

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA DOKTORA PROGRAMI**  
**2021-DR-005**

**LİPAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN**  
**KO-İMMOBİLİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN**  
**ARITILMASINDA KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI**

**ÇAĞDAŞ SUNNA**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ADU-FEF-15042 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2021**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren, bilgi birikimi, deneyimi ve yönlendirmeleri ile akademisyenliği, bilimsel çalışma temellerini ve bilimsel etiği bana öğreten, akademik hayatım boyunca hoşgörü ile her konuda fikir ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam, sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hoşgörü ve sabırlı yaklaşımları ile Tez İzleme Komitemde sundukları katkılardan dolayı CBÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Tülin AYDEMİR'e ve ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Kubilay METİN'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında fikirleriyle bana yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN ve sayın Prof. Dr. Murat UYGUN'a teşekkür ederim. Laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum destek, saygı ve sevgisini eksik etmeyen kardeşim olarak gördüğüm Araş. Gör. Dr. Rukiye YAVAŞER'e teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım; Onur KORKMAZ, Bernis GİRGİN KORKMAZ, Sinem EVLİ, Hande ERDOĞDU, Ulviye KİLİMCİ, Melis BAYRAKTAROĞLU ve Baha ÖNDEŞ'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı ADU-FEF-15042 No'lu Bilimsel Araştırma Projesi olarak destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve olanaklarından faydalandığım Kimya Bölümü Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Son olarak, tüm süreç boyunca bana maddi ve manevi tüm desteklerini sunan ve her koşulda yanımda olan aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

Çağdaş SUNNA

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
RESİMLER DİZİNİ .....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
ÖZET .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. İmmobilizasyon .....	3
1.2.1. Enzim İmmobilizasyonu.....	4
1.2.1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	5
1.2.1.1.1. Kovalent Bağlama .....	7
1.2.1.1.2. Adsorbsiyon.....	8
1.2.1.1.3. Tutuklama.....	8
1.2.1.1.4. Çapraz Bağlama.....	9
1.2.1.2. Destek Materyalleri .....	9
1.2.1.2.1. Manyetik Taşıyıcılar .....	11
1.3. Ko-immobilizasyon .....	11
1.4. Aljinat.....	13
1.5. Kitosan.....	15
1.6. Lipazlar.....	17

1.7. Peroksidazlar .....	20
1.7.1. Yaban Turbu (Horseradish= <i>Armoracia rusticana</i> ) Peroksidazı.....	23
1.8. Endüstriyel Atık Sular .....	24
1.8.1. Zeytin Karasuyu .....	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	29
2.1. Peroksidaz İmmobilizasyon Çalışmaları .....	29
2.2. Lipaz İmmobilizasyon Çalışmaları.....	33
2.3. Ko-immobilizasyon Çalışmaları.....	38
2.4. Enzimatik Atık Su Arıtım Çalışmaları .....	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1. Materyal.....	53
3.2. Yöntem.....	54
3.2.1. Boncukların Üretimi.....	54
3.2.1.1. Boncuk Üretiminin Optimizasyonu.....	54
3.2.1.2. Boncukların Karakterizasyonu .....	56
3.2.1.3. Boncukların Mekanik Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	57
3.2.2. Serbest Yaban Turbu Peroksidaz (HRP) Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini.....	58
3.2.3. Serbest HRP Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	59
3.2.3.1. Serbest HRP Enziminin Lipaz ve p-Nitrofenil Laurat (pNPL) Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	61
3.2.4. Serbest Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini.....	62
3.2.5. Serbest Lipaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	64
3.2.5.1. Serbest Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	65
3.2.6. Aljinat ve Manyetik Aljinat Boncuklara HRP ve Lipaz İmmobilizasyonu, HRP ve Lipaz Ko-immobilizasyonu.....	66

3.2.7. Aljinat/Kitosan ve Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuklara HRP ve Lipaz İmmobilizasyonu, HRP ve Lipaz Ko-immobilizasyonu .....	67
3.2.8. Sığır Serum Albümin (BSA) Standart Grafiğinin Hazırlanması .....	67
3.2.9. Boncuklara Enzim Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	68
3.2.10. İmmobilize HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini .....	68
3.2.11. İmmobilize HRP Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini .....	70
3.2.11.1. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin pNPL Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	71
3.2.12. İmmobilize Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini .....	72
3.2.13. İmmobilize Lipaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini .....	73
3.2.13.1. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Pyrogallol Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini.....	74
3.2.14. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılık Tayini .....	76
3.2.15. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının Tayini .....	76
3.2.16. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılık Tayini .....	77
3.2.17. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılık Tayini .....	77
3.2.18. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılık Tayini .....	77
3.2.19. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılık Tayini.....	78
3.2.20. Boş Boncukların Sentetik Boya Adsorbsiyon Kapasitelerinin Tayini .....	78
3.2.21. Serbest HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Gideriminin Tayini .....	79
3.2.22. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Gideriminin Tayini.....	79
3.2.23. Gallik Asit Standart Grafiğinin Hazırlanması .....	79
3.2.24. Serbest HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Giderim Tayini..	80
3.2.25. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Giderim Tayini.....	80
3.2.26. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Gideriminde Tekrar Kullanılabilirliğinin Tayini .....	81

3.2.27. Serbest Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasitesinin Tayini .....	81
3.2.28. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasitelerinin Tayini .....	82
3.2.29. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidrolizinde Tekrar Kullanılabilirliğinin Tayini .....	82
4. BULGULAR .....	84
4.1. Boncukların Görüntülenmesi.....	84
4.2. Boncukların Karakterizasyonu .....	87
4.2.1. SEM Fotoğrafları .....	87
4.2.2. FTIR Spektrumları.....	90
4.3. Boncukların Mekanik Kararlılıkları .....	93
4.4. Serbest HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları .....	97
4.5. Serbest HRP Enziminin Kinetik Parametreleri.....	98
4.6. Serbest HRP Enziminin Lipaz ve pNPL Varlığında Kinetik Parametreleri .....	98
4.7. Serbest Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları .....	99
4.8. Serbest Lipaz Enziminin Kinetik Parametreleri .....	101
4.9. Serbest Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Varlığında Kinetik Parametreleri.....	101
4.10. Sığır Serum Albümin (BSA) Standart Grafiği .....	103
4.11. Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri .....	103
4.11.1. Aljinat ve Manyetik Aljinat Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri .....	103
4.11.2. Aljinat/Kitosan ve Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri.....	106
4.12. İmmobilize HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları.....	109
4.13. İmmobilize HRP Enziminin Kinetik Parametreleri.....	113
4.14. Ko-immobilize HRP Enziminin Lipaz ve pNPL Varlığında Kinetik Parametreleri .....	116
4.15. İmmobilize Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları .....	122
4.16. İmmobilize Lipaz Enziminin Kinetik Parametreleri.....	126

4.17. Ko-immobilize Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Varlığında Kinetik Parametreleri.....	128
4.18. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları .....	134
4.19. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları .....	135
4.20. Serbest HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılıkları .....	139
4.21. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılıkları .....	140
4.22. Serbest HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları .....	145
4.23. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları.....	146
4.24. Boş Boncukların Sentetik Boya Adsorbsiyon Kapasiteleri .....	150
4.25. Serbest HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Giderimi .....	151
4.26. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Giderimi.....	152
4.27. Gallik Asit Standart Grafiği.....	156
4.28. Serbest HRP Enziminin ve Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyundan Total Fenolik Bileşik Giderimi .....	156
4.29. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyundan Total Fenolik Bileşik Gideriminde Tekrar Kullanılabilirliği.....	157
4.30. Serbest Lipaz Enzimi ve HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasiteleri .....	158
4.31. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidrolizinde Tekrar Kullanılabilirliği .....	159
5. TARTIŞMA.....	160
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	182
KAYNAKLAR.....	185
BİLİMSEL ETİK BEYANI .....	203
ÖZGEÇMİŞ.....	204

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ΔA</b>	: Absorbans Farkı
<b>ABTS</b>	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)
<b>ADÜ</b>	: Adnan Menderes Üniversitesi
<b>AG</b>	: α-Glukozidaz
<b>BAH</b>	: Bisaril Hidrazon
<b>bIOMNP</b>	: Biyolojik Yöntemle Sentezlenmiş Manyetik Nanopartikül
<b>BOD</b>	: Biyokimyasal Oksijen Talebi
<b>BPA</b>	: Bisfenol A
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albümin
<b>BUÜ</b>	: Bursa Uludağ Üniversitesi
<b>CALB</b>	: <i>Candida antarctica</i> Lipaz B
<b>CBÜ</b>	: Celal Bayar Üniversitesi
<b>CCEE</b>	: Elektrostatik Tutuklama
<b>CHIT</b>	: Kitosan
<b>ChOx</b>	: Kolesterol Oksidaz
<b>cMNP</b>	: Kimyasal Yöntemle Sentezlenmiş Manyetik Nanopartikül
<b>CMNP</b>	: Kitosan Kaplı Manyetik Nanopartiküller
<b>CMPS</b>	: Katyonik Mikro Gözenekli Nişasta
<b>CNT</b>	: Karbon Nanotüp
<b>CNZ</b>	: Bakır Nanzim
<b>COD</b>	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
<b>CRL</b>	: <i>Candida rugosa</i> Lipazı
<b>Cs</b>	: Kitosan
<b>CsGOn</b>	: Yeşil Nano Adsorban



<b>CuONS</b>	: Bakır Oksit Nanotabaka
<b>DKR</b>	: Dinamik Kinetik Çözünürlük
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DY12</b>	: Direct Yellow 12
<b>E1</b>	: Estron
<b>E2</b>	: 17- $\beta$ -Estradiol
<b>E3</b>	: Estriol
<b>EE2</b>	: 17- $\alpha$ -Etinilestradiol
<b>ESM</b>	: Yumurta Kabuğu Zarı
$\epsilon$	: Molar Absorbsiyon Katsayısı
<b>FPSW</b>	: Balık İşleme Katı Atığı
<b>FTIR</b>	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
<b>G6P</b>	: Glukoz-6-Fosfat
<b>GdmHCL</b>	: Guanidinyum Hidroklorür
<b>GK</b>	: Gliserol Kinaz
<b>GO</b>	: Grafen Oksit
<b>GO<sub>x</sub></b>	: Glukoz Oksidaz
<b>GPO</b>	: Gliserol-3-Fosfat Oksidaz
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>HRP</b>	: Yaban Turbu Peroksidazı
<b>LDH</b>	: Laktat Dehidrogenaz
<b>LiP</b>	: Lignin Peroksidaz
<b>LOD</b>	: Laktat Oksidaz
<b>MCF</b>	: Mezogözenekli Silis Köpük
<b>MNP</b>	: Manyetik Nanopartiküller
<b>MO</b>	: Metil Orange

<b>mPEG</b>	: Polietilen Glikol Metil Esteri
<b>MPS</b>	: Mikro Gözenekli Nişasta
<b>MWCNT</b>	: Modifiye Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
<b>NPG</b>	: Nanogözenekli Altın
<b>O&amp;G</b>	: Yağ ve Gres
<b>OMWW</b>	: Zeytin Karasuyu
<b>OPD</b>	: o-Fenilendiamin
<b>PAN</b>	: Poliakrilonitril
<b>PANI</b>	: Polianilin Film
<b>PDSM</b>	: Polidimetiloksan
<b>PFM</b>	: Poli(metil metakrilat ko-etil akrilat) Lifli Membranlar
<b>PGM</b>	: Fosfoglukomutaz
<b>PLA</b>	: Poliaktik Asit
<b>PMMA</b>	: Poli(metil metakrilat)
<b>PMMA CEA</b>	: Poli(metil metakrilat ko-etil akrilat)
<b>pNPL</b>	: p-Nitrofenil Laurat
<b>pNPP</b>	: p-Nitrofenil Palmitat
<b>PNT</b>	: Peptit Nanotüp
<b>POD</b>	: Peroksidaz
<b>PTL</b>	: Faz Geçişli Lizozim
<b>PVC</b>	: Polivinil Klorür
<b>PyOx</b>	: Piranoz Oksidaz
<b>RSM</b>	: Yanıt Yüzey Morfolojisi
<b>SBP</b>	: Soya Fasülyesi Peroksidazı
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SF-MNP</b>	: Yüzey İşlevli Manyetik Nanopartikül

<b>SNF</b>	: Silikon Nanofilament
<b>SYA</b>	: Serbest Yağ Asidi
<b>T</b>	: Sıcaklık
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>TEOS</b>	: Tetraetil Ortosilikat
<b>TG</b>	: Trigliserit
<b>TGA</b>	: Termogravimetrik Analiz
<b>U</b>	: Enzim Ünitesi
<b>UV</b>	: Ultraviyole Spektroskopisi
<b>XRD</b>	: X Işını Kristalografisi
<b><math>\alpha</math>GP</b>	: Glukan Fosforilaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzim immobilizasyon yöntemleri. ....	6
Şekil 2. Manyetik nanopartikül ( $Fe_3O_4$ ) sentezi ve kitosan-mPEG (kitosan-polietilen glikol metil esteri) ile immobilizasyonu.....	11
Şekil 3. Glukoz oksidaz (GOx) ve yaban turbu peroksidazın (HRP) katalitik reaksiyonları...	12
Şekil 4. Aljinatın mannuronik asit birimleri (M), glukuronik asit birimleri (G) ve moleküler yapısı. ....	13
Şekil 5. Aljinatın kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ile çapraz bağlanması ve çapraz bağlanmış kalsiyum aljinat jel oluşumu. ....	14
Şekil 6. Kitinin moleküler yapısı.....	16
Şekil 7. Kitosanın moleküler yapısı. ....	16
Şekil 8. <i>Aspergillus niger</i> lipaz enziminin üç boyutlu yapısı ve aktif merkezinin yapı üzerindeki konumu.....	19
Şekil 9. Lipaz enzimlerinin katalitik mekanizması. ....	19
Şekil 10. Peroksidaz enzimlerinin katalitik mekanizması.....	21
Şekil 11. Peroksidaz enzimlerinin <i>hem</i> yapısı.....	22
Şekil 12. Horseradish peroksidaz enzimin üç boyutlu yapısı, aktif merkez, protoporfirin IX ve demir (III) gruplarının yapı üzerindeki konumu. ....	23
Şekil 13. Zeytinyağı üretim işlemi ve karasuyun oluşumu. ....	26
Şekil 14. Aljinat boncukların FTIR spektrumu.....	90
Şekil 15. Manyetik aljinat boncukların FTIR spektrumu.....	91
Şekil 16. Aljinat/kitosan boncukların FTIR spektrumu. ....	91
Şekil 17. Manyetik aljinat/kitosan boncukların FTIR spektrumu. ....	91
Şekil 18. Aljinatın FTIR spektrumu.....	92
Şekil 19. Kitosanın FTIR spektrumu.....	92
Şekil 20. $Fe_3O_4$ 'ün FTIR spektrumu. ....	92

Şekil 21. Serbest HRP enziminin optimum pH grafiği. ....	97
Şekil 22. Serbest HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	97
Şekil 23. Serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	98
Şekil 24. Lipaz varlığında serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	99
Şekil 25. Lipaz ve pNPL varlığında serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	99
Şekil 26. Serbest lipaz enziminin optimum pH grafiği. ....	100
Şekil 27. Serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	100
Şekil 28. Serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	101
Şekil 29. HRP varlığında serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	102
Şekil 30. HRP ve pyrogallol varlığında serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği...	102
Şekil 31. Sığır serum albümin standart grafiği.....	103
Şekil 32. Aljinat boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	104
Şekil 33. Aljinat boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	104
Şekil 34. Aljinat boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi..	104
Şekil 35. Manyetik aljinat boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi	105
Şekil 36. Manyetik aljinat boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi	105
Şekil 37. Manyetik aljinat boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	106
Şekil 38. Aljinat/kitosan boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. .	106
Şekil 39. Aljinat/kitosan boncuklara lipaz enzimi yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	107
Şekil 40. Aljinat/kitosan boncuklara HRP ve lipaz enzimlerinin birlikte yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	107
Şekil 41. Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	108
Şekil 42. Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi. ....	108

