 6000 mg N/lt üre çözeltisi ile 25 mg üreaz/lt konsantrasyonunda 20 °C’de pH 7’de yürütülen reaksiyon 7500 dakika izlenmiştir. Reaksiyonunu 5. dakikaya kadar hızla ilerlediği görülmüş ve zamanla reaksiyon hızında düşüş izlenmiştir. 7500 dakikada 5760 mg N /lt konsantrasyonda üre hidroliz olup %96 reaksiyon verimi elde edilirken, 360. dakikada 5062 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %84 verim elde edilmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



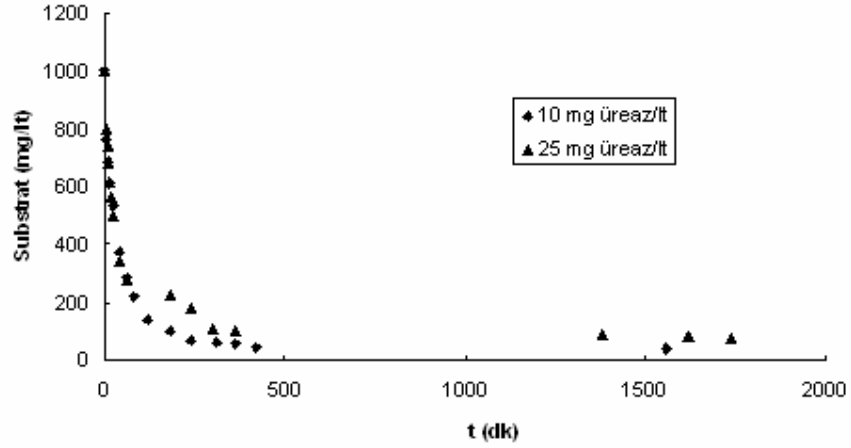
Şekil 3.9: 6000 mg N/lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltilinin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi



Şekil 3.10: 6000 mg N/l Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 25 mg üreaz/l Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

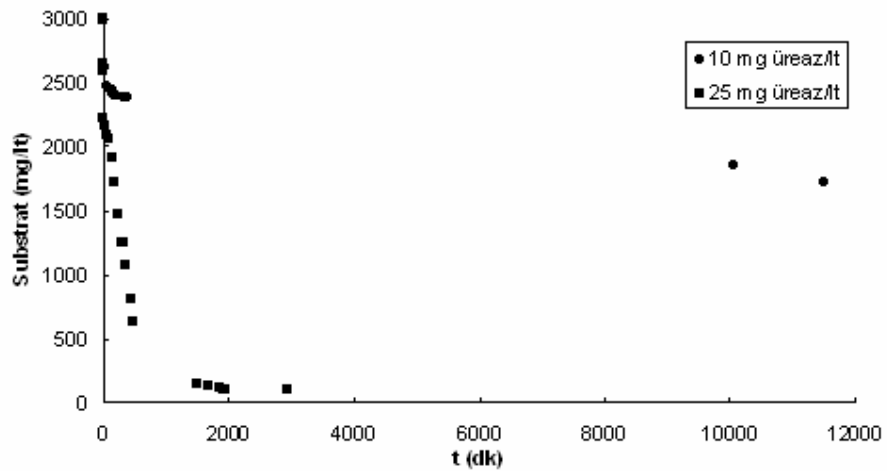
3.3.1.6 Optimum üreaz konsantrasyonunun seçilmesi

Tablo 3.3’de optimum üreaz konsantrasyonunun seçilmesi amacıyla yürütülen üre hidroliz reaksiyonları özetlenmiştir. 10 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda 360 dakikada %94 verime ulaşılrken ve 25 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda 360 dakikada % 90 verime ulaşılmıştır. 10 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda yürütülen deneyde enzim konsantrasyonu 20 mg üreaz/l enzim konsantrasyonuna göre düşük olduğu için başlangıç amonyak dönüşümü yavaş meydana gelmiş ve ürün inhibisyonu görülmemiştir. Bu nedenle reaksiyon hızı 25 mg üreaz/l enzim konsantrasyonuna göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Bununla birlikte 25 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda yürütülen deneyde ürün inhibisyonu meydana geldiği için reaksiyonun tamamlanma sürelerine bakıldığında 10 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda reaksiyon 1560 dakikada % 96 verime tamamlanırken 25 mg üreaz/l enzim konsantrasyonunda 1740 dakikada % 93 verime tamamlanmıştır. (Şekil 3.11).



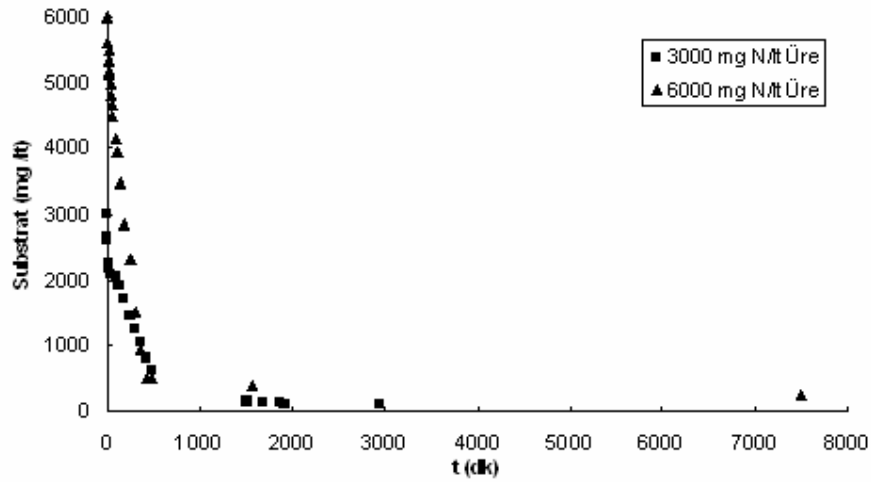
Şekil 3.11: 1000 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 ve 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonlarında Yürütülen Deneylerin Karşılaştırılması

3000 mg N/lit üre konsantrasyonunda 10 ve 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda yürütülen deneylerde reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu ile paralel olarak artmıştır. 10 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda 360 dakika sonra % 20 verim elde edilirken, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda % 65 verim elde edilmiştir. 10 mg üreaz/lit konsantrasyonda yürütülen deney 11520 dakika sonra reaksiyon %43 verimle sona ererken, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda yürütülen deneyde 2940 dakika sonra % 97 verimle reaksiyon sonlanmıştır. Dolayısı ile üreaz konsantrasyonunun reaksiyon süresine ve verimine doğrudan etki ettiği görülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: 3000 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltinin 10 ve 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonlarında Yürütülen Deneylerin Karşılaştırılması

6000 mg N/lt üre konsantrasyonuna sahip sentetik çözeltide yürütülen reaksiyonu 3000 mg N/lt üre çözeltisi ile yürütülen reaksiyon ile karşılaştırıldığında 6000 mg N/lt üre çözeltisinde 360 dakikaya kadar %84 verim elde edilirken, 3000 mg N/lt üre çözeltisinde 360 dakikaya kadar % 65 verim elde edilebilmiştir (Şekil 3.13). 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide, başlangıçtan ilk 360 dakikaya kadar reaksiyon 3000 mg N/lt üre konsantrasyonundaki sentetik çözeltiye göre daha hızlı gerçekleşmiş, ancak amonyak konsantrasyonunun artması ile ürün inhibisyonu meydana gelmiş ve reaksiyon hızının düşmesine sebep olmuştur. Bu sebepten, 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide 7500 dakika sonunda % 96 verime ulaşılırken, 3000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide 2940 dakika sonunda %97 verime ulaşılmıştır. Dolayısı ile reaksiyonda amonyak dönüşümünün başlangıçta hızlı olması, ürün inhibisyonunun gerçekleşmesine sebep olarak reaksiyon hızı üzerine olumsuz etki yaratmıştır.



Şekil 3.13: 3000 mg N/lt ve 6000 mg N/lt Üre Konsantrasyonlarında Sentetik Çözeltilerin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Hidrolizi

Yapılan bu ön deneyler sonunda optimum üreaz enzimi konsantrasyonu 25 mg/lt olarak seçilmiştir.

Tablo 3.3: Sentetik Numunelerde Yapılan Ön Deneyler

Sentetik Numunelerde Yapılan Ön Deney Sonuçları			
Substrat Konsantrasyonu (mg N/lt)	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/lt)	Zaman (dakika)	Verim %
1000 mg N/lt	10	360	94
		1560	96
	25	360	90
		1740	93
3000 mg N/lt	10	360	20
		11520	43
	25	360	65
		2940	97
6000 mg N/lt	25	360	84
		7500	96

3.3.2 İdrarın içinde bulunan tuzların etkisinin incelendiği deneyler

İdrar içinde tuzların etkisinin incelendiği deneylerde çalışılacak sentetik çözelti konsantrasyonunu idrara en yakın konsantrasyonun seçilmesi açısından 6000 mg N/lt üre konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Tablo 3.1’de verilen idrarın tipik bileşiminden yola çıkarak belirlenen konsantrasyon ve kombinasyonlarda tuzlar sentetik üre çözeltisine ilave edilerek, tuz bileşimleri içinde yer alan ve hidroliz prosesi üstüne etkili olması beklenen anyon ve katyonların etkisi araştırılmıştır. Bu anyon ve katyonların etkilerinin belirlenmesi, idrarda gerçekleşen üre hidroliz reaksiyonunun açıklanması açısından önem taşımaktadır. Bu çerçevede yapılan deneyler aşağıda anlatılmıştır, bir karşılaştırma yapabilmek açısından tuz ilavesi olmayan ve ön deneylerde 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide yürütülen hidroliz reaksiyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

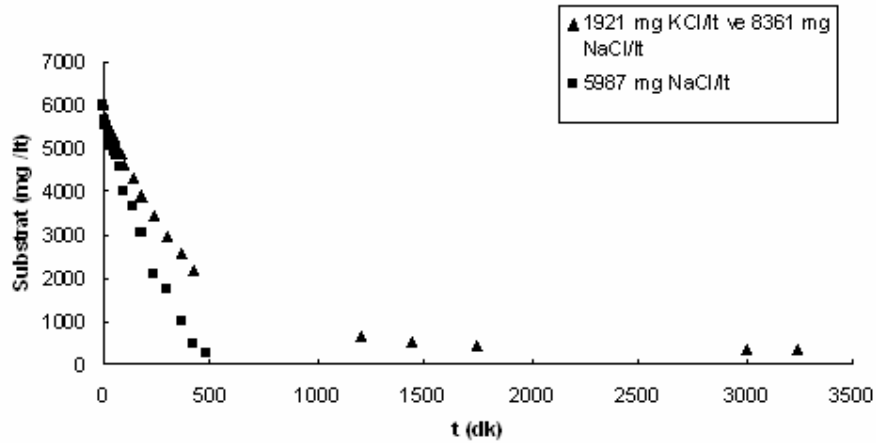
3.3.2.2 6000 mg N/lt üre çözeltisine KCl ve NaCl tuzlarının ilavesi

İdrar içinde bulunan iyonların etkisinin saptanması amacı ile yürütülen deneylerde önce 6000 mg N/lt üre içeren sentetik çözeltiye 1921 mg KCl /lt ve 8361 mg NaCl /lt konsantrasyonlarda tuzlar ilave edilip bir deney yürütülmüştür, daha sonra da K^+ tuzunun etkisinin tespit edilmesi amacı ile 6000 mg N/lt üre çözeltisine 5087 mg NaCl /lt konsantrasyonunda KCl tuzu ilave edilmiştir.

