



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Üreazın modifiye edilmiş florisile kovalent immobilizasyonu ve serbest ve immobilize üreazın karakterizasyonu

Covalent immobilization of urease onto modified florisil and characterization of free and immobilized urease

Özlem Alptekin

Çukurova Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(3):811-818.

Abstract

Purpose: In this study, it was aimed to immobilize urease from *Canavalia ensiformis* onto modified Florisil (magnesium silicate) by covalently and to characterize immobilized urease and also to investigate reusability of immobilized urease in a batch type bioreactor.

Materials and Methods: Florisil was activated with 3-aminopropyltriethoxysilane and then modified with glutaraldehyde. Urease was covalently immobilized onto modified support. Images of support and immobilized urease were examined on a scanning electron microscope. The optimum pH and temperature, kinetic parameters (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m) and storage stabilities at 4°C and room temperature of free and immobilized ureases were determined. Reusability of immobilized urease was investigated in a batch type bioreactor.

Results: Free and immobilized ureases showed their maximum activities at pHs 7.0 and 6.5, and at temperatures 50 and 60°C, respectively. The K_m value of immobilized urease increased 2.2 fold compared to free urease. The catalytic efficiency of immobilized urease was about 0.1% of the free urease. Free urease completely lost its activity at the end of 5 days stored at 4°C and room temperature; however, immobilized urease did not lose its activity at the end of 19 days at the same conditions. Immobilized urease maintained 50% of its initial activity at the end of 10 reuses in batch type bioreactor.

Conclusions: Although urease activity significantly decreased upon covalent immobilization onto modified Florisil. However, high storage stability and reusability of immobilized urease makes it potentially useful immobilized form.

Keywords: Urease, immobilization, bioreactor, florisil

Öz

Amaç: Bu çalışmada, *Canavalia ensiformis* kaynaklı üreazın modifiye edilmiş Florisil'e (magnezyum silikat) kovalent immobilize edilmesi ve immobilize üreazın karakterizasyonunun yapılarak biyoreaktör uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Florisil, 3-aminopropiltrioksilan ile aktifleştirilmiş daha sonra glutaraldehit ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş desteğe üreazın kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Desteğin ve immobilize üreazın taramalı elektron mikroskopunda görüntüleri incelenmiştir. Serbest ve immobilize üreazın optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m) belirlenmiş ve 4°C'de ve oda sıcaklığında depolama kararlılıkları incelenmiştir. Immobilize üreazın tekrar kullanım kararlılığı kesikli tip reaktörde araştırılmıştır.

Bulgular: Serbest ve immobilize üreaz için optimum pH sırasıyla 7,0 ve 6,5; optimum sıcaklık ise 50 ve 60°C olarak belirlenmiştir. Immobilizasyondan sonra enzimin K_m değeri 2,2 kat artmıştır. Immobilize üreazın katalitik etkinliği, serbest üreazın katalitik etkinliğinin %0,1'i kadar bulunmuştur. Oda sıcaklığında ve 4°C'de serbest üreaz 5 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken, aynı koşullarda immobilize üreaz 12 gün sonunda aktivitesini kaybetmemiştir. Immobilize üreaz kesikli tip biyoreaktörde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %50'sini korumuştur.

Sonuç: Immobilize üreaz, serbest üreaza göre düşük aktivite göstermekle beraber, depolama kararlılığının ve biyoreaktör uygulamalarında tekrar kullanımının yüksek olması immobilize üreazın serbest üreaza göre kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Üreaz, immobilizasyon, biyoreaktör, florisil

GİRİŞ

Üreaz (EC 3.5.1.5), ürenin amonyak ve karbondioksite dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.



Birçok bitki, bakteri, mantar ve alg de bulunan enzim, azotun doğadaki genel metabolizmasında önemli bir rol oynar¹. *Canavalia ensiformis* kaynaklı üreaz enzimi, 91 kDa molekül ağırlığına sahip birbirinin aynı alt birimleri içeren bir hegzamerdir. Toplam molekül ağırlığı 590 kDa olup, 12 nm boyutundadır². Enzimin aktif merkezinde aktivitesinde çok önemli rol oynayan iki nikel iyonu bulunur³.

