

## Gliksal Molekölü ile Partikül Yüzeyine İmmobilize Üreaz Enziminin Depo Kararlılığına etkisi

Ümit YASAR<sup>1\*</sup>, Fatma ULUSAL<sup>2</sup>, Pınar YILGÖR HURİ<sup>3</sup>, Bilgehan GÜZEL<sup>4</sup>, Nurten DİKMEN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ardahan Üniversitesi, Nihat Delibalta Gölü Meslek Yüksekokulu, Ardahan

<sup>2</sup>Tarsus Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Mersin

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, Ankara

<sup>4</sup>Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Adana

<sup>5</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): [umityasar@ardahan.edu.tr](mailto:umityasar@ardahan.edu.tr)

**Geliş Tarihi (Received):** 18.06.2023

**Kabul Tarihi (Accepted):** 30.07.2023

### Özet

İmmobilizasyon biyolojik bir katalizörün analitik bir sistem içerisinde tutuklanmasıdır. Sentezlenen kompleks serbest biyokimyasal enzimin katalitik özelliğe sahiptir. Günümüzde hızlı inaktifleşen enzimlerin yerine immobilize enzim avantajlarından faydalanılmaya çalışılmaktadır. Serbest enzimlere göre tekrar kullanılabilirliği, reaksiyon ortamından uzaklaştırılma kolaylığı gibi avantajları gün geçtikçe geliştirmektedir. Bu çalışmada nanoparçacıkların belirlenen avantajları kullanılarak üreaz enzim stabilizasyonunun sağlanması planlandı (Çukurova Üniversitesi Proje Birimi, TYD-2015-3765). Bu amaçla üreaz enzimi üretilen nanoparçacıklara bağlanarak yeniden biçimlendirilmesi sonrası, enzim aktivitesinin katalitik özelliği, farklı sıcaklıklarda değerlendirildi. Süper paramanyetik nanopartiküller (SPIONs) sentezlendi. Gliksal molekülü kullanılarak yüzey modifikasyonları sağlandı ve enzim kararlılığı amacı ile üreaz enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Optimum sıcaklık sınırlarının altında ve değişken (25°C- 4°C- 37°C) şartlarda aktivite özellikleri incelendi. İstatistiksel olarak çalışma gruplarının kontrol grupları ve gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlendi. Çalışma sonuçları immobilize enzimin depolama kararlılıklarını ve raf ömrünü iyileştirdiğini gösterdi ( $p>0,05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Üreaz, immobilizasyon, nanopartikül, kararlılık

## Effect of Urease Enzyme Immobilized to Particle Surface with Glyoxal Molecule on Storage Stability

### Abstract

Immobilization is the immobilization of a biological catalyst in an analytical system. The synthesized complex has the catalytic feature of the free biochemical enzyme. Nowadays, it is tried to benefit from the advantages of immobilized enzymes instead of rapidly inactivated enzymes. Its advantages over free enzymes, such as reusability and ease of removal from the reaction medium, are developing day by day. In this study, it was planned to provide urease enzyme stabilization by using the advantages of nanoparticles (Çukurova University Project Unit, TYD-2015-3765). For this purpose, after the urease enzyme was bound to the produced nanoparticles and reshaped, the catalytic property of the enzyme activity was evaluated at different temperatures. Superparamagnetic nanoparticles (SPIONs) were synthesized. Surface modifications were provided by using glyoxal molecule and urease enzyme immobilization was performed for enzyme stability. The activity properties were investigated under the optimum temperature limits and under variable (25°C-4°C- 37°C) conditions. Statistically, it was determined that the study groups did not show a statistically significant difference between the control groups and groups. The results of the study showed that the immobilized enzyme improved the storage stability and shelf life ( $p>0.05$ ).

**Keywords:** Urease, immobilization, nanoparticle, stability

## 1. Giriş

Protein ve aminoasitlerin katabolizması sonucu endojen bir ürün olan üre oluşur. Ürenin amonyağa hidrolizi nikel bağımlı bir metalloenzim olan üreaz (üre amidohidrolaz, EC3.5.1.5) enzimi tarafından katalize edilir(Kafarski ve Talma, 2018; Sepehri ve Khedmati, 2023). Katalize edilmemiş bir reaksiyon hızıyla karşılaştırıldığında üreaz, ürenin hidrolizinde yaklaşık  $10^{14}$  kat daha hızlı ve verimli bir katalizördür(İlleova ve ark., 2003). Üreaz, heteropolimerik enzimler grubunda yer alır. Bitki, omurgasız hayvanlarda bulunduğu gibi bazı mantarlar ve bakterilerde de bulunur(Sepehri ve Khedmati, 2023). Üre protein ve aminoasitlerin katabolizması sonucu insan vücudu tarafında da üretilmektedir. Vücutta amonyak ( $\text{NH}_3$ ) formundaki nitrojen, karaciğer ve böbrekte kan, ter ve idrar yoluyla atılmak üzere üreye dönüştürülür. Bu dönüşüm üre döngüsü sonucunda olur. Üre suda çözünen bir moleküldür. Vücut sıvılarına hızlı bir şekilde yayılır. Vücut sıvılarındaki üre seviyesi (kan, idrar vb), özellikle böbrek ve karaciğer problemleri olmak üzere bazı metabolizma bozukluklarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kusma, ishal gibi durumlarda kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği gibi hastalıklarda, düşük protein beslenmelerinde, endokrin bozukluklarda üreaz enzim aktivitesi ile vücuttaki üre seviyesi değişebilir(Ozbek ve ark., 2022). Bu nedenle bu patolojik durumların takip edilebilmesi ve değerlendirilmesi açısından üre, seviyesinin sürekli takip edilmesi gereken önemli bir biyobelirteçtir(Ozbek ve ark., 2022). Üre belirli organların işlevlerini kontrol amaçlı tayini yapılmaz aynı zamanda hemodiyaliz sonrası kandaki üre tayini hemodiyalizin etkinliğini test etmek için de kullanılabilir. Bununla birlikte sadece tıbbi alanda değil gıda ve gübre endüstrisi, toprak analizi alanlarında da üre tayini yapılmaktadır. Bu katalitik enzim, ürenin hidroliz reaksiyonunu hızlandırır ve ürenin üreaz ile hidrolizinde bir molekül amonyak ve bir

