

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Nuri GÜLEŞCİ

**ÜREAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA
KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜREAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA
KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Nuri GÜLEŞCİ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez/01/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
ÜYE

.....
Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
ÜYE

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Selahattin SERİN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2011D31

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ÜREAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Nuri GÜLEŞCİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Yıl : 2013, Sayfa: 105

Jüri : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

: Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

: Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

: Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Üreaz, ürenin amonyum ve karbondioksit dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. Enzim taşıyıcı materyallerin boyutundaki küçülmeler genellikle immobilize enzimin etkinliğini artırır ve bu sayede partikülün birim kütlesi başına bağlanan enzim miktarı artar. Bu çalışmada, Fe_3O_4 magnetik nanopartiküllerin sentezi ve üreaz enziminin Fe_3O_4 magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden kovalent olarak immobilizasyonu ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği koşullar (pH, tampon derişimi ve sıcaklık) belirlenerek kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m , E_a) bulunmuştur. İmmobilize üreaz örneklerinin termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları ile tekrar kullanılabilirlikleri kesikli reaktörlerde araştırılmıştır. Ayrıca immobilize üreaz örneklerinin taramalı elektron mikroskopunda görüntüleri incelenmiştir. Üreaz enziminin glutaraldehit (GA) ve epiklorohidrin (ECH) ara kolları üzerinde magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu K_m ve V_{max} değerlerinin arttığı görülmektedir. Glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m ($2,746 \text{ dk}^{-1} \text{M}^{-1}$) ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m ($2,761 \text{ dk}^{-1} \text{M}^{-1}$) oranları serbest üreazın k_{cat}/K_m ($4,139 \text{ dk}^{-1} \text{M}^{-1}$) oranına göre yaklaşık 1,5 kat azalmıştır. Serbest ve immobilize üreazın farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve serbest enzime göre immobilize enzimler yüksek sıcaklık ve sürede aktivitesini daha fazla koruduğu tespit edilmiştir. Tekrar kullanılabilirliği kesikli reaktör modelinde araştırılmış ve 20 kullanımdan sonra immobilize enzimlerin aktivitelerini sırasıyla %57 (GA) ve %61 (ECH)'ini koruduğu belirlenmiştir. Serbest üreazın 5°C 'de ve 25°C 'de 30 gün depolanma süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesinin %30 ve %23'üdür. İmmobilize enzimler için 5°C 'de ve 25°C 'de 30 gün depolanma süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesini %72, %71'ini (GA) ve %60, %57'sini (ECH) koruduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Üreaz, Magnetik nanopartikül, Epiklorohidrin, Glutaraldehit.

ABSTRACT

PhD THESIS

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF UREASE ENZYME OVER MAGNETIC NANOPARTICLES THROUGH DIFFERENT INTERMEDIATE ARMS

Nuri GÜLEŞCİ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Year: 2013, Pages: 105
Jury : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Assoc. Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Urease is one of the foremost enzymes used mostly in the development of immobilization systems for medical applications. Diminution in the extent of materials carrying enzymes generally increases the efficiency of immobilized enzyme and so the amount of the enzyme bounded to the per unit of the particle increases. In this study, the synthesis of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and covalent immobilization and characterization of urease enzyme on magnetic nanoparticles by different intermediate arms are researched. By defining the conditions in which free and immobilized enzymes show maximum activity (pH, buffer concentration and temperature) kinetic parameters (K_m , $V_{\max}$, k_{cat}/K_m , E_a) are found. Thermal stability, storage stability and reusability of immobilized urease samples are searched in batch reactors. Besides, the images of immobilized urease samples in scanning electron microscope are investigated. As a result of the immobilization of urease enzyme to magnetic nanoparticles on glutaraldehyde, epichlorohydrin intermediate arms, it is seen that the values of K_m and $V_{\max}$ increase. Compared to free urease's k_{cat}/K_m ($4,139 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$) rate, the rate of immobilized urease on glutaraldehyde arms k_{cat}/K_m ($2,746 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$) and the rate of immobilized urease on epichlorohydrin arms k_{cat}/K_m ($2,761 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$) decrease almost one and a half fold. The thermal stabilities of free and immobilized urease are compared and it is determined that immobilized enzymes can maintain their activities in high temperatures and to a longer extent compared to free enzymes. Its reusability is searched on batch reactor model and after 20 uses, it is determined that immobilized enzymes retain their activities %57 (GA) and %61 (ECH) respectively. The activity of free urease maintained after the 30 days of storage time in 5°C and 25°C is %30 and %23 of its initial activity. For immobilized enzymes, it is figured that in 5°C and 25°C after 30 days of storage time, it maintains %72, %71 (GA) and %60, %57 (ECH) of its initial activity respectively. The thermal stability of free and immobilized urease designated in different temperatures are compared and it is found that immobilized enzymes retain their activity more.

Keywords: Urease, Magnetic nanoparticles, Epichlorohydrin, Glutaraldehyde.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyuncaengin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, hoşgörüsü ve nezaketiyle destek olan danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımdaya her zaman destek olan sayın hocalarım, Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e çok teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında bana her zaman çok destek olan arkadaşlarım Dr. Deniz YILDIRIM'a Dr. Dilek ALAGÖZ'e, Ercan ÇINAR'a, Arş. Gör. Ali TOPRAK'a, Mustafa Serkan YALÇIN'a teşekkür ederim. Beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamamaddi olarak destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	2
1.2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	2
1.2.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri	3
1.2.1.1.(1). Bağlama.....	3
1.2.1.1.(2). Tutuklama.....	11
1.2.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon	14
1.2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	14
1.3. Üreaz	15
1.3.1. Üreaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı.....	17
1.3.2. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları.....	19
1.4. Nanopartiküller	20
1.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	21
1.6. Enzim İmmobilizasyonda Kullanılan Magnetik Destek Materyalleri	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kimyasallar	35
3.1.2. Araç ve Gereçler.....	35
3.2. Metod	36
3.2.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi.....	36

3.2.2. Magnetik Nanopartiküllerin Üreaz İmmobilizasyonu İçin	
Hazırlanması	36
3.2.3. Magnetik Nanopartiküllerdeki Alkilamin Türevinin Glutaraldehit İle	
Aktifleştirilmesi.....	37
3.2.4. Magnetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit İle	
Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini	38
3.2.5. Üreaz Enziminin Glutaraldehit Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere	
Kovalent İmmobilizasyonu	40
3.2.6. Magnetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin İle Aktifleştirilmesi	41
3.2.7. Üreaz Enziminin Epiklorohidrin Üzerinden Magnetik	
Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu	41
3.2.8. Total Protein Tayini.....	42
3.2.9. Standart Amonyum Sülfat Eğrisinin Belirlenmesi.....	43
3.2.10. Üreaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	44
3.2.11. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu	45
3.2.11.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının	
Belirlenmesi.....	45
3.2.11.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon	
Değişimlerinin Belirlenmesi	45
3.2.11.3. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının	
Belirlenmesi.....	45
3.2.11.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_m ve V_{max} Değerlerinin	
Belirlenmesi.....	46
3.2.11.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının	
Belirlenmesi.....	46
3.2.11.6. Serbest ve İmmobilize Üreazın Depolama Kararlılıklarının	
Belirlenmesi.....	46
3.2.11.7. İmmobilize Üreazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının	
Belirlenmesi.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Bulgular	47

4.1.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi ile İlgili Bulgular	47
4.1.1.1. SEM Analizi	47
4.1.1.2. FT-IR Analizi	49
4.1.1.3. XRD Analizi.....	50
4.1.2. Serbest Üreazın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular	51
4.1.2.1. Serbest Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular .	51
4.1.2.2. Serbest Üreazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular	52
4.1.2.3. Serbest Üreazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular.....	53
4.1.2.4. Serbest Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular	54
4.1.2.5. Serbest Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	55
4.1.2.6. Serbest Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	56
4.1.3. Üreazın Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular	57
4.1.3.1. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular.....	58
4.1.3.2. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular	58
4.1.3.3. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular	59
4.1.3.4. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular.....	60
4.1.3.5. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	61

4.1.3.6. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	62
4.1.3.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular.....	63
4.1.4. Üreazın Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular	65
4.1.4.1. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular.....	66
4.1.4.2. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular	67
4.1.4.3. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular	67
4.1.4.4. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular.....	68
4.1.4.5. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	69
4.1.4.6. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular.....	70
4.1.4.7. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular.....	71

4.1.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitelerinin Birlikte Gösterimleri	73
4.1.5.1. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular	73
4.1.5.2. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine Tampon Derişimlerinin Etkisi İle İlgili Bulgular	74
4.1.5.3. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular	75
4.1.5.4. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular	76
4.1.5.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	77
4.1.5.6. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	78
4.1.5.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular	78
4.2. Tartışma	79

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ	101
EKLER.....	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	15
Çizelge 4.1. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri	77
Çizelge 4.2. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları	77
Çizelge 4.3. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları	78
Çizelge 4.4. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıkları.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	3
Şekil 1.2. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri.	4
Şekil 1.3. Kopolimerizasyon yöntemi.....	5
Şekil 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi	6
Şekil 1.5. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu	8
Şekil 1.6. Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi	9
Şekil 1.7. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu	11
Şekil 1.8. Matrikste tutuklama yöntemi.....	12
Şekil 1.9. Mikrokapsülde tutuklama yöntemi	13
Şekil 1.10. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu	13
Şekil 1.11. Üreazın kataliz reaksiyonu	16
Şekil 1.12. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	17
Şekil 1.13. Klebsiella aerogenes bakterisindeki üreaz enzimi	18
Şekil 1.14. Bacillus pasteurii bakterisindeki üreaz enzimi	18
Şekil 1.15. Helicobacter pylori bakterisindeki üreaz enzimi	19
Şekil 3.1. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktivite edilmesi	37
Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile reaksiyonu.....	38
Şekil 3.3. Ninhidrinin –NH ₂ grubu ile verdiği reaksiyon.....	39
Şekil 3.4. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere üreaz enziminin immobilizasyonu	40
Şekil 3.5. Magnetik nanopartiküllerin epiklorohidrin ile reaksiyonu.....	41
Şekil 3.6. Epiklorohidrin ile aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere üreaz enziminin immobilizasyonu.....	42
Şekil 4.1. Magnetik Fe ₃ O ₄ nano partiküllerinin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü.....	48

Şekil 4.2. Magnetik Fe ₃ O ₄ nano partiküllerine glutaraldehit ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü.....	48
Şekil 4.3. Magnetik Fe ₃ O ₄ nano partiküllerine epiklorohidrin ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü.	49
Şekil 4.4. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	50
Şekil 4.5. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin XRD spektrumu	51
Şekil 4.6. Serbest üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.....	52
Şekil 4.7. Serbest üreaz aktivitesinin pH 7,5 fosfat tamponunun derişimine bağlı olarak değişimi... ..	53
Şekil 4.8. Serbest üreaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	54
Şekil 4.9. Serbest üreaz için Lineweaver-Burk grafiğı.....	55
Şekil 4.10. Serbest üreazın 60, 70 ve 80°C'deki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.....	56
Şekil 4.11. Serbest üreazın 4°C ve 25°C'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi	57
Şekil 4.12. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.13. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.....	59
Şekil 4.14. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi	60
Şekil 4.15. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın Lineweaver-Burk grafiğı.....	61
Şekil 4.16. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 60, 70 ve 80°C'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.....	62
Şekil 4.17. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 4°C ve 25°C'deki depolama süresine bağlı olarak değişimi	63

Şekil 4.18. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	64
Şekil 4.19. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	64
Şekil 4.20. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	65
Şekil 4.21. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.22. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.23. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.....	68
Şekil 4.24. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın Lineweaver-Burk grafiği	69
Şekil 4.25. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 60, 70 ve 80°C'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi	70
Şekil 4.26. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 4°C ve 25°C'deki depolama süresine bağlı olarak değişimi	71
Şekil 4.27. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	72

Şekil 4.28. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (50 mg) bağlı aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	72
Şekil 4.29. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (100 mg) bağlı aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim	73
Şekil 4.30. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri	74
Şekil 4.31. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin tampon derişimlerine bağlı değişimleri	75
Şekil 4.32. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-APTES	: 3-Aminopropiltrietoksisilan
AN	: Akrilonitril
dak	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ECH	: Epiklorohidrin
FT-IR	: Fourier Transform Infrared
GA	: Glutaraldehit
GMA	: Glisidil metakrilat
k_{cat}	: Turnover sayısı
k_i	: Termal inaktivasyon sabiti
K_m	: Michealis Menten hız sabiti
mL	: Mili litre
mg	: Mili gram
mM	: Mili molar
nm	: Nano metre
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
um	: Birim kütle
V_{max}	: Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız
XRD	: X Ray Diffractometer

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörler olarak tanımlanırlar (Nelson ve Cow, 2005). Bununla birlikte yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları, enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme imkânı vermektedir. Enzimlerin kimya ve biyoteknoloji alanında farklı amaçlar için kullanılmaya başlanması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmalarının artmasına sebep olmaktadır. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidirler. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptir. Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12,000'den 1 milyona kadar değişebilen molekül ağırlıklarına sahiptir.

Enzimler analitiksel amaçlı, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarım amaçlı, gıda, deterjan, deri ve tekstil endüstrilerinde geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Wiseman, 1986). Her bir alanda kullanılan enzimlerin fiyatları beklenen özelliklerine göre birkaç dolardan birkaç bin dolara kadar değişebilmektedir. 2007 yılında endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin mali değeri yaklaşık 2,3 milyar \$ iken 2012 yılında bu değer 2,7 milyar \$'a yükseleceği tahmin edilmektedir (BIO030E, 2008).

Enzimler, suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden dolayı katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için ortama inhibitör eklenebilir. Fakat ortama yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Yukarıda da belirtildiği gibi katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden

reaksiyon ortamından çıkarılabilmesi olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden en yüksek oranda faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Telefoncu, 1997).

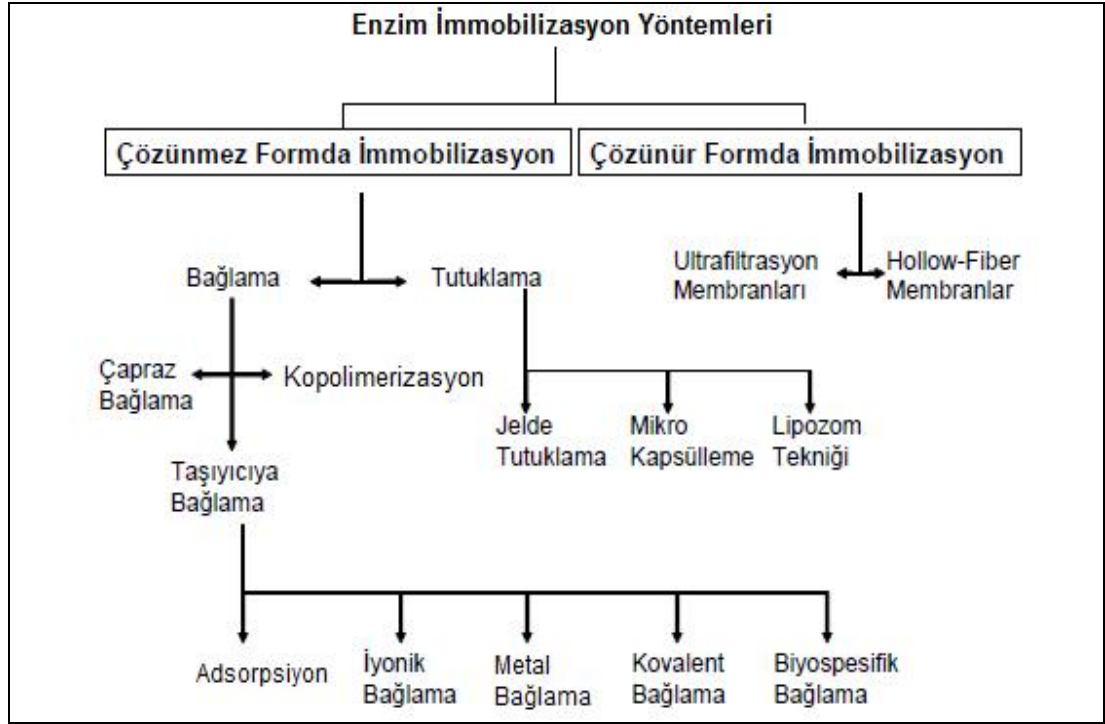
Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilmesi, çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklı olmaları, birçok kez ve uzun süre kullanılabilir olmaları, sürekli işlemlere uygulanabilmesi, doğal enzime kıyasla daha kararlı olmaları, birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygun olmaları, bazı durumlarda serbest enzime daha yüksek bir aktivite göstermeleri immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleridir (Coşkun, 2007).

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

1.2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu, kelime anlamı olarak enzim hareketini sınırlandırma olarak tanımlanır (Telefoncu, 1997). Bir enzimin immobilizasyonunda önemli olan bağlanma metodunun seçimidir. Bu bağlanmada, enzimin kimyasal doğasının değişimi veya enzimin bağlanma bölgesindeki reaktif grupların değişimi ile enzimin aktivite kaybetmesi engellenmelidir. Enzim immobilizasyon yöntemleri için farklı sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 1.1’de olduğu gibi bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997)

Enzim immobilizasyon yöntemleri çözünmez formda immobilizasyon ve çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

1.2.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri de bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

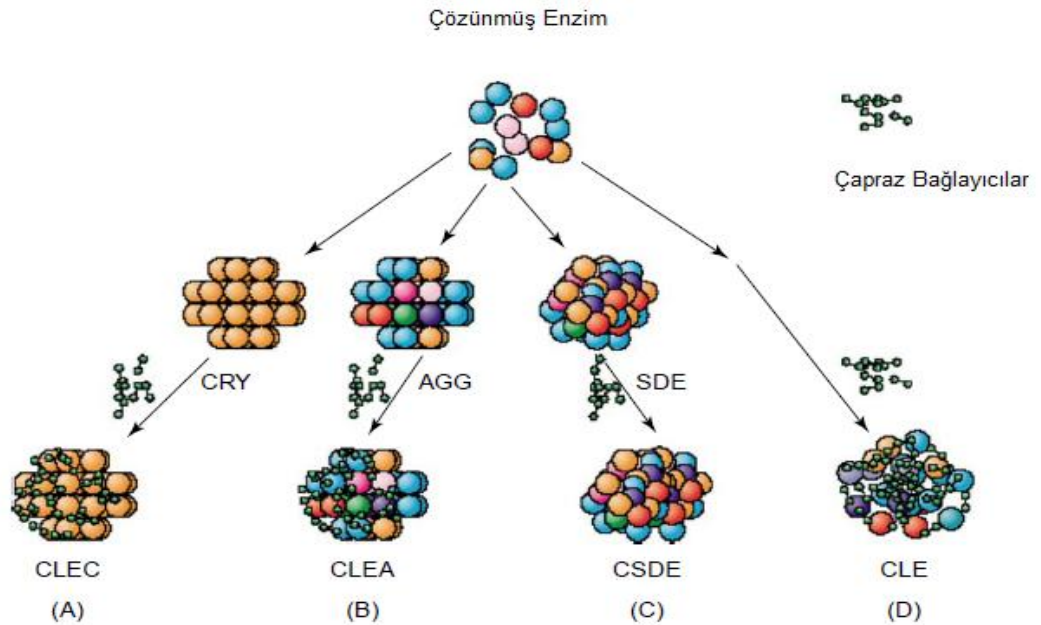
1.2.1.1.(1). Bağlama

Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

1. Çapraz Bağlama: Küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar (Chibata, 1978). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En

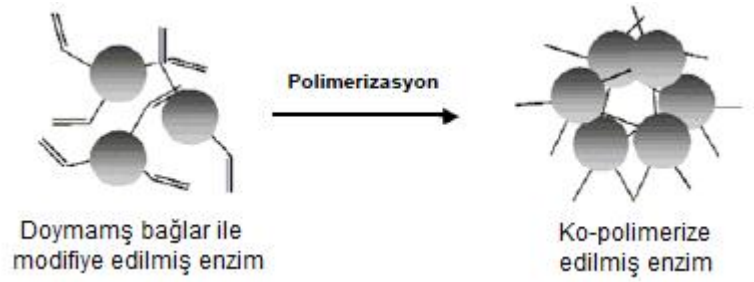
çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır (Alptekin, 2009). Çapraz bağlama yöntemleri;

- A. Çapraz bağlı enzim kristalleri; CLEC (cross-linked enzyme crystal),
 - B. Çapraz bağlı enzim agregatları; CLEA (cross-linked aggregate enzyme),
 - C. Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim; CSDE (cross-linked spray dried enzyme),
 - D. Çapraz bağlı çözünmüş enzim; CLE (cross-linked dissolved enzyme)
- olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılabilir. Bu dört immobilizasyon metodu şekil 1.2’de görüldüğü gibi birbirlerinden sadece çapraz bağlanmada kullanılan öncü moleküller yönünden değişim göstermektedir (Cao ve ark., 2003).



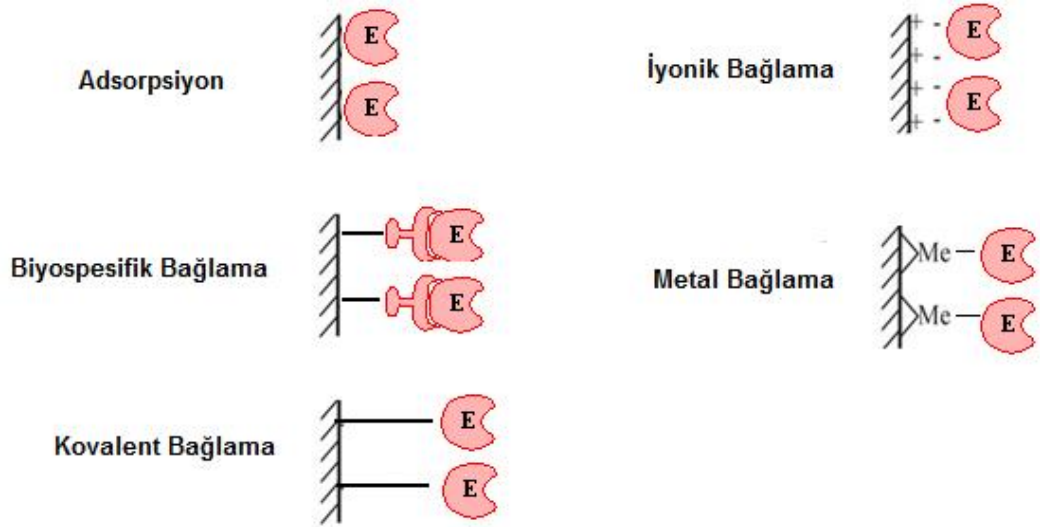
Şekil 1.2. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri. (A) kristallendirme, (B) çöktürme, (C) püskürtürerek kurutma, (D) doğrudan çapraz bağlama. CRY: kristalleştirilmiş, AGG: çöktürülmüş, SDE: püskürtülerek kurutulmuş (Twyman, 2005)

2. Kopolimerizasyon: Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Bu yöntem polimer matrikse tutuklamaya benzer. Ancak enzim kaçışını önlemesi gibi bir üstünlüğü de vardır (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.3. Kopolimerizasyon yöntemi (Cao, 2005)

3. Taşıyıcıya Bağlama: Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzimlerin moleküler yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Ayrıca kullanılan taşıyıcının enzim tarafından parçalanmamasına, mikrobiyal üremeye izin vermemesine, pH ve çözügenlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir. Taşıyıcı olarak; cam, metaller ve silika jel gibi anorganik materyaller; selüloz, nişasta ve jelâtin gibi doğal polimerler ve naylon, poliakrilamid ve metakrilat gibi sentetik polimerler de kullanılabilir. Eğer kullanılacak olan taşıyıcı aktif değil ise uygun reaktifler kullanılarak taşıyıcı reaktif hale getirilerek immobilizasyonda kullanılır. Enzim ve taşıyıcı arasında gerçekleşecek olan reaksiyonun, oda sıcaklığı ve nötral pH gibi ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesine dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Adsorpsiyon, iyonik bağlama, metal bağlama (şelat), kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama (affinite) olarak beş gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi

Adsorpsiyon; enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO_3 , nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916; Klivanov, 1983). Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilir, bu şekilde kullanılan taşıyıcının aktifleştirilmesine gerek duyulmaz, ekonomik olarak avantajlıdır ve genellikle immobilizasyon işlemi sonunda enzim aktivitesini büyük ölçüde korur (Messing, 1976; Rexova-Benkova ve ark., 1982; Woodward, 1985). Her ne kadar yöntem basit gözükse de optimizasyon koşullarının belirlenmesi zordur. Eğer taşıyıcı ve enzim arasındaki non-kovalent etkileşim yeteri kadar büyük değilse desorpsiyon ile enzim ortama geçebilir ve böylelikle ürün kirlenmesine neden olur (Telefoncu, 1997).

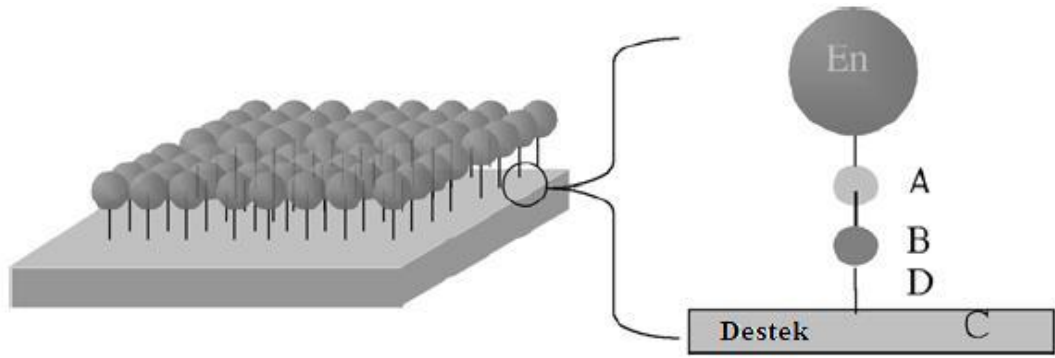
İyonik Bağlama; iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993). İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu basit bir yöntemdir. Bu yöntem enzimin desteğe hem kuvvetli bağlandığı hem de çok aktif olduğu şartları sağlamasından dolayı aynı anda bu şartları bulmak zordur (Bahulekar ve ark., 1991). İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif

merkezde herhangi bir değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzimin taşıyıcıdan ayrılması söz konusudur (Telefoncu, 1997).

Metal Bağlama (Şelat); bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve ark., 1983). Metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine (selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür. İmmobilizasyon işlemi metalin boş d orbitali ile enzim molekülündeki artık aminoasit grupları arasında gerçekleşir. Metal bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemi oldukça basit bir yöntem olup immobilizasyon işlemi sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin %30 ile %80 arasında koruduğu görülmektedir. Lakin, metalin taşıyıcı yüzeyinden uzaklaşması dolayısıyla immobilize enzimin operasyonel stabilitesinde değişken ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmeyi zorlaştırır (Porath, 1992; Brena ve ark., 1994; Kagedal, 1998).

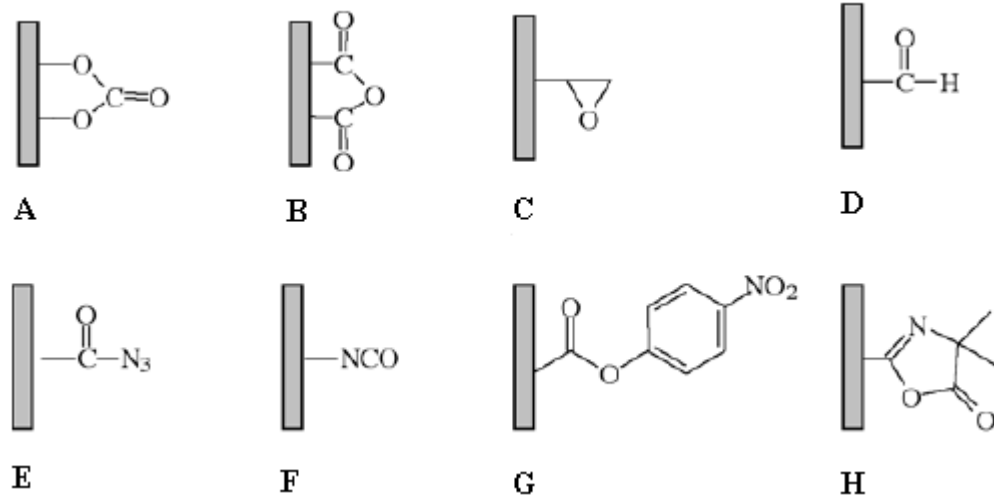
Kovalent Bağlama; enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Zaborsky, 1973). Kovalent bağlama yöntemi ile yapılan enzim immobilizasyonu kovalent bağın doğası gereği enzim molekülü ve destek arasındaki bağın kararlı olması ve bu yüzden enzimin destek yüzeyinden kolaylıkla ayrılmasının mümkün olmaması sebebiyle enzim immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Kovalent enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken önemli nokta, bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden olmaması ve bağlanma esnasında sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Guisan, 2006). Kovalent bağlama yöntemi genellikle çapraz bağlanmayla birlikte uygulanır. Böylece enzim ile destek arasında oluşmuş kovalent bağlar çapraz bağlanma sonucunda daha kararlı hale gelir. Bu amaçla ilk olarak bir bağ ajanı kullanılarak destek üzerindeki fonksiyonel gruplar aktif hale getirilir. İkinci olarak ise bu aktif hale gelen destekle enzimin birleştirilmesi ve immobilizasyon işleminin tamamlanması sağlanır. Aktivasyon işlemindeki amaç destek üzerindeki fonksiyonel grupların elektrofilik hale getirilmesi için yapılır. Daha sonra immobilizasyon reaksiyonunda, bu gruplar enzim yüzeyindeki belli amino asitlerin amino (NH_2)⁺

fonksiyonel gruplarıyla kovalent bağ oluşturur (Bickerstaff, 1997). Enzimin yüzeyinde yer alan aminoasit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 1.5’de gösterilmiştir (Cao, 2005).