<b>Şekil 43.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi.....	108
<b>Şekil 44.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği. ....	109
<b>Şekil 45.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği.	109
<b>Şekil 46.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği....	110
<b>Şekil 47.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği. ....	110
<b>Şekil 48.</b> Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği.....	111
<b>Şekil 49.</b> Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği. ....	111
<b>Şekil 50.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği. ....	112
<b>Şekil 51.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	112
<b>Şekil 52.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği.	113
<b>Şekil 53.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	114
<b>Şekil 54.</b> Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	115
<b>Şekil 55.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	115
<b>Şekil 56.</b> Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	116
<b>Şekil 57.</b> Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği. ....	117
<b>Şekil 58.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	117

<b>Şekil 59.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği.....	118
<b>Şekil 60.</b> Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	119
<b>Şekil 61.</b> Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği.....	119
<b>Şekil 62.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	120
<b>Şekil 63.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği.....	121
<b>Şekil 64.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği. ....	122
<b>Şekil 65.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.	122
<b>Şekil 66.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği.....	123
<b>Şekil 67.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	123
<b>Şekil 68.</b> Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği.....	124
<b>Şekil 69.</b> Aljinat/Kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	124
<b>Şekil 70.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği.....	125
<b>Şekil 71.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	125
<b>Şekil 72.</b> Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.	126
<b>Şekil 73.</b> Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	127
<b>Şekil 74.</b> Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	127

<b>Şekil 75.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	128
<b>Şekil 76.</b> Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	129
<b>Şekil 77.</b> Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği. ....	129
<b>Şekil 78.</b> Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	130
<b>Şekil 79.</b> Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği. ....	131
<b>Şekil 80.</b> Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	131
<b>Şekil 81.</b> Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği. ....	132
<b>Şekil 82.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği. ....	133
<b>Şekil 83.</b> Manyetik aljinat/ kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği. ....	133
<b>Şekil 84.</b> Serbest HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	135
<b>Şekil 85.</b> Serbest lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	135
<b>Şekil 86.</b> Aljinat boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	136
<b>Şekil 87.</b> Aljinat boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	136
<b>Şekil 88.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	137
<b>Şekil 89.</b> Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği. ....	137



<b>Şekil 90.</b> Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısı kararlılık grafiği. ....	138
<b>Şekil 91.</b> Aljinat/Kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipazın farklı sıcaklıklardaki ısı kararlılık grafiği. ....	138
<b>Şekil 92.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısı kararlılık grafiği. ....	139
<b>Şekil 93.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısı kararlılık grafiği. ....	139
<b>Şekil 94.</b> Serbest HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	140
<b>Şekil 95.</b> Serbest lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	140
<b>Şekil 96.</b> Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	141
<b>Şekil 97.</b> Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	141
<b>Şekil 98.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	142
<b>Şekil 99.</b> Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	142
<b>Şekil 100.</b> Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	143
<b>Şekil 101.</b> Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipazın farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	143
<b>Şekil 102.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	144
<b>Şekil 103.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği. ....	144
<b>Şekil 104.</b> Serbest HRP enziminin depo kararlılık grafiği. ....	145
<b>Şekil 105.</b> Serbest lipaz enziminin depo kararlılık grafiği. ....	145

<b>Şekil 106.</b> Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği. ....	146
<b>Şekil 107.</b> Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği. ....	146
<b>Şekil 108.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği. ....	147
<b>Şekil 109.</b> Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği. ....	147
<b>Şekil 110.</b> Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği. ....	148
<b>Şekil 111.</b> Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği. ....	148
<b>Şekil 112.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği. ....	149
<b>Şekil 113.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği. ....	149
<b>Şekil 114.</b> Gallik asit standart grafiği. ....	156
<b>Şekil 115.</b> Serbest HRP enziminin ve lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin total fenolik bileşik giderimi. ....	157
<b>Şekil 116.</b> Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin total fenolik bileşik giderimi için kullanım sayısı. ....	157
<b>Şekil 117.</b> Serbest lipaz ve HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidroliz kapasiteleri ....	158
<b>Şekil 118.</b> HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidrolizi için kullanım sayısı. ....	159

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Örnek 2, 3 ve 4'ün fotoğrafları. ....	84
<b>Resim 2.</b> Örnek 6, 7 ve 8'in fotoğrafları. ....	84
<b>Resim 3.</b> Örnek 10, 11 ve 12'nin fotoğrafları. ....	85
<b>Resim 4.</b> Örnek 14, 15 ve 16'nın fotoğrafları. ....	85
<b>Resim 5.</b> Örnek 18, 19 ve 20'nin fotoğrafları. ....	85
<b>Resim 6.</b> Örnek 22, 23 ve 24'ün fotoğrafları. ....	86
<b>Resim 7.</b> Örnek 25, 26 ve 27'nin fotoğrafları. ....	86
<b>Resim 8.</b> Örnek 28, 29 ve 30'un fotoğrafları. ....	86
<b>Resim 9.</b> Manyetik aljinat ve manyetik aljinat/kitosan boncukların fotoğrafları.....	87
<b>Resim 10.</b> Boş aljinat boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları. ....	87
<b>Resim 11.</b> Boş manyetik aljinat boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları.....	88
<b>Resim 12.</b> Boş aljinat/kitosan boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları.....	88
<b>Resim 13.</b> Boş manyetik aljinat/kitosan boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları.....	88
<b>Resim 14.</b> HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş aljinat boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları. ....	89
<b>Resim 15.</b> HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş manyetik aljinat boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları.....	89
<b>Resim 16.</b> HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş aljinat/kitosan boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları. ....	89
<b>Resim 17.</b> HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş manyetik aljinat/kitosan boncukların 250 kat ve 1000 kat büyütülmüş SEM fotoğrafları.....	90
<b>Resim 18.</b> Örnek 2, 3 ve 4'ün deneme sonundaki görünüşleri.....	94
<b>Resim 19.</b> Örnek 6, 7 ve 8'in deneme sonundaki görünüşleri.....	94

<b>Resim 20.</b> Örnek 10, 11 ve 12'nin deneme sonundaki görünümüleri.....	94
<b>Resim 21.</b> Örnek 14, 15 ve 16'nın deneme sonundaki görünümüleri.....	95
<b>Resim 22.</b> Örnek 18, 19 ve 20'nin deneme sonundaki görünümüleri.....	95
<b>Resim 23.</b> Örnek 22, 23 ve 24'ün deneme sonundaki görünümüleri.....	95
<b>Resim 24.</b> Örnek 25, 26 ve 27'nin deneme sonundaki görünümüleri.....	96
<b>Resim 25.</b> Örnek 28, 29 ve 30'un deneme sonundaki görünümüleri.....	96
<b>Resim 26.</b> Manyetik aljinat ve manyetik aljinat/kitosan boncukların deneme sonundaki görünümüleri.....	96

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.</b> Ticari olarak kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları.....	2
<b>Çizelge 2.</b> İmmobilize enzimlerin avantajları ve dezavantajları. ....	5
<b>Çizelge 3.</b> Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri.....	10
<b>Çizelge 4.</b> Bazı lipaz kaynakları.....	18
<b>Çizelge 5.</b> Bazı lipaz kaynakları ve o kaynaktan elde edilen lipazın optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri. ....	20
<b>Çizelge 6.</b> Bazı peroksidazların kaynakları ve kullanım alanları.....	22
<b>Çizelge 7.</b> Boş boncukların optimizasyon çalışmasında kullanılan kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> ), aljinat ve kitosan yüzde (w/v) derişimleri.....	56
<b>Çizelge 8.</b> Serbest HRP enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.....	58
<b>Çizelge 9.</b> Serbest HRP enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları. ....	59
<b>Çizelge 10.</b> Serbest HRP enziminin kinetik parametrelerinin tayini için işlem basamakları. .	60
<b>Çizelge 11.</b> Lipaz varlığında serbest HRP aktivitesinin tayini için işlem basamakları.....	61
<b>Çizelge 12.</b> Lipaz ve pNPL varlığında serbest HRP aktivitesinin tayini için işlem basamakları....	62
<b>Çizelge 13.</b> Serbest lipaz enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.....	63
<b>Çizelge 14.</b> Serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları. ....	63
<b>Çizelge 15.</b> Serbest Lipaz enziminin kinetik parametrelerinin tayini için işlem basamakları. .	64
<b>Çizelge 16.</b> HRP varlığında serbest lipazın aktivite tayini için işlem basamakları.....	65
<b>Çizelge 17.</b> HRP ve pyrogallol varlığında serbest lipazın aktivite tayini için işlem basamakları....	66
<b>Çizelge 18.</b> İmmobilize HRP enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları. ....	69
<b>Çizelge 19.</b> İmmobilize HRP enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.....	69
<b>Çizelge 20.</b> İmmobilize HRP enziminin kinetik parametrelerin tayini için işlem basamakları.....	70

<b>Çizelge 21.</b> Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin aktivite tayini işlem basamakları.....	71
<b>Çizelge 22.</b> Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL substratı varlığında aktivite tayini işlem basamakları.....	72
<b>Çizelge 23.</b> İmmobilize lipaz enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.....	73
<b>Çizelge 24.</b> İmmobilize lipaz enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.....	73
<b>Çizelge 25.</b> İmmobilize lipaz enziminin kinetik parametrelerin tayini için işlem basamakları.....	74
<b>Çizelge 26.</b> HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin aktivite tayini işlem basamakları.....	75
<b>Çizelge 27.</b> HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında aktivite tayini işlem basamakları.....	75
<b>Çizelge 28.</b> Farklı bileşen yüzdeleri ile üretilen boncukların mekanik kararlılıkları.....	93
<b>Çizelge 29.</b> İmmobilize ve serbest HRP enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri.....	113
<b>Çizelge 30.</b> İmmobilize, ko-immobilize ve serbest HRP enzimlerinin kinetik parametreleri..	121
<b>Çizelge 31.</b> İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri.....	126
<b>Çizelge 32.</b> İmmobilize, ko-immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin kinetik parametreleri..	134
<b>Çizelge 33.</b> Boş boncukların sentetik boya adsorbsiyon kapasiteleri.....	150
<b>Çizelge 34.</b> Serbest HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.....	151
<b>Çizelge 35.</b> Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.....	152
<b>Çizelge 36.</b> Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.....	153
<b>Çizelge 37.</b> Aljinat/kitosan boncuklara ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.....	154
<b>Çizelge 38.</b> Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.....	155

## ÖZET

### LİPAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN KO-İMMOBİLİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN ARITILMASINDA KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI

Sunna Ç. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2021.

**Amaç:** Bu çalışma yaban turbu peroksidazı (HRP) ve *Aspergillus niger* lipazı enzimlerinin manyetik olmayan ve manyetik doğal polimerler üzerine ko-immobilizasyonu ve endüstriyel atık suların arıtılmasında kullanılmasının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Ko-immobilizasyon aljinat ve kitosan temelli manyetik ve manyetik olmayan boncuklarda gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. Isıl, pH ve depo kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Immobilize HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi incelenmiştir. Endüstriyel atık su uygulama örneği olarak seçilen zeytin karasuyunda fenolik bileşik giderimi ve zeytinyağının lipaz hidroliziyle yağ asitlerine yıkımı araştırılmıştır. Ayrıca zeytin karasuyunda tekrar kullanılabilirlik denemeleri gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Serbest ve ko-immobilize enzimlerin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametrelerinde belirgin farklar olmadığı görülmüştür. Enzimlerin birbiri yanında katalitik reaksiyonlarını katalizlediği tespit edilmiştir. Immobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyasla depolama süresi, sıcaklık ve pH gibi ortam şartlarına daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Serbest ve ko-immobilize HRP enzimlerinin sentetik boya örneklerinde renk gideriminin %40-60; zeytin karasuyunda fenolik bileşik gideriminin %60-75 aralığında olduğu bulunmuştur. Zeytin karasuyunda zeytinyağının lipaz hidroliziyle yağ asitlerine yıkımı başarılı olmuştur.

**Sonuç:** Bu çalışmada HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin doğal polimer üzerine ko-immobilizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş; boya örneklerinde renk giderimi, total fenolik bileşik giderimi ve zeytinyağının yağ asitlerine yıkımında kullanımı incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** HRP, Lipaz, Ko-immobilizasyon, Atık Su Arıtımı, Zeytin Karasuyu.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF CO-IMMOBILIZATION OF LIPASE AND PEROXIDASE AND THEIR USE FOR TREATMENT OF INDUSTRIAL EFFLUENT

Sunna Ç. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Chemistry Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2021.

**Objective:** This research was carried out to investigate co-immobilization of horseradish peroxidase (HRP) and *Aspergillus niger* lipase enzymes onto non-magnetic and magnetic natural polymers and their use in the treatment of industrial wastewater.

**Material and Methods:** Co-immobilization was performed on alginate and chitosan based magnetic and non-magnetic beads. Optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters of free and immobilized enzymes were determined. Thermal, pH and storage stability studies were carried out. Decolorization of synthetic dye samples using immobilized HRP enzyme was investigated. Removal of phenolic compounds from olive oil mill wastewater for industrial application and the degradation of olive oil to fatty acids through lipase hydrolysis were investigated. In addition, reusability tests were carried out in olive oil mill wastewater.

**Results:** It was observed that there were no significant differences in the optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters of free and co-immobilized enzymes. It has been determined that each enzymes catalyze its specific reaction in the vicinity of the other enzyme. Immobilized enzymes were more resistant to environmental conditions such as storage duration, temperature and pH compared to free enzymes. It was measured that with free and co-immobilized HRP enzymes decolorization of synthetic dye samples was 40-60%; the phenolic compound removal in olive black water was in the range of 60-75%. The degradation of olive oil into fatty acids by lipase hydrolysis was successful in olive oil mill wastewater.

**Conclusion:** In this study, co-immobilization of HRP and *A. niger* lipase enzymes onto natural polymer was performed successfully; decolorization, total phenolic compound removal and the use of olive oil in the degradation of fatty acids were investigated.

**Keywords:** HRP, Lipase, Co-immobilization, Wastewater Treatment, Olive Mill Wastewater.



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzimler

Enzimler, canlı sistemlerdeki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapıdaki biyokatalizörlerdir. Uygun koşullar altında çok yüksek substrat spesifikliğı ile reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahip olan enzimler, hücre içinde meydana gelen çok sayıda farklı biyokimyasal reaksiyonu kataliz ederler. Bu yeteneğın hücre dışında da geçerli olduğı farkedildiğinden beri, enzimler biyoteknoloji ve ilgili alanlarda kullanım bulmaktadır. Bunun sonucu olarak hücrelerde oldukça önemli metabolik reaksiyonlarda katalizör görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir.

Enzimin ürüne dönüştürdüğü moleküle substrat adı verilir. Enzimler substratları için oldukça spesifiktirler ve her enzim sadece kendi substrat ve/veya substratlarını ürüne dönüştürebilmektedir. Her katalizör gibi enzimler de bir tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek çalışır ve böylece tepkimenin hızını ciddi bir şekilde arttırlar. Endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimler bitki, hayvan ve çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedirler (Yetim vd., 2019). Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin tercih edilmesindeki en önemli sebepler bol miktarda, ucuz ve kolay elde edilebilmeleridir. Buna ilaveten mikroorganizma kaynaklı enzimler bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha yüksek katalitik aktivite göstermektedir (Kirk vd., 2002).

Günümüzde enzimler süt üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde görev alarak gıda endüstrisinde; protein ve yağ atıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde ve atık arıtım işlemlerinde; deri ve iplik işlenmesini kolaylaştırarak tekstil endüstrisinde ayrıca teşhis ve tedavi amacıyla da tıpta sıklıkla kullanılmaktadırlar. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Kıran vd., 2006). Çizelge 1'de ticari olarak kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları listelenmiştir.

