



**T. C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BENTONİT/KİTOSAN/POLİ(AKRİLAMİD) KOMPOZİTLERİNİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU: ÜREAZ
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Serhat ÖNER
(201492011168)**

**Biyokimya Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Demet BAYBAŞ**

**SIVAS
ARALIK 2018**

Serhat ÖNER'in hazırladığı ve “BENTONİT/KİTOSAN/POLİ(AKRİLAMİD) KOPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU: ÜREAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	Doç. Dr. Demet BAYBAŞ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

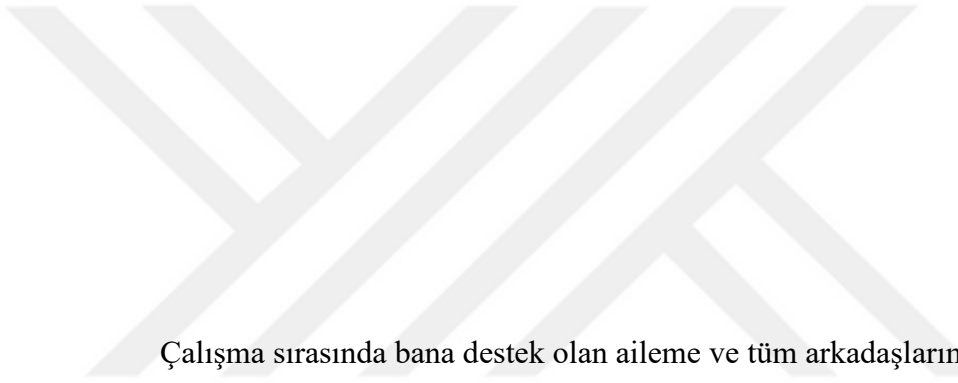


Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-512 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Serhat ÖNER, 2018



Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

29.11.2018

Serhat ÖNER

ÖZET

BENTONİT/KİTOSAN/POLİ(AKRİLAMİD) KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU: ÜREAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI

Serhat ÖNER

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Demet BAYBAŞ

2018, 80+xviii sayfa

Bu çalışmanın amacı, bir hidrojel olan poliakrilamidin (PAAm) bentonit (B) minerali ve bir aminopolisakkarit olan kitosan (Ch) ile oluşturduğu PB (poliakrilamid-bentonit), PCh (poliakrilamid-kitosan) ve PChB (poliakrilamid-bentonit-kitosan) kompozit adsorbanların hazırlanması, karakterizasyonu ve üreaz immobilizasyonunda kullanımının araştırılmasıdır.

PB ve PCh kompozitleri, B ve Ch'yi süspansiyon olarak içeren akrilamid çözeltisinde akrilamidin bir çapraz bağlayıcı eşliğinde doğrudan polimerleştirilmesiyle elde edilmiştir. PChB kompozitinin hazırlanmasında B süspansiyonu üzerine asetik asitte çözülmüş kitosan eklenmiş ve epiklorohidrin (ECH) ilave edilmiştir. Oluşan viskoz süspansiyon şırınga içerisine alınarak sodyum tripolifosfat (NaTTP) çözeltisi bulunan behere damlalar halinde eklenerek Ch-B boncukları oluşturulmuştur. Ardıl yıkamalarla saflaştırılan ChB'nin PAAm ile oluşturduğu PChB kompoziti PB hazırlanmasındaki yöntemle hazırlanmıştır. Oluşturulan kompozit yapıların FT-IR, XRD, TGA, DSC, SEM ve SYN analizleri kompozit oluşumunu kanıtlamıştır.

Kompozit yapılara üreaz immobilizasyonun, derişim, zaman ve sıcaklıkla değişimi, iletkenlik yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. PB, PCh ve PChB'nin tek tabaka adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 93, 174, 95 mg g⁻¹'dir. İmmobilizasyonun zamanla değişiminin (kinetik) daha çok sözde (pseudo) ikinci derece hız modeline uyduğu

regresyon değerleri (R^2) ile kanıtlanmıştır. Sıcaklıkla değişimi araştırması tutunmanın sıcaklığa bağlı olmadığını göstermiştir.

Kompozite immobilize edilmiş üreaz aktivitelerinin substrat derişimi, pH ve sıcaklıkla değişimi, serbest üreazın aktivite ölçümleri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Ölçümlerde Berthelot yöntemi kullanılmıştır. Michaelis-Menten grafiğinden türetilen V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla, serbest enzim için 11 ünite mg^{-1} ve 128 mM, PB için 11 ünite mg^{-1} ve 243 mM, PCh için 20 ünite mg^{-1} ve 104 mM, PChB için 19 ünite mg^{-1} ve 102 mM bulunmuştur. Her üç kompozit ve serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık deneyleri yapılmıştır.

Anahtar Szckler : İmmobilizasyon, reaz, kompozit, bentonit, kitosan, poliakrilamid

ABSTRACT

Master of Science

THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BENTONITE/CHITOSAN/POLY(ACRYLAMIDE) COMPOSITES: THE USE OF UREASE IMMOBILIZATION

Serhat ÖNER

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Demet BAYBAŞ

2018, 80+xviii pages

The objectives of this investigation is to prepare, to characterize and to investigate the usability of urease immobilization of the composite adsorbents in combination of polyacrylamide (PAAm) as an hydrogel and bentonite (B) mineral, and chitosan (Ch) as a polysaccharide; PB (polyacrylamide-bentonite), PCh (polyacrylamide-chitosan) and (polyacrylamide-chitosan-bentonite) PChB.

The Pb and PCh composites were synthesized by the polymerization of acrylamide in suspension of B and Ch in presence of a cross linking agent. The ChB beads were formed by drop wise addition of this suspension in a sodium tripolyphosphate solution by the aid of a syringe. The composite of PAAm with ChB purified by sequential washes was then formed by the method used for PB formation. The formation of the composites was proved by their analysis with FT-IR, XRD, TGA, DSC, SEM and PZC.

The effect of concentration, time and temperature on urease immobilization on to the composites was investigated by the use of conductometric technique. The monolayer adsorption capacities of PB, PCh and PChB were composites were 93, 174 and 95 mg g⁻¹ in respective order. High compatibility of time dependence of urease

immobilization (kinetics) to pseudo second order model was confirmed with the values of coefficients of regression (R^2). The research for temperature dependence showed that the immobilization was not temperature dependent.

The activity dependence of urease immobilized on the composites on the substrate (urea) concentration, pH and temperature was evaluated with reference to the activity measured for free urease. Berthelot method was used for the measurements. The V_{\max} and K_m values derived from Michaelis-Menten graphs were 11 unit mg^{-1} and 128 mM for the free enzyme, 11 unit mg^{-1} and 243 mM for PB, 20 unit mg^{-1} and 104 mM for PCh, and 19 unit mg^{-1} and 102 mM for PChB. The optimum pH and temperature tests were performed for all three composite and free enzymes.

Keywords: Immobilization, urease, composite, bentonite, chitosan, polyacrylamide

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Demet BAYBAŞ'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süresince engin bilgi ve deneyimleri ile güler yüzü ve sabrıyla bana her zaman yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ulvi ULUSOY'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yaralandığım Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP ve Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS başta olmak üzere tüm Biyokimya Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Gülyüzü ve yaşama sevinciyle her zaman desteğini hissettiğim ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Yasemin IŞIKVER'e teşekkür ederim.

TG ve DSC analizlerinde emeğini esirmeyen Malatya İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet GÜLTEK'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması aşaması boyunca sabır ve anlayışla desteklerini esirgemeyen başta şefim Fatih KESKİNBALTA olmak üzere tüm Fen Fakültesi Dekanlığı personeline teşekkür ederim.

Her zaman desteklerini hissettiğim, her ne koşulda olursa olsun yardımlarını esirgemeyen başta değerli annem ve babama, dostlarıma ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzim İmmobilizasyonu.....	4
1.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	6
1.2.1 Fiziksel Yöntemler.....	7
1.2.1.1. Adsorpsiyon	7
1.2.1.2 Tutuklama	16
1.2.2 Kimyasal Yöntemler.....	16
1.2.2.1 Kovalent Bağlama.....	16
1.2.2.1 Çapraz Bağlama.....	17
1.3 Üreaz Enzimi ve Özellikleri	18
1.3.1 Üreaz Enziminin Molekül Yapısı	19
1.3.2 Üreaz Enziminin Kullanım Alanları	20
1.3.2.1 Üre Derişimi Tayini	20
1.3.2.2 Böbreklerden Ürenin Uzaklaştırılması.....	21
1.3.2.3 Alkollü İçeceklerden Ürenin Uzaklaştırılması.....	21
1.3.3. Üreaz immobilizasyonu	22
2. MATERYAL ve METOT	23
2.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih.....	23
2.2 Kullanılan Maddeler	23
2.3 PB, PCh ve PChB Kompozitlerinin Hazırlanması	24
2.4 Yapısal Analizler	25
2.4.1 FT-IR Analizleri	25
2.4.2 XRD ve SEM Analizleri.....	25
2.4.3 Termal Analizler.....	25
2.4.4 Sıfır Yük Noktasının (SYN) Saptanması.....	25
2.5 Sulu Çözeltilerden Üreaz İmmobilizasyonu	25
2.5.1 İmmobilizasyonun Derişimle Değişimi	26
2.5.2 İmmobilizasyonun Zamanla Değişimi.....	26
2.5.3 İmmobilizasyonun Sıcaklıkla Değişimi.....	26
2.6 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi.....	26
2.6.1 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin Substrat Derişimi ile Değişimi ...	27
2.6.2 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin pH ile Değişimi	28
2.6.3 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi	28
2.6.4 İmmobilize Enzimin Kullanım Kararlılığının Araştırılması.....	29
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	30
3.1 Verilerin Değerlendirilmesi.....	30
3.1.1 Adsorbanların Yapısal Karakterizasyonunda XRD Değerlendirilmesi.....	30

3.1.2. Enzim İmmobilizasyonunda İletkenlik Yöntemi.....	30
3.1.2.1 İzotermelerinin Değerlendirilmesi	32
3.1.2.2. Enzim İmmobilizasyonun Zamanla Değişiminin Değerlendirilmesi.	33
3.1.3. Enzim Kinetiği ve Aktivite İle İlgili Değerlendirmeler.....	34
3.2 Adsorbanların Yapısal Karakterizasyonu.....	36
3.2.1 FT-IR Analizleri	36
3.2.2 XRD Analizleri.....	42
3.2.3 Termal Analizler.....	44
3.2.4 SEM Görüntüleri	49
3.2.5 Sıfır Yük Noktası Tayini (SYN).....	51
3.3 Üreaz Enzim İmmobilizasyonu	54
3.3.1 İmmobilizasyonun Derişimle Değişimi.....	54
3.3.2 İmmobilizasyonun Zamanla Değişimi.....	57
3.3.3 İmmobilizasyonun Sıcaklıkla Değişimi.....	60
3.4 Üreaz Aktivitesi.....	62
3.4.1 İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitesinin Substrat Derişimi ile Değişimi ve Kinetik Parametrelerin Saptanması.....	62
3.4.2 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitesinin pH ile Değişimi	64
3.4.3 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi	65
3.4.4 İmmobilize Enzimin Kullanım Kararlılığının Araştırılması.....	65
4. SONUÇLAR	67
KAYNAKLAR	72
EKLER.....	77
EK-1 Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun (Q) enzim derişimiyle (C ₀) derişimi	77
EK-2 Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun zamanla derişimi	77
EK-3 Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun sıcaklıkla derişimi	77
EK-4 Enzim Aktivitesi hesabı için kullanılan Berthelot yöntemi, UV-GB spektrofotometrik ölçümlerde kullanılan örnek kalibrasyon doğruları	78
EK-5 Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin üre derişimiyle derişimi	79
EK-6 Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin pH ile derişimi	79
EK-7 Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin sıcaklıkla derişimi	79
EK-8 Tekrar kullanılabilirlik verileri	79
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Liu vd, 2018)	7
Şekil 1.2 Enzim immobilizasyonu için farklı yöntemlerin şematik gösterimi (Kundurdu vd., 2017)	7
Şekil 1.3 Giles izoterm modelleri (Aslan, 2015)	8
Şekil 1.4 Adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu (Jesionowski vd., 2014)	10
Şekil 1.5 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması (Jesionowski vd., 2014)	10
Şekil 1.6 Bentonitin Yapısı	12
Şekil 1.7 Kitosanın Yapısı (Yıldız ve Yangınlar, 2014)	13
Şekil 1.8 Poliakrilamid Polimerizasyonu	14
Şekil 1.9 Glutaraldehit ile modifiye edilmiş silika yüzeyine lipaz enzim immobilizasyonu (Jesionowski vd., 2014)	15
Şekil 1.10 Üreaz tepkimesi (Teke, 2008)	18
Şekil 1.11 Üreaz enzimin üç boyutlu yapısı (Tetiker, 2016)	19
Şekil 3.1 İletkenlik ölçümlerinde standart üreaz çözeltilerinin ilk hızlarının bulunmasında kullanılan örnek İletkenlik (L)–zaman (t) grafiği.	31
Şekil 3.2 İletkenlik ölçümlerinde kullanılan örnek kalibrasyon doğrusu	31
Şekil 3.3 İlk Hızın (V_0) substart derişimine bağlı değişimi (Telefoncu, 1997)	35
Şekil 3.4 B'nin FT-IR spektrumu	37
Şekil 3.5 Ch'nin FT-IR spektrumu	37
Şekil 3.6 PAAm'nin FT-IR spektrumu	37
Şekil 3.7 PAAm ve B'nin bileşiminden oluşan PB'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları	38
Şekil 3.8 PAAm ve Ch'nin bileşiminden oluşan PCh'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları	39
Şekil 3.9 Ch ve B'nin bileşiminden oluşan Ch-B'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları	40
Şekil 3.10 PAAm, Ch ve B'nin bileşiminden oluşan PChB'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları	41
Şekil 3.11 PB kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları	42
Şekil 3.12 PCh kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları	43
Şekil 3.13 PChB kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları	44

Şekil 3.14 PB, PCh ve PChB kompozitleri ve bileşenlerinin karşılaştırmalı TG termogramları	45
Şekil 3.15 PB, PCh ve PChB kompozitleri ve bileşenlerinin karşılaştırmalı DSC termogramları	47
Şekil 3.16 PAAm ve B bileşenlerinden oluşan PB kompozitinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri	49
Şekil 3.17 PAAm ve Ch bileşenlerinden oluşan PCh kompozitinin karşılaştırmalı SEM görünümüleri	50
Şekil 3.18 PAAm ile B ve Ch (Ch-B) bileşenlerinden oluşan PChB kompozitinin karşılaştırmalı SEM görünümüleri	51
Şekil 3.19 PB için $\Delta pH-pH_i$ ve $pHe-pH_i$ ilişkisi	52
Şekil 3.20 PCh için $\Delta pH-pH_i$ ve $pHe-pH_i$ ilişkisi	52
Şekil 3.21 PChB için $\Delta pH-pH_i$ ve $pHe-pH_i$ ilişkisi	52
Şekil 3.22 (PB, PCh ve PChB kompozitlerine üreaz adsorpsiyon izotermelerinin Langmuir ve Freundlich modellerine uyumu.	55
Şekil 3.23 Kompozitlerin üreaz adsorpsiyon izotermeleri	56
Şekil 3.24 Üreaz immobilizasyon kinetiğinin Sözdde birinci (Lagergren), ikinci derece ve Weber-Morris kinetik modellere uyumu	58
Şekil 3.25 Üreaz immobilizasyon yüzdesinin sıcaklıkla değişimi.....	61
Şekil 3.26 Serbest ve immobilize enzimler için Michaelis-Menten eğrileri.....	63
Şekil 3.27 Serbest ve immobilize enzim aktivitelerinin pH ile değişimi.....	64
Şekil 3.28 Serbest ve immobilize enzim aktivitelerinin sıcaklıkla değişimi	65
Şekil 3.29 İmmobilize Enzimin Kullanım Kararlılığı.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Literatürdeki enzim immobilizasyonu çalışmalarından örnekler	22
Çizelge 3.1 Kompozitler ve bileşenlerinin diferansiyel TG grafiklerindeki pik merkezi sıcaklık değerleri ve % kütle kayıpları	46
Çizelge 3.2 ΔpH ($pH_e - pHi$)- pHi verilerinin doğrusal denkleme uyumu ve uyumdan hesaplanan SYN değerleri	53
Çizelge 3.3 Kompozitlere üreaz enziminin adsorpsiyonunun Langmuir ve Freundlich modellerine uyumundan türetilen parametreler	54
Çizelge 3.4 Bu araştırma kapsamında yer alana destek materyallerinin adsorpsiyon kapasiteleri ile daha önceki çalışmalardan derlenen farklı desteklere ait adsorpsiyon kapasitelerinin (Ads. Kap.) karşılaştırılması	56
Çizelge 3.5 10, 100 ve 1000 mg L ⁻¹ başlangıç derişimli 1 L enzim çözeltisinden %50 ve %90 adsorpsiyon için gerekli adsorban kütleleri (W/g) ve boyutsuz faktör (R_L) değerler	57
Çizelge 3.6 Sözde birinci (Lagergren), sözde ikinci derece ve Weber-Morris kinetik modellerden elde edilen katsayılar	59
Çizelge 3.7 Serbest ve immobilize üreazların Michaelis-Menten denklemine uyumu ve kinetik sabitler	63
Çizelge 3.8 İmmobilize enzimlerin 7 kez kullanımında elde edilen ortalama aktivite (mM dk-1) ve standart sapma değerleri	66

KISALTMALAR DİZİNİ

PAAm	Poliakrilamit
B	Bentonit
Ch	Kitosan
PB	Poliakrilamit-Bentonit
PCh	Poliakrilamit-Kitosan
PChB	Poliakrilamit-Kitosan-Bentonit
PB-U	PB kompozitine immobilize edilmiş üreaz miktarı
PCh-U	PCh kompozitine immobilize edilmiş üreaz miktarı
PChB-U	PChB kompozitine immobilize edilmiş üreaz miktarı
SYN	Sıfır Yük Noktası (Point of Zero Charge)
JBU	Jack Bean Üreaz

1. GİRİŞ

Enzimler, suda çözünen, biyoprosesleri katalizleyen ve büyük bir özgünlüğe sahip olan özgül katalizörlerdir. Enzimler protein yapısında biyomakromoleküller olup, doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler ve çok defa hücre dışında da etkinliğini korurlar.

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözümlenmesine rağmen, enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması oldukça masraflı bir işlemdir (Telefoncu, 1997). Bununla birlikte düşük termal kararlılık, dar pH aralığı, çözelti ortamında etkili aktivite ve bir döngüden sonra katalitik aktivite kaybı, çok sayıda pratik süreçte enzimlerin kullanılmasında en büyük engeldir (Jesionowski vd., 2014).

Enzimler tepkimeler sonucunda değişime uğramaması sebebiyle aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin tepkenler ve/veya ürünler ile birlikte aynı ortamda bulunması, enzimin çözeltiden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle çok sayıda endüstriyel analitik ve klinik işlemlerde serbest enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılır ve ürün elde edildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Serbest enzimin aktivitesini yitirmeden tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştıramadığından tepkime kontrolü sağlanamayacak, tepkimeyi durdurması için inhibitörün katılması ise serbest enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır (Telefoncu, 1997). Enzim saflaştırma işlemlerinin zor koşullar altında ve yüksek maliyet gerektirmesinin yanında sadece bir kere kullanılmaları enzimler için önemli bir dezavantaj unsuru oluşturmaktadır.

Katalizör olarak kullanılan enzimlerin tepkime ortamındaki ürünlerden ayrılmasının zorluğu, saflaştırma işleminin masraflı olması enzim immobilizasyon yöntemini doğurmuştur. Enzimlerin farklı immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilerek kararlılıklarının artırılması, tekrar kullanıma olanak tanınması ile üretim maliyetinin düşmesinin yanı sıra enzimatik süreçlerin sürekli olarak yapılabilmesi bu yöntemin sağladığı önemli avantajlardır.

İmmobilizasyon terimi, yirminci yüzyılın başında literatürde ilk ortaya çıkmış ve doğrudan taşıyıcılara bağlı enzimlere değinmiştir. Günümüzde bu terim, hem taşıyıcılar üzerindeki doğrudan immobilizasyonları hem de ara ajanlarla desteklenen immobilizasyonları içerecek şekilde genişletilmiştir.

Enzimlerin katı taşıyıcılara immobilizasyonu, geniş bir çeşitlilikte kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak yapılabilir. Enzim immobilizasyonu için önerilen birçok yöntem arasında en önemli ve yararlı olanı adsorpsiyon yöntemidir. Adsorpsiyon, taşıyıcı ile enzim arasında oluşturulan ve van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağımlı içeren fiziksel etkileşimleri kullanır. Bağlanma oldukça zayıftır ve önemli olan tipik olarak enzimin doğal yapısını değiştirmemesidir. Bu, enzimin aktif bölgelerinin inaktive olmasını engeller ve enzimin etkinliğini korumasını sağlar. Enzim-taşıyıcı etkileşimlerini sağlayan taşıyıcı üzerindeki spesifik aktif grupların varlığıdır ve bu sayede enzim adsorbe edilir. Eğer bu gruplar yoksa etkileşimler, ara ajanlar kullanılarak sağlanabilir.

İmmobilizasyon işleminin uygulanması ve enzim seçiminde gerekli kriterler: spesifik koşullarda maliyet, bulunabilirlik, kararlılık ve reaktörün tipidir. Taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken fiziko-kimyasal parametreler ise: yüzey alanı, parçacık boyutu, gözenek yapısı ve yüzeyde bulunan fonksiyonel grupların tipleridir (Jesionowski vd., 2014).

Literatürde, enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar, doğal ve yapay malzemeleri içeren çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Jesionowski ve arkadaşları (2014) yaptıkları derleme yayında, genel olarak adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcıların hem organik hemde inorganik yapıda olabileceğini rapor etmiştir. Çalışmaya göre, en yaygın inorganik taşıyıcılar; silikalar, titanyum ve hidroksiapatittir. Buna karşın organik taşıyıcılar; kitin, kitosan, selüloz ve alginat gibi doğal kökenli bileşikler, sentetik bileşiklerde en çok kullanılan polimerler ve bu doğal yapılarla polimerlerin olumlu özelliklerinin birleştirildiği kompozitler'dir. Basit bir literatür tarama ile bile enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılarla ilgili yukarıdakine benzer pek çok derleme çalışmaya rastlanabileceği gibi, çok sayıda enzim için, çok sayıda malzemenin kullanıldığı araştırmalar da görülebilir. Bu çalışmalara örnekler, ilgili bölümlerde de yer almaktadır.

Üreaz (Üre amidohidrolaz; E.C. 3.5.1.5.) hidrolazlar sınıfına giren üreyi amonyak ve karbondioksite hidroliz eden nikel bağlı bir metalloenzimdir. Üreaz birçok bitki, alg, lifli mantar ve bakteride yer alır ve tabiattaki azot döngüsünde önemli bir rol oynar (Sökmen vd., 2016). Üreaz protein içeriği açısından son derece zengin olan *Canavalia ensiformis* (Jack bean) bitkisinde yüksek oranda bulunmaktadır. Jack bean üreaz (JBU) 1926 yılında James B. Sumner tarafından ilk kristalize edilen ve ilk keşfedilen nikel-metalloenzimdir.

Üreaz enziminin son zamanlarda araştırmacıların ilgi odağı olmasının nedenleri arasında;

- atık sulardan üre temizleme,
- biyolojik sıvılarda üre miktarının hesaplanması,
- yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılması,
- meyve suyu ve alkollü içeceklerden ürenin uzaklaştırılması gerekliliği ve
- diagnostik kit olarak,
- kan üre tayininde biyosensör olarak,
- gıda endüstrisinde,
- Hg²⁺ ölçümü gibi biyoteknolojik çalışmalarda

kullanılması sayılabilir (Tetiker, 2016).

Bu çalışmada kullanılan malzemelerden, Poliakrilamid-Bentonit (PB); hazırlanışı, karakterizasyonu ve Toryum (Th) için adsorban özellikleri daha önce yapılan bir doktora tezi (Baybaş, 2009) kapsamında, Poliakrilamid-Kitosan (PCh) ve Poliakrilamid-Kitosan-Bentonit (PChB) ise benzer şekilde bir yüksek lisans tezinde (Eninanç, 2013) yer almıştır. Bu tez kapsamında, karakterizasyon bölümü, FTIR, TG, SEM, Sıfır Yük Noktası (SYN) analizlerinin yanında DSC ısı analizleriyle zenginleştirilmiştir. Ayrıca malzemelerin biyokimya alanındaki kullanımı, üreaz immobilizasyonu araştırmalarıyla ilk kez değerlendirilmiştir. PB, PC ve PChB taşıyıcı materyaline üreaz enzimi adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş ve optimum parametreler belirlenmiştir. İmmobilize edilen enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH ve derişim parametrelerinin etkisi incelenmiş, serbest enzimle karşılaştırılmış ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların dayandığı bilimsel bilgiler ilerleyen bölümlerde özet şeklinde verilmiştir. Yapılan çalışmalar ile ilgili veriler ve sonuçları tamamen özgündür, bunların dışında kullanılan bilgi ve veriler kaynakçaları ile sunulmuştur.

1.1 Enzim İmmobilizasyonu

Bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan enzimler biyokimyasal ve kimyasal tepkimeleri katalizyen proteinlerdir. İmmobilize, kelime olarak 'hareketi sınırlandırmak' anlamına gelir. İmmobilize enzimler adlandırılırken daha önce, 'bağlanmış enzim', 'suda çözünmeyen enzim', 'matrikse bağlı enzim', 'tutuklanmış enzim' gibi terimler kullanılmıştır. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm değerleri kapsarken diğerleri immobilizasyon yöntemlerini ifade etmektedir. 'İmmobilize enzim' terimi 1971 yılında yapılan 3. Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu (Henniker, USA) ve 1. Enzim Mühendisliği Konferasında tavsiye edilmiş ve bu anlam karmaşasına açıklık getirilmiştir (Telefoncu, 1997). İmmobilize enzim terimi; katalitik aktivitesini muhafaza ederek, belirli bir alanda fiziksel olarak sınırlı veya yerleştirilmiş olan ve tekrar tekrar kullanılabilen enzimleri ifade eder (Brena vd., 2013).

Enzimler veya "biyokatalizörler", biyoproses teknolojisi alanında dikkate değer bir keşiftir. Kolayca üretebilmeleri, faaliyetlerinde son derece özgün olmaları ve çevre dostu (yeşil kimyası) olmaları sayesinde; gıda sanayilerinde (fırıncılık, süt ürünleri, nişasta dönüşümü, meşrubat işleme vs.), tekstil endüstrisinde, kâğıt ve kâğıt hamuru yapımında, deterjan endüstrilerinde, sağlık ve ilaç endüstrisinde, kimyasal üretim sektöründe, atık yönetimi, kirli suyun arıtılması ve katı çöplerin arıtılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Datta vd., 2013; Ali vd, 2017). Ancak enzimlerin endüstri uygulamaları, raf ömrü, geri kazanımı ve yeniden kullanılabilirliği nedeniyle etkilenir. Özellikle ticari ölçekte yeniden kullanılabilirliği ekonomik anlamda önem arz etmektedir. İmmobilizasyon işlemi maliyetli bir yöntem olmasına rağmen, enzimin; kararlılığını korumak, ekonomik hale getirmek ve tekrar tekrar kullanabilmek için yaygın olarak uygulanmaktadır (Ali vd, 2017). İmmobilizasyon endüstriyel kullanımlarına ek olarak teşhis, biyo-afinite kromografisi ve biyosensörlerde uygulanmakta olan bir dizi biyoteknoloji ürününün temelini oluşturmaktadır (Brena vd., 2013).

Serbest enzimlerle karşılaştırıldığında immobilize enzimler daha sağlam, çevresel değişikliklere dayanıklı, arttırılmış kararlılıkları ile istenilen anda tepkime ortamından uzaklaştırılabilir ve tekrar döngüler için kullanılabilirler. Ayrıca immobilizasyondan sonra enzimlerin, depolama kararlılığı, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı dirençler genellikle gelişmektedir. (Liu vd, 2018) İmmobilizasyon sürekli ekonomik işleyiş, süreklilik, yüksek yatırım/kapasite oranı ve daha fazla saflıkta ürün geri kazanımı sağlar (Datta vd., 2013).

İmmobilize enzimlerin keşfine yol açan ilk bilimsel gözlem Nelson ve Griffin, tarafından 1916'da yapılmıştır. Odun kömürü veya alüminyum hidroksit gibi katı bir destek materyalinin üzerine invertraz enzimi adsorbe edildiğinde serbest enzimle aynı aktiviteyi sergilediğini fark etmişlerdir. Bu durum şu anda mevcut enzim immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Homaei vd., 2013; Ahmad ve Sardar, 2015). İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı ise 1966 yılında Chibata ve çalışma arkadaşları tarafından sentetik rasemik *D-L* amino asitlerinin çözünürlüğü için *Aspergillus oryzae* fungal aminoaçilazının immobilizasyonunu geliştirmişlerdir (Brena vd., 2013). 1960'lı yıllardan bugüne kadar, enzim immobilizasyon teknikleri konusunda 5.000'den fazla yayın ve patent yayınlanmıştır (Ahmad ve Sardar 2015). Son on yılda immobilize enzim teknolojisi klinik, endüstriyel ve çevresel numunelere yönelik uygulamalarda dikkat çeken bir araştırma alanı haline gelmiştir

İmmobilize enzim sistemlerinin ana bileşenleri şunlardır: enzim, destek ve enzimin matrise tutunma şekli. Katı faz, katı destek, taşıyıcı ve matris terimleri eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (Brena vd., 2013).

İmmobilize enzim sistemlerinin performansının belirlenmesinde destek seçimi büyük önem arz etmektedir. İdeal destek materyalinin özellikleri arasında; düşük maliyet, inertlik, fiziksel sıkıştırmaya direnç, hidrofiliklik, biyo-uyumluluk, kararlılık, enzim özgüllüğü/aktivitesini artırma, ürün inhibisyonunu azaltma ve mikrobiyal saldırılara karşı direnç sayılabilir (Datta vd., 2013; Brena vd., 2013). Matrislerin fiziksel özellikleri (ortalama parçacık çapı, şişme davranışı, mekanik mukavemet, sıkıştırma davranışı gibi) arasında özellikle gözenek parametreleri ve parçacık boyutu toplam yüzey alanını belirler ve bu nedenle enzimlerin bağlanma kapasitesini kritik olarak

etkiler (Brena vd, 2013). Yüksek yüzey alanı sayesinde enzimlerin daha verimli şekilde yüklenmesine izin vermesi ve enzimin çevre koşullarından korunması sebebiyle gözenekli destekler gözeneksiz desteklere göre daha çok tercih edilir (Kunduru vd., 2017).

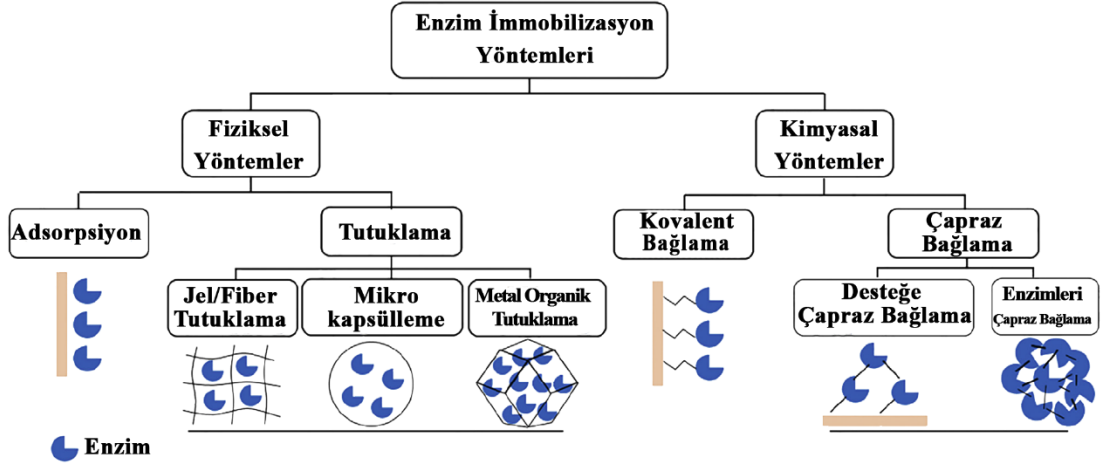
Enzim destekleri organik ve inorganik destek olmak üzere iki tipe ayrılır. Organik destekler; polisakkaritler, dekstranlar, selüloz, agar, agaroz, kitin, aljinat, kitin, kitosan, kollajen, karajenan, jelatin, nişasta, pektin, sefaroze, proteinler, kollajen ve albümin gibi doğal polimerler ya da polistiren (PS), poliakrilamid (PAM), polimetilakrilat, poliamid gibi sentetik polimerler olabilir. İnorganik destekler arasında doğal mineraller, bentonit, silika, zeolitler, seramik, selit, silika, aktif karbon, mangal kömürü, cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenekli), metaller ve kontrollü gözenekli metal oksitler sayılabilir (Brena vd., 2013; Datta vd., 2013).