Şekil 1.5. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu: (A) Aktif amino asit artığı; (B) desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol (Cao, 2005)

İnorganik ve organik yapıda birçok doğal ve yapay materyal kovalent immobilizasyonda destek materyali olarak kullanılabilir. Destek suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır. Bu tür desteklerin seçiminde enzim ile destek arasındaki bağın aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında desteğin enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Kullanılan desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin durumunu (örneğin, aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir (Cao, 2005). Destek yüzeyine kovalent bağlanmada kullanılan farklı aktif fonksiyonel gruplar vardır. Bunlar Şekil 1.6’da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi (A: Karbonat, B: Anhidrit, C: Epoksit, D: Aldehit, E: Açilazid, F: İzosiyanat, G: Karboksilli asit fenil ester, H: Lakton) (Yıldırım, 2010)

Kovalent bağlama yönteminin avantajlı ve dezavantajlı yönleri bulunmaktadır (Rao ve ark., 1998). Avantajlı yönlerini aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- ▼ Kovalent bağlamadaki bağlar çok sıkı olduğu için, immobilizasyonu yapılmış enzimin kullanımı esnasında, ortamda yüksek iyonik karakterli çözücü veya substrat bulunması durumunda dahi enzimler destekten sızmaz.
- ▼ Enzim, destek yüzeyindeki belirli bölgelere lokalize olduğundan dolayı enzim ile substratın karşılaşma ihtimali artar.
- ▼ Enzim molekülleri ile destek arasındaki güçlü etkileşimden dolayı enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenir.

Kovalent bağlama yönteminin dezavantajlı yönleri ise aşağıdaki gibi sıralanabilir;

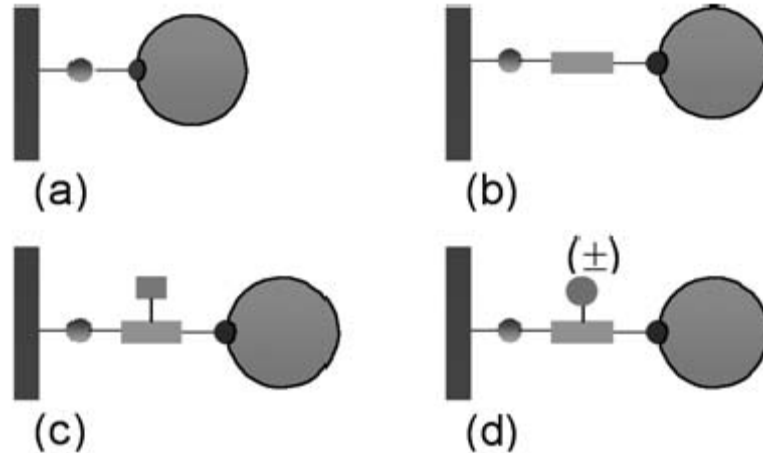
- ▼ Kısmi modifikasyondan dolayı enzim moleküllerinin aktif yapıları bozulmaya eğilim gösterir.
- ▼ Enzim molekülleri ile destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareket etmesini engelleyerek enzimin aktivitesinin düşmesine sebep olabilir.

- ▼ İmmobilizasyon için optimum koşulları bulmak zordur (Rao ve ark., 1998).

Kovalent immobilizasyonda kullanılacak inorganik desteğin yüzeyine daha fazla enzimin bağlanabilmesi için desteğin mümkün olan en küçük gözenek büyüklüğüne sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Weethall, 1976). Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmesi gerekir. İmmobilizasyon çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir. Buna sebep olan faktörler şu şekilde sıralanabilir;

- ▼ Sterik engeller,
- ▼ Desteğin çevresel etkileri (hidrofobik yüzeyler genellikle enzimin inaktivasyonuna neden olur),
- ▼ Matriksin özellikleri,
- ▼ Enzim molekülü ile destek arasında istenmeyen etkileşimler,
- ▼ Enzimin desteğe yanlış yönelmesi (aktif bölgesinden bağlanması),
- ▼ Uygun olmayan mikro çevre,
- ▼ Aşırı çoklu noktadan bağlanma,
- ▼ Enzim hareketliliğinin veya konformasyonel esnekliğin etkilenmesi.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında enzim ile destek arasına çeşitli ara kollar eklenerek enzim aktivitesinin artırılmasına yönelik teknikler araştırılmaktadır (Alptekin, 2009). Enzimin desteğe doğrudan immobilizasyonunda enzim hareketi sınırlı iken ara kol üzerinden immobilizasyonunda enzim daha serbest hareket edebilmektedir. Ara kolun immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi karmaşıktır. Bunun nedeni ara kol varlığında mikro çevredeki, enzim yönelmesindeki ve enzimin esnekliğindeki değişimlerdir. Uygun ara kol (uzunluk, hidrofiliklik, dallanmışlık veya doğrusallık v.b.) kullanımıyla immobilizasyon sonunda immobilize enzim aktivitesi yüksek olabilmektedir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu (Cao, 2005)

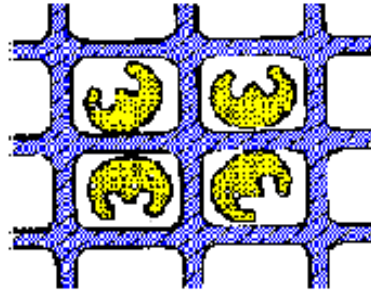
Biyospesifik Bağlama (Affinite); biyolojik sistemlerdeki gelişmiş biyospesifik etkileşme veya tanıma sistemleri kullanılarak yapılan immobilizasyon tekniğidir. Bir enzimin, antikor veya lektinler kullanılarak immobilizasyonu biyospesifik bir immobilizasyondur. Burada kullanılan lektinler belirli karbohidrat dizisine sahip enzimlere etkili bir şekilde bağlanabilir. Son zamanlarda monoklonal antikorlar kullanılarak da biyospesifik immobilizasyon yapılmaktadır (Telefoncu, 1997). Biyospesifik bağlama yönteminde en sık kullanılan sistem ise biyotinavidin sistemidir. Avidin, ayrışma katsayısı 10^{-15} M civarında olan spesifik iyon çifti etkileşimiyle dört adet biyotin ligandı bağlayabilen, tetramerik bir proteindir. Bu tip bir immobilizasyonda reaktif fonksiyonel gruba bağlı biyotin türevleri hem taşıyıcı yüzeye hem de proteine kovalent bağlanmıştır. Biyotinlenmiş taşıyıcı öncelikle avidin ile daha sonra da biyotinlenmiş enzim ile muamele edilir. Kapsamlı manipülasyonların kullanımını gerektirdiği ve maliyet yüksekliği nedeniyle bu yöntem sadece sulu sistemlerde, pahalı enzimlerin kullanıldığı durumlarda uygun olmaktadır (Öztürk, 2009).

1.2.1.1.(2). Tutuklama

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir ortamda durdurulmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matris içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı

geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemini diğer üç yöntemden ayıran en önemli özelliği bu teknikte enzim molekülünün diğer tekniklerde olduğu gibi herhangi bir taşıyıcıya kovalent veya non-kovalent olarak bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997). Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olarak üçe ayrılmaktadır.

Polimer Matrikse Tutuklama Yöntemi; bu yöntem, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde enzimin tutulması esasına dayanmaktadır (Cremonesi ve Angiuro, 1983). Bu yöntemin avantajlı ve dezavantajlı yönleri bulunmaktadır. Yöntemin avantajları; çok kolay uygulanabilir, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda enzime ihtiyaç duyulmasıdır. İmmobilizasyon işlemi sırasında nötral ve suda çözünmeyen taşıyıcılar kullanıldığından yüklü taşıyıcılara gerek duyulmamaktadır. Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun, deney koşullarına oldukça bağımlı olması ve immobilize enzimin sadece küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir. Diğer bir dezavantajı ise polimer sentezlenirken gözenek çapının hassas kontrolü çoğunlukla mümkün olmadığından kütle transferinin kısıtlanması tutuklanmış enzim için önemli bir problem teşkil etmektedir (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.8. Matrikste tutuklama yöntemi

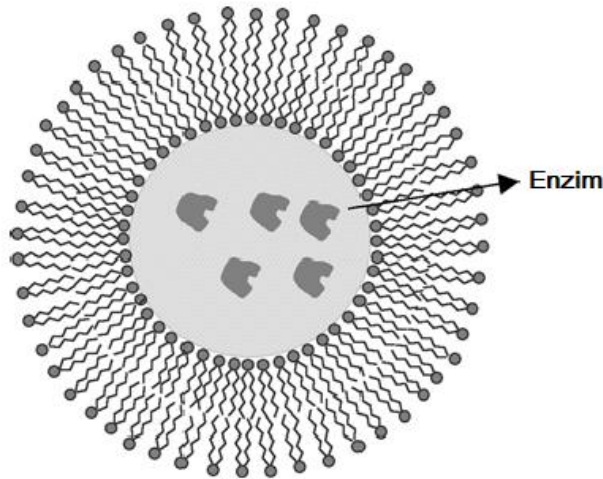
Mikrokapsülleme; bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat

moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).



Şekil 1.9. Mikrokapsülde tutuklama yöntemi

Lipozom Tekniği; bu yöntem, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır (Regen ve ark., 1984). Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça büyük bir kontak yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır (Şekil 1.10). Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim kaçma olasılığı bulunmaktadır (Luisi ve Magid, 1986).



Şekil 1.10. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005)

1.2.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir (Weethall, 1976). Enzimler çözünür formda kullanılmadan önce düşük veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilerek daha kullanışlı ve kararlı hale getirilebilirler. Örneğin bazı enzimlerin düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle açılmesi enzimin kararlılığını artırmaktadır (Tükel ve Alptekin, 2007).

Enzimin membran içerisinde immobilizasyonunda ise enzimin kaçıışı ve mikrobiyal kontaminasyon söz konusu değildir. Membranlar kolaylıkla rejene edilip kullanılabilir. Birden fazla enzimin bir arada immobilize edilmesi mümkündür. Ürün ve substratlar, membran sayesinde seçimli olarak kontrol edilebilir. Kütle transferinde önemli bir engel oluşu ve membranda zamanla tabakalaşma gözlenmesi bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir. (Telefoncu, 1997).

Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır (Yıldırım, 2010).

1.2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin immobilizasyonu için çok sayıda teknikler geliştirilmesine karşın, enzimlerin yapılarının ve kimyasal özelliklerinin birbirinden çok farklı olması,

oluşan ürünlerin ve kullanılan substratların farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle enzimler veya uygulamaları için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 1.1’de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, 1986; Telefoncu, 1997)

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	İçinde Tutma
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

1.3. Üreaz

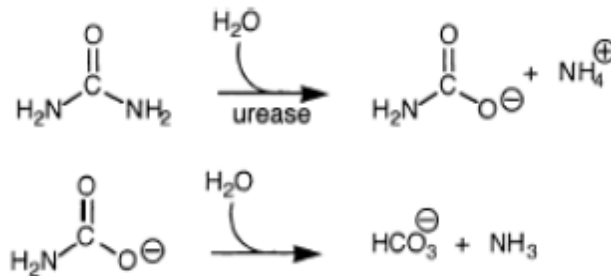
1926 yılında James B. Sumner tarafından fasulye (*Canavalia ensiformis*) tohumundan ilk defa kristalleştirilen enzim olarak enzimolojide önemli bir yere

sahiptir (Balasubramanian ve Ponnuraj, 2010). Enzimlerin en önemli özellikleri, substratı aktive etmek ve reaksiyona su sağlamak için aktif bölgelerinde metal iyonları bulundurmalarıdır. Bu grup içindeki diğer dinükleer metalloenzimler arasında üreazlar, aktif bölgelerinde nikel iyonu bulundurmaları açısından tektirler (Krajewska ve ark., 2001). Fasulye (*Canavalia ensiformis*) kaynaklı üreaz enzimi, 90.770 kDa molekül ağırlığına sahip birbirinin aynı alt birimleri içeren bir heksamerdir (Takishima ve ark., 1988). Toplam molekül ağırlığı 590.000 kDa'dur.

Uluslararası Biyokimya Birliği (U.B. International Union Biochemistry) 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı revizyonla enzimi E.C. 3.5.1.5. olarak kodlamıştır. Bu sıralamaya göre; 3: Tip no: Enzimin bir hidrolaz olduğunu 5: Grup no: Enzimin C-N bağlarına etkili olan amidaz grubuna dahil olduğunu 1: Alt grup no: Enzimin bir açilamidaz olduğunu 5: Sistemik ad: Enzimin sistemik adının “üre aminohidrolaz” olduğunu gösterir (Kara, 2006). Üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksite dönüşmesini sağlayan bir enzimdir (Krajewska ve ark., 2001).



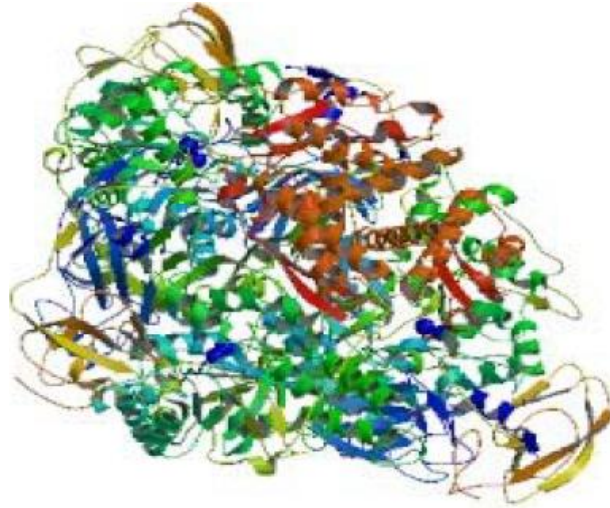
Normalde üre hidrolizi yavaş gerçekleşen bir reaksiyondur. Katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyonda meydana gelen ürünler amonyak ve siyanürik asittir. Katalizör varlığında gerçekleşen reaksiyonlarda ise oluşan ürünler amonyak ve karbonik asittir. Son basamakta karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Blakeley ve ark., 1984). Üreazın kataliz reaksiyonu şekil 1.12'de gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Üreazın kataliz reaksiyonu (Ciurci ve ark., 1999)

1.3.1. Üreaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

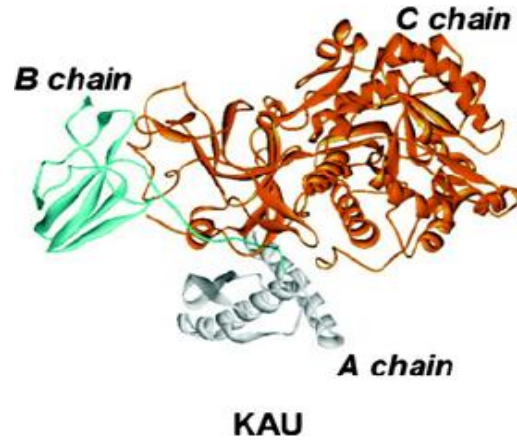
Sumner tarafından saf kristal enzim olarak elde edildikten ve bu kristallerin protein yapısında olduğu anlaşıldıktan 50 yıl sonra Dixon tarafından ilk nikel metaloenzimi olduğu bildirilmiştir (Kayastha ve Das, 1999). Enzim α , β , γ olarak adlandırılan üç alt birimin oluşturduğu bir heteropolimerdir ve aktif merkezler α alt biriminde bulunur. Enzimin aktif merkezinde iki nikel iyonu bulunur ve bu nikel iyonlarının enzimin aktivasyonunda çok önemli rolü vardır. Şekildeki yeşil, mavi, kırmızı kısımlar sırasıyla α , β , γ alt birimlerini göstermektedir. Aktif merkezde Ni iyonları ise pembe ile gösterilmiştir.



Şekil 1.12. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı

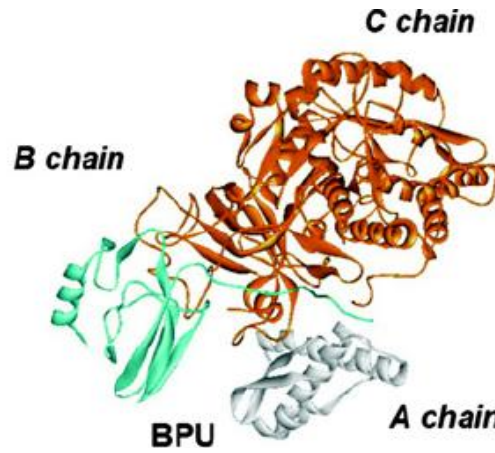
Üreaz enzimi içeren kaynaklardan bazıları aşağıdaki gibidir;

- 1- *Klebsiella aerogenes*: Geviş getiren hayvanların sindirim sisteminde yaşayan ve içerdiği üreaz (KAU) miktarı azot metabolizmasında önemli rol oynayan bir bakteridir.



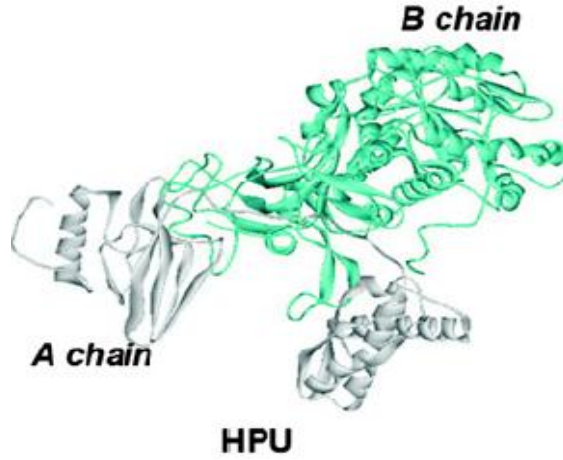
Şekil 1.13. *Klebsiella aerogenes* bakterisindeki üreaz enzimi (Follmer, 2008)

- 2- *Bacillus pasteurii*: Toprakta, sulara, pis sulara yaşar. Ziraat için çok önemlidir. İçerdiği üreaz (BPU) miktarı bitkilerin toprağını azotça zenginleştirir.



Şekil 1.14. *Bacillus pasteurii* bakterisindeki üreaz enzimi (Follmer, 2008)

- 3- *Canavalia ensiformis*: Bir tür fasulyedir. Bulunduğu bitkide topraktan azot emiliminin yeterli olmadığı durumlarda azot deposu olarak kullanılan argininin açığa çıkardığı üreyi, içerdiği üreaz (JBU) miktarı amonyağa çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasına yardım eder.
- 4- *Helicobacter pylori*: İnsanlarda mide rahatsızlığına sebep olan bir bakteridir. Midenin asidik yapısını etkileyerek ülser gibi birçok rahatsızlıklara sebep olur (Stefano, 2000).



Şekil 1.15. *Helicobacter pylori* bakterisindeki üreaz enzimi (Follmer, 2008)

1.3.2. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Bu enzimin bağlı olarak ucuzluğu, dayanıklılığı ve kolay izlenebilmesinin yanı sıra kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Baysal, 2000). Biyolojik sıvılarda ürenin miktarının hesaplanmasında: Üre vücudumuzda metabolik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ve böbreklerden idrar yoluyla sürekli atılan en önemli toksik maddelerden biridir (Akgöl ve ark., 2002), bu sebepten dolayı yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında, immobilize üreaz sistemleri diagnostik amaçlı biyosensörlerde (Petersson, 1988), ürenin kandan uzaklaştırılmasında (Yang ve Lin, 2001) ya da hemodiyaliz işleminde, sentetik diyalizat çözeltisinin rejenere edilmesinde kullanılmaktadır (Krajewska ve ark., 1989).

Üreazın farklı alanlardaki kullanımlarını şu şekilde sıralayabiliriz; atık sulardaki ürenin temizlenmesinde, gıda endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılır. Bunun yanı sıra, gübre ve atık sularında bulunan ürenin dönüştürülmesinde kullanılmaktadır (George ve ark., 1997; Di Martino ve ark., 2003; Fahmy ve ark., 1998).

1.4. Nanopartiküller

Kimya, atomların ve moleküllerin düzenlenmesi üzerine kurulmuş bir bilim dalıdır ve nano yapıları da içeren materyallerin sentezinde oldukça uzun bir tarihe sahiptir. Kolloidler ve katalizörler bunlara örnek olarak gösterilebilir. Nano bilimin bugünkü popülaritesi, kullanılan birçok eski (kullanılmayan) kimyasal metodun yeniden kullanılmasına olanak sağlamış ve aynı zamanda nano yapıları materyallerin sentezi için yeni ve modifiye kimyasal metodların devamlı olarak gelişmesine yol açmıştır. Nano yapıları materyallerin kimyasal sentezlerinin ve proseslerinin kapsamı çok geniş olup optik, elektronik, magnetik, biyolojik, katalitik ve biyomedikal materyaller gibi birçok uygulama alanına sahiptir (Koch, 2000).

Nanometre boyutlarındaki inorganik bileşikler diğer maddelerden daha farklıdır, çünkü elektron tutucu etki gibi yapısal boyutlarına özgül özelliklere sahiptirler. Bu bileşikler “nanopartikül” olarak adlandırılırlar (Portakal, 2008). Genelde tanecik büyüklüğü 1–100 nm arasındadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bu malzemelerin özelliklerinin çoğunlukla tanecik boyutuna bağlı olduğunu göstermiştir (Klabunde ve ark., 1996). Dahası, nano malzemelerin yapısı, fiziksel ve kimyasal özelliklerde önemli değişimlere sebep olmaktadır. Örneğin, magnetik malzemelerdeki zorlayıcı kuvvet değiştirilebilir, yüzeyin tepkimeye girme kabiliyeti ve katalitik yeteneği artırılabilir ve mekanik dayanıklılık beş veya daha fazla kat artırılabilir (Li ve ark., 2006). Yapısal unsurlar arasında, nano taneciğin yüzey etkileri oldukça önemli bir yere sahiptir. Örneğin, nano boyutlara getirilen kristalitlerin yüzey kimyası, mikro boyutlu taneciklerden farklılık gösterir. Ayrıca bunlar benzersiz bir tepkime kimyasına sahiptirler. Bunun yanı sıra, geniş özgül yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle nano tanecikler, makro boyutta yüzeyler gibi düşünülebilir. Bu da onların hacim özelliklerini etkiler. 3 nm civarındaki bazı küresel nano taneciklerin, atom ya da iyonlarının yaklaşık %50’si yüzeydedir. Bu sayede, yüzey özellikleri, hacim özelliklerini etkileyebilir ve yakın-stokiyometrik tepkimeler oluşabilir (Klabunde ve ark., 1996).

Çoğunlukla malzemelerin yüzeylerinde bozulmalar meydana gelir. Bunun giderilmesi için yüzey yapısının optimizasyonu, nano taneciğin tüm davranışlarını

etkin bir şekilde değiştirebilir. Enzim taşıyıcı materyallerin boyutundaki küçülmeler genellikle immobilize enzimin etkinliğini artırır. Yüzeye bağlanmalarda, küçük partiküller enzimin materyale tutunabilmesi için daha geniş yüzey alanına sahiptirler ve bu sayede partikülün birim kütlesi başına bağlanan enzim miktarı artar (Jia ve ark., 2003).

1.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Son dönemde gelişmekte olan nanoteknolojinin bir çok uygulama alanı mevcuttur. Bunlar arasında; küçük, hızlı, akıllı ve çoklu analiz yapabilen sensörler; küçük, yüksek yoğunluklu ve hızlı özelliklere sahip elektronikler ve optikler; daha iyi kontrol ve daha iyi salınım yapabilen terapi; yüksek dayanıklılık, kararlılık ve optiklik özelliklerinden dolayı kompozit ve film yapımı; elektrik, yüksek yoğunluk depolaması gibi özelliklerinden dolayı enerji; yumuşak iyileştirme filmleri, oto-lens gibi sistemlerde kullanılabilen akıllı sistemler; istenen ürün üzerinde çalışan nano fabrikalar örnek olarak gösterilebilir.

Nanoteknolojiye sahip uygulama alanlarının alt dallarını dört ana gruba ayırabiliriz;

- ▼ Nanomateryaller,
- ▼ Nanoelektronikler,
- ▼ Nanobiyoteknoloji,
- ▼ Nanomakinalar (Öztürk, 2006).

1.6. Enzim İmmobilizasyonda Kullanılan Magnetik Destek Materyalleri

Son on yılda, immobilize enzimler çoğunlukla gıda, ilaç ve diğer biyolojik olarak önemli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla magnetik özelliğe sahip parçacıkların birkaç çeşit farklı işlevsel grupları ile çeşitli polimerik gruplar üretilmektedir. Polivinilbutiral, polietilen glikol, polivinil alkol, poliakrilamid, polimetilmetakrilat ve aljinat değişik uygulamalarda kullanılan tipik polimer kökenli

taşıyıcılara örnek olarak verilebilir (Wiseman, 1995; Boy ve ark., 1999). Bu destek materyalleri, endüstriyel ve biyolojik ayırma işlemlerinde, hücre izolasyonu ve enzim immobilizasyonunda, enzim saflaştırılmasında, çeşitli kromatografi yöntemlerinde, ilaç hedefleme ve kontrollü salım sistemlerinde, immünolojik test ve tanı kitlerinde ve moleküler biyoloji alanındaki araştırmalarda kullanılan geniş bir yelpazeye sahiptir. Kalıcı magnetik alana sahip olsa bile; bu parçacıkları bir araya toplamak için magnetik alana sahip bir parçacık yeterli olabilir. Bu sorunu çözmek için, süper paramagnetik parçacıklar geliştirilmesi gerekmektedir. Fe_3O_4 süper paramagnetik maddelerden biridir ve yaygın olarak biyoteknolojik ve biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır (Bayramoğlu ve ark., 2007).

Bu çalışmada magnetik nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu, sentezlenen magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonu için magnetik nanopartiküllerde fazla çalışılmamış ara kolların bağlanarak aktifleştirilmesi, aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllerin kovalent olarak immobilize edilmesi, serbest ve immobilize üreazın, kinetik özellikleri (K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m), termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları ve tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Krajewska ve Leszko, (1990), üreaz enzimini yeni bir akrilik (Amino butil akrilat-etilen metakrilat kopolimeri) enzim taşıyıcısı üzerine kovalent olarak immobilize etmişler ve serbest ve immobilize üreaz enzimlerinin özelliklerini belirleyerek birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak immobilize enzimlerin orijinal aktivitelerinin %56'sını koruduğunu bulmuşlardır. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hızın (V_{max}) serbest enzim için daha düşük iken, immobilize üreaz için daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Immobilize enzimin pH değişikliklerine karşı aktivitesini önemli ölçüde koruduğunu, immobilize üreazın çok iyi depolama kararlılığına ve tekrar kullanımına sahip olduğunu, 70°C'de immobilize enzimin aktivitesini kaybettiğini rapor etmişlerdir.

Pozniak ve ark., (1995), üreazı modifiye edilmiş bir polisülfon zarı üzerine immobilize etmişler, serbest enzim ile immobilize üreazın termal stabiliteleri karşılaştırdıklarında immobilize üreazın stabilitesinin arttığını ve sonuç olarak termal stabilitedeki artışın PAA / PVI ağları tarafından sağlanan koruma ile denatürasyonu engellediğini tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize üreaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisini değişen pH aralıklarında (4,0-9,0) incelemişler, bunun sonucunda immobilize enzim pH 8,0'de maksimum aktivite gösterirken serbest üreazın pH 7,0'de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Serbest ve immobilize üreaz pH stabilitesini belirlemek için farklı tamponlarda (pH 4,0-9,0) hazırlanmış çözeltilerde 2 saat inkübasyona tabi tutulmuş ve immobilize üreazın serbest enzime göre yüksek pH seviyelerinde daha çok kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Immobilize ve serbest üreazın depolama kararlılığını belirlemek için 4°C'de muhafaza edilen örneklerde yapılan çalışmalarda immobilize üreazın 16 gün sonra başlangıç aktivitesinin %98'ini, 25°C'de muhafaza edilen örneklerin ise 16 gün sonra başlangıç aktivitesinin %82'sini koruduğunu saptamışlardır.

