

**Enzim İmmobilize Edilmiş Membranların Hazırlanması ve  
Karakterizasyonu: Membran Performanslarının Belirlenmesi**

**Proje No: 105M325**

Prof.Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA  
Prof. Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU  
Yılmaz YÜREKLİ

HAZİRAN 2008  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu rapor “Enzim İmmobilize Edilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu: Membran Performanslarının Belirlenmesi” başlıklı TÜBİTAK-105M325 No’lu uluslararası araştırma projesinin sonuçlarını içermektedir. Çalışma polielektrolit desteğiyle ultrafiltrasyon membranları üzerine enzim immobilizasyonu yapmak, bu membranların performanslarını hem deneysel yöntemlerle, hem de matematik modelleme yolu ile test etmek amacı ile uluslararası bir proje olarak TÜBİTAK ve Fransa CNRS’e önerilmiştir. Nisan 2006 yılında 21114 YTL’lik bütçe ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümünde yürütölmek üzere desteklenmeye başlayan çalışma, 1 Haziran 2008’de tamamlanmıştır. Verilen destek kapsamında Türk ekibinden biri doktora öğrencisi üç araştırmacının 2006 ve 2007 yıllarında proje ortaklarımızın bulunduğu University of Montpellier II Insitut Europeen Des Membranes’e ziyaretleri gerçekleşmiştir. Proje Fransız ekibi ile ortaklaşa yürütölmüş olmakla birlikte, bu raporda Türk ekibinin yapmış olduğu çalışmaların sonucu verilmiştir.

Projede üreaz immobilize edilmiş poliakrilonitril (PAN), polietilenimin (PEI) ve kitosan (CHI) ile modifiye edilmiş PAN membranları elde edilmiştir. Geliştirilen membranların katalitik performansları optimum sıcaklık, aktivite profilleri, kinetik parametreleri ve ultrafiltrasyon esnasında üreyi uzaklaştırma kapasiteleri ile belirlenmiştir. Deneysel filtrasyon çalışmalarının yanı sıra, geliştirilen matematik model sayesinde de ultrafiltrasyon koşullarının, membranın yapısal özelliklerinin ve üreaz immobilizasyonunun ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda polielektrolit desteğiyle enzim immobilize membranların kolay ve ucuz bir şekilde hazırlanabileceği, polielektrolit türü değiştirilerek membranların katalitik performanslarının optimize edilebileceği sonucuna varılmıştır.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	13
ABSTRACT.....	14
1. GİRİŞ.....	15
2. GENELBİLGİLER.....	18
2.1. Polimerler.....	18
2.2. Enzim.....	18
2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyaller.....	20
3.2. Metod.....	20
3.2.1. Üreaz aktivitesinin belirlenmesi.....	20
3.2.2. Protein miktarının belirlenmesi.....	21
3.2.3. Membranların kitosan ile modifiye edilmesi.....	22
3.2.4. Üreaz İmmobilizasyonu.....	22
3.2.5. Üreaz immobilize edilmiş membranların depolama stabiliteilerinin belirlenmesi.....	23
3.2.6. Üreaz immobilize edilmiş membranların kinetik özelliklerinin karakterize edilmesi.....	23
3.2.7. Ultrafiltrasyon Deneyleri.....	23
4. MATEMATİK MODEL.....	25
4.1. Filtrasyon Deneylerinin Teorik Deneylerinin Teorik Analizi.....	25
4.2. Enzim İmmobilize Edilmiş Membranların Kullanıldığı Ultrafiltrasyon İşlemine Ait Matematik Model.....	26
4.2.1. Model Varsayımları.....	26
4.2.2. Model Denklemleri.....	28
4.2.3. Model Denklemlerinin Çözümü.....	30
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
5.1. Na-fosfat tampon konsantrasyonunun üreaz aktivitesine etkisi.....	31

5.2.	Üreaz İmmobilizasyon çalışmaları.....	34
5.2.1.	Üreazın PAN ve PAN+PEI membranlarına immobilizasyonu .....	34
5.2.2.	Üreazın kitosanla kaplanmış PAN (PAN+CHI) ve PAN+PEI (PAN+PEI+CHI) membranlarına immobilizasyonu.....	37
5.3.	Serbest ve immobilize üreazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	38
5.4.	Serbest ve immobilize üreazın optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi .....	40
5.5.	İmmobilize üreazın depolama stabilitesinin belirlenmesi.....	42
5.6.	İmmobilize üreazın operasyonel stabilitesinin belirlenmesi.....	43
5.7.	Filtrasyon deneyleri.....	44
5.7.1.	Su geçirgenliği çalışmaları.....	44
5.7.2.	Membran kirliliği çalışmaları.....	46
5.7.3.	Katalitik aktivite çalışmaları.....	49
5.7.4.	Na-Fosfat Tamponu ile Yapılan Filtrasyon Çalışmaları.....	51
5.8.	MATEMATİK MODEL SONUÇLARI.....	62
5.8.1.	Filtrasyon deneylerinin teorik analizi.....	62
5.8.2.	Enzim İmmobilize Membranların Kullanıldığı Ultrafiltrasyon İşleminin Modellenmesi.....	64
5.8.2.1.	Ürenin besleme çözeltisi içindeki kütle transfer katsayısının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi.....	67
5.8.2.2.	Membran boyunca uygulanan basınç farkının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan	

	etkisi.....	72
5.8.2.3.	Ürenin başlangıç konsantrasyonunun ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi .....	76
5.8.2.4.	Membranın kalınlığının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi.....	77
5.8.2.5.	Membranın gözenekliliğinin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi .....	81
5.8.2.6.	Membranın gözenek boyutunun (çapının) ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi .....	85
5.8.2.7.	Enzimin maksimum reaksiyon hızındaki değişimin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi .....	88
5.8.2.8.	Enzim tabakasının kalınlığının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi.....	90
5.8.3.	Ultrafiltrasyon Modelinin Test Edilmesi .....	92
VI.	SONUÇLAR .....	95
VII.	KAYNAKLAR.....	97

## TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1.	Farklı membranlar üzerine dengeye ulaşıldığında adsorplanan üreaz miktarları ve aktiviteleri.....	37
Tablo 5.2.	Farklı membranlar üzerine immobilize edilmiş üreazın kinetik parametreleri.....	40
Tablo 5.3.	Basıncın temiz ve kirli PAN+CHI+üreaz membranının katalitik performansı üzerine olan etkisi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl'dir.....	51
Tablo 5.4.	PAN membranına ait filtrasyon deney sonuçlarının (4.2) numaralı denklemle analiz edilmesi sonucu elde edilen model parametreleri.....	63
Tablo 5.5.	Simulasyonlarda referans olarak kullanılan parametrelerin listesi.....	65
Tablo 5.6.	Besleme çözeltisinden 1 saatin sonunda uzaklaştırılan üre miktarları (%) .....	66

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Polietileniminin kimyasal yapısı .....	18
Şekil 3.1.	Membranlarda bağlanan üreaz miktarının Bradford protein tayiniyle belirlenmesi amacıyla kullanılmış standart doğru.....	22
Şekil 4.1.	Enzim immobilize edilmiş membranların kullanıldığı ultrafiltrasyon işleminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 5.1.	Üreaz aktivitesi ölçümü sırasında Na-fosfat tamponu ve üre konsantrasyonunun aktivite üzerindeki etkisi. Semboller; (◆) 0.01 M, (■) 0.02 M, (▲) 0.05 M, (●) 0.08 M, (+) 0.1 M, (*) 0.15 M tampon konsantrasyonunu göstermektedir.....	32
Şekil 5.2.	Üreaz aktivitesi ölçümü sırasında Na-fosfat tamponu ve üre konsantrasyonunun reaksiyon karışımı pH'sı üzerindeki etkisi. Semboller; (◆) 0.01 M, (■) 0.02 M, (▲) 0.05 M, (●) 0.08 M, (+) 0.1 M, (*) 0.15 M tampon konsantrasyonunu göstermektedir.....	33
Şekil 5.3.	Reaksiyon boyunca oluşan amonyum konsantrasyonunun değişimi.....	34
Şekil 5.4.	PAN ve PAN+PEI membranlarında immobilize üreaz miktarının süreye göre değişimi. İmmobilizasyon deneyinde kullanılan çözeltilerdeki üreaz konsantrasyonları: (a) 0.0347 mg/ml; (b) 0.0521 mg/ml; (c) 0.0694 mg/ml; (d) 0.1388 mg/ml.....	35
Şekil 5.5.	PAN ve PAN+PEI membranlarına immobilize olan üreazın adsorpsiyon Izotermi.....	36
Şekil 5.6.	PAN+CHI ve PAN+PEI+CHI membranlarında immobilize üreaz miktarının süreye göre değişimi.....	37
Şekil 5.7.	Üreaz immobilize edilmiş membranların reaksiyon hızlarının üre konsantrasyonuna göre değişimi.....	39
Şekil 5.8.	Serbest ve immobilize edilmiş üreaz aktivitelerinin pH'ya göre değişimi.....	40
Şekil 5.9.	Serbest ve immobilize edilmiş üreaz aktivitelerinin sıcaklığa göre değişimi. ....	41
Şekil 5.10.	Üreaz immobilize edilmiş membranların depolama stabiliteleri.....	42
Şekil 5.11.	Üreaz immobilize edilmiş membranların operasyonel stabiliteleri;	

	(◇) PAN+CHI; (■) PAN+PEI; (□) PAN+PEI+CHI.....	44
Şekil 5.12.	Üreaz immobilize edilmiş ve edilmemiş membranlardan birim zamanda geçen su miktarının basınca göre değişimi.....	45
Şekil 5.13.	Üreaz immobilize edilmiş ve edilmemiş membranların hidrolik geçirgenlikleri.....	46
Şekil 5.14.	Üre çözeltilisinin ve üre+BSA çözeltilisinin temiz ve kirli PAN membranından akış hızlarının basınca göre değişimi.....	47
Şekil 5.15.	Üre ve üre+BSA çözeltilerinin temiz ve kirli PAN+PEI+üreaz membranından akış hızlarının basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl' dir. ....	47
Şekil-5.16.	Üre ve üre+BSA çözeltilerinin temiz ve kirli PAN+CHI+üreaz membranından akış hızlarının basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl' dir. ....	48
Şekil 5.17.	Temiz ve kirletilmiş membranların üre çözeltilisine karşı gösterdikleri hidrolik geçirgenliklerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 5.18.	Temiz ve kirletilmiş PAN+PEI+üreaz membranının katalitik aktivitesinin basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 500 mg/dl' dir.....	50
Şekil 5.19.	Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltilisinin PAN membranından akış hızının basınca göre değişimi.....	52
Şekil 5.20.	Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltilisinin PAN+CHI membranından akış hızının basınca göre değişimi.....	52
Şekil 5.21.	Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltilisinin PAN+PEI membranından akış hızının basınca göre değişimi.....	53
Şekil 5.22.	Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltilisinin PAN+CHI+üreaz membranından akış hızının basınca göre değişimi.....	53
Şekil 5.23.	Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltilisinin PAN+PEI+üreaz membranından akış hızının basınca göre değişimi.....	54
Şekil 5.24.	Membranların üre çözeltilisine karşı gösterdikleri hidrolik geçirgenliklerinin üre konsantrasyonuna göre değişimi.....	54
Şekil 5.25a.	PAN, PAN+PEI ve PAN+CHI membranlarının 1 saatin sonunda uzaklaştırdıkları toplam üre miktarı.....	55



Şekil 5.25b.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI ve PAN+CHI membranlarının 1 saatin sonunda uzaklaştırdıkları toplam üre miktarı.....	56
Şekil 5.26.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 1 mM'dır.....	57
Şekil 5.27.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 2.5 mM'dır.....	57
Şekil 5.28.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 5 mM'dır.....	58
Şekil 5.29.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 10 mM'dır.....	58
Şekil 5.30.	PAN+PEI membranlarının ultrafiltrasyon işleminin sonunda ölçülen kalıntı aktivitelerinin basınca göre değişimi.....	59
Şekil 5.31.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 1 mM'dır.....	60
Şekil 5.32.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 2.5 mM'dır.....	60
Şekil 5.33.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 5 mM'dır.....	61
Şekil 5.34.	Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 10 mM'dır.....	61

Şekil 5.35.	Transmembran basıncının PAN membranından filtre edilen üre+BSA çözeltisinin akış hızına etkisi.....	62
Şekil 5.36.	Protein tabakasının direncinin zamana göre değişimi.....	64
Şekil 5.37.	Ürenin besleme tarafındaki kütle transfer katsayısının konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	69
Şekil 5.38.	Besleme çözeltisinin karıştırma hızının ürenin bu çözelti içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	70
Şekil 5.39.	Besleme çözeltisinin karıştırma hızının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	71
Şekil 5.40.	Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	73
Şekil 5.41.	Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	74
Şekil 5.42.	Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	75
Şekil 5.43.	Ürenin başlangıç konsantrasyonunun toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	76
Şekil 5.44.	Membranın kalınlığının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	78
Şekil 5.45.	Membranın kalınlığının besleme çözeltisi içindeki üre konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize	

	edilmiş membran.....	79
Şekil 5.46.	Membranın kalınlığının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	80
Şekil 5.47.	Membranın gözenekliliğinin ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	82
Şekil 5.48.	Membranın gözenekliliğinin ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	83
Şekil 5.49.	Membranın gözenekliliğinin ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	84
Şekil 5.50.	Membranın gözenek çapının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	85
Şekil 5.51.	Membranın gözenek çapının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	86
Şekil 5.52.	Membranın gözenek çapının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.....	87
Şekil 5.53.	Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi.....	88
Şekil 5.54.	Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi.....	89
Şekil 5.55.	Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi.....	90
Şekil 5.56.	Enzim tabakasının kalınlığının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi.....	91
Şekil 5.57.	Enzim tabakasının kalınlığının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi.....	91

Şekil 5.58.	Enzim tabakasının kalınlığının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi.....	92
Şekil 5.59.	Deneysel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması . $\Delta P=0.7$ bar.....	93
Şekil 5.60.	Deneysel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması . $\Delta P=1$ bar.....	93
Şekil 5.61.	Deneysel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması . $\Delta P=1.5$ bar.....	94

## ÖZET

Bu çalışmada üreaz enzimi polietilenimin (PEI) ve kitosan (CHI) ile modifiye edilmiş poliakrilonitril (PAN) membranları üzerine immobilize edilmiştir. PEI ve CHI ile modifikasyon PAN membranı üzerine adsorbe olan üreaz miktarını etkilemezken, aktiviteler sırayla 2 ve 1.5 kat artış göstermiştir. Membranların üreye karşı gösterdikleri kinetik performans aşağıdaki şekilde bulunmuştur: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. pH 7 ile 9 aralığında modifiye edilmiş membranlar üzerine immobilize edilen üreaz PAN üzerine immobilize edilene göre daha iyi bir aktivite profili sergilemiştir. PAN+CHI ve PAN membranları üzerine immobilize edilen üreaz 30 ve 37 °C’de optimum aktivite gösterirken, PAN+PEI ve PAN+PEI+CHI üzerine immobilizasyon optimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklığın 50 ve 60 °C’ye yükselmesine neden olmuştur. PAN+CHI, PAN+PEI ve PAN+PEI+CHI membranları 4 °C distile suda 6 ve 10 gün depolandıktan sonra üreaz aktivitelerinin 50% sini koruyabilirken, aynı koşullarda depolanan PAN membranı 1 günün sonunda aktivitesinin 75 %’ini kaybetmiştir. Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAN membranları üzerine üreaz adsorpsiyonu sonucu membranların hidrolitik geçirgenlikleri önemli oranda değişmemiştir. Ultrafiltrasyon esnasında besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı membran boyunca uygulanan basıncın artması ile artarken, besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonundan etkilenmemiştir. Deneysel filtrasyon çalışmalarının yanı sıra, bu çalışmada geliştirilen matematik model sayesinde ultrafiltrasyon koşullarının, membranın yapısal özelliklerinin ve üreaz immobilizasyonunun ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkileri de incelenmiştir. Model tahminleri ile deneysel veriler arasındaki uyum yeterli bulunmuştur. Genel olarak, bu çalışmada elde edilen sonuçlar üreaz enziminin modifiye edilmiş PAN membranları üzerine elektrostatik kuvvetlerle immobilizasyonunun basit ve etkili bir immobilizasyon tekniği olduğunu önermektedir. Yapılan tüm ölçümler dikkate alındığında, üreaz immobilizasyonu için en iyi destek malzemesinin PAN+PEI+CHI membranı olduğu bulunmuştur.

*Anahtar kelimeler:* üreaz; immobilizasyon; polietilenimin; kitosan; poliakrilonitril; ultrafiltrasyon; matematik model.

## ABSTRACT

In this study urease was immobilized non-covalently onto polyethyleneimine (PEI) coated and/or chitosan (CHI) deposited polyacrylonitrile (PAN) membranes. The PEI coating and/or CHI deposition did not considerably affect the amount of urease immobilized onto PAN membranes, however, activities increased by a factor of 2 and 1.5 fold, respectively. The kinetic performances of the membranes against urea were found as follows: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. In neutral to alkaline pH values between 7.0 and 9.0, immobilized urease in all modified membranes showed a better activity profile than enzyme immobilized onto PAN membranes. The enzyme immobilized onto PAN+CHI and PAN membrane showed optimal activity at 30 and 37°C, respectively while immobilization of urease onto PAN+PEI and PAN+PEI+CHI membranes resulted in optimal activity at 50 and 60 °C, respectively. The PAN+CHI, PAN+PEI and PAN+PEI+CHI membranes maintained at least 50% of their urease activity after 6 and 10 days of cold storage in distilled water at 4°C, respectively, while PAN membrane lost almost 75% of its urease activity in 1 day at the same conditions. Urease immobilization on unmodified and modified PAN membranes did not change the hydrolic permeabilities significantly. During ultrafiltration, % removal of urea from the feed solution increased with increased transmembrane pressure, while this quantity was not influenced by the urea concentration in the feed solution. In addition to experimental filtration studies, the influences of operating conditions, structural parameters of the membrane and urease immobilization on the performance of the ultrafiltration operation were also investigated through a mathematical model developed in this study. The agreement between the model predictions and the experimental data was found to be satisfactory. Overall, the results obtained in this study suggest that urease immobilization onto modified PAN membranes through electrostatic interactions is an easy and effective immobilization technique. Based on all measurements, the best support material for urease immobilization was found as PAN+PEI+CHI membrane.

*Key words:* urease; immobilization; polyethyleneimine; chitosan; polyacrylonitrile; ultrafiltration; mathematical model.

## I. GİRİŞ

Geçen yüzyılın yarısından bu yana değişik uygulamalar için immobilize enzim sistemlerinin geliştirilmesi konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Immobilize enzim sistemleri çözünür enzimlere göre daha fazla avantaja sahiptir. Öncelikle enzimin aktivitesi, stabilitesi ve seçiciliği gibi performansını belirleyen özellikleri immobilize edilmesi sonucu iyileşir. Enzim immobilize formda aktivitesini çok daha uzun süre koruyabildiğinden sürekli işlemlerde yeniden kullanılabilmesi mümkündür. Ayrıca, enzimatik reaksiyon sonucu çıkan ürünlerle , reaksiyona girmeyen substratların enzimin immobilize edildiği destek (support) sayesinde ayrıştırılması da mümkündür. Böylece, serbest çözünür enzim yerine immobilize enzimi kullanan proseslerin üretim maliyetlerini azaltmak mümkün olabilir (CAO, 2005).

Üreaz, ürenin amonyum ve karbondioksit dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. Immobilize üreaz sistemleri diagnostik amaçlı biyosensörlerde (PETERSSON, 1988), ürenin kandan uzaklaştırılmasında (YANG ve Lin, 2001), ya da hemodiyaliz işleminde, sentetik diyalizat çözeltisinin rejenere edilmesinde kullanılmaktadır (KRAJEWSKA ve ark., 1989). Bunun yanısıra, gübre atıksularında bulunan ürenin dönüştürülmesinde (GEORGE ve ark., 1997; DI MARTINO ve ark., 2003) ve gıda endüstrisinde içeceklerden ürenin uzaklaştırılmasında da (FAHMY ve ark., 1998) uygulama alanları bulmuştur.

Enzimin immobilize edileceği uygun bir destek malzemesinin seçimi; hem enzimin aktivite, stabilite, seçicilik gibi katalitik özelliklerini, hem de ürün ve reaksiyona girmeyen substratları ayrıştırma performansını önemli oranda etkiler. Üreaz enziminin immobilize edilmesi için en sıklıkla kullanılan polimerik destek malzemeleri, kitosan (KRAJEWSKA ve ark., 1990; ZABORSKA ve ark., 1991), polisülfon (POŹNIAK ve ark., 1995; KRAJEWSKA ve ark., 1997) , etilen vinil alkol kopolimeri (MIYATA ve ark., 1997), epoksiden türetilmiş polihidroksietilmetakrilat (pHEMA)(ARICA, 2000) , polietilen-g-akrilik asit (HSIUE ve ark., 1990), polipropilen (WANG ve ark., 1992), polivinilalkohol-poliakrilik asit (PVA-PAA)(JHA ve ark., 2008), nylon 6 (EL-SHERIF ve ark., 2001; TEKE ve Baysal, 2007), poliamid (AKGÖL ve ark., 2002), polivinil alkol (REJIKUMAR ve Devi, 1998), karboksimetil selüloz (DUMITRIU ve ark., 1989), poliüretan (CHIA ve Hwang, 1992; HUNAG ve Chen, 1992), polivinilpridin (SUGİİ ve ark., 1986), poliakrilamid (SADA ve ark., 1980), poliglisisidmetakrilat (MOYNIHAN ve ark., 1989) ve stiren divinil benzen kopolimerleridir (OGAWA ve ark., 1988).

Üstün termal ve mekanik özelliklerinden dolayı, poliakrilonitril (PAN) ve akrilonitril kopolimerlerinden üretilmiş olan membranlar da üreaz immobilizasyonunda kullanılmıştır (GODJEVARGOVA ve Dimov, 1997; YANG ve Lin, 2001; GODJEVARGOVA ve Gabrovska, 2005; 2006; GABROVSKA ve ark., 2007). Yang ve Lin (2001) üreazı gluteraldehiti çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanarak kovalent bağla PAN membranı üzerine immobilize etmişlerdir. Üreazın immobilize formdaki stabilitesi ve aktivitesinin, çözünür haldekine oranla daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bunun yanısıra, üreaz immobilize edilmiş membranın kullanıldığı diyalizörün üreyi uzaklaştırma etkinliğinin, enzimsiz membranın kullanıldığı diyalizöre göre daha yüksek olduğunu da belirlemişlerdir. Godjevargova ve Dimov (1997) akrilonitril-metilmetakrilat-sodyum vinilsülfonat kopolimerini 2-dimetilaminoetilmetakrilat (DMAEM) ve diakrilamid-2-metilpropansülfonik asit (AMPSA) ile modifiye etmişler ve bu modifikasyonun tutunan üre miktarı, aktif grupların miktarı, hidrofilitik derecesi, relatif aktivite, optimum sıcaklık ve membranların termal kararlılığı üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Aynı grup, iki ayrı çalışmada 7 farklı kimyasal modifikasyonun poli(akrilonitril-metilmetakrilat-sodyum vinilsülfonat) membranlarının üreaz aktivitesi ve transport özelliklerine olan etkilerini rapor etmişlerdir (GODJEVARGOVA ve Gabrovska, 2005; 2006). En son yapılan bir çalışmada Gabrovska ve arkadaşları (2007), akrilonitril-metilmetakrilat-sodyum vinilsülfonat kopolimerini kitosan çözeltisi ile kaplayarak ardından üreaz enzimini immobilize etmişlerdir. Kopolimeri kitosan ile kaplamanın membranın gözenek boyutunu küçülttüğünü ve dolayısıyla membrandan geçiş hızlarını yavaşlattığını bulmuşlardır. Kaplama çözeltisinin içindeki kitosan konsantrasyonu arttıkça, membranların hidrofilitik karakteri ve immobilize olan enzim miktarı artmış, relatif aktivite maksimum değere ulaştıktan sonra düşmeye başlamıştır. Enzim aktivitesindeki düşüş, membran yüzeyinde biriken enzim nedeni ile substrat ve ürünlerin difüzyonuna karşı daha fazla oranda direnç gösterilmesi ile açıklanmıştır.

Enzimlerin bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılarak kovalent bağlarla yüzeye immobilize edilmeleri oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Öte yandan, biyosensör uygulamalarında destek üzerine zıt yüklü grupların, ardından enzimin elektrostatik kuvvetlerle immobilizasyonu denenmiştir (ONDA ve ark., 1996; CASELİ ve ark., 2006; 2007). Örneğin, Onda ve arkadaşları(1996) yüzeye önce peroksidaz (POD) ve poli(stiren sülfonatu) (PSS) adsorplamışlar, bu katmanların üzerine polietilenimin (PEI) ve ardından glukoz oksidaz (GOD) enzimini tutturmuşlardır. Yapılan çalışma bu enzim immobilizasyon tekniğinin basitliğini ve enzimin



aktivitesini kaybetmesine engel olduğunu göstermiştir. Caseli ve grubu (2006; 2007) da bu metodu kullanarak glukoz oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir. Ancak, bu grubun yaptığı çalışmada ara katmanları kitosan (CHI) ve PSS oluşturmuştur. En yüksek enzim aktivitesi, enzim ara katmanlar yerine sadece en üst katmana immobilize edildiğinde elde edilmiştir (CHI-PSS-CHI-PSS-CHI-GOD).

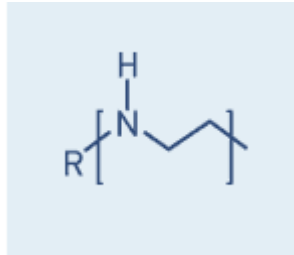
Bu çalışmada üreaz enziminin immobilizasyonu için, modifiye edilmiş ve edilmemiş sülfonlanmış poliakrilonitril (PAN) membranları kullanılmıştır. Modifiye edilmemiş PAN membranı Hospal Endüstri, Fransa, tarafından üretilmiştir ve membranın ilk modifikasyonu firma tarafından polietilenimin ile kaplanarak yapılmıştır (PAN+PEI). Projede her iki membranda kitosan ile kaplanarak modifiye edilmiştir (PAN+CHI ve PAN+PEI+CHI). Ardından, üreaz immobilizasyonu bu dört membran üzerine gerçekleştirilmiş ve her bir membran türünün üreazın katalitik performansı üzerine olan etkisi, optimum pH ve sıcaklık ölçümleri, depolama ve operasyonel stabilite, kinetik parametreleri ve üreyi uzaklaştırmadaki etkinlikleri belirlenerek incelenmiştir. Bu amaçla hem immobilizasyon deneyleri, hem de dinamik koşullarda ultrafiltrasyon deneyleri yapılmıştır. Enzim immobilize membranların ultrafiltrasyon işleminin verimliliği üzerine olan etkisini incelemek amacı ile bir matematik model geliştirilmiştir. Model tahminlerinin doğruluğu deneysel verilerle test edilmiştir.

## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Polimerler

Projede enzim immobilizasyonu için , ağırlıkça 91 % akrilonitril ve 9% sodyum methalil sulfonattan oluşan kopolimerden (PAN) hazırlanmış membranların yanısıra bu membranların polietileniminle (PEI) kaplanarak modifiye edilmiş formları (PAN+PEI) kullanılmıştır. Yüzeydeki sulfonat ( $SO_3^{-2}$ ) grupları sayesinde PAN membranının ıslatma kabiliyeti artırılmıştır. PAN membranının kanla temas eden yüzeyi, protein adsorpsiyonunu ve buna bağlı olarak oluşabilecek istenmeyen reaksiyonları engellemek amacıyla polietilenimin ile kaplanmıştır. Her iki membran örneğinin de iyonik kapasitesi 580 mEq/kg olarak belirlenmiştir (THOMAS ve ark., 2000).

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi polietilenimin oldukça yüksek yük yoğunluğuna sahip amin grubu içeren bir polikatyondur. Taşıdığı pozitif gruplar nedeni ile negatif yüklü yüzeylere oldukça sağlam bağlarla tutunabilme özelliğine sahiptir.



Şekil 2.1. Polietileniminin kimyasal yapısı

### 2.2. Enzim

Projede üreaz enzimi kullanılmıştır. 480000 g/mole molekül ağırlığına sahip olan üreaz, sadece üre üzerinde etkili, pH 4-10 arasında aktif olan bir enzimdir. Ürenin amonyum ve karbondioksit'e dönüşmesini sağlar.



Üreaz enzimi bakteri ve bitkilerde bulunan ve aktif kısımlarında nikel içeren bir enzimdir.

### **2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri**

Enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki grupta toplanır (BAILEY ve Ollis, 1986). Kimyasal yöntemle immobilizasyon sağlam kovalent bağları içerirken, fiziksel immobilizasyonda daha zayıf bağlarla tutunma söz konusudur. Kimyasal yöntemle immobilizasyonda ilk adım; yüzeyin silanlama, fonksiyonel gruplarla kaplama, esnek fonksiyonel grupların ilave edilmesi ile modifiye edilmesi yada aktif hale getirilmesidir. Ardından enzim yüzeye tutturulur. Bu işlemlerin yanısıra enzim yüzeye bir çapraz bağlayıcı ajan yardımı ile de immobilize edilebilir. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemesinin yüzey özelliklerinin (hidrofilik, hidrofobik karakteri) yanısıra, gözeneklilik , gözenek boyutu gibi yığın özellikleri de immobilize edilen enzim miktarını ve enzimin aktivitesini belirleyen faktörlerdir. Fiziksel immobilizasyonda enzim polimer matrisinin içine hapsedilebileceği gibi, enzim çözeltisi substrat ve reaksiyon ürünlerine karşı geçirgenliği olan bir membran içinde de tutuklanabilir.

### III. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyaller

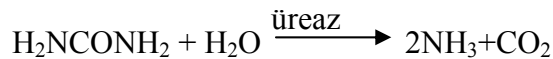
Bu çalışmada, Fransız firması Hospal'dan temin edilen hemodiyaliz uygulamaları için üretilmiş orijinal poliakrilonitril (PAN) ile bir yüzeyi polietilenimin (PEI) ile kaplanmış poliakrilonitril-polietilenimin (PAN+PEI) ultrafiltrasyon membranları kullanılmıştır. PAN membranı, akrilonitril ve sodyum metalil sulfonatin kopolimerizasyonu ile üretilmiştir. Kopolimer içindeki sodyum metalil sulfonatin ağırlıkça yüzdesi firma tarafından %9 olarak ayarlanmıştır.

Bu iki membranın modifiye edilmesi için kullanılan kitosan (CHI), Jack bean urease tip III (E.C. 3.5.1.3, U1500-20KU, 1.18 G solid, 17000 ünite/G solid) ve protein tespiti için kullanılan Bradford reagent (B 6916) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Bradford (1976) analiziyle yapılan protein tayini sonucuna göre 1 mg ticari enzim içerisinde 0.0347 mg protein bulunmuştur. Protein tayininde ve filtrasyon deneylerinde model protein olarak kullanılan sığır serum albumini (BSA) (minimum %98, EEC No 232-936-2) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Enzim substratı olarak kullanılan üre Labosi firmasından temin edilmiştir. Tampon çözeltiler ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ve asetik asit Fluka'dan temin edilmiştir. Bütün sulu çözeltiler ultra saf suyla ( $> 18\text{M}\Omega\text{cm}$ ) hazırlanmıştır.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Üreaz aktivitesinin belirlenmesi

Üreaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla enzimin üreden belli koşullarda birim zamanda oluşturduğu amonyum miktarı dikkate alınmıştır. Aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, üre üreazın katalitik etkisi sonucu amonyum ve karbon dioksit dönüşmektedir.



Amonyum tayininde Weatherburn (1967) tarafından geliştirilmiş olan ve halen en yaygın olarak kullanılan amonyum tayin metodlarından birisi olan yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, iki ayrı karışım hazırlanmıştır.

Karışım A: 5 g fenol (Reactabur >99%) 25 mg sodyum nitroprusside dehidrat (Fluka) ile karıştırılıp suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Karışım B: 2.5 g sodyum hidroksit anhidrous pelet (Carlo Erba >97%) ile 4.2 ml sodyum hipoklorit (Riedel, 6-14% Cl aktif) karışımı suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Bütün aktivite ölçüm deneylerinde reaksiyon hacmi 5 ml olarak sabit tutulmuştur. Çözünür enzim aktivite ölçüm deneylerinde 0.5 ml enzim çözeltisiyle (liyofilize haldeki ticari enzimin 0.01M, pH 7.4 Na-fosfat tamponu içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır) 4.5 ml 0.05 M, pH 7.4 Na fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 10mM üre çözeltisi karıştırılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmişlerdir. Reaksiyon sonunda karışıma 2.5 ml 2.5%'luk asetik asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon sonucu oluşan amonyum tayini için, karışımdan alınan 0.02 ml'lik örnek önce 5 ml karışım A içeren çözeltiyle karıştırılmış daha sonra 5 ml karışım B ilave edilerek tekrar karıştırılıp 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbansı Uvikon 923 Double Beam UV/VIS spektrofotometre kullanılarak 625 nm'de tespit edilmişlerdir. Ölçümler üç paralel olarak yürütülmüş ve enzim aktivitesi 3ölçümün ortalamasından hesaplanmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan amonyum miktarını belirlemede kullanılan kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Enzim aktivitesi µmol amonyum/dakika/ml enzim ekstraktı olarak hesaplanmıştır.