İnorganik taşıyıcıların birçok avantajına (örneğin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyel bozunmaya karşı yüksek kararlılık) sahip olmasına rağmen, endüstriyel uygulamaların çoğu organik desteklerle gerçekleştirilir. Hidrofilik karakter, immobilize enzimin aktivite düzeyini belirleyen en önemli faktörlerden biridir.

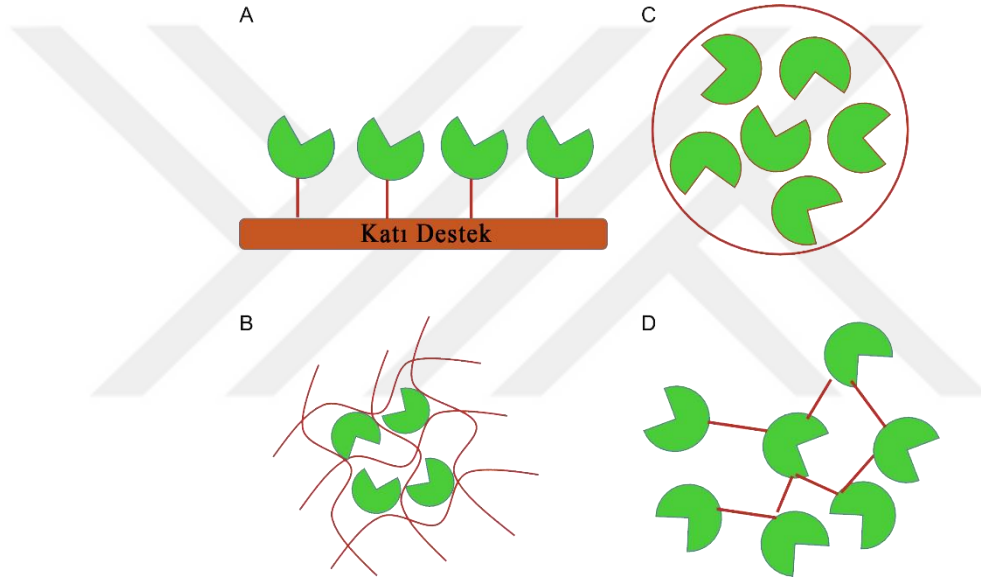
Organik destek materyali ‘agaroz’ yaygın olarak kullanılan mükemmel bir destektir. Proteinler için agaroz gözenekli yapısı sayesinde yüksek bir kapasiteye sahiptir. Bunun yanı sıra hidrofilik karakter, kolay türevlenme, yüklü grupların yokluğu (substrat ve ürünlerin adsorpsiyonunu engelleyen) ve ticari elverişliliği bazı önemli avantajlarıdır. Ancak agaroz yüksek maliyetlidir. Bu problemi ortadan kaldırmak için desteklerin yenilenmesine ve yeniden kullanılmasına yönelik tersine çevrilebilir immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Brena vd., 2013).

1.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Genel anlamda enzimler ve destek taşıyıcılar arasında etkileşimlere göre fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılabilir. Adsorpsiyon ve yakalama, enzim destek taşıyıcıları arasında kovalent etkileşimlerin olmadığı fiziksel yöntemlere dâhil edilirken, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama kimyasal yöntemlere aittir. Bazı durumlarda enzimlerin immobilizasyonu için çoklu enzim-destek etkileşimleri kullanılır (Liu vd, 2018). Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.1 ve Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Liu vd, 2018)



Şekil 1.2 Enzim immobilizasyonu için farklı yöntemlerin şematik gösterimi

- (a) Kovalent Bağlama, (b) Tutuklama, (c) Kapsülleme ve
(d) Çapraz bağlama (Kundurdu vd., 2017)

1.2.1 Fiziksel Yöntemler

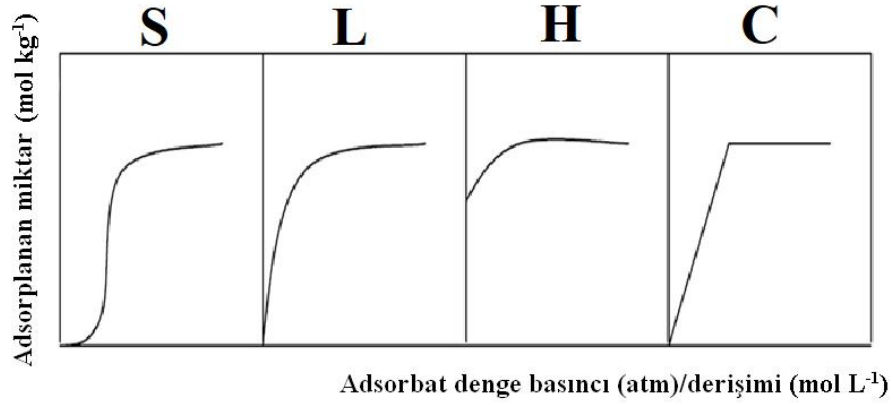
1.2.1.1 Adsorpsiyon

“Adsorpsiyon” terimi, karışmayan iki faz birbiri arasında etkileştirildiğinde iki faz arasındaki yüzeyde veya ara yüzeyde (katı yüzeyinde) yığın derişimine göre artışı şeklinde tanımlanabilir. Yüzeyde tutunan maddeye “adsorplanan madde” veya “adsorbat” adsorplayıcı faz ise “adsorban” olarak adlandırılır. Adsorpsiyon yüzeye bağlanmanın türüne göre; fiziksel, kimyasal ve iyon değişimi (elektrostatik etkileşim) olmak üzere üç grupta sınıflandırılır. Adsorplanan ile adsorplayıcının arasındaki polar

etkileşimlere bağlı van der Waals kuvvetleri ile oluşuyorsa fiziksel, aktif merkezler arasında yük aktarımı varsa kimyasal, Coulomb elektrostatik etkileşimlerle sağlanıyorsa iyonik adsorpsiyon olarak tanımlanır. (Baybaş, 2009; Aslan, 2015).

Etkin kullanıma elverişli bir katı adsorban, yüksek yüzey alanı veya gözenekli yapıya ve gözenek ağına sahip olmalıdır. Hem küçük gözenekli hemde yeterince gözenek sayısına sahip olan iyi bir katı adsorban; kimyasal, petrokimyasal, biyokimyasal, biyolojik ve biyomedikal endüstrilerde yaygın şekilde kullanılır (Baybaş, 2009).

Adsorpsiyon İzotermeleri: Adsorpsiyon izotermeleri, adsorplanan tür miktarının sabit sıcaklıkta adsorpsiyon etkilerinden (derişim, pH gibi) birine bağlı değişimini ifade eden eğrilerdir. Adsorbanın adsorpsiyon etkisine bağlı olarak adsorpsiyon izotermeleri, ‘adsorpsiyon kapasitesi’ ‘adsorpsiyon enerjisi’ ve ‘adsorpsiyon türü’ gibi önemli bilgiler sağlar (Aslan, 2015). Adsorpsiyon izotermelerini, Giles ve diğerleri tarafından izotermin başlangıcında görülen bükülmenin doğasına göre S, L, H ve C tip olarak dört temel sınıfa ayırmışlardır. Giles adsorpsiyon izotermeleri Şekil 1.3’de verilmiştir (Giles vd., 1973; Baybaş, 2009; Aslan, 2015).



Şekil 1.3 Giles izoterm modelleri (Aslan, 2015)

Adsorpsiyon süreçleri, sabit sıcaklıkta adsorpsiyonun derişimle değişimi sonucu elde edilen matematiksel verilerin değerlendirilmelerine dayalı modellerle açıklanır. Adsorpsiyon izotermeleri için önerilen matematiksel modellerden bazıları; Langmuir, Freundlich, Dubinin–Radushkevich, Temkin, Toth, Redlich–Peterson ve Brunauer–Emmett–Teller (BET) izotermeleridir (Foo ve Hameed, 2010). Langmuir ve Freundlich izotermeleri diğerlerine göre daha çok kullanılmaktadır.

Langmur izoterm modeli aşağıdaki varsayımlara dayanır;

1. Yüzeyde adsorplanan moleküller tek tabaka halinde adsorplanır.
2. Adsorban homojendir, yüzeyin her yerinde adsorpsiyon enerjisi aynıdır.
3. Yüzeyde adsorplanan atom ya da moleküller yer yer adsorplanır ve adsorplanan maddeler arasında etkileşimler olmaz.
4. Her bir aktif merkez sadece bir tek atom ya da molekül içerir (Baybaş, 2009; Aslan, 2015).

Freundlich izoterm modeli ise; tek tabakanın oluşumuyla sınırlı olmayan ideal ve geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlayan varsayımdır. Bu tip izotermde, adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı önce derişim veya basınçla hızla artmakta daha sonra katı yüzeyinin adsorplanan madde ile doymasıyla daha yavaş bir artış göstermektedir. Bu izoterm, özellikle organik bileşikler veya aktif karbon ve moleküler elekler üzerindeki yüksek etkileşimli türler için heterojen sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Foo ve Hameed, 2010).

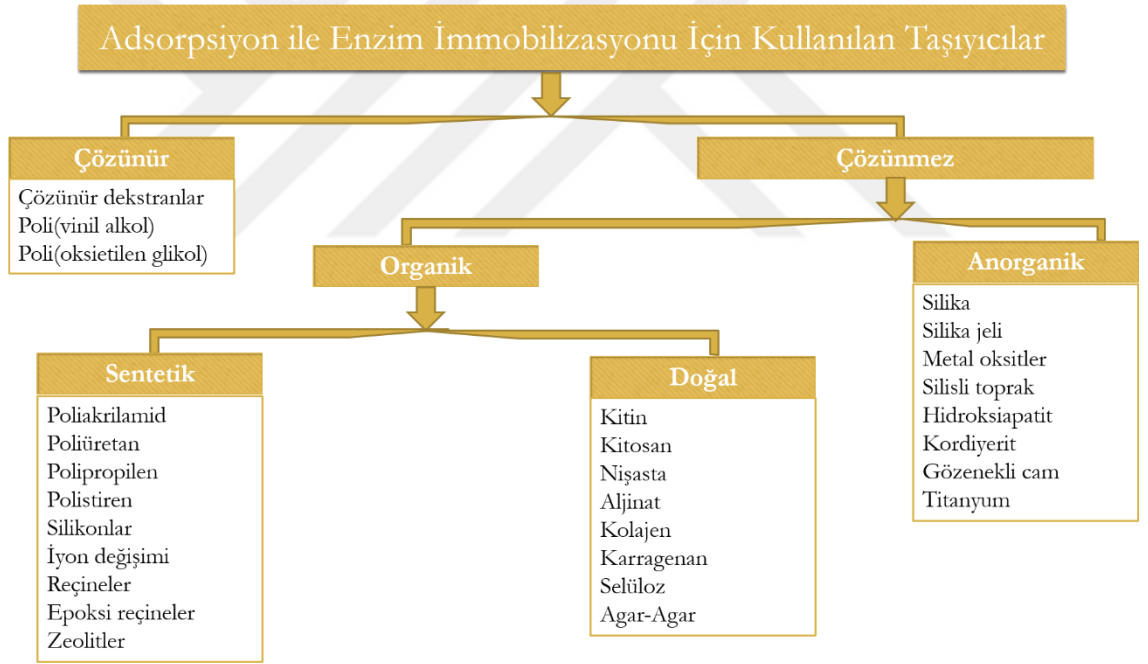
Adsorpsiyon, enzim imobilizasyonunda en eski basit ve kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde; enzim taşıyıcı üzerine fiziksel etkileşimleri (van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimleri ve hidrojen bağları) kullanarak bağlanır. Uygun bir çözelti içinde çözülmüş halde bulunan enzim, destek ile belli bir süre etkileştirilerek enzimin desteğe tutturulması ile sağlanır. Bağlanmanın oldukça zayıf olması sayesinde enzimin doğal yapısını değiştirmez. Bu enzimin aktif bölgelerinin rahatsız edilmesini engeller ve enzimin etkinliğini muhafaza eder. Adsorpsiyon ortamının koşulları, enzimin fizyolojik koşullarına çok yakın olarak düzenlendiğinde, aktivite kaybı oldukça düşüktür. Enzim-taşıyıcı etkileşimlerinin üretilmesini sağlayan taşıyıcı üzerindeki spesifik aktif grupların varlığı sayesinde enzim adsorbe edilir. Eğer yoksa etkileşimler, ara ajanlar uygulayarak ayarlanabilir (Şekil 1.4). İmmobilize edilen enzimde hemen hemen hiçbir kimyasal değişiklik olmaz. Çünkü destek materyali ile kimyasal bir etkileşim olmamaktadır. Bu avantajların yanında optimum koşulların sağlanma güçlüğü ve enzimle destek arasında zayıf bir çekim varsa enzimin desorpsiyonu ile ürün kirlenmesi gibi dezavantajlar da söz konusu olabilir (Telefoncu, 1997; Jesionowski vd., 2014).

İmmobilizasyon teknikleri arasında, yüksek bir ticari potansiyele sahip olması, yüksek katalitik aktiviteleri muhafaza edebilmesi daha basit ve ucuz olması nedeniyle

adsorpsiyon diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilir (Bayramoğlu vd., 2005). Özellikle bu yöntem; enzim-destek arasında etkileşimler zayıf olduğundan, enzim aktivitesinin azalması halinde destek üzerinden enzim desorbe edilerek destek materyalinin tekrar tekrar kullanılmasına olanak sağlar.



Şekil 1.4 Adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu (Jesionowski vd., 2014)



Şekil 1.5 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması (Jesionowski vd., 2014)

Anorganik Taşıyıcılar

Adsorpsiyon ile enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan birçok anorganik taşıyıcılar arasında, silikalar en dikkat çekenidir. Genellikle enzim immobilizasyonu için gözenekli yapılarıyla SBA-15, MUCH, MCM-41 ve FDU-12 kullanılır. Silika matrisleri gözenek büyüklüğü ve yapısı bakımından farklılık gösterirler. Yaygın olarak

kullanılan diğerk silika taşıyıcılar ise silis jelleridir. Gözenekli yapıları, yüzey alanları, yüksek mekanik mukavemeti ve termal kararlılıkları gelişmiştir. İmmobilizasyonda kullanılan diğerk silis türleri; vesiküler silika ve fūme silikalardır. Enzimlerin silikalara olan ilgisini artırmak için matrislerin polimerler ile modifikasyonları geliştirilebilir. Böylelikle immobilize edilen enzim miktarı 2-3 kat artırılabilir.

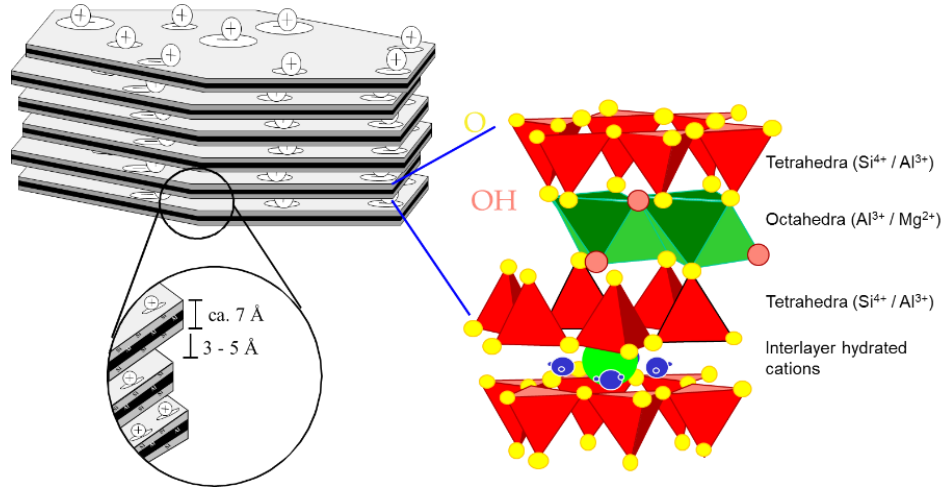
Altın çok az çözüner ama kolayca şekilledirilebilmesi ve istenilen forma dönüştürülmesi sebebiyle bir taşıyıcı olarak kullanılabilir. Altın bazında yapılan materyaller esas olarak biyosensörlere monte edilen elektrotlarda kullanılır, fakat bunlar aynı zamanda selülozun biyo bozunmasında da kullanılabilirler. Altın enzim adsorpsiyonunda, nanopartiküller, altın katkılı manyetik silika nanopartiküller ve nanotüpler şeklinde kullanılır.

Enzim immobilizasyonu için kullanılan bir başkaka anorganik taşıyıcı, titanya sol-jel filmidir. Titanyum dioksit, yüksek erime noktası ve iyi adsorpsiyon parametreleri olan beyaz bir katıdır.

Zirkonyum yüksek erime noktası ve kimyasal dirence sahip beyaz bir kristal katıdır. Nanoparçacıklar, katmanlı γ -zirkonyum ve saf halde kullanıldığında, enzim immobilizasyonu için cazip hale gelmektedir (Jesionowski vd., 2014).

Hidroksiapatit diğerk taşıyıcı destek materyali olarak kullanılan kalsiyum, fosfor, oksijen ve hidrojenden oluşan bir mineraldir. Kemik dokusunda, dişlerin mine ve dentin tabakasında bulunan ve kimyasal olarak da sentezlenebilen hidroksiapatit, biyoaktif yapıda olan ve yüksek biyoyumluluk gösteren biyomateryaldir. Çok çeşitli tepkime koşullarına karşı yüksek direnç gösterir. Toz halinde bir katı veya seramik hidroksiapatit olarak kullanıldığında tüm enzimleri pratik olarak adsorbe edilebilmesi en önemli avantajıdır (Jesionowski vd., 2014; Aslan, 2015).

Dış tabakalar arasındaki yüzeylerde yer alan yoğun miktardaki aktif merkezleri sayesinde bentonit iyi bir destek materyali olarak kullanılır. Suda çözüner ancak kolayca şişmesi sayesinde enzimlerin sulu ortamlarında kullanılabilir. Düzenli yapıları ve seçici adsorban özellik göstermelerine rağmen, sıcaklık ve elektrolitin değiştiği ortamlarda bentonit parçacıklarının topaklanması (agregasyonu) destek materyali olarak kullanılmasında dezavantaj unsuru oluşturur (Baybaş, 2009; Jesionowski vd., 2014).



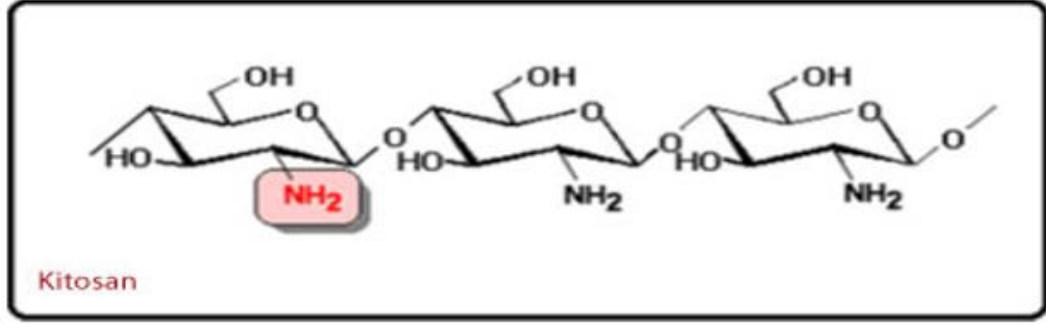
Şekil 1.6 Bentonitin Yapısı (<http://www.imerys-additivesformetallurgy.com/our-resources/bentonite/>)

Zeolitler, iyi tanımlanmış yapılara ve şekil seçici özelliklere sahip olan ve moleküler adsorpsiyonda yaygın olarak kullanılan mikro gözenekli kristal yapıya sahip katılardır. Sulu çözelti içinde şişen ya da çözenen yapıya sahip değildirler. Kristal yapıları ve düzgün dağılmış gözenekleri sayesinde sadece belirli büyüklükteki yapıların gözeneklerine girmesine izin verirler. Seçici davranmaları nedeniyle “moleküler elek” olarak da bilinirler (Baybaş, 2009; Datta vd., 2013).

Yukarıda belirtilen destek materyallerine ilaveten enzim destek taşıyıcısı olarak alüminyum jel, alüminyum, halloysit, mika, aktif karbon, mangal kömürü, selit, seramik, ve cam sayılabilir (Datta vd., 2013; Jesionowski vd., 2014).

Organik Taşıyıcılar

Enzim adsorpsiyonu için organik taşıyıcılar arasında özel bir ilgi kitosandır. Kitosan, kitin'in deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Kitosan, membranlar, boncuklar, nanopartiküller, lifler, içi boş elyaflar veya süngerler gibi farklı geometrik yapılarda kolayca hazırlanabilen toksik olmayan, biyoyumlu ve jel oluşturucu katyonik bir bileşiktir. Son zamanlarda kitosan, tıbbi ve biyomedikal alanlarda ümit vaat eden bir polimer olduğu bildirilmiştir. Ucuz, inert, hidrofilik, biyoyumlu bir destek olması nedeniyle enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar arasında cazip hale gelmiştir (Çetinus ve Öztop, 2003; Jesionowski vd., 2014). Çetinus ve Öztop, katalaz immobilizasyonunda kitosan filmler (2000) ve çapraz bağlı kitosan boncuklar kullanmışlardır (Çetinus ve Öztop, 2000; Çetinus ve Öztop, 2003).



Şekil 1.7 Kitosanın Yapısı (Yıldız ve Yangınlar, 2014)

Yaygın olarak kullanılan diğer organik bileşik, kalsiyum aljinattır. Kahverengi alglerin hücre duvarından elde edilen alijinat alginik asidin kalsiyum, magnezyum ve sodyum tuzlarıdır. Alijinat, çekici jel oluşturma, derişik hale getirme ve kararlı hale getirme gibi özellikleri sunan bir anyonik polisakkarittir. Yeniden kullanılabilirliği olan ksantan-aljinat boncuklar, aljinat-poliakrilamid jeller ve kalsiyum aljinat boncuklar immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Alternatif olarak organik taşıyıcı selülozdur. Doğal kaynaklı, glukoz moleküllerinden yapılmıştır bir polisakkarittir. Endüstriyel ölçekte selüloz ahşaptan elde edilir. Genellikle renksiz selüloz asetat formunda kullanılır. Suda çözünmeyen, termoplastik fakat sert yanıcı bir polimerdir. Bu en bol doğal polimer, mantar lakkazı, penisilin G asilaz, glukoamilaz, α -amilaz, tirozinaz, lipaz ve β -galaktosidazın immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Datta vd., 2013; Jesionowski vd., 2014).

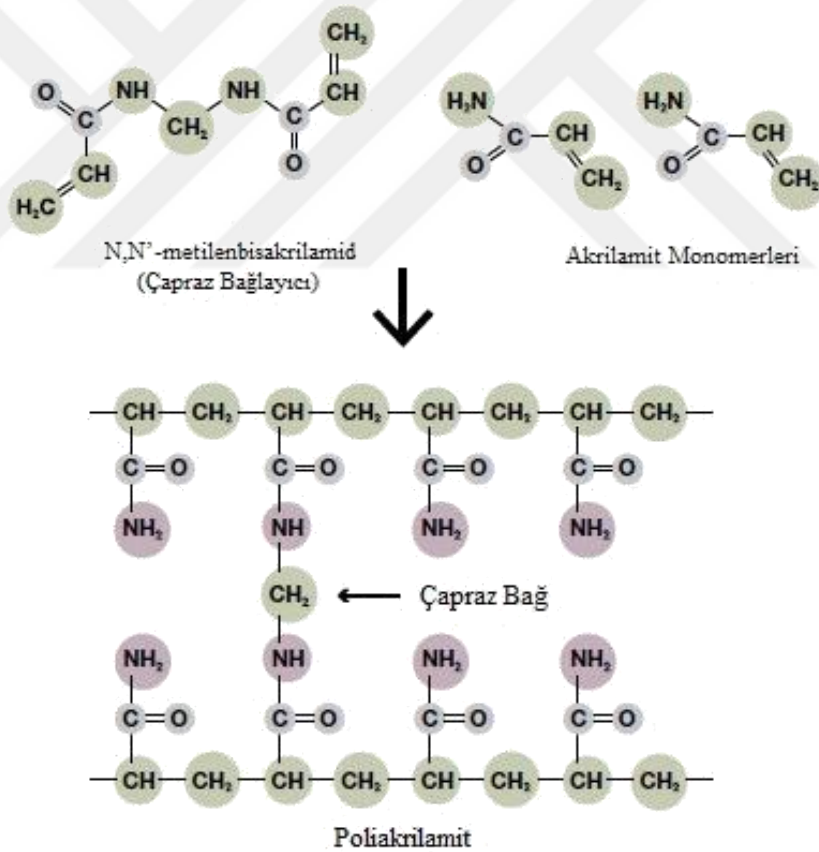
Genellikle nükleik asitlerin ayrılması için uygulanan bir polisakkarit olan agaroz jel, morfolojik yapısı ve yararlı adsorpsiyon özelliklerinden ötürü enzim immobilizasyonu için de kullanılır (Jesionowski vd., 2014).

Enzim adsorpsiyonu için organik taşıyıcılar arasında doğal halde bulunan diğer destek materyalleri; Kollajen, karagenan, jelatin, nişasta, pektin, ve sepharose sayılabilir (Datta vd., 2013).

Doğal polimerlere ek olarak, sentetik polimerler enzim taşıyıcılarının geniş ve çeşitli bir grup oluşturmaktadır. Doğal matrislerin bazı enzimlere olan ilgilerinin zayıf olması ve işlem koşullarındaki düşük dayanıklılıkları nedeniyle uygulamaları sınırlamaktadır. Sentetik polimer matrisleri enzim adsorpsiyonun için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çünkü istenilen özelliklere uygun polimerler tasarlanabilir ya da polimer kompozitler hazırlanarak adapte edilebilirler. Dahası üretimi nispeten kolay ve hızlıdır. Özellikle sentetik polimer matrisler yüksek termal ve kimyasal direnç gösterirler (Jesionowski vd., 2014).

Yaygın olarak kullanılan sentetik polimerden biri de Poliakrilamittir (PAAm). Poliakrilamit (PAAm) akrilamit monomerinin çapraz bağlanmasıyla elde edilen bir polimerdir. Çapraz bağlı olması sayesinde yüksek su tutabilen ve absorpladığı suyu jel bünyesinden eşit olarak dağıtabilen bir hidrojeldir. Poliakrilamit (PAAm); işlevsel açıdan asal (inert) olması ve hidrojel polimer olması nedeniyle kompozitlerle rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca jel elektroforezinde, yumuşak kontak lenslerin yapımında ve (derialtı) dolgu maddesi olarakda kullanılmaktadır (Baybaş 2009; Aslan, 2015).



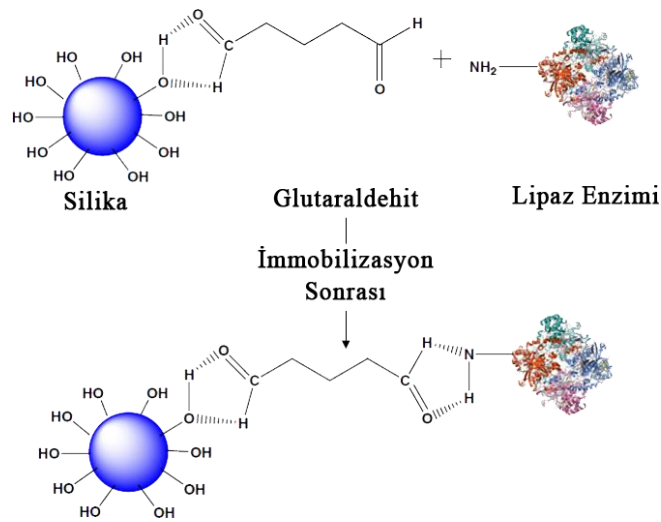
Şekil 1.8 Poliakrilamit Polimerizasyonu (<http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/introduction-polyacrylamide-gels?ID=LUSPBRM5B>)

Enzim taşıyıcıları olarak en çok kullanılan sentetik polimerler; poli(vinil alkol) (PVA), çapraz bağlı poli(vinil alkol), poli(N-metiloakrilamid), polipropilen, köpük halindeki polistiren, poli (akrilik asit-ko-akrilamid), hidrotalsit nanokompozit hidrojelleri, poli(hidroksibutirat) nanopartiküller, poli(akrilonitril) (PAN), Polistiren (PS) ve Poliamid (PA) sayılabilir (Jesionowski vd., 2014).

Yüzey Değiştirici Ajanlar

Bir enzimin katı bir taşıyıcı üzerinde adsorbe edilebilmesi için gereken şart, enzim ve taşıyıcının yüzeyi üzerinde spesifik fonksiyonel grupların varlığıdır. Bu gruplar yok olduğunda, taşıyıcı bir kimyasal modifikasyona tabi tutulur. Bunlar enzim-taşıyıcı bağlanması için yeterince güçlü etkileşimleri ortaya çıkartmaktadır. Modifiye edici maddenin molekülünde en az iki reaktif grup bulunmalıdır ve fiziksel olarak enzimle etkileşime girmesi için taşıyıcıya kimyasal olarak kenetlenmesinin sağlaması gerekir. Bu koşulu karşılayan tipik bileşikler, iki fonksiyonlu karbonil bileşikleridir. Bunların arasında glutaraldehit en yaygın olanıdır.

Glutaraldehit bir dezenfektan ve koruyucu olarak kullanılır. Bakterilere mantarlara ve proteinlere yüksek afiniteye sahip olması nedeniyle iyi bir enzim yüzey değiştirici ajandır. Ayrıca beş atomlu zinciri sayesinde enzimler için bir ara yer işlevi görür ve bu da aktif bölgelerin substratlar için kolay erişilebilir olmasını sağlar. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş silika yüzeyine lipaz enzim immobilizasyonu Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9 Glutaraldehit ile modifiye edilmiş silika yüzeyine lipaz enzim immobilizasyonu (Jesionowski vd., 2014)

Enzim adsorpsiyonu için sıkça kullanılan bileşikler arasında silanlar (3-aminopropitrimetoksisilan, 3-aminopropiltrioksisilan, merkaptopropiltrimetoksisilan, n-oktiltrioksisilan, feniltrimetoksisilan, viniltrimetoksisilan ve 3-(trimetoksisil)propil oktadesil di metil amonyum klorür), polimerler (polietilenimin, polistirenden, poli(stiren sulfonat) ve akrilonitrilkopolimer), aminler (dietilamin, dietilaminoetil (DEAE), agaroz jel ve monoaminometil-N-aminoetil) ve karboksilik asitler (eruşik asit, itakonik asit) sayılabilir (Jesionowski vd., 2014).

1.2.1.2 Tutuklama

Bu yöntemde temel prensip belirli bir ortamda enzim moleküllerini hapsetmektir. Böylece enzimler bulunduğu ortamdan dışarı çıkamazlar (Telefoncu, 1997). Enzimlerin topaklanma (agregasyonu) eğilimi göstermesi nedeniyle katalitik aktivitelerini azalttığı durumlarda bu yöntem kullanılır. Tutuklama yöntemi düşük maliyetli polimerik ağlarda enzimlerin tutuklandığı bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde enzimler ağlarda tutularak ayrışmaları azaltılır. Böylece daha kararlı halde bulunan enzimler sabit kalırken substratların ve ürünlerin geçmesi sağlanır. Enzimler jel/fiber veya mikrokapsülleme ile immobilize edilirler. Enzim ve destek matrisleri arasında kovalent bağlanma bulunmadığından enzim aktif bölgeleri rahatsız edilmez böylece bu yöntemle immobilize edilen enzimler yüksek katalitik aktivite gösterirler. Bununla birlikte yüksek difüzyon bariyerleri makro moleküler substratların ağlardan geçmesini önler ki bu da bu tekniğin bir dezavantajıdır. Polimerik ağlarda tıkanmanın yanı sıra metal organik çerçeveler (MOF) son zamanlarda enzimleri gömmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde diğer destek materyalleri olarak kitosan, kalsiyum aljinat, kollajen, selüloz triasetat, poliakrilamid, jelatin, agar, silikon kauçuk, polivinilalkol ve polivinilalkol tanecikleri sayılabilir (Liu vd., 2018).