**Çizelge 1.** Ticari olarak kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları (Kirk vd., 2002).

<b>Endüstri Alanı</b>	<b>Enzim</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>Deterjan Endüstrisi</b>	Proteaz Amilaz Lipaz Selülaz	Protein kalıntısı uzaklaştırma Nişasta kalıntısı uzaklaştırma Lipid kalıntısı uzaklaştırma Renk açma
<b>Nişasta Endüstrisi</b>	Amilaz Amiloglukozidaz Glukoz İzomeraz	Nişastayı parçalama Nişastayı parçalama Glukoz-Fruktoz dönüşümü
<b>Yiyecek Endüstrisi</b>	Proteaz Lipaz Laktaz Pektinaz Transglutaminaz	Bebek maması yapımı Peynir yapımı Laktöz uzaklaştırma Meyveli ürünlerin işlenmesi Visko-Elastik modifikasyon
<b>Fırıncılık Endüstrisi</b>	Amilaz Ksilanaz Lipaz ve Fosfolipaz Glukoz Oksidaz Lipoksigenaz Proteaz	Ekmek yapımı Hamur iyileştirme Hamur iyileştirme Hamur sertleştirme Ekmek beyazlatma Bisküvi ve kurabiye yapımı
<b>Hayvan Yemi Endüstrisi</b>	Fitaz $\beta$ -Glukanaz Ksinalaz	Fitatın sindirilebilirliği Sindirilebilirlik artırma Sindirilebilirlik artırma
<b>İçecek Endüstrisi</b>	Pektinaz Amilaz $\beta$ -Glukanaz Asetolaktat Dekarboksilaz Lakkaz	Depektinizasyon Düşük kalorili içecek üretimi Mayşeleme Birada olgunlaştırma Berraklaştırma
<b>Tekstil Endüstrisi</b>	Selülaz Amilaz Pektat Liyaz Katalaz Lakkaz Peroksidaz	Pamuk yumuşatma Haşıl sökme Aşındırma Beyazlatma ve ağartma Beyazlatma ve ağartma Boya giderimi
<b>Kağıt Endüstrisi</b>	Lipaz Proteaz Amilaz Ksilanaz Selülaz	Kontaminasyon kontrolü Biyofilm uzaklaştırma Nişasta kaplama ve drenaj Beyazlatmayı hızlandırma Mürekkepten arındırma
<b>Yağ Endüstrisi</b>	Lipaz Fosfolipaz	Transesterifikasyon Zamklama ve lesitin üretimi
<b>Organik Sentez Endüstrisi</b>	Lipaz Açilaz Nitrilaz	Kiral alkol, amid ayrıştırma Penisilin sentezi Saf karboksilik asit sentezi
<b>Deri Endüstrisi</b>	Proteaz Lipaz	Tabaklama Yüzey temizleme
<b>Kozmetik Endüstrisi</b>	Amiloglukosidaz Glukoz Oksidaz Peroksidaz	Antimikrobiyal Antimikrobiyal Antimikrobiyal

Enzimlerin yaygın olarak kullanıldığı diğer bir alan ise atık su arıtımıdır. Birçok endüstrinin atık suyunun hem temiz sulara hem de çevreye büyük zararlar verdiği bilinmektedir. Suyun sağlıklı yaşam için büyük bir ihtiyaç olduğu düşünülürse temiz su kaynaklarında karşılaşılabilecek olumsuzluklara karşı kirli/atık suyun geri dönüşümü/arıtımı büyük önem taşımaktadır. Örneğin, tekstil, deri ve kâğıt endüstrisinin atık sularında ve zeytin karasuyunda yüksek miktarda boyar madde ve fenolik bileşik olduğu bilinmektedir (Durán ve Esposito, 2000). Bu bileşikler düşük derişimlerde bile toksik ve karsinojeniktir. Peroksidaz ve lakkaz enzimleri bu bileşiklerin gideriminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte gıda endüstrisinin atık sularında ve zeytin karasuyunda yüksek oranda yağ bulunmaktadır. Bu yağlar özellikle suların üzerinde birikerek doğal yaşamı olumsuz etkilemektedir. Lipazlar atık sularındaki yağların giderimi için kullanılmaktadır (Durán ve Esposito, 2000).

Enzimlerin üretimi ve saflaştırılması masraflı ve zor bir süreç olduğundan enzimler pahalı maddelerdir. Bu yüzden enzimlerin tekrar kullanılabilirliği önemlidir. Serbest halde kullanılan enzimin ortamdaki alınıp tekrar kullanılabilmesi zor ve yine masraflıdır. Bu yüzden endüstride ve özellikle atık arıtımında enzimler immobilize edilerek kullanılırlar (F. Jia vd., 2014).

## 1.2. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, “hareketsizleştirilmiş ve/veya hareketi sınırlandırılmış” demektir (Brena ve Batista-Viera, 2006). Örneğin, bir aracın hareketini durdurma eylemi, bir immobilizasyon işidir. Bu nedenle, immobilizasyon yöntemi, uygun bir materyal kullanarak bir maddeyi sabitleme tekniği olarak kabul edilebilir (W. Liu vd., 2012). İmmobilizasyon özellikle biyokimyada çeşitli biyomateryalleri kullanarak enzim, hücre, molekül ve hatta atom için uygulanabilen güncel bir çalışma alanıdır.

İmmobilizasyon, mikroskobik yaşamda doğal olarak gerçekleşir. Biyofilmler (bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri polimerik yapıdaki jel bir tabakada yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk) doğal bir immobilizasyon örneği olarak karşımıza çıkar. Biyofilm mikroorganizmaları 1940'larda keşfedilmiş ve incelenmiş, yirmi yıl sonra faydaları anlaşılmış ve avantajları taklit edilmeye başlanmıştır (W. Liu vd., 2012).

İmmobilizasyon bir molekülün fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik ve/veya inorganik bir destek materyaline tutturularak hareketsiz hale getirilmesidir. İmmobilizasyon farklı amaçlar için hücre, enzim, ilaç ve boya

gibi birçok farklı organik ve inorganik materyale; aljinat, kitosan, selüloz gibi organik ve silika gibi inorganik birçok farklı destek materyali kullanılarak uygulanabilir. Özellikle saflaştırması zor ve pahalı olan enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini arttırmak amacıyla bir destek materyaline immobilizasyonu sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu nedenle enzimlerin immobilizasyonu, endüstri ve sağlık alanında önemli bir yer tutmaktadır (F. Jia vd., 2014).

### 1.2.1. Enzim İmmobilizasyonu

“İmmobilize enzimler” terimi, sürekli ve tekrar kullanılabilir, katalitik aktivitesi korunmuş, fiziksel ve/veya kimyasal olarak hapsedilmiş veya tutuklanmış enzimler anlamına gelir (Brena ve Batista-Viera, 2006). İmmobilize bir enzim sisteminin ana bileşenleri: enzim, taşıyıcı (destek materyali) ve bağlanma şeklidir. Burada enzim, immobilize edilen yani destek materyaline tutturulacak moleküldür. Destek materyali ise immobilize edilecek enzimin tutturulduğu taşıyıcıdır. Bağlanma şekli ise enzimin destek materyaline ne şekilde tutturulacağını ifade eder.

İmmobilize enzimlerin tarihsel gelişimi incelendiğinde; ilk olarak 19. yüzyılın başında endüstriyel alanda immobilize mikroorganizmaların kullanıldığı görülmektedir. Hedef enzim saflaştırılmadan doğrudan enzimi yapısında barındıran mikroorganizma immobilize edilmiş ve sağlanan katalitik aktivite hem sirkenin mikrobiyal üretiminde hem de atık su arıtımında kullanılmıştır. Bu yöntem enzim immobilizasyon sistemleri için önemli bir basamak olmuştur. Mevcut enzim immobilizasyon teknolojilerinin temeli ise 1960'larda atılmış ve bu dönemde “saflaştırılmış enzimler” immobilize edilmeye başlanmıştır. İlk olarak 1966 yılında Japonya’da Chibata ve arkadaşları *Aspergillus oryzae*’den saflaştırılan aminoaçilaz enzimini immobilize etmişler ve L-amino asit üretiminde kullanılmak üzere denemiştir (Brena ve Batista-Viera, 2006). Daha sonraki dönemlerde teknolojilerin gelişmesiyle birlikte koenzim, kofaktör içeren ve ko-immobilizasyon dahil olmak üzere daha karmaşık sistemler geliştirilmiştir.

Bir enzimi immobilize ederek kullanmak, enzimlerin verimli bir şekilde geri kazanılması ve yeniden kullanılmasını kolaylaştırır. Diğer bir fayda hem depolama hem de çalışma koşulları altında sıcaklık, pH, organik çözümler, denatürasyon gibi ortam şartlarına karşı genellikle arttırılmış stabiledir (Nisha vd., 2012). Serbest enzimin karşılaştığı aktivite kaybı, stabilite kaybı, pH ve sıcaklık değişimlerine bağlı denatürasyon, tekrar kullanılabilirlik ve geri kazanımın zor olması gibi dezavantajların üstesinden genellikle enzimin immobilize edilmesi

ile gelinebilir. Bunun yanında enzimi immobilize etmenin getirdiği bazı dezavantajlar da olabilmektedir. İmmobilizasyon sonucu karşılaşılabilecek en büyük sorun enzimin aktivitesini kısmen veya tamamen kaybetmesidir. Enzimde yaşanan aktivite kaybı immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı seçiminde başlıca yol gösterici olmaktadır. Saf enzimler pahalı maddeler olduklarından uygun immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı seçimi iyi hesaplanmalıdır. Çizelge 2’de immobilize enzimlerin avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir.

**Çizelge 2.** İmmobilize enzimlerin avantajları ve dezavantajları.

<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Uzun süre ve tekrar kullanılabilirlik	İmmobilizasyon sırasında oluşabilecek aktivite kaybı
Değişen ortam şartlarına karşı genellikle serbest enzime kıyasla daha dayanıklı olma	Enzim ve substrata göre değişken immobilizasyon yöntemi seçimi
Ortamdan serbest enzime kıyasla daha kolay uzaklaştırılabilme	Enzim ve substrata göre değişken taşıyıcı seçimi
Ekonomik olarak avantajlı olma	Ekonomik olmayan taşıyıcılar nedeniyle maliyetin yüksek olması

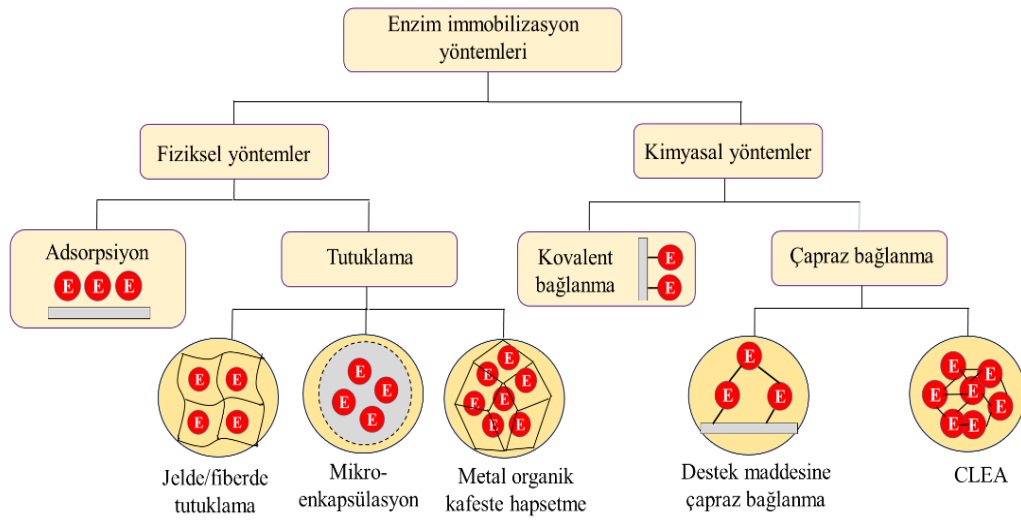
Enzimler taşıyıcıya birçok farklı yol ile bağlanabilirler. Enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşim fiziksel adsorbsiyon gibi geri dönüşümlü veya kovalent bağlanma gibi geri dönüşümsüz olabilir. Geleneksel uygulamalar enzimin geri dönüşümlü olarak değil de taşıyıcıya sağlam bir şekilde bağlanması yönünde gerçekleşmiştir. Günümüzde daha kolay uygulanabilmesi ve enzimin istenildiğine taşıyıcıdan uzaklaştırılabilmesinden dolayı adsorbsiyon gibi geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemleri ile aktivite kaybını en aza indiren tutuklama gibi yöntemler tercih edilmektedir (Liang vd., 2000).

### **1.2.1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri**

İmmobilizasyon yöntemi enzime, taşıyıcıya ve kullanım şekline göre belirlenir. Bu yüzden immobilizasyon için yöntem seçimi önemlidir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşim geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Enzimin taşıyıcıya geri dönüşümsüz bağlanması, enzimin ve taşıyıcının yapısının bozulmadan birbirlerinden ayrılacakları

anlamına gelirken; geri dönüşümlü bağlanması ise, enzim ve taşıyıcının yapısının bozulmadan birbirlerinden ayrılabilmesi demektir.

Temel olarak, üç geleneksel enzim immobilizasyon yöntemi vardır; bir desteğe (taşıyıcıya) bağlama, tutuklama (tuzaklama) ve çapraz bağlama. Desteğe bağlama fiziksel adsorpsiyon ile geri dönüşümlü veya kovalent bağlanma ile geri dönüşümsüz olabilir. Şekil 1’de enzim immobilizasyonu için uygulanabilecek yöntemler şematize edilmiştir.



Şekil 1. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Yavaş, 2019).

En çok kullanılan geri dönüşümsüz bağlanma yöntemleri: kovalent bağlama, tutuklama ve çapraz bağlamadır. Bu yöntemlerle immobilize edilmiş enzimlerin geri dönüşümü çok zordur. Bu yüzden bu yöntemler kullanılacaksa taşıyıcı seçimine ve enzimin aktivite kaybına uğramasına çok dikkat edilmelidir. Geri dönüşümlü bağlanmada ise enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler zayıf olduğu için bağlanmış olduğu taşıyıcıdan uygun koşullar altında ayrılabilir. Bu immobilizasyon yöntemi, enzimin immobilizasyonu sırasında aktivite kaybı olması durumunda taşıyıcıdan alınıp tekrar kullanılabilmesi için, ekonomik açıdan tercih sebebidir (Sheldon, 2007). Ayrıca enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlar kovalent olmadığı için enzim aktivitesinde büyük kayıplar yaşanma olasılığı düşüktür.

Fiziksel adsorpsiyon enzimi zorlu reaksiyon koşullarında taşıyıcıda sabit tutmak için genellikle çok zayıftır. Kovalent bağlama ise genellikle enzimin desteğe daha güçlü bağlanmasıdır, bu da enzimin taşıyıcıdan ayrılmasını zorlaştıran bir avantaj anlamına gelir. Bununla birlikte, kovalent bağlanmanın bir dezavantajı da vardır: eğer enzim geri

döndürülemez bir şekilde aktivitesini kaybederse hem enzim hem de destek materyali kullanılamaz hale gelir. Başka bir immobilizasyon yöntemi, bir organik polimer, polimer ağı (jel kafes), içi boş bir fiber veya bir mikrokapsül gibi bir taşıyıcıya enzimin dahil edilmesi yoluyla tutuklamadır. Tutuklama, enzim varlığında polimerik ağın sentezini gerektirir. Örneğin enzim bir jelin (fiber, membran, kafes veya boncuk) sentezi sırasında ortamda mevcut olduğunda, enzim jel içerisine hapsolür yani tutuklanır. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonunda ise enzim agregatlarının veya kristallerinin birbirleri arasında çapraz bağlanması söz konusudur (Sheldon, 2007).