İmmobilize enzim kullanımı, reaksiyon koşullarının kolay kontrol edilebilmesi, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmesi ve tekrar kullanılabilirliği gibi nedenlerle serbest enzim kullanımına göre üstünlükler sağlamaktadır⁴. İmmobilize üreaz, sağlık alanında diagnostik amaçlı biyosensörlerde, ürenin kandan uzaklaştırılmasında ya da hemodiyaliz işleminde sentetik diyalizat çözeltisinin yenilenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde içeceklerden ürenin uzaklaştırılmasında ve gübre atık sularında bulunan ürenin dönüştürülmesinde de kullanım alanına sahiptir⁵⁻⁹. Son yıllarda üreazın kovalent immobilizasyonunda aktif karbon, katyonik lâteks partiküller, cyrogel, TiO₂ boncuklar, yumurta kabuğu zarı, magnetik nanopartiküller ve altın-glutasyon nanokonjüгат, selüloz gibi destekler kullanılmıştır⁵⁻¹². İnorganik destekler termal ve mekanik kararlılıklarının yüksek olması ve toksik olmamaları nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir⁴. Florisil (magnezyum silikat), %15 MgO ve %85 SiO₂ içeren, gözenek büyüklüğü 6-8 nm, spesifik yüzey alanı ise 170-300 m²/g'dir. Ayrıca termal kararlılığı yüksek, hidrofilik karakterde, mikrobiyal saldırılara ve organik çözücülere karşı dayanıklı bir destekdir¹³.

Bu çalışmada, Florisil destek 3-aminopropiltrioksilan (3-APTES) ile aktifleştirildi ve glutaraldehit ile modifiye edildi. Desteğin modifikasyonundan sonra üreaz kovalent olarak desteğe bağlandı. İmmobilize üreazın optimum pH'sı, sıcaklığı, kinetik parametreleri (K_m, V_{max}, k_{cat}/K_m) belirlenerek, depolama kararlılığı ve kesikli

tip biyoreaktörde tekrar kullanım kararlılığı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Çalışmada kullanılan, *Canavalia ensiformis* kaynaklı üreaz (15-50 U/mg katı), Florisil, 3-APTES, glutaraldehit ve diğer kimyasallar Sigma firmasından temin edilmiştir.

Florisil'in modifikasyonu

Modifiye edilmiş Florisilin hazırlanmasında literatürde daha önce Tükel ve Alptekin¹³ tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Üreazın desteğe immobilizasyonunda Florisil önce HNO₃ ile yıkandı daha sonra 3-APTES ile aktifleştirildi. Florisil'den 10 g tartılarak üzerine %5 (w/v)'lik HNO₃ çözeltisinden 50 mL eklendi. Karışım 80-90°C'de 1 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra destek süzülerek saf su ile yıkandı ve 120°C'de etüvde kurutuldu.

Kurutulmuş destekten 1 g alınarak üzerine %4'lük (v/v) asetonla hazırlanan 3-APTES çözeltisinden eklendi ve karışım 45°C'de 24 saat bekletildi. 3-APTES ile silanlanan destek saf su ile yıkanarak 115°C'de 1 gece bekletildi. Silanlanmış destekten 1 g alınarak üzerine pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış %2,5'lik (w/v) glutaraldehit çözeltisinden eklendi ve karışım 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Destek saf su ile yıkanarak 60°C'de kurutuldu.

Üreazın immobilizasyonu

Modifiye edilmiş destekten 1 g tartılarak üzerine pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan üreaz çözeltisinden 4 mL eklendi. Karışım oda sıcaklığında çalkalayıcıda 60 rpm hızla 2 saat karıştırıldı. İmmobilize üreaz süzüldü ve süzüntüde protein kalmayınca kadar yıkandı. Süzüntüler protein tayini için biriktirildi. Desteğe bağlanan üreaz miktarının belirlenmesi amacıyla süzüntüde bikinoninik asit kullanılarak protein tayini yapıldı¹⁴. Başlangıçta immobilizasyon ortamına eklenen protein miktarından toplanan süzüntüde bulunan protein miktarı çıkarılarak 1 gram desteğe bağlanan protein miktarı belirlendi.