1.2.2 Kimyasal Yöntemler

1.2.2.1 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama enzim immobilizasyonu için geleneksel bir yöntemdir. Bu yöntemde kovalent bağlar, destek materyalleri ile enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Güleşci, 2013; Liu vd., 2018). Yaygın olarak amid, eter, tiyoeter veya karbomat bağları ile enzim desteğe immobilize edilir. Kovalent bağların doğası gereği enzim molekülü ile ve destek materyalleri arasındaki bağın kararlı olmasıyla enzimler destek materyallerinden kolay

ayrılması mümkün değildir. Bu yüzden enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kovalent bağlama yöntemi kullanılır. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, bağlanmanın enzim aktif bölgesinden olmaması ve bağlama esnasında sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesi gerekir. Kovalent bağın doğası gereği enzimatik aktivite bozulduğunda desteğin enzimle birlikte atılması gerekir. Bu da bu yöntemin geri dönüşümsüz şekilde bir defaya mahsus destek materyallerinin kullanılmasına yol açar ki maliyetli bir işlemdir (Brena vd., 2013). Bu yöntemle çapraz bağlama yöntemi bir arada kullanılarak bağlanmanın daha kararlı hale gelmesi sağlanabilir (Güleşci, 2013; Liu vd., 2018).

Kovalent bağlama yöntemiyle enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak inorganik ve organik yapıda birçok doğal ve yapay materyaller kullanılır. Kullanılacak destek materyali suda çözünmemeli, suda ıslanabilmeli ve mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır. Enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmamasının yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler dikkate alınmalıdır (Telefoncu, 1997).

1.2.2.1 Çapraz Bağlama

Moleküller arası tepkimelere dayanarak, enzimler iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler kullanılarak destek materyallerine çapraz bağlanır. Bu yöntem enzimlerin kararlılığı artırmak ve yeniden kullanılabilirliğine olanak sağlamak için enzimler destek materyallerine kovalent bağlarla sağlam bir şekilde sabitlenmiştir. Bununla birlikte enzimler çapraz bağlama işlemi sırasında katalitik aktivitelerini kaybedebilirler (Liu vd., 2018).

En çok kullanılan bağlama reaktifleri; Glutaraldehid, izosiyanat, N, N' bis maleimit, klorformat karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divilsulfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Bunlar arasında glutaraldehid en yaygın olarak kullanılır (Telefoncu, 1997; Liu vd., 2018).

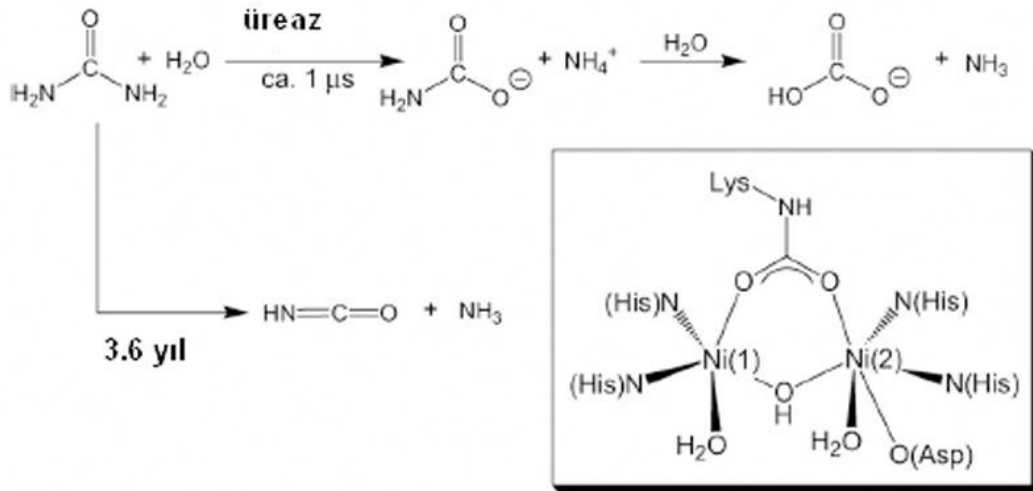
Geleneksel çapraz bağlama metoduyla enzim immobilizasyon yöntemlerinden biraz farklı olarak çapraz bağlanmış enzim agregatları (CLEA) son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. CLEA'lar, enzim molekülleri arasındaki çapraz bağlanma yoluyla çok noktaya eklemeye dayanmaktadır. CLEA'ların penisilin asilazlar, lipazlar,

lakkazlar ve yabanturpu peroksidaz gibi geniş bir aralıktaki enzimlerin başarılı bir şekilde immobilizasyonu sağlanmıştır. (Brena vd., 2013).

1.3 Üreaz Enzimi ve Özellikleri

Üreaz hidrolazlar sınıfına giren nikel bağlı bir metalloenzimdir. Enzimoloji de önemli bir yere sahip olan üreaz, 1926 yılında James B. Sumner tarafından fasulye (*Canavalia ensiformis*) tohumundan ilk defa kristalleştirilen enzimdir. Böylece ilk defa bir enzim saf olarak elde edilmiş ve enzimlerin protein yapısında oldukları kesin olarak kanıtlanmıştır. Enzimlerin substratı aktive etmek ve tepkimeye su sağlamak için aktif bölgelerinde metal iyonları bulundurlar. Bu grup içerisinde üreazlar, aktif bölgelerinde nikel iyonu bulundurmaları açısından diğer dinükleer metalloenzimler arasında tektir (Teke, 2008; Acar, 2009; Güleşçi, 2013; Tetiker, 2016).

Uluslararası Biyokimya Birliği (U.B. International Union Biochemistry) 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı düzenlemeyle, üreaz enzimi E.C.3.5.1.5. olarak kodlanmıştır. Bu sıralamaya göre; '3': Tip no: hidrolaz sınıfı bir enzim, '5':Grup no: C-N bağlarına etkili olan amidaz grubu, '1': Alt grup no: açilamidaz olduğu, '5': Sistematik ad: Enzimin sistematik adının "üre aminohidrolaz" olduğunu gösterir (Güleşçi, 2013; Tetiker, 2016).



Şekil 1.10 Üreaz tepkimesi (Teke, 2008)

Normalde üre hidrolizi yavaş gerçekleşen bir tepkimedir. Üreaz olmadan gerçekleşen tepkimelerde meydana gelen ürünler amonyak ve siyanürik asittir. Üreaz enzimi

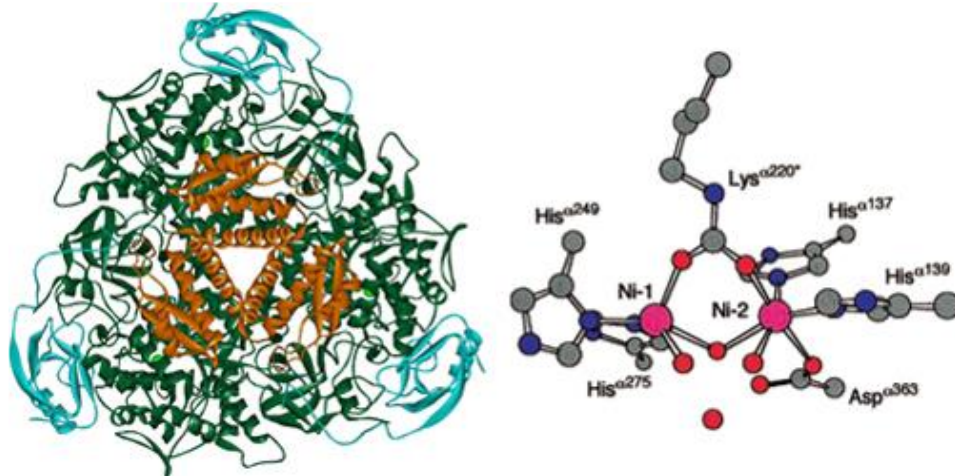
varlığında ise gerçekleşen tepkimelerde oluşan ürünler amonyak ve karbonik asittir. Son basamakta karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Güleşci, 2013).

Üreazın temel işlevi, üreyi amonyak ve karbondioksite parçalayarak organizmaların bu ürünleri azot kaynağı olarak kullanmasını sağlamaktır. Ürün olarak elde edilen amonyak ayrıca topraktaki mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından da kullanılır (Tetiker, 2016).

Üreaz inhibitörleri arasında; amidler, fosforik asit esterleri, tiyoller, hidroksamik asitler, fosfinik ve tiyofosfinik asitler, borik ve boronik asitler, fosfat, ağır metal iyonları, bizmut bileşikleri, kinonlar ve florür sayılabilir. (Krajewska, 2016).

1.3.1 Üreaz Enziminin Molekül Yapısı

Üreazlar buldukları canlı sınıfına göre farklı kuaterner yapı göstermelerine rağmen benzer kataliz mekanizmalarına sahiptirler. Enzimde alfa, beta, gama olarak adlandırılan 3 alt birim bulunur ve aktif merkezler alfa alt biriminde bulunur. Enzimin aktif merkezinde iki nikel iyonu bulunur. Nikel iyonları enzim aktivasyonunda önemli rol oynadığı ve reaksiyonun bu nikel iyonlarının farklı görevleri yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Üreaza bağlı nikel iyonlarından bir tanesi üreyi bağlayarak, diğeri ise nükleofilik su molekülünü bağlayarak aktifleştirir (Güleşci 2013; Tetiker, 2016).



Şekil 1.11 Üreaz enzimin üç boyutlu yapısı (Tetiker, 2016)

Üreaz enzimi içeren kaynaklardan bazıları aşağıdaki gibidir;

1. **Bitkisel Kaynaklı Üreazlar;** Üreaz enzimi özellikle baklagillerden (soya fasülyesi, mısır, nohut, fındık, meksika fasülyesi ve kavun çekirdeği) elde

edilir. Bitkisel kaynaklardan izole edilen enzimler kullanılan organik çözücüler, sıcaklık ve pH gibi etkilerden dolayı, düşük kararlılığa sahiptir ve aktivitelerini hızlıca kaybederler. Bitkilerde üreaz enzimi azot biyoyararlanımında ve bitkiyi patojen organizmalara karşı korumada rol oynar. Üre gübre olarak bitkilere verildiğinde üreaz enzimi sayesinde bitkiler tarafından rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca üre dünyada en fazla kullanılan azot gübresi olduğundan, ürenin enzimatik hidrolizi tarımsal açıdan önem arz etmektedir. Soya fasulyesinden elde edilen *Canavalia ensiformis*, biyokimyasal olarak en iyi karakterize edilen üreazdır (Tetiker, 2016).

- 2. Bakteriye Üreazlar;** Önemli üreaz pozitif bakteriler arasında; *Helicobacter pylori*, *Bacillus pasteuril*, *Yersinia entereolitica*, *Clostridium neoformans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *klebsiella aerogenes*, *proteus vulgaris* ve *morganella morganii* sayılabilir. *Helicobacter pylori*: İnsanlarda mide rahatsızlığına sebep olan bir bakteridir. Düşük mide pH'sında hayatta kalarak midenin asidik yapısını etkiler. Mide ülserleri ve birçok rahatsızlıklara sebep olur. Üreaz enzimi sayesinde ortamda bulunan üreyi parçalayarak oluşan ürünler (amonyak ve karbondioksit) sayesinde ortam pH'sını yükseltir. Yükselen pH ile birlikte G hücrelerinden gastrin hormonu salgılanır ve midede asit sekresyonu artarak zamanla gastrit oluşumuna sebep olur. *Bacillus pasteuril* ise toprakta, pis sularda yaşar. İçerdiği üreaz miktarı sayesinde bitkilerin toprağını azotça zenginleştirir (Güleşci, 2013; Tetiker, 2016).

1.3.2 Üreaz Enziminin Kullanım Alanları

Biyolojik, çevresel, medikal ve endüstriyel sıvılarda üre tayini son derece önemlidir. Üre hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyak ve karbondioksit, pH, sıcaklık ve tepkime ortamındaki iyonik bileşimin değişimlerine sebep olur. Enzimatik tepkimelerden kaynaklanan bu tür değişimleri tayin etmek için birçok üre tayin yöntemi geliştirilmiştir (Tunalı, 2008; Tetiker, 2016).

1.3.2.1 Üre Derişimi Tayini

Serbest üreaz enziminin her zaman kararlı olmaması ve tepkime ortamından uzaklaştıramadığı için tekrar tekrar kullanılmaması maliyet açısından sorun teşkil ettiğın farklı immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. İmmobilize üreazların kullanıldığı tayin yöntemleri; amperometrik, potansiyometrik, optik, kondüktometrik,

kalorimetrik, spektrofotometrik ve iyon değişimi likit kromatografisi şeklinde sıralanabilir. Ticari ürün olarak üre biyosensörleri, kan serumunda, idrarda, suda, atık sularda, besinlerde ve alkollü içeceklerde üre derişimlerini tayin etmek için kullanılmaktadır (Tunalı, 2008).

1.3.2.2 Böbreklerden Ürenin Uzaklaştırılması

Üre, vücut tarafından üretilen ve böbreklerden idrar yoluyla sürekli atılan toksik bir maddedir. Özellikle böbrek rahatsızlıklarında vücuttan uzaklaştırılması gerekir. Ürenin idrarla dışarı atılmayıp kanda birikmesi durumunda, şuur kaybı ve komaya neden olarak ölümlle sonuçlanabilir. Kanda ve idrarda biriken üre, üreaz enzimi tarafından amonyuma dönüştürülerek karaciğer ve böbrekler yardımıyla metabolizmadan idrarla atılır. Özellikle yapay böbreklerde ürenin kandan uzaklaştırılmasında immobilize üreaz sistemleri kullanılmaktadır (Tunalı, 2008, Güleşci, 2013; Tetiker, 2016).

1.3.2.3 Alkollü İçeceklerden Ürenin Uzaklaştırılması

Alkollü içeceklerde özellikle şarapta bulunan üre, karsinojenik bir madde olan etil karbamatin öncül maddesidir ve depolama sırasında açığa çıkar. pH aralığı 3.2 – 4.0 arasında değişen alkollü içeceklerin üre uzaklaştırma yöntemi için asit üreazları kullanılır. Asit üreazı ilk defa sıçan gastrointestinal sisteminde bulunan *Lactobacillus* bakterisinde keşfedilmiş, daha sonra *Streptococcus*, *Escherichia*, *Morganella* ve *Bifidobacterium* gibi farklı cins mikroorganizmalarda da bulunmuştur. Ürenin alkollü içeceklerden asit üreaz ile uzaklaştırılması işlemi esnasında enzim içecekler içerisine karışabilir. Alkollü içecek kullanan bir insanın vücudunda bireken üreaz enzimi, idrar yolu taşlarına ve diğer hastalıklara sebebiyet verebilir. Bu nedenle üre uzaklaştırma işlemlerinde serbest asit üreaz enzimi yerine immobilize asit üreaz reaktörleri tercih edilmektedir (Tunalı, 2008, Tetiker, 2016).

Kreatinin içeriğinin tayin edilmesinde, renal metabolik hastalıkların teşhisinde, biyolojik sıvılarda üre miktarının hesaplanmasında, atık sulardaki ürenin temizlenmesinde, ağır metal iyonlarının tayininde, immünoglobülin G (IgG) ölçümlerinde, arginin analizinde ve gıda endüstrisinde meyve suyu ve yiyeceklerden üre uzaklaştırılmasında üreaz enzimi kullanılır. Bunun yanı sıra, gübre ve atık sularında bulunan ürenin dönüştürülmesinde de kullanılır (Tunalı, 2008, Güleşci, 2013; Tetiker, 2016).

1.3.3. Üreaz immobilizasyonu

Literatürde immobilizasyon araştırmaları yapılmış, en yaygın enzimlerden biri de üreazdır. Krajewska 2009 yılında yaptığı çalışmada, son yirmi yılı kapsayan üreaz immobilizasyonu çalışmalarını, bu çalışmalardaki enzim özelliklerini, immobilizasyon tekniklerini ve kullanılan destek materyallerini derlemiştir. Bu çalışmada ayrıntılı bir üreaz immobilizasyonu tablosuna rastlanmaktadır. Tez kapsamında yararlanılan kaynakları içeren daha küçük bir izelge 1.1’de sunulmuştur.

Çizelge 1.1 Literatürdeki enzim immobilizasyonu çalışmalarından örnekler

Destek	Deney Koşulları			V _{max} (U mg ⁻¹)		K _m (mM)		Kaynak
	C _{URS} ¹	t/°C	pH	SE ²	İE ³	SE ²	İE ³	
Hidroksiapatit	304		8	230.7	152.9	7.45	6.89	Marzadori vd, 1998
Polianilin	% 0.1	25	7	0.28	0.24	8.7	12.36	Laska vd., 1999
p(NIPAAm-NAS-HEMA)	102	60-70	7.5		5.71	2.84	2.51	Chen ve Chui, 2000
Poliamid oyuk fiber membran	2000	25	6	25.9	59.7	18	22	Akgöl vd., 2002
Düz Poli(HEMA-GMA2) Dallanmış Poli(HEMA-GMA2)	1000	22	7.5	59.7	26.6 33.4	18	32 24	Bayramoğlu vd, 2003
poli(HEMA-MAH) poli(HEMA-MAH)-Ni	2000	22	6.5	63.4	24.2 27.2	16	26 21	Bayramoğlu vd, 2005
EDC CMC GA		45-50	7	11.0	12.5 8.1 3.0	12.4	27.5 36.5 79.4	Yeon ve Lueptow 2006
TiO ₂ TiO ₂ -Ch	1500 1000	25	7	0.402	1.22 0.899	0.121	0.071 0.321	Doğaç vd, 2014
ECM-g-PAm	143	35	7	5	2	11	14	Alatawi vd, 2018

¹ mg L⁻¹

²SE: Serbest Enzim ³İE: İmmobilize Enzim

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu tez kapsamında yer alan deneysel çalışmalar; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya ve Kimya Bölümleri Araştırma Laboratuvarlarında Ocak 2017-Aralık 2018 tarihleri arasında yapılmıştır.

Hazırlanan kompozit materyaller ve bileşenlerinin karakterizasyonlarında;

- FTIR ve SEM analizleri için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (CÜTAM),
- XRD analizleri için Erciyes Üniversitesi (Kayseri) Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM),
- TG ve DSC analizleri için İnönü Üniversitesi (Malatya) Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarı olanaklarından yararlanılmıştır.

2.2 Kullanılan Maddeler

Bu çalışmada poliakrilamit-bentonit (PB), poliakrilamit-kitosan (PCh) ve poliakrilamit-kitosan-bentonit (PChB) kompozitlerinin hazırlanmasında kompozit bileşeni olan Na-Bentonit (Alfa Aesar, Germany) ve kitosan (Alfa Aesar, Germany) herhangi bir kimyasal işlem yapılmaksızın doğrudan kullanılmıştır. Kompozitin polimer bileşeninde akrilamid (Merck, Germany), epiklorohidrin (ECH) (Sigma-Aldrich, Germany), N,N'-metilenbisakrilamid (Alfa Aesar, Germany), N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED) (Sigma, China), sodyum tripolifosfat (NaTTP) (Merck, Germany) ve amonyumperoksidisülfat (Merck, Germany) kullanılmıştır.

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar, KBr (FTIR Grade, Merck, Germany), KNO₃ (Merck, Germany), glacial asetik asit (Merck, Germany), NH₄OH (Merck, Germany), fenol (Merck, Germany), sodyumnitroprussid (NaNO₂Prs) (Sigma, USA.), sodyum hidroksit (Merck, Germany) ve sodyumhipoklorittir (aktif klor içeriği %15.46).

Enzim içeren çalışmalarda, Fasulye (*Jack Bean*) (*Canavalia ensiformis*)'den elde edilen U1500-20KU aktiveye sahip Tip III 15.000-50.000 birim (g katı)⁻¹ enzim (Sigma,USA), üre (Merck, Germany), mono sodyum fosfat (NaH₂PO₄) (Sigma-

Aldrich, Germany) ve disodyum fosfat (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, Germany) ve trisodyum fosfat (Na_3PO_4) (Merck, Germany) kullanılmıştır.

Çalışma boyunca kullanılan tüm kimyasal maddelerin analitik saflıkta ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan suyun çift distile olmasına dikkat edilmiştir.

2.3 PB, PCh ve PChB Kompozitlerinin Hazırlanması

PB kompoziti Baybaş, PCh ve PChB kompozitleri ise Eninanç tarafından verilen yöntemler izlenerek hazırlanmıştır (Baybaş, 2009; Eninanç, 2013).

PChB kompozitinin hazırlanmasında öncelikle kitosan-bentonit (ChB) materyali sentezlenmiştir. 4 g ChB sentezlemek amacıyla; %5 (v/v)'lik 80 mL asetik asit içerisinde 2 g kitosan (Ch) ve 2 g bentonit (B) bir manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca homojen bir süspansiyon elde edilene kadar karıştırılmış ve bir gece beklemeye bırakılmıştır. Elde edilen süspansiyona 80 mL epiklorohidrin (ECH) (0.001M pH=10) ilave edilmiş ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşan viskoz süspansiyon şırınga içerisine alınarak 250 mL 0.05 M sodyum tripolifosfat (NaTPP) bulunan behere damla damla ilave edilerek boncuklar oluşturulmuş ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. Oluşan boncuklar yapısındaki safsızlıklar yıkama suyu iletkenliğinin distile su iletkenliğine ulaşınca dek yıkanmıştır. Saflaştırılan ChB kompoziti kurutulup öğütülerek kapalı kaplarda saklanmıştır.

PB ve PCh kompozitlerinin hazırlanmasında 2 g bentonit veya 2 g kitosan, PChB kompozitinin hazırlanmasında ise yukarıda açıklanan 2 g ChB 10 mL suya eklenerek bir manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. Bu süspansiyonlara sırasıyla; 4 g akrilamid monomer ve 0.4 g N,N'-metilenbisakrilamidin (çapraz bağlayıcı) 10'ar mL sudaki çözeltileri ilave edilmiştir. Homojen süspansiyonlar elde edilinceye kadar karıştırıldıktan sonra 2 mL amonyum persoksidisülfat (100 mg mL^{-1}) ve 500'şer μL N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (hızlandırıcı) eklenerek içinde B, Ch veya ChB tutuklanmış poliakrilamid (PAAm) oluşumu sağlanmıştır. Oluşan kompozitler suya alınmış ve saf su ile yıkama suyunun iletkenliği saf su iletkenliğine erişene kadar yıkanmış, kompozitler dekantasyonla ayrılarak $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de etüvde kurutulmuştur. Elde edilen kompozitler öğütülerek kapalı kaplarda saklanmıştır.

2.4. Yapısal Analizler

2.4.1 FT-IR Analizleri

Kompozitler (PB, PCh ve PChB) ve bileşenlerinin (PAAm, B, Ch, ChB) FT-IR spektrumları FT-IR cihazı (Bruker Tensor II) kullanılarak alınmıştır. 400-4000 cm^{-1} aralığında spektrumlar alınmıştır. Zemin spektrumu (background) olarak saf KBr spektrumu kullanılmıştır.

2.4.2 XRD ve SEM Analizleri

PAAm, B, Ch, ChB, PB, PCh ve PChB örneklerinin SEM görüntüleri Yüksek Taramalı Elektron Mikroskobu (TESCAN MIRA3, XMU) ve XRD spektrumları ise XRD cihazı (BRUKER AXS D8 ADVANCE) ile alınmıştır.

2.4.3 Termal Analizler

TG ve DSC analizleri ilgili cihaz (SHIMADZU-50) kullanılarak yapılmıştır. Termal testlerde, azot atmosferi ve 10 $^{\circ}\text{C dk}^{-1}$ tarama hızı kullanılmıştır.

2.4.4 Sıfır Yük Noktasının (SYN) Saptanması

Sıfır yük noktalarını belirlemede örneklerle etkileştirilen çözeltilerin başlangıç ve denge pH değerleri saptanarak belirlenmiştir. 100 mg PB, PCh veya PChB örneklerine pH'leri 1-12 arasında değişen 0.1 M KNO_3 çözeltisinden 10 mL eklenmiş ve 24 saat karıştırıldıktan sonra pH değerleri ölçülmüştür (Mullet vd., 1999; Smičiklas vd., 2000; Smičiklas vd., 2008). pH ölçümlerinde THERMO marka Orion 420A+ model pH metre kullanılmıştır.

2.5 Sulu Çözeltiden Üreaz İmmobilizasyonu

Üreazın PB, PCh ve PChB kompozitlerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonu incelenmiş ve adsorpsiyon parametreleri türetilmiştir. İmmobilizasyona pH, derişim, zaman ve sıcaklık etkisi incelenerek immobilizasyonun optimum koşulları belirlenmiştir. İmmobilizasyonun sıcaklıkla değişimi dışındaki tüm deneyleri 298 K sabit sıcaklıkta yapılmıştır. Tüm immobilizasyon deneylerinde adsorban kütlesi 0.1 g, ve adsorbat hacmi 10 mL olarak seçilmiştir. İmmobilizasyon işlemlerinin sonunda denge çözeltilerinde kalan üreaz derişimleri iletkenlik ölçümü yöntemiyle belirlenmiştir. Ölçümleri ECOSCAN (Con5) iletkenlik ölçüm cihazı kullanılmıştır.

50-3000 mg L^{-1} derişim aralığında 10 mM fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) tamponunda (pH=7) üreaz çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerin 1'er mL'si tampon çözeltiyle 9

mL'ye seyreltilip 1 mL 10000 mg L⁻¹ üre sulu çözeltisi eklenerek üreazın üre bozundurma tepkime başlatılmıştır. Tepkime ürünü derişiminin zamana bağlı değişimi iletkenliğin 30, 60, 120, 180, 240 ve 300. saniyedeki değerleri olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1). Her bir üreaz derişimi için elde hesaplanan ilk hızın üreaz derişimine bağlı değişiminden elde edilen doğrusal grafik çalışma (kalibrasyon) eğrisi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2).

2.5.1 İmmobilizasyonun Derişimle Değişimi

Fosfat tamponundaki 50–2000 mg L⁻¹ aralığında değişen üreaz çözeltilerinin 10 mL'si 0.1'er g PB, PCh veya PChB kompozitlerine eklenmiş ve sabit sıcaklıktaki su banyosunda 24 saat inkübe edilmiştir. İmmobilizasyon sonunda denge çözeltilerinde kalan üreaz derişimlerine bağlı ilk hız değerleri Bölüm 2.5'de açıklanan yöntem izlenerek saptanmış ve çalışma eğrisi kullanılarak üreaz derişimi hesaplanmıştır. Elde edilen denge derişimlerinden adordplanan üreaz miktarları hesaplanmıştır.

2.5.2 İmmobilizasyonun Zamanla Değişimi

0.2 g PB, PCh veya PChB kompozitlerine 20 mL 2000 mg L⁻¹ (pH=7) üreaz çözeltisi eklenmiş ve 24 saat boyunca 25 °C'de belirli süre aralıklarla immobilizasyon ortamından 0.5 mL hacimli örnekleme yapılmıştır. Örnekleme başlangıçta kısa süre aralıklı (10, 20, 30 45... dk), ilerleyen zamanda ise uzun aralıklı seçilmiştir. Zamanla azalan denge derişimleri Bölüm 2.5'de verilen iletkenlik ölçüm yöntemiyle hesaplanmıştır (Ölçümlerde, örnekleme hacmi nedenli olarak toplam 5 mL hacimle çalışılmıştır) İmmobilize olan enzim miktarları hesaplanarak kinetik parametreler türetilmiştir.

2.5.3 İmmobilizasyonun Sıcaklıkla Değişimi

Üreaz immobilizasyonuna sıcaklık etkisini incelemek için 0.1 g kompozit örneklerinin her birine 10 mL 2000 mg L⁻¹ (pH=7) üreaz çözeltisi ilave edilmiş ve 277, 288, 298, 308 ve 318 K sıcaklıklarda 24 saat bekletilmiştir. Denge derişimleri Bölüm 2.5'de verilen iletkenlik ölçüm yöntemiyle hesaplanmıştır.

2.6 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi

Üreaz enzimi yukarıdaki deneyler sonucunda belirlenen optimum koşullarda PB, PCh ve PChB üzerine immobilize edilmiştir. Tutunmuş üreaz aktivitesinin pH, substrat derişimi ve sıcaklık ile değişimi serbest enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak

incelenmiştir. Bunlara ekolarak kompozitlere tutturulmuş enzimin tekrar kullanımı incelenmiştir.

Enzim aktivitesi ölçümleri Berthelot yöntemiyle belirlenmiştir.

Bu yöntemde;

- Reaktif-A çözeltisi; 10 g fenol ve 0.05 g sodyum nitroprussid 1 L saf su içerisinde,
- Reaktif-B çözeltisi ise; 5 g sodyumhidroksit ve 0.42 g sodyum hipoklorit 1 L saf su içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan reaktifler, renkli şişelere alınmış ve buzdolabında saklanarak kararlı kalmaları sağlanmıştır. İmmobilize veya serbest enzimle etkileştirilen üre çözeltilerinin 1'er mL'sine 5'er mL reaktif A ve B ilave edilmiş, oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat sonra kararlı hale gelen mavi renk 630 nm'deki absorbans değerleri UV-GB spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (Chaney ve Marbach, 1961).

2.6.1 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin Substrat Derişimi ile Değişimi

Destek Materyallerine Enzim İmmobilizasyonu:

PB, PCh ve PChB'nin her birinden 6 adet 0.1'er g tartılıp, üzerine 10'ar mL 200 mg L⁻¹ üreaz çözeltisi (pH 7 fosfat tamponunda) eklenmiştir. 25 °C'de immobilizasyon başlatılarak 24 saat sonunda denge çözeltileri ayrılmıştır. Enzim tutunmuş kompozitlerin (PB-U, PCh-U ve PChB-U) her biri 20 mL 10 mM pH=7 fosfat tampon çözeltisiyle yıkanmıştır. Denge ve yıkama çözeltilerinin 1'er mL'si toplam hacim 9 mL olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildikten sonra üzerine 1 mL 10000 mg L⁻¹ üre eklenerek hidroliz tepkimesi başlatılmıştır. 5 dk sonunda tepkime ortamından belirli hacimde çözelti alınmış ve hacimce 1:1 oranında Berthelot (B) reaktifine eklenerek tepkime durdurulmuştur. Bu çözeltideki NH₄⁺ derişimleri Berthelot yöntemi ile belirlenmiştir.

İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi:

Denge çözeltilerinden ayrılmış ve yıkanmış destek materyalleri, su tutma kapasiteleri de göz önünde bulundurulacak şekilde toplam hacim 9 mL olana kadar pH=7 fosfat tamponu eklenmiş ve 0, 500, 1000, 5000, 10000 ve 20000 mg L⁻¹ üre derişimleriyle 10 mL tepkime ortamı sağlanarak aktiviteleri izlenmiştir.

Serbest Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi:

1 mL 200 mg L⁻¹ serbest enzime 8 mL pH=7 fosfat tamponu eklenmiş ve üzerine 1 mL 0, 500, 1000, 5000, 10000 ve 20000 mg L⁻¹ üre derişimli çözelti eklenerek 10 mL'lik tepkime ortamı sağlanarak aktiviteler izlenmiştir.

Serbest ve immobilize enzimler için, başlangıç substrat derişimlerine ([S]₀) karşı 5. dk'daki tepkime hızı (v₀) değerleri grafiğe geçirilmiş, Michaelis-Menten grafikleri çizilmiştir.

2.6.2 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin pH ile Değişimi

Adsorpsiyon yöntemiyle PB, PCh ve PChB üzerine optimum koşullar sağlanarak immobilize edilen üreaz enzimleri yukarıda anlatıldığı gibi, süzülüp yıkanmış ve destek materyallerine immobilize edilen enzim miktarları belirlenmiştir.