#### **1.2.1.1.1. Kovalent Bağlama**

Enzim immobilizasyonu için en çok kullanılan yöntemlerden biri enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasıdır. Bu yöntemde enzim ile taşıyıcı arasındaki bağların kuvvetli olması nedeniyle enzimin reaksiyon ortamı değişikliklerine karşı daha dayanıklı olması ve enzim kaybının olmaması en büyük avantajlardır. Öte yandan enzim ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağın enzimin katalitik bölgesindeki amino asitler üzerinden gerçekleşme ihtimali sonucu oluşabilecek aktivite kayıpları kovalent bağlamanın en büyük dezavantajıdır. Üründe enzimin bulunmaması gereken durumlarda immobilizasyon için kovalent yöntemlerin kullanılması bir gereklilik olarak kabul edilir.

Kovalent immobilizasyonda, taşıyıcı üzerinde bulunan fonksiyonel gruplara bağlı olarak farklı bağlanma yöntemleri vardır: taşıyıcıya bir reaktif fonksiyonun eklenmesi ile taşıyıcının aktivasyonu veya reaktif bir grup oluşturmak için taşıyıcının modifikasyonu. Taşıyıcıya kovalent bağlanma sürecini kontrol eden temel ilkeler, proteinlerin kimyasal modifikasyonu için kullanılanlara benzerdir. En sık kullanılan, taşıyıcı ile enzimin yan zincirindeki lizin, sistein, aspartik asit ya da glutamik asit gibi amino asit birimleri arasında gerçekleşen, kovalent reaksiyonlardır. Ayrıca karboksilik asit, imidazol, indol ve fenolik hidroksil gibi fonksiyonel gruplar da kovalent bağların oluşumunda görev almaktadırlar (Yang vd., 2014).

### **1.2.1.1.2. Adsorbsiyon**

Temel olarak adsorbsiyon, iyonik bağlanma ve afiniteye dayalı bağlanmanın söz konusu olduğu en basit ve çok tercih edilen immobilizasyon yöntemidir. Adsorbsiyon genellikle destek maddesinin enzim çözeltisi ile temas ettirilmesi ve bir süre inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Adsorbsiyon geri dönüşümlü bir işlemdir. Destek maddesi ile enzim arasındaki etkileşimi zayıflatacak pH, sıcaklık gibi parametrelerde değişiklik yapıldığında enzim destek maddesinden uzaklaştırılabilir. Adsorbsiyon yöntemi basit, ekonomik, geri dönüştürülebilir, rejeneratif ve koruyucudur. Ayrıca protein, nükleik asit, karbonhidrat ve sentetikler bileşikleri (ilaç, boya vb.) immobilize etmek için en kolay yöntem olduğu bildirilmiştir (Sheldon, 2007). Adsorbsiyonla immobilizasyon kolay bir işlemdir ve genellikle enzimin katalitik aktivitesini korur. Bu tür yöntemler bu nedenle ekonomik olarak çekicidir, ancak etkileşimler nispeten zayıf olduğundan taşıyıcıdan enzim sızıntısı gibi sorunlar olabilir.

Adsorbsiyonda, enzim taşıyıcıya hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri ve/veya hidrofobik etkileşimler ile bağlanmaktadır (W. Liu vd., 2012). İyonik bağlanmada enzim tuz köprüleri üzerinden taşıyıcıya bağlanırken, afiniteye dayalı bağlanmada enzime afinitesi olan veya enzimin afinite gösterdiği bir molekülün taşıyıcıya tutturulması ile enzim taşıyıcıya bu molekül üzerinden bağlanır. İyonik bağlanmada destek maddesi yüklü durumdadır böylece zıt yüklü protein desteğe iyonik etkileşimler sayesinde bağlanabilmektedir. Enzim pH değişikliği ya da salting-out yapılarak destekten sökülebilir. Ucuz ve kolay olmasına rağmen, yüklü bir destek enzim yapısında bozulmalara dolayısıyla enzim aktivitesinde düşüşe neden olabilir. Diğer bir yaklaşım, hidrofobik etkileşimlerin kullanılmasıdır. Hidrofobik adsorbsiyon, otuz yılı aşkın süredir kromatografik bir prensip olarak kullanılmaktadır (W. Liu vd., 2012). Etkileşimin gücü hem adsorbanın hem de proteinin hidrofobikliğine bağlıdır.

### **1.2.1.1.3. Tutuklama**

Tutuklama yönteminde enzim genellikle polimer bir matriks veya membran içerisine tutuklanmaktadır. Tutuklama yöntemi, substratın ve ürünlerin geçmesine izin veren ancak enzimi tutan bir tekniğe dayanır. Bu yöntem, enzimin taşıyıcıya bağlı olmaması açısından diğer immobilizasyon yöntemlerinden ayrılır (Liang vd., 2000). Tutuklama, enzimlerin jelleşme veya çapraz bağlama işlemleri sırasında taşıyıcı içerisine hapsedildiği bir işlemdir. Bu işlem



taşıyıcının sentezi sırasında, düşük sıcaklıkta belirli polimerlerin ve/veya tuzların eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Taşıyıcılar geometrik olarak ince filmler, boncuklar veya fiberler halinde sentezlenebilmektedir. Tutuklama yöntemi, enzimlerin bağlanmasını veya modifikasyonunu içermediğinden, kovalent bağlanma ile önemli ölçüde denatürasyona uğrayan enzimler için uygundur. Ayrıca taşıyıcı ile kimyasal etkileşim olmadığı için hücre immobilizasyonunda tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir.

Geri dönüşümsüz bir immobilizasyon yöntemi olan tutuklama, mekanik kararlılığı arttıran, enzim kaybını ve denatürasyonunu minimize eden hızlı, kolay ve ucuz bir yöntemdir. Enzim büyüklüğü ile gözenek büyüklüğü, tutuklamada dikkate alınması gereken en önemli unsurdur. Enzimatik reaksiyonun hızı substrat ve ürünün gözeneklerden difüzyon hızına bağlıdır. Bu yöntemde destek maddesi olarak en sık kullanılan polimerler: aljinat, kitosan, karragenan, kollajen, poliakrilamid, nişasta, jelatin, silikon kauçuk ve poliüretandır (Liang vd., 2000).

#### **1.2.1.1.4. Çapraz Bağlama**

Bu yöntemde enzim kristalleri ve/veya enzim agregatları kendi aralarında çapraz bağlanarak immobilize edilir. Enzimin türüne ve yapısına göre uygun çapraz bağlayıcı ajan kullanılır. Çapraz bağlama yöntemi destek materyali gerektirmeyen bir immobilizasyon yöntemidir. Enzim kendi kendisinin taşıyıcısı olarak davranır. Yöntem 1960'lı yıllarda glüteraldehitin enzimlerin yüzeyindeki -NH<sub>2</sub> grupları ile reaksiyona girdiğinin fark edilmesi sonucu geliştirilmiştir (Datta vd., 2013). Ancak genellikle karşılaşılan düşük aktivite, tekrar kullanılabilirliğin düşük olması, destek maddesi kullanılmadığı için mekanik kararlılığın zayıf olması ve kullanımlarının zor olması nedeniyle tercih destek maddelerine bağlanmış enzimlere kaymıştır.

#### **1.2.1.2. Destek Materyalleri**

İmmobilizasyon için ticari olarak temin edilebilen birçok taşıyıcı vardır. Uygun taşıyıcı seçiminde katalizörün özelliklerinin ve kullanım amacının dikkate alınması gerekir. Bununla

birlikte, genellikle birden fazla yaklaşımı denemek ve ardından bir yöntemi belirli koşullara uyarlamak gerekir.

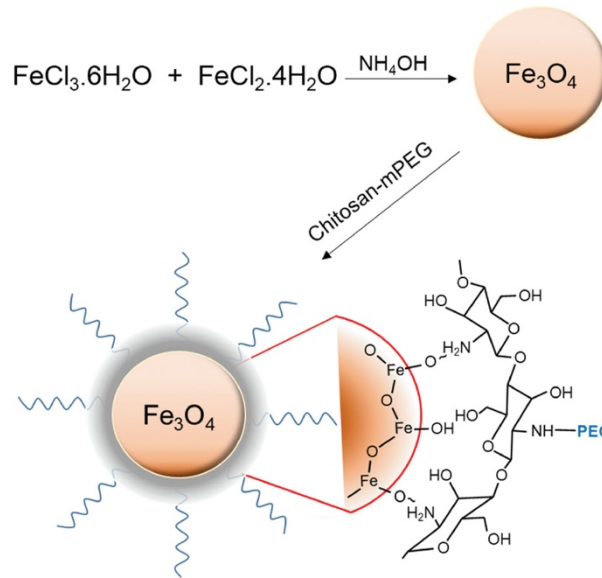
Taşıyıcının özellikleri, immobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde büyük önem taşır. İdeal taşıyıcı özellikleri arasında fiziksel dayanıklılık, hidrofilik olma, enzimlere karşı inert olma, biyouyumluluk, mikrobiyal saldırıya direnç ve düşük maliyet bulunur (Brena ve Batista-Viera, 2006). Özellikle, gözenek parametreleri ve partikül boyutu toplam yüzey alanını belirler ve dolayısıyla enzimlerin bağlanma kapasitesini kritik bir şekilde etkiler. Destek materyalleri kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik olarak; ayrıca doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilir (Datta vd., 2013). Çizelge 3'te enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyaller verilmiştir.

**Çizelge 3.** Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri (Zdarta vd., 2018).

	<b>Doğal Materyaller</b>	<b>Sentetik Materyaller</b>
<b>Organik Destekler</b>	Kitin Pektin Aljinat Nişasta Agaroz Selüloz Keratin Kitosan Kolajen Dekstran Albümin	Polistiren Polianilin Polipropilen Poliakrilamid Polimetakrilat Polivinil Alkol Poliakrilik Asit
<b>İnorganik Destekler</b>	Silika Zeolit Bentonit Diatomit Hidroksiapatit Montmorillonit	Cam Metal Seramik Aktif Kömür Aktif Karbon Titanyum Dioksit Alüminyum Oksit Zirkonyum Dioksit

### 1.2.1.2.1. Manyetik Taşıyıcılar

Enzim immobilizasyonunun en büyük avantajlarından biri enzimin reaksiyon sonrasında ortamdaki kolayca ayrılabilmesidir. Ayrıca immobilizasyon sürecinde enzime veya taşıyıcıya manyetik partikül (demir oksit nanopartiküller) tutturulması veya eklenmesi ile mıknatıs vasıtasıyla enzim ortamdaki alınabilmektedir. Manyetik demir oksit nanopartiküller ( $Fe_3O_4$ ) geniş yüzey alanı ve yapısında bulunan hidroksil grupları sebebiyle modifikasyonu kolay ve sıkı bağlanma potansiyeli gösterirler. Manyetik demir oksit nanopartiküllere doğrudan enzim bağlanabildiği gibi bu manyetik nanopartiküller enzimin yükleneceği taşıyıcıya da bağlanabilir veya tutuklama gibi yöntemler ile immobilizasyon sistemine dahil edilebilirler (Zdarta vd., 2018). Şekil 2’de manyetik nanopartiküllerin ( $Fe_3O_4$ ) sentezi ve kitosan-mPEG (kitosan-polietilen glikol metil esteri) ile immobilizasyonu gösterilmiştir.

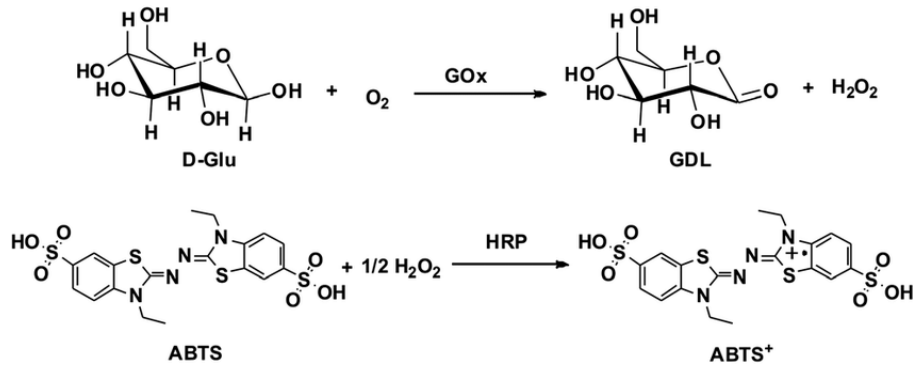


**Şekil 2.** Manyetik nanopartikül ( $Fe_3O_4$ ) sentezi ve kitosan-mPEG (kitosan-polietilen glikol metil esteri) ile immobilizasyonu (Hoang vd., 2016).

### 1.3. Ko-immobilizasyon

Ko-immobilizasyon birden fazla enzimin aynı taşıyıcıya birlikte bağlanması ve/veya tutuklanması olarak tanımlanabilir. Ko-immobilizasyon özellikle biyosensör uygulamalarında kullanılan bir yöntemdir (F. Jia vd., 2014). Enzim immobilizasyon çalışmaları çoğunlukla tek enzim immobilizasyonuna odaklanmasına rağmen tek bir enzimin reaksiyonları tamamen

katalizleyemediği ve birlikte çalışan birden çok enzime ihtiyaç duyulan birçok katalitik reaksiyon dizisi vardır. Örneğin bir glukoz biyosensörü için glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimleri ko-immobilizasyon ile bir taşıyıcıya bağlanırlar. Glukoz oksidazın görevi glukozu okside ederek glukonat ve hidrojen peroksit oluşturmaktır. Peroksidaz ise ilk kataliz reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksiti kromojen bir bileşik yardımıyla renkli bir bileşiğe okside ederek reaksiyonun spektrofotometrik olarak izlenebilmesini sağlar. Şekil 3'te glukoz oksidaz (GOx) ve yaban turbu peroksidazının (HRP) katalitik reaksiyonları gösterilmiştir. Sonuç olarak iki enzim birlikte çalışır ve glukoz tayini için uygun bir sistem oluştururlar. Bununla birlikte ko-immobilizasyonda birbirinden bağımsız iki enzimatik reaksiyonu katalizleyen enzimlerin taşıyıcıya birlikte bağlanması da söz konusudur. Bu şekilde bir ko-immobilize enzim sistemi ile tek seferde birbirinden bağımsız birden fazla katalitik reaksiyonun gerçekleştirilmesi ön görülmektedir.

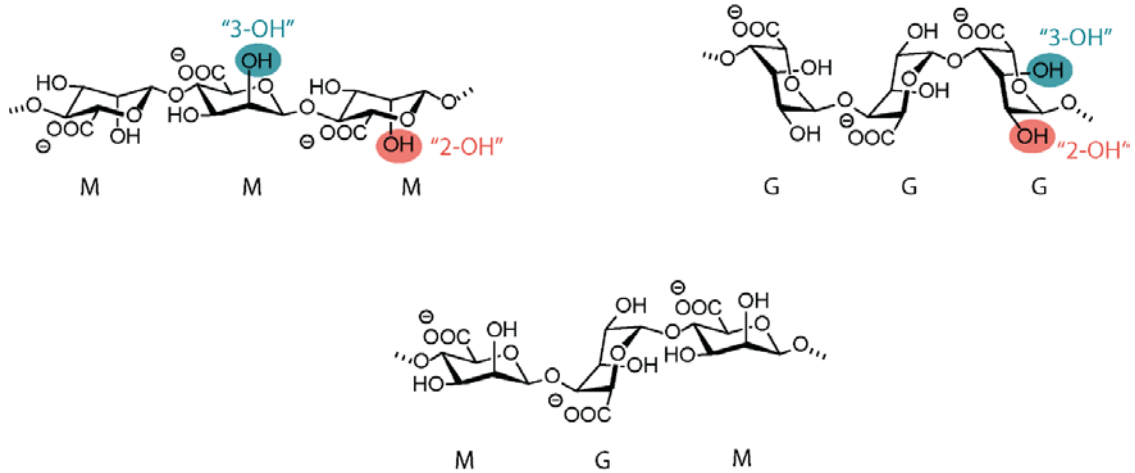


**Şekil 3.** Glukoz oksidaz [GOx (üstte)] ve yaban turbu peroksidazın [HRP (altta)] katalitik reaksiyonları (Costantini vd., 2013).