İmmobilize enzim aktivite ölçümlerinde, enzim immobilize edilmiş membranlar (1x2 cm<sup>2</sup>) 37 °C'e getirilmiş 5ml üre çözeltisine (0.05 M, pH 7.4 Na fosfat tamponu içerisinde 50mM olarak hazırlanmıştır) daldırılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edilmişlerdir. Bu aşamadan sonra çözeltilerin içerisindeki amonyum konsantrasyonu çözünür üreaz aktivitesi belirleme yönteminde belirtildiği gibi ölçülmüş ve µmol amonyum/dakika/cm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.2. Protein miktarının belirlenmesi**

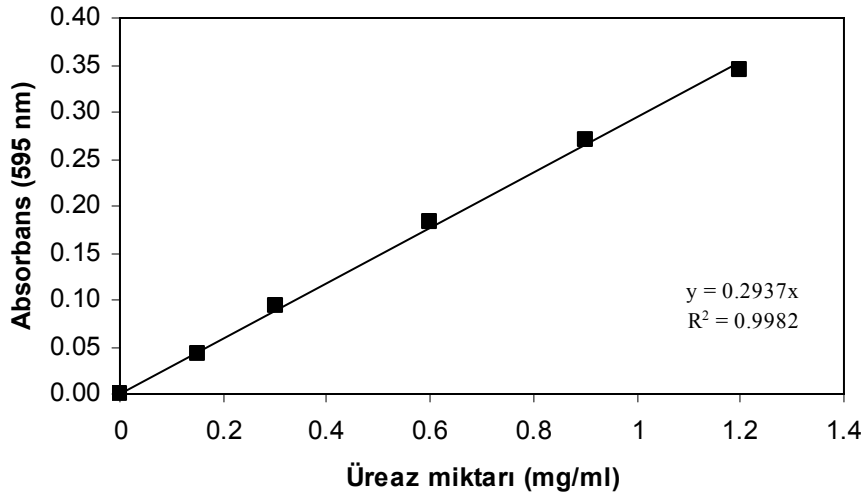
Çözeltideki protein miktarı Bradford yöntemine göre (BRADFORD, 1976) Sigma (St. Louis, Mo., USA)'dan temin edilmiş hazır Bradford çözeltisi kullanılarak tayin edilmiştir. Standard kalibrasyon eğrileri sığır serum albumini kullanılarak elde edilmiştir. Protein miktarı üç ölçümün ortalaması kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3. Membranların kitosan ile modifiye edilmesi

Kitosan çözeltisini hazırlamak için 1g kitosan 1L deiyonize suda çözülmüş, çözeltinin pH'sı 0.1 M HCl kullanılarak 5'e ayarlanmış ve sabit karıştırma hızında oda koşullarında 1 gün boyunca karıştırılmıştır. Homojen hale gelen çözelti süzülerek içindeki çözünen kalan safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Ardından, 6x6 cm<sup>2</sup> boyutlarındaki membranlar 50 ml kitosan çözeltisi içine daldırılmış ve çözeltide yarım saat süre ile bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda membranlar yüzeyine tutunmayan kitosanı uzaklaştırabilmek amacı ile yarım saat boyunca 50 ml deiyonize su ile yıkanmışlardır. Kitosanla kaplama membranların kalınlıklarında değişime yol açmamıştır.

### 3.2.4. Üreaz İmmobilizasyonu

6x6 cm<sup>2</sup> alana sahip membran örnekleri, pH'sı 7.4'e ayarlanmış 20 ml 0.01 M fosfat tampon içinde çözündürülmüş enzim çözeltisi içine daldırılarak immobilizasyon başlatılmıştır. Çözelti 4 °C sabit sıcaklıkta sürekli karıştırılmış, membranlar 24 saatin sonunda çözeltiden çıkarılarak immobilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Belirli zaman aralıklarında çözeltiden örnek alınarak, konsantrasyon değişiminden yüzeye tutunan üreaz miktarı ölçülmüştür. Bunun için 0.1ml örnek 1 ml Bradford reaktif ajanı ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika karanlıkta inkübe edilerek renk değişiminden kaynaklanan absorpsiyon 595 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 0.01M, pH 7.4 fosfat tamponu içinde hazırlanmış üreaz kullanılmıştır (Şekil 3.1). 24



Şekil 3.1. Membranlarda bağlanan üreaz miktarının Bradford protein tayiniyle belirlenmesi amacıyla kullanılmış standart doğru.

saat sonunda membranlar enzim çözeltisinden alınıp zayıf bağlarla tutunmuş çözünür enzimin uzaklaştırılması amacıyla 15 ml deiyonize su ile 15 dakika yıkanmışlardır. Yıkama suyuna geçen üreaz miktarı protein tayini ile belirlenmiş, bu miktar immobilizasyon sonunda absorplanan üreaz miktarından çıkartılarak membranın 1 cm<sup>2</sup>'sine tutunan immobilize enzim miktarı belirlenmiştir. Elde edilen membranlar kısa süre için kullanılabileceği kadar su içerisinde 4°C'de depolanmışlardır.

### **3.2.5. Üreaz immobilize edilmiş membranların depolama stabilitesinin belirlenmesi**

Üreazın immobilize formda stabilitesini belirlemek için membran parçacıkları deiyonize su içinde 4 °C'de depolanmışlardır. Farklı depolama sürelerinin sonunda her bir membrana ait üç parça sudan çıkartılıp kalıntı üreaz aktiviteleri ölçülmüştür. Üreaz aktivitesi 3.2.1 nolu kısımda açıklandığı şekilde tayin edilmiştir. Düşük enzim konsantrasyonlarında ölçülebilen amonyum miktarını artırabilmek için reaksiyon karışımının inkübasyon süresi 45 dakikaya çıkartılmıştır.

### **3.2.6. Üreaz immobilize edilmiş membranların kinetik özelliklerinin karakterize edilmesi**

Karakterizasyon çalışmaları standard reaksiyon karışımları kullanılarak pH 7.4'de ve 37 °C'de yapılmıştır. Bu çalışmalar 3 farklı membran parçası kullanılarak tekrarlanmış, sonuçlar 3 ölçümün ortalaması olarak verilmiştir. Üre konsantrasyonu 1 mM ile 100 mM arasında değiştirilerek immobilize üreaz aktiviteleri ölçülmüş, bu verilerden enzimin kinetik parametreleri  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri elde edilmiştir. Sıcaklık 10 ile 60 °C arasında, reaksiyon karışımının pH'sı ise 5 ile 9 arasında değiştirilerek sıcaklık ve pH'nın immobilize enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

### **3.2.7. Ultrafiltrasyon deneyleri**

Su ile yapılan filtrasyon deneylerinde toplam hacmi 10 ml ve aktif yüzey alanı 4.1 cm<sup>2</sup> olan dead-end karıştırmalı modül (Model 8010, Millipore Corp. Bedford, MA), Na-fosfat tamponu ile yapılan filtrasyon çalışmalarında ise toplam hacmi 50 ml ve aktif yüzey alanı 13.4 cm<sup>2</sup> olan modül kullanılmıştır. Besleme kısmının basıncı azot gazı ile sabitlenmiştir ve bütün deneyler sabit basınçta yapılmıştır. Membran yüzeyinde konsantrasyon polarizasyonunu engellemek amacıyla besleme çözeltisi sabit karıştırma hızında (300 rpm) karıştırılmıştır. Değişik basınçlarda membrandan geçen çözeltinin (permeate) zamana karşı ağırlığındaki değişim analitik

bir terazi (Sartorius) vasıtasıyla ölçülmüştür. Bütün deneyler oda koşullarında,  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de yapılmıştır.

Suyun çözücü olarak kullanıldığı filtrasyon deneylerinde membranlar öncelikle yüksek basınca maruz bırakılarak (2 bar) kompakt edilmiş ve 5 g örnek toplanana kadar geçen süre tespit edilmiştir. Membranların yüzeyinde oluşan kirliliğin ve membranların katalitik aktivitelerinin filtrasyon şartlarından ne oranda etkilendiğini belirlemek amacıyla aynı membranla, aynı basınç farkı uygulanarak önce 50 mg/ml üre çözeltisi, daha sonra 25 mg/ml üre ve 0.5 mg/ml BSA çözeltisi ve üçüncü aşamada yine 50 mg/ml üre çözeltisi kullanılarak geçiş deneyleri yapılmıştır. Herbir deneyin sonunda modül içinde kalan çözelti boşaltılıp yeni çözelti eklendikten sonra basınç istenen değere ayarlanarak deneylere devam edilmiştir. Basınç ayarlaması yapıldıktan sonra sabit akış elde edebilmek için 10 dakika beklenmiş ve bu sürenin sonunda membrandan geçen (filtrate) çözelti toplanmaya başlanmıştır. BSA konsantrasyonunun filtrasyon performansına etkisini görebilmek için konsantrasyonu 0.5 mg/ml'den 5 mg/ml'ye artırılmış ve aynı metod tekrarlanmıştır. Yukardaki protokol 4 farklı basınçta (0.2, 0.5, 1 ve 1.5 bar) tekrarlanmıştır.

Na-fosfat tamponu ile yapılan filtrasyon deneylerinde besleme çözeltisindeki tampon konsantrasyonu 22 mM'a, pH ise 7'ye ayarlanmıştır. Deneyler öncesinde her bir membran, tampon kullanılarak 30 dakika süre ile 2 kez 2 bar basınca maruz bırakılmış ve membranın tampon çözeltisine karşı gösterdiği hidrolik geçirgenlik değerleri belirlenmiştir. Ardından, sabit basınçta (0.5, 1 ve 1.5 bar) besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 1 mM ile 10 mM arasında değiştirilerek deneyler yapılmıştır. Tüm membranlar için 50 dakika filtrasyonun sonunda membranın üst (retentate) ve alt (permeate) bölmesinde kalan üre miktarları tayin edilmiştir. Üreaz immobilize membranların kullanıldığı durumlarda her 10 dakikanın sonunda altta biriken toplama (permeate) çözeltisinden 100 µl örnek alınarak amonyum miktarı belirlenmiştir.



## 4. MATEMATİK MODEL

### 4.1. Filtrasyon deneylerinin teorik analizi

Membran ayırma işlemlerinin performansını etkileyen en önemli faktörlerden birisi membran yüzeyinde veya membranın içindeki gözeneklerde (pore) oluşan protein kirliliğidir. Literatürde filtrasyon ile ilgili deneysel verilerin analizinde genellikle klasik gözenek tıkanıklılığı (classical pore blocking), gözenek daralması (pore constriction) ve kek filtrasyon modelleri kullanılmıştır (HO ve Zydney, 2000). Bu modellerin tümü için kullanılan denklemler ortak bir formda aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k \left( \frac{dt}{dV} \right)^n \quad (4.1)$$

Yukardaki denklemde, t zamanı, V toplam filtre edilen hacmi ve  $J = \frac{1}{A_0} \frac{dV}{dt}$  hacimsel akışı ifade etmektedir. Denklemdaki n'nin sayısal değeri filtrasyon modelini tanımlamaktadır. Buna göre, n=0 kek filtrasyonu, n=1 ara tıkanıklık (intermediate blocking), n=3/2 gözenek daralması ve n=2 gözeneklerin tamamen bloke edilmesi (complete pore blocking) modellerini ifade etmektedir. Bu modeller deneysel verileri tahmin etmede kısmen başarısız kalmışlardır. Deneysel veriler protein kaynaklı kirlilik mekanizmasının gözenek tıkanıklılığından kek oluşumuna doğru bir geçiş yaptığını göstermiştir. Bu çalışmada, filtrasyon verileri HO ve Zydney (2000) tarafından geliştirilen matematiksel model aracılığıyla analizlenmiştir. Model, gözenek tıkanmalarından kaynaklanan başlangıçtaki kirlenmeyle, daha sonraki, tıkanmış bölgelerde biriken protein kekinin büyümesinden kaynaklanan kirliliği hesaba katmaktadır. Bu modele göre protein ile kirlenmiş bir membrandan geçen hacimsel akının ve biriken protein tabakasının direncinin zamana göre değişimleri 4.2 ve 4.3 numaralı denklemlerle ifade edilmiştir.

$$Q = Q_0 \left[ \exp \left( - \frac{\alpha \Delta PC_b}{\mu R_m} t \right) + \frac{R_m}{R_m + R_p} x \left( 1 - \exp \left( - \frac{\alpha \Delta PC_b}{\mu R_m} t \right) \right) \right] \quad (4.2)$$

$$R_p = (R_m + R_{p0}) \sqrt{1 + \frac{2fR'\Delta PC_b}{\mu(R_m + R_{p0})^2} t} - R_m \quad (4.3)$$

Denklem 4.2 ve 4.3'deki sembollerin anlamı aşağıda sıralanmıştır.

Q Hacimsel akış hızı, m<sup>3</sup>/saniye

$Q_0$	Temiz membrandaki hacimsel akış hızı, m <sup>3</sup> /saniye
$\alpha$	Gözenek tıkanıklılık parametresi, m <sup>2</sup> /kg
$\Delta P$	Transmembran basıncı, N/m <sup>2</sup>
$C_b$	Membranın maruz kaldığı çözeltideki protein konsantrasyonu, g/L
$\mu$	Çözeltinin viskozitesi, kg/m.saniye
$R_m$	Temiz membranın direnci, m <sup>-1</sup>
$R_p$	Biriken protein tabakasının direnci, m <sup>-1</sup>
$R_{p0}$	Başlangıçta biriken protein tabakasının direnci, m <sup>-1</sup>
$R'$	Spesifik protein tabakasının direnci, m/kg
$f'$	Biriken protein tabakasının büyümesine katkıda bulunan toplam proteinin kesirsel miktarı

Bu parametrelerden üçü  $\alpha$ ,  $R_{p0}$ ,  $f'$  ve  $R'$ 'in çarpımı  $f' R'$  deneysel olarak zamana karşı ölçülen hacimsel akış değerleri ile denklem 4.2'den elde edilen teorik değerler arasındaki fark minimize edilerek hesaplanmışlardır.

## 4.2. Enzim immobilize edilmiş membranların kullanıldığı ultrafiltrasyon işlemine ait matematik model

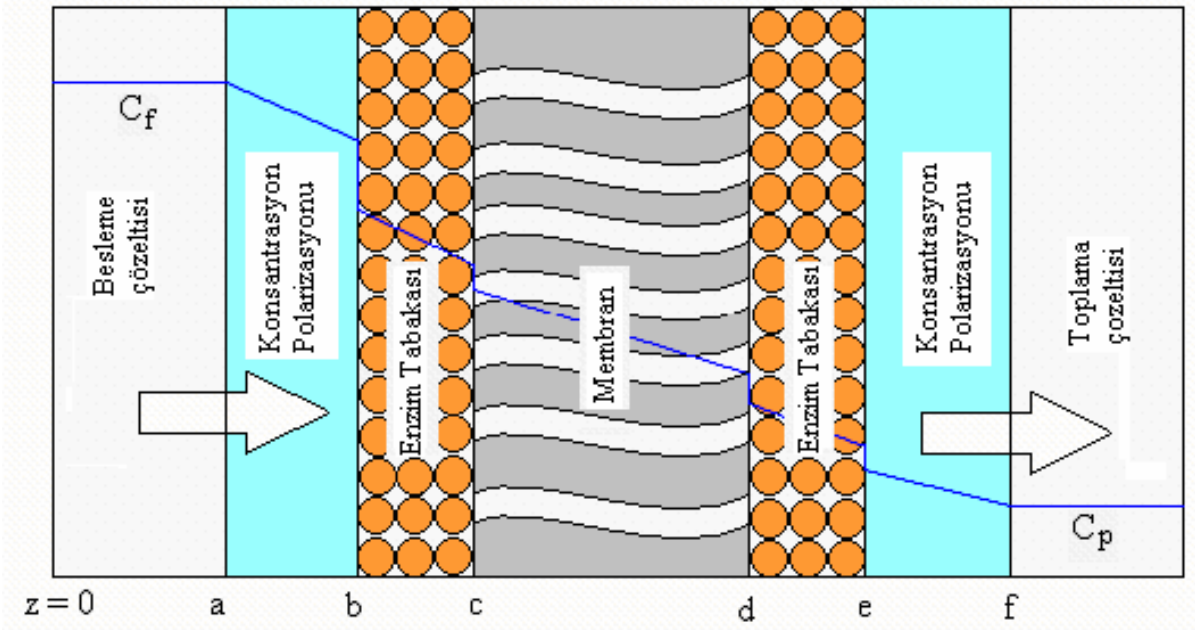
### 4.2.1 Model varsayımları

Şekil 4.1'de matematik modelin geliştirilmesinde kullanılan ultrafiltrasyon işleminin şematik görüntüsü verilmektedir. L kalınlığındaki bir membranın her iki yüzeyine de Le kalınlığında enzim tabakası immobilize edilmiştir. Hem besleme, hem de membrandan geçerek toplanan çözelti karıştırılmakla birlikte membran yüzeyine yakın kısımlarda konsantrasyon polarizasyonu oluşabilmektedir ve bu oluşum matematik modelde dikkate alınmıştır. Membran boyunca basınç farkı uygulanarak çözeltideki substratın hem difüzyon hem de konveksiyon mekanizmaları ile membran ve enzim tabakalarından geçişi sağlanmaktadır.

4.2.2 numaralı kısımda verilen matematik model denklemlerinin türetilmesinde kullanılan varsayımlar şu şekildedir.

1. Membran ve enzim tabakalarının kalınlıkları diğer boyutlarına göre çok küçük olduğundan kütle transferi sadece kalınlık yönünde (z yönü) gerçekleşir.

2. Membran ve enzim tabakaları oldukça ince olduğundan bu katmanlarda kararlı (steady state) koşullara çok kısa sürede ulaşılır. Diğer bir deyimle, substratın membran ve enzim tabakaları boyunca konsantrasyonu, zamandan bağımsız olarak sadece kalınlık boyunca değişim gösterir.
3. Besleme (feed solution) ve toplama (permeate) çözeltileri iyi karıştırıldığından bu çözeltilerde substratın konsantrasyonu sadece zamana bağlı olarak değişir.
4. Enzim küresel bir şekle sahiptir ve yüzeye immobilize edildiğinde gözenekli jel şeklinde bir katman oluşturur.
5. Enzimatik reaksiyon membranın dış yüzeylerinde bulunan enzim katmanları içinde gerçekleşir.
6. Enzimatik reaksiyon sonucu (substratın enzim tarafından ürüne dönüştürüldüğü reaksiyon) oluşan ürünler reaksiyon hızını etkilemez.
7. Ultrafiltrasyon işlemi boyunca enzimin aktivitesinde herhangi bir değişim olmaz.
8. Substratın hem enzim tabakası, hem de membran içindeki difüzyon katsayısı konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermez.



Şekil 4.1. Enzim immobilize edilmiş membranların kullanıldığı ultrafiltrasyon işleminin şematik gösterimi

#### 4.2.2. Model denklemleri

Ultrafiltrasyon işleminin başlangıcında hacmi  $V_o$  olan ve içinde  $C_o$  konsantrasyonunda substrat içeren besleme çözeltisi ultrafiltrasyon hücresinin üst kısmına ilave edilir. Membran boyunca uygulanan basınç farkı ile birlikte substrat enzim tabakası ve membrandan geçerek toplama çözeltisinde toplanır. Substratın besleme ve toplama çözeltileri içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimi 4.4 ve 4.5 numaralı denklemlerle ifade edilir.

$$\frac{d}{dt}(C_f V_f) = -k_f A (C_f - C_e^f) \quad (4.4)$$

$$\frac{d}{dt}(C_p V_p) = k_p A (C_e^p - C_p) \quad (4.5)$$

Bu denklemlerde  $C_f$  ve  $C_p$  substratın besleme ve toplama çözeltileri içindeki konsantrasyonunu,  $V_f$  ve  $V_p$  besleme ve toplama çözeltilerinin hacimlerini,  $k_f$  ve  $k_p$  substratın besleme ve toplama çözeltileri içindeki kütle transfer katsayısını,  $A$  ultrafiltrasyon hücresinin alanını,  $C_e^f$  ve  $C_e^p$  substratın enzim/besleme çözeltisi ve enzim/toplama çözeltisi ara yüzeylerindeki konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bu konsantrasyonlar ile substratın enzim tabakaları içindeki konsantrasyonları lineer bir denge ilişkisi olduğu ( $\phi$ : Denge katasayısı) kabul edilerek 4.6 ve 4.7 numaralı denklemlerle ilişkilendirilebilir.

$$C_e \Big|_{z=b} = \phi_e C_e^f \quad (4.6)$$

$$C_e^p = \phi_e C_e \Big|_{z=e} \quad (4.7)$$

Substrat enzim tabakası boyunca hem difüzyon, hem de konveksiyon mekanizmaları ile taşınmaktadır. Substratın enzim tabakası boyunca konsantrasyonundaki değişim aşağıdaki denklem ile ifade edilir.

$$\frac{d}{dz}(K_{ce} C_e J_v) - \frac{d}{dz} \left( \varepsilon_e K_{de} D_e \frac{dC_e}{dz} \right) + r = 0 \quad (4.8)$$

Bu denklemde geçen  $K_{ce}$  ve  $K_{de}$  konveksiyon ve difüzyon ile ilgili engellenme (hindrance) faktörlerini,  $J_v$  membrandan geçen çözeltinin hacimsel akış hızını,  $\varepsilon_e$  enzim tabakasının gözenekliliğini,  $D_e$  substratın enzim tabakası içindeki difüzyon katsayısını,  $r$  ise enzimatik reaksiyonun hızını ifade etmektedir. Modelde reaksiyon hızı Michaelis Menten denklemi kullanılarak aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir.

$$r = \frac{V_{\max}}{K_m + C_e} C_e \quad (4.9)$$

Denklem 4.9'da görülen  $V_{\max}$  enzimatik reaksiyonun ulaşabileceği maksimum hızı ifade ederken ,  $K_m$  maksimum reaksiyon hızının yarısına ulaşmak için gerekli olan substrat konsantrasyonunu gösterir. Membrandan geçen çözeltinin hacimsel akısı,  $J_v$ , membranın hidrolik geçirgenliği,  $L_p$ , ve membran boyunca uygulanan basınç farkı ,  $\Delta P$ , kullanılarak aşağıdaki denklemle ifade edilir.

$$J_v = L_p \Delta P \quad (4.10)$$

Substratın membran boyunca olan taşınımı da hem difüzyon, hem de konveksiyon mekanizması ile gerçekleşmektedir. Substratın membran boyunca konsantrasyonundaki değişim 4.11 numaralı denklem ile hesaplanmıştır (OPONG ve ZYDNEY, 1991).

$$\frac{d}{dz}(K_{cm} C_m J_v) - \frac{d}{dz} \left( \varepsilon_m K_{dm} D_m \frac{dC_m}{dz} \right) = 0 \quad (4.11)$$

Denklem 4.11'de  $K_{cm}$  ve  $K_{dm}$  konveksiyon ve difüzyon ile ilgili engellenme faktörlerini,  $\varepsilon_m$  enzim tabakasının gözenekliliğini,  $D_m$  substratın enzim tabakası içindeki difüzyon katsayısını,  $C_m$  ise substratın enzim tabakası içindeki konsantrasyonunu göstermektedir.

4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11 numaralı denklemlerin çözümü için gerekli olan sınır koşulları aşağıda verilmektedir.

$z=b$  Besleme çözeltisi/enzim tabakası arayüzeyi :

$$N_{\text{substrat}}^{\text{besleme}} = N_{\text{substrat}}^{\text{enzim}} \quad (4.12)$$

Denklem 4.12 birim zamanda besleme çözeltisinden enzim tabakasına aktarılan substrat miktarının enzim tabakası boyunca aktarılan miktarla eşit olduğunu ifade etmektedir. Denklem 4.12 substratın konsantrasyonu ve transport parametreleri cinsinden aşağıdaki şekilde yeniden yazılabilir.

$$k_f (C_f - C_e^f) = \frac{d}{dz} (K_{ce} C_e J_v) \Big|_{z=b} - \frac{d}{dz} \left( \varepsilon_e K_{de} D_e \frac{dC_e}{dz} \right) \Big|_{z=b} \quad (4.13)$$

$z=c$  Enzim tabakası/membran arayüzeyi :

$$N_{\text{substrat}}^{\text{enzim}} = N_{\text{substrat}}^{\text{membran}} \quad (4.14)$$

$$\frac{d}{dz} (K_{ce} C_e J_v) \Big|_{z=c} - \frac{d}{dz} \left( \varepsilon_e K_{de} D_e \frac{dC_e}{dz} \right) \Big|_{z=c} = \frac{d}{dz} (K_{cm} C_m J_v) \Big|_{z=c} - \frac{d}{dz} \left( \varepsilon_m K_{dm} D_m \frac{dC_m}{dz} \right) \Big|_{z=c} \quad (4.15)$$

z=d Membran/enzim takabası arayüzeyi :

$$N_{substrat}^{membran} = N_{substrat}^{enzim} \quad (4.16)$$

$$\frac{d}{dz}(K_{cm} C_m J_v)|_{z=d} - \frac{d}{dz}\left(\varepsilon_m K_{dm} D_m \frac{dC_m}{dz}\right)|_{z=d} = \frac{d}{dz}(K_{ce} C_e J_v)|_{z=d} - \frac{d}{dz}\left(\varepsilon_e K_{de} D_e \frac{dC_e}{dz}\right)|_{z=d} \quad (4.17)$$

z=e Enzim takabası/toplama çözeltisi arayüzeyi :

$$N_{substrat}^{enzim} = N_{substrat}^{toplama} \quad (4.18)$$

$$\frac{d}{dz}(K_{ce} C_e J_v)|_{z=e} - \frac{d}{dz}\left(\varepsilon_e K_{de} D_e \frac{dC_e}{dz}\right)|_{z=e} = k_p (C_e^p - C_p) \quad (4.19)$$

Besleme çözeltisi/enzim ve enzim/toplama çözeltisi arayüzeylerinde olduğu gibi, diğer tüm arayüzeylerdeki konsantrasyonlarda lineer bir denge ilişkisi kullanılarak birbiriyle aşağıdaki denklemler vasıtasıyla ilişkilendirilmiştir.

$$C_m|_{z=c} = \phi_m C_e|_{z=c} \quad (4.20)$$

$$C_e|_{z=d} = \phi_m C_m|_{z=d} \quad (4.21)$$

### 4.2.3. Model denklemlerinin çözümü

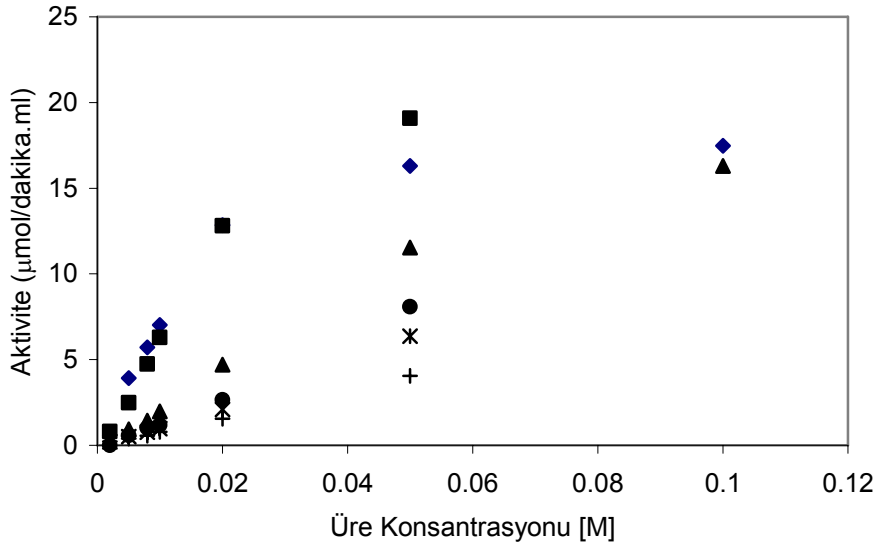
Bir önceki kısımda verilen matematik model denklemleri reaksiyon kinetiğinin nonlineer olması nedeniyle nonlineer bir doğaya sahiptir ve birlikte çözüm gerektirmektedir. Matematik modelin çözümü için denklemler öncelikle sonlu farklar yöntemi (finite difference) kullanılarak diferansiyel denklemden algebrik denklemlere dönüştürülmüştür. Ardından, birbirinin içine geçmiş nonlineer denklemlerin çözümü Levenberg Marquard metodu ile elde edilmiştir (PRESS ve ark., 1992). Nümerik çözümün optimizasyonu zaman ( $\Delta t$ ) ve adım aralıklarını ( $\Delta z$ ) değiştirerek sağlanmıştır.

## V. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Na-fosfat tampon konsantrasyonunun üreaz aktivitesine etkisi

Enzim içeren tamponlarda aktiviteyi etkileyen en önemli faktörler tamponun iyonik gücü ve pH değeridir. Özellikle pH değeri bir yandan enzimin aktif bölgesindeki reaktif grupların protone-deprotone olmasını etkilerken, diğer yandan da enzimin yük dağılımını ve bunun sonucunda oluşan iç ve dış itme-çekme kuvvetlerini etkilemektedir. Bu etkileşimler sonucunda enzimin aktif bölgesinin pozisyonu değişebilmekte ve substratla olan etkileşiminin kolay veya zor olmasına bağlı olarak aktivite etkilenmektedir. Ortamın iyonik gücü ise iyonik etkileşimlerin ve H bağlarının gücünü etkilemekte ve bu durum enzimin konformasyonunu ve/veya polimerize-depolimerize olma veya çözünürlük durumunu değiştirmektedir. Buna göre içereceği amino asit yan zincirlerinin niteliklerine (proton alma verme ve yük durumu) göre bir enzimin pH değişiminden farklı şekilde etkileneceği açıktır. Diğer yandan bir enzimin aktivitesi ölçülürken kullanılan tamponlar, o enzime oluşturulacak ürünleri de etkileyebilmektedir. Örneğin, sitrat ve tris'in tampon olarak kullanıldığı durumlarda üreaz tarafından hidrolize edilen ürenin açığa çıkaracağı ürünler amonyum ve karbamatken; Na-fosfat tamponu kullanıldığında amonyum ve karbondioksit açığa çıkmaktadır (JESPERSEN, 1975). Oluşacak bu ürünlerin enzim aktivitesini değişik şekilde etkilemesi mümkündür. Nitekim özellikle yüksek substrat ve tampon konsantrasyonlarında bu etkilerin oluşması olasılığı daha da artmaktadır. Şekil 5.1'de, farklı Na-fosfat tampon konsantrasyonlarında pH 6.0'da ölçülmüş üreaz aktivitesinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi görülmektedir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere substrat konsantrasyonu arttıkça aktivite artmakta, buna karşın Na-fosfat tampon konsantrasyonu arttıkça aktivite düşmektedir. En yüksek aktiviteler benzer sonuçlar vermiş olan 0.01 ve 0.02 M Na-fosfat tamponu kullanıldığı zaman oluşmakta, 0.05 M tampon kullanıldığı zamansa aktivite değerlerinde bir miktar düşüş gözlenmektedir. Bu tampon konsantrasyonu üzerinde ise aktivitede kayda değer düşüşler yaşanmaktadır. Bilindiği gibi tampon kullanımının temel amacı aktivite ölçümlerinin mümkün olduğunca sabit pH değerlerinde gerçekleştirilmesidir. Üreaz enzimi aktivitesi sonucunda alkali ürünler üreten bir enzim olup, ölçüm sırasında pH değerinde bir artış meydana getirmektedir. Bu durumun önlenmesi amacıyla ortamda uygun bir tamponun yine uygun bir konsantrasyonda kullanılması gerekmektedir. Aksi takdirde ortam pH değeri çoğu enzimin aktivitesinin azaldığı alkali ortama doğru kayabilmektedir. Şekil 5.2'de aktivite

ölçümlerinin 30. dakikası sonunda farklı reaksiyon karışımlarının pH değerlerini gösteren eğriler de verilmiştir. Buna göre özellikle yüksek aktivite ölçülen durumlarda pH değişimlerinin de doğal olarak yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Tampon gücü artırıldıkça pH değişimi de azalmaktadır. Ancak, bu durumun enzim aktivitesinde düşüş yarattığı da unutulmamalıdır. Tampon konsantrasyonunun artmasıyla enzim aktivitesinde görülen düşüşün nedeni, ortamın iyon gücünün artmasıyla ilişkili olabileceği gibi, tamponun kendisinin veya enzimin oluşturduğu ürünlerle meydana getirdiği metabolitlerin inhibisyon etkisiyle de açıklanabilir.

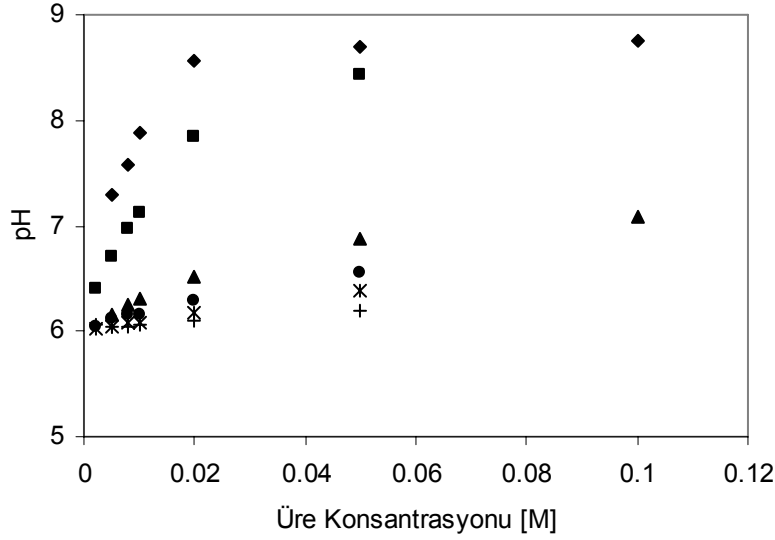


Şekil 5.1. Üreaz aktivitesi ölçümü sırasında Na-fosfat tamponu ve üre konsantrasyonunun aktivite üzerindeki etkisi. Semboller; (◆) 0.01 M, (■) 0.02 M, (▲) 0.05 M, (●) 0.08 M, (+) 0.1 M, (\*) 0.15 M tampon konsantrasyonunu göstermektedir.

