



**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Sentetik ve Doğal Polimerik Gözenekli Yapılara**  
**Enzim İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları**

**DOKTORA TEZİ**

**ŞAHİN DEMİRCİ**

**Tez Danışmanı**  
**PROF. DR. NURETTİN ŞAHİNER**

**ÇANAKKALE – 2021**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**Sentetik ve Doğal Polimerik Gözenekli Yapılara  
Enzim İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları**

DOKTORA TEZİ

ŞAHİN DEMİRCİ

Tez Danışmanı

PROF. DR. NURETTİN ŞAHİNER

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri  
Komisyonu kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2020-3437

ÇANAKKALE – 2021



T.C.  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



Şahin DEMİRCİ tarafından Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER yönetiminde hazırlanan ve 27/07/2021 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Sentetik ve Doğal Polimerik Gözenekli Yapılara Enzim İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER  
(Danışman)

.....

Prof. Dr. Selhattin YILMAZ

.....

Prof. Dr. Erdener KARADAĞ

.....

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

.....

Prof. Dr. Coşkun SILAN

.....

Tez No : .....

Tez Savunma Tarihi : 27/07/2021

.....

Prof. Dr. Pelin KANTEN  
Enstitü Müdürü

.././20..

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Şahin DEMİRCİ

08/07/2021

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, maddi ve manevi olarak her zaman destek olan, bu tez çalışmasının her aşamasını planlayan, derin bilgi birikimi, deneyim ve bilimsel bakış açısıyla bana yol gösteren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER'e,

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle birlikte göğüsleyen başta annem Sevinç DEMİRCİ, babam Őenel DEMİRCİ ve kardeşim Arda DEMİRCİ olmak üzere bütün aileme,

Deneysel çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mehtap ŞAHİNER ve Dr. Öğr. Üyesi Selin SAęBAŐ SUNER başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu araştırmaya YK 100/2000 Doktora ncelik Alan programına “Biyoteknoloji” alanı ve Çanakkale Onsekiz Mart niversitesi bünyesinde yer alan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine FDK-2020-3437 no’lu projesi ile finansal destek olması nedeniyle,

sonsuz teőekkürlerimi sunarım...

Şahin DEMİRCİ  
anakkale, Temmuz 2021

## ÖZET

### SENTETİK VE DOĞAL POLİMERİK GÖZENEKLİ YAPILARA ENZİM İMMOBİLİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Şahin DEMİRCİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER

27/07/2021, 138

Bu tez çalışması kapsamında, enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere sentetik p(HEMA), p(AAm), p(AMPS), p(APTMACl), p(Amfoter) ve PEI kriyojelleri ile doğal polimer olan CMC ve Dekstran dan kriyojeller hazırlanmıştır. Süper makro gözenekli bu kriyojellerin sentezi için kullanılan bileşenler ile birlikte  $\alpha$ -glikosidaz ( $\alpha$ -Glu) ve Üreaz enzim çözeltileri değişik miktarlarda eklenerek gözenekler içerisine immobilize edilmiştir. İçerisine enzim yerleştirilmiş (enzim@kriyojel) kriyojellerin karakterizasyonu SEM, FT-IR ve TGA cihazları ile yapılmıştır. Hazırlanan enzim@kriyojel sistemlerinde immobilizasyon verimleri %80'in üzerinde bulunmuştur. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için en yüksek aktivitenin gözlemlendiği optimum koşullar 37 °C ve pH 6,8 iken aynı sıcaklıkta  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri için pH 6,8,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri için pH 8,0 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) kriyojelleri için pH 5,0'da %90'ın üzerinde aktivite gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemleri için ise pH 5,0-9,0 aralığındaki tüm değerlerde %70'ten yüksek aktivite gözlenmiştir. Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin, pH 5,0-9,0 ve 15-45 °C sıcaklık aralığında, serbest enzimin optimum koşulları (pH 7,0, 37 °C) dışında, serbest enzime göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Üreaz enzimi immobilize edilmiş CMC ve Dekstran kriyojelleri %90'nın üzerinde immobilizasyon verimine sahip olmalarına rağmen serbest Üreaz enzimine göre daha düşük aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Buna rağmen bu kriyojeller tekrar kullanım ve depolama çalışmalarında serbest enzime göre daha yüksek kararlılık göstermiştir. Tez kapsamında hazırlanan enzim@kriyojel sistemlerinin serbest enzime kıyasla en az 10 kez yüksek aktivite ile kullanılabilmesi ve kriyojel içerisinde immobilizasyonun enzimlerin saklama sürelerini oldukça arttırdığı belirlenmiştir. Michaelis-Menten kinetik parametreleri, lineer ve non-

lineer Lineweaver-Burk denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Hazırlanan enzim@kriyojel sistemlerinin serbest enzimlere göre daha yüksek  $K_m$  değerleri hesaplanması, substratın enzim için afinitelerinin azaldığını göstermiştir. Bununla beraber, rozmarinik asit çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen enzim deaktivasyon çalışmalarında serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemleri benzer davranışlar göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyojel, enzim immobilizasyonu, hapsedme tekniği, enzim@kriyojel, enzimatik reaksiyon, biyoteknoloji



## ABSTRACT

### ENZYME IMMOBILIZATION INTO SYNTHETIC AND NATURAL POLYMERIC POROUS STRUCTURES AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Sahin DEMIRCI

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Nurettin SAHINER

07/27/2021, 138

Within the scope of this thesis, synthetic p(HEMA), p(AAm), p(AMPS), p(APTMACl), p(Amphoter) and PEI cryogels and CMC and Dextran as natural polymeric cryogels were prepared for use in enzyme immobilization. Together with the components used in synthesis of these super macroporous cryogels, different amounts of  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -Glu) and Urease enzyme solutions were added into reaction and immobilized within the pores of cryogels. The characterization of the enzyme-embedded (enzyme@cryogel) cryogels was performed via SEM, FT-IR and TGA devices. Immobilization yields of the enzyme@cryogel systems were found to be over 80%. The optimum conditions of free  $\alpha$ -Glu where the highest enzyme activity is found to be at 37 °C, and pH 6.8, and at the same temperature the optimum pHs for  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) and  $\alpha$ -Glu@p(AAm) cryogels was observed at 6.8 whereas more than 90% activity was observed at pH 8.0 for  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) cryogels and at pH 5.0 for  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) cryogels. For  $\alpha$ -Glu@p(Amphoter) cryogel systems, higher than 70% activity was observed at all pHs in 5.0-9.0 range. Urease@PEI cryogel systems at pH 5.0-9.0 and temperature 15-45 °C ranges were shown higher activities with respect to the free enzyme except for the optimum conditions of the free enzyme (pH 7.0, 37 °C). Additionally, even though more than 90% urease immobilization efficiency was observed for CMC and Dextran cryogels, a lower activity compared to that of the free enzyme was determined. Nevertheless, these cryogels showed higher stability than the free enzyme in reuse and storage studies. It was established that the

enzyme@cryogel systems in comparison to the free enzyme can be used at least 10 times sequentially with higher activities and the immobilization of enzyme within the cryogels considerably increases storage time of enzymes for extended time durations. Michaelis-Menten kinetic parameters were calculated using linear and non-linear Lineweaver-Burk equations. Accordingly, the prepared enzyme@cryogel systems exhibited decreased substrate affinities as higher  $K_m$  values were calculated than free enzymes. Besides, free  $\alpha$ -Glu and  $\alpha$ -Glu@cryogel systems showed similar inhibition trend in the enzyme deactivation studies using rosmarinic acid solution as deactivator.

**Keywords:** Cryogel, enzyme immobilization, entrapment technique, enzyme @cryogel, enzymatic reaction, biotechnology

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

1

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

4

2.1. Hidrojellerin özel bir türü “Kriyojeller”.....	4
2.2. Enzimlerin genel özellikleri .....	5
2.2.1. $\alpha$ -Glu enzimi.....	6
2.2.1. Üreaz enzimi.....	7
2.3. Enzim immobilizasyon teknikleri.....	7
2.3.1. Adsorpsiyon tekniği.....	8
2.3.2. Kovalent bağlanma tekniği.....	9
2.3.3. Çapraz bağlanma tekniği.....	10
2.3.4. Enkapsülasyon tekniği.....	10
2.3.5. Hapsetme tekniği.....	11
2.4. Literatürde enzim immobilize edilmiş sistemler .....	11

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM  
MATERYAL YÖNTEM

15

3.1. Kullanılan malzemeler.....	15
3.2. Süper makro gözenekli kriyojel ve enzim immobilize edilmiş kriyojel yapılarının sentezi.....	16
3.2.1. Sentetik kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin sentezi.....	16
P(HEMA) ve $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojelleri.....	16
P(AAm) ve $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri.....	17
P(AMPS) ve $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri.....	18
P(APTMAcI) ve $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojelleri.....	19
P(Amfoter) ve $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri.....	21
P(NIPAM) ve $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri.....	22
PEI ve Üreaz@PEI kriyojellerinin sentezi.....	23
3.2.2. Doğal polimer kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin sentezi.....	24
CMC ve Üreaz@CMC kriyojellerinin sentezi.....	24
Dekstran ve Üreaz@Dekstran kriyojellerinin sentezi.....	25
3.3. Karakterizasyon.....	25
3.4. Enzimatik reaksiyonlar.....	27
3.4.1 Serbest ve immobilize $\alpha$ -Glu'nun enzimatik reaksiyonu .....	27
3.4.2 Serbest ve immobilize Üreaz enziminin enzimatik reaksiyonu.....	28
3.5. İmmobilizasyonu parametrelerinin hesaplanması.....	29
3.5.1 Enzim sızıntısı.....	29
3.5.2 İmmobilizasyon verimi.....	30
3.5.3 İmmobilizasyon etkinliği.....	30
3.6. Enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik reaksiyon optimizasyon çalışmaları.....	30
3.7. Kinetik parametreler.....	31
3.8. Enzim immobilize edilmiş kriyojel sistemlerin tekrar kullanım çalışmaları.....	32
3.9. Enzim immobilize edilmiş kriyojel sistemlerin saklama süreleri ilgili çalışmalar.	32
3.10 $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivite çalışmaları.....	32

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM  
ARAŞTIRMA BULGULARI

34

4.1. Kriyojel ve enzim@kriyojel yapılarının sentezi.....	34
4.2. Kriyojel ve enzim@kriyojel yapılarının karakterizasyonları.....	37
4.2.1. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin şişme, gözenek hacmi, gözeneklilik ve jel verimi.....	37
4.2.2. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin SEM görüntüleri.....	39
4.2.3. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR analizleri.....	40
4.2.4. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA analizleri.....	45
4.3. Enzim@kriyojel sistemleri için immobilizasyon parametreleri.....	51
4.4. Serbest ve immobilize edilmiş enzim sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	62
4.4.1. $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	62
$\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	62
$\alpha$ -Glu@p(AAm), $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	67
$\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	73
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	77
4.4.2. Üreaz enzimi immobilize edilmiş kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	82
Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	82
Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	87
Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi.....	91
4.5. Immobilize edilmiş enzim sistemlerinin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları.....	95
4.6. Immobilize edilmiş enzim sistemlerinin saklama süresi çalışmaları.....	102
4.7. Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	111

4.8.  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivasyon çalışmaları..... 115

BEŞİNCİ BÖLÜM  
SONUÇ ve ÖNERİLER 118

KAYNAKÇA ..... 122

ÖZGEÇMİŐ ..... I



## SİMGELER VE KISALTMALAR

P(HEMA)	Poli(N-Hidroksil etilmetakrilat)
P(AAm)	Poli(Akrilamit)
P(AMPS)	Poli(2-akrilamido-1-metil propan sülfonik asit)
P(APTMACl)	Poli(3-akrilamido propil trimetil amonyum klorür)
P(NIPAM)	Poli(N-İzopropil akrilamit)
PEI	Poli(etilenimin)
CMC	Karboksimetil selüloz
$\alpha$ -Glu	Alfa-Glikozidaz
4-NPG	4-Nitrofenil-a-D-glukopiranozid
4-NP	4-Nitrofenol
$K_m$	Michaelis-Menten sabiti
$V_{max}$	Maksimum reaksiyon hızı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi ışıklı spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik analiz
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
mL	Mililitre
mg	Miligram
Unit	Enzim aktivite birimi
nm	Nanometre
mM	Milimolar
dk	Dakika

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Enzim içermeyen kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verim değerlerinin karşılaştırılması	38
<b>Tablo 2</b>	$\alpha$ -Glu@kriyojel sistemleri için hesaplanan %immobilizasyon verimi ve %immobilizasyon etkinliği değerlerinin karşılaştırılması	58
<b>Tablo 3</b>	Üreaz@kriyojel sistemleri için hesaplanan %immobilizasyon verimi ve %immobilizasyon etkinliği değerlerinin karşılaştırılması	61
<b>Tablo 4</b>	Enzim@kriyojel sistemleri için hesaplanan kinetik parameterelerin karşılaştırılması	112

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	(a) $\alpha$ -Glu ve (b) Üreaz enzimlerinin kristal yapıları [(Benini vd., 2013; Caputo vd., 2016)].	6
Şekil 2	İmmobilizasyon teknikleri ve şematik gösterimleri.	8
Şekil 3	$\alpha$ -Glu enziminin katalizlediği 4-NPG'nin 4-NP ve glikoza parçalanması reaksiyonu.	27
Şekil 4	Üreaz enziminin katalizlediği ürenin amonyak ve karbondioksite dönüştürülmesi reaksiyonu.	28
Şekil 5	Hazırlanan kriyojellerin polimerlerinin kimyasal yapıları.	35
Şekil 6	Süper makro gözenekli enzim@kriyojel sistemlerinin hazırlanışının şematik gösterimi.	36
Şekil 7	Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin SEM görüntüleri.	40
Şekil 8	(a) p(HEMA), (b) p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.	41
Şekil 9	(a) p(Amfoter) ve (b) p(NIPAM) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.	42
Şekil 10	(a) PEI, (b) CMC ve (c) Dekstran kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.	44
Şekil 11	(a) P(HEMA), (b) p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.	46
Şekil 12	(a) p(Amfoter) ve (b) p(NIPAM) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.	48
Şekil 13	(a) PEI, (b) CMC ve (c) Dekstran kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.	50
Şekil 14	(a) $\alpha$ -Glu@p(HEMA) ve (b) $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	52
Şekil 15	(a) $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve (b) $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)), 5 mL	53

	pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMACl)), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	
<b>Şekil 16</b>	Şekil 16. (a) $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve (b) $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	55
<b>Şekil 17</b>	(a) Üreaz@p(PEI), (b) Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	56
<b>Şekil 18</b>	Değişik miktarlarda enzim içeren $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin ve eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	63
<b>Şekil 19</b>	$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojellerinin ve eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) inkübasyon süresi, (b) sıcaklık ve (c) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].	65
<b>Şekil 20</b>	Değişik miktarlarda enzim içeren $\alpha$ -Glu@p(AAm), $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	68
<b>Şekil 21</b>	$\alpha$ -Glu@p(AAm)-1, $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve $\alpha$ -Glu@p(APTMACl)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli süre, (b) %aktivite üzerinde sıcaklık ve (c) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].	70
<b>Şekil 22</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) değişik miktarlarda enzim içeren $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (c) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	74
<b>Şekil 23</b>	$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojelleri ile eşit miktarlarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].	76

<b>Şekil 24</b>	Değişik miktarlarda enzim içeren $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	78
<b>Şekil 25</b>	(a) P(NIPAM) ve $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları, (b) $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde sıcaklık, (c) 25 °C ve (d) 37 °C reaksiyon sıcaklığında pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C (Sıcaklık); 25 ve 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].	80
<b>Şekil 26</b>	Normal PEI kriyojel sentez koşullarında sentezlenen Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin eşit miktardaki serbest enzim ile (a) aktivite ve (b) %aktivite karşılaştırılmaları, (c) serbest Üreaz enziminin ve Üreaz@PEI kriyojel sisteminin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (d) enzim için optimum saklama koşulları olan pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içinde hazırlanmış olan, değişik miktarlarda enzim içeren Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin aktivite ve (e) %aktivite karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	84
<b>Şekil 27</b>	Üreaz@PEI-3 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 25 °C (pH), 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	86
<b>Şekil 28</b>	(a) Üreaz@CMC ve eşit miktardaki serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) Üreaz@CMC kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	88
<b>Şekil 29</b>	Üreaz@CMC kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	90
<b>Şekil 30</b>	(a) Üreaz@Dekstran ve serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) Üreaz@Dekstran kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	92

<b>Şekil 31</b>	Üreaz@Dekstran kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	94
<b>Şekil 32</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve (b) $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi ve serbest $\alpha$ -Glu enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	96
<b>Şekil 33</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve (b) $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin tekrar kullanılabilirliğinin karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1), 5 mL pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	97
<b>Şekil 34</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliğinin eşit miktarda serbest enzim ile karşılaştırılması, (b) $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin 25 °C ve (c) 37 °C çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirlikleri. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C ( $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)); 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu 25 ve 37 °C ( $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)), 0,5 mL 10 mM substrat].	99
<b>Şekil 35</b>	(a) Üreaz@PEI ve (b) Üreaz@CMC ile Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi ve serbest Üreaz enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].	101
<b>Şekil 36</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve (b) $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin saklama sürelerinin incelenmesi ve serbest $\alpha$ -Glu enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat, 25 °C depolama sıcaklığı].	103
<b>Şekil 37</b>	(a) $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve (b) $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin saklama sürelerinin karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1), 5 mL pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].	104
<b>Şekil 38</b>	$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerinin (a) -20 °C, (b) +4 °C ve (c) +25 °C saklama sıcaklıklarında aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin serbest enzim ile karşılaştırılması [Çalışma	106

koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

- Şekil 39** Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin -20 °C’de saklanan (a) 25 °C, (b) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon, (c) +4 °C’de saklanan ve 25 °C’deki, (d) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon, (e) +25 °C’de saklanan 25 °C’deki, (f) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon ile saklama sürelerinin karşılaştırılması [Reaksiyon koşulu: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 0,5 mL 10 mM substrat]. 108
- Şekil 40** Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin (a) -20 °C ve (b) +25 °C sıcaklıklardaki saklama sürelerinin incelenmesi ve serbest Üreaz enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP]. 110
- Şekil 41** (a)  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için deneysel olarak elde edilen [S] karşı  $V$  grafiğinin teorik olarak lineer ve non-lineer Lineweaver-Burk denklemlerinden hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin teorik verilerle karşılaştırılması. 114
- Şekil 42** (a) Rosmarinik asit molekülünün kimyasal yapısı ve (b) serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ile  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivasyonu ile ilgili çalışmalar [Çalışma koşulları: 4 mL tampon çözelti, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat, 1 mL RA çözeltisi] 116

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Enzimler kimyasal tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttıran protein yapısında biyokatalizörlerdir. Belirli biyolojik ve kimyasal reaksiyonların verimliliği ve hızını arttırmaları, stereo ve enantiyo-seçicilikleri ile substratlarına spesifik olmaları, yüksek ürün saflıkları, çevre dostu olmaları ve ılıman reaksiyon koşullarında aktif olmaları gibi benzersiz özelliklerinden ötürü enzimlerin kullanım alanları oldukça geniştir (Homaei vd., 2013; Illanes vd., 2012; Pera vd., 2015). Buna rağmen enzimlerin karmaşık yapılarından dolayı üretim ve saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması, doğal olmayan veya ekstrem koşullarda düşük dayanıklılık ve aktiviteye sahip olmaları, yüksek substrat konsantrasyonlarında ve/veya ürün konsantrasyonlarında kolayca deaktive olmaları gibi dezavantajları endüstriyel kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Cacicedo vd., 2019; Moehlenbrock ve Minter, 2017). Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için kararlı kılıcı katkı maddelerinin kullanılması (Pooni vd., 2019), kimyasal modifikasyonlar (Krishnamurthy vd., 2018), termofilik organizmalardan enzimlerin seçilmesi (Ribeiro vd., 2017) ve çeşitli immobilizasyon teknikleri gibi yöntemler geliştirilmiştir (Kurayama vd., 2020; Sharifi vd., 2020). Bu teknikler içerisinde katalizörlerin uzun ömürlü olması, ekstrem koşullarında bile yüksek enzimatik aktivite sağlaması, ekonomik olarak uygulanabilir ve çevre dostu olmasından dolayı en sık araştırılan yöntemlerden birisi enzim immobilizasyonudur (Moehlenbrock ve Minter, 2017; Tran ve Balkus, 2011). Genel olarak, enzim immobilizasyonu adsorpsiyon (Askaripour vd., 2020), kovalent bağlama vd., 2020), çapraz bağlama (Fernandez-Lopez vd., 2017), enkapsülasyon (Song vd., 2019) ve hapsetme (Kumar vd., 2017) olarak bilinen 5 temel teknikle gerçekleştirilmektedir. En uygun immobilizasyon yöntemini seçmek için enzimin immobilizasyon koşullarına toleransı (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet vb.), enzimler üzerindeki yüzey fonksiyonel grupları, enzimin boyutu, enzimin polaritesi ve substrat/ürün taşınımı gibi çok önemli faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir (Hanefeld vd., 2009; Moehlenbrock ve Minter, 2017). İmmobilize enzimlerin avantajları, reaksiyon ortamından kolayca çıkarılması, olası yeniden kullanılabilirliği, temiz bir ürün elde edilmesi, pH, sıcaklık, çözücü, kirletici ve safsızlıklara karşı enzim dayanıklılığının artırılması gibi önemli özelliklerin kazandırılmasıdır (Kharisov ve Eldin, 2018). Literatürde enzim immobilizasyon tekniklerinin bazı dezavantajlara sahip

oldukları rapor edilmiştir (Homaei vd., 2013). Adsorpsiyon tekniğinde adsorplanan yüzeyden enzimin kolayca salınması, enkapsülasyon tekniğinde ise kapsülleyici malzemelerin kolay dağıldığı gibi önemli sorunlar mevcuttur. Bunların dışında enzimlerin katı yüzeylere kovalent olarak bağlanması ve enzimlerin birbirine çapraz bağlanma tekniklerinde ise enzimler aktif bölgelerinden de bağlanabilecekleri için enzim aktivitelerini kaybederek deaktive oldukları gösterilmiştir (Homaei vd., 2013). Bunların yanı sıra hapsetme tekniği olarak bilinen immobilizasyon yönteminde diğer teknikler kadar önemli dezavantajlar göstermediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Homaei vd., 2013).

Kriyojeller, normal hidrojellere kıyasla yüksek mekanik dayanıklılık ve esneklik gibi üstün özellikler sağlayan, çapraz bağlı birbirleri ile bağlantılı süper makro gözenekli hidrojellerdir (Lozinsky ve Okay, 2014; Sahiner ve Seven, 2014). Kriyojeller, kriyojel öncülleri (monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve hızlandırıcı) içeren çözeltinin donma noktasının altındaki sıcaklıklarda sentezlenir. Reaksiyon koşulları altında oluşan buz kristalleri, boyutları birkaç mikrometreden birkaç yüz mikrometreye kadar değişebilen birbirine bağlı süper gözenekli yapılar oluşturur (Karacan ve Okay, 2013; Lozinsky, 2008). Normal hidrojeller ile karşılaştırıldığında, kriyojeller yüksek elastikiyet, mekanik dayanım ve hızlı tepki verme gibi üstün özelliklere sahiptir (Bereli vd., 2010; Sahiner ve Yildiz, 2014). Kriyojeller, metal nanopartiküllerin (Dmitriy, 2020; Seven ve Sahiner, 2014a), iletken polimerlerin sentezinde (Sahiner ve Demirci, 2016) ve grafen oksitli kompozitlerin hazırlanmasında (Klongklaew vd., 2018; Sahiner vd., 2018) ve hatta biyolojik moleküllerin de immobilizasyonunda (Lozinsky vd., 2003) yaygın olarak kullanılmaktadır. Kriyojellerin bu avantajlarından dolayı enzim immobilizasyonu için oldukça elverişli malzemeler olduğu düşünülmektedir (Busto vd., 2007; Das-Bradoo vd., 2004; Efremenko vd., 2016; Hedström vd., 2008).

Yapılan tez çalışması kapsamında, enzim immobilizasyonu nötral p(HEMA) ve p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), hem anyonik hem de katyonik fonksiyonel gruplar içeren p(AMPS-ko-APTMAcI) (p(Amfoter)), sıcaklık duyarlı p(NIPAM), dallanmış zincir yapısındaki katyonik PEI ve hatta doğal polimer CMC ile Dekstrandan sentezlenen kriyojeller içine gerçekleştirilerek, destek malzemelerinin enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Hazırlanan kriyojellere sentez sırasında hapsetme

metodu ile  $\alpha$ -Glu ve Üreaz enzimleri immobilize edilerek enzimlerin farklı sıcaklık ve pH koşullarındaki aktiviteleri araştırılmıştır. Hazırlanan kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin karakterizasyonu için %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve jel verimi hesaplamaları, SEM, FT-IR ve TGA analizleri yapılmıştır. Ayrıca, enzim@kriyojel sistemlerinin immobilizasyon verimi ve immobilizasyon etkinlik değerleri malzemelerin farklı kimyasal tepkimelerde aktivitelerinin belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi çalışmalarında,  $\alpha$ -Glu enzimi için 4-Nitrofenil-  $\alpha$ -D-glukopiranozid (4-NPG), Üreaz enzimi için üre substratları kullanılarak belirlenmiş olan optimum çalışma koşullarında serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin üzerine reaksiyon sıcaklığının (15-60 °C) ve pH değerlerinin (pH 4,0-9,0) etkisi incelenmiştir. Enzim@kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirlikleri ve saklama süreleri araştırılmış ve serbest enzimler ile karşılaştırılmıştır. Enzimatik reaksiyonlar için önemli Michaelis-Menten kinetik parametreleri olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri lineer ve non-lineer Lineweaver-Burk denklemlerinden hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ayrıca,  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivasyonları rosmarinik asit molekülü varlığında incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Hidrojellerin özel bir türü “Kriyojeller”

Gözenekli yapılar, gözenek boyutlarına göre 4'e ayrılırlar. Bunlar sırasıyla <2 nm gözenek boyutlarına sahip mikro-gözenekli yapılar, 2-50 nm gözenek boyutuna sahip mezo-gözenekli yapılar, 50 nm-1µm gözenek boyuna sahip makro-gözenekli yapılar ve >1µm gözenek boyutuna sahip süper makro-gözenekli yapılardır (Hollister, 2005). Süper gözenekliğe sahip yapılardan bir tanesi de kriyojellerdir. Kriyojeller, normal hidrojellerin kriyojenik şartlarda (kullanılan çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklar) hazırlanmasıyla oluşan, birbirleri ile bağlantılı süper makro-gözeneklere sahip olan, hidrojellerin özel bir türüdür (Lozinsky ve Okay, 2014; Sahiner ve Seven, 2014). Kriyojenik şartlar terimi ise, polimerizasyon ve çapraz bağlanma reaksiyonlarının çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklarda gerçekleşmesi koşulu için kullanılmaktadır (Pattavarakorn vd., 2013). Kısaca, çoğunluğunu çözücünün oluşturduğu monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve hızlandırıcı içeren çözelti, örneğin çözücü eğer su ise donma noktası altındaki sıcaklıklarda (genelde -20 °C) polimerizasyon ve çapraz bağlanma reaksiyonları ile gerçekleştirilir (Chu ve Rutt, 1997). Bu sıcaklıklarda buza dönüşen su molekülleri katı faza geçerken, monomer, çapraz bağlayıcı, hızlandırıcı ve başlatıcının derişimi artar ve oluşan buz kristalleri etrafında aynı anda polimerleşme ve çapraz bağlanma reaksiyonları ilerler. Hazırlanan çapraz bağlı kriyojel, oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve süper makro gözenekli kriyojeller sentezlenmiş olur (Lozinsky ve Okay, 2014). Kriyojellerin gözenek boyutları ve gözenek duvar kalınlıkları kullanılan suyun, monomerin, çapraz bağlayıcının ve başlatıcının oranına göre ayarlanabilir (Karacan ve Okay, 2013). Kriyojellerin mekanik dayanımları, elastikiyetleri ve dışarıdan gelen etkiye tepki verme hızları birbiri ile bağlantılı süper gözenekli yapıları sayesinde normal hidrojellere göre çok daha iyidir ve bu sebeple son zamanlarda birçok uygulama alanı bulmuşlardır (Dainiak vd., 2010). Kriyojeller bu özellikleri sayesinde ayırma ve saflaştırma (Sahiner ve Demirci, 2016), doku mühendisliği (Arvidsson vd., 2003; Bloch vd., 2010), çevre uygulamaları (Sahiner vd., 2015a), sensör/biyosensör uygulamaları (Ertürk ve Mattiasson, 2014) ve hatta katalitik çalışmalarda (Sahiner vd., 2015b) bile yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

## 2.2. Enzimlerin genel özellikleri

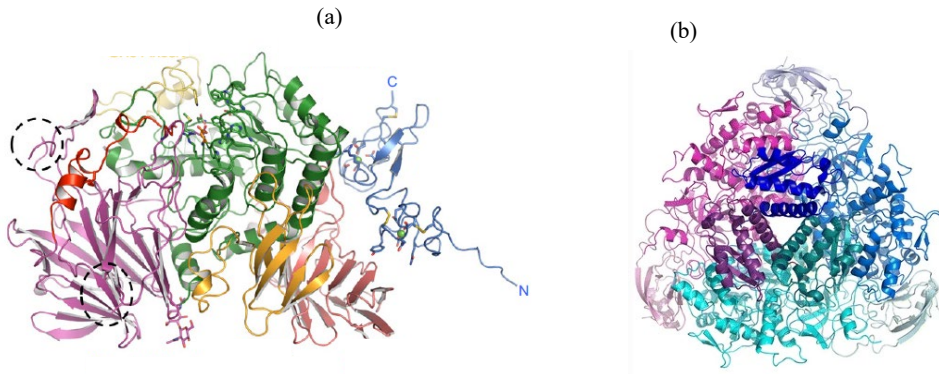
Enzimler, RNAse hariç biyokimyasal reaksiyonları katalize edebilen aktif proteinlerdir (Patel vd., 2017). Bunlar hem sentez hem de canlı organizmalar tarafından parçalanma reaksiyonları için gerekli olan biyomoleküllerdir. Tüm canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonlar, substrat denen spesifik bir bileşiği daha yüksek reaksiyon hızında ürünlere dönüştürme kabiliyetine sahip olan biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından yürütülür. Enzimler aktivasyon enerjisini ( $E_a$ ) düşürerek reaksiyon hızını kimyasal katalizörler gibi arttırmasına ilaveten oldukça seçicilerdir. Çoğu enzimatik reaksiyonun hızı, katalizlenmemiş reaksiyondan milyonlarca kat daha hızlıdır. Yüzlerce yıl sürebilecek olan dönüşümleri dakikalar hatta saniyeler içinde gerçekleştirebilirler (Dalby, 2003; Otten ve Quax, 2005). Enzimlerin canlılarda yaklaşık 4000 biyokimyasal reaksiyonu katalize ettiği rapor edilmiştir (Bairoch, 2000).

Enzimler, ılıman koşullarda yüksek verim ve seçiciliği olan biyolojik ve yeşil katalizörlerdir (Sheldon ve van Pelt, 2013) ve enzimler tarafından katalize edilen biyolojik reaksiyonlar, kimyasal ürünlere uyarlanması için güçlü bir araç olarak düşünülmektedir (Sheldon, 2007). Enzimin katalizör olarak kullanıldığı reaksiyonlarda yan ürün oluşumu ya çok azdır ya da hiç gözlenmemektedir. Enzimlerin katalitik etkinliği kimyasal katalizörlere göre çok daha fazladır, reaksiyonlar ılıman şartlarda gerçekleşir, enzimler doğal katalizör olduklarından çevreye zararlı değildirler, daha az basamaklı tepkimeler gerçekleşir, kimyasal seçicilik gösterirler, doğal substratlar ile sınırlı değildirler ve organik bileşiklere de uygulanabilirler (Sheldon, 2007). Buna rağmen doğal konformasyonunu kaybetme, deaktivasyon, kararsızlık, yeniden kullanılmama ve serbest formdaki enzimin reaksiyon ortamından uzaklaştırılmaması (Wu vd., 2013) gibi olumsuzluklar mevcuttur. Karmaşık ve spesifik kimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimlerin, daha yaygın bir şekilde kullanılması için malzeme bilimcileri ve mühendisler birçok yöntem aramaktadır.

### 2.2.1. $\alpha$ -Glu enzimi

$\alpha$ -Glikosidaz enziminin (EC 3.2.1.20) üç boyutlu yapısı **Şekil 1 (a)**'da verilmiştir.  $\alpha$ -Glu enzimi aril (veya alkil)-glikozitler, disakkaritler veya oligosakkaritlerden  $\alpha$ -1,4-bağlı glikoz kalıntılarının hidrolizini katalize eder (Terra ve Ferreira, 2005) ve orta bağırsak ile küçük dokuların fırçalı yüzeylerinde bulunur (Cristofolletti vd., 2003; Terra ve Ferreira, 2005).

Literatürde immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimleri ile birçok sistem bildirilmiştir (Cheng vd., 2019; Liu vd., 2017; Odaci vd., 2010; Prodanović vd., 2006; Qiu vd., 2020; Xiong vd., 2016). Prodanović ve arkadaşları çözücü sistemlerde immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enziminin dayanıklılığını ve aktivitesini karşılaştırmıştır (Prodanović vd., 2006). Ayrıca, farklı immobilize  $\alpha$ -Glu enzim sistemleri kullanılarak çeşitli enzim deaktivasyon ajanlarının etkisi araştırılmıştır (Cheng vd., 2019; Liu vd., 2017; Qiu vd., 2020; Xiong vd., 2016). Ayrıca,  $\alpha$ -Glu ve piranoz oksidaz enzimleri birlikte immobilize edilerek, maltoz molekülleri için bir biyosensör olarak kullanılmıştır (Odaci vd., 2010).



Şekil 1. (a)  $\alpha$ -Glu ve (b) Üreaz enzimlerinin kristal yapıları. (Benini vd., 2013; Caputo vd., 2016).

### 2.2.2. Üreaz enzimi

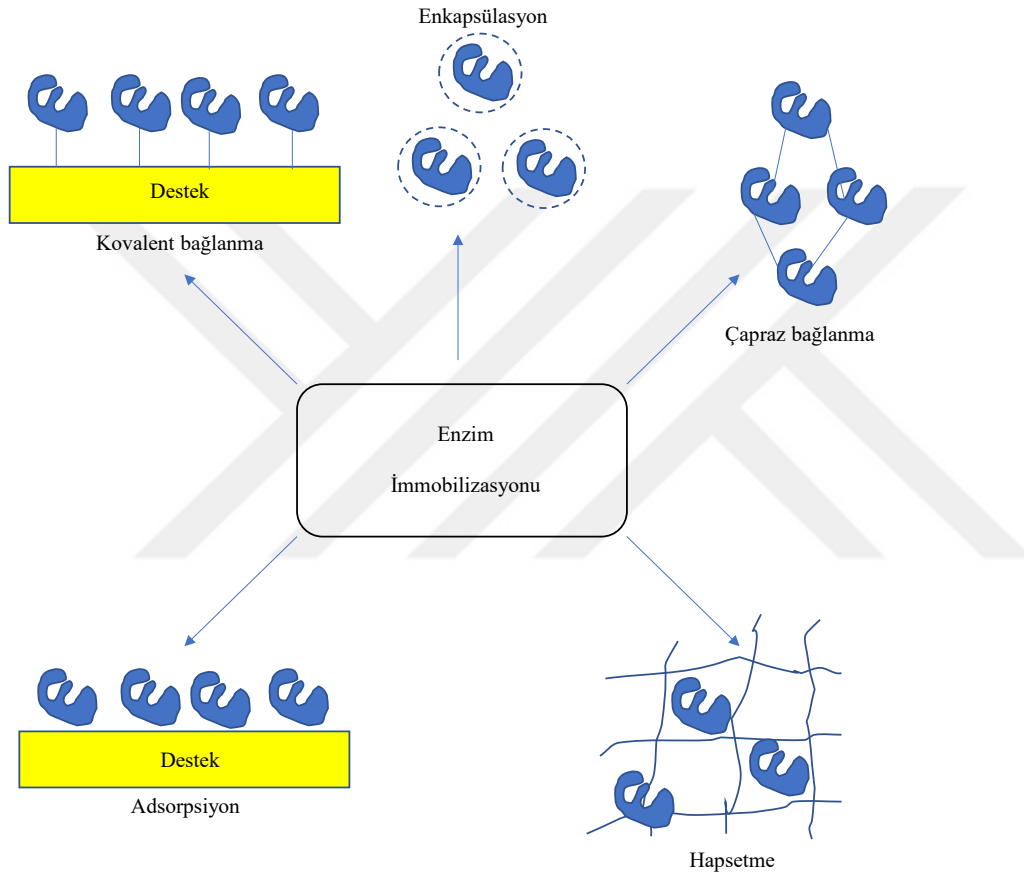
Üreaz enziminin (EC 3.5.1.5) üç boyutlu yapısı **Şekil 1 (b)**'de verilmiştir. Üreaz enzimi ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini katalizleyen yaklaşık 480 kDa molekül ağırlığında hidrolaz sınıfı bir enzimdir (Dixon vd., 1975). Üreaz enziminin bitki, mantar ve bakterileri kapsayan geniş bir organizma çeşitliliğinden elde edilebildiği rapor edilmiştir (Adetunji vd., 2017; Kappaun vd., 2018; Morris, 2002).

Üreaz enziminin esas substratı üre olmasına rağmen, enzim daha zayıf olarak asetamid, formamid, N-metilüre, semikarbazit ve hidroksiüre gibi farklı substratların hidrolizini de katalizleyebilmektedir (Dixon vd., 1980). Üreaz enzimi en çok bitki, mantar ve bakterilerde bulunur. Ayrıca zirai gübrelemede ürenin hidrolizini hızlandırmada önemli rol oynarken, insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olabilir (Kafarski ve Talma, 2018). Üreaz enzimi, biyolojik sıvılarda ürenin miktarının hesaplanmasında, yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında, atık sulardaki ürenin temizlenmesinde, gıda endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılmaktadır (Pundir vd., 2019).

### 2.3. Enzim immobilizasyon teknikleri

İmmobilizasyon terimi, biyolojik olarak aktif moleküllerin bir reaktör veya analitik sistem içinde sabitlenmesi, hareketsizleştirilmesi veya bağlanması demektir (Reis vd., 2019). İmmobilize kompleks, katı desteğin fiziksel ve kimyasal karakteristiklerini gösterirken, serbest biyolojik molekülün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir (Nisha vd., 2012). İmmobilize enzim ise “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgede fiziksel veya kimyasal olarak hareketsizleştirilmesi ve bağlanması” olarak adlandırılabilir. İmmobilizasyon teknikleri, enzim kararlılığının sürdürülmesi, daha büyük katalitik yüzeylerin sağlanması ve pahalı enzimlerin tekrar kullanılmasına olanak sağlamak için oldukça önemlidir (Sheldon, 2007; Tischer ve Wedekind, 1999). Ayrıca immobilizasyon tekniği, enzimlerin katalitik aktivitelerinin daha uzun süreler korunmasına imkan sağlayabilmektedir (Sheldon ve Brady, 2019). Bu nedenle, uygun taşıyıcı ve immobilizasyon

yönteminin seçimi, immobilize edilmiş enzim biyokatalizörünün istenilen bir aktivitesini ve çalışma koşullarını kolaylaştırmak için önemli noktalar. Genel olarak, biyokatalizörlerin bir destek üzerine immobilizasyonunun şematik gösterimleri **Şekil 2**'de verilen adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama, enkapsülasyon ve hapsetme ile gerçekleştirilir (Mateo vd., 2007; Mohamad vd., 2015).



Şekil 2. Immobilizasyon teknikleri ve şematik gösterimleri.

### 2.3.1. Adsorpsiyon tekniği

Adsorpsiyon tekniği ile destek yüzeyine enzim immobilizasyonu, immobilizasyon teknikleri arasındaki en basit yöntemlerden biridir. Adsorpsiyon tekniğinde etkili olan kuvvetler, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlara dayanmaktadır (Sassolas vd., 2012). Adsorpsiyon ile immobilizasyon; 1. Fiziksel

adsorpsiyon, 2. Elektrostatik etkileşim, 3. Hidrofobik adsorpsiyon olmak üzere 3 temel teknikle yapılır (Nguyen ve Kim, 2017). Enzim çözünür ve katı destek enzim aktivitesini sürdüren uygun koşullar altında sabit bir süre boyunca enzim çözeltisi ile temas halinde olacak şekilde yerleştirilir. Adsorplanmamış enzim molekülleri daha sonra tamponla yıkanarak yüzeyden uzaklaştırılır. Adsorpsiyon tekniği ile immobilizasyon, reaktif içermeyen, düşük maliyetli ve desteğin herhangi bir fonksiyonlaştırılmasını içermediği için genellikle enzim aktivitesine zarar vermeyen basit ve ekonomik bir işlemdir. Buna rağmen, bu teknikte enzimler desteğe zayıf fiziksel etkileşimler ile gevşek bir şekilde bağlıdır. Bu nedenle ortamdaki sıcaklık, pH veya iyonik kuvvetteki değişiklikler enzim desorpsiyonuna neden olan birçok dezavantajlar içerir (Mohamad vd., 2015). Ayrıca, zayıf çalışma ve düşük saklama süresine sahip olması da önemli bir dezavantajdır.

### **2.3.2. Kovalent bağlama tekniği**

Kovalent bağlama tekniği ile enzim immobilizasyonu, enzim molekülleri üzerindeki fonksiyonel gruplar ve destek matriksi arasında kovalent bağlanma ile oluşturulan ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Destek ile kovalent bir bağın kurulabileceği enzim üzerinde bulunan fonksiyonel grup, genellikle lizin ( $\epsilon$ -amino grubu), sistein (tiyol grubu), glutamik ve aspartik asit (karboksilik grup) yan zincirleri, enzimatik aktivite için gerekli olmamalıdır. Kovalent bağlama tekniğinde yaygın şekilde kullanılan fonksiyonel gruplar: Amin, karboksilik asit, hidroksil, tiyol gibi gruplardır (Setford ve Newman, 2005). Enzimin katı desteğe bağlanma prosedürü genellikle; 1) glutaraldehit veya karbodiimid gibi bağlayıcı moleküller kullanılarak yüzeyin aktivasyonu, 2) aktive edilmiş desteğe enzimin kovalent bağlanması ile iki aşamadan gerçekleşir (Nguyen ve Kim, 2017). Gluteraldehit veya karbodiimid gibi yaygın kullanılan bağlayıcı moleküller, kovalent bağ yoluyla yüzey ve enzim arasında köprü görevi gören çok işlevli reaktiflerdir. Kovalent bağlama tekniği, enzimler ve destek matriksi arasında güçlü bağlar sağlar ve bu nedenle destekten çok az enzim sızıntısı meydana gelebilir. Kovalent bağlanma esnasında, çoğu enzimin fonksiyonel gruba sahip olmak için kimyasal modifikasyonlardan geçmesi gerektiğinden, enzim denatürasyonu riski yüksektir. Ayrıca, yöntem yüksek hacimde biyoreaktif gerektirir, ancak yalnızca gram matriks başına ~0,02 gram gibi küçük miktarlarda enzim immobilize edilebilir (Trevan, 1988).

### 2.3.3. Çapraz bağlama tekniği

Çapraz bağlama tekniği ile enzim immobilizasyonu, enzim molekülleri arasında kovalent bağlarla moleküller arası çapraz bağların oluşmasıyla gerçekleştirilen geri dönüşü olmayan bir yöntemdir. İşlem, enzim moleküllerini üç boyutlu çapraz bağlı k meli yapılara dönüştürmek için bağlayıcı görevi gören çok işlevli bir reaktifin yardımıyla gerçekleşir (Nguyen ve Kim, 2017). İmmobilize enzim, reaksiyon karışımında bulunur ve herhangi bir desteğe bağlı değildir. Çapraz bağlama immobilizasyonunda çapraz bağlama enzim topakları (CLEA) ve çapraz bağlama enzim kristalleri (CLEC) kullanımı olmak üzere iki yaklaşım vardır. Çapraz bağlama ile immobilizasyon, enzimlerin güçlü kimyasal bağlarla bağlanmasına dayanan basit bir yöntemdir, bu nedenle enzim sızıntısı minimumdur. Yöntemin bir başka avantajı, dayanıklılığı artırmaya yardımcı olan yüzey tamamlayıcılığı yoluyla uygun kararlı kılıcı ajanlar kullanarak ortamı enzim için ayarlama olasılığıdır (Mateo vd., 2004). Bununla birlikte, çapraz bağlayıcı kullanımı ciddi enzim modifikasyonlarına neden olabilir ve enzimde konformasyonel değişikliklere ve aktivite kaybına yol açabilir. Bu nedenle, jelatin, sığır serum albümini (BSA) gibi inert proteinler, enzimlerin bu şiddetli modifikasyonunu en aza indirmek için immobilizasyon işlemi sırasında eklenebilir (Sheldon vd., 2005).

### 2.3.4. Enkapsülasyon tekniği

Enkapsülasyon tekniği ile immobilizasyon, enzimlerin yarı geçirgen zar biçimleri içine sarılmasıyla gerçekleştirilir (Ariga vd, 1993; Grosov  vd., 2008). Yüksek molekül ağırlıklı proteinler veya enzimler kapsülden dışarı çıkmaz veya kapsül içine giremez, ancak k k substratlar ve ürünler yarı geçirgen zardan serbestçe geçebilir. Çapları 10-100  m aralığında olan mikrokapsüller oluşturmak için naylon ve selüloz nitrat gibi çok sayıda malzeme kullanılmıştır. Bu tekniğin en büyük dezavantajlarından birisi difüzyon problemidir (Lalonde ve Margolin, 2008; Tamer vd., 2016).