Ko-immobilizasyon, tek enzim immobilizasyonu ile birçok ortak özelliği paylaşır. Tek enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı seçimi ve bağlanma teknikleri, aynı zamanda ko-immobilizasyon için de geçerlidir. Bununla birlikte, birden çok enzimin birlikte immobilizasyona dahil edilmesi birçok zorluğu beraberinde getirir. Farklı enzimlerin çeşitli özellikleri (boyut, konformasyonel stabilite vb.) enzimatik aktiviteyi korumak için bağlanma yöntemlerini ve taşıyıcıyı seçerken ko-immobilizasyonu karmaşık hale getirir, çünkü enzim aktivitesini korumak için her enzimin yapısı ve işlevi dikkate alınmalıdır.

#### 1.4. Aljinat

Aljinat ya da aljinik asit kahverengi alglerin bazı türlerinin (*Macrocystis pyrifera*, *Sargassum spp* ve *Ascophyllum nodosum*) hücre duvarlarından elde edilen; 1,4- $\beta$ -D-mannuronik asit ve 1,4- $\alpha$ -L-guluronik asit birimlerinden oluşan lineer, doğal polisakkarittir. Aljinatın toksik olmadığı, biyolojik olarak metabolize olduğu ve yüksek biyoyumluluk gösterdiği rapor edilmiştir. Aljinat sulu çözeltilisine divalent katyonların eklenmesi ile iyonik olarak çapraz bağlanır. Aljinatın kalsiyum ile çapraz bağlandığı immobilizasyon uygulamalarında bağlı enzimin biyolojik aktivitesinin korunduğu saptanmıştır. Oluşan kalsiyum aljinat birçok hücre, enzim ve ilaç immobilizasyonu ve tutuklama yöntemlerinde kullanılmaktadır (Szekalska vd., 2016). Şekil 4'te aljinatın moleküler yapısı gösterilmiştir.



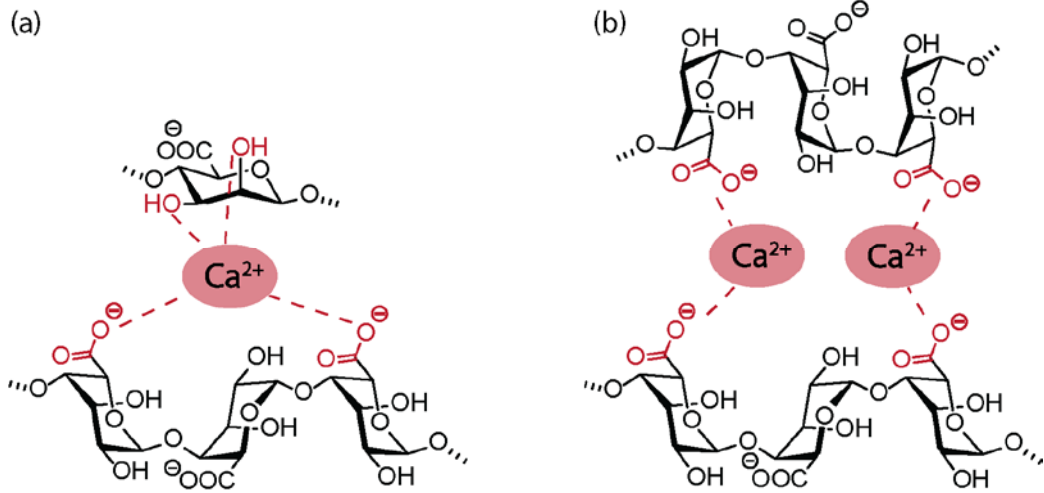
**Şekil 4.** Aljinatın mannuronik asit birimleri (M), glukuronik asit birimleri (G) ve moleküler yapısı (altta). Bağ yapma potansiyeli yüksek olan hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) grupları renkli gösterilmiştir (Szabó vd., 2020).

Deniz yosunlarından aljinatın ekstraksiyonu karmaşık değildir ancak çok aşamalı bir prosedürdür ve genellikle kurutulmuş ham maddenin seyreltilmiş mineral asit kullanılarak işlenmesiyle başlar. Safılaştırmadan sonra elde edilen aljinik asit, kalsiyum karbonat varlığında suda çözünür sodyum veya potasyum tuzuna dönüştürülür ve ticari olarak aljinik asit sodyum tuzu ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ) veya aljinik asit potasyum tuzu ( $\text{KC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ) olarak bulunur. Aljinata farklı fizikokimyasal özellikler sağlamak için son zamanlarda mikrobiyal fermentasyon yoluyla

alternatif üretimler araştırılmasına rağmen, ticari olarak aljinat yalnızca alg kaynaklarından elde edilir (Szekalska vd., 2016).

Aljinat gıda, biyomedikal ve tekstil gibi birçok endüstriyel alanda, ayrıca; hücre, enzim ve ilaç immobilizasyonu çalışmalarında, doku mühendisliği gibi biyoteknolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca avantajları kolay bulunabilirliği, biyolojik olarak parçalanabilirliği, toksik olmaması ve kolayca jel oluşturabilmesidir. Bu özelliklerinin yanında aljinat su tutucu özelliğinden dolayı kâğıt ve tekstil sanayinde sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca jel oluşturma özelliği ile içeceklerde, dondurmalarda, çorbalarda ve kozmetikte kıvamlaştırıcı olarak ve bazı ilaçlarda destek maddesi olarak kullanılmaktadır.

Jel oluşumu, iki değerlikli ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  vb.) veya üç değerlikli ( $\text{Al}^{3+}$  vb.) iyonların polimer zincirindeki glukuronik asit birimleri arasında zincirler arası iyonik bağlanması sonucunda üç boyutlu bir polimer ağ oluşumu ile meydana gelir. Bu iyonlar, büyük miktarlarda suyu bağlayarak ve hapsederek aljinat zincirlerini stabilize eden çapraz bağlayıcılar olarak işlev görürler. Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ), aljinatı iyonik olarak çapraz bağlamak için en sık kullanılan ajanlardan biridir. Şekil 5'te aljinatın kalsiyum iyonları ile çapraz bağlanması gösterilmiştir.



**Şekil 5.** Aljinatın kalsiyum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ile çapraz bağlanması (a) ve çapraz bağlanmış kalsiyum aljinat jel (b) oluşumu (Szabó vd., 2020).

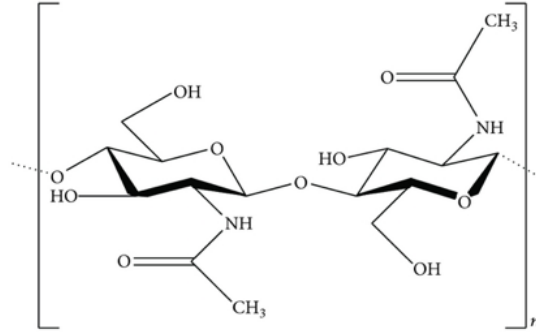
Aljinat jellerin geçirgenliği, şişme özellikleri, viskozitesi ve elastikiyeti manuronik asit ve glukuronik asit miktarından oldukça etkilenir. Jel oluşumunu yöneten temel faktör aljinatın

yapısında bulunan guluronik asit oranıdır. Guluronik asit içeriği arttıkça daha dayanıklı ve gözenekliliği yüksek jeller oluşur. Mannuronik asit bakımından zengin aljinattan yapılan jeller ise daha yumuşak ve kırılımandır ve ayrıca daha düşük gözenekliliğe sahip olabilir. Bunun nedeni, polimer zincirleri arasındaki daha düşük bağlanma kuvveti ve moleküllerin daha yüksek esnekliğidir. Jelleştirme işlemi, büyük ölçüde çapraz bağlayıcı iyonların polimer ağına difüzyonuna bağlıdır. Bu jellerin yapısını etkileyen bir diğer faktör ise pH'dır. Aljinat çözeltisinin pH'ı asidik bölgelere yaklaştıkça yapısında bulunan karboksilat grupları protonlanır ve çözeltinin viskozitesi artar.

Ticari olarak temin edilebilen aljinatların molekül ağırlığı 32.000 ile 400.000 g/mol arasında değişir. Aljinatın yapısındaki karboksilat grupları protonlanıp hidrojen bağları oluşturduğundan, aljinat çözeltilerinin viskozitesi pH düştükçe artar ve pH 3.0-3.5 civarında maksimuma ulaşır. Aljinatın molekül ağırlığı, elde edilen jellerin fiziksel özelliklerine etki eder. Bununla birlikte, yüksek molekül ağırlıklı bir aljinatın çözeltisi, uygulamada genellikle istenmeyen bir durum olan yüksek viskozite oluşturur (Lee ve Mooney, 2012). Farklı molekül ağırlığındaki aljinat kombinasyonları kullanılarak bu durumun üstesinden gelinebilir.

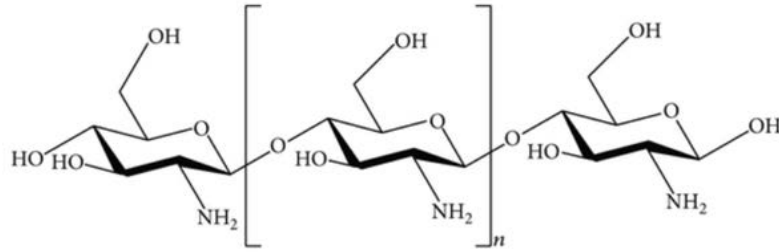
## 1.5. Kitosan

Kitosan [ $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz] doğada selülozdan sonra en çok bulunan; enzim, ilaç ve hücre immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan; D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinin lineer katyonik kopolimeridir. Kitosan ticari olarak yengeç ve karides gibi canlıların kabuklarının atıkları olan kitinden elde edilir. Kitin, selülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimerdir ve esas olarak kabukluların dış iskeletlerinden, alg, fungus ve böceklerin hücre duvarlarından elde edilir. Kitosan ise kabuklu deniz canlılarının kabuklarının baz ve asitler ile aşındırılması ile elde edilen kitinin yüksek sıcaklıkta baz hidrolizi sonucu deasetillenmesi ile elde edilir. Kitosanın bu şekilde elde edilmesi kolay ve masrafsız bir işlemdir. Şekil 6'da kitinin moleküler yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 6.** Kitinin moleküler yapısı (X. Li vd., 2013).

Kitosanın temel avantajları bolluğu, toksik olmaması, ucuz olması ve biyolojik olarak parçalanabilirliğidir. Kitosan uygun yöntemleri ile kolaylıkla jel, membran, nanolif, boncuk, mikropartikül, nanopartikül oluşturabilir ve bu açıdan bakıldığında geniş bir uygulama yelpazesi vardır. Kitosan polikatyonik doğası nedeniyle, aynı zamanda bir flokülasyon ajanı olarak da kullanılmıştır. Ayrıca metallerin ve organik moleküllerin şelatlanmasına ve elektrostatik etkileşimler yoluyla adsorpsiyonun gerçekleşmesine izin verir. Bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda kitosanın immobilizasyon ve atık arıtımında kullanımının yaygın olduğu görülmektedir. Şekil 7’de kitosanın moleküler yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 7.** Kitosanın moleküler yapısı (X. Li vd., 2013).

Asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asit çözeltileri kitosanı çözmek için kullanılır fakat çoğunlukla %1’lik asetik asit çözeltisi çözücü olarak kullanılır. Kitosan zayıf asitte çözünür ve pH 7.0’nin üzerinde çöker. Kitosanın inorganik asit çözeltilerindeki çözünürlüğü azdır. Kitosan %1’lik hidroklorik asit çözeltisinde çözünür fakat sülfürik ve fosforik asit çözeltilerinde çözünmez. Alkali pH değerlerinde oluşan çökme ve jelleşme



özelliklerinden dolayı bu pH değerlerinde çözünürlüğü azdır. Kitosan glukozamin birimleri içerdiğinden nişasta gibi diğer karbohidratlara benzer bir degradasyon mekanizması vardır.

Kimyasal yapısından dolayı kitosan, selüloz ve kitine çok benzer. Kitin asetilamin gruplarının lineer zincirinden oluşurken kitosan bu yapıdan yeterince asetil grubunun uzaklaştırılması ile oluşur. Bu işleme deasetilasyon denir. Kitin ile kitosan arasındaki fark polimerin asetil içeriğinden kaynaklanır. Kitosan, kitinden farklı olarak, serbest bir amino grubu içerir ki bu durum kitosanı kullanıma daha uygun yapmaktadır. Kitosan ayrıca yapısal olarak selüloza da çok benzer. Aralarındaki tek fark kitosanın amin grubunun bulunduğu yerde selülozun hidroksil grubu bulundurmasıdır. Selülozdan farklı olarak kitosan pozitif iyonik yüke sahiptir bu da onun negatif yüklü yağlara, lipitlere, kolesterole, metal iyonlarına, proteinlere ve makromoleküllere bağlanmasına olanak tanır.

Kitosan toksik olmayan ve biyoyumluluğu yüksek olan bir polimerdir ve immobilizasyon çalışmalarında sıkça kullanılır. Aljinata benzer şekilde kitosan, biyolojik olarak parçalanabilen ve jel oluşturabilme özelliğine sahip bir biyopolimerdir. Sonuç olarak kitosan ve kitin biyoyumluluk, biyolojik olarak metabolize olabilme, adsorpsiyon ve jel oluşturabilme özelliklerinden dolayı immobilizasyon çalışmaları için vazgeçilmez biyopolimerlerdir.

## **1.6. Lipazlar**

Lipazlar (EC 3.1.1.3) enzim sınıflandırmasında hidrolazlar sınıfında yer alan açilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazların temel katalitik reaksiyonu yağ asitlerinin gliserol veya başka alkoller ile yapmış oldukları ester bağlarının hidrolizidir. Bununla birlikte lipazlar, ester ve gliserol sentezi ve yağların modifikasyonu gibi birçok reaksiyonu da katalizlerler. Ayrıca lipazlar bazen fosfolipaz, izofosfolipaz, kolesterol esteraz, amidaz ve diğer esteraz aktiviteleri de gösterirler (Verma vd., 2012).

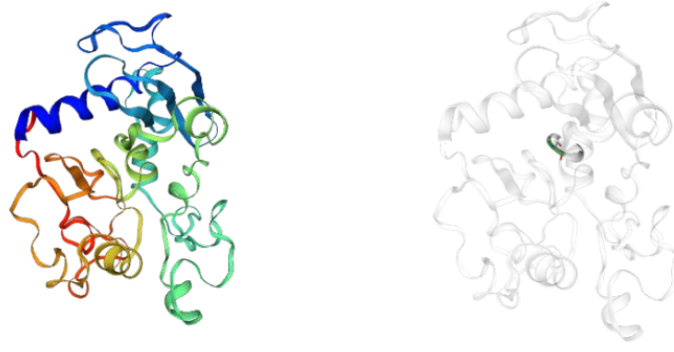
Lipazlar endüstride sıkça kullanım alanı bulmaktadırlar. Yiyecek endüstrisinde tat ayarı için, deterjan endüstrisinde yağların hidrolizi için, farmakolojide kiral ilaç sentezi için, kâğıt endüstrisinde yoğunluk kontrolü için, tıpta trigliserit ölçümü için, kozmetik sektöründe yağ giderimi için, atık su arıtımında yağların uzaklaştırılması için ve deri endüstrisinde hayvan derisinden yağın uzaklaştırılması için lipazlardan yararlanılmaktadır.