Serbest ve immobilize üreazın aktivitelerinin ölçülmesi

Serbest ve immobilize üreazın spesifik aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür¹⁵. $1,0 \times 10^{-2}$ mg serbest üreaz veya 20 mg immobilize üreaz preparatı pH'sı 7,0 olan HEPES tamponu içine (15 mM üre ve 0,05 mM EDTA içeren) eklenerek 30°C'de 30 dk. çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 0,32 M H₂SO₄ çözeltisinden 0,3 mL ve %0,3'lük (w/v) Na₂WO₄ çözeltisinden 0,3 mL eklenerek tepkime durduruldu. Nessler reaktifi eklenerek çözeltinin 405 nm'deki absorbanası ölçüldü. Tepkime sırasında açığa çıkan amonyum miktarını belirlemek için analitik saflıkta NH₄Cl kullanılarak oluşturulan standart eğri kullanıldı. Üreaz için spesifik aktivite, 1 dakikada 1 µmol NH₄⁺'u açığa çıkaran enzim olarak tanımlandı. Aktivite ölçümleri en az 3 tekrarlı çalışıldı.

Serbest ve immobilize üreazın karakterizasyonu

Serbest ve immobilize üreaz örneklerinin aktiviteleri farklı pH'larda (4,5-8,0) ve sıcaklıklarda (20-70°C) ölçüldü. Serbest ve immobilize üreaz örneklerinin en yüksek aktivite gösterdikleri ortam pH'sı ve sıcaklık belirlendi. Enzimlerin aktivite değerleri bağıl olarak hesaplandı. Serbest ve immobilize üreaz örneklerinin farklı substrat derişimlerinde (1,5-15 mM üre) belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde aktiviteleri ölçüldü. Lineweaver – Burk grafiği kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri belirlendi. K_m ve V_{max} değerleri kullanılarak serbest ve immobilize üreaz için k_{cat} (geri dönüşüm sayısı) ve k_{cat}/K_m (katalitik etkinlik) değerleri hesaplandı. Derişimi 10 µg/mL olan üreaz çözeltisi ve immobilize üreazın kurutulmuş formu oda sıcaklığında ve 4°C'de bekletildi ve belirli zaman aralıklarında aktiviteleri ölçülerek depolama kararlılıkları belirlendi. Immobilize üreazın kesikli tip biyoreaktörde tekrar kullanım kararlılığı araştırıldı. Bunun için immobilize üreaz örneğinden 35 mg alınarak çapı 1,3 cm, yüksekliği 5,8 cm olan reaktöre yerleştirildi. Üzerine derişimi 15 mM olan üre çözeltisinden 1,5 mL eklenerek 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 30 dk. sonunda çözelti hızla reaktörden uzaklaştırıldı. Süzüntüye 0,45 mL H₂SO₄ (0,32 M) ve 0,45 mL Na₂WO₄ (%0,3'lük (w/v)) çözeltilerinden eklendi. Süzüntüde enzimatik tepkime sırasında açığa çıkan NH₄⁺ miktarı

belirlendi. Substrat çözeltisinden tekrar reaktöre eklenerek aynı işlemler tekrar edildi. Her bir kullanımda kalan enzim aktivitesi hesaplandı. Böylece kesikli tip biyoreaktör sisteminde immobilize üreaz preparatının tekrar kullanım kararlılığı belirlendi.

İstatistiksel analiz

Serbest ve immobilize üreazın kinetik parametreleri ortalama±standart sapma şeklinde verildi.

BULGULAR

Üreaz modifiye edilmiş Florisil desteğine kovalent olarak bağlanmıştır. Desteğe bağlanan enzim miktarı 3,9 mg/ g destek, enzimin desteğe bağlanma oranı %97 olarak belirlenmiştir. Immobilize üreaz örneği için taramalı elektron mikroskopunda alınan görüntüler Şekil 1'de verilmiştir.