molekül karbamat ortaya çıkar. Bu durumda üreaz enziminin substratı üredir ve vücut sıvı örneklerinde üreyi saptamak için kullanılabilir(Amani ve ark., 2022). Canlılarda reaksiyonları hızlandıran ve kolaylaştıran enzimlerin aktivitesi, klinik teşhis ve deneysel çalışma dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Ancak kararlılık, maliyet ve depolama gibi dezavantajlarından dolayı, bilim dünyasının yeni çalışmalar ile bu enzimleri daha verimli ve kullanışlı biçime dönüştürmeyi hedeflediği görülmektedir. Doğal enzimlerin aktif bölgelerini manipüle edilmesi sonucu biçimlendirilmiş yeni enzimler doğal enzimlerin güçlü mimetik özelliklerini taşımakla birlikte onların sahip olduğu dezavantajlarının da giderilmesi amaçlanmaktadır(Singh ve ark., 2023). Laboratuvar ortamında üretilen metalik nanopartiküllerin sentezi, benzersiz özellikleri ve geniş kullanım alanları nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmeye başlamıştır(Della-Flora ve de Andrade, 2023). Küçük boyutları, geniş hacimleri ve düşük üretim maliyetleri çalışmalardaki çeşitli sorunları gidermede kullanılabilir(Ulusal ve Özdemir, 2023). Doğal indirgeme, kapatma ve stabilize etme etkileri çalışmalar için avantaj sağlamaktadır. Son yıllarda nanoparçacıklar manyetik cihaz ve sensör gibi çeşitli uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır(Ulusal ve ark., 2022). Bu tür mekanik uygulamalarla birlikte biyomedikal algılama ve antibiyotikler dahil olmak üzere tıbbi uygulamalarda da görülmeye başlanmıştır(Berhe ve Gebressassie, 2023). Biz çalışmada nanoparçacıkların belirlenen avantajları kullanılarak üreaz enzim stabilizasyonunun sağlanmasını planladık. Üretilen partikül - üreaz enzim konjugatlarının amacı, enzimi bozunmaya karşı korumak ve farklı sıcaklıklarda etkinliğinin devamını sağlamaktır. Bu amaçla üreaz enzimi üretilen nanoparçacıklara bağlanarak yeniden biçimlendirilmesi sonrası enzim aktivitesinin katalik özelliği farklı sıcaklıklarda değerlendirilmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal detaylar: Glioksal (Sigma), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Sigma), Üreaz (Sigma) enzim çözeltisi, üre, Sodyum Hidroksit (NaOH), sodyum sülfat, (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) (Sigma), Azot (N<sub>2</sub>), Hidroklorik asit (HCl) (Merck), Demir (III) klorür hekza klorür (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) (Sigma), Sodyum klorür (Sigma), Demir (II) sülfat mono hidrat (FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (Sigma), Fosfat Buffer Saline (Biochrome).

### 2.2. Cihazlar

Etüv; Binder, manyetik karıştırıcılı ısıtıcı; WiseStir, Schelenk düzeneği, mekanik karıştırıcı; WiseMix, Steril Filtre (0.22µ), elektronik terazi; Shimadzu, otomatik Pipetler; Eppendorf, ultrasonik banyo, Rotatör; Plate; (12-96 kuyucuklu/Costar), Bio RS, ultrasonik homojenizatör; Bandelin, Mikroplate Okuyucu; Biotek Eon, santrifüj; Hettich, Santrifüj Tüp 15/50 ml, biyogüvenlik Kabini; Berner, Çalkalamalı su banyosu; Memmert, derin dondurucu (-18), Elektromıknatis. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FT-IR) (Thermo), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDX) (JEOL JSM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), X- Işınları difratometre (XRD).

### 2.3. Yöntem

Bu çalışmada, nano boyuttaki partiküller sentezlenerek yüzeyleri; glioksal ile çeşitli teknikler kullanılarak kaplandı. Elde edilen nanopartiküller üzerine üreaz enzim molekülü Schiff bazı oluşturularak bağlandı. İmmobilize ve stabilize edilen üreaz enzimlerinde kontrole (standart) göre aktive tayinleri yapıldı. Çalışmada; FT-IR, TEM, XRD, SEM-EDX, spektroskopi analizleri yapıldı.

#### 2.3.1. Partikül sentezi

Nano boyut partiküllerin Demir II ve III'ün belirli miktarlarda (sırasıyla yaklaşık 5mmol; 9 mmol) kullanıldı. Sentezde yüksek ısı (90-100 derece), azot atmosferi ve mekanik karıştırıcı kullanıldı.