Literatürde Na-fosfat tamponunun üreaz üzerinde özellikle yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman inhibe edici bir etkisi olduğu iddia edilmektedir (KRAJEWSKA ve Zaborska, 1999). Ancak, bu tampon, sözkonusu enzimle ilgili çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan bir tampon olup, elde edilen verilerin literatürdekilerle kıyaslanması açısından kullanılması uygun görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre çözünür enzimle gerçekleştirilen aktivite ölçümlerinde tampon konsantrasyonunun pH değişiminin mümkün olduğunca sınırlanması açısından 0.02 M

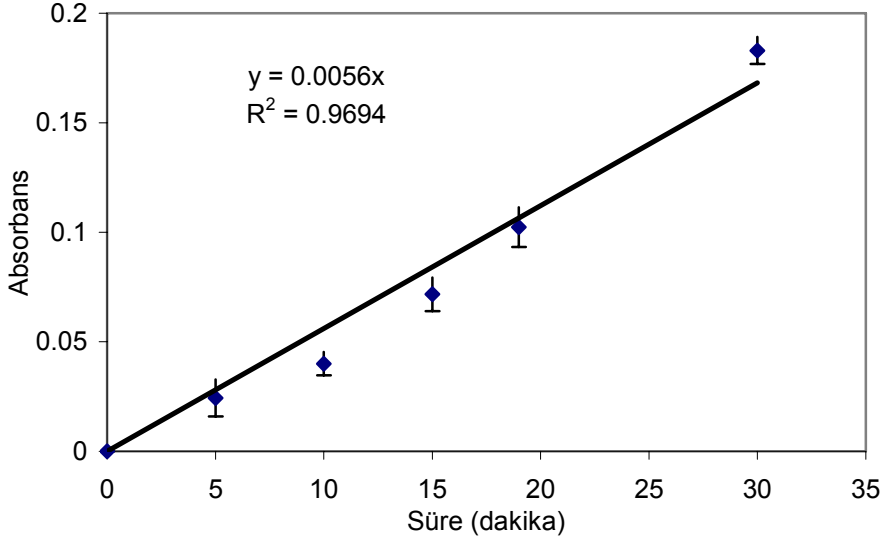


üzerinde olması gerekmektedir. Bu durumda, substrat konsantrasyonunun da 0.05 M ve altında tutulmasıyla pH değişimlerinin 30 dakika sonunda 1 birimden az gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 5.2. Üreaz aktivitesi ölçümü sırasında Na-fosfat tamponu ve üre konsantrasyonunun reaksiyon karışımı pH'sı üzerindeki etkisi. Semboller; (◆) 0.01 M, (■) 0.02 M, (▲) 0.05 M, (●) 0.08 M, (+) 0.1 M, (\*) 0.15 M tampon konsantrasyonunu göstermektedir.

Şekil 5.3'de 0.05 M, pH 6.0 Na-fosfat tamponu ve 0.01M üre bulunan ortamda enzimin zamana göre amonyum oluşturmasına bağlı olarak tayin edildiği yöntem sırasında oluşturduğu absorbans değerleri verilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre enzim aktivitesi ölçümü sırasında reaksiyonun 30 dakikalık bölümünün doğrusal bir hızda geliştiği ve 30 dakikalık test süresinin sabit test süresi olarak kullanılmasının aktivite ölçümünde herhangi bir hataya neden olmadığı açıktır. Esas olarak daha önceden tarafımızdan yürütülen çalışmalarda aktivite ölçümü sırasında lineritenin 45 dakika ve üzerinde bile devam ettiği ve bu sürenin de aktivite ölçümünde kullanılabileceği de belirlenmişti.



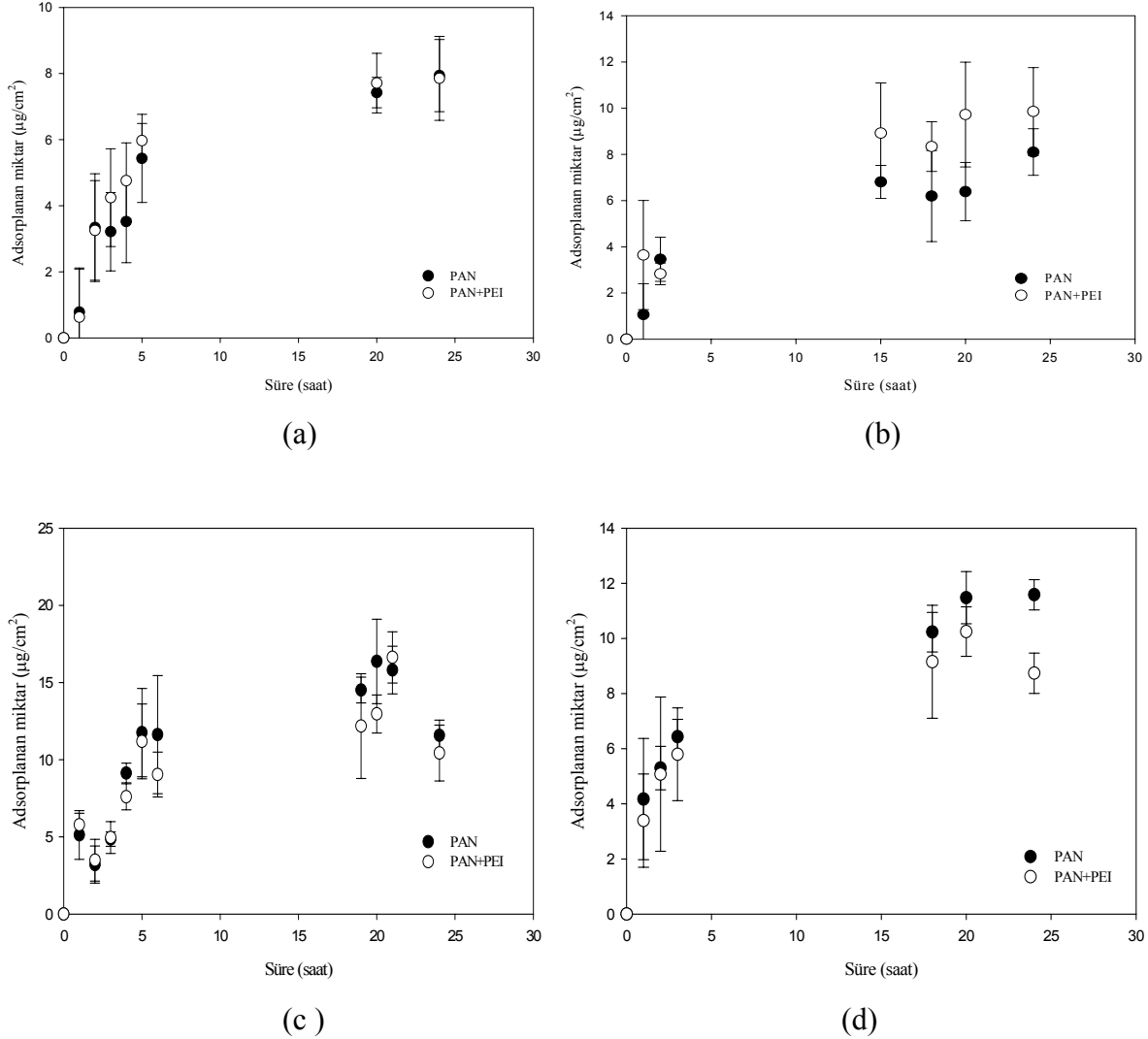
Şekil 5.3. Reaksiyon boyunca oluşan amonyum konsantrasyonunun değişimi

## 5.2. Üreaz immobilizasyon çalışmaları

### 5.2.1. Üreazın PAN ve PAN+PEI membranlarına immobilizasyonu

İmmobilizasyon koşullarının optimize edilebilmesi için PAN ve PAN+PEI membranları değişik konsantrasyonlarda üreaz çözeltisinin içine daldırılmışlardır. Şekil 5.4a'dan 5.4d'ye kadar membranlara tutunan üreaz miktarının zamana göre değişimi görülmektedir. İmmobilizasyonun gerçekleştiği pH olan 7.4'te isoelektrik noktası 4.9 ( $pI=4.9$ ) olan üreaz daha çok negatif yüke sahiptir. Bu pH değerinde enzimin amino asitlerinin 13 %'ü yüksek pKa değerine sahiptir, dolayısıyla enzim aynı zamanda pozitif yüke de sahiptir (Milton ve Taylor, 1969). Üreaz enziminin, pKa değeri 9.4 ile 10.6 arasında olan  $\epsilon$ -amino gruplarına sahip hemen hemen 39 lizin kalıntısı içerdiği rapor edilmiştir (Milton ve Taylor, 1969; Fennema, 1996). Böylece, immobilizasyon koşullarında üreaz hem negatif yüklü PAN, hem de pozitif yüklü PEI ( $NH_3$  grubunun pKa değeri  $> 8$ ) yüzeylerine tutunmuştur. PAN ve PAN+PEI membranları benzer adsorpsiyon özellikleri göstermiştir. Her iki tip membran için de üreaz adsorpsiyonunun önemli bir kısmı 3 ile 6. saatler arasında gerçekleşmiştir. Ardından adsorpsiyon yavaşlamış ve denge değerlerine ulaşılmıştır. Şekil 5.5'den görüleceği gibi enzim çözeltisinin konsantrasyonunun 35

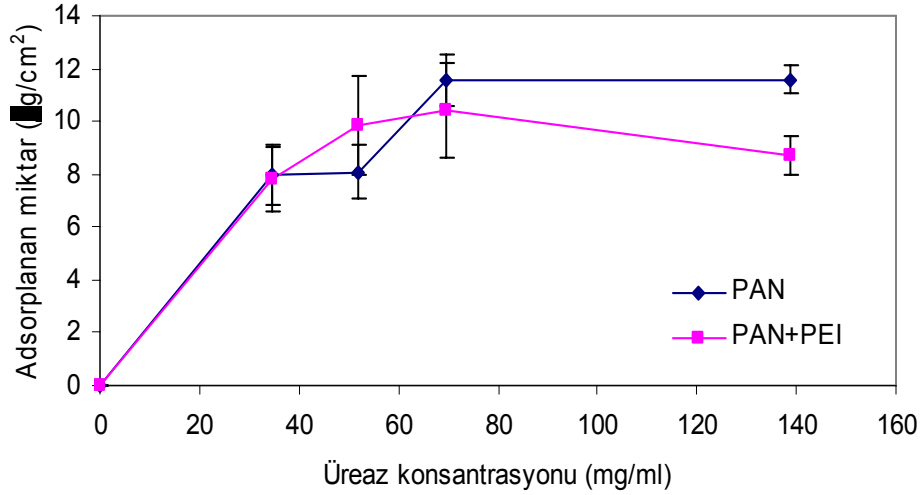
$\mu\text{g/ml}$ 'den  $69 \mu\text{g/ml}$ 'ye artırılması ile her iki membrana da tutunan enzim miktarında benzer oranda artış olmuştur. Enzim konsantrasyonunun  $69 \mu\text{g/ml}$ 'den



Şekil 5.4. PAN ve PAN+PEI membranlarında immobilize üreaz miktarının süreye göre değişimi. İmmobilizasyon deneyinde kullanılan çözeltilerdeki üreaz konsantrasyonları: (a)  $0.0347 \text{ mg/ml}$ ; (b)  $0.0521 \text{ mg/ml}$ ; (c)  $0.0694 \text{ mg/ml}$ ; (d)  $0.1388 \text{ mg/ml}$ .

$139 \mu\text{g/ml}$ 'ye artırılması sonucu, PAN membranına tutunan üreaz miktarında herhangi bir değişiklik olmazken, PAN+PEI membranına tutunan miktarda az da olsa bir düşüş gözlenmiştir. Literatürde buna benzer bir sonuç immobilize enzim miktarı ile aktivite arasında gözlenmiştir (

GODJEVARGOVA ve Dimov, 1997; GABROVSKA ve ark., 2007). Araştırmacılar bunun nedenini yüksek enzim konsantrasyonlarında enzimin membran yüzeyinde çökmesi



Şekil 5.5. PAN ve PAN+PEI membranlarına immobilize olan üreazın adsorpsiyon izotermi

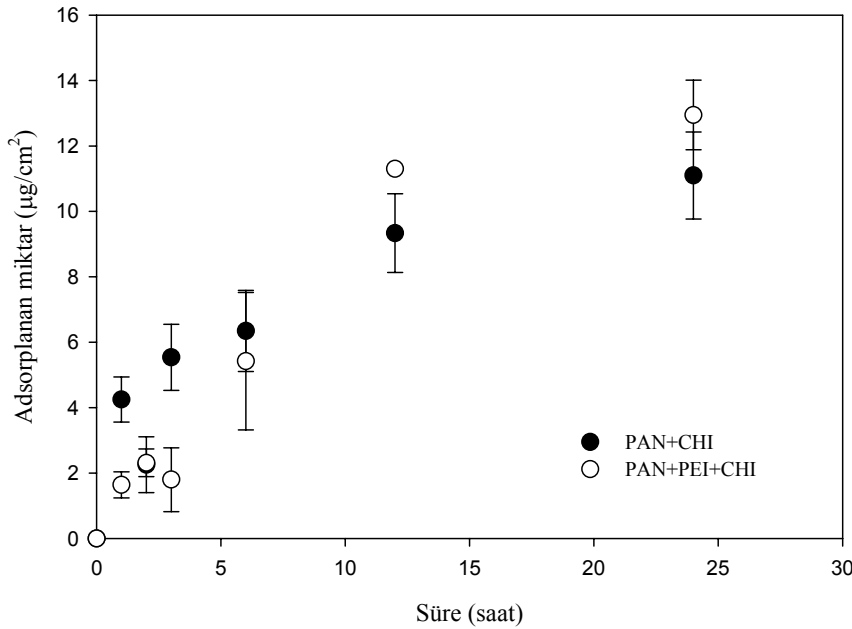
(aggregation) ve bunun sonucu substratın enzimin aktif kısımlarına kolaylıkla ulaşamaması ile açıklamışlardır. Şekil 5.5’de gözlemlenen, PEI kaplı membran yüzeyine tutunan enzim miktarındaki azalma da, yüksek enzim konsantrasyonunda enzimin yüzeyde çökelti oluşturması sonucu enzim membran etkileşiminin azalması ve yıkama esnasında enzimin kolayca desorbe olması ile açıklanabilir. Şekil 5.5’de elde edilen sonuçlara dayanılarak, tüm immobilizasyon çalışmaları için enzim konsantrasyonunun 69 µg/ml olmasına karar verilmiştir. Bu enzim konsantrasyonunda PAN+PEI membranına tutunan miktar PAN membranına tutunana göre biraz daha az olmakla birlikte, gösterdiği enzim aktivitesi PAN membraninkine kıyasla 2 kat daha yüksektir (Tablo 5.1). Bu sonuç, enzimin dallanmış yapıda bir polielektrolit olan PEI yüzeyine daha çok aktif kısmı serbest kalacak şekilde tutunmuş olması ve substratın enzimin aktif kısımlarına daha fazla oranda ulaşma olasılığı ile açıklanabilir.

Tablo 5.1. Farklı membranlar üzerine dengeye ulaşıldığında adsorplanan üreaz miktarları ve aktiviteleri

Membran	Adsorplanan miktar $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Aktivite $\mu\text{mol}/\text{dak.cm}^2$	Spesifik Aktivite $\mu\text{mol}/\text{dak.mg enzim}$
PAN	$11.57 \pm 0.99$	$0.10 \pm 0.0084$	8.64
PAN+CHI	$11.09 \pm 1.33$	$0.14 \pm 0.0088$	12.62
PAN+PEI	$10.43 \pm 1.81$	$0.21 \pm 0.0223$	20.13
PAN+PEI+CHI	$12.95 \pm 1.06$	$0.32 \pm 0.0192$	24.71

### 5.2.2. Üreazın kitosanla kaplanmış PAN (PAN+CHI) ve PAN+PEI (PAN+PEI+CHI) membranlarına immobilizasyonu

Kitosanla kaplanmış PAN ve PAN+PEI membranları üzerine üreaz immobilizasyonu da pH 7.4'de ve 69  $\mu\text{g}/\text{ml}$  üreaz konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.6'da bu

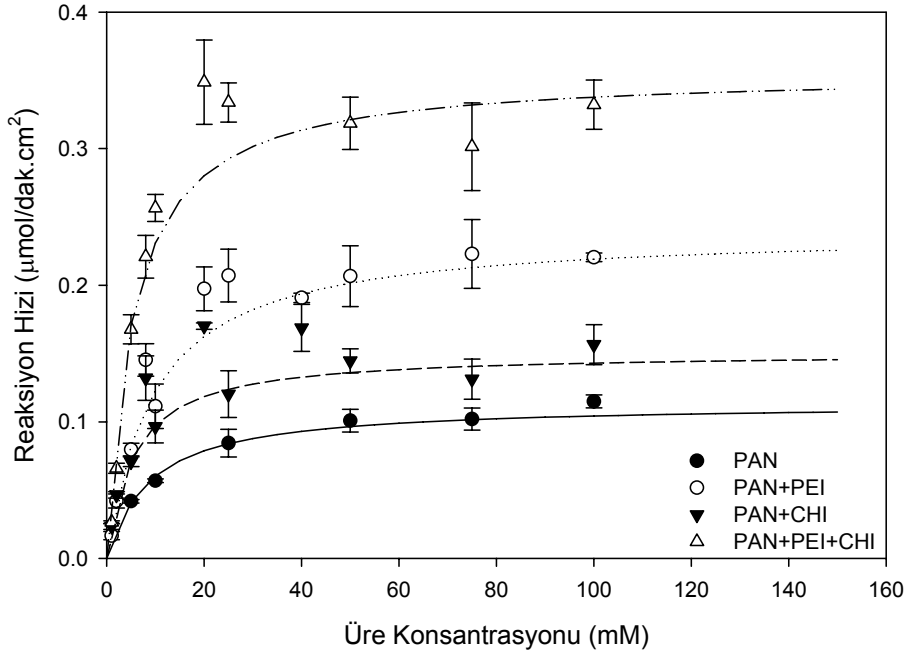


Şekil 5.6. PAN+CHI ve PAN+PEI+CHI membranlarında immobilize üreaz miktarının süreye göre değişimi.

membranlara tutunan üreaz miktarının zamana göre değişimi görülmektedir. Tablo 5.1’de her iki membrana da tutunan maksimum üreaz miktarı ve üreaz aktiviteleri verilmektedir. Kitosanla kaplama sonucu PAN membranına tutunan üreaz miktarında herhangi bir değişim olmazken, aktivitesinde 1.5 kat artış gözlenmiştir. Bu durum bir kez daha, üreaz üzerinde yeterli sayıda negatif ve pozitif yüklü grupların varlığını, dolayısıyla üreazın hem negatif, hem de pozitif yüklü membran yüzeylerine tutunabildiğini, ancak pozitif yüklü olan kitosan yüzeyi üzerine daha iyi bir pozisyonla tutunduğunu kanıtlamıştır. PAN+PEI membranının kitosanla kaplanması sonucu yüzeye tutunan üreaz miktarında 1.2 kat, enzim aktivitesinde ise 1.5 kat oranında artış kaydedilmiştir. Pozitif yüklü olan PAN+PEI membranının kitosan çözeltisine daldırılması sonucu, PEI polielektrolitinin bir kısmının kitosanla yer değiştirme olasılığı vardır. Bu değişimin gerçekleştiği kitosanla modifiye edilmiş PAN+PEI membranının üreaz adsorplama kapasitesindeki az miktarda artıştan anlaşılmaktadır. PAN+PEI+CHI membranının hem adsorpsiyon kapasitesindeki, hem de aktivitesindeki artış, membran yüzey alanının artması ve substratın enzimin aktif kısımlarına daha kolay ulaşabilmesi ile açıklanabilir.

### **5.3. Serbest ve immobilize üreazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi**

Serbest ve immobilize üreazın aktivitesi ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki denklem 4.9’da verilen Michealis Menten denklemi ile ifade edilmiştir. Bu denklemin tersi alınıp  $1/r$ ’ye karşı  $1/C_e$  grafiği çizdirilerek, elde edilen doğrunun y eksenini kestiği noktadan  $V_{max}$ , doğrunun eğiminden de  $K_m$  değeri elde edilmiş ve sonuçlar Tablo 5.2’de gösterilmiştir. Enzimin substrata karşı ilgisini (affinity) gösteren  $V_{max}/K_m$  oranının hem PAN, hem de PAN+PEI membranının kitosanla kaplanması sonucu arttığı gözlenmiştir. Şekil 5.7’de membranların deneysel olarak ölçülmüş reaksiyon hızlarının substrat konsantrasyonuna göre değişimi görülmektedir. Deneysel verilerle model tahminlerinin arasındaki farkın oldukça az olması, üreazın üreaz tarafından parçalanma kinetiğinin Michaelis Menten denklemi tarafından tanımlanabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.7. Üreaz immobilize edilmiş membranların reaksiyon hızlarının üre konsantrasyonuna göre değişimi.

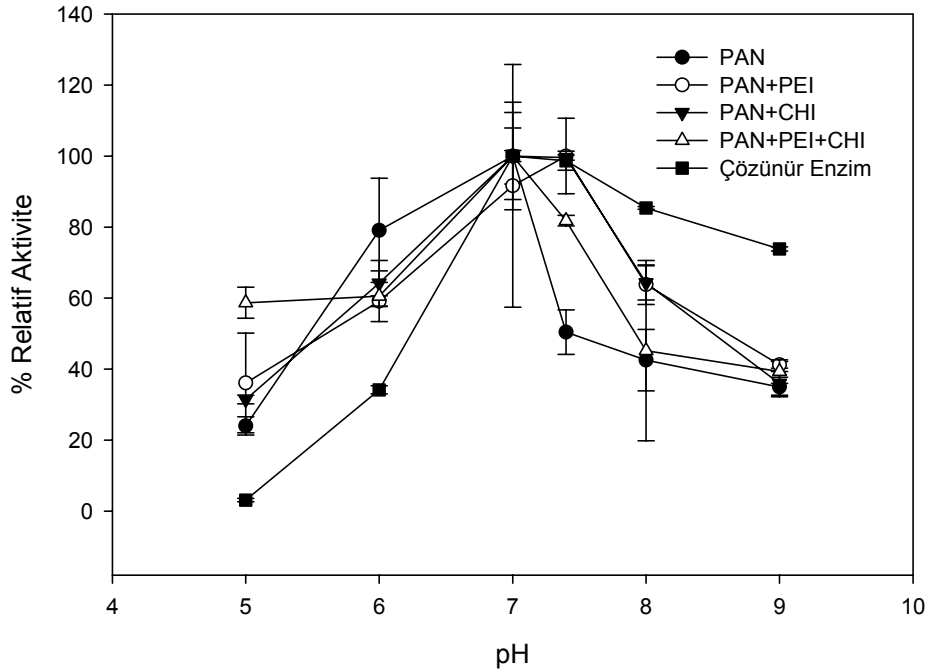
Şekil 5.7'deki sonuçlar ve Tablo 5.2'deki  $V_{max}$  değerleri dikkate alındığında membranların üreye karşı gösterdikleri katalitik aktiviteleri büyükten küçüğe doğru aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır. PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. Düşük üre konsantrasyonlarında membranların üreyi dönüştürme hızları birbirine yakın iken, daha yüksek konsantrasyonlarda PAN+PEI ve PAN+PEI+CHI membranlarının daha iyi bir katalitik performans sergilediği gözlenmiştir. Sonuçlar, PEI'in kitosana kıyasla PAN membranının katalitik aktivitesini artırmada daha etkin bir polielektrolit olduğunu göstermektedir. Bu durum, üreazın dallı yapıya sahip PEI üzerine lineer yapıya sahip kitosana göre daha iyi bir konformasyonla (aktif kısımları daha fazla oranda serbest kalacak şekilde) tutunduğuna işaret etmektedir. PAN+PEI membranının aktivitesinin ve  $V_{max}$  değerinin kitosana kaplanması sonucu artması, bu membrana kitosan tutunduğunu bir kez daha kanıtlamaktadır.

Tablo 5.2. Farklı membranlar üzerine immobilize edilmiş üreazın kinetik parametreleri

Kinetik parametre	PAN	PAN+PEI	PAN+CHI	PAN+PEI+CHI
$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dak.cm}^2$ )	0.1135	0.2399	0.1507	0.3559
$K_m$ ( $\mu\text{mol/ml}$ )	8.8051	9.5135	5.4368	5.4127
$V_{max}/K_m$ (1/dak)	0.0129	0.0252	0.0277	0.0658

#### 5.4. Serbest ve immobilize üreazın optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Şekil 5.8’de verilen pH-aktivite profilleri, üreaz enziminin immobilize edilmesi sonucu katalitik performansının asidik ile nötral bölge arasında arttığını göstermektedir. PAN+PEI+CHI membranı üzerine immobilize edilen üreazın diğer membranlara kıyasla pH 5 ile 7 arasında optimum aktivitesinin 60%’ını koruyabildiği görülmektedir.

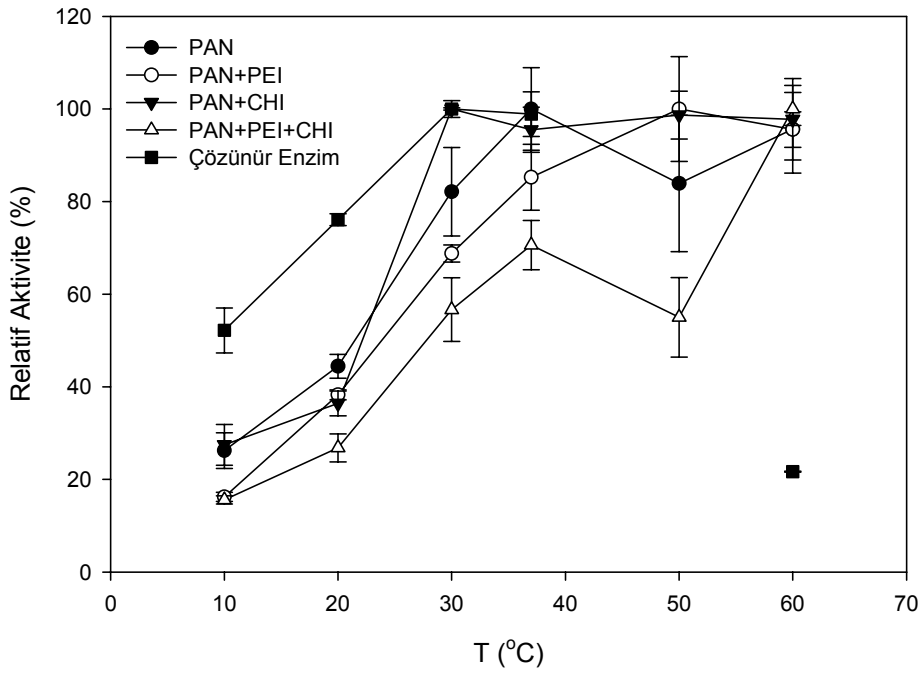


Şekil 5.8. Serbest ve immobilize edilmiş üreaz aktivitesinin pH'ya göre değişimi.



pH 6 değerinde PAN üzerine immobilize edilen üreazın performansı daha iyi olmakla birlikte, pH 5 ile 7 aralığında bu membran ve diğer iki membran (PAN+CHI, PAN+PEI) üzerine immobilize edilen üreazın performansları arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. pH'ın 7'den büyük olduğu bölgede en iyi katalitik performansı çözüner enzim göstermiştir. Bu bölgede PAN+PEI ve PAN+CHI ile PAN ve PAN+PEI+CHI membranlarının % aktiviteleri benzerdir. PAN+PEI membranının optimum pH değeri 7.4 olarak belirlenirken , çözüner üreaz, PAN, PAN+CHI ve PAN+PEI+CHI membranlarının optimum pH değerleri 7 olarak bulunmuştur.

Şekil 5.9'da enzimin sıcaklığa göre aktivitesindeki değişim görölmektedir. Sonuçlar, 30 °C'nin altında enzimin immobilize edilmesi sonucu aktivitesinde çözüner enzime göre azalma olduğunu göstermektedir. Ancak, 60 °C'de serbest enzim optimum aktivitesinin 20%'sine düşerken, dört



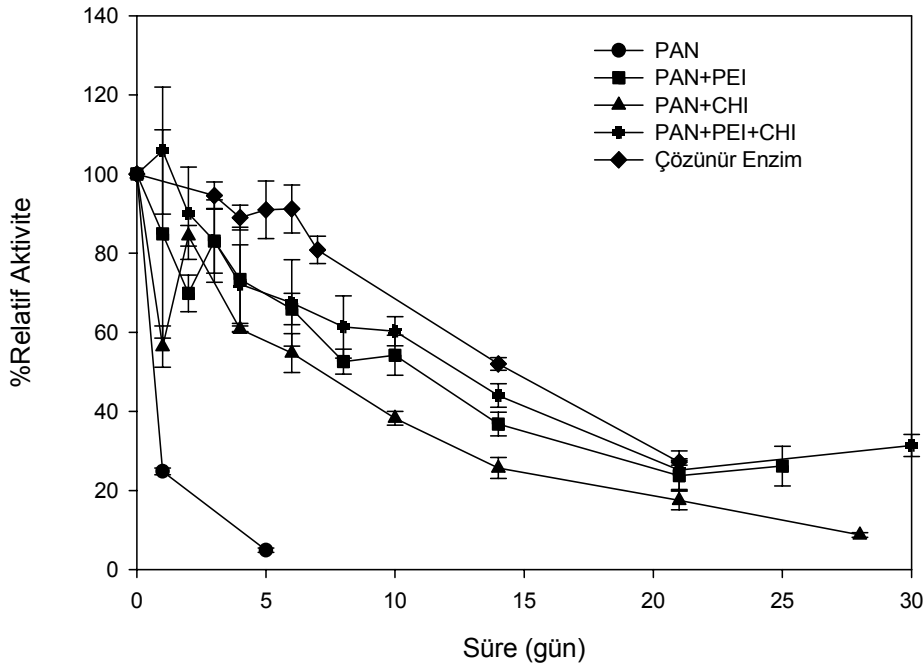
Şekil 5.9. Serbest ve immobilize edilmiş üreaz aktivitelerinin sıcaklığa göre değişimi.

membran üzerine de immobilize edilen enzim optimum aktivitesinin 95%'ini koruyabilmektedir. Sonuçlar, 30 °C'nin üstünde enzimin immobilize edilmesi sonucu sıcaklığa karşı daha dirençli hale geldiğini göstermektedir. Çözüner üreazın ve PAN+CHI üzerine immobilize edilmiş üreazın optimum sıcaklıkları 30 °C, PAN membranına immobilize edilmiş üreazınki 37 °C,

PAN+PEI ve PAN+PEI+CHI'na immobilize edilmiş üreazın optimum sıcaklıkları ise 50 ve 60 °C olarak belirlenmiştir.

### 5.5. İmmobilize üreazın depolama stabilitesinin belirlenmesi

Çözünür enzim ve farklı membranlara immobilize edilmiş üreazın 4 °C'de deiyonize suda depolanması esnasında, zamanla aktivitesindeki değişim Şekil 5.10'da verilmektedir. PAN membranı üzerine immobilize edilmiş üreazın başlangıçtaki aktivitesinin 75 %'ini ilk günün %95'ini ise 5. günün sonunda kaybetmesi enzimin bu membran üzerinde stabil bir konfigürasyonda yerleşmediğini göstermektedir. Buna karşın, PAN+CHI üzerine immobilize



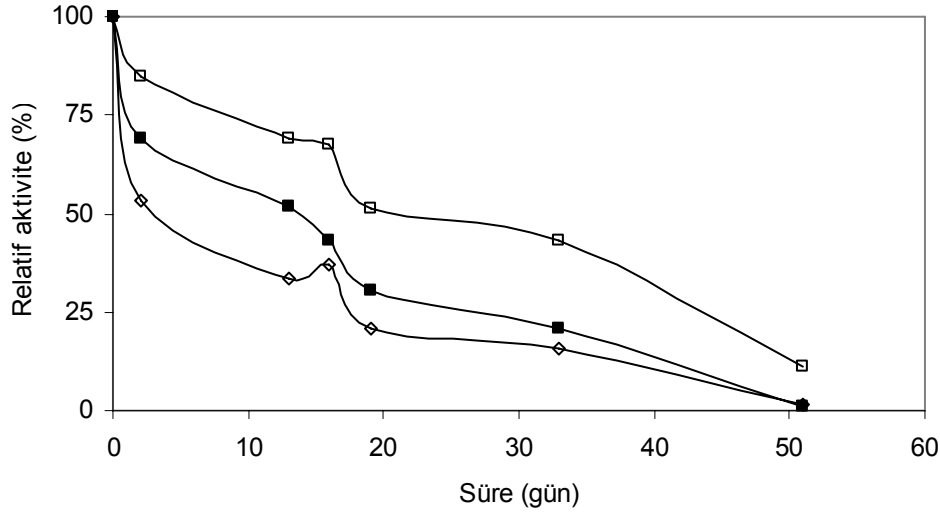
Şekil 5.10. Üreaz immobilize edilmiş membranların depolama stabiliteleri

edilmiş üreaz 6 günün sonunda aktivitesinin 50%'sini koruyabilmiştir. Bu sonuç, PAN membranının kitosana modifiye edilmesinin üreazın stabilitesini artırmada etkin olduğunu vurgulamaktadır. PAN+PEI ve PAN+PEI+CHI üzerine immobilize edilmiş üreazın stabilitesi depolama süresince benzer bir davranış sergilemiştir. Bu membranlara immobilize edilmiş üreazın aktivitesi 10 günün sonunda 50 % oranında azalmıştır. PAN membranının modifikasyonu için, PEI'in kitosana kıyasla üreazın depolama esnasındaki aktivitesini koruyabilmesi açısından

daha etkin bir polielektrolit olduğu gör÷lmektedir. Şekil 5.10'da gör÷len ilginç bir sonuç, ilk iki hafta içinde çözüner enzimın başlangıç aktivitesini immobilize üreaza göre daha fazla oranda korumasıdır. Ancak, 21 günün sonunda aktivitesi PAN+PEI, PAN+CHI ve PAN+PEI+CHI üzerine immobilize edilmiş üreaz ile aynı seviyelere düşmüştür.