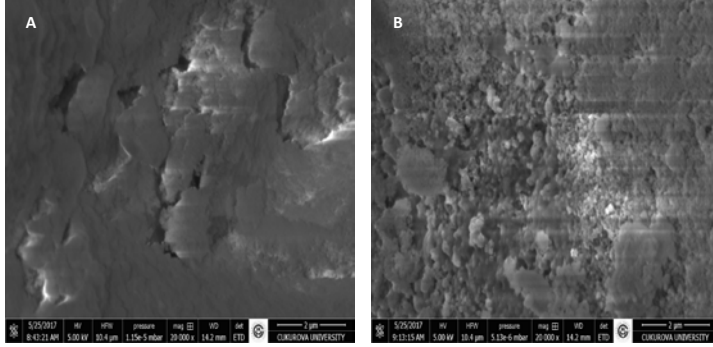
Modifiye edilmiş Florisil desteğin immobilizasyondan sonra elde edilen görüntülerinde yüzey morfolojisinin değiştiği, yüzeydeki girinti ve çıkıntılarının arttığı görülmüştür.

Serbest ve immobilize üreaz preparatları için farklı pH'da yapılan aktivite ölçümleri sonucunda elde edilen veriler bağıl olarak Şekil 2'de verilmiştir.

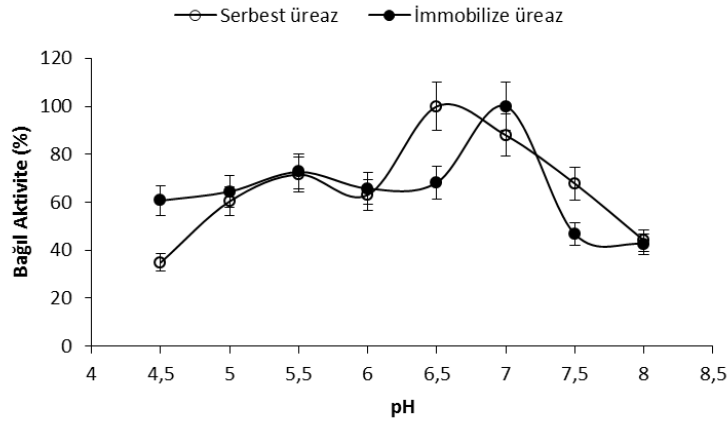
Serbest üreaz en fazla aktiviteyi pH 6,5'de gösterirken, immobilize üreaz pH 7,0'de göstermiştir. Serbest ve immobilize üreaz preparatları için farklı sıcaklıklarda yapılan aktivite ölçümleri sonucunda elde edilen veriler Şekil 3'de verilmiştir.

Serbest üreaz en yüksek aktiviteyi 50°C'de, immobilize üreaz ise 60°C'de göstermiştir. Kinetik parametreler (K_m ve V_{max}), Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlenmiştir. Bu veriler kullanılarak serbest ve immobilize üreaz için k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize üreazlara ait kinetik parametreler Tablo 1'de verilmiştir.

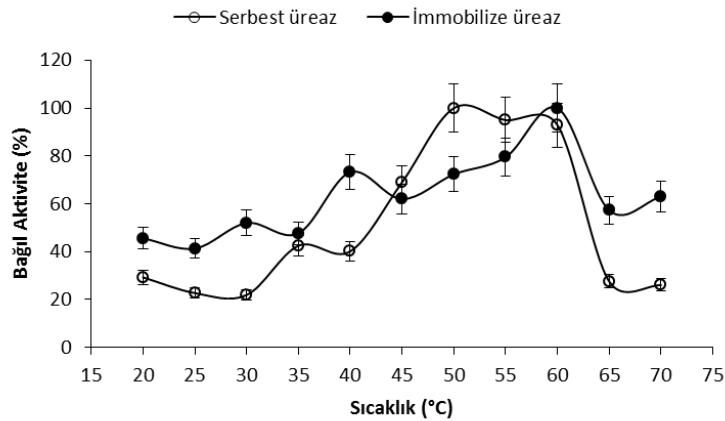
Immobilizasyondan sonra üreazın K_m değeri 2,2 kat artmıştır. Immobilizasyondan sonra üreazın aktivitesinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Immobilize üreazın katalitik etkinliği serbest üreazın katalitik etkinliğinin %0,1'i kadar olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. Taramalı elektron mikroskobu görüntüsü. A. Orijinal Florisil'e ait 20.000 kat büyütülmüş görüntü. B. Üreazın bağlandığı modifiye Florisil'e ait 20.000 kat büyütülmüş görüntü.