İmmobilize halde üreaz içeren destek materyalleri üzerine pH'ları 2, 3, 6, 7 ve 11 olan 10 mM'lık fosfat tamponlarının (H₃PO₄/NaH₂PO₄/Na₂HPO₄/Na₃PO₄) 9 mL'si eklenmiş ve sonra eklenen 1 mL 10000 mg L⁻¹ üre çözeltisi ile tepkime başlatılmıştır. 5 dk sonunda tepkime durdurulmuştur. Bu süre sonunda ortamda biriken amonyak miktarı Berthelot yöntemiyle ölçülerek immobilize üreaz enziminin % aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Yukardaki işlemler benzer şekilde serbest enzim için de tekrarlanmıştır;

1 mL 200 mg L⁻¹ serbest enzim üzerine aynı pH'lardaki 9 mL fosfat tamponları ve 1 mL üre eklenerek tepkime başlatılmış ve ölçme işlemleri yapılmıştır.

2.6.3 İmmobilize Üreaz Enzim Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi

Üreaz, 0.1 g kompozit örneklerinin 10 mL 200 mg L⁻¹ 25 °C'de enzim çözeltileri ile etkileştirilmesiyle kompozitler üzerine immobilize edilmiştir. Üreaz içeren kompozitler yıkanmış ve aktivite ölçüm deneylerine hazırlanmıştır.

Enzim içeren kompozitler 9 mL 10 mM pH 7 fosfat tamponuna alınmıştır. Üzerine 1 mL 10000 mg L⁻¹ üre çözeltisi eklenerek 4, 15, 25 ve 35 °C'de tepkime başlatılmıştır. Benzer işlemler eş koşullardaki serbest enzim için de yinelenmiştir. Tepkime başlangıcından 5 dk sonrasında ortamda oluşan NH₄⁺ miktarları ölçülmüş, özgül ve % aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.4 İmmobilize Enzimin Kullanım Kararlılığının Araştırılması

İmmobilizasyonun en önemli avantajlarından biri de enzimin tekrar kullanılabilir hale getirilmesidir. Bu amaçla optimum koşullarda (25 °C pH=7) adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen üreaz enzimi ardıl üre hidrolizi tepkimelerine sokulmuş ve kompozitler her kullanım sonunda 20 mL 10 mM fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Bu işlem 7 kez tekrarlanmıştır. İmmobilize enzimin her tepkime sonundaki aktivitesi ölçülmüş ve her kullanım için mM dk⁻¹ biriminde aktivite değerleri hesaplanmıştır. 7 kullanım için ortalama aktivite değerleri, standart sapma ve standart hataları ile birlikte sunulmuştur.



3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 Verilerin Değerlendirilmesi

3.1.1 Adsorbanların Yapısal Karakterizasyonunda XRD Değerlendirilmesi

PAAm, B, Ch, ChB, PB, PCh ve PChB adsorbanlarının yapısal karakterizasyonunda X-ışını kırınım (XRD) spektrumu analizi yapılmıştır. Bragg denklemi ile tabakalar arası açılma hesaplanmıştır.

$$d_{hkl} = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} \quad \text{Bragg Denklemi} \quad (1)$$

burada 'd' tabakalar arası mesafe (hkl Miller indisleri ile tanımlı), 'λ' kullanılan X-ışını demetinin (Cu Kα) dalga boyu (0.154 nm) ve 'θ' yansıma açısı olarak tanımlanmaktadır.

3.1.2. Enzim İmmobilizasyonunda İletkenlik Yöntemi

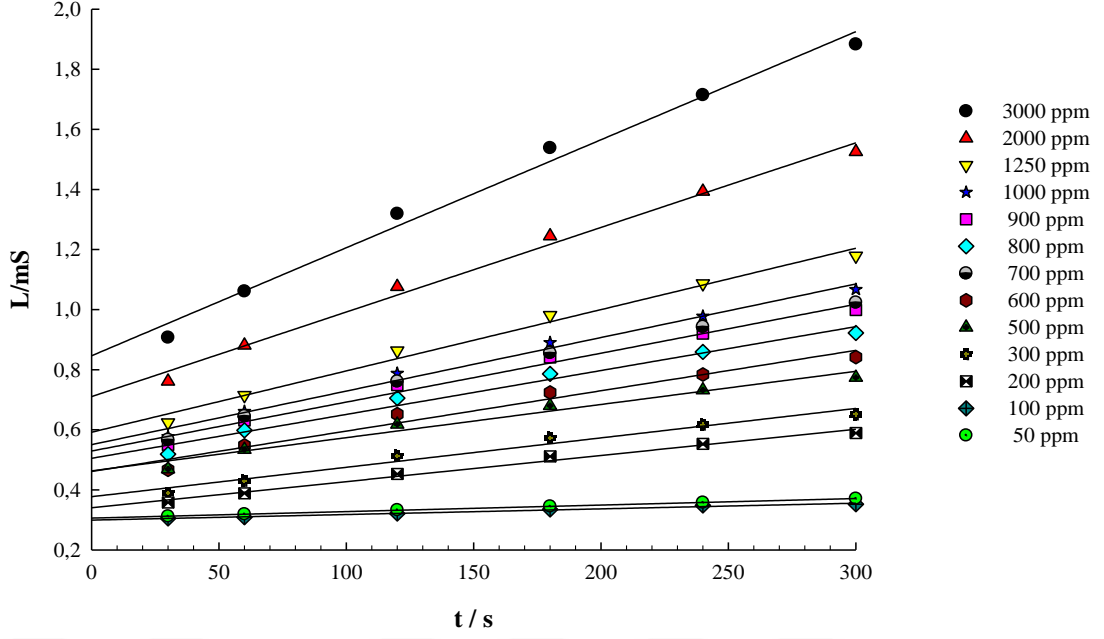
İmmobilizasyon deneylerinin tümünde, aynı stoktan farklı derişimlerde standart enzim çözeltileri hazırlanmıştır. Bu standart enzim çözeltilerine sabit ve yüksek derişimde üre (10000 mg L⁻¹) eklenerek başlatılan tepkimelerin 30-300 s aralığında ölçülen iletkenlik verileri ile çizilen İletkenlik (L/μS veya mS)-Süre (t/s) grafiklerinin eğimi enzim-substrat çözeltilisinin ilk hızını verir. Örnek grafik Şekil 3.1'de görülmektedir. İlk hız (v₀/μS s⁻¹)-Standart enzim derişimi (C_{std}/mg L⁻¹) grafiği (Şekil 3.2) ise kalibrasyon doğrusunu oluşturmaktadır.

Adsorpsiyon sonrası elde edilen denge çözeltilerinin enzim içeriğinin bulunmasında da üre eklenerek ilk hızlar bulunmuş, ilk hız değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine yazılarak immobilize olmamış enzim derişimleri hesaplanmıştır.

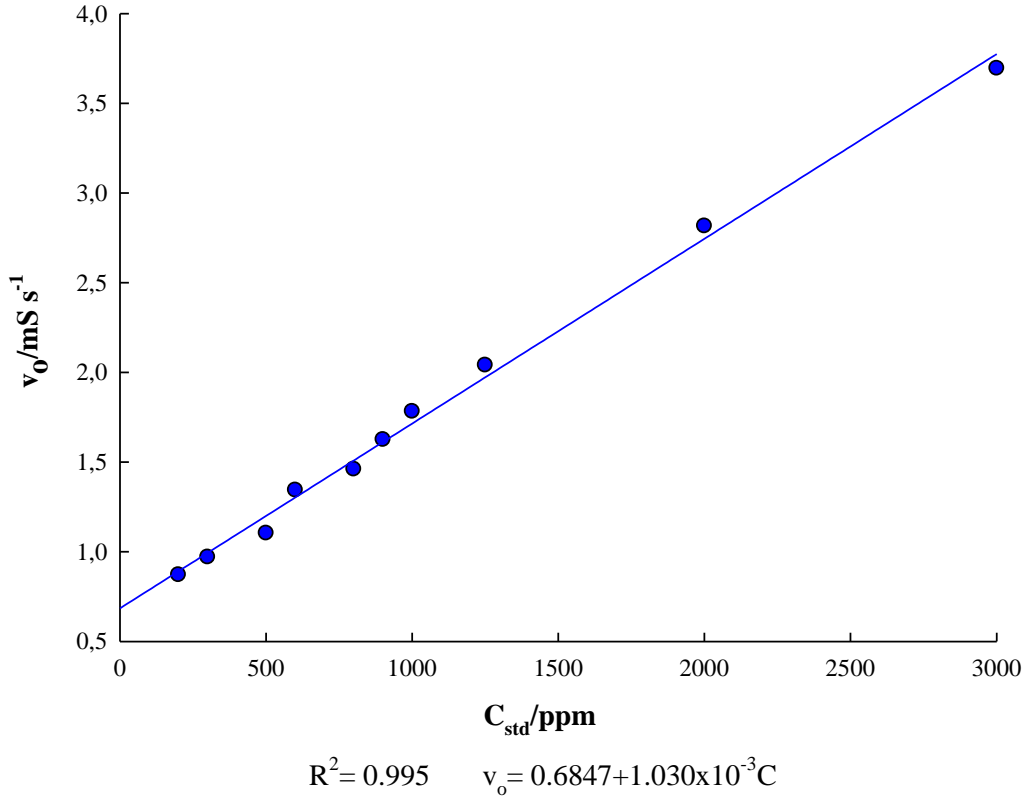
Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon çalışmalarında immobilize edilen enzim miktarı Q (g mg⁻¹)

$$Q = \left[\frac{C_i - C_d}{m} \right] V \quad (2)$$

eşitliği ile hesaplanmıştır. Burada 'C_i' adsorbanla etkileştirilen enzimin başlangıç derişimini (mg L⁻¹), 'C_d' adsorpsiyon sonundaki denge derişimini (mg L⁻¹), 'm' adsorban kütlesini (g) ve 'V' çözelti hacmini (L) göstermektedir.



Şekil 3.1: İletkenlik ölçümlerinde standart üreaz çözeltilerinin ilk hızlarının bulunmasında kullanılan örnek İletkenlik (L)-zaman (t) grafiği.



Şekil 3.2: İletkenlik ölçümlerinde kullanılan örnek kalibrasyon doğrusu (Standart üreaz derişimi/mg L⁻¹-ilk hız/mS s⁻¹)

3.1.2.1 İzotermlerinin Değerlendirilmesi

Bu araştırmada deneysel verilerden elde edilen (Q-C_d) izotermier Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ile değerlendirilmiştir.

$$Q = \frac{K_L \cdot X_L \cdot C_d}{1 + K_L C_d} \quad \text{Langmuir Modeli} \quad (3)$$

Langmuir modeli; 'Q' adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanan enzimin (adsorbat) miktarını (mg g⁻¹), 'C_d' adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan adsorbat derişimini (mg L⁻¹), 'X_L' adsorpsiyon kapasitesini ve 'K_L' adsorpsiyon enerjisi ile ilgili Langmuir sabitini (L mg⁻¹) gösterir.

$$Q = X_F C_d^\beta \quad \text{Freundlich Modeli} \quad (4)$$

Freundlich modeli; 'Q' adsorplanan miktarı (mg g⁻¹), 'X_F' adsorpsiyon kapasitesinin ölçüsü, 'C_d' adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan adsorbat derişimini (mg L⁻¹) ve 'β' adsorban yüzey heterojenliği olarak tanımlanan ve değeri 0 < β < 1 değeri ile ilişkilidir.

Oluşturulan Q-C_d deneysel izotermierinin ilgili adsorpsiyon modellerine (Langmuir ve Freundlich modelleri için) uyumu SigmaPlot grafik ve istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Adsorbanın adsorpsiyon verimliliği

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (5)$$

eşitliği kullanılarak değerlendirilmiştir. Burada 'R_L' boyutsuz ayırma faktörünü, 'K_L' (L mg⁻¹) Langmuir sabitini ve 'C₀' (mg L⁻¹) adsorbatın başlangıç derişimini belirtmektedir. Adsorpsiyon; R_L büyüklüğüne bağlı olarak 1 < R_L verimsiz (kullanışsız), 1 = R_L doğrusal (verimli), 0 < R_L < 1 olumlu (elverişli) ve R_L = 0 ise tersinmezdir (Baybaş ve Ulusoy. 2011).

Kompozitlerin boyutsuz faktör açısından elverişliliği öngörmek için, ilgili iyonun 'C₀' (mg L⁻¹) derişiminin 'C_d' derişimine artırılması için gerekli olan kurumsal adsorban miktarı hesaplanmıştır.

$$\frac{W}{V} = \frac{C_0 - C_i}{\left(\frac{K_L X_L C_d}{1 + K_L C_d} \right)} \quad (6)$$

Burada 'C₀' başlangıç derişimini (mg L⁻¹), 'C_d' denge derişimini (mg L⁻¹), 'W' gerekli olan adsorban kütleini (g) ve 'V' çözeltili hacmini (L) göstermektedir (Baybaş ve Ulusoy, 2011).

3.1.2.2. Enzim İmmobilizasyonunun Zamanla Değişiminin Değerlendirilmesi

Enzim immobilizasyonunun kinetik açıdan değerlendirilmesinde kullanılan çok sayıdaki modelden en yaygın olarak kullanılan sözde (pseudo) birinci ve ikinci kinetik modelleri tercih edilmiştir.

Sözde (pseudo) birinci derece (Lagergren) ve sözde ikinci derece doğrusal olmayan hız ifadeleri;

$$Q_t = Q_k(1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

$$Q_t = \frac{k_2 Q_k^2 t}{1 + k_2 Q_k t} \quad (8)$$

şeklindedir. Burada Q_t ve Q_k (mg g⁻¹) kompozite tutunan enzim miktarını göstermektedir: Q_t adsorpsiyon başlangıcından herhangi bir "t" süre sonraki deneysel miktarı. Q_k ise deneysel Q_t-t verilerinin bu hız modeline uyumundan bulunacak olan miktarı tanımlar. "k₁" (dk⁻¹) ve "k₂" (g mg⁻¹ dk⁻¹) birinci ve ikinci derece adsorpsiyon hız sabitlerini gösterir. Her iki dereceden hız modelinde bulunacak Q_k değeri adsorpsiyonun denge durumundaki adsorplanan teorik miktarı tanımlamaktadır. Deneysel olarak ulaşılan denge durumundaki Q_d değerleri ile Q_k değerlerinin birbirlerine yakınlığı adsorpsiyonun izlenme süresinin yeterli olup olmadığını gösteren bir ölçüttür. Adsorpsiyonun sözde bir ve ikinci derece modeli için başlangıç hızı (H; mg g⁻¹ dk⁻¹) ve yarılanma süreleri (t_{1/2}; dk) hesaplamasında ise;

$$H_1 = k_1 Q_k \quad (9)$$

$$H_2 = k_2 Q_k^2 \quad (10)$$

$$(t_{1/2})_1 = \frac{\ln 2}{k_1} \quad (11)$$

$$(t_{1/2})_2 = \frac{1}{k_2 Q_k} = \frac{Q_k}{H_2} \quad (12)$$

denklemleri kullanılır (Ho ve McKay, 1999; Basha ve Murty, 2007).

Weber-Morris denkliği olarak bilinen adsorban içine difüzyon modeline göre "k₁" difüzyon hız sabitini göstermek üzere;

$$Q_t = k_1 t^{0.5} \quad (13)$$

denklemiyle ifade edilir.

Sonuç olarak kinetik çalışma ile ilgili deneysel verilerin ilgili modellere uygun olarak Q=f(t) grafikleri (şekil 3.24) oluşturulmuş ve araştırılan modellere uyumu SigmaPlot grafik ve istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.1.3. Enzim Kinetiği ve Aktivite İle İlgili Değerlendirmeler

Ürenin üreaz kataliziyle gerçekleşen hidroliz tepkimesi;



şeklindedir. Tepkime ilk hızının genel ifadesi ise;

$$V_0 = -\frac{\partial [\text{Tepken}]}{\partial t} = \frac{1}{2} \frac{\partial [\text{Ürün}]}{\partial t} \quad (15)$$

eşitliği ile µmol dk⁻¹ biriminde verilebilir. Bu alışma boyunca, iletkenlik ve Berthelot spektrofotometrik yöntemleriyle ölçülen amonyak derişimi kullanılarak ilk hız ifadeleri türetilmiştir.

Tepkime hızının, substrat derişimi ile değerimi Michaelis-Menten yaklaşımı,

$$V_0 = \frac{v_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (16)$$

doğrusal olmayan eşitliğiyle ifade edilir.

Bölge No	Hız Eşitlikleri	Grafiksel Gösterimleri
1. Bölge $[S] \ll K_m$	$v = (V_{max}/K_m)[S] = k[S]$ $-ds/dt = ks;$ $2,3 \log [S_0]/[S] = kt$ $t_{1/2} = 0,693 / k$	
2. Bölge $[S] = 0,3 - 2 K_m$	$v = (V_{max}[S]) / (K_m + [S])$ $1/v = (K_m/V_{max})(1/[S]) + (1/V_{max})$ $[S]/v = (1/V_{max})[S] + (K_m/V_{max})$ $v = -K_m(v/[S]) + V_{max}$ $v/[S] = -(1/K_m)v + (V_{max}/K_m)$ $-(d[S]/dt) = (V_{max}[S]) / (K_m + [S])$ $[P]/t = -K_m[(2,3/t) \log ([S_0]/[S]) + V_{max}]$	
3. Bölge $[S] \gg K_m$	$v = V_{max}$	

Şekil 3.3 İlk Hızın (V_0) substrat derişimine bağı değişimi (Telefoncu, 1997)

V_0 -[S] grafiği 3 bölge içerir (Telefoncu, 1997).

1. Bölge, substrat derişiminin belirlenmesinde kullanılır. Standart çözeltiler kullanılarak, k hız sabiti bulunur ve bilinmeyen örnekler analiz edilir.

2. Bölge $[S] \sim K_m$ bölgesidir. K_m ve V_{max} belirlemede kullanılır.

3. Bölge $[S] > 100K_m$ bölgesidir ve enzim miktarının belirlenmesinde kullanılır.

Bu bölgede sıfırcı derece kinetik geçerlidir.

Bu bilgiler eşliğinde, tez kapsamında enzim miktarı belirleme deneylerinde yüksek üre derişimleri (10000 mg L⁻¹) kullanılmıştır.

Bir ünite üreaz enziminin aktivitesi; dakikada bir µmol amonyak oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Serbest ve immobilize enzim aktivitelerinin pH ve sıcaklıkla değişimi deneylerinin değerlendirilmesinde % aktivite değerleri kullanılmıştır.

$$\% \text{ Aktivite} = \left(\frac{A_i}{A_{\max}} \times 100 \right)_{\text{serbest ya da immobilize enzim}} \quad (17)$$

Burada A_i her bir pH veya sıcaklık için elde edilen aktivite değerleri (serbest ya da immobilize enzim için), A_{max} ise o deneyde elde edilen en yüksek aktiviteyi ifade eder.

EK 6 ve 7'de ayrıca % bağıl aktivite değerleri de görölmektedir. Bağıl aktivite hesabında ise eşitlik (18) kullanılmıştır.

$$\% \text{ Bağıl Aktivite} = \frac{A_i}{(A_{\max})_s} \times 100 \quad (18)$$

A_i her bir pH veya sıcaklık için elde edilen aktivite değerleri (serbest ya da immobilize enzim için), (A_{max})_s ise, serbest enzimin en yüksek değerini göstermektedir.

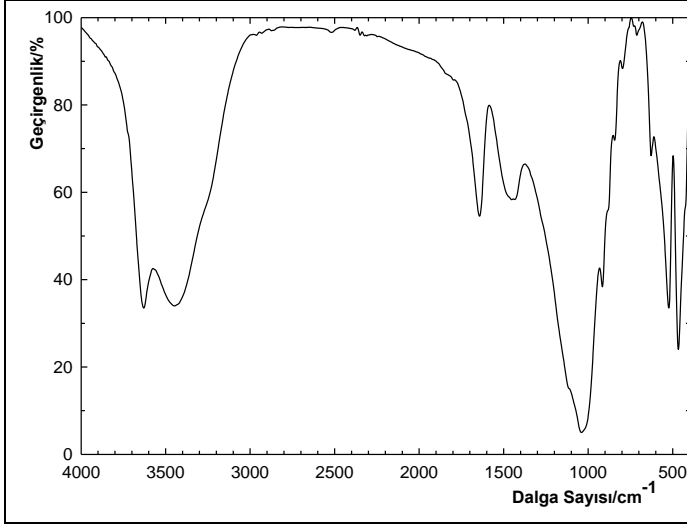
3.2 Adsorbanların Yapısal Karakterizasyonu

Bu bölüm; PB, PCh ve PChB kompozit materyalleri ve bileşenleri için. FT-IR. XRD. SEM. TG. DSC ve SYN analizlerine ait sonuç ve değerlendirilmeleri içermektedir.

3.2.1 FT-IR Analizleri

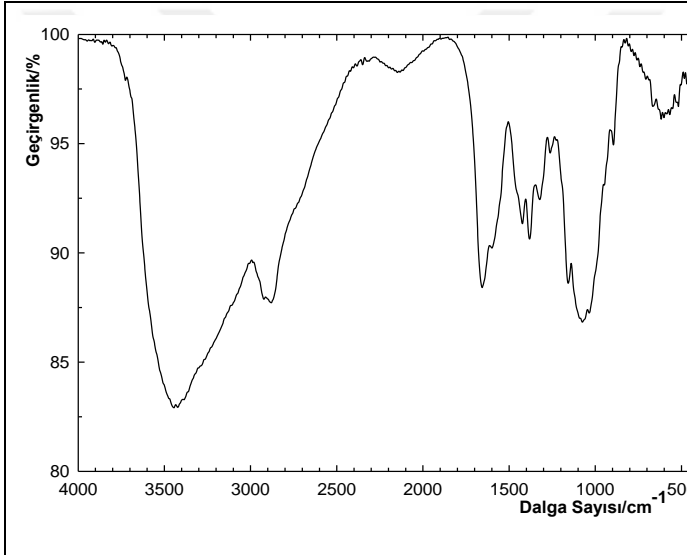
Bu çalışmada kullanılan kompoziterin bileşenlerini oluşturan Ch, B ve PAAm¹'ye ait FT-IR spektrumları ve onlara ait karakteristik açıklamalar sırasıyla Şekil 3.1-3.3'de sunulmuştur. Her bir kompozitin kendi bileşenleri ile FT-IR spektrum kıyaslamaları PB için Şekil 3.4, PCh için Şekil 3.5, ChB için Şekil 3.6 ve PChB için Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

¹ Önceki çalışmalarda, Bölüm 2.3'de açıklandığı gibi, (B,Ch ya da ChB içermeden) sentezlenen PAAm polimeri kullanılmıştır



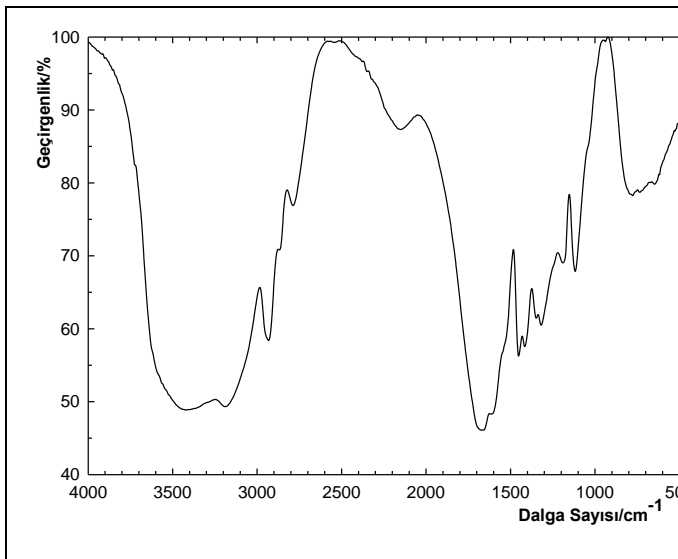
Bentonit spektrumunda; $\sim 3630 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik silanol O-H titreşimini göstermektedir. $3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş bant HO-H gerilmeleri ile ilişkilidir. Tetrahedral kafesteki Si-O titreşimleri $1060\text{-}1120 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki şiddetli pikle gözlenir. 530 ve 460 cm^{-1} 'deki pikler Al-O-Si ve Si-O-Si titreşimlerinin sonucudur (Baybaş, 2009; Anirudhan vd., 2008; Eren ve Afsin, 2008; Bhattacharyya ve Gupta, 2007).

Şekil 3.4 B'nin FT-IR spektrumu



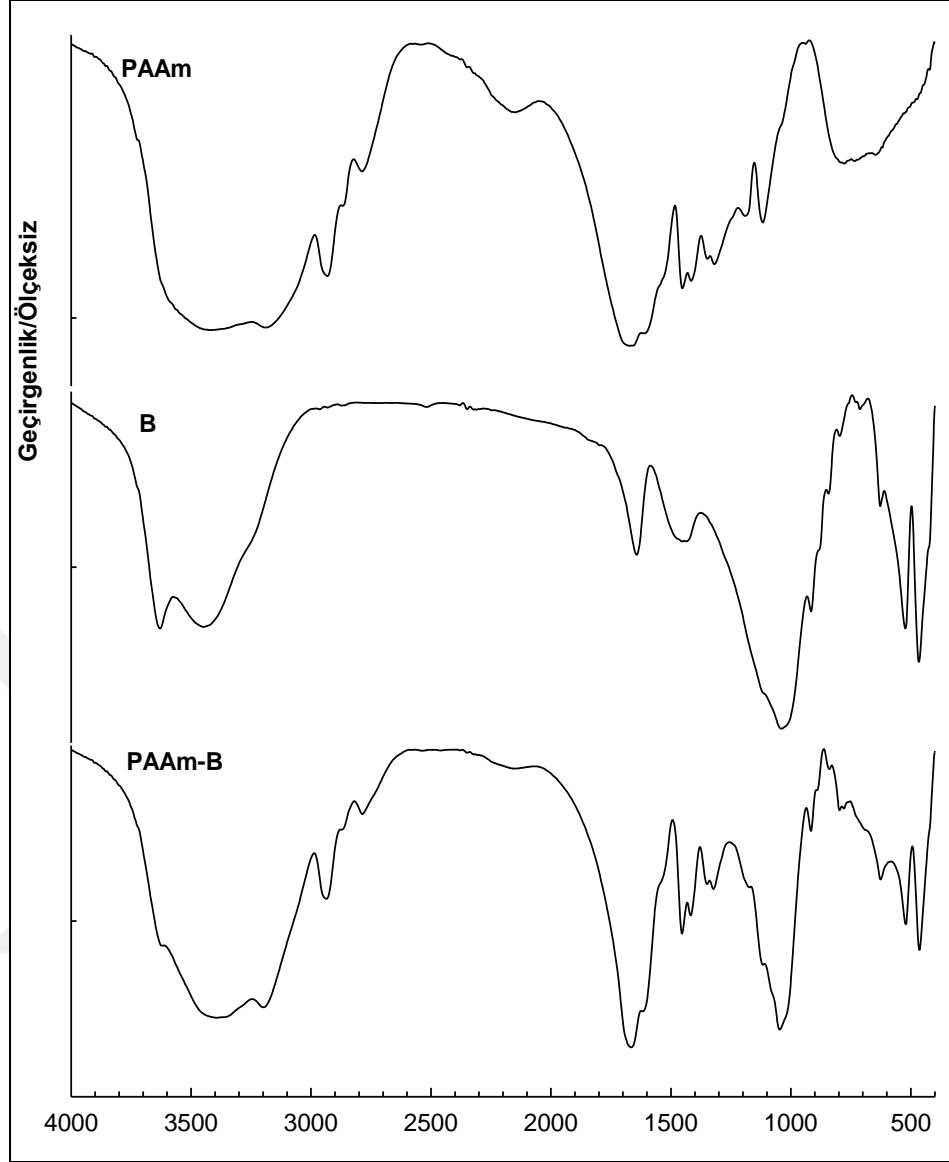
Kitosan IR spektrumunda; 3290 ve 3430 cm^{-1} O-H ve 3500 cm^{-1} N-H gerilmelerini göstermektedir. 2920 ve 2880 cm^{-1} karakteristik simetrik ve asimetrik polisakkarit C-H gerilmelerini tanımlar. 1645 ve 1325 cm^{-1} N-Asetil ile ilgili C=O ve C-N pikleridir. 1320 cm^{-1} amin N-H, 1560 cm^{-1} ve 1660 cm^{-1} bantları amit gruplarındaki N-H ve C=O gerilme titreşimleri ile ilişkilidir. (Qeios vd., 2015, Eninanç, 2013, Humelnicu vd., 2011; Wan Ngah vd., 2012).

Şekil 3.5 Ch'nin FT-IR spektrumu



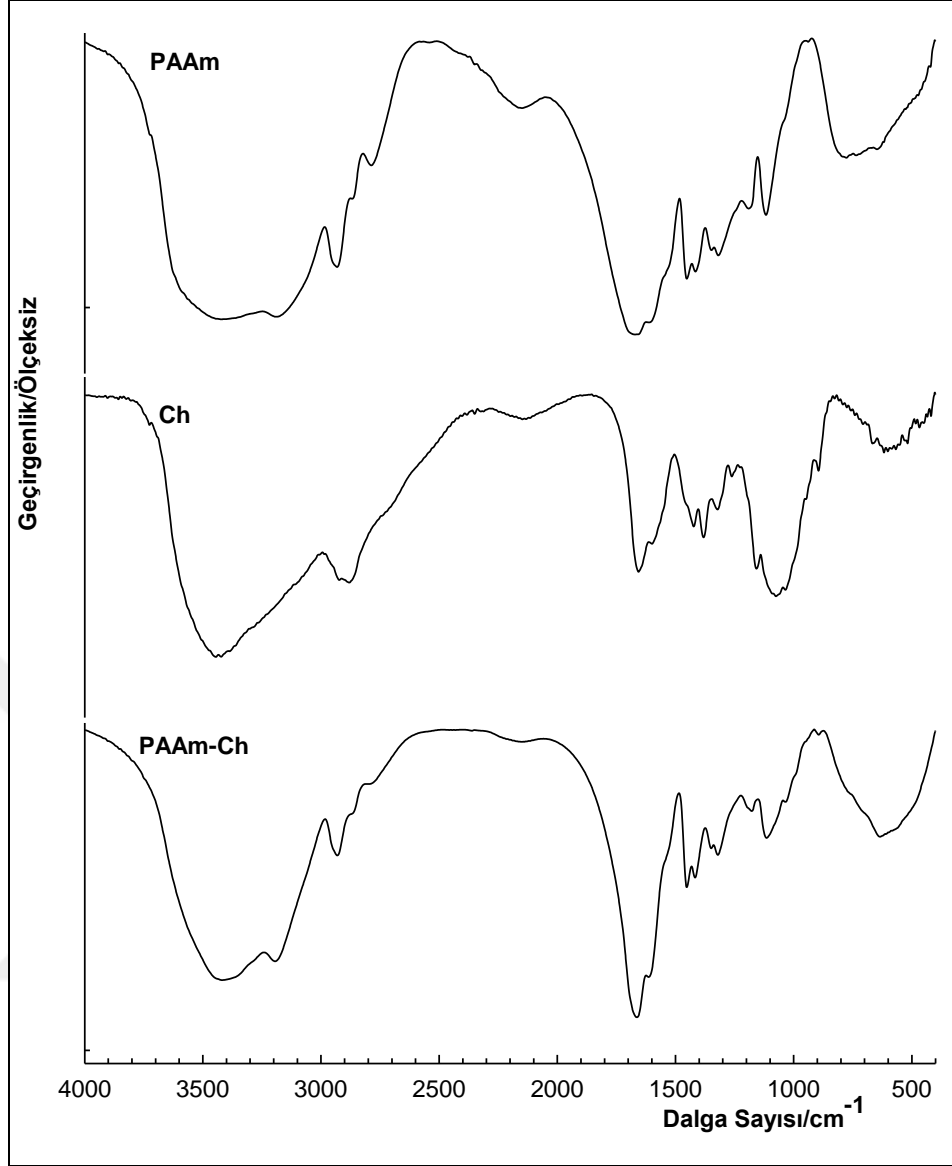
Poliakrilamid (PAAm) spektrumunda; $3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen geniş bant amit grubundaki N-H, 2950 cm^{-1} 'deki keskin pik C-H gerilmelerini göstermektedir. 1670 ve 1610 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla amit grubundaki C=O ve N-H, $1450\text{-}1455 \text{ cm}^{-1}$ pikleri CH ile ilgili gerilme-bükülme titreşimleri ile ilgilidir. $500\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler CH bükülmelerini yansıtmaktadır (Baybaş, 2009; Bai vd., 2007; Mukherjee ve Mukherjee, 2006).