## **5.6. İmmobilize üreazın operasyonel stabilitesinin belirlenmesi**

Operasyonel stabilite tanımı literatürde pek yaygın olarak kullanılmayan bir tanım olup, bu çalışmada enzimin immobilize formda depolanması sırasında farklı zamanlarda birçok kez aktivitesinin ölçülmesi deneyinin tanımlanması amacıyla kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde depolama stabilitesinin aksine hep aynı membran tekrar tekrar kullanıldığı için bu tür bir deney üretilmiş olan bir membranın depolanarak yeniden kullanılabilme yeteneğini göstermektedir. Bir enzimin bu tür bir deney sonunda aktivitesini az kaybetmesi veya kaybetmemesi onun kendi stabilitesi, membrana immobilize olma derecesi ve yerleşim şekliyle ilişkilidir. Operasyonel stabilite çalışmasının gerçekleştirilebilmesi amacıyla her filmde iki adet hazırlanmış ve 4 °C'deki destile su içerisinde depolanarak belirli zamanlarda filmlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Aktivitenin her belirlenmesinden sonra filmler üzerlerindeki substrat ve ürün kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla 10 ml destile suyla yıkanmış ve depolama deneyine devam edilmiştir. Depolamada kullanılan destile suyun zaman içerisinde filmde geçecek aktivite ölçümünden kalan kalıntılarla kirlenmesini önlemek amacıyla her aktivite ölçümünden sonra ayrıca depolama suyu da yenilenmiştir. Şekil 5.11'den de gör÷ldüğü üzere PAN+PEI+CHI filmler en yüksek operasyonel stabiliteyi göstermektedir. Buna göre kitosanla kaplanmış PAN+PEI membranlara immobilizasyon gerçekleştirme depolama stabilitesini kısmen azaltsa da (Şekil 5.10) kullanım açısından büyük önem taşıyan operasyonel stabiliteyi artırmaktadır. Diğer yandan PAN membran ve PAN+PEI membranların 5 kez kullanıldıktan sonra 20 günün üzerinde depolanması sonucunda aktivitede kayda değer bir kayba uğradığı da gör÷lmektedir. PAN+PEI+CHI membranlarda ise ciddi aktivite kayıpları 6. kullanımdan sonra ve 30 günün üzerindeki depolamalarda gör÷lmektedir.



Şekil 5.11. Üreaz immobilize edilmiş membranların operasyonel stabiliteleeri; (◇) PAN+CHI; (■) PAN+PEI; (□) PAN+PEI+CHI.

## 5.7. Filtrasyon deneyleri

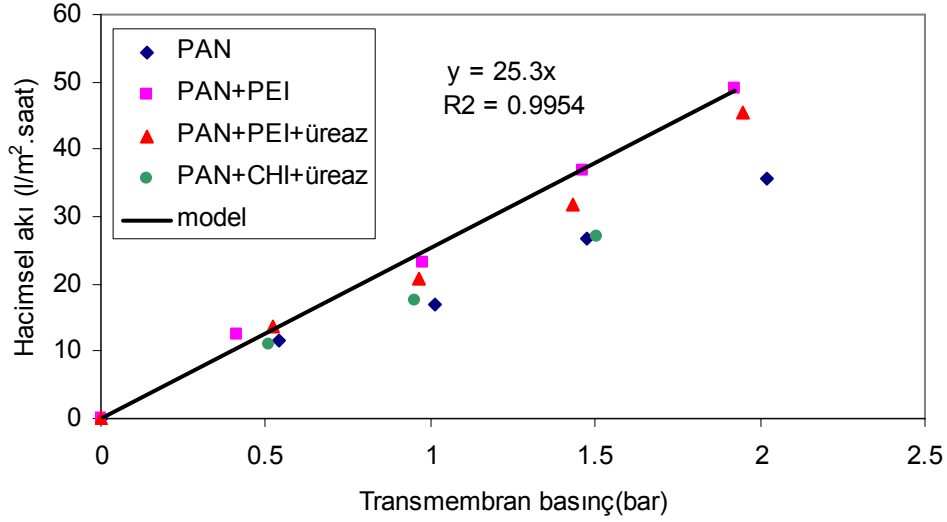
Ultrafiltrasyon deneyleri öncelikle çözücü olarak su kullanılarak, ardından Na-fosfat tamponu kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir.

### 5.7.1. Su geçirgenliği çalışmaları

Ultrafiltrasyon deneyleri öncesi membranlar iki kez yüksek basınca maruz bırakılmış, her iki deneyden elde edilen akı (flux) değerlerinin birbirine eşit veya çok yakın olduğu koşulda membranın kararlı hale geldiğine karar verilip deneylere başlanmıştır. Her bir geçiş deneyi 5 gram çözelti toplanıncaya kadar sürdürülmüştür. Zamana karşı çözeltinin hacmindeki değişim grafiğinin eğiminden hacimsel debi hesaplanmıştır. Membrandan geçen çözeltinin hacimsel akısı ( $J_v$ ) ile membran boyunca uygulanan basınç farkı ( $\Delta P$ ) arasındaki ilişki aşağıdaki matematiksel ifade ile tanımlanmıştır.

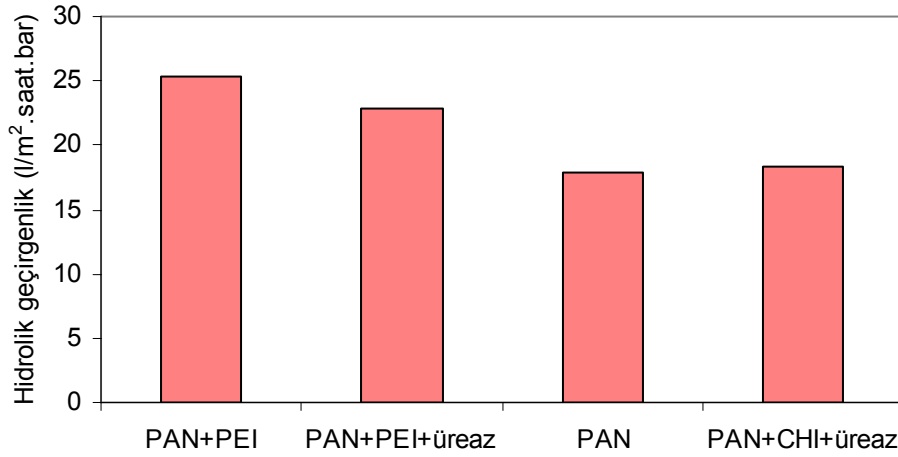
$$J_v = L_p \Delta P \quad (5.1)$$

Bu ifade de geçen  $L_p$  membranın hidrolik geçirgenliğini ifade etmektedir. Geçirgenlik deneylerinde immobilizasyon deneyleri sonucuna göre aktivitesi yüksek olan ve bu aktiviteyi uzun süre koruyabilen membranlar kullanılmıştır. Şekil 5.12'de membranların hacimsel akılarının transmembran basıncına göre değişimi görülmektedir.



Şekil 5.12. Üreaz immobilize edilmiş ve edilmemiş membranlardan birim zamanda geçen su miktarının basınca göre değişimi

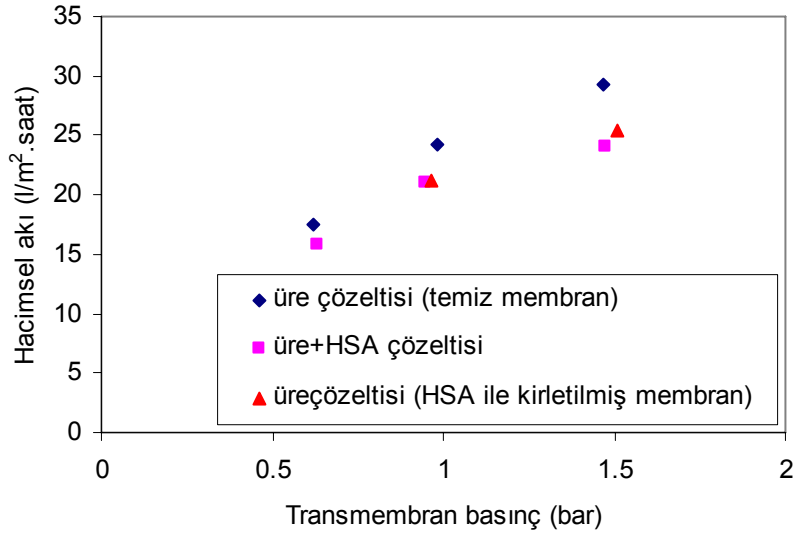
Her bir deneysel data lineer bir doğru ile modellenmiş ve 5.1 numaralı denklem kullanılarak bu doğruların eğiminden membranların hidrolik geçirgenlikleri hesaplanmıştır ve bu değerler Şekil 5.13'de verilmektedir. Membranların su geçirgenliği büyükten küçüğe doğru aşağıdaki şekilde bulunmuştur: PAN+PEI > PAN+PEI+üreaz > PAN+CHI+üreaz > PAN. PAN+PEI membranının su geçirgenliği üreaz immobilizasyonu sonucu azalmıştır. Bunun sebebi membran yüzeyinde oluşan ince enzim tabakasının su akışına karşı gösterdiği dirençtir. PAN membranının su geçirgenliği PAN+PEI membranına göre daha düşüktür. PAN membranın hidrofobik yapısı su geçişi esnasında yüzey gerilmesinden dolayı su geçişini kısıtlar ve geçişin yavaşlamasına neden olur.



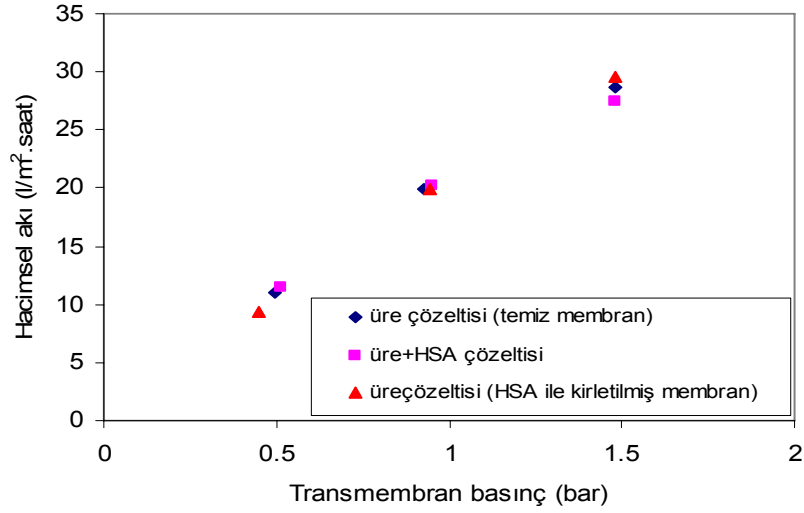
Şekil 5.13. Ürez immobilize edilmiş ve edilmemiş membranların hidrolik geçirgenlikleri

### 5.7.2. Membran kirliliği çalışmaları

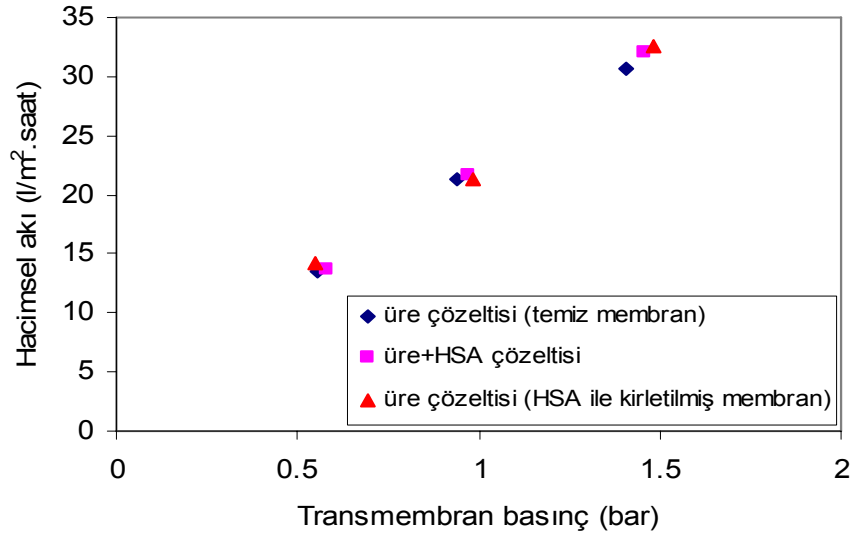
Enzim immobilizasyonunun membranın protein ile kirlenme düzeyi üzerine olan etkisini incelemek amacı ile aynı membran kullanılarak ard arda üç geçiş deneyi yapılmıştır. 1) Besleme çözeltisi:Üre 2) Besleme çözeltisi:Üre+BSA 3) Besleme çözeltisi:Üre. Şekil 5.14 PAN membranı kullanılarak elde edilen deney sonuçlarını göstermektedir. Şekilden de görüldüğü gibi üre çözeltisinin temiz PAN membranından geçen hacimsel akısı transmembran basıncı arttıkça doğrusal bir şekilde artmaktadır. Ancak BSA içeren üre çözeltisinin ve BSA ile kirlenmiş membrandan geçen üre çözeltisinin hacimsel akılarının transmembran basıncı ile artışı doğrusallıktan sapmaktadır. Bu durum BSA'ya maruz kalan PAN membranının kirlendiğini göstermektedir. Literatürde yer alan pek çok çalışma hidrofobik membranlardaki protein kirlilik düzeyinin hidrofilik membranlara göre daha fazla olduğunu göstermektedir (SUN ve ark., 2003). Şekil 5.15 ve 5.16, PAN membranının PEI ve kitosan gibi katyonik polimerlerle modifiye edilmesi, ardından ürez ile immobilize edilmesi sonucu, bu membranlardan geçen hacimsel akıda BSA'dan kaynaklanan bir azalma olmadığını göstermektedir. Ürez enziminin izoelektrik noktası 5'tir ve pH 7.4'de eksi yüke sahiptir. Aynı yüke sahip BSA molekülleri ürez immobilizasyonu sayesinde negatif yüke sahip olan membran yüzeyine elektrostatik itim gücü nedeniyle yaklaşamamakta, böylece membranın BSA adsorplama kapasitesi azalmaktadır.



Şekil 5.14. Üre çözeltisinin ve üre+BSA çözeltisinin temiz ve kirli PAN membranından akış hızlarının basınca göre değişimi



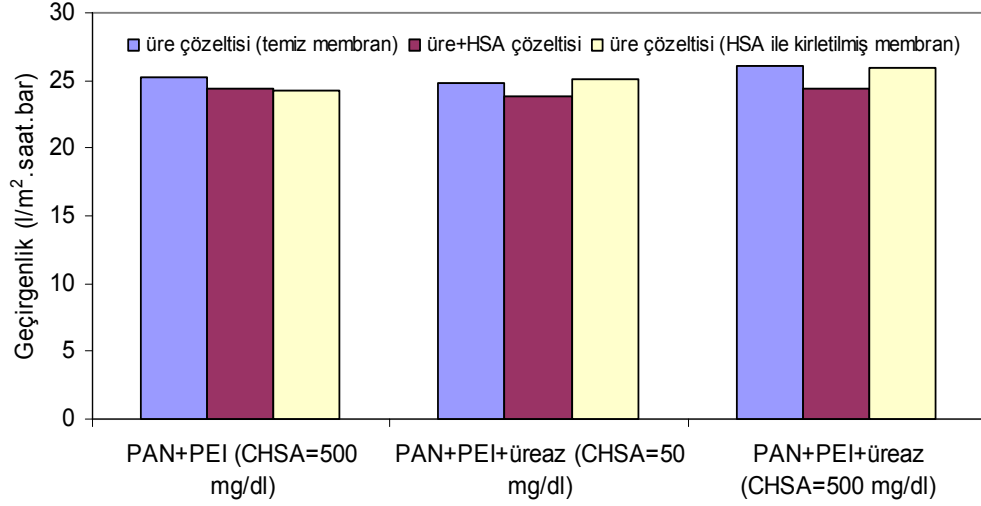
Şekil 5.15. Üre ve üre+BSA çözeltilerinin temiz ve kirli PAN+PEI+ürezaz membranından akış hızlarının basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl'dir.



Şekil 5.16. Üre ve üre+BSA çözeltilerinin temiz ve kirli PAN+CHI+ürez membranından akış hızlarının basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl'dir.

Bunun sonucu ard arda kullanılan membranın filtrasyon performansında kirliliğe bağlı bir değişme olmamaktadır. Protein konsantrasyonunun membranların performansına olan etkisini incelemek amacıyla besleme çözeltisindeki BSA konsantrasyonu 50 mg/dl'den 500 mg/dl'ye çıkarılmıştır. Şekil 5.17'de ürez immobilize edilmiş ve edilmemiş PAN+PEI membranlarının 0.5 bar transmembran basıncında farklı BSA konsantrasyonlarındaki üre çözeltilerine karşı gösterdiği hidrolik geçirgenlikleri kıyaslanmaktadır.





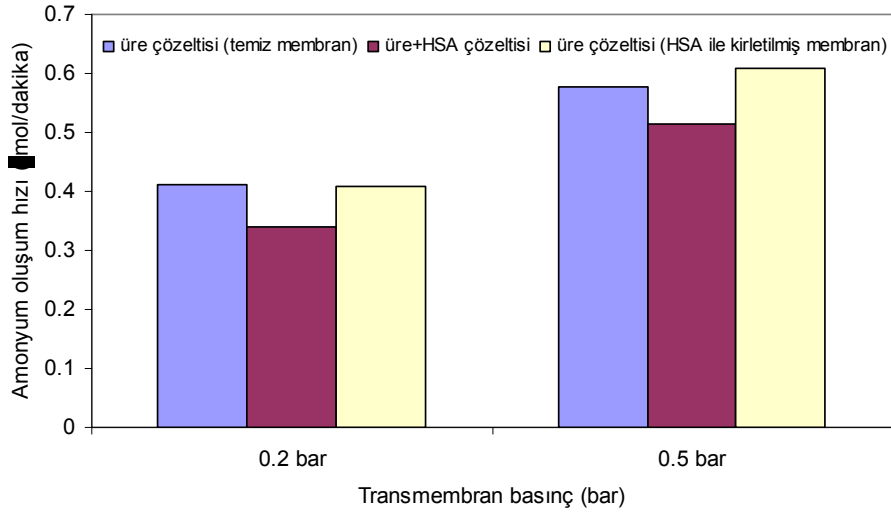
Şekil 5.17. Temiz ve kirletilmiş membranların üre çözeltisine karşı gösterdikleri hidrolik geçirgenliklerinin karşılaştırılması

Sonuçlar membranların üre çözeltisi geçirgenliklerinin besleme çözeltine BSA ilave edilmesi sonucu azaldığını göstermektedir. Ancak BSA'ya maruz kalan ürez immobilize edilmiş membranlar tekrar kullanıldığında üre geçirgenlikleri temiz membranlarınkine ile aynı düzeyde kalmaktadır. Bu sonuç, ürez immobilize edilmiş membran yüzeylerine BSA'nın çok daha zayıf kuvvetlerle tutunduğunu ve kolaylıkla membran yüzeyinden uzaklaşarak kalıcı bir kirliliğe yol açmadığını göstermektedir. Ürez immobilize edilmiş membranlarda oluşan kirliliğin besleme çözeltisindeki BSA konsantrasyonu 10 kat artırıldığında bile kalıcı olmadığı, temiz ve iki kez kullanılmış membranların geçirgenliklerinin aynı seviyede kalmasından net olarak anlaşılmaktadır.

### 5.7.3. Katalitik aktivite çalışmaları

Filtrasyon deneylerinde kullanılan ürez immobilize edilmiş PAN+PEI membranının deney sonunda aktivitesi  $0.0803 \mu\text{mole/cm}^2.\text{dakika}$ , deneyde kullanılmamış orijinal PAN+PEI membranının ürez aktivitesi ise  $0.0805 \mu\text{mole/cm}^2.\text{dakika}$  olarak ölçülmüştür. Filtrasyon deneyi sonunda besleme çözeltisi ve membrandan geçerek toplanan çözelti içerisinde oluşan toplam amonyum miktarı belirlenmiş ve bu değerler Şekil 5.18'de verilmiştir. Özellikle düşük

basınlarda (0.2 bar) PAN+PEI membranı uzun süreli üre ve BSA çözeltilerine maruz bırakılmış fakat Şekil 5.18'den de gözükeceği gibi bu durum membranın aktivitesini etkilememiştir. 0.2 barda yapılan filtrasyon deneyinde üre geçişi 2 saat sürmüştür, aynı membran 2 saat boyunca üre+BSA ve sonra yine 2 saat daha üre çözeltilisine maruz kalmıştır. 6 saat sonunda membran aktivitesinde bir değişiklik olmamıştır. 0.5 barda yapılan deneylerde de ard arda üç kez kullanılan membranın katalitik aktivitesinde bir değişim olmamıştır. Bu sonuç, üreaz enziminin ultrafiltrasyon koşullarında aktivitesini koruyabildiğini göstermiştir. Şekil 5.18'den transmembran basıncı arttığında membranın amonyum oluşturma hızının da arttığı görülmektedir.



Şekil 5.18. Temiz ve kirletilmiş PAN+PEI+üreaz membranının katalitik aktivitesinin basınca göre değişimi. BSA konsantrasyonu 500 mg/dl'dir.

PAN+PEI membranının aksine, Tablo 5.3'de verilen sonuçlar üre çözeltisi içerisinde bulunan BSA'nın PAN+CHI membranının katalitik aktivitesini azalttığını göstermektedir.

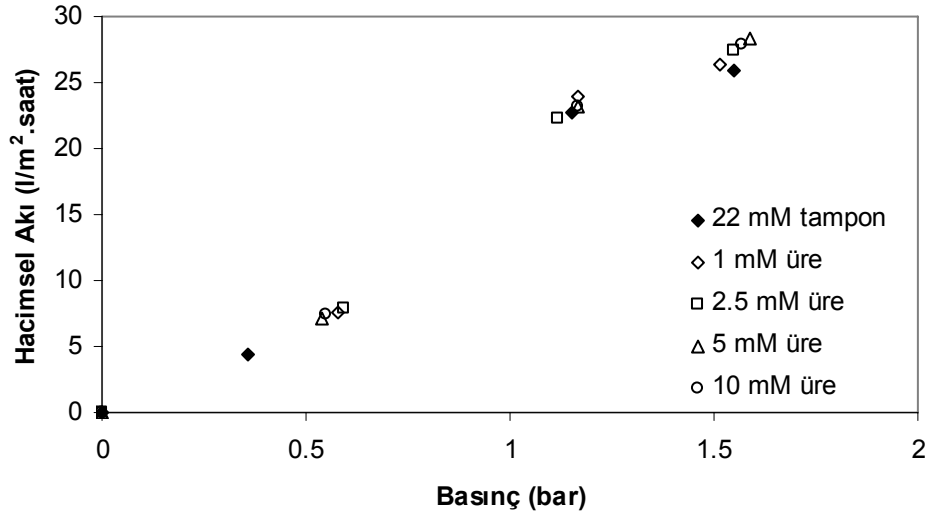
Tablo 5.3. Basıncın temiz ve kirli PAN+CHI membranının katalitik performansı üzerine olan etkisi. BSA konsantrasyonu 50 mg/dl'dir.

Besleme çözeltisi	Amonyum oluşum hızı (μmol/dakika )	Transmembran basıncı (bar)
Üre çözeltisi (Temiz membran)	0.147	0.5
Üre+BSA çözeltisi	0.119	0.5
Üre çözeltisi (Temiz membran)	0.173	1
Üre+BSA çözeltisi	0.12	1

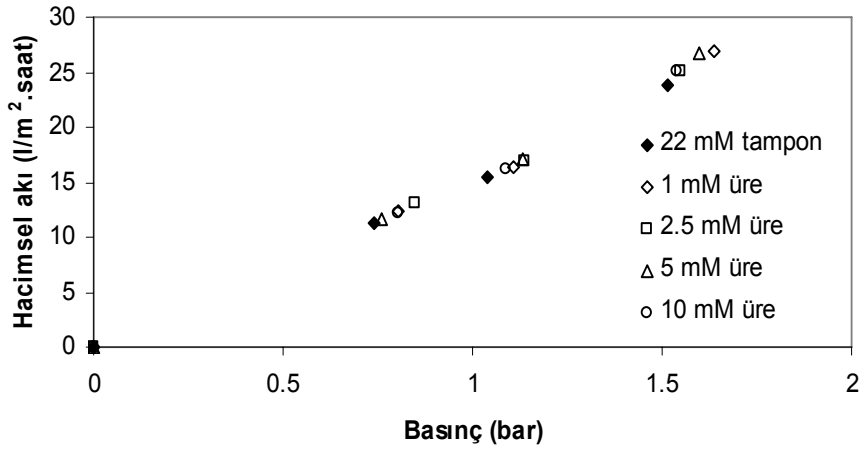
Bu sonucun proteinin membran yüzeyine tutunmuş olan üreaz enziminin aktif kısımlarını bloke etmiş olmasından yada enzimin konformasyon değiştirmiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Membran boyunca uygulanan transmembran basıncının artması membranların katalitik aktivitelerinin artmasına neden olmuştur. Bu artışın basınç altında enzimin konformasyon değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### 5.7.4. Na-Fosfat tamponu ile yapılan filtrasyon çalışmaları

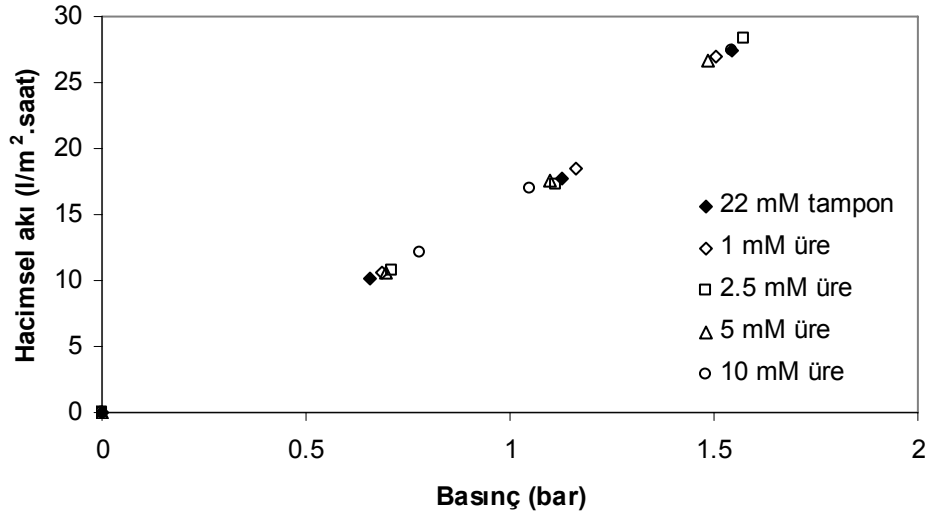
Şekil 5.19'dan 5.23'e kadar PAN, PAN+CHI, PAN+PEI, PAN+CHI+üreaz ve PAN+PEI+üreaz membranlarından geçen üre çözeltisinin hacimsel akılarının membran boyunca uygulanan transmembran basıncına göre olan değişimi görülmektedir. Sonuçlar, besleme çözeltisi içindeki üre miktarının membranın geçirgenliğini etkilemediğini, hacimsel akı ile basınç arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermektedir. Şekil 5.24'de denklem 5.1'den hesaplanan, membranların üre çözeltisi geçirgenlik değerlerinin üre konsantrasyonuna göre olan değişimi görülmektedir.



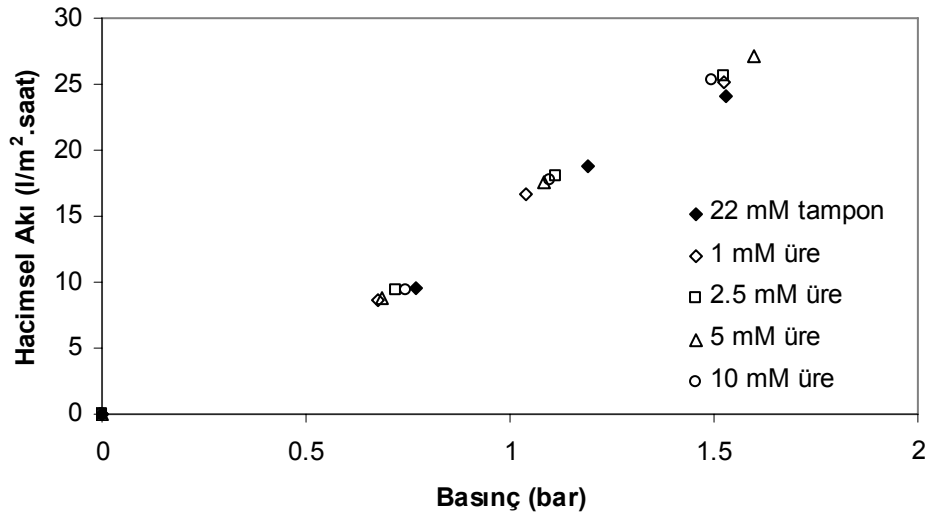
Şekil 5.19. Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltisinin PAN membranından akış hızının basınca göre değişimi



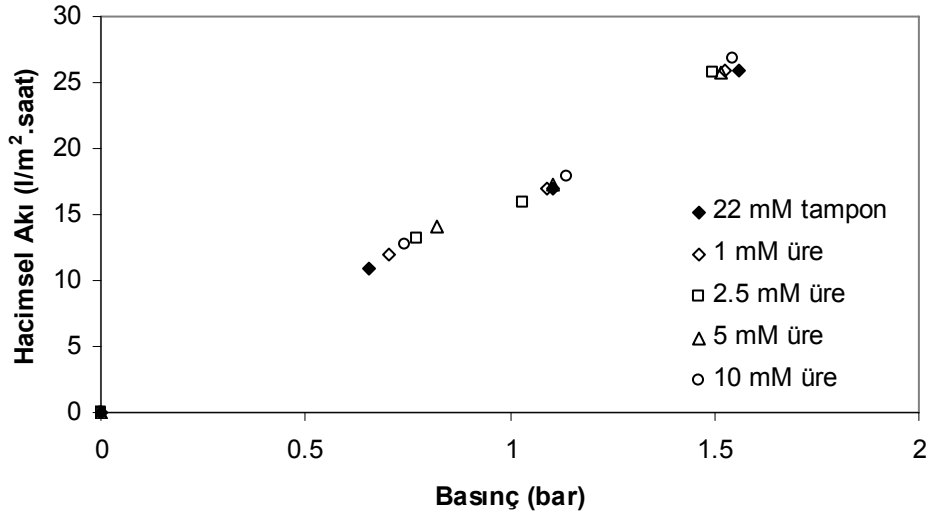
Şekil 5.20. Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltisinin PAN+CHI membranından akış hızının basınca göre değişimi



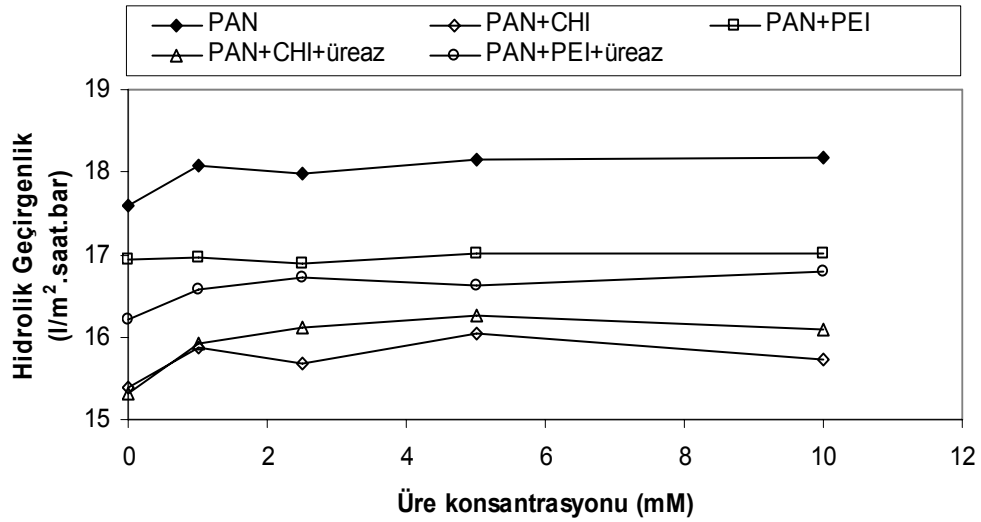
Şekil 5.21. Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltisinin PAN+PEI membranından akış hızının basınca göre değişimi



Şekil 5.22. Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltisinin PAN+CHI+ürez membranından akış hızının basınca göre değişimi



Şekil 5.23. Na-fosfat tamponu içindeki çözünen üre çözeltisinin PAN+PEI+ürez membranından akış hızının basınca göre değişimi



Şekil 5.24. Membranların üre çözeltisine karşı gösterdikleri hidrolik geçirgenliklerinin üre konsantrasyonuna göre değişimi

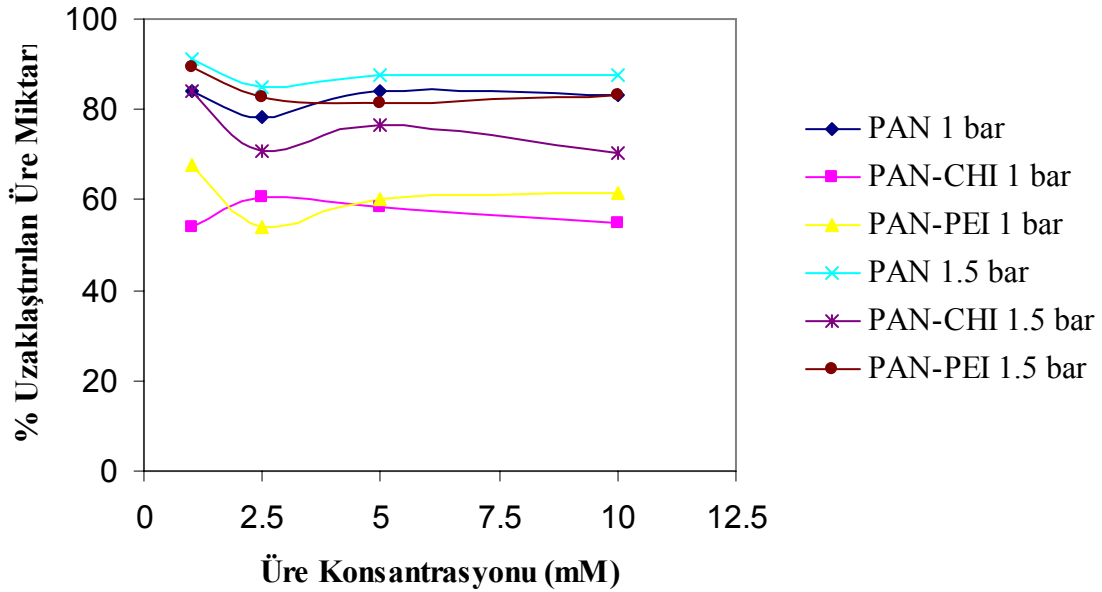
PAN+PEI ve PAN+CHI membranlarına ürez immobilize edilmesi sonucu geçirgenlik değerlerinde önemli bir değişim olmamıştır. PAN membranının geçirgenliği diğerlerine kıyasla

daha yüksek görünmekle birlikte, sonuç tekrarlamayı gerektirmektedir. Tekrar deneyi hem PAN membranının kararlı hale gelmesi için bekleme süresini artırmak , böylece yüksek basınç altında aynı geçirgenlik değerlerini elde etmek, hem de hacimsel akı ile basınç arasındaki lineeriteyi artırmak için gereklidir.