Godjevargova ve Dimov, (1997), üreaz enzimini akrilonitril (AN) kopolimer (toz) birime 2-dimetilaminoetilmetakrilat (DMAEM) ve diakrilamido-2-metilpropansülfonikası (AMPSA) ile modifiye edilerek hazırlanan membranlar üzerine immobilize etmişler ve immobilize üreaz enziminin (bağlı protein ve relativ

aktivite miktarını) sıcaklık, optimum pH ve termal stabilite gibi temel özelliklerini incelemişlerdir. Serbest enzim için optimum pH 7 olarak bulunmuştur. Serbest enzimin optimum pH'sı ile immobilize edilmiş üreazların optimum pH'ları karşılaştırıldığında AMPSA ile modifiye membranlara immobilize enzimin pH'sının alkali değerlere (pH 7 den - pH 7,5'e) doğru, DMAEM ile modifiye membranlara immobilize üreazın optimum pH'sının ise tam tersi yönde bir kayma gösterdiğini bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize üreazın optimum sıcaklığına bakmışlar ve serbest üreaz için optimum sıcaklığı 30°C, AMPSA ile modifiye membranlara immobilize edilmiş üreazın optimum sıcaklığını ise 45°C olarak tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize üreazın termal kararlılığını belirlemek için 50°C ve 70°C'de inkübe etmişler ve 2 saat sonunda aktivitelerini belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize üreazın 50°C'deki 2 saatlik inkübasyonları sonucunda aktivitelerinin en az %80'nini koruduklarını, 70°C'deki serbest üreazda aktivite gözlemlenmezken, AMPSA ve DMAEM ile modifiye edilmiş AN kopolimerlerinin aktivitelerinde sırasıyla %30 ve %15 düşüş olduğunu rapor etmişlerdir.

Marzadori ve ark., (1998), jack bean üreazını hidroksiapatit üzerine adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. Immobilize olan üreazın optimum pH'sının 8, serbest enzimin optimum pH'sının ise 7 olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan kinetik analizler sonucunda; serbest enzim için $V_{max} = 230,7 \text{ U mg}^{-1}$, $K_m = 7,45 \text{ mM}$, immobilize enzim için $V_{max} = 152,9 \text{ U mg}^{-1}$, $K_m = 6,89 \text{ mM}$ olduğunu bildirmişlerdir. Enzimlerin depolanma kabiliyetlerine bakmışlar ve immobilize üreaz aktivitesini %60 oranında korur iken 4 gün sonra serbest enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca pronaz varlığında yapılan çalışmalarda ise immobilize üreaz aktivitesini %50 oranında korur iken 3 gün sonra serbest enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir.

Chellapandian ve Krishnan, (1998), üreaz enzimini kitosan-poli(glisidil metakrilat) (GMA) desteğine epoksi gruplar üzerinden kovalent olarak bağlayarak immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Serbest ve immobilize üreazın optimum pH'ının her ikisi içinde değişmediğini (7,5), serbest ve immobilize üreazın optimum sıcaklıklarının ise sırasıyla 60°C ve 70°C olduğunu belirlemişlerdir. Serbest enzim ile immobilize enzimin termal kararlılıklarını karşılaştırmışlar ve bunun sonucunda

immobilize enzimin termal karalılığının artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimlerin depolanma kabiliyetlerini 4°C ve 25°C’de incelemişler, 60 gün sonra immobilize ve serbest üreazın aktivitesini sırasıyla %73 ve %58,05 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan kinetik analizler sonucunda; serbest enzimin K_m değerinin 3,23 mM ve immobilize enzimin K_m değerinin ise 6,7 mM olduğunu belirlemişlerdir.

Rejikumar ve Devi, (1998), üreaz enzimini poly(vinil alkol) üzerine çapraz bağlayarak immobilize etmişler ve immobilize üreaz ile serbest enzimi karşılaştırmışlardır. Ayrıca immobilize üreazın temel özelliklerini (pH_{opt} , T_{opt} , ve depolama stabilitesini) belirlemişlerdir. Immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 8-9’nın olduğunu, immobilize üreazın yüksek pH değerlerinde daha büyük bir kararlılık sergilediğini tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize üreaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini 30°C ile 70°C arasında değişen sıcaklık aralıklarında incelemişler ve serbest ve immobilize enzim aktivitesinde düşük sıcaklıklarda anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Üreaz (PVA-F) sistemi 70°C’de termal olarak kararlı iken serbest enzimin 50°C’de çok hızlı bir şekilde aktivite kaybettiğini tespit etmişlerdir. Yapılan kinetik analizler sonucunda; serbest enzim için $V_{max} = 3,4 \times 10^{-5} \text{ mM min}^{-1}$, $K_m = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mM}$, immobilize enzim için $V_{max} = 2,43 \times 10^{-5} \text{ mM min}^{-1}$, $K_m = 7,1 \times 10^{-4} \text{ mM}$ olduğunu bildirmişlerdir. Enzimlerin depolanma kabiliyetlerine bakmışlar, immobilize üreaz aktivitesini 45 gün sonra %50 oranında korur iken serbest enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir.

El-Sherif ve ark., (2001), naylon membranlar üzerine kimyasal aşılama yöntemi ile üreaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişler. Optimum pH’ın belirlenmesinde enzim aktivitesinin %95 olduğu fosfat tamponunu kullanmışlardır. Immobilize enzimin optimum pH’ı 7,5 ile 5,7 (Sitrat tamponunda) olduğunu serbest enzimin optimum pH’ının ise 8,0 ile 6,5 (Sitrat tamponunda) olduğunu belirlemişlerdir. Serbest enzimin optimum sıcaklığının 70°C olduğunu immobilize enzim için optimum sıcaklığın 75°C olduğunu tespit etmişlerdir. Aktivasyon enerjisini serbest enzim için $5,90 \text{ kcal mol}^{-1}$, immobilize enzimi için ise $9,10 \text{ kcal mol}^{-1}$ olduğunu hesaplamışlardır. Yapılan kinetik analizler sonucunda;

serbest enzim için $V_{\max} = 11,96 \text{ mmol min}^{-1}$, $K_m = 19,5 \text{ mM}$, immobilize enzim için $V_{\max} = 19,23 \text{ mmol min}^{-1}$, $K_m = 50,00 \text{ mM}$ olduğunu bildirmişlerdir.

Lin ve Yang, (2003), poliakrilonitril boş liflerin yüzeyine üreaz enzimini hidroliz ve kovalent olarak glutaraldehit ile immobilize etmişlerdir. Çeşitli pH'larda saklanan enzimlerin bağlı aktivitelerini karşılaştırmışlar ve immobilize üreazın bağlı aktivitesinin serbest üreazdan daha yüksek aktiviteyi sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Immobilize üreazın pH stabilitesi serbest enzime göre daha yüksek bulunmuştur. Tekrar kullanım kapasitesinin belirlenmesinde 15. kez yeniden kullanılan immobilize üreazın aktivitesini %86 olarak koruduğunu belirlemişlerdir.

Godjevargova ve Gabrovska, (2003), poli (akrilonitril-metil-sodyum vinilsülfonat) membranları, yedi farklı kimyasal modifikasyona tabi tutmuşlar, oluşan yeni modifiye membranların miktarlarını belirlemişlerdir. Üreazı modifiye membranların üzerine kovalent bağlayarak immobilize etmişler ve bağlanan protein miktarı ile immobilize üreazın relativ aktivite miktarını ölçmüşlerdir. En yüksek aktiviteyi hidroksilamonyum sülfat (%68) ve hidrazinium sülfat (%67) ile modifiye membranlara bağlı immobilize üreazlarda bulmuşlardır ayrıca en yüksek bağlanma oranı hidroksilamonyum sülfat ve hidrazinium sülfat ile modifiye membranların üzerine immobilize olduğunu belirlemişlerdir. Serbest üreazın optimum pH değerini 5,8 olarak tespit etmişlerdir. Immobilize negatif yüklü membranlar için optimum pH düşük, pozitif yüklü membranlar için optimum pH'nın yüksek değerlere doğru kaydığını tespit etmişlerdir. Farklı modifiye membranlar üzerine immobilize edilen enzimin büyük bir kısmı membranlar üzerinde sabit kalmıştır. Termal kararlığın ölçülmesi için serbest enzim ve immobilize enzimler 70°C 'de en az 4 saat inkübe edilmiş ve serbest enzim tamamen inaktif iken immobilize enzim aktivitesini %20 oranında kaybettiğini tespit etmişlerdir. Serbest üreaz için K_m ve $V_{\max}$ değerleri sırasıyla $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ve $45,4 \times 10^{-3} \text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir. Immobilize enzimlerin tepkime hızlarının ise negatif yüklü membranlarda daha fazla olduğunu not etmişlerdir ve bu modifiye membranlar hidroksilamonyum sülfat ve hidrazinium sülfat ile NaOH+EDA (Etilendiamin), NaOH+GA (Glutaraldehit)+EDA ve sülfokarboksilik anyonlar içeren membranlar olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca NaOH+EDA ve H_2O_2 ile modifiye edilmiş membranda K_m

değerinin serbest enzimin K_m ($3,2 \times 10^{-3}$ mol mg^{-1} min^{-1}) değerine eşit olduğunu bulmuşlardır.

Bayramoğlu ve ark., (2003). poli(hidroksietilmetakrilat-ko-glisidil metakrilat) (poli(HEMA-GMA-1-3)) film kullanmışlardır. Epoksi grupları içeren poli(HEMA-GMA-1-3) film, 2- hidroksietil metakrilat ve glisidil metakrilat (GMA)'nın UV başlatıcılı fotopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. 1,6-diaminohekzan uzatıcı kol olarak epoksi gruplarına takılmış ve üreaz kovalent bağlanmayla immobilize etmişlerdir. Aktivite veriminin poli(HEMA-GMA-2) filmler üzerine ara kollarla bağlı immobilize üreaz için %53 ve poli(HEMA-GMA-2) filmler üzerine immobilize enzim için %36 olduğunu tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize üreazın optimum pH'larının sırasıyla pH 7 ve pH 6,5 olduğunu bulmuşlardır. Serbest enzim ile her iki immobilize üreaz enzimi karşılaştırıldığında sıcaklık inaktivasyonu direncine sahiptir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 45°C , immobilize enzimler için 50°C olarak tespit edilmiştir. İmmobilize üreaz preparatlar ve serbest enzim için kinetik parametreleri belirlemişlerdir. Bunun sonucunda immobilize enzimlerin K_m (32 ve 24 mM) değerlerinin önemli ölçüde serbest enzime (18 mM) göre daha büyük olduğunu bulmuşlardır. $V_{\max}$ değerlerinin ise her iki immobilize enzim için 26,6 U mg^{-1} protein ve 33,4 U mg^{-1} protein, serbest enzimin ise 59,7 U mg^{-1} protein olarak belirlemişler ve immobilize enzimlerin $V_{\max}$ değerlerinin serbest enzime göre daha küçük olduğunu tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimlerin termal karalılıkları incelenmiş ve bunun için 55°C 'de 120 dakika inkübasyon süresi sonucunda aktivitelerinin %24 ve %77'sini koruduğunu, 65°C 'de 120 dakika sonunda ise aktivitelerinin %13 ve %48'ni koruduğunu tespit etmişlerdir. İmmobilize üreazın operasyonel inaktivasyon hız sabitini (k_{opi}) $1,51 \times 10^{-5}$ min^{-1} bulmuşlardır.

Di Martino ve ark. (2003), Tarımsal atık suların arıtımı göz önünde bulundurulduğunda, kirlenmiş üre, katalitik ve hidrofobik membran sikloheksil metakrilat (CHMA) ile aşılınmış bir naylon kağıda üreaz immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bunun için hekzametilendiamin (HMDA) ve glutaraldehiti (GA) sırasıyla boşluk ve çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlardır. İmmobilize üreazın optimum pH, optimum sıcaklık ve K_m değerlerini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda immobilize üreazın optimum pH'sının serbest üreaza göre daha fazla

asidik değerlere kaydığını, optimum sıcaklığının daha yüksek olduğunu, daha yüksek K_m değerlerine sahip olduğunu tespit etmişler ve ürenin immobilize üreaza karşı afinitesinde belirgin bir kayıp olduğunu rapor etmişlerdir. İzotermal olmayan biyoreaktör teknolojisiyle sulu çözeltilerdeki üre konsantrasyonunda azalma gösterdiğini doğrulamışlardır.

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

Polat, G., (2007), sodyum aljinat ve asetil sodyum aljinatın glisidil metakrilat (GMA) ile aşılmasını benzofenon ile aktivasyon sonrası GMA ile aşılama şeklinde iki adımlı olarak gerçekleştirmiş ve optimum koşullarda karboksil üzerinden üreaz, epoksi üzerinden alanin dehidrogenaz immobilizasyonunu yapmıştır. Çalışmada çift enzim sisteminin üreyi alanine dönüştürme yeteneğini batch tipi reaktör çalışmasıyla incelemiştir. Aşı polimerinde enzim immobilizasyonunu 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ile aktivasyon yoluyla karboksil grubu üzerinden ve aşı polimerinde mevcut epoksi grupları üzerinden immobilizasyon olarak iki farklı şekilde yapmıştır. 1/10 EDC/COOH oranı kullanılarak aktive edilmiş karboksil (COOH) grubu üzerinden immobilizasyonda pH 5,0'de 100 mg sodyum aljinat aşı polimerinin optimum 9 mg üreaz ile immobilizasyonu sonucu 6,77 U aktivitede, 100 mg asetil sodyum aljinat aşı polimerinin optimum 12 mg üreaz ile immobilizasyonu sonucu 5,95 U aktivitede immobilize ürünler elde etmiştir. Epoksi grubu üzerinden üreaz immobilizasyonunda 100 mg sodyum aljinat aşı polimerinin optimum 12 mg üreaz ile 10,88 U, 100 mg asetil sodyum aljinat aşı polimerinin optimum 6 mg üreaz ile 8,17 U aktiviteye sahip immobilize ürünler oluşturduğunu

bulmuştur. Epoksi grubu üzerinden AlaDH immobilizasyonu çeşitli tamponlarda çalışılmış, 50 mg aş polimerinde optimum koşullarda yapılan immobilizasyon sonucu 3,39 U/3,25 U üreaz-alaDH aktivitesine sahip çift enzim sistemini elde etmiştir. 3,39 U/3,25 U üreaz-alaDH aktivitesine sahip çift enzim sisteminin üreyi alanine dönüştürme yeteneğinin incelenmesi amacıyla batch tipi reaktör tasarımı yapmış ve 60 dakikalık reaksiyon süresi sonucunda NADH derişimindeki değışimi dikkate almış ve sistemin %42,13 ile dönüşüm sağladığını saptamıştır.

Gabrovska ve ark., (2007), üreaz enzimini poli(akrilonitril) kitosan membran parçacıklarının üzerine immobilize etmişler ve Poli(akrilonitril) (PAN) kitosanının üreaz enziminin immobilizasyonu için uygun bir destek materyali olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca immobilize üreazın temel özelliklerini (pH_{opt} , $pH_{stabilite}$, T_{opt} , $T_{stabilite}$, ısı inaktivasyonu ve depolama stabilitesini) belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, poli(akrilonitril) kitosan bileşik membranlarının enzim hareketsizliği için uygun olduğunu göstermiştir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH'sını belirlemek için uygun tamponlar ilave edilerek farklı pH değerlerinde (5,2-6,8) reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bileşik membranlar üzerinde serbest ve immobilize enzim için maksimum aktiviteleri pH 5,8 de gözlemlenmiştir. Fakat immobilize üreaz düşük ve yüksek pH değerlerinde serbest enzimden daha yüksek bağıl aktivite göstermiştir. Bu immobilize üreazın serbest üreaza göre pH değışikliklerine daha az duyarlı olduğunu göstermiştir. İmmobilize üreaz ile serbest ve PAN / kitosan bileşik membran arasında pH stabilitesi 30°C'de, farklı tampon derişimleri (pH 5-6,8) içinde 20 dakika inkübe edilerek tespit edilmiş, bunun sonucunda immobilize üreaz ile serbest enzim karşılaştırıldığında, düşük ve yüksek pH değerlerindeki immobilize üreazın aktivite kararlılığını önemli oranda koruduğunu göstermişlerdir. İmmobilize üreazın optimum sıcaklığı 30°C iken serbest üreazın optimum sıcaklığını 28°C olarak bildirmişlerdir. İmmobilize ve serbest üreazın termal inaktivasyonunu belirlemek için 70°C'de çalışmışlar, bunun sonucunda immobilize enzimin büyük bir kısmının 240. dakika sonunda enzim aktivitesinin %63'ünü kaybettiğini ve serbest üreazın ise tamamen inaktive olduğunu tespit etmişlerdir. İmmobilize ve serbest üreazın depolama kararlılığını belirlemek için 4°C'de muhafaza edilen örneklerde yapılan çalışmalarda immobilize üreazın 60 gün sonra başlangıç aktivitesinin %78'ni

koruduğunu ve serbest üreazın ise 25 gün sonra tamamen inaktive olduğunu saptamışlardır.

Mulagalapalli ve ark., (2007), agar tabletler üzerine güvercin bezelyesi (*Cajanus cajan*) üreazını immobilize etmişlerdir. %5 agar (w/v) destek üzerine yapılan immobilizasyonda 0,019 mg protein/agar tablet bağlanmış ve %51,7 arasında bir optimum immobilizasyon saptamışlardır. Çözünür ve immobilize üreazın optimum pH'ını 7,3 ve 7,5, optimum sıcaklığını 30°C ve 60°C olarak belirlemişler ve immobilizasyon sonucu termal stabilitenin iyileştiğini bildirmişlerdir. Immobilizasyon sonrası K_m değerinin 3,23 mM' dan 5,07 mM' a yükseldiğini, çözünür ve immobilize üreazın yarılanma ömrünün (4°C, pH 7,'de) sırasıyla 21 ve 53 gün olduğunu bulmuşlardır.

Alsoy ve ark., (2008), yaptıkları çalışmada üreaz enzimini polietilenimin (PEI) ve kitosan (CHI) ile modifiye edilmiş poliakrilonitril (PAN) membranları üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. PEI ve CHI ile modifikasyon PAN membranı üzerine adsorbe olan üreaz miktarını etkilemezken, aktiviteler sırayla 2 ve 1,5 kat artış göstermiştir. Membranların üreye karşı gösterdikleri kinetik performans aşağıdaki şekildedir: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAN membranları üzerine üreaz adsorpsiyonu sonucu membranların hidrolik geçirgenliklerinin önemli oranda değişmediğini, üreaz immobilizasyonu için en iyi destek malzemesinin PAN+PEI+CHI membranı olduğunu bildirmişlerdir.

Baran Teke, A., (2008), farklı yöntemler kullanarak üreaz ve Üreaz/AlaDH enzim çiftinin immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Üreaz enzimini, glisidil metakrilat (GMA) aşılannmış naylon-6-membrana, kalsiyum-aljinat boncuklarına ve poli-L-lizin (PLL) kaplı kalsiyum-aljinat boncuklarına ve ayrıca Üreaz/AlaDH enzimini ise PLL kaplı kalsiyum-aljinat boncuklarına immobilize etmiştir. Çalışmada immobilize ve serbest enzimlerin aktivitesine bazı parametrelerin (inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu) etkisi incelenerek kararlılık testleri (termal, pH, depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik), seçilen immobilizasyon metodu ile uygun reaktör tasarımı yapılmıştır. Optimum pH değeri serbest enzim için 7,0 bulunurken aljinat boncuklara immobilize üreaz için 6,0, optimum sıcaklık değeri ise

serbest enzim için 37°C, immobilize enzim için 40°C olarak bulunmuştur. Kinetik sabitler, serbest enzim için $K_m = 0,18$ mM, $V_{max} = 121,9$ U/mg-protein bulunurken immobilize enzim için $K_m = 2,18$ mM, $V_{max} = 33,3$ U/mg-protein olarak saptanmıştır. Üreaz içeren aljinat boncuklar katyonik polimerik membran olan PLL ile kaplanmış ve optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinde bir değişiklik olmadığını belirlenmiştir. Yapılan kinetik analizler sonucunda; $K_m = 1,85$ mM, $V_{max} = 25,77$ U/mg-protein olarak saptanmıştır. Kararlılık testleri ve tekrar kullanılabilirlik kapasitelerini belirlemek için yapılan ölçümlerde ise 20. ölçüm sonrasında aktivitenin %68'inin korunduğu belirlenmiştir. PLL kaplı aljinat boncuklarda Üreaz/AlaDH enzim çifti immobilize edilmiş, optimum immobilizasyon koşulları belirlenerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve serbest Üreaz/AlaDH çifti ile karşılaştırılmıştır. Optimum pH serbest enzim için 6,5 immobilize enzim için ise 6,3 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık incelenmiş ve serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 37°C ve 40°C olarak saptanmıştır. Enzim çiftini içeren PLL kaplı boncuklarda pH ve termal kararlılık, depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik incelenmiş, depolanan örneğin %63 aktivitesini koruyabildiğini ve aynı koşullarda depolanan serbest enzim için ise bu değer %12 olduğunu belirlemiştir.

Kumar ve ark., (2009), soya fasulyesi (*Glycine max*) üreazını aljinat ve kitosan boncuklar üzerine immobilize etmişler ve çeşitli parametrelerini optimize ederek karşılaştırmışlardır. Immobilizasyon kitosan ve aljinat için sırasıyla %77 ve %54 olarak gerçekleşmiştir. Serbest üreaz (çözünür) için optimum sıcaklık 65°C, kitosan için 75°C ve aljinat için 80°C olarak bulunmuştur. Aktivasyon enerjilerinin serbest (çözünür), kitosan ve aljinat üzerine immobilize üreazlar için sırasıyla 3,68 kcal mol⁻¹, 5,02 kcal mol⁻¹, 6,45 kcal mol⁻¹ olduğu bulunmuştur. Optimum pH ise serbest (çözünür) üreaz için 7, aljinat için 6,2 ve kitosan için 7,9 olarak tespit edilmiştir. Serbest enzimin K_m değeri 2,70 mM iken immobilize enzim 5,88 mM olarak bulunmuştur. V_{max} değerlerini aljinat ve kitosan üzerine immobilize edilmiş ve serbest üreaz için sırasıyla $2,82 \times 10^2$ µmol NH₃ min⁻¹ mg⁻¹ protein, $2,65 \times 10^2$ µmol NH₃ min⁻¹ mg⁻¹ protein ve $2,85 \times 10^2$ µmol NH₃ min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak bulmuşlardır. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında kitosan-üreaz ve aljinat-üreaz boncuklar 14 kez kullanılmış ve 14. kullanım sonunda aktivite kaybının aljinat-üreaz

boncuklar için %45, kitosan-üreaz boncuklar için %20 olduğunu belirlemişlerdir. Serbest, aljinat ve kitosan üreaz boncukları için $t_{1/2}$ sırasıyla 19 gün, 80 gün ve 121 gün olarak belirlemişlerdir.

Şenel ve ark., (2010), yaptıkları çalışmada, üreazı poli (akrilik asit) (PAA) ile poli (1-vinil imidazol) (PVI) kompleksleşmesi ile elde edilen bir polimer ağı içinde immobilize etmişler, polimer ağ hazırlanmasını FT-IR spektroskopisi ile izlemişlerdir. İmmobilize üreaz için Michaelis-Menten sabiti (K_m), V_{max} ve temel özelliklerini (pH_{opt} , $pH_{stability}$, T_{opt} , $T_{stability}$, tekrar kullanılabilirlik ve depolama kararlılığı) belirlemişlerdir. Serbest üreazın V_{max} değerinin ($0,01807 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) immobilize üreazdan ($0,07491 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) daha küçük olduğunu bulmuşlardır. Serbest ve immobilize üreaz için K_m değerlerini sırasıyla, 4,1 mM ve 27,8 mM olarak hesaplamışlardır. Serbest ve immobilize üreaz için optimum sıcaklık değişimlerini 30°C ile 90°C arasındaki sıcaklıklarda incelemişler ve serbest enzimin optimum sıcaklığını 55°C immobilize enzimin optimum sıcaklığını ise 60°C olarak belirlemişlerdir.

Sahoo ve ark., (2011), magnetik demir nonopartiküllerini N-fosfonometil iminodiasetik asit (PMIDA) ile modifiye etmişler ve üzerine üreazı immobilize etmişlerdir. Serbest üreaz için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $1,1 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$ ve $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. İmmobilize haldeki enzim için K_m ve V_{max} değerleri $2,0 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$ ve $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. İmmobilize üreaz için gözlenen kinetik veriler serbest üreazdan farklıdır. Üreaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini değişen pH aralıklarında (3,0-11,0) incelemişler ve immobilize enzimin pH 8,0'de, serbest üreazın ise pH 7,0'de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. İmmobilize ve serbest üreazın termal kararlılıklarını 30 ile 80°C arasında değişen çeşitli sıcaklıklarda incelemişler, sıcaklık artışı ile serbest üreazın katalitik etkinliğinin azaldığını, immobilize enzimin katalitik aktivitesinin ise arttığını, serbest üreazın 80°C'de aktivitesini başlangıç aktivitesine göre %90 oranında kaybettiğini, immobilize üreazın ise aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Gabrovska ve ark., (2011), üreaz enzim immobilizasyonu için yeni bir matriks olarak rodyum nano taneciklerini (%5 aktif kömür ile birleşmesiyle) elde

etmişler ve öncelikle kimyasal olarak modifiye edilen akrilonitril (AN) kopolimer membran ile farklı konsantrasyonlarda kimyasal bağlı kitosan (%0,15; %0,3; % 0,5; %1,0; %1,5) üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kitosan ve modifiye membranların temel özelliklerini incelemişlerdir. SEM analizi ile farklı modifiye membranların morfoloji değişikliğini göstermişlerdir. Bağlı protein miktarı ile immobilize enzimin aktivite miktarlarını ölçmüşlerdir. Rodyum nanopartikülleri içeren ve %1,0'lik kitosan ile kaplanmış akrilonitril (AN) kopolimer membranlara bağlı üreaz enzimi için daha yüksek bir (yaklaşık olarak %77,44) aktivite belirlemişlerdir. İmmobilize üreaz enziminin sıcaklık, optimum pH, termal stabilite ve depolama kararlılığı gibi temel özelliklerini incelemişlerdir. Reaksiyon için uygun tamponlar ilave ederek pH 5,2 ile pH 7,6 arasında değişen aralıklarda aktivite tayini yapmışlardır. Serbest enzimin optimum pH'ını 5,8 olduğunu, immobilize üreazın optimum pH'sının ise yüksek değerlere ($pH_{opt} 7'e$) doğru kayma gösterdiğini saptamışlardır. Serbest üreazın optimum sıcaklığını 28°C, modifiye akrilonitril (AN) kopolimer membranlara immobilize edilmiş üreazın optimum sıcaklığını ise 30 °C olarak belirlemişlerdir. Termal kararlılıklarını belirlemek için serbest ve immobilize üreazları 70°C'de 3 saat inkübe ederek süresinin sonunda aktivitelerine bakmışlar ve immobilize enzimin %20 aktivite kaybına uğradığını serbest enzimin ise tamamen aktivitesini kaybettiğini saptamışlardır. Modifiye membranlar üzerine bağlı üreaz aktivitesi iyi operasyonel stabilite göstermiştir. Enzimin aktivitesinde 10 kez kullanımdan sonra yaklaşık olarak %9 kayıp tespit etmişlerdir. 50 gün süresince 4°C (pH 7,0) de saklanan enzimlerin depolanma kabiliyetlerine bakılmış, serbest üreazın aktivitesini %50 muhafaza ettiğini ve immobilize enzimin ise başlangıçtaki aktivitesini %93 oranında koruduğunu belirlemişlerdir. Serbest enzimin K_m değerini 16 mM iken immobilize enzimin K_m değerini 52,6 mM olarak bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır.

Üre, üreaz, nessler reaktifi, amonyum sülfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sodyum karbonat (Na_2CO_3) , kloroform, sodyum hidroksit (NaOH) , fosforik asit (%85, v/v), hidroklorik asit (%37, v/v), sülfürik asit (%95-97, v/v), etil alkol, potasyum iyodür, civa(II) iyodür, sodyum sitrat, sığır serum albümin, glutaraldehit, 3-aminopropiltrietoksisilan (3-APTES), 1-kloro-2,3-epoksipropan (epiklorohidrin), sodyum tiyosülfat $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$, aseton, ninhidrin, bakır (II) sülfat $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, folin-ciocalteu çözeltisi, nişasta, iyot, fenolftalein kullanılmıştır.

3.1.2. Araç ve Gereçler

UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), FT-IR (Perkin Elmer, Spectrum RX I FT-IR System), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu ve otomatik pipet kullanılmıştır. Magnetik nanopartiküllerin görüntülerinin incelenmesi ve partikül boyutunun belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) cihazları, magnetik nanopartiküllerin nitel yapı analizi için Rigaku SmartLab marka X-Işını Kırınım Cihazı (X Ray Diffractometer) kullanılmıştır.

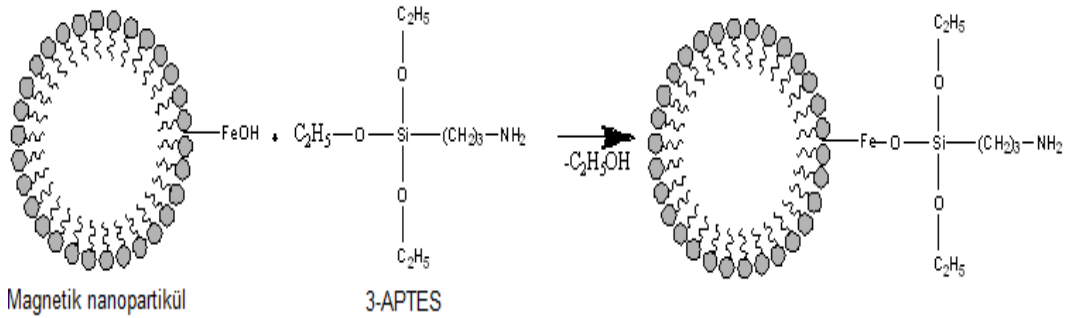
3.2. Metod

3.2.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi

Magnetik nanopartiküller birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Valenzuela ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 300 mL 0,1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ çözeltisiyle, 300 mL 0,05 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlanıp bir beherde 25°C 'de 250 devir/dak hızla karıştırarak ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltinin sıcaklığı 36°C 'ye ulaştığında üzerine damla damla 1 N NaOH siyah bir çökelti oluşturuncaya kadar eklenmiştir. Bu işlem süresince çözelti karıştırılmış ve ısıtmaya devam edilmiştir. Çözeltinin sıcaklığı 52°C 'ye ulaştığında ısıtıcı kapatılmıştır. Daha sonra çözeltinin üzerine damla damla 3 N NaOH eklenerek siyah çökeltinin yoğunluğu arttırılmıştır. Elde ettiğimiz çökelekler etanol ile yıkanarak süzölmüş ve bir gece boyunca 74°C 'de etüvde kurutulmuştur.