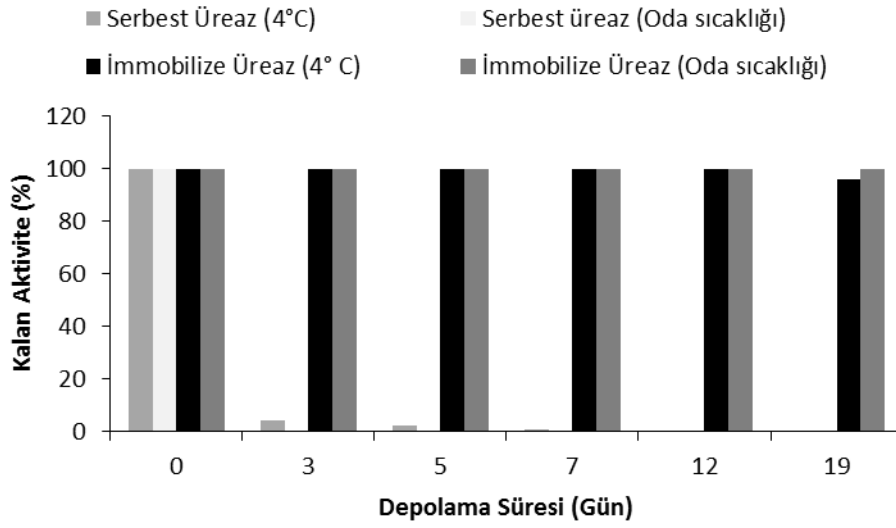
Şekil 2. Serbest ve immobilize üreazın farklı pH'daki tepkime ortamlarında ölçülen aktivite değerlerindeki bağıl değişim.



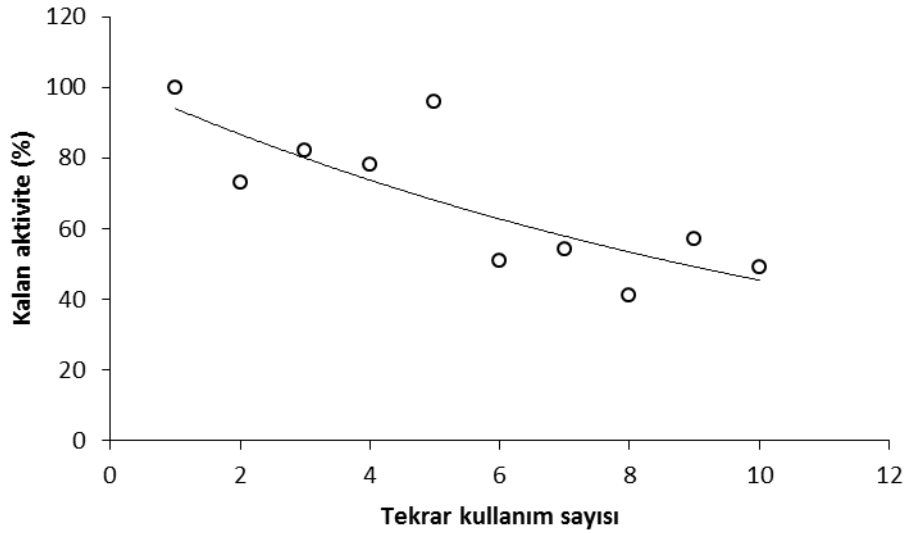
Şekil 3. Serbest ve immobilize üreazın farklı sıcaklıklarda aktivite değerlerindeki bağıl değişim.

Tablo 1. Serbest ve immobilize üreazın kinetik parametreleri.

	Serbest Üreaz	İmmobilize Üreaz
K_m (mM)	$2,7 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,3$
V_{max} (U/mg protein)	$51,5 \pm 2,6$	$0,09 \pm 0,01$
k_{cat} (s^{-1})	$68,7 \pm 3,4$	$0,12 \pm 0,01$
k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)	$2,5(\pm 0,1) \times 10^4$	$2,0(\pm 0,1) \times 10^1$



Şekil 4. Serbest ve immobilize üreazın 4°C ve oda sıcaklığındaki depolama kararlılıkları.