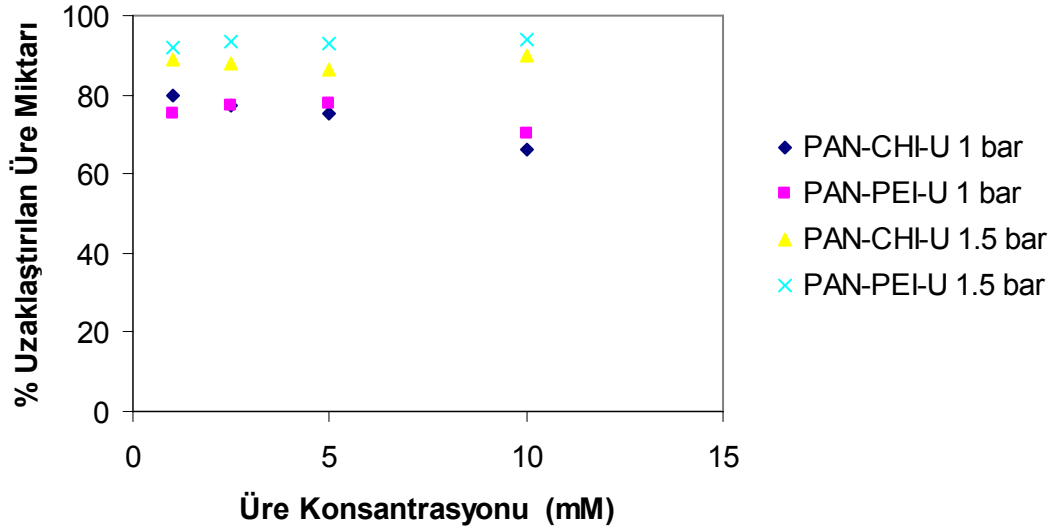
Ultrafiltrasyon işleminin sonunda besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\% \text{ uzaklaştırılan üre miktarı} = \frac{C_f V_f - C_r V_r}{C_f V_f} \times 100 \quad (5.2)$$

Bu denklemde  $C_f$ ,  $C_r$ ,  $V_f$  ve  $V_r$  ultrafiltrasyon işleminin başında ve sonundaki üre konsantrasyonunu ve çözelti hacimlerini ifade etmektedir. Şekil 5.25a ve 5.25b’de üreaz immobilize edilmemiş ve edilmiş membranların 1 ve 1.5 bar basınç altında 1 saatin sonunda uzaklaştırdıkları toplam üre miktarının değişimi görülmektedir.



Şekil 5.25a. PAN, PAN+PEI ve PAN+CHI membranlarının 1 saatin sonunda uzaklaştırdıkları toplam üre miktarı.



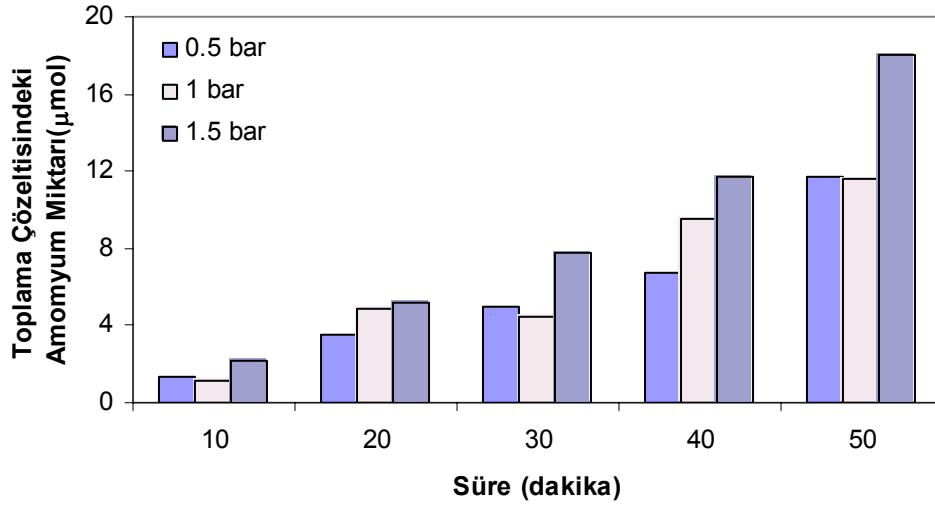
Şekil 5.25b. Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI ve PAN+CHI membranlarının 1 saatin sonunda uzaklaştırdıkları toplam üre miktarı.

Üreaz immobilize edilmemiş membranlar arasında en iyi performansı PAN membranı gösterirken ardından PAN+PEI ve PAN+CHI membranları gelmektedir. Şekil 5.25b'den üreaz immobilize edilmiş membranlar arasında, PAN+PEI membranının üre uzaklaştırmadaki etkinliğinin PAN+CHI membranına göre özellikle 1.5 bar basınç altında daha iyi olduğu görülmektedir. Üreaz immobilizasyonu sonucu her iki membranın da üre uzaklaştırma etkinlikleri 1 bar basınç altında daha fazla oranda artmaktadır. Bunun yanı sıra, her iki basınç seviyesinde de PAN+CHI membranının üreyi uzaklaştırmadaki etkinliği PAN+PEI membranına göre daha fazla oranda artış göstermiştir.

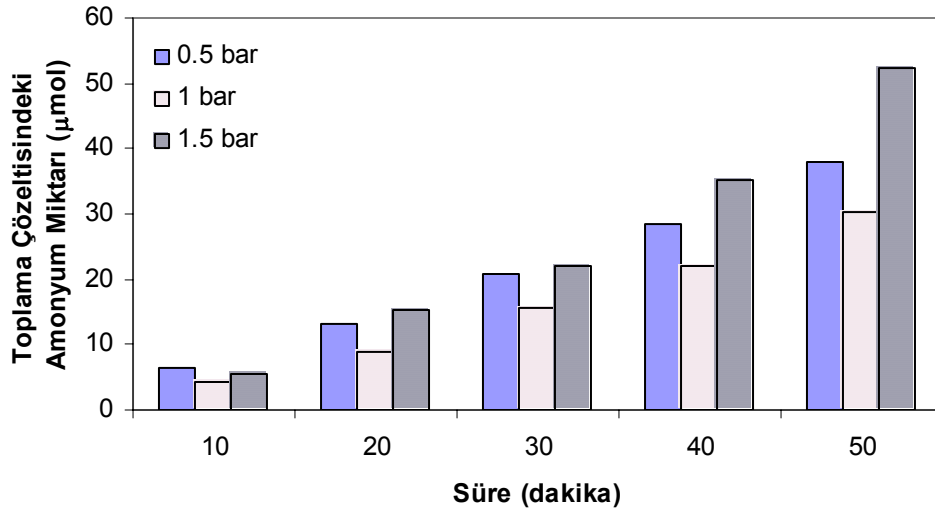
Şekil 5.26'dan 5.29'a kadar üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranı kullandığında toplama çözeltisi içinde ölçülen amonyum miktarının zamana göre değişimi verilmektedir. Her basınç seviyesinde oluşan amonyum miktarının zamanla yaklaşık lineer oranda arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, PAN+PEI membranının katalitik aktivitesinde önemli oranda azalma olmadığını göstermektedir. Tüm üre konsantrasyon seviyelerinde membranın 1.5 bar basınçtaki katalitik etkinliği 0.5 bara göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte 2.5 mM ve 5mM üre konsantrasyonlarında membranın 1 bardaki katalitik aktivitesi 0.5 bara göre daha düşük



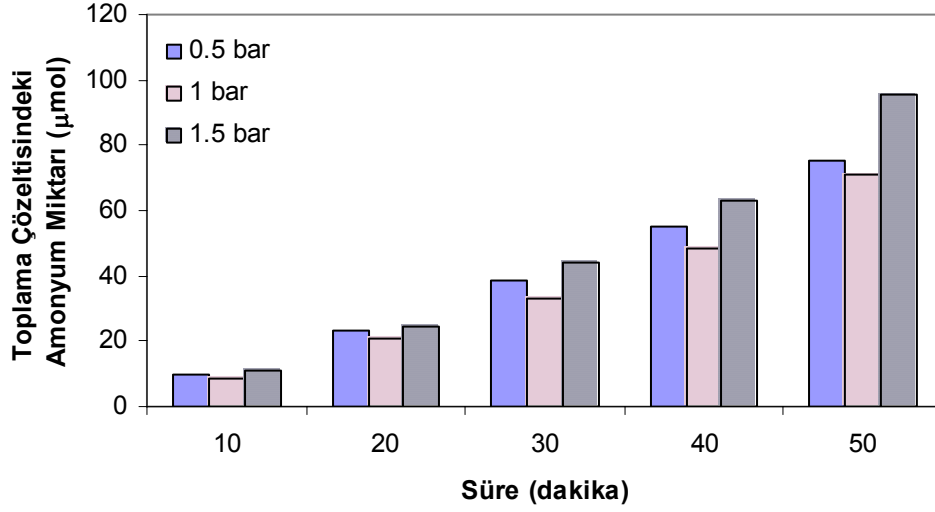
olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, enzimin kinetik parametrelerinin konformasyonundaki değişimden dolayı basınçtan etkilendiğini göstermektedir.



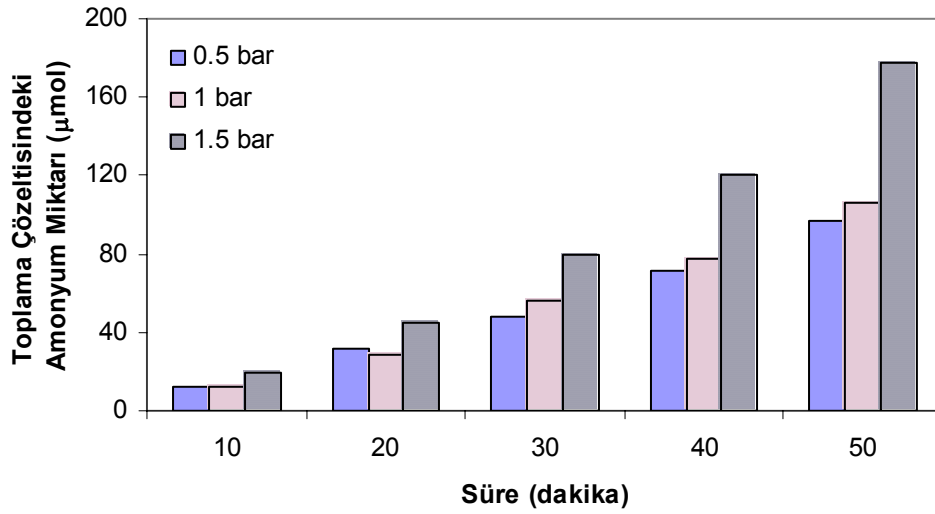
Şekil 5.26. Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 1 mM'dır.



Şekil 5.27. Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 2.5 mM'dır.

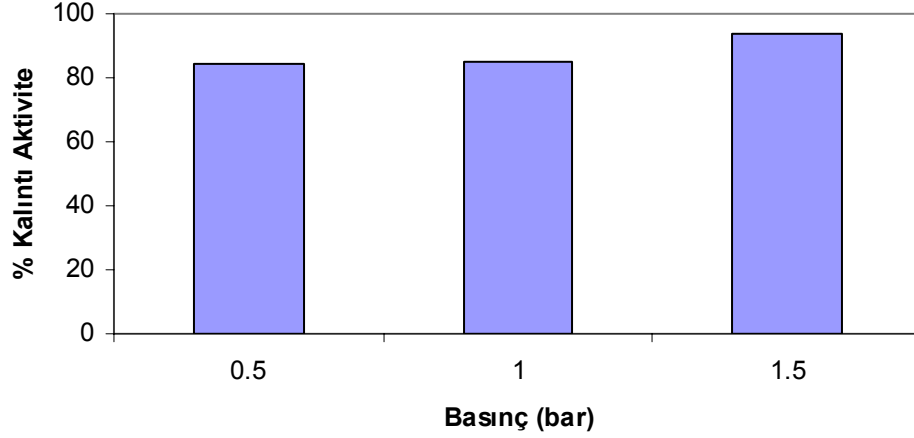


Şekil 5.28. Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltilinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltilisindeki üre konsantrasyonu 5 mM'dır.



Şekil 5.29. Üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltilinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltilisindeki üre konsantrasyonu 10 mM'dır.

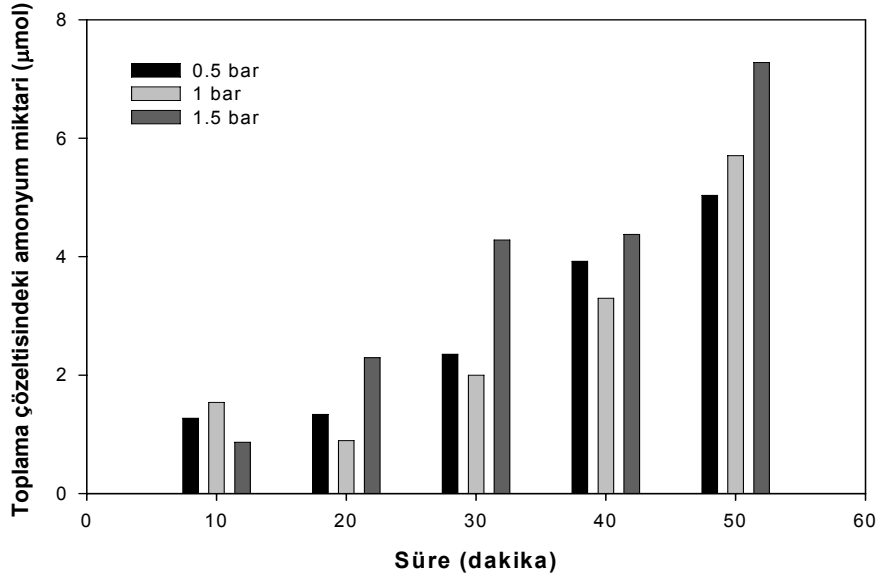
Şekil 5.30'da PAN+PEI+ürezaz membranlarının ultrafiltrasyon işleminin sonunda ölçülen % kalıntı (immobilize) aktiviteleri görülmektedir. En yüksek kalıntı aktivite 1.5 bar basınç altında



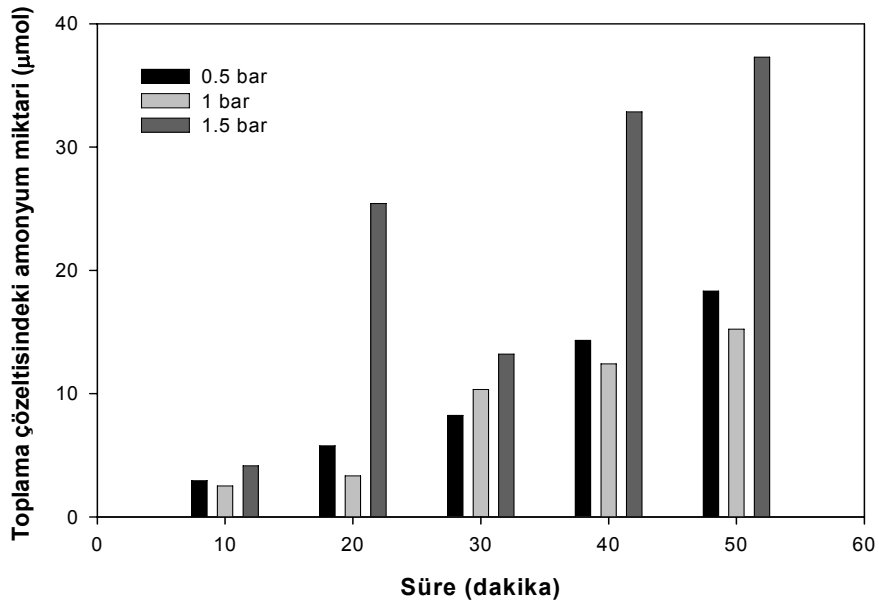
Şekil 5.30. PAN+PEI membranlarının ultrafiltrasyon işleminin sonunda ölçülen kalıntı aktivitelerinin basınca göre değişimi

kullanılan membranda ölçülmüştür. Bu sonuç, basıncın 0.5 bardan 1.5 bara artmasıyla enzimin konformasyonunu, dolayısıyla aktivitesini daha iyi koruyabildiğini göstermektedir. Aynı zamanda, 1.5 barda ölçülen amonyum seviyelerinin 0.5 ve 1 barda ölçülen değerlere göre neden daha yüksek olduğunu da açıklamaktadır.

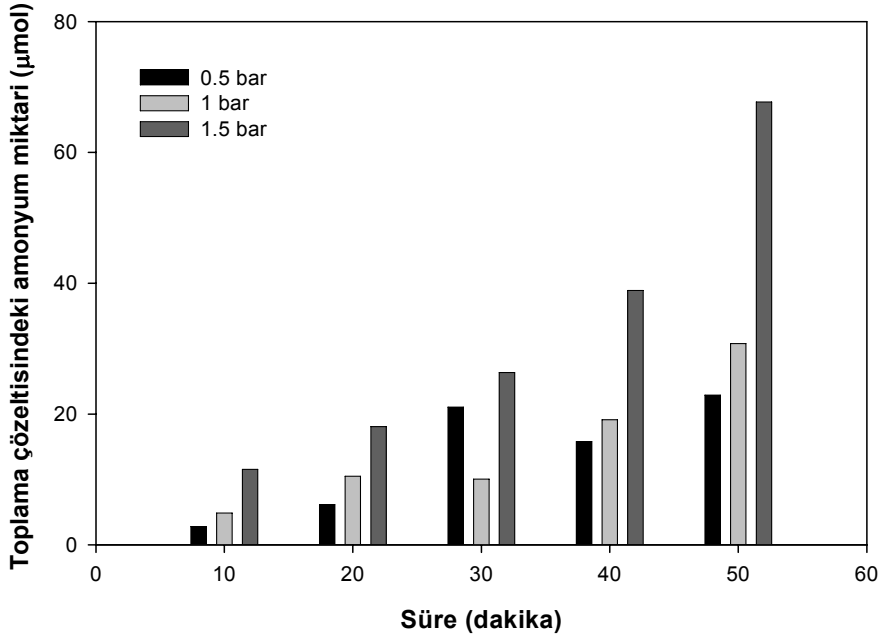
PAN+CHI membranının katalitik performansı Şekil 5.31 ile Şekil 5.34 arasında görülmektedir. PAN+PEI membranına benzer şekilde, bu membranında tüm üre konsantrasyonlarında 1.5 bardaki katalitik aktivitesi 0.5 bara göre daha yüksektir. Ancak, 1 mM ve 2.5 mM üre konsantrasyonlarında 0.5 barda ölçülen amonyum seviyesi 1 barda ölçülene göre daha yüksektir. Bu sonuç, PAN+CHI üzerine immobilize edilen üreazın aktivitesinin de basınçtan etkilendiğini göstermektedir.



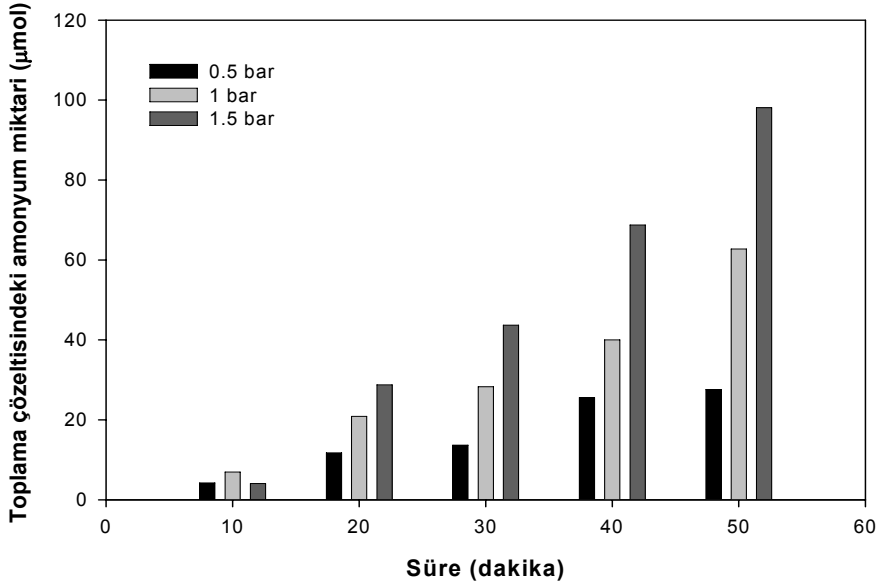
Şekil 5.31. Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 1 mM'dır.



Şekil 5.32. Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 2.5 mM'dır.



Şekil 5.33. Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 5 mM'dır.

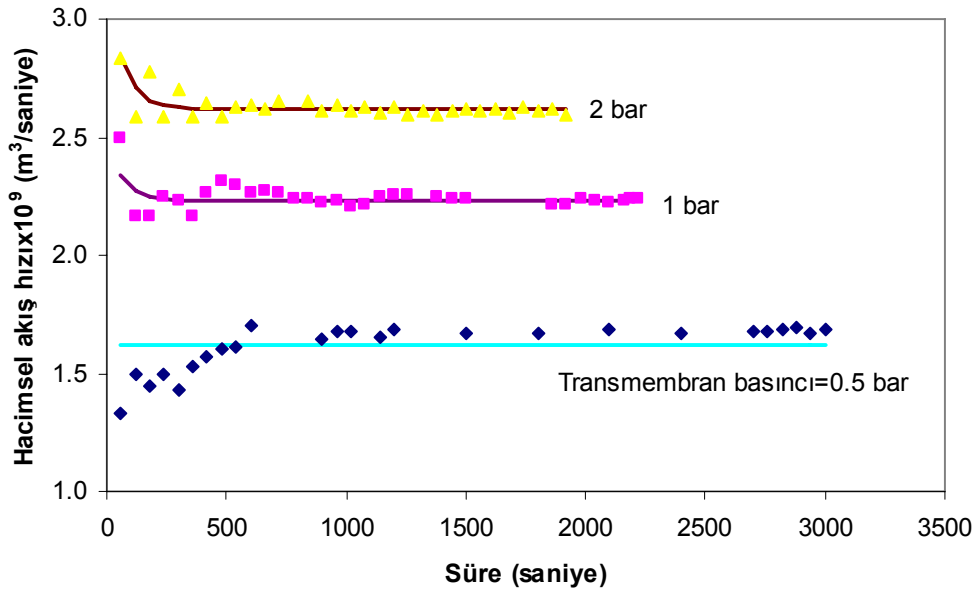


Şekil 5.34. Üreaz immobilize edilmiş PAN+CHI membranında ürenin parçalanması sonucu oluşan ve toplama çözeltisinde biriken amonyum miktarının zamana göre değişimi. Besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonu 10 mM'dır.

## 5.8. Matematik Model Sonuçları

### 5.8.1. Filtrasyon deneylerinin teorik analizi

Geçiş deneylerinde kullanılan membranlar arasında hidrofobik yapıya sahip olan PAN membranının performansının protein kirliliğinden etkilendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle bu membrana ait 0.5, 1.0, ve 1.5 bar transmembran basınçlarında 0.5 g/L BSA konsantrasyonunda elde edilen deneysel veriler 4.1 numaralı kısımda verilen 4.2 numaralı denklem kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 5.35’den de görüldüğü gibi 0.5 bar transmembran basıncında 50 dakikann sonucunda akış hızında bir değişiklik olmazken 1.0 ve 1.5 bar transmembran basınçlarında akış hızında özellikle deneyin başlangıcında belli bir azalma görülmektedir. Bu durum, yüksek transmembran basınçlarında kirliliğin düşük basınçlara göre akış hızını daha çok etkilediğini göstermektedir. Model denklemlerden üretilen verilerin deneysel verilerle örtüşmesi modelin kullanılabilirliğini göstermektedir.



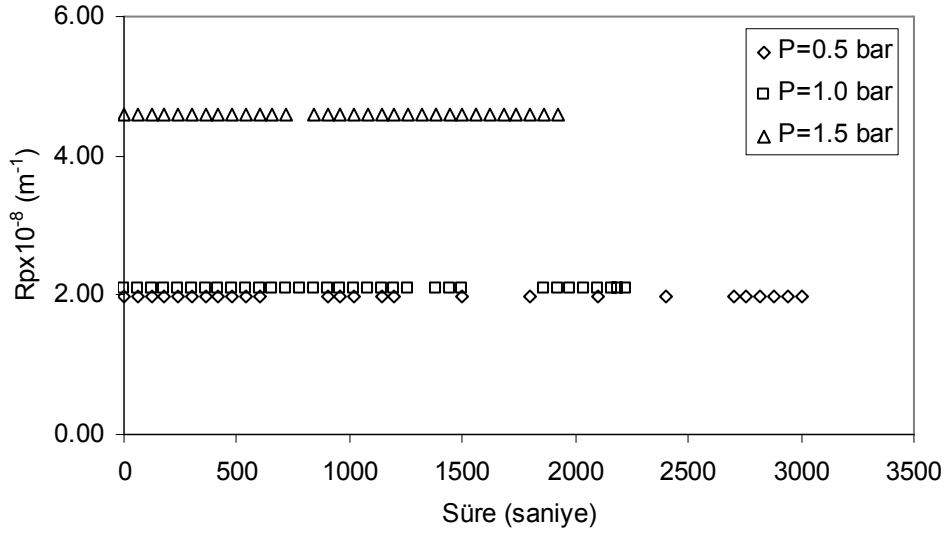
Şekil 5.35. Transmembran basıncının PAN membranından filtre edilen üre+BSA çözeltisinin akış hızına etkisi

Deneysel verilerle model denklemlerinin arasındaki farkın minimize edilmesi sonucu elde edilen model parametreleri Tablo 5.4'de verilmektedir. Bu parametrelerden  $\alpha$  membranın gözeneklerinin tıkanma hızını ifade etmektedir. Sonuçlar, transmembran basıncı arttıkça membranın gözeneklerinin tıkanma hızının azaldığını göstermektedir. Model parametrelerinden  $R_{po}$  başlangıçta membran yüzeyinde oluşan protein tabakasının direncini gösterirken,  $f' R'$  protein tabakasının direncinin zamana göre artışını ifade etmektedir. Beklenildiği gibi transmembran basıncı arttıkça hem başlangıçta oluşan protein tabakasının direnci, hem de protein tabakasının direncinin zamanla artış hızı artmaktadır.

Tablo 5.4. PAN membranına ait filtrasyon deney sonuçlarının (4.2) numaralı denklemle analiz edilmesi sonucu elde edilen model parametreleri

Parametre	$\Delta P = 0.5$ bar	$\Delta P = 1$ bar	$\Delta P = 1.5$ bar
$\alpha$	4	0.5	0.4
$R_{po}$ ( $m^{-1}$ )	$1.99 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$4.59 \times 10^8$
$f' R'$ (m/kg)	$1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-3}$

Şekil 5.36'da PAN membran yüzeyine tutunan BSA'nın direncinin transmembran basıncı ile arttığı ancak zamanla değişmediği görülmektedir. Bu sonuç, proteinlerin deneyin başlangıcında membranın yüzeyini kapladığını ancak bu protein tabakasının üzerine daha fazla protein tutunmadığını göstermektedir. Temiz PAN membranı kullanılarak BSA içermeyen üre çözeltisi ile yapılan filtrasyon deneylerinin analizi sonucu transmembran basıncın 0.5 bardan 1.5 bara çıkartılması sonucu membranın gösterdiği direncin  $1.15 \times 10^9 m^{-1}$ 'den  $2.07 \times 10^9 m^{-1}$  değerine yükseldiği görülmüştür. Bu sonuçlar Tablo 5.4 ve Şekil 5.36'da verilen değerlerle birleştirildiğinde, 0.5 bar transmembran basıncında membran yüzeyinde biriken protein tabakasının direncinin toplam direncin 17 %'sini oluşturduğu hesaplanmıştır. Bu oran transmembran basıncın 1.5 bara çıkartılması ile 17 %'den 22 %'ye yükselmiştir.



Şekil 5.36. Protein tabakasının direncinin zamana göre değişimi

### 5.8.2. Enzim immobilize membranların kullanıldığı ultrafiltrasyon işleminin modellenmesi

4.2.2 numaralı kısımlarda detayları verilen ultrafiltrasyon modeli üç farklı amaçla kullanılabilir.

1) Ultrafiltrasyon işlemi esnasında ayarlanabilen parametrelerin 2) Membranın yapısal özelliklerinin 3) Farklı enzim immobilizasyon işlemlerinin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkilerini incelemek için . Matematik modelin bu kapasitelerini göstermek amacıyla 8 farklı durum için simülasyonlar yapılmıştır. Tüm simülasyonlarda referans olarak kullanılan parametreler Tablo 5.5’de verilmiştir. İncelenen 8 parametreden her birinin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi 1 saatin sonunda besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı baz alınarak değerlendirilmiştir. Yalnızca basınç farkına bağlı olarak rapor edilen üre uzaklaştırma hızları (%) yarım saatin sonundaki değerlerdir. Bu değerler 5.3 numaralı denklem ile hesaplanarak Tablo 5.6’da rapor edilmiştir.