Reaksiyon sırasında sırasıyla 0,1M'lık ve 0,3M'lık NaOH eklenerek çökeltme sağlandı. Yıkama serisinden sonra (5x 5dk x pH:7 tampon) glioksal molekülleri bağlandı. Bağlamda, %25'lik 15mmol'luk glioksal çözeltisi kullanıldı. Mekanik karıştırma aşaması sonrası asetonla seri halde yıkandı (3x). Son olarak vakum altında kuruldu.

#### 2.3.2. Üreaz enzim immobilizasyonu

Bu aşamada glioksal ara kolları kullanılarak üreaz enzim moleküllerinin Schiff bazı bileşiği oluşturması sağlandı. Böylelikle, stabilizasyonu ve immobilizasyonu gerçekleştirildi. Glioksal kaplanmış partiküllerin 1mg'ı homojenizatörde homojen hale getirildi. Üzerine 150mg çözünmüş 10ml'lik pH:7 fosfat tamponunda hazırlanmış enzim çözeltisi eklendi. Ekleme sonrası rotatörde oda sıcaklığında 5 saat karıştırılarak süre sonunda manyetik alana maruz bırakıp dekante edildi. Yıkama serisinden geçirildi (5 x pH:7 fosfat tamponu). Aşamalar sonrası üretilen nanokompleksler, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 3 grup halinde (oda sıcaklığı, +4 ve 37°C) ve sırasıyla ilk iki örnek 6 gün, üçüncü örnek ise 3 gün oda sıcaklığında, 3 gün +4 °C'de bekletilip 1 saat 37 °C'de inkübasyon yapıldıktan sonra, standart olarak hazırlanan (2,5 mmol/L) örnekte, aktivite tayinleri yapıldı. Her grup 10 farklı seride tekrarlandı. Elde edilen absorbans değerleri: Örnek OD/ Std. OD X30 formülü ile hesaplandı.

#### 2.3.3. İstatistiksel analiz

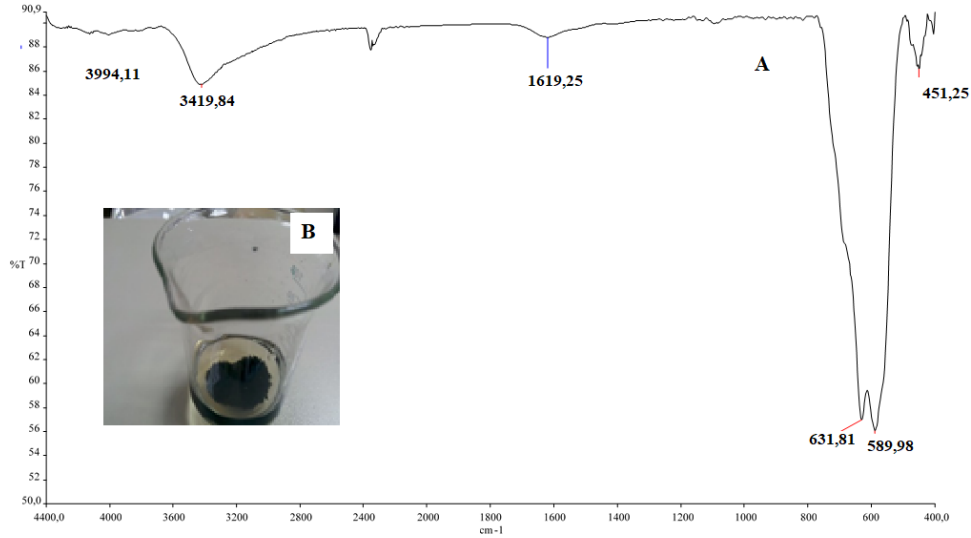
İstatistiksel analizde veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Normal dağılıma ve homojen varyansa sahip gruplarda iki yönlü ANOVA sonrasında ikili karşılaştırmalarda Tukey HSD testi kullanıldı.

## 3. Bulgular

FeSO<sub>4</sub> ve FeCl<sub>3</sub> tuzları ile siyah renkte elde edilen nano boyuttaki partiküllerin manyetik özellikleri ve FT-IR, SEM, TEM, XRD karakterizasyonları yapıldı. Sentezlenen partiküllerin manyetik özellikleri mıknatisla test edilmiştir. Ayrıca

elde edilen partiküllerin FT-IR analizleri yapıldı. Nano boyuttaki partiküllerin FT-IR spektrumu incelendiğinde  $3419,84 \text{ cm}^{-1}$  ve