### 2.3.5. Hapsetme tekniği

Hapsetme tekniği ile immobilizasyonda enzim doğrudan destek yzeyine bağlanmaz, yalnızca substrat ve rrenlerin geğişine izin veren ve sadece enzimi tutan bir polimerik ađ içinde tutulur. Bu nedenle enzim difzyonu kısıtlanır. Hapsetme tekniği ile immobilizasyon; 1) enzimin bir monomer veya polimer zozeltisine (kriyojel nccl zozeltisi) karıştırılması, ardından 2) kriyojel nccl zozeltisinin bir kimyasal reaksiyon veya değişen deneysel koşullarla kriyojelasyonu olmak zere iki aşamada gerçekteşir (Nguyen ve Kim, 2017). Bir enzim, bir polimer orgu ağı içinde fiziksel olarak sınırlandırıldığından, enzim ile taşıyıcı polimer kimyasal olarak etkileşime girmez. Bzylece yntem, enzim dayanıklılığını iyileştirebilir ve enzim sızıntısını ve denatürasyonunu en aza indirger. Yntemin bir baška avantajı, kullanılan matriksin optimal pH, polarite veya amfifilikliğe sahip olacak şekilde sečilerek, enzim iin optimum kataliz koşulları sağlanabilir. Bunların dıőında, hapsetme tekniğinde polimerizasyon srresinin uzaması jel matris kalınlığını arttırma eğilimindedir. Bzylece substrat, enzimin aktif bzlgesine ulaşmak iin jel matrisinin derinliklerine yayılmakta zorlanması bu yntemin en önemli dezavantajıdır (Nguyen ve Kim, 2017).

### 2.4. Literatürde enzim immobilize edilmiş sistemler

Literatürde immobilize edilmiő enzimler; stereospesifik veya bzlge spesifik reaksiyonlar ile yararlı bileşiklerin rzetimi, biyoteknolojik iőlemler ile enerji rzetimi, zevresel problemlerin zozzümünde kirliliklerin sečilimli artıtılması, zezitli bileşiklerin yzsek duyarlılıkta ve spesifiklikte analizi, yeni ilaıların veya yapay organların rzetimi gibi birzok uygulamada kullanılmıőtır (Ertürk ve Mattiasson, 2014). Literatürde enzim immobilizasyonu iin; manyetik polistren boncuklar (J. Wang vd., 2014) ve aktif kzmür (Rani vd., 2000) zzerine fiziksel adsorpsiyon, glutraldehit ile aktiveleştirilmiő jelatin (Tanriseven ve Olzer, 2008) ve manyetik nanopartikzller zzerine kovalent bağlama (Gupta vd., 2013), alginat (Svensson ve Ottesen, 1981) ve LentiKats® (Rebros vd., 2006) iine hapsetme gibi yntemler ve aynı amaılar iin deđiőik matriksler kullanılmıőtır. Bazı destek malzemelerinin kullanılması sonucu, srrekli reaksiyonlarda akıő hızlarının dűőme eğiliminde olması ve basını zűőüşlerinin meydana gelmesi, bu malzemelerin verimliliğinin

çok az olması ve boyut kontrolünün zor olması gibi bazı dezavantajlar oluşturmuştur (Rebroš vd., 2006). Bu malzemelerin gözeneksiz yapılar olmalarından dolayı kan gibi viskoz sıvıların içerisinde kullanım potansiyelleri yoktur. Bu yüzden gözenekli yapıda membran, monolit ve kriyojel formunda yeni nesil polimerik malzemeler geliştirilerek bu malzemeler ile bu sorunların üstesinden gelmeye büyük ilgi gösterilmiştir (Ma ve Ramakrishna, 2008; Thoemmes ve Kula, 1995). Son zamanlarda kriyojeller, ayırma ve saflaştırma, biyomedikal ve biyokatalizör uygulamalarda kullanım potansiyelleri yüksek yeni matriksler olarak kabul edilmiştir (Tennikova ve Reusch, 2005). Makro gözenekli yapıdaki kriyojeller, çok yüksek akışta kullanılabilir ve geleneksel boncuk bazlı malzemelerin aksine viskoz sıvılarda basınç yükselmelerine neden olmazlar (Arvidsson vd., 2003; Lozinsky, 2002; Lozinsky vd., 2003; Tennikova ve Reusch, 2005).

Kriyojellerin enzim immobilizasyonunda, diğer destek malzemelerine göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (Aktaş Uygun vd., 2015; Efremenko vd., 2016; Petrov vd., 2011; Sahoo vd., 2013; Sheldon, 2007). Kriyojellerin makro gözenekli yapısı substratın matrikse kolayca yayılmasını sağlar ve süper makro gözeneklerinin içinde çok miktarda bağlanmış su içerdiği için hem sulu hem de sulu olmayan koşullarda enzimatik reaksiyonların ilerleyebilmesi için uygun ortam yaratabilmektedir (Belokon vd., 2000; Martínez vd., 2013).

*Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi, glisidil metakrilat (GMA) ile fonksiyonelleştirilmiş poliakrilamid-alginat (PAG) kriyojeli üzerinde immobilize edilmiştir (Yavaşer ve Karagözler, 2021). Lakkaz enzimi kovalent bağlama tekniği ile immobilize edilmiş ve immobilizasyon sonunda  $68,7 \pm 1,45$  mg/g enzim immobilize edildiği hesaplanmıştır. Lakkaz enziminin PAG kriyojellerine immobilizasyonu sonucu sıcaklık değişimine karşı direnci artarken, depolanma dayanıklılığı ve tekrar kullanılabilirliğinin konusunda serbest enzimden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Yavaşer ve Karagözler, 2021).

Bir başka çalışmada hazırlanan p(HEMA)/MOF/Au kompozit kriyojelleri içerisinde tripsin enzimi immobilize edilmiş ve sistem, serbest tripsin enzimine göre geniş sıcaklık (25–65 °C) ve pH (6,0–10,0) aralığında daha yüksek aktivite göstermiştir (Zhao vd., 2019).

Yüksek aktivite ile 8 kez tekrar kullanılabilirlik sağlayan tripsin immobilize edilmiş kriyojel, 4 hafta depolama sonunda bile %80'den fazla aktivite göstermiştir (Zhao vd., 2019).

Grafen içeren kitosan gözenekli kriyojel platformu üzerinde ürikaz'ın immobilize edilmesi ile hazırlanan sistem ürik asit için amperometrik bir sensör olarak kullanılmıştır (Jirakunakorn vd., 2020). Hazırlanan sistem  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $S/N = 3$ ) belirleme limiti ile  $0,0025$  ve  $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$  arasında doğrusal bir aralık göstermiştir. Hazırlanan enzim immobilize edilmiş kriyojel sistemi 175 defa tekrar kullanımı sağlayan mükemmel bir dayanıklılığı sağlamıştır (Jirakunakorn vd., 2020).

Poli(metil metakrilat-glisidil metakrilat) (Poli(MMA-GMA)) kriyojeller, radikal kriyopolimerizasyon tekniği ile sentezlenmiş epoksi kimyası kullanılarak amiloglukozidazın kriyojel yüzeyine immobilizasyonu için kullanılmıştır (Uygun vd., 2015). Sistemin pH ve sıcaklık profilleri incelendiğinde ve immobilizasyon ile enzimin optimum pH değerinin (pH 5,0) değişmediği, immobilizasyondan sonra enzimin optimum sıcaklığının  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  daha sıcak bölgeye kaydığı tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize amiloglukozidazın saklama ve operasyonel kararlılıklarının serbest enzime göre çok daha iyi olduğu gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada, p(AAm) kriyojel üzerine peroksidaz immobilizasyonu yapılmış ve bu enzim modifiyeli kriyojellerin fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için kullanılabilirliği araştırılmıştır (Akpınar vd., 2020). Hazırlanan p(AAm) kriyojellerine kovalent bağlama tekniği ile peroksidaz enzimi immobilize edilmiştir. P(AAm) kriyojeline maksimum peroksidaz yüklemesi  $127,3 \text{ mg/g}$  kriyojel olarak bulunmuştur. Son olarak, peroksidaz immobilize edilmiş p(AAm) kriyojelinin fenolik bileşikleri uzaklaştırma etkinliği, fenol, bisfenol A, guaiakol, pirogallol ve katekol gibi model fenolikler için incelenmiş ve çok yüksek fenolik giderim verimi gözlenmiştir (Akpınar vd., 2020).

N,N'-metilenbisakrilamid çapraz bağlı 2-hidroksietil metakrilat ve glutaraldehit çapraz bağlı kitosan'ın kriyojelasyonu ile elde edilen iç içe geçen bir ağ üzerine papain enzimi immobilize edilmiştir (Yavaşer ve Karagözler, 2020). Kovalent bağlama tekniği ile kriyojel üzerine immobilize edilen papain miktarı  $15,2 \pm 2,5 \text{ mg/g}$  kriyojel olarak

hesaplanmış ve yeniden kullanılabilirlik ve saklama süreleri yönünden serbest papain enzimine göre dayanıklılığın arttığı gözlenmiştir. Papain enzimi immobilize edilmiş kriyojel sisteminin etkinliği, enzimin endüstriyel bir kullanımı olarak elma suyu berraklaştırma çalışması ile gösterilmiştir (Yavaşer ve Karagözler, 2020).

Farklı miktarlarda glisidil metakrilat içeren poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) (poli(HEMA-GMA)) kriyojellerinin içine katalaz enzimi adsorpsiyon tekniği ile immobilize edilmiş ve  $298,7 \pm 9,9$  mg/g katalaz adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir (Erol vd., 2019). İmmobilize enzimin  $V_{max}$  değeri serbest enzime göre 4 kat azalırken,  $K_m$  değerlerinin karşılaştırılması durumunda immobilize enzimin substrata afinitesi 1,94 kat artmıştır (Erol vd., 2019).

Bir başka çalışmada, konkanavalin A (Con A)-bağlı poli(etilen glikol dimetakrilat) [poli(EGDMA)] kriyojelleri inülinazın immobilizasyonu için kullanılmıştır (Altunbaş vd., 2013). İmmobilizasyon adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve sistemin sürekli sistemlerde yüksek fruktozlu şurubun hazırlanması için etkili bir şekilde kullanılabildiği rapor edilmiştir.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan malzemeler

Bu tez kapsamında sentetik kriyojellerin sentezi için monomer olarak 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA, %99, Sigma-Aldrich), akrilamid (AAm, %98, Acros), 2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit sodyum tuzu (AMPS, suda %50, Sigma-Aldrich) ve 3-akrilamidopropiltrimetil amonyum klorür (APTMACl, 75 suda %, Sigma-Aldrich), N-izopropilakrilamid (%98, Sigma Aldrich) monomerler olarak, N,N'-Metilenbisakrilamid (MBA, %99, Acros) çapraz bağlayıcı olarak, potasyum persülfat (KPS, %99, Sigma-Aldrich) başlatıcı olarak ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED, %98 Acros) hızlandırıcı olarak kullanılmıştır. Bunların yanı sıra dallanmış zincir yapısındaki polietilenimin (PEI, suda ağırlıkça %50 çözelti, Mn:1800, d:1.08, Sigma Aldrich) ve gliserol diglisidil eter (GDE, ≤ %100, Sigma Aldrich) PEI kriyojellerinin sentezinde kullanılmıştır. Doğal polimerler olan karboksimetil selüloz sodyum tuzu (CMC, Mw~250.000, substitüsyon derecesi: 1,2, Aldrich) ve dekstran (*Leuconostoc spp*'den, 15-25 kg/mol<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich) kriyojellerinin sentezi için divinil sülfon (DVS, %98, Merck) çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen  $\alpha$ -Glikozidaz enzimi ( $\alpha$ -Glu, 100 Birim/mg protein, Sigma Aldrich) ve Üreaz enzimi (Jack Beans'den, Fisher Chemical) kriyojel içerisine immobilize edilecek model enzimler olarak kullanılmıştır. Serbest ve immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu ve Üreaz enzimleri için substrat olarak sırasıyla 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (p-NPG, %99, Acros) ve üre (%99, Merck) kullanılmıştır. Yine kullanılan  $\alpha$ -Glu ve Üreaz enzimleri için sırasıyla L-Glutatyon (%98, Aldrich) ve bovin serum albumin (liyofilize edilmiş toz, %96, Sigma Aldrich) kofaktör olarak kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanması için potasyum fosfat monobazik (%98-100,5, Sigma Aldrich), sodyum fosfat monobazik (%99, Sigma Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH, %99,9, VWR Chemicals) ve hidroklorik asit (HCl, %36,5, Sigma Aldrich) kullanılmıştır.  $\alpha$ -Glu enzim reaksiyonlarının sonlandırılması için sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, %99, Merck) ve deaktivasyon çalışmaları için ajan olarak rosmarinik asit (RA, %96, Aldrich) kullanılmıştır. Üreaz enzim aktivitesinin hesaplanması için kullanılan titrimetrik metot için indikatör olarak 4-nitrofenol (4-NP, 99%, Acros) kullanılmıştır. Tez çalışması

kapsamında çözeltilerin hazırlanması için ultra saf su (18,3 M $\Omega$ , Direct Q3, Millipore) kullanılmıştır.

### **3.2. Süper makro gözenekli kriyojel ve enzim immobilize edilmiş kriyojel yapılarının sentezi**

Süper makro gözenekli kriyojellerin sentezi kriyojenik şartlar diye tabir edilen ve kullanılan çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen kriyojelasyon yöntemi ile yapılmıştır. Sentetik monomerler olan HEMA, AAm, AMPS, APTMACl, NIPAM, dallanmış yapıda sentetik bir polimer olan PEI ve doğal polimerler olan CMC ve Dekstran kullanılarak kriyojenik şartlarda ilgili kriyojeller sentezlenmiş ve sentez sırasında bu kriyojeller içerisine model enzimler immobilize edilmiştir. Kriyojel ve enzim immobilize edilmiş enzim@kriyojel sistemlerinin sentezine ait detaylar aşağıda verilmiştir.

#### **3.2.1. Sentetik kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin sentezi**

Sentetik monomerlerden sentezlen nötral p(HEMA) ve p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMACl), p(Amfoter), sıcaklık duyarlı akıllı p(NIPAM), dallanmış zincir yapısındaki PEI kriyojelleri ve bunların enzim immobilize edilmiş formları aşağıda detayları verildiği şekilde sentezlenmiştir.

#### **P(HEMA) ve $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojelleri**

P(HEMA) kriyojellerinin sentezi, literatürde daha önce bildirilen çalışma takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Seven ve Sahiner, 2014b). Kısaca, 0,48 mL HEMA monomeri ve bu monomere göre molce %10'luk MBA 6,02 mL su ile bir viyalde karıştırılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan MBA çözüldükten sonra karışıma hızlandırıcı olarak 50  $\mu$ L TEMED ilave edilmiş ve 500 rpm karıştırma hızında 1 dk karıştırılıp soğutulmak üzere -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Daha sonra, kriyojel öncül karışımına 0,015 g/mL konsantrasyonda 1 mL soğutulmuş KPS başlatıcı çözeltisi ilave edilip hızlıca

vortekslendikten sonra ve 0,8 cm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilerek -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuştur. Pipetler 16 saat boyunca -20 °C'deki derin dondurucuda süper makro gözenekli p(HEMA) kriyojellerinin sentezlenmesi için gerçekleşmesi gereken kriyojelasyon için bekletilmiştir.

$\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş p(HEMA) kriyojellerinin ( $\alpha$ -Glu@p(HEMA)) sentezi, yukarıda bahsedilen sentez yöntemine benzer şekilde hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki  $\alpha$ -Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır. Ayrı bir vialde, çözeltinin toplam hacmi 6,5 mL'ye tamamlanmadan önce HEMA ve MBA içeren viyale sırasıyla 0,48, 0,96 ve 1,92 mL miktarlarında  $\alpha$ -Glu-Glutasyon çözeltisi eklenmiştir. MBA çapraz bağlayıcısı çözüldükten sonra bu karışıma 50  $\mu$ L TEMED eklenmiş ve karışım soğutma amacıyla -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Daha sonra bu karışıma 1 mL, 0,015 g/mL derişimdeki KPS çözeltisi ilave edilmiş ve hızlıca vortekslendikten sonra plastik pipetlere doldurularak kriyojelasyon için 16 saat -20 °C'deki derin dondurucuda tutulmuştur.

Hazırlanan p(HEMA) ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutma tekniği ile liyofilizatörde (-86 °C, Christ, Alpha 2-4 LSC) kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 0,48, 0,96 ve 1,92 mL  $\alpha$ -Glu enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojelleri  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 olarak isimlendirilmiştir.

### **P(AAm) ve $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri**

P(AAm) kriyojellerinin sentezi literatürde daha önce rapor edilmiş çalışma takip edilerek yapılmıştır (Sahiner ve Demirci, 2016). Kısaca, 0,5 g AAm monomeri ve monomer göre molce %6,4'lük MBA bir vial içinde 6,5 mL su ile çözülmüştür ve bu karışıma 50  $\mu$ L TEMED eklenerek vortekslenmiş ve soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Başka bir vialde, kullanılan AAm monomerine göre molce %1'lik KPS

çözeltisi hazırlanmış ve soğuması için derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Daha sonra, KPS çözeltisinden 1 mL alınarak kriyojel öncül çözeltisinin içerisine eklenmiş ve hızlıca vortekslenip, pipetlendikten sonra kriyojelasyon için -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilerek 16 saat bekletilmiştir.

$\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş p(AAm) kriyojellerinin ( $\alpha$ -Glu@p(AAm)) sentezi, yukarıda bahsedilen sentez yöntemine benzer şekilde hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki  $\alpha$ -Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır. Bu çözeltiden, 1, 2 ve 4 mL kriyojel sentezi için kullanılması gereken su ile değiştirilmiştir. Kısaca, 0,5 g AAm monomer, her biri 5.5, 4.5 ve 2.5 mL su içeren viyalere yerleştirilmiştir. Daha sonra, her bir şişeye çapraz bağlayıcı olarak 0,0859 g MBA ve hızlandırıcı olarak 50  $\mu$ L TEMED ilave edilmiştir. Sonrasında, bu karışımlara bahsedildiği gibi 1, 2 ve 4 mL hazırlanmış olan  $\alpha$ -Glu-Glutasyon enzim çözeltileri eklenmiş ve oda sıcaklığında 500 rpm'de 15 dakika karıştırılmıştır. Enzim ve kriyojel öncüllerini içeren çözelti soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Başka bir viyalde hazırlanmış olan monomere göre molce %1'lik KPS çözeltisinden 1 mL, enzim-kriyojel öncül çözeltilerine ayrı ayrı ilave edildikten sonra hızlı bir şekilde vortekslenip 8 mm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilmiştir. Pipetler -20 °C'deki derin dondurucuda kriyojelasyon için 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan p(AAm) ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 1, 2 ve 4 mL enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 olarak isimlendirilmiştir.

### **P(AMPS) ve $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri**

P(AMPS) kriyojellerinin hazırlanması literatürde rapor edilen çalışmaya göre yapılmıştır (Sahiner ve Demirci, 2016). Kısaca, 0,78 mL sulu AMPS çözeltisi (ağırlıkça

%50) ve %8,8 w/v MBA 5,22 mL su içinde çözülmüştür. Bu çözelti içine 50 µL TEMED eklenerek vortekslenmiş ve soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Aynı olarak, monomere göre molce %1 olan 0,0054 g/mL konsantrasyondaki KPS çözeltisi 3 dk derin dondurucuda soğutulmuştur. Son olarak bu başlatıcı çözeltisinden 1 mL alınarak, soğutulmuş monomer çözeltisine eklenmiş ve daha sonra bu karışım 8 mm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilmiştir. Daha sonra pipetler kriyojelasyon için 20 saat -20°C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

$\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş p(AMPS) kriyojellerin ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)) hazırlanması, yukarıda bahsedilen sentez yöntemine benzer şekilde yapılmıştır. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki  $\alpha$ -Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri, kriyojel hazırlarken kullanılan suyun 0,9, 1,8 ve 3,6 mL'si hazırlanmış olan  $\alpha$ -Glu-Glutasyon çözeltileri ile değiştirilerek enzim-kriyojel öncül çözeltisi soğuması için derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Aynı olarak, su içinde monomere göre molce %1'lik olacak şekilde 0,0054 g/mL konsantrasyonunda hazırlanan başlatıcı KPS çözeltisi, 1 mL soğutulmuş enzim-kriyojel öncül çözeltisi ile karıştırılmış ve daha sonra bu karışımlar 8 mm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilmiştir. Son olarak, pipetler kriyojelasyon için 20 saat boyunca -20 °C'deki derin dondurucuda tutulmuştur.

Hazırlanan p(AMPS) ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 0,9, 1,8 ve 3,6 mL enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3 olarak isimlendirilmiştir.

### **P(APTMAcI) ve $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojelleri**

P(APTMAcI) kriyojelleri literatüre göre sentezlenmiştir (Sahiner ve Demirci, 2016). Buna göre, katyonik APTMAcI monomerinin 0,832 g'ı ve %16,5 w/v MBA, 5,5 mL suda

çözölmüştür. Bu çözeltiliye 50 µL TEMED eklenerek vortekslenmiş ve soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuştur. Ayrı bir viyalde, monomere göre molce %1 KPS çözeltisi 0,0083 g/mL olacak şekilde hazırlanmış ve bu çözelti de soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra başlatıcı çözeltisinin 1 mL'si monomer çözeltisine eklenmiş hızlıca karıştırıldıktan sonra 8 mm çapındaki pipetlere konularak 20 saat boyunca kriyojelasyon için -20 °C'de bekletilmiştir.

α-Glu immobilize edilmiş p(APTMAcI) kriyojellerinin (α-Glu@p(APTMAcI)) sentezi, yukarıda bahsedilen sentez yöntemine benzer şekilde yapılmıştır. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki α-Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır. Başka bir viyalde monomer olarak 1 mL APTMAcI çözeltisi (su içinde %75), çapraz bağlayıcı olarak 0,0842 g MBA, hızlandırıcı olarak 50 µL TEMED ve 1,5, 3 ve 6 mL α-Glu-glutasyon çözeltileri karıştırılmıştır. Daha sonra enzim-kriyojel öncül çözeltilerinin hacmi su ile 6 mL'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında 15 dk karıştırılmıştır. Aynı zamanda başka bir viyalde 0,0083 g/mL konsantrasyonda başlatıcı olarak kullanılan monomer göre molce %1'lik KPS çözeltisi hazırlanmış ve iki çözelti de derin dondurucuda -20 °C'de soğutulmuştur. Bunu takiben, 1 mL başlatıcı çözeltisi, enzim-kriyojel öncül çözeltisine eklenmiş ve vortekslenildikten sonra hızlıca pipetlenerek, kriyojelasyon için -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuş ve burada 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan P(APTMAcI) ve α-Glu@p(APTMAcI) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 1,5, 3 ve 6 mL enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan α-Glu@p(APTMAcI) kriyojelleri α-Glu@p(APTMAcI)-1, α-Glu@p(APTMAcI)-2 ve α-Glu@p(APTMAcI)-3 olarak isimlendirilmiştir.

## **P(Amfoter) ve $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri**

P(Amfoter) kriyojeller, literatürde belirtilen yöntemler modifiye edilerek kriyojenik koşullar altında sentezlenmiştir (Sahiner ve Demirci, 2016). Kısaca, %50 su içinde 0,78 mL AMPS çözeltisi ve %75 su içinde 0,5 mL APTMACl çözeltisi (1:1 mol oranı) bir viyal içinde karıştırılmış ve %10,6 w/v çapraz bağlayıcı MBA eklendikten sonra toplam hacim su ile 5,5 mL'ye tamamlanmıştır. Karışıma hızlandırıcı olarak 50  $\mu$ L TEMED ilave edilmiş ve karışım MBA tamamen çözünene kadar 500 rpm'de karıştırıldıktan sonra soğuması için -20 °C'deki bir derin dondurucuya konulmuştur. Başka bir viyalde, monomerlerin toplam molüne göre %1'lik KPS çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti de soğumaya bırakılmıştır. Son olarak soğutulmuş olan başlatıcı çözeltisinden 1 mL alınarak kriyojel öncül çözeltisine eklenmiş ve hızlıca karıştırılıp pipetlendikten sonra kriyojelasyonun gerçekleşmesi için -20 °C'deki derin dondurucuda 20 saat bekletilmiştir.

$\alpha$ -Glu immobilize edilmiş p(Amfoter) kriyojeller ( $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) enzim içermeyen p(Amfoter) kriyojellerin sentezi için kullanılan yöntem benzer şekilde sentezlenmiştir. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki  $\alpha$ -Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır. Ardından sentez için kullanılan suyun 1, 2 ve 4 mL'si  $\alpha$ -Glu-Glutasyon çözeltileri ile değiştirilerek  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemleri hazırlanmıştır. Kriyojel öncül çözeltilerinin toplam hacmi 5,5 mL'dir.

Hazırlanan p(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 1, 2 ve 4 mL enzim çözeltisi kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 olarak isimlendirilmiştir.

## P(NIPAM) ve $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri

P(NIPAM) kriyojelleri, daha önce rapor edilen çalışma takip edilerek bazı modifikasyonlarla sentezlenmiştir (Sahiner, 2018). Kısaca, 7,5 mmol NIPAM monomeri ve 1,1 mmol MBA tartılarak 12 mL su içinde çözülmüş ve bu çözeltiye hızlandırıcı olarak 100  $\mu$ L TEMED ekledikten sonra 500 rpm karıştırma hızında 10 dakika karıştırılmıştır. Başka bir viyalde, başlatıcı olarak kullanılacak olan monomere göre molce %1'lik KPS çözeltisi hazırlanmış ve kriyojel öncüllerini içeren çözelti ile soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuştur. Daha sonra, soğutulmuş başlatıcı çözeltisinden 1 mL alınarak kriyojel öncül çözeltisine eklenmiş ve hızlı bir şekilde karıştırılmış ve pipetlenerek -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Kriyojelasyon için pipetler 20 saat -20 °C'de bekletilmiştir.

$\alpha$ -Glu immobilize edilmiş p(NIPAM) kriyojelleri ( $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)) de yukarıda açıklanan yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi olarak hacimce 1:1 olacak şekilde 0,15 mg/mL konsantrasyondaki  $\alpha$ -Glu sulu çözeltisi ile 3 mM Glutasyon sulu çözeltisi karıştırılmıştır. Ayrı bir viyalde p(NIPAM) kriyojellerinin sentezi için kullanılan 12 mL suyun 2, 4 ve 8 mL  $\alpha$ -Glu-Glutasyon çözeltisi ile değiştirilmiştir. Benzer şekilde MBA, TEMED çözeltileri, yukarıda bahsedilen p(NIPAM) kriyojel sentez yöntemindeki gibi hazırlanmıştır.

Hazırlanan p(NIPAM) ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez çift damıtılmış su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla 2, 4 ve 8 mL enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 olarak isimlendirilmiştir.

## PEI ve Üreaz@PEI kriyojellerinin sentezi

PEI kriyojellerinin sentezi literatüre göre bazı modifikasyonlar (Sahiner ve Demirci, 2016) ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde PEI kriyojellerinin sentezi su içinde gerçekleştirilirken, burada PEI kriyojellerinin sentezi pH 7,0'a ayarlanmış 20 mM sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 9 mL sodyum fosfat tampon (pH 7,0) çözeltisine 1 mL PEI (%50 sulu çözeltisi) ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilerek soğutulmuş ve hemen ardından bu çözeltiye 400 µL GDE ilave edilerek 1 dakika hızlı bir şekilde vortekslenildikten sonra 8 mm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilmiştir. Plastik pipetler kriyojelasyon işlemi için hızlı bir şekilde -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiş ve 20 saat bekletilmiştir.

Üreaz enzimi immobilize edilmiş PEI kriyojelleri (Üreaz@PEI) PEI kriyojellerinin sentezindeki gibi gerçekleştirilmiştir. Burada, 6,25 mg/mL konsantrasyonunda 20 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış olan Üreaz enzim çözeltisinden sırasıyla 2,25, 4,5 ve 9 mL alınarak yine pH 7,0 fosfat tamponu çözeltisi ile 9 mL'ye tamamlandıktan sonra üzerlerine 1'er mL PEI çözeltisi eklenmiş ve 5 dakika karıştırıldıktan sonra -20 °C'deki derin dondurucuda soğutulmuştur. Sonrasında yine PEI'in tekrar eden birimine göre molce %100 olacak şekilde 400 µL GDE çapraz bağlayıcısı eklenip, 1 dakika hızlı bir şekilde vortekslenildikten sonra 8 mm çapındaki plastik pipetlere yerleştirilmiştir. Plastik pipetler kriyojelasyon işlemi için hızlı bir şekilde -20 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiş ve 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan PEI ve Üreaz@PEI kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır. Sırasıyla, 2,25, 4,5 ve 9 mL enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan Üreaz@PEI kriyojelleri Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 olarak isimlendirilmiştir.

### 3.2.2. Doğal polimer kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin sentezi

Doğal polimer kriyojellerinin sentezlenmesi için molekül ağırlığı 250 kDa ve süstitüye oranı 1,2 olan CMC ve molekül ağırlığı 15-25 kDa olan dekstran doğal polimeri kullanılmıştır. Kriyojellerin sentezine ait detaylar aşağıda verilmiştir.

#### CMC ve Üreaz@CMC kriyojellerinin sentezi

CMC kriyojel sentezi literatürde daha önce bildirilen çalışma takip edilerek yapılmıştır (Saniner vd., 2020). Buna göre, 0,2 g CMC, ortam sıcaklığında 3 saat boyunca 500 rpm sabit karıştırma hızı altında 6 mL 0,2 M NaOH içinde çözülmüş ve soğuması için -20 °C'deki bir dondurucuda bekletilmiştir. Daha sonra, CMC'nin tekrar eden birimine göre (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>22</sub>) molce %100 oranında DVS çapraz bağlayıcısı eklenmiş ve hızlıca pipetlenerek (8 mm çap), kriyojelasyon için 20 saat boyunca -20 °C'deki bir dondurucuda bekletilmiştir.

Üreaz enzimi immobilize edilme CMC kriyojelleri (Üreaz@CMC) CMC kriyojellerinin sentezindeki gibi gerçekleştirilmiştir. Burada, 0,2 g CMC'nin çözüldüğü 6 mL 0,2 M NaOH çözeltisi içine 5 mg Üreaz enzimi eklenmiş ve 5 dk karıştırıldıktan sonra soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuştur. Daha sonra soğumuş çözeltinin üzerine CMC'nin tekrar eden birimine göre molce %100 DVS çapraz bağlayıcısı eklenip, pipetlenerek kriyojelasyon için -20 °C'deki derin dondurucuda 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan CMC ve Üreaz@CMC kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır.

## Dekstran ve Üreaz@Dekstran kriyojellerinin sentezi

Dekstran kriyojelleri, daha önce bildirilen çalışma takip edilerek kriyojenik koşullar altında hazırlanmıştır (Ari vd., 2020). Kısaca, 15-25 kDa molekül ağırlığına sahip Dekstran doğal polimerinden 0,3 g tartılarak 6 mL 0,2 M NaOH çözeltisi içinde 500 rpm karıştırma hızında karıştırılarak çözünmüştür. Çözelti -20 °C'deki derin dondurucuda soğutulduktan sonra dekstran doğal polimerinin tekrar eden birimine göre (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) molce %40 DVS eklenmiş ve hızlıca karıştırıldıktan sonra pipetlenerek, kriyojelasyonun gerçekleşmesi için -20 °C'deki derin dondurucuda 20 saat bekletilmiştir.

Üreaz enzimi immobilize edilmiş Dekstran kriyojelleri (Üreaz@Dekstran) Dekstran kriyojellerinin sentezindeki gibi gerçekleştirilmiştir. Burada, 0,3 g Dekstran'ın çözündüğü 6 mL 0,2 M NaOH çözeltisi içine 5 mg Üreaz enzimi eklenmiş ve 5 dk karıştırıldıktan sonra soğuması için -20 °C'deki derin dondurucuya konulmuştur. Daha sonra soğumuş çözeltinin üzerine CMC'nin tekrar eden birimine göre molce %40 DVS çapraz bağlayıcısı eklenip, pipetlenerek kriyojelasyon için -20 °C'deki derin dondurucuda 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan Dekstran ve Üreaz@Dekstran kriyojelleri benzer şekil ve boyutlarda kesilmiş ve 3 kez su ile yıkandıktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra kriyojeller karakterizasyon ve ileriki çalışmalar için -20 °C'deki bir derin dondurucuda kilitli torbalarda saklanmıştır.

### 3.3. Karakterizasyon

Kriyojeller ve enzim@kriyojel sistemlerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (QUANTA 400F Alan Emisyon SEM ve Regulus 8230, Hitachi) birkaç nm altın kaplandıktan sonra ve 20 kV çalışma gerilimi uygulanarak alınmıştır.

Kriyojeller ve enzim@kriyojel sistemlerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Işımalı (FT-IR, Spectrum, Perkin Elmer) spektrumları, ATR yöntemi kullanılarak 4000-650 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı arasında 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlük aralığı ve 4 tekrarlı tarama ile kaydedilmiştir.

Kriyojeller ve enzim@kriyojel sistemlerinin termal kararlılık ve bozunma davranışları, termogravimetrik analizör (TGA, Seiko, SII 6300, Exstar) kullanılarak araştırılmıştır. Yaklaşık 3-5 mg ağırlığındaki kriyojeller TGA kefesine yerleştirilmiş ve 200 mL/dk azot gazı akışı ve 10 °C/dk ısıtma altında 750 °C'ye kadar ısıtılmıştır.

Kriyojeller ve enzim@kriyojel sistemlerinin %şişme, %gözenekliliği, %gözenek hacmi ve %jel verimi, aşağıda verilen ve çok iyi bilinen denklemler olan Denklem 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır (Plieva vd., 2005; Tripathi & Melo, 2015);

$$\%Şişme = (m_s - m_d) / m_d \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%Gözeneklilik = (m_s - m_d) / (m_s - m_{sq}) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%Gözenek hacmi = (m_s - m_d) / m_s \times 100 \quad (3.3)$$

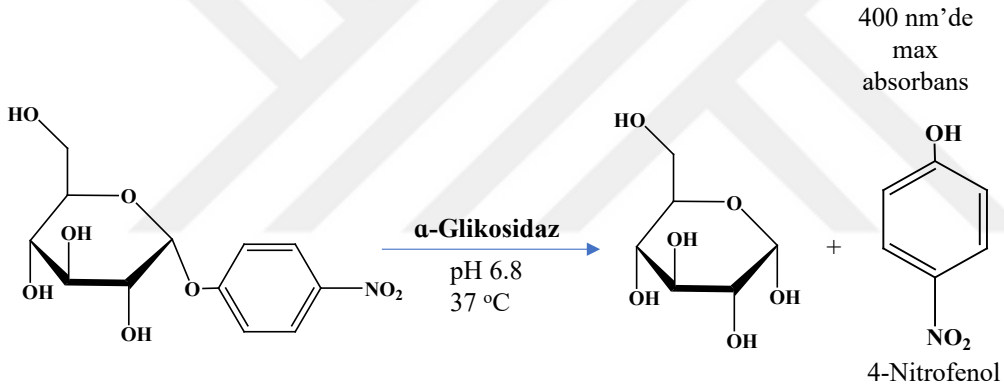
$$\%Jel verimi = (m_d / m_r) \times 100 \quad (3.4)$$

burada “m<sub>s</sub>” suda şişmiş kriyojel parçalarının ağırlığı, “m<sub>d</sub>” yıkanmış ve dondurularak kurutulmuş kriyojel parçalarının ağırlığı, “m<sub>sq</sub>” suda şişirildikten sonra sıkılmış kriyojel parçalarının ağırlığı ve “m<sub>r</sub>” kriyojel öncüllerinin toplam miktarının ağırlığıdır. Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### 3.4. Enzimatik reaksiyonlar

#### 3.4.1. Serbest ve immobilize $\alpha$ -Glu'nun enzimatik reaksiyonu

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -Glu için enzim deneyleri, substrat olarak 4-NPG kullanılarak ve üretici tarafından sağlanan teknik bilgilere göre ürün olarak açığa çıkan 4-NP'yi takip ederek belirlenmiştir (Sigma-Aldrich, 1996). Enzimatik reaksiyon sonucunda 4-NP molekülüne ait olan ve UV-Vis spektrometre ile 400 nm dalga boyunda gözlemlenen absorbans değerleri takip edilerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır ve ilgili enzimatik reaksiyon **Şekil 3**'te verilmiştir.



Şekil 3.  $\alpha$ -Glu enziminin katalizlediği 4-NPG'nin 4-NP ve glikoza parçalanması reaksiyonu.

Buna göre, pH 6,8'e ayarlanmış 67 mM potasyum fosfat tampon çözeltisinden 5 mL alınmış ve bu çözeltiye hazırlanan serbest  $\alpha$ -Glu enzim çözeltisi ve eşit hacimde 0,2 mM indirgenmiş glutatyon çözeltisi eklenerek, 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra  $\alpha$ -Glu enzimi içeren tampon çözeltiye substrat olarak su içinde 10 mM konsantrasyonda hazırlanmış 4-NPG çözeltisinden 0,5 mL ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyon 37°C'de 20 dakika boyunca devam ettirilmiştir. Kontrol grubu için tampon çözelti içerisine enzim-glutatyon çözeltisi yerine 0,4 mL su ilave edilmiştir. Enzimatik reaksiyon, kontrol ve test grubundan 2'şer mL çözelti 8 mL 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltileri içerisine ayrı ayrı eklenerek durdurulmuştur. Son olarak bu çözeltilerin 400 nm dalga boyundaki absorbans değerleri sırasıyla A<sub>test</sub> ve A<sub>kontrol</sub> olarak kaydedilerek UV-Vis spektrometresinde okunmuştur.

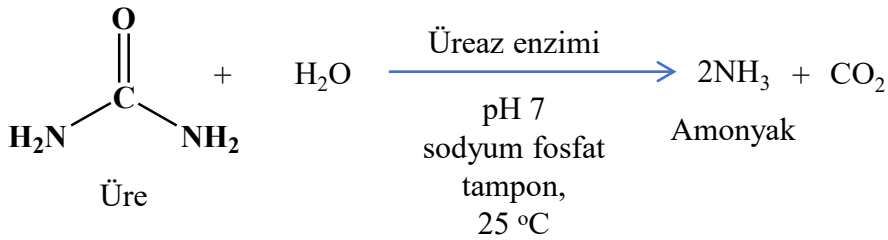
Enzimin aktivitesi Units/mL enzim olarak Denklem 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır (Sigma-Aldrich, 1996);

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{(A_{\text{test}} - A_{\text{kontrol}}) \times (10) \times (5.9) \times (\text{df})}{((18.3) \times (20) \times (2) \times (\text{enzim çözeltisi}))} \quad (3.5)$$

burada “10” nihai çözelti hacmi (mL), “5,9” reaksiyon karışımının hacmi (mL), “df” seyreltme faktörü, “18,3” 400 nm'de 4-NP'nin mM sönme katsayısı, “20” reaksiyon zamanı (dk) ve “2” nihai çözeltiliye eklenen enzim çözeltisinin hacmidir (mL). "Unit" tanımı, 37 °C ve pH 6,8'de dakikada 4-NPG'den serbest bırakılan µmol D-glikoz olarak tanımlanmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### 3.4.2. Serbest ve immobilize Üreaz enziminin enzimatik reaksiyonu

Hem serbest hem de immobilize edilmiş Üreaz enziminin enzimatik aktivitesi üretici firma tarafından bildirilen metot kullanılarak titrimetrik yöntemle hesaplanmıştır (Sigma-Aldrich, 2021). Üreaz enzimi kullanılan enzimatik reaksiyonda üre substrat olarak kullanılmış ve açığa çıkan NH<sub>3</sub> miktarı 4-NP indikatörü varlığında titre edilerek hesaplanmış ve ilgili reaksiyon Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. Üreaz enziminin katalizlediği ürenin amonyak ve karbondioksite dönüştürülmesi reaksiyonu.

Bu amaçla, 1 M NaOH çözeltisi ile pH 7,0'a ayarlanmış 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 0,625 mg/mL konsantrasyonunda Üreaz enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Substrat çözeltisi ise 5 M NaOH çözeltisi ile pH 7,0'ye ayarlanmış 750 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 30 mg/mL üre ve 0,05 mg/mL BSA olacak şekilde hazırlanmıştır. İndikatör olarak kullanılacak olan 4-NP çözeltisi 4 mg/mL konsantrasyonda su içinde hazırlanmıştır. Daha sonra, enzimatik reaksiyon test grubu için 5 mL substrat çözeltisi 25 °C'de bir viyale konulmuş ve substrat çözeltisine 1 mL enzim çözeltisi eklenerek 25 °C'de 5 dakika karıştırılmıştır. Hemen ardından, bu çözeltiliye 1 mL 4-NP çözeltisi eklenmiş ve 0,1 M HCl çözeltisi ile titre edilerek çözeltinin sarı rengi kaybolana kadar eklenen 0,1 M HCl çözeltinin hacmi (mL) kaydedilmiştir. Kontrol grubunda ise enzim çözeltisi yerine 1 mL pH 7,0'ye ayarlanmış 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-NP çözeltisi eklendikten sonra yine 0,1 M HCl çözeltisi ile titre edilerek renk kaybolana kadar kullanılan hacim belirlenmiştir. Enzim aktivitesi Denklem 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{Unit/mg protein} = ([\text{HCl}] \times (\Delta V_{\text{test}} - \Delta V_{\text{blank}}) \times 1000) / (\text{zaman} \times \text{mg enzim}) \quad (3.6)$$

burada, [HCl] molaritesi “mM” cinsinden,  $\Delta V_{\text{test}}$  ve  $\Delta V_{\text{kontrol}}$  titrasyon sırasında kullanılan hacim “L” cinsinden, zaman “dk” cinsinden, enzim miktarı “mg” cinsinden ve 1000 birim tanımına göre milimolden mikromole dönüşüm faktörü olarak bildirilmiştir. “Unit” tanımı ise, 25 °C ve pH 7,0'da dakikada üreden açığa çıkan  $\mu\text{mol NH}_3$  olarak yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### 3.5. İmmobilizasyon parametrelerinin hesaplanması

Enzim immobilizasyon çalışmalarında, immobilizasyon için en önemli parametreler olarak belirtilen terimler “immobilizasyon verimi”, “immobilizasyon etkinliği” olarak literatürde rapor edilmiştir (Boudrant vd., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013). Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### **3.5.1. Enzim sızıntısı**

Enzim immobilize edilmiş enzim@kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları, serbest enzimin aktivitesi ile kriyojel içinde enzim immobilize edilmiş sistemlerin yıkama çözeltilerinin enzimatik aktivitelerinin karşılaştırması yoluyla hesaplanmıştır (Boudrant vd., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013). Hazırlanan enzim@kriyojel sistemlerinin yıkama işlemleri 8 saatte bir değiştirilen 20 mL su ile 5 kez yapılmıştır. Yıkama çözeltileri enzimatik reaksiyonda test edilmiş ve gözlenen aktivite ile enzim immobilize edilmiş sistemlerden sızan enzim miktarı hesaplanmıştır.

### **3.5.2. İmmobilizasyon verimi**

İmmobilizasyon verimi, immobilizasyon sırasında kullanılan enzim miktarı ve immobilize edilmiş sistem içerisinde bulunan enzim miktarının oranından bulunmaktadır. Bunun için enzim sızıntısı ile elde edilen verilerden yararlanılarak immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. Buna göre sisteme immobilizasyon için eklenen enzim çözeltisinin aktivitesi ile sistemden sızan enzimin aktivitesi karşılaştırılarak immobilizasyon verimi değerleri hesaplanmıştır (Boudrant ve., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013).

### **3.5.3. İmmobilizasyon etkinliği**

İmmobilizasyon etkinliği, sistem içerisine immobilize edilmiş enzimin aktivitesinin eşit miktardaki serbest enzimin aktivitesine oranlanması ile hesaplanmıştır. Bunun için eşit miktarda enzim içeren serbest enzim çözeltisi ve enzim@kriyojel sistemi enzimatik reaksiyonlarda kullanılmış ve serbest enzim için hesaplanan enzim aktivitesi %100 kabul edilerek enzimin kriyojel içerisinde immobilizasyonu ile aktivitesinde meydana gelen değişim incelenmiştir (Boudrant vd., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013).

### 3.6. Enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik reaksiyon optimizasyon çalışmaları

Enzim immobilize edilmiş enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin eşit miktarda serbest enzimin aktivitesi ile karşılaştırmak ve enzim@kriyojel sistemlerinin optimum çalışma koşullarını belirleyebilmek için immobilize edilen enzimin miktarı, inkübasyon süresi, reaksiyon pH ve sıcaklığının enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Buna göre serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemlerinin aktiviteleri pH 4,0-9,0 aralığındaki farklı pH değerlerinde ve 15-60 °C aralığındaki farklı sıcaklıklarda hazırlanan reaksiyon ortamlarında hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Enzim aktivitesinin enzim miktarına bağımlılığı, substrat eklenmeden önce optimum reaksiyon pH ve sıcaklığında inkübasyon süresi, pH ve sıcaklık gibi etkenlerin enzim aktivitesine etkisi serbest enzimin optimum koşullardaki aktivitesi %100 aktivite değeri olarak kabul edilerek karşılaştırılmıştır. Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### 3.7. Kinetik parametreler

Enzimatik reaksiyonlar için Michaelis-Menten kinetik parametreleri  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri serbest ve immobilize edilmiş enzimler için non-lineer (Denklem 3.7) ve lineer (Denklem 3.8) Lineweaver-Burk denklemleri kullanılarak belirlenmiştir;

$$V_o = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (7)$$

$$1/V_o = K_m / (V_{max} \times [S]) + 1/V_{max} \quad (8)$$

burada, " $V_o$ " başlangıç hızı (mM/dk), " $V_{max}$ " maksimum reaksiyon hızı (mM/dk), "[S]" substrat konsantrasyonu (mM) ve " $K_m$ " Michaelis-Menten sabiti (mM) olarak tanımlanmıştır.