20 °C’de, pH 7’de 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda 1921 mg KCl /lt ve 8361 mg NaCl /lt ilavesi ile yürütülen reaksiyon 3240 dakika izlenmiş ve reaksiyon sonunda 5682 mg N/lt üre hidroliz olurken, 300 dakika sonra hidroliz olan üre miktarı 3040 mg N/lt olarak tespit edilmiştir. Bu süreler için reaksiyon verimi sırasıyla, %95 ve %50 olarak tespit edilmiştir.

6000 mg N /lt üre içeren sentetik çözeltiye 5087 mg NaCl /lt ilave edilmiş ve 20°C’de, pH 7’de 25 mg üreaz/lt enzimiyle reaksiyon yürütülmüştür. 480 dakika izlenen reaksiyonda 5749 mg N /lt üre hidrolizi ile %96’lık reaksiyon verimi elde edilmiştir. Bununla birlikte %50 verime 180 dakikada ulaşılmıştır (Tablo 3.4).

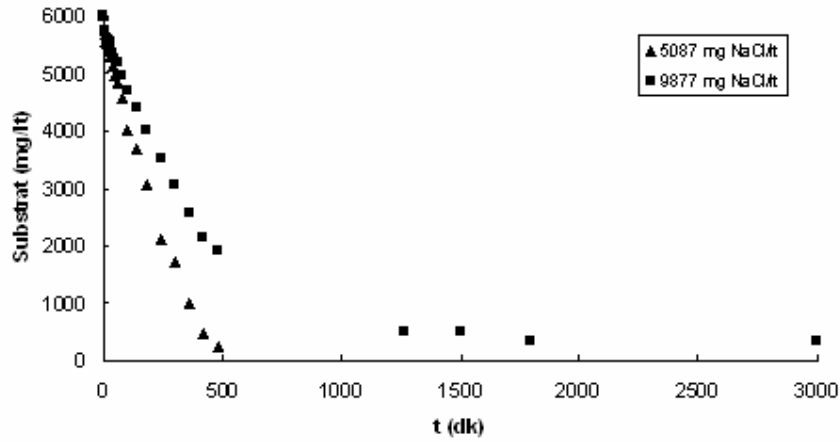
Şekil 3.14’de ve Tablo 3.4’de her iki reaksiyondan elde edilen ve karşılaştırmalı olarak gösterilen sonuçlardan, K^+ iyonunun hidroliz reaksiyonunda hız kısıtlayıcı etki yarattığı görülmüştür.



Şekil 3.14: KCl ve NaCl Tuzlarının Etkisinin Araştırılması

Sürdüren diğer bir deneyde, 6000 mg N /lt üre içeren sentetik çözeltiye 9877 mg NaCl /lt ilave edilmiş ve elde edilen çözeltide 20 °C’de, pH 7’de 25 mg üreaz /lt konsantrasyonda enzim ile hidroliz reaksiyonu izlenmiştir. 3000 dakika boyunca izlenen reaksiyonda, 1800 dakikadan sonra üre konsantrasyonunun değişmediği tespit edilmiştir. 1800 dakika 5677 mg N /lt ürenin hidrolizi ile %95’lik reaksiyon verimi elde edilmiştir. 300 dakika sonunda N cinsinden üre konsantrasyonuna bakıldığında 2926 mg N/lt ürenin hidroliz olduğu görülmüş ve % 50 reaksiyon verimi elde edilmiştir (Tablo 3.4).

Şekil 3.15’da zamana karşı substrat değişiminden görüldüğü gibi, 9877 mg/lt NaCl konsantrasyonunda yürütülen deneyde reaksiyon 5087 mg/lt NaCl konsantrasyonunda yürütülen deneyden daha yavaş olarak gerçekleşmiştir. Şekil 3.16’dan ve Tablo 3.4’den görüldüğü gibi her iki reaksiyonda ciddi bir hız farkı vardır. NaCl konsantrasyonundaki artış ile birlikte reaksiyon hızı yavaşlamıştır, her iki reaksiyonda da % 95 verime ulaşılmasına rağmen NaCl konsantrasyonundaki artış reaksiyonun tamamlanma süresini uzatmıştır.



Şekil 3.15: Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

Tablo 3.4: KCl ve NaCl Tuzlarının İlave Edildiği Reaksiyon Sonuçları

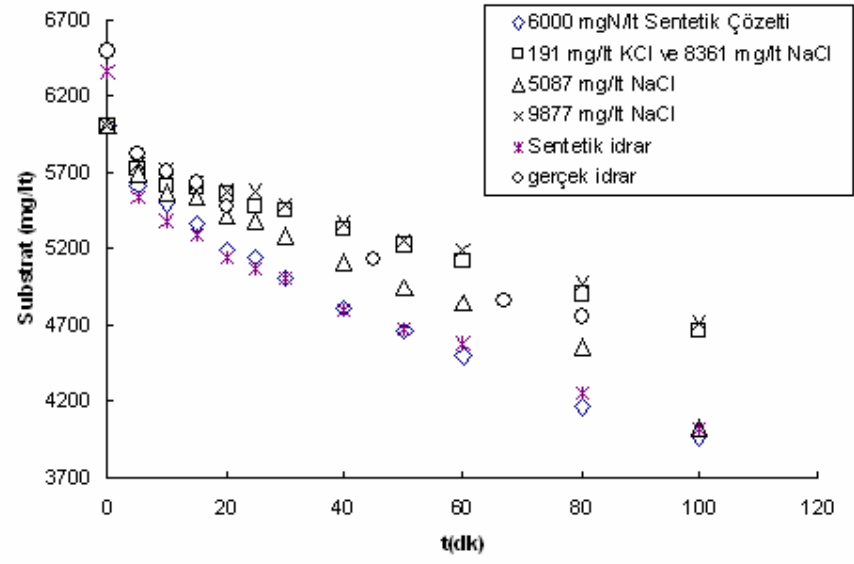
Substrat (mg N/lit)	Eklenen Tuz mg/lit	Üreaz (mg üreaz/lit)	Zaman (dakika)	Verim %
6000 mgN/lit	1921 mg KCl/lit 8361 mg NaCl/lit	25	300	50
			3240	95
6000 mgN/lit	5087 mg NaCl/lit	25	180	50
			480	96
			480	96
6000 mgN/lit	9877 mg NaCl/lit	25	300	50
			1800	95

3.3.2.3 6000 mg N/lit üre çözeltisine tüm tuzların ilavesi

İdrar numunesine en yakın özellikleri taşıyan sentetik çözelti elde etmek amacı ile, 6000 mg N /lit üre içeren sentetik çözeltiye 752 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ /lit, 1091 mg $CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$ /lit, 1621 mg NH_4Cl /lit, 1921mg KCl /lit, 5045 mg $Na_2SO_4 \cdot 10(H_2O)$ /lit, 2746 mg Na_2HPO_4 /lit, 4943 mg NaCl /l konsantrasyonlarda tuzlar eklenerek, pH 7’de 25 mg üreaz /lit enzimi konsantrasyonunda reaksiyon izlenmiştir. İlk 5 dakikada reaksiyonun hızlı bir şekilde ilerlediği ancak zamanla reaksiyon hızında düşüş meydana geldiği görülmüştür. 1620 dakika izlenen reaksiyonda, 5709 mg N /lit cinsinden üre hidroliz olmuş ve % 89 reaksiyon verimi elde edilmiştir. 180 dakikaya kadar reaksiyonun gidişine bakıldığında, 3143 mg N/lit üre hidroliz olmuş ve reaksiyon verimi % 53 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.5).

En düşük reaksiyon verimi sentetik idrarda yürütülen reaksiyonda elde edilmiştir. İçinde herhangi bir tuz ilavesi olmayan sentetik üre çözeltisinde verimin, idrar numunesinden daha fazla olduğu görülmüştür. Bunu sebebi sentetik idrar numunesine ilave edilen tuzların reaksiyonda hız kısıtlayıcı etkileri olarak açıklanabilmektedir (Şekil 3.16).

Bununla birlikte, sentetik idrarla yürütülen reaksiyondan elde edilen sonuçlar, gerçek idrarla aynı koşullarda sürdürülen reaksiyon sonuçları ile karşılaştırıldığında gerçek idrardan daha yüksek bir verim elde edildiği görülmektedir. Bu durum idrarın içinde bulunan diğer bileşenlerin, hormonların üreaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yarattığı şeklinde açıklanabilmektedir.



Şekil 3.16: Tuzlarla Yapılan Hidroliz Reaksiyonlarının, Üre Çözeltisi ve Sentetik İdrar Numunesi İle Karşılaştırılması

Tablo 3.5: Yapılan Tüm Deneylerin Birlikte Gösterimi

Substrat (mg N/lit)	Eklenen Tuz (mg/lit)	Üreaz (mg üreaz/lit)	Zaman (dakika)	Verim %
6000	-	25	180	50
			7500	96
6000	1921 mg KCl/lit 8361 mg NaCl/lit	25	300	50
			3240	94
6000	5087 mg NaCl/lit	25	180	50
			480	96
6000	9877 mg NaCl/lit	25	300	50
			1800	95
6000	752 mg MgCl ₂ . 6H ₂ O/lit 1091 CaCl ₂ . 2(H ₂ O) mg/lit 1621 mg NH ₄ Cl /lit 1921mg KCl /lit 5045 mg Na ₂ SO ₄ * 10(H ₂ O)/lit 2746 mg Na ₂ HPO ₄ /lit 4943 mg NaCl /lit	25	180	53
			1620	89

3.3.2 pH'ın etkisinin incelendiği pH kontrollü ve kontrolsüz yürütülen deneyler

pH'ın etkisinin incelenmesi amacı ile yürütülen her iki deneyde 6518 mg N/lit üre konsantrasyonuna sahip 2. idrar numunesi (bkz. Sayfa 19) kullanılmıştır. Deneyler 20 °C'de, pH 9'da 25 mg üreaz/lit konsantrasyonunda üreaz enzimi ilavesi ile yürütülmüştür. Bir deneyde pH kontrolünü sağlamak için borat tampon ilave edilirken, karşılaştırma sağlayabilmek amacı ile yürütülen diğer deneyde borat tampon ilave edilmemiştir.