Lipazlar mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler tarafından üretilebilmektedir. Genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler, organik çözümlere daha dayanıklı olduklarından ve üretim maliyetleri düşük olduğundan, endüstriyel uygulamalarda tercih edilmektedirler (Verma vd., 2012). Bakteri, maya ve funguslar lipaz sentezi için üç ana kaynaktır. Literatüre bakıldığında endüstride kullanılan lipazların %90'ının mikroorganizma kaynaklı olduğu görülmektedir. Bakterilerden lipaz üretimi için en çok tercih edilen türler *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia*'dır. Funguslardan lipaz üretimi için en çok tercih edilen türler ise *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ve *Candida*'dır. Funguslar arasında *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* bilinen en iyi ekstraselüler lipaz üreticileridir. Çizelge 4'te bazı lipaz kaynakları gösterilmiştir. Birçok farklı substrat özelliğine ve farklı biyokimyasal özelliklere sahip mikrobiyal lipaz rapor edilmiştir.

**Çizelge 4.** Bazı lipaz kaynakları (Treichel vd., 2010).

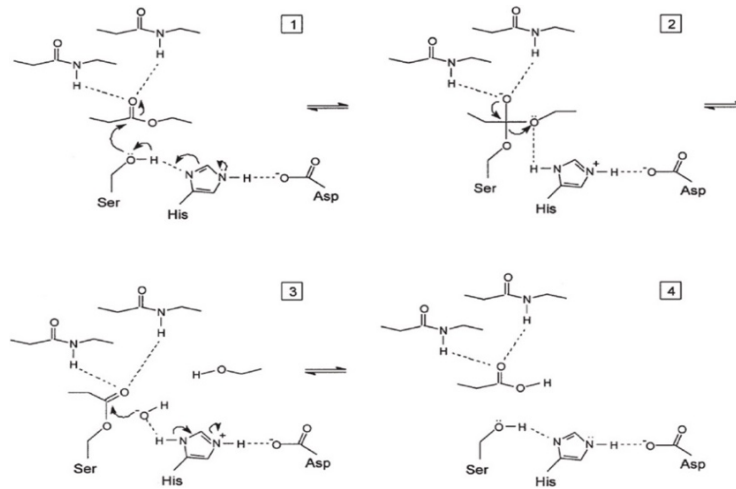
<b>Fungus</b>	<b>Maya</b>	<b>Bakteri</b>
<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Rhizopus homothallicus</i>	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Staphylococcus caseolyticus</i>
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Penicillium restrictum</i>	<i>Candida cylindracea</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>
<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Williopsis californica</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacillus subtilis</i>

Lipazların moleküler yapısı 1990 yılında X-Işını Kristalografisi ile aydınlatılana kadar çalışma mekanizması bilinmiyordu. Lipazların üç boyutlu moleküler yapısı aydınlatıldığında aktif merkez üzerinde bir protein uzantısı olduğu görüldü. Bu da lipazı diğer enzimlerden farklı yapıyordu. Bu uzantı enzim üzerinde kapak benzeri görev yaparak aktif merkezi kapatıyor; yüzey aktive edilmezse aktif bölge açılmıyordu. Yapılan denemelerde aktif merkezi kapatan bu kapağın yağ/su ara yüzeyi oluşmadan açılmadığı ve aktif merkeze substratın ulaşamadığı görülmüştür. Sonraki yıllarda yapılan yoğun çalışmalar tüm lipazların bu tür bir kapağa sahip olmadığını göstermiştir (Schmid ve Verger, 1998). Şekil 8'de *Aspergillus niger* lipazının üç boyutlu yapısı ve aktif merkezin molekül üzerindeki konumu gösterilmiştir.



**Şekil 8.** *Aspergillus niger* lipaz enziminin üç boyutlu yapısı (solda) ve aktif merkezinin yapısı üzerindeki konumu (sağda, renkli bölge) (<https://swissmodel.expasy.org>, 2021).

Lipazlar amino asit dizilimi ve katalitik aktivite açısından farklılık gösterirler. Çoğu lipazın aktif merkezinde serin amino asiti bulunur. Bu yüzden lipazlar, serin proteazlar ile katalitik benzerlik gösterirler. Lipazların aktif merkezinde bulunan amino asit üçlüsü Serin-Histidin-(Aspartat/Glutamat) şeklindedir. Öncelikle katalitik bölge üzerindeki kapak yağ/su yüzeyinin buraya teması ile açılır; böylelikle substrat yani açılgliserol katalitik bölgeye ulaşabilir. Lipazın katalitik üçlüsünün görevi burada başlar. Katalitik bölgedeki serin amino asiti hidrojen bağı ile aktive olur ve açılgliserol serin üzerinden katalitik bölgeye bağlanır. Katalitik bölgeye bağlanan kısımdan açılgliserolün bir yağ asiti kopar ve bu şekilde lipaz ilk yağ asidini uzaklaştırmış olur. Lipazların yağ açıl gliserollere nasıl bağlandığı ve kataliz mekanizması Şekil 9’da gösterilmiştir.



**Şekil 9.** Lipaz enzimlerinin katalitik mekanizması (Yu vd., 2021).

Lipazlar yüksek katalitik aktivite, yüksek seçicilik, pH dayanıklılığı, sıcaklığa karşı dayanıklı olma, organik çözücülere karşı dayanıklı olma ve biyobozunur özellikleri nedeniyle uzun yıllardır endüstride kullanılmaktadır. Lipazların diğer önemli bir özelliği mono-, di-, trigliseritleri ve serbest yağ asitlerini ayırt etmeksizin hidrolizlemesidir. Bunun yanında ürün inhibisyonunun düşük olması, susuz ortamda yüksek aktivite gösterebilmesi, sıcaklık, pH ve alkole olan dayanıklılığı, ayrıca immobilize olarak da tekrar kullanılabilir olması lipazların avantajlarından. Çizelge 5'te bazı lipaz kaynakları ve o kaynaktan elde edilen lipazın optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri gösterilmiştir.

**Çizelge 5.** Bazı lipaz kaynakları ve o kaynaktan elde edilen lipazın optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri (Murty vd., 2002).

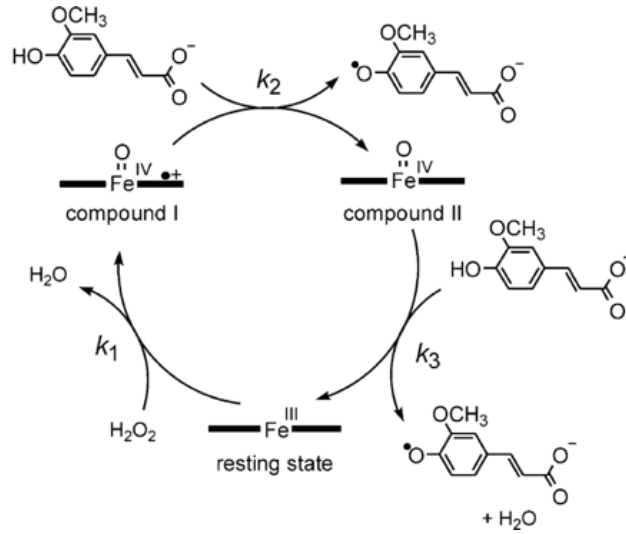
Lipaz Kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
<i>Pseudomonas fluorescen</i>	8.0	55
<i>Candida rugosa</i>	7.0	45
<i>Aspergillus niger</i>	6.5	45
<i>Pseudomonas cepacia</i>	7.0	50
<i>Rhizopus niveus</i>	7.0	50
<i>Pseudomonas sp.</i>	7.0	50
<i>Mucor javanicus</i>	7.0	40
<i>Rhizopus oryzae</i>	7.0	40
<i>Penicillium camerbertyi</i>	5.0	45

Lipazlar türlerine bağlı olarak pH 3.0-12.0 aralığında aktivite gösterebilirler. Bununla birlikte birçok lipaz nötral ya da alkali pH değerlerinde optimum aktivite gösterir. Lipazlar genellikle 30-60 °C sıcaklıkta optimum aktivite gösterirler ve genellikle organik çözücülere karşı dayanıklıdır. Ayrıca Ca<sup>2+</sup> iyonları lipazları aktive ederken, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> iyonları lipazları inhibe etmektedir (Verma vd., 2012). Tüm bu fiziksel ve kimyasal özellikleri kapsamında lipazlar endüstriyel ve laboratuvar çalışmalarının vazgeçilmez enzimleridir.

## 1.7. Peroksidazlar

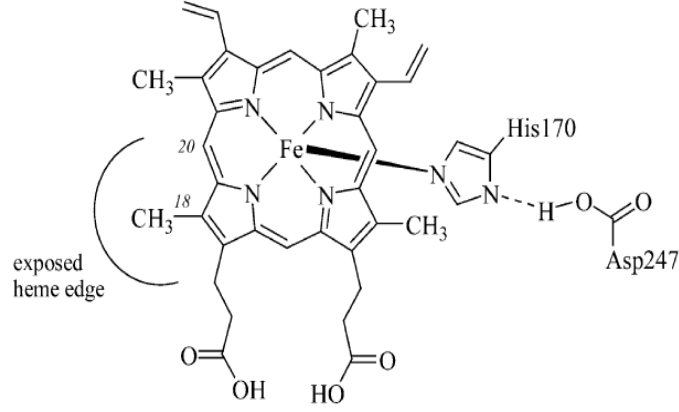
Peroksidazlar (EC 1.11.1.7) oksidoredüktazlar enzim sınıfında bulunan antioksidatif bir enzim grubudur. Peroksidazların optimal substratı hidrojen peroksittir (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Fakat bazı

peroksidazlar lipid peroksidler gibi organik hidroperoksidleri de substrat olarak kullanırlar. Peroksidaz katalitik reaksiyonunda hidrojen peroksit hidrojen atomu akseptörü, diğer substrat ise hidrojen atomu donörü olarak görev alır. Böylece peroksidaz ikinci bir substrat varlığında hidrojen peroksiti indirgeyip su oluştururken diğer substratı da yükseltgemektedir. Şekil 10'da yaban turbu peroksidazın (HRP) *hem* grubunun ferrulik asit ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) substratlarıyla katalitik döngüsü açıklanmıştır.



**Şekil 10.** Peroksidaz enzimlerinin katalitik mekanizması (Veitch, 2004).

Peroksidazların katalitik merkezinde *hem* grubu bulunur. Bu yüzden peroksidazlar *hem* proteinlerdir ve prostetik grup olarak demir (III) ve protoporfirin IX içerirler. Bazı peroksidazlarda ise *hem* grubu yerine sistein veya selenosistein bulunur. Peroksidazların molekül ağırlıkları 30-150 kD aralığında değişmektedir (Mugdha ve Usha, 2012). Peroksidazların etki ettiği grup spesifik bir grup ise onun adıyla birlikte belirtilir: glutatyon peroksidaz, lignin peroksidaz gibi; fakat birçok gruba etki ediyor dolayısıyla substrat sayısı fazla ise sadece peroksidaz olarak belirtilir. Peroksidazların *hem* yapısı Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Peroksidaz enzimlerinin hem yapısı (Veitch, 2004).

Peroksidazlar için elektron donörü tamamen enzimin yapısına bağlıdır. Örneğin, horseradish (yaban turpu) peroksidazı birçok organik bileşiği elektron donörü veya akseptörü olarak kullanabilir. Çünkü katalitik bölgesi açık konumda bulunur, böylece birçok bileşik buraya kolayca ulaşabilir (Veitch, 2004). Fakat katalitik bölgesi sıkıca kapalı olan sitokrom c peroksidaz enziminin donör ve akseptörleri oldukça spesifiktir. Çizelge 6'da bazı peroksidazların kaynakları ve kullanım alanları açıklanmıştır.

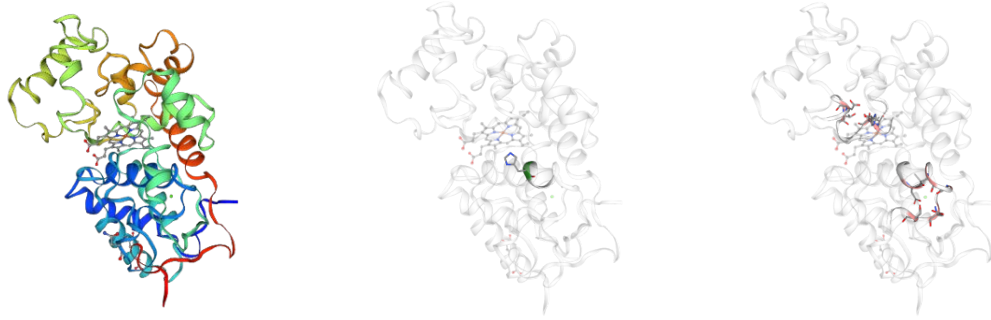
Çizelge 6. Bazı peroksidazların kaynakları ve kullanım alanları (Bansal ve Kanwar, 2013).

Peroksidaz	Tür	Mikroorganizma	Uygulama
Peroksidaz	Bakteri	<i>E. coli</i>	Boya Giderimi
Peroksidaz	Bakteri	<i>Bacillus sp.</i>	Boya Giderimi
Mangan Peroksidaz	Fungus	<i>Coriolus versicolor</i>	Biyodelignifikasyon
Lignin Peroksidaz	Bakteri	<i>Citrobacter sp.</i>	Black Liquor
Lignin Peroksidaz	Maya	<i>Candida crusei</i>	Basic Violet 3
Lignin Peroksidaz	Bakteri	<i>Pseudomonas desmolyticum</i>	Direct Blue 6
Mangan Peroksidaz	Bakteri	<i>Pseudomonas sp.</i>	Malachite Green
Lignin Peroksidaz	Fungus	<i>Pleurotusostreatus</i>	Remazol Brilliant
Peroksidaz	Bakteri	<i>Pseudomonas sp.</i>	Congo Red
Lignin Peroksidaz	Fungus	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Azo Boyalar
Peroksidaz	Bakteri	<i>Clostridium bifermentans</i>	Reaktif Azo Boyalar
Versatil Peroksidaz	Fungus	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	Reactiveblue 5
DyP Peroksidaz	Fungus	<i>Auricularia auricularia judae</i>	Redoks Boyalar
Lignin Peroksidaz	Bakteri	<i>Bacillus sp.</i>	Navy Blue 2GL
DyP Peroksidaz	Fungus	<i>Pleurotusostreatus</i>	Azo Boyalar

Peroksidazlar birçok kaynaktan elde edilmektedirler. Diğer enzimlerde olduğu gibi başlıca üretim kaynakları bakteri, fungus ve mayalardır. Mikroorganizmalar dışında hayvan ve bitki kaynaklı peroksidazlar da mevcuttur. En iyi bilinen bitkisel kaynaklı peroksidazlar yaban turbu, muz ve papayadan elde edilmektedir.

### 1.7.1. Yaban Turbu (Horseradish=*Armoracia rusticana*) Peroksidazı

Yaban turbu (Horseradish=*Armoracia rusticana*) peroksidazı 308 amino asitten oluşan tek zincir bir polipeptittir ve amino asit sekansı 1976'da Welinder tarafından belirlenmiştir (Veitch, 2004). Polipeptidin N-terminalinde bir glutamat bulunurken C-terminalinde serin amino asiti bulunur. Yapıda ayrıca sisteinler arasında 4 disülfid bağı ve aspartat ile arjinin arasında bir tuz köprüsü bulunmaktadır. Yapısında heptasakkaritler bulunan horseradish peroksidaz enziminin ortalama %20 karbonhidrat içeriği vardır. Şekil 12'de horseradish peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı, aktif merkez, protoporfirin IX ve demir(III) gruplarının yapı üzerindeki konumu gösterilmiştir.



**Şekil 12.** Horseradish peroksidaz enzimin üç boyutlu yapısı (solda), aktif merkez (ortada, renkli bölge), protoporfirin IX ve demir (III) gruplarının yapı üzerindeki konumu (sağda, renkli bölge) (<https://swissmodel.expasy.org>, 2021).