3.2.2. Magnetik Nanopartiküllerin Üreaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

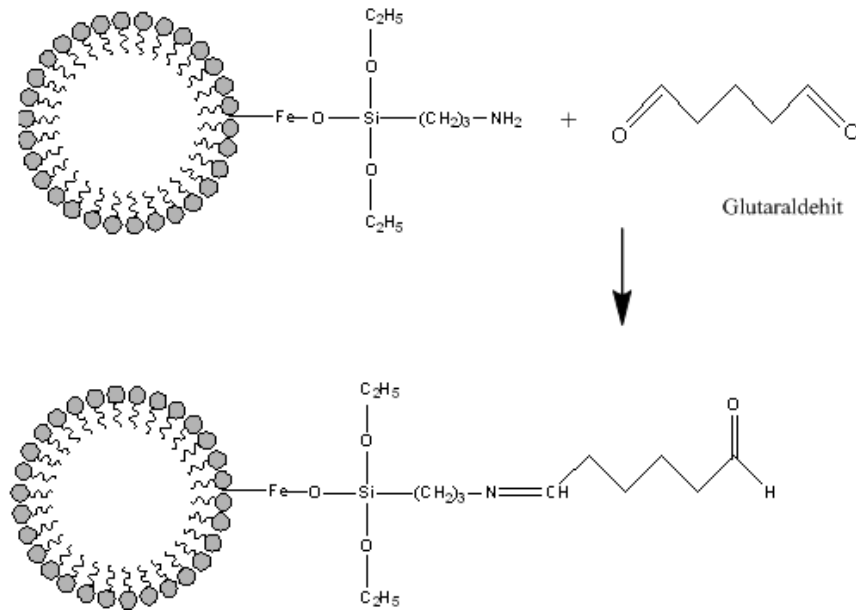
Üreaz enziminin immobilizasyonunda kullanılacak olan magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Magnetik nanopartiküllerin aktifleştirilmesinde Weethall (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınmış ve 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. Magnetik nanopartikülün 2,0 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45°C 'de 24 saat bekletilerek aktifleştirilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115°C 'de 1 gece kurutulmuştur. 3-APTES ile aktifleştirilen magnetik nanopartikül desteğindeki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktivite edilmesi

3.2.3. Magnetik Nanopartiküllerdeki Alkilamin Türevinin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi

Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g aktifleştirilmiş destek üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda %2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.2). Magnetik nanopartiküller saf su ile süzültüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50°C'de 24 saat süresince kurutulmuştur. Süzültüde glutaraldehit olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Boratynski ve Zal'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanması sonrasında arta kalan serbest amino grubu miktarının tayini Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır.



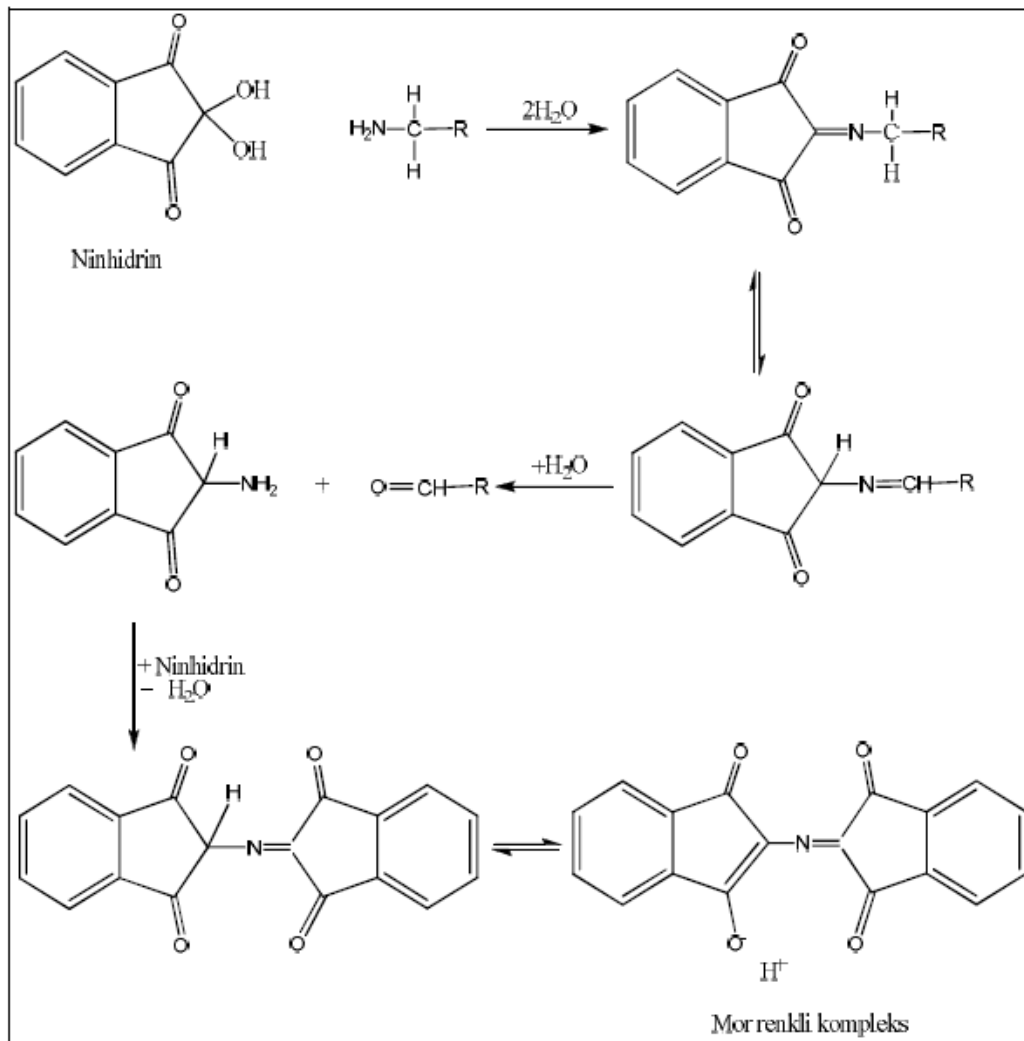
Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile reaksiyonu

3.2.4. Magnetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Magnetik nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino ($-\text{NH}_2$) grubunun miktarı Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Aynı yöntem silanlanan desteklerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $-\text{NH}_2$ grubu tayini içinde kullanılmıştır. Yöntemin esası, $-\text{NH}_2$ grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin (Şekil 3.3) etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm’de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Amino gruplarının tayini için,

- 1) Derişimi 6×10^{-4} , 9×10^{-4} , 12×10^{-4} , 15×10^{-4} , 18×10^{-4} , 21×10^{-4} M olan 3-APTES çözeltileri hazırlanmıştır.
- 2) Hazırlanan çözeltilerden 100 μL tüplere alınarak ve üzerine 200 μL ninhidrin (%2 (w/v)) çözeltisi eklenmiştir. Kör tüpü için 100 μL su alınarak üzerine 200 μL ninhidrin çözeltisi eklenmiştir.

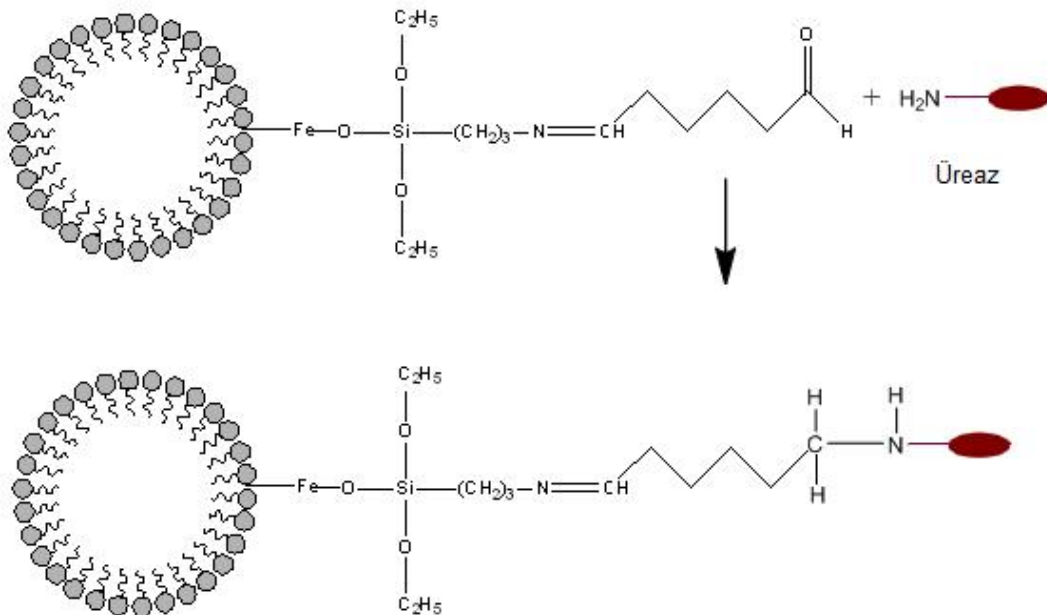
- 3) Tüpler 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda soğutulması için bekletilmiştir.
- 4) Her bir tüpe 50:50 etanol:su karışımından 5 mL eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır.
- 5) Çözeltilerin absorbansı köre karşı 570 nm’de okunmuştur. Amino grubu belirlenecek destek materyalinden 10 mg tartılarak üzerine 100 µL su eklendikten sonra standart çalışmasındaki basamaklar aynen uygulanmıştır. Örnekler 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan kompleks etanol-su fazına alınarak absorbansı 570 nm’de okunmuştur.



Şekil 3.3. Ninhidrinin –NH₂ grubu ile verdiği reaksiyon

3.2.5. Üreaz Enziminin Glutaraldehit Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu

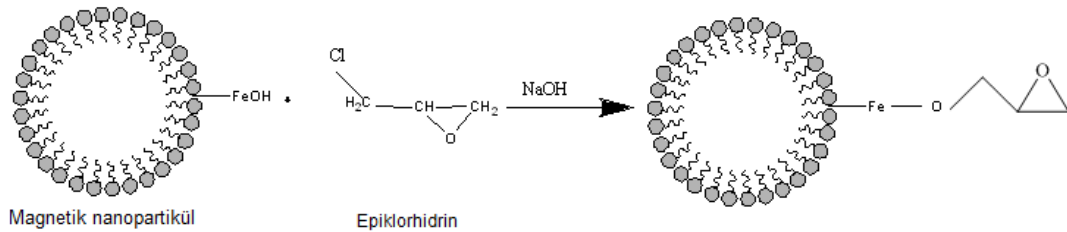
Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere glutaraldehit üzerinden kovalent immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde modifiye edilen magnetik nanopartiküllerden 50 mM pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanmış derişimi 0,25 mg/mL olan üreaz çözeltisinin 8 mL'si 2,0 g desteğe ilave edilmiştir. Karışım 12 saat boyunca 4°C'de karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize üreaz preparatları süzülerek fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) ile süzüntüde protein kalmayınca kadar yıkanmıştır. Bu şekilde desteğe bağlanmayan serbest üreazın ortamdan tamamen uzaklaştığını anlamak için süzüntünün 280 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini Lowry ve ark., (1951) önerdiği yöntemle yapılmıştır. Protein tayini yapıldıktan sonra immobilizasyonun başlangıcında ortama eklenen üreaz miktarı çıkartılarak 1,0 g desteğe bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır. İmmobilize enzimler kullanılıncaya kadar 5°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere üreaz enziminin immobilizasyonu

3.2.6. Magnetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin İle Aktifleştirilmesi

Magnetik nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorohidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g destek üzerine 50 mL 2 M'lık NaOH olacak şekilde hazırlanmış çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra NaOH ile muamele edilen magnetik nanopartiküllerin üzerine 3,9 mL 0,05 mol epiklorohidrin eklenerek oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Epiklorohidrin ile aktifleştirilen magnetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır.

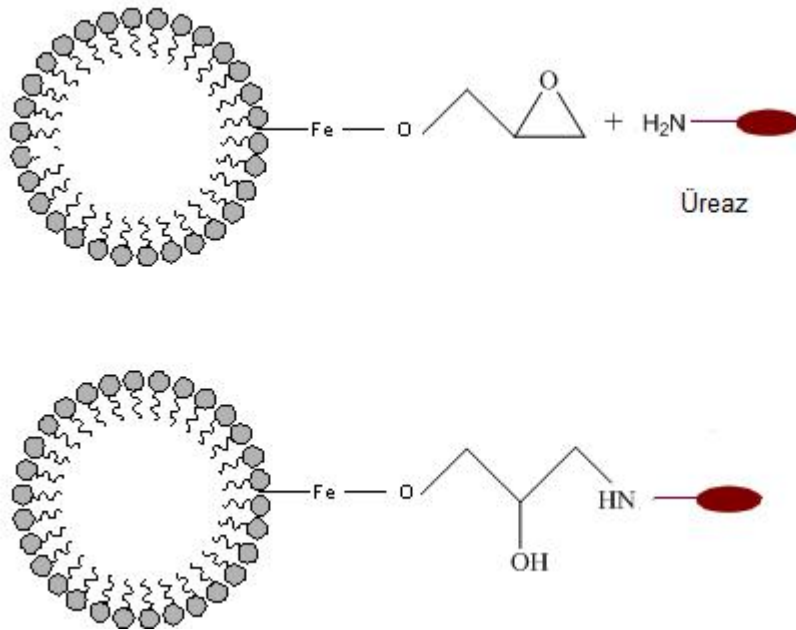


Şekil 3.5. Magnetik nanopartiküllerin epiklorohidrin ile reaksiyonu

3.2.7. Üreaz Enziminin Epiklorohidrin Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu

Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin üzerinden kovalent immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde modifiye edilen magnetik nanopartiküllerden 50 mM pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanmış derişimi 0,25 mg/mL olan üreaz çözeltisinin 8 mL'si 2,0 g desteğe ilave edilmiştir. Karışım 12 saat boyunca 4°C'de karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize üreaz preparatları süzülerek fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) ile süzüntüde protein kalmayınca kadar yıkanmıştır. Bu

şekilde desteğe bağlanmayan serbest üreazın ortamdan tamamen uzaklaştığını anlamak için süzütünün 280 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini Lowry ve ark., (1951) önerdiği yöntemle yapılmıştır. Protein tayini yapıldıktan sonra immobilizasyonun başlangıcında ortama eklenen üreaz miktarı çıkartılarak 1,0 g desteğe bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır. İmmobilize enzimler kullanılıncaya kadar 5°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. Epiklorohidrin ile aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere üreaz enziminin immobilizasyonu

3.2.8. Total Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve ark., (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli kaideye dikkat etmek gerekir ki bu reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklıdır. Tarif edilen bu redüklenme ise pH 10'da gerçekleşmektedir. Bundan dolayı folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine hemen ilave edilmeli ve derhal şiddetle karıştırılmalıdır. Bu suretle fosfomolibdat-

fosfotungstat reaktifi parçalanmadan önce indirgenme olayı gerçekleşir. Standart çözelti olarak albümin çözeltisi kullanılmıştır.

Total protein tayininde kullanılacak çözeltiler: Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- 1) Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 4,0 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 2) Çözelti B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 3) Çözelti C: 50 mL Çözelti A ve 1 mL Çözelti B karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 4) Folin Ciocalteu reaktifi: Folin Ciocalteu reaktifi saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 5) Standart protein çözeltisi: 100 mL'de 14 mg sığır albümini olacak şekilde saf su içerisinde hazırlanmıştır.
- 6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 μL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuş ve bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9. Standart Amonyum Sülfat Eğrisinin Belirlenmesi

Nessler's metoduna göre ölçülmüştür (Rao ve ark., 1995). Açığa çıkan amonyak Nessler ayıracı ile etkileştirilerek bunun sonucunda oluşan renkli bileşiğin renk şiddeti 505 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart amonyum sülfat ölçümünde kullanılan çözeltiler;

- 1) Stok Amonyum Sülfat: Saf amonyum sülfattan (100°C’de kurutulmuş durumda) 0,236 g tartıldı ve 75 mL saf suda çözüldü, üzerine 1-2 damla derişik sülfürik asit (H₂SO₄) damlatılarak 100 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözeltideki azot konsantrasyonu 0,3 mg/mL dir.
- 2) Günlük çalışma standardı: 1 mL stok amonyum sülfat çözeltisinden alınarak 50 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin derişimi 0,01 mg/mL nitrojendir.

3.2.10. Üreaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

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

Üreaz Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılacak Çözeltiler;

- 1) Nessler Ayıracı: 500 mL’lik bir balona 10 mL distile suda çözünmüş 15 g KI konulmuş ve 11,25 g iyot bu çözeltiye eklenerek çözülmüştür. Daha sonra 15 g civa tartılmış, her eklemede çözelti karıştırılarak soğutulmuştur. Bu çözelti içinden 5 mL alınmış ve %1’lik nişasta ile serbest iyodun olup olmadığına bakılmıştır. Serbest iyodun varlığını gösteren mavi renk oluşuncaya kadar iyot çözeltisinden (İyot çözeltisi: 1,5 g KI birkaç mL suda çözülmüş ve üzerine 1,2 g iyot konulmuştur) damla damla eklenmiştir. 1 mL için harcanan iyot miktarı hesaplanmış ve gereken oranda iyot çözeltisi ana çözeltiye eklenmiştir. Distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. Daha önceden hazırlanmış %10’luk NaOH (485 mL %10’luk NaOH üzerine) çözeltinin tamamına eklenerek, iyice karıştırılmış ve berraklaşması için beklenmiştir.
- 2) Üreaz: 40 mg üreaz pH 7,4 fosfat tamponunda çözülmüştür.

- 3) Standart Üre: 322 mg üre tartılarak 500 mL distile suda çözölmüştür. Üzerine 1-2 damla kloroform eklenmiştir. Bu çözeltide 0,3 mg/mL üre nitrojeni vardır.

3.2.11. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

3.2.11.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreazın aktivitesi farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçölerek aktiviter hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.11.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreazın aktiviteri daha önce belirlenmiş olan optimum pH'larda ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçölümüştür.

3.2.11.3. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

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

3.2.11.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize üreazın aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiğı yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize üreaz için geri dönüşüm sayısı ve katalitik etkinlik parametreleri hesaplanmıştır.

3.2.11.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

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

3.2.11.6. Serbest ve İmmobilize Üreazın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

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

3.2.11.7. İmmobilize Üreazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize üreazların tekrar kullanımı ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1,1x5 cm) ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. 25, 50 ve 100 mg immobilize üreaz enzimi üzerine 3 mL fosfat tamponunda (50 mM pH 5,5) hazırlanmış substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon için 10 dakika bekledikten sonra kolon musluğu açılarak alınan süzüntüye 1 mL Nessler ayırıcı ilave edilmiş ve reaksiyon absorbansı 505 nm’de okunmuştur. İmmobilize enzim 5 mL tampon ile yıkandıktan sonra üzerine yeniden tampon ve substrat çözeltisi yüklenmiştir. Bu işlemler 20 kez tekrarlanmıştır.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

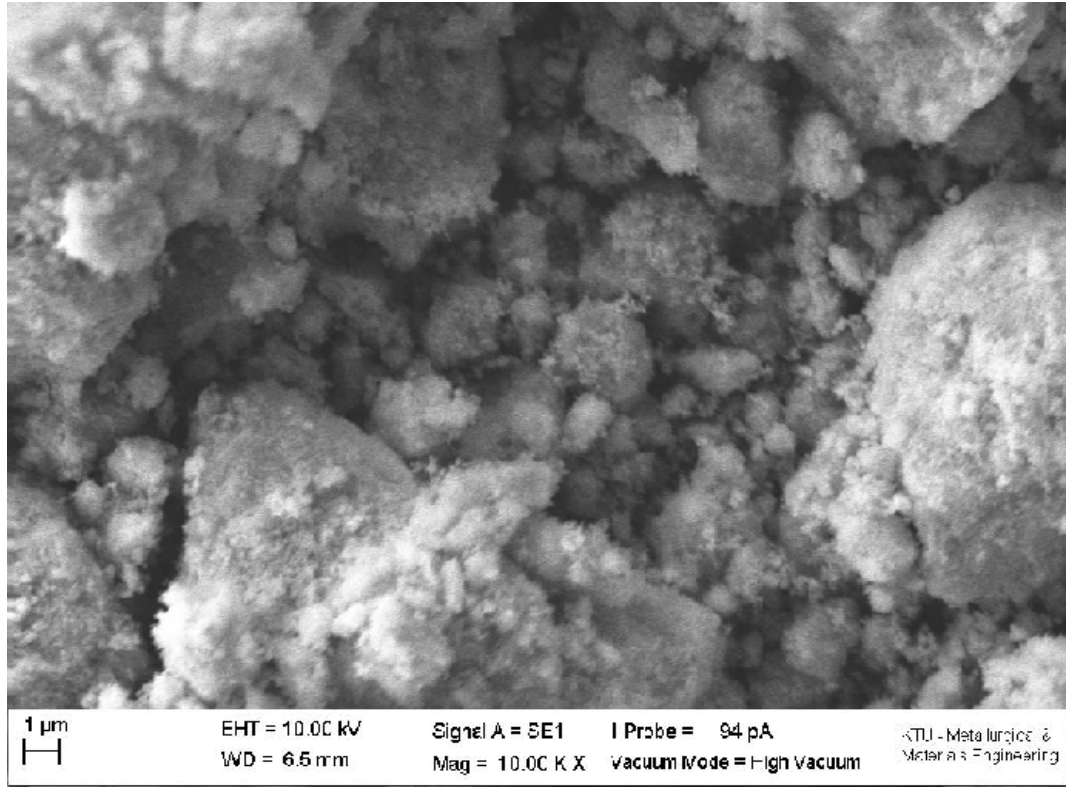
4.1. Bulgular

Bu çalışmada üreaz enziminin aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize üreaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) belirlenen optimum koşullardaki aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

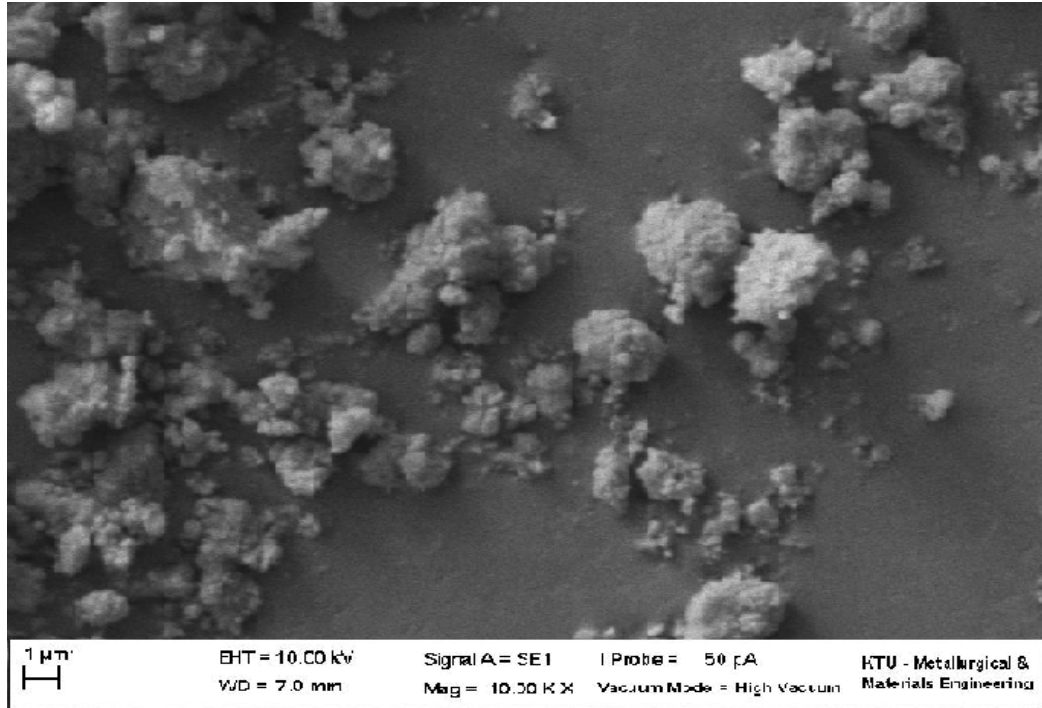
4.1.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi İle İlgili Bulgular

4.1.1.1. SEM Analizi

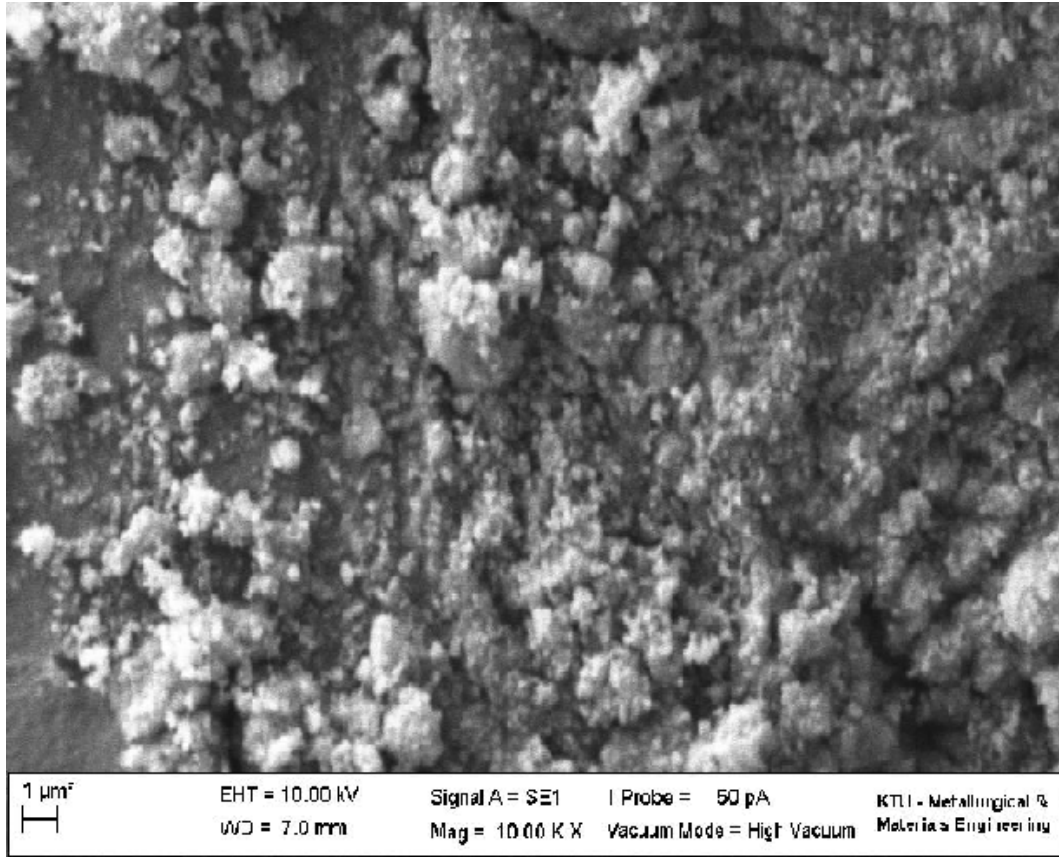
Sentezlenen Fe_3O_4 magnetik nano yapılarının boyut analizi, Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile ölçülmüş ve karakterizasyonu SEM (Zeis) mikroskopunda yapılmıştır. Ortalama spesifik ağırlığı $0,843 \text{ m}^2/\text{g}$, ortalama yüzey ağırlığı $7,113 \text{ um}$ ve ortalama hacim ağırlığı $30,262 \text{ um}$ olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan nano yapıların ortalama boyutunun $158,2 \text{ nm}$ olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü



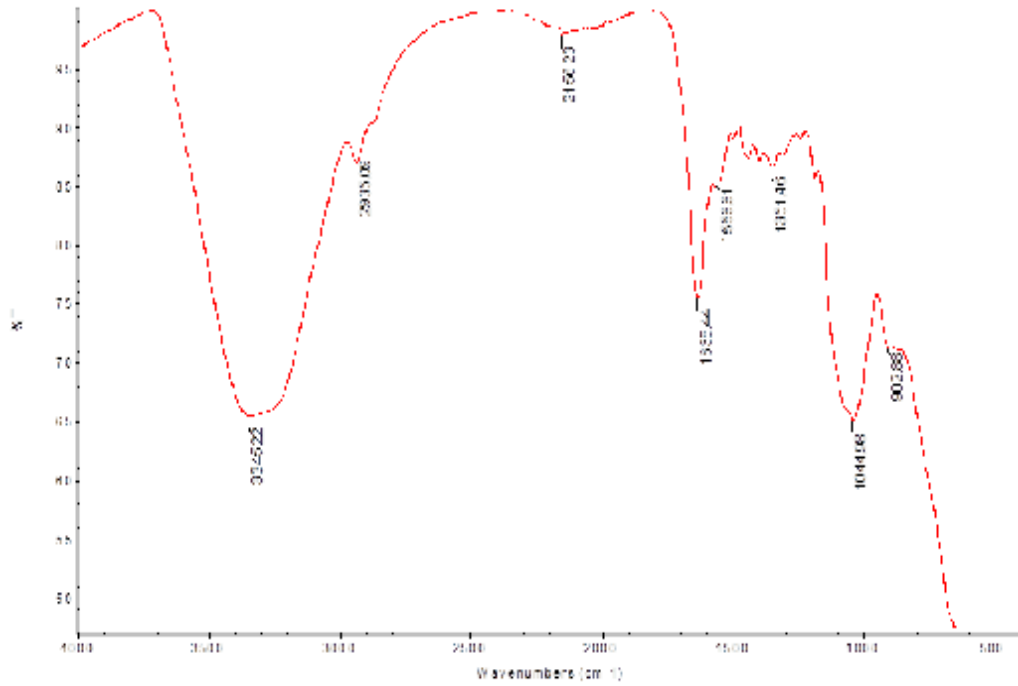
Şekil 4.2. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine glutaraldehit ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü



Şekil 4.3. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine epiklorohidrin ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü

4.1.1.2. FT-IR Analizi

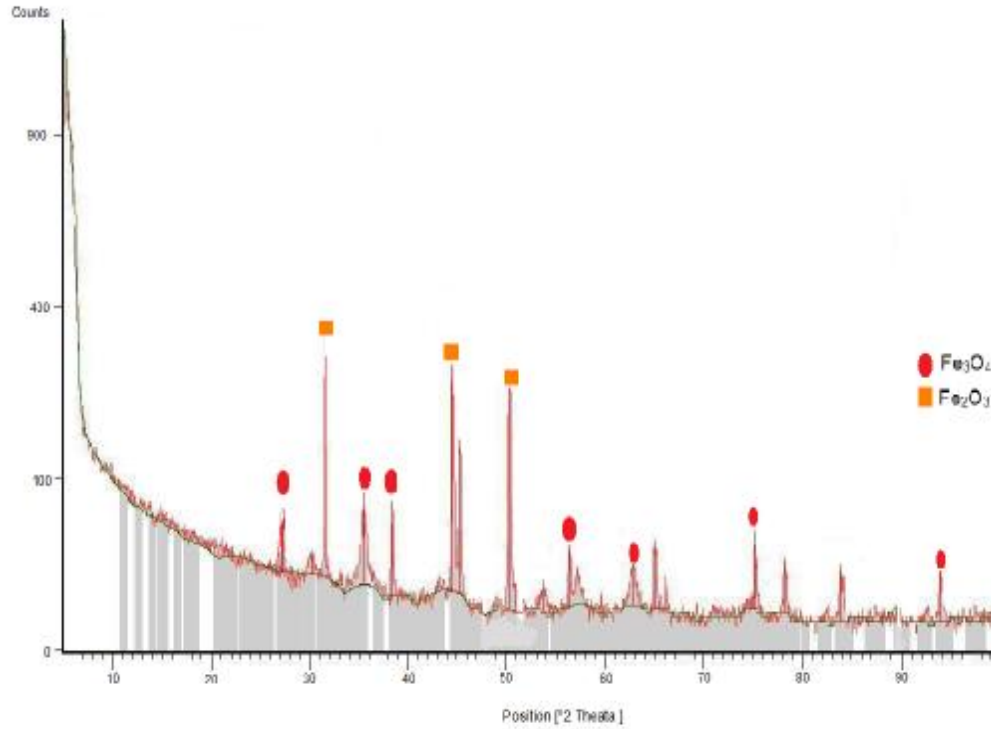
Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR grafiği incelendiğinde (Şekil 4.4) 3345 cm^{-1} deki pikin numunenin tuttuğu suya veya hidrojen bağlı $-\text{OH}$ gruplarına ait olan O-H gerilim titreşimi olduğu görülür. Yine 1635 cm^{-1} ve 1351 cm^{-1} deki pik suya ait olan O-H gerilim titreşiminden, 1044 cm^{-1} deki pikin epoksi gerilim titreşiminden (Ek 3, Ek 4) kaynaklanmıştır. 902 cm^{-1} 'deki pikler ise $\alpha\text{-FeOOH}$ 'i göstermektedir (Chen-Xiao ve ark., 2012).



Şekil 4.4. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

4.1.1.3. XRD Analizi

X-ışını kırınımı kristalin bileşiklerin kalitatif olarak tanınmasında pratik ve uygun bir yöntemdir. Kristal malzemelerin atomlarının geometrik yapıları ve aralarındaki mesafe hakkındaki bilgilerin çoğu doğrudan kırınım çalışmalarıyla belirlenmiştir (Kılıç ve ark., 1998). Sentezlenen nanopartiküllerin nitel yapı analizinde Rigaku SmartLab marka X-Işını Kırınım Cihazı (X Ray Diffractometer) kullanılmıştır. XRD analizine göre sentezlediğimiz maddenin yapısında Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 bulunmaktadır (Şekil 4.5). Piklerin çoğu sentezlemek istediğimiz Fe_3O_4 'e aittir.

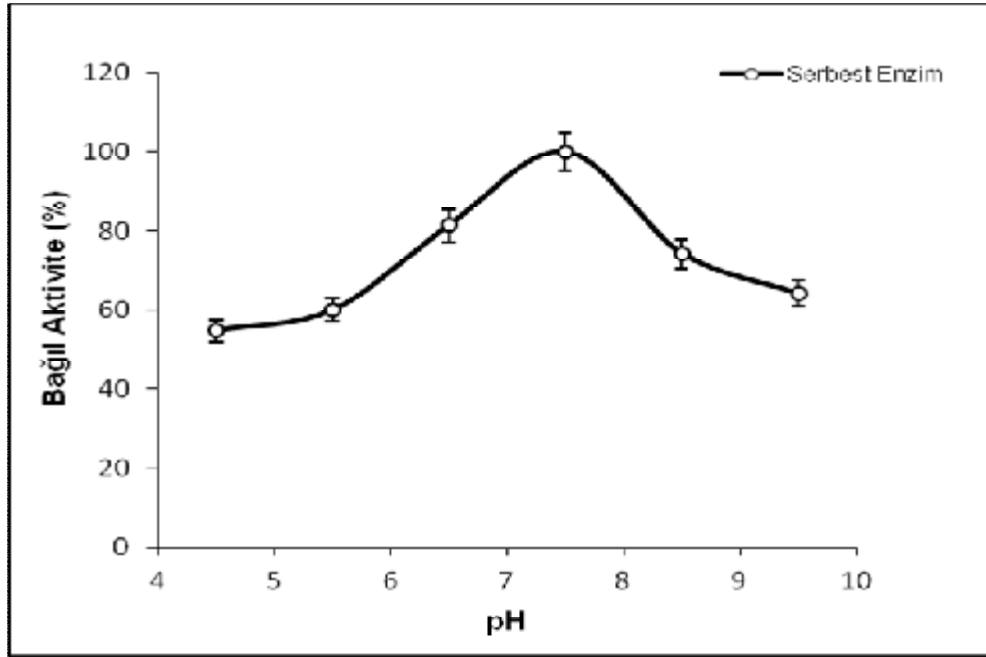


Şekil 4.5. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

4.1.2. Serbest Üreazın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

4.1.2.1. Serbest Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest üreazın aktivitesi farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6).

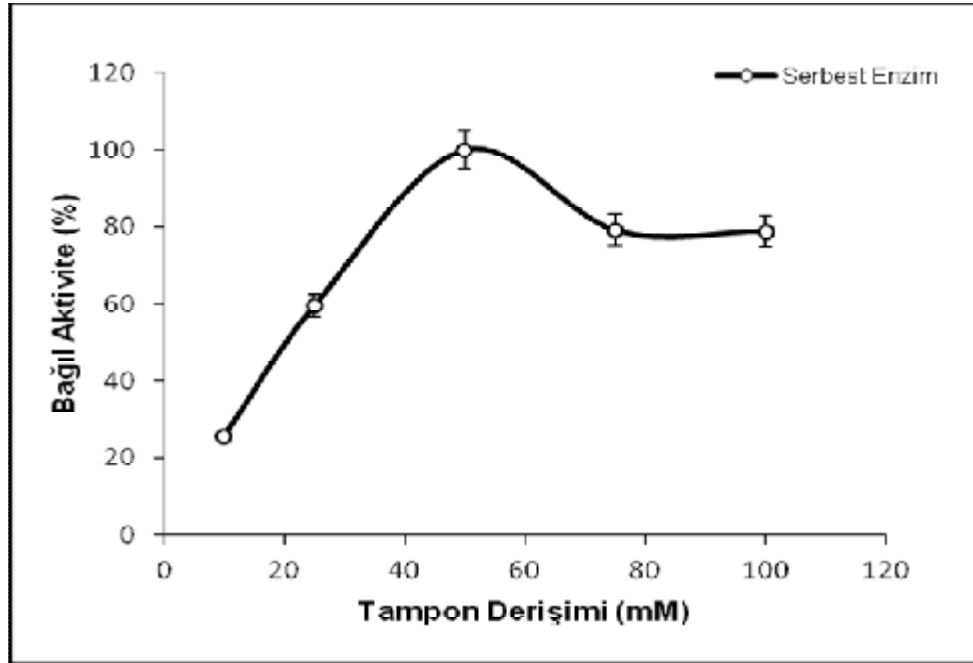


Şekil 4.6. Serbest üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

Şekil 4.6'dan görüleceği gibi serbest üreaz için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. Serbest Üreazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular

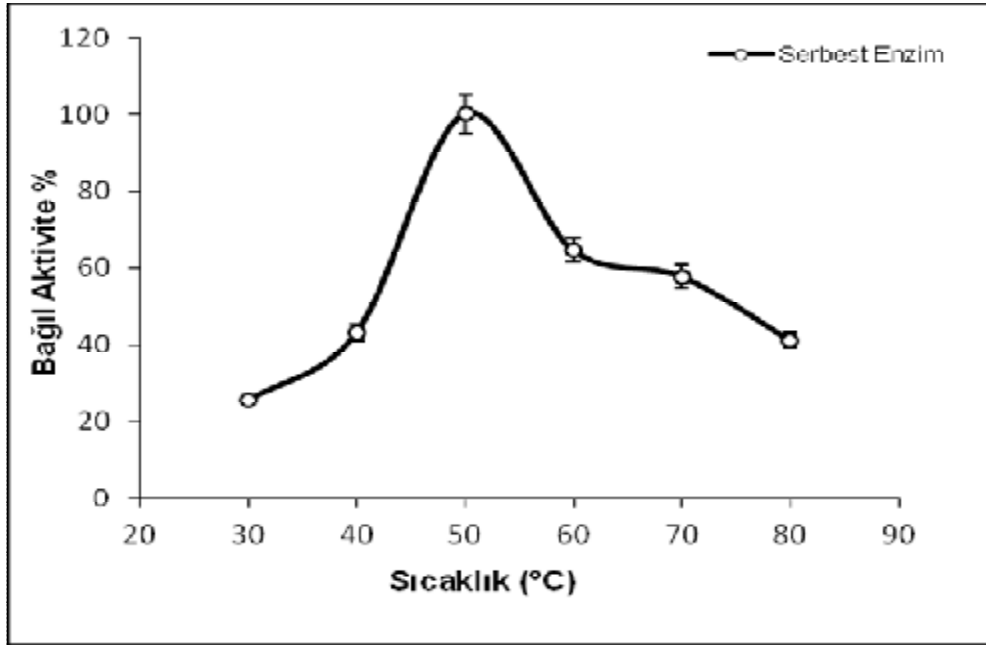
Serbest üreazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (7,5) ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak şekil 4.7'de verilmiştir . Şekil 4.7'de görüldüğü gibi serbest üreaz enzimi için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Serbest üreaz aktivitesinin pH 7,5 fosfat tamponunun derişimine bağılı olarak değışimi

4.1.2.3. Serbest Üreazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest üreazın daha önce belirlenmiş olan optimum pH 7,5 ve derişimi 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivitenin sıcaklığa bağılı olarak değışimi % bağıl aktivite olarak Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

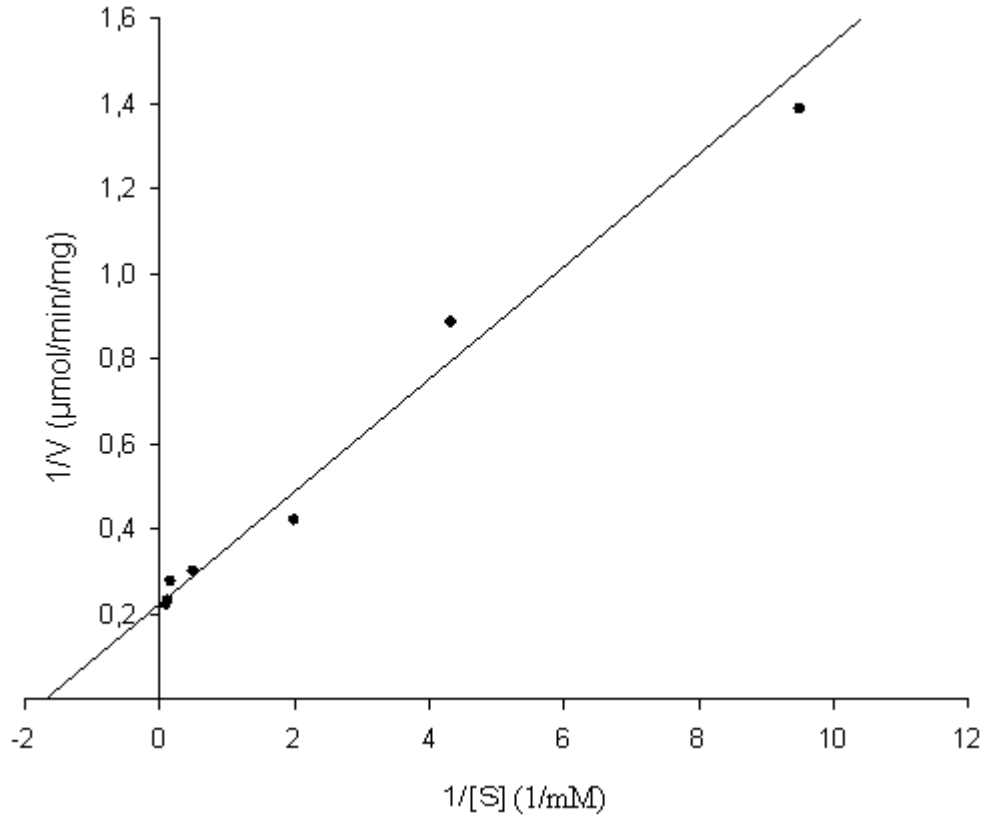


Şekil 4.8. Serbest üreaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Serbest üreazın optimum çalışma sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. 50°C'nin üstündeki sıcaklık değerlerinde üreazın aktivitesi keskin bir şekilde düşmektedir. Serbest üreaz için aktivasyon enerjisi ise 55,2 kJ/mol olarak belirlenmiştir.

4.1.2.4. Serbest Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

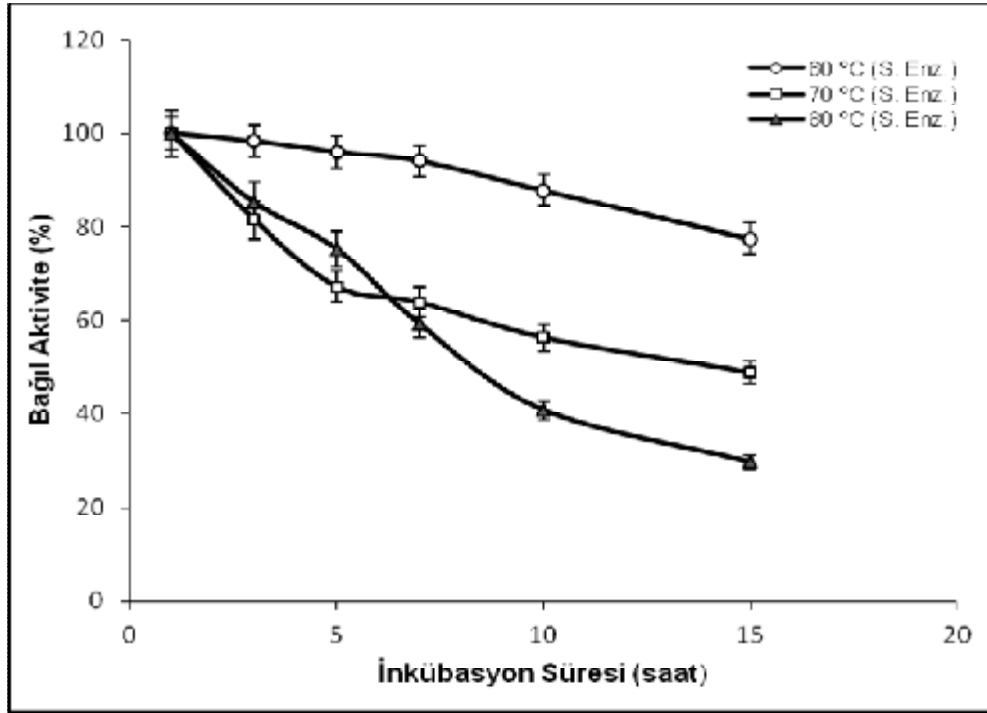
Serbest üreazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.9) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,5925 mM, 4,5 U/mg protein, 2,4525 dk⁻¹ 4,139 dk⁻¹M⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Serbest üreaz için Lineweaver-Burk grafiği

4.1.2.5. Serbest Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

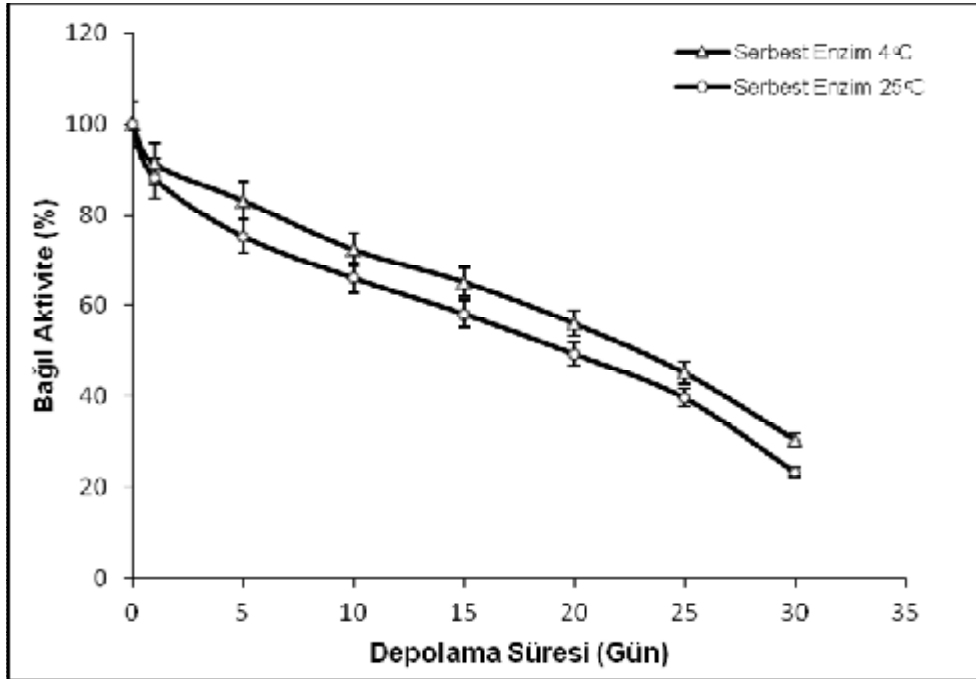
Serbest üreaz 3 farklı sıcaklıkta (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.10). Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi % bağıl aktivite ve inkübasyon süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. 15 saat inkübasyon süresi sonunda serbest üreazın 60, 70 ve 80°C'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla %77, %48 ve %29'nu koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Serbest üreazın 60, 70 ve 80°C'deki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

4.1.2.6. Serbest Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest üreazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında üreaz aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.11). Serbest üreazın 4°C ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %30'unu ve %23'ünü korudukları belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Serbest üreazın 4°C ve 25°C'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi

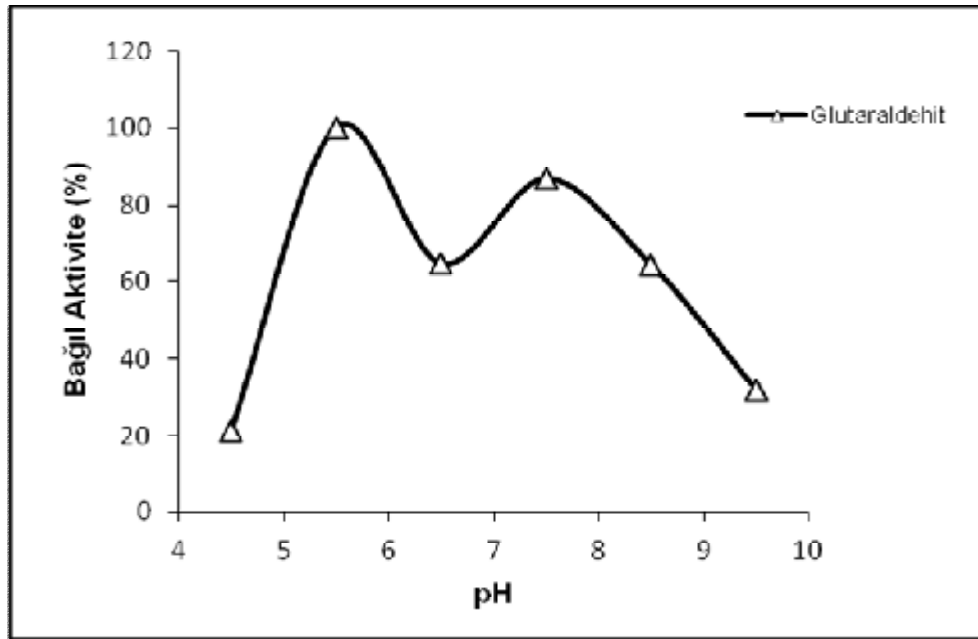
4.1.3. Üreazın Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular

Üreazın magnetik nanopartiküllere immobilizasyonunda önce magnetik nanopartiküller 3-APTES ile silanlanmıştır. Silanlama işlemi sonunda destek yüzeyindeki –OH gruplarına bağlanan 3-aminopropil dietoksisilil gruplarının miktarı (dolayısıyla –NH₂ gruplarının miktarı) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Silanlanmış magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki –NH₂ grubu miktarı 231 µmol/g destek olarak bulunmuştur.

Silanlanan magnetik nanopartiküller glutaraldehit ile muamele edilmiştir. Glutaraldehit muamelesinden sonra magnetik nanopartiküllerden glutaraldehit uzaklaşınca kadar yıkanmıştır. Silanlanan destekteki –NH₂'nin %78'ine glutaraldehitin bağlandığı saptanmıştır. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarı %63,7 mg prot./g olarak belirlenmiştir.

4.1.3.1. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.12). Şekil 4.12'de görüleceği gibi immobilize üreaz için optimum pH 5,5 olarak belirlenmiştir.

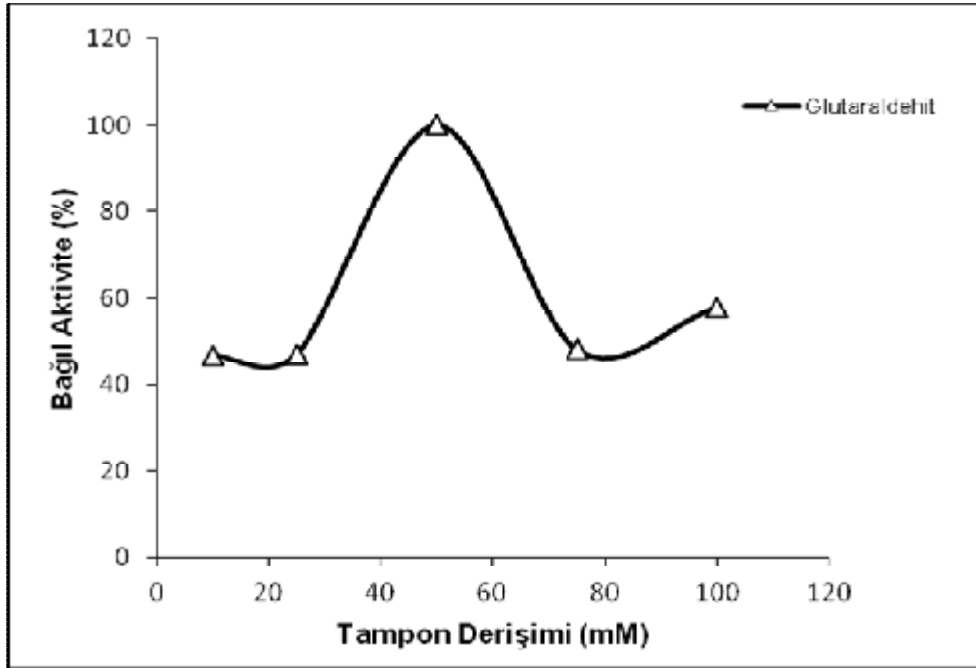


Şekil 4.12. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

4.1.3.2. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (5,5)

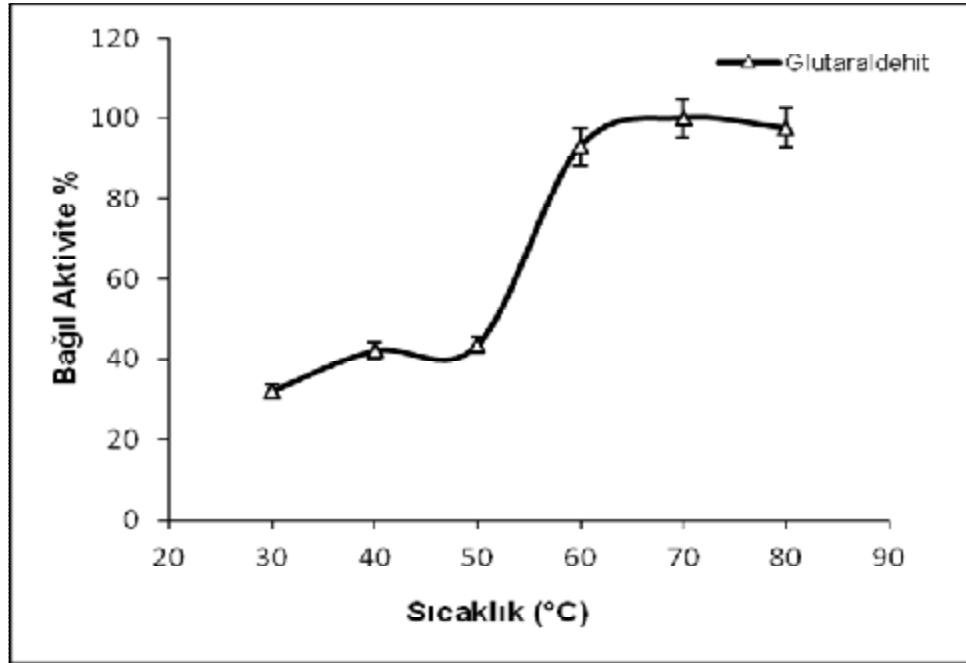
ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 4.13). Şekil 4.13’de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi

4.1.3.3. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

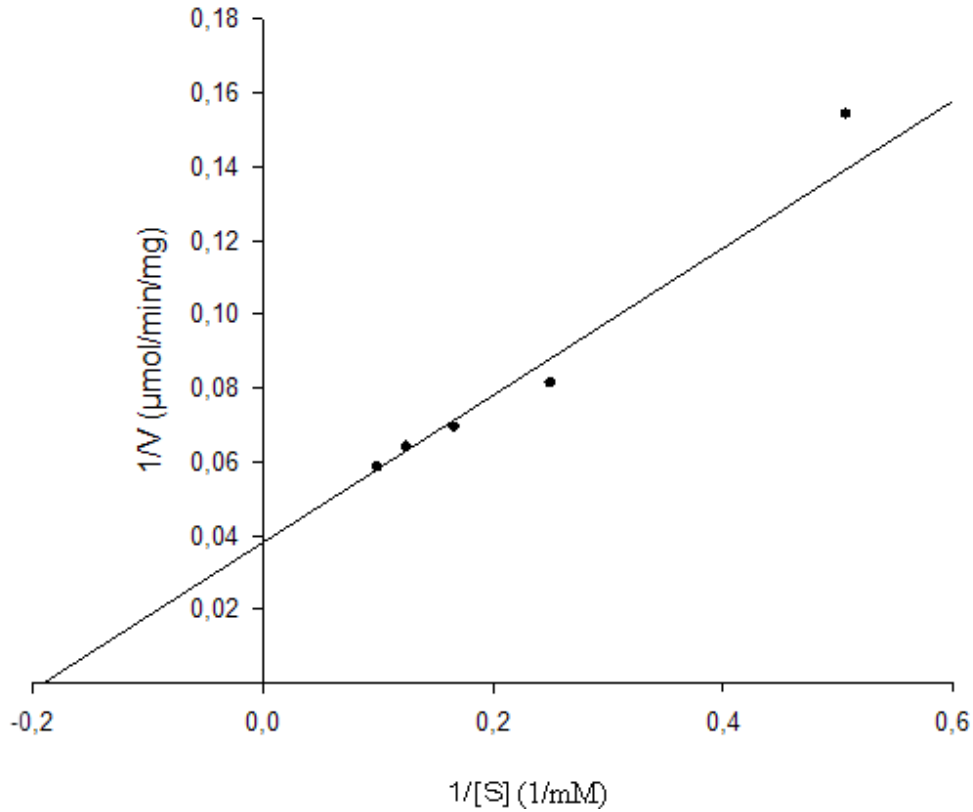
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin optimum pH'ı 5,5 ve tampon derişimi 50 mM kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.14). Şekil 4.14’de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için sıcaklık 70°C olarak belirlenmiştir. İmmobilize üreaz için aktivasyon enerjisi ise 26,3 kJ/mol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