Kinetik çalışmalar, enzim@kriyojel sistemleri için kullanılan enzim  $\alpha$ -Glu iken kullanılan substrat çözeltilerinin konsantrasyonları 0,23-3,64 mM aralığındayken, Üreaz enzimi kullanılırken substrat çözeltilerinin konsantrasyonları 10-1000 mM aralığında ve ilgili enzimin optimum çalışma koşullarında yapılmıştır. Non-lineer Lineweaver-Burk denkleminde kinetik parametreler Excel-Solver (Hernández ve Ruiz, 1998; Kemmer ve Keller, 2010) kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### **3.8. Enzim immobilize edilmiş kriyojel sistemlerin tekrar kullanım çalışmaları**

Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin operasyonel dayanıklılığı veya yeniden kullanılabilirliği, kullanılan serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemleri için yapılan çalışmalarla belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. Buna göre, serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemleri gözenek boyutu 12 kDa olan selülozik diyaliz membranlar içine yerleştirilerek enzimatik reaksiyonda artarda kullanım potansiyelleri aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenerek araştırılmıştır. Serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemlerinin ilk kullanımlarında gözlenen aktivite değerleri %100 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### **3.9. Enzim immobilize edilmiş kriyojel sistemlerin saklama süreleri ilgili çalışmalar**

Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin farklı sıcaklıklarda saklandıktan sonra, kullanılan enzim ve enzim@kriyojel sistemleri için yapılan çalışmalarla belirlenen optimum koşullar altında enzimatik reaksiyonlarda kullanılmıştır. Buna göre, serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemleri -20, +4, ve +25 °C sıcaklıklarda saklanmış ve farklı günlerde enzimatik reaksiyonlarda kullanılarak aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenip karşılaştırılmıştır. Serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemlerinin ilk kullanımlarında gözlenen aktivite değerleri %100 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

### 3.10. $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivite çalışmaları

$\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin ve eşit miktarda serbest  $\alpha$ -Glu enziminin deaktivitelerinin belirlenmesinde model ajan olarak rosmarinik asit çözeltisi kullanılmıştır (Tadera vd., 2006). Bu amaçla, serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemleri için belirlenen optimum çalışma koşullarında 3,6 mg/mL konsantrasyonda rosmarinik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Enzimatik reaksiyon başlatılmadan önce reaksiyon ortamına 0,11-1,8 mg/mL konsantrasyonlarında rosmarinik asit çözeltilerinden 1'er mL ayrı ayrı eklenerek enzimatik aktivitenin azalması takip edilmiştir. Deaktivatör olmadan yapılan enzimatik reaksiyon sonucunda 400 nm dalga boyunda gözlenen absorbans değeri " $A_{test}$ ", deaktivatör varlığında gözlenen absorbans değerleri  $A_{inh}$  olarak kaydedilmiş ve Denklem 3.9 kullanılarak %deaktivasyon değerleri hesaplanmıştır (Zhu vd., 2014). Hesaplamalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

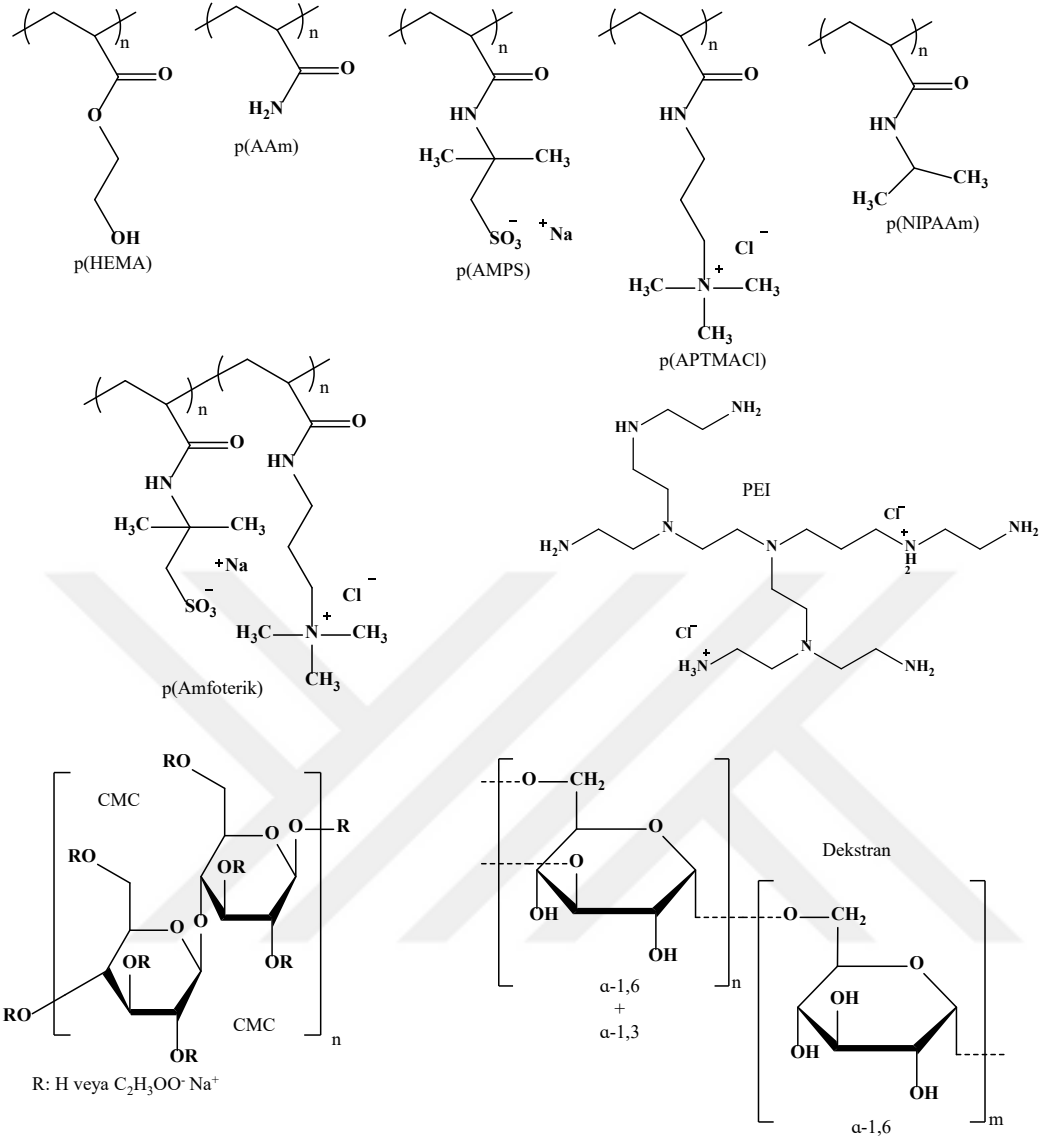
$$\%Deaktivasyon = (A_{test} - A_{inh}) / A_{test} \times 100 \quad (3.9)$$

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Kriyojel ve enzim@kriyojel yapılarının sentezi

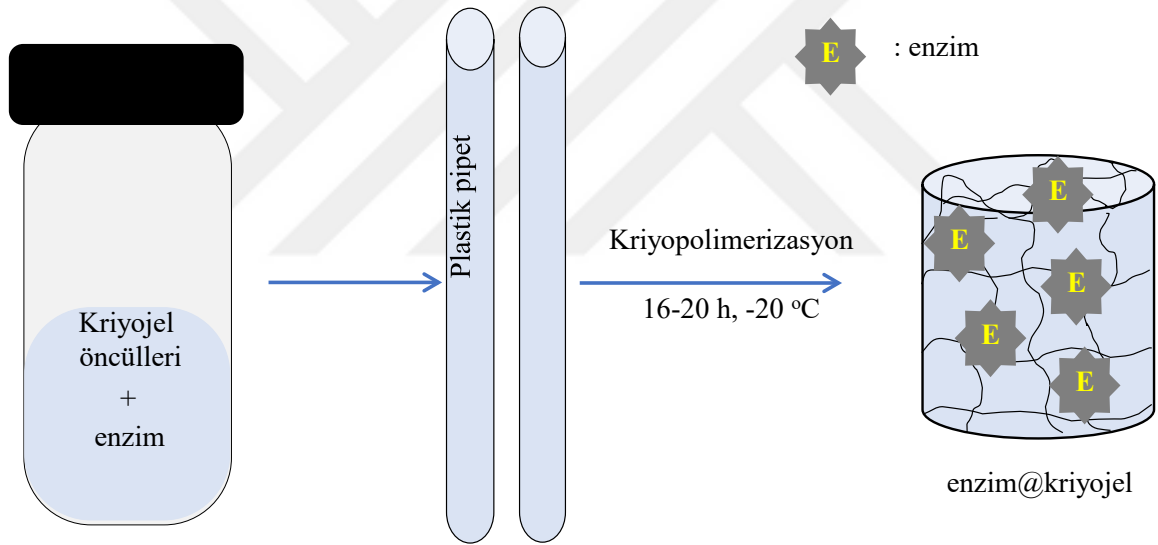
Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin sentezi için farklı iyonik karakterdeki sentetik monomerler (HEMA, AAm, AMPS, APTMACl, NIPAM), dallanmış polimer (PEI) ve doğal polimer (CMC, Dextran) zincirleri çıkış malzemeleri olarak kullanılmıştır ve kimyasal yapıları **Şekil 5**'te gösterilmiştir. Nötral, anyonik ve katyonik monomerlerden, dallanmış PEI zincirlerinden, ve CMC ile Dekstran doğal polimerlerinden hazırlanan kriyojellerin hepsinin sentez ve karakterizasyonu değişik amaçlar için Şahiner grubu tarafından daha önceden gerçekleştirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır (Ari vd., 2020; Sahiner ve Demirci, 2016; Sahiner, 2018; Saniner vd., 2020; Seven ve Sahiner, 2014b, 2014a).



Şekil 5. Hazırlanan kriyojellerin polimerlerinin kimyasal yapıları.

Kriyojenik şartlar altında gerçekleşen serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen P(HEMA) ve p(AAm) kriyojelleri nötral yapıda, p(AMPS) kriyojelleri sülfonik asit grupları nedeniyle anyonik karakterde, p(APTMACl) kriyojelleri amonyum grupları nedeniyle katyonik karakterdedirler. Bunların yanı sıra p(NIPAM) kriyojelleri nötral olması yanında sıcaklık duyarlı, p(Amfoter) kriyojeller ise hem anyonik sülfonik asit hem de katyonik amonyum gruplarını aynı anda içermektedirler.

Kriyojellerin sentezinin kriyojenik şartlar (çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklar, - 20 °C) altında gerçekleşmesi ve enzimlerin bu şartlarda saklanıyor olması kriyojellerin içerisine sentez sırasında enzimlerin aktivitelerini kaybetmeden immobilize edilmesine olanak sağlayabilir ve enzim immobilizasyonu işlemini tek basamağa indirerek kolaylaştırdığı için bu çok büyük bir avantaj sağlar. Enzim@kriyojel sistemlerinin hazırlanmasının şematik gösterimi Şekil 6'da verilmiştir. Buna göre kriyojel sentezi sırasında monomer, çapraz bağlayıcı, hızlandırıcı içeren karışıma enzim çözeltisi eklenmiş ve başlatıcı eklendikten sonra ilgili öncüllerin kriyojelasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Görüldüğü gibi, kriyojel öncülleri ve enzim çözeltisi (değişen miktarlarda) plastik pipetlere yerleştirilmiş ve 20 saat -20 °C'de kriyopolimerizasyon için bırakılmış ve enzimler kriyojeller içerisine hapsedilme metodu ile immobilize edilmiştir.



Şekil 6. Süper makro gözenekli enzim@kriyojel sistemlerinin hazırlanışının şematik gösterimi.

Hazırlanan enzim@kriyojel sistemleri silindirik şekilde 1-1,2 cm boyutlarda kesilmiş ve su ile 3 kez yıkanıp dondurarak kurutulduktan sonra -20 °C'de kapalı kilitli naylon torbalarda saklanmıştır. Bu sistemde, monomerlerinin/polimerlerin polimerizasyonu ve/veya eşzamanlı çapraz bağlanması, buz kristallerinin etrafında meydana gelmiş ve enzimler kriyojenik koşullar altında gözenekler ve gözenek duvarları içinde yerleşmiştir. Kriyojeller içindeki hapsedilmiş enzim miktarının, kriyojel sentezi sırasında eklenen enzim

çözültüsünün miktarındaki artışla kolayca artırılabilmesi bu yöntemin avantajlarından bir diğeri olarak göze çarpmıştır.

## 4.2. Kriyojel ve enzim@kriyojel yapılarının karakterizasyonları

### 4.2.1. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin Şişme, gözenek hacmi, gözeneklilik ve jel verimi

Farklı iyonik yapı ve özelliklerdeki kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi değerleri hesaplanmış ve **Tablo 1**'de karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalara göre kriyojel ve  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi değerlerinde çok büyük değişiklikler gözlenmemiştir. P(HEMA) kriyojelleri için %şişme, %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri sırasıyla %960 $\pm$ 59, 58,1 $\pm$ 3,2 ve 90,2 $\pm$ 1,3 olarak hesaplanırken bu değerler  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojelleri için %942 $\pm$ 24, 50,5 $\pm$ 1,9 ve 87,2 $\pm$ 2,1 olarak hesaplanmıştır. P(AAm) kriyojelleri için ise %şişme, %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri %814 $\pm$ 47, 51,7 $\pm$ 1,9 ve 84,3 $\pm$ 3,8 olarak hesaplanmış ve bu değerler enzim immobilize edildikten sonra çok az düşerek  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojelleri için %804 $\pm$ 31, 50,3 $\pm$ 2,2 ve 82,1 $\pm$ 3,2 olarak hesaplanmıştır. Anyonik ve katyonik p(AMPS) ve p(APTMACl) kriyojelleri için %şişme değerleri sırasıyla %1536 $\pm$ 145 ve 1711 $\pm$ 193 olarak hesaplanmış ve nötral p(HEMA) ve p(AAm) kriyojellerine göre daha yüksek çıkmıştır. Diğer taraftan %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri p(AMPS) kriyojelleri için %57,4 $\pm$ 2,7 ve 90,1 $\pm$ 2,4 olarak hesaplanırken, bu değerler  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri için %55,3 $\pm$ 1,8 ve 90,7 $\pm$ 1,8 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber katyonik p(APTMACl) kriyojellerinin %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri anyonik p(AMPS) kriyojellerine göre daha yüksek çıkmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) kriyojelleri için %şişme, %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri sırasıyla %1703 $\pm$ 146, 58,2 $\pm$ 1,8 ve 91,3 $\pm$ 1,8 olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojelleri için %şişme, %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri %1127 $\pm$ 98, 79,2 $\pm$ 1,9 ve 83,1 $\pm$ 3,7 olarak hesaplanmış ve bu değerler  $\alpha$ -Glu enzim immobilizasyonundan sonra %1116 $\pm$ 112, 78,7 $\pm$ 1,4 ve 80,6 $\pm$ 2,5 değerlerine düşmüştür.

Tablo 1

Enzim içermeyen kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verim değerlerinin karşılaştırılması

Kriyojel	Şişme %	Gözeneklilik %	Gözenek hacmi %	Verim %
P(HEMA)	960±59	58,1±3,2	90,2±1,3	94,4±0,8
$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3	942±24	50,5±1,9	87,2±2,1	93,2±3,1
P(AAm)	814±47	51,7±1,9	84,3±3,8	95,4±1,1
$\alpha$ -Glu@p(AAm)-3	804±31	50,3±2,2	82,1±3,2	94,3±2,1
P(AMPS)	1536±145	57,4±2,7	90,1±2,4	94,1±2,1
$\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3	1487±105	55,3±1,8	90,7±1,8	95,1±1,8
P(APTMACl)	1711±193	60,2±2,5	92,1±3,1	94,9±2,2
$\alpha$ -Glu@p(APTMACl)-3	1703±146	58,2±1,8	91,3±1,8	93,8±1,9
P(Amfoter)	1513±107	80,9±0,4	93,8±0,4	86,4±1,9
$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3	1487±95	79,1±0,9	93,1±1,1	85,9±1,7
P(NIPAM)	1127±98	79,2±1,9	83,1±3,7	95,1±0,9
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3	1116±112	78,7±1,4	80,6±2,5	94,3±1,9
PEI	1889±334	67,4±5,2	79,2±2,7	96,1±0,9
PEI ureaz-3	1752±219	65,3±2,7	80,6±1,7	95,3±1,4
CMC	1831±192	81,3±2,9	87,9±3,7	91,3±1,7
CMC Ureaz	1786±93	80,4±4,1	88,7±1,2	90,7±0,9
Dekstran	1510±30	84,3±2,6	87,4±3,1	85,1±2,3
Dekstran Ureaz	1457±69	8,1±3,6	84,1±1,8	84,2±1,6

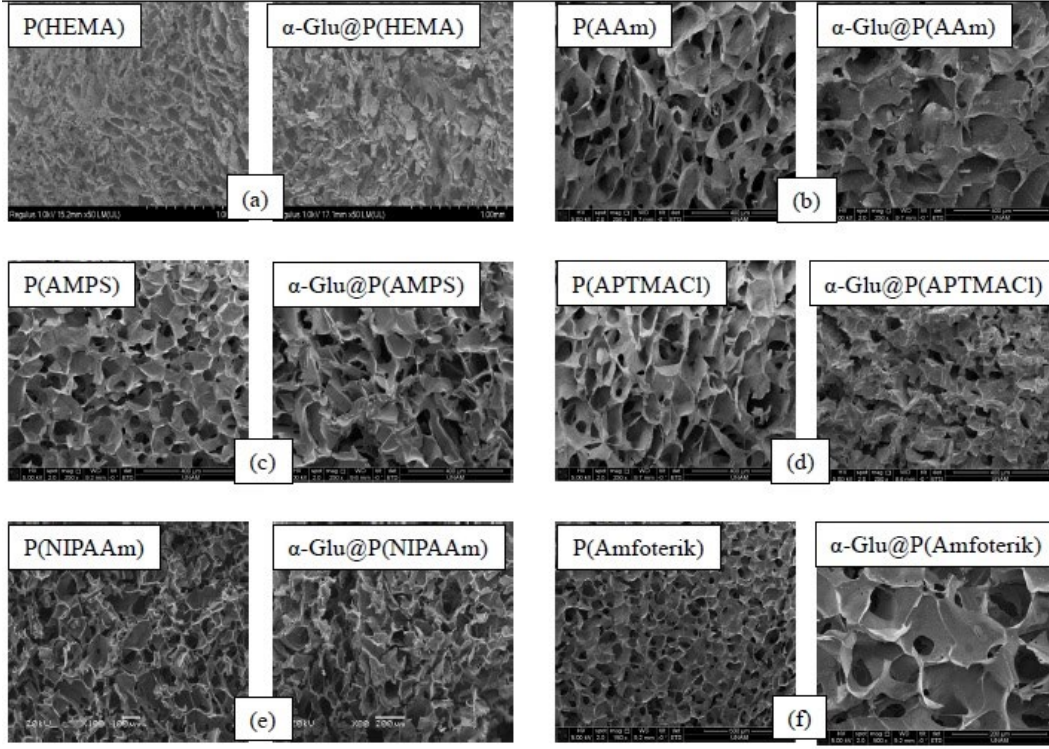
Anyonik ve katyonik monomerlerin kopolimeri olarak hazırlanan p(Amfoter) kriyojeller için %şişme, %gözeneklilik ve %gözenek hacmi değerleri sırasıyla %1513±107, 80,9±0,4 ve 93,8±0,4 olarak hesaplanırken, bu değerler  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri için sırasıyla %1487±95, 79,1±0,9 ve 93,1±1,1 olarak hesaplanmıştır. P(HEMA), p(AAm), p(AMPS), p(APTMACl), ve p(NIPAM) kriyojelleri ile bunların  $\alpha$ -Glu enzim immobilize

edilmiş formlarının %jel verimi %90'ın üzerinde çıkmıştır. Diğer taraftan p(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri için %jel verimi yaklaşık %85 olarak hesaplanmıştır.

Diğer taraftan Üreaz enzimi için kullanılan PEI kriyojellerinin %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi değerleri sırasıyla  $1889 \pm 334$ ,  $67,4 \pm 5,2$ ,  $79,2 \pm 2,7$  ve  $96,1 \pm 0,9$  olarak hesaplanmış ve bu değerler Üreaz enzimi immobilizasyonundan sonra önemli bir değişikliğe uğramamıştır. Aynı şekilde, enzim içermeyen CMC ve Dekstran kriyojellerinin de %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi değerleri Üreaz enziminin immobilizasyonu sonrasında önemli değişiklikler göstermemiştir. Buradan, immobilizasyon sonucunda süper makro gözenekli kriyojel yapılarının gözeneklerinin kapanmadığı ve şişme kabiliyetlerini kaybetmediği açıkça görülmüştür.

#### **4.2.2. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin SEM görüntüleri**

P(HEMA), p(AAm), p(AMPS), p(APTMAcI), p(NIPAM), p(Amfoter) kriyojellerinin ve bunların ilgili  $\alpha$ -Glu immobilize edilmiş formlarının SEM görüntüleri Şekil 7 (a)-(f)'de verilmiştir. Görüntülerden görüldüğü gibi, kriyojeller ve enzim@kriyojel sistemleri 1-100  $\mu$ m arasında değişen büyük gözenek boyutlarına sahip makro gözenekli yapılar olarak başarılı şekilde sentezlenmiştir.

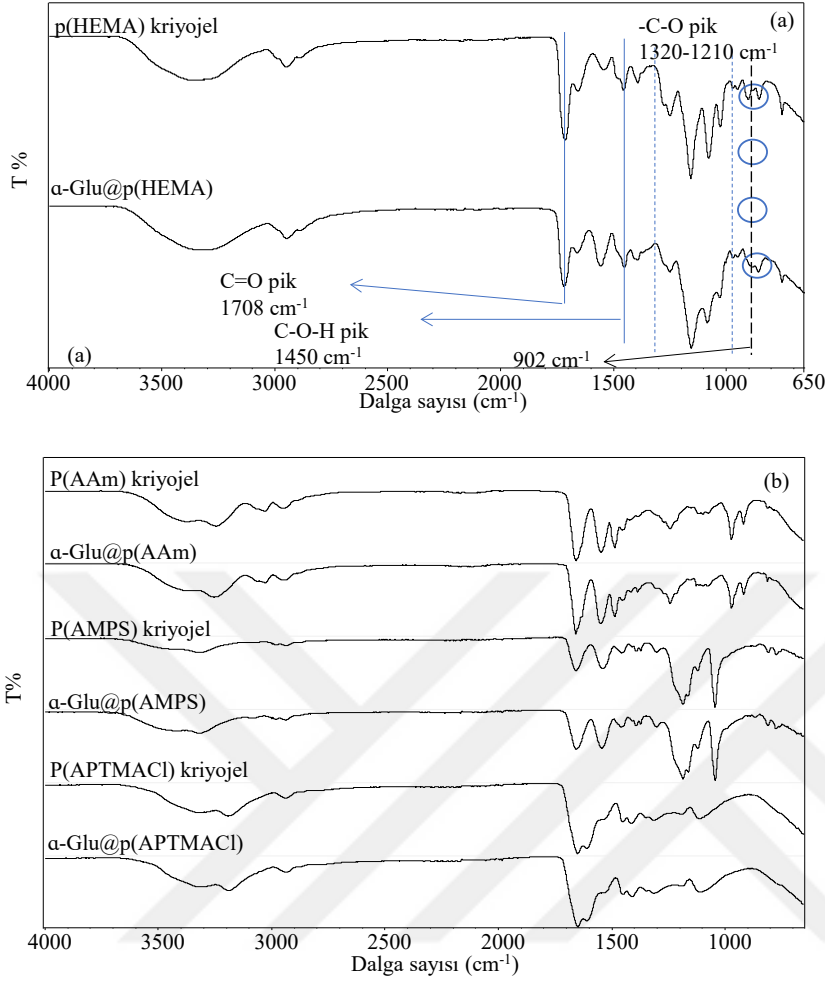


Şekil 7. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin SEM görüntüleri.

Enzim immobilizasyonu nedeniyle gözeneklerin tıkanması veya kapanmasının gerçekleşmediği açıkça görülmektedir. Bu nedenle, enziminin varlığının, kriyojellerin makro gözenekli yapısını değiştirmedeği sonucu çıkarılmıştır. Enzim@kriyojel sistemlerinin süper gözenekli olması, daha yüksek substrat difüzyon hızı ve enzimler için enzimatik reaksiyonlara hızlı yanıt için bir ortam sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

#### 4.2.3. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR analizleri

Süper makro gözenekli p(HEMA) ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları Şekil 8 (a)'da karşılaştırılmıştır. Tüm FT-IR spektrumlarında yaklaşık  $1710\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O titreşimleri, yaklaşık  $1450\text{ cm}^{-1}$ 'de C-OH gerilme pikleri ve  $1320\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$  arasındaki -C-O pikleri gibi p(HEMA) kriyojelleri için karakteristik pikler gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin spektrumunda ise yaklaşık  $902\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikin kaybolması, kriyojel gözeneklerinde enzimlerin var olduğunu göstermiştir.

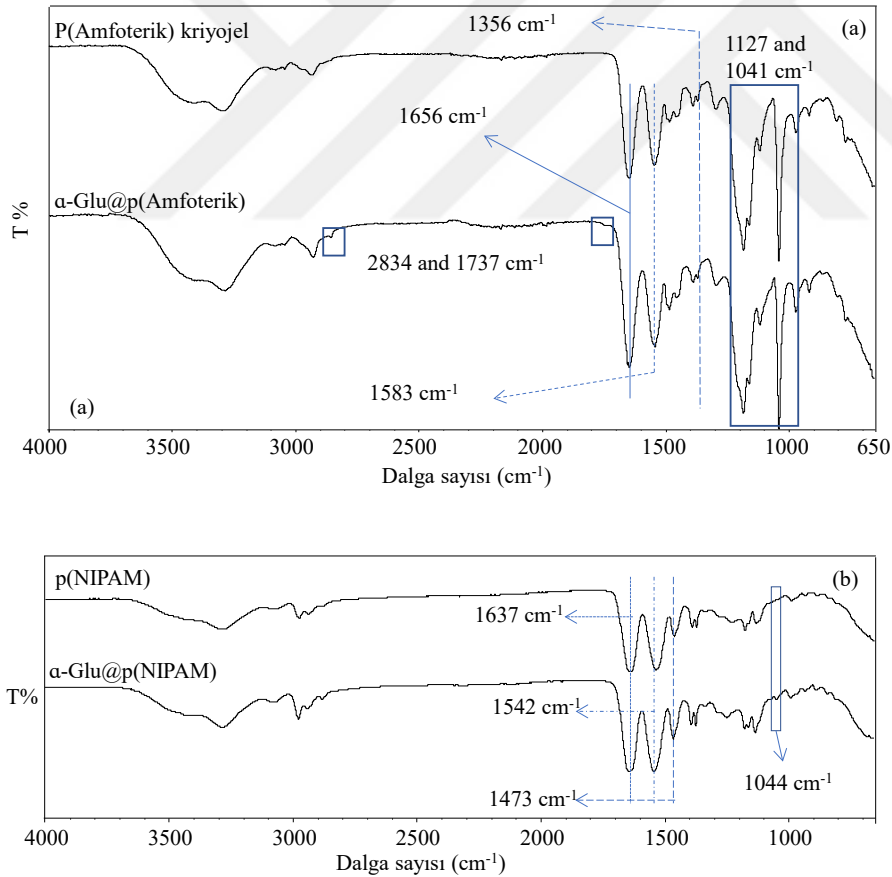


Şekil 8. (a) p(HEMA), (b) p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.

FT-IR spektrum analizi enzim içermeyen ve enzim immobilize edilmiş p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojellerinin karakterizasyonu için de yapılmış ve Şekil 8 (b)'de verilmiştir. Şekil 8 (b)'de sunulduğu gibi enzim içermeyen ve enzim immobilize edilmiş p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojellerin FT-IR spektrumları arasında çok önemli farklar yoktur. Ayrıca, enzim içermeyen ve enzim immobilize edilmiş p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojelleri, kriyojellere ait olan karakteristik pikleri de göstermiştir. Kısaca, tüm numuneler için amit gruplarından 3320 ve 3280 cm<sup>-1</sup> civarında NH<sub>2</sub> gerilme titreşimleri ve 1650 cm<sup>-1</sup> civarında C=O gerilme pikleri gözlenmiştir. Bunlardan farklı olarak, p(AMPS) ve α-Glu@p(AMPS) kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumunda sülfonik asit grupları nedeniyle 1352 ve 1121 cm<sup>-1</sup>'de asimetrik ve simetrik O-S-O gerilme titreşimleri ve 1037 cm<sup>-1</sup>'de S=O gerilme titreşimleri gözlenmiştir. Benzer

şekilde, kuaterner amonyum tuzları nedeniyle p(APTMAcI) esaslı kriyojellerin FT-IR spektrumunda yaklaşık  $1623\text{ cm}^{-1}$ 'de kuaterner amonyum pikleri gözlenmiştir.

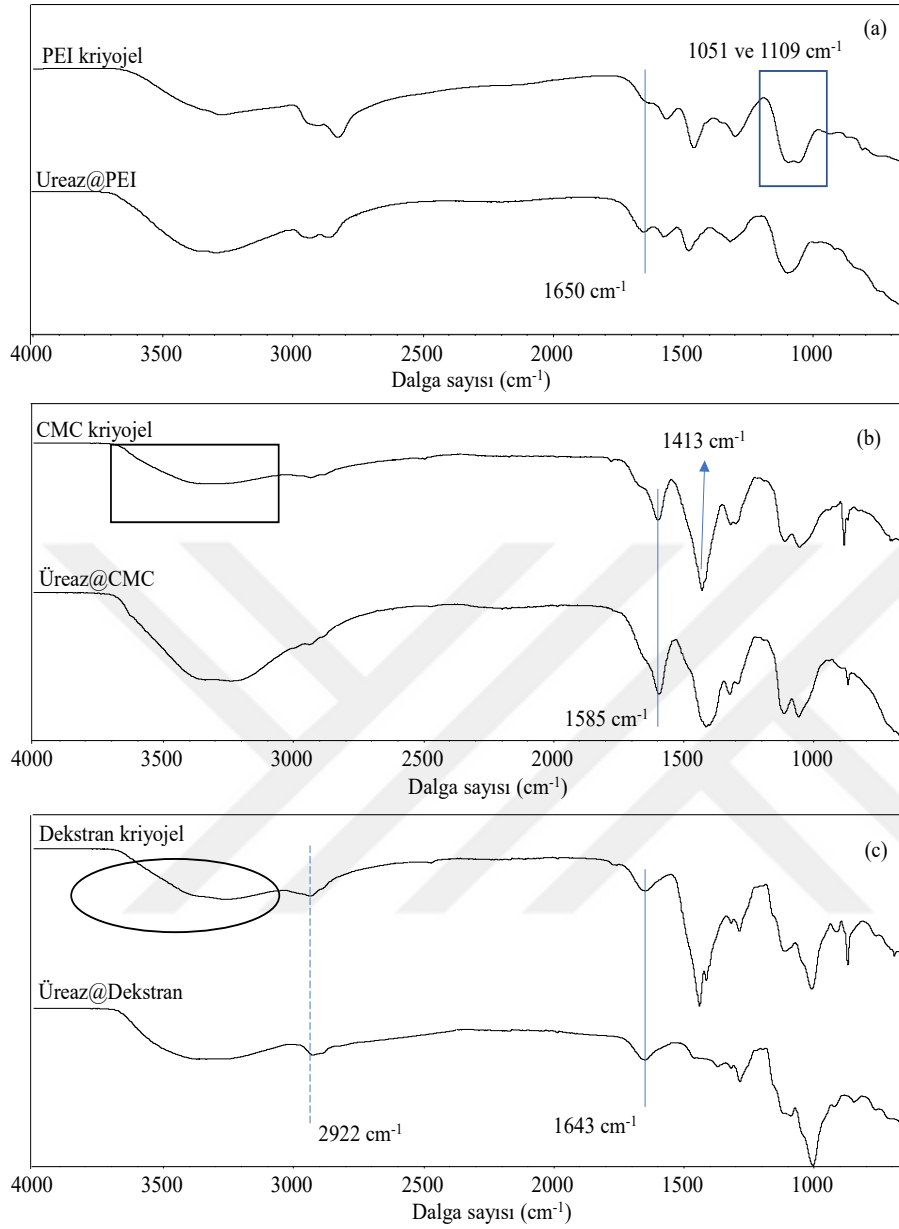
P(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları **Şekil 9 (a)**'de karşılaştırılmıştır.  $1356\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen asimetrik ve simetrik O-S-O gerilme titreşimleri ve  $1041\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen S=O gerilme titreşimleri, AMPS'nin karakteristik bandları, buna karşılık  $1656\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki kuaterner amonyum pikleri ve  $1583\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında gözlenen C=O pikleri de APTMAcI moleküllerine aittir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojeller, p(Amfoter) kriyojellerin karakteristik piklerini paylaşmıştır ve  $2834$  ve  $1737\text{ cm}^{-1}$  dalga sayılarında ortaya çıkan 2 ek pik ise  $\alpha$ -Glu enzimlerinin varlığından olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 9. (a) p(Amfoter) ve (b) p(NIPAM) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.

P(NIPAM) kriyojellerinin ve karşılık gelen  $\alpha$ -Glu enzim hapsedilmiş formlarının FT-IR spektrumları **Şekil 9 (b)**'da verilmiştir. **Şekil 9 (b)**'da verilen FT-IR spektrumlarında açıklandığı gibi, p(NIPAM) kriyojeli için en belirgin olan pikler  $1637\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O titreşimi,  $1542\text{ cm}^{-1}$ 'de ikincil aminin N-H bükülme titreşimleri ve  $1473\text{ cm}^{-1}$ 'de CN gerilme titreşimi,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için de gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemi için yaklaşık  $1044\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında gözlenen pik kriyojel gözeneklerinde enzimin olmasına bağlanmıştır.

Dallanmış zincir yapısındaki PEI ve doğal polimerler CMC ve Dekstran'dan sentezlenen kriyojeller içerisine sentez sırasında hapsetme yöntemi ile Üreaz enzimi immobilize edilen sistemlerin ve enzim içermeyen PEI, CMC ve Dekstran kriyojellerinin FT-IR spektrumları sırasıyla **Şekil 10 (a), (b) ve (c)**'de verilmiştir. **Şekil 10 (a)**'da PEI kriyojelleri ve Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumlarında PEI'ye ait karakteristik pikler olan  $3286\text{ cm}^{-1}$ 'de N-H,  $2982$  ve  $2856\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gerilmesi ve  $1602\text{ cm}^{-1}$ 'de N-H bükülmesine ait titreşim pikleri açıkça görülmektedir. Bunun yanı sıra, GDE ile çapraz bağlanması üzerine, alkol gruplarından gelen en belirgin pikler sırasıyla O-H bükülmesi ve ikincil alkolden C-O gerilmesi ise sırasıyla  $1051$  ve  $1109\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmüştür. Bununla beraber  $1650\text{ cm}^{-1}$  civarında şiddeti artan pik ise Üreaz enzimine aittir.



Şekil 10. (a) PEI, (b) CMC ve (c) Dekstran kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları.

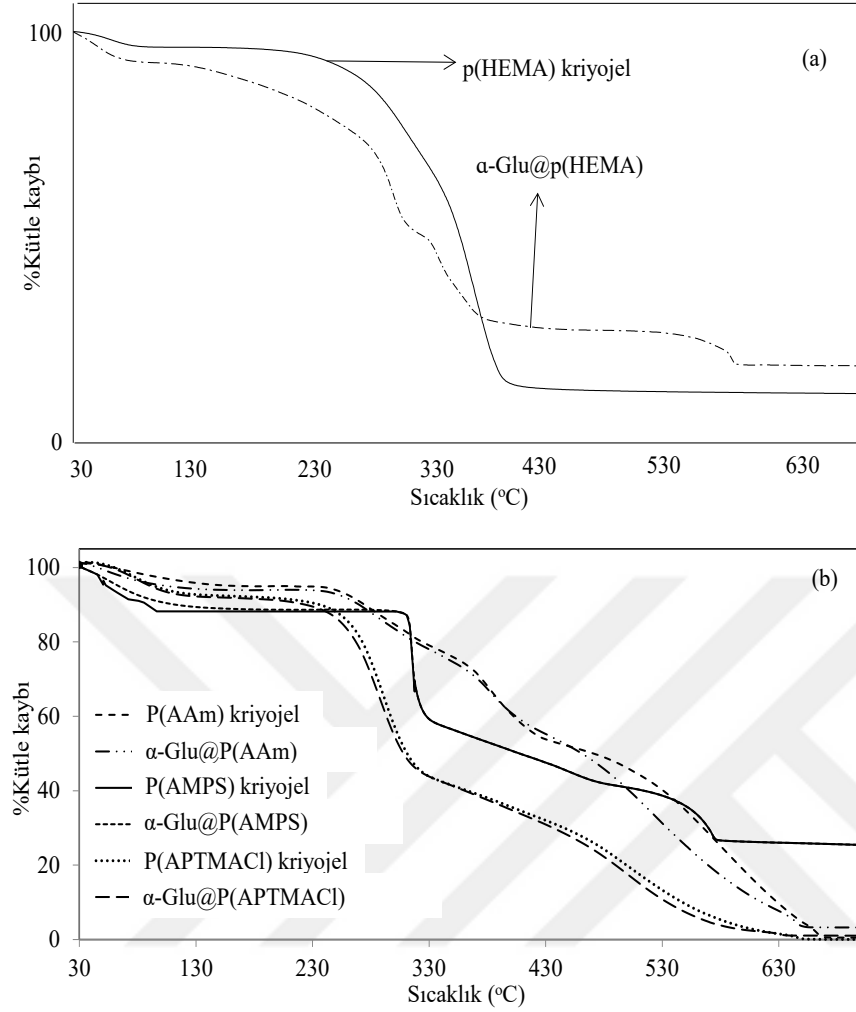
CMC kriyojellerinin ve Üreaz enzimi immobilize edilmiş formlarının FT-IR spektrumları Şekil 10 (b)'de karşılaştırılmıştır. CMC kriyojellerinin in FT-IR spektrumuna göre,  $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş pik, -OH gerilmesinden kaynaklanırken,  $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik asimetrik -CH<sub>2</sub> gerilmesine,  $1585 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise asimetrik -COO<sup>-</sup> gerilmesine,  $1413 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik -COO<sup>-</sup> simetrik gerilmesine ve  $1051 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise -CO gerilmesine atanmıştır.

Bu pikler hafif kırmızı veya mavi kaymalar ile Üreaz@CMC kriyojellerinde de gözlenmiştir ve bunlara ek olarak 1678 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen hafif bir omuz Üreaz enzimine atfedilmiştir.

**Şekil 10 (c)**'de ise Dekstran kriyojellerinin ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin FT-IR spektrumları incelenmiştir. Her iki sistem içinde dekstran polimerine ait -OH grupları için 3362 ila 3316 cm<sup>-1</sup> aralığında ve -CH grupları için 2922 ve 1643 cm<sup>-1</sup>'de karakteristik pikler ve 1313 cm<sup>-1</sup>'de DVS çapraz bağlayıcısından gelen S=O gerilme pikleri görülmüştür. Üreaz@Dekstran kriyojellerinin FT-IR spektrumlarında ise 1500-1300 cm<sup>-1</sup> arası bazı pikler kaybolmuş ve bu da Üreaz enzimin yapıya girmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

#### 4.2.4. Kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA analizleri

Enzim içermeyen p(HEMA) ve α-Glu@p(HEMA) kriyojel sistemlerinin termal kararlılıkları **Şekil 11 (a)** 'da gösterildiği gibi TGA ile karşılaştırılmıştır. P(HEMA) kriyojellerinin 250-450 °C arasında %95,2 ağırlık kaybıyla bir termal bozunma adımına sahip olduğu ve ardından 750 °C'da %97 toplam ağırlık kaybı gösterdiği gözlenmiştir. Öte yandan, α-Glu@p(HEMA) kriyojel sistemleri üç termal bozunma basamağına sahiptir ve ilk olarak enzimlerin denatürasyonu ile açıklanabilecek 100 °C ısıtmaya kadar %7,5 ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Ayrıca, α-Glu@p(HEMA) kriyojel sistemleri için sırasıyla 125–360 °C arasında başlayan bozunma adımlarında %51,7 ağırlık kaybı ve 370–440 °C arasında %76,6 ağırlık kaybı meydana gelmiştir. Ayrıca α-Glu@p(HEMA) kriyojel sistemleri için 750 °C'de %89,6 ağırlık kaybı gözlenmiştir. Bu nedenle, p(HEMA) kriyojellerinin termal dayanıklılığının, enzimlerin daha düşük termal dayanıklılığına bağlı olarak hapsedilen α-Glu enzimi ile azaldığı sonucu çıkarılmıştır.

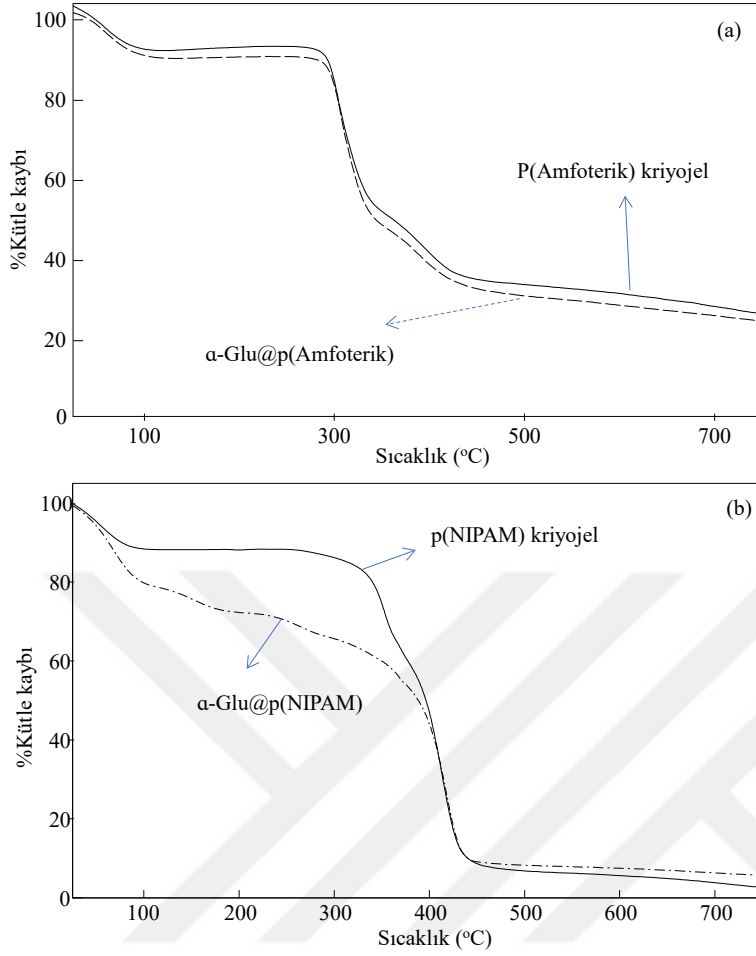


Şekil 11. (a) P(HEMA), (b) p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.

Enzim içermeyen p(AAm), p(AMPS), p(APTMAcI) kriyojellerinin TGA termogramları, sistemlerin termal kararlılıklarını anlamak için α-Glu enzimi hapsedilmiş formları ile karşılaştırılmış ve karşılık gelen TGA termogramları Şekil 11 (b)'de verilmiştir. P(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojelleri ve bunların karşılık gelen enzim hapsedilmiş formları neredeyse benzer termal dayanıklılık profili göstermiştir. Hem enzim içermeyen p(AAm) hem de α-Glu@p(AAm) kriyojelleri sırasıyla %5,0 ve %6,5 ile 30-100 °C arasında ağırlık kaybı yaşamaya başlamış ve her ikisi de %44,9 ve 42,2 ile 240-430 °C arasında ağırlık kaybına devam etmiştir. 700 °C'ye kadar her iki sistem için %99'a yakın ağırlık kaybı gözlenmiştir. Öte yandan, enzim içermeyen p(AMPS) ve α-Glu@p(AMPS) kriyojellerin termal bozunması 10-90 °C arasında başlamış ve ağırlık kayıpları sırasıyla

%10,2 ve 12,1 olarak gözlenmiştir. Ayrıca, 300-330 ve 530-570 °C arasında yaklaşık %40 ve %72 kümülatif ağırlık kaybı gözlemlenmiş ve hem enzim içermeyen p(AMPS) hem de  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) kriyojelleri için 700 °C'de yaklaşık %75 kümülatif ağırlık kaybı görülmüştür. Son olarak, enzim içermeyen p(APTMACl) ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) kriyojelleri de sırasıyla %9,2 ve %10,3 ağırlık kayıpları ile 30-110 °C arasında ağırlık kaybetmeye başlamıştır. Ayrıca 210-320 °C aralığında hem enzim içermeyen p(APTMACl) hem de  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl) kriyojellerinde yaklaşık %55 kümülatif ağırlık kaybı ve her ikisi için de 700 °C'de yaklaşık %99 kümülatif ağırlık kaybı gözlenmiştir. Özetle, 30-100 °C arasında %10 civarında gözlenen ağırlık kaybı, kriyojellerden moleküler suyun uzaklaştırılması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, 30-100 °C arasındaki enzim hapsedilmiş kriyojeller için ağırlık kaybı yüzdesinde biraz daha yüksek bir artış, enzimlerin daha düşük termal dayanıklılığının sonucu çıkarılmıştır.