Şekil 3.6 PAAm'nin FT-IR spektrumu



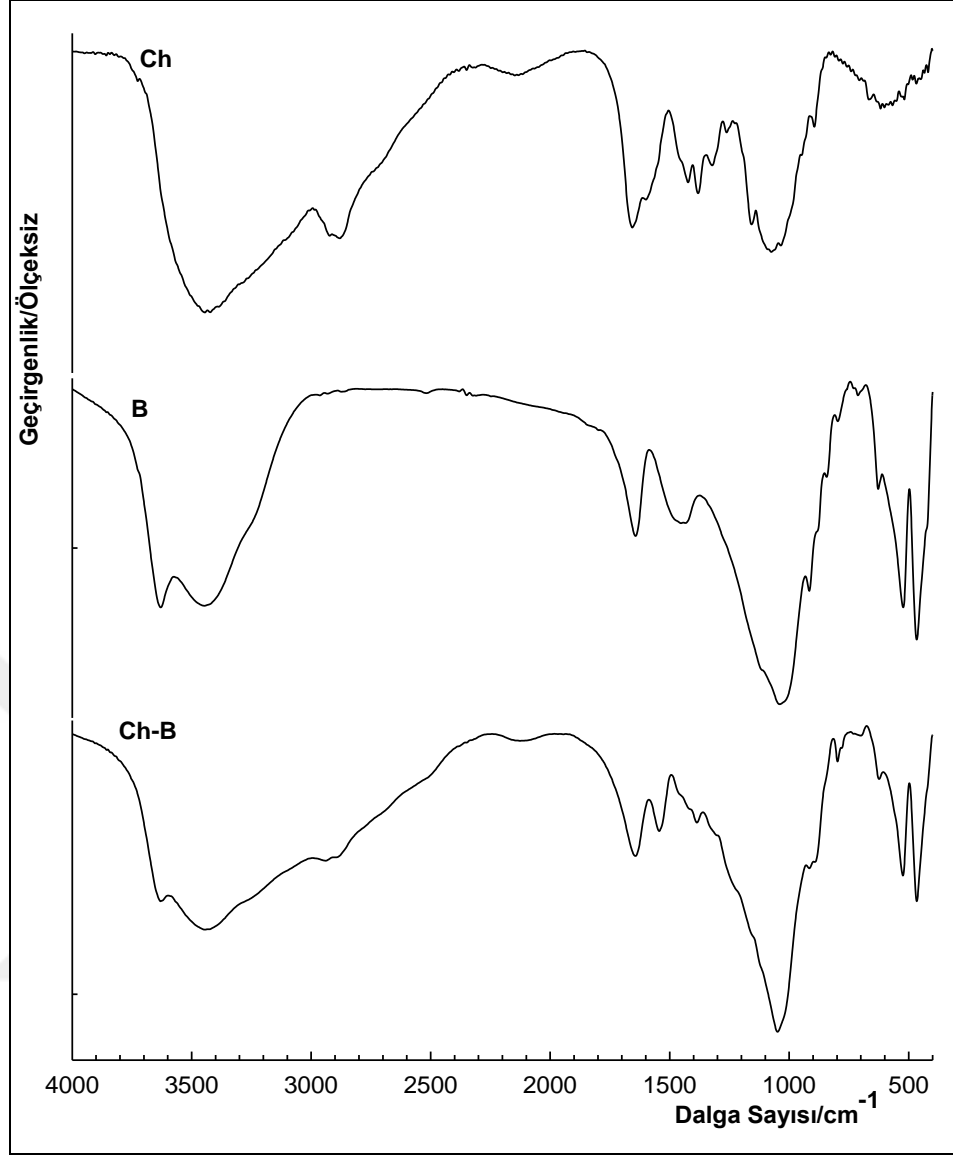
Şekil 3.7 PAAm ve B'nin bileşiminden oluşan PB'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Saf B ve PAAm'nin FT-IR spektrumlarında gözlenen pikler PB spektrumunda gözlenen piklerle karşılaştırıldığında; PB kompozitindeki N-H ($3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ geniş bant), C-H (2950 cm^{-1}), amit uçlarla ilgili C=O ve N-H (1670 ve 1610 cm^{-1}) ve C-H ($1450\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$) piklerinin PAAm'den geldiği açıkça görülmektedir. Aynı karşılaştırma sonucu, PB'deki O-H ($3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ geniş bant), Si-O ($1060\text{--}1120\text{ cm}^{-1}$) ve Al-O-Si ve Si-O-Si (530 ve 460 cm^{-1} 'deki pikler) piklerin B ile ilgili olduğu görülür. Sonuç olarak PB spektrumu bu kompozitin PAAm ve B bileşiminden oluştuğunu kanıtlamaktadır.



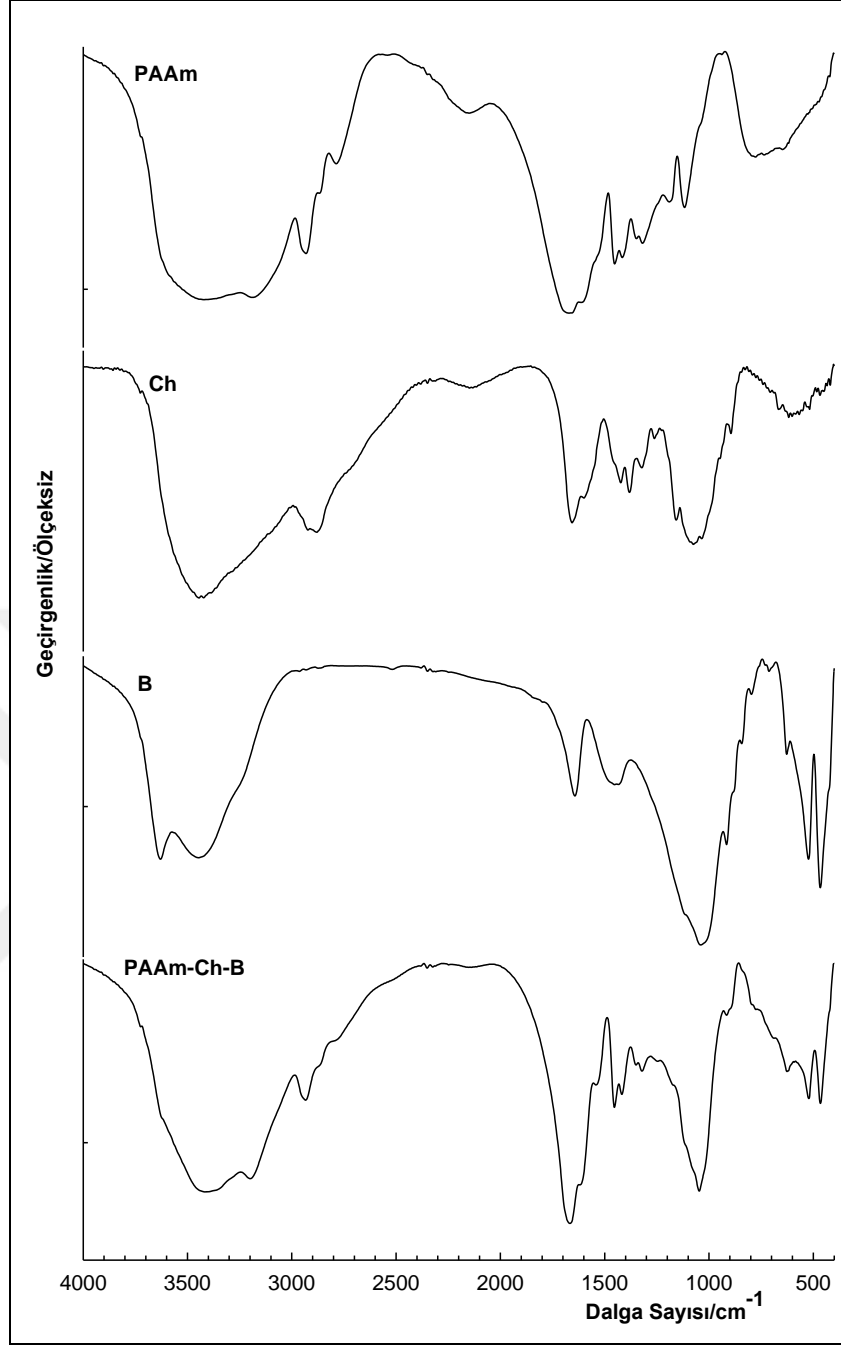
Şekil 3.8 PAAm ve Ch'nin bileşiminden oluşan PCh'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Saf PAAm ve Ch'nin FT-IR spektrumlarında gözlenen pikler PCh spektrumunda gözlenen piklerle karşılaştırıldığında her iki yapıda da benzer kimyasal grupların varlığı nedeniyle PAAm veya Ch'yi temsil eden ayırt edici piklerin sayısının sınırlı olduğu görülür. Kompoziti spektrumuna PAAm'yi temsil eden en güçlü kanıtın amit uçlarla ilgili C=O ve N-H (1670 ve 1610 cm⁻¹) pikleri olduğu söylenebilir. PCh'nin 3200–3500 cm⁻¹ ve 2800–3000 cm⁻¹ aralıklarındaki bantların Ch ve PAAm'nin aynı bölgedeki pikleri ile kıyaslanmasıyla görülen temsili değişimler PCh'ye PAAm ve Ch'nin katkılarıyla ilgili ek deliller olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 3.9 Ch ve B'nin bileşiminden oluşan Ch-B'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Saf B ve Ch'nin FT-IR spektrumlarında gözlenen pikler Ch-B spektrumunda gözlenen piklerle karşılaştırıldığında; Ch-B kompozitindeki N-H (3500 cm^{-1}), C-H ($2900\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$), C=O ve C-N (1645 ve 1325 cm^{-1}) ve N-H ve C=O (1560 ve 1660 cm^{-1}) piklerinin Ch'den geldiği açıkça görülmektedir. Benzer karşılaştırmayla, Ch-B'deki O-H (3620 cm^{-1}), Si-O ($1060\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$) ve Al-O-Si ve Si-O-Si (530 ve 460 cm^{-1} 'deki pikler) piklerin B ile ilgili olduğu görülür. Sonuç olarak Ch-B spektrumu bu kompozitin Ch ve B bileşiminden oluştuğunu göstermektedir.

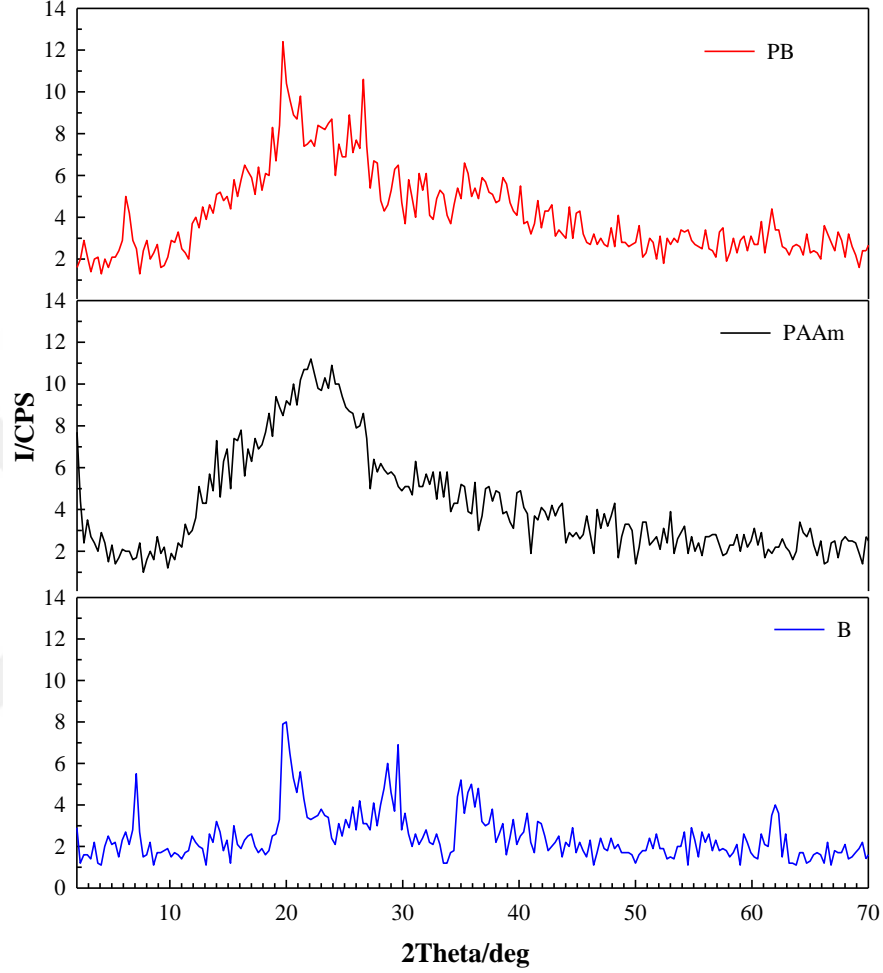


Şekil 3.10 PAAm, Ch ve B'nin bileşiminden oluşan PChB'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Saf PAAm, Ch ve B FT-IR spektrumlarında gözlenen pikler PChB spektrumunda gözlenen piklerle karşılaştırıldığında; amit uç gruplarla ilgili C=O ve N-H (1670 ve 1610 cm^{-1}) pikleriyle PAAm'nin, C=O ve C-N (1645 ve 1325 cm^{-1}) pikleriyle Ch'nin ve Al-O-Si ve Si-O-Si (530 ve 460 cm^{-1}) pikleriyle B'nin kompozit spektrumuna ayırt edici katkılarını göstermektedir. Bu veriler PChB bileşiminin PAAm, Ch ve B katkılarıyla oluştuğu kanıtlamaktadır.

3.2.2 XRD Analizleri

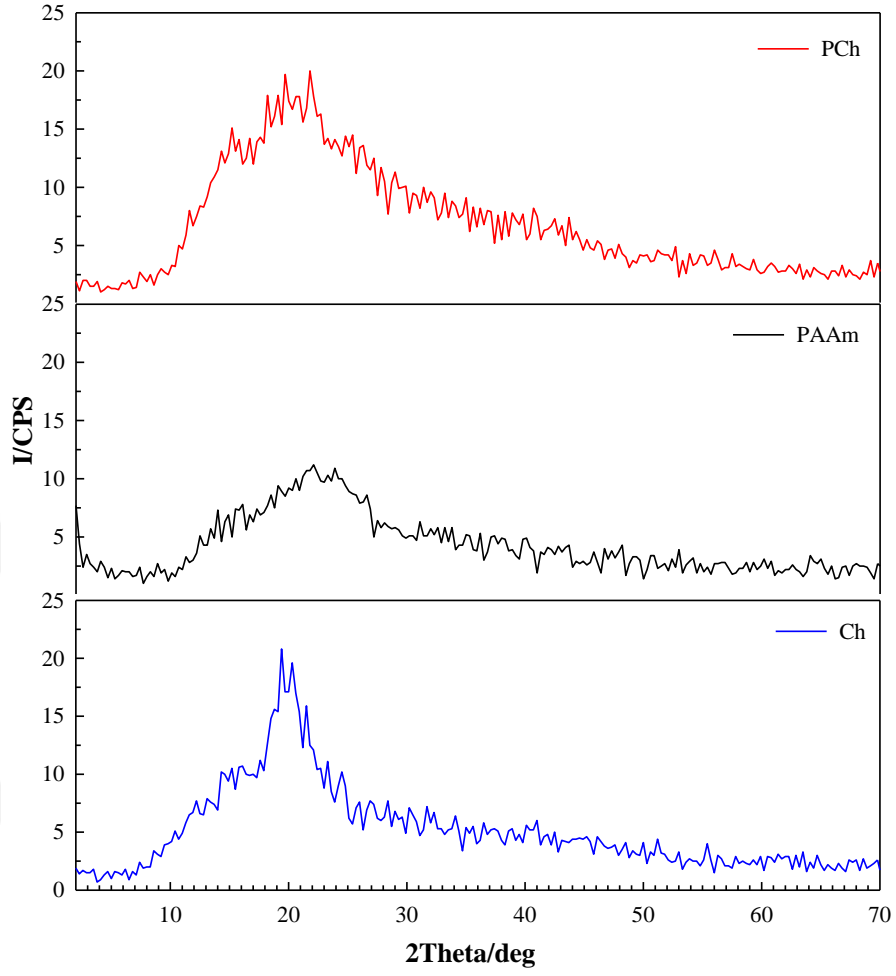
İlgili kompozit ve bileşenlere ait XRD spektrumları ve değerlendirilmeleri Şekil 3.11-3.13'de sunulmuştur. Değerlendirmeler daha önceki çalışmalara benzerdir (Baybaş ve Ulusoy 2011; Eninanç, 2013).



Şekil 3.11 PB kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları

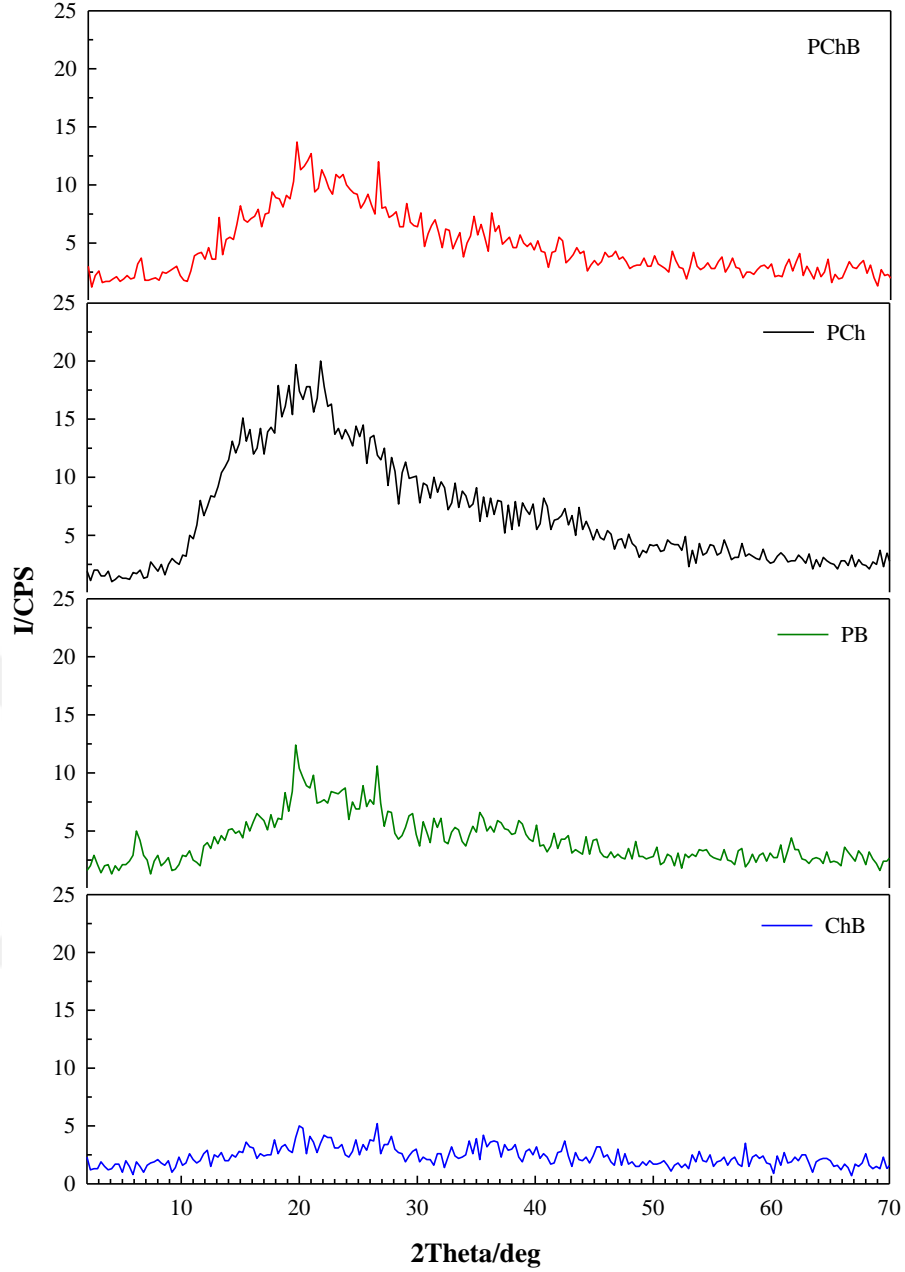
Şekil 3.8'deki spektrumda. B'ye ait $2\theta=7.1$ (001) ve $2\theta=19.7$ (002)'deki pikler B'nin [Montmorilonit; $\text{Na}_{0.3}\text{Al}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_{2.2}\text{H}_2\text{O}$] karakteristik kristal düzlem yansımaları ile ilgilidir (Baybaş, 2009). Tabakalar arası uzaklık hesaplamalarında referans olarak seçilen d_{001} yansımasında B ve PB için Bragg denklemi ile hesaplanan değerler sırasıyla 1.24 nm ve 1.42 nm olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi, yapıya amorf bir bileşen olan PAAm'nin katılmasıyla tabakalar arası uzaklık açılmıştır. Alexandre ve Dubois (2000) tarafından yapılan polimer-silikat kompozitleri sınıflandırmasına göre. PB tabakaları arası açılmış bir nano-kompozittir.

Şekil 3.9'daki spektrumda. Polimorf yapıdaki Ch'ye ait $2\theta=19.4$ piki, her ne kadar PAAm'nin amorf spektrumu ile örtülse de. kompozit yapıda da görülmektedir.



Şekil 3.12 PCh kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları

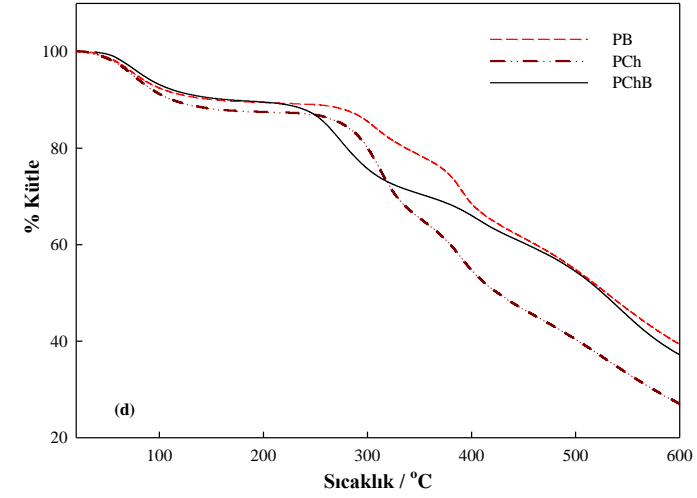
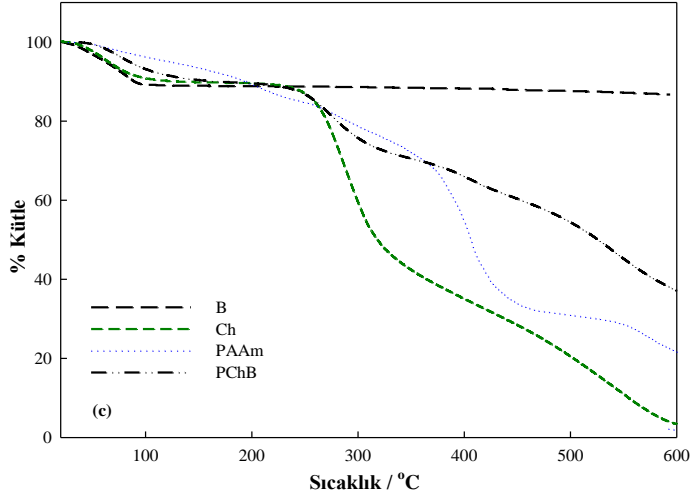
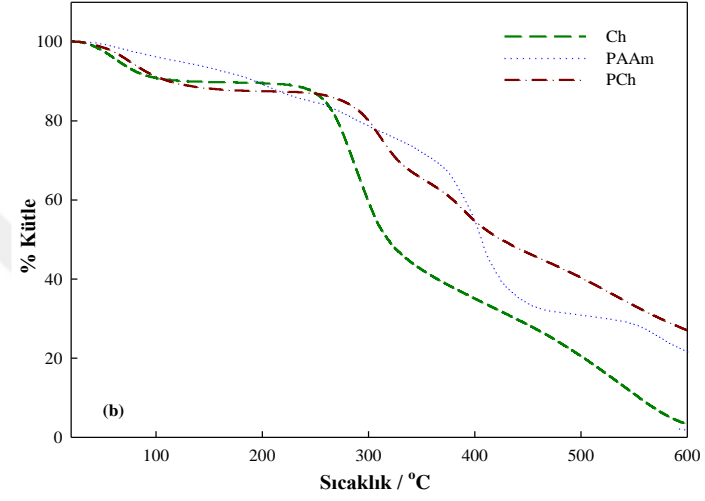
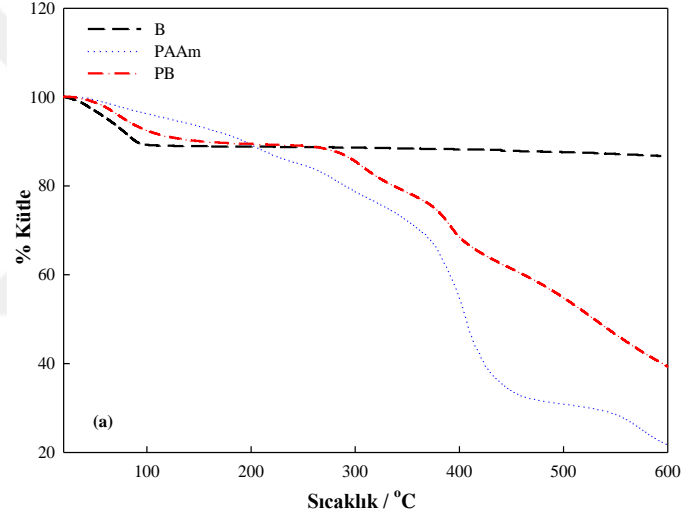
PChB kompozitinde tabakalar arası uzaklık d_{001} yansıması için 1.36 nm olarak hesaplanmıştır. Bu kompozitte bentonit tabakaları arası açılma 0.12 nm'dir.



Şekil 3.13 PChB kompoziti ve bileşenlerinin XRD spektrumları

3.2.3 Termal Analizler

Araştırma kapsamında yer alan kompozitler ve bunların bileşenlerine ait TG ve DSC termogramları Şekil 3.14 ve 3.15’de görülmektedir. Tüm TG eğrileri, daha önceki çalışmalarda bulunan sonuçlara benzer davranış göstermiştir (Baybaş ve Ulusoy, 2012; Eninanç, 2013; Gabour, 2017).



Şekil 3.14 (a) PB, (b) PCh ve (c) PChB kompozitleri ve bileşenlerinin (d) tüm kompozitlerinin karşılaştırmalı TG termogramları

Ch ve PAAm bileşenleri ile PB. PCh ve PChB kompozitlerinde 3 aşamalı kütle kaybı gözlenmiştir. Genel olarak ilk bölgedeki kütle kaybı 100 °C'nin altında başlamış olup, molekül içi ve moleküller arası nemin buharlaşması nedeniyledir. İkinci kayıp gazlar ve CO, OH ve NH₂ gibi fonksiyonel gruplar için ana termal ayrışmaya atfedilmektedir. Son termal ayrışma ise ana zincirdeki kopmalardan kaynaklanmaktadır [Gabour, 2017; Işıkver, 2017]. Bentonitte 20-100 °C sıcaklık aralığında, neme bağlı kütle kaybı, 100-600 °C aralığında ise –OH grupların uzaklaşmasına bağlı olduğu düşünülen (Baybaş, 2009) %3'lük bir kayıp görülmektedir.

Çizelge 3.1'de B, Ch, PAAm ve onlardan oluşan kompozitlerin termogramlarında görülen aşamalı kütle kayıpları (%) ve kütle azalmasının başladığı ve bittiği sıcaklık aralıklarının merkez sıcaklık değerleri, yani diferansiyel termogramlardaki pik merkezlerinin sıcaklıkları görülmektedir.

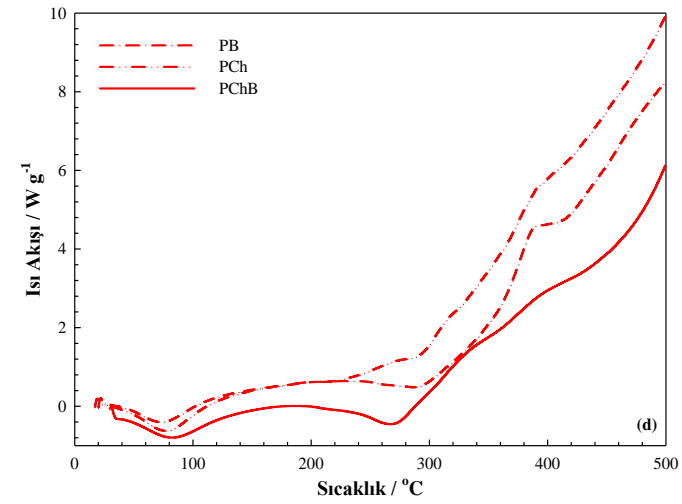
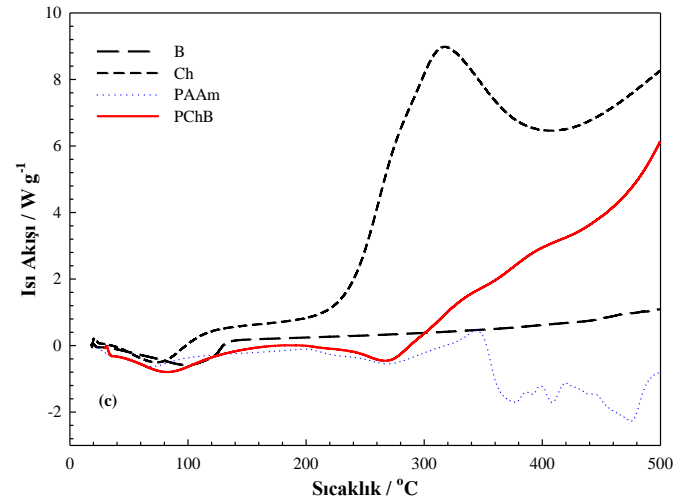
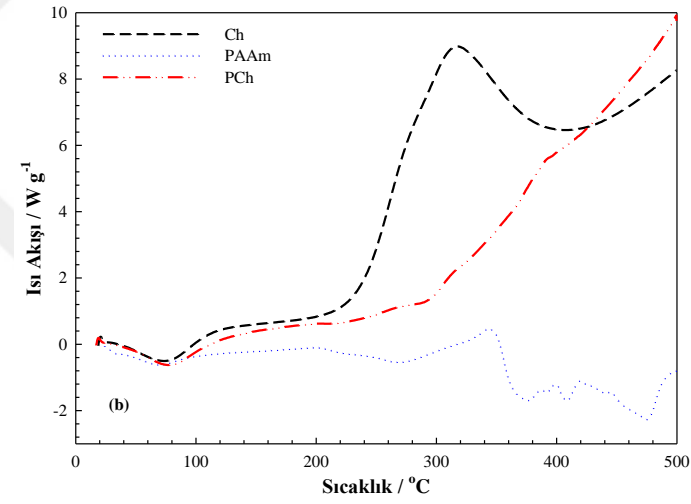
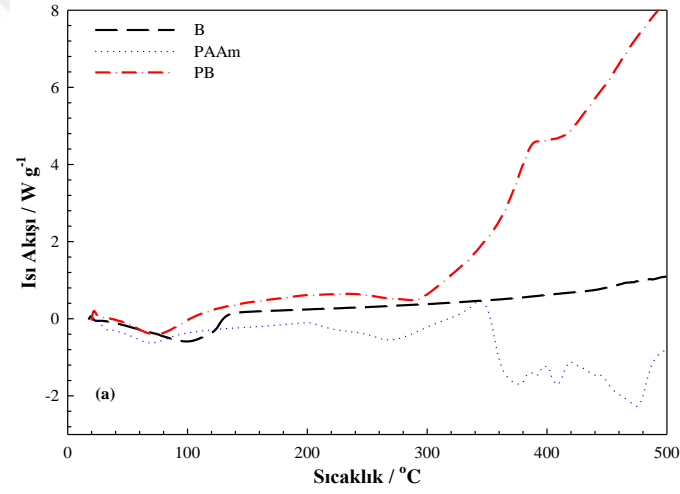
Çizelge 3.1 Kompozitler ve bileşenlerinin diferansiyel TG grafiklerindeki pik merkezi sıcaklık değerleri ve % kütle kayıpları

Bölge	B		Ch		PAAm		PB		PCh		PChB	
	t	%	t	%	t	%	t	%	t	%	t	%
1	64	11	66	10	95	7	78	9	84	12	95	10
2	-	-	280	50	195	9	290	8	285	21	270	20
3	-	-	470	92	405	54	---	38	---	46	---	37

Termogramlar ve yukarıdaki çizelge incelendiğinde, genel anlamda kompozit yapıların ısıl kararlılığının yüksek olduğu söylenebilir. Birebir karşılaştırmalar Sonuçlar bölümünde daha ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Şekil 3.15 (a), (b) ve (c) sırasıyla PB. PCh ve PChB kompozitleri ile bileşenlerinin DSC termogramlarını içermektedir. Şekil 3.15 (d)'de ise her üç kompozitin karşılaştırmalı termogramı mevcuttur.