Horseradish peroksidazının yapısında iki metal merkez bulunur: demir(III) ve protoporfirin IX. Ayrıca yapıda iki kalsiyum atomu da bulunur. Hem metal merkezler hem de kalsiyum atomları enzimin yapısı ve aktivitesi için önemlidir. Enzimin üç boyutlu yapısı incelendiğinde çoğunlukla  $\alpha$ -heliks yapısı göstermesiyle birlikte az miktarda  $\beta$ -katlanma da

yaptığı görülür. Katalitik bölgede bulunan *hem* grubu çevresindeki amino asitlerden histidin, aspartat ve arginin katalitik aktiviteden sorumlu amino asitlerdir.

## 1.8. Endüstriyel Atık Sular

Tatlı sular, denizler ve canlı yaşamı için önemli olan su kaynakları endüstri atıklarından olumsuz etkilenmektedir. İnsan yaşamı için gerekli olan bu kaynakların endüstriyel atıklar ile kirlenmesi çevre üzerinde bertaraf kapasitesinden daha fazla yüklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Özellikle su kaynakları aşırı kirletici yüklere maruz kalmakta ve bazen bu kaynakların olumlu kullanım imkanları tamamen sona ermektedir. Su kaynakları canlı yaşamı için hayati önem arz eden önemli doğal kaynaklardır ve iyi yönetildiği sürece yenilenebilir kaynak olmaya devam etmektedir. Endüstriyel atıkların ve/veya atık suların bertaraf edilmeden tatlı su kaynaklarına bırakılması sonucunda nehirler, göller ve denizler kirlenmektedir. Bu sebeple kimyasallar, hormonlar, pestisitler, yağlar, sentetik boyalar ve farmasötiklerin bertarafı önemli bir çalışma alanıdır. Özellikle trifenilmetan ve azo temelli sentetik boyalar kâğıt, tekstil ve kozmetik endüstrisinde sıklıkla kullanılmakta olup bertaraf edilmedikleri takdirde çevreye ve insan sağlığına ciddi zararları bulunmaktadır. Yüksek derecede toksik olan bu kirleticileri içeren atıkların bertaraf edilmeden çevreye salınması, genotoksik aktiviteye neden olarak diyabet, obezite, üreme bozukluğu, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır (Zdarta vd., 2018).

Azo temelli sentetik boyalar hem toplam üretim hacmi bakımından hem de farklı kimyasal yapı çeşitliliği olarak en geniş boyar madde grubunu oluşturmaktadır. Bu özellikleri ile renk çeşitliliğinin çok fazla olması sebebiyle tekstil başta olmak üzere birçok endüstri kolunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tür inatçı kirleticilere karşı geleneksel atık su arıtma yöntemleri yetersiz kaldığından bu maddelerin bertarafı için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Kaushik ve Malik, 2009). Bu yöntemlerin başında enzimatik atık su giderimi için kullanılan enzimler ve bu enzimlerin immobilize olarak kullanıldığı sistemler gelmektedir.

Enzimlerin, spesifik kirleticileri hedeflemek için atık arıtım işlemlerinde kullanılabileceğine dair artan bir kabul vardır. Geleneksel işlemlere kıyasla enzimatik işlemin doğrudan kirleticiyi hedefleme, kolay işlem kontrolü sağlama, geniş bir pH, sıcaklık ve tuzluluk aralığında çalışma, yüksek ve düşük kirletici derişimlerinde çalışma gibi potansiyel avantajları



vardır. Oksidatif enzimlerin, çok sayıda atık arıtma uygulamasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Durán ve Esposito, 2000). Peroksidazlar ve fenoloksidazlar, spesifik inatçı kirleticiler üzerinde etkili olabilecek potansiyel enzim gruplarıdır. Yaban turbu peroksidazı, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz, çeşitli inatçı aromatik bileşiklerin gideriminde kullanılan önemli enzimlerdir. Yaban turbu peroksidaz; fenollerin, bisfenollerin, anilinlerin, benzidinlerin ve ilgili heteroaromatik bileşiklerin oksidasyonunu kataliz edebilir. Buna ilaveten geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivitesini koruduğu için atık su arıtımı için uygundur (Durán ve Esposito, 2000).

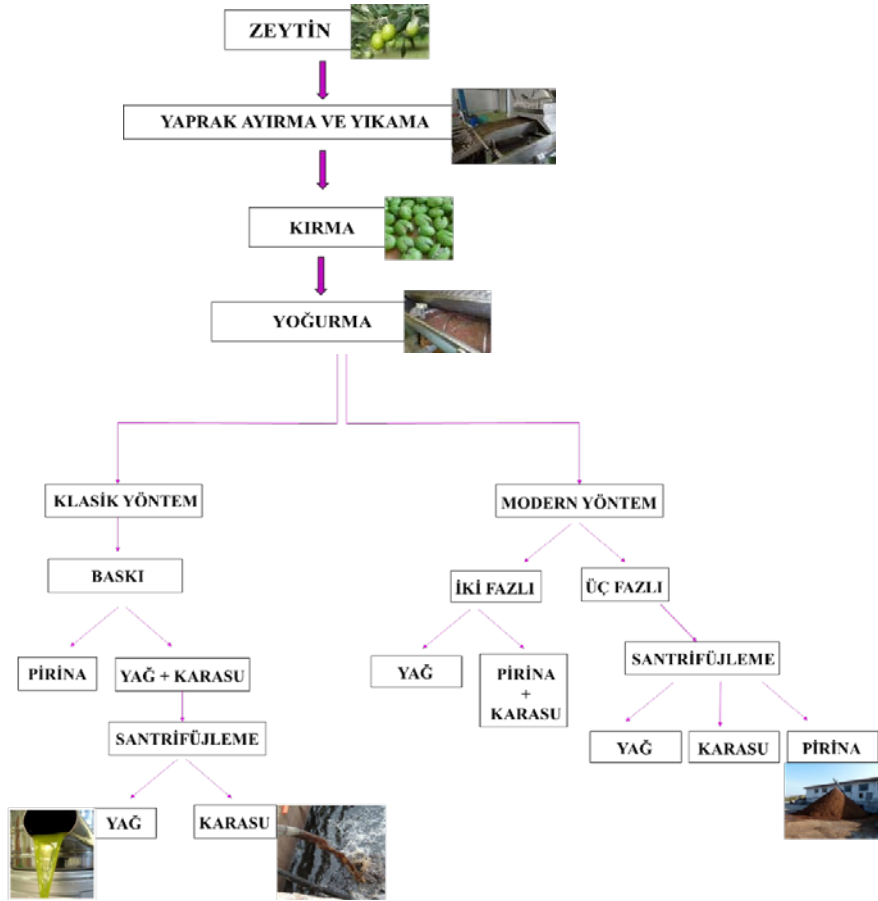
Bu alandaki en son araştırmalar, atık su arıtımı için enzim immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır.

### **1.8.1. Zeytin Karasuyu**

Zeytinyağı üretimi sırasında ortaya çıkan zeytin karasuyu zeytinin kendi özsuğu, yıkama suları, işleme sırasında eklenen su ve pirinadan sızan suğun bir araya gelmesi ile oluşur (Sassi vd., 2006). Zeytinyağı üretimi de bir endüstri alanı olup bu üretim sırasında oluşan zeytin karasuyu endüstriyel atık su olarak tanımlanabilmektedir. Diğer endüstri atık sularından farklı olarak birçok kirleticiyi bir arada içeren kompleks bir atık su olarak karşımıza çıkar. Zeytinin işlenmesinden kaynaklanan atık su, 220 g/L kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) ve 100 g/L biyokimyasal oksijen talebi (BOD) ile en güçlü endüstriyel atık sulardan biridir. Özellikle içerdiği yağ oranı diğer endüstri atık suları ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Zeytin karasuyunun içeriği ve özellikleri; zeytinyağı üretim yöntemi, zeytin türü ve olgunluğu, bulunduğu bölgenin iklim koşulları ve yetiştirme yöntemleri gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Karasu genel anlamda koyu renkli, bulanık, kötü kokulu, yüksek miktarda askıda katı madde, yüksek organik madde konsantrasyonları ile karakterize edilmekte; ayrıca yağ ve fenolik bileşikler gibi kirletici özelliği yüksek olan maddeleri içermektedir.

Her zeytin ağacından yılda ortalama 15-40 kg zeytin toplanmaktadır. Zeytinyağı üretim işleminden kaynaklanan karasu, işleme bağılı olarak 1000 kg zeytin başına 0,5-1,5 m<sup>3</sup>tür. Şekil 13'te zeytinyağı üretim işlemi ve karasuyun oluşum süreci gösterilmiştir. İki ve üç fazlı modern yöntemler klasik yöntemle kıyasla daha az ancak daha fazla konsantre atık su üretirler. Zeytin karasuyunun ortalama bileşimi %83-96 su, %3,5-15 organik madde ve %0,5-2 mineral tuzdur. Karasuyun koyu rengi, bu suğun en inatçı fraksiyonunu oluşturan lignin benzeri bir yapı

sergileyen polimerik fenolik bileşiklerin (organik maddenin %10'una karşılık gelir) varlığıyla ilişkilendirilmiştir ve kirletici karakterinin temelini oluşturmaktadır. Karasuyun inatçı bir atık olarak karakterize edilmesine katkıda bulunan yüksek asitliğin yanı sıra büyük miktarlarda fenoller ve askıda katı madde varlığı gözlemlenmektedir. Ayrıca uzun zincirli yağ asitleri, lipidler, karbonhidratlar ve proteinlerden oluşan yüksek organik içerik ve başta potasyum olmak üzere kalsiyum, sodyum, magnezyum ve demir tuzları gibi yüksek inorganik tuz içeriği zeytin karasuyunun kirletici karakterinin diğer öğeleridir. Fenolik bileşikler: basit fenoller, flavonoidler veya basit fenollerin polimerizasyonundan kaynaklanan polifenoller olabilir. Yüksek organik yük ve ilişkili toksisite, zeytin karasuyunun bertarafını zorunlu kılar.



Şekil 13. Zeytinyağı üretim işlemi ve karasuyun oluşumu (Yavaşer, 2019).

Zeytin karasuyu yüksek organik madde içeriği, asidik pH ve toksik özellikte fenolik bileşikler ve yağ asitleri içerdiği için kontrolsüz olarak çevreye bırakılması ciddi çevre problemlerine neden olmaktadır. Doğrudan doğaya bırakılması sonucunda kötü koku oluşmakta, doğal suların yapısı bozulmakta, ortamdaki çözülmüş oksijen azalmakta, toprak

kalitesi bozulmakta ve bitkiler olumsuz etkilenmektedir. Zeytin karasuyunun bertarafında önemli olan bir aşama renkli polimerik fenolik bileşiklerin monomerlerine yıkımıdır. Fenolik bileşik gideriminin derecesi toplam fenolik bileşik tayini yapılarak belirlenebilir. Bunun yanında karasuyun yapısında bulunan yağlar özellikle su kaynakları üzerinde birikerek su kaynağının biyolojik dengesini bozmakta ve canlı hayatını tehlikeye atmaktadır.

Şu anda zeytin karasuyunun çevreye bırakılmasını düzenleyen bir Avrupa mevzuatı yoktur ve standartlar tek tek ülkelere bırakılmıştır. Halihazırda uygulanan uygulamalar arasında araziye bırakma, yakındaki nehirlere, göllere veya denizlere bırakma veya lagünlerde depolama/buharlaştırma yer almaktadır. Bu uygulamaların tamamında toprak kirliliği, su kirliliği, yer altı sızıntısı ve koku gibi çevresel problemlerle sıklıkla karşılaşılır. Bunun yanında işlenmemiş karasuyun bir gübre olarak topraklarda ve mahsullerde kontrollü bir şekilde kullanılması bertaraf sorununu kısmen çözen yaygın bir uygulamadır. Fakat bu uygulama yeterli olmamakta ve çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemler arasında enzimatik atık su giderimi özellikle immobilize enzimlerin kullanıldığı sistemler ile güncel olarak dikkat çeken bir uygulamadır.

Literatürde yer etmiş çalışmalara baktığımızda enzimleri çeşitli endüstri alanlarında ve biyoteknolojik araştırmalarda uzun yıllardır tercih edilen ve çalışılan biyokatalizörler olarak görüyoruz. Atık su arıtımında kullanılan enzimlere bakıldığında ise özellikle peroksidaz ve lipazların öne çıktığını söyleyebiliriz. Lipaz ve peroksidaz enzimlerinin immobilize edilerek atık su arıtımında kullanılması oldukça güncel bir konudur. Ayrıca enzimlerin immobilize olarak kullanılması kazanmış oldukları birçok avantaj dolayısıyla tercih sebebidir. Çoğunlukla enzimler tek şekilde immobilize edilmesine rağmen birden fazla enzimin birlikte immobilize edilmesi yani ko-immobilizasyon işlemi özellikle biyosensör uygulamalarında karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan enzimler özellikle aynı substratı katalizleyen ya da diğer enzimin katalizlediği reaksiyonun ürününü substrat olarak kullanan iki veya daha fazla enzim için gerçekleştirilmiştir. Biribirinden farklı ve bağımsız reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ko-immobilizasyonu literatürde sık karşılaşılan bir durum değildir ve bu konuda fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında atık sularda sık karşılaşılan sentetik boyalar ve fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan ve katalizleyen yaban turbu peroksidazı (HRP) ve triaçil gliserollerini substrat olarak kullanan ve katalizleyen *Aspergillus niger* lipazı enzimlerinin aljinat boncuk, manyetik aljinat boncuk, aljinat/kitosan boncuk ve manyetik aljinat/kitosan boncuk olmak üzere dört farklı taşıyıcıya tutuklama yöntemi ile ko-immobilizasyonu hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda ko-immobilizasyonu yapılan

enzimlerin farklı sentetik boyaların renk gideriminde, zeytin karasuyunda fenolik bileşiklerin gideriminde ve yağın hidrolizinde kullanılması öngörülmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Peroksidaz İmmobilizasyon Çalışmaları

Alemzadeh ve Nejati (2009) fenolün uzaklaştırılması amacıyla gözenekli kalsiyum aljinat içine HRP'nin immobilizasyonunu denemiştir. HRP'nin kalsiyum aljinatta immobilizasyonu için en uygun koşullar belirlenmiştir. Jelleşme (tutuklama), %5,5 (ağırlık/hacim) kalsiyum klorür varlığında ve %1 (ağırlık/hacim) sodyum aljinatta optimize edilmiştir. En yüksek giderim, 2 mM'lık fenol derişimine ait bulunmuştur. Hem immobilize hem de serbest enzimler için fenol giderimine yönelik araştırma, immobilize enzimin serbest enzim derişimine kıyasla daha düşük etkinliğe sahip olduğunu göstermiş; bununla birlikte kapsüller, aktivitelerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın dört döngüye kadar yeniden kullanılabilmiştir. Enzim derişiminin 0,15'ten 0,8 birim/g aljinat'a yükseltilmesi, fenolün uzaklaştırılmasında kademeli artışa neden olmuştur. En yüksek fenol gideriminin elde edildiği hidrojen peroksit/fenol oranının ilk fenol derişimine bağlı olduğu ve 2 ve 8 mM fenol çözeltisinde sırasıyla 1,15 ve 0,94 olduğu bulunmuştur.

Park vd. (2012) peptit nanotüp (PNT) içine HRP immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve aktivitesini ölçmüştür. Enzim denemesinde 0,16 µg enzimin 1 mg PNT içine immobilize edildiği belirtilmiştir. İmmobilizasyon ayrıca taramalı elektron mikroskobu (SEM), ultraviyole spektroskopisi (UV) ve fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile doğrulanmıştır. İmmobilize HRP'nin aktivitesi, termal stabilitesi, uzun vadeli depolama stabilitesi ve denatürasyon direnci incelenmiştir. İmmobilize enzim 18 gün boyunca aktivitesini %90'a kadar koruyarak iyi bir depolama kararlılığı göstermiş, serbest HRP aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. Termal stabilite sonucuna göre 55 °C'de immobilize HRP aktivitesi, serbest HRP'den %20 daha yüksek bulunmuştur. İmmobilize HRP aktivitesi, guanidinyum hidroklorür (GdmHCl) varlığında serbest HRP'den yaklaşık %10 daha yüksek bulunmuştur. Çalışmanın sonunda, HRP'nin PNT içerisine immobilize edilmesinin, çeşitli ortamlarda enzim aktivitesini stabil tutmanın etkili bir yolu olabileceği belirtilmiştir.

Satvekar vd. (2014) silika soljel ve dekstrandan imal edilen yeni bir soljel organik-inorganik nanokompozit destek materyali üretmiştir. Bu destek materyali hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) için bir biyosensör oluşturmak üzere HRP immobilizasyonu için kullanılmıştır. Sensör filmi, enzimin yapısal özellikleri ve konformasyonu açısından FTIR ve UV spektroskopisi ile

karakterize edilmiştir. Biyosensör yüksek elektron transfer etkinliğine sahip bir aracı olarak metilen mavisi varlığında kantitatif olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimini tayin etmek için kullanılmıştır. Biyosensör pH 7.0'de, 0,5 mM ile 16,5 mM derişim aralığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e yanıt vermiş ve saptama sınırının 0,5 mM bulunduğu belirtilmiştir.

Vinueza Galárraga vd. (2013) yaptıkları çalışmada mısır koçanı tozu üzerine immobilize edilmiş peroksidazın bromfenol mavisinin renk giderimi için etkinliğini değerlendirmiştir. Peroksidaz soya fasulyesi tohum kabuğundan ekstrakte edilmiş, ardından yüzeyinin aminasyonu yapılmıştır. Aminleştirilmiş peroksidaz, yüksek düzeyde aktifleştirilmiş mısır koçanı tozu üzerine immobilize edilmiş ve bromfenol mavisinin renginin giderimi için kullanılmıştır. Ekstraktın protein miktarı 0,235±0,011 mg/mL ve spesifik peroksidaz aktivitesi substrat olarak 1 mmol/L ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)] kullanılarak 86,06±1,52 µmol/dk/mg bulunmuştur. İmmobilizasyonun ardından peroksidaz serbest enzime göre %86 aktivite göstermiştir. İmmobilize peroksidazın bromfenol mavisinin renk giderimini 30 dakika reaksiyon süresinden sonra %89 bulunmuştur. Ayrıca üç kez kullanım sonrası katalitik aktivitenin %60'ı korunmuştur. Soya fasulyesi tohum kabuğundan ekstrakte edilmiş peroksidaz düşük maliyetli olan mısır koçanı tozu desteği üzerine immobilize edildiğinde yüksek termal stabilite sergilemiştir.

Xu vd. (2013) yaban turbu (*Amoracia rustikana*) köklerinden ekstrakte edilen HRP'yi yeni enzim taşıyıcıları poli(metil metakrilat ko-etil akrilat) (PMMA CEA) mikrofibröz membranları üzerine başarıyla immobilize etmiş ve bisfenol A'nın sudan uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Fiber çapları 300-500 nm olan PMMA CEA lifli membranlar (PFM), elektrospinning ile üretilmiştir. HRP, önceden polietilenimin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş mikrofibrlerin yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiştir. HRP yüklemesi 285 mg/g'a ulaşmış ve enzim aktivitesi, immobilizasyondan sonra serbest HRP'nin %70'i olarak bulunmuştur. HRP'nin hem kararlılığı hem de yeniden kullanılabilirliği, immobilizasyondan sonra büyük ölçüde gelişmiştir. Tekrarlanan altı çalışmadan sonra, immobilize HRP, başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumuştur. İmmobilize HRP, bisfenol A (BPA) için 3 saatte %93, serbest HRP %61 ve tek başına PFM %42 giderim etkinliği göstermiştir.

Jiang vd. (2014) HRP'yi biyomimetik titanifikasyon ile fosfolipid kaplı titanyum dioksit partiküller içine tutuklamış, fenolik bileşikler ve boya ile kirlenmiş atık suyun arıtılmasında kullanılmıştır. Tutuklanmış HRP, iyileştirilmiş termal stabilite, geniş pH stabilitesi aralığı ve inaktive edici maddelere karşı yüksek tolerans sergilemiştir. Tutuklanmış HRP için K<sub>m</sub> değerinde (8,21 mM) serbest ile karşılaştırıldığında artış gözlenmiştir. Tutuklanmış HRP ile

fenolik bileşiklerin ve boyanın uzaklaştırılmasındaki pratik uygulamalar için, birinci işlem döngüsünde fenol, 2-klorofenol, Direct Black-38 için giderim verimliliği sırasıyla %92,99; %87,97 ve %79,72 bulunmuştur. Ek olarak tutuklanmış HRP'nin serbest HRP'den daha iyi boya giderim verimliliği ve iyi bir yeniden kullanım kapasitesi gösterdiği belirtilmiştir.

Spasojević vd. (2014) aljinat boncuklara HRP immobilizasyonunu enzim ve polisakkarit zincirlerinin kimyasal modifikasyonu ile gerçekleştirmiştir. HRP ve aljinat, periyodat ile oksitlenmiş ve ardından etilendiamin ile modifiye edilmiştir. En yüksek immobilizasyon etkinliği %81 olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin aktivitesi 0,43 U/mL olarak hesaplanmıştır. İmmobilize enzim, %80 (v/v) dioksan içinde 2 gün inkübasyondan sonra orijinal aktivitesinin %75'ini korumuş ve doğal enzime kıyasla bazik çöeltelerde artan aktivite göstermiştir. Pyrogallol oksidasyonu için kesikli reaktörde tekrarlanan kullanım sırasında immobilize peroksidaz, orijinal aktivitesinin %75'ini korumuştur. Bu çalışma sonucunda immobilize enzimin iyi bir stabilite ve tekrar kullanım gösterdiği rapor edilmiştir.

Jankowska vd. (2021) elektrospun malzemelere ve immobilize enzime dayalı olarak boya giderimi için oldukça etkili, yeni, ucuz, çevre dostu ve sürdürülebilir bir çözüm önermiştir. Adsorpsiyon ve kovalent bağlama ile poliamid 6 elektrospun lifleri üzerine HRP immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, kirli deniz sularını taklit ederek boyaların renksizleştirilmesi için uygulanmıştır. İmmobilize HRP'nin en yüksek bağlı aktivitesi, adsorpsiyon yöntemi için 50 °C ve pH 7.0'de 60 dakika; kovalent yöntem için, %3 glutaraldehit derişiminde 60 °C ve pH 7.0'de 70 dakika sonra elde edilmiştir. Üretilen biyokatalitik sistemlerin yüksek katalitik özelliklere sahip olduğu bulunmuş ve kirli deniz sularını taklit eden çözeltilerden Reaktif Siyah 5 ve Malakit Yeşili tekstil boyalarının renk giderimi için kullanılmıştır. Boyaların en yüksek renk giderme verimleri pH 7.0 ve 25 °C sıcaklıkta 60 dakikalık işlemde sonra elde edilmiş ve %70'in üzerine çıkmıştır. Gelecekte renk giderme süreçlerinde immobilize edilmiş enzimlerin kullanımına dayalı olarak sunulan yaklaşımın boyaların endüstriyel olarak uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayacağı belirtilmiştir.

B. Chen vd. (2021) TiO<sub>2</sub> nanopartikülü iki amaç için kullanmıştır: HRP'nin immobilizasyonu için katı bir taşıyıcı olarak ve bir fotokatalizör olarak. Bu şekilde enzim immobilizasyonu sırasında enzimatik aktivite kaybının TiO<sub>2</sub> fotokatalizörünün bağlanmasıyla telafi edilebilir olduğu öngörülmüştür. İmmobilizasyon sürecinde TiO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının yüzeyi faz geçişli lizozim (PTL) ile modifiye edilmiş ve bir DNA sarmalı (HRP-DNA-PTL@TiO<sub>2</sub>) aracılığıyla HRP ile bağlanmıştır. DNA çift sarmal zinciri immobilize enzimin esnekliğini korumak için esnek bir aralayıcı kol olarak kullanılmıştır. HRP-DNA-PTL@TiO<sub>2</sub>,

atık sudaki fenol parçalanırken yüksek katalitik aktivite, stabilite ve yeniden kullanılabilirliği koruyabilmiştir. İmmobilize enzim 0,5 mmol/L'lik fenolü 10 dakika içinde tamamen gidermiştir. Ayrıca HRP-DNA-PTL@TiO<sub>2</sub> ile 0-0,2 mmol/L fenol derişimi için görsel bir kolorimetrik yöntem olarak çıplak gözle tespit edilebilir bir sistem oluşturmuştur. HRP-DNA-PTL@TiO<sub>2</sub>'nin verimliliği, enzimatik ve fotokatalitik sinerjik etkisi ile atık su arıtımında potansiyel bir uygulama olabileceği belirtilmiştir.

El-Naggar vd. (2021) çalışmalarında iki farklı modifiye nişasta: mikro gözenekli nişasta (MPS) ve katyonik mikro gözenekli nişasta (CMPS) sentezlemiştir. Sonrasında HRP'nin CMPS üzerinde immobilizasyonu pH 6.0 ve 100 Ünite enzim/100 mg CMPS'de en yüksek immobilizasyon verimini (%86) ile gerçekleştirilmiştir. CMPS-HRP'nin 10 kez yeniden kullanımından sonra başlangıç etkinliğinin %66'sını koruduğu belirtilmiştir. Serbest HRP'nin optimum pH'ı 6.0 iken, CMPS-HRP 6.0-7.0 arasında geniş bir pH optimumu göstermiştir. Serbest HRP ve CMPS-HRP'nin optimum sıcaklıkları sırasıyla 30 °C ve 40 °C olarak ölçülmüştür. Serbest HRP 40 °C sıcaklığa kadar aktivite gösterirken, CMPS-HRP 50 °C sıcaklığa kadar aktivite göstermiştir. Serbest HRP ve CMPS-HRP'nin K<sub>m</sub> değerleri sırasıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 6,6 mM ve 10,8 mM ve guaiacol için 34 mM ve 41,6 mM olarak bulunmuştur. CMPS-HRP çeşitli substratlara karşı serbest HRP'den daha yüksek afinite göstermiştir. CMPS-HRP; ağır metaller, üre, izopropanol, Triton X-100 ve tripsine karşı serbest enzime göre daha fazla stabilite göstermiştir. CMPS-HRP'nin serbest HRP'ye kıyasla fenol ve p-klorofenolü gidermek için daha yüksek potansiyel gösterdiği belirtilmiştir.

Aldahri vd. (2021) yaban turbu peroksidazının (HRP) yeni iki boyutlu bir bakır oksit nanotabaka (CuONS) üzerinde immobilizasyonu ve poli(metil metakrilat) (PMMA) içinde kapsülleme ile desteklenmesini raporlamışlar. CuONS-PMMA üzerinde immobilize edilmiş HRP'nin morfolojik/kimyasal özellikleri araştırılmış, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir. İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra %1 CuONS-PMMA kullanılarak geri kazanılan HRP aktivitesi %72,8 olmuştur. İmmobilize enzimin on döngü sonunda başlangıç aktivitesinin %52'sinin korunduğu gösterilmiştir. Ayrıca HRP'nin bu yöntem kullanılarak immobilizasyonu optimum pH'nın 7.0'den 7.5'a ve optimum sıcaklığın 40 °C'den 50 °C'ye kaymasına neden olmuştur. Serbest ve immobilize HRP'nin K<sub>m</sub> değerleri sırasıyla guaiacol için 30,2 ve 46,7 mM ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 5,53 ve 8,55 mM bulunmuştur. İmmobilize HRP enziminin metal iyonlarına karşı daha kararlı olduğu bildirilmiştir. İmmobilize HRP kristal mor, metil yeşili ve malakit yeşili boya renklerinin giderimi için kullanılmıştır. İmmobilize HRP serbest enzime göre boya renk



giderme kapasitesinde önemli bir gelişme göstermiştir. Bu nedenle HRP immobilizasyonu için kullanılan bu tekniğin endüstriyel uygulamalar için umut verici olduğu bildirilmiştir.

Mirdamadian vd. (2021) çalışmalarında peroksit nanoparçacıklarının ve HRP'nin çekirdek-kabuk immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve organik kirleticilerin gideriminde kullanılmasının avantajlarını araştırmıştır. Bu yeni teknoloji mikrobiyal popülasyon için fenolik şoku önlemek amacıyla kirli sudan fenolün uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Kalsiyum peroksit nanopartikülleri tarafından hidrojen peroksit üretimi magnezyum peroksitten altı kat daha yüksek olabileceğinden sonraki deneyler için hidrojen peroksit tedarikçisi olarak kalsiyum peroksit seçilmiştir. Kitosan ve aljinatın immobilizasyon matrisi olarak difüzyon özellikleri ve mekanik kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Mekanik kararlılık %6'lık kitosan için  $3,0 \pm 0,9$  g ve %3'lük aljinat için  $19,0 \pm 3,3$  g bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kitosanın (%6 w/v) sodyum tripolifosfat ile çapraz bağlanmasıyla %1 (w/v) nanopartiküller içeren mikrokapsül çekirdeği oluşturulmuştur. Daha sonra kalsiyum klorür ile çapraz bağlanmış enzim içeren bir aljinat tabakası (%3 w/v) ile muntazam bir şekilde kaplanmıştır. Enzim kaynağı olarak ticari yaban turbu peroksidazı ve yaban turbu köklerinden kısmen saflaştırılmış peroksidaz hazırlanan mikrokapsüllerin endüstriyel kullanımlar için uygulanmasını değerlendirmek üzere karşılaştırılmıştır. Optimize edilmiş çekirdek-kabuk mikrokapsüllerinin ilk fenol uzaklaştırma hızı sabit reaksiyon hacminde  $0,0687 \mu\text{mol fenol/saat}$  bulunmuş ve kolon deneylerinde 15 gün sonra kademeli olarak başlangıç hızının %50'sine düştüğü görülmüştür.

## 2.2. Lipaz İmmobilizasyon Çalışmaları

Won vd. (2005) *Candida rugosa* lipazını, sodyum aljinat çözeltisi ve enzim karışımının  $\text{Ca}^{2+}$  tuzu çözeltisine damla damla eklenmesiyle immobilize etmiştir. Aljinat derişimi,  $\text{CaCl}_2$  derişimi, enzimin aljinata oranı (E/A) ve boncuk boyutu gibi immobilizasyon koşullarının yükleme verimliliği (tutulan toplam enzim yüzdesi) ve immobilizasyon verimi (hapsedilmiş lipazın serbest lipaza spesifik aktivite oranı) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Aljinat derişimindeki artış, yükleme verimliliğini arttırmış, ancak immobilizasyon verimini düşürmüştür.  $\text{CaCl}_2$  derişiminin yükleme verimliliği ve immobilizasyon verimi üzerinde benzer bir etkiye sahip olması beklenirken, test edilen etki 50-300 mM aralığından küçük bulunmuştur. Artan boncuk boyutuyla birlikte, immobilizasyon verimi kütle aktarım direnci nedeniyle azalmış, ancak yükleme verimliliği değişmemiştir. Enzimin jel boncuklardan dışarı sızmasını

önlemek için boncuklar kitosan ve silikat ile kaplanmıştır. Kaplanmamış boncuklarla karşılaştırıldığında kaplanmış aljinat boncuklar, kaplama yönteminin etkinliğini gösteren daha yüksek yeniden kullanılabilirlik göstermiştir. Silikatla kaplandığında, lipaz immobilize boncukların katalitik aktiviteyi en yüksek düzeyde koruduğu belirtilmiştir.

Kumari vd. (2009) gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir aroma esteri olan izoamil asetatın sentezini çözümsüz bir sistemde gerçekleştirmiştir. İmmobilize *Rhizopus oryzae* NRRL 3562 lipaz kullanılarak izoamil alkolün vinil asetat ile transesterifikasyonu yoluyla izoamil asetat sentez veriminin artırılması için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Mevcut sentezde, substratların immobilize