Tablo 5.5. Simulasyonlarda referans olarak kullanılan parametrelerin listesi

Parametre	Parametrenin değeri
Besleme çözeltisinin kütle transfer katsayısı [cm/saniye]	0.148
Membran boyunca uygulanan basınç farkı [bar]	1
Ürenin besleme çözeltisindeki başlangıç konsantrasyonu [mol/cm <sup>3</sup> ]	0.00005
Membranın kalınlığı [cm]	25x10 <sup>-4</sup>
Membranın gözenekliliği	0.8
Membranın gözenek çapı [nm]	3.56
Maksimum enzimatik reaksiyon hızı, V <sub>max</sub> [mmole/cm <sup>3</sup> .sn]	4.8
Enzim tabakasının kalınlığı [cm]	1.31x10 <sup>-5</sup>
Ürenin membranın gözenekleri içindeki difüzyon katsayısı [cm <sup>2</sup> /sec]	1.81 x 10 <sup>-5</sup>
Ürenin enzim tabakasının gözenekleri içindeki difüzyon katsayısı [cm <sup>2</sup> /sec]	1.81 x 10 <sup>-5</sup>

Tablo 5.6. Besleme çözeltisinden 1 saatin sonunda uzaklaştırılan üre miktarları (%)

Parametre	Parametrenin değeri	Uzaklaştırılan üre miktarı (%) Enzim immobilize edilmemiş membran	Uzaklaştırılan üre miktarı (%) Enzim immobilize edilmiş membran
Besleme çözeltisinin kütle transfer katsayısı [cm/sn.]	1. 0.1428	56.93	69.85
	2. 0.01428	52.07	67.28
	3. 0.001428	47.02	64.11
Membran boyunca uygulanan basınç farkı [bar]	1. 1	19.78	29.61
	2. 1.5	32.29	40.80
	3. 2	51.81	58.60
Ürenin besleme çözeltisindeki başlangıç konsantrasyonu [mol/cm <sup>3</sup> ]	1. 0.00005	56.93	69.85
	2. 0.0001	56.79	69.97
	3. 0.0002	57.02	69.82
Membranın kalınlığı [cm]	1. 25x10 <sup>-4</sup>	56.93	69.85
	2. 75x10 <sup>-4</sup>	48.94	64.89
	3. 25x10 <sup>-3</sup>	42.06	60.61
Membranın gözenekliliği	1. 0.8	56.93	69.85
	2. 0.5	53.68	67.87
	3. 0.3	49.85	65.46
Membranın gözenek çapı [nm]	1. 3.56	56.93	69.85
	2. 4.00	59.04	71.25
	3. 4.30	60.26	72.03
Maksimum enzimatik reaksiyon hızı, V <sub>max</sub> [mmole/cm <sup>3</sup> .sn]	1. 4.8	-	69.85
	2. 0.48	-	55.13
	3. 0.0048	-	53.08
Enzim tabakasının kalınlığı [cm]	1. 1.31 x 10 <sup>-5</sup>	-	69.85
	2. 1.60 x 10 <sup>-5</sup>	-	72.54
	3. 5.00 x 10 <sup>-5</sup>	-	91.04

$$\text{Besleme çözeltilisinden uzaklaştırılan üre miktarı (\%)} = \left( \frac{C_o V_o - C_f V_f}{C_o V_o} \right) \times 100 \quad (5.3)$$

Bu denklemde  $C_o$  ve  $C_f$  ürenin başlangıçta ve ardından herhangi bir t anında besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunu  $V_o$  ve  $V_f$  ise besleme çözeltisinin başlangıçta ve herhangi bir t anındaki hacimlerini göstermektedir. Simulasyonu yapılan her bir durum için incelenen parametrenin Tablo 5.6'da belirtilen değeri dışında diğer tüm parametrelerin değerleri Tablo 5.5'de verilenlerle aynıdır. Enzim immobilizasyonunun ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisini incelemek amacıyla tüm simulasyonlar enzim immobilize edilmiş ve edilmemiş membranlar için geliştirilen matematik modeller kullanılarak yapılmıştır. Aşağıda bu parametrelerin ürenin besleme çözeltisinden uzaklaştırılma hızı üzerine olan etkileri incelenecektir. Sonuçlar 1 saatin sonunda tüm sistem boyunca elde edilen konsantrasyon profilleri, ürenin besleme ve toplama çözeltileri içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimi verilerek tartışılmıştır.

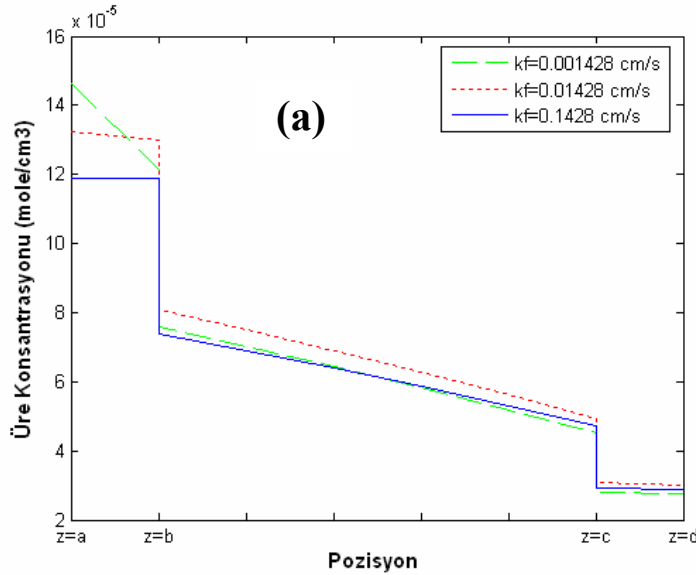
### **5.8.2.1. Ürenin besleme çözeltisi içindeki kütle transfer katsayısının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi**

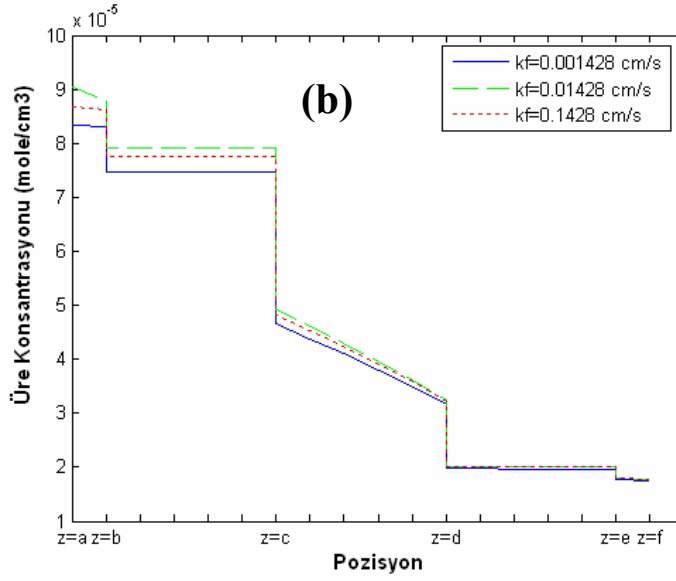
Besleme çözeltisinin düşük hızda karıştırılması sonucu özellikle membran yüzeyine yakın olan kısımlarda konsantrasyon polarizasyonu gerçekleşmektedir ( $k_f=0.001428$  cm/sec). Ancak Şekil 5.37a'dan görüleceği gibi karıştırma hızının artırılması, böylece kütle transfer katsayısında 100 katlık bir artış sonucu ( $k_f=0.1428$  cm/sec) konsantrasyon polarizasyonu sorunu ortadan kalkmaktadır. Diğer bir deyimle besleme çözeltisi içinde kütle transferine karşı gösterilen direnç ihmal edilebilir bir boyuta inmektedir. Membran boyunca lineer bir konsantrasyon profili elde edilmiştir. Bu sonuç, ürenin membran boyunca olan transportunun difüzyonla kontrol edildiğini, konveksiyonun ise ihmal edilebilir bir düzeyde olduğunu göstermektedir. Şekil 5.37b ürenin enzim immobilize edilmiş membran boyunca olan konsantrasyon profilinin lineer olduğunu, dolayısıyla transportunun enzimsiz membranlarda olduğu gibi difüzyon tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Membranın iki yüzeyini de kaplayan enzim katmanları boyunca ürenin konsantrasyonundaki değişim ihmal edilebilir düzeydedir. Bu sonuç, ürenin enzim katmanları boyunca olan transport hızının kütle transferinden ziyade enzimatik reaksiyon tarafından kontrol

edildiğine işaret etmektedir. Simulasyonların verdiği bu sonucu boyutsuz bir sayı olan Thiele modulus,  $\psi$ , değerini hesaplayarak doğrulamak mümkündür. Thiele modulus, enzimatik reaksiyon hızının difüzyon hızına olan oranını veren bir sayıdır ve tanımı aşağıda verilmektedir (GIORNO ve Drioli, 2000).

$$\psi = L \left( \frac{V_{\max}}{D_e K_m} \right)^{0.5} \quad (5.4)$$

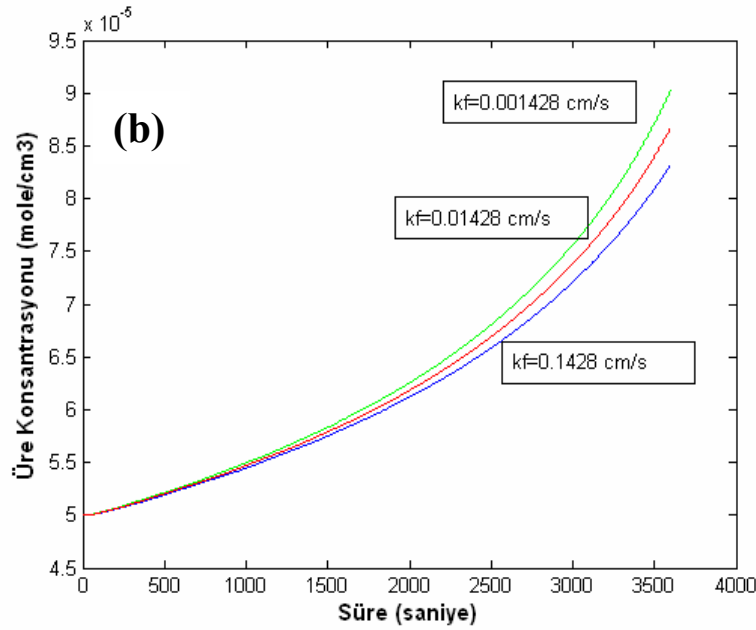
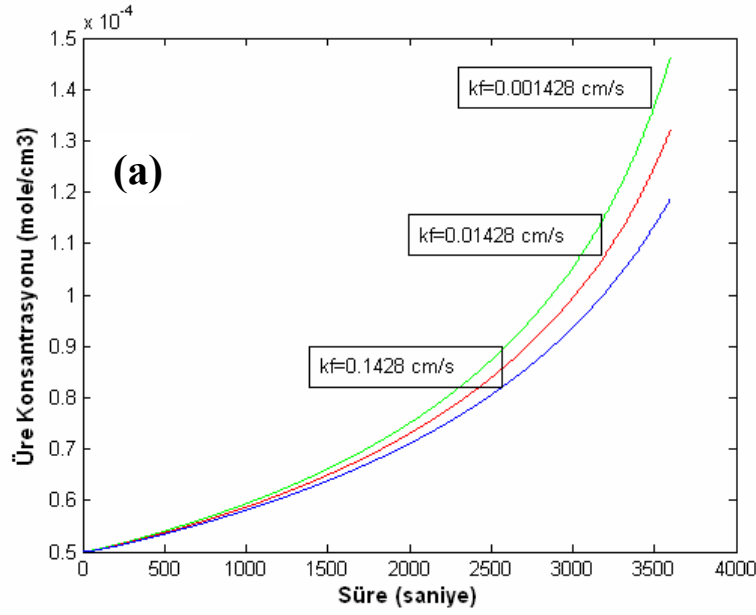
Bu denklemden  $L$  enzim tabakasının kalınlığını  $D_e$  ise ürenin enzim tabakası içindeki difüzyon katsayısını ifade etmektedir. Tablo 5.5’de verilen değerler kullanıldığında Thiele modulus değeri  $2.28 \times 10^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer  $1$ ’e oranla oldukça küçük olması reaksiyon hızının difüzyon hızına oranla daha düşük olduğunu, dolayısıyla ürenin enzim tabakası içindeki transportunun enzimatik reaksiyon tarafından kontrol edildiğini göstermektedir.



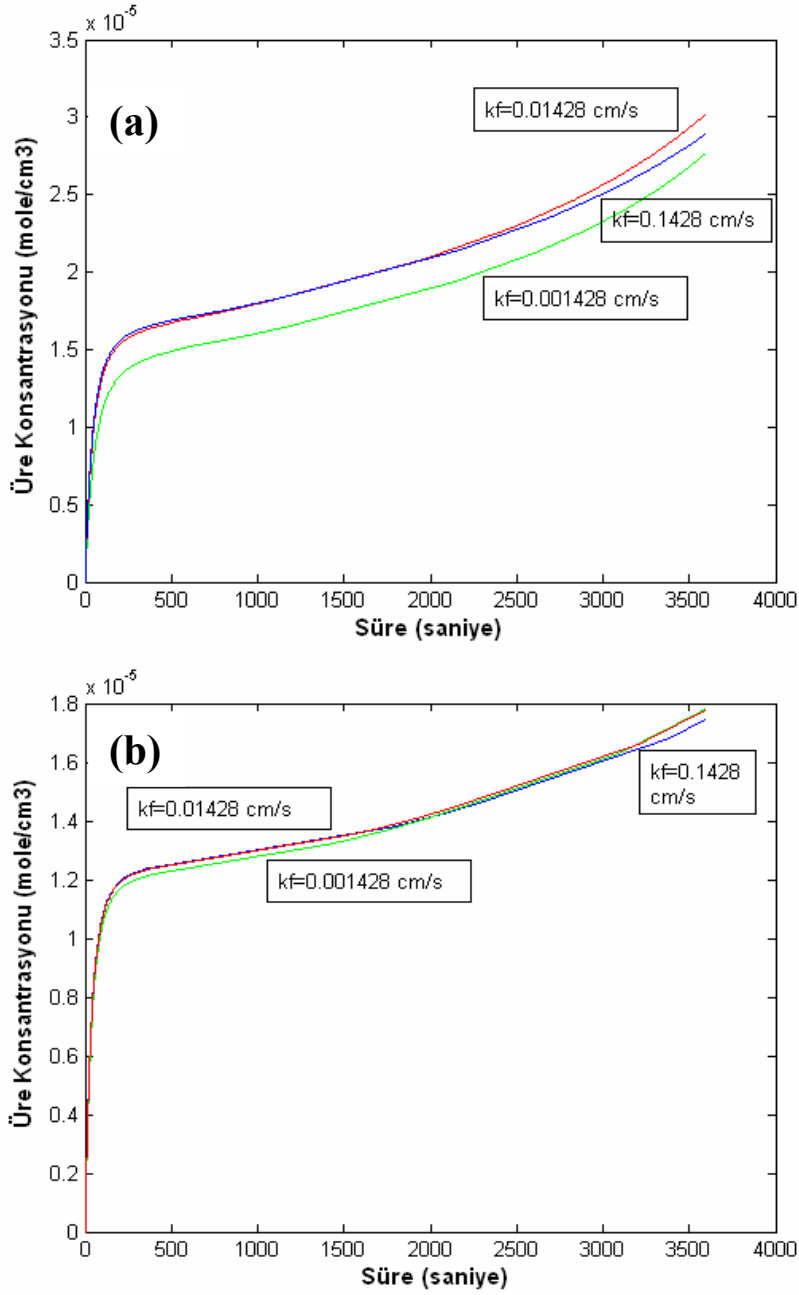


Şekil 5.37. Ürenin besleme tarafındaki kütle transfer katsayısının konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

Ürenin besleme çözeltisi içindeki kütle transfer katsayısının besleme ve toplama çözeltileri içindeki konsantrasyonunun değişimine olan etkisi Şekil 5.38 ve 5.39'da gösterilmektedir. Şekil 5.38'den görüldüğü gibi her bir durum için ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonu zamanla artış göstermektedir. Bu artış, besleme çözeltisinin hacmindeki azalmanın üre miktarındaki azalmaya oranla daha az olmasından kaynaklanmaktadır. Ürenin kütle transfer katsayısındaki artışla birlikte kütle transferine karşı olan direnç azaldığından besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı artmakta, böylece konsantrasyonu azalmaktadır. Şekil 5.39a'dan görüleceği gibi ürenin kütle transfer katsayısındaki artışla birlikte toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonu da artmaktadır. Öte yandan, enzim immobilize membranların kullanılması durumunda, kütle transfer katsayısının toplama çözeltisi içindeki üre konsantrasyonuna olan etkisi daha azdır (Şekil 5.39b). Bu sonuç enzimli membranlarda ürenin transportunun enzimatik reaksiyon hızı tarafından kontrol edildiğinin bir göstergesidir.



Şekil 5.38. Besleme çözeltisinin karıştırma hızının ürenin bu çözelti içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran



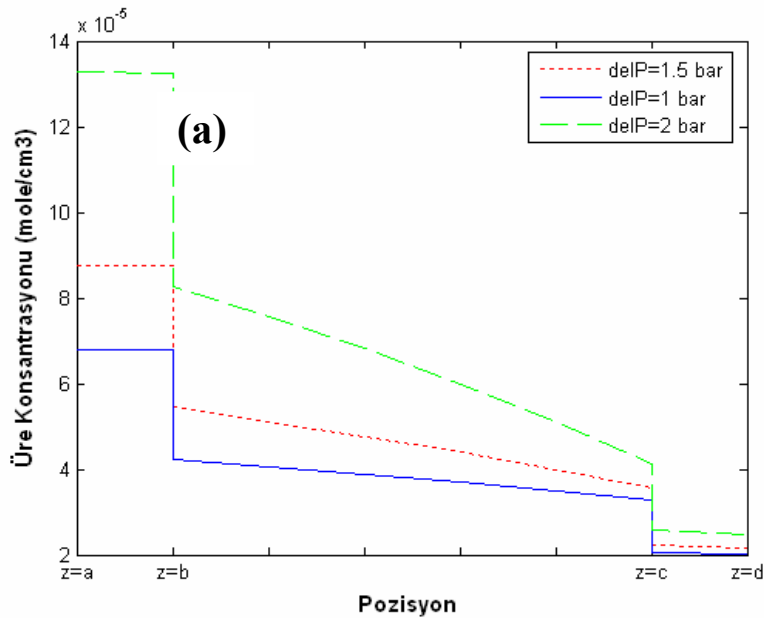
Şekil 5.39. Besleme çözeltisinin karıştırma hızının ürenin toplama çözelti içindeki konsantrasyonunun zamana göre değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

Tablo 5.6'da verilen sonuçlar, besleme çözeltisinin karıştırma hızının artırılmasıyla daha fazla oranda ürenin uzaklaştırılabileceğini göstermektedir. Kütle transfer katsayısının 0.001428

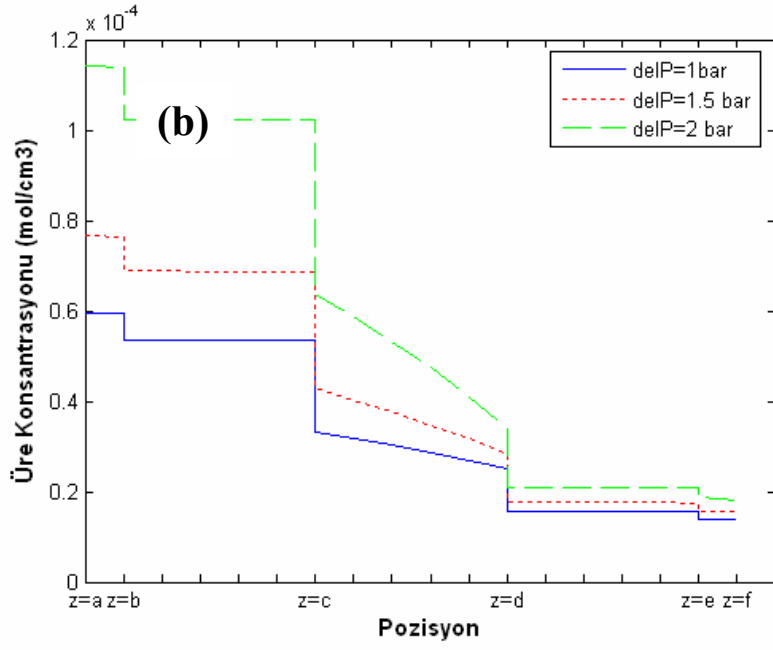
cm/saniye'den 0.1428 cm/saniye'ye artırılmasıyla ürenin enzimsiz membran tarafından uzaklaştırılma hızı %21 oranında artarken, enzim immobilize edilmiş membran kullanılması durumunda bu artış %8.9 civarındadır.

### 5.8.2.2. Membran boyunca uygulanan basınç farkının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

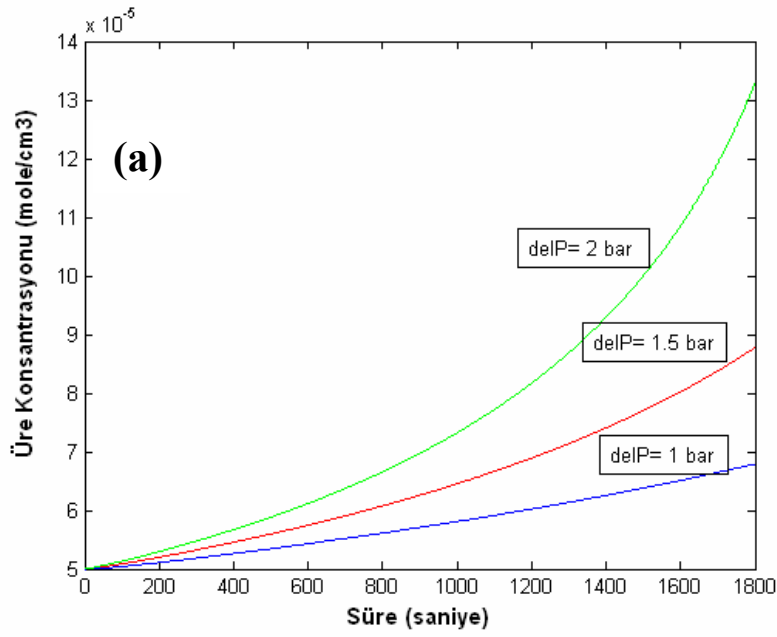
Ultrafiltrasyon işlemi esnasında ayarlanabilen parametrelerden birisi membran boyunca uygulanan basınç farkıdır. Şekil 5.40a ve 5.40b ultrafiltrasyon esnasında uygulanan basınç farkı arttıkça membran boyunca olan konsantrasyon farkının arttığını göstermektedir. Tablo 5.5'de verilen koşullar ile elde edilen simulasyon sonuçları enzimsiz membranlarda ürenin kütle transferine karşı en büyük direncin membran içinde olduğunu, enzimli membranlarda enzim tabakaları içinde ürenin transportunun enzimatik reaksiyon tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Şekil 5.41, ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla arttığını göstermektedir. Bu durum basınç farkının artmasıyla birlikte membrandan geçen toplam hacimsel akının artması ve bunun sonucu çözelti hacmindeki azalma ile ilgilidir.

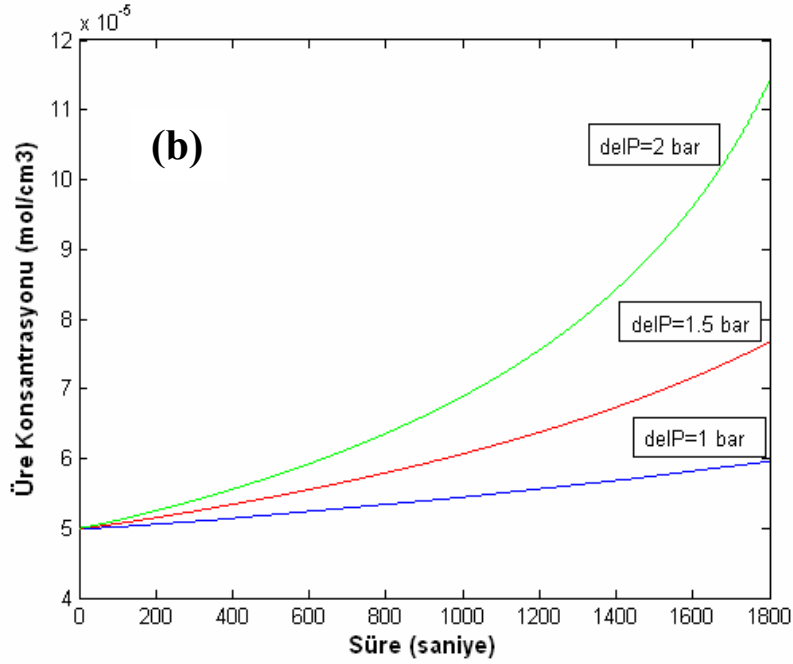






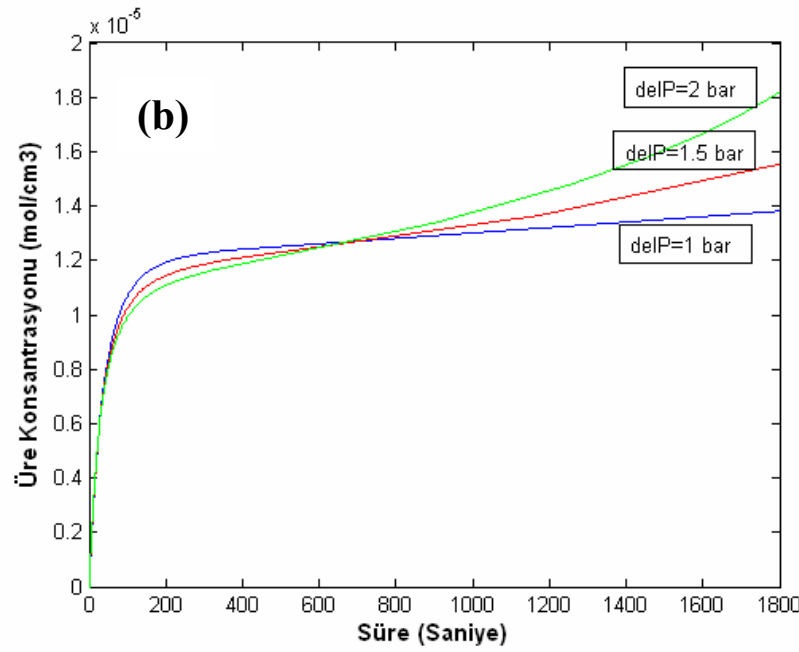
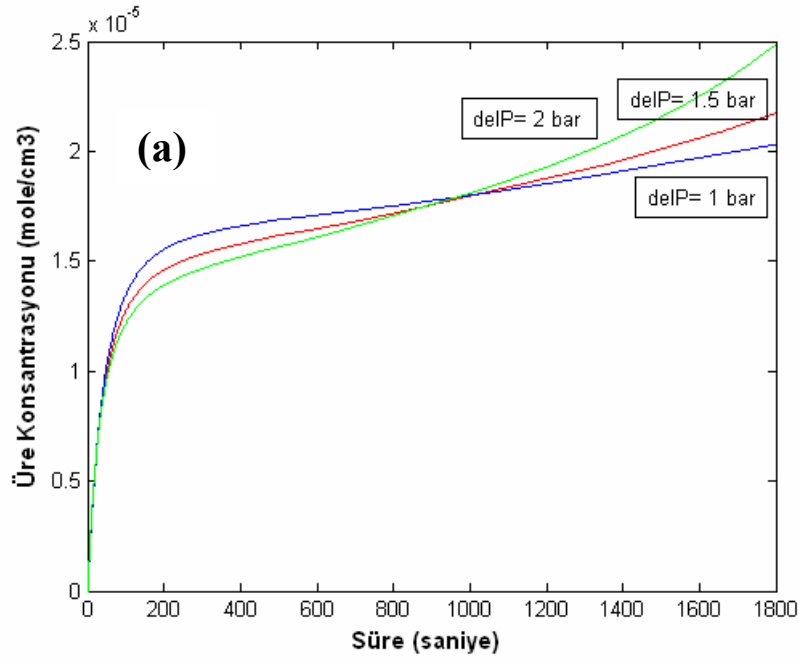
Şekil 5.40. Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.





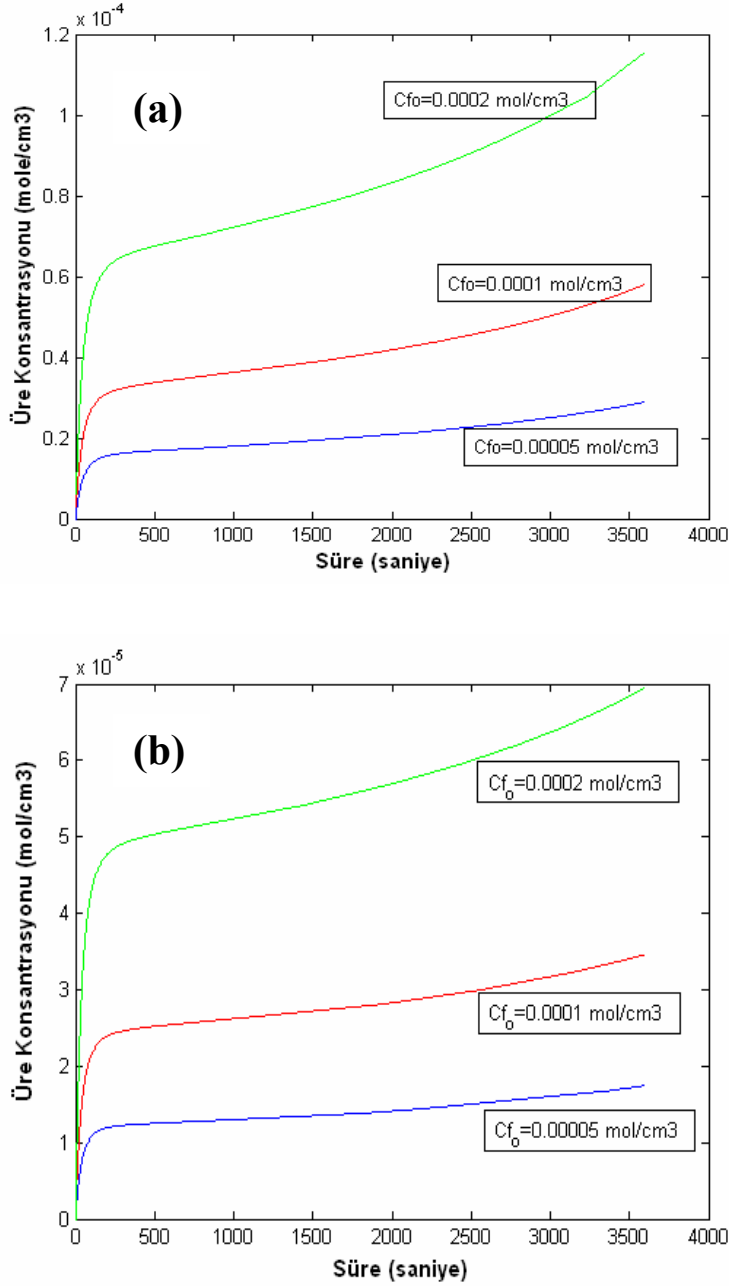
Şekil 5.41. Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

Uygulanan basınç farklarında ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun değişimi Şekil 5.42’de verilmektedir. Enzimsiz membranlarda ilk 1000 saniye içinde, enzimli membranlarda ise ilk 650 saniye içinde basınç farkı arttıkça toplama çözeltisi içindeki üre konsantrasyonu azalmaktadır. Bu durum çözelti hacmindeki artışın çözeltiliye geçen üre miktarına oranla daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Ultrafiltrasyonun ilerleyen aşamalarında, basınç farkının artışı ile birlikte ürenin miktarının toplama çözeltilisinde artması sonucu konsantrasyonu da artmaktadır. Tablo 5.6’da verilen sonuçlar basınç farkının 1 bardan 2 bara çıkartılması sonucu enzimsiz ve enzim immobilize membranlar kullanılarak ürenin besleme çözeltisinden uzaklaştırılma hızının %161 ve %98 arttığını göstermektedir. Bu rakamlar membran boyunca uygulanan basınç farkının ultrafiltrasyon işleminin verimliliğini artırmada önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.42. Membran boyunca uygulanan basınç farkının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

### 5.8.2.3. Ürenin başlangıç konsantrasyonunun ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

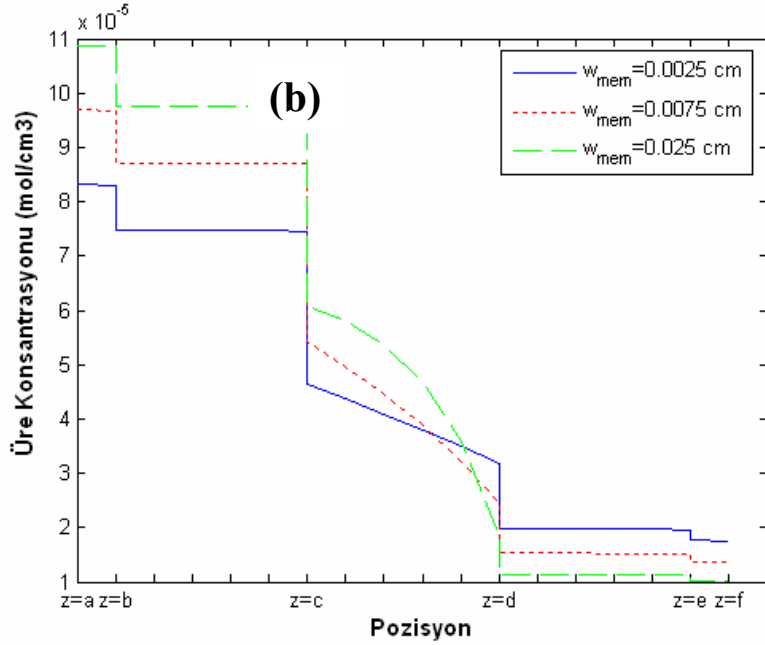
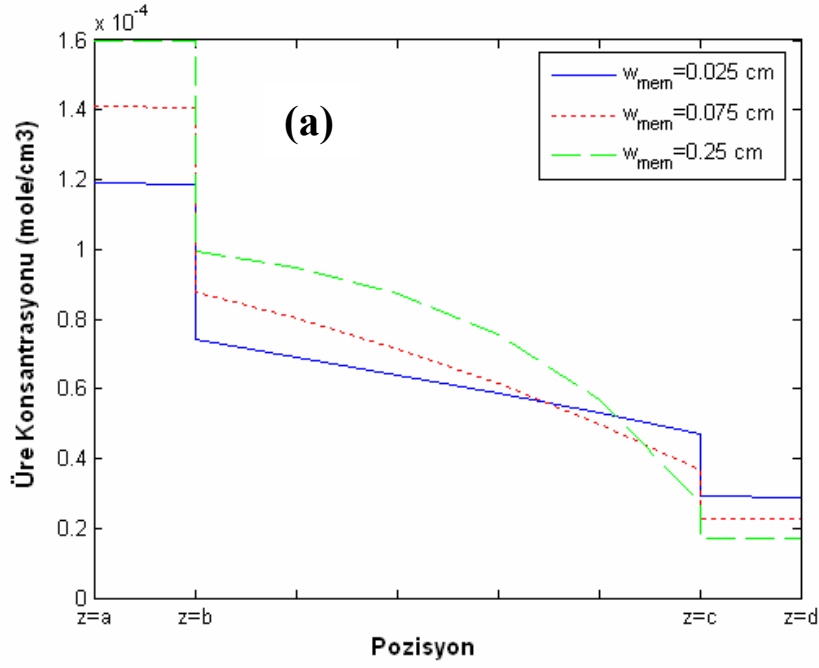


Şekil 5.43. Ürenin başlangıç konsantrasyonunun toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

Şekil 5.43'den görüleceği gibi ürenin başlangıç konsantrasyonunun artması sonucu toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonu da artış göstermektedir. İncelenen her üç konsantrasyon seviyesi içinde hacimsel akı aynı kalmakta, dolayısıyla toplama çözeltisinin zamanla hacmindeki artış da aynı kalmaktadır. Ancak, ürenin başlangıç konsantrasyonunun artması sonucu daha fazla üre toplama çözeltisinde birikmektedir. Hacim aynı kalırken biriken üre miktarının artması da üre konsantrasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Bunun yanısıra, Tablo 5.6'daki sonuçlar ürenin başlangıç konsantrasyonunun değiştirilmesinin 1 saatin sonunda besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarını değiştirmediğini göstermektedir.