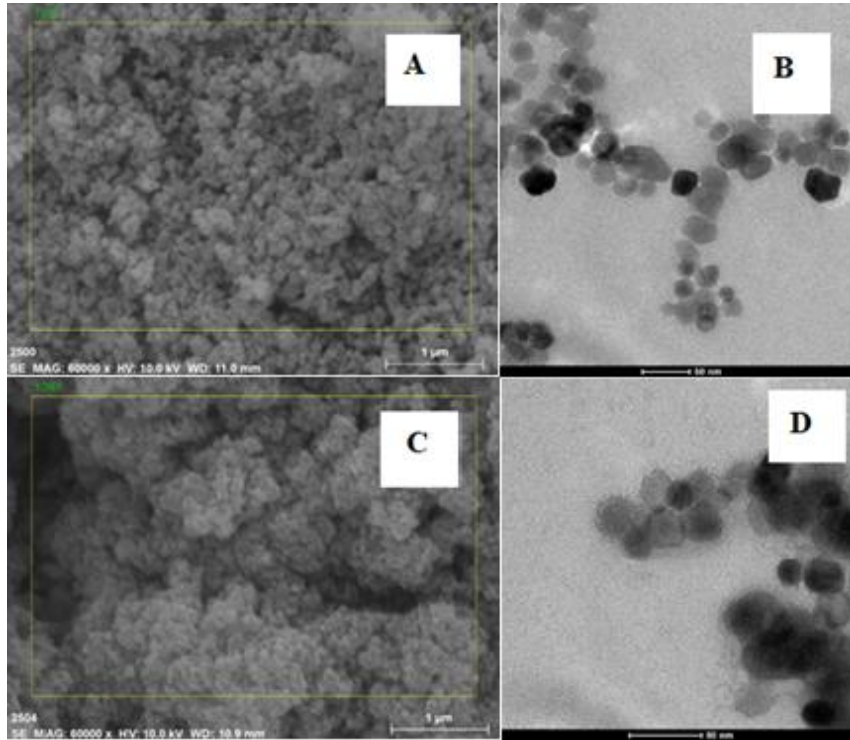
$589,98 \text{ cm}^{-1}$  iki karakteristik pik gözlenmiştir (Şekil 1A-B).



Şekil 1. A: Mıknatıs ile manyetik özelliklerin sunumu B: Partikül FT-IR analizi

SEM ve TEM görüntü ve boyut analizlerine göre tanecik boyutları  $50 \text{ nm}$  altında bulunmuştur. Ayrıca SEM görüntüleri de bunu desteklemektedir. SEM analiz sonuçları topaklanmanın az olduğunu

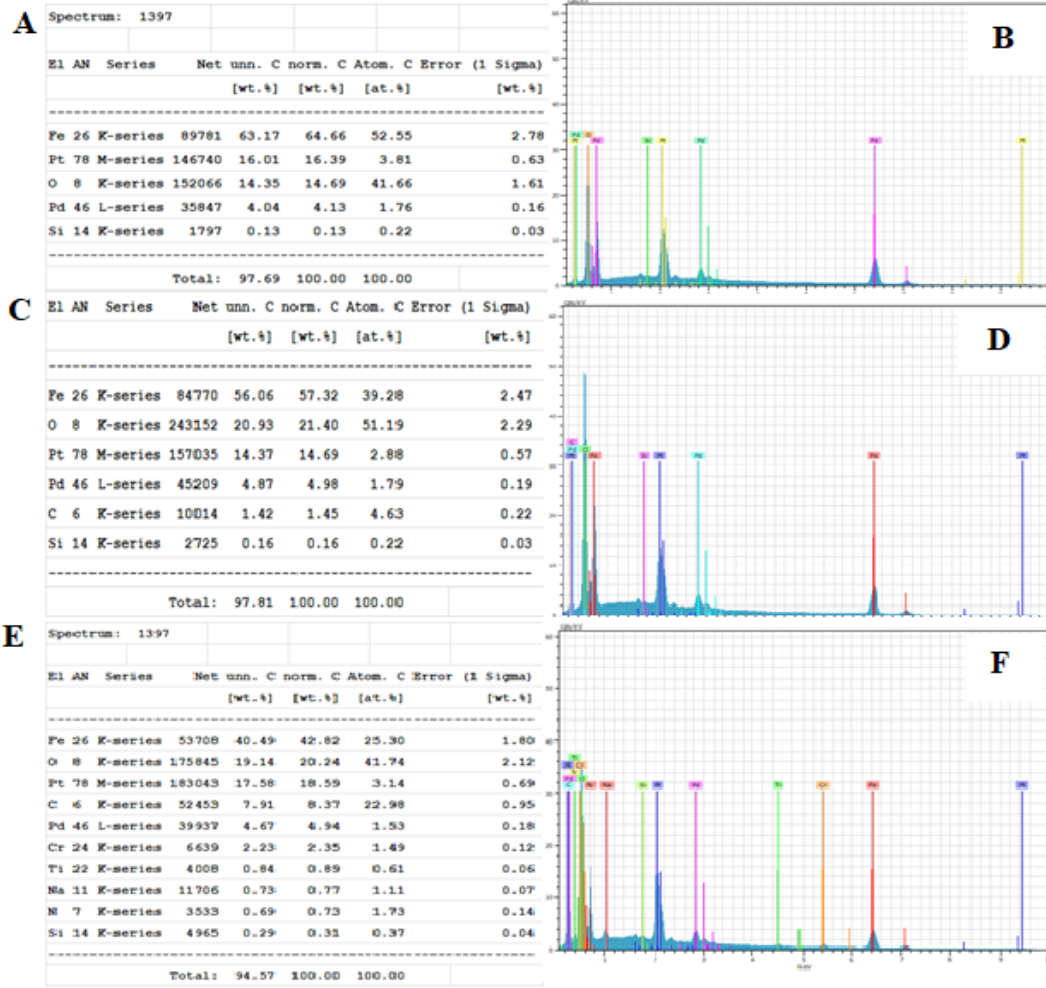
göstermiştir. TEM ve SEM görüntülerinde (immobilizasyon öncesi ve sonrası) boyutların küçük olduğu belirlenmiştir (sırasıyla  $<50 \text{ nm}$  ve  $<100 \text{ nm}$ ) (Şekil 2).