4.1.3.4. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

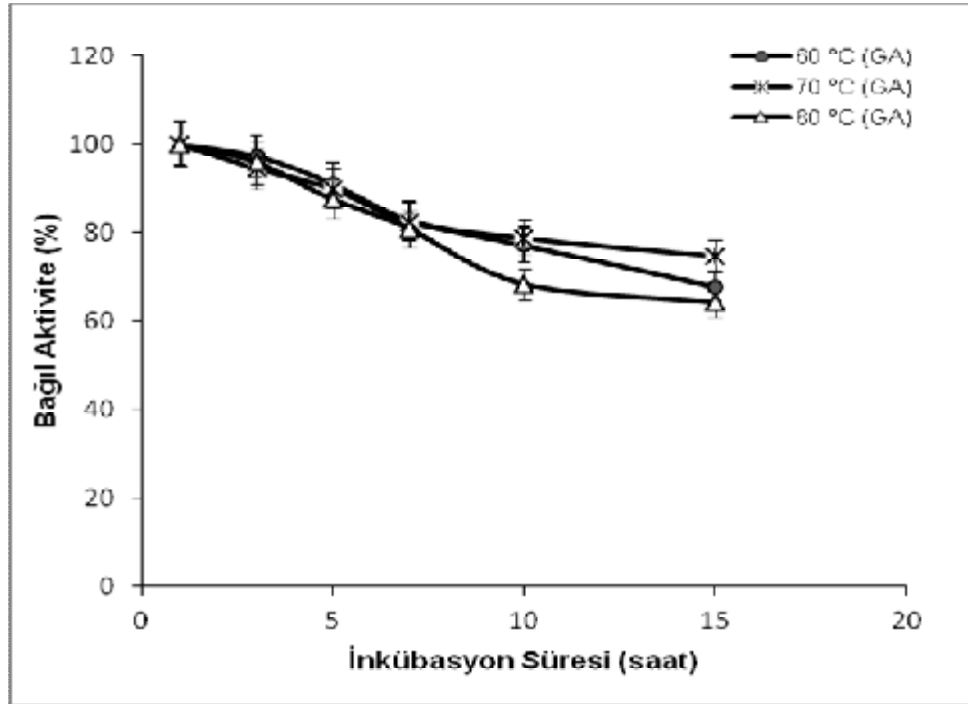
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğı çizilmiş (Şekil 4.15) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 5,2 mM, 26,2 U/mg protein, 14,279 dk⁻¹, 2,746 dk⁻¹M⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın Lineweaver-Burk grafiği

4.1.3.5. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

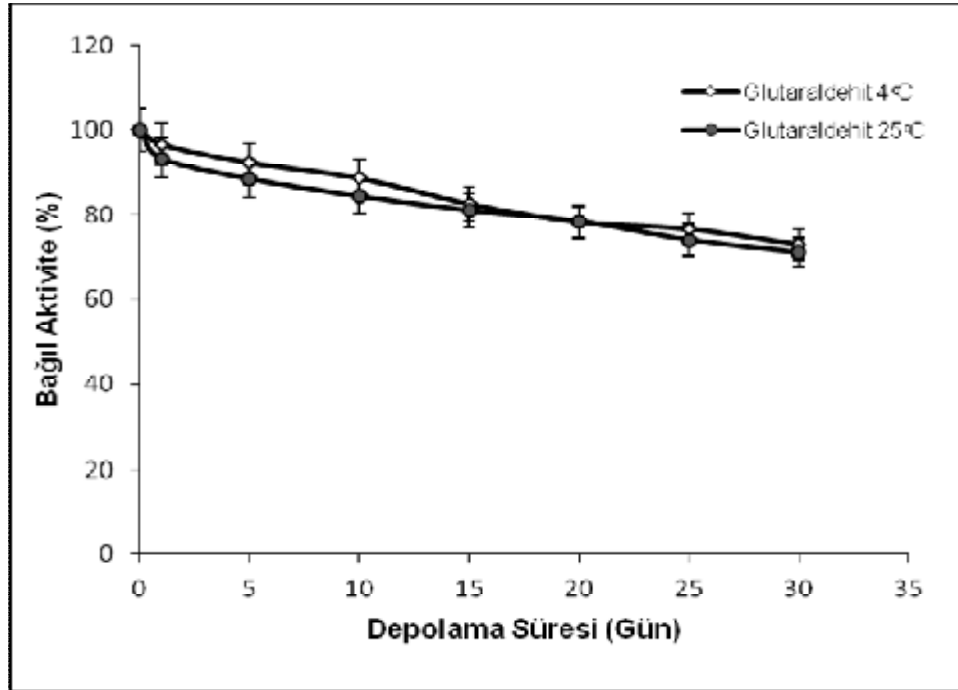
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz 3 farklı sıcaklıkta (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.16). 15 saat inkübasyon süresi sonunda magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın 60, 70 ve 80°C'deki başlangıç aktivitelerini sırasıyla %67, %74 ve %64'ünü koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 60, 70 ve 80°C’deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

4.1.3.6. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

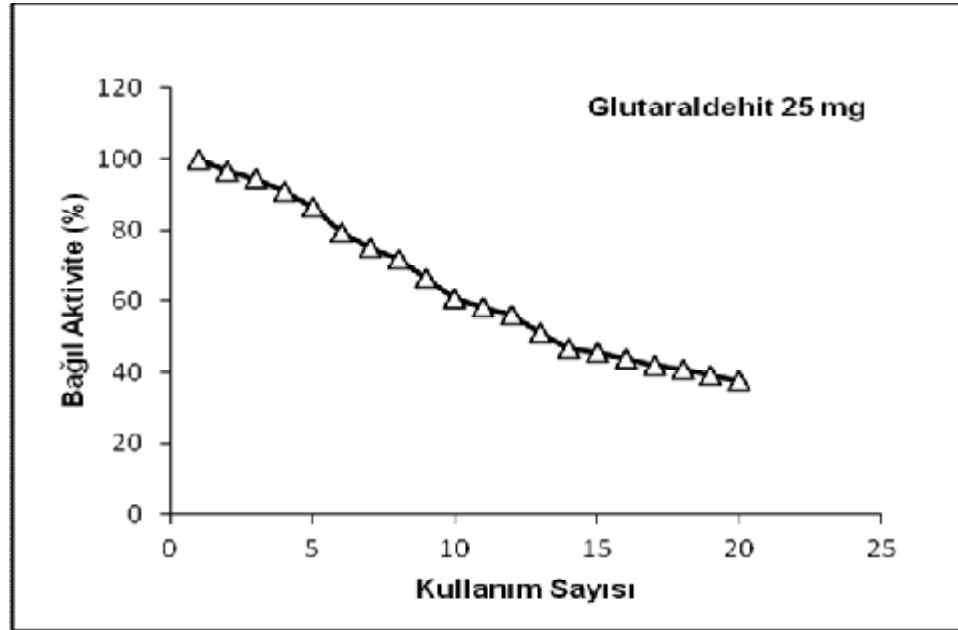
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında üreaz aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.17). Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın 4°C ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitelerini sırasıyla %72 ve %71’ini korudukları belirlenmiştir.



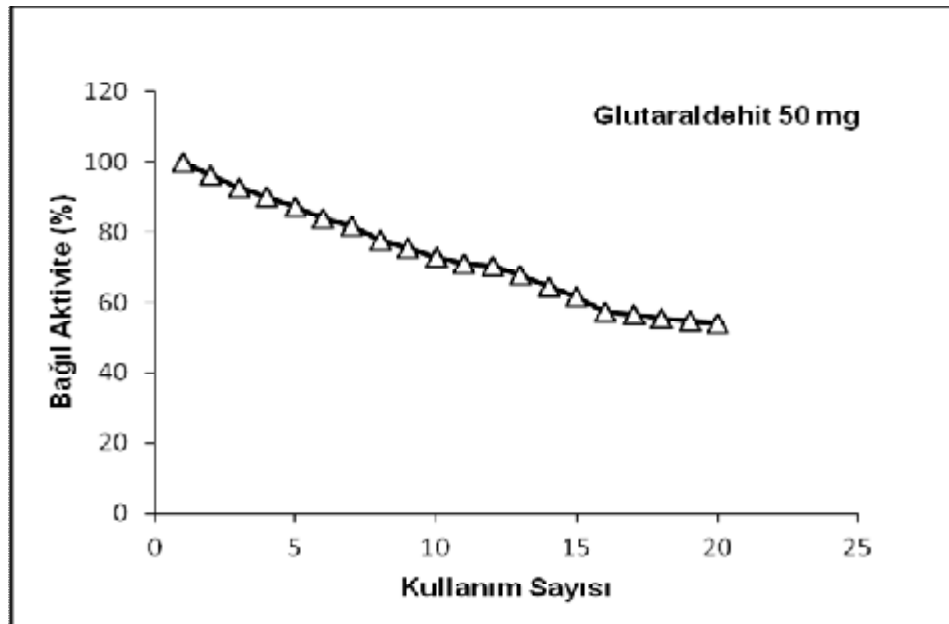
Şekil 4.17. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 4°C ve 25°C’deki depolama süresine bağlı olarak değişimi

4.1.3.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

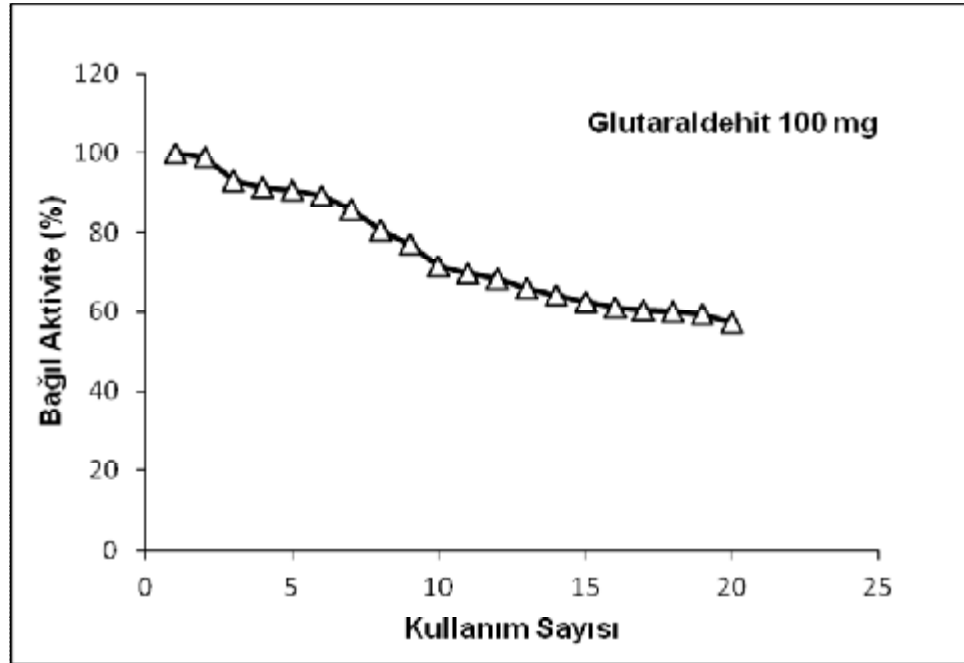
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir (Şekil 4.18, 4.19, 4.20). 25, 50 ve 100 mg örnekler alınarak 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın başlangıç aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla %37, %53 ve %57’sini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim



Şekil 4.19. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim



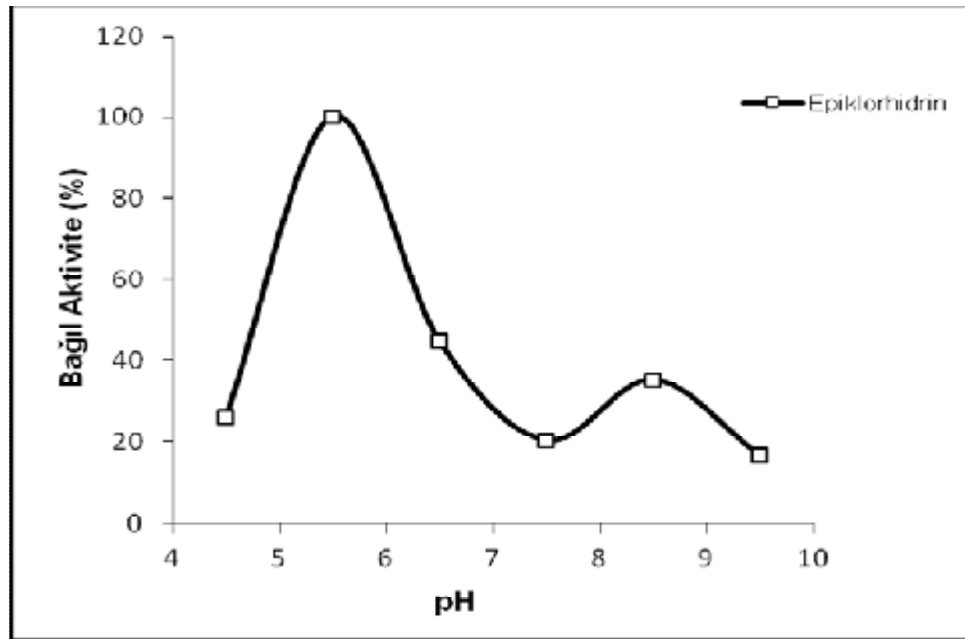
Şekil 4.20. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim

4.1.4. Üreazın Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular

Epiklorohidrin ile aktifleştirilen magnetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır. Bunun sonucunda magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu miktarı 400 $\mu\text{mol/g}$ destek olarak bulunmuştur. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarı %87,5 mg prot./g olarak belirlenmiştir.

4.1.4.1. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

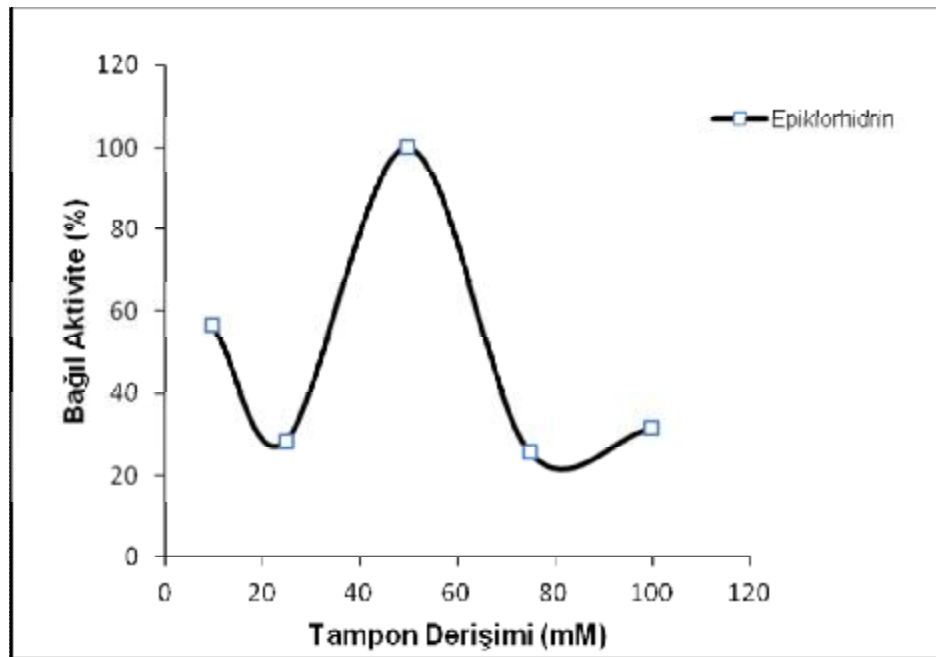
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesi farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 10 dakika sonunda oluşan azot miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.21). Şekil 4.21'de görüleceği gibi immobilize üreaz için optimum pH 5,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

4.1.4.2. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (5,5) ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 4.22). Şekil 4.22'de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.

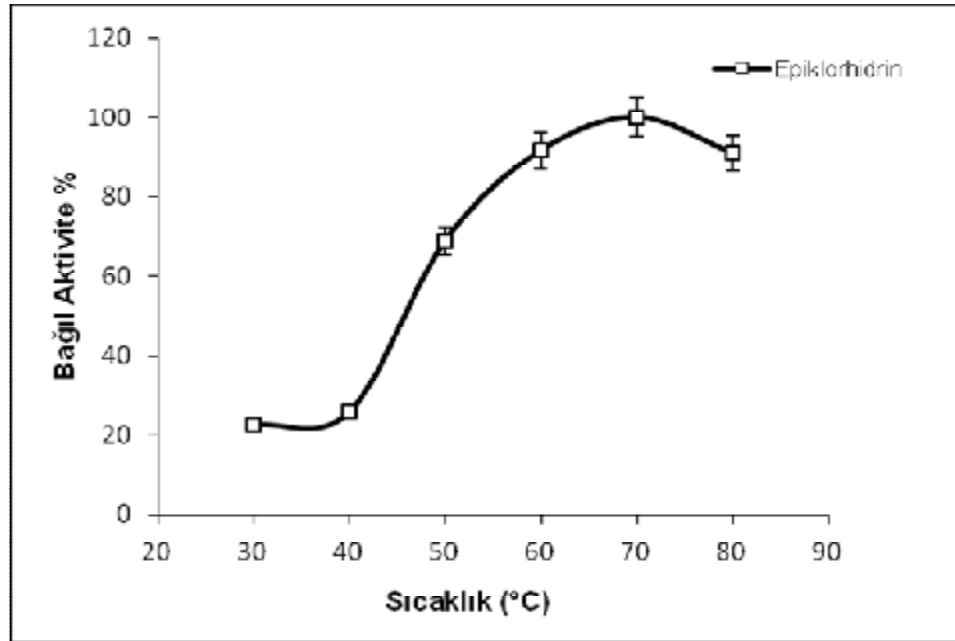


Şekil 4.22. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi

4.1.4.3. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin optimum pH'ı 5,5 ve tampon derişimi 50

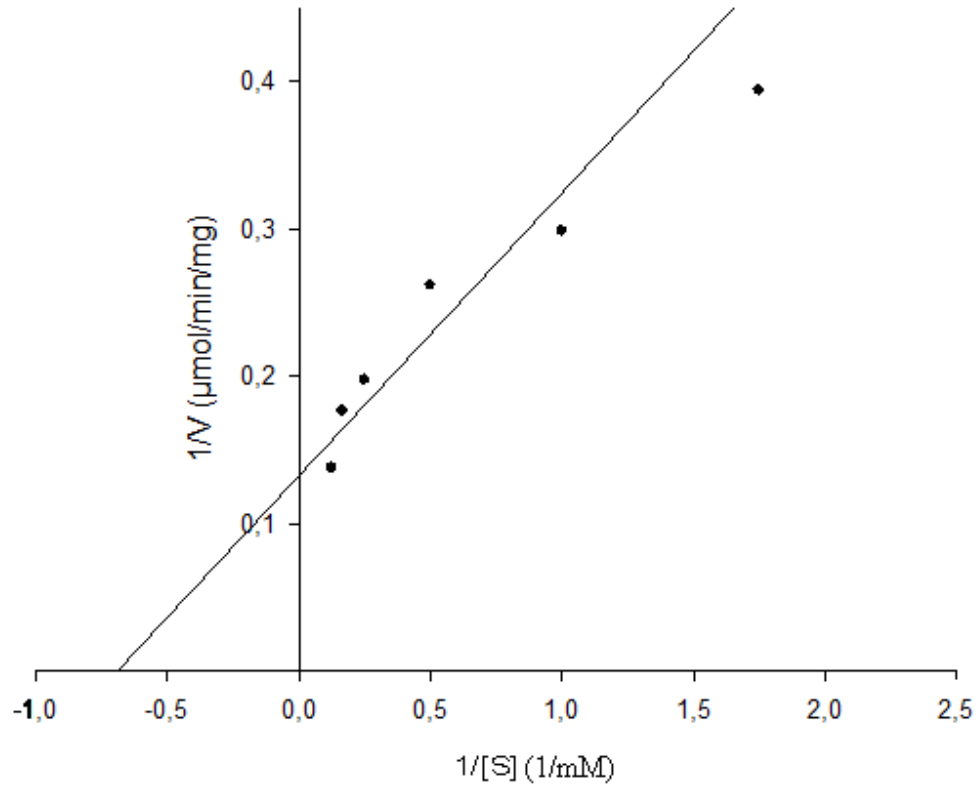
mM kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.23). Şekil 4.23’de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için sıcaklık 70°C olarak saptanmıştır. İmmobilize üreaz için aktivasyon enerjisi ise 36,6 kJ/mol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

4.1.4.4. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

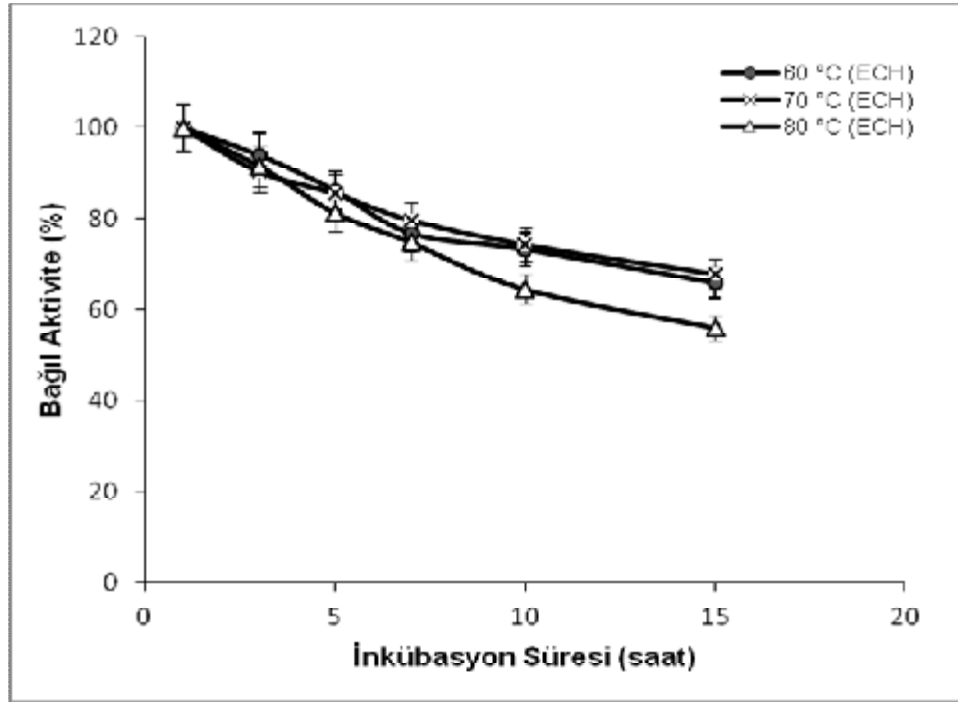
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğı çizilmiş (Şekil 4.24) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 1,5 mM, 7,6 U/mg protein, 4,142 dk⁻¹, 2,761 dk⁻¹M⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.24. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın Lineweaver-Burk grafiği

4.1.4.5. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

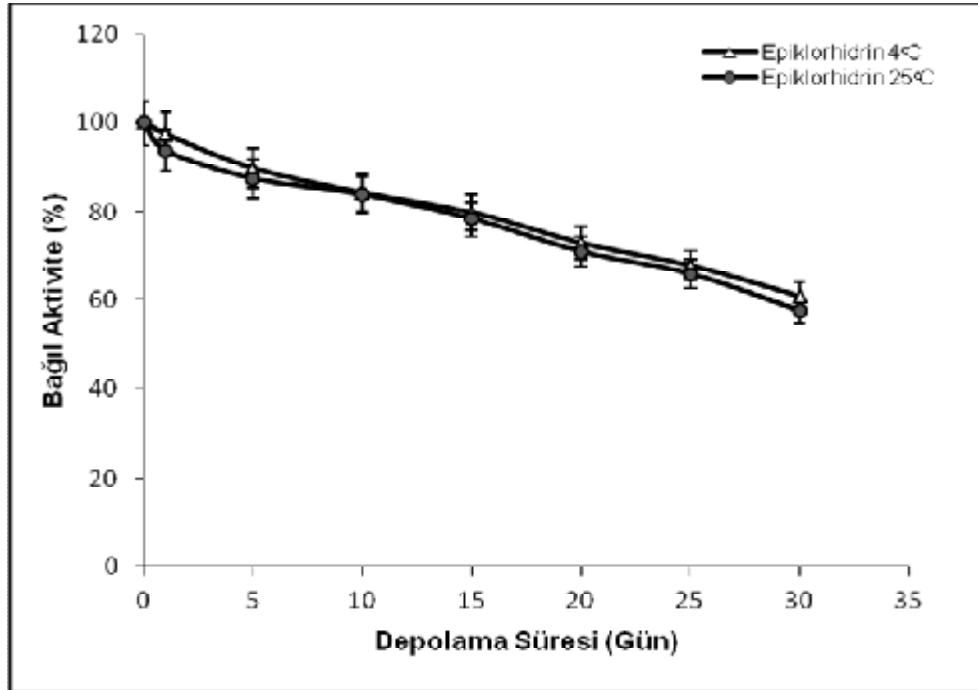
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın üç farklı sıcaklıkta (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.25). 15 saat inkübasyon süresi sonunda magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın 60, 70 ve 80°C'deki başlangıç aktivitelerini sırasıyla %65, %67 ve %56'sını koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.25. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 60, 70 ve 80°C’deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

4.1.4.6. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

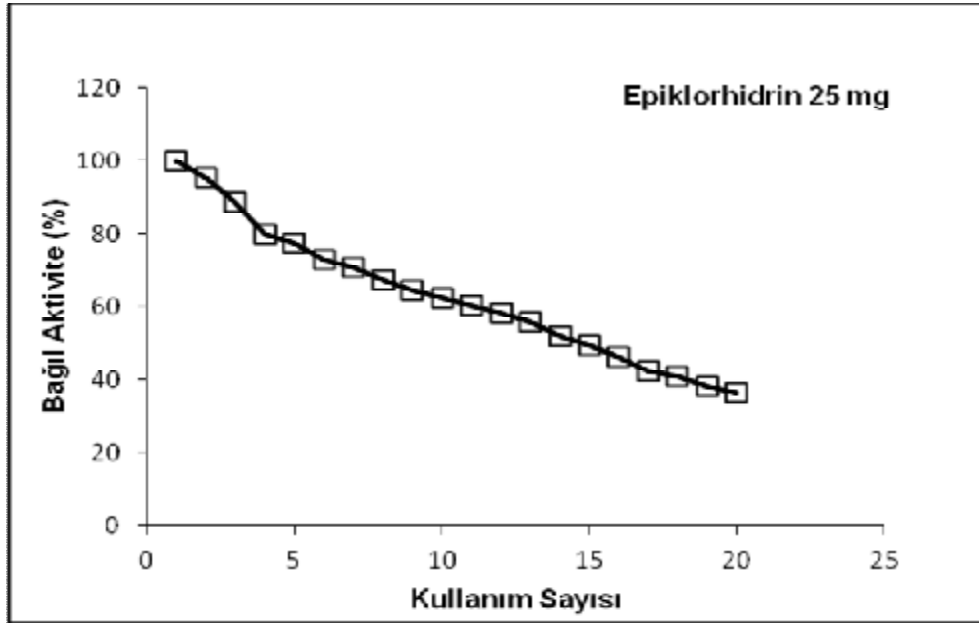
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında üreaz aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.26). Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın 4°C ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %60 ve %57’sini korudukları belirlenmiştir.