3.3.2.1 pH kontrolsüz üre hidrolizi

pH 9'a ayarlanıp borat tampon ilave edilmeden, 3040 dakika izlenen reaksiyonda 1660. dakikada reaksiyon alanında 4719 mg N/lit ürenin hidroliz olduğu saptanmış ve 3040. dakikaya kadar konsantrasyonda bir değişim olmadığı görülmüştür. 1660

dakikalık reaksiyon sonunda %72'lik reaksiyon verimi elde edilmiştir. 360. dakikaya kadar reaksiyonda 2609 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %40 verim elde edilmiştir (Tablo 3.6).

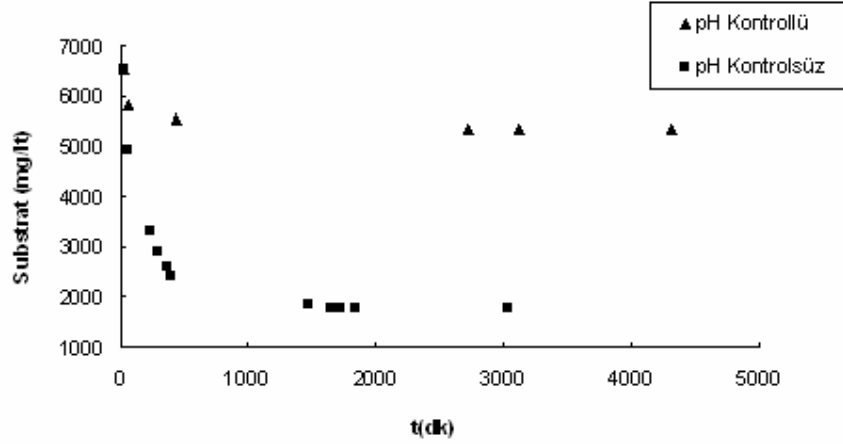
3.3.2.2 pH Kontrollü Üre Hidrolizi

pH'ı 9'a ayarlanan 500 ml idrar numunesine 32 gr ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) borat tamponu eklenerek pH kontrolünün hidroliz verimine etkisi saptanmıştır. 4320 dakika izlenen reaksiyon sonunda 1193 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %18 hidroliz verim elde edilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: pH Kontrollü ve Kontrolsüz Yürütülen Reaksiyonların Karşılaştırılması

Substrat Konsantrasyonu (mg N/lt)	pH	Borat Tampon $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/lt)	Zaman (dakika)	Verim %
6518 mg N/lt	9	Yok	25	360	40
				1660	72
		Var	25	4320	18

pH 9'da 25 mg üreaz/lt konsantrasyonunda pH kontrollü ve pH kontrolsüz üre hidroliz reaksiyon verimleri karşılaştırıldığında borat tamponu ile yürütülen reaksiyonda borat tamponun inhibisyon etkisi nedeni ile verim 4320 dakikada ancak %18'e ulaşırken, borat tampon ilave edilmeyen reaksiyonda 1660 dakikada reaksiyonda % 72 verim elde edildiği görülmüştür. Şekil 3.17'de de görüldüğü gibi pH kontrollü deneyde reaksiyon verimi pH kontrolsüz deneye göre oldukça düşüktür. Bunun borat tamponun üreaz enzim aktivitesini düşürmesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Literatürde Fidaleo ve Lavecchia da borat tampon kullanarak yürüttükleri çalışmada, borat tamponun enzim aktivitesini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir.



Şekil 3.17: II. İdrar Numunesi İle Yürütülen pH Kontrollü-Kontrolsüz Hidroliz Reaksiyonu

Borat tampon ilave edilip yürütülen reaksiyonda borat tamponunun etkisi sebebi ile pH 9’da sabit kalırken, tampon ilavesinin olmadığı deneyde pH 9.5 değerine ulaşmıştır. Bu sonuç deneysel çalışma kapsamında başlangıç pH’ını 7’ye ayarlayıp reaksiyon yürüttüğümüz deney sonuçlarına uyarken, aynı zamanda Fidaleo ve Lavecchia da, 2003 senesinde yaptıkları çalışmada tampon ilavesi olmayan sistemlerde pH’ın 9.4’e ulaştığını bildirmişlerdir.

3.3.3 Üreaz konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneyler

6518 mg N /lt üre içeren II. idrar numunesinde 20 °C’de pH 7’de 10, 15, ve 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen deneylerde üreaz enzimi konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. Sürdürülen reaksiyonlarda 5. dakikaya kadar reaksiyonun hızla ilerlediği ancak 5. dakikadan sonra reaksiyon hızında düşüş olduğu görülmüştür.

3.3.3.1 10 mg üreaz/lt

10 mg üreaz /lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyon 2880 dakika sonunda %80 verim elde ederek durmuştur. Bu süre içinde 5186 mg N/lt üre hidroliz olmuştur. 460 dakikaya kadar reaksiyonda 3103 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %50 verim elde edilmiştir (Tablo 3.7).

3.3.3.2 15 mg üreaz/lt

15 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyon 4320 dakika izlenmiştir. 4320 dakika boyunca izlenen reaksiyonda 2100. dakikadan sonra üre konsantrasyonunda bir değişim görülmemiş ve reaksiyonun 2100. dakikada durduğu tespit edilmiştir.

2100 dakika sonunda 5230 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %80 reaksiyon verimi elde edilmiştir. Bununla birlikte 260 dakikada 3216 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %50 verim elde edilmiştir (Tablo 3.7).

3.3.3.3 25 mg üreaz/lt

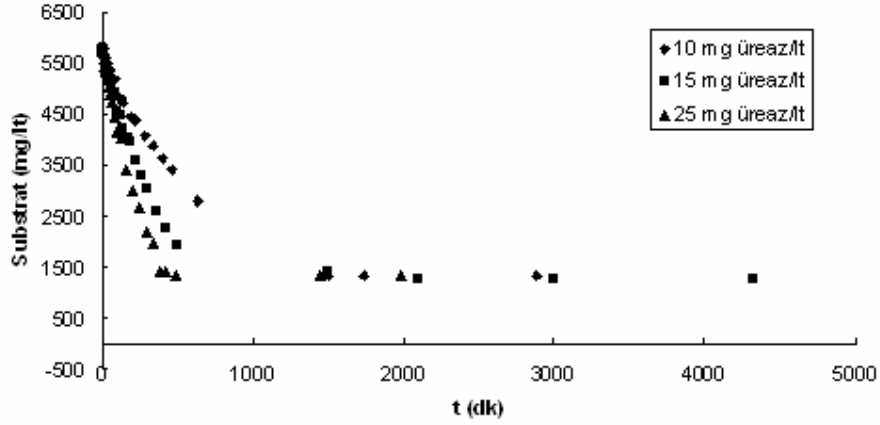
1980 dakika sürdürülen reaksiyonda 480. dakikadan sonra üre konsantrasyonunda bir değişim olmadığı ve reaksiyonun 480. dakikada 5187 mg N/lt üre hidrolizi ile durduğu gözlenmiştir. Reaksiyon sonucunda %80 verim elde edilmiştir. Reaksiyon 200. dakikada % 50 verim elde edilmiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: Farklı Üreaz Konsantrasyonunda Sürdürülen Reaksiyon Sonuçları

Substrat Konsantrasyonu (mg N/lt)	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/lt)	Zaman (dakika)	Verim %
6518 mg N /lt Üre	10	460	50
		1740	80
	15	260	50
		2100	80
	25	200	50
		480	80

Substrat konsantrasyonunun sabit tutulup üreaz konsantrasyonunun 10, 15, 25 mg üreaz/lt konsantrasyonlarda değiştirildiği deneylerde elde edilen verimler kıyaslandığında, üreaz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak %50 verim elde etmek için geçen süre 10, 15, 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonlarında reaksiyon sürelerinin sırasıyla 460, 260, 200 dakika şeklinde azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte üç reaksiyonda da, reaksiyon tamamlandıktan sonra %80 verime ulaşılmıştır. Ancak % 80 verim 10 mg/lt üreaz konsantrasyonunda 1740 dakikada, 15 mg/lt üreaz

kullanılan reaksiyonda 2100 dakikada, 25 mg/l t ureaz kullanılan reaksiyonda ise 480 dakikada tamamlanmıştır (Tablo3.7). 15 mg ureaz/l enzim kullanılan deneyde ürün inhibisyonu nedeniyle reaksiyon hızının düştüğü düşünülmüştür (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: İdrar Numunesinin 25-15-10 mg ureaz/l Enzim Konsantrasyonunda Hidrolizi

Bununla birlikte, reaksiyonlarda pH değişimleri izlendiğinde 10 mg ureaz/l enzim konsantrasyonunda yürütülen deneyde 630. dakikada, 15 mg ureaz/l konsantrasyonunda yürütülen deneyde 420. dakikada, 25 mg ureaz/l enzim konsantrasyonunda yürütülen deneyde ise 200. dakikada pH 9.5'a ulaşmıştır. Dolayısı ile ureaz konsantrasyonu hidroliz hızını artırıcı etkisi görülmüştür. Literatürde, Fidaleo ve Lavecchia (2003) benzer bir çalışmada ure hidroliz hızının ureaz enzim konsantrasyonu ile arttığını göstermişlerdir.

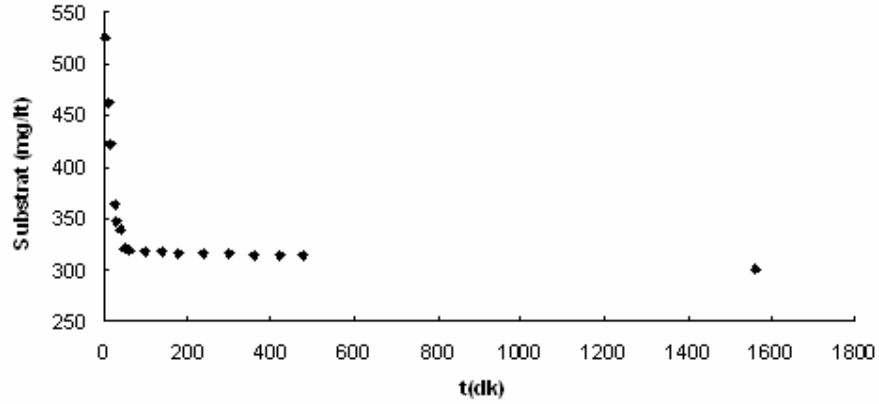
3.3.4 Üre konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneyler

6518 mg N/l t üre içeren II. idrar numunesi 1000 ve 3000 mg N/l t sentetik üre çözeltisi ile kıyaslama yapabilmek için 870 ve 2600 mg N/l t üre içerecek şekilde seyreltilmiş ve 20 °C'de, pH 7'de 25 mg ureaz/l enzim konsantrasyonunda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.1 870 mg N/l t üre konsantrasyonu içeren idrar numunesi