Termogramların tümünde 65-100 °C aralığındaki geniş endotermik pikler ortaktır. Her bir malzeme için bu pikin materyallerdeki su kaybı nedeniyle oluştuğu düşünülebilir. Çünkü örneklere analiz öncesi kurutma işlemi uygulanmamıştır. Ch içeren kompozitlerde bu pikin sıcaklığı kitosandan (73 °C) daha yüksektir (PCh için 77 °C, PChB için 83 °C). PAAm ve PB için ise pik sırasıyla 69 ve 74 °C'de görülmektedir. Bu değişiklikler, makromoleküllerin su tutma kapasitesi ve su-polimer etkileşim kuvvetlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Kittur vd., 2002).



Şekil 3.15 (a) PB. (b) PCh ve (c) PChB kompozitleri ve bileşenlerinin (d) tüm kompozitlerinin karşılaştırmalı DSC termogramları

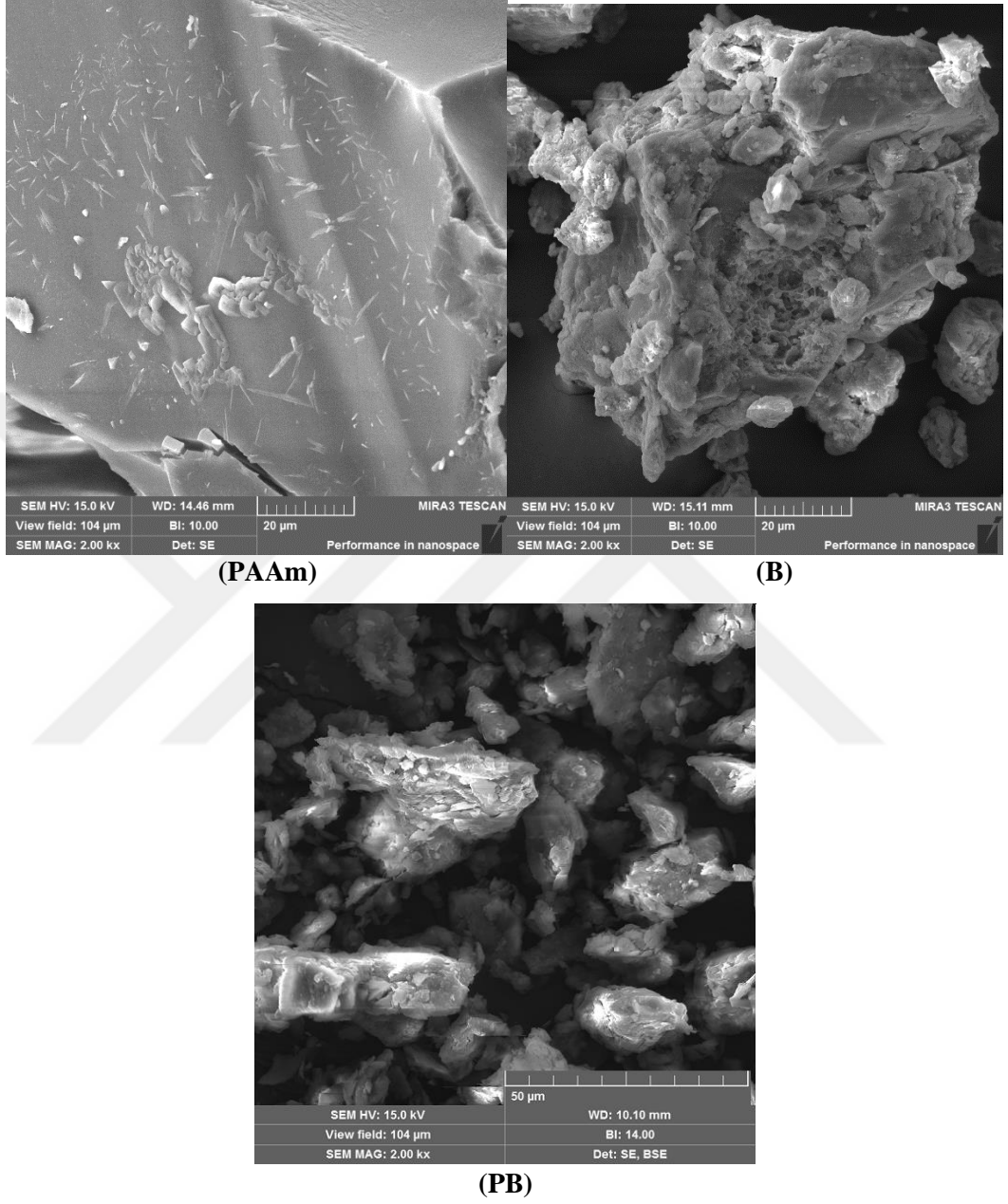
Işıkver'in çalışmasında (2017), çapraz bağlı PAAm ve PHEMA homopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) literatür değerleri 190 °C ve 126 °C olarak verilmiş, P(AAm-co-MeA), P(HEMA-co-MeA), P(AAm-co-AcA) ve P(HEMA-co-AcA) hidrojenlerinde daha düşük T_g değerleri saptanmıştır. Polimer yapısındaki -COOH grubunun plastikleştirici olarak işlev gördüğü ve bu grupların artan sayısının T_g değerlerinde bir azalmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır (Işıkver, 2017). Silva ve arkadaşlarının (2000) çalışmasında Poliakrilamid için T_g değeri 199 °C olarak verilmiştir. Bu çalışmada ise PAAm'nin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 205 °C, bozunma sıcaklığı (T_d) ise 377 °C'de bulunmuştur. Kompozitlerde PAAm'deki azota bağlı iki hidrojenin varlığı, bileşenlerle hidrojen bağları gibi çok sayıda etkileşime izin vermekte, bu da polimer zincirlerinin hareketliliğini azaltmakta ve dolayısıyla T_g 'lerde artma beklenmektedir. Bu durum T_g 'nin PB için 256, PChB için 214 °C'de gözlenmesiyle doğrulanmıştır.

Ch ve PCh için ise camsı geçiş sıcaklığı gözlenememiştir. Kittur vd.'nin (2002) çalışmalarında da kitin, kitosan ve bunların karboksimetil türevlerinin ikinci ısıtma taramalarında camsı geçişin (T_g) gözlenmediği rapor edilmiştir.

Ch için 317.5 °C'de gözlenen ekzotermik pik, glukozamin birimlerinin ayrışması ile ilgilidir ve Ch içeren polimerlerde gözlenmemiştir. Bu durum artmış polimerleşme derecesi ve termal kararlılığın artışı anlamına gelir. Ancak kompozit içerisindeki Ch miktarının düşük olması dolayısıyla asetil grubunun düşük olması da buna neden olabilir.

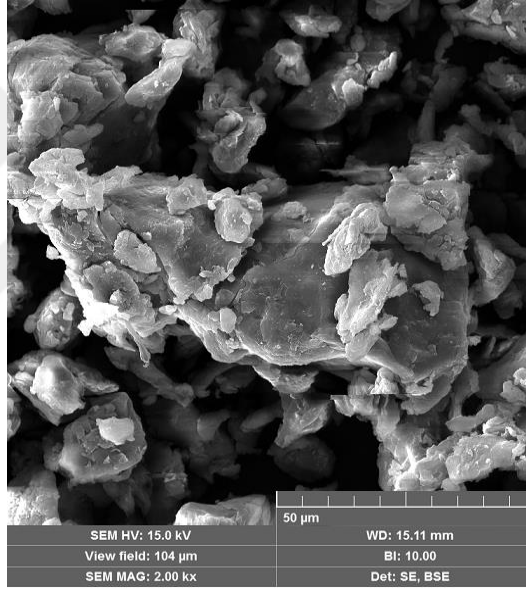
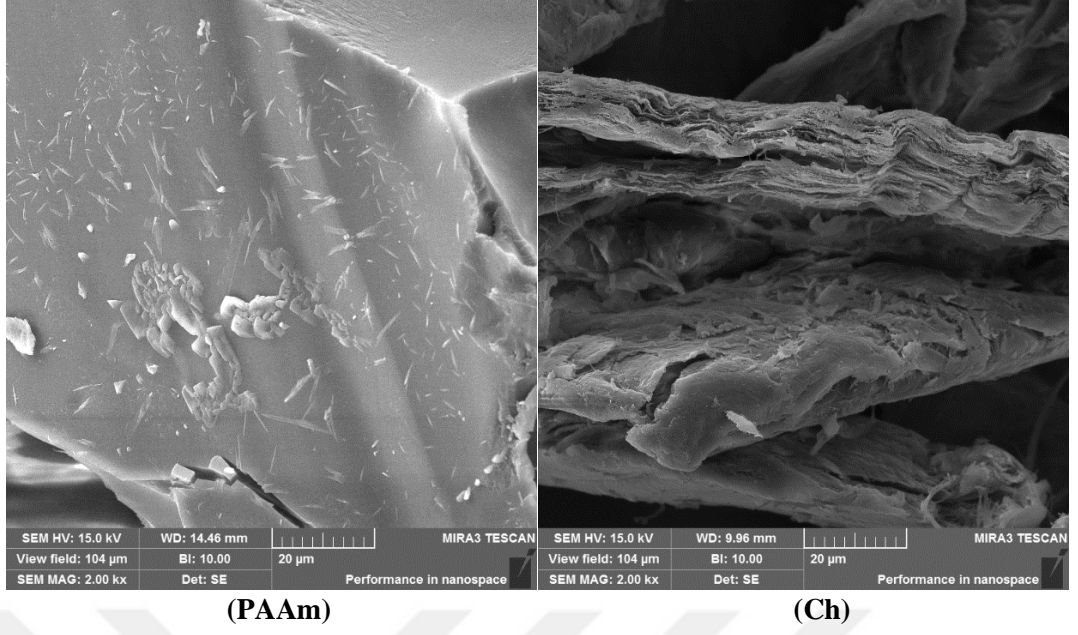
3.2.4 SEM Görüntüleri

Bu çalışmada kullanılan kompoziterin SEM görüntüleri kompoziti oluşturan bileşenlere ait görüntülerle Şekil 3.16-18'de karşılaştırılmıştır.



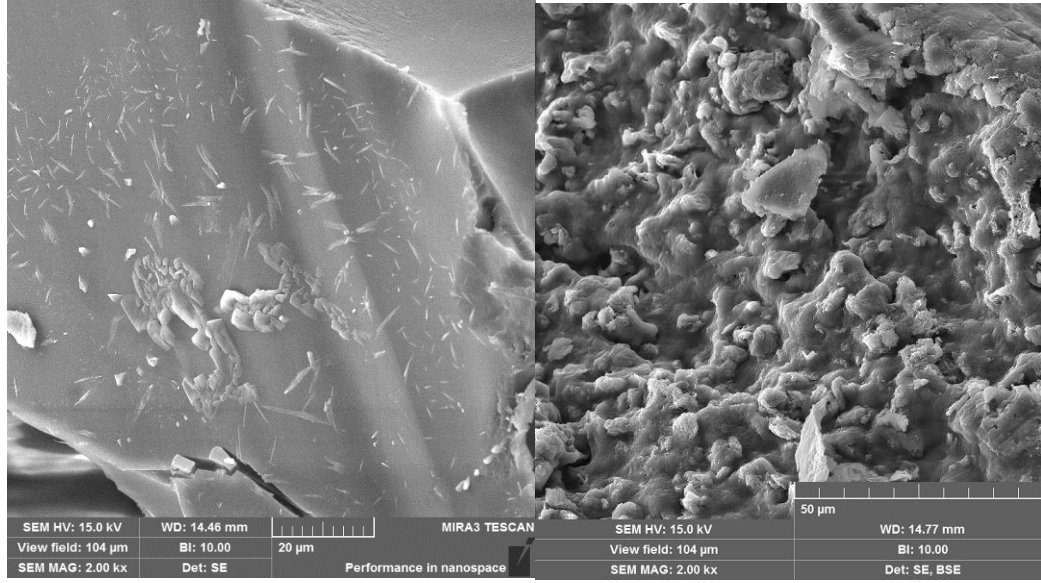
Şekil 3.16 PAAm ve B bileşenlerinden oluşan PB kompozitinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri

Mineralojik kristalleri açıkça görülen B'nin PAAm amorf yapısına girmesiyle oluşan kompozit (PB) morfolojisi PAAm ile kaplı mineralojik kristaller görünümünü yansıtmaktadır.



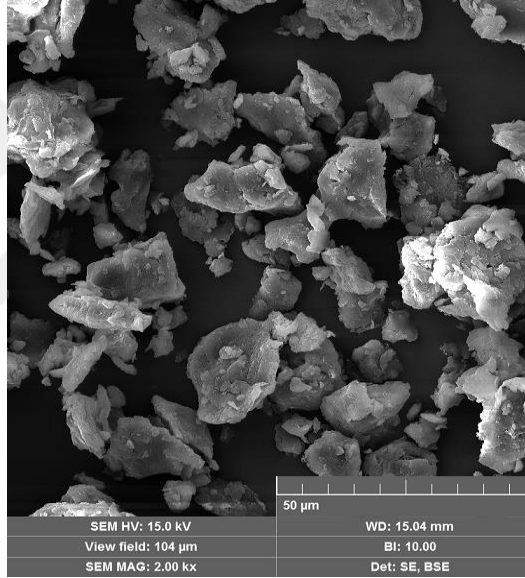
Şekil 3.17 PAAm ve Ch bileşenlerinden oluşan PCh kompozitinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri

Amorf PAAm yapısına yaprak istiflenmesi görünümlü amorf Ch katılmasıyla oluşan PCh, bileşenlerinin melezi görünümündedir.



(PAAm)

(Ch-B)



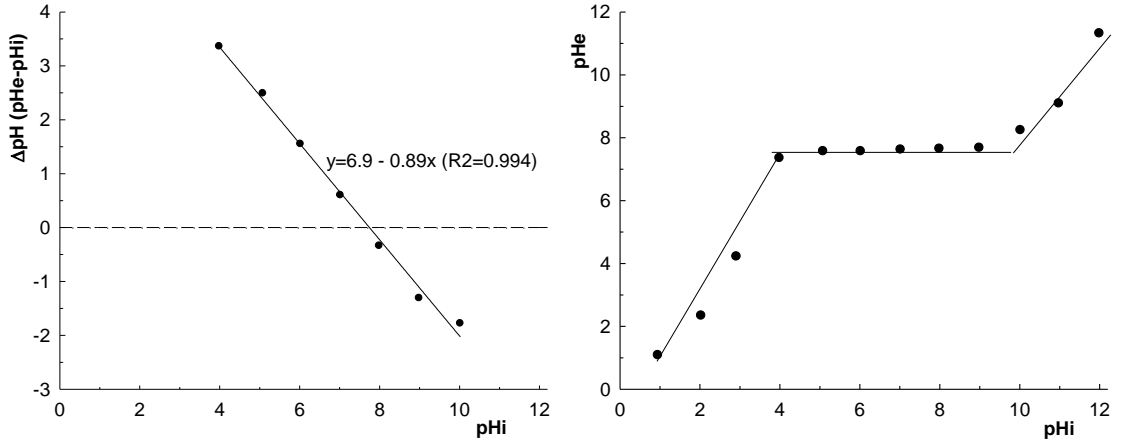
(PChB)

Şekil 3.18 PAAm ile B ve Ch (Ch-B) bileşenlerinden oluşan PChB kompozitinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri

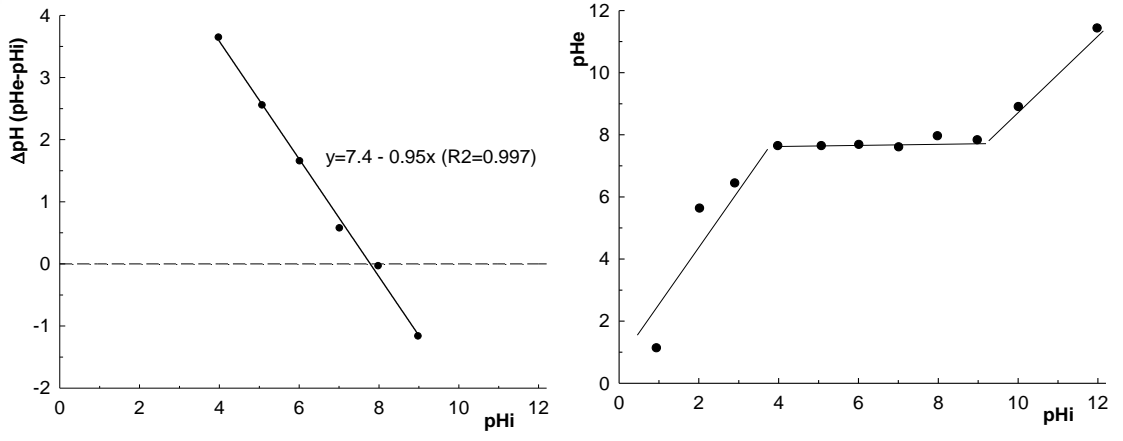
Minerolojik yapılı B'nin Ch ile oluşturduğu amorf yapının (Ch-B) yine amorf yapılı PAAm yapısına katılması ile oluşan PChB morfolojisi tümüyle melez görünümlüdür.

3.2.5 Sıfır Yük Noktası Tayini (SYN)

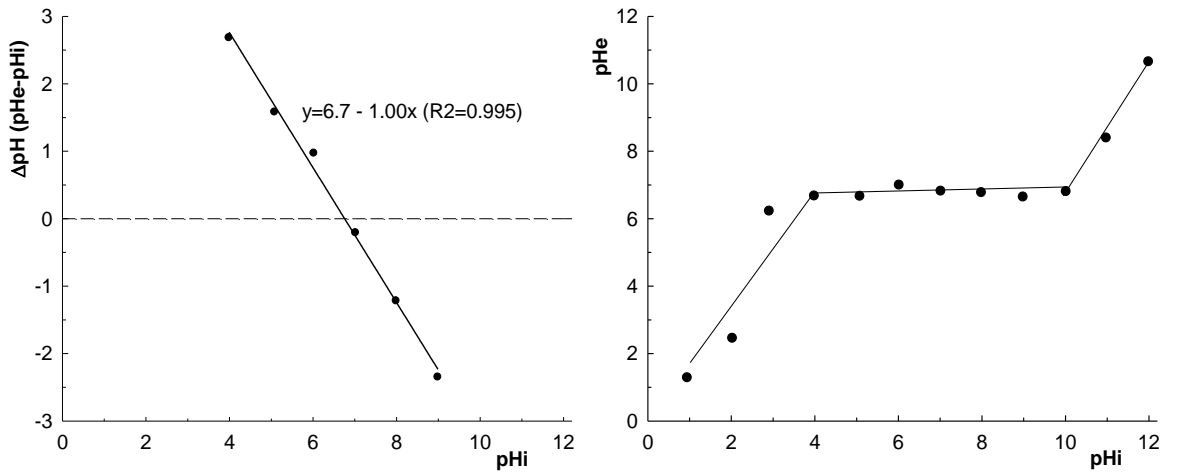
PB, PCh ve PChB kompozitlerin ΔpH ($pH_e - pH_i$)- pH_i ilişkisi, bunların doğrusal denkleme uyumu ve tampon özellikleri (pH_e , denge pH 'sı- pH_i , başlangıç pH 'sı) sırasıyla Şekil 3.19-21'de gösterilmiştir. Çizelge 3.2, ΔpH ($pH_e - pH_i$)- pH_i ilişkisinden hesaplanan SYN değerlerini içermektedir.



Şekil 3.19 PB için ΔpH -pHi ve pHe-pHi ilişkisi



Şekil 3.20 PCh için ΔpH -pHi ve pHe-pHi ilişkisi



Şekil 3.21 PChB için ΔpH -pHi ve pHe-pHi ilişkisi

Çizelge 3.2 ΔpH ($pH_e - pH_i$)- pH_i verilerinin doğrusal denkleme uyumu ve uyumdan hesaplanan SYN değerleri

Kompozit	Doğrusal denklem	R²	SYN (y=0 için x)
PB	$y=6.9-0.89x$	0.994	7.7
PCh	$y=7.4-0.95x$	0.997	7.8
PChB	$y=6.7-1.00x$	0.995	6.7

Şekiller ve çizelgeden görüldüğü gibi kompozitlerin SYN değerleri birbirine oldukça yakın ve yaklaşık nötral pH değerindedir. SYN kompozit yüzey yükünün +/- geçiş için eşik değeri tanımladığından, bu çalışmada kullanılan kompozitlerin yüzey yükü asidik ortamda '+' ve bazik ortamda '-' yüklüdür sonucunu göstermektedir. Kompozitler $pH_i \approx 4-10$ aralığında tampon özellik göstermektedir.

3.3 Üreaz Enzim İmmobilizasyonu

Bu bölümde, araştırma konusu olan kompozitlere üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunun derişim, zaman ve sıcaklık etkisi ile değişimi incelenmiş ve tartışılmıştır.

3.3.1 İmmobilizasyonun Derişimle Değişimi

İlgili kompozitlere, pH=7 10 mM fosfat tamponunda ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) hazırlanmış farklı derişimlerde üreaz içeren çözeltiler eklenmiş ve 24 saat etkileşim sonundaki enzim denge derişimleri iletkenlik yöntemiyle belirlenmiştir. Eşitlik (2)'den hesaplanan Q (mg g^{-1}) değerleri C_d (mg L^{-1})'ye karşı grafiğe geçirilmiştir. PB, PCh ve PChB kompozitlerinin izotermelerinin her biri kendisini oluşturan bileşenlerle birlikte Şekil 3.22 (a), (b) ve (c)'de verilmiştir. Şekil 3.23'de ise üç kompozitin izotermeleri karşılaştırılmıştır. İzotermelerin oluşturulmasında kullanılan tüm veriler EK 1'de görülmektedir. Bu grafiklere (3) ve (4) numaralı eşitlikler Sigma Plot grafik programıyla uygulanmış, Langmuir ve Freundlich izoterm parametreleri (Çizelge 3.3) hesaplanmıştır.

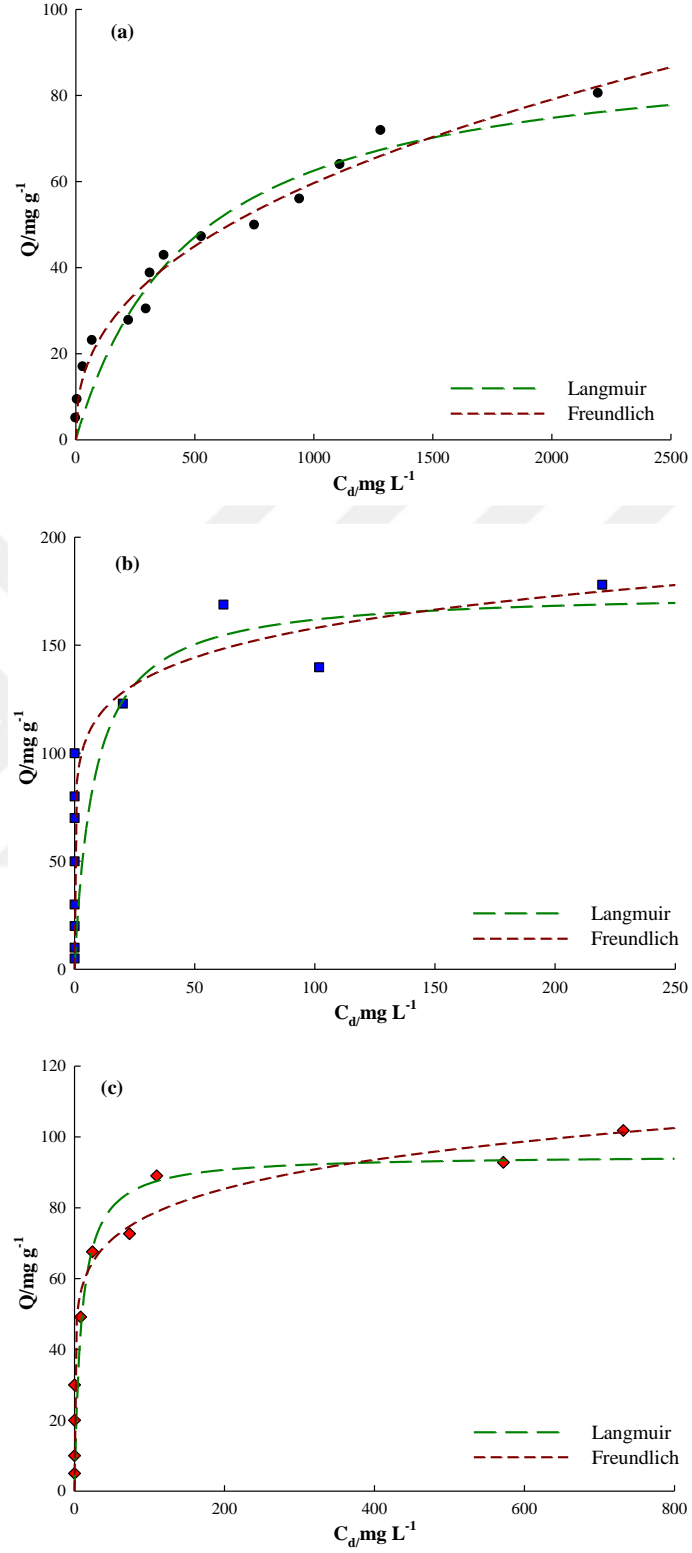
Çizelge 3.3 Kompozitlere üreaz enziminin adsorpsiyonunun Langmuir ve Freundlich modellerine uyumundan türetilen parametreler

	PB	PCh	PChB
Langmuir			
$X_L/\text{mg g}^{-1}$	93.0	174.0	94.9
$K_L \times 10^2/\text{L mg}^{-1}$	0.2	13.0	10.8
R^{2*}	0.927	0.731	0.858
Freundlich			
X_F	3.6	79.11	42.4
β	0.41	0.15	0.13
R^2	0.976	0.910	0.861

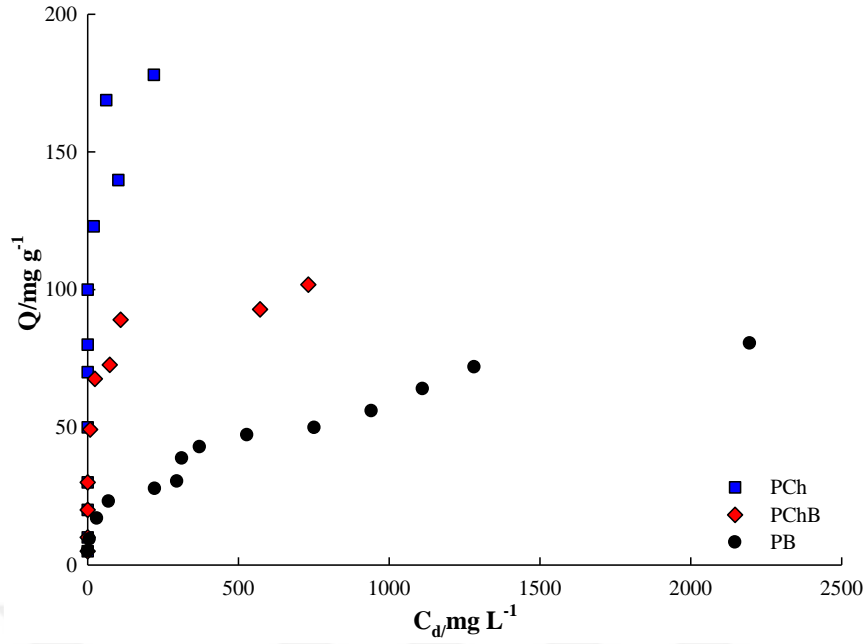
Çizelge ve izotermelerden de görülebileceği gibi PCh ve PChB izotermeleri Giles sınıflandırmasına göre H tipe uymakta ve üreaz enzimine yüksek ilgi göstermektedir. Bu iki kompozit için, düşük başlangıç derişimlerinde, enzimin denge derişimleri iletkenlik yönteminin ölçüm sınırları altındadır. Bu durumda enzimin tamamına yakınının kompozitlere tutunduğu söylenebilir. PB ise L-tip izoterm ile uyumludur ve regresyon katsayılarına göre de Langmuir modeline en çok uyan adsorbandır.

Kompozitlerin Langmuir modeline göre hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasiteleri oldukça yüksektir. Bu zamana kadar literatürde üreaz adsorpsiyonunda

kullanılan adsorbanlardan bazıları ve $X_L/\text{mg g}^{-1}$ değerleri Çizelge 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.22 (a) PB, (b) PCh ve (c) PChB kompozitlerine üreaz adsorpsiyon izotermelerinin Langmuir ve Freundlich modellerine uyumu.