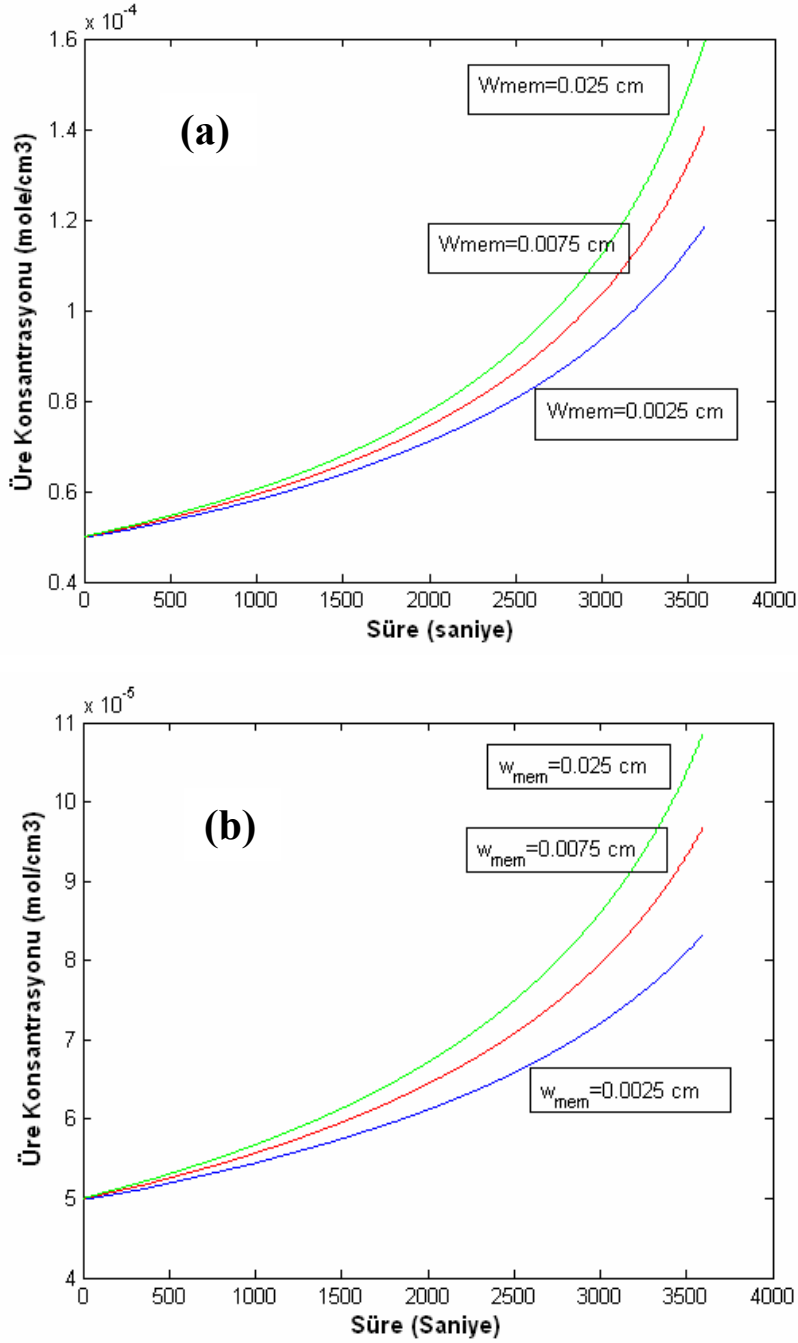
#### **5.8.2.4. Membranın kalınlığının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi**

Membranın en önemli yapısal özelliklerinden birisi kalınlığıdır. Kalınlık seçimi hem membranın uygulanan basınç farkındaki dayanıklılığı, hem de ultrafiltrasyon işleminin performansı üzerine olan etkisi dikkate alınarak yapılmalıdır. Şekil 5.44'de farklı membran kalınlıklarında ürenin konsantrasyon profilleri görülmektedir. Membranın kalınlığı arttıkça membran boyunca olan konsantrasyon farkı dolayısıyla kütle transfer direnci artmaktadır. Her iki tip membranda da membranın kalınlığının 0.025 cm'den 0.25 cm'ye artırılması sonucu konsantrasyon profilleri lineerden parabolik şekle dönüşmüştür. Bu sonuç, ürenin membran içindeki transportunun difüzyonun yanısıra konveksiyon tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Enzim immobilize membranda enzim tabakaları içinde ürenin transportu enzimatik reaksiyon tarafından kontrol edilmektedir.



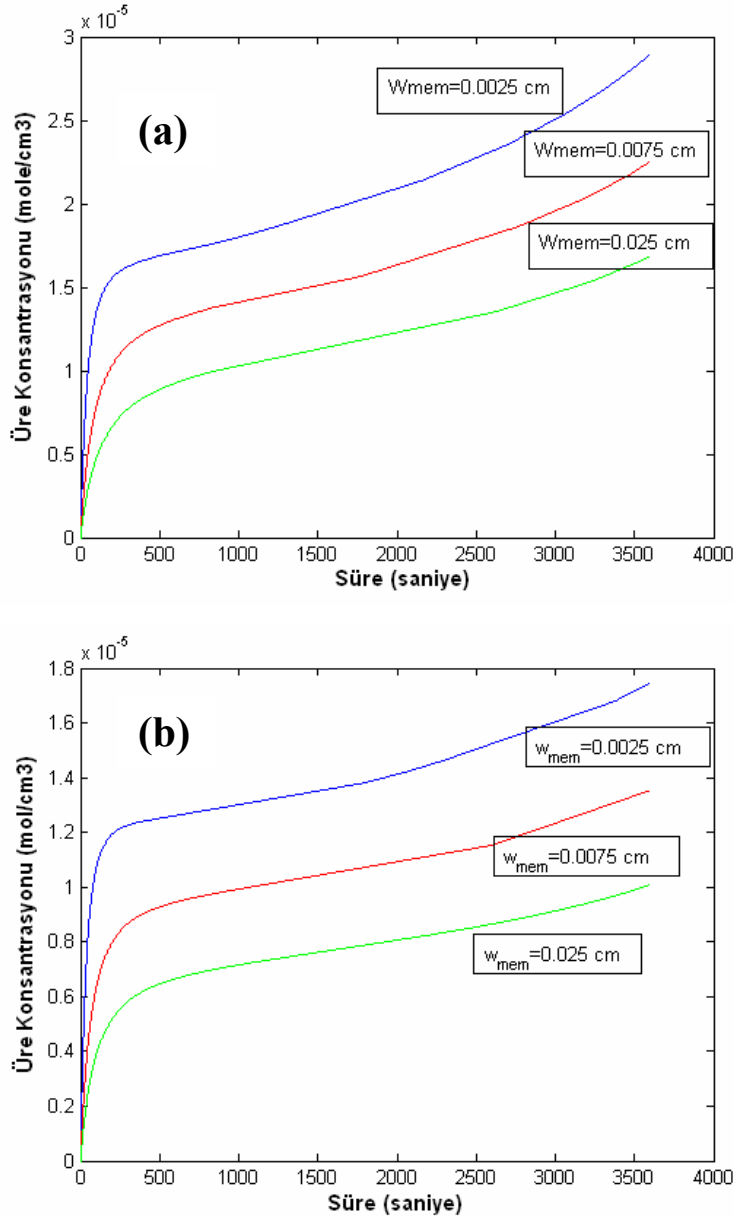
Şekil 5.44. Membranın kalınlığının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

Şekil 5.45’de ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonu görülmektedir. Membran kalınlığının artması sonucu besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonu artmıştır. Bu sonuç,



Şekil 5.45. Membranın kalınlığının besleme çözeltisi içindeki üre konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

membranın kütle transferine karşı gösterdiği direncin artmasıyla daha az oranda üre geçişi dolayısıyla çözeltide daha fazla oranda üre bulunmasıyla ilgilidir. Diğer taraftan, membranın kalınlığının artması ile birlikte ürenin geçişine karşı olan direnç artmakta, dolayısıyla toplama çözeltisi içinde daha az miktarda üre toplanmasına bağlı olarak konsantrasyonu azalmaktadır (Şekil 5.46). Enzim içermeyen membranın kalınlığının artması besleme çözeltisi içindeki ürenin



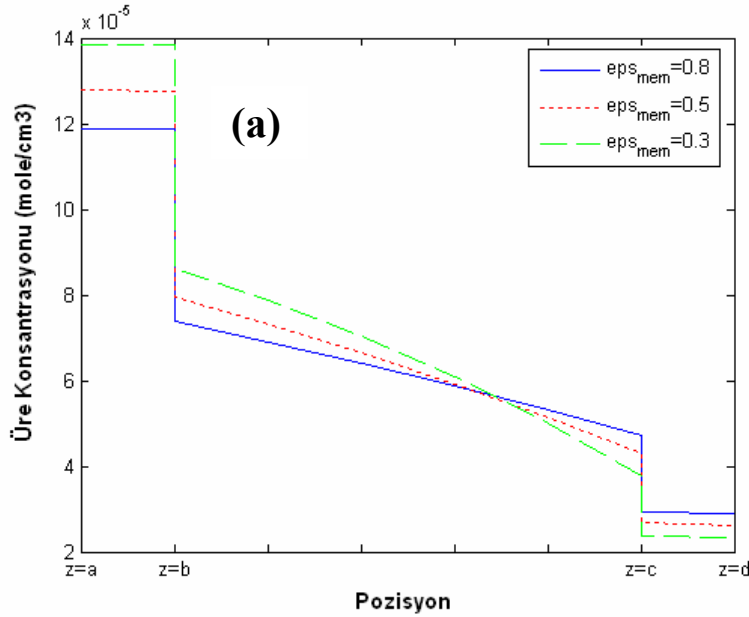
Şekil 5.46. Membranın kalınlığının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran

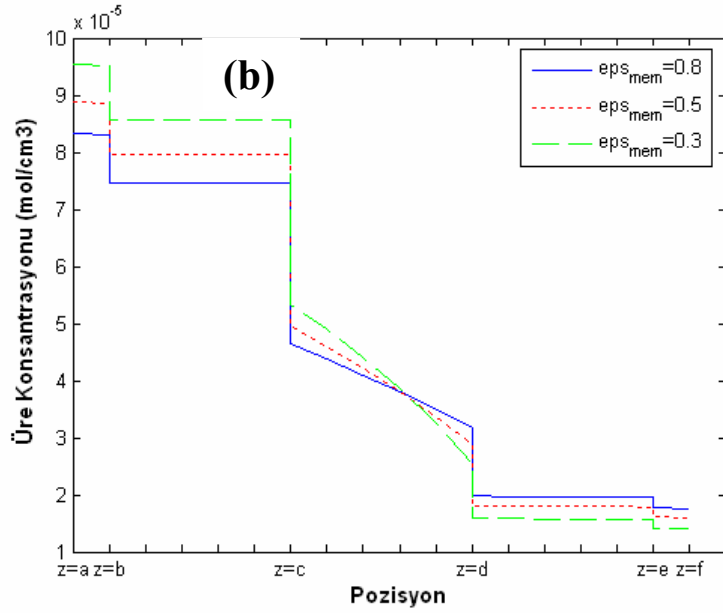


uzaklaştırılma hızının %26 oranında azalmasına neden olurken, bu azalma enzim immobilize edilmiş membranlarda %13 düzeyindedir. Enzim immobilize edilmiş membranlarda ürenin bir kısmı öncelikle enzim tabakası içinde parçalandığı için membranın kalınlığının artması ultrafiltrasyon performansının daha az oranda etkilenmesini sağlamaktadır.

### 5.8.2.5. Membranın gözenekliliğinin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

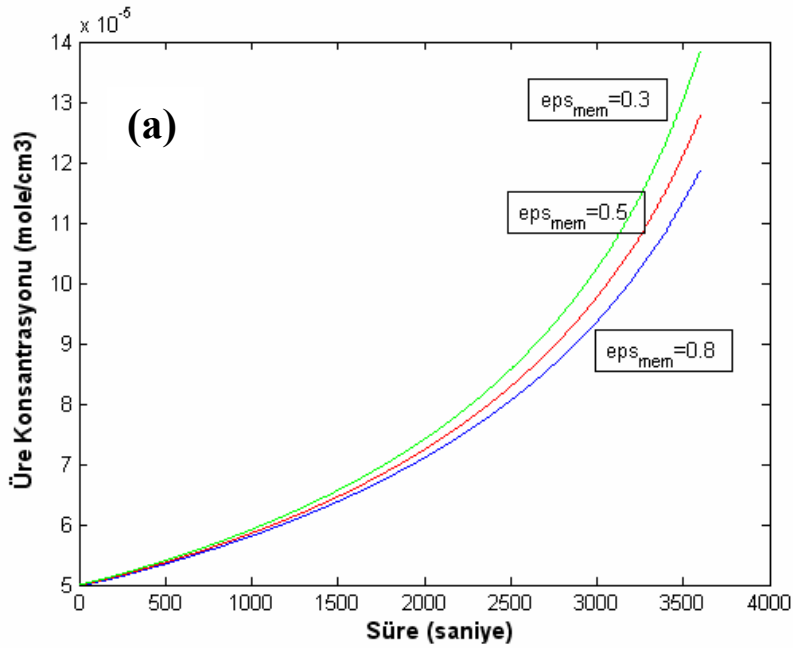
Şekil 5.47 membranın gözenekliliğinin ürenin konsantrasyon profiline olan etkisini göstermektedir. Membranın gözenekliliği azaldıkça ürenin transportuna olan direnç artmakta, dolayısıyla membran boyunca olan konsantrasyon farkı da artmaktadır. Şekil 5.47b'den görüleceği gibi ürenin enzim tabakası içindeki transportu enzimatik reaksiyon tarafından kontrol edilmektedir.

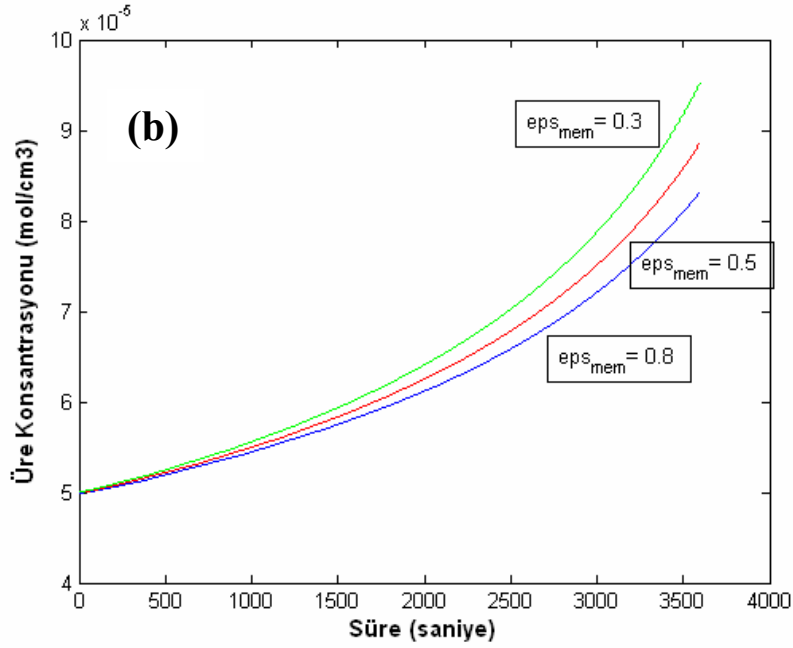




Şekil 5.47. Membranın gözenekliliğinin ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

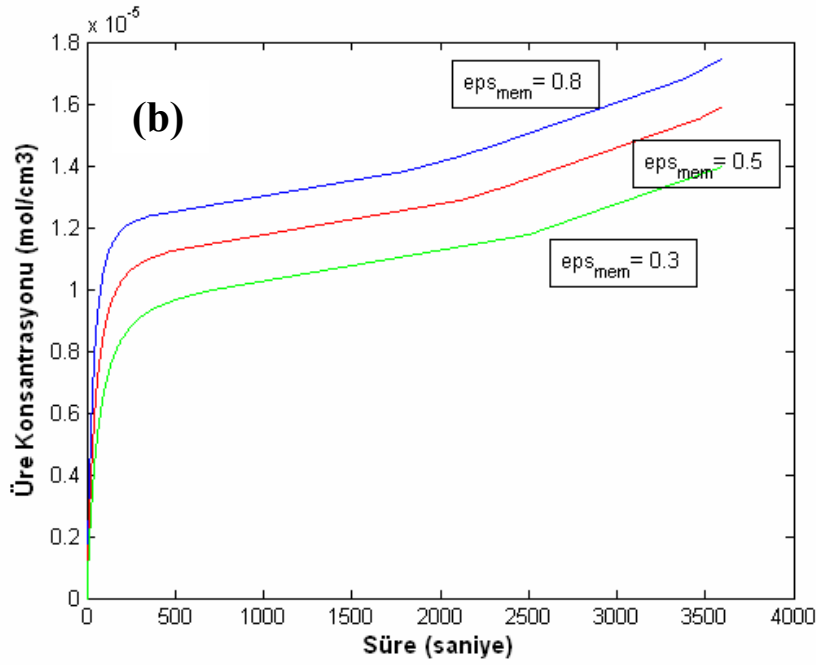
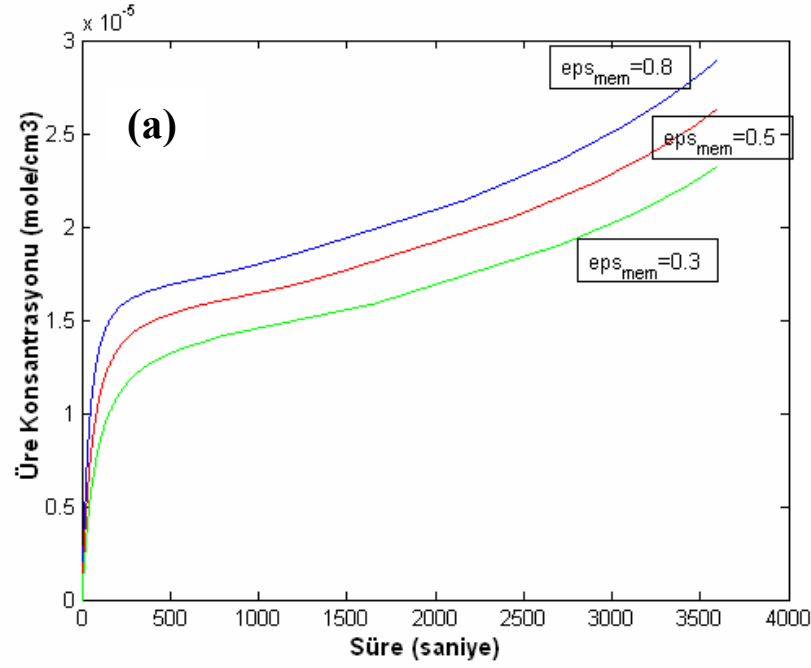
Membranın gözenekliliğinin artması membrandan daha fazla oranda üre geçişini sağladığından, ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Şekil 5.48).





Şekil 5.48. Membranın gözenekliliğinin ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

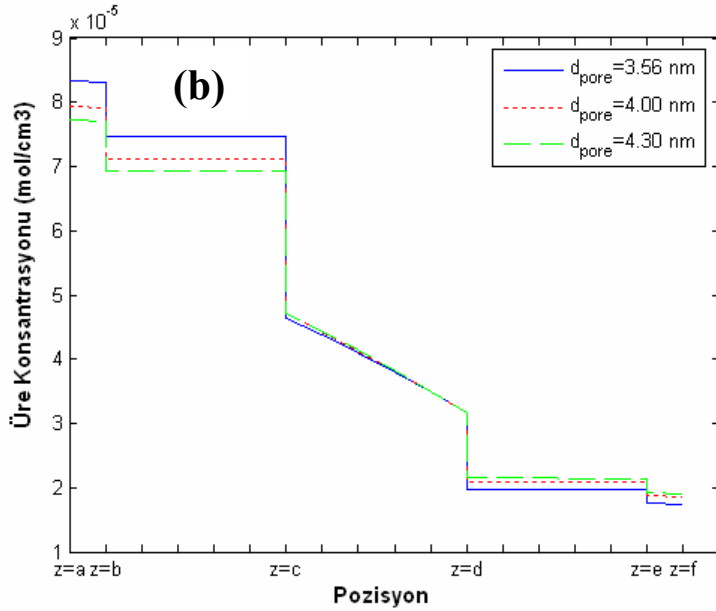
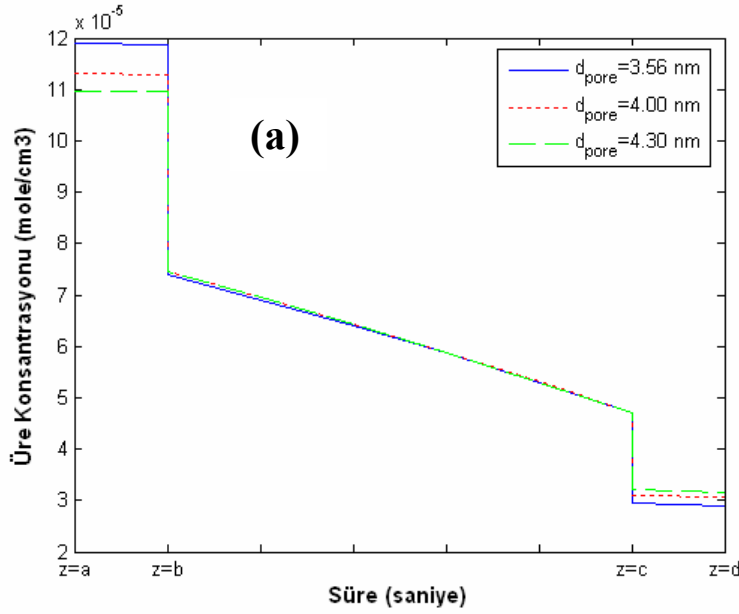
Diğer taraftan, membranın daha gözenekli olması sayesinde toplama çözeltisinde biriken üre miktarı, böylece ürenin konsantrasyonu da artmaktadır (Şekil 5.49). Membranın gözenekliliğinin 0.3'den 0.8'e değiştirilmesi sonucu ürenin besleme çözeltisinden uzaklaşma hızı enzim içermeyen membran için %14.2, enzim immobilize edilmiş membran içinse 6.7% oranında artmıştır.



Şekil 5.49. Membranın gözenekliliğinin ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

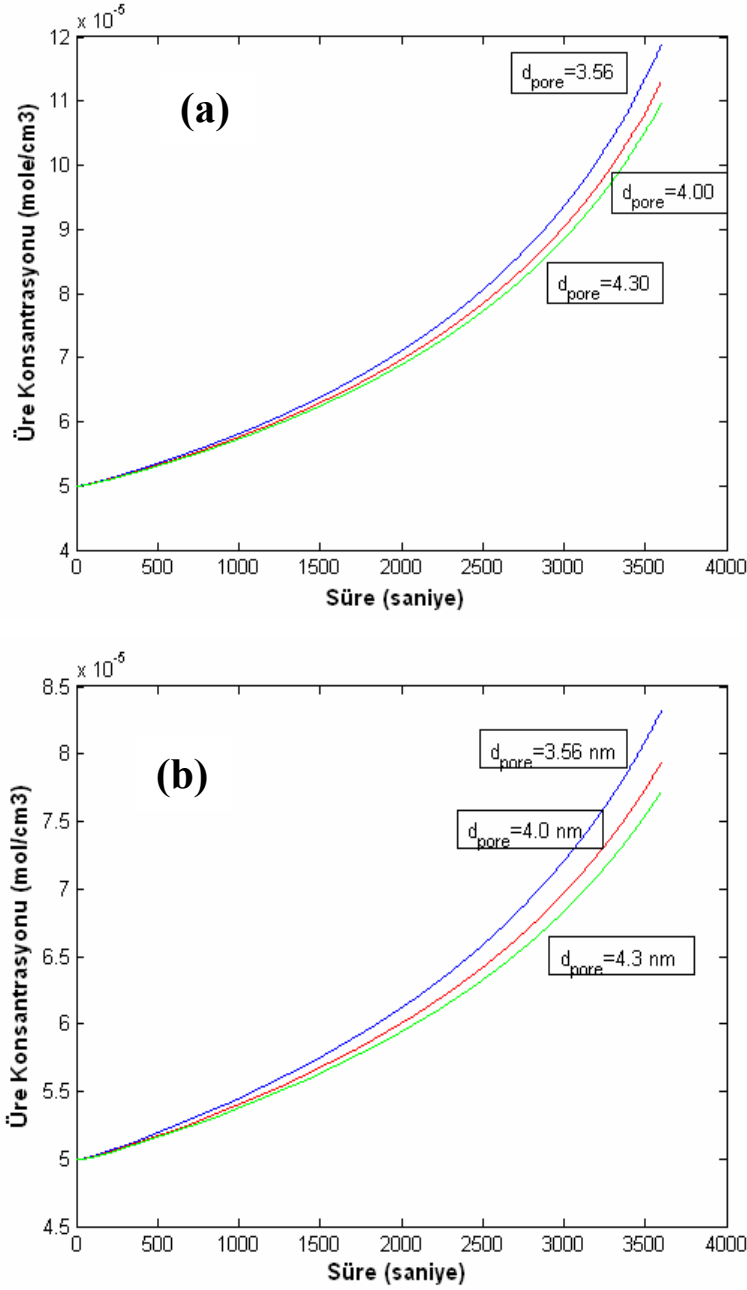
### 5.8.2.6. Membranın gözenek boyutunun (çapının) ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

Şekil 5.50, membranın gözenek çapının 3.56 nm'den 4.3 nm'ye artırılması durumunda ürenin enzim içermeyen ve enzim içeren membran boyunca konsantrasyon profilinde herhangi bir değişim olmadığını göstermektedir.



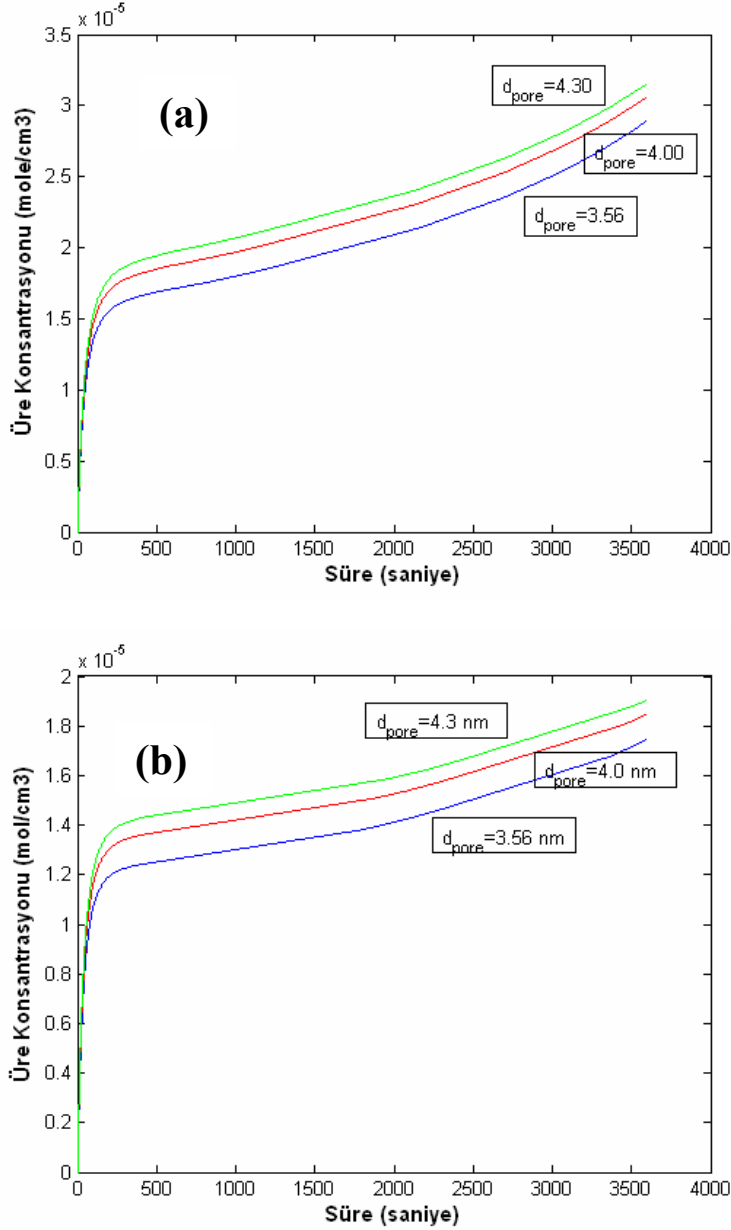
Şekil 5.50. Membranın gözenek çapının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

Membranın gözenek çapının artması ürenin membrandan daha fazla oranda geçmesine, böylece besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonun da azalmasına neden olmaktadır (Şekil 5.51).



Şekil 5.51. Membranın gözenek çapının ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

Ürenin geçiş hızının az da olsa artması sonucu toplama çözeltisinde daha fazla oranda üre birikimi konsantrasyonunun da artmasına neden olmuştur (Şekil 5.52). Membranın gözenek çapının 3.56 nm'den 4.3 nm'ye değiştirilmesi sonucu ürenin besleme çözeltisinden uzaklaştırılma hızı

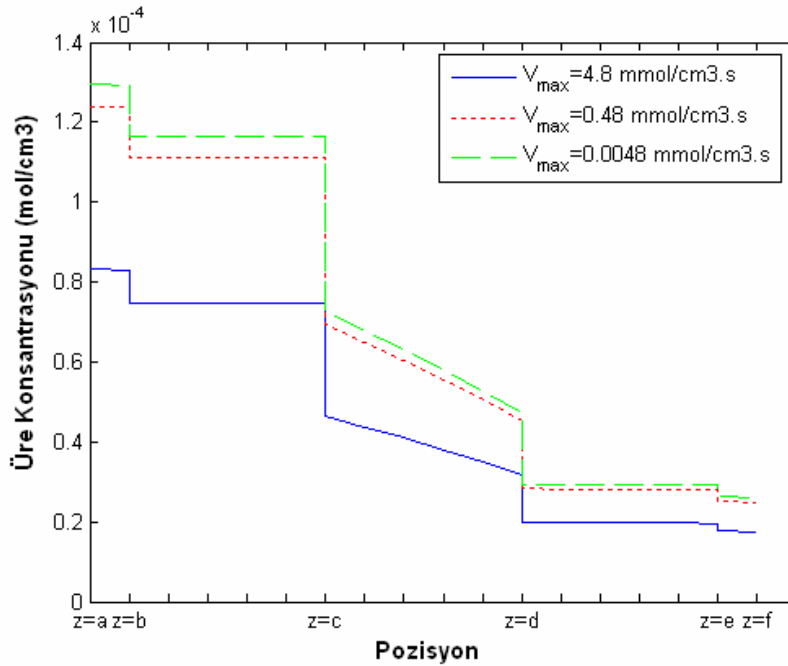


Şekil 5.52. Membranın gözenek çapının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun zamanla değişimine olan etkisi. a) Enzim immobilize edilmemiş membran b) Enzim immobilize edilmiş membran.

enzimsiz membran için 5.8% , enzim immobilize edilmiş membran içinse 3.1 % oranında artmıştır.

### 5.8.2.7.Enzimin maksimum reaksiyon hızındaki değişimin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

Enzimatik reaksiyon hızı immobilizasyon yöntemine ve koşullarına bağlı olarak önemli oranda değiştirilebilir. Şu an literatürde farklı enzim immobilizasyon tekniklerinin enzimin kinetik parametreleri üzerine olan etkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. Şekil 5.53 , üreaz enziminin maksimum reaksiyon hızının  $4.8 \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{saniye}$ 'ye oranla 1000 kat azalması durumunda konsantrasyon profilindeki değişimi göstermektedir. Şekilden de görüleceği gibi reaksiyon hızındaki azalma ürenin membran ve enzim tabakaları boyunca olan transport mekanizmasında herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır.