Yürütülen reaksiyonda 1560 dakikadan sonra N cinsinden üre konsantrasyonunda değişim görülmemiş ve reaksiyon durmuştur. Reaksiyon sonunda 568 mg N/l t üre hidroliz olmuş ve %65'lik verim elde edilmiştir. 360 dakikaya kadar 555 mg N/l t üre

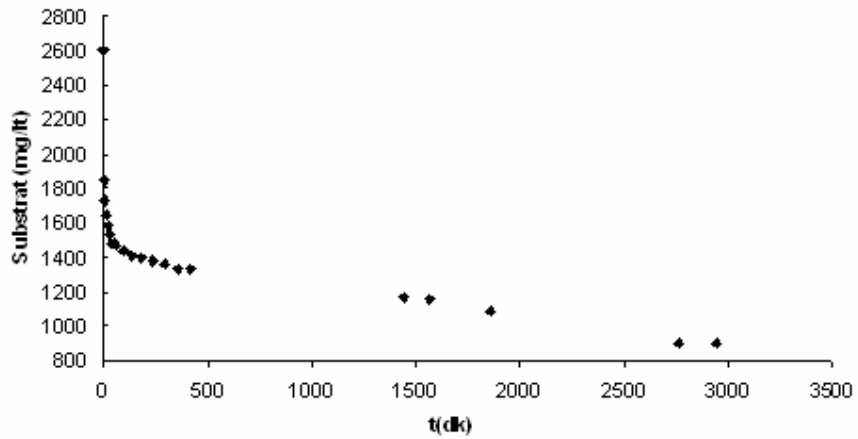
hidroliz olmuş %63 verim elde edilmiş ve 10 dakikaya kadar %50 verim elde edilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19: 870 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda İdrar Numunesinin 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi

3.3.4.2 2600 mg N/lit üre konsantrasyonu içeren idrar numunesi

2940 dakika izlenen reaksiyonda 1720 mg N/lit üre hidroliz olmuş ve %65 verim elde edilmiştir. 360. dakikaya kadar 1277 mg/lit N üre hidroliz olmuş ve %50 verim elde edilmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: 2600 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda İdrar Numunesinin 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Reaksiyon Süresince Hidrolizi

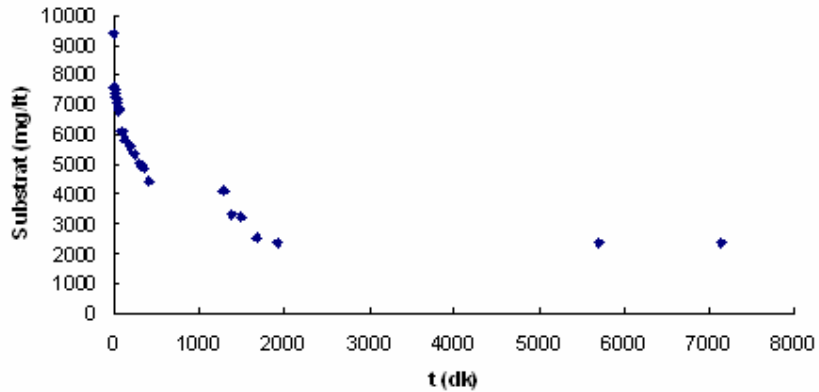
Üre konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneylerde, üre hidroliz reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna aşırı bağlılık gösterdiği görülmüştür. 2600 mg N/lit üre içeren idrar numunesi ile yürütülen reaksiyonda ürün inhibisyonu sebebiyle

reaksiyon hızı, 870 mg N/lt üre içeren idrar numunesine nazaran daha yavaş olarak gerçekleşmiştir. Bununla birlikte 360. dakikadaki verimler karşılaştırıldığında 2600 mg N/lt üre içeren idrar numunesinde % 50 verim elde edilirken, 870 mg N/lt idrar numunesinde ise % 63 verim elde edilmiştir.

870 mg/lt N ve 2607 mg/lt N üre konsantrasyonuna seyreltilmiş idrar numunesinde pH değişimi hızdan bağımsız olarak devam etmiş ve seyreltilerek elde edilmiş her iki konsantrasyonda da pH maksimum 9,3 değerine ulaşabilmiştir.

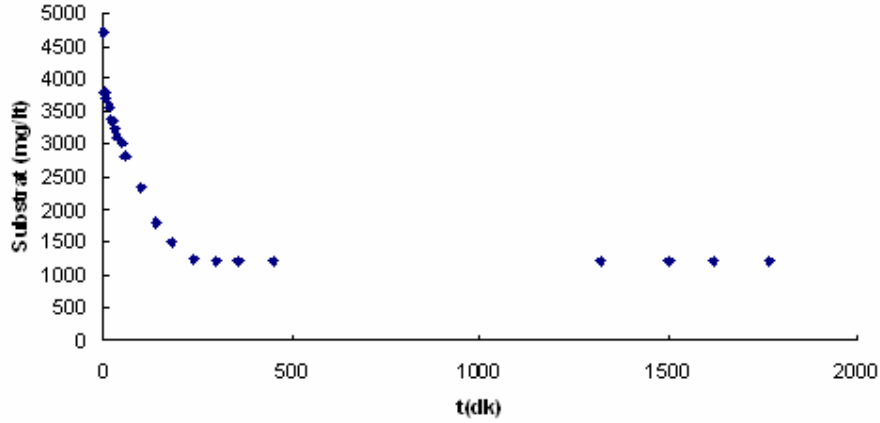
Deneyssel çalışma kapsamında 9400 mg N/lt konsantrasyonda üre içeren III. İdrar numunesi ile yapılan son grup deneyde, gerçek sistemlerle kıyaslama yapabilmek maksadı ile 1'e 1 seyrelme yaparak ve yapmadan, 20 °C'de ve pH 7'de 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda iki deney yürütülmüştür (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22).

Seyrelme yapılmadan yürütülen reaksiyon 7140 dakika izlenmiş ancak üre konsantrasyonunun 1920 dakikadan sonra değişmediği görülmüştür. 1920. dakikaya kadar 7023 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %75 verim elde edilmiştir. 360. dakikaya kadar 4937 mg N/lt üre hidroliz olmuş ve %50 verim elde edilmiştir (Tablo 3.8).



Şekil 3.21: 9400 mg N/lt Üre Konsantrasyonunda İdrar Numunesinin 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi

III. idrar numunesinin 1:1 seyreltilmesi ile sürdürülen reaksiyonda 4700 mg N/lt içeren idrar numunesi ile yapılan reaksiyon 1770 dakika izlenmiş ve 360. dakikada 1202 mg N/lt üre konsantrasyonuna ulaşarak %75 verim ile sonlanmıştır. Reaksiyonda %50 verime 100 dakika sonunda ulaşıldığı görülmüştür (Tablo 3.8).



Şekil 3.22: 4700 mg N/lit üre Konsantrasyonunda İdrar Numunesinin 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Tüm Reaksiyon Boyunca Hidrolizi

Tablo 3.8: Seyrelmiş ve Seyrelmemiş İdrar Numunesinde Hidroliz Reaksiyonu

Substrat Konsantrasyonu (mg N/lit)	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/lit)	Zaman (dakika)	Verim %
9400 mg N/lit pH:9.4 (1283 ^I)	25 mg N/lit	360	50
		1920	75
4700 mg N/lit pH:9.4 (100 ^I)	25 mg N/lit	100	50
		360	75

Bire bir seyrelme yapılarak sürdürülen reaksiyonda %75 verime 360 dakika sonra ulaşılırken, 9400 mg N/lit üre içeren idrar numunesi ile sürdürülen reaksiyonda % 75 verime 1920 dakika sonra ulaşılmıştır. Bununla birlikte, 1:1 seyrelmenin yapıldığı idrar numunesinde %50 verime 100 dakikada ulaşılırken, 9400 mg N/lit üre konsantrasyonunda sürdürülen deneyde %50 verime 360 dakikada ulaşılmıştır. Başlangıç substrat konsantrasyonu yüksek olan seyrelmemiş idrar numunesinde amonyak dönüşümünün fazla olması ürün inhibisyonuna sebep olmuştur. Reaksiyonun pH gidişine bakıldığında 9400 mg N/lit üre içeren idrar numunesinde pH 9.4'e 1283 dakika sonra ulaşılırken, birebir seyreltilerek elde edilmiş idrar numunesinde yürütülen reaksiyonda pH 9.4'e 100 dakika sonra ulaşılmıştır. Buradan

elde edilen sonuçlarda başlangıç üre konsantrasyonunun reaksiyon süreleri üzerine doğrudan etki yarattığı görülmüştür.

Her iki reaksiyonun ilk 5 dakikası karşılaştırılacak olursa; 9400 mg N/lit üre içeren idrar numunesi ile sürdürülen reaksiyonun 5. dakikadaki hızı birebir seyreilmemenin olduğu 4698 mg N/lit üre içeren idrar numunesinin 5. dakikadaki hızının iki katıdır. Dolayısı ile reaksiyon alanında oluşan amonyak konsantrasyonunun fazla olması reaksiyon hızını yavaşlatıcı bir etki yaratmıştır ve 9400 mg N/lit üre içeren idrar numunesinde reaksiyon hızı düşmüştür.

3.4 Deneysel Çalışmanın Değerlendirilmesi

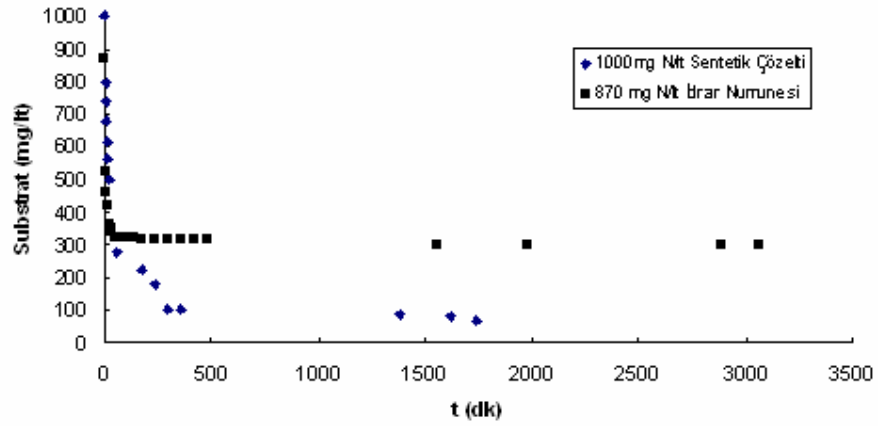
3.4.1 Sentetik ve idrar numunesinde yürütülen deneylerin birbirleri ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi

Deneysel çalışmaların daha bir anlam kazanması açısından, sentetik ve gerçek numunelerde sürdürülen reaksiyon sonuçları birlikte irdelenmiş ve değerlendirilmiştir.