Ayrıca, TGA ölçümleri ile karakterize edilen enzim içermeyen p(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemlerinin termal kararlılıkları **Şekil 12 (a)**'da karşılaştırılmıştır. Termogramlardan görülebileceği gibi enzim içermeyen p(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemleri için üç basamaklı benzer termal bozunma modelleri gözlenmiştir. Enzim içermeyen p(Amfoter) kriyojeller için ağırlık kaybı 25-90 °C arasında %6,6 ile başlayan ve kriyojellerin nem içeriği ile ilişkilendirilen bir ağırlık kaybı ile başlamıştır ve termal bozunma sırasıyla %45,6 ve %63,6 ağırlık kayıpları ile 280-340 °C ve 350-430 °C arasında devam etmiştir. Termal bozunmanın son adımı 750 °C'de %73,1 toplam ağırlık kaybı ile sonuçlanmıştır. Enzim içermeyen p(Amfoter) kriyojellere benzer şekilde  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemleri, 25-90, 280-340 ve 350-430 °C arasındaki aynı sıcaklık aralıklarında sırasıyla %8,0, %48,7 ve %65,7 toplam ağırlık kayıplarına uğradığı gözlenmiştir.

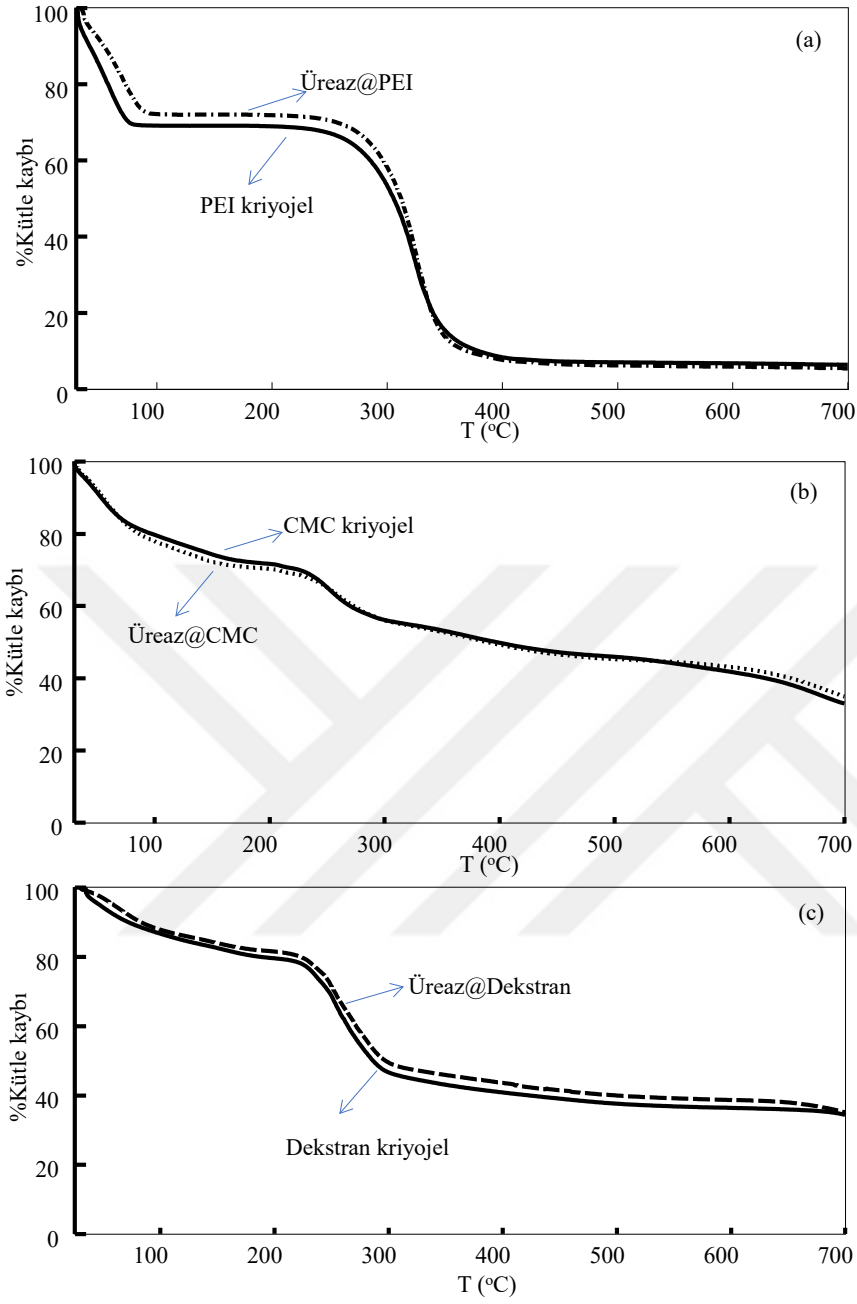


Şekil 12. (a) p(Amfoter) ve (b) p(NIPAM) kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.

P(NIPAM) kriyojellerin ve karşılık gelen  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş formlarının termal bozunması Şekil 12 (b)'de karşılaştırılmıştır. İmmobilize edilmiş enzimlerin olası denatürasyona uğramaları nedeniyle TGA termogramları doğrudan 25 °C'den başlatılmıştır. Enzim içermeyen p(NIPAM) kriyojelleri için 90 °C'ye kadar gözlenen %7,1 ağırlık kaybı, moleküller arası su veya nem giderimine bağlanmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için 90 °C'ye kadar ağırlık kaybında artış gözlenmiş ve %18,7 ağırlık kaybı moleküller arası suya ve enzimlerin daha düşük termal dayanıklılığından dolayı olduğu düşünülmüştür. Daha fazla sıcaklık artışı, ağırlık kayıplarını artırmıştır, örneğin p(NIPAM) kriyojelleri için 250-450 °C aralığında %90,4 ağırlık kaybı gözlenmiş ve 750 °C'de %96 kümülatif ağırlık kaybı ölçülmüştür. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için 100-170 °C aralığında %26,1 ağırlık kaybı gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)

kriyojel sistemleri için 210-440 °C'de %90,3 ağırlık kaybı gözlenmiştir. Son olarak, α-Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için 750 °C'deki kümülatif ağırlık kaybının %94,3 olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, genel olarak, α-Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinin termal kararlılıkları, yaklaşık 75-350 °C aralığında enzim içermeyen p(NIPAM) kriyojel ile karşılaştırıldığında biraz daha düşük sıcaklıklara düşmüştür.

Bunların yanı sıra, PEI, CMC ve Dekstran kriyojellerinin ve bunlara Üreaz enzimi immobilize edildikten sonraki termal kararlılıklarının incelenmesi için yapılan TGA analizlerine ait termogramlar sırasıyla **Şekil 13 (a), (b) ve (c)**'de verilmiştir. **Şekil 13**'den açıkça görüleceği gibi Üreaz enzimi immobilize edilmiş bütün sistemler, ilgili kriyojellerin enzim içermeyen hallerinin termal bozunma davranışları ile benzer bozunma davranışları göstermiştir. PEI kriyojeli ve Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin TGA termogramları **Şekil 13 (a)**'da verilmiştir. PEI kriyojeli ve Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin 30-100 °C aralığında sergilediği yaklaşık %30'luk kütle kaybı yapılarda bulunan muhtemel nemin uzaklaştırılmasından kaynaklanmıştır. Bunun sonrasında ise iki sistemin de 300°C'ye kadar termal olarak kararlı şekilde kütle kaybı göstermeden kalabildiği ve 300-350 °C arasında gözlenen tek bir bozunma basamağı ile yaklaşık %90 kütle kaybı yaşadığı görülmüştür.



Şekil 13. (a) PEI, (b) CMC ve (c) Dekstran kriyojel ve enzim@kriyojel sistemlerinin TGA termogramları.

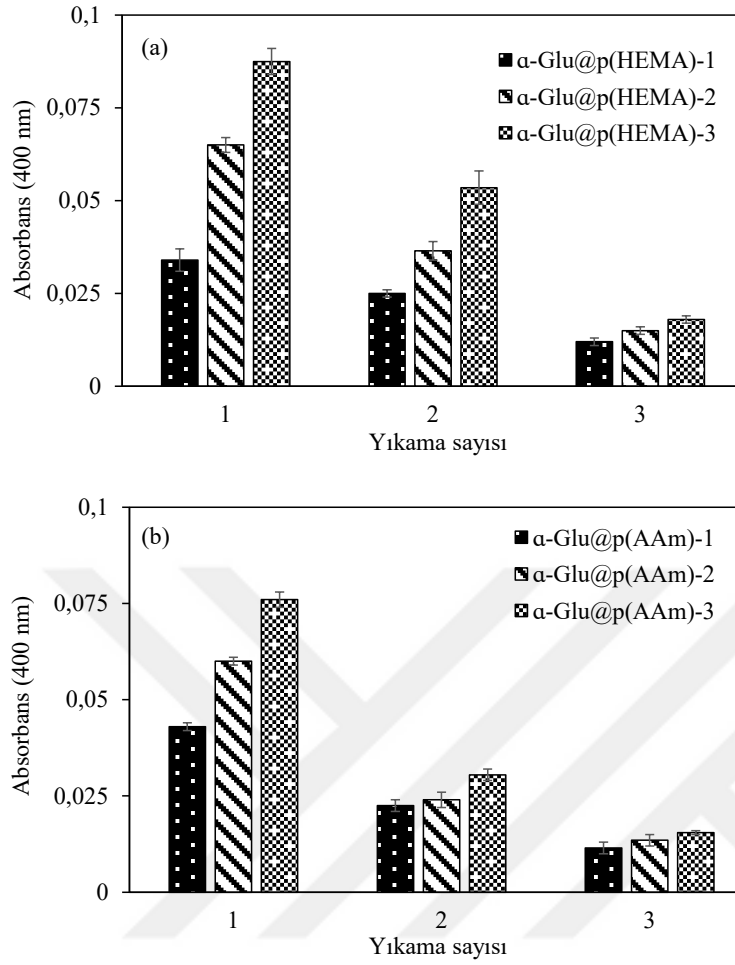
CMC kriyojeli ve Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin TGA termogramlarında Şekil 13 (b)'de verilmiş ve benzer bozunma davranışları sergiledikleri görülmüştür. Burada da, iki sistem için de 100 °C'ye kadar yapıda bulunan nemin uzaklaşmasından dolayı yaklaşık %20'lik bir kütle kaybı gözlenmiştir. Sonrasında ise 220-290 °C aralığında yine iki sistem içinde yaklaşık %40'lık bir kütle kaybı gözlenmiştir.

Dekstan ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin de **Şekil 13 (c)**'de verilen TGA termogramlarından 220 °C'ye kadar sırasıyla %21,7 ve %19,5'lik, sonrasında 220-300 °C aralığında yine sırasıyla %53,5 ve %50,8 kütle kayıplarına uğradıkları gözlenmiştir. Bu iki sistem de diğer Üreaz@kriyojel sistemleri gibi benzer termal bozunma davranışları göstermiştir.

### 4.3. Enzim@kriyojel sistemleri için immobilizasyon parametreleri

Serbest enzimlerin, hapsedme metodu ile sentez sırasında immobilize edildiği kriyojel ağ yapılarından dışarıya sızıp sızmadığı, hazırlanan enzim@kriyojel sistemlerinin yıkama çözeltilerinin ilgili serbest enzim için optimum çalışma koşullarındaki enzimatik reaksiyonlarda kullanılması ile hesaplanmıştır.

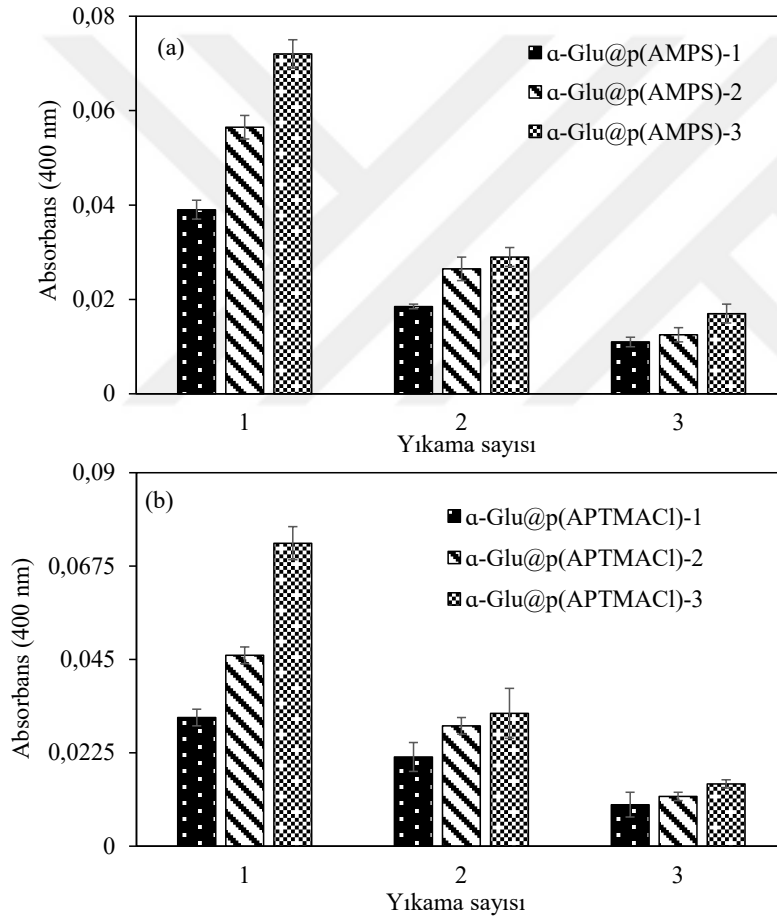
$\alpha$ -Glu@p(HEMA) ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojellerinin yıkama çözeltileri ile yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan 4-NP için 400 nm dalga boyunda gözlenen absorbans değerleri kullanılan serbest enzimin aktivitesi ile karşılaştırılmış ve **Şekil 14 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir. Serbest enzim çözeltisi ile 0,5 mL 10 mM 4-NPG substrat çözeltisinin 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tampon çözeltisi içine eklenmesi ile 37 °C sıcaklıkta yapılan enzimatik reaksiyon sonucunda 400 nm dalga boyundaki absorbans değeri 0,78 olarak ölçülmüştür. Immobilizasyon için kullanılan enzim çözeltisinin miktarının artması ile  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin yıkama çözeltileri ile yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucunda absorbans değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Immobilizasyon için kullanılan enzim çözeltisi ile eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 kriyojel sistemlerinin I. yıkama çözeltilerinin enzimatik reaksiyonda kullanılması sonucu 400 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri sırasıyla  $0,034 \pm 0,003$ ,  $0,065 \pm 0,002$  ve  $0,088 \pm 0,004$ 'tür. Absorbans değerleri III. Yıkama sonunda  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 kriyojel sistemleri için sırasıyla  $0,012 \pm 0,001$ ,  $0,014 \pm 0,001$  ve  $0,018 \pm 0,001$  olarak ölçülmüştür.



Şekil 14. (a)  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(AAm) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

$\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 kriyojel sistemlerinde enzim sızıntısının tespiti için gerçekleştirilen çalışmalara ait grafik Şekil 14 (b)'de verilmiştir. Burada da yine immobilizasyon için enzim çözeltisinin miktarı arttıkça sistemden sızan enzim miktarının arttığı ve yıkama sayısı arttıkça sızan enzim miktarının azaldığı gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 kriyojel sistemlerinden I. yıkama sonunda sızan enzim ile yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucunda ölçülen absorbans değerleri sırasıyla  $0,043 \pm 0,001$ ,  $0,060 \pm 0,001$  ve  $0,076 \pm 0,002$ 'dir. III. yıkama çözeltisi ile yapılan enzimatik reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 kriyojel sistemleri için absorbans değerleri sırasıyla  $0,011 \pm 0,001$ ,  $0,014 \pm 0,001$  ve  $0,015 \pm 0,001$  olarak ölçülmüştür. IV. yıkama çözeltisi ile yapılan deneyler de sızıntı çözeltilerinde enzimatinin gözlenmediği tespit edilmiştir.

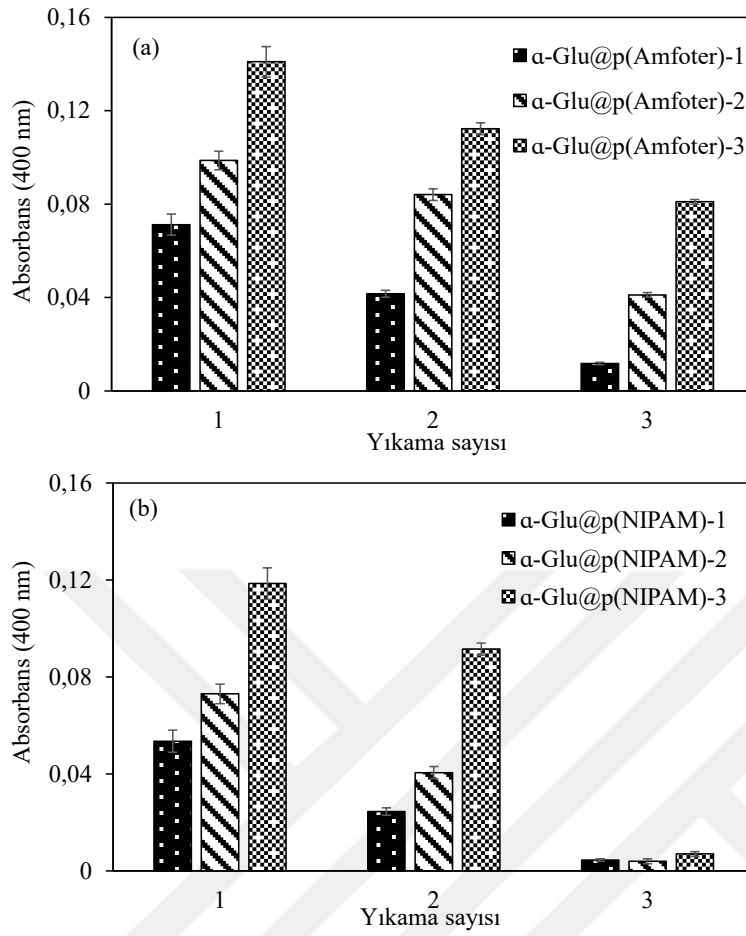
Anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı tespiti için yapılan çalışmalara ait grafikler ise sırasıyla **Şekil 15 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir. Nötral kriyojellerdeki enzim sızıntısına benzer şekilde, anyonik p(AMPS) kriyojel içerisinde immobilize edilen enzim miktarı arttıkça enzim sızıntısı artarken yıkama sayısı arttıkça sızan enzim miktarı da azalmıştır ve ilgili grafik **Şekil 15 (a)**'da verilmiştir. Buna göre I. yıkama çözeltisi ile yapılan enzimatik reaksiyonda 400 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3 kriyojel sistemleri için sırasıyla  $0,039\pm 0,002$ ,  $0,056\pm 0,003$  ve  $0,072\pm 0,003$  iken, bu değerler III. yıkama çözeltileri için sırasıyla  $0,011\pm 0,001$ ,  $0,013\pm 0,002$  ve  $0,017\pm 0,002$  olarak ölçülmüştür.



**Şekil 15.** (a)  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)), 5 mL pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-3 kriyojel sistemlerinin I. yıkama çözeltileri ile yapılan enzimatik reaksiyonlarda **Şekil 15 (b)**'de verilmiş ve 400 nm dalga boyunda ölçülen absorban değerleri sırasıyla  $0,031\pm 0,02$ ,  $0,046\pm 0,003$  ve  $0,073\pm 0,007$ 'dir ve bu değerler III. yıkama çözeltisi ile yapılan reaksiyonda  $0,010\pm 0,001$ ,  $0,012\pm 0,001$  ve  $0,015\pm 0,001$  olarak tespit edilmiştir. Anyonik ve katyonik kriyojeller ile hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojellerinin ikisi içinde IV. yıkama çözeltileri için herhangi bir absorban değeri ölçülemediği ve daha fazla enzim sızıntısının olmadığı anlaşılmıştır.

$\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojellerinin enzim sızıntısı çalışmaları sonunu ölçülen absorban değerlerine dair grafikler sırasıyla **Şekil 16 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir. Burada diğer anyonik AMPS ve katyonik APTMAcI monomerlerinin kriyojenik şartlarda kriyokopolimerizasyonu ile sentezlenen p(Amfoter) kriyojel içerisine immobilize edilen  $\alpha$ -Glu enzimin sızıntı çalışmasına ait grafik **Şekil 16 (a)**'da verilmiştir. Ölçülen sonuçlardan immobilizasyon için kullanılan enzimin miktarı arttıkça sistemden sızan enzim miktarı da artmış ve yıkama sayısı arttıkça sızan enzim miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Yıkama çözeltileri ile yapılan enzimatik reaksiyonlarda I. yıkama sonunda  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojel sistemleri için 400 nm dalga boyunda ölçülen absorban değerleri sırasıyla  $0,064\pm 0,005$ ,  $0,089\pm 0,004$  ve  $0,132\pm 0,009$ 'dur.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojel sistemlerinin III. yıkama çözeltileri için  $0,005\pm 0,001$ ,  $0,031\pm 0,002$  ve  $0,072\pm 0,006$  absorbas değerleri ölçülürken, IV. yıkamada herhangi daha fazla enzim sızıntısı olmadığı gözlenmiştir.

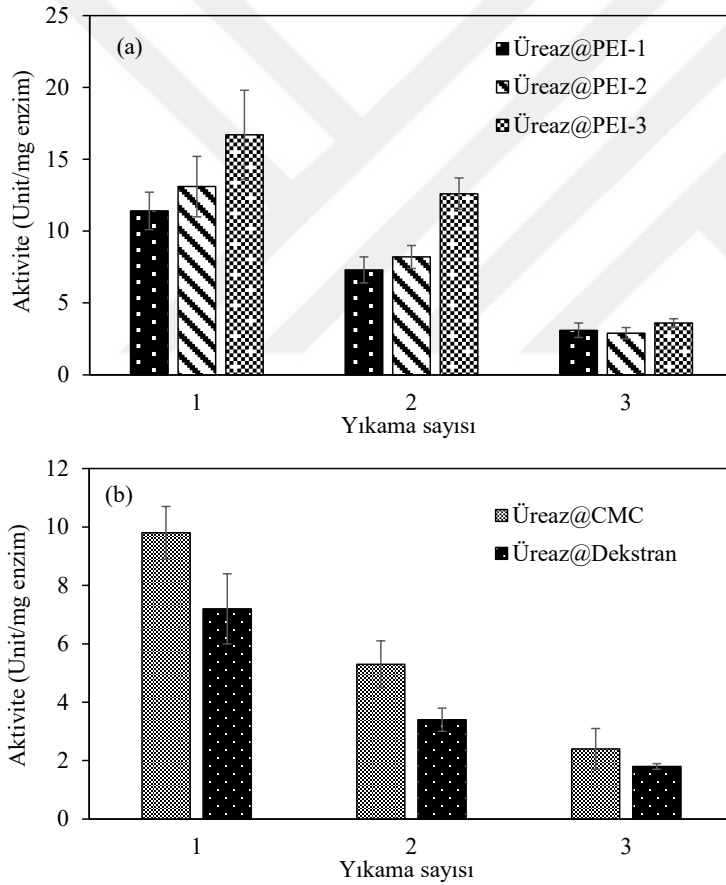


Şekil 16. (a)  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Sıcaklık duyarlı  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısına ait grafik Şekil 16 (b)'de verilmiştir ve diğer  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş kriyojel sistemleri gibi sistemden sızan enzim immobilizasyon sırasında kullanılan enzim miktarı arttıkça artmış ve yıkama sayısı arttıkça enzim sızıntısı azalmıştır. IV. yıkama sonunda daha fazla enzim sızıntısının olmadığı gözlenmiştir.

Tez kapsamında kullanılan diğer model enzim olan Üreazın da sentetik PEI ve doğal polimer CMC ile Dekstran kriyojellerinden sızıntısı için benzer metot kullanılmış ve yıkama çözeltileri enzimatik reaksiyonda kullanılarak hesaplanan aktivite değerlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 17'de verilmiştir. Burada, yıkama çözeltileri Üreaz enzimi için optimum

koşullar olan pH 7,0 sodyum fosfat tamponu ve 25 °C'deki enzimatik reaksiyonda kullanılmıştır. İmmobilizasyon için kullanılan serbest enzim çözeltisinin aktivitesi 277,3±22,9 Unit/mg protein olarak hesaplanmıştır ve Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojellerinin yıkama çözeltilerinin aktivitesinin immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı artması ile arttığı **Şekil 17 (a)** açıkça görülmüştür. Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojellerinin I. yıkama çözeltilerinin aktivitesi sırasıyla 11,4±1,3, 13,1±2,1 ve 16,7±3,1 Unit/mg protein olarak hesaplanırken bu değerlerin III. yıkama çözeltilisinde sırasıyla 3,1±0,5, 2,9±0,4 ve 3,6±0,3 Unit/mg protein seviyelerine düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 17. (a) Üreaz@p(PEI), (b) Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı çalışmaları [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Enzim sızıntısı çalışmalarıyla bağlantılı olarak hesaplanan immobilizasyon verimi ve immobilizasyon etkinliği değerleri  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş sentetik kriyojel sistemleri için **Tablo 2**'de verilmiştir. Enzim sızıntısı deneylerinden elde edilen verilerle  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin %immobilizasyon verimi hesaplamaları karşılık gelen eşit miktarlardaki serbest enzimin aktivitesi %100 varsayılarak yapılmıştır. Burada, %immobilizasyon verimi hesaplamaları III yıkama sonunda enzim@kriyojel sisteminden sızan toplam enzim miktarına göre yapılmıştır. Genel olarak  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinde immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttıkça sistemlerin immobilizasyon veriminin düştüğü gözlenmiştir. Enzim sızıntısı çalışmalarından hesaplanan ve **Tablo 2**'de özetlenen %immobilizasyon verimi değerleri nötral  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 kriyojel sistemleri için sırasıyla %91±1, %85±2 ve %79±3 olarak hesaplanırken,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 kriyojel sistemleri için sırasıyla %97±2, %93±2 ve %80±2 olarak hesaplanmıştır. Anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3 kriyojel sistemleri için %immobilizasyon verimi değerleri sırasıyla %96±1, %92±1 ve %78±2 olarak hesaplanırken, katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-3 kriyojel sistemleri içinde bu değerler sırasıyla %97±1, %92±1 ve %75±3 olarak benzer davranışlar göstermişlerdir. Anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinde elde edilen yüksek %immobilizasyon verimi değerlerine rağmen, anyonik AMPS ve katyonik APTMAcI monomerlerinden sentezlenen  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojel sistemleri için %immobilizasyon verimi değerleri sırasıyla %83±4, %68±3 ve %46±5 olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık duyarlı  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemleri için ise immobilizasyon verimi değerleri sırasıyla %89±3, %85±2 ve %72±5 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2

$\alpha$ -Glu@kriyojel sistemleri için hesaplanan %immobilizasyon verimi ve %immobilizasyon etkinliği değerlerinin karşılaştırılması

Kriyojel	İmmobilizasyon verimi %	Enzim miktarı (mg/g)	İmmobilizasyon etkinliği %
$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1	91±1	0,12±0,03	92±2
$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2	85±2	0,22±0,04	85±2
$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3	79±3	0,41±0,03	86±4
$\alpha$ -Glu@p(AAm)-1	97±2	0,25±0,02	81±3
$\alpha$ -Glu@p(AAm)-2	93±1	0,48±0,05	59±2
$\alpha$ -Glu@p(AAm)-3	80±2	0,82±0,04	48±2
$\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1	96±1	0,30±0,03	61±2
$\alpha$ -Glu@p(AMPS)-2	92±1	0,58±0,04	52±1
$\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3	78±2	0,99±0,05	37±1
$\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1	97±1	0,24±0,03	50±2
$\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-2	92±1	0,45±0,04	34±1
$\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-3	75±3	0,74±0,03	26±1
$\alpha$ -Glu@p(Amfoterik)-1	83±4	0,15±0,02	91±2
$\alpha$ -Glu@p(Amfoterik)-2	68±3	0,24±0,02	76±3
$\alpha$ -Glu@p(Amfoterik)-3	46±5	0,32±0,02	57±5
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1	89±3	0,28±0,03	66±3
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2	85±2	0,54±0,06	57±1
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3	72±5	0,91±0,03	40±1

Enzim sızıntısı ve immobilizasyon verimi hesaplamalarından elde edilen veriler ile 1 gram kriyojel içerisinde immobilize edilmiş enzim miktarı mg olarak hesaplanmış ve **Tablo 2**'de verilmiştir. Buna göre immobilizasyon için kullanılan enzim çözeltisinin miktarı arttıkça immobilize edilmiş enzim miktarının arttığı belirlenmiştir. İmmobilizasyon verimi yüzdesinin azalması immobilize edilecek enzim miktarının artması ile kriyojel ağ yapısında

sızıntısının artması ile orantılıdır. Ayrıca kullanılan kriyojel yapısında yüzeye tutunan enzim miktarının immobilizasyon için kullanılan enzim çözeltisi miktarının artması ile doğru orantılı olarak enzim sızıntısının daha fazla olabileceği sonucuna varılmıştır.

İmmobilizasyon veriminden farklı olarak, immobilizasyon etkinliği terimi, eşit miktarda serbest enzime göre immobilize edilmiş enzim aktivitesinin yüzdesini tanımlamak için kullanılır (Boudrant vd., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013). %100 immobilizasyon verimi ve %0 immobilizasyon etkinliği, tüm enzimlerin desteğe immobilize olduğu, ancak herhangi bir nedenle enzimin deaktivasyonu veya erişilemezliği nedeniyle aktivite göstermediği anlamına gelir (Boudrant vd., 2020; Sheldon ve van Pelt, 2013) bu da enzim immobilizasyonunun başarısız olduğunun göstergesidir. Değişik miktarlarda  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş nötral p(HEMA), p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), anyonik ve katyonik grupları bir arada içeren p(Amfoter) ve sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojelleri için hesaplanan %immobilizasyon etkinliği değerleri de **Tablo 2**'de özetlenmiştir. Burada serbest enzimin hesaplanan aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve enzim immobilize edilmiş sistemler ile yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucunda hesaplanan aktivite değeri ile oranlanarak %immobilizasyon etkinliği değerleri hesaplanmıştır. Bütün  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş kriyojel sistemleri için %immobilizasyon etkinliği değerlerinin immobilizasyon için kullanılan enzimin miktarının artması ile azaldığı gözlenmiştir. Nötral  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemleri için gözlenen  $92 \pm 2$  ve  $81 \pm 3$  immobilizasyon etkinliği değerleri anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için hesaplanan  $61 \pm 2$  ve  $50 \pm 2$  değerlerinden daha yüksek çıkmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojellerinin %immobilizasyon etkinliği değerleri, karşılık gelen eşit miktarlardaki serbest enzimin aktivitesi %100 aktivite varsayılarak hesaplanmış ve sırasıyla  $91,3 \pm 1,7$ ,  $76,1 \pm 3,2$  ve  $56,8 \pm 4,9$  olarak bulunmuştur. Bu değerler sıcaklık duyarlı  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemleri için pH 6,8 ve 37 °C'de gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar sonucu sırasıyla  $66 \pm 3$ ,  $57 \pm 1$  ve  $40 \pm 1$  olarak hesaplanmıştır. Enzim sızıntısı ve immobilizasyon verimi hesaplamalarından sonra ilgili p(HEMA), p(AAm)

Doğal polimerler olan CMC ve Dekstran'dan sentezlenen kriyojeller içerisinde immobilize edilen Üreaz enziminin sistemden sızmasının incelenmesi için yapılan

çalışmalara ait grafik **Şekil 17 (b)**'de verilmiştir. Buna göre yapılan çalışmada, yıkama sayısının artması ile sistemden sızan enzim miktarının azaldığı anlaşılmıştır. Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinde I., II. ve III. yıkama çözeltileri ile yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucu elde edilen aktivite değerleri sırasıyla  $9,8 \pm 0,9$ ,  $5,3 \pm 0,8$  ve  $2,4 \pm 0,6$  Unit/mg enzim olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin de yıkama çözeltilerinin kullanılması ile yapılan reaksiyonlarda I., II. ve III. yıkama çözeltileri için aktivite değerleri sırasıyla  $7,2 \pm 1,2$ ,  $3,4 \pm 0,4$  ve  $1,8 \pm 0,1$  olarak hesaplanmıştır.

%immobilizasyon etkinliğinde immobilizasyon için kullanılan enzim miktarındaki artış ile gözlenen azalma, kriyojel ağı içindeki enzimlerin kümelenmesinden ve kriyojel gözenek duvarları içine gömülmesinden dolayı enzimatik aktivitenin kaybı veya taşıyıcı matriks içinde kümelenmiş enzimlere substrat moleküllerinin erişememesi ile açıklanabilir (Boudrant vd., 2020). Bir başka deyişle, kullanılan kriyojellerin gözenek duvarları içinde daha yüksek miktarlarda enzim hapsedilmesi, kümelenme nedeniyle aktif bölgelerin işgal/bloke edilmesiyle enzimatik aktivitelerin azaltılmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Kriyojellerin iyonik yapısı ortamın pH'ına bağlı şişme kapasitesini etkileyebileceğinden ve anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMACI) kriyojellerinin yükleri ve yük oluşturma kapasitesi ortamın pH'ına ve iyonik gücüne bağlıdır (Drozdov ve Christiansen, 2015). Enzimatik reaksiyon şartlarında, pH 6,8'de, gerçekleştiren  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilen nötral p(HEMA) ve p(AAm) kriyojellerinin,  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilen anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMACI) kriyojellerine göre daha yüksek %immobilizasyon etkinliği göstermesi bu şekilde açıklanabilir.

Üreaz enzimin immobilize edildiği sentetik PEI, doğal polimer CMC ve Dekstran kriyojelleri için %immobilizasyon verimi ve etkinliği değerleri **Tablo 3**'te karşılaştırılmıştır. Enzim sızıntısı deneylerinden elde edilen verilerle Üreaz@kriyojel sistemlerinin %immobilizasyon verimi hesaplamaları karşılık gelen eşit miktarlardaki serbest enzimin aktivitesi %100 varsayılarak yapılmıştır. Burada, %immobilizasyon verimi hesaplamaları III yıkama sonunda Üreaz@kriyojel sisteminden sızan toplam enzim miktarına göre yapılmıştır. Üreaz@PEI kriyojelleri enzim sızıntısı çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile hesaplanan %immobilizasyon verimi değerleri Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemleri için sırasıyla  $92 \pm 1$ ,  $91 \pm 2$  ve  $88 \pm 3$  olarak hesaplanmış ve immobilizasyon

için kullanılan enzim miktarı arttıkça %immobilizasyon veriminin azalmasına rağmen hazırlanan Üreaz@PEI kriyojel sistemleri için yaklaşık %90 civarında immobilizasyon verimi elde edilmiştir. Immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttıkça %immobilizasyon verimliliğinin düşmesinin sebebi olarak immobilizasyon sırasında yüzeye tutunmuş olan enzim miktarının artması ve yüzeye tutunmuş olan enzimlerin sistemden daha kolay sızması olarak düşünülmüştür. Immobilizasyon etkinliği değerleri immobilize edilmiş enzim miktarının artması ile arttığı gözlemlenmiştir. Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemleri için %immobilizasyon etkinliği değerleri sırasıyla %89±2, %90±3 ve %92±4 olarak hesaplanmıştır. Immobilizasyon etkinliği değerlerinin de immobilize edilmiş enzim miktarı ile artmasının sebebi PEI kriyojel yapısının içinde daha fazla enzim olması ile açıklanmıştır.

Tablo 3

Üreaz@kriyojel sistemleri için hesaplanan %immobilizasyon verimi ve %immobilizasyon etkinliği değerlerinin karşılaştırılması

Kriyojel	İmmobilizasyon verimi %	Enzim miktarı (mg/g)	İmmobilizasyon etkinliği %
Üreaz@PEI-1	92±1	1,4±0,1	89±2
Üreaz@PEI-2	91±2	2,9±0,3	90±3
Üreaz@PEI-3	88±3	5,5±0,6	92±4
Üreaz@CMC	94±1	19,5±1,1	37±4
Üreaz@pDekstran	96±1	12,1±1,4	44±3

Üreaz enziminin immobilize edildiği doğal polimerlerden hazırlanan CMC ve Dekstran kriyojel sistemleri için immobilizasyon verimi her iki sistem içinde %90'ın üzerinde elde edilmiştir. Üreaz@CMC kriyojel sistemi için immobilizasyon verimi %94±1, Üreaz@Dekstran kriyojelleri için ise %96±1 olarak bulunmuştur. Bu kadar yüksek immobilizasyon verimi elde edilmesine rağmen hazırlanan sistemler içerisinde elde edilen en yüksek immobilizasyon etkinliği değerleri aynı miktardaki serbest Üreaz enziminin aktivitesine göre sırasıyla %34±4 ve %44±3 olarak Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri için ölçülmüştür.

#### **4.4. Serbest ve immobilize edilmiş enzim sistemlerinin enzimatif aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

Serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren enzim@kriyojel sistemlerinin ilgili enzimatif reaksiyonlarda gösterdikleri enzimatif aktivitelerde enzim miktarı, inkübasyon zamanı, sıcaklık ve pH gibi faktörlerin etkileri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

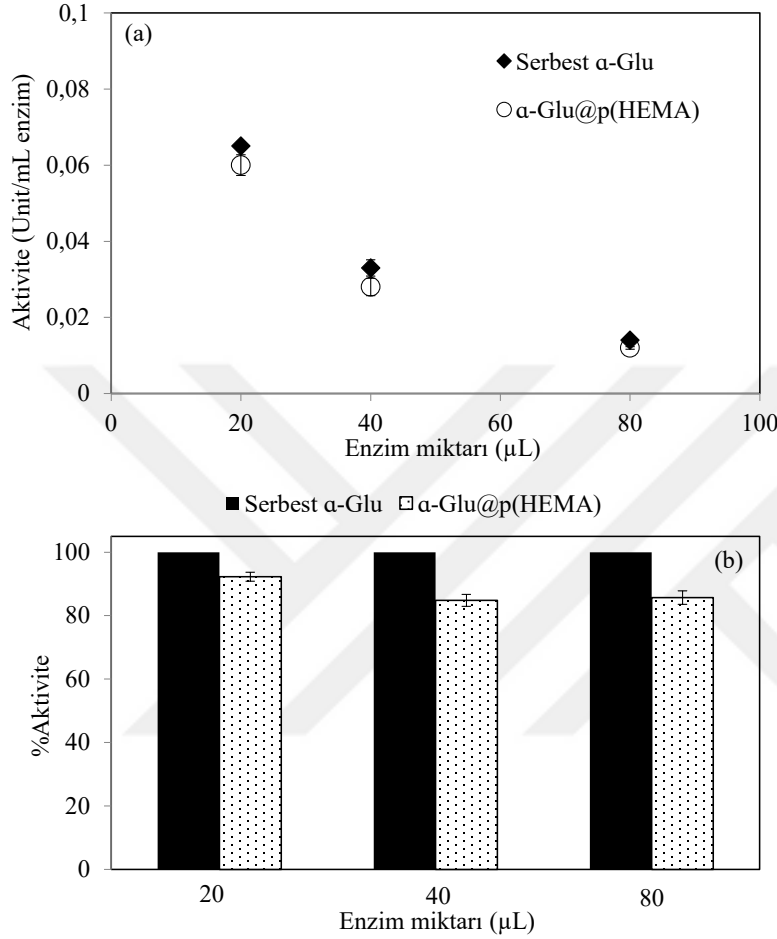
##### **4.4.1. $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin enzimatif aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş nötral p(HEMA), p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), hem anyonik hem de katyonik gruplar içeren p(Amfoter) ve sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojellerinin enzimatif aktivitelerinin karşılaştırılmaları yapılmıştır. Enzimatif reaksiyonlar, 0,5 mL 4-NPG substrat çözeltisi ve 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak 37 °C'de 20 dk'da gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivitesi **Şekil 3**'te verilen enzim-4-NPG reaksiyonunun 4-NP ürünü izlenerek ölçülmüştür.

##### **$\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojel sistemlerinin enzimatif aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

Farklı miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin aktivitesi hesaplanmış ve aynı miktarda serbest enzim ile karşılaştırılmıştır ve karşılık gelen grafik **Şekil 18 (a)**'da verilmiştir. Hazırlanan enzim stok çözeltisinin aktivitesi 20, 40 ve 80  $\mu$ L enzim çözeltileri için sırasıyla  $0,065 \pm 0,003$ ,  $0,031 \pm 0,002$  ve  $0,015 \pm 0,003$  Unit/mL enzim olarak hesaplanmıştır. İmmobilize edilen enzim miktarındaki artışla birlikte hem serbest hem de immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivitelerinde azalma olduğu açıktır.  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojellerinin aktivitesi 0,06 Unit/mL enzim olarak ölçülürken, aktivite değerlerinin immobilizasyon sırasında kullanılan enzim çözeltisinin hacminin artmasıyla

azaldığı ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 kriyojelleri için sırasıyla 0,028 ve 0,012 Unit/mL enzimi olduğu tespit edilmiştir.

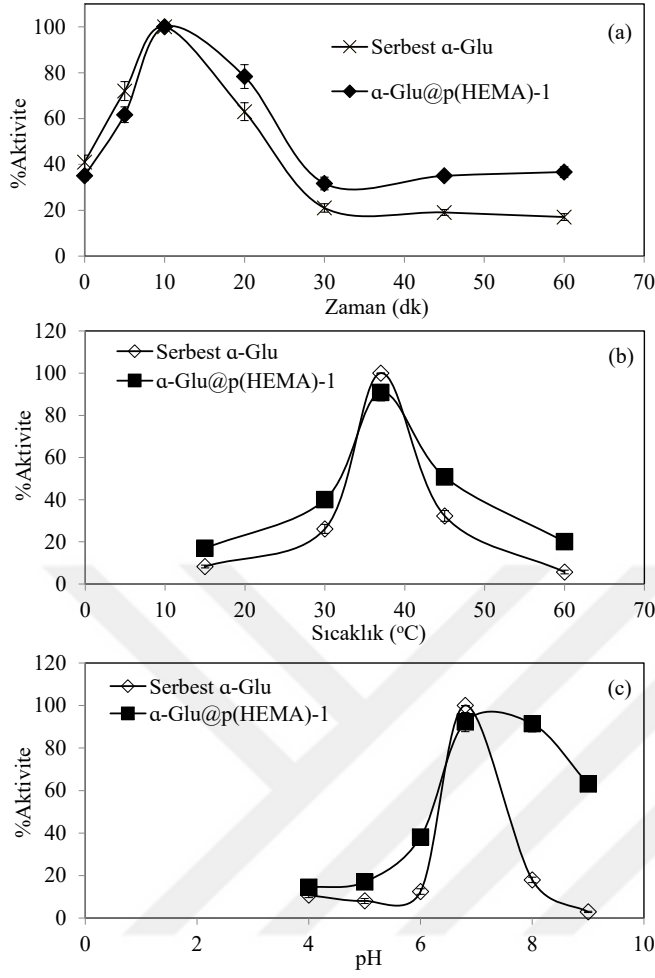


Şekil 18. Değişik miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin ve eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Hem serbest hem de immobilize edilmiş enzim aktivitesindeki azalma, enzimin aktif bölgesinin aynı substrat için yarışma eğilimi ile açıklanabilir. Immobilize edilmiş enzimlerin miktarlarındaki daha fazla artış, kapalı bir alanda aşırı kalabalık enzimler nedeniyle enzim kümeleşmelerine yol açarak, substrat için aktif bölgeleri azaltmış ve aktiviteyi düşürebileceği öngörülmektedir (Wang vd., 2013). Serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin aktivite yüzdesindeki azalma da Şekil 18 (b)'de karşılaştırılmıştır ve görüldüğü gibi  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-2, ve  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-3 kriyojelleri, eşit serbest

enzim miktarına göre sırasıyla %92,3±1,4, %84,8±1,9 ve %85,7±2,1 olarak aktivitelerini korumuştur.

İnkübasyon süresi, pH ve sıcaklığın  $\alpha$ -Glu@p(HEMA) kriyojellerinin %aktivitesine etkisinin araştırılması ve serbest enzim ile karşılaştırılması için en yüksek aktivite yüzdesine sahip olduğu gözlenen  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri kullanılmıştır. Enzimatik aktiviteye inkübasyon süresinin etkisinin araştırılması için yapılan çalışmaya ait grafik **Şekil 19 (a)**'da verilmiştir. Serbest enzimler, 5, 10, 20, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde substrat çözeltisi eklenmeden önce pH 6,8 5 mL potasyum fosfat tampon çözeltisi içinde ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi 10 dakikaya kadar serbest enzimlerin %aktivitesinin arttığı, inkübasyon süresinin bundan arttırılmasıyla %aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Benzer şekilde,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri de 5, 10, 20, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde substrat çözeltisi eklenmeden önce pH 6,8 5 mL potasyum fosfat tampon çözeltisinde ve 37°C'de inkübe edilmiştir. **Şekil 18 (a)**'da görülebileceği gibi,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojeller için, 10 dakikalık inkübasyon süresi neticesinde maksimum aktivite gözlemlenmiştir ve bu nedenle,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojelleri için optimum inkübasyon süresi 37°C'de 10 dakika olarak kabul edilmiştir. Enzimlerin depolanması için gereken 5 °C ve altındaki sıcaklıklarda ve enzimlerin optimum reaksiyon koşullarında çok fazla kaldıklarında bile aktivitelerini kaybedebilecek kadar hassas katalizörler olması ile inkübasyon süresinin artmasıyla aktivitede meydana gelen azalma açıklanabilir (Worthington vd., 2016).



Şekil 19.  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojellerinin ve eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) inkübasyon süresi, (b) sıcaklık ve (c) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].