Şekil 5. İmmobilize üreazın kesikli tip biyoreaktörde tekrar kullanım kararlılığı.

Serbest ve immobilize üreazın depolama kararlılıkları oda sıcaklığında ve 4 °C'de belirlendi. Serbest ve immobilize üreazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi Şekil 4'de verilmiştir. Serbest üreaz hem 4°C'de hem de oda sıcaklığında 5 gün sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Immobilize üreaz aynı koşullarda 12 gün sonunda aktivitesini kaybetmezken, 26 günde oda sıcaklığında başlangıç aktivitesinin %64'ünü 4°C'de ise %80'nini korumuştur. Immobilize üreazın kesikli tip biyoreaktör sisteminde tekrar kullanıma bağlı aktivite değişimi Şekil 5'de gösterilmiştir. Immobilize üreaz biyoreaktörde 10 kez tekrar kullanıldığında başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumuştur.

TARTIŞMA

Florisil, 3-APTES ile aktifleştirilerek yüzeyinde serbest -NH₂ gruplarının bulunması sağlanmıştır. Daha sonra destek glutaraldehit ile modifiye edilmiştir. Glutaraldehitin bir ucu destekteki amino grupları ile Schiff bazı oluştururken diğer ucu yüzeyde aldehit gruplarının bulunmasını sağlamıştır. Son aşamada enzim modifiye destek ile muamele edildiğinde destekteki aldehit grupları ile enzimde bulunan -NH₂ grupları (lizin amino asit artıkları ya da N ucu) ile Schiff bazı oluşturularak kovalent bağlanmıştır. Amin grubu içeren katı desteğe enzimin glutaraldehit ile bağlanması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir¹⁶. Desteğin glutaraldehit ile muamelesinden sonra desteğin su ile yıkanarak ortamdaki serbest glutaraldehitin destekten tamamen uzaklaştırılması çok önemlidir. Destekte kalan serbest glutaraldehit immobilizasyon sırasında üreazın hızla inaktif olmasına neden olmaktadır¹⁷. Desteğe immobilizasyondan önce uygulanan işlemler (HNO₃ çözeltisi ile muamele, 3-APTES ile aktifleştirme ve glutaraldehit ile modifikasyon) desteğin yüzeyinde girinti ve çıkıntıların artmasına dolayısıyla yüzey morfolojisinde değişikliğe neden olmuştur. Bu bulgular desteğin modifikasyon sonunda yüzey alanının artmış olabileceğini göstermektedir. Enzim boyutunun (12 nm) desteğin gözenek boyutundan (6-8 nm) küçük olması nedeni ile üreazın desteğin gözeneklerine girmeden desteğin yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir. Alatawi ve arkadaşları¹⁸ epiklorohidrin ile çapraz bağlı karboksimetil selüloz destekte yaptıkları modifikasyonlar ile destekteki -NH₂ gruplarının miktarını 4-8 mmol/ g destek olduğunu bildirmişlerdir. Destekteki -NH₂ miktarı arttıkça bağlanan enzim miktarının arttığını (80-212 mg/ g

destek), bununla birlikte immobilize üreazın aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Immobilize üreazın aktivitesi, desteğe bağlanma miktarına, desteğin doğasına ve immobilizasyon yöntemine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir^{15,19}.

İmmobilizasyon ile üreazın optimum pH'sı 0,5 birim artmıştır. Lizinin ε-amino grubu gibi bazik gruplar üzerinden gerçekleşen kovalent bağlanma sonucu enzim molekülü serbest haline kıyasla daha polianyonik bir yapıya kavuşmakta ve bunun sonucu olarak taşıyıcıya bağlı enzimin optimum pH'sı serbest enziminkine kıyasla bazik bölgeye kayabilmektedir¹⁶. Literatürde benzer sonuç kumaş yüzeyine glutaraldehit üzerinden kovalent bağlanmış üreaz için bildirilmiştir. Üreazın optimum pH'sının immobilizasyondan sonra 7,0'den 7,5'e yükseldiği bildirilmiştir.