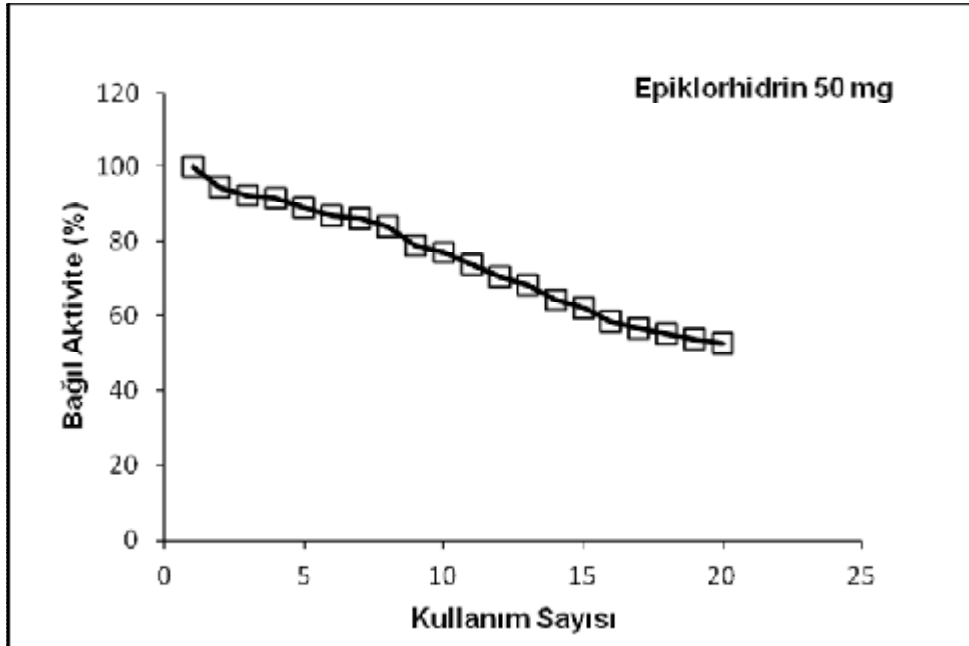
Şekil 4.26. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 4°C ve 25°C’deki depolama süresine bağlı olarak değişimi

4.1.4.7. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

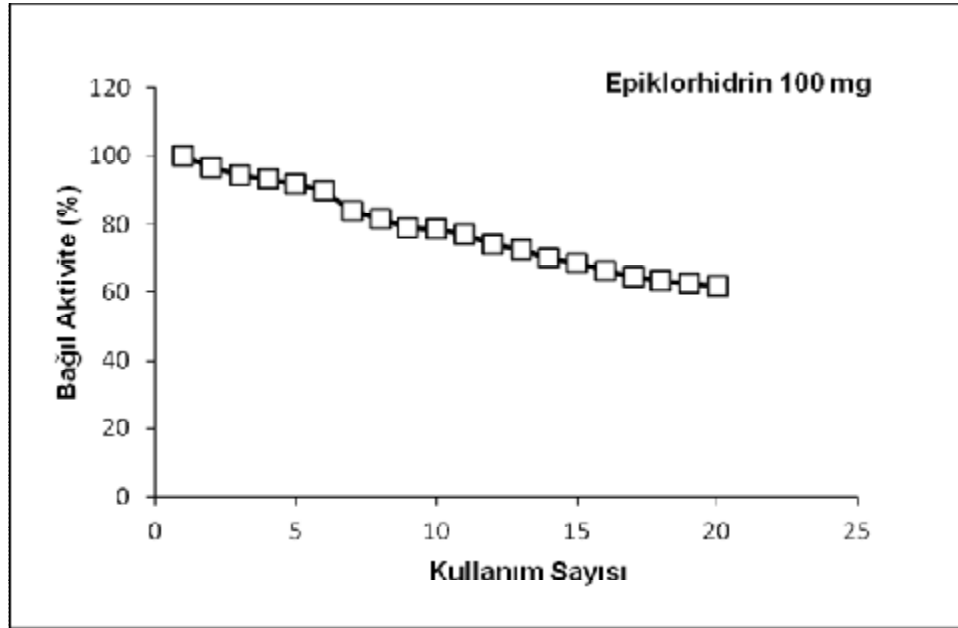
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir (Şekil 4.27, 4.28, 4.29). 25, 50 ve 100 mg örnekler alınarak 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın başlangıç aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla %36, %52 ve %61’ini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.27. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim



Şekil 4.28. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim

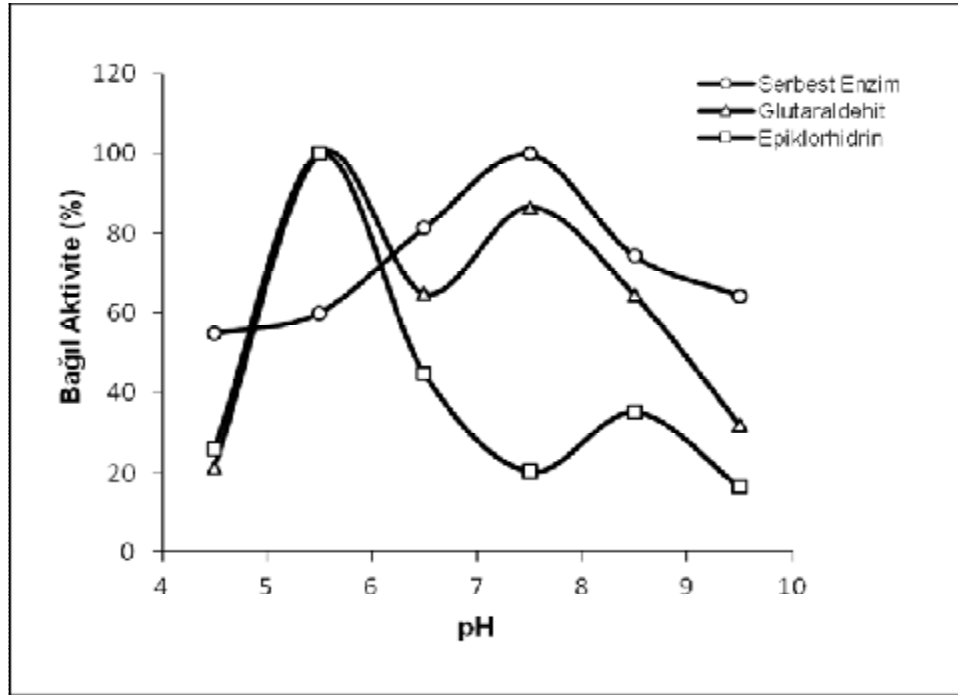


Şekil 4.29. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim

4.1.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitelerinin Birlikte Gösterimleri

4.1.5.1. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

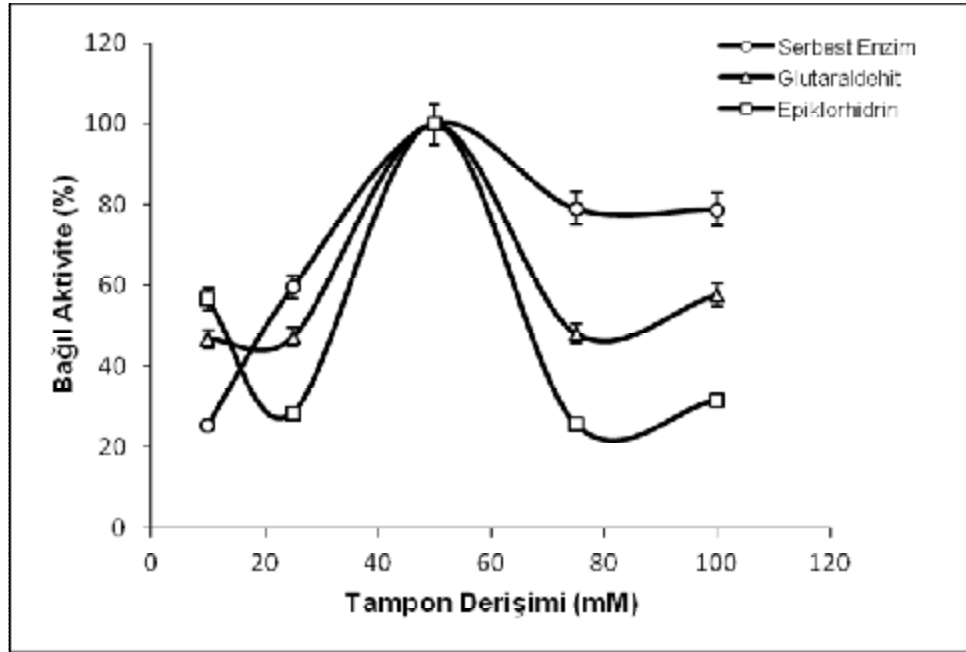
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri Şekil 4.30'de birlikte gösterilmiştir. Sırasıyla pH'lar 7,5-5,5 ve 5,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30 Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri

4.1.5.2. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine Tampon Derişimlerinin Etkisi İle İlgili Bulgular

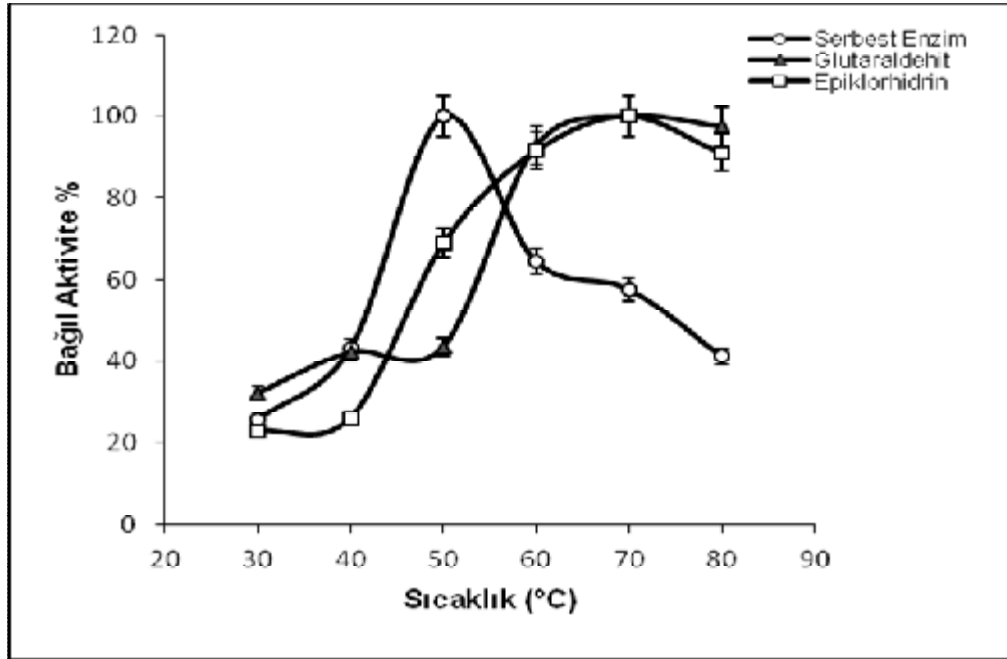
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerine belirlenmiş optimum pH'larda farklı tampon derişimlerinin etkisi şekil 4.31' de gösterilmiştir. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin tampon derişimlerine bağılı değışimleri

4.1.5.3. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağılı değışimleri Şekil 4.32’de birlikte gösterilmiştir. Şekil 4.32’den görülebileceğı gibi optimum çalışma sıcaklıkları sırasıyla 50, 70 ve 70°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri

4.1.5.4. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri

	K_m (mM)	V_{max} (U/mg prot.)	k_{cat} (dk ⁻¹)	k_{cat}/K_m (dk ⁻¹ M ⁻¹)
Serbest Enzim	0,5925	4,5	2,4525	4,139
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	5,2	26,2	14,279	2,746
İmmobilize Enzim (Epiklorohidrin Ara kolu)	1,5	7,6	4,142	2,761

4.1.5.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların üç farklı sıcaklıkta (60, 70 ve 80°C) 15 saat süreyle inkübe edilerek belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiş ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları

	Sıcaklık (°C)	% Bağıl Aktivite
Serbest Enzim	60	%77
	70	%48
	80	%29
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	60	%67
	70	%74
	80	%64
İmmobilize Enzim (Epiklorohidrin Ara kolu)	60	%65
	70	%67
	80	%56

4.1.5.6. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında kalan üreaz aktiviteleri ölçülmüştür. Kalan aktiviteleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları

	30 gün sonunda kalan aktiviteler	
	4 °C	25 °C
Serbest Enzim	%30	%23
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	%72	%71
İmmobilize Enzim (Epiklorohidrin Ara kolu)	%60	%57

4.1.5.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Üreazların Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıkları Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıkları

	Miktar (mg)	% Bağlı Aktivite
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	25	%37
	50	%53
	100	%57
İmmobilize Enzim (Epiklorohidrin Ara kolu)	25	%36
	50	%52
	100	%61

4.2. Tartışma

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Bu enzimin bağlı olarak ucuzluğu, dayanıklılığı, kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Baysal, 2000). Şimdiye kadar üreaz, birçok analitik ve biyomedikal amaç için immobilize edilmiştir. İmmobilize üreazın detoksifikasyon için kandan ürenin uzaklaştırılması, diagnostik amaçlı biyosensörlerde (Chang, 1976; Petersson, 1988; Yang ve Lin, 2001) ya da yapay karaciğer makinelerinin diyaliz yenileme sistemlerinde kullanıldığı bildirilmiştir (Krajewska ve ark., 1989). Ayrıca immobilize üreazın bioreaktör sistemi içerisinde atık sularda ürenin amonyak ve karbondioksit dönüştürülmesinde (George ve ark., 1997), ya da gıda endüstrisinde meşrubat ve yiyeceklerden ürenin uzaklaştırılması gibi işlemlerde kullanıldığı bildirilmiştir (Elçin, 1995; Amine ve ark., 2006). Üreazın immobilizasyonu için en çok kullanılan destekler karboksimetil selüloz, poliüretan, polivinil piridin, iyon değiştirici reçineler, polipropilen, stirendivinil benzen sayılabilir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda üreazın akrilonitril kopolimeri, poli(vinil alkol), Ca-aljinat, polianilin, PNIPAAm, kitosan-poli(glisidilmetakrilat) kopolimeri kullanılarak immobilize edildiği bildirilmiştir (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Rejikumar ve Devi, 1998; Laska ve ark., 1999; Chen ve Chiu, 2000; DeGroot ve Neufeld, 2001; Godjevargova ve Gabrovska, 2003). Bu çalışmada üreaz enzimi

magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize edilmiştir.

Magnetik nanopartiküller birlikte çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda sentezlenen maddenin büyük ölçüde Fe_3O_4 'den oluştuğu ancak diğer bazı demir oksit türlerini de kısmen içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca nano yapıların ortalama boyutunun 158.2 nm olduğu saptanmıştır.

Magnetik nanopartiküller 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve yüzeyinde primer amin grupları oluşturulmuştur. Primer amin grubu içeren desteklerin glutaraldehit ile muamele edilmesi ve sonrasında enzimin immobilizasyonu çoğu araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tükel ve Alptekin, 2004; Taylor ve ark., 2005; Alptekin ve ark., 2009). Destekte yapılan modifikasyonlardan sonra destekteki fonksiyonel grupların sayısı desteğe bağlanan enzim moleküllerinin miktarını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda 1 g destekte bulunan $-NH_2$ grubu miktarının 270 $\mu\text{mol/g}$ destek olup ve aktive edilen desteğin glutaraldehit ile muamelesi sonrasında primer amin grubunun %78'i glutaraldehit ile modifiye edilebilmektedir. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %63,7 mg prot./g olduğu belirlenmiştir. Lin ve Yang, (2003), üreaz enzimini poliakrilonitril boş liflerin yüzeyine hidroliz ve kovalent bağlama yöntemini kullanarak glutaraldehit ara kolu üzerinde immobilize etmişlerdir. Gabrovska ve ark., (2007), poli(akrilonitril)kitosan kompozit membranlara üreaz enzimini glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişler ve amino gruplarının miktarının kitosan konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Arıca, (2000), epoksi grubu taşıyan destek materyallerinin laboratuvar uygulamalarında ve geniş ölçekli kullanımlarda enzimin çok kolay tutuklanmasına olanak sağlayan malzemeler olduğunu, bu destek materyallerin depolama süresince kararlı olduklarını ve epoksi grubu taşıyan destek materyallerinin, ılımlı deney koşulları (pH 7,0) altında farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik) çok kararlı kovalent bağ oluşturabilmeleri nedeni ile enzim teknolojisi uygulamalarında önemli kullanım alanlarına sahip olduklarını bildirmiştir. Akkaya, (2006), poli (akrilamit-ko-akrilikasit)/polietilenimin ve poli (metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) desteklerini

epiklorohidrin ile, Şahin, (2007), poli(metilmetakrilat-2-hidroksietilmetakrilat) P(MMA-HEMA) mikroboncuklarını epiklorohidrin ile aktifleştirmiştir. Axen ve ark., (1975), modifiye agaroz jeli epiklorohidrin ile aktifleştirmiş ve 0,15 mL/3 g jel süspansiyon içerisinde 310 µmol/g epoksi grubu bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu miktarı 400 µmol/g destek olarak bulunmuştur. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %87,5 mg prot./g olduğu belirlenmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri Şekil 4.30'da birlikte gösterilmiştir. Sonuçlar üreazın magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu ile maksimum aktivitenin asidik pH'ya (5,5) doğru kaydığını göstermektedir. Literatürde poli(hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat) filmde yapılan üreaz immobilizasyon çalışmalarında serbest üreazın optimum pH'sının 7,0 olduğu ve immobilize üreazın optimum pH'sının asidik bölgeye doğru (pH 6,0) kaydığı veya optimum pH'ın değişmediği bildirilmiştir (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Bayramoğlu ve ark., 2003). Godjevargova ve Dimov, (1997), yaptıkları çalışmada üreazı diakrilamido-2-metilpropansülfonik asit (AMPSA) ve 2-dimetilaminoetilmetakrilat (DMAEM) modifiye membranlarına immobilize etmişlerdir ve AMPSA membrana immobilize edilen üreazın optimum pH'sının alkali değerlere (pH 7'den - pH 7,5'e) doğru, DMAEM için ise tam tersi yönünde bir kayma gösterdiğini bildirmişlerdir. Sahoo ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada PMIDA ile modifiye edilmiş magnetik nanopartiküllere immobilize edilmiş üreazın pH 8,0'de maksimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Şekil 4.31'de görüldüğü gibi serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir. Literatürlerde tampon derişiminin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı derişimlerde tampon çözeltiler kullanılmıştır. Sahoo ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada 0,01 M'lık fosfat tamponu, Mulagalapalli ve ark., (2007), ise 0,05 ve 0,025 M'lık tris asetat tamponu kullandıklarını bildirmişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri Şekil 4.32’de birlikte gösterilmiştir. Şekil 4.34’de görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar sırasıyla 50, 70 ve 70°C olarak belirlenmiştir. Bayramoğlu ve ark., (2005), poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-N-metakrilol-L-histidinmetilester) mikrokürelere immobilize ettikleri üreaz için optimum sıcaklığı 50°C olarak bildirmişlerdir. Godjevargova ve Dimov, (1997), 2-metilaminoetilmetakrilat ile modifiye edilmiş akrilonitril kopolimerden hazırlanmış membran üzerine immobilize ettikleri üreazın optimum sıcaklığının 45°C, Fahmy ve ark., (1998), ise dietilaminoetil-sellüloza immobilize edilen *Citrullus vulgaris* üreazı için optimum sıcaklığın 65°C olduğunu bildirilmişlerdir.

Serbest üreaz ve immobilize edilen üreazlar için aktivasyon enerjileri sırasıyla 55,2 kJ/mol, 26,3 kJ/mol (GA), 36,6 kJ/mol (ECH) olarak belirlenmiştir. El-Sherif ve ark., (2001), yaptıkları çalışmada naylon membranlar üzerine kimyasal aşılama yöntemi ile üreaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve aktivasyon enerjisini serbest enzim için 5,90 kcal mol⁻¹, immobilize enzimi için ise 9,10 kcal mol⁻¹ olduğunu belirlemişlerdir. Kumar ve ark., (2009), aktivasyon enerjilerinin serbest enzim, kitosan ve aljinat üzerine immobilize üreazlar için sırasıyla 3,68 kcal mol⁻¹, 5,02 kcal mol⁻¹, 6,45 kcal mol⁻¹ olduğunu bildirmişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Çizelge incelendiğinde görülebileceği gibi K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla (0,5925 mM, 4,5 U/mg prot., 2,4525 dk⁻¹ 4,139 dk⁻¹M⁻¹), (5,2 mM, 26,2 U/mg prot., 14,279 dk⁻¹, 2,746 dk⁻¹M⁻¹), (1,5 mM, 7,6 U/mg prot., 4,142 dk⁻¹, 2,761 dk⁻¹M⁻¹) olarak belirlenmiştir. Üreaz enziminin glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinde magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu K_m ve V_{max} değerlerinin arttığı görülmektedir (Çizelge 4.1). İmmobilizasyon işlemi sonucunda yaklaşık %63,7 mg prot./g ve %87,5 mg prot./g bağlanma olmasına rağmen aktivitenin daha düşük olduğu görülmüştür. Glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m

(2,746dk⁻¹M⁻¹) ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m (2,761 dk⁻¹M⁻¹) oranları serbest üreazın k_{cat}/K_m (4,139 dk⁻¹M⁻¹) oranına göre yaklaşık 1,5 kat azalmıştır. İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları serbest enzime göre farklılık gösterir. İmmobilize enzimin K_m değerindeki artış, aktif bölgeye substrat afinitesindeki azalışı ifade etmektedir. Substrat afinitesindeki bu düşüşün sebepleri, immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin konformasyonel esnekliğinin azalışına, taşıyıcının yarattığı sterik engellere ve difüzyonel dirence bağlanabilir (Mulagalapoli ve ark., 2007; Sahoo ve ark., 2011). Baran, (2008), serbest enzimle karşılaştırıldığında aljinata immobilize olan üreazın K_m değerinde bir artış olduğunu rapor etmiştir. Serbest enzimin K_m , V_{max} , değerlerini sırasıyla 0,18 mM ve 121,9 U/mg, aljinata immobilize edilen üreazın K_m , V_{max} , değerlerini sırasıyla 2,18 M ve 33,3 U/mg, PLL kaplı aljinata immobilize edilen üreazın K_m , V_{max} , değerlerini ise sırasıyla 1,85 mM ve 25,77 U/mg olarak bildirmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın farklı sıcaklıklardaki (60, 70 ve 80°C) ve inkübasyon süresinde kalan aktivite miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 4.16 ve 4.25). Şekillerden de görülebileceği gibi 60, 70 ve 80°C de glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilen üreaz 15 saat sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %67, %74 ve %64'ünü, epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize edilen üreaz ise sırasıyla %65, %67 ve %56 oranında korumaktadır. Serbest enzimin ise 60, 70 ve 80°C de 15 saat sonunda başlangıç aktivitesinin ancak %77, %48 ve %29' unu koruduğu belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde görülebileceği gibi sıcaklığın artmasıyla serbest enzimin katalitik veriminde azalma varken immobilize üreazın aktivitesi artmıştır. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize üreazların termal karalılıklarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Baran, (2008), poli-L-lizin (PLL) kaplı immobilize enzimin optimum deney koşullarında bir saat sonunda 70°C'de aktivitesinin %60'ını koruduğunu, aynı koşullarda serbest üreazın aktivitesine bakıldığında %90 oranında aktivite kaybı olduğunu rapor etmiştir. Enzimin konformasyonel yapısı immobilizasyondan etkilenir. Bu konformasyonel sınırlamalardan dolayı, immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek termal

kararlılığa sahiptir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir yada hiç değişmez. Genellikle kovalent bağlı, suda çözünmez enzimlerin ısıya ve denatüre edici ajanlara karşı serbest forma göre daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Literatürde immobilize üreazın termal kararlılık çalışmalarında, 40°C'ye kadar % bağıl aktivitesini koruduğu, 65°C gibi yüksek sıcaklıklarda ise serbest enzim %87 aktivite kaybederken, immobilize enzimlerin %48 aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Bayramoğlu ve ark., 2003).

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın depolama kararlılıklarını belirlemek amacıyla 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. Kalan aktivitelerin sırasıyla (%30, %23), (%72, %71), (%60, %57) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi immobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize olan üreazın epiklorohidrin ara koluna kıyasla daha iyi depolama kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde immobilize üreazın çok iyi depolama kararlılığına sahip olduğunu bildirilmiştir (Krajewska ve Leszko, 1990). (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Laska ve ark., 1999), üreaz enzimini kitosan-poli(glisidil metakrilat) (GMA) desteğine epoksi gruplar üzerinden kovalent olarak bağlayarak immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve immobilize enzimin 60 gün sonunda 4°C'de %73, 25°C'de %58,05 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Örnek, (2009), üreaz enziminin Ca-Alginat üzerine immobilizasyonunda depolama kararlılığı araştırmış ve depolama kararlılığının serbest enzime göre arttığını bildirmiştir. Marzadori ve ark., (1998), hidroksiapatit üzerine adsorbe ederek immobilize ettikleri jack bean üreazının depolama kararlılığına bakmışlar ve immobilize üreazın aktivitesini %60 oranında koruduğunu, serbest enzimin ise 4. gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini rapor etmişlerdir.

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıkları Çizelge 4.4'de verilmiştir. 25, 50 ve 100 mg için 20 kullanımdan sonra kalan aktiviteleri

başlangıç aktivitesinin yaklaşık sırasıyla (%37, %53, %57), (%36, %52, %61) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada immobilize üreazın serbest üreaza kıyasla tekrar kullanım kararlılığının daha iyi olduğu, her iki ara kolun tekrar kullanım kararlılığının birbirine yakın olduğu saptanmıştır. İmmobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi enzimin endüstride kullanılması açısından önemli bir faktördür. Artan kararlılık immobilize enzimi serbest enzimden daha avantajlı hale getirmektedir (Lei ve ark., 2007). İmmobilize üreazın çok iyi tekrar kullanımına sahip olduğunu bildirmiştir (Krajewska ve Leszko, 1990). Baran Teke, (2008), aljinat boncukta ve Poli-L-lizin (PLL) kaplı aljinat boncukta immobilize edilen üreazın tekrar kullanılabilirliğini araştırmış ve PLL kaplı aljinat boncukta immobilize edilen üreazın aktivitesinin ilk üç ölçümde değişmediğini, üçüncü ölçümden sonra azalma gösterdiğini, 12. ölçüm sonrası başlangıç aktivitesinin %88'nini, 20. ölçümde %68'ini koruduğunu, aljinatta ise 12. ölçüm sonrası enzimin başlangıç aktivitesinin %53'ünü koruduğunu bildirmiştir. Lin ve Yang, (2003), poliakrilonitril boş liflerin yüzeyine hidroliz ve kovalent bağlama yöntemini kullanarak glutaraldehit ara kolu üzerinde immobilize edilen üreazın 15. yeniden kullanım sonrasında aktivitesinin %86'sını koruduğunu bildirmişlerdir.

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

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Üreaz enziminin Fe_3O_4 magnetik nanopartiküllerine farklı ara kollar üzerinden kovalent olarak immobilizasyonunu hedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumları alınarak fonksiyonel grupların varlığı araştırılmış, XRD kullanılarak yapı analizi yapılmıştır. Sentezlenen maddenin büyük ölçüde Fe_3O_4 'den oluştuğu ancak diğer bazı demir oksit türlerini de kısmen içerdiği tespit edilmiştir. SEM mikroskobu kullanılarak nano yapıların boyut analizi yapılmış ve ortalama boyutun 158,2 nm olduğu bulunmuştur.
2. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların maksimum aktivite gösterdikleri pH'lar sırasıyla 7,5, 5,5 ve 5,5 olarak belirlenmiştir.
3. Serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir. Serbest üreaz ve immobilize edilen üreazlar için aktivasyon enerjileri sırasıyla 55,2 kJ/mol, 26,3 kJ/mol GA, 36,6 kJ/mol ECH olarak belirlenmiştir.
4. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların optimum sıcaklıkları sırasıyla 50, 70 ve 70°C olarak belirlenmiştir.
5. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri serbest enzim için sırasıyla 0,5925 mM, 4,5 U/mg prot., 2,4525 dk⁻¹ 4,139 dk⁻¹M⁻¹, glutaraldehit ara

kolu için 5,2 mM, 26,2 U/mg prot., 14,279 dk⁻¹ , 2,746 dk⁻¹M⁻¹, epiklorohidrin ara kolu için 1,5 mM, 7,6 U/mg prot., 4,142 dk⁻¹ , 2,761 dk⁻¹M⁻¹ olarak belirlenmiştir.

6. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz farklı sıcaklıklarda (60, 70 ve 80°C) inkübe edilmiş ve 15 saat sonundaki kalan aktiviteleri serbest enzim için sırasıyla (%77, %48, %29), glutaraldehit ara kolu için (%67, %74, %64) ve epiklorohidrin ara kolu için (%65, %67, %56) olarak belirlenmiştir.
7. Immobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize olan üreazın epiklorohidrin ara koluna kıyasla daha iyi depolama kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir.
8. Yapılan çalışmada glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıklarının birbirine yakın olduğu saptanmıştır.

5.2. Öneriler

1. Tıp, tarım ve endüstriyel alanlarda geniş uygulamaları olan üreaz enziminin farklı magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu araştırılabilir.
2. Endüstriyel önemi olan enzimlerin magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu incelenebilir.
3. Daha etkin ve daha ekonomik kullanılabilmesi için daha farklı koşullar araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- AKGÖL, S., YALÇINKAYA, Y., ARICA, Y., 2002. Reversible Immobilization of Urease. *Process Chemistry*, 38:675-683.
- AKKAYA, B., 2006. Poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/Polietilenimin ve Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) Destekleri Kullanılarak Kolesterol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu. G.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 76s.
- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ve ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and Properties of Catalase Immobilized onto Controlled Pore Glass and Its Application in Batch and Plug-Flow Type Reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:124-131.
- ALPTEKİN, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 219s.
- ALSOY ALTINKAYA, S., YEMENİCİOĞLU, A., YÜREKLİ, Y., 2008. Enzim İmmobilize Edilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu: Membran Performanslarının Belirlenmesi. TÜBİTAK-105M325, İzmir, 101s.
- AMINE, A., MOHAMMADI, H., BOURAIS, I., and PALLESCHI, G., 2006. Enzyme Inhibitionbased Biosensors for Food Safely and Environmental Monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:1406-1423.
- ARICA, M.Y., 2000. Epoxy-derived pHEMA Membrane for Use Bioactive Macromolecules Immobilization: Covalently Bound Urease in a Continuous Model System. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(9):2000-2008.
- AXEN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J., 1975. Preparation of Modified Agarose Gels Containing Thiol Groups. *Acta Chemica Scandinavica B*, 29:471-474.
- BAHULEKAR, R., AYYANGAR, N.R., PONRATHNAM, S., 1991. Polyethyleneimine in Immobilization of Biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology*, 13:858-868.
- BARAN T.A., 2008. Farklı Yöntemlerle Üreaz/Alanindehidrogenaz Enzim Çiftinin İmmobilizasyonu ve Sistemin Kan Üre Düzeyini Düşürebilme Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 162s.