Enzimatik reaksiyonlar dahil her türlü reaksiyon için reaksiyon sıcaklığı çok önemli olduğundan,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri için reaksiyon sıcaklığının etkisi pH 6,8 potasyum fosfat tamponunda 15, 30, 37, 45 ve 60 °C ortam sıcaklığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 19 (b)'de aynı miktarda serbest enzimle karşılaştırılmıştır. Buna göre, hem serbest  $\alpha$ -Glu hem de  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri için optimum çalışma sıcaklığının 37 °C olduğu görülmüştür. Ayrıca  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemlerinin aktivite yüzdelerinin, 30 °C'de  $40 \pm 2,5$ 'ini korurken, bu değer 15 °C'de  $17 \pm 1,3$ 'e düşmüştür. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri ise 30 ve 15 °C'de aktivitelerinin sırasıyla  $26 \pm 2,1$  ve  $8 \pm 0,7$ 'sini korumuştur. Bununla beraber reaksiyon ortamının sıcaklığı 45 ve 60 °C'ye

çıkarıldığı zaman, hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojellerinin %aktivitesi sırasıyla  $51 \pm 2,2$  ve  $20 \pm 1,8$  olarak gözlenirken, serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri aynı reaksiyon koşullarında sırasıyla  $32 \pm 2,6$  ve  $6 \pm 0,6$  gibi daha düşük aktivite yüzdesi göstermiştir.

Özetle, serbest  $\alpha$ -Glu veya  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri için optimum sıcaklıktan,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'den, normal sentetik katalizörler için yaygın bir durum olduğu gibi, aktivite yüzdesi için daha yüksek değerlere kayma yoktur. Ayrıca,  $\alpha$ -Glu enzimlerinin p(HEMA) kriyojellerine hapsedilmesinin, bu enzim sisteminin termal dayanıklılığını serbest  $\alpha$ -Glu enzimine göre biraz daha arttırdığı gözlenmiştir. Bu, p(HEMA) kriyojellerinin gözenekleri ve gözenek duvarları içinde tutulan  $\alpha$ -Glu enzimlerinin, örneğin sıcaklık gibi zorlu koşullara karşı korunabilmesi,  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktif yapısını sağlam bir şekilde daha kararlı hale getirmesi ile açıklanabilir (Fan vd., 2016; Pan vd., 2009).

Enzimatik reaksiyonlarda inkübasyon süresi ve sıcaklık kadar ortamın pH'ı da çok önemlidir. Bu nedenle, reaksiyon pH'ının  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojellerinin ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin %aktivitesi üzerindeki etkisi pH 4,0-9,0 aralığında ve  $37\text{ }^\circ\text{C}$  reaksiyon sıcaklığında yapılan enzimatik reaksiyonlar ile karşılaştırılmış ve **Şekil 19 (c)**'de verilmiştir. Enzimatik reaksiyon ortam pH'ının  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri ve eşit miktarlarda serbest enzimin %aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde  $\alpha$ -Glu enziminin p(HEMA) kriyojeli içerisinde immobilizasyonu ile optimum çalışma pH'ının değişmediği gözlenmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu ve immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivite değerinin daha yüksek pH değerlerine kıyasla pH 4,0, 5,0 ve 6,0 potasyum fosfat tamponlarında daha düşük olduğu gözlenmiştir. İlginç olarak, daha yüksek çözelti pH'larında,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojelleri, pH 8,0 ve 9,0'da serbest enzimlerden çok daha yüksek %aktivite sergilemiştir. Ayrıca pH 7,0 ile 8,0 arasında, immobilize edilmiş enzimlerin %aktivite değerlerinde çok az değişiklik vardır. Örneğin,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri pH 7,0'da  $92 \pm 4,5$  aktivite değerlerine sahipken, pH 8,0'da aktivitesinin  $91 \pm 3,8$ 'ini korumuştur.

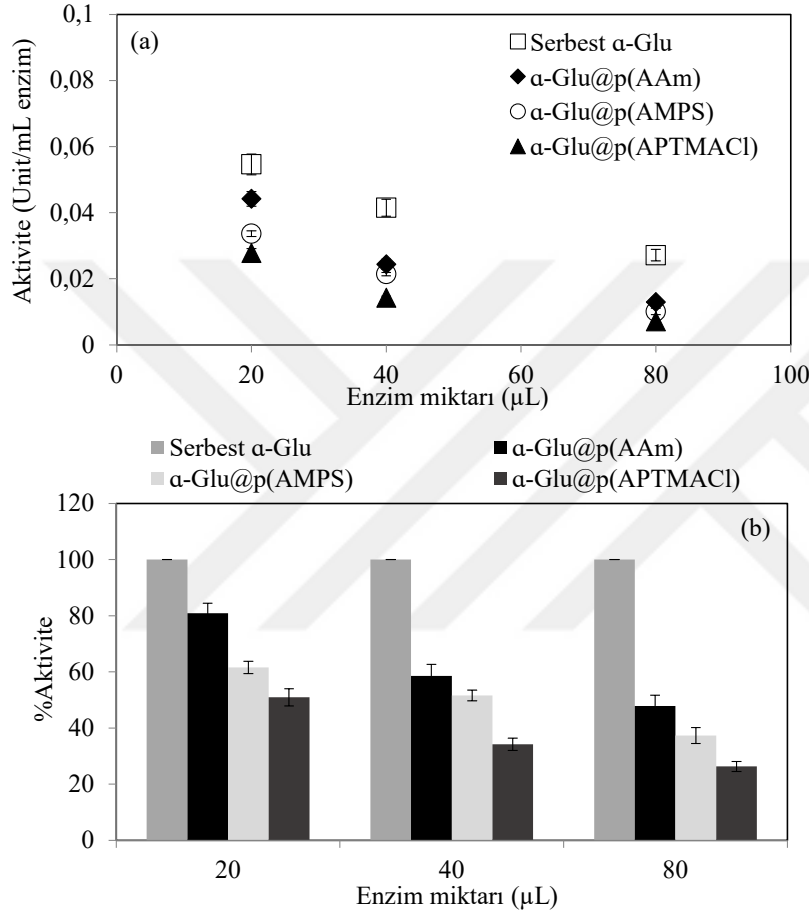
Özetlemek gerekirse, p(HEMA) kriyojeli içerisinde immobilize edilen  $\alpha$ -Glu enzimi, pH 8,0 ve 9,0'da serbest  $\alpha$ -Glu enzimine kıyasla daha yüksek enzim %aktivite göstermiştir.

Bu  $\alpha$ -Glu enziminin daha yüksek bir pH aralığında reaksiyona girmesini sağlayabilir. Yüksek pH değerlerinde, immobilize edilmiş enzimlerin serbest enzimlere göre daha yüksek aktivite göstermesi, p(HEMA) kriyojellerinin yapısındaki hidroksil ve karbonil grupları gibi bazı fonksiyonel grupların çevresinde immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimlerini pH değişikliklerine karşı dirençli hale getirmesine bağlanabilir (Deng vd., 2005; Liu vd., 2017). Ayrıca immobilize enzimlerin daha geniş bir çalışma pH aralığında yüksek aktivite göstermesi enzimlerin immobilizasyon yoluyla daha kararlı yapılara dönüştürülmesinden dolayı olabileceği literatürde de bildirilmiştir (Deng vd., 2005; Liu vd., 2017). Ek olarak, destek malzemesinin bir iyon değiştirici olarak hareket etme yeteneği, enzimlerin yüksek aktivitede çalışabildiği reaksiyon ortamındaki pH'dan önemli ölçüde farklı olabilen bir pH üreten bir "katı tampon" olarak hareket etmesi de önemli bir rol oynar (Rodrigues vd., 2013).

#### **$\alpha$ -Glu@p(AAm), $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

$\alpha$ -Glu enzimi, glikoz ve 4-NP molekülleri oluşturmak için 4-NPG molekülündeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını kırar. Daha sonra, üretilen 4-NP molekülünün 400 nm'de UV-Vis spektroskopisi ile ölçülen absorbans değerinden enzimin katalitik aktivitesi takip edilmiştir. Reaksiyonlar, pH 6,8 potasyum fosfat tampon çözeltisinde 37 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin enzimatik aktivitesi 20, 40 ve 80  $\mu$ L için sırasıyla 0,055 $\pm$ 0,003, 0,041 $\pm$ 0,002 ve 0,027 $\pm$ 0,003 Unit/mL enzim olarak hesaplanmış ve karşılık gelen grafik **Şekil 20 (a)**'da verilmiştir. Ayrıca nötral p(AAm), anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojelleri içerisinde immobilize edilen enzim miktarının enzimatik aktivite üzerindeki etkisi de araştırılmış ve **Şekil 20 (a)**'da verilmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(AAm),  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojellerinin enzimatik aktivitesinin, immobilize edilen enzim miktarındaki artışla azaldığı gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-3 kriyojellerinin enzimatik aktiviteleri pH 6,8 ve 37 °C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarda sırasıyla 0,044 $\pm$ 0,002, 0,024 $\pm$ 0,001 ve 0,013 $\pm$ 0,001 Unit/mL enzim olarak hesaplanmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-3 kriyojellerinin enzimatik aktivitesi pH 6,8 ve 37 °C'de gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar sonrasında sırasıyla 0,034 $\pm$ 0,001, 0,021 $\pm$ 0,001 ve 0,010 $\pm$ 0,001 Unit/mL enzim olarak hesaplanmıştır. Benzer

şekilde, kationik p(APTMAcI) kriyojelleri için de immobilize edilen enzim miktarındaki artış, pH 6,8 ve 37 °C'deki enzimatik aktiviteyi  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-3 sistemleri için sırasıyla 0,028±0,001 ila 0,014±0,001 ve 0,007±0,0001 Unit/mL enzim seviyesine azaltmıştır.

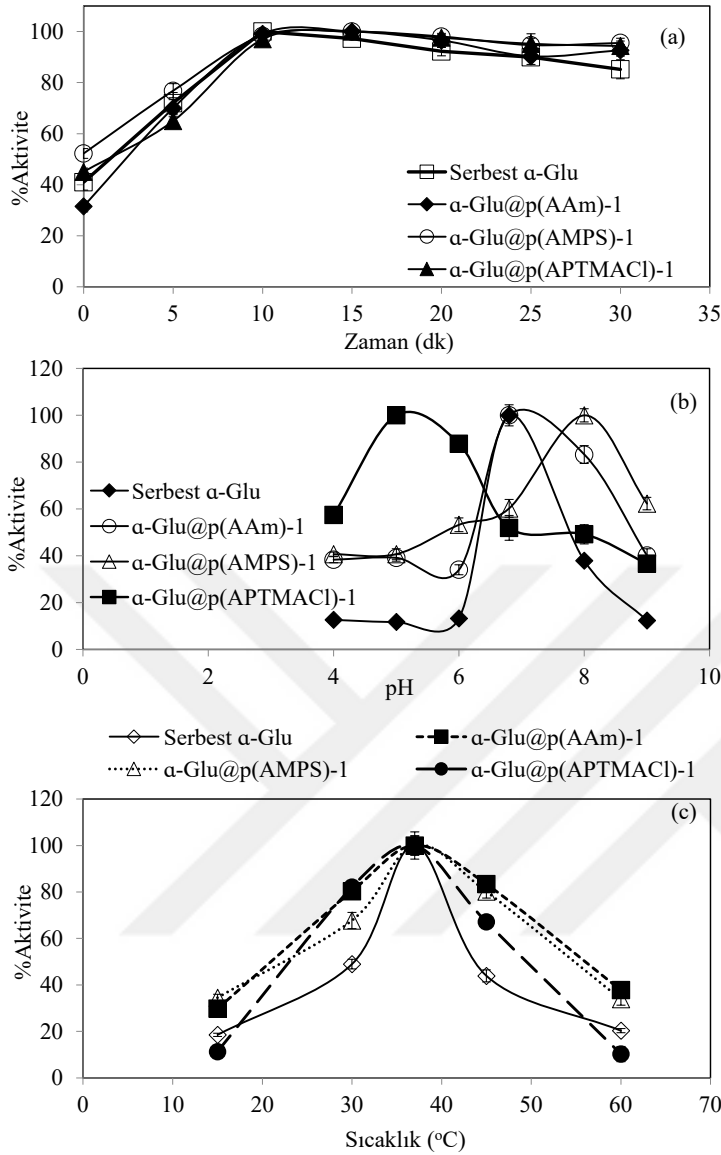


Şekil 20. Değişik miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(AAm),  $\alpha$ -Glu@p(AMPS) ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Farklı kimyasal yapıya sahip kriyojeller içindeki serbest ve hapsedilmiş enzimlerin %aktivite değerleri de karşılaştırılmış ve Şekil 20 (b)'de sunulmuştur. Her bir miktar için serbest enzimin enzimatik aktivite değerleri %100 olarak kabul edilmiştir. Optimum çalışma koşullarında en yüksek enzimatik aktivite, 0,055±0,003 Unit/mL ile 20  $\mu$ L serbest enzim

çözeltisi için gözlenmiş ve %100 olarak kabul edilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivite yüzdesi, enzim çözeltilerinin miktarındaki artışla azalmıştır. Örneğin enzim çözeltilerinin hacimleri 40 ve 80  $\mu$ L'ye yükseltildiğinde sırasıyla %75,9 $\pm$ 2,8 ve %49,6 $\pm$ 3,3 enzimatik aktiviteler ölçülmüştür. Benzer şekilde, her  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemlerinin eşit miktarda enzim içeren formları için serbest enzimin optimum çalışma koşullarında %aktivite değerleri sırasıyla %80,9 $\pm$ 3,5, %61,5 $\pm$ 2,2 ve %50,9 $\pm$ 3,1 olarak hesaplanmıştır. P(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojelleri içinde immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enziminin miktarının artması, sistemin %aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Eşit miktarda enzim içeren p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojellerinin %aktivite değerleri karşılaştırıldığında,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojellerinin aktivite yüzdesi %80,9 $\pm$ 3,5 olarak hesaplanmış ve %61,5 $\pm$ 2,2 aktivite gösteren  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ile %50,9 $\pm$ 3,1 aktivite gösteren  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojellerinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojellerinin inkübasyon süresinin %aktivitesine etkisi pH 6,8 potasyum fosfat tampon çözeltisi 37 °C'de optimum enzimatik reaksiyonun şartlandırılması için gereken süreyi belirlemek için de araştırılmıştır. İnkübasyon süresinin %aktivite üzerinde etkisini değerlendirmek için 20  $\mu$ L enzim çözeltisi ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri kullanarak, aynı koşullarda 30 dk'ya kadar inkübe edilmiş ve belirlenen optimum inkübasyon sürelerine ait grafik **Şekil 21 (a)**'da verilmiştir. **Şekil 21 (a)**'da 0,055 $\pm$ 0,003 Unit/mL enzim aktivite ile 10 dk inkübasyon süresinde serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için en yüksek enzimatik aktivite gözlenmiş ve bu değer %100 olarak kabul edilmiştir. Diğer taraftan,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için maksimum %aktivite değerleri, 15 dk inkübasyon süresinde gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresi 15 dk'yı geçtikten sonra,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojellerinin %aktivite değerlerinin çok az miktarda azaldığı görülmüştür.



Şekil 21.  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli süre, (b) %aktivite üzerinde sıcaklık ve (c) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].

Daha yüksek enzimatik aktivite gösteren 20  $\mu$ L serbest  $\alpha$ -Glu enzim çözeltisi ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojel sistemleri, çözelti pH'ının %aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla, enzimatik reaksiyon ortamının pH'ı 4,0, 5,0, 6,0, 6,8, 8,0 ve 9,0'a ayarlanmıştır. Serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojel sistemlerinin %aktivitesi üzerindeki pH'ın etkisi **Şekil 21**

(b)'de verilmiştir. Enzimatik reaksiyon ortam pH'ının serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesine etkisi, 37 °C'de 20  $\mu$ L enzim çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için en yüksek aktivite değeri pH 6,8'de gözlenmiş ve %100 aktivite olarak kabul edilmiştir. Bunun yanında, pH'ın 6,0'dan daha düşük değerlere inilmesinin serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için önemli enzim aktivitesi kaybına neden olduğu ve pH 6, 5 ve 4'te görevini neredeyse yerine getirememesine neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, pH 8,0 ve 9,0'da serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesi sırasıyla %37,9 $\pm$ 1,3 ve %12,4 $\pm$ 0,6 olarak gözlenmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin düşük pH seviyelerine (<6,0) kıyasla pH 8,0'da aktivitesinin yaklaşık %40'ını koruyabildiği gözlenmiştir. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu enziminin nötral p(AAm), anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojellerinin içerisinde immobilize edilmesi, ekstrem pH değerlerinde dayanıklılık artışı sağlamıştır. **Şekil 21 (b)**'de gösterildiği gibi, pH 6,8'de, serbest enzim ile hemen hemen aynı %aktivite sergileyen  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojelleri için farklı pH değerlerinde de serbest enzime göre daha yüksek %aktivite gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemleri pH 6,0, 5,0 ve 4,0 gibi düşük pH değerlerinde aktivitesinin yaklaşık %40'ını korurken serbest  $\alpha$ -Glu enzime göre yaklaşık 4 kat daha fazla aktivite sergilemiştir. Ayrıca,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojellerinin pH 8,0 ve 9,0'da sırasıyla %83,2 $\pm$ 2,7 ve %40,0 $\pm$ 3,2 aktivitesi aynı pH değerlerindeki serbest  $\alpha$ -Glu enziminden yaklaşık 2 ve 4 kat daha yüksektir. Serbest enzim için sadece %37,9 $\pm$ 1,3 aktivite gözlenen pH 8'de  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojellerinin %100 aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bununla beraber,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojelleri için sırasıyla pH 6,8, 6,0, 5,0 ve 4,0 değerlerinde %60,2 $\pm$ 3,9, %53,3 $\pm$ 2,4, %40,8 $\pm$ 1,9 ve %40,7 $\pm$ 3,1 aktivite değerleri gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu enziminin immobilizasyonu için anyonik p(AMPS) matrisinin kullanılması,  $\alpha$ -Glu için optimum pH değerlerini önemli ölçüde geliştirmiş ve optimum çalışma pH'ını serbest  $\alpha$ -Glu enziminin önemsiz katalitik aktivite sergilediği pH 8,0 değerlerine kaydırarak daha yüksek çözelti pH'larında enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bunlarla beraber,  $\alpha$ -Glu enziminin katyonik p(APTMAcI) kriyojelleri içinde immobilize edilmesi ile serbest enzim için pH 6,8 olan optimum çalışma pH'ının pH 5,0'a kaydığı gözlenmiştir. Serbest enzim için %11,8 $\pm$ 1,3 aktivite gözlenen pH 5,0'da,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri için %100 aktivite gözlenmiştir. Ayrıca,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojellerinin pH 4,0'da bile aktivitesinin neredeyse %60'ını koruduğu ve bu değer aynı pH'ta serbest enzimden neredeyse 5 kat daha yüksek olduğu açıkça görülmüştür.  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri, pH 6,0, 6,8, 8,0 ve 9,0'da sırasıyla %87,9 $\pm$ 4,2, %51,9 $\pm$ 2,5, %49,2 $\pm$ 3,1 ve %36,6 $\pm$ 1,8 aktivite göstermiştir ve bu değerlerin aynı pH değerlerindeki serbest  $\alpha$ -Glu

enziminin aktivitesinden, serbest enzim için optimum pH değeri olan pH 6,8 dışında, daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Özetle,  $\alpha$ -Glu enziminin amit, sülfonik asit ve kuaterner amonyum gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahip süper gözenekli kriyojeller içinde immobilizasyonu ile enzimin ekstrem pH değerlerindeki dayanıklılıkları arttırılmıştır. İmmobilize edilmiş enzimler için kriyojel ağındaki fonksiyonel gruplar onlara geniş çalışma pH aralığında bazı yararlı ortamlar sağladığından, onları pH değişikliklerine karşı dirençli kılmıştır (Deng vd., 2005; Liu vd., 2017; Worthington vd., 2016). İyon değiştirici rolü ile katı bir tampon görevi gören destek malzemelerinin iyonik yapısının, enzimin daha yüksek aktivite ile kolayca çalışabileceği bir pH üretebildiği de bildirilmiştir (Rodrigues vd., 2013). Ayrıca, bu çalışmada kullanılan kriyojellerin farklı pH değerlerinde %100 aktivite göstermesi, bu kriyojel destek malzemelerinin iyonik yapısına da bağlanabilir. Nötral p(AAm) kriyojeli içerisinde immobilize edilen  $\alpha$ -Glu enzimi, serbest enzim gibi pH 6,8'de en yüksek aktiviteyi gösterirken, anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojelleri en yüksek aktivite değerlerini sırasıyla pH 8,0 ve pH 5,0'te göstermiştir. Ayrıca, bazik pH değerlerinde anyonik jeller ve asidik pH değerlerinde katyonik jeller için gözlenen maksimum şişme yüzdesi (Drozdov ve Christiansen, 2015), substratın katalitik reaksiyon için genişlemiş kriyojel gözeneklerine veya gözenek duvarlarına kolayca girip çıkabilmesine olanak sağlayabileceği için immobilize edilmiş kriyojel sistemlerinin daha yüksek aktivite göstermelerine katkıda bulunmuştur.

Sıcaklık, enzimatik reaksiyonlar için optimum koşulların belirlenmesinde de önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle, sıcaklığın nötral p(AAm), anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojellerinde immobilize edilmiş ve serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivite yüzdesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve karşılık gelen grafik **Şekil 21 (c)**'de verilmiştir. Enzimatik reaksiyon ortamının pH değerleri,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin için 6,8,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojel sistemleri için 8,0 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için 5,0'e ayarlanarak, 15, 30, 37, 45 ve 60 °C reaksiyon ortamında, immobilize edilmiş ve serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada serbest  $\alpha$ -Glu enzimin 37 °C'deki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve %aktivitenin 30 °C'de  $48,9 \pm 3,2$ 'ye, 15 °C'de ise yaklaşık

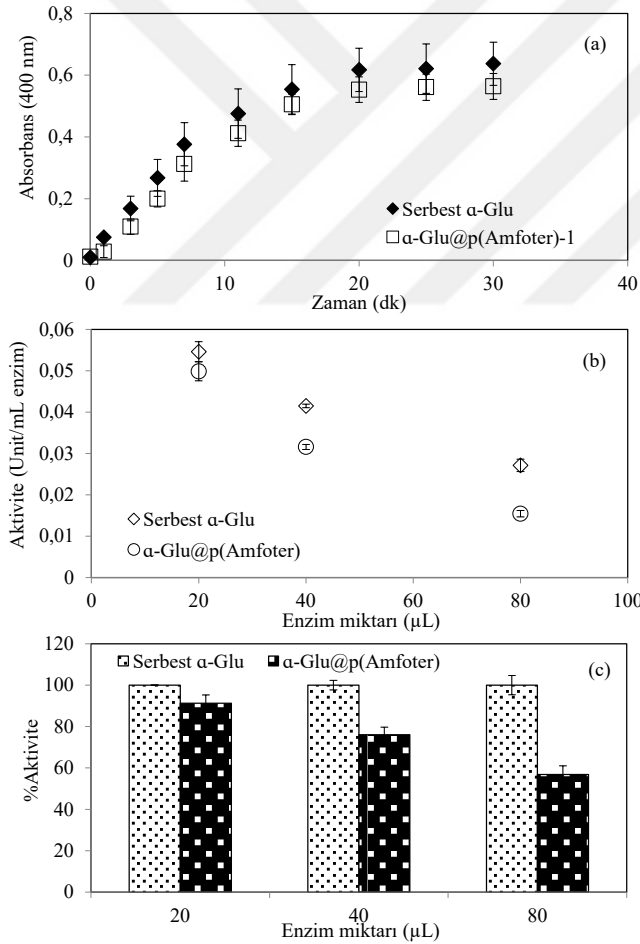
%18,5±0,7'ye düşerken, 45 ve 60 °C'de serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesi %43,9±2,3 ve %20,2±1,1'e düştüğü gözlenmiştir. Diğer taraftan hazırlanan,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri içinde optimum çalışma sıcaklığının ilgili tampon pH değerlerinde 37 °C olduğu gözlenmiştir. Ayrıca,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için yüksek ve düşük sıcaklıkta gözlenen aktivite değerlerinin serbest  $\alpha$ -Glu enziminden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara göre, ilgili tampon pH'larında yapılan enzimatik reaksiyonlarda  $\alpha$ -Glu enziminin nötral p(AAm), anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojelleri içerisinde immobilizasyonunun optimum çalışma sıcaklığına belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. Yani hem serbest  $\alpha$ -Glu, hem de  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için ilgili tampon pH'larında optimum reaksiyon sıcaklığı 37 °C olarak gözlenmiştir. Enzimlerin nötral p(AAm), anyonik p(AMPS) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojellerinde immobilize edilmesi ile serbest enzimlere göre farklı sıcaklıklardaki enzim dayanıklılığında en az 2 kat artış elde edilmiştir. Bu, immobilizasyon işlemi ile kriyojel ağı içindeki  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktif taraflarının olası korunmasına bağlanabilir ve  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktif taraflarının bu şekilde korunması sayesinde zorlu reaksiyon koşulları altında nispeten daha iyi performans göstermesine neden olur (Fan vd., 2016; Pan vd., 2009).

#### **$\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

$\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojellerinin ve eşit miktarda serbest  $\alpha$ -Glu enziminin enzimatik aktivitesi maltoz gibi  $\alpha$ -1-4 bağlı sakkaritleri taklit eden kalorimetrik substrat 4-NPG'nin, serbest enzim ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan 4-NP molekülü takip edilerek incelenmiştir. Renksiz reaksiyon ortamı, enzimatik dönüşümden sonra sarımsı renge dönmüş ve enzim aktivitesini ölçmek için 400 nm dalga boyunda ölçülen absorbans kullanılmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri ile katalize edilen reaksiyon için çeşitli zaman aralıklarında ölçülen absorbans

değerleri **Şekil 22 (a)**'da verilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü ve tüm katalizör (serbest veya immobilize) çeşitleri reaksiyonun 20. dakikasında maksimum absorbans değerleri vermiştir (Sigma-Aldrich, 1996). Bu nedenle, bu çalışmada optimum reaksiyon süresi 20 dk olarak kabul edilmiştir ve enzimatik reaksiyonlar bu süre ile sınırlandırılmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojellerin ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin enzimatik aktivitesi **Şekil 22 (b)**'de karşılaştırılmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojel sistemlerinin aktivitesi sırasıyla  $0,050 \pm 0,001$ ,  $0,031 \pm 0,003$  ve  $0,015 \pm 0,002$  Unit/mL enzim olarak hesaplanmıştır ve bu değerler 20, 40 ve 80  $\mu$ L serbest enzim çözeltileri için sırasıyla  $0,055 \pm 0,003$ ,  $0,041 \pm 0,002$  ve  $0,027 \pm 0,003$  Unit/mL enzim olarak hesaplanmıştır.

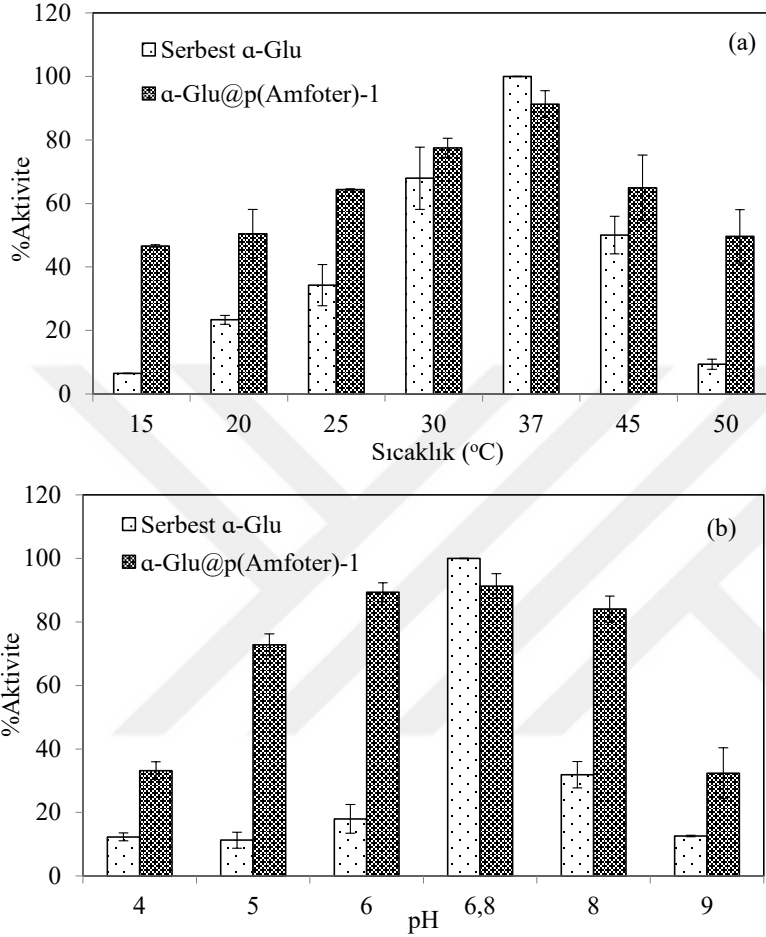


Şekil 22. (a)  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) değişik miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (c) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Ayrıca  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojellerin ve bunların içindeki enzime eşit miktarda serbest enzimin %aktivite değerleri hesaplanmış ve sonuçlar **Şekil 22 (c)**'de grafik olarak verilmiştir. Burada serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivitesinin %100 olduğu varsayılmış ve eşit miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) kriyojel sistemleri ile %aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Buna göre,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojeller, 20  $\mu$ L serbest enzim çözeltisinin aktivitesinin %91,3 $\pm$ 1,7'sini koruduğu, ancak %aktivite değerlerinin serbest ve hapsedilmiş  $\alpha$ -Glu enzimlerinin miktarı arttıkça azaldığı gözlenmiştir. Enzim çözeltilerinin 40 ve 80  $\mu$ L'sinin aktivitesine göre hesaplanan  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-3 kriyojel sistemlerinin %aktivitesi sırasıyla %76,1 $\pm$ 2,3 ve %56,8 $\pm$ 4,7 olarak hesaplanmıştır.

Bu nedenle, sıcaklık ve pH bağımlı aktivite belirleme çalışmaları için serbest  $\alpha$ -Glu çözeltisi ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri kullanılmıştır. Sıcaklık, enzimatik reaksiyonların optimal koşulları için en etkili parametrelerden biridir. Bilindiği üzere enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktiviteleri en ufak bir sıcaklık değişikliğinde bile %50'nin altına düşebilmektedir (Demirci ve Sahiner, 2021). Bu nedenle, reaksiyon sıcaklığının  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerin ve eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuçlar **Şekil 23 (a)**'da gösterilmiştir. Potasyum fosfat pH 6,8 tampon çözeltisi 37°C reaksiyon sıcaklığında serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ile elde edilen aktivite yüzdesi %100 olarak varsayılmıştır. Buna karşın, serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesi 30 °C'de %67,9 $\pm$ 4,8'e ve 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda %50'nin altına düşmüştür. Optimum sıcaklıklardan daha yüksek 45 ve 50 °C'de ise serbest enzimin aktivitesi sırasıyla %50,0 $\pm$ 3,6 ve %9,4 $\pm$ 1,6 olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel formundaki immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimleri, serbest enzimlerin aktivitelerini büyük ölçüde kaybettiği sıcaklıklarda çok daha yüksek operasyonel aktiviteyi sürdürmüştür.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin %aktivite değerleri 30, 25, 20, 15, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda sırasıyla %77,5 $\pm$ 4,2, %64,4 $\pm$ 3,0, %50,4 $\pm$ 2,8, %46,6 $\pm$ 1,9 %64,9 $\pm$ 5,2 ve %49,6 $\pm$ 3,1 olarak hesaplanmıştır.  $\alpha$ -Glu enziminin optimum çalışma sıcaklığı (37 °C) dışında,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri için elde edilen tüm %aktivite değerleri, 15-50 °C gibi uygulanabilir endüstriyel geniş sıcaklık aralığında daha yüksek olarak bulunmuştur.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin bu daha yüksek %aktivitesi, kriyojel ağlarında tutulma yoluyla  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktif

bölgelerinin korunmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir (Fan vd., 2016; Pan vd., 2009).



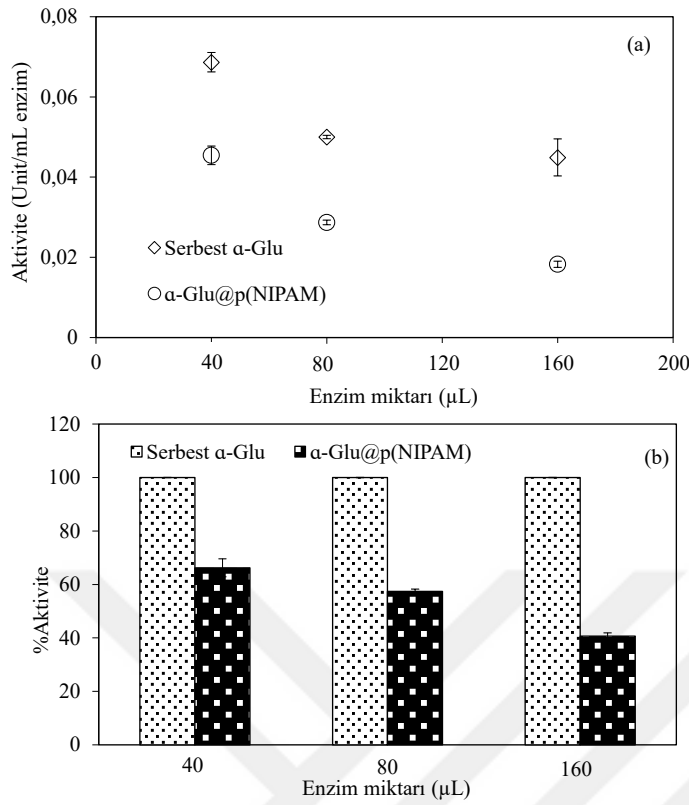
Şekil 23.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojelleri ile eşit miktarlarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].

Enzimlerin optimal operasyonel aktivitesini ciddi şekilde etkileyen bir diğer önemli parametre pH olduğundan ve ortamın pH'ındaki değişikliklere karşı aktiviteyi mümkün olduğu kadar sürdürebilen biyokatalizör sistemlerinin hazırlanması, endüstriyel ve çevresel uygulamalar için büyük önem taşır. Bu nedenle, serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin pH'a bağlı %aktivitesi pH 4,0-9,0 aralığında çalışılmış ve karşılık gelen aktivite Şekil 23 (b)'de karşılaştırılmıştır. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivite yüzdesinin pH 6,0 ve altında %20'nin altına, pH 8,0 ve üzerinde ise %30'un altına düştüğü

gözlenmiştir. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri, pH 5,0-8,0 aralığında optimal aktivitelevlerinin %70'inden fazlasını korumuştur. Daha spesifik olarak,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri pH 5,0, 6,0, 6,8 ve 8,0'da sırasıyla %72,8±3,2, %89,3±3,1, %91,3±1,7 ve %84,1±2,7 aktivite göstermiştir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerin geniş bir pH aralığında yüksek enzim aktivitesi ile çalışma kapasitesi, pH'a bağılı iyon değişimi ve p(Amfoter) kriyojel ağında mevcut sülfonik asit ve kuaterner amonyum gruplarının katı bir tampon görevi görme potansiyelleri ile açıklanabileceği sonucuna varılmıştır (Deng vd., 2005; Liu vd., 2017). İlgili fonksiyonel gruplar, kriyojel matriksi içindeki ani pH değişikliklerine karşı daha fazla koruma sağlar (Rodrigues vd., 2013). Bu nedenle,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri endüstriyel uygulamalarda daha iyi işletme maliyeti ve verimlilik sunabilir.

#### **$\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelevlerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

Çeşitli miktarlardaki serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin ve bunlarla eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemlerinin 67 mM pH 6,8 potasyum fosfat tamponu 37 °C'de 20 dakikalık reaksiyonlarda hesaplanan aktivite değerleri **şekil 24 (a)**'da karşılaştırılmıştır.  $\alpha$ -Glu enzim çözeltisinden 40, 80 ve 160  $\mu$ L ile yapılan reaksiyon sonucu enzimatik aktivitelevler sırasıyla 0,068±0,002, 0,049±0,0004 ve 0,044±0,005 Unit/mL enzim olarak belirlenmiştir. Ayrıca  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistem aktivitelevlerinin pH 6,8 ve 37 °C'de sırasıyla 0,045±0,002, 0,029±0,001 ve 0,018±0,001 Unit/mL enzim olduğu ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivitelevlerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir.



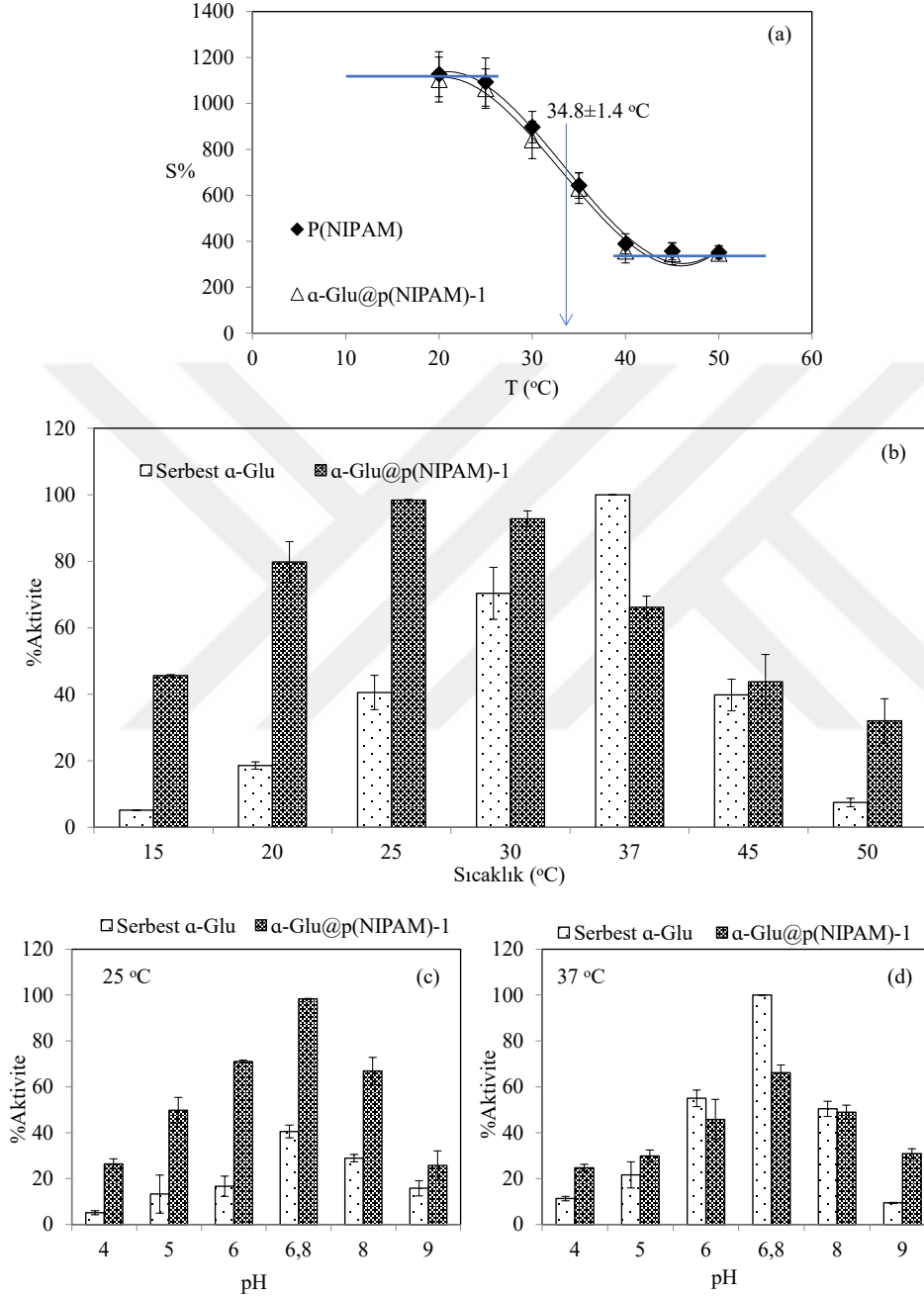
Şekil 24. Değişik miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin (a) aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemlerinin aktivite yüzdesi, serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri için pH 6,8, 37 °C'de için belirlenen aktivite değerleri %100 varsayılarak hesaplanmış ve karşılık gelen grafik Şekil 24 (b)'de verilmiştir. Kullanılan 40, 80 ve 160  $\mu$ L serbest  $\alpha$ -Glu çözeltileri için elde edilen enzimatik aktiviteler %100 olarak kabul edilmiş ve eşit miktarlarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemlerinin aktiviteleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre immobilize edilen enzim miktarı arttıkça %aktivitenin düştüğü gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-2 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-3 kriyojel sistemleri için gözlenen %aktivite değerleri sırasıyla %66,2 $\pm$ 3,3, %57,4 $\pm$ 0,9 ve %40,7 $\pm$ 1,1 olarak bulunmuştur.

En yüksek %aktivite  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için gözleendiğinden, bu malzeme ve onun eşit miktardaki serbest  $\alpha$ -Glu çözeltisi (40  $\mu$ L) 15-50 °C aralığında sıcaklık ve 4,0-9,0 aralığında pH değerlerinin %aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi çalışmaları için kullanılmıştır. Enzimatik aktiviteyi olumlu ya da olumsuz etkileyen birçok faktör olsa da aralarında sıcaklık ve pH en belirgin faktörler olarak öne çıkmaktadır (Forsyth ve Patwardhan, 2013; Hanefeld vd., 2009; Ho, 2012). Bu nedenle ilk olarak, sıcaklığın serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin aktivite yüzdesine etkisi 6,8 sabit pH değerinde, reaksiyon sıcaklığı 15, 20, 25, 30, 37, 45 ve 50 °C olarak incelenmiştir. Bu sıcaklık değerleri, sıcaklık duyarlı olması nedeniyle p(NIPAM) kriyojellerinin aşağı kritik çözelti sıcaklığının (LCST) kapsanmasını sağlamak için seçilmiştir. P(NIPAM) için LCST değeri 32 °C'dir (Sahiner, 2018). Farklı sıcaklıklarda yapılan şişme çalışmaları ile ilgili grafik **Şekil 25 (a)**'da verilmiştir ve p(NIPAM) ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojellerinin LCST değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Buna göre, p(NIPAM) ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojellerinin LCST değerleri benzer olarak yaklaşık 34,8 $\pm$ 1,4 °C olarak gözlenmiştir.

Sıcaklığın serbest  $\alpha$ -Glu ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin aktivite yüzdesi üzerindeki etkisine ilişkin ilgili grafik **Şekil 25 (b)**'da verilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için maksimum aktivite 37 °C'de %100 olarak kabul edilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivite yüzdesi 30, 25, 20 ve 15 °C'de sırasıyla %70,4 $\pm$ 7,8, %40,5 $\pm$ 5,2, %18,6 $\pm$ 1,1 ve %5,2 $\pm$ 0,5'e düşmüştür. Benzer şekilde serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesi sıcaklığın 45 ve 50 °C'ye yükselmesiyle sırasıyla %39,8 $\pm$ 4,7 ve %7,5 $\pm$ 1,2 olarak gözlenmiştir. İlginç bir şekilde,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin %aktivitesi 25 ve 30 °C'de sırasıyla %98,4 $\pm$ 0,2 ve %92,8 $\pm$ 2,4 aktivite değerleri ile %90'dan fazla olarak gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin %aktivitesi, sıcaklığın 20 ve 15 °C'ye düşmesiyle sırasıyla %79,8 $\pm$ 6,1'e ve %45,6 $\pm$ 0,3'e düşmüştür. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin %aktivitesi 37, 45 ve 50 °C'de sırasıyla %66,2 $\pm$ 3,3, %43,8 $\pm$ 8,2 ve %31,9 $\pm$ 6,7 olarak hesaplanmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojellerin aktivite yüzdesindeki azalma 30 °C'nin üzerinde, bu sıcaklık değeri LCST değerlerinin (34,8 $\pm$ 1,4 °C) üzerinde olduğu için p(NIPAM) kriyojellerinin hidrofobik doğasının artması ile açıklanmıştır. Genel olarak, LCST'nin üstündeki veya altındaki p(NIPAM) kriyojelleri, enzimi korur ve normal çalışma

sıcaklığı olan 37 °C hariç, serbest enzime kıyasla  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojelleri için daha yüksek bir %aktivite gözlenmesine neden olur.



Şekil 25. (a) P(NIPAM) ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları, (b)  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde sıcaklık, (c) 25 °C ve (d) 37 °C reaksiyon sıcaklığında pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C (Sıcaklık); 25 ve 37 °C (pH), 0,5 mL 10 mM substrat].

P(NIPAM) zincirlerinin LCST değeri olan 32 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, %aktivite değerindeki azalmanın olası nedeninin hidrofobik hale gelerek p(NIPAM) kriyojel ağının genel olarak büzülmesini tetiklediği çok iyi bilinmektedir (Sahiner, 2018). Bu nedenle,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin 32 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda %aktivitesinin azalması, yakalanan enzimlerin aktif bölgelerinin üst üste binmesi ve kümelenmesi ile açıklanabilir. P(NIPAM)'in LCST değerlerinin üzerinde düşük şişme özelliği göstermesi substratın kriyojel ağının iç kısımlarına erişimini kısıtlayabilen p(NIPAM) kriyojelinin artan hidrofobik özelliği nedeniyle substratın enzim molekülleri ile etkileşimini zorlaştırarak %aktivitesinde bir azalmaya neden olur.

Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesi, 37 °C'de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminden daha yüksektir. Öte yandan, 25 °C'de  $\alpha$ -Glu enzimlerinin p(NIPAM) kriyojelleri içinde tutulması, daha düşük ve daha yüksek sıcaklıklarda serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinden daha yüksek %aktivite ile gelişmiş bir termal dayanıklılık ortaya koymuştur.  $\alpha$ -Glu enzimleri için daha düşük veya daha yüksek sıcaklıklar gibi ekstrem reaksiyon koşulları altında elde edilen nispeten daha iyi performans, immobilizasyon işlemiyle elde edilen p(NIPAM) kriyojel ağı içindeki  $\alpha$ -Glu enzimlerinin korunması ile açıklanabilir (Ding vd., 2016; Hamerska-Dudra vd., 2007; Homaei vd., 2013; J. Wang vd., 2015).

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin %aktivitesi üzerinde pH'ın etkisi 25 ve 37°C'de ayrı ayrı incelenmiştir. Bu amaçla pH 4,0-9,0 potasyum fosfat tampon çözeltilerinde enzim deneyleri yapılmıştır. Gözlenen en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilmiştir. **Şekil 25 (b)**'de,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için pH 6,8'de 25 °C'de daha yüksek %aktivite değeri gözlenirken, aynı koşullarda serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin %aktivitesi  $40,5 \pm 2,8$  olarak hesaplanmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi, 25 °C'de ve herhangi bir pH aralığında (pH 4,0-9,0) gerçekleştirilen reaksiyonları, serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinden daha yüksek %aktivite ile gerçekleştirmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin %aktivite değerinin pH 6,0, 5,0 ve 4,0'da %20'nin altına düştüğü ve pH 8,0 ve üzerinde %30'un altına düştüğü bulunurken,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi ise 25 °C'de aktivitesinin pH 5,0'a kadar %50'sini ve pH 8,0'a kadar %65'ini koruduğu gözlenmiştir. Öte yandan, **Şekil 25 (c)**'den açıkça görüldüğü gibi, serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri için en yüksek aktivite pH 6,8 ve 37 °C'de elde edilmiş ve %100

olarak kabul edilmiştir. Buna rağmen,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin aktivite yüzdesi pH 6,8 ve 37 °C'de %66,2±3,3 olarak gözlenmiştir. **Şekil 25 (c)**'den açıkça görüldüğü gibi, ortam pH'ındaki artış veya azalma, 37 °C'de hem serbest  $\alpha$ -Glu hem de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için hemen hemen benzer aktivite değişikliği eğilimi göstermiştir.

Özetle,  $\alpha$ -Glu enzimlerinin p(NIPAM) kriyojel içinde immobilize edilmesi,  $\alpha$ -Glu enzimine, serbest  $\alpha$ -Glu enzimine kıyasla daha yüksek %aktivite ile geniş bir pH aralığında çalışılabilen bir ortam sağladığı gözlemlenmiştir. Bu ifade, enzimlerin bir desteğin içine/üzerine immobilizasyonunun, geniş pH değerlerinde enzim dayanıklılığını arttırabildiği literatür ile uyumludur (Cheng vd., 2019; Deng vd., 2005). Immobilizasyon işleminde destek materyali, kriyojel ağı ve ağ üzerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde kapalı bir ortam görevi görür. Bu şekilde immobilizasyon, ağ içinde ve dışında önemli sıcaklık ve pH değişimi, enzimlerin daha yüksek aktivitelerle çalışabileceği ortamlar yaratabilir (Rodrigues vd., 2013).

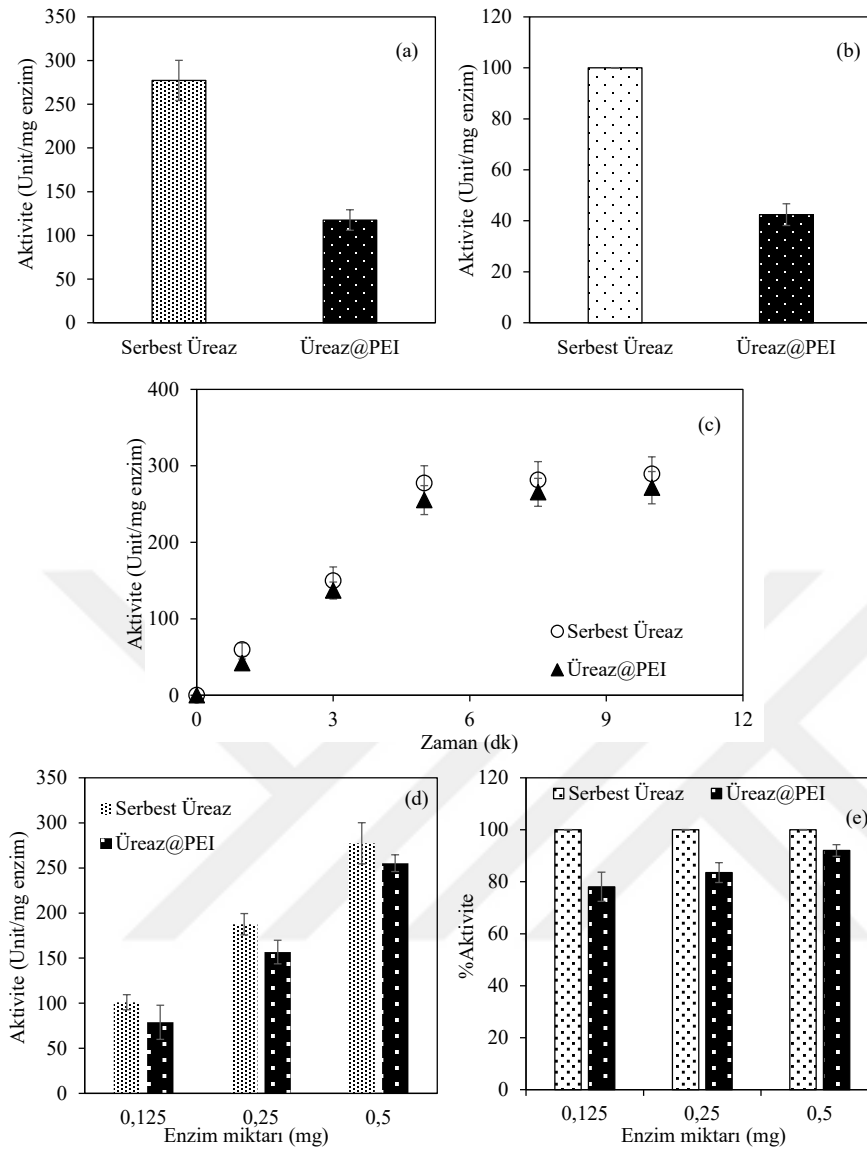
#### **4.4.2. Üreaz enzimi immobilize edilmiş kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

##### **Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin enzim miktarı, sıcaklık ve pH ile değişimi**

Serbest Üreaz ve eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin enzimatik aktiviteleri pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış olan substrat (üre) çözeltisi ile 25 °C reaksiyon sıcaklığında yapılmış ve reaksiyon sonucu açığa çıkan NH<sub>3</sub> miktarının 0,1 M HCl asit ile titre edilerek tayin edilmesi ile belirlenmiştir. **Şekil 26 (a)**'da serbest Üreaz enzimi ve PEI kriyojellerinin normal sentez koşullarında (Sahiner ve Demirci, 2016) Üreaz enzimi immobilize edilen Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin enzimatik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Üreaz enziminin aktivitesi 277,3±22,9 Unit/mg enzim olarak bulunurken, immobilize edilmiş Üreaz enziminin aktivitesinin 117,6±11,8 Unit/mg enzim olduğu gözlenmiştir. Serbest enzim için elde edilen

aktivite değerinin %100 olarak kabul edildiği ve **Şekil 26 (b)**'de verilen serbest Üreaz ve Üreaz@PEI kriyojel sisteminin %aktiviteleri incelendiğinde, immobilize edildikten sonra Üreaz enzimin aktivitesinin yaklaşık %60'ını kaybettiği görölmüştür. Bunun nedeninin PEI kriyojellerinin sentezi sırasında oluşturulan kriyojel öncül çözeltilsinin pH değerinin 11 civarı olması olarak düşünölmüş ve sentez sırasında hapsedme metodu ile gerçekleştirilen immobilizasyon şartları optimize edilmiştir. Buna göre PEI kriyojelleri içine Üreaz enzimi immobilize etmek için hazırlanan öncül çözelti pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda yapılmıştır.

Serbest Üreaz ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi ile gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonların ne kadar sürede maksimum aktiviteye ulaştığını tespit etmek için aktivite değerleri reaksiyonun 1-10 dk'lık zaman dilimlerindeki çeşitli aralıklara hesaplanmış ve ilgili grafik **Şekil 26 (c)**'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar reaksiyonun 5 dk da maksimum aktiviteye ulaştığını göstermiş, Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemleri için optimum reaksiyon süresi olarak 5 dk seçilmiştir. Sıcaklık ve pH parametrelerinin enzimatik aktivite üstündeki etkisinin inceleneceği çalışmalarda 5 dk'lık reaksiyon süresi kullanılmıştır.



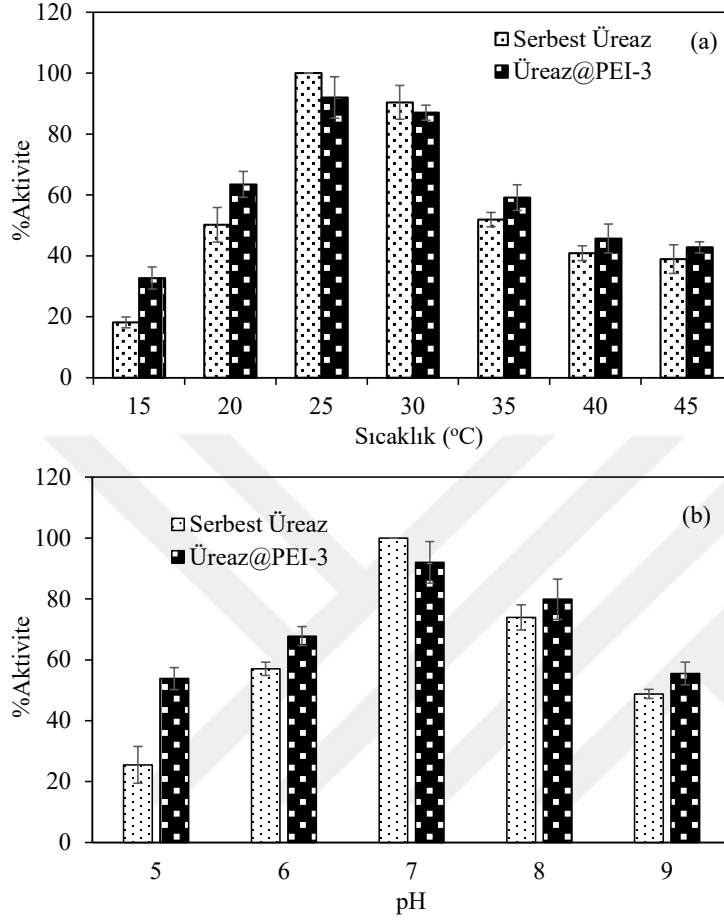
Şekil 26. Normal PEI kriyojel sentez koşullarında sentezlenen Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin eşit miktardaki serbest enzim ile (a) aktivite ve (b) %aktivite karşılaştırmaları, (c) serbest Üreaz enziminin ve Üreaz@PEI kriyojel sisteminin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (d) enzim için optimum saklama koşulları olan pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içinde hazırlanmış olan, değişik miktarlarda enzim içeren Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinin aktivite ve (e) %aktivite karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Hazırlanan Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitesi aynı koşullar altında incelenmiş ve eşit miktardaki serbest enzimler ile

karşılaştırılarak **Şekil 26 (d)**'de vermiştir. Buna göre serbest Üreaz enziminin miktarı arttıkça aktivite değeri de artmış ve  $101,1\pm 8,4$ ,  $187,6\pm 11,9$  ve  $277,3\pm 22,9$  olarak bulunmuştur. Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitesi aynı koşullar altında incelenmiş ve sistemlerin aktivitesi sırasıyla  $78,9\pm 9,3$ ,  $156,7\pm 13,1$  ve  $255,2\pm 18,9$  Unit/mg enzim olarak hesaplanmıştır. Farklı miktarlardaki serbest enzim için elde edilen aktivite değerlerinin %100 olarak kabul edilmiştir. Eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin %aktiviteleri ile karşılaştırılması da **Şekil 26 (e)**'de verilmiş ve Üreaz@PEI-1, Üreaz@PEI-2 ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin aktivitelerinin sırasıyla  $\%78,0\pm 5,6$ ,  $\%83,5\pm 3,8$  ve  $\%92,1\pm 2,2$ 'sini korudukları görülmüştür. İmmobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttıkça %aktivite değeri artmıştır ve en yüksek aktivite Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi için elde edilmiştir. Bu nedenle, pH ve sıcaklık parametrelerinin enzimatik aktivite üzerine etkilerinin incelenmesinden Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi ve eşit miktarda serbest Üreaz enzimi kullanılmıştır.

Serbest Üreaz ve eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI-3 kriyojel sisteminin %aktivitesinin sıcaklıkla değişimi ile ilgili grafik **Şekil 27(a)**'da verilmiştir. Sıcaklığın enzimatik aktivite üzerindeki etkisi pH 7,0 fosfat tamponu çözeltisinde  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve 5 dk'lık reaksiyon süresi ile çalışılmıştır. Yapılan çalışmada serbest Üreaz enziminin  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi için en yüksek aktivite  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de  $\%92,1\pm 2,1$  olarak gözlenmiştir. Serbest Üreaz enzimi için aktivite değerleri  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de  $\%50,1\pm 5,7$  ve  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de  $\%18,2\pm 1,8$  olarak gözlenirken bu değerler aynı koşullarda Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi için sırasıyla  $\%63,5\pm 4,2$  ve  $\%32,7\pm 3,6$  olarak daha yüksek gözlenmiştir. Optimum çalışma sıcaklığı olan  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den daha yüksek sıcaklıklarda da Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi eşit miktardaki serbest Üreaz enzimine göre daha yüksek %aktivite değerleri göstermiştir. Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi için  $30$ ,  $35$ ,  $40$  ve  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  reaksiyon sıcaklıklarında sırasıyla  $\%87,1\pm 2,4$ ,  $\%59,1\pm 4,2$ ,  $\%45,7\pm 4,8$  ve  $\%42,8\pm 1,8$  aktivite değerleri gözlenmiştir. Yapılan çalışmalardan Üreaz enziminin PEI kriyojelleri içerisine immobilizasyonu ile düşük ve yüksek sıcaklıklarda dayanıklılığının arttığı açıkça görülmektedir. Bu, PEI kriyojellerinin gözenekleri ve gözenek duvarları içinde immobilize edilen Üreaz enzimlerinin, örneğin sıcaklık gibi ekstrem koşullara karşı korunabilmesi,

Üreaz enzimlerinin aktif yapısını sağlam bir şekilde daha kararlı hale getirmesi ile açıklanabilir (Fan vd., 2016; Pan vd., 2009).



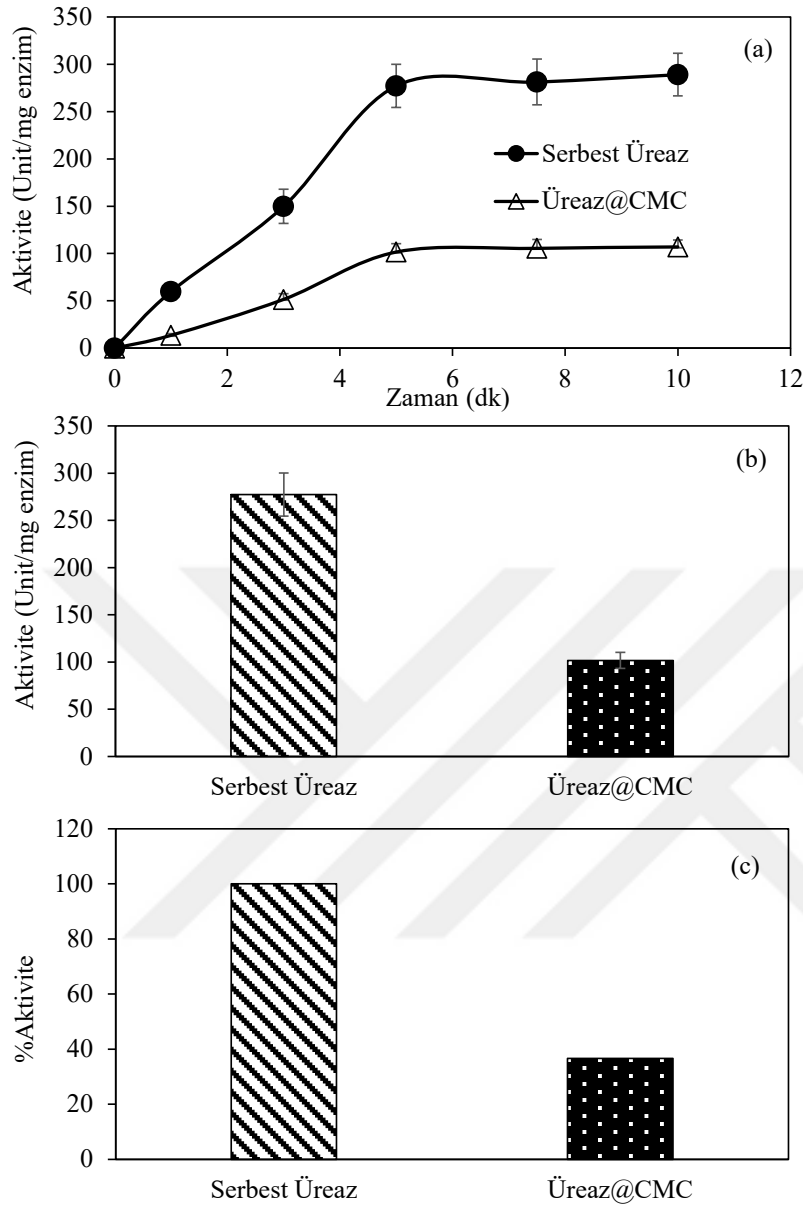
Şekil 27. Üreaz@PEI-3 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu (Sıcaklık), 25 °C (pH), 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Serbest Üreaz ve eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI-3 kriyojel sisteminin %aktivitesine reaksiyon pH'ının etkisinin incelenmesi için pH 5,0-9,0 aralığında ve 25 °C'de enzimatik reaksiyonlar gerçekleştirilmiş ve Şekil 27 (b)'de karşılaştırılmıştır. Reaksiyon pH'ının enzimatik aktiviteye etkisi incelenirken pH 4,0'a indikatör olarak kullanılan 4-NP molekülünün rengi gözlenemediği için inilememiştir. Serbest Üreaz ve eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI-3 kriyojel sisteminin optimum çalışma pH'ı 7,0 olarak bulunmuştur. Ancak, yine grafikten görüleceği gibi optimum çalışma pH'ından yüksek ve düşük pH değerlerinde Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi serbest Üreaz enzimine göre daha yüksek

%aktivite göstermiştir. Reaksiyon pH değeri 6,0 ve 5,0'e ayarlandığında serbest enzim aktivitesinin sırasıyla %42,9±2,2 ve %74,5±6,1'ini kaybederken, Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi aynı koşullarda aktivitesinin sırasıyla %67,8±3,1 ve %53,8±3,6'sını korumuştur. Bununla beraber pH 8,0 ve 9,0'da ise serbest Üreaz enzimi aktivitesinin %73,9±3,6 ve 48,8±1,5'ini korurken, aynı koşullarda bu değerler Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemi için %79,9±6,6 ve %55,5±3,7 olarak gözlenmiştir. İmmobilize sistem için geniş bir pH aralığında yüksek enzim aktivitesi ile çalışma kapasitesi, pH'a bağlı iyon değişimi ve PEI kriyojel ağ yapısında bulunan primer, sekonder ve tersiyer aminlerin yanı sıra yapıda doğal olarak bulunan kuaterner amonyum gruplarının katı bir tampon görevi görme potansiyelleri ile açıklanabilir (Deng vd., 2005; Rodrigues vd., 2013). Bunların kriyojel matrisi içindeki ani pH değişikliklerine karşı daha fazla koruma sağladığı düşünülmektedir.

### **Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin sıcaklık ve pH ile değişimi**

Doğal bir polimer olan CMC ile sentezlenen kriyojeller içerisine, sentez sırasında hapsedme metodu ile immobilize edilerek Üreaz@CMC kriyojel sistemleri hazırlanmıştır. Eşit miktardaki serbest Üreaz enzimleri ve Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlarda maksimum aktiviteye ulaştığı süreyi tespit etmek için reaksiyon 1-10 dk zaman aralığında çeşitli zamanlarda durdurulmuş ve aktivite değerleri hesaplanarak **Şekil 28 (a)**'da karşılaştırılmıştır. Buna göre enzimatik reaksiyonların 5. dk'sında serbest Üreaz enzimi ve Üreaz enzimi immobilize edilmiş CMC kriyojel sistemlerinin maksimum aktiviteye ulaştıkları görülmüştür ve sonraki çalışmalarda reaksiyon süresi 5 dk olarak belirlenmiştir.

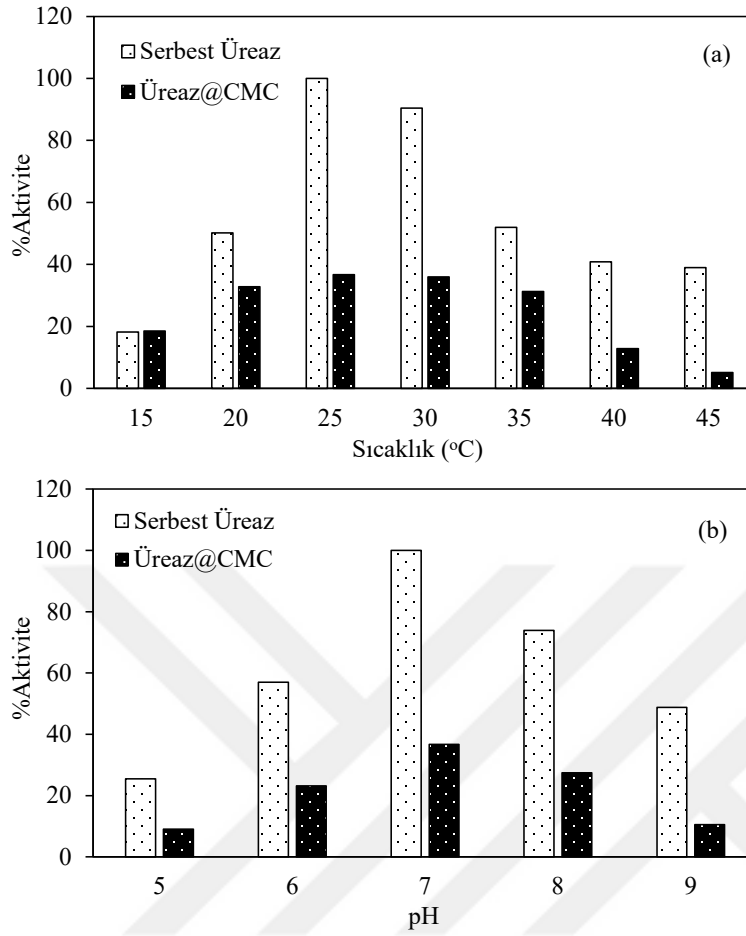


Şekil 28. (a) Üreaz@CMC ve eşit miktardaki serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) Üreaz@CMC kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Şekil 28 (b) ve (c)'de ise serbest üreaz ve Üreaz@CMC kriyojel sistemleri kullanılarak pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen 5 dk enzimatik reaksiyonların da gösterdikleri aktiviteler ve %aktiviteler karşılaştırılmıştır. Burada serbest enzim için elde edilen  $277,3 \pm 22,9$  Unit/mg enzim aktivite %100 olarak kabul edildiğinde, CMC kriyojelleri içerisinde immobilize edildikten sonra aktivitenin  $101,7 \pm 8,6$  Unit/mg

enzim olarak gözlendiği ve immobilizasyon sonucunda aktivitenin  $36,7 \pm 3,1$ 'e düştüğü görülmüştür. **Tablo 3**'te verilen yüksek immobilizasyon verimine rağmen, aktivitenin bu kadar çok düşmesinin nedeni olarak CMC kriyojellerinin sentezi için hazırlanan öncül çözeltinin Michael tip reaksiyonlar ile gerçekleşmiş olan çapraz bağlanma reaksiyonları nedeniyle 0,2 M NaOH çözeltisi içerisinde yapılması ve yüksek bazik ortam nedeniyle enzim yapısının bozulması olarak öngörülmüştür.

**Şekil 29 (a)**'da enzimatik reaksiyon sıcaklığının Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin %aktivitesine etkisi incelendiği görülmüştür. Serbest Üreaz enziminin aktiviteleri Üreaz@CMC kriyojel sistemleri ile karşılaştırıldığında ise sıcaklık değişiminin enzimin aktivitesine etkisinin immobilizasyon ile azaldığı gözlenmiştir. Buna rağmen, 25 °C'de serbest Üreaz enzimi için elde edilen aktivite %100 olarak kabul edildiğinde, Üreaz@CMC kriyojel sistemleri için gözlenen en yüksek aktivitenin yine 25 °C'de  $36,7 \pm 3,1$  olduğu görülmüştür. Serbest enzimin aktivitesi 20 ve 35 °C çalışma sıcaklıklarında yaklaşık %50 azalırken, Üreaz@CMC kriyojel sistemlerinin aktivitesi yaklaşık %5 azalarak hemen hemen sabit kaldığı görülmüştür. Üreaz@CMC kriyojel sistemi için elde edilen düşük aktiviteye rağmen, immobilizasyon neticesinde daha geniş sıcaklık aralığında daha kararlı aktivite ile çalışılabildiği gözlenmiştir ve optimum çalışma sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir. Bu, CMC kriyojellerinin gözenekleri ve gözenek duvarları içinde immobilize edilen Üreaz enzimlerinin, örneğin sıcaklık gibi zorlu koşullara karşı korunabilmesi, Üreaz enzimlerinin aktif yapısının CMC kriyojelleri ile korunması ile açıklanmıştır (Fan vd., 2016; Pan vd., 2009).

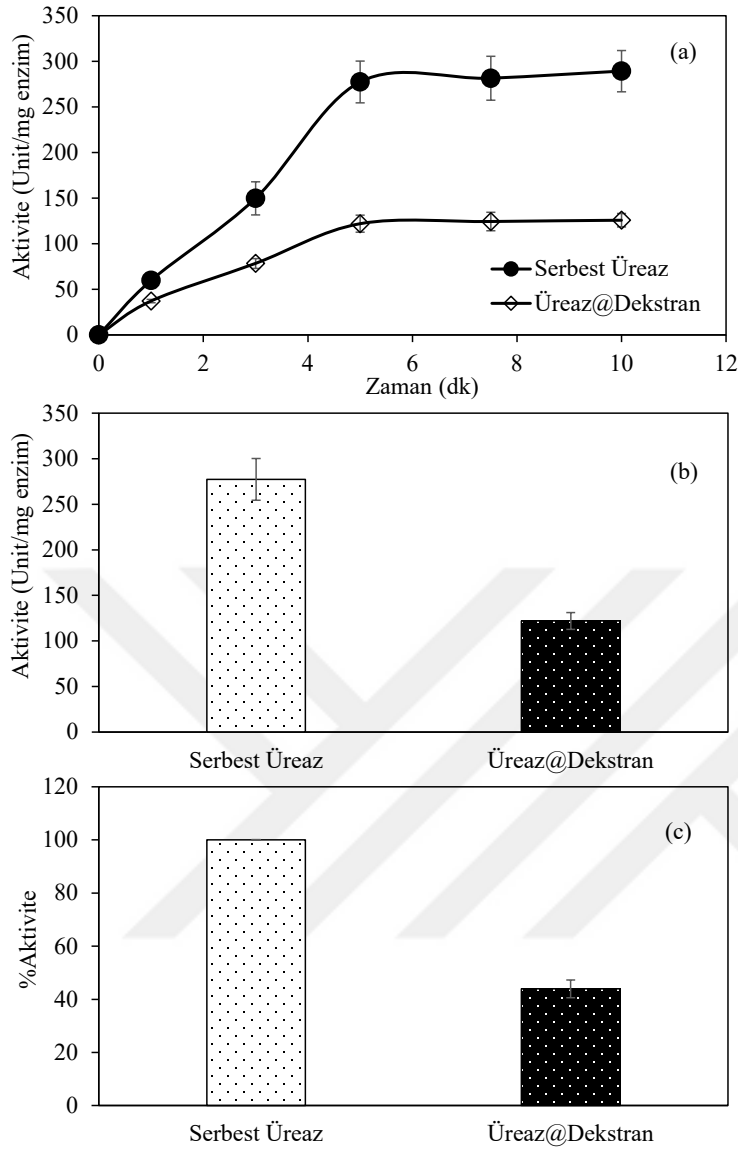


Şekil 29. Üreaz@CMC kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Aynı şekilde enzimatik reaksiyon pH'nın serbest ve CMC kriyojelleri içerisine immobilize edilmiş Üreaz enzimin aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi için pH 5,0-9,0 arasındaki değerlerde hazırlanan substrat çözeltileri ile 25 °C'de yapılan reaksiyonlarla gerçekleştirilmiş ve ilgili grafik **Şekil 29 (b)**'de verilmiştir. Serbest üreaz enziminin pH 7,0'de yapılan reaksiyonlar sonucu gösterdiği aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve aktivitesinin pH 6,0 ve 5,0'te sırasıyla yaklaşık %43 ve %75'ini kaybettiği, pH 8,0 ve 9,0'da ise yaklaşık %74 ve %50'sini koruduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, Üreaz@CMC kriyojel sistemi için gözlenen en yüksek aktivite yine %36,7±3,1 ile pH 7,0'de olurken, aktivitenin pH 6,0 ve 8,0'de sırasıyla %23,2±2,6 ve %27,4±1,5 olarak gözlemlendiği ve yine serbest enzime göre pH değişiminden daha az etkilendiği anlaşılmıştır.

## Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitelerinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Bir başka doğal polimer olan Dekstran moleküllerinden hazırlanan kriyojellerin içerisinde sentez sırasında hapsedme metodu ile immobilize edilen Üreaz enzimi ve eşit miktarda serbest Üreaz enzimin maksimum aktiviteye ulaştıkları reaksiyonun zamanın belirlenmesi için yapılan çalışmaya ait grafik **Şekil 30 (a)**'da verilmiştir. Enzimatik reaksiyonlar serbest enzim için optimum çalışma koşulları olarak pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde ve 25 °C'de yapılmıştır. Buna göre, 1-10 dk arasında çeşitli sürelerdeki reaksiyon sonucu hem serbest hem de hazırlanan Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin maksimum aktiviteye 5 dk'da ulaştıklarını ve daha sonra hemen hemen sabit bir aktivite göstermiştir. Dolayısıyla, sonraki çalışmalarda reaksiyon süresi olarak optimum süre 5 dk olarak belirlenmiştir.

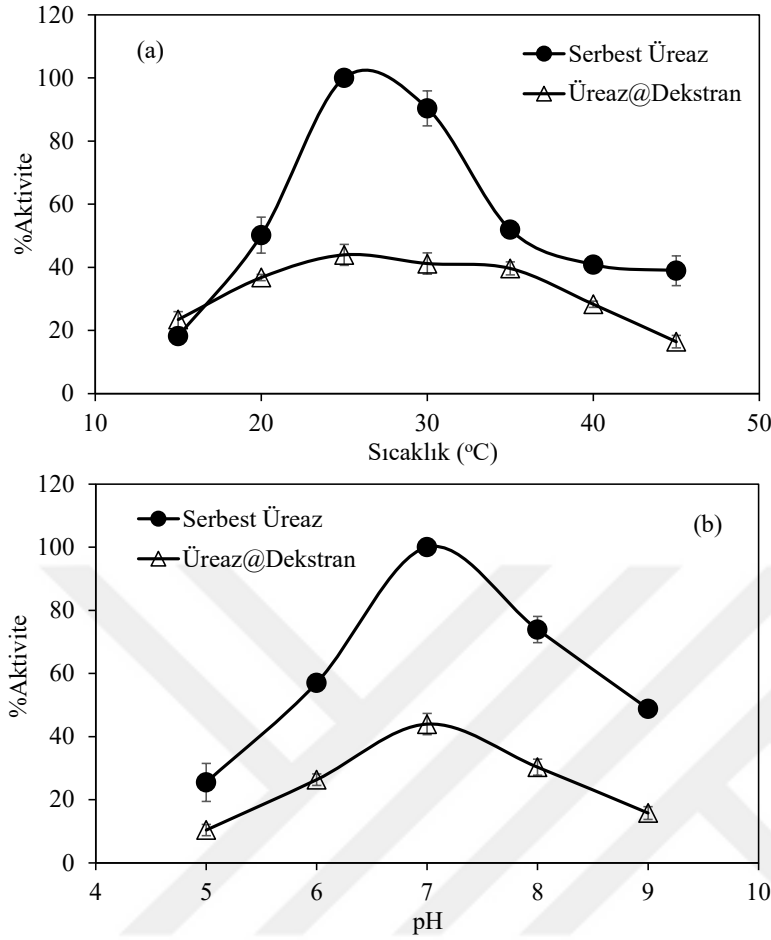


Şekil 30. (a) Üreaz@Dekstran ve serbest enzimin maksimum aktiviteye ulaşması için gerekli olan süre, (b) Üreaz@Dekstran kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin aktivite ve (b) %aktivite değerlerinin karşılaştırılması. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Serbest Üreaz enzimin aktivitesi pH 7,0 sodyum fosfat tamponu ve 25 °C’de 5dk enzimatik reaksiyon sonucu  $277,3 \pm 22,3$  Unit/mg enzim olarak hesaplanırken, bu değer Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri için  $121,9 \pm 9,3$  Unit/mg enzim olarak gözlenmiştir ve ilgili grafik Şekil 30 (b)’de verilmiştir. Ardından, Şekil 30 (c)’de serbest Üreaz enzimi ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin %aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Serbest Üreaz enzimi için pH 7,0 sodyum fosfat tamponu 25 °C’de 5 dk enzimatik reaksiyon sonucu elde

edilen aktivite değeri %100 olarak kabul edildiğinde, Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin aktivitesi  $43,9 \pm 3,3$  olarak hesaplanmıştır. Yine Üreaz enziminin Dekstran kriyojelleri içerisine immobilizasyonu sonucu gözlenen bu %aktivite kaybı, kriyojel öncül çözeltisinin çapraz bağlanma reaksiyonlarının gerçekleşebilmesi için 0,2 M NaOH içerisinde hazırlanması ve bu çözeltinin enzimin yapısını bozabilecek pH'larda olması ile ilişkilendirilmiştir.

Enzimatik reaksiyon sıcaklığı ve pH'nın Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitesi üzerindeki etkisi 15-45 °C arasındaki değişik sıcaklıklarda ve pH 4,0-9,0 arasındaki değerlerde hazırlanan sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde yapılmıştır ve sırasıyla **Şekil 31 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir. Reaksiyon sıcaklığının %aktivite üzerindeki etkisi, pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonlarda, 15-45 °C arasında ki 5'er °C'lik artışlar ile yapılarak çalışılmış ve ilgili grafik **Şekil 31 (a)**'da verilmiştir. Serbest enzimin pH 7,0 sodyum fosfat tamponu 25 °C'de gerçekleştirilen reaksiyon sonucu gösterdiği ativite değeri %100 olarak kabul edilmiştir ve aynı koşullarda Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin aktivitesi  $43,9 \pm 3,3$  olarak hesaplanmıştır. Buna göre, 15 ve 20 °C reaksiyon sıcaklıklarında serbest enzimin aktivitesi sırasıyla  $18,2 \pm 1,8$  ve  $50,2 \pm 5,7$  olarak hesaplanırken, Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri için hesaplanan aktivite değerleri sırasıyla  $23,5 \pm 2,5$  ve  $36,8 \pm 1,1$  olarak hesaplanmıştır. Yüksek sıcaklıklarda ise, serbest Üreaz enzimi 35 °C'den sonra aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybederken, Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri 30 ve 35 °C'deki reaksiyonlarda sırasıyla  $41,2 \pm 3,4$  ve  $39,6 \pm 2,1$  aktivite göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri düşük aktivite göstermelerine rağmen serbest üreaz enzimine göre geniş çalışma sıcaklıklarında daha dayanıklı olduğu göstermiştir. Bu, Dekstran kriyojellerinin gözenekleri ve gözenek duvarları içinde immobilize edilen Üreaz enzimlerinin, örneğin sıcaklık gibi zorlu koşullara karşı korunabilmesi, Üreaz enzimlerinin aktif yapısını sağlam bir şekilde daha kararlı hale getirmesi ile açıklanabilir (Demirci vd., 2020; Demirci ve Sahiner, 2021).

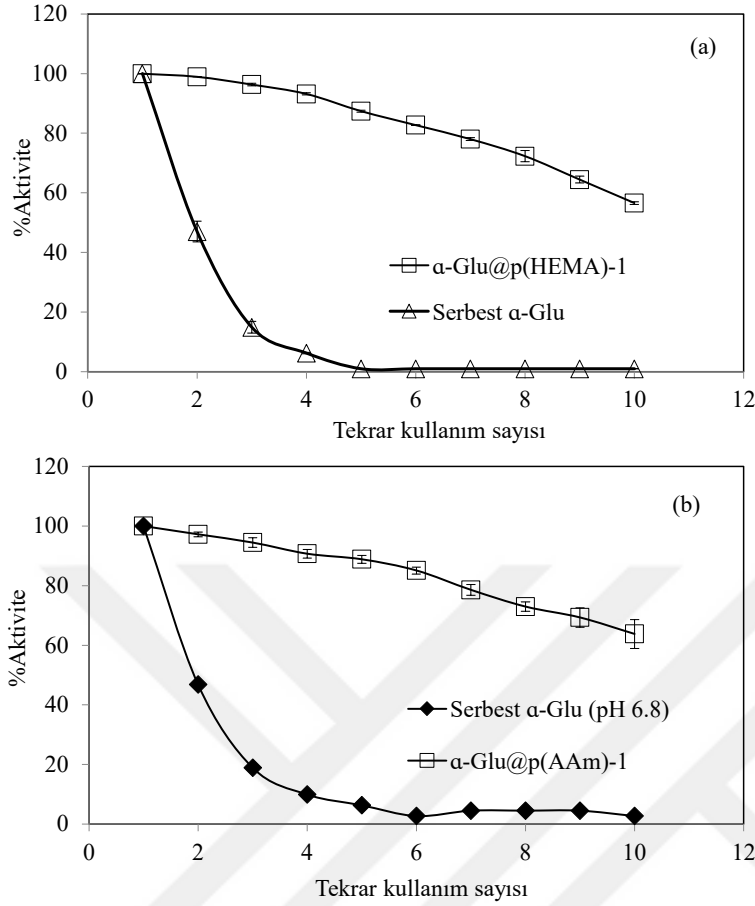


Şekil 31. Üreaz@Dekstran kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin %aktivitesi üzerinde (a) sıcaklık ve (b) pH parametrelerinin etkisi. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Reaksiyon pH'ının 25 °C'de gerçekleştirilen deneylerde Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin aktivitesi üzerindeki etkisi de incelenmiş ve ilgili grafik Şekil 31 (b)'de verilmiştir. Serbest Üreaz enziminin pH 7,0'de eldilen aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Serbest Üreaz enziminin aktivitesi pH 6,0 ve 5,0'te sırasıyla %57,1±2,2 ve %25,4±6,0 olarak hesaplanırken, pH 8,0 ve 9,0'da sırasıyla %73,9±4,1 ve %48,8±1,5 olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin aktivitesi pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0'da sırasıyla %10,4±1,8, %26,4±1,8, %43,9±3,3, %30,3±2,5 ve %15,8±2,1 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.5. İmmobilize edilmiş enzim sistemlerinin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları

Destek matriksleri üzerinde enzim immobilizasyonunun en büyük faydalarından biri, amaçlanan uygulamalardan sonra biyokatalizörlerin reaksiyon ortamından ayrılma kolaylığı ve sonraki reaksiyonlarda daha fazla işlem ve yeniden kullanılabilirliğidir (Bashir vd., 2020; Nisha vd., 2012). Reaksiyon ortamında serbest enzimlerin geri kazanılması ve yeniden etkinleştirilmesi zor ve maliyetli işlemler gerektirdiğinden, çok yönlü immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesine büyük ilgi gösterilmiştir (Bashir vd., 2020; Nisha vd., 2012). Bir enzimin tek kullanımını yeniden kullanılabilir sistemlere dönüştürmek, endüstriyel uygulamalar için önemli maliyet avantajları sunan, hiçbir aktivite kaybı veya minimum performans düşüşü ile büyük fayda ve sürdürülebilir kullanım sağlar. Enzimlerin destek malzemelerine immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesinin temel amacı, ekstrem koşullarda enzimlerin dayanıklılığının iyileştirilmesi ve enzimatik reaksiyonların maliyetini azaltmak için yeniden kullanılabilir enzim formlarının oluşturulmasıdır (Sheldon vd., 2005; Zdarta vd., 2018). Yeniden kullanılabilirlik çalışmaları serbest enzim ve enzim immobilize edilmiş sistemlerin gözenek boyutu 12 kDa olan diyaliz membranlar içerisine yerleştirildikten sonra her bir kullanım sonrası ilgili reaksiyon için kullanılan pH değerindeki tampon çözeltiler ile 30 dk yıkandıktan sonra tekrar kullanılması, ilk kullanım sonrası elde edilen aktivitelerin %100 varsayılarak %aktivitede meydana gelen değişimlerin incelenmesi ile yapılmıştır. Bu nedenle, hazırlanan  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemlerinin ve eşit miktarda serbest  $\alpha$ -Glu enzimin yeniden kullanılabilirliği incelenmiş ve **Şekil 32 (a)**'da karşılaştırılmıştır. Yeniden kullanılabilirlik çalışmalarında, diyaliz membran içerisine yerleştirilmiş serbest enzim ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri, daha önce bahsedildiği gibi pH 6,8 potasyum fosfat tamponunda ve 37 °C reaksiyon sıcaklığı kullanılmış ve yeniden kullanmadan önce substrat veya ürünü sistemden uzaklaştırmak için 10 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu içinde yıkanmıştır. Bu döngü ardarda on kez tekrarlanmıştır. Ardarda 10 kez kullanılan serbest enzimin aktivitesi 2. kullanımdan sonra  $47,1 \pm 3,5$ , 3. kullanımdan sonra %20'nin altına düşmüş ve 4. kullanımdan sonra aktivite gözlenmemiştir. Diğer taraftan 10 kez tekrarlanan kullanımda  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemlerinin %aktivitesinin 5. kullanımda  $87,4 \pm 0,3$ 'e düştüğü ve 10. kullanımda bile  $56,6 \pm 0,4$  aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

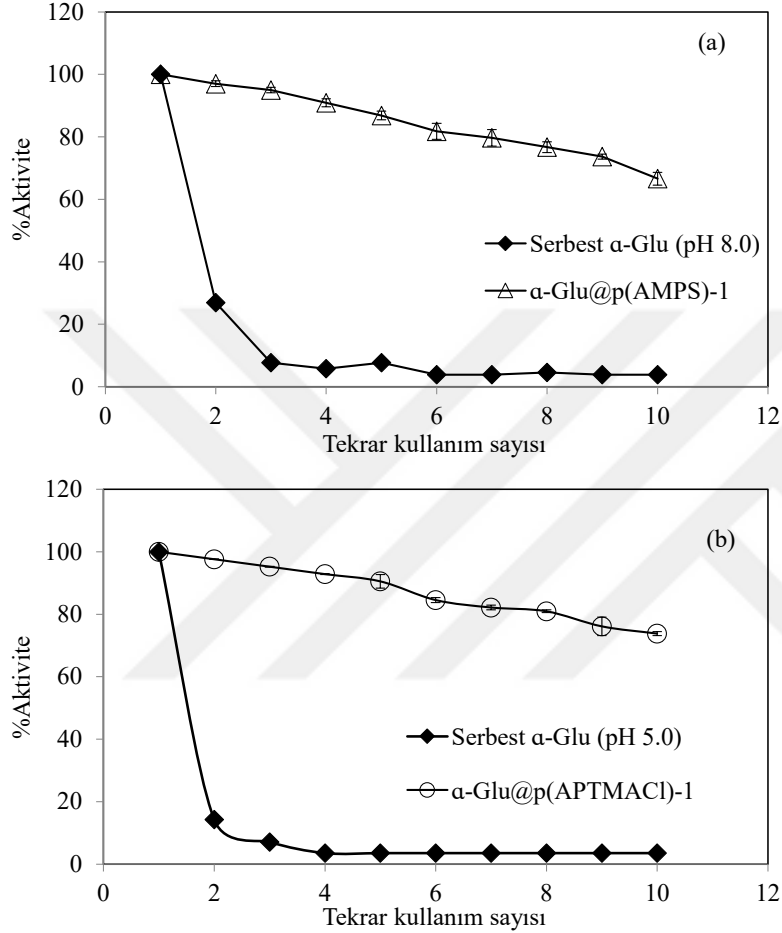


Şekil 32. (a)  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Bir başka nötral kriyojel olan p(AAm) içine immobilize edilmiş ve serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aynı koşullarda tekrar kullanılabilirliklerinin karşılaştırılması da Şekil 32 (b)'de verilmiştir. Burada da serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesinin 3. kullanımdan sonra neredeyse sıfırlandığı ancak eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin 5. kullanımda aktivitelerinin  $88,8 \pm 1,3$ 'ünü korurken, 10. kullanımda bile hala  $63,8 \pm 4,8$  aktiviteye sahip olduğu hesaplanmıştır.

Operasyonel dayanıklılık çalışmaları,  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş anyonik p(AMPS) kriyojelleri (pH 8,0, 37 °C) ve katyonik p(APTMAcI) kriyojelleri (pH 5,0, 37 °C'de) ve eşit miktardaki serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri için optimize edilmiş çalışma koşullarında

gerçekleştirilmiştir. Aynı kriyojellerin her kullanım arasında 30 dakika boyunca ilgili pH'da yıkama işleminden sonra ardışık 10 enzimatik reaksiyonda kullanılması ile ilgili grafikler sırasıyla **Şekil 33 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir.