Şekil 2. İmmobilizasyon önce (A: SEM; B: TEM) ve sonrası (C: SEM; D: TEM) partikül görüntüleri.

Sentezlenen nano demir partiküllerinin kaplama öncesi yapılan EDX analizlerinde beklenildiği gibi demir ve oksijen yüzdeleri (Fe: 2,78 wt.%; O: 1,61 wt.%) yüksek çıkmıştır (Şekil 3A-B). Ayrıca, gliksal kaplama sonrası yapılan EDX analiz verileri karbon ve oksijen atom

varlığının attığını göstermiştir (sırasıyla, 0,22wt.%; 2,29 wt.%) (Şekil 3C-D). Gliksal kaplaması sonrası üreaz immobilizasyonu yapılan partikül EDX sonuçlarında karbon miktarının arttığı ve azot varlığı gözlenmiştir (sırasıyla, 0,95 wt.%; 0,14 wt.%) (Şekil 3E-F).



Şekil 3. EDX veri analiz sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. 3A-B: Gliksal molekülü bağlanmadan önce; 3C-D: Gliksal molekülü bağlandıktan sonra ve 3E-F: Üreaz enzim bağlanması sonrası

Partikül boyut analizleri için bağlama öncesi ve sonrası XRD analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarında bağlama öncesi boyut ortalamasının (23nm) Üreaz

enzimi bağlama sonrası ortalamasına göre (36nm) daha küçük olduğunu göstermiştir (Tablo 1).

**Tablo 1. A: İmmobilizasyon öncesi B: Sonrası XRD analizi**

A No.	2-theta(deg)	d (Å)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size
1	30.410(15)	2.9369(14)	301(22)	153(3)	0.390(13)	221(7)
2	35.744(7)	2.5100(5)	982(40)	526(4)	0.389(6)	224(3)
3	37.48(5)	2.398(3)	37(8)	13.6(19)	0.34(4)	261(32)
4	43.41(2)	2.0828(9)	213(19)	109(2)	0.361(17)	247(12)
5	53.81(3)	1.7022(10)	86(12)	46(2)	0.46(2)	204(11)
6	57.334(16)	1.6057(4)	245(20)	143(2)	0.478(12)	198(5)
7	62.957(15)	1.4751(3)	410(26)	224(3)	0.418(11)	233(6)
8	74.49(4)	1.2728(6)	66(10)	38(2)	0.43(5)	240(30)
B No.	2-theta(deg)	d (Å)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size
1	14.997(15)	5.902(6)	130(15)	50(3)	0.26(2)	320(28)
2	20.294(17)	4.372(4)	492(29)	229(6)	0.304(18)	277(16)
3	22.80(3)	3.897(5)	170(17)	53(5)	0.29(3)	289(27)
4	31.596(14)	2.8293(12)	345(24)	82(3)	0.202(12)	427(25)
5	32.525(8)	2.7506(7)	921(39)	284(5)	0.252(7)	343(9)
6	45.356(11)	1.9978(5)	217(19)	40(2)	0.164(12)	547(39)
7	46.770(19)	1.9407(7)	106(13)	31(2)	0.25(2)	359(32)
8	52.69(7)	1.736(2)	58(10)	34(3)	0.42(7)	221(37)
9	58.13(3)	1.5857(7)	145(16)	53(7)	0.30(2)	312(26)
10	75.18(3)	1.2628(4)	59(10)	20.1(15)	0.19(4)	552(128)
11	77.76(4)	1.2272(6)	34(8)	10.5(17)	0.29(5)	371(61)

Çalışmamızda glioksal molekülüyle çeşitli teknikler kullanılarak stabilize edilen üreaz enzim çözeltileri; Grup I-II-III (sırasıyla; oda sıcaklığı (25 °C), 4 ve 37 °C)

olmak üzere 3 gruba ayrıldı ve metotta belirtilen inkübasyonu sonrası aktivite çalışması yapıldı (absorbans değerleri Tablo 2).

**Tablo 2. Aktivite çalışması sonrası stabilize enzimin absorbans/sonuç değerleri (Grup I-II-III için)**

Group 1 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blank	0,04	0,04	0,04	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,04	0,041
Standard	0,048	0,049	0,05	0,05	0,051	0,053	0,052	0,052	0,051	0,053
Sample	0,044	0,045	0,045	0,046	0,046	0,047	0,046	0,046	0,045	0,047
UreN mg/dl	15	16,6	15	16,6	15	15	13,6	13,6	13,6	15
Result mmol/L	2,5	2,51	2,5	2,51	2,5	2,5	2,48	2,48	2,49	2,5
Group 2 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blank	0,04	0,039	0,04	0,042	0,042	0,04	0,038	0,041	0,042	0,042
Standard	0,048	0,048	0,048	0,054	0,055	0,05	0,052	0,05	0,048	0,055
Sample	0,044	0,044	0,044	0,048	0,049	0,045	0,044	0,046	0,045	0,049
UreN mg/dl	10,9	16,6	15	15	16,1	15	15	13,3	15	15
Result mmol/L	2,47	2,51	2,5	2,5	2,51	2,5	2,5	2,49	2,5	2,5
Group 3 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blank	0,042	0,042	0,04	0,04	0,041	0,042	0,042	0,048	0,04	0,041
Standard	0,055	0,054	0,048	0,049	0,053	0,54	0,053	0,054	0,049	0,053
Sample	0,049	0,048	0,044	0,045	0,047	0,048	0,047	0,042	0,045	0,047
UreN mg/dl	16	15	15	16,6	15	15	15	15	16,6	15
Result mmol/L	2,51	2,5	2,5	2,51	2,5	2,5	2,5	2,5	2,51	2,5