- BALASUBRAMANIAN A., and PONNURAJ K., 2010. Crystal Structure of The First Plant Urease From Jack Bean: 83 Years of Journey From Its First Crystal to Molecular Structure. *Journal of Molecular Biology*, 400:274–283.
- BAYSAL, H., 2000. Üreaz İçeren Enzim Komplekslerinin Hazırlanması ve Kullanım Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 110s.
- BAYRAMOĞLU, G., ALTINOK, H., BULUT, A., 2003. Preparation and Application of Spacer-arm-attached Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-Glycidyl methacrylate) Films for Urease Immobilization. *Reactive & Functional Polymers*, 56:111-121.
- BAYRAMOĞLU, G., YALÇIN, E., ARICA, M.Y., 2005. Immobilization of Urease Via Adsorption onto L-histidine-Ni (II) Complexed Poly (HEMA-MAH) Microspheres: Preparation and Characterization. *Process Biochemistry*, 40:3505-3513.
- BAYRAMOĞLU, G., LOĞOĞLU, E., ARICA, M.Y., 2007. Cytochrome c Adsorption on Glutamic Acid Ligand Immobilized Magnetic Poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) Beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 297:55-62.
- BAYRAMOĞLU, G., TUNALI, Y., ARICA M.Y., 2007. Immobilization of β -galactosidase onto Magnetic Poly (GMA-MMA) Beads for Hydrolysis of Lactose in Bed Reactor. *Catalysis Communications*, 1094-1101.
- BIO030E, 2008. Enzyme for Industrial Applications. Focus on Catalysts, 4:2.
- BICKERSTAFF, G.F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, New Jersey, 449p.
- BORATYNSKI, J., and ZAL, T., 1990. Colorimetric Micro Methods for Glutaraldehyde Determination by Means Phenol and Sulfuric Acid or Perchloric Acid. *Analytic Biochemistry*, 184:259-262.
- BOY M., DOMINIK A., VOS H., 1999. Fast Determination of Biocatalyst Process Stability. *Process Biochemistry*, 34:535-547.
- BRENA, B., RYDEN, L., PORATH, J., 1994. Immobilization of β -galactosidase on Metal-chelated-substituted Gels. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 19:217-231.

- BLAKELEYAND, R. L., ZERNER, B., 1984. Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme. *Journal of Molecular Catalysis*, 23:263-292.
- CAO, L., VAN LANGENY, L., and SHELDON, R.A, 2003. Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:387-394.
- CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kgaa, Weinheim, 580p.
- CHANG, T.M.S., 1976. Microencapsulation of Enzymes and Biologicals. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 201–218.
- CHELLAPANDIAN, M., and KRISHNAN, M.R.V., 1998. Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) Copolymer for Immobilization of Urease. *Process Biochemistry*, 33:595-600.
- CHEN, J., and CHIU, S., 2000. Poly(N-isopropylacrylamide-co-Nacryloxysuccinimide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) Composite Hydrogel Membrane for Urease Immobilization to Enhance Urea Hydrolysis Rate by Temperature Swing. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:359-367.
- CHEN-XIAO, W., YAN, Z., YU-CONG, W., and XIA-HAI, W., 2012. Preparation and Characterization of Magnetic Fe₃O₄/CRGO Nanocomposites for Enzyme Immobilization. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22:162-168.
- CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:204-210.
- CHIBATA, I., 1978. Immobilized Enzymes. Research and Development. Kodansha, Tokyo, 284p.
- CIURCI, S., BENINI, S., MANGANA, S., 1999. Structural Properties of Nickel Ions in Urease. *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192:331-335.
- CREMONESI, P., and ANGIURO, L.D, 1983. Kinetic and Thermal Characteristics of Enzyme-Graft Copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(3):735-744.

- COŞKUN, G., 2007. Glutatiyon-S-Transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 118s.
- DEGROOT, R.A., and NEUFELD, J.R., 2001. Encapsulation of Urease in Alginate Beads and Protection from Chymotrypsin with Chitosan Membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:321-322.
- DI MARTINO, S., EL-SHERIFF, H., DIANO, N., MAIO, A.D., GRANO, V., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., MATTEI, A., MITA, D.G., 2003. Urea Removal from Agricultural Waste Waters by Means of Urease Immobilized on Nylon Membranes Grafted with Cyclohexyl-methacrylate. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46:613-629.
- EL-SHERIF, H., MARTELLI, P.L., CASADIO, R., PORTACCIO, M., BENCIVENGA, U., MITA, D.G., 2001. Urease Immobilization on Chemically Grafted Nylon Membranes Part 1: Isothermal Characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14:15–29.
- ELÇİN, Y.M., 1995. Encapsulation of Urease Enzyme in Xanthan-Alginate Spheres. *Biomaterials*, 16:1157-1161.
- FAHMY, A.S., BAGOS, V.B., MOHAMMED, T.M., 1998. Immobilization of Citrullus Vulgaris Urease on Cyanuric Chloride DEAE-Cellulose Ether: Preparation and Properties. *Bioresource Technology*, 64:121-129.
- FOLLMER, C., 2008. Insights into The Role and Structure of Plant Ureases. *Phytochemistry*, 69:18–28.
- GABROVSKA, K., GEORGIEVA, A., GODJEVARGOVA, T., STOILOVA, O., and MANOLOVA, N., 2007. Poly(acrylonitrile)chitosan Composite Membranes for Urease Immobilization. *Journal of Biotechnology*, 129:674–680.
- GABROVSKA, K., IVANOV, J., VASILEVA, I., DIMOVA, N., GODJEVARGOVA, T., 2011. Immobilization of Urease on Nanostructured Polymer Membrane and Preparation of Urea Amperometric Biosensor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48:620–626.

- GEORGE, S., CHELLAPANDIAN, M., SIVASANKAR, B., and JAYARAMAN, K., 1997. A New Process for The Treatment of Fertilizer Effluent Using Immobilized Urease. *Bioprocess Engineering*, 16:83-85.
- GODJEVARGOVA, T.S., DIMOV, A., 1997. Immobilization of Urease onto Membranes of Modified Acrylonitrile Copolymer. *Journal of Membrane Science*, 135:93-98.
- GODJEVARGOVA, T., GABROVSKA, K., 2003. Immobilization of Urease onto Chemically Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. *Journal of Biotechnology*, 103:107-111.
- GUISAN, J.M., 2006. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, New Jersey, 449p.
- JIA, H., ZHU, G., WANG, P., 2003. Catalytic Behaviour of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility. *Biotechnology and Bioengineering*, 84:406-414.
- KAGEDAL, L., 1998. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Purification*, pp:311-342.
- KARA, F., 2006. Üreazın Aljinat-kitosan Polielektrolit ve Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/κ-karragenan İnterpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu. G.Ü. Doktora Tezi, 59s.
- KAYASTHA, A.M., and DAS, N., 1999. A Simple Laboratory Experiment for Teaching Enzyme Immobilization with Urease. *Biochemical Education*, 27:114-117.
- KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. and SCOUTEN, W.H., 1983. Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry (W. H., SCOUTEN). *Chemical Analysis*, John Wiley and Sons, New York, 253-392 p.
- KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F., YILMAZ, H., 1998. Enstrümental Analiz İlkeleri (D. A., SKOOG editör). Bilim Yayıncılık, Ankara. 850s.
- KLABUNDE, K. J., STARK, J., KOPER, O., MOHS, C., PARK, D. G., DECKER, S., JIANG, Y., LAGADIC, I., ZHANG, D., 1996. Nanocrystals As Stoichiometric Reagents With Unique Surface Chemistry. *Journal of Physical Chemistry*, 100:12142-12153.

- KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts Science. 219:722-727.
- KOCH, C.C., 2000. Nanostructured Materials. Processing, Properties and Potential Applications. Noyes Publications William Andrew Publishing: New York, 612p.
- KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., and ZABORSKA, W., 1989. Membrane-Immobilized Urease for Possible Use in Dialysate Regeneration System of Artificial Kidney. Environmental Protection Engineering, 15:173-180.
- KRAJEWSKA, B., and LESZKO, M., 1990. Urease Immobilization on Aminated Butyl Acrylate Ethylenedimethacrylate Copolymer. Die Angewandte Makromolekularen Chemie, 179:21-33.
- KRAJEWSKA, B., ZABORSKA, W., LESZKO, M., 2001. Inhibition of Chitosan-Immobilized Urease by Slow-Binding Inhibitors: Ni^{2+} , F^- and Acetohydroxamic Acid. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 14:101-109.
- KUMAR, S., DWEVEDI, A., KAYASTHA, M.A., 2009. Immobilization of Soybean (*Glycine max*) Urease on Alginate and Chitosan Beads Showing Improved Stability: Analytical Applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:138–145.
- LASKA, J., WLODARCZYK, J., ZABORSKA, W., 1999. Polyaniline as a Support for Urease Immobilization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 6:549-553.
- LEI, Z., BI, S., HU, B., YANG, H., 2007. Combined Magnetic and Chemical Covalent Immobilization of Pectinase on Composites Membranes Improves Stability and Activity. Food Chemistry, 889-896.
- LI, L., FAN, M., BROWN, R.C., LEEUWEN, J.V., WANG, J., WANG, W., SONG, Y., ZHANG, P., 2006. Synthesis, Properties, and Environmental Applications of Nanoscale Iron-Based Materials: A Review, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 36:405–431.

- LIN, C., YANG, M., 2003. Urea Permeation and Hydrolysis Through Hollow Fiber Dialyzer Immobilized with Urease: Storage and Operation Properties. *Biomaterials*, 24:1989-1994.
- LOWRY, O.H., ROSENBAUGH, N., FARR, L., and RANDALL, R., 1951. Protein Measurement with Theophilin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 183:265–275.
- LUISI, P.L. and MAGID, L.J., 1986. Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20(4):409–474.
- MARZADORI, C., MILETTI, S., GESSA, C., and CIURLI, S., 1998. Immobilization of Jack Bean Urease On Hydroxyapatite: Urease Immobilization in Alkaline Soils. *Soil Biology Biochemistry*, 30:1485-1490.
- MESSING, R.A., 1976. Adsorption and Inorganic Bridge Formations. *Methods in Enzymology*, 44:148-169.
- MULAGALAPALLI, S., KUMAR, S., KALATHUR, R.C.R., KAYASTHA, M.A., 2007. Immobilization of Urease from Pigeonpea (*Cajanus cajan*) on Agar Tablets and Its Application in Urea Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142:291–297.
- NELSON, D.L., and COX, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. (NEDRET, K. editör). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 1152s.
- NELSON, J.M., and GRIFFEN, E.G., 1916. Adsorption of Invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38:1109–1115.
- ÖRNEK, A.D., 2009. Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. A.D.Ü. Yüksek Lisans Tezi, 52s.
- ÖZTÜRK, N., 2006. Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu. A.D.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 116s.
- ÖZTÜRK, T., 2009. Lipaz Enziminin Polivinil Alkol (PVA) Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Organik Çözümlerde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 113s.

- PETERSSON, B. A., 1988. Enzymatic Determination of Urea in Undiluted Whole Blood by Flow Injection Analysis Using an Ammonium Ion-Selective Electrode. *Analytica Chimica Acta*, 209:239-248.
- POLAT, G., 2007. Aşı Polimerlerinde Üreaz-Alanin Dehidrogenaz Enzim Çiftinin İmmobilizasyonu ve Sistemin Üreyi Alanine Dönüştürme Yeteneğinin Araştırılması. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 145s.
- PORTAKAL, O., 2008. Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller. *Turkish Journal Biochemistry*, 33(1):35-38.
- PORATH, J., 1992. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification*, 3:263-281.
- POZNIAK, G., KRAJEWSKA, B., and TROCHIMCZUK, W., 1995. Urease Immobilized on Modified Polysulphone Membrane: Preparation and Properties. *Biomaterials*, 16:129–134.
- RAO, M.S., CHELLAPANDIAN, M., and KRISHNAN, M.R.V., 1995. Immobilization of Urease on Gelatin-Poly(HEMA) Copolymer Preparation and Characterization. *Bioprocess Engineering*, 13:211–214.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635.
- REGEN, S.L., SINGH, M., and SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilization of α -Chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 119:646–651.
- REJIKUMAR, S., DEVI, S., 1998. Preparation and Characterization of Urease Bound on Crosslinked Poly(Vinyl Alcohol). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4:61-66.
- REXOVA-BENKOVA, L., OMELKOVA, J., and KUBANEK, V., 1982. Endo-d-Galacturonanase Immobilized by Adsorption on Porous Poly(Ethylene terephthalate). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 47:2716-2723.

- SAHOO, B., KUMAR SAHU, S., and PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method for The Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69:95–102.
- STEFANO, B., 2000. Structure and Function Relationship of Urease and Cytochrome c-553 From *Bacillus Pasteurii*. A Thesis The Degree of Doctor of Philosophy, The University of York Faculty of Science, 16–36.
- ŞAHİN, 2007. Poli(Metil Metakrilat-2-Hidroksietil Metakrilat) Mikroboncuklarına Kovalent Bağlanma ile Glukoz İzomerazın İmmobilizasyonu. G.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 95s.
- ŞENEL, M., COŞKUN, A., ABASIYANIK, M.F., and BOZKURT, A., 2010. Immobilization of Urease in Poly(1-vinyl imidazole)/Poly(acrylic acid) Network. *Chemical Papers*, 64:(1)-1-7.
- TAKISHIMA, K., SUGA, T., and MAMIYA, G., 1988. The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, 175:151-165.
- TAYLOR, R., FOURNIER, S.M., SIMONS, B.L., KAPLAN, H., and HEFFORD, M.A., 2005. Covalent Protein Immobilization on Glass Surfaces: Application to Alkaline Phosphatase. *Journal of Biotechnology*, 118:265–269.
- TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21–27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye, 446s.
- TÜKEL, S.S., ve ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate, *Process Biochemistry*, 39(12): 2149-2155.
- TÜKEL, S.S., ve ALPTEKİN, Ö., 2007. Aktifleştirilmiş Florisil Desteğine Katalazın Aspartik Asit ve Glutamik Asit Ara Kolları Üzerinden İnhibitörleri veya Aktivatörleri Varlığında Kovalent İmmobilizasyonunun Araştırılması. Proje.
- TWYMAN, R.M., 2005. Immobilized Enzymes. *Encyclopedia of Analytical Science*, 523-529.
- WANG, S.S., 1993. Chemistry of Protein Congutition and Cross Linking. CRC Press, Boca Raton. USA.
- WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. *Methods of Enzymology*, 44:134-148.

- WISEMAN, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.
- WISEMAN A., 1995. Handbook of Enzyme Biotechnology. TJ Press Ltd., Cornwall, UK, 465-466.
- WOODWARD, J., 1985. Immobilized Enzymes: Adsorption and Covalent Coupling, Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.
- VALENZUELA, R., FUENTES, M.C., PARRA, C., BAEZ, J., DURAN, N., SHARMA, S.K., KNOBEL, M., FREER, J., 2009. Influence of Stirring Velocity on The Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe_3O_4) by The Co-Precipitation Method. Journal of Alloys and Compounds, 488:227-231.
- YANG M. C., and LIN C.C., 2001. Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease. Biomaterials, 22(8):91-99.
- YILDIRIM, D., 2010. Mucor Miehei ve Pseudomonas SP Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu ve İmmobilize Lipazın Esterleşme Reaksiyonlarında Kullanımı. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 199s.
- ZABORSKY, O.R., 1973. Immobilized Enzymes. CRC Press, Cleveland, Ohio, p. 175.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlköğrenimimi 1992 yılında Fatih İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi 1995 yılında K.Maraş Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında kazandığı Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 1999 yılında Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne yatay geçiş yaptı. 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılında Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisansa başladı ve 2006 yılında tamamladı. Yüksek Lisans öğrenimi süresince araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında doktora çalışmasına başladı. 2009 yılında Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaya başladı ve halen burada görevine devam ediyor.

EKLER

EK 1



Result Analysis Report

Sample Name:
Nuri hoca-2 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:

SOP Name:
Measured by:
casper
Result Source:
Averaged

Measured:
02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:17:51
Analysed:
02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:17:53

Particle Name:
Iron III Oxide 0.03
Particle RI:
2.420
Dispersant Name:
Water

Accessory Name:
Hydro 2000MU (A)
Absorption:
0.03
Dispersant RI:
1.330

Analysis model:
General purpose
Size range:
0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual:
0.885 %

Sensitivity:
Normal
Obscuration:
7.67 %
Result Emulation:
Off

Concentration:
0.0065 %Vol

Span :
3.218

Uniformity:
0.999

Result units:
Volume

Specific Surface Area:
0.843 m^2/g

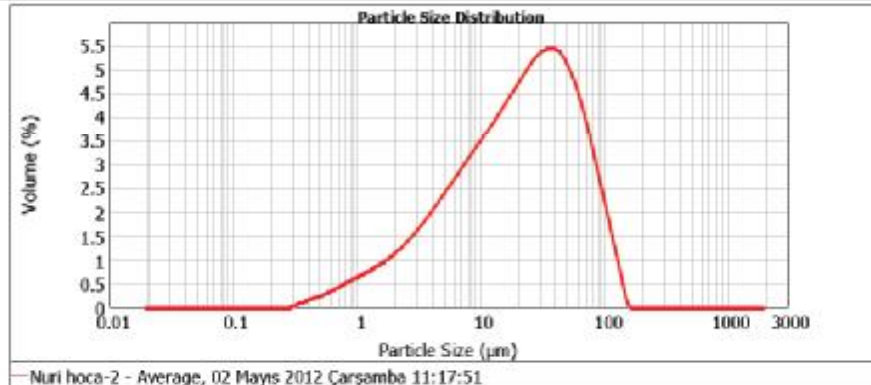
Surface Weighted Mean D[3,2]:
7.113 μm

Vol. Weighted Mean D[4,3]:
30.262 μm

d(0.1): 3.052 μm

d(0.5): 21.284 μm

d(0.9): 71.538 μm



Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %
0.075	0.00	0.105	0.00	1.365	0.00	11.482	0.46	120.220	0.00
0.077	0.00	0.108	0.00	1.259	0.70	13.183	3.67	130.030	0.25
0.079	0.00	0.110	0.00	1.445	0.82	15.126	9.89	150.480	0.00
0.081	0.00	0.112	0.00	1.600	0.92	17.370	4.12	180.970	0.00
0.083	0.00	0.114	0.00	1.905	0.92	19.863	4.54	200.030	0.00
0.085	0.00	0.116	0.00	2.188	1.04	22.609	4.96	220.800	0.00
0.087	0.00	0.118	0.00	2.512	1.17	26.303	4.34	275.423	0.00
0.089	0.00	0.120	0.00	2.884	1.31	30.200	4.00	310.220	0.00
0.091	0.00	0.122	0.00	3.211	1.47	34.874	4.00	360.070	0.00
0.093	0.00	0.124	0.00	3.502	1.65	39.811	4.00	410.000	0.00
0.095	0.00	0.126	0.00	3.800	1.83	45.790	4.00	470.000	0.00
0.097	0.00	0.128	0.00	4.300	2.00	52.401	4.34	540.541	0.00
0.099	0.00	0.130	0.00	5.012	2.23	60.290	3.98	630.000	0.00
0.101	0.00	0.132	0.00	5.794	2.44	69.183	3.38	724.430	0.00
0.103	0.00	0.134	0.00	6.907	2.84	79.433	2.75	831.794	0.00
0.105	0.00	0.136	0.00	8.170	3.05	91.201	2.13	954.000	0.00
0.107	0.00	0.138	0.00	10.000	3.05	104.713	1.46	1060.470	0.00
0.109	0.00	0.140	0.00	11.482	3.26	120.220	1.46	1200.000	0.00

Operator notes:

EK 2



Result Analysis Report

Sample Name: Nuri hoca-4 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:

SOP Name:
Measured by: casper
Result Source: Averaged

Measured: 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:32:02
Analysed: 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:32:03

Particle Name: Iron III Oxide 0.03
Particle RI: 2.420
Dispersant Name: Water

Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.03
Dispersant RI: 1.330

Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 1.610 %

Sensitivity: Normal
Obscuration: 6.24 %
Result Emulation: Off

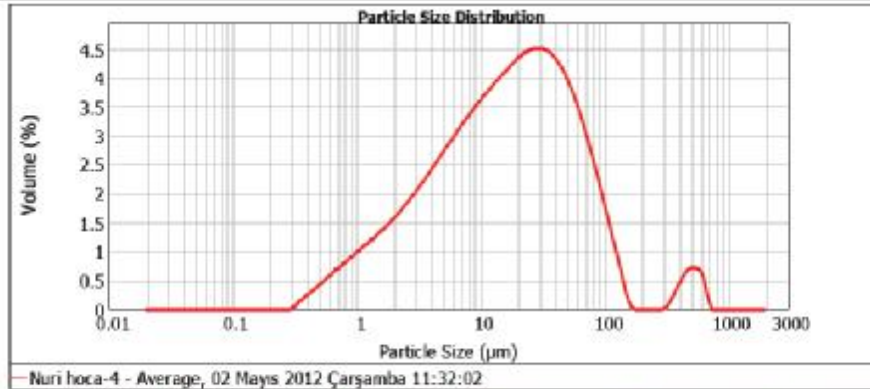
Concentration: 0.0038 %Vol
Specific Surface Area: 1.13 m^2/g

Span : 4.280
Surface Weighted Mean D[3,2]: 5.332 μm

Uniformity: 1.87
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 37.935 μm

Result units: Volume

d(0.1): 2.052 μm **d(0.5):** 16.728 μm **d(0.9):** 73.645 μm



Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %	Size (μm)	Volume in %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.090	1.01	11.462	3.47	120.226	0.75	1256.925	0.36
0.011	0.00	0.120	0.00	1.250	1.11	13.983	3.81	138.038	0.76	1440.440	0.36
0.013	0.00	0.136	0.00	1.445	1.21	15.930	3.91	158.469	0.76	1659.557	0.36
0.015	0.00	0.158	0.00	1.680	1.31	17.376	3.74	181.970	0.80	1905.481	0.36
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	1.32	19.950	3.85	208.990	0.80	2187.702	0.36
0.019	0.00	0.206	0.00	2.190	1.45	22.500	3.90	230.863	0.80	2511.686	0.36
0.020	0.00	0.240	0.00	2.572	1.58	26.380	4.05	275.423	0.80	2894.032	0.36
0.025	0.00	0.275	0.00	2.884	1.72	30.380	4.07	308.226	0.80	3381.311	0.36
0.030	0.00	0.316	0.01	3.311	1.88	34.874	4.06	365.075	0.76	3881.854	0.36
0.035	0.00	0.360	0.21	3.802	2.21	39.811	3.83	405.809	0.66	4305.155	0.36
0.040	0.00	0.417	0.31	4.365	2.38	45.700	3.82	479.530	0.63	5011.872	0.36
0.045	0.00	0.479	0.41	5.012	2.65	52.481	3.34	549.341	0.61	5794.360	0.36
0.052	0.00	0.558	0.51	5.754	2.72	60.250	2.90	630.957	0.22	6900.604	0.36
0.060	0.00	0.631	0.61	6.607	2.72	69.983	2.90	724.436	0.60	7585.725	0.36
0.069	0.00	0.724	0.61	7.596	2.88	79.433	2.80	831.764	0.60	8700.836	0.36
0.079	0.00	0.832	0.71	8.710	3.04	91.201	2.10	954.903	0.60	10000.000	0.36
0.091	0.00	0.955	0.81	10.000	3.18	104.710	1.71	1028.478	0.60		
0.105	0.00	1.098	0.81	11.462	3.34	120.226	1.28	1256.925	0.60		

Operator notes:

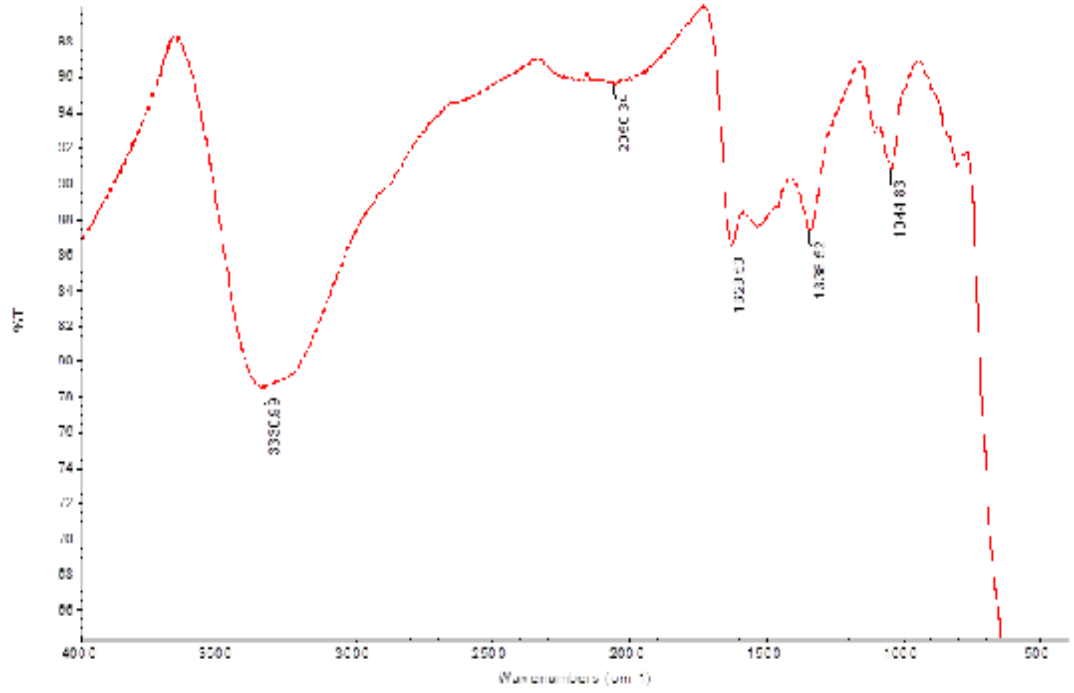
Malvern Instruments Ltd.
 Malvern, UK
 Tel: +44 (0) 1684-892456 Fax: +44 (0) 1684-892789

Mastersizer 2000 Ver. 5.60
 Serial Number: MAL1062207

File name: atomila deneme
 Record Number: 200
 02.05.2012 14:57:51

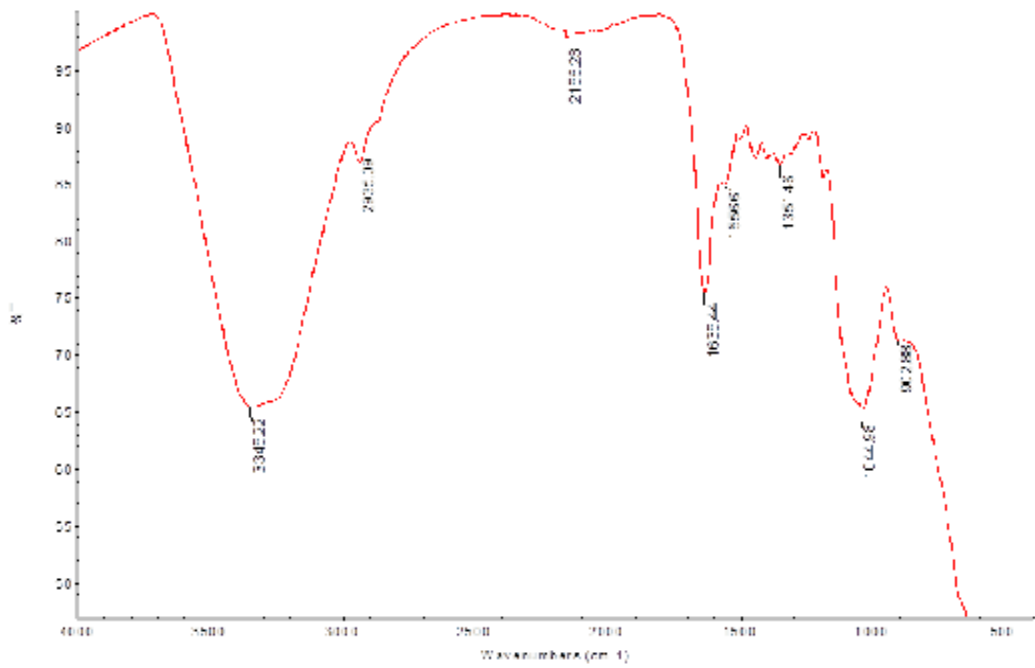
Ek 2. Magnetik nanopartiküllerin boyut analizi

EK 3



Ek 3. Magnetik nanopartiküllere epiklorhidrin ara kolu bağıli örneğin FT-IR spektrumu

EK 4



Ek 4. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu bağıli örneğin FT-IR spektrumu

EK 5



Ek 5. SEM mikroskobu