1000 mg N /lit içeren üre çözeltisinde ve 870 mg N/lit üre konsantrasyonuna seyreltilmiş idrar numunesinde 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyon sonuçları karşılaştırıldığında, seyreltilmiş idrar numunesinde reaksiyon hızının düşük olduğu saptanmıştır. Bunun durum idrar numunesinde yapılan seyreilmemenin enzim aktivitesini etkilemesi olarak açıklanmıştır (Tablo 3.9) ve (Şekil 3.23).

Tablo 3.9: 870 mg N/l $\ddot{u}$ re İçeren Seyreltilmiş İdrar Numunesi ve 1000 mg N/l $\ddot{u}$ re Sentetik $\ddot{u}$ re çözeltisinde Hidroliz Reaksiyonunun Karşılaştırılması

Substrat Konsantrasyonu (mg N/l $\ddot{u}$ t)	$\ddot{u}$ reaz Konsantrasyonu (mg $\ddot{u}$ reaz/l $\ddot{u}$ t)	Zaman (dakika)	Verim %
Seyreltilmiş İdrar Numunesi 870 mg N/l $\ddot{u}$ t	25 mg N/l $\ddot{u}$ t	10	51
		360	63
		1560	65
Sentetik $\ddot{u}$ re çözeltisi 1000 mg N/l $\ddot{u}$ t	25mg N/l $\ddot{u}$ t	360	90
		1740	93

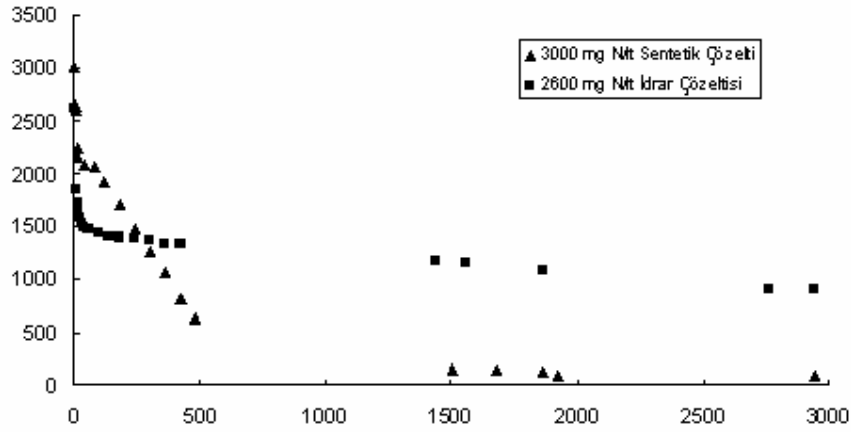


Şekil 3.23: 1000 mg N/l $\ddot{u}$ re Konsantrasyonunda Sentetik ve 870 mg N/l $\ddot{u}$ re Konsantrasyonunda İdrar Numunelerinin 25 mg $\ddot{u}$ reaz/l $\ddot{u}$ t Enzim Konsantrasyonunda Hidrolizi

3000 mg N/l $\ddot{u}$ re içeren sentetik numune ile 2600 mg N/l $\ddot{u}$ re konsantrasyonuna seyreltilip kullanılan gerçek idrar numunesinde 25 mg $\ddot{u}$ reaz/l $\ddot{u}$ t enzim konsantrasyonunda yrtlen hidroliz reaksiyonundan seyreltilmiş idrar numunesinin reaksiyon hızının düşük olduğu görülmüş ve yine idrar numunesindeki seyrelmenin $\ddot{u}$ reaz aktivitesi üstüne inhibisyon etki yaratığı düşünülmüştür (Tablo 3.10) ve (Şekil 3.24).

Tablo 3.10: 2600 mg N/lit Üre İçeren Seyrelmiş İdrar Numunesi ve 3000 mg N/lit Sentetik Çözeltilde Hidroliz Reaksiyonu

Substrat Konsantrasyonu (mg N/lit)	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/lit)	Zaman (dakika)	Verim %
2600 mg N/lit	25 mg N/lit	360	50
		2940	65
3000 mg N/lit	25 mg N/lit	360	65
		2940	97



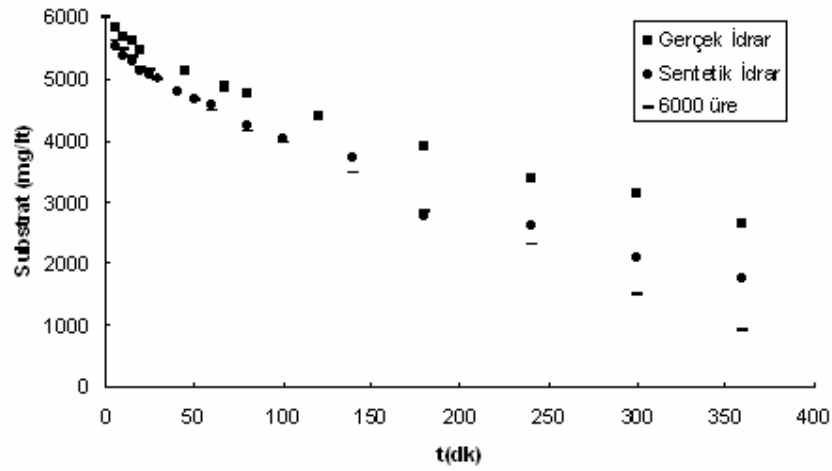
Sekil 3.24: 3000 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda Sentetik ve 2600 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda İdrar Numunelerinin 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Hidrolizi

6000 mg N/lit üre içeren sentetik idrar numunesi, gerçek idrar numunesi ve sentetik üre çözeltisinde yürütülen hidroliz reaksiyonlarının ilk 360 dakikası karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde sırası ile en iyi verimin üre çözeltisinde, sentetik idrar numunesinde ve gerçek idrar numunesinde olduğu görülmüştür. Gerçek idrar numunesinde, bulunan hormonların ve diğer bileşenlerin üreaz enzimi üstüne inhibisyon etkisi sebebiyle en düşük verim elde edildiği düşünülmüştür. Buna ilave olarak idrar numunesi içinde bulunan tuzların belirlenen konsantrasyonlarda

eklenmesi ile elde edilen sentetik idrar numunesinde yürütülen reaksiyonda anyon ve katyonların üreaz enzimi üstüne inhibisyon etki yarattığı düşünülmüştür (Şekil 3.25).

Tablo 3.11: Sentetik Üre Çözeltilisi, Gerçek İdrar Numunesi, Sentetik İdrar

Substrat Konsantrasyonu (mg N/l)	Üreaz Konsantrasyonu (mg üreaz/l)	Zaman (dakika)	Verim %
6000 mg N/l Gerçek İdrar Numunesi	25 mg üreaz/l	360	60
6000 mg N/l Sentetik İdrar Numunesi			73
6000 mg N/l Sentetik Üre Çözeltilisi			85



Şekil 3.25: Sentetik Üre Çözeltilisi, Gerçek İdrar Numunesi ve Sentetik İdrar Numunelerinde Yürütülen Hidroliz Reaksiyonlarının Karşılaştırılması

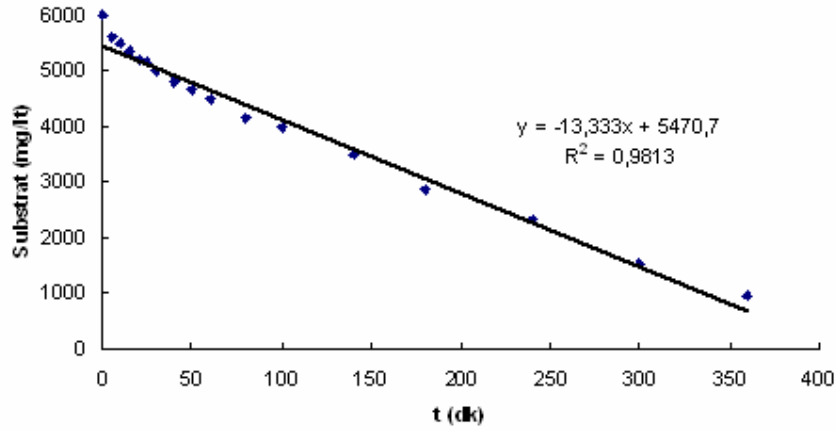
3.4.2 Kinetik değerlendirme

3.4.2.1 Sentetik numunelerde kinetik değerlendirme

6000 mg N/l üre konsantrasyonunda sentetik üre çözeltisi 20 °C’de, pH 7’de 25 mg üreaz/l enzim konsantrasyonu ilavesi ile sürdürülen üre hidroliz reaksiyonunda

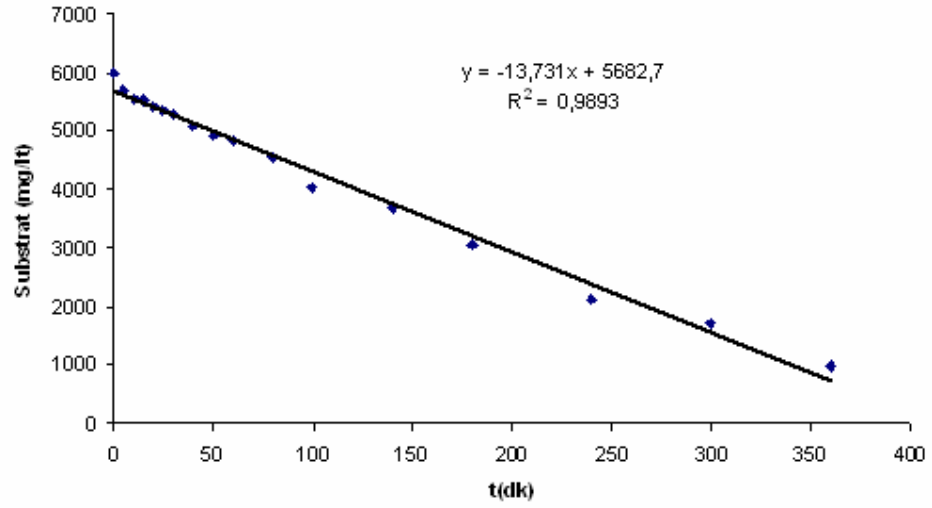
izlenmiştir. 360 dakikada 5062 mg N/l't üre hidroliz olmuş ve %84 verim elde edilmiştir.

Reaksiyonda 360 dakika boyunca zamana karşı üre konsantrasyonundaki değişime bakıldığında 0. mertebe reaksiyon kinetiğine 0.98 korelasyon katsayısı ile uyduğu görülmüştür (Şekil 3.26).