İmmobilize üreazın optimum sıcaklığı immobilizasyondan etkilenmiştir. İmmobilizasyon sonrasında üreazın optimum sıcaklığı 10°C artmıştır. Immobilize üreazın serbest üreaza göre yüksek sıcaklıklarda daha yüksek aktivite göstermesi, immobilize üreazın termal kararlılığının daha yüksek olmasından kaynaklanabilir. Bu durum, üreazın desteğe kovalent bağlanması sırasında aynı anda çok sayıda kovalent bağ yapmasından kaynaklanabilir. Çoklu bağlanma, sıcaklık artışı ile enzimdeki konformasyonel değişimleri sınırlandırır¹⁸. Yeon ve Lueptow²⁰, kumaşa kovalent bağlanmış immobilize üreazın optimum sıcaklığının 55°C olduğunu, immobilizasyondan sonra optimum sıcaklığın 10 °C arttığı bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, immobilizasyon sonucunda üreazın K_m değeri yaklaşık 2,2 kat artmıştır. Literatürde immobilizasyon sonrasında üreazın K_m değerinin arttığını^{18,20-24} ve azaldığını^{18,20,21,24} bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Immobilize üreazın kinetik parametrelerinin serbest üreazdan farklılık göstermesinin nedenleri, immobilizasyon ile enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimler, sterik etkiler, mikroçevre ve difüzyon sınırlamaları olabilir^{16,17,25}. Literatürde üreazın immobilizasyondan sonra V_{max} değerinin %30- %90 oranında azaldığını bildiren araştırma bulguları rapor edilmiştir^{16,18,20,24-27}.

Depolama kararlılığı uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Serbest üreaz 5 gün sonunda hem oda sıcaklığında hem de 4°C'de başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Immobilize üreaz ise her iki sıcaklıkta 12 gün

sonunda aktivitesinin tamamını korumuştur. Yeon ve Lueptow²⁰, kumaşa immobilize edilen üreazın 4°C'de 98 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %50'sini kaybettiğini bildirmişlerdir. Alatawi ve arkadaşları¹⁸, karboksimetil selüloza immobilize edilen üreazın oda sıcaklığında 1 hafta sonunda başlangıç aktivitesinin %30'unu kaybettiğini, serbest üreazın ise başlangıç aktivitesinin %80'nini kaybettiğini bildirmişlerdir.

İmmobilize enzimlerin etkin kullanımları için tekrar kullanılabilirlikleri en önemli faktörlerden biridir.¹⁹ Bu çalışmada, kesikli tip biyoreaktörde 10 kullanım sonunda immobilize üreaz başlangıç aktivitesinin %50'sini korumuştur. Alatawi ve arkadaşları¹⁸, epiklorohidrin ile çapraz bağlı karboksimetil selüloza kovalent immobilize edilmiş üreazın kesikli reaktörde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %88'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, ipek fibroin üzerine kovalent immobilize edilmiş üreazın 7 kullanımdan sonra aktivitesinin değişmediği bildirilmiştir¹⁹. Doğan ve Teke²¹, kitosan kaplı alginat nikel-ferrit boncuğa immobilize edilmiş üreazın 18 kez kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin yarısının kaldığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, modifiye edilmiş Florisil desteğe üreaz yüksek oranda (%97) kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyondan sonra üreazın optimum pH ve sıcaklık değerleri değişmiş, aktivitesi azalmıştır. Ancak, immobilize üreazın depolama kararlılığı hem 4°C'de hem de oda sıcaklığında serbest üreazdan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca immobilize üreazın kesikli tip biyoreaktör sisteminde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %50'sini koruması, immobilize üreazın kesikli tip biyoreaktörde kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: ÖA; Veri toplama: ÖA; Veri analizi ve yorumlama: ÖA; Yazı taslağı: ÖA; İçeriğin eleştirel incelenmesi: ÖA; Son onay ve sorumluluk: ÖA; Teknik ve malzeme desteği: ÖA; Süpervizyon: ÖA; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : ÖA; Data acquisition: ÖA; Data analysis and interpretation: ÖA; Drafting manuscript: ÖA; Critical revision of manuscript: ÖA; Final approval and accountability: ÖA; Technical or material support: ÖA; Supervision: ÖA; Securing funding (if available): n/a.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