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı  $F(3,36) = 1,059$

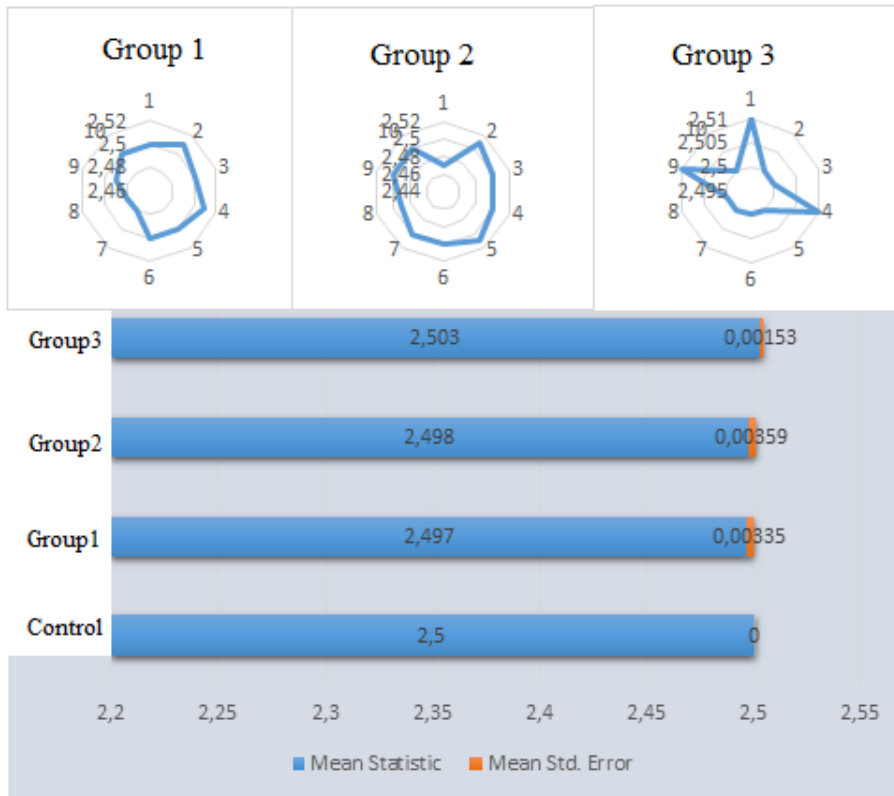
$p > 0,05$ . Birbirleriyle karşılaştırıldığında yine gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 3, 4 ve Şekil 4).

**Tablo 3.** Tanımlayıcı istatistiklerin analizi Urea-N (mmol/L)

Group	N	Minimum	Maximum	Mean±S.E
control	10	2,50	2,50	2,50
group1	10	2,48	2,51	2,50±0,003
group2	10	2,47	2,51	2,50±0,004
group3	10	2,50	2,51	2,50±0,002

**Tablo 4.** Gruplar arası karşılaştırma istatistik analizi

<u>Multiple Comparisons</u>				
<u>Tukey HSD</u>				
<u>(I) group</u>	<u>(J) group</u>	<u>Mean Difference (I-J)</u>	<u>Std. Error</u>	<u>Sig.</u>
<u>control</u>	<u>group1</u>	0,003	0,004	0,842
	<u>group2</u>	0,002	0,004	0,946
<u>group1</u>	<u>group2</u>	-0,001	0,004	0,993
	<u>group3</u>	-0,006	0,004	0,364
<u>group2</u>	<u>group3</u>	-0,005	0,004	0,523



**Şekil 4.** Grup ve gruplar arası veri sonuçlarının grafiksel sunumu

#### 4. Tartışma

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen moleküllerdir. Özgünlükleri sayesinde pek çok uygulama alanına sahiptir. Sanayide, deterjanlarda, kimyasal sentezlerde medikalde biyosensör olarak, polimeraz zincir reaksiyonlarında, proteomik analizlerde kullanılmaktadır. Ancak kısa ömürleri yüzünden kullanımları sınırlı kalmakta ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zor olmaktadır(Yener, 2007). Bunun çarpıcı örneklerinden biri, biyosensör geliştirme çabalarında engel olarak karşılaşılan enzim stabilizasyon eksikliği gösterilebilir(Aykut ve Temiz, 2006). Bu nedenle enzimlerin inaktivasyona karşı stabilizasyonu endüstriyel uygulamalar için zorunludur. Enzim inaktivasyonları; sıcaklık, pH, denatüre edici kimyasallar, oksijen, proteazların mevcudiyeti gibi birçok faktörün etkisi ile gerçekleşir. Stabilitenin artırılması enzim kayıplarını azaltarak, enzim preparatlarının işletmeye olan maliyetini düşürecektir. Günümüzde katkı maddeleri kullanımı; kimyasal modifikasyon ve protein mühendisliği enzim stabilizasyonunda sıkça kullanılan yöntemlerdendir. Bu çalışmada, glioksal molekülü kullanarak *in vitro* koşullarda model olarak vücut sıvılarından ürenin tayini amacıyla kullanılan üreaz enziminin stabilizasyon deneme çalışması yapıldı. FT-IR analiz sonuçlarımıza göre 3000-3300  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H titreşim pikleri gözlemlendi. Çalışmada manyetiklik özelliği mıknaıtis ile değerlendirildi ve sentezlenen partiküllerin manyetik olduğu belirlendi. Sentez sonrası yapılan XRD sonuçları bağlama öncesi partikül boyutlarının (23nm) bağlanma sonrası boyutlarına göre (36nm) daha küçük olduğu belirlendi. Bu durum partikülün yüzeyinde glioksal ve enzim immobilizasyonun göstergesiydi. Bağlama öncesi ve sonrası TEM ve SEM görüntüleri de bize bağlamanın gerçekleştiğini, XRD sonuçlarımızla uyumlu olarak boyutların bağlanma öncesi ve sonrasında 100nm