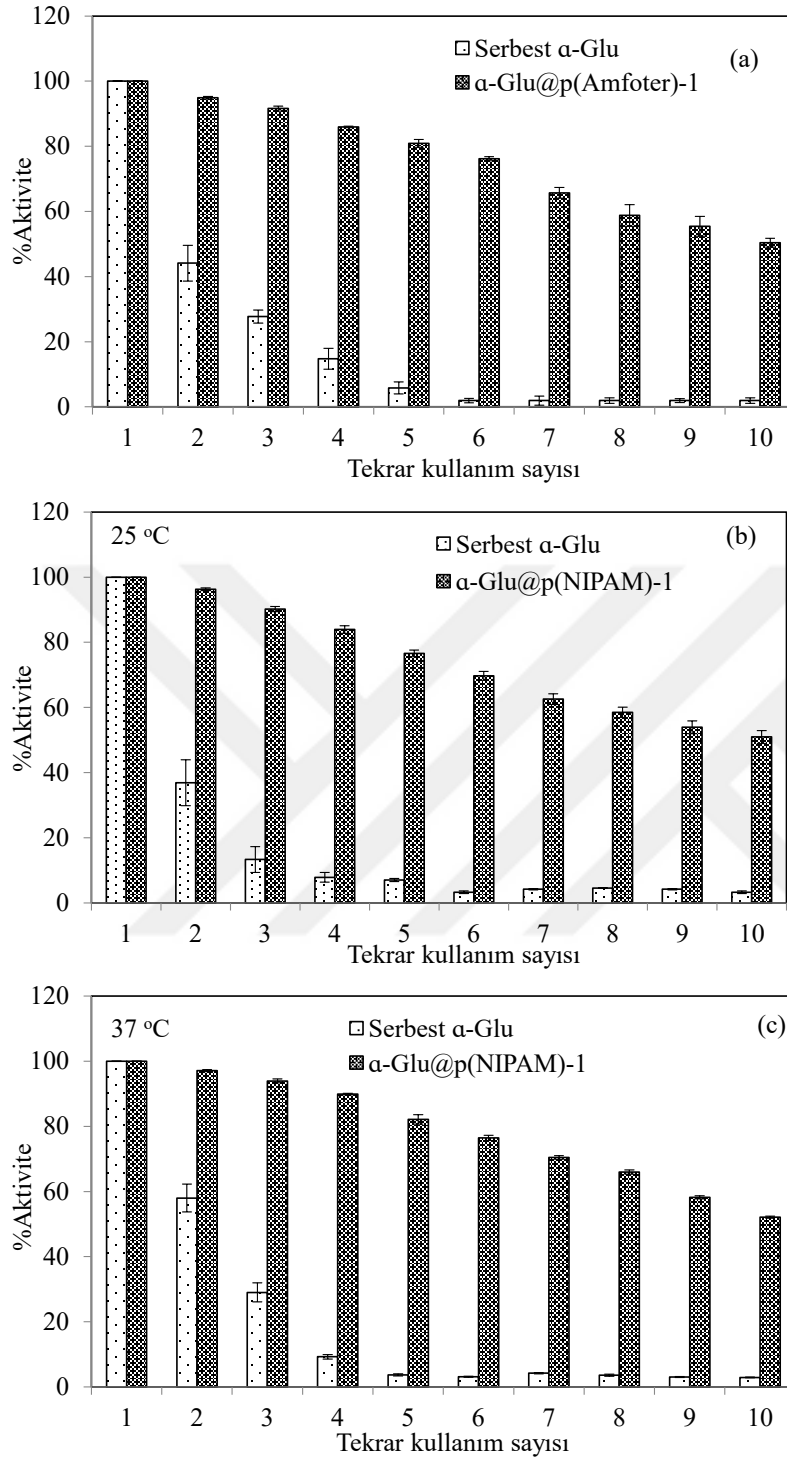


**Şekil 33.** (a)  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin tekrar kullanılabilirliğinin karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1), 5 mL pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Her sistemin ilk kullanımlarındaki aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve her kullanımdan sonra %aktivitedeki değişim operasyonel kararlılık çalışmaları olarak hesaplanmıştır. **Şekil 33**'te gösterildiği gibi serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesi 3. kullanımdan %95'ten fazla aktivite kaybı yaşamış ve neredeyse hiç aktivite göstermemiştir. Ayrıca, optimum çalışma koşullarında yapılan enzimatik reaksiyonlarda  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -

Glu@p(APTMACl)-1 kriyojelleri, 10 ardışık kullanımdan sonra %50'den fazla aktivite göstermiştir. Operasyonel dayanıklılık çalışmaları sırasında  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojellerinin %aktivitesi 4. kullanıma kadar neredeyse %90'dan fazla gözlenirken, 10. ardışık kullanımdan sonra aktivitesinin %66,6 $\pm$ 2,1'ini koruduğu görülmüştür. Bununla birlikte,  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl)-1 kriyojellerinin operasyonel dayanıklılık çalışmalarında, 5. kullanımdan sonra %90,5 $\pm$ 2,1 aktivite gösterirken, bu değer 10 ardışık kullanımdan sonra %73,8 $\pm$ 0,6'ya düşmüştür.

$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerin yeniden kullanılabilirliği, serbest  $\alpha$ -Glu enziminin ve  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin optimum çalışma koşullarında (37 °C'de pH 6,8 potasyum fosfat tamponu) ve 10 ardışık kullanım ile araştırılmıştır ve **Şekil 34 (a)**'da karşılaştırılmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerinin ve eşit miktardaki serbest enzimlerin yeniden kullanım çalışmaları, selüloz diyaliz membranlarında gerçekleştirilmiş ve reaksiyona girmemiş substratları ve/veya reaksiyon ürünlerini uzaklaştırmak için her kullanımdan sonra 30 dakika boyunca tampon çözelti ile yıkandıktan sonra yeniden kullanılmıştır. Grafikten görüldüğü gibi serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin aktivitesi 2. ve 3. kullanımdan sonra %44,1 $\pm$ 5,5 ve %27,7 $\pm$ 2,0'a düşmüş, 4. kullanımdan sonra hemen hemen hiç aktivite görülmemiştir. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri, ardışık 5. kullanıma kadar ilk aktivitelerinin %80'ini korumuş ve 10. kullanımdan sonra %50,4 $\pm$ 1,3 aktivite göstermiştir.



Şekil 34. (a)  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliğinin eşit miktarda serbest enzim ile karşılaştırılması, (b)  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin 25 °C ve (c) 37 °C çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirlikleri. [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C ( $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)); 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu 25 ve 37 °C ( $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)), 0,5 mL 10 mM substrat].

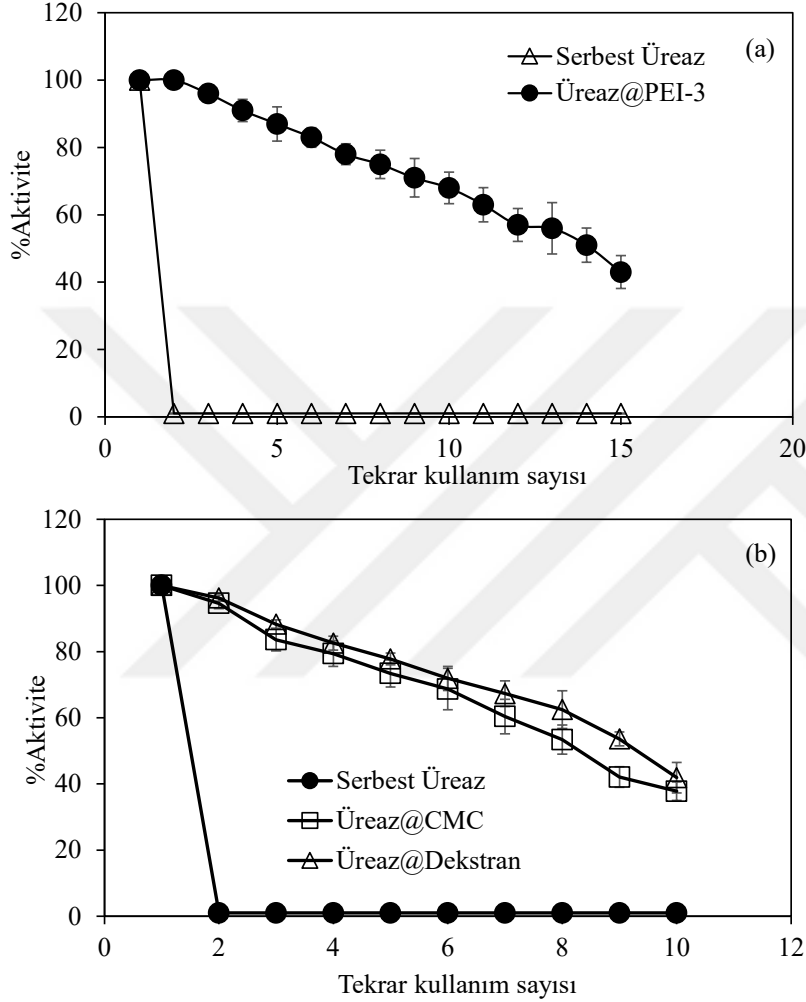
Hem serbest  $\alpha$ -Glu enziminin, hem de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin yeniden kullanılabilirliği pH 6,8 tampon çözeltisinde ve 25 ile 37 °C'de araştırılmış ve sırasıyla **Şekil 34 (b)** ve **(c)**'de verilmiştir. İlk kullanımın aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiş ve her kullanımdan sonra hem serbest hem de immobilize edilmiş enzim sistemleri pH 6,8 tampon çözeltisi ile 30 dakika yıkanmıştır. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında 25 °C'deki aktivitesindeki azalma **Şekil 34 (b)**'de verilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesi 2. kullanımda  $36,9 \pm 7,1$  olarak hesaplanmış ve 3. kullanımdan sonra %15'ten daha az aktivite göstermiştir. Öte yandan  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin 25 °C'deki aktivite yüzdesi 2. ve 3. kullanımda sırasıyla  $96,3 \pm 0,4$  ve  $90,2 \pm 0,8$  olarak hesaplanmış ve 10 ardışık kullanımdan sonra aktivitesinin neredeyse %50'sini korumuştur.

Serbest ve sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojelleri içerisine immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzim sistemlerinin 37 °C'de yapılan yeniden kullanılabilirlik çalışmaları da **Şekil 34 (c)**'de gösterilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimlerinin %aktivite değerlerinin 4. kullanımdan sonra %10'un altına düştüğü gözlenmiştir. Öte yandan,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin %aktivitesi 7 ardışık kullanımdan sonra yaklaşık %70 ve 10 ardışık kullanımdan sonra neredeyse %50 olarak gözlenmiştir.

Özetle,  $\alpha$ -Glu enziminin nötral p(HEMA) ve p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), hem anyonik hem de katyonik fonksiyonel gruplar içeren p(Amfoter), ve sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojeller içerisinde sentez sırasında immobilizasyonu ile 10. kullanımdan sonra bile %50 aktivite gösterebilen sistemler oluşturulmuştur. Bu nedenle,  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin serbest  $\alpha$ -Glu enziminin pratik uygulamalarında serbest formuna kıyasla daha iyi işletme maliyeti ve daha ekonomik olabileceği öngörülmektedir.

Üreaz enzimi immobilize edilmiş eşit miktarda enzim içeren Üreaz@PEI, Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları ilk kullanımlarında gösterdikleri aktivite %100 kabul edilerek **Şekil 35 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir. Serbest Üreaz enzimi ve Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları ile elde edilen sonuçlar **Şekil 35 (a)**'da karşılaştırılmıştır. Serbest

Üreaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini olmadığını anlaşıldığı çalışmada, Üreaz@PEI kriyojel sistemleri için 5. kullanımdan sonra  $87,3 \pm 5,1$ , 10. kullanımdan sonra  $68,1 \pm 4,7$  ve 15. kullanımdan sonra ise  $43,6 \pm 4,9$  aktivite göstermiştir.



Şekil 35. (a) Üreaz@PEI ve (b) Üreaz@CMC ile Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi ve serbest Üreaz enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirliklerine ait grafikler Şekil 35 (b)'de verilmiş ve karşılaştırılmıştır. Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri için ilk kullanımda hesaplanan aktivite değerleri %100 kabul edilerek incelenen tekrar kullanım potansiyellerinin çok benzer oldukları görülmüştür. Buna göre,

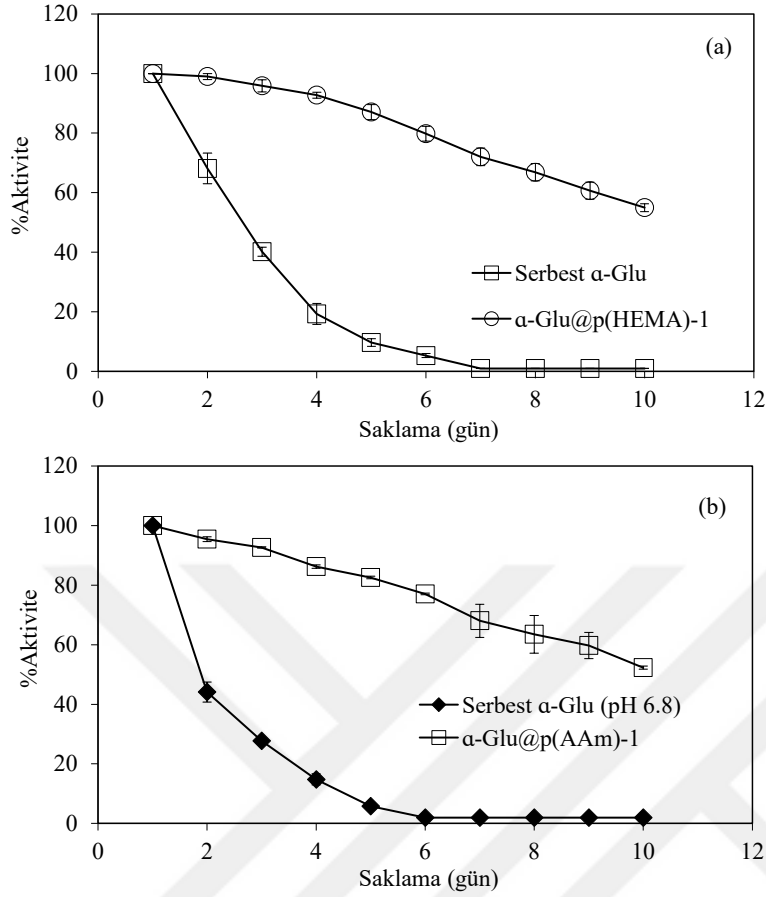
Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemleri için 5. kullanımdan sonra sırasıyla %73,4±4,1 ve %77,8±1,8 aktivite gösterirken, 10. kullanımda sistemlerin aktiviteleri sırasıyla %37,8±2,8 ve %41,9±4,6 olarak gözlenmiştir.

Özetlenecek olursa Üreaz enzimin dallanmış polimer PEI, ve doğal polimerler CMC ve Dekstran kriyojelleri içerisinde immobilizasyonu ile tekrar kullanılabilir sistemler hazırlanmıştır ve endüstriyel kullanım potansiyelleri maliyeti düşürmesi açısından önemli olabileceği sonucuna varılmıştır.

#### 4.6. İmmobilize edilmiş enzim sistemlerinin saklama süresi çalışmaları

Genel olarak enzimler, uzun süreli kullanımda aktivitelerini korumak için sıfırın altındaki sıcaklıklarda depolanırlar (Madhavan vd., 2017). Enzimlerin daha ılıman sıcaklık aralıklarında saklama koşullarının iyileştirilmesi hem enerji tasarrufu hem de maliyet düşüşü sağlayabilir. Bu nedenle hazırlanan enzim@kriyojel sistemleri değişik şartlarda (-20, +4, +25 °C) 30 güne kadar saklanarak aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenmiş ve aynı şartlarda saklanan serbest enzimlerin aktiviteleri ile karşılaştırılmıştır. Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin kullanıldığı ilk gün aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiş ve çeşitli zaman (gün) aralıklarında enzimatik reaksiyonlarda kullanılarak %aktivitelerinde meydana gelen değişimler karşılaştırılmıştır. Reaksiyonlar ilgili enzim@kriyojel sistemleri için belirlenen optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Depolama çalışmalarında, nötral  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojelleri ile eşit miktardaki serbest enzim on gün boyunca 25 °C oda sıcaklığında saklanmıştır. Daha sonra,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzim kullanılarak 10 gün boyunca her gün için yeni bir  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ile  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojelinin ve eşit miktardaki serbest  $\alpha$ -Glu enziminin %aktivitesi hesaplanmış ve sırasıyla **Şekil 36 (a)** ve **(b)**'de verilmiştir.

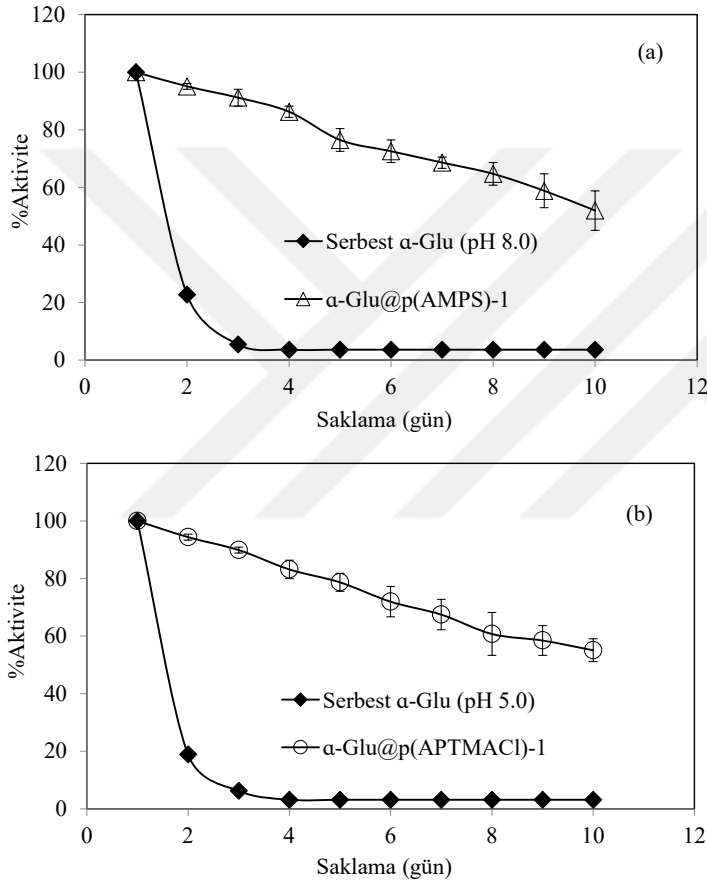


Şekil 36. (a)  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin saklama sürelerinin incelenmesi ve serbest  $\alpha$ -Glu enimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat, 25 °C depolama sıcaklığı].

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi 5. günden sonra aktivitesinin %90'dan fazlasını kaybederken,  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemleri 10. günden sonra bile aktivitesinin yaklaşık %56,5±0,4'ünü korumuştur. Diğer tarafta,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojellerinin aktivitesi de oda sıcaklığında 10 günlük depolamadan sonra yaklaşık %52,3±0,5 olarak hesaplanmıştır.

Enzimlerin yüksek aktivite değerlerini koruyabilmesi için düşük sıcaklıklar gibi ekstrem koşullar gerekmektedir. Bu nedenle, anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMACl)-1 kriyojel sistemlerinin saklama çalışmaları anyonik sistem için pH 8,0 ve 37 °C, katyonik sistemler için de pH 5,0 ve 37 °C olan optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, serbest  $\alpha$ -Glu ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu @p(APTMACl)-1 kriyojelleri 25 °C oda sıcaklığında 10 gün

bekletilmiş ve her gün enzimatik reaksiyonlarında kullanılmıştır. İlk gün kullanımını sonucunda elde edilen aktivite değerleri %100 olarak kabul edildikten sonraki her farklı günde yapılan enzimatik reaksiyonlarda elde edilen aktivitelere meydana gelen değişimler incelenmiştir. **Şekil 37 (a)**'da  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojellerinin saklama çalışmalarında elde edilen sonuçlar verilmiş ve  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojel sisteminin oda sıcaklığında 5 günlük saklama sonrasında aktivitesinin %70'ten fazlasını koruduğu gözlenmiştir.

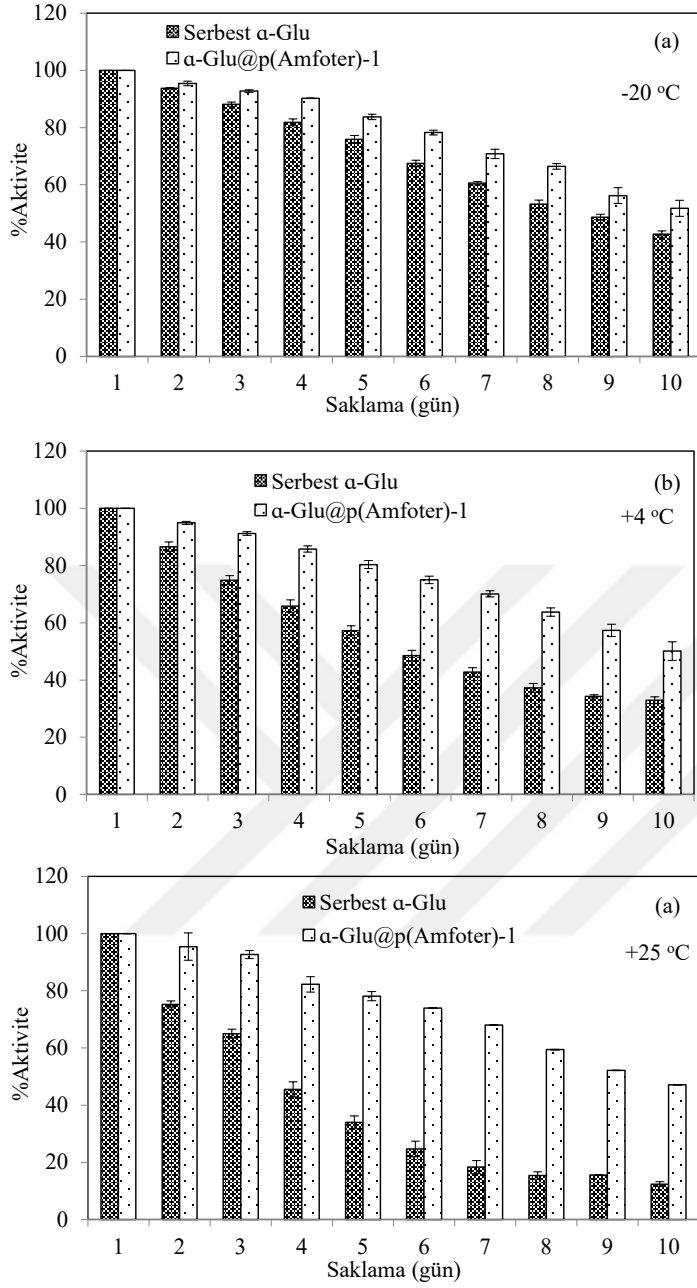


**Şekil 37.** (a)  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojelleri ile eşit miktarda serbest enzimin saklama sürelerinin karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1), 5 mL pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ( $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1), 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Her iki immobilize edilmiş sistem için belirlenen optimum çalışma koşullarında serbest enzimler 25 °C'de 4 gün saklama sonrasında aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybederken, **Şekil 37 (b)**'de,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sisteminin 25 °C'de 4 günlük

saklama sonrası aktivitesinin yaklaşık %80'ini koruduğu ve 10 günlük saklama süresinden sonra aktivitesinin %55,1±3,9'a düştüğü gözlenmiştir.

$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin ve eşit miktardaki serbest enzimin saklama süresi çalışmaları, 10 gün boyunca -20, +4 ve 25 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilerek, pH 6,8 potasyum fosfat tamponu içinde ve 37 °C reaksiyon sıcaklığında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar ile incelenmiştir. Her gün için  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin %aktivite değerlerinde meydana gelen değişimler incelenmiş ve aynı koşullarda saklanan ve enzimatik reaksiyonda kullanılan eşit miktardaki serbest enzimin aktivitesinde meydana gelen değişimler ile karşılaştırılmıştır. Serbest ve p(Amfoter) kriyojel içerisinde immobilize edilmiş  $\alpha$ -Glu enzimlerinin -20 °C'deki saklama çalışmaları ile ilgili grafik **Şekil 38 (a)**'da verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojelleri, sırasıyla 5. ve 10. günlerde başlangıç aktivitesinin %83,7±1,3 ve %51,8±2,3'ünü korurken, aynı aralıklarda serbest enzimin aktivitesi sırasıyla %75,8±2,1 ve %42,7±1,9 olarak daha düşük bulunmuştur. **Şekil 38 (b)**, 10 gün boyunca +4 °C sıcaklıkta saklanan  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin ve eşit miktardaki serbest enzimin aktivitelerinde meydana gelen değişimleri göstermektedir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin, serbest enzim ile karşılaştırıldığında daha iyi saklama sürelerine sahip olduğu tespit edilmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin saklama sürelerinin 5. ve 10. günlerinde sırasıyla %80,3±2,6 ve %50,1±1,6 aktivite gösterdiği, serbest enzimlerin aktivite yüzdesinin ise +4 °C'de saklamanın 5. ve 10. gününden sonra aktivitesinin sırasıyla %57,2±2,2 ve %32,9±1,2'ye düştüğü tespit edilmiştir.



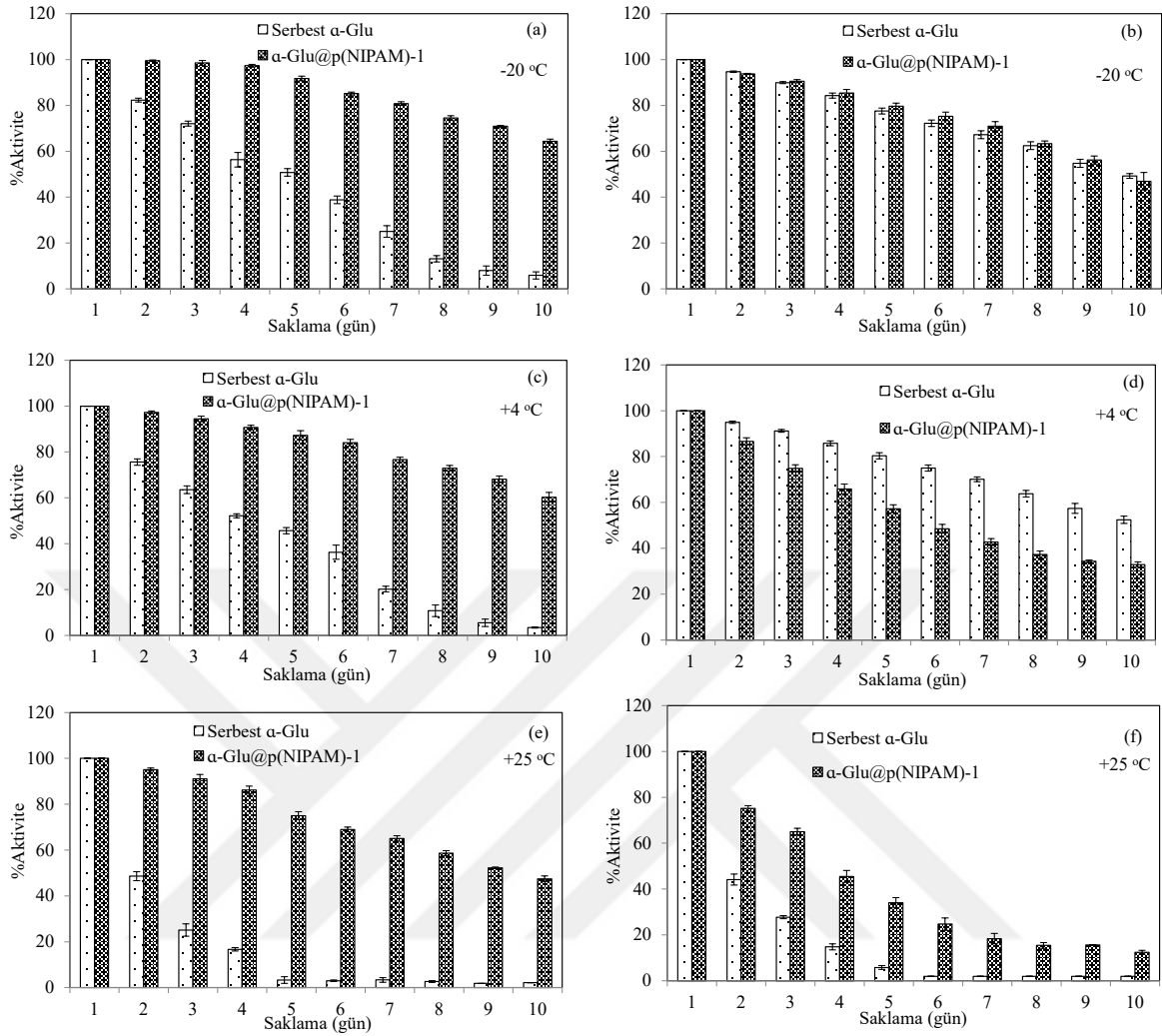
Şekil 38.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojellerinin (a) -20 °C, (b) +4 °C ve (c) +25 °C saklama sıcaklıklarında aktivitelelerinde meydana gelen değişimlerin serbest enzim ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat].

Benzer şekilde,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin ve eşit miktardaki serbest enzimin 25 °C'de 10 gün boyunca saklanması ile %aktivitelelerinde meydana gelen değişimler Şekil 38 (c)'de verilmiştir. Görüldüğü gibi 25 °C'de saklamanın 4. gününde

serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesi %50'nin altına düşmüş ve 10. günde aktivitesinin yaklaşık %90'ı kaybolmuştur. Bu arada,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri, saklamanın 5. gününden sonra başlangıç aktivitesinin %78,1 $\pm$ 1,9'unu korumuş ve 10. günde %47,2 $\pm$ 3,2 aktivite göstermiştir.

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin -20, +4 ve 25 °C gibi çeşitli sıcaklıklarda saklandıktan sonra pH 6,8 potasyum fosfat tamponu içinde 25 °C ve 37 °C reaksiyon sıcaklıklarında yapılan enzimatik reaksiyonlardaki %aktivite değerleri 10 gün boyunca test edilmiş ve elde edilen sonuçlar **Şekil 38**'de verilmiştir.

$\alpha$ -Glu enzimi ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin kullanıldığı ilk gün reaksiyonlarında hesaplanan aktivite değerleri %100 olarak kabul edilmiştir. **Şekil 39 (a)** ve **(b)**'de, -20 °C'de saklanan serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin sırasıyla 25 ve 37 °C'de yapılan reaksiyon için belirlenen %aktivite değerleri verilmiştir. **Şekil 39 (a)**'dan görüldüğü gibi  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi -20 °C'de 10 gün saklandıktan sonra 25 °C reaksiyon sıcaklığında yapılan enzimatik reaksiyonlarda yaklaşık %60 aktivite muhafaza ederken, serbest  $\alpha$ -Glu enzimleri için neredeyse hiç aktivite gözlenmemiştir. Diğer taraftan, **Şekil 39 (b)**'de, hem serbest hem de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin -20 °C'de 10 gün saklandıktan sonra 37 °C reaksiyon sıcaklığında aktivitelerinin yaklaşık %50'sini korudukları gözlenmiştir.



Şekil 39. Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin -20 °C’de saklanan (a) 25 °C, (b) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon, (c) +4 °C’de saklanan ve 25 °C’deki, (d) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon, (e) +25 °C’de saklanan 25 °C’deki, (f) 37 °C sıcaklıkta reaksiyon ile saklama sürelerinin karşılaştırılması [Reaksiyon koşulu: 5 mL pH 6,8 potasyum fosfat tamponu, 0,5 mL 10 mM substrat].

Hem serbest  $\alpha$ -Glu enzimi hem de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri için %aktivite +4 °C’de 10 günlük saklama sırasında, 25 ve 37 °C reaksiyon sıcaklığında, araştırılmış ve ilgili grafikler sırasıyla Şekil 39 (c) ve (d)’de verilmiştir. Şekil 39 (c)’de, 25 °C’de yapılan enzimatik reaksiyonlarda serbest  $\alpha$ -Glu enziminin aktivitesi +4 °C’de saklamanın 5. gününde %50’nin altına düşerken, 10. günde aktivitesinin %90’ından fazlasını kaybetmiştir, ancak  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri +4 °C’de 5 gün saklama sonrası aktivitesinin %87,2±2,1’ini ve 10. günde de %60,2±3,6’sını korumuştur.

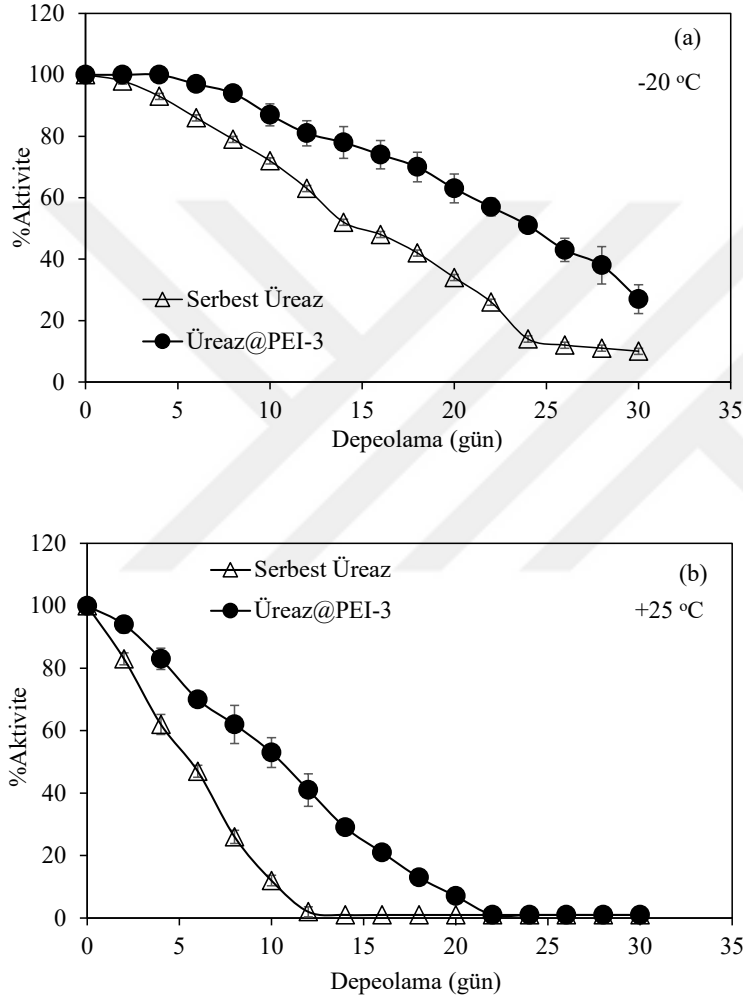
Diğer taraftan, **Şekil 39 (d)**'de,  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri +4 °C'de saklanması 5. ve 10. günlerinden sonra 37 °C'de yapılan enzimatik reaksiyonlarda aktivitesinin sırasıyla %80,3±1,4 ve %52,4±1,6'sını korurken, serbest enzimin aktivitesi sırasıyla %56,3±1,7 ve %32,9±1,2 olarak gözlenmiştir.

$\alpha$ -Glu enzimi ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin 10 gün süreyle 25 °C'de saklanan serbest enzim ile 25 ve 37 °C'deki enzimatik reaksiyonlarda kullanılması sonrası %aktivite değerlerinde meydana gelen değişimler hesaplanmış ve sırasıyla **Şekil 39 (e)** ve **(f)**'de verilmiştir. **Şekil 39 (e)**'de, 25 °C'de 10 günlük saklama sonrasında 25 °C reaksiyon sıcaklığında serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için hemen hemen hiç aktivite gözlenmemiştir. Diğer taraftan, 25 °C'de 10 gün saklama sonrası 25 °C reaksiyon sıcaklığında  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin aktivitesinin %50'sinin korunduğu görülmüştür. **Şekil 39 (f)**'de ise 25 °C'de 10 günlük saklama sonrası 37 °C reaksiyon sıcaklığında kullanılan hem serbest  $\alpha$ -Glu hem de  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sisteminin aktivite yüzdesinin %10'un altına düştüğü gözlemlenmiştir.

Özetle,  $\alpha$ -Glu enziminin nötral p(HEMA), p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), hem anyonik hemde katyonik fonksiyonel gruplar içeren p(Amfoter) ve sıcaklık duyarlı p(NIPAM) kriyojelleri içerisinde sentez sırasında hapsedme yöntemi ile immobilize edilmesi oda sıcaklığında bile saklanabildiği gözlenmiştir. Bunun da endüstriyel biyoteknolojik uygulamalar için ekonomik uygulanabilirlik sağlayabileceği düşünülmektedir. İmmobilizasyon matriksleri olarak kriyojellerin kullanılmasıyla, serbest  $\alpha$ -Glu enziminin saklama koşulları, sıfırın altındaki sıcaklıktan oda sıcaklığına kolayca kaydırılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin saklama çalışmaları 30 gün boyunca -20 ve +25 °C'de saklanan serbest Üreaz ve Üreaz@PEI-3 kriyojellerinin saklama süresince belirli günler pH 7,0 sodyum fosfat tampon çözeltisinde ve 25 °C'de gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonda kullanılarak %aktivitesinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Buna göre, serbest ve PEI kriyojelleri içerisine immobilize edilmiş üreaz enzimlerinin -20 °C'de saklama süresince yapılan çalışmalara ait grafik **Şekil 40 (a)**'da verilmiştir. Serbest enzimin

-20 °C'deki saklama çalışmalarından sonra 10, 20 ve 30. günlerdeki aktiviteleri sırasıyla %72,1±2,8, %34,6±5,1 ve %10,3±1,3 olarak hesaplanırken, Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin -20 °C'deki saklama çalışmalarından sonra 10, 20 ve 30. günlerdeki aktivitesi sırasıyla %87,4±3,6, %63,1±4,7 ve %27,7±4,7 olarak elde edilmiş ve serbest enzime göre saklama sonucunda aktivitesini daha iyi koruduğu görülmüştür.



Şekil 40. Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinin (a) -20 °C ve (b) +25 °C sıcaklıklardaki saklama sürelerinin incelenmesi ve serbest Üreaz enzimi ile karşılaştırılması [Çalışma koşulları: 5 mL pH 7,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C, 1 mL 100 mM substrat, 1 mL 4 mg/mL 4-NP].

Şekil 40 (b)'de verilen +25 °C'de yapılan saklama çalışmaları sırasında farklı günlerde kullanılan serbest Üreaz ve Üreaz@PEI-3 kriyojellerinin aktivitesinde meydana

gelen değişimlerin incelendiği ve karşılaştırıldığı grafikten de anlaşılacağı gibi Üreaz@PEI-3 kriyojellerinin saklama sürelerinde aktivitesini korumaları serbest enzime göre daha fazladır. Serbest enzim +25 °C’de saklama sonrası 10. gününde aktivitesinin %90’ından fazlasını kaybederken, bu durum Üreaz@PEI-3 kriyojel sistemlerinde 20. günden sonra görülmüştür.

#### 4.7. Serbest enzim ve enzim@kriyojel sistemlerinin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve eşit miktarda  $\alpha$ -Glu enzimi içeren  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemleri için önemli kinetik parametreler olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum reaksiyon hızı ( $V_{max}$ ) değerleri kullanılan immobilize sistemi için belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Buna göre hazırlanmış olan 0,23-3,64 mM substrat çözeltileri kullanılarak Lineweaver–Burk denklemlerinin lineer ve non-lineer formları ile hesaplanarak karşılaştırılmış ve **Tablo 4**’te özetlenmiştir.  $K_m$  değerleri, enzimin substrata afinitesinin ölçüsüdür ve daha yüksek  $K_m$  değerleri, enzimin substrata afinitesinin daha düşük olduğunu gösterir (Gopinath ve Sugunan, 2007).

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri lineer Lineweaver-Burk denkleminde sırasıyla 1,04±0,02 mM ve 0,004±0,0002 mM/dk olarak, non-lineer Lineweaver-Burk denkleminde ise sırasıyla 1,36±0,05 mM ve 0,004±0,0005 mM/dk olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 kriyojel sistemi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri lineer Lineweaver-Burk denkleminde sırasıyla 3,22±0,06 mM ve 0,005±0,0002 mM/dk olarak saptanmış ve  $\alpha$ -Glu enziminin p(HEMA) kriyojelleri içerisinde immobilizasyonu ile  $K_m$  değerinin yaklaşık 3 kat arttığı ve  $V_{max}$  değerinin neredeyse aynı kaldığı görülmüştür.

Tablo 4

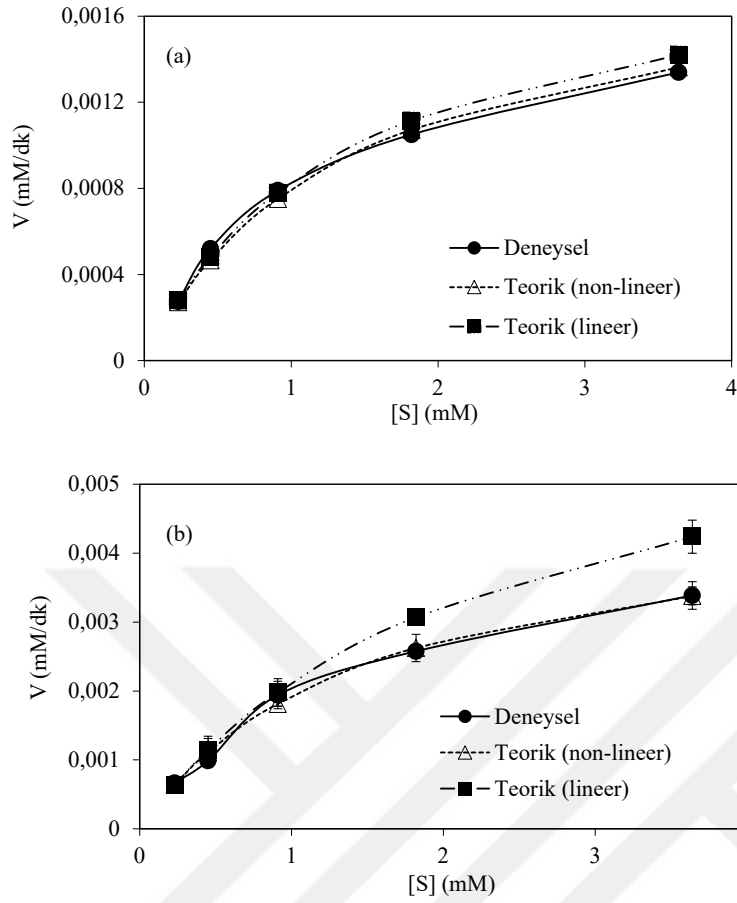
Enzim@kriyojel sistemleri için hesaplanan kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Kriyojel	Lineer		Non-Lineer	
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)
Serbest $\alpha$ -Glu	1,04 ± 0,02	0,004 ± 0,0003	1,36 ± 0,05	0,004 ± 0,0005
$\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1	3.22 ± 0,06	0,005 ± 0,0002	-	-
$\alpha$ -Glu@p(AAm)-1	-	-	1,40 ± 0,02	0,007 ± 0,0002
$\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1	-	-	1,55 ± 0,03	0,006 ± 0,0003
$\alpha$ -Glu@p(APTMA Cl)-1	-	-	1,81 ± 0,04	0,005 ± 0,0002
$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1	1,37 ± 0,04	0,002 ± 0,0002	1,36 ± 0,04	0,002 ± 0,0003
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1	1,07 ± 0,02	0,002 ± 0,0002	1,10 ± 0,01	0,002 ± 0,0001
Serbest Üreaz	365,1 ± 42,9	135,1 ± 9,8	224,2 ± 17,7	78,0 ± 6,1
Üreaz@PEI ureaz-3	731,9 ± 58,6	84,7 ± 11,2	272,9 ± 15,4	70,4 ± 8,5

Lineer Lineweaver-Burk denklemi yüksek substrat konsantrasyonlarındaki veri noktalarını küçük bir bölgeye sıkıştırması ve daha düşük substrat konsantrasyonlarındaki verileri vurgulaması gibi dezavantajları ile  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin doğru olarak

hesaplanmamasına yol açması nedeniyle (Cho ve Lim, 2018; Marasović vd., 2017),  $\alpha$ -Glu enzimleri immobilize edilmiş p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMACI) kriyojel sistemlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri non-linear Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak Excel-Solve programı ile hesaplanmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojel sistemlerinin kinetik çalışmaları ilgili sistemler için belirlenen optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir. Eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojel sistemleri için  $K_m$  değerlerinin sırasıyla  $1,40 \pm 0,02$ ,  $1,55 \pm 0,03$  ve  $1,81 \pm 0,04$  mM olarak hesaplandığı ve bu değerlerin serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için hesaplanan  $K_m$  değerine ( $1,36 \pm 0,05$  mM) çok yakın olmasına rağmen yine daha yüksek çıktığı açıktır. Bunun yanı sıra,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMACI)-1 kriyojel sistemleri için hesaplanan  $V_{max}$  değerleri de sırasıyla  $0,007 \pm 0,0002$ ,  $0,006 \pm 0,0003$  ve  $0,005 \pm 0,0002$  mM/dk olarak bulunmuştur.