1. Krajewska B, Ciurli S. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid-base groups of the active site by pH variation. *Plant Physiol Biochem.* 2005;43:651–8.
2. Blakely RL, Zerner B. Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme. *J Mol Catal.* 1984;23:263–92.
3. Takishima K, Suga T, Mamiya G. The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur J Biochem.* 1988;175:151–65.
4. Cao L, Schmid RD. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006.
5. Wang L, Wang S, Deng X, Zhang Y, Xiong C. Development of coconut shell activated carbon-tethered urease for degradation of urea in a packed bed. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2014;2:433–9.
6. Zhou J, Cao J, Huan W, Huang L, Wang Y, Zhang S, Yuan Y, Hua D. Preparation and property of urease immobilization with cationic poly(4-vinylpyridine) functionalized colloidal particles. *Chem Biochem Eng Q.* 2013;27:431–7.
7. Uygun M, Akduman B, Akgöl S, Denizli A. A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170:1815–26
8. İspirli Doğan Y, Deveci I, Teke M, Mercimek B. TiO₂ beads and TiO₂-chitosan beads for urease immobilization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;42:429–35.
9. D'Souza SF, Kumar J, Jha SK, Kubal BS. Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:850–4.
10. Yücebilgiç G, Güleşçi N, Yıldırım D. Immobilization and characterization of urease onto different spacer arms attached magnetic nanoparticles. *New Biotechnol.* 2016;33:1–213.
11. Garg S, De A, Mozumdar S. pH-dependent immobilization of urease on glutathione-capped gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103:1771–83.
12. Lv M, Ma X, Anderson DP, Chang PR. Immobilization of urease onto cellulose spheres for the selective removal of urea. *Cellulose.* 2018;25:233–43.
13. Tükel SS, Alptekin Ö. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochem.* 2004;39:2149–25.
14. Smith P K, Krohn R.I, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto EK, Goetze N M, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
15. Rao MS, Chellapandian M, Krishnan MRV. Immobilization of urease on gelatin — poly (HEMA) copolymer preparation and

- characterization. *Bioprocess Eng.* 1995;13:211–4.
16. Wiseman Alan. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England, 1985.
 17. Chen JP, Chiu SH. Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Eng.* 1999;21:323–30.
 18. Alatawi FS, Monier M, Elsayed NH. Amino functionalization of carboxymethyl cellulose for efficient immobilization of urease. *Int J Biol Macromol.* 2018;114:1018–25.
 19. Moon BM, Choi MJ, Sultan MT, Yang JW, Ju HW, Lee JM et al. Novel fabrication method of the peritoneal dialysis filter using silk fibroin with urease fixation system. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105:2136–44.
 20. Yeon KH, Lueptow RM. Urease immobilization on an ion-exchange textile for urea hydrolysis. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006;81:940–50.
 21. Doğaç YI, Teke M. Synthesis and characterisation of biocompatible polymer-conjugated magnetic beads for enhancement stability of urease. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016;179:94–110.
 22. Pozniak, G, Krajewska B, Trochimczuk W. Urease immobilized on modified polysulphone membrane: preparation and properties. *Biomater.* 1995;16:129–34.
 23. Somtürk B, Yılmaz I, Altınkaynak C, Karatepe A, Özdemir N, Ocoşo I. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme Microb Technol.* 2016;86:134–42.
 24. Maia MDMD, de Vasconcelos EA, de Mascena Diniz PFC, da Costa Maciel J, Cajueiro KRR, da Silva MDPC, et al. Immobilization of urease on vapour phase stain etched porous silicon. *Process Biochem.* 2007;42:429–33.
 25. Rogalski J, Szczodrak J, Pleszczyński M, Fiedurek J. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum* dextranase on controlled porous glass. *J Mole Cataly B Enzym.* 1997;3:271–83.
 26. Kumar, Sandeep; Kansal, Ajay; Kayastha, Arvind M; Immobilization of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease on gelatin and its characterization. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 2005;5:43–7.
 27. Bayramoğlu G, Altınok H, Bulut A, Denizli A, Arca MY. Preparation and application of spacer-arm-attached poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) films for urease immobilisation. *Reac Func Polym.* 2003;56:111–21.