Şekil 3.23 Kompozitlerin üreaz adsorpsiyon izotermi

Çizelge 3.4: Bu araştırma kapsamında yer alana destek materyallerinin adsorpsiyon kapasiteleri ile daha önceki çalışmalardan derlenen farklı desteklere ait adsorpsiyon kapasitelerinin (Ads. Kap.) karşılaştırılması

Destek (Adsorban)	Ads. Kap./mg g ⁻¹	Kaynakça
PB	93.0	
PCh	174.0	Bu çalışma
PChB	94.9	
Poliamid içi oyuk fiber membran	78	Akgöl vd.. 2002
Poli (HEMA-MAH)	47.8	Bayramoğlu vd.. 2005
poli(HEMA-MAH)-Ni (II)	66.1	
Silika yapılar		
PE-MCM-41.	102	Hossain vd.. 2008
MCM-41.	56	
SGA	21	
Zn ₂ Al – Cl	325	
Zn ₃ Al – Cl	228	Vial vd.. 2008
Zn ₄ Al – Cl	215	
Doğal halloysit nanotüp	11.7	Zhai vd.. 2010
Poli(HEMA-GMA)-IDA-Ni(II) kriyojel	11.3	Uygun vd.. 2013
Nanoceria (Seryum oksit)	359.6	Kadhem vd.. 2016
Lewatit	480.0	Çınar vd.. 2017

Langmuir parametreleri kullanılarak Eşitlik (9) ve (10)'dan hesaplanan R_L ve (W/V) değerleri Çizelge 3.5'de görülmektedir. R_L değeri kompozitlerin enzim adsorpsiyonunda verimliliğinin bir ölçüsüdür. Çizelgedeki tüm R_L değerleri 0-1 arasında olduğundan, adsorbanların enzim immobilizasyonu için verimli olduğu söylenebilir. Özellikle yüksek derişimlerde kitosanlı adsorbanlar için bulunan R_L değerlerinin 0'a yakın olması PCh ve PChB'nin PB'ye göre daha verimli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.5: 10, 100 ve 1000 mg L⁻¹ başlangıç derişimli 1 L enzim çözeltisinden %50 ve %90 adsorpsiyon için gerekli adsorban kütleleri (W/g) ve boyutsuz faktör (R_L) değerler

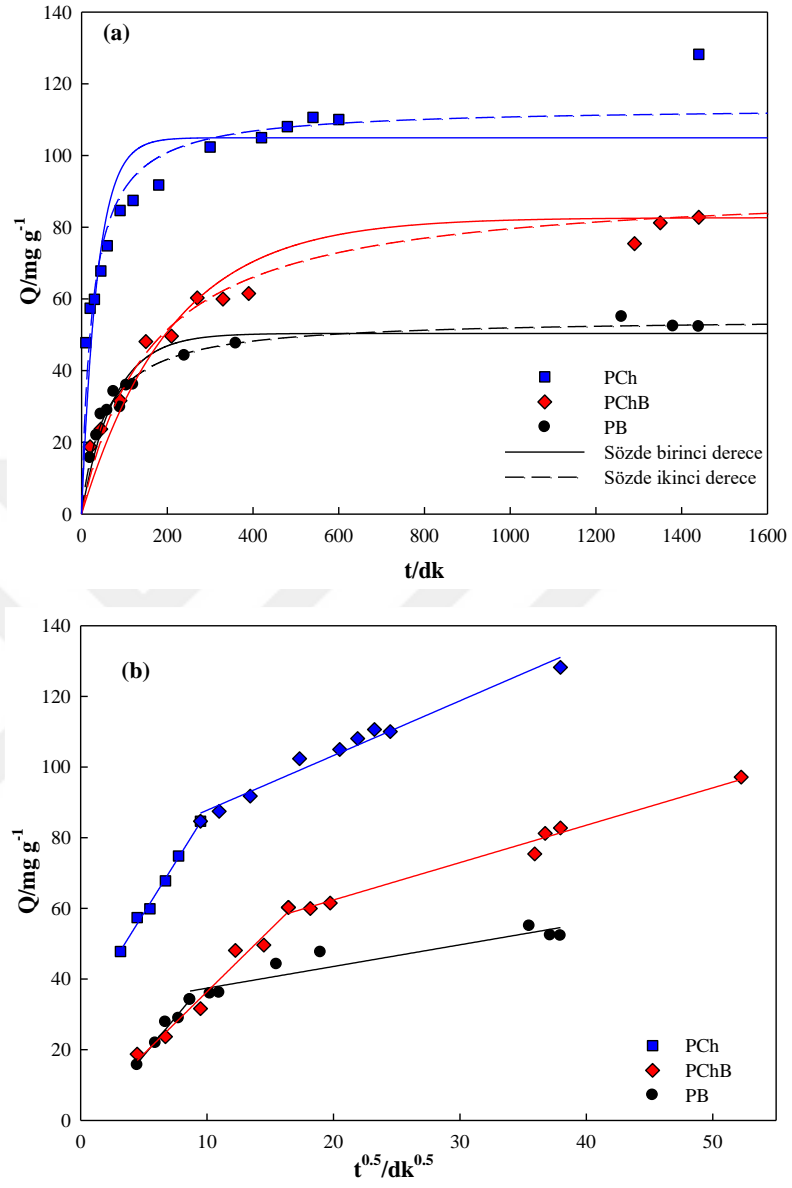
Kompozit	$C_0/\text{mg L}^{-1}$	R_L	$(W/V)/\text{g L}^{-1}$	
			%50	%90
PB	1	1.00	5.24	47.13
	10	0.98	5.29	47.22
	100	0.83	5.77	48.09
	1000	0.33	10.61	56.80
PCh	1	0.88	0.05	0.40
	10	0.43	0.07	0.45
	100	0.07	0.33	0.92
	1000	0.01	2.93	5.59
PChB	1	0.90	0.10	0.89
	10	0.48	0.15	0.97
	100	0.08	0.63	1.83
	1000	0.01	5.38	10.38

W/V değeri ise adsorbanların endüstriyel kullanımı açısından önemlidir. Örneğin şarap endüstrisinde karsinogenik madde (etilkarbammat) oluşumuna karşı eklenmesine izin verilen sınır üreaz miktarı 1 mg L⁻¹'dir. Etil karbammat oluşturan üre miktarı beyaz şaraplarda ortalama 9 ve kırmızı şaraplarda 20 µg L⁻¹'dir (Güven, 2008). 1 mg L⁻¹ derişimde enzimi %90 immobilize etmek için 1 L'lik çözeltiye eklenmesi gereken kompozit kütlesi PCh ve PChB için 1 g'dan azdır. İmmobilizasyon ile tekrar kullanılabilirliğin sağlandığı düşünüldüğünde endüstride kullanılan enzim miktarı çok düşecektir. Diyaliz makinalarında da düşük miktarlarda kompozit kullanılarak enzim immobilizasyonu sağlanabilir.

3.3.2 İmmobilizasyonun Zamanla Değişimi

PB, PCh ve PChB'ye üreaz immobilizasyonunun sabit derişim (2000 mg L⁻¹) ve sabit sıcaklıkta (298 K) zamanla değişiminin araştırılmasından elde edilen veriler EK 2'de verilmiştir. Bu verilerden yararlanılarak çizilen sözde birinci derece için ' Q_t-t ', sözde ikinci derece için ' t/Q_t-t ' ve parçacık içine difüzyon için ' $Q_t-t^{0.5}$ ' grafikleri ve bunların ilgili kinetik modellere uyumu Şekil 3.24'de görülmektedir. Çizelge 3.6'da deneysel

verilerin sözde birinci derece, sözde ikinci derece ve Weber-Morris modellerine uyumundan türetilen parametreler bulunmaktadır.



Şekil 3.24 Üreaz immobilizasyon kinetiğinin (a) Sözde birinci (Lagergren) ve ikinci derece (b) Weber-Morris kinetik modellere uyumu

Çizelge 3.6: Söзде birinci (Lagergren), söзде ikinci derece ve Weber-Morris kinetik modellerden elde edilen katsayılar

Adsorbanlar	<u>Söзде Birinci Derece</u>					<u>Söзде İkinci Derece</u>						<u>Weber-Morris</u>			
	$^1k \times 10^3$	2Q_k	$^3(t_{1/2})_1$	4H_1	R^2	$^5k \times 10^3$	2Q_k	2Q_d	4H_2	$^3(t_{1/2})_2$	R^2	<u>Yüzeye difüzyon</u>		<u>Parçacık İçine dif.</u>	
												6k_i	R^2	6k_i	R^2
PB	13.4	50.4	52	0.67	0.945	0.34	54.7	51.8	1.02	54	0.984	4.31	0.968	0.61	0.883
PCh	26.9	104.9	26	2.83	0.858	0.35	113.5	112.4	4.50	25	0.942	5.74	0.993	1.55	0.974
PChB	4.8	82.7	145	0.39	0.904	0.07	92.2	87.1	0.58	159	0.942	3.52	0.973	1.06	0.982

$^1 \text{mg g}^{-1} \text{dk}^{-1}$,

$^2 \text{mg g}^{-1}$,

$^3 \text{dk}$,

$^4 \text{mg g}^{-1} \text{dk}^{-1}$,

$^5 \text{g mg}^{-1} \text{dk}^{-1}$,

$^6 \text{mg g}^{-1} \text{dk}^{-1}$

Çizelge 3.6’da verilen regresyon katsayıları (R^2) incelediğinde sözde ikinci dereceden kinetikle ilgili değerlerin sözde birinci dereceye göre daha büyük olduğu; immobilizasyon kinetiğinin sözde birinci dereceden çok ikinci derece modele uyduğu görülür. Sözde ikinci derece kinetik modelden bulunan kuramsal Q değeri (Q_k), deneysel değere yakındır. Bu modelden türetilen adsorpsiyon başlangıç hızları (H_2) ve bunlardan hesaplanan yarılanma süreleri ($t_{1/2}$)₂ immobilizasyonun özellikle PCh için hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

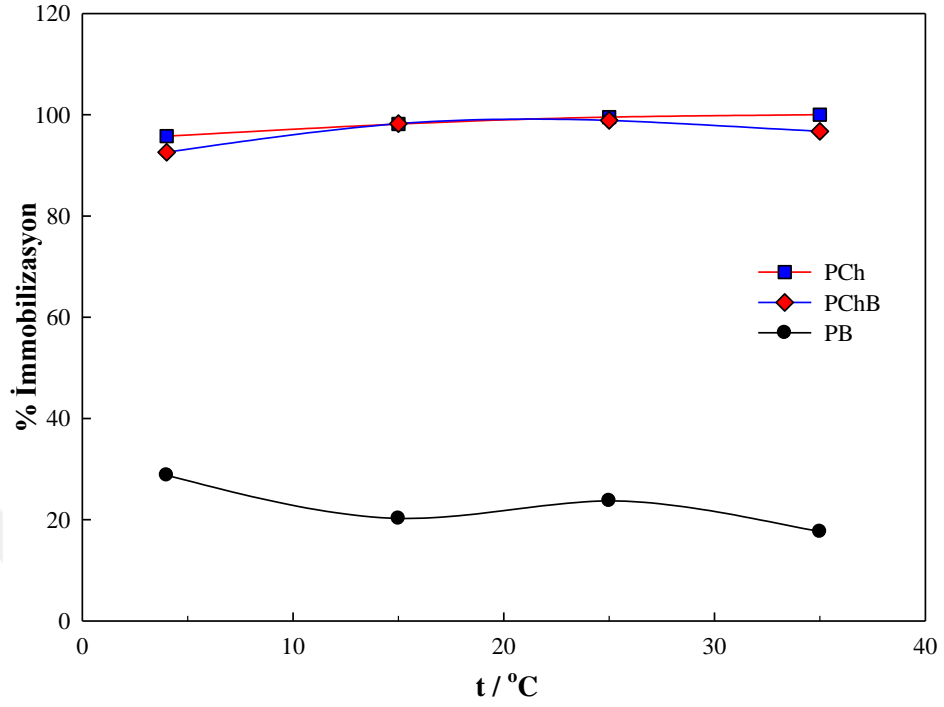
Weber-Morris modelinden hesaplanan parçacık içerisine difüzyon hızları tüm adsorbanlar için oldukça küçük değerlerde bulunmuştur. Weber-Morris modelinden, birincisi adsorban yüzeyine hızlı taşınım, ikincisi ise parçacık içine taşınım ile ilgili iki doğrusal bileşen elde edilmesi ile adsorpsiyonun derişime bağı ve kimyasal olduğunu gösterir.

3.3.3 İmmobilizasyonun Sıcaklıkla Değişimi

PB, PCh ve PChB’ye üreaz (2000 mg L^{-1} sabit derişimde) immobilizasyonunun, sıcaklıkla değişimi araştırmasından türetilen denge derişimleri ve bunlar için hesaplanan Q değerleri EK 3’de, t-%immobilizasyon grafikleri ise Şekil 3.25’de verilmiştir. İletkenlik ölçümleri, ortam sıcaklığındaki standart ve denge çözeltileri ile yapılmıştır. İletkenlik ölçümü enzim aktivitesi belirlemede kullanılan bir yöntemdir ve enzim aktivitesi sıcaklıkla değişir. Yönteme göre ölçüm için 4, 15, 25 ve 35 °C’de 24 saat bekletilen farklı derişimlerdeki standart çözeltilerin iletkenlikleri ölçülmeli, yani her sıcaklık için ayrı standart çözelti setleri hazırlanmalıdır. Bu durum çok miktarda üreaz harcamayı gerektirir ve ekonomik değildir. Bu sınırlamaya çözüm olarak her bir sıcaklıktaki su banyosuna immobilizasyon çözeltilerinin yanına 10 mL 2000 mg L^{-1} boş çözelti konularak 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda boş (adsorbansız) çözeltiler ve denge çözeltilerinin derişimleri ölçülmüş, Q hesaplarken C_0 olarak boş çözeltinin derişimleri alınmıştır.

Şekil 3.25 kitosan içeren kompozitlerin immobilizasyon yüzdesinin (% immobilizasyon) sıcaklıkla çok değişmediğini göstermektedir. Dört farklı sıcaklık için ortalama Q değerleri ve standart sapmaları PCh ve PChB için sırasıyla $179.0 \pm 20.2 \text{ mg g}^{-1}$ ve $176.0 \pm 22.4 \text{ mg g}^{-1}$, % tutunma değerleri ise $\% 98.4 \pm 1.9$ ve $\% 96.6 \pm 2.8$ ’dir. Bu kompozitler için adsorpsiyon sonrası denge derişimleri ölçüm sınırının altında ($\sim 0 \text{ mg g}^{-1}$) olduğu için K (dağılım katsayısı, Q/C_d) değerleri tanımsız ya da

çok büyük bulunmuştur. Bu nedenle $\ln K-(1/T)$ grafikleri çizilememiş ve termodinamik parametreler hesaplanamamıştır.



Şekil 3.25 Üreaz immobilizasyon yüzdesinin sıcaklıkla değişimi

PCh ve PChB kompozitlerine göre daha düşük olsa da PB kompoziti için de immobilizasyon yüzdesi sıcaklıkla belirgin şekilde değişmemektedir. Dört farklı sıcaklık için ortalama Q ve % immobilizasyon değerleri (\pm standart sapmaları), $41.5 \pm 11.4 \text{ mg g}^{-1}$ ve $\% 22.6 \pm 4.8$ 'dir.

3.4 Üreaz Aktivitesi

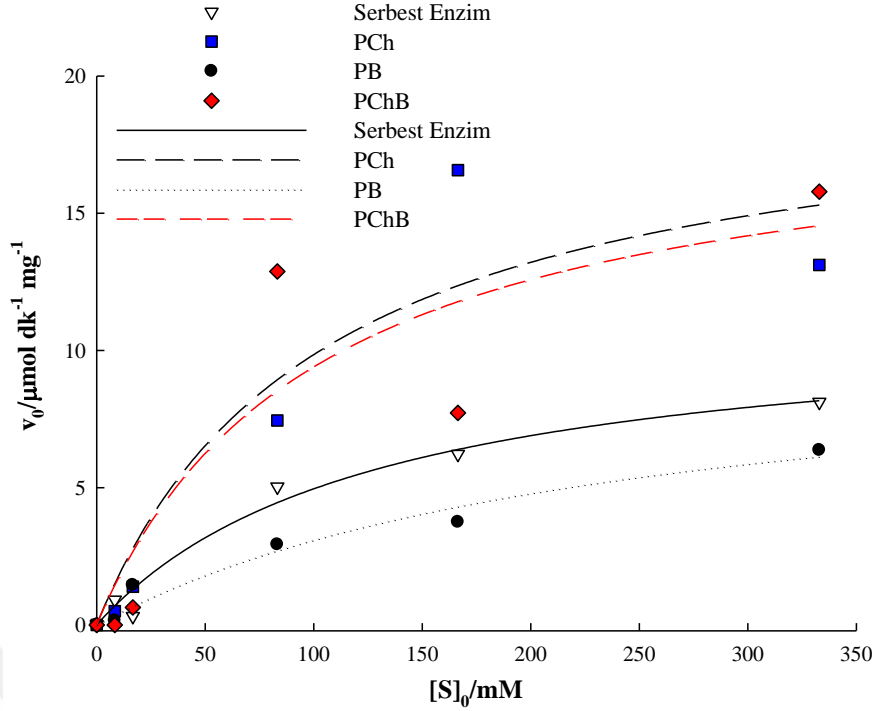
Bu bölümde immobilize üreaz aktivitesinin farklı pH, substrat derişimi ve sıcaklıklarda incelenmiş, aynı ortamlardaki serbest enzim aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Denge ve yıkama çözeltilerinin amonyak derişimlerinden EK 4'deki $C_{NH_4^+}$ -CURS doğru denklemi kullanılarak üreaz derişimlerine geçilmiş ve Berthelot yöntemiyle immobilize olan enzim miktarları hesaplanabilmiştir.

3.4.1 İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitesinin Substrat Derişimi ile Değişimi ve Kinetik Parametrelerin Saptanması

200 mg L⁻¹ serbest üreaz derişimi ile farklı üre derişimlerinde (0, 500, 1000, 5000, 10000 ve 20000 mg L⁻¹) başlatılan hidroliz tepkimesinin 5. dakikası sonunda oluşan NH₄⁺ derişimleri Berthelot Yöntemi ile belirlenmiş ve serbest enzim için enzim aktivitesi (v_0) mM dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Ardından serbest enzimin neden olduğu ilk hız değerleri ünite (mg enzim)⁻¹ (μ mol dk⁻¹ mg⁻¹) birimine dönüştürülmüştür.

PB, PCh ve PChB destek materyallerine immobilize edilen enzim miktarları ortalama olarak, sırasıyla 2.55, 17.73 ve 8.05 mg enzim/g kompozit şeklindedir. Bu miktarlar immobilizasyon verileriyle uyuşmamaktadır (İzotermlerden PB, PCh ve PChB için Q değerleri sırasıyla 16.92, 20.00 ve 20.00 mg g⁻¹'dir). Bunun nedeni izotermlerde kullanılan adsorbanların pudraya yakın küçük tanecik boyutlu olması dolayısıyla yüzey alanının çok büyük olmasıdır. Bu katıların immobilizasyon sonrası kullanılması Batch tekniğinde bulanık çözelti oluşturması ve kolon uygulamasında kolonda tıkanmaya neden olduğundan pratik değildir. Uygulama ve tekrar kullanım zorlukları nedeniyle bu bölüm boyunca öğütülmemiş milimetre boyutlu (daha küçük yüzey alanlı) adsorbanlar kullanılmıştır. Her bir desteğe tutunan enzim miktarı ve aktivite değerleri kendi içinde değerlendirilmiştir. Desteğe immobilize edilen enzim miktarları kullanılarak immobilize enzimin neden olduğu ilk hız (v_0) değerleri (μ mol dk⁻¹ mg⁻¹) biriminde hesaplanmıştır.

Şekil 3.26'da Michaelis-Menten eğrileri, Çizelge 3.7'de ise K_m ve V_{max} değerleri görülmektedir.



Şekil 3.26 Serbest ve immobilize enzimler için Michaelis-Menten eğrileri

Çizelge 3.7: Serbest ve immobilize üreazların Michaelis-Menten denkleminde uyumu ve kinetik sabitler

Enzim	R ²	V _{max} /ünite mg ⁻¹	K _m /mM	(V _{max} / K _m)
Serbest enzim	0.988	11.3	128.2	0,0881
PB-U	0.943	10.6	242.6	0,0437
PCh-U	0.890	20.1	103.8	0,1936
PChB-U	0.826	19.0	102.4	0,1855

Kinetik sabitler daha önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır (bkz Çizelge 1.1). İmmobilizasyon işlemi sonrası beklenildiği gibi K_m ve V_{max} değerleri belirgin şekilde değişmiştir.

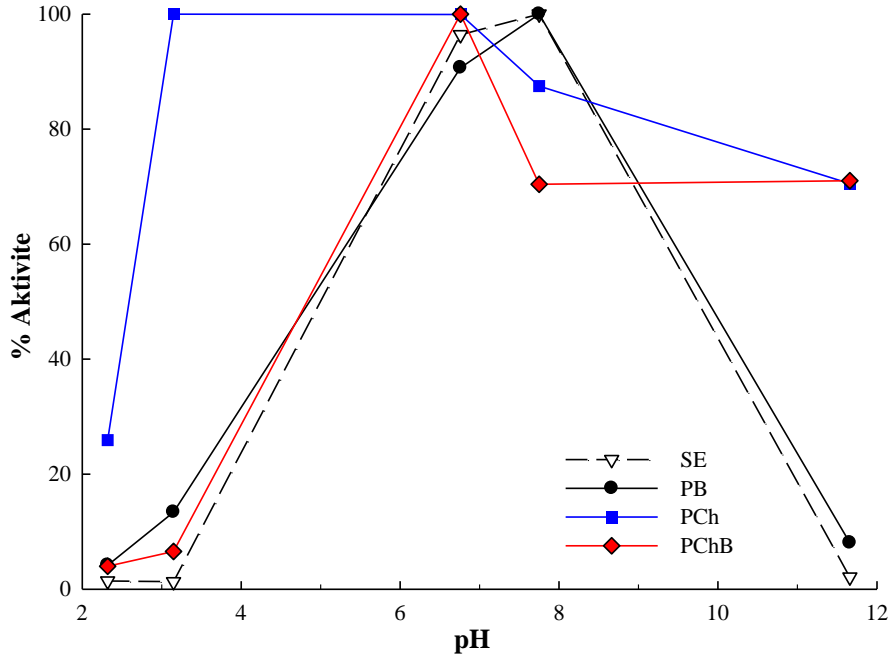
K_m değeri genellikle, difüzyon sınırlamaları, sterik engeller ve iyonik şiddet gibi nedenlerle serbest enzimden farklıdır. İmmobilizasyon sürecinin enzimdeki yapısal değişikliğe neden olması ve substratın immobilize enzimin aktif bölgesine erişilebilirliğindeki zorluklar nedeniyle de enzimin substrata olan ilgisi değişir (Bayramoğlu vd., 2003). Genellikle immobilizasyonun enzimlerin K_m değerlerini arttırdığı, yani katı bir destek üzerine immobilize olmuş enzimlerin substrata olan ilgisinin azaldığı bilinmektedir. Çizelge 1.1'deki çalışmaların çoğunda da bu durum tekrarlanmıştır. Bu çalışmada PB kompozitine immobilize olmuş üreazın K_m değerleri artmış, kitosanlı enzimlerde ise bu durumun tersi gerçekleşmiştir. Akgöl ve

arkadaşlarının çalışmalarında da (2002) immobilize enzim K_m değeri, serbest enzimden daha büyüktür.

Enzimlerin serbest ve immobilize haldeki V_{max} değerleri karşılaştırıldığında ise tüm kompozitlere immobilize olmuş enzim için azalma olduğu görülmektedir. İmmobilizasyon işlemi enzim ile substratın buluşması engellenebileceğinden V_{max} değerindeki azalma önceki çalışmalarda da görülmektedir. Öte yandan immobilizasyon sonrası V_{max} 'ın arttığı çalışma örneği de vardır (Akgöl vd., 2002).

3.4.2 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitesinin pH ile Değişimi

Serbest ve immobilize üreaz aktivitesi farklı pH'larda 10 mM fosfat tamponları içinde hazırlanmış 10000 mg L⁻¹ (166.5 mM) üre çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 5 dakika sonunda oluşan amonyum miktarları ölçülerek aktivite hesaplanmış ve sonuçlar % aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe (Şekil 3.27) geçirilmiştir. Tüm veriler EK 6'de mevcuttur. Enzim ve kompozitlerin aktif yüzeylerinin pH ayarlamada kullanılan tuzların iyonlarından farklı şekilde etkileneceği düşünüldüğü için tüm pH'lar fosfat tuzları (Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) ve H₃PO₄ ile ayarlanmıştır.

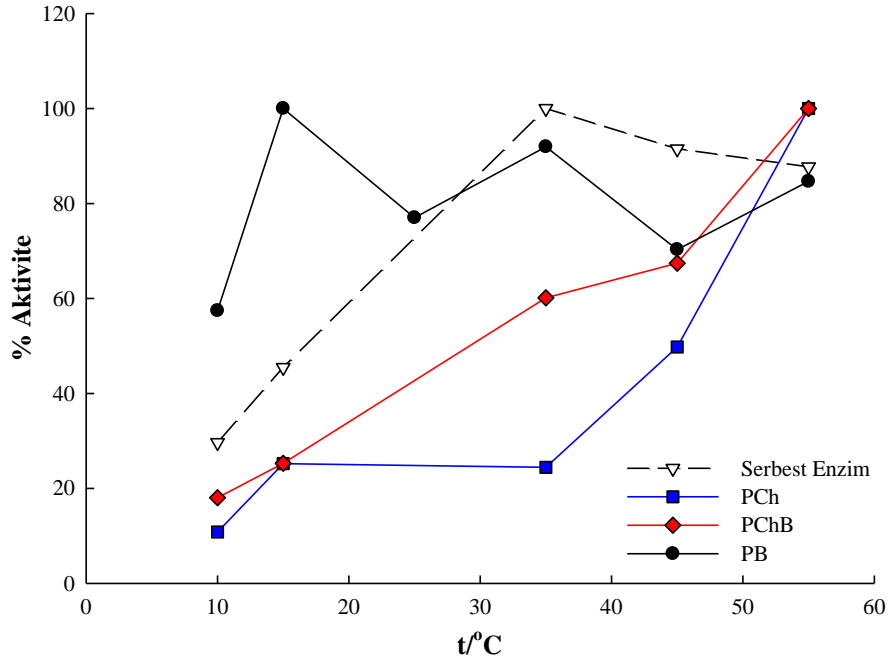


Şekil 3.27 Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin pH ile değişimi

Serbest enzim için optimum pH 7.5 iken, PCh da bu değer aynı kalmış, PChB'de ~ 6.4, PB'de ise 3-6.4 arasına kaymıştır. Fosfat tamponları ile 3.1-6.2 pH aralığında tampon çözelti hazırlanamadığı için PB için optimum pH değeri verilememiştir.

3.4.3 İmmobilize ve Serbest Üreaz Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi

Sıcaklığın serbest immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3.25'da tüm veriler EK 7'de görülmektedir. Enzimin % 100 aktivite gösterdiği sıcaklık genellikle optimum sıcaklık olarak adlandırılır. Şekil 3.28'de serbest enzimin optimum sıcaklığının 35 °C olduğunu görülmektedir. Hareketsiz hale getirilmiş durumda olan enzimlerden PB ve PChB için optimum sıcaklığın çalışılan sıcaklık aralığının dışında olduğu düşünülebilir. PCh için ise optimum sıcaklık 55 °C'ye çıkmıştır. Serbest enzim ile karşılaştırıldığında PCh'de immobilize üreazın bu arttırılmış termal kararlılığı, ürenin fizikokimyasal doğasını değiştiren kitosana pek çok noktadan tutunmasıyla açıklanabilir.



Şekil 3.28 Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

İmmobilize üreaz için optimum sıcaklıktaki benzer kaymaların gözlemlendiği raporlar literatürde bulunmaktadır. Örneğin, boya-Ni yüklü oyuk fiber membranlar için optimum pH 45 °C'den (serbest enzim) 55 °C'ye kaymıştır (Akgöl vd., 2002).

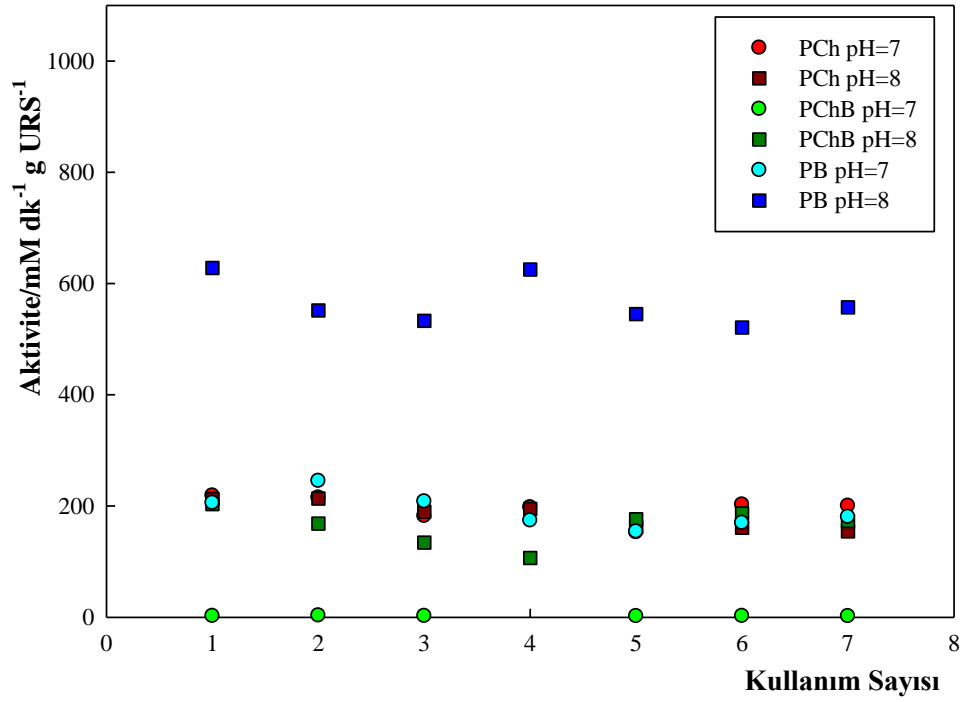
3.4.4 İmmobilize Enzimin Kullanım Kararlılığının Araştırılması

İmmobilize enzimin aktivitesinin pH ile değişimi araştırmasında pH=7 ve pH=8 için elde edilen immobilize enzim içerikli destekler pH 7 fosfat tamponu ile yıkanmış ve 7 ardıl kullanım boyunca 5 dakikada oluşturdukları NH₄⁺ derişimleri (mM) hesaplanmıştır. 7 kullanım ile elde edilen Aktivite değerleri Şekil 3.29'da, ortalama

aktivite ve standart sapma değerleri izelge 3.8’de sunulmuştur. Deneyle ilgili tüm verilere EK 8’den ulaşılabilir.

Çizelge 3.8: İmmobilize enzimlerin 7 kez kullanımında elde edilen ortalama aktivite (mM dk^{-1}) ve standart sapma değerleri

Örnekler	PB	PCh	PChB
1	0.83 ± 0.13	5.39 ± 0.61	2.67 ± 0.51
2	0.80 ± 0.06	4.95 ± 0.67	2.95 ± 0.59



şekil 3.29 İmmobilize enzimin kullanım kararlılığı

4. SONUÇLAR

Bu araştırmanın amacı, bir hidrojel olan Poliakrilamidin (PAAm) Bentonit (B) ve kitosan (Ch) ile oluşturduğu ikili, Bentonit-kitosan (BCh) ile oluşturduğu üçlü kompozit adsorbanların hazırlanması, karakterizasyonu ve üreaz immobilizasyon özelliklerinin araştırılmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışma sonuçlarının yorumları, bulgular ve tartışma bölümü altında verilen her bir alt başlık kapsamında aşağıda sunulmuştur.

Karakterizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar:

- FT-IR analizleri sonuçları; ilgilenilen kompozit yapıların bileşiminin, PAAm, Ch ve B katkılarıyla oluştuğunu kanıtlamaktadır.
- B, PB ve PBCh'ye ait XRD spektrumlarının karşılaştırmalı değerlendirmesi; B yapısına PAAm katılmasıyla B'nin d_{001} tabakalarında, PB kompoziti için 0.18 nm, PChB kompoziti içinse 0.12 nm'lik açılmaları neden olduğunu ve polimerleşmenin PB ve PBCh yapılarının tabakaları arasında da gerçekleştiğini göstermiştir. Değişimin nano ölçekte gözlenmesi (1-10 nm), adı geçen kompozitlerin nano-kompozit olarak değerlendirilebileceği sonucunu doğurmuştur. Polimorf yapıdaki Ch'ye ait $2\theta=19.4$ piki. her ne kadar PAAm'nin amorf spektrumu ile örtülse de. PCh ve PChB kompozit yapılarında da görülmektedir. Bu durum FTIR analizinin sonucunda da söylenen, kompozit yapıların bileşenlerin katkılarıyla oluştuğunu kesinleştirmektedir.
- Isıl analizlerin sonuçları aşağıdaki gibidir.

TG analizlerinde;

Ch ve PAAm bileşenleri ile PB. PCh ve PChB kompozitlerinde 3 aşamalı, B mineralinde ise 20-100 °C sıcaklık aralığında tek büyük kütle kaybı gözlenmiştir.

İlk bölgedeki yaklaşık kütle kaybı, literatüre göre de molekül içi ve moleküller arası nemin buharlaşması nedeniyledir (Gabour, 2017; Işıkver, 2017). Çizelge 3.1'deki rakamlardan da görülebileceği gibi, kompozit oluşumu B ve Ch için ısıl kararlılığı arttırmıştır.

İkinci kayıp gazlar ve fonksiyonel gruplar (-NH₂, -COOH vs.) için ana termal ayrışmaya atfedilmektedir. PAAm için 195 °C'de %9, 295 °C'de %17 şeklinde iki basamaklıdır. Kütle kaybı ve sıcaklık değerleri incelendiğinde, PB kompoziti B ile karşılaştırıldığında kararsızlaşmış, ancak PAAm ile karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklıklarda fonksiyonel gruplarını kaybetmiştir. Ch ve PAAm'nin kompozit (PCh) oluşturarak ısıl kararlılıklarını arttırdıkları söylenebilir. PChB için de benzer şekilde Ch ve B'nin yapıya katılmasının, PAAm'ye kararlılık kazandırdığı söylenebilir.

Son termal ayrışma ise uç grup kopmalarının ötesinde, ana zincir kopmalarına atfedilmektedir. Bu kütle kaybı bölgesi için de benzer şekilde kompozit yapıların saf Ch ve PAAm'ye göre ısıl olarak daha kararlı olduğunu göstermiştir.

DSC analizlerinde;

PAAm'nin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) 205 °C olarak bulunmuştur. Literatürde bu sıcaklık 190 ve 199 °C'dir (Silva vd., 2000; Işıkver, 2017).