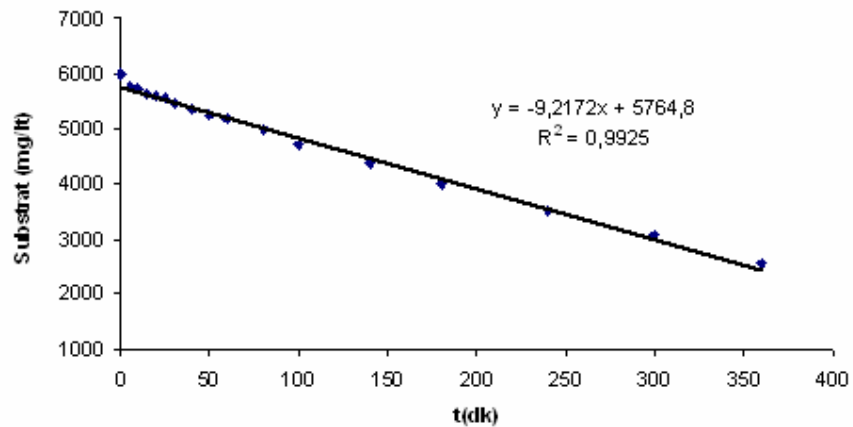
Şekil 3.26: 6000 mg N/l't Üre Konsantrasyonunda Sentetik Üre Çözeltilisinin 25 mg üreaz/l't Enzim Konsantrasyonunda 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

6000 mg N /l't üre içeren sentetik çözeltiye 5087 mg NaCl /l't ilave edilmiş ve 20°C'de, pH 7'de 25 mg üreaz/l't enzimiyle reaksiyon yürütülmüştür. Reaksiyonda 360 dakika sonra %83 verim elde edilirken, zamana karşı substrat konsantrasyonundaki değişimine bakıldığında 0.98 korelasyon katsayısı ile 0. mertebe reaksiyon kinetiğine uyum görülmüştür (Şekil 3.27).



Şekil 3.27: 6000 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltiye 5087 mg/lit NaCl İlavesi İle Elde Edilen Çözeltide 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Yürütülen Reaksiyonun 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

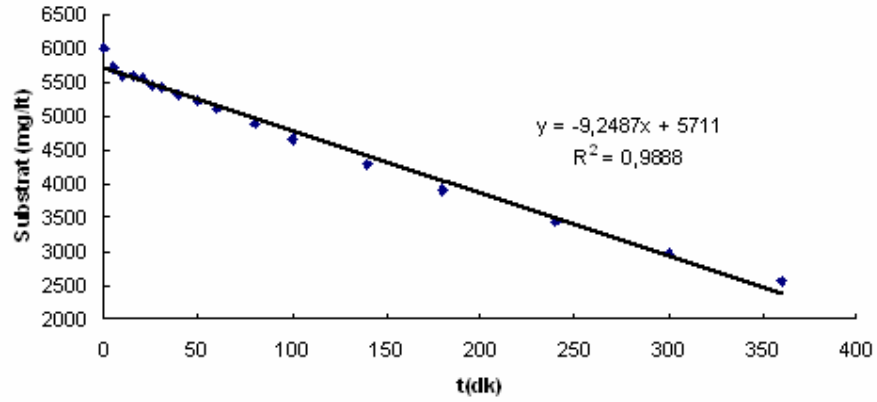
6000 mg N /lt içeren sentetik üre çözeltisine 9877 mg NaCl /lt ilave edilerek elde edilen çözeltide, 20 °C’de, pH 7’de 25 mg üreaz /lt konsantrasyonda enzim ilave edilerek hidroliz reaksiyonu izlenmiştir. 360 dakika sonunda hidroliz olan N cinsinden üre konsantrasyonuna bakıldığında 3436 mg N/lt üre ile % 57’lik reaksiyon verimi elde edilmiştir. Bununla birlikte, 360 dakika boyunca zamana bağlı olarak N cinsinden üre konsantrasyonundaki değişime bakıldığında ise 0.99 korelasyon katsayısı görülmüştür (Şekil 3.28).



Şekil 3.28: 6000 mg N/lit Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltiye 9877 mg/lit NaCl İlavesi İle Elde Edilen Çözeltide 25 mg üreaz/lit Enzim Konsantrasyonunda Yürütülen Reaksiyonun 360 Dakika Hidrolizi

6000 mg N /lt üre içeren sentetik üre çözeltisine 1921 mg KCl /lt ve 8361 mg NaCl/lt eklenerek elde edilen çözeltide 20 °C’de, pH 7’de 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen reaksiyonda 360 dakika sonra 3426 mg N/lt üre hidroliz olduğu saptanmış ve %57 reaksiyon verimi elde edilmiştir.

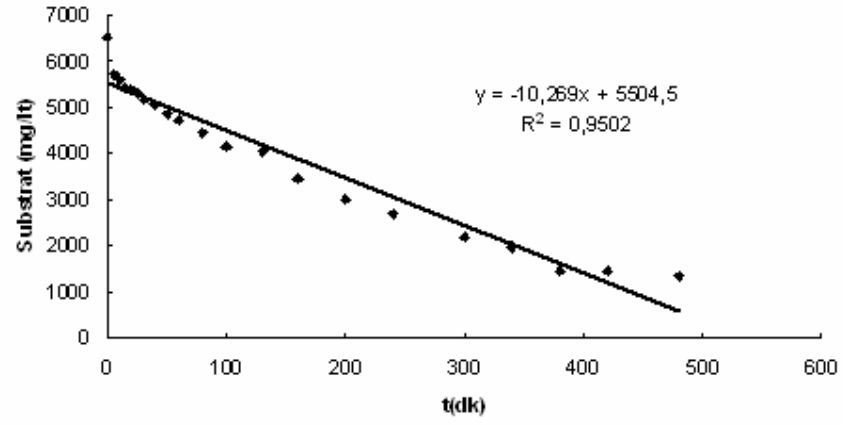
Zaman karşı konsantrasyon değişimine bakıldığında 360 dakika sonunda korelasyon katsayısı 0.98 olarak bulunmuştur (Şekil 3.29).



Şekil 3.29: 6000 mg N/lt Üre Konsantrasyonunda Sentetik Çözeltiye 1921 mg/lt KCl ve 8361 mg/lt NaCl İlavesi İle Elde Edilen Çözeltide 25 mg üreaz/lt Enzim Konsantrasyonunda Yürütülen Reaksiyonun 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

3.4.2.2 İdrar numunesinde kinetik değerlendirme

İdrar numuneleri ile yapılan deneysel sonuçlarda da tamamı için bir kinetik değerlendirmenin anlamlı olmadığı 360 dakikalık dönüşüm için bunun anlamlı olduğu görülmüştür. 6518 mg N/lt üre konsantrasyonunda idrar numunesinde 360 dakika boyunca zamana karşı substrat değişimine bakıldığında 0.95 korelasyon katsayısı ile 0. mertebe reaksiyon kinetiğine uyduğu görülmüştür (Şekil 3.30).



Şekil 3.30: II. İdrar Numunesinde 25 mg üreaz/l Enzim Konsantrasyonunda Yürütülen Reaksiyonun 360 Dakika Boyunca Hidrolizi

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanlar, azot, fosfor, potasyum gibi nütrientler içeren organik maddeleri tüketmektedirler. Dolayısı ile bu organik maddeler de boşaltım sisteminde toplanmakta ve idrar ile dışarı atılmaktadır. Bu sebepten evsel atıksularda toplam azot yükünün %80'i ve toplam fosfat yükünün ise %60'ı idrardan gelmektedir. Bu durum idrarın evsel atıksularda nütrient geri kazanımı için anahtar bir bileşen olmasını sağlamakta ve ayrı toplanması ve değerlendirilmesi için sebep oluşturmaktadır. Böylece arıtma tesislerinde çok önemli olan N ve P yükünün azalması sağlanmaktadır.

Ancak idrardaki N ve P'ı geri kazanmak çok da kolay olmamaktadır. Bunun için idrar içindeki ürenin hidroliz olması gerekmektedir, eğer idrar ayrı toplandığında üre hidroliz olmazsa amonyağı ve özellikle fosfatı arıtmamız mümkün olmamaktadır. İdrardaki ürenin hidrolizi ise, idrarın ayrı toplandıktan sonra, depolanması ve arıtılması açısından son derece önemli ve zaman kısıtlayıcı olan bir prosestir. Dolayısı ile bu prosesin çeşitli açılardan incelenip değerlendirilmesi arıtma, bekletme, depolama açısından son derece önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında literatürde yapılmış çalışmalar toplanmış, dizayn açısından önemli esasları oluşturacak üre hidroliz prosesi tez çalışması çerçevesinde incelenip bir sonuca varmak hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında çeşitli gruplarda deneyler yürütülmüştür. Öncelikli olarak idrar numunesinde çalışılacak optimum üreaz konsantrasyonunun saptanması açısından bir seri ön deney yürütülmüştür. Daha sonra idrar bileşimi içinde bulunan tuzların anyon ve katyonların proses üstüne etkisinin tespit etmek amacı ile bir grup deney yürütülmüştür.

Tez çalışması kapsamında tüm deneyler gerçek sistemleri temsil etmesi açısından pH kontrolsüz olarak yürütülmüştür. Ancak, pH kontrollü bir deney yürütülerek dönüşüm hızının pH kontrolsüz sistemlerdeki dönüşüm hızı ile karşılaştırılması sağlanmıştır. Bunun akabinde üre hidroliz reaksiyonuna üre konsantrasyonunun ve üreaz konsantrasyonunun etkisinin araştırılması açısından bir grup deney yapılmıştır. Deneyisel çalışma kapsamında yapılan son grup deneyde, gerçek sistemleri

yansıtması açısından idrar numunelerinin 1:1 seyreltilmesi ile bir grup deney yürütülmüştür.

Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, gerek sentetik numunelerle gerekse idrar numuneleri ile yürütülen üre hidrolizinin genel bir karakteri olduğu görülmüştür. Bu karakterde hidroliz reaksiyonunda başlangıçta yüksek hızlı giderimin olduğu sonra ise reaksiyonun yavaşlama şeklinde kendini gösterdiği görülmüştür. Reaksiyon sonunda bu dönüşümün son derece yavaş olduğu görülmüştür.

Tez çalışması kapsamında sürülen deneyler gerçek sistemleri yansıtması açısından pH kontrollü olarak yürütülmemiştir. pH 7’de sürdürülen bu reaksiyonlarda pH 9’a oldukça hızlı bir şekilde yükselip daha sonra, 9-9.5 civarında kalmıştır. Bu eğilimin tez çalışması kapsamında yapılan bütün deneylerde böyle olduğu görülmüştür.