üzerine çıkmadığını gösterdi. Mikelashvili ve arkadaşlarının yapmış olduğu sitrik asit modifiye partikül sonuçları da bizimkine benzerdir. Elektrohidrolik deşarj sistemi ile hazırladıkları saf partiküllerin manyetik özellikte olduğu ve XRD boyut sonuçlarının 25-28nm aralığında olduğunu raporlamışlardır(Mikelashvili ve ark., 2023). Ayrıca bizim çalışmamıza benzer olarak partikül karakteristik piklerini göstermişlerdir (sırasıyla; (220), (311), (400), (422), (511) ve (440)).Tang ve arkadaşları demir partikül sentezinde yüzeyde OH gruplarının oluşumundan bahsetmişlerdir(Tang ve ark., 2011; Yasar ve ark., 2023). Bizim çalışmamızda 3000-3450  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H titreşiminin olduğu belirlendi. Ayrıca Fe-O gerilme piki 589,98  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. Bu sonuçlara benzer olarak 536  $\text{cm}^{-1}$ 'de karakteristik gerilme piki ve 3492  $\text{cm}^{-1}$ 'de OH pikinden bahseden çalışmalar mevcuttur(Mikelashvili ve ark., 2023; Pinheiro ve ark., 2013; Sahoo ve ark., 2005). TEM ve SEM görüntüleri partikül kaplama ve boyutlarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bizim çalışmamızda da kaplama ve boyut analizleri XRD, FT-IR, EDX analizlerin yanı sıra SEM ve TEM analizleri ile onaylandı ve literatürle benzerliği ortaya kondu(Javanbakht ve ark, 2016; Yasar ve ark., 2023). Sentezlediğimiz partiküllerin EDX analizleri incelendiğinde bağlama öncesi atom çeşit ve yüzdesi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular glioksal molekülü bağlama aşamasından sonra karbon atomu yüzdesinde artış olduğunu gösterdi. Bu durum glioksal moleküllerinin partikül yüzeyine bağlandığının göstergesiydi. Enzim bağlama sonrası alınan EDX analiz sonuçlarımızdaki karbon ve azot atomlarının yüzdesinin artması mevcut üreaz enzim moleküllerinden kaynaklandığını düşündürdü (histidin, lizin aminoasitleri gibi). EDX analiz sonuçlarındaki karbon ve azot atom varlığına atıfta bulunarak organik molekül bağlanabildiğini raporlayan literatür çalışmaları da bizim sonuçlarımıza



benzerdi. (Yasar ve ark., 2023). Çalışmamızda kararlılığın değerlendirilmesinde farklı sıcaklık şartlarında bekletilmiş üreaz-partikül komplekslerinin aktivitesi incelendi. 3 grup halinde (oda sıcaklığı, +4 ve 37°C) ve sırasıyla ilk iki örnek 6 gün, üçüncü örnek ise 3 gün oda sıcaklığında, 3 gün +4°C'de bekletilip 1 saat 37 °C'de inkübasyon yapıldıktan sonra, standart olarak hazırlanan (2,5 mmol/L) örnekte, aktivite tayinleri yapıldı. Her grup 10 farklı seride tekrarlanmış ve elde edilen absorbans değerleri ile aktivite çalışıldı. Bulgularımız her 3 grubunda hem kendi aralarında hem de kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı ve kararlılığın yüksek seviyede gerçekleşmiş olduğu yönündeydi. Literatürde bağlı ve immobilize üreaz çalışmalarında pH: sırasıyla 6.5- 7.5 arası optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığını sırasıyla 50-60°C olduğunu raporlamıştır (Çınar ve ark., 2017). Biz çalışmamızda optimum sıcaklıkların altında da immobilize olan enzimin aktivitesi değerlendirmeyi amaçladık. Sonuçlarımız kontrol grubuna göre daha düşük farklı sıcaklıklarda da immobilize ve serbest enzimlerin işlevlerini kaybetmediği göstermekteydi. Bu sonuçlar sıcaklık değişkenliğinde bile immobilize enzimin aktivitesini serbest üreaza göre koruduğunu gösterdi.

## 5. Sonuçlar

Sonuç olarak, Literatürde çoğunlukla immobilize üreaz enzimin optimum koşulları incelenmektedir (Alptekin, 2019). Bizim çalışmamızda ise optimum koşullardan sadece sıcaklık parametresinin düşürülmesi ve bu sınırların altındaki sıcaklık değişikliklerinde aktivitesini değerlendirmektir. Böylelikle depolama kararlılığında, raf ömründe ve biyoreaktör kullanımlarındaki avantajı göstermekti. Sonuçlarımız, değişken sıcaklıklarda depolanan ve daha sonra farklı sıcaklıklarda değişim gösteren şartlarda dahi

(gruplarımız) immobilize üreazın aktivitesini istatistiksel olarak serbest üreaz aktivitesine benzer olabildiği yönündedir.