Ch'nin T_g değeri için ise literatürde belirsizlikler mevcuttur. Bazı yazarlara (Kittur vd., 2002; Ali vd., 2017) göre Ch'nin DSC termogramında ~80 °C'de gözlenen (bu çalışmada 73 °C) pik, su kaybına atfedilmektedir. Buna karşın Gabour, T_g değerlerini termogramda görülen ilk endotermik tepenin orta noktasını alarak Poliakrilamid-kitosan kompoziti için T_g'nin 100-120 °C aralığında olduğunu belirlemiştir (Gabour 2017). Dhawade ve Jagtap, konvansiyonel DSC'den, kitosanın cam geçiş sıcaklığının kuru halde 118 °C 'de ortaya çıktığını, su varlığında ve sıcaklık modülasyonlu DSC analizinde ise T_g'nin 61 °C'de gözlendiğini rapor etmişlerdir. Bu durum, suyun kitosan içinde plastikleştirici olarak davrandığını doğrular. Su, içinde bulunan amin ve hidroksil grupları aracılığıyla kitosan ile moleküller arası bir hidrojen bağı oluşturur. Bu, kitosandaki zincir hareketliliğini kolaylaştıran, moleküler düzenlemeye yardımcı olur (Dhawade ve Jagtap 2012).

Kompozitlerin T_g değerleri PB için 256, PChB için 214 °C'de gözlenmiş, Ch ve PCh için ise camsı geçiş sıcaklığı gözlenmemiştir.

Bu çalışmada elde edilen termogramların tümünde 65-100 °C aralığındaki geniş endotermik pikler, herhangi bir ön kurutma işlemi uygulanmadığı için yüzey ve gözenekler içindeki suyun kaybindan kaynaklanmaktadır. Bulgular ve Tartışma

Bölümünde de belirtildiği gibi, Ch içeren kompozitlerde bu ilk pikin sıcaklığı kitosandan (73 °C) daha yüksektir (PCh için 77 °C. PChB için 83 °C). PAAM ve PB için ise pik sırasıyla 69 ve 74 °C’de görülmektedir. Bu sonuçlar kompozit oluşumunun ısıl kararlılığı arttırdığının başka bir kanıtıdır.

- SEM görüntüleri incelendiğinde kompozitlerin tümünde karşılaşılan genel görünüm, PB, PCh ve PChB yapılarında amorf yapıdaki PAAM’nın yapıya girmesi ile polimer kaplı B, Ch ve ChB oluşumudur.
- SYN değerlerinin tümü yaklaşık nötr pH değerlerindedir. Kompozitlerin pHi≈4–10 aralığında tampon özellik gösterdiği görülmektedir.

İmmobilizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar:

- Üreaz immobilizasyonunun incelenmesi deneylerinde, protein belirleme yöntemi olan Bradford spektrofotometrik yöntem kullanılamamıştır. Coomassie Brilliant Blue G-250 ile Ch içeren kompozitlerin denge çözeltileri, protein pikiyle örtüşen bir pik oluşturmaktadır. Bu durumla Su ve arkadaşlarının (2010) çalışmalarında da karşılaşılmış ve çalışmanın özet bölümünde “*Deney sonuçlarında kayda değer hatalar vardır ve yöntem uygun değildir.*” notu düşülmüştür (Su vd., 2010).

Bu nedenle immobilizasyon deneyleri daha önceki bölümlerde de açıklandığı gibi yüksek substrat derişimlerinde, iletkenlik yöntemiyle yapılmıştır.

- İmmobilizasyonun üreaz derişimiyle değişiminin araştırılmasıyla elde edilen izotermilerin Giles sınıflandırmasındaki L (PB) veya H (PCh ve PChB) tipte olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, kullanılan kompozitlerin özellikle kitosanlı kompozitlerin üreaza olan yüksek adsorpsiyon ilgisi olarak nitelendirilmiştir. Langmuir adsorpsiyon izoterminden elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasiteleri PB, PCh ve PChB için sırasıyla; 93, 174 ve 95 mg g⁻¹’dir.
- İmmobilizasyon kinetiği ile ilgili araştırma sonuçları tutunmanın sözde ikinci derece modelle açıklanabileceğini göstermiştir. İkinci derece hız denklemine uyum ve Weber-Morris modelinden iki doğrusal bileşen elde edilmesi; daha önceki çalışmalarda da açıklandığı gibi, adsorpsiyonun derişime bağlı olduğunu ve hız belirleyen basamağın kompleks oluşumu üzerinden gerçekleştiğini kanıtlamıştır (Baybaş, 2009; Eninanç, 2013).

- İmmobilizasyonun sıcaklıkla değişimi araştırmalarında, tutunmanın sıcaklığa bağlı olmadığı gözlenmiştir. Dört farklı sıcaklık (4, 15, 25 ve 35 °C) ve 2000 mg L⁻¹ başlangıç için, iletkenlik yöntemiyle bulunan, denge derişimi (C_d) ve tutunma miktarlarının (Q) ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla; PB için 1405±78 mg L⁻¹ ve 42±6 mg g⁻¹, PCh için 31±18 mg L⁻¹ ve 179±10 mg g⁻¹, PChB için 61±26 mg L⁻¹ ve 176±11 mg g⁻¹'dir. Özellikle PCh ve PChB kompozitleri, 2000 mg L⁻¹'lik üreazın ortalama olarak %98 ve %97'sini tutmuştur. Kalan üreaz derişimi iletkenlik yöntemiyle duyarlı olarak ölçülemeyecek kadar küçüktür. Bu durumda dağılım katsayıları (K_d=Q/C_d)'nın "ln"i alındığında tanımsız ya da çok büyük değerler bulunmuştur. Sonuç olarak (1/T)-(lnK_d) grafikleri çizilememiş ve dolayısıyla termodinamik parametreler (ΔH, ΔS ve ΔG) türetilenemiştir.

Aktivite deneylerinin sonuçları:

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerine farklı ortamların etkisinin belirlenmesi ile ilgili deneylerde, aynı zamanda üreaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan iletkenlik yöntemi kullanılamamıştır. Çünkü yöntemin ölçülebilen en düşük üreaz derişimi 50 mg L⁻¹'dir. Dolayısıyla aktivite farklarının belirlenmesinde bu yöntem çok duyarlı değildir. Bu nedenle oldukça düşük (1-10 mg L⁻¹) NH₄⁺ derişimlerinin (dolayısıyla enzim derişiminin) belirlenebildiği Berthelot spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır.

- İmmobilize enzim aktivitesinin, üre derişimi, pH ve sıcaklık ile değişimi incelenerek, aynı koşullardaki 200 mg L⁻¹ derişimli serbest enzim ile karşılaştırılmıştır.
- İmmobilize ve serbest enzimler için tepkime ilk hızının üre derişimiyle değişimi, deneylerinden elde edilen V_{max} değerleri; 11 ünite mg⁻¹ (serbest enzim), 11 ünite mg⁻¹ (PB immobilize enzim), 20 ünite mg⁻¹ (PCh immobilize enzim), 19 ünite mg⁻¹ (PChB immobilize enzim) olarak bulunmuştur. K_m değerleri ise; 128 mM (serbest enzim), 243 mM (PB immobilize enzim), 104 mM (PCh immobilize enzim) ve 102 mM (PChB immobilize enzim)'dir. Enzim immobilizasyonu ile K_m değeri PB için ~2 kat artarken, Ch'lı kompozitler için ise yaklaşık 0.75 kat azalmıştır.
- Enzim aktivitesinin pH ile değişimi deneylerinden, serbest enzim ve PCh için en yüksek aktivite izlenen pH'nın ~7, PChB'de ~ 6.4, PB'de ise 3-6.4 arasında oluğu sonucuna ulaşılmıştır. Farklı iyonik türlerin enzim aktivitesini farklı şekilde

etkileyeceği için, aynı deneyde, fosfat tamponu dışında tampon (asetik asit, tris, amonyak vs) kullanılmamıştır. $H_3PO_4/H_2PO_4^-$, $H_2PO_4^-/ HPO_4^{2-}$ ve HPO_4^{2-}/PO_4^{3-} tamponlarının pH aralıkları ise sınırlı olduğu için örneğin 3-6.4 arasında başlangıç pH'sına sahip tampon çözelti hazırlamak zorlaşmıştır.

- Enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişimi deneylerinden, serbest enzimin optimum sıcaklığı 35 °C olarak bulunmuştur. Kitosanlı komozitlerin (PCh ve PChB) üreazın termal kararlılığını arttırdığı söylenebilir.
- Tekrar kullanım deneylerinde ise, immobilize enzimin amacına uygun şekilde 7 kullanım sonunda bile aktivitesini kaybetmediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonucun ulaşılan en önemli bulgu olduğu düşünölmektedir.

Daha sonra yapılması planlanan çalışmalar:

İmmobilize enzimlerin gerçek örneklere uygulanması tez sürecinde yapılamamıştır. Sonraki çalışmalarda üreaz tutturulmuş kompozitlerin endüstriyel kullanımının araştırılması düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad R., Sardar M.,** (2015), Enzyme Immobilization: An overview on nanoparticles as immobilization matrix, *Biochem Anal Biochem* 4, 2-8.
- Akgöl S., Yalçinkaya Y., Bayramoğlu G., Denizli A., Arıca M. Y.,** (2002), Reversible immobilization of urease onto Procion Brown MX-5BR-Ni(II) attached polyamide hollow-fibre membranes, *Process Biochemistry*, 38 () 675-683.
- Alatawi F. S., Monier M., Elsayed N. H.,** (2018), Amino functionalization of carboxymethyl cellulose for efficient immobilization of urease, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1018–1025.
- Alexandre, M., Dubois, P.,** (2000), Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering*, 28, 1-63
- Ali S., Zafar W., Shafiq S., Manzoor M.,** (2017), Enzymes immobilization: an overview of techniques, support materials and its applications, *International journal of scientific & technology research*, v 6, I 7, 64-72.
- Ali Z. A., Venkatesan J., Kim S. K., Sudha P. N.,** (2011), Beneficial effect of chitosanpolyacrylamide copolymer in removal of heavy metals from industrial dye effluents, *International Journal Of Environmental Sciences* 1, 820-833.
- Anirudhan T. S., Suchithra P.S., Rijith S.,** (2008), Amine–modified polyacrylamide– bentonite composite for the adsorption of humic acid in aqueous solutions, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 326, 147–156.
- Aslan F.,** (2015), Poliakrilamit-lignin-hidroksiapatit kompozit yapılarının hazırlanması ve karakterizasyonu, bsa ve bazı radyoaktif metaller için adsorban özelliklerinin araştırılması, *C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek Lisans Tezi), 87s, Sivas.
- Bai, J., Li, Y., Dub, J., Wang, S., Zheng, J., Yang, O., Chenc, X.,** (2007), One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite, *Materials Chemistry and Physics*, 106, 412–415.
- Baran Teke A.,** (2008), Farklı yöntemlerle üreaz/alanindehidrogenaz enzim çiftinin immobilizasyonu ve sistemin kan üre düzeyini düşürebilme olanaklarının araştırılması, *E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, (Doktora Tezi), 162s, İzmir.
- Basha S., Murthy Z.V.P.,** (2007), Kinetic and equilibrium models for biosorption of Cr(VI) on chemically modified seaweed, *Cystoseira indica*, *Process Biochemistry*, 42, 1521–1529.
- Baybaş D.,** (2009). Poliakrilamit-aluminosilikat kompozitlerin karakterizasyonu ve toryum için adsorpsiyon özelliklerinin araştırılması, *C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü* (Doktora Tezi), 144s, Sivas.
- Baybaş D., Ulusoy U.,** (2011), The use of polyacrylamide-aluminosilicate composites for thorium adsorption, *Applied Clay Science*, 51, 138–146.
- Baybaş D., Ulusoy U.,** (2012), Polyacrylamide–hydroxyapatitecomposite: Preparation, characterization and adsorptive features for uranium and thorium, *Journal of Solid State Chemistry*, 194, 1–8.
- Bayramoğlu G., Altınok H., Bulut A., Denizli A., Arıca M. Y.,** (2003), Preparation and application of spacer-arm-attached poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) films for urease immobilisation, *Reactive & Functional Polymers*, 56, 111–121.

- Bayramoğlu G., Yalcın E., Arıca 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.
- Bhattacharyya K. G., Gupta S. S.,** (2007), Adsorptive accumulation of Cd(II), Co(II), Cu(II), Pb(II), and Ni(II) from water on montmorillonite: Influence of acid activation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 310, 411–424.
- Bilgin Sökmen B., Aydın S., Şahin Y., Akyurt İ.,** (2016), Üreaz ve elastaz aktivitelere giresun'dan toplanan cystoseira barbata (stackhouse) c. agardh deniz yosununun inhibisyon etkisinin incelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 6(14), 124-131.
- Brena B., González-Pombo P., Batista-Viera F.,** (2013), İmmobilization of enzymes: a literature survey, *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology*, 1051, 15-31
- Chaney A. L., Marbach E. P.,** (1961), Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia, *Chemical Laboratory, Glendale*, 6, 130-132. Oancea D., Răducan A., Bostan M., (2005), *Chimie, Anul XIV*, I-II, 309-314.
- Chen J-P. ve Chiu S-H.,** (2000), A poly(N-isopropylacrylamide-co-N-acryloxysuccinimide-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.
- Çetinus Ş., Öztop H. N.,** (2000), Immobilization of catalase on chitosan film, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 497–501.
- Çetinus Ş., Öztop H. N.,** (2003), Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 889–894.
- Çınar E., Ercan S., Güleşiçi N.,** (2017), Lewatit Partikülüne Üreaz Enziminin İmmobilizasyonu, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 7, 124-136.
- Datta S., Christena L. R., Rajaram Y. R. S.,** (2013), Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *Biotech*, 3, 1-9.
- Dhawade P. P., Jagtap R. N.,** (2012), Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry, *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 3, 1372-1382.
- Eninanç O.,** (2013), Poliakrilamid-zeolit/kitosan kompozitinin Sentezi, karakterizasyonu ve th, ac-228, pb-212, bi-212 ve tl-208 İçin adsorban özelliklerinin araştırılması, *C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)*, 71s, Sivas.
- Eren E., Afsin B.,** (2008), An investigation of Cu(II) adsorption by raw and acid-activated bentonite: A combined potentiometric, thermodynamic, XRD, IR, DTA study, *Journal of Hazardous Materials*, 151, 682–691.
- Fidaleo M., Lavecchi R.,** (2003), Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4–9, *Chem. Biochem.* 17, 311–318.
- Foo K.Y., Hameed B. H.,** (2010), Insights into the modeling of adsorption isotherm systems *Chemical Engineering Journal*, 156, 2–10.
- Gaabour L.H.,** (2017), Spectroscopic and thermal analysis of polyacrylamide/chitosan (PAM/CS) blend loaded by gold nanoparticles, *Results in Physics*, 7, 2153–2158.
- Giles, C.H., D'Silva, A.P., Easton, I.A.,** (1973). A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm, *Journal of Colloid and Interface Science*, 47 (3), 766-778.

- Güleşci N.**, (2013), Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu, *C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, (Doktora Tezi)*, 105s, Adana.
- Güven S.**, (2008), Şarap üretimi ve kalite kontrolü, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayın, 3, 316s*, Çanakkale.
- Ho Y.S., McKay G.**, (1999), Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochemistry*, 34, 451–465.
- Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R.**, (2013), Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol*, 6, 185–205.
- Hossain K. Z., Monreal C. M., Sayari A.**, (2008), Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62, 42–50.
- Humelnicua D., Dinub M. V., Dragan E. S.**, (2011), Adsorption characteristics of UO_2^{2+} and Th^{4+} ions from simulated radioactive solutions onto chitosan/clinoptilolite sorbents, *Journal of Hazardous Materials*, 185, 447–455.
- Ispirli Doğaç Y., Deveci İ., Teke M., Mercimek B.**, (2014), TiO_2 beads and TiO_2 -chitosan beads for urease immobilization, *Materials Science and Engineering C*, 42, 429–435.
- Işıkver Y.**, (2017), Removal of some cationic dyes from aqueous solution by acrylamide- or 2-hydroxyethyl methacrylate-based copolymeric hydrogels, *Fibers and Polymers*, 18, 2070–2078.
- Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B.**, (2014), Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Journal of the International Adsorption Society*, 20, 5–6, 801–821.
- Kadhema A-H. H., Kadhema K. M., Andersonb G. E.**, (2016), Immobilization of urease enzyme on nanoceria modifies secondary and tertiary protein structures, *Acta Chimica Slovaca*, 9, 44–53.
- Kappaun K., Piovesan A. R., Carlini C. R., Ligabue-Braun R.**, (2018), Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review, *Journal of Advanced Research*, 13, 3–17
- Kittur F. S., Prashanth K. V. H., Sankar K. U., Tharanathan R. N.**, (2002), Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry, *Carbohydrate Polymers*, 49, 185–193.
- Krajewska B.**, (2009) Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 22–40.
- Krajewska B.**, (2016), A combined temperature-pH study of urease kinetics. Assigning pKa values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 124, 70–76.
- Kunduru K. R., Kutcherlapati S.N. R., Arunbabu D., Jana T.**, (2017), Armored urease: enzyme-bioconjugated poly(acrylamide) hydrogel as a storage and sensing platform, *Methods in Enzymology*, 590, 143–167.
- Kutcherlapati S. N. R., Yeole N., Jana T.**, (2016), Urease immobilized polymer hydrogel: Long-term stability and enhancement of enzymatic activity, *Journal of Colloid and Interface Science*, 463, 164–172.
- Laska J., Włodarczyk J., Zaborska W.**, (1999), Polyaniline as a support for urease immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6, 549–553.

- Limousin G., Gaudet J. P., Charlet L., Szenknect S., Barthe`s V., Krimissa M.,** (2007), Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement, *Applied Geochemistry*, 22, 249–275.
- Liu D. M., Chen J., Shi Y. P.,** (2018), Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends in Analytical Chemistry* 102, 332-342.
- Marzadori C., Miletto S., Gessa C., Ciurli S.,** (1998), Immobilization Of Jack Bean Urease On Hydroxyapatite: Urease Immobilization In Alkaline Soils, *Soil Biol. Biochem. Vol. 30, No. 12, pp.* 1485-1490.
- Miller, C.J., Miller, J.N.,** (1988). Statistics for Analytical Chemistry 2., *Ellis Horwood Limited, England.*
- Mukherjee S., Mukherjee M.,** (2006), Nitrogen-mediated interaction in polyacrylamide–silver nanocomposites, *J. Phys.: Condens. Matter*, 18, 11233–11242.
- Mullet M., Fievet P., Szymczyk A., Foissy A., Reggiani J.-C., Pagetti J.,** (1999), A simple and accurate determination of the point of zero charge of ceramic membranes, *Desalination*, 121, 41-48.
- Örnek Acar, D.,** (2009), Üreaz enziminin ca-alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi, *A. D. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans Tezi)*, 68s, Aydın.
- Queiroz M. F., Melo K. R. T., Sabry D. A., Sasaki G. L., Rocha H. A. O.,** (2015), Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation, *Mar. Drugs*, 13, 141-158.
- Sheldon R. A.,** (2007), Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289 – 1307.
- Silva M E. S.R., Dutra E. R., Mano V., Machado J. C.,** (2000), Preparation and thermal study of polymers derived from acrylamide, *Polymer Degradation and Stability*, 67, 491-495.
- Smiciklas I. D., Milonjic S. K., Pfendt P., Raicevic S.,** (2000), The point of zero charge and sorption of cadmium (II) and strontium (II) ions on synthetic hydroxyapatite, *Separation and Purification Technology*, 18, 185–194.
- Su Z. Q., Wu S. H., Zhang H. L., Feng Y. F.,** (2010), Development and validation of an improved Bradford method for determination of insulin from chitosan nanoparticulate systems, *Pharmaceutical Biology*, 48, 966-973.
- Telefoncu A.,** (1997), Enzimoloji Yüksek Lisans Yazokulu, 446s, Aydın.
- Tunali S.,** (2008), Fındıktan (*corylus maxima miller*) üreazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, *İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, (Doktora Tezi)*, 108s, İstanbul.
- Türksever Tetiker A.,** (2016), Farklı kaynaklardan izole edilen üreaz enziminin immobilizasyonu ve üre tayininde ve hidrolizinde uygulanabilirliğinin araştırılması, *T. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, (Doktora Tezi)*, 111s, Edirne.
- Uygun M., Akduman B., Akgöl S., Denizli A.,** (2013), A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease, *Appl Biochem Biotechnol*, 170, 1815–1826.
- Vial S., Prevot V., Leroux F., Forano C.,** (2008), Immobilization of urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by soft chemistry routes, *Microporous and Mesoporous Materials*, 107, 190–201.
- Yeon K-H ve Lueptow R. M.,** (2006), Urease immobilization on an ion-exchange textile for urea hydrolysis, *J Chem Technol Biotechnol*, 81, 940–950.

- Yener F.**, (2007), Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu, *C.Ü. (Yüksek Lisans Tezi)*, 47s, Adana.
- Yıldız O.P.**, ve **Yangınlar F.**, (2014), Gıda Endüstrisinde Kitosanın Kullanımı, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30(3):198-206
- Zdarta J.**, **Meyer S.M.**, **Jesionowski T.**, **Pinelo M.**, (2018), Aa general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, *properties, practical utility Catalysts*, 8, 92.
- Zhai R.**, **Zhang B.**, **Liu L.**, **Xie Y.**, **Zhang H.**, **Liu J.**, (2010), Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes, *Catalysis Communications*, 12, 259–263.



EKLER

EK 1: Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun (Q) enzim derişimiyle (C₀) değişimi

PB			PCh			PChB		
C ₀ ¹	C _d ²	Q ³	C ₀	C _d	Q	C ₀	C _d	Q
50	0.0	5.0	50	0.0	5.0	50	0.0	5.0
100	6.6	9.3	100	0.0	10.0	100	0.0	10.0
200	30.8	16.9	200	0.0	20.0	200	0.0	20.0
300	69.6	23.0	300	0.0	30.0	300	0.0	30.0
500	222.9	27.7	500	0.0	50.0	500	8.2	49.2
600	296.3	30.4	700	0.0	70.0	700	24.0	67.6
700	312.9	38.7	800	0.0	80.0	800	73.4	72.7
800	371.9	42.8	1000	0.0	100.0	1000	109.6	89.0
1000	528.4	47.2	1250	20.1	123.0	1500	571.8	92.8
1250	751.7	49.8	1500	101.8	139.8	1750	731.8	101.8
1500	941.1	55.9	1750	61.9	168.8			
1750	1111.0	63.9	2000	219.6	178.0			
2000	1281.8	71.8						
3000	2195.4	80.5						

EK 2: Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun zamanla değişimi
(C₀=2000 mg L⁻¹) (ölçümlere hacim faktörü uygulanmıştır)

PB			PCh			PChB		
t/dk	C _d	Q	t/dk	C _d	Q	t/dk	C _d	Q
0	1978.8	2.1	0	1937.8	6.2	0	1857.4	14.3
20	1818.8	18.1	10	1447.6	55.2	20	1665.5	33.5
35	1751.3	24.9	20	1346.7	65.3	45	1614.7	38.5
45	1685.4	31.5	30	1319.8	68.0	90	1518.4	48.2
60	1672.9	32.7	45	1232.0	76.8	150	1320.5	68.0
75	1611.3	38.9	60	1151.3	84.9	210	1301.0	69.9
90	1663.8	33.6	90	1035.9	96.4	270	1158.4	84.2
105	1587.9	41.2	120	1001.7	99.8	330	1162.9	83.7
120	1584.6	41.5	180	948.0	105.2	390	1141.2	85.9
240	1477.1	52.3	300	807.1	119.3	1290	935.1	106.5
360	1430.4	57.0	420	771.5	122.8	1350	845.5	115.5
1260	1324.6	67.5	480	727.2	127.3	1440	820.8	117.9
1380	1363.8	63.6	540	689.5	131.1	2730	570.6	142.9
1440	1365.4	63.5	600	698.2	130.2			
			1440	407.6	159.2			

EK 3: Kompozitlere üreaz enzim immobilizasyonunun sıcaklıkla değişimi

PB					PCh			PChB		
C ₀	t ⁰ C	C _d	Q	%T ⁴	C _d	Q	% T	C _d	Q	% T
1873	4	1334	54	29	79	179	96	139	173	93
2009	15	1602	41	20	37	197	98	35	197	98
1895	25	1446	45	24	9	189	100	21	187	99
1506	35	1241	27	18	0	151	100	49	146	97

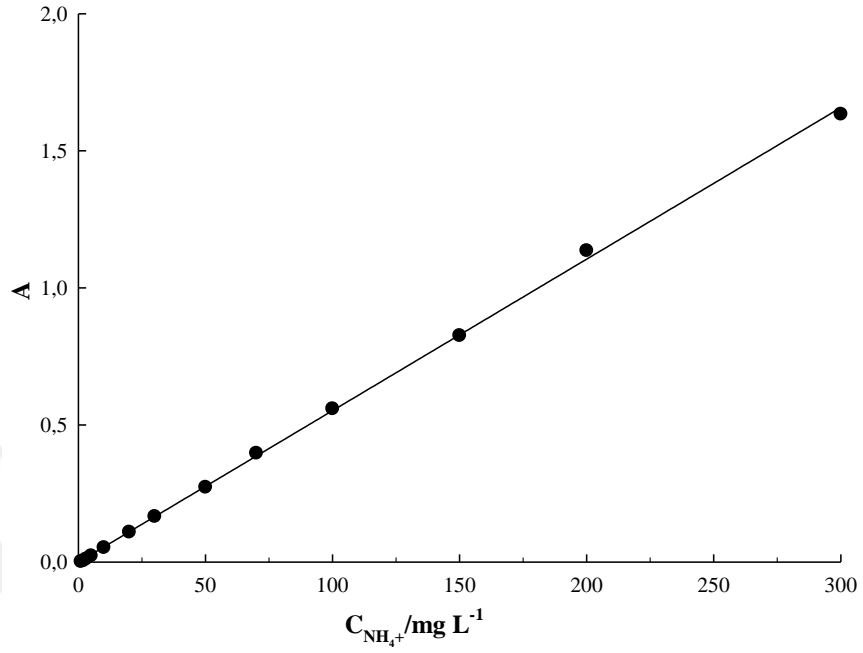
¹ Başlangıç enzim derişimleri (C₀/mg L⁻¹)

² Denge derişimleri (C_d/mg L⁻¹)

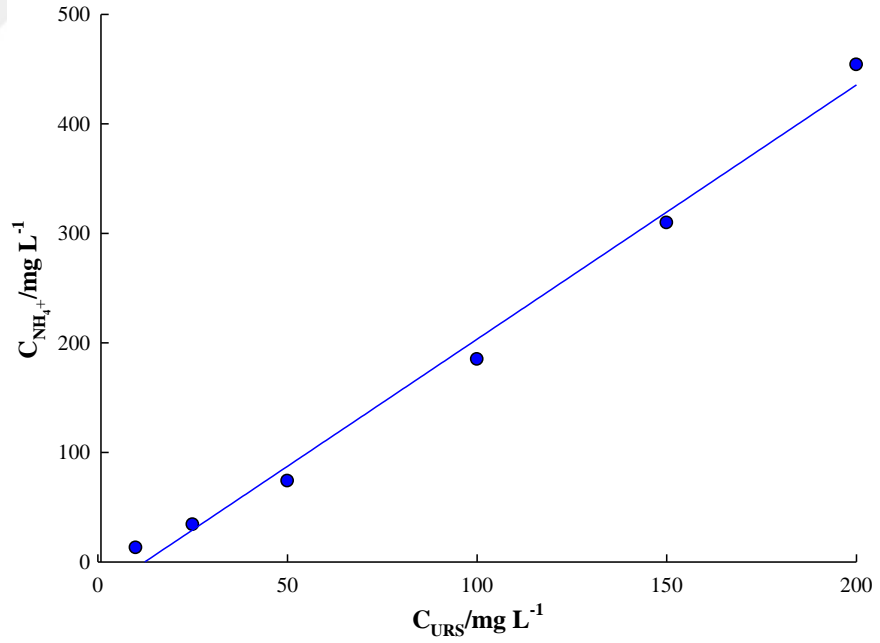
³ g adsorban başına tutunan enzim miktarı (Q/mg g⁻¹)

⁴ % Tutunma [(C₀-C_d)*100/C₀]

EK 4: Enzim Aktivitesi hesabı için kullanılan Berthelot yöntemi, UV-GB spektrofotometrik ölçümlerde kullanılan örnek kalibrasyon doğruları



$R^2 = 0.9994$ $A = -5.308 \times 10^{-4} + 5.527 \times 10^{-3} \times C_{NH_4^+}$



$R^2 = 0.9913$ $C_{NH_4^+} = -28.71 + 2.321 \times C_{URS}$

EK 5: Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin üre derişimiyle değişimi

[S] ₀ /mM	<u>Serbest Enzim</u>		<u>PB-U</u>		<u>PCh-U</u>		<u>PChB-U</u>	
	v ₀ /ünite mg ⁻¹		v ₀ /ünite mg ⁻¹		v ₀ /ünite mg ⁻¹		v ₀ /ünite mg ⁻¹	
0.0	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8.3	1.83	0.26	0.26	0.52	0.52	0.01	0.01	0.01
16.7	2.97	1.56	1.56	1.42	1.42	0.67	0.67	0.67
50.0	4.22	--	--	--	--	--	--	--
83.2	5.03	3.05	3.05	7.56	7.56	13.01	13.01	13.01
116.6	5.57	--	--	--	--	--	--	--
166.5	5.81	3.87	3.87	16.73	16.73	7.84	7.84	7.84
333.0	6.47	6.51	6.51	13.26	13.26	15.94	15.94	15.94

EK 6: Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin pH ile değişimi

pH	<u>Serbest Enzim</u>		<u>PB-U</u>		<u>PCh-U</u>		<u>PChB-U</u>	
	A ⁵	%BA ⁶	A	%BA [*]	A	%BA [*]	A	%BA [*]
2.32	3.16	1.42	1.41	0.64	14.64	6.59	2.48	1.12
3.15	2.86	1.29	4.55	2.05	56.48	25.44	4.09	1.84
6.76	214.01	96.39	30.83	13.88	56.43	25.42	62.29	28.06
7.75	222.03	100.00	34.00	15.31	49.41	22.25	43.86	19.75
11.66	4.66	2.10	2.74	1.23	39.83	17.94	44.25	19.93

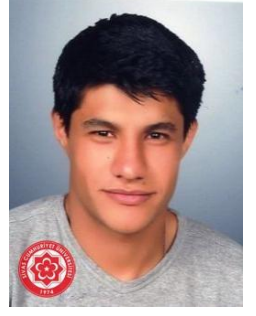
EK 7: Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

t/°C	<u>Serbest Enzim</u>		<u>PB-U</u>		<u>PCh-U</u>		<u>PChB-U</u>	
	A	%BA [*]	A	%BA [*]	A	%BA [*]	A	%BA [*]
10	70.6	29.7	5.8	2.4	26.6	11.2	24.5	10.3
15	108.2	45.5	10.1	4.2	62.0	26.0	34.4	14.5
35	237.9	100.0	9.2	3.9	60.0	25.2	81.8	34.4
45	217.7	91.5	7.1	3.0	122.3	51.4	91.7	38.5
55	208.7	87.7	8.5	3.6	245.8	103.3	136.0	57.2

EK 8: Tekrar kullanılabilirlik verileri

KS ⁷	<u>PB-U</u>		<u>PCh-U</u>		<u>PChB-U</u>	
	A ₁ ⁸	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
1	0.89	0.89	6.02	5.72	2.75	3.65
2	1.06	0.78	5.93	5.74	3.56	3.02
3	0.90	0.76	5.02	5.10	2.76	2.41
4	0.75	0.89	5.45	5.23	--	1.91
5	0.67	0.77	4.22	4.35	2.17	3.16
6	0.73	0.74	5.58	4.33	2.62	3.35
7	0.78	0.79	5.52	4.15	2.16	3.11
Ort	0.83	0.80	5.39	4.94	2.67	2.95
Std	0.13	0.06	0.61	0.67	0.51	0.59
Sapma						
Std.						
Hata	0.05	0.02	0.23	0.25	0.21	0.22

⁵ Spesifik Aktivite/ünite mg⁻¹⁶ * %BA: % Bağıl Aktivite⁷ *KS: Kullanım Sayısı⁸ Aktivite, mM dk⁻¹ (1 ve 2 numaralı örnek için)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Serhat ÖNER
Doğum Yeri ve Tarihi Kayseri, 30.01.1987
Medeni Hali Bekar
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı
58140 Sivas
E-posta Adresi soner@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Kayseri Lisesi, 2004
Lisans Erciyes Üniversitesi, 2011
Yüksek Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 2018

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Bilgisayar İşletmeni, 2012-2018
Cumhuriyet Üniversitesi Kimyager, 2018