Üre hidroliz reaksiyonu üzerine üreaz konsantrasyonunun önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Bu durum sürdürülen gerçek ve sentetik numunelerde görülmüştür. 10, 15, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonlarında sürdürülen üre hidroliz reaksiyonlarında üreaz konsantrasyonundaki artış ile reaksiyon hızının arttığı saptanmıştır. Aynı giriş substrat konsantrasyonlarında yürütülen bu deneylerde % 50 reaksiyon verimi elde etmek için 10, 15, 25 mg N/lit üreaz konsantrasyonlarında sırası ile 460, 260 ve 200 dakika geçtiği tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan pH’ın üre hidroliz reaksiyonu üstüne çok kritik etki yarattığı görülmüştür. Deneysel çalışmalarda reaksiyon pH’ında meydana gelen artış reaksiyonda dönüşüm hızını düşürmüştür, buna zıt olarak reaksiyon pH’ında meydana gelen artışın yavaş olması, reaksiyon aynı pH’da uzun süre kaldığı için, reaksiyon hızının da yüksek olmasını sağlamıştır. Bu dönüşüme paralel olarak amonyak oluşumunun artması ile ortamda bir anda ürün konsantrasyonunda meydana gelecek artış ile ürün inhibisyonu görülmüş ve reaksiyon hızı düşmüştür. Bununla birlikte seyrelmiş numunelerle yapılmış deneylerde yüksek girişli substrat konsantrasyonlarında başlangıçtaki amonyak salınımı daha yüksek olduğu için ürün inhibisyonu görülmüştür.

İdrar içindeki anyon ve katyonların etkisinin araştırıldığı deneysel çalışmalardan K⁺ iyonunun hız kısıtlayıcı etki yarattığı ve NaCl tuzunda meydana gelen konsantrasyon artışının reaksiyon hızını düşürdüğü görülmüştür. İdrar içindeki tüm bileşenlerin gerçek idrarda bulunan oranlarda üre çözeltisine eklenip meydana getirilen sentetik

idrar numunesinde sürdürülen reaksiyondan, diğer tuzlarla olan reaksiyonlarla kıyaslandığında düşük bir verim elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak da, ilave edilen anyon ve katyonların enzim aktivitesine olumsuz etkileri olarak düşünülmüştür. Bununla birlikte tuz ilavesi yapılmış numunelerde sürdürülen reaksiyonlar gerçek idrar numunesi ile sürdürülen reaksiyonlarla karşılaştırıldığında, gerçek idrar numunesinde düşük reaksiyon verimleri elde edildiği görülmüştür. Bu durum idrarın içinde bulunan diğer bileşenlerin üreaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yarattığı şeklinde açıklanabilmektedir.

Sentetik numuneler ve idrar numunelerinde yapılan karşılaştırmalardan, seyrelmiş idrar numunesinde sürdürülen üre hidroliz reaksiyonlarında reaksiyon verimlerinin düşük olduğu ve seyrelme sebebiyle üreaz enzimi üstüne hız kısıtlayıcı etki yarattığı saptanmıştır.

Ayrıca, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunda sentetik ve idrar numunesinde yürütülen deneylerde 360 dakikaya kadar kinetik değerlendirme yapılmıştır. Yapılan kinetik değerlendirmelerde tuz ilavesinin yapıldığı sentetik numunelerde 0. mertebe kinetiğe 0.98 korelasyon katsayısı ile uyum görülmüştür. Bununla idrar numunesinde 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonunun yürütülen deneyde 360 dakikaya kadar substrat konsantrasyonundaki değişim incelendiğinde 0. mertebe kinetiğe 0.95 korelasyon katsayısı ile uyum görülmüştür.

Bu tez çalışması çerçevesinde hidroliz ile ilgili bir takım sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar sentetik numunelerin gerçek idrar numunesini pek temsil edici olmayacağını ortaya koymuştur. Üre hidroliz reaksiyonunda, üreaz konsantrasyonunun, üre konsantrasyonunun, pH'ın ve tuzların hidroliz prosesine etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak, bu sonuçların pratiğe yansımaları için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar arasında en fazla ihtiyaç duyulan ilave çalışmalar yüksek üre konsantrasyonunda, mümkün olduğu kadar pH kontrollü ortamda yapılacak çalışmalardır. Burada kritik olan nokta, pH kontrolünde kullanılacak tamponların hidroliz prosesini etkilememesi açısından önceden denenmesi ve prosesi en az etkileyecek tamponun seçilmesi olmaktadır. Bu çerçevede yapılan kinetik değerlendirmelerin daha duyarlı ve uygulamaya yönelik olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adamsson, M.**, 2000. Potential Use Of Human Urine By Greenhouse Culturing Of Microalga (*Scenedesmus acuminatus*), Zooplankton (*Daphnia magna*) And Tomatoes (*Lycopersicon*), *Ecological Engineering*, **16**, 243-254
- Berndtsson, J.C.**, **2005**, Experiences From The Implementation of a Urine Separation System: Goals, Planning, Reality, *Building and Environment*, 1-11
- Bibby J.M. ve Hukins D.W.L.**, 1992. Measurement of pH to Quantify Urease Activity, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **25**, 231-236
- Fidaleo, M. and Lavecchia, R.**, 2003. Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in Then pH Range 4-9, *Chemical Biochemical Engineering*, **17**, 311-318
- Hüttl, R., Bohmhammel, K., Wolf, G. and Oehmgen, R.**, 1995. Calorimetric Investigations into Enzymatic Urea Hydolysis, *Thermochimica Acta*, **250**, 1-12
- Jönsson, H., Stenström, T.A., Svensson J. and Sundin A.**, 1997. Source Separated Urine-Nutrient And Heavy Metal Content, Water Saving And Faecal Contamination, *Water Science and Technology*, **35**, 145-152
- Juszkiewicz, A., Kot M. And Zaborska W.**, 1998. Calorimetric Study of Inhibition of Urease by 2-mercaptoethanol Procedures Based Upon Integrated Rate Equation, *Thermochimica Acta*, **320**, 45-52
- Kabdaşı, I., Tünay O., İşlek, Ç., Erdinç, E., Hüskalar, S. and Tath, M. B.**, 2006 Nitrogen Recovery by Urea Hydrolysis and Struvite Precipitation From Anthropogenic Urine, *Water Science and Technology*, **53**, 305-312
- Koizumi M., Tachibana A. Ve Yamabe T.**, 1988. Reaction Ergodography for the Hydolysis of Urea, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **164**, 37-47
- Kot M., Zaborska W., Juszkiewicz A.**, 2000. Inhibition of Jack Bean Urease by Thiols. Calorimetric Studies, *Thermochimica Acta*, **354**, 63-69

- Krajewska, B. and Zaborska W.**, 1999. The Effect of Phosphate Buffer in The Range of pH 5.8-8.07 on Jack Bean Urease Activity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **6**, 75-81
- Krajewska, B., Chudy, M., Drozdek, M. and Brzozka, Z.**, 2003. Potentiometric Study of Urease Kinetics Over pH 5.36-8.21, *Electroanalysis*, **15**, 460-466
- Larsen T.A. and Gujer W.**, 1996. Seperate Management of Anthropogenic Nutrient Solutions (Human Urine), *Water Science and Technology*, **34**, 87-94
- Lind, B.B., Ban, Z. and Byden S.**, 2001. Volume Reduction and Concentration of Nutrients In Human Urine, *Ecological Engineering*, **16**, 561-566
- Oehlschlager K., Hüttl, R. and Wolf G.**, 1998. Calorimetric Investigation of Urease Inhibition by Heavy Metal Ions, *Thermochimica Acta*, **310**, 185-189
- Tünay, O., Kabdaşlı, I., Topçuoğlu, S. and Tatlı, M.B.**, 2006. Urea Hydrolysis In Anthropogenic Nutrient Solution, *Fresenius Environmental Bulletin*, **15**, 715-719
- Udert, K.M., Larsen, T.A., Biebow, M. and Gujer W.**, 2003. Urea Hydrolysis and Precipitation Dynamics in a Urine-Collecting System, *Water Research*, **37**, 2571-2582
- Wilsenach, J.A. and Van Loosdrecht M.C.M.**, 2004. Effects of Separate Urine Collection on Advanced Nutrient Removal Processes, *Environmental Science&Technology*, **38**, 1208-1215
- Zerner B.**, 1991. Recent Advances In The Chemistry of an Old Enzyme Urease, *Bioorganic Chemistry*, **19**, 116-131

EKLER

EK A

EK. A1. 1000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide, 10 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonuna yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman (dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7	28	1000
5	8,843	237	763
10	9,008	309	691
15	9,112	392	608
20	9,165	466	534
40	9,109	627	373
60	9,488	714	286
80	9,341	778	222
120	9,306	861	139
180	9,2	902	98
240	9,427	933	67
310	9,464	938	62
360	9,343	944	56
420	9,317	954	46
1560	9,457	960	40

EK. A2. 1000 mg N/lt üre konsantrasyonunda Sentetik çözeltide, 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonuna yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,02	34	1000
5	8,755	202	798
7	8,829	264	736
10	8,886	318	682
13	8,933	385	615
17	8,974	437	563
20	8,988	499	501
40	9,054	659	341
60	9,056	722	278
180	9,047	775	225
240	9,04	819	181
300	9,017	898	102
360	9,033	900	100
1380	9,061	914	86
1620	9,144	919	81
1740	9,08	930	70

EK B

EK. B1. 3000 mg N/lit üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide, 10 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonuna yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,098	123	3000
30	9,049	379	2621
60	9,108	517	2483
90	9,111	551	2449
120	9,108	557	2443
150	9,108	585	2415
180	9,11	592	2408
210	9,098	602	2398
300	9,071	606	2394
360	9,069	613	2387
390	9,059	616	2384
10080	9,37	1149	1851
11520	9,02	1287	1713

EK. B2. 3000 mg N/lit üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide, 25 mg üreaz/lit enzim konsantrasyonuna yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,08	92	3000
5	8,79	351	2649
7	8,823	394	2606
10	9,068	767	2233
15	9,142	830	2170
40	9,138	906	2094
80	9,223	936	2064
120	9,261	1077	1923
180	9,324	1288	1712
240	9,383	1532	1468
300	9,428	1745	1255
360	9,462	1936	1064
420	9,487	2188	812
480	9,528	2362	638
1500	9,538	2845	155
1680	9,528	2861	139
1860	9,509	2882	118
1920	9,467	2903	97
2940	9,543	2903	97

EK C

EK. C1. 6000 mg N/lt üre içeren sentetik çözeltide 25 mg N/lt üreaz enzim konsantrasyonunda sürdürülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	6,985	205	6000
5	8,907	389	5611
10	9,304	512	5488
15	9,427	645	5355
20	9,563	812	5188
25	9,599	862	5138
30	9,594	1001	4999
40	9,561	1196	4804
50	9,723	1342	4658
60	9,638	1509	4491
80	9,55	1845	4155
100	9,753	2040	3960
140	9,672	2522	3478
180	9,586	3143	2857
240	9,67	3685	2315
300	9,661	4500	1500
360	9,571	5062	938
420	9,863	5484	516
480	9,58	5484	516
1560	9,546	5598	402
7500	9,544	5760	240