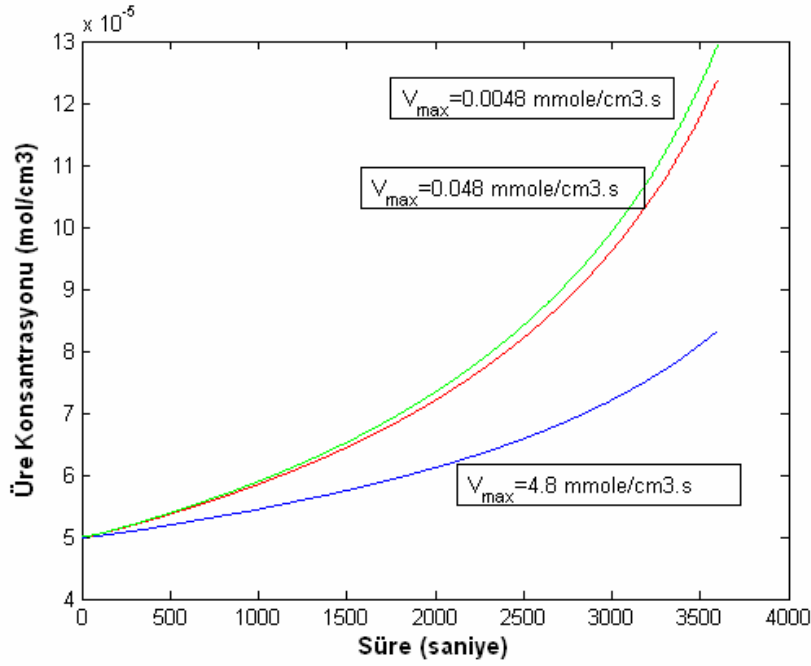


Şekil 5.53. Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürenin konsantrasyon profiline olan etkisi.

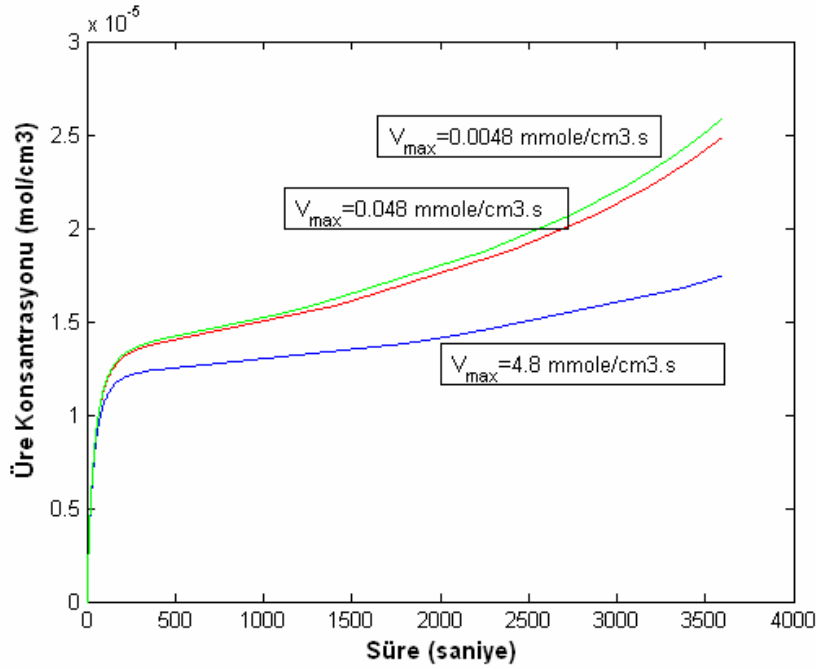
Şekil 5.54, reaksiyon hızının  $0.0048 \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{saniye}$ 'den  $0.048 \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{saniye}$ 'ye artması sonucu ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonunda önemli bir değişim olmadığını göstermektedir. Ancak maksimum reaksiyon hızının 100 kat daha artması, ürenin



konsantrasyonunda ciddi bir azalmaya neden olmuştur. Benzer bir davranış ürünün toplama çözeltisi içindeki konsantrasyon değişiminde de gözlenmiştir. Şekil 5.55'den görüleceği gibi enzimin maksimum reaksiyon hızının  $0.0048 \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{saniye}$ 'den  $4.8 \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{saniye}$ 'ye artması sonucu ürünün toplama çözeltisindeki konsantrasyonu önemli oranda azalmıştır. Bu azalma daha fazla ürünün enzim tarafından parçalanması nedeni ile oluşmaktadır. Tablo 5.6'dan görüleceği gibi maksimum reaksiyon hızının 1000 kat artması sonucu ürünün besleme çözeltisinden uzaklaştırılma hızı 31.6 % oranında artmıştır.



Şekil 5.54. Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürünün besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi.



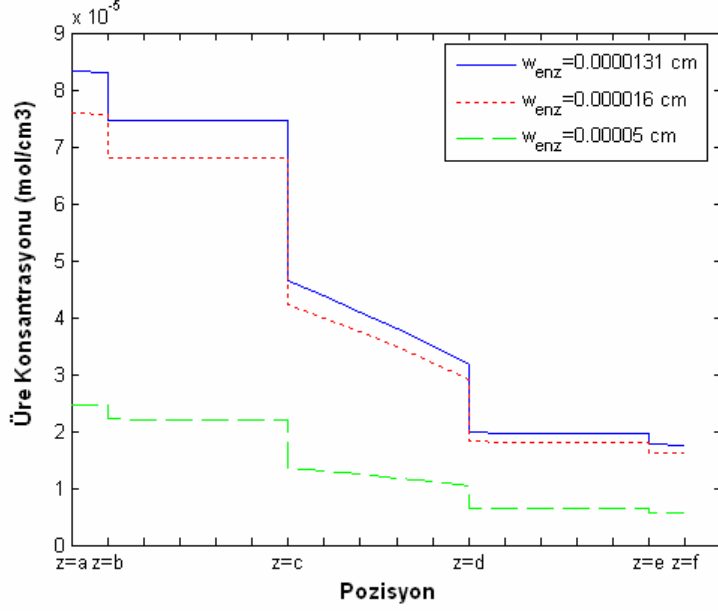
Şekil 5.55. Enzimin maksimum reaksiyon hızının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi.

#### 5.8.2.8. Enzim tabakasının kalınlığının ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisi

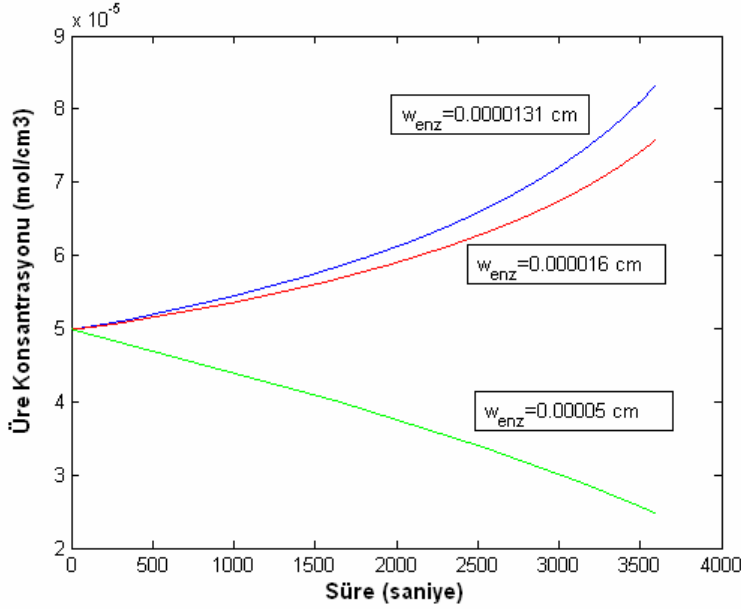
Farklı immobilizasyon yöntemleri membran yüzeyine tutunan enzim miktarını, dolayısıyla enzim katmanının kalınlığını değiştirmektedir. Şekil 5.56 bu değişimin ürenin konsantrasyon profiline olan etkisini göstermektedir. Şekilden görüleceği gibi enzim tabakasının kalınlığının artması ürenin membran ve enzim tabakaları boyunca olan transport mekanizmasını değiştirmemektedir.

Enzim tabakasının kalınlığının artması ile birlikte daha fazla oranda ürenin parçalanması nedeniyle besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonu azalmaktadır. Enzim tabakasının yeterince kalın olmadığı durumlarda ürenin konsantrasyonu zamanla artış gösterirken, kalınlığın yeterince artması sonucu ürenin besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonu zamanla azalmaktadır (Şekil 5.57). Benzer davranış ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonunun değişiminde de gözlenmiştir. Şekil 5.58'den görüleceği gibi enzim tabakasının kalınlığı 0.00005 cm olduğunda ultrafiltrasyon işleminin başlangıcında ilk 100 saniyede ürenin konsantrasyonu artmakta, ancak ardından azalmaya başlamaktadır. Üre konsantrasyonunda gözlenen maksimum ultrafiltrasyon işleminin ilerleyen aşamalarında ürenin parçalanması ve toplama çözeltisine daha az oranda üre

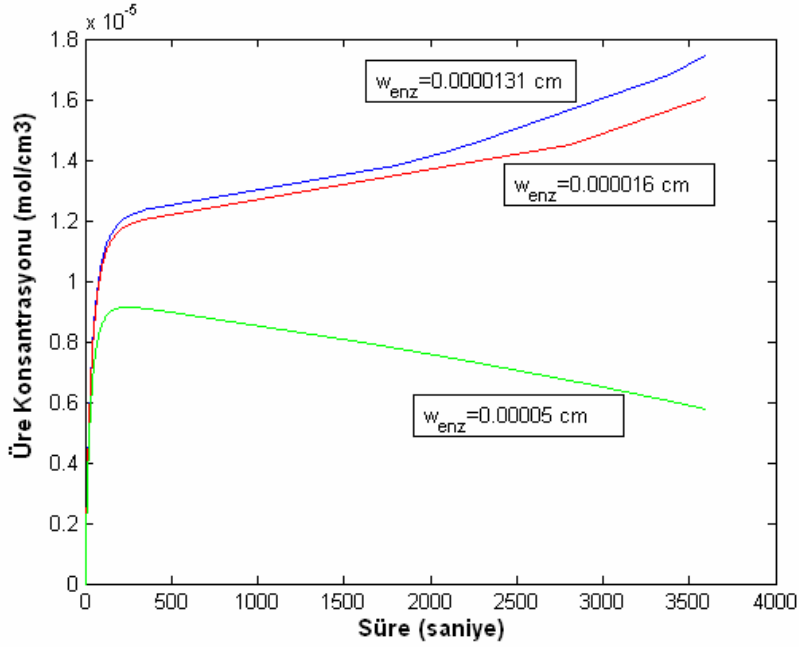
geçiş olması ile ilgilidir. Enzim kalınlığının  $1.31 \times 10^{-5}$  cm'den  $5 \times 10^{-5}$  cm'ye artması sonucu ürünün besleme çözeltisinden uzaklaştırılma hızı %30 oranında artış göstermiştir.



Şekil 5.56. Enzim tabakasının kalınlığının ürünün konsantrasyon profiline olan etkisi.



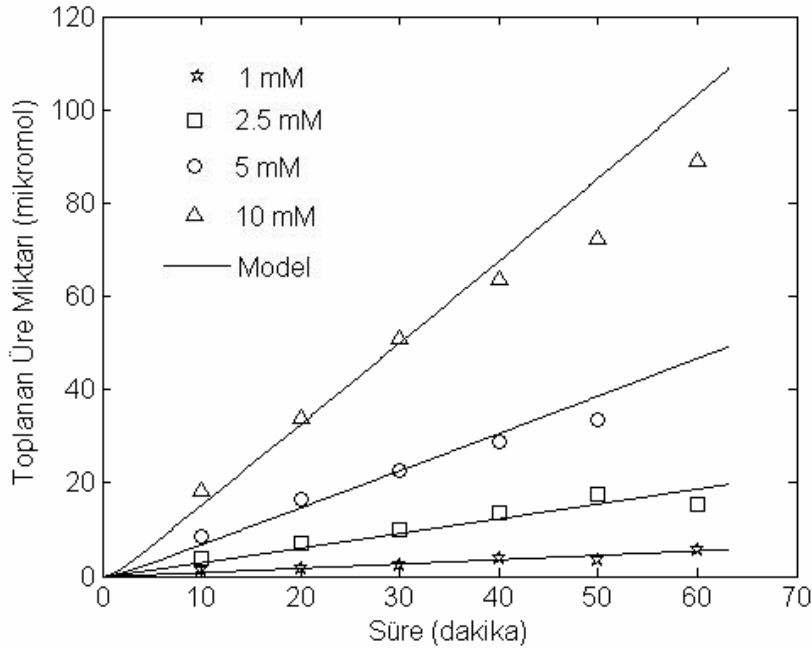
Şekil 5.57. Enzim tabakasının kalınlığının ürünün besleme çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi.



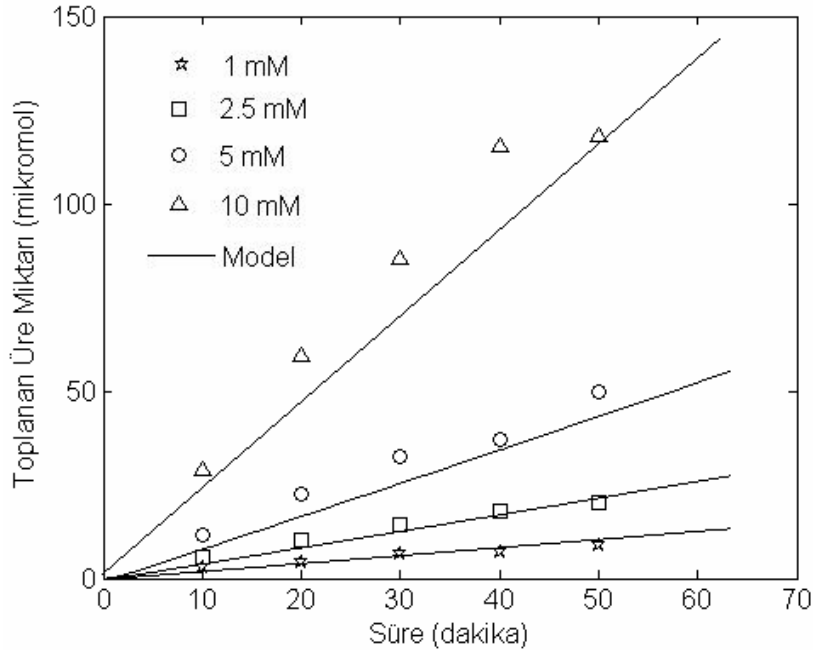
Şekil 5.58. Enzim tabakasının kalınlığının ürenin toplama çözeltisi içindeki konsantrasyonun zamanla değişimine olan etkisi.

### 5.8.3. Ultrafiltrasyon modelinin test edilmesi

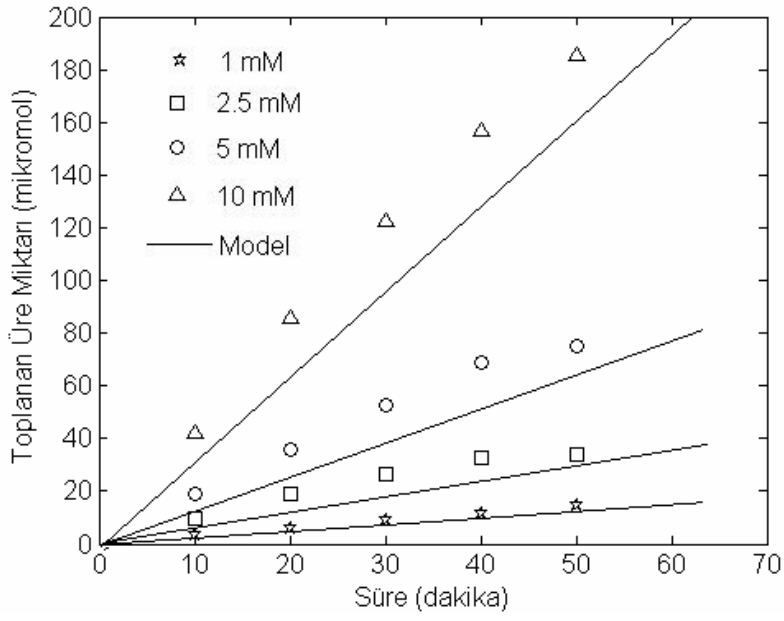
Ultrafiltrasyon işleminin performansını belirlemek amacı ile geliştirilen matematik modelin doğruluğu, model tahminleri ile deneysel veriler karşılaştırılarak test edilmiştir. Bu amaçla üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranı kullanılarak, üç farklı basınçta (0.7 bar, 1 bar ve 1.5 bar) ve her bir basınç seviyesinde dört farklı üre konsantrasyonunda (1 mM, 2.5 mM, 5 mM ve 10) mM) ultrafiltrasyon deneyleri yapılmış, deney süresince her 10 dakikada bir toplama çözeltisinde bulunan üre miktarları ölçülmüştür. Şekil 5.59'da görüldüğü gibi 0.7 barda, matematik model tahminleri ile deneysel data arasındaki karşılaştırma 10 mM üre konsantrasyonu hariç oldukça iyidir. 1 bar (Şekil 5.60) ve 1.5 barda (Şekil 5.61) bu konsantrasyonda yapılan ölçüm sonuçları da model tahminlerinden sapma göstermektedir. Bu sapmanın en önemli sebebi model denklemlerinde enzimin inaktivasyonunun dikkate alınmamasıdır. Enzimin aktivitesinde hem basınca maruz kalması, hem de belli substrat konsantrasyonunun üstünde substrat inhibisyonu nedeni ile azalma olabilir. Model tahminleri ile deneysel data arasındaki en büyük sapma 1.5 bar basınçta gözlenmekle birlikte, modelin yeterince doğru tahminlerde bulunduğu da açıktır.



Şekil 5.59. Deneyel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması .  $\Delta P=0.7$  bar.



Şekil 5.60. Deneyel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması .  $\Delta P=1$  bar.



Şekil 5.61. Deneysel olarak toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarlarının model tahminleri ile karşılaştırılması .  $\Delta P=1.5$  bar.

## VI. SONUÇLAR

Bu çalışmada PAN membranı ile PEI ve kitosan ile modifiye edilmiş PAN membranları üzerine üreaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, polielektrolytle modifikasyonun adsorplanan üreaz miktarını değiştirmediğini, ancak üreazın aktivitesinde önemli artışlara neden olduğunu göstermiştir. Bu durum, üreazın PEI ve kitosanla modifiye edilmiş pozitif yüklü PAN membranlarına, modifiye edilmemiş negatif yüklü PAN membranına kıyasla daha iyi bir pozisyonla tutunduğuna işaret etmektedir. Membranların üreye karşı gösterdikleri kinetik performans şu şekilde bulunmuştur: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. Üreazın membranlara immobilizasyonu pH-aktivite, sıcaklık-aktivite profillerinde ve depolama stabilitelerinde oldukça fazla değişimlere neden olmuştur. Asidik pH değerlerinde çözünür enzime kıyasla, PAN membranlarına immobilize edilmiş üreaz daha fazla aktivite göstermiştir. Üreazın sıcaklık stabilitesi de immobilizasyon sonucu iyileştirilmiştir. Kısa süreli depolamalarda çözünür enzim immobilize olana göre daha iyi bir stabilite gösterirken, uzun süreli depolamalarda çözünür ve modifiye edilmiş PAN membranları üzerine immobilize edilen üreaz benzer davranış sergilemiştir. PAN membranı uzun süreli depolamada üreaz aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Membranların ultrafiltrasyon koşullarında gösterdikleri performans da test edilmiştir. Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAN membranları üzerine üreaz adsorpsiyonu sonucu membranların hidrolik geçirgenlikleri önemli oranda değişmemiştir. Üre çözeltisine protein (BSA) ilave edilmesi sonucu PAN membranından geğiş hızı yavaşlarken, PAN+PEI+üreaz ve PAN+CHI+üreaz membranlarının performansında bir değişim olmamıştır. PAN+PEI membranının BSA içeren üre çözeltisine maruz kalması sonucu membran yüzeyinde kalıcı bir kirliliğin olduğu, üreaz immobilize edilmiş PAN+PEI membranlarında ise yüksek BSA konsantrasyonu içeren besleme çözeltisi kullanıldığı durumda bile membranın yüzeyinde kalıcı bir kirliliğin oluşmadığı, membranın filtrasyon performansını koruduğu bulunmuştur. Ultrafiltrasyon esnasında besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı membran boyunca uygulanan basıncın artması ile artarken, besleme çözeltisindeki üre konsantrasyonundan etkilenmemiştir. Su içinde çözülerek hazırlanan üre çözeltileriyle, PAN+PEI membranı kullanılarak yapılan ultrafiltrasyon deneylerinde temiz ve BSA ile muamele görmüş membranların üreaz aktivitelerinin değişmediği gözlemlenmiştir. Ancak, Na-fosfat tamponunda

çözülerek hazırlanan üre çözeltileri ile yapılan ultrafiltrasyon deneyinin sonunda PAN+PEI membranı aktivitesinin bir kısmını, tamponun enzim aktivitesini inhibe edici etkisinden dolayı kaybetmiştir.

Üreaz enzimi immobilize edilmiş ultrafiltrasyon membranlarının ürenin uzaklaştırılma hızı üzerine olan etkisini incelemek amacıyla bir matematik model geliştirilmiştir. Model tahminleri ultrafiltrasyon işlemi esnasında ayarlanabilen parametrelerin, membranın yapısal özelliklerinin ve farklı enzim immobilizasyon tekniklerinin ultrafiltrasyon işleminin performansına olan etkisini incelemek amacıyla kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon işleminin performansı 1 saatin sonunda besleme çözeltisinden uzaklaştırılan üre miktarı baz alınarak değerlendirilmiştir. Bu kriter baz alındığında, incelenen her bir parametre için üreaz enzimi immobilize edilmiş membranlarla enzimsiz membranlara oranla daha fazla miktarda ürenin uzaklaştırılabileceği görülmüştür. Model tahminleri çözeltinin karıştırma hızı ve ultrafiltrasyon basıncının artırılmasının uzaklaştırılan üre miktarının artmasına sebep olduğunu göstermiştir. Membranın gözenekliliğinin ve gözenek boyutunun artması daha fazla ürenin uzaklaştırılabilmesini sağlarken, membranın kalınlığındaki artış bu hızın azalmasına neden olmuştur. Farklı immobilizasyon tekniklerinin ve koşullarının uygulanması ile enzimin maksimum reaksiyon hızındaki ve membrana adsorbe olan enzim miktarındaki değişimin etkisinde incelenmiştir. Model tahminleri enzim tabakasının kalınlığındaki ve enzimin maksimum reaksiyon hızındaki artışın daha fazla ürenin parçalanmasına neden olduğunu, böylece ürenin ortamdaki daha hızlı bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermiştir. Model tahminlerinin doğruluğu; toplama çözeltisinde ölçülen üre miktarı ile modelden hesaplanan üre miktarları karşılaştırılarak test edilmiştir. Modelin deneysel verileri yeterince doğru tahmin edebildiği bulunmuştur.

Bu çalışmada uygulanan polielektrolit destekli enzim immobilizasyonu, hem çevre kirliliğine yol açabilecek, hem de enzimin aktivitesinde azalmaya neden olabilecek kimyasalların kullanımına gerek duyulmayan, ucuz ve basit bir immobilizasyon yöntemidir. Yapılan tüm ölçümler dikkate alındığında, üreaz immobilizasyonu için en iyi destek malzemesinin PAN+PEI+CHI membranı olduğu bulunmuştur.



## VII. KAYNAKLAR

AKGÖL S., Yalçinkaya Y, Bayramoğlu G., Denizli A., Yakup Arica M., Reversible immobilization of urease onto Procion Brown MX-5BR-Ni(II) attached polyamide hollow-fibre membranes, *Process Biochemistry*, 38, 5, 675-683, (2002)

ARICA M. Y., Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: Covalently bound urease in a continuous model system, *Journal of Applied Polymer Science*, 77, 9, 2000-2008, (2000).

BAILEY J.E., Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition, McGraw-Hill International Editions, New York, (1986). Pp. 181-189.

BARAN Teke A., Hamarat Baysal Ş., Immobilization of urease using glycidyl methacrylate grafted nylon-6-membranes, *Process Biochemistry*, 42, 3, 439-443, (2007).

BRADFORD M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, (1976).

CAO L., Immobilised enzymes: science or art, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 2, 217-226, (2005).

CASELI L., Santos Jr. D. S. D., Foschini M., Gonçalves D., Oliveira Jr. O. N., The effect of the layer structure on the activity of immobilized enzymes in ultrathin films, *Journal of Colloid and Interface Science*, 303, 326–331, (2006).

CASELI L., Santos Jr. D. S. D., Foschini M., Gonçalves D., Oliveira Jr. O. N., Control of catalytic activity of glucose oxidase in layer-by-layer films of chitosan and glucose oxidase, *Materials Science and Engineering C*, 27, 1108-1110, (2007).

CHIA H.T., Hwang C.D., Kinetic study of urea hydrolysis by urease immobilized with bovine serum albumin and glutaraldehyde on polyurethane foam, *J. Chem. Eng.*, 25, 458-462, (1992).

DUMITRIU S., Popa M., Artenie V., Dan F., Bioactive polymers. 56: Urease immobilization on carboxymethylcellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 3, 283-290, (1989).

EL-SHERIF H., Martelli P. L., Casadio R., Portaccio M., Bencivenga U., Mita D. G., Urease immobilisation on chemically grafted nylon membranes: Part 1: Isothermal characterization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14, 1,3, 15-29, (2001).

FAHMY A.S., Bagos V.B., Mohammed T.M., Immobilization of *Citrullus vulgaris* urease on cyanuric chloride DEAE-cellulose ether: preparation and properties, *Biores. Technology*, 64, 121-129, (1998).

GABROVSKA K., Georgieva A., Godjevargova T., Stoilova O., Manolova N., Poly(acrylonitrile)chitosan composite membranes for urease immobilization, *Journal of Biotechnology*, 129, 4, 674-680, (2007).

GEORGE S., Chellapandian M., Sivasankar B., Jayaraman K., A new process for the treatment of fertilizer effluent using immobilized urease, *Bioprocess Eng*, 16, 83-85, (1997).

Giorno L., Drioli, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, *Trends in Biotechnology*, 18, 339-349, (2000).

GODJEVARGOVA Ts., Dimov A., Immobilization of urease onto membranes of modified acrylonitrile copolymer, *Journal of Membrane Science*, 135, 1, 93-98, (1997).

GODJEVARGOVA T., Gabrovska K., Kinetic parameters of urease immobilized on modified acrylonitrile copolymer membranes in the presence and absence of Cu(II) ions, *Macromolecular Bioscience*, 5, 5, 459-466, (2005).

GODJEVARGOVA T., Gabrovska K., Influence of matrix on external mass transfer resistance in immobilized urease membranes, *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 338-342, (2006)

HO C.C., Zydney A.L., A combined pore blockage and cake filtration model for protein fouling during microfiltration, *Journal of Colloid and Interface Science*, 232, 389-399, (2000).

HSIUE G.-H., Wang C.-C., Chen C.-Y., Chang C.-J., Urease immobilized polyethylene-g-acrylic acid membrane for urea sensor, *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 179, 1, 149-156, (1990).

HUANG T.C., Chen D.H., A study on the removal of urea from aqueous solution with immobilized urease and electro dialysis, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 55, 2, 191-199, (1992).

JESPERSEN N.D., Thermochemical study of the hydrolysis of urea by urease, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 7, 1662-1667, (1975).

JHA S. K., Topkar A., D'Souza S. F., Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN), *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 6, 1145-1150, (2008).

KRAJEWSKA B., Leszko M., Zaborska W., Membrane-immobilized urease for possible use in dialysate regeneration system of artificial kidney, *Environ Protec Eng*, 15, 173-180, (1989).

KRAJEWSKA B., Leszko M., Zaborska W., Urease immobilized on chitosan membrane: Preparation and properties, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 48, 3, 337-350, (1990).

KRAJEWSKA B., Zaborska W., Leszko M., Olech A., Urease immobilized on an aminated polysulphone membrane - inhibition by boric acid, *Acta Biotechnologica*, 17, 3, 223-230, (1997).

KRAJEWSKA B., Zaborska W., The effect of phosphate buffer in the range of pH 5.80-8.07 on jack bean urease activity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 75-81, (1999).

MARTINO S. D., El-Sheriff H., Diano N., Maio A. D., Grano V., Rossi S., Bencivenga U., Mattei A., Mita D.G., Urea removal from agricultural waste waters by means of urease immobilized on nylon membranes grafted with cyclohexyl-methacrylate, *Applied Catalysis B: Environmental*, 46, 613-629, (2003).

Milton J.M., Taylor I.E.P., The amino acid composition of jack-bean urease, *Biochem. J.*, 113, 678-680, (1969).

MIYATA T., Jikihara A., Nakamae K., Permeation decomposition of urea through asymmetrically urease-immobilized ethylene-vinyl alcohol copolymer membranes, *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 12, 1579-1588, (1997).

MOYNIHAN H.J., Lee C.K., Clark W., Wang N.-H.L., Urea hydrolysis by immobilized urease in a fixed-bed reactor: Analysis and kinetic parameter estimation, *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 7, 951-963, (1989).

OGAWA N., Kawauchi Y., Nishimura K., Sugii A., Continuous preparative method of relatively large and uniform polymer beads and their application to immobilization of urease, *Journal of Applied Polymer Science*, 35, 5, 1283-1288, (1988).

ONDA M., Lvov Y., Ariga K., Kunitake T., Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption, *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 163-167, (1996).

OPONG W.S., ZYDNEY, A.L., Diffusive and convective protein transport through asymmetric membranes, *AIChE J.*, 37, 1497-1510, (1991).

PETERSSON B. A., Enzymatic determination of urea in undiluted whole blood by flow injection analysis using an ammonium ion-selective electrode, *Analytica Chimica Acta*, 209, 239-248, (1988).

POŹNIAK G., Krajewska B., and Trochimczuk W., Urease immobilized on modified polysulphone membrane: Preparation and properties, *Biomaterials*, 16, 2, 129-134, (1995).

PRESS, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P., *Numerical Recipes*, Second Edition, Cambridge University Press, (1992), Pp. 678-680,

REJIKUMAR S., Devi S., Preparation and Characterization of Urease Bound on Crosslinked Poly(vinyl alcohol), *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 61-66, (1998).

KITANO H., Yoshijima S., ve Ise N., Kinetic study of a hollow-fiber enzyme reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2643-2653, (1980).

SUGII A., Ogawa N., Matsumoto M., Preparation of new hydrophilic poly-vinylpyridine beads and their application to immobilization of urease, *Journal of Applied Polymer Science*, 32, 5, 4931-4938, (1986).

SUN S., Yue Y., Huang X., Meng D., Protein adsorption on blood-contact membranes, *Journal of Membrane Science*, 222, 3-18, (2003).

Thomas M., Valette P., Mausset A.-L., Dejardin P., High molecular weight kininogen adsorption on hemodialysis membranes: Influence of pH and relationship with contact phase activation of blood plasma. Influence of pre-treatment with poly(ethyleneimine), *The International Journal of Artificial Organs*, 23, 1, 20-26, (2000).

WANG Y. J., Chen C. H., Hsiue G. H., Yu B. C., Urea sensor with single poly(propylene) membrane, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 3, 446-449, (1992).

WEATHERBURN M.W., Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.*, 39, 971-974, (1967).

WHITAKER J. R., Enzymes, *Food Chemistry*, 3rd edition, ed: Fennema O.R., Marcel Dekker, INC., New York, (1996), Pp: 431-529.

YANG M. C., Lin C. C., Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease, *Biomaterials*, 22, 9, 891-896, (2001).

ZABORSKA W., Krajewska B, Leszko M., Chitosan membrane with covalently immobilized urease. Pore size distribution, *Journal of Membrane Science*, 61, 279-280, (1991).

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 105M325
<b>Proje Başlığı:</b> Enzim Immobilize Edilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu:Membran Performanslarının Belirlenmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Yürütücü:Prof. Dr. Sacide Alsoy Altinkaya Araştırmacılar: Prof. Dr. Ahmet Yemenicioğlu Yılmaz Yürekli
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü Gülbahçe Köyü 35430 Urla İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> TÜBİTAK ve Fransa CNRS
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 03.02.2006 /03.04.2008
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu çalışmada üreaz enzimi polietilenimin (PEI) ve kitosan (CHI) ile modifiye edilmiş poliakrilonitril (PAN) membranları üzerine immobilize edilmiştir. PEI ve CHI ile modifikasyon PAN membranı üzerine adsorbe olan üreaz miktarını etkilemezken, aktiviteler sırayla 2 ve 1.5 kat artış göstermiştir. Membranların üreye karşı gösterdikleri kinetik performans aşağıdaki şekildedir: PAN+PEI+CHI>PAN+PEI>PAN+CHI>PAN. Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAN membranları üzerine üreaz adsorpsiyonu sonucu membranların hidrolik geçirgenlikleri önemli oranda değişmemiştir. Üreaz immobilizasyonu için en iyi destek malzemesinin PAN+PEI+CHI membranı olduğu bulunmuştur.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Üreaz; immobilizasyon; polietilenimin; kitosan; poliakrilonitril; ultrafiltrasyon; matematik model.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b>