$\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri,  $\alpha$ -Glu enziminin optimum çalışma koşullarında 0,23-3,64 mM substrat çözeltileri kullanılarak lineer ve non-linear Lineweaver-Burk denklemlerinden hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4'te özetlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri lineer Lineweaver-Burk denkleminde sırasıyla  $1,37 \pm 0,04$  mM ve  $0,002 \pm 0,0002$  mM/dk olarak bulunmuştur.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemi için gözlenen daha yüksek  $K_m$  değerleri,  $\alpha$ -Glu enziminin substrat molekülleri için afinitesinin, p(Amfoter) kriyojeller içinde immobilizasyonu ile azaldığını göstermiştir (Gopinath ve Sugunan, 2007). Bununla birlikte,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemleri için non-linear Lineweaver-Burk denkleminde hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $1,36 \pm 0,04$  mM ve  $0,002 \pm 0,0003$  mM/dk olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, **Şekil 41 (a)**'da gösterildiği gibi,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojeller için deneysel olarak elde edilen değerlerin lineer ve non-linear denklemlerden edilen sonuçlar ile karşılaştırılması sonucunda non-linear Lineweaver-Burk denkleminde hesaplanan,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri lineer denkleme göre, yukarıda belirtilen dezavantajları nedeniyle beklendiği gibi, deneysel sonuçlarla daha iyi uyum sağlamıştır (Cho ve Lim, 2018; Marasović vd., 2017).



Şekil 41. (a)  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter) ve (b)  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM) kriyojel sistemleri için deneysel olarak elde edilen  $[S]$  karşı  $V$  grafiğinin teorik olarak lineer ve non-lineer Lineweaver-Burk denklemlerinden hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin teorik verilerle karşılaştırılması.

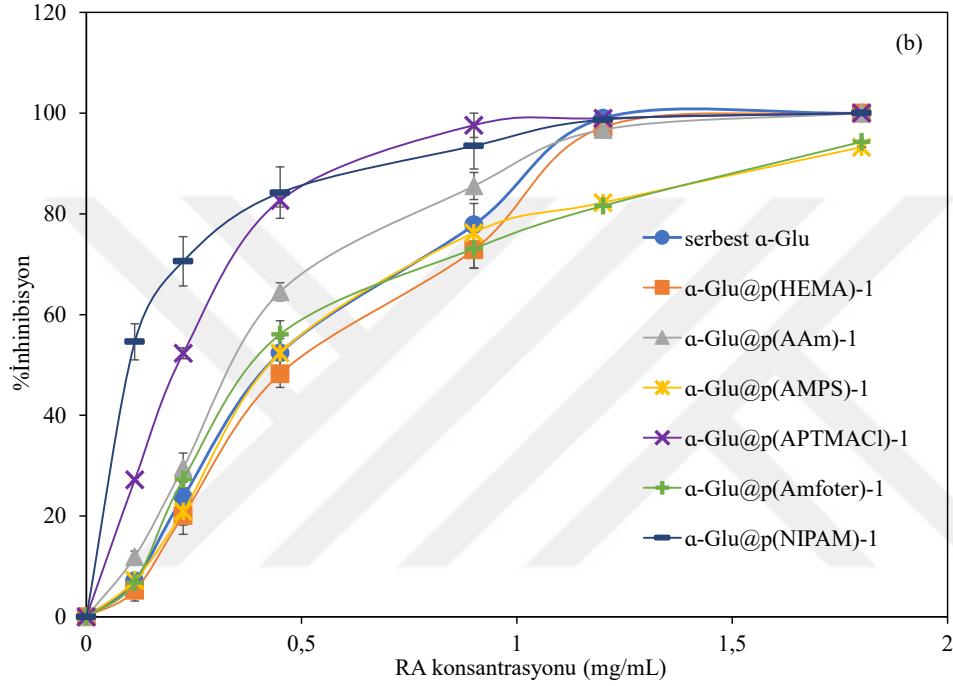
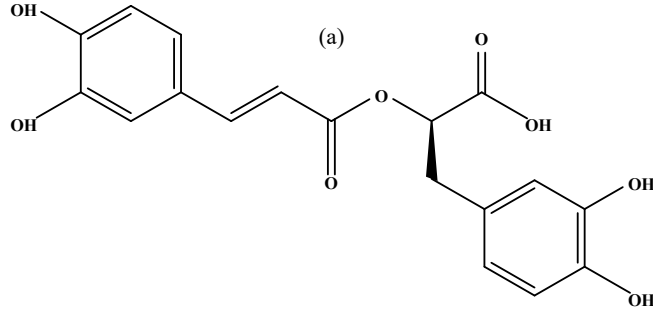
$\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri için de  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, belirlenen optimum çalışma koşullarında yapılan reaksiyonlar ile Lineweaver-Burk denklemlerinin lineer ve non-lineer formlarından hesaplanmıştır.  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için lineer ve non-lineer Lineweaver-Burk denklemlerinden  $K_m$  değerleri sırasıyla  $1,07 \pm 0,02$  ve  $1,10 \pm 0,01$  mM olarak hesaplanmıştır. Lineer denklemden  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için hesaplan  $K_m$  değeri, serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için lineer denklemden hesaplanan  $K_m$  değerine çok yakın gözlenmiştir. Buna rağmen non-lineer denklemden  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için hesaplan  $K_m$  değeri, serbest  $\alpha$ -Glu enzimi için hesaplanan  $K_m$  değerinden küçük olarak gözlenmiştir. Bununla beraber, Lineweaver-Burk denklemlerinin lineer ve non-lineer formlarından  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemi için hesaplanan  $V_{max}$  değerleri  $0,002$  mM/dk olarak aynı gözlenmiştir.

Lineweaver-Burk denklemlerinin lineer ve non-lineer formlarından elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri ile çizdirilen grafiklerin, deneysel olarak elde edilen sonuçlar ile **Şekil 41 (b)**'de karşılaştırılması sonucunda non-lineer Lineweaver-Burk denkleminde elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin deneysel sonuçlarla daha iyi uyum gösterdiği açıkça görülmüştür.

Özetle,  $\alpha$ -Glu enzimi immobilize edilmiş sistemlerin kinetik çalışmalarından istisnalar hariç  $\alpha$ -Glu enziminin kriyojeller içerisinde hapsetme metodu ile sentez sırasında immobilizasyonu enzimlerin substrat afinitesini düşürdüğü, serbest enzime göre daha yüksek olarak gözlenen  $K_m$  değerleri ile anlaşılmıştır. Bu, kriyojel içindeki serbest ortalama yol nedeniyle substratın immobilize sistemlerde  $\alpha$ -Glu enziminin aktif bölgesine ulaşması, serbest  $\alpha$ -Glu enzimine göre daha zor olmasından kaynaklanmaktadır (Sahoo vd., 2013; Sun vd., 2012; Zhang vd., 2016).

#### 4.8. $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivasyon çalışmaları

Karbonhidratların parçalanmasında hayati bir role sahip olan  $\alpha$ -Glu enzimini deaktive ederek, hiperglisemi ve tip II diyabetin en büyük sorunu olarak görülen kan şekeri seviyesindeki artış, bazı karbonhidratlı diyetler ile çok kolay bir şekilde azaltılabilmektedir (Hossain vd., 2020; Jiao vd., 2018).  $\alpha$ -Glu enziminin deaktivasyonun, hiperglisemi ve tip II diyabetin kontrollü tedavisi için oldukça önemli olduğu rapor edilmiştir (Kwon vd., 2006; Nair vd., 2013; Yang vd., 2019). Bununla beraber, endüstriyel uygulamalar için kullanılan bir katalizör sisteminin kontrol edilebilir deaktivasyonu, istenen/kontrol edilebilir katalitik performans elde edilmesinde oldukça önemlidir (Sheldon vd Woodley, 2018). Flavonoidlerin  $\alpha$ -Glu enzimlerini deaktive etmede kullanıldığı gösterilmiştir (Sahiner vd., 2018). Bu nedenle, serbest ve kriyojeller içerisinde immobilize edilen  $\alpha$ -Glu enziminin deaktivasyon davranışlarının belirlenmesi için kimyasal yapısı **Şekil 42 (a)**'da verilen Rosmarinik asit (RA) molekülünün 0,1125-1,8 mg/mL arasındaki çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri ilgili  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemi için belirlenen tampon çözeltilerinde hazırlanmış ve enzimatik reaksiyon ortamına 1'er mL eklenerek sistemlerin deaktivasyon davranışları incelenmiştir.



Şekil 42. (a) Rosmarinik asit molekülünün kimyasal yapısı ve (b) serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ile  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinin deaktivasyonu ile ilgili çalışmalar [Çalışma koşulları: 4 mL tampon çözelti, 37 °C, 0,5 mL 10 mM substrat, 1 mL RA çözeltisi].

Serbest  $\alpha$ -Glu enzimi ve eşit miktarda enzim içeren  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1,  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin deaktivitelerinin karşılaştırıldığı grafik Şekil 42 (b)'de verilmiştir. Serbest  $\alpha$ -Glu enziminin deaktivasyonu incelendiğinde 0,45 mg/mL konsantrasyonunda RA varlığında  $52,4 \pm 3,2$  deaktiviteye uğradığı gözlenirken, 1,8 mg/mL konsantrasyondaki RA çözeltisi serbest enziminin aktivitesini %100 deaktive etmiştir. Nötral  $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemlerinin de serbest  $\alpha$ -Glu enziminin deaktivasyonuna benzer bir davranış gösterdiği görülmüştür. Buna göre  $\alpha$ -

Glu@p(HEMA)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1 kriyojel sistemleri 0,45 mg/mL RA konsantrasyonunda aktivitelerinin sırasıyla %48,2 $\pm$ 2,7 ve %64,5 $\pm$ 2,9'unu kaybederken, 1,8 mg/mL RA konsantrasyonunda serbest enzim gibi %100 deaktive olmuştur. Anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojel sistemleri sırasıyla 0,45 ve 1,8 mg/mL RA konsantrasyonunda yaklaşık %50 ve %90 deaktive olurken, katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemlerinin aynı konsantrasyonlardaki RA çözeltisi varlığında sırasıyla %82,6 $\pm$ 1,3 ve %100 deaktive olduğu gözlenmiştir.  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 kriyojel sistemlerinin de aynı RA konsantrasyonlarında sırasıyla %56,1 $\pm$ 2,4 ve %94,3 $\pm$ 0,2 aktivite kaybı yaşadığı gözlenirken, bu değerler  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri için sırasıyla %84,2 $\pm$ 5,1 ve %100 olarak ölçülmüştür.

Deaktivite çalışmalarının sonucunda serbest ve immobilize  $\alpha$ -Glu enzimlerinin benzer davranışlar sergilediği görülmüştür. Bununla beraber, katyonik p(APTMAcI), negatif yüklü RA moleküllerini kolayca absorbe/adsorbe edebileceği için içerisinde immobilize edilmiş enzim daha düşük RA konsantrasyonlarında bile daha fazla deaktive olmuştur.

## BEŞİNCİ BÖLÜM BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Nötral p(HEMA), p(AAm), anyonik p(AMPS), katyonik p(APTMAcI), hem anyonik hemde katyonik fonksiyonel gruplar içeren p(Amfoter), sıcaklık duyarlı p(NIPAM) ve dallanmış PEI gibi sentetik monomer ve/ya polimer zincirlerinden ve doğal CMC ve Dekstran polimerlerinden hazırlanan süper makro gözenekli kriyojel yapılarına sentez sırasında hapsetme tekniği kullanılarak  $\alpha$ -Glu ve Üreaz enzimleri başarıyla immobilize edilmiştir. Daha sonra bu enzim@kriyojel sistemleri %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi ve SEM, FT-IR ve TGA yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Enzim@kriyojel sistemlerinden enzim sızıntısı, immobilizasyon verimi ve immobilizasyon etkinliği parametreleri hesaplandıktan sonra, immobilize edilen enzim miktarı, inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH gibi önemli parameterelerin enzim@kriyojel sistemlerinin enzimatik aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve eşit miktardaki serbest enzimin aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Bunlarla beraber, enzim@kriyojel sistemlerinin tekrar kullanılabilirlikleri ve saklama süreleri eşit miktardaki serbest enzim ile %aktivite değeri üzerinden karşılaştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

- Kriyojellerin sentez koşullarının (kriyojenik şartlar, çözücünün donma noktasının altında sıcaklıklar, -20 °C), enzimlerin saklanma koşullarına benzer olması sayesinde enzim immobilizasyonu hapsetme tekniği kullanılarak sentez sırasında kolayca gerçekleştirilmiştir.
- Enzim immobilizasyonu için sentez sırasında hapsetme tekniği kullanılması ile immobilize edilecek enzim miktarının kolayca kontrol edilebileceği gösterilmiştir.
- Enzim içermeyen kriyojeller içine enzim immobilizasyonu sonrasında %şişme, %gözeneklilik, %gözenek hacmi ve %jel verimi değerlerinde önemli değişiklikler olmamıştır ve kriyojellerin süper makro gözenekli yapılarının enzim immobilizasyonu ile kapanmadığı ve/veya bozulmadığı anlaşılmıştır.
- Enzim içermeyen ve enzim immobilize edilmiş kriyojel yapılarının SEM görüntüleri ile 1-100  $\mu$ m arasında değişen birbiri ile bağlantılı süper makro gözenekli yapıda oldukları gözlemlenmiş ve enzimin varlığı ile gözeneklerin kapandığı sonucuna varılmıştır.

- Hapsetme tekniği ile enzim immobilizasyonunun en büyük dezavantajlarından biri olan enzim sızıntısı için yapılan deneyler immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttıkça enzim sızıntısında arttığı göstermiştir. Bunun nedeni, immobilizasyon için kullanılan enzim miktarının artmasıyla yüzeye tutunan enzim miktarında artması ve yıkama sırasında sistem uzaklaşmasıdır.

- Hazırlanan enzim@kriyojel sistemleri için, immobilizasyon verimlerinin immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttıkça azaldığı gözlenmiştir.

- En yüksek immobilizasyon verimleri, immobilizasyon için kullanılan en düşük enzim miktarları için elde edilmiştir. %İmmobilizasyon verimleri  $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinde p(HEMA), p(AAm), p(AMPS) ve p(APTMAcI) kriyojelleri için %90'ın üzerinde gözlenirken, p(Amfoter) ve p(NIPAM) kriyojelleri için %80'in üzerinde gözlenmiştir. Üreaz enzimi immobilize edilen PEI, CMC ve Dekstran kriyojelleri için immobilizasyon verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur.

- $\alpha$ -Glu@kriyojel sistemlerinde en yüksek aktivite değerini, en az enzim içeren sistemler için gözlenmiştir ve enzim miktarı arttıkça aktivite değerinin düşmesi enzimlerin kriyojellerin gözenek ve gözenek duvarları içerisine gömülmesi ve artan derişimle üstüste gelerek birbirlerinin aktif bölgelerini etkilemeleri olarak açıklanmıştır.

- $\alpha$ -Glu@p(HEMA)-1,  $\alpha$ -Glu@p(AAm)-1,  $\alpha$ -Glu@p(Amfoter)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemleri pH 6,8 sodyum fosfat tamponu ve 37 °C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarda aktivitelerini serbest  $\alpha$ -Glu enzimine göre sırasıyla %92±2, %81±3, %91±2 ve %66±3'n korudukarı belirlenmiştir.

- $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin 37 °C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarda %66±3 gibi düşük aktivite göstermesi, p(NIPAM) kriyojelinin yapısı gereği LCST (32 °C) değerinin üstündeki sıcaklıklarda hidrofobik zelliğ gösterek şişmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Destek materyalin hidrofobik zelliğ göstererek gözenek boyutlarının küçülmesi ile substratın kriyojel içerisine difüzyonu zorlaşmış ve ayrıca az şişen kriyojel içersinde enzimler birbirlerine yaklaşarak birbirlerinin aktif bölgelerini olumsuz yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

- $\alpha$ -Glu@p(NIPAM)-1 kriyojel sistemlerinin aktivitesi, pH 6,8 sodyum fosfat tamponu ve 25 ve 30 °C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarda sırasıyla %98±0,2 ve %93±2 olarak gözlenmiştir.

- $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 ve  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojellerinde ise en yüksek aktivite değerleri pH değişikliklerine karşı direnç gösterdikleri için ve maksimum %şişme gösterdikleri pH'a bağlı olarak, anyonik  $\alpha$ -Glu@p(AMPS)-1 kriyojel sistemleri için optimum çalışma koşulları pH 8,0 potasyum fosfat tamponu ve 37 °C olarak gözlenirken, katyonik  $\alpha$ -Glu@p(APTMAcI)-1 kriyojel sistemleri için optimum çalışma koşulları pH 5,0 potasyum fosfat tamponu ve 37 °C olarak gözlenmiştir.

- Buna bağlı olarak AMPS ve APTMAcI monomerlerinden hazırlanan p(Amfoter) kriyojelleri içine  $\alpha$ -Glu enzimi immobilizasyonu, 37 °C reaksiyon sıcaklığında %70'ten yüksek aktiveyle pH 5,0-8,0 aralığında çalışma olanağı sağlayarak katı bir tampon görevi gördüğü sonucuna varılmıştır.

- Üreaz@PEI kriyojel sistemlerinde en yüksek immobilizasyon etkinliği en çok enzim içeren sistemler ile elde edilmiştir. Serbest Üreaz enzimi ve Üreaz@PEI kriyojel sistemleri için pH 7,0 sodyum fosfat tamponu ve 25 °C'de yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucunda Serbest Üreaz enzimi için  $277,3 \pm 22,9$  Unit/mg enzim aktivite hesaplanırken, aktivite değeri Üreaz@PEI kriyojel sistemleri için  $255,2 \pm 18,9$  Unit/mg enzim olarak gözlenmiş ve aktivitesinin %90'ından fazlasını koruduğu sonucu çıkarılmıştır.

- Üreaz@CMC ve Üreaz@Dekstran kriyojel sistemlerinde immobilizasyon veriminin %90'ın üzerinde çıkmasına rağmen, sistemlerin aktivitesi pH 7,0 sodyum fosfat tampon ve 25 °C'de yapılan reaksiyonlarda serbest enzime göre aktivitelerinin %50'sinden fazlasını koruyamamıştır. Bunun nedeni, kriyojel öncül çözeltilerinin çapraz bağlanma reaksiyonunun gerçekleştirilebilmesi için 0,2 M NaOH çözeltisi içinde yapılması ve bu bazik çözeltilerin enzimin konformasyonel yapısını bozması olabileceği sonucuna varılmıştır.

- Yapılan tekrar kullanım ve saklama süresi çalışmalarında, hazırlanan bütün enzim@kriyojel sistemlerinin serbest enzimlere göre dayanıklılıklarının arttığı gözlenmiştir.

- Hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinden, enzim@kriyojel sistemlerinin substrata olan afinitesinin azaldığı ve bunun sebebinde substratın kriyojel içerisindeki hapsedilmiş enzimler ile buluşmasının geciktirilmesi (difüzyon) nedeni ile olabileceği sonucuna varılmıştır.

- $\alpha$ -Glu enziminin RA varlığındaki deaktivite çalışmalarında ise enzimlerin kriyojeller içerisinde immobilizasyonunun, serbest enzimin ve immobilize enzimin deaktivite davranışına etki etmediği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar nötral p(HEMA), p(AAm), anyonik p(AMPS), kationik p(APTMAcI), p(Amfoter), sıcaklık duyarlı p(NIPAM) ve PEI kriyojellerinin hapsetme tekniği ile enzim immobilizasyonu için kullanılabilirliği, ve hazırlanan sistemlerin serbest enzimlere göre geniş sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek aktivite ile çalışılabilme potansiyelleri gösterilmiştir. Bunlarla birlikte, kriyojeller içerisinde enzim immobilizasyonu ile hazırlanan sistemlerin tekrar kullanım ve saklama kolaylığı sağlayarak endüstriyel uygulamalar için önemli ekonomik kazanımlar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ışığında öneriler aşağıda verilmiştir;

- Sentetik polimerlerden nötral, anyonik, kationik, amfoter ve/veya sıcaklık duyarlı kriyojeller içerisine Üreaz enzimi immobilizasyonu ve bununla ilgili aktivite çalışmalarının serbest enzim ile karşılaştırılması,
- Sentetik polimerlerde hazırlanacak nötral, anyonik, kationik, amfoter ve/veya sıcaklık duyarlı kriyojeller içerisine daha başka enzimlerin de immobilizasyonu ve bununla ilgili aktivite çalışmalarının ilgili serbest enzimler ile karşılaştırılması,
- PEI ve doğal polimerlerden hazırlanan kriyojeller (CMC ve Dekstran) içerisinde  $\alpha$ -Glu enziminin immobilizasyonu ve bununla ilgili aktivite çalışmalarının serbest enzim ile karşılaştırılması,
- PEI ve doğal polimerlerden hazırlanan kriyojeller (CMC ve Dekstran) ile ilgili Üreaz enzim immobilizasyonu çalışmalarının optimizasyonu ve enzimatik reaksiyon sonuçlarının farklı aktivite tayin metotları ile tespit edilmesi,
- Başka doğal polimerlerden hazırlanacak kriyojeller içerisine  $\alpha$ -Glu, Üreaz ve daha farklı enzimlerin de immobilizasyonu ve bununla ilgili aktivite çalışmalarının ilgili serbest enzimler ile karşılaştırılması,
- Sentetik ve doğal polimerlerden hazırlanacak kompozit yapıdaki kriyojel yapılarının içerisine değişik enzimlerin immobilizasyonu ve aktivite çalışmaları önerilmektedir.

## KAYNAKÇA

Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(3), 794–807. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>

Akpınar, F., Evli, S., Güven, G., Bayraktaroğlu, M., Kilimci, U., Uygun, M., & Aktaş Uygun, D. (2020). Peroxidase Immobilized Cryogels for Phenolic Compounds Removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(1), 138–147. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03083-1>

Aktaş Uygun, D., Uygun, M., Akgöl, S., & Denizli, A. (2015). Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels. *Materials Science and Engineering C*, 50, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.024>

Ari, B., Yetiskin, B., Okay, O., & Sahiner, N. (2020). Preparation of dextran cryogels for separation processes of binary dye and pesticide mixtures from aqueous solutions. *Polymer Engineering & Science*, 60(8), 1890–1901. <https://doi.org/10.1002/pen.25425>

Ariga, O., Kato, M., Sano, T., Nakazawa, Y., & Sano, Y. (1993). Mechanical and kinetic properties of PVA hydrogel immobilizing  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(3), 203–206. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90009-W](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90009-W)

Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986(2), 275–290. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01871-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01871-X)

Askaripour, H., Vossoughi, M., Khajeh, K., & Alemzadeh, I. (2020). Examination of chondroitinase ABC I immobilization onto dextran-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its in-vitro release. *Journal of Biotechnology*, 309(December 2019), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.020>

Bairoch, A. (2000). The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 304–305. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.304>

Bashir, N., Sood, M., & Bandral, J. D. (2020). Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2),

254–261. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2d.8779>

Belokon, Y. N., Kochetkov, K. A., Pleiva, F. M., Ikonnikov, N. S., Maleev, V. I., Parmar, V. S., Kumar, R., & Lozinsky, V. I. (2000). Enantioselective Hydrolysis of a Schiff's Base of D,L-Phenylalanine Ethyl Ester in Water-Poor Media Via the Reaction Catalyzed with  $\alpha$ -Chymotrypsin Immobilized on Hydrophilic Macroporous Gel Support. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 88(1–3), 097–106. <https://doi.org/10.1385/ABAB:88:1-3:097>

Benini, S., Kosikowska, P., Cianci, M., Mazzei, L., Vara, A. G., Berlicki, Ł., & Ciurli, S. (2013). The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(3), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-0983-7>

Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E. B., Yavuz, H., & Denizli, A. (2010). Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. *Materials Science and Engineering C*, 30(2), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.11.013>

Bloch, K., Vanichkin, A., Damshkaln, L. G., Lozinsky, V. I., & Vardi, P. (2010). Vascularization of wide pore agarose–gelatin cryogel scaffolds implanted subcutaneously in diabetic and non-diabetic mice. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1200–1205. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.022>

Boudrant, J., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, 90, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>

Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3), 1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.033>

Cacicedo, M. L., Manzo, R. M., Municoy, S., Bonazza, H. L., Islan, G. A., Desimone, M., Bellino, M., Mammarella, E. J., & Castro, G. R. (2019). Immobilized enzymes and their applications. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8>

Caputo, A. T., Alonzi, D. S., Marti, L., Reca, I. B., Kiappes, J. L., Struwe, W. B.,

Cross, A., Basu, S., Lowe, E. D., Darlot, B., Santino, A., Roversi, P., & Zitzmann, N. (2016). Structures of mammalian ER  $\alpha$ -glucosidase II capture the binding modes of broad-spectrum iminosugar antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(32), E4630–E4638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604463113>

Cheng, G., Xing, J., Pi, Z., Liu, S., Liu, Z., & Song, F. (2019).  $\alpha$ -Glucosidase immobilization on functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for screening of enzyme inhibitors. *Chinese Chemical Letters*, *30*(3), 656–659. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.12.003>

Cho, Y. S., & Lim, H. S. (2018). Comparison of various estimation methods for the parameters of Michaelis–Menten equation based on in vitro elimination kinetic simulation data. *Translational and Clinical Pharmacology*, *26*(1), 39–47. <https://doi.org/10.12793/tcp.2018.26.1.39>

Chu, K. C., & Rutt, B. K. (1997). Polyvinyl alcohol cryogel: An ideal phantom material for MR studies of arterial flow and elasticity. *Magnetic Resonance in Medicine*, *37*(2), 314–319. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910370230>

Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F., Deraison, C., Rahbé, Y., & Terra, W. R. (2003). Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, *49*(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00222-6)

Dainiak, M. B., Allan, I. U., Savina, I. N., Cornelio, L., James, E. S., James, S. L., Mikhailovsky, S. V., Jungvid, H., & Galaev, I. Y. (2010). Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials*, *31*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.029>

Dalby, P. A. (2003). Optimising enzyme function by directed evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, *13*(4), 500–505. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00101-5)

Das-Bradoo, S., Svensson, I., Santos, J., Plieva, F., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2004). Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. *Journal of Biotechnology*, *110*(3), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.004>

Demirci, S., Sahiner, M., Yilmaz, S., Karadag, E., & Sahiner, N. (2020). Enhanced

enzymatic activity and stability by in situ entrapment of  $\alpha$ -Glucosidase within super porous p(HEMA) cryogels during synthesis. *Biotechnology Reports*, 28, e00534. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00534>

Demirci, S., & Sahiner, N. (2021). Superporous neutral, anionic, and cationic cryogel reactors to improved enzymatic activity and stability of  $\alpha$ -Glucosidase enzyme via entrapment method. *Chemical Engineering Journal*, 409, 128233. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128233>

Deng, H., Li, X., Peng, Q., Wang, X., Chen, J., & Li, Y. (2005). Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. *Angewandte Chemie*, 117(18), 2842–2845. <https://doi.org/10.1002/ange.200462551>

Ding, Z., Zheng, X., Li, S., & Cao, X. (2016). Immobilization of cellulase onto a recyclable thermo-responsive polymer as bioconjugate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 128, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.007>

Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, 97(14), 4131–4133. <https://doi.org/10.1021/ja00847a045>

Dixon, N. E., Riddles, P. W., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1980). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N -methylurea, and related compounds. *Canadian Journal of Biochemistry*, 58(12), 1335–1344. <https://doi.org/10.1139/o80-181>

Dmitriy, B. (2020). Gold nanoparticles incorporated into cryogel walls for efficient nitrophenol conversion. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119089. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119089>

Drozdov, A. D., & Declaville Christiansen, J. (2015). Modeling the effects of pH and ionic strength on swelling of polyelectrolyte gels. *Journal of Chemical Physics*, 142(11). <https://doi.org/10.1063/1.4914924>

Efremenko, E. N., Lyagin, I. V., & Lozinsky, V. I. (2016). Enzymatic biocatalysts immobilized on/in the cryogel-type carriers. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications*, 309–332. <https://doi.org/10.1201/b19676-15>

Erol, K., Cebeci, B. K., Köse, K., & Köse, D. A. (2019). Effect of immobilization on

the activity of catalase carried by poly(HEMA-GMA) cryogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.121>

Ertürk, G., & Mattiasson, B. (2014). Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*, 1357, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.055>

Fan, C., Li, K., Wang, Y., Qian, X., & Jia, J. (2016). The stability of magnetic chitosan beads in the adsorption of Cu<sup>2+</sup>. *RSC Advances*, 6(4), 2678–2686. <https://doi.org/10.1039/c5ra20943a>

Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S. G., Lopez-Carrobles, N., Virgen-Ortíz, J. J., Gorines, B. C., Otero, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. *Process Biochemistry*, 54, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.018>

Forsyth, C., & Patwardhan, S. V. (2013). Controlling performance of lipase immobilised on bioinspired silica. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(8), 1164–1174. <https://doi.org/10.1039/c2tb00462c>

Girelli, A. M., Quattrocchi, L., & Scuto, F. R. (2020). Silica-chitosan hybrid support for laccase immobilization. *Journal of Biotechnology*, 318(April), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.004>

Gopinath, S., & Sugunan, S. (2007). Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science*, 35(1–2), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.04.007>

Grosová, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised &beta;-galactosidase in food industry – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(No. 1), 1–14. <https://doi.org/10.17221/1134-CJFS>

Gupta, K., Jana, A. K., Kumar, S., & Maiti, M. (2013). Immobilization of amyloglucosidase from SSF of *Aspergillus niger* by crosslinked enzyme aggregate onto magnetic nanoparticles using minimum amount of carrier and characterizations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.015>

Hamerska-Dudra, A., Bryjak, J., & Trochimczuk, A. W. (2007). Immobilization of

glucoamylase and trypsin on crosslinked thermosensitive carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.008>

Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453–468. <https://doi.org/10.1039/b711564b>

Hedström, M., Plieva, F., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2008). Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: A new matrix for enzyme immobilization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3), 907–912. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1745-6>

Hernández, A., & Ruiz, M. T. (1998). An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics*, 14(2), 227–228. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.2.227>

Ho, F. M. (2012). Structural and mechanistic investigations of photosystem II through computational methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(1), 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.04.009>

Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4(7), 518–524. <https://doi.org/10.1038/nmat1421>

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>

Hossain, U., Das, A. K., Ghosh, S., & Sil, P. C. (2020). An overview on the role of bioactive  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. *Food and Chemical Toxicology*, 145(August), 111738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111738>

Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., & Castro, G. R. (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.050>

Jiao, Y., Hua, D., Huang, D., Zhang, Q., & Yan, C. (2018). Characterization of a new heteropolysaccharide from green guava and its application as an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor for the treatment of type II diabetes. *Food and Function*, 9(7), 3997–4007. <https://doi.org/10.1039/c8fo00790j>

Jirakunakorn, R., Khumngern, S., Choosang, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Numnuam, A. (2020). Uric acid enzyme biosensor based on a screen-printed electrode coated with Prussian blue and modified with chitosan-graphene composite cryogel. *Microchemical Journal*, 154(September 2019), 104624. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104624>

Kafarski, P., & Talma, M. (2018). Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 13(January), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.007>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>

Karacan, P., & Okay, O. (2013). Ethidium bromide binding to DNA cryogels. *Reactive and Functional Polymers*, 73(3), 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.11.014>

Kemmer, G., & Keller, S. (2010). Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nature Protocols*, 5(2), 267–281. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.182>

Kharisov, B. I., & Eldin, M. S. M. (2018). Enzyme Immobilization: Nanopolymers for Enzyme Immobilization Applications. *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*, 220–228. <https://doi.org/10.1201/b19457-22>

Klongklaew, P., Naksena, T., Kanatharana, P., & Bunkoed, O. (2018). A hierarchically porous composite monolith polypyrrole/octadecyl silica/graphene oxide/chitosan cryogel sorbent for the extraction and pre-concentration of carbamate pesticides in fruit juices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(27), 7185–7193. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1323-0>

Krishnamurthy, A., Mundra, S., & Belur, P. D. (2018). Improving the catalytic efficiency of Fibrinolytic enzyme from *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* by chemical modification. *Process Biochemistry*, 72(June), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.015>

Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., & Raj, A. (2017). Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 24–33.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.104>

Kurayama, F., Mohammed Bahadur, N., Furusawa, T., Sato, M., & Suzuki, N. (2020). Facile preparation of aminosilane-alginate hybrid beads for enzyme immobilization: Kinetics and equilibrium studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 1203–1212. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.130>

Kwon, Y. I. I., Vattem, D. A., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *15*(1), 107–118.

Lalonde, J., & Margolin, A. (2008). Immobilization of enzymes. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9783527618262.ch6>

Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.045>

Lozinsky, V. I. (2008). Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. *Russian Chemical Bulletin*, *57*(5), 1015–1032. <https://doi.org/10.1007/s11172-008-0131-7>

Lozinsky, Vladimir I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., & Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, *21*(10), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002>

Lozinsky, Vladimir I., & Okay, O. (2014). Basic Principles of Cryotropic Gelation. In *Advances in Polymer Science* (Vol. 263, pp. 49–101). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_2)

MA, Z., & RAMAKRISHNA, S. (2008). Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. *Journal of Membrane Science*, *319*(1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.045>

Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2017). Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource Technology*, *245*, 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.031>

Marasović, M., Marasović, T., & Miloš, M. (2017). Robust Nonlinear Regression in

Enzyme Kinetic Parameters Estimation. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6560983>

Martínez, Y. N., Cavello, I., Hours, R., Cavalitto, S., & Castro, G. R. (2013). Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment. *Bioresource Technology*, 145, 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.063>

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

Mateo, C., Palomo, J. M., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2004). A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(3), 273–276. <https://doi.org/10.1002/bit.20033>

Moehlenbrock, M. J., & Minteer, S. D. (2017). Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. In *Enzyme Stabilization and Immobilization* (Vol. 1504, pp. 1–7). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_1)

Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

Morris, S. M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22(58), 87–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547>

Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128–132.

Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>

Nisha, S., Karthick, S. A., & Gobi, N. (2012). A Review on Methods, Application

and Properties of Immobilized Enzyme. *Che Sci Rev Lett*, 1(3), 148–155.

Odaci, D., Telefoncu, A., & Timur, S. (2010). Maltose biosensing based on co-immobilization of  $\alpha$ -glucosidase and pyranose oxidase. *Bioelectrochemistry*, 79(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.12.010>

Otten, L. G., & Quax, W. J. (2005). Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomolecular Engineering*, 22(1–3), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.02.002>

Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of  $\beta$ -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3–4), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.003>

Patel, A. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2017). Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>

Pattavarakorn, D., Youngta, P., Jaesrichai, S., Thongbor, S., & Chaimongkol, P. (2013). Electroactive Performances of Conductive Polythiophene/hydrogel Hybrid Artificial Muscle. *Energy Procedia*, 34, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.799>

Pera, L. M., Baigori, M. D., Pandey, A., & Castro, G. R. (2015). Biocatalysis. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00012-4>

Petrov, P., Pavlova, S., Tsvetanov, C. B., Topalova, Y., & Dimkov, R. (2011). In situ entrapment of urease in cryogels of poly(N-isopropylacrylamide): An effective strategy for noncovalent immobilization of enzymes. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(3), 1742–1748. <https://doi.org/10.1002/app.34063>

Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., & Galaev', I. Y. (2005). Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1(4), 303–309. <https://doi.org/10.1039/b510010k>

Pooni, J., Giustozzi, F., Robert, D., Setunge, S., & O'Donnell, B. (2019). Durability of enzyme stabilized expansive soil in road pavements subjected to moisture degradation.

<https://doi.org/10.1016/j.trgeo.2019.100255>

Prodanović, R., Milosavić, N., Jovanović, S., Prodanović, O., Ćirković Veličković, T., Vujčić, Z., & Jankov, R. M. (2006). Activity and stability of soluble and immobilized  $\alpha$ -glucosidase from baker's yeast in cosolvent systems. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(3), 195–200. <https://doi.org/10.1080/10242420600655903>

Pundir, C. S., Jakhar, S., & Narwal, V. (2019). Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 123, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.067>

Qiu, B., Shi, Y., Yan, L., Wu, X., Zhu, J., Zhao, D., Khan, M. Z. H., & Liu, X. (2020). Development of an on-line immobilized  $\alpha$ -glucosidase microreactor coupled to liquid chromatography for screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 180, 113047. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113047>

Rani, A. S., Das, M. L. M., & Satyanarayana, S. (2000). Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(5), 471–476. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00116-2)

Rebroš, M., Rosenberg, M., Mlichová, Z., Křištofiková, L., & Paluch, M. (2006). A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats® as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 800–804. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.001>

Reis, C., Sousa, E., Serpa, J., Oliveira, R., Oliveira, R., & Santos, J. (2019). Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbaks and oppurtunities. *Química Nova*, X(00), 1–16. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>

Ribeiro, A. L., Sánchez, M., Hidalgo, A., & Berenguer, J. (2017). Stabilization of Enzymes by Using Thermophiles. In J.-L. Barredo & I. Herráiz (Eds.), *Microbial Steroids* (Vol. 1645, pp. 297–312). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7183-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7183-1_21)

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>

Sahiner, M., Sahiner, N., Sagbas, S., Fullerton, M. L., & Blake, D. A. (2018). Fabrication of Biodegradable Poly(naringin) Particles with Antioxidant Activity and Low Toxicity. *ACS Omega*, 3(12), 17359–17367. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02292>

Sahiner, N., & Demirci, S. (2016). In situ preparation of polyaniline within neutral, anionic, and cationic superporous cryogel networks as conductive, semi-interpenetrating polymer network cryogel composite systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(46). <https://doi.org/10.1002/app.44137>

Sahiner, Nurettin. (2018). Super macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) cryogel for separation purpose. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(8), 2184–2191. <https://doi.org/10.1002/pat.4326>

Sahiner, Nurettin, & Demirci, S. (2016). Poly ionic liquid cryogel of polyethyleneimine: Synthesis, characterization, and testing in absorption studies. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(22), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.43478>

Sahiner, Nurettin, Demirci, S., Sahiner, M., Yilmaz, S., & Al-Lohedan, H. (2015). The use of superporous p(3-acrylamidopropyl)trimethyl ammonium chloride cryogels for removal of toxic arsenate anions. *Journal of Environmental Management*, 152, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.023>

Sahiner, Nurettin, & Seven, F. (2014). The use of superporous p(AAc (acrylic acid)) cryogels as support for Co and Ni nanoparticle preparation and as reactor in H<sub>2</sub> production from sodium borohydride hydrolysis. *Energy*, 71, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.031>

Sahiner, Nurettin, & Yildiz, S. (2014). Preparation of superporous poly(4-vinyl pyridine) cryogel and their templated metal nanoparticle composites for H<sub>2</sub> production via hydrolysis reactions. *Fuel Processing Technology*, 126, 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.05.025>

Sahiner, Nurettin, Yildiz, S., & Al-Lohedan, H. (2015). The resourcefulness of p(4-VP) cryogels as template for in situ nanoparticle preparation of various metals and their use in H<sub>2</sub> production, nitro compound reduction and dye degradation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166–167, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.11.027>

Sahiner, Nurettin, Yildiz, S., & Sagbas, S. (2018). Graphene oxide embedded P(4-VP) cryogel composites for fast dye removal/separations. *Polymer Composites*, 39(5), 1694–

1703. <https://doi.org/10.1002/pc.24120>

Sahoo, B., Sahu, S. K., Bhattacharya, D., Dhara, D., & Pramanik, P. (2013). A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.003>

Saniner, N., Suner, S. S., & Tosunoglu, M. (2020). Preparation of Macroporous Carboxymethyl Cellulose Cryogels and Its Blood Compatibility. *MRS Advances*, 5(16), 825–833. <https://doi.org/10.1557/adv.2019.483>

Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>

Setford, S. J., & Newman, J. D. (2005). Enzyme Biosensors. In *Microbial Enzymes and Biotransformations* (pp. 29–60). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-846-3:029>

Seven, F., & Sahiner, N. (2014a). Enhanced catalytic performance in hydrogen generation from NaBH<sub>4</sub> hydrolysis by super porous cryogel supported Co and Ni catalysts. *Journal of Power Sources*, 272, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.08.047>

Seven, F., & Sahiner, N. (2014b). Superporous P(2-hydroxyethyl methacrylate) cryogel-M (M:Co, Ni, Cu) composites as highly effective catalysts in H<sub>2</sub> generation from hydrolysis of NaBH<sub>4</sub> and NH<sub>3</sub>BH<sub>3</sub>. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(28), 15455–15463. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.093>

Sharifi, M., Sohrabi, M. J., Hosseinali, S. H., Hasan, A., Kani, P. H., Talaei, A. J., Karim, A. Y., Nanakali, N. M. Q., Salihi, A., Aziz, F. M., Yan, B., Khan, R. H., Saboury, A. A., & Falahati, M. (2020). Enzyme immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.064>

Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3–4), 141–147. <https://doi.org/10.1080/10242420500183378>

Sheldon, Roger A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>

Sheldon, Roger A., & Brady, D. (2019). Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. *ChemSusChem*, 12(13), 2859–2881. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900351>

Sheldon, Roger A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

Sheldon, Roger A., & Woodley, J. M. (2018). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, 118(2), 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>

Sigma-Aldrich. (n.d.). *Enzymatic Assay of Urease from Jack Beans*. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/protocol/food-and-beverage-testing-and-manufacturing/chemical-analysis-for-food-and-beverage/enzymatic-assay-of-urease-from-jack-beans>

Sigma-Aldrich. (1996). Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Glucosidase (EC 3.2.1.20) p-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Glucoside as Substrate. *Sigma Quality Control Test Procedure*, 1–3. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/g5003enz.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/g5003enz.pdf)

Song, J., He, W., Shen, H., Zhou, Z., Li, M., Su, P., & Yang, Y. (2019). Self-assembly of a magnetic DNA hydrogel as a new biomaterial for enzyme encapsulation with enhanced activity and stability. *Chemical Communications*, 55(17), 2449–2452. <https://doi.org/10.1039/c8cc09717h>

Sun, L., Liang, H., Yuan, Q., Wang, T., & Zhang, H. (2012). Study on a carboxyl-activated carrier and its properties for papain immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(8), 1083–1088. <https://doi.org/10.1002/jctb.3714>

Svensson, B., & Ottesen, M. (1981). Entrapment of chemical derivatives of glycoamylase in calcium alginate gels. *Carlsberg Research Communications*, 46(1–2), 13–24. <https://doi.org/10.1007/BF02906194>

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 149–153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>

Tamer, T., Omer, A., & Hassan, M. (2016). Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(August 2019), 385–392.

Tanriseven, A., & Ölçer, Z. (2008). A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.011>

Tennikova, T. B., & Reusch, J. (2005). Short monolithic beds: history and introduction to the field. *Journal of Chromatography A*, 1065(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.074>

Terra, W. R., & Ferreira, C. (2005). Biochemistry of Digestion. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 4–6, 171–224. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00053-3>

Thoemmes, J., & Kula, M.-R. (1995). Membrane chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*, 11(4), 357–367. <https://doi.org/10.1021/bp00034a001>

Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*. 200, 95–126. [https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7_4)

Tran, D. N., & Balkus, K. J. (2011). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catalysis*, 1(8), 956–968. <https://doi.org/10.1021/cs200124a>

Trevan, M. D. (n.d.). Enzyme Immobilization by Covalent Bonding. In *New Protein Techniques* (pp. 495–510). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:495>

Tripathi, A., & Melo, J. S. (2015). Preparation of a sponge-like biocomposite agarose-chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model. *RSC Advances*, 5(39), 30701–30710. <https://doi.org/10.1039/c5ra04153h>

Wang, C. Y., Yang, C. H., Huang, K. S., Yeh, C. S., Wang, A. H. J., & Chen, C. H. (2013). Electrostatic droplets assisted in situ synthesis of superparamagnetic chitosan microparticles for magnetic-responsive controlled drug release and copper ion removal. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(16), 2205–2212. <https://doi.org/10.1039/c3tb00467h>

Wang, J., Wu, D., Zhao, G., Li, M., Li, Y., Han, Y., He, A., & Jiang, Y. (2014). Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic polystyrene beads with multifunctional groups. *Process Biochemistry*, 49(5), 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.009>

Wang, J., Zhao, G., Wang, X., Peng, X., & Li, Y. (2015). Synthesis of magnetic thermosensitive microcontainers for enzyme immobilization. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(5), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2986-5>

Worthington, C. C., Worthington, V., & Worthington, A. (2016). *Introduction to enzymes*. 1–14.

Wu, H., Zhang, C., Liang, Y., Shi, J., Wang, X., & Jiang, Z. (2013). Catechol modification and covalent immobilization of catalase on titania submicrospheres. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 92, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.03.018>

Xiong, Y., Liu, Q., & Yin, X. (2016). Synthesis of  $\alpha$ -glucosidase-immobilized nanoparticles and their application in screening for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1022, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.013>

Yang, C. Y., Yen, Y. Y., Hung, K. C., Hsu, S. W., Lan, S. J., & Lin, H. C. (2019). Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review. *Nutrition and Diabetes*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0092-y>

Yavaşer, R., & Karagözler, A. A. (2020). Covalent immobilization of papain onto poly(hydroxyethyl methacrylate)-chitosan cryogels for apple juice clarification. *Food Science and Technology International*, 26(7), 629–641. <https://doi.org/10.1177/1082013220919307>

Yavaşer, R., & Karagözler, A. A. (2021). Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. *Process Biochemistry*, 101(November 2020), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.021>

Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

Zhang, B., Li, P., Zhang, H., Fan, L., Wang, H., Li, X., Tian, L., Ali, N., Ali, Z., & Zhang, Q. (2016). Papain/Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hybrid nanoflower: Preparation, characterization and its enhanced catalytic activity as an immobilized enzyme. *RSC Advances*, 6(52), 46702–46710. <https://doi.org/10.1039/c6ra05308d>

Zhao, S., Zou, Y., Liu, X., & Zhang, H. (2019). Ecofriendly construction of enzyme reactor based on three-dimensional porous cryogel composites. *Chemical Engineering Journal*, 361, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.101>

Zhu, F., Asada, T., Sato, A., Koi, Y., Nishiwaki, H., & Tamura, H. (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 885–892. <https://doi.org/10.1021/jf404318j>