EK D

EK. D1. 1921 mg KCl /lt ve 8361 mg NaCl /lt konsantrasyonunda tuzlar 6000 mg N/lt üre içeren sentetik çözeltiye eklenmesi ile oluşturulan çözeltide 25 mg N/lt üreaz enzim konsantrasyonunda sürdürülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,039	174	6000
5	9,591	280	5720
10	9,62	397	5603
15	9,637	403	5597
20	9,623	447	5553
25	9,659	526	5474
30	9,666	554	5446
40	9,659	677	5323
50	9,669	783	5217
60	9,679	888	5112
80	9,672	1100	4900
100	9,656	1342	4658
140	9,644	1706	4294
180	9,595	2088	3912
240	9,637	2572	3428
300	9,64	3034	2966
360	9,694	3425	2575
420	9,671	3817	2183
1200	9,745	5328	672
1440	9,671	5487	513
1740	9,669	5546	454
3000	9,519	5682	318
3240	9,508	5682	318

EK. D2. 5087 mg NaCl /lt ilave edilen 6000 mg N/lt sentetik üre Çözeltisinde 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,001	210	6000
5	9,291	311	5689
10	9,306	439	5561
15	9,335	466	5534
20	9,383	588	5412
25	9,401	622	5378
30	9,444	716	5284
40	9,452	895	5105
50	9,502	1062	4938
60	9,544	1152	4848
80	9,58	1443	4557
100	9,563	1980	4020
140	9,498	2332	3668
180	9,452	2942	3058
240	9,444	3886	2114
300	9,383	4275	1725
360	9,452	5008	992
420	9,448	5521	479
480	9,431	5748	252

EK. D3. 9877 mg NaCl tuzunun 6000 mg N/lt konsantrasyonda üre içeren sentetik çözeltide çözünmesi ile elde edilen çözeltide 25 mg N/lt üreaz enzimi konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,03	189	6000
5	9,363	245	5755
10	9,516	279	5721
15	9,539	373	5627
20	9,549	424	5576
25	9,579	429	5571
30	9,586	524	5476
40	9,618	635	5365
50	9,65	747	5253
60	9,65	814	5186
80	9,656	1025	4975
100	9,627	1287	4713
140	9,656	1616	4384
180	9,662	1992	4008
240	9,674	2501	3499
300	9,639	2926	3074
360	9,672	3436	2564
420	9,679	3845	2155
480	9,689	4087	1913
1260	9,691	5504	496
1500	9,713	5504	496
1800	9,662	5676	324
3000	9,534	5676	324

EK. D4.

752 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /lt,
1091 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ /lt,
1621 mg NH_4Cl /lt,
1921mg KCl /lt,
5045 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10(\text{H}_2\text{O})$ /lt,
2746 mg Na_2HPO_4 /lt,
4943 mg NaCl /l

konsantrasyonlarda tuzların 6000 mg N/lt üre konsantrasyonunda sentetik çözeltide
çözünmesi ile elde edilen sentetik idrarda 25 mg N/lt üreaz enzimi
konsantrasyonunda hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,044	541	6352
5	8,22	815	5537
10	8,579	973	5379
15	8,673	1066	5286
20	8,925	1219	5133
25	8,976	1288	5064
30	9,052	1351	5001
40	9,063	1554	4798
50	9,11	1680	4672
60	9,131	1781	4571
80	9,165	2098	4254
100	9,19	2339	4013
140	9,223	2610	3742
180	9,246	3582	2770
240	9,272	3732	2620
300	9,315	4250	2102
360	9,32	4610	1742
420	9,326	4999	1353
480	9,338	5421	931
1440	9,385	5708	644
1620	9,402	5708	644

EK E

EK. E1. 6518 mg N/lt üre içeren idrar numunesinin pH'ı 9'a ayarlanıp, 32 gr (Na₂B₄O₇.10H₂O) borat tampon ilavesi ile pH kontrollü olarak 25 mg N/lt üreaz enzimi konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
19	9,033	662	6518
60	9,023	688	5830
440	9,022	972	5547
2720	9,025	1151	5368
3120	9,032	1168	5350
4320	9,044	1193	5325

EK. E2. 6518 mg N/lt üre içeren idrar numunesinin pH'ı 9'a ayarlanıp pH kontrolsüz olarak 25 mg N/lt üreaz enzimi konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu.

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
20	9,013	989	6518
60	9,297	1591	4928
240	9,456	3225	3294
300	9,48	3625	2893
360	9,514	3909	2609
400	9,53	4102	2416
1480	9,539	4669	1849
1660	9,541	4718	1800
1720	9,529	4718	1800
1840	9,515	4718	1800
3040	9,486	4718	1800

EK F

EK. F1. 6518 mg N/l^t üre konsantrasyonunda gerçek idrar numunesinde 10 mg üreaz/l^t enzim konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH ₃ -N	C(üre)
0	7,09	489	6518
5	7,732	673	5845
10	8,087	731	5787
15	8,264	826	5693
20	8,493	920	5598
25	8,653	933	5585
30	8,785	1026	5493
40	8,883	1131	5388
50	8,903	1183	5335
60	8,981	1302	5217
85	8,954	1328	5190
100	8,936	1630	4888
120	9,153	1683	4836
140	9,174	1793	4726
190	9,252	2077	4441
220	9,27	2130	4388
280	9,316	2445	4073
340	9,361	2630	3889
400	9,417	2892	3626
460	9,421	3103	3416
630	9,481	3721	2798
1500	9,585	5170	1348
1740	9,591	5186	1333
2880	9,59	5186	1333

EK. F2. 6518 mg N/lt üre konsantrasyonunda gerçek idrar numunesinde 15 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,085	448	6518
5	7,89	809	5709
10	8,3	831	5688
15	8,438	860	5658
20	8,707	1019	5500
25	8,839	1072	5446
30	9,076	1112	5406
40	9,208	1246	5272
50	9,235	1367	5151
60	9,317	1421	5098
80	9,329	1616	4903
100	9,449	1983	4535
120	9,476	2040	4479
140	9,497	2278	4240
168	9,505	2466	4053
180	9,52	2573	3945
220	9,471	2948	3570
260	9,478	3216	3302
300	9,485	3484	3034
360	9,497	3918	2600
420	9,5	4262	2257
500	9,515	4585	1933
1500	9,625	5112	1407
2100	9,478	5230	1288
3000	9,608	5230	1288
4320	9,586	5230	1288

EK. F3. 6518 mg N/lt üre konsantrasyonunda gerçek idrar numunesinde 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda yürütülen hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,08	401	6518
5	8,379	800	5718
10	8,799	920	5598
15	8,929	1090	5429
20	9,099	1144	5375
25	9,15	1211	5308
30	9,157	1332	5186
40	9,312	1466	5052
50	9,419	1641	4877
60	9,431	1803	4716
80	9,451	2072	4447
100	9,421	2368	4151
130	9,5	2476	4043
160	9,451	3087	3432
200	9,529	3504	3015
240	9,554	3835	2684
300	9,55	4331	2187
340	9,678	4552	1966
380	9,748	5076	1442
420	9,586	5076	1442
480	9,578	5187	1332
1440	9,571	5187	1332
1980	9,566	5187	1332

EK G

EK. G1. 870 mg N/lt üre içeren seyreltilmiş idrar numunesi ile 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda sürdürülen hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
7,09	0	146	869
8,917	5	343	526
8,996	10	408	462
9,186	15	447	422
9,35	25	505	364
9,432	30	522	348
9,372	40	531	339
9,323	50	548	321
9,241	60	549	320
9,404	100	551	318
9,333	140	551	318
9,366	180	552	317
9,284	240	552	317
9,383	300	552	317
9,056	360	555	315
9,028	420	555	315
9,056	480	555	315
8,373	1560	568	301
8,605	1980	568	301
8,525	2880	568	301
8,538	3060	568	301

EK. G2. 2600 mg N/lt üre içeren seyreltilmiş sentetik idrar ile 25 mg üreaz/lt enzim konsantrasyonunda hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
7,09	0	469	2607
8,389	5	754	1853
8,93	10	879	1728
9,086	15	963	1644
9,113	20	1020	1587
9,213	30	1073	1534
9,239	40	1123	1484
9,265	50	1129	1478
9,182	60	1136	1471
9,273	100	1169	1438
9,126	140	1195	1412
9,132	180	1206	1401
9,164	240	1224	1383
8,955	300	1243	1364
8,923	360	1277	1330
8,87	420	1277	1330
8,881	1440	1440	1167
8,846	1560	1444	1163
8,804	1860	1521	1086
8,858	2760	1701	906
8,86	2940	1701	906

EK H

EK. H1. 9397 mg N/lt üre konsantrasyonunda seyreltilmemiş idrar numunesinde (III.İdrar numunesi) 25 mg N/lt üreaz ile hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,03	1425	9397
5	7,861	1800	7597
10	8,037	1846	7551
15	8,198	1915	7482
20	8,39	2010	7387
25	8,505	2104	7294
30	8,713	2174	7224
40	8,744	2337	7060
50	8,812	2501	6896
60	8,915	2594	6803
100	9,017	3319	6078
140	9,155	3553	5845
180	9,24	3780	5618
240	9,267	4067	5330
300	9,297	4366	5031
360	9,316	4553	4844
420	9,327	4937	4460
1410	9,462	5272	4125
1440	9,488	6098	3300
1560	9,48	6188	3209
1680	9,476	6876	2521
1920	9,459	7023	2374
5700	9,439	7023	2374
7140	9,43	7023	2374

EK. H2. 9397 mg N/lt üre konsantrasyondaki idrar numunesinin 1:1 seyreltilmesi ile elde edilen numunenin 25 mg N/lt üreaz enzimi ile hidroliz reaksiyonu

Zaman(dk)	pH	NH3-N	C(üre)
0	7,03	595	4698
5	8,281	916	3782
10	8,696	1010	3688
15	8,907	1136	3562
20	8,937	1314	3384
25	9,081	1340	3358
30	9,121	1471	3227
40	9,176	1580	3118
50	9,225	1692	3006
60	9,331	1889	2809
100	9,441	2364	2334
140	9,454	2902	1796
180	9,454	3202	1496
240	9,376	3451	1247
300	9,45	3478	1220
360	9,456	3496	1202
450	9,465	3496	1202
1320	9,46	3496	1202
1500	9,475	3496	1202
1620	9,443	3496	1202
1770	9,43	3496	1202

ÖZGEÇMİŞ

Selin Topçuoğlu

1981 yılında Tekirdağ'da doğdu. 1987-1992 yılları arasında Lüleburgaz Emrullah Efendi İlkokulunda ilk eğitimini tamamladı. 1995 yılında Lüleburgaz Merkez Ortaokulu'ndan mezun oldu. 1995-1999 yılları arasında Lüleburgaz Lisesi'nde(yabancı dil ağırlıklı) lise eğitimini tamamladıktan sonra, 1999 senesinde Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Halen 2005 yılında girdiği İstanbul Teknik Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Mühendisliği yüksek lisans programında eğitimini sürdürmektedir.