## Yazarların Katkı Beyanı

Yazarlar makaleye eşit katkıda bulduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Finansman

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TYD-2015-3765.

## Kaynaklar

- Alptekin, Ö. 2019. Üreazın modifiye edilmiş florisile kovalent immobilizasyonu ve serbest ve immobilize üreazın karakterizasyonu. *Cukurova Medical Journal*, 44(3): 811-818.
- Amani, A., Kalajahi, S.T., Yazdian, F., Mirzababaei, S., Rashedi, H., Faramarzi, M.A., Vahidi, M. 2022. Immobilization of urease enzyme on chitosan/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers. *Biotechnol Prog*, 38(5): e3282.
- Aykut, U., Temiz, H. 2006. Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(51): 51-52.
- Berhe, M. G., Gebreslassie, Y.T. 2023. Biomedical Applications of Biosynthesized Nickel Oxide Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 18: 4229-4251.
- Çınar, E., Ercan, S., Güleşçi, N. 2017. Lewatit partikülüne üreaz enziminin immobilizasyonu. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 7(2/2): 124-136.

- Della-Flora, I.K., de Andrade, C.J. 2023. Biosynthesis of metallic nanoparticles by bacterial cell-free extract. *Nanoscale*.
- Illeova, V., Polakovic, M., Stefuca, V., Acai, P., Juma, M. 2003. Experimental modelling of thermal inactivation of urease. *Journal of Biotechnology*, 105(3): 235-243.
- Javanbakht, T., Laurent, S., Stanicki, D., Wilkinson, K.J. 2016. Relating the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) to their bactericidal effect towards a biofilm of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 11(4): e0154445.
- Kafarski, P., Talma, M. 2018. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 13: 101-112.
- Mikelashvili, V., Kekutia, S., Markhulia, J., Saneblidze, L., Maisuradze, N., Kriechbaum, M., Almásy, L. 2023. Synthesis and Characterization of Citric Acid-Modified Iron Oxide Nanoparticles Prepared with Electrohydraulic Discharge Treatment. *Materials*, 16(2): 746.
- Ozbek, O., Berkel, C., Isildak, O., Isildak, I. 2022. Potentiometric urea biosensors. *Clin Chim Acta*, 524: 154-163.
- Pinheiro, P.C., Daniel-da-Silva, A.L., Tavares, D.S., Calatayud, M.P., Goya, G.F., Trindade, T. 2013. Fluorescent magnetic bioprobes by surface modification of magnetite nanoparticles. *Materials*, 6(8): 3213-3225.
- Sahoo, Y., Goodarzi, A., Swihart, M.T., Ohulchanskyy, T.Y., Kaur, N., Furlani, E.P., Prasad, P. N. 2005. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9): 3879-3885.
- Sepehri, S., Khedmati, M. 2023. An overview of the privileged synthetic heterocycles as urease enzyme inhibitors: Structure-activity relationship. *Arch Pharm (Weinheim)*: e2300252.
- Singh, S., Rai, N., Tiwari, H., Gupta, P., Verma, A., Kumar, R., Kailashiya, V., Salvi, P., Gautam, V. 2023. Recent Advancements in the Formulation of Nanomaterials-Based Nanozymes, Their Catalytic Activity, and Biomedical Applications. *ACS Appl Bio Mater*.
- Tang, T., Fan, H., Ai, S., Han, R., Qiu, Y. 2011. Hemoglobin (Hb) immobilized on amino-modified magnetic nanoparticles for the catalytic removal of bisphenol A. *Chemosphere*, 83(3): 255-264.
- Ulusal, F., Özdemir, N. 2023. İlaç Taşımaya Yönelik Yeni Mezogözenekli Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanotüplerin Sentezi ve Karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 1353-1368.
- Ulusal, H., Ulusal, F., Bozdayı, M.A., Güzel, B., Taysı, S., Tarakçıoğlu, M. 2022. Attachment of Idarubicin to Glutaraldehyde-coated Magnetic Nanoparticle and Investigation of its Effect in HL-60 Cell Line. *International Journal of Chemistry and Technology*, 6(2): 154-163.
- Yasar, U., Ulusal, F., Yılıgör Huri, P., Güzel, B., Dikmen, N. 2023. Development of biomaterial-based oxygen transportation vehicles for circulation within blood. *Journal of King Saud University-Science*, 35(5).
- Yener, F. 2007. Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

---

**Atf Şekli:** Yasar, Ü., Ulusal, F., Yılgör Huri, P., Güzel, B., Dikmen, N., 2023. Glioksal Molekölü ile Partikül Yüzeyine İmmobilize Üreaz Enziminin Depo Kararlılığına etkisi. *MAS Uygulamalı Bilimler Dergisi*, 8(Özel Sayı): 872–882.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10001636>.

**To Cite:** Yasar, Ü., Ulusal, F., Yılgör Huri, P., Güzel, B., Dikmen, N., 2023. Effect of Urease Enzyme Immobilized to Particle Surface with Glyoxal Molecule on Storage Stability. *MAS Journal of Applied Sciences*, 8(Special Issue): 872–882.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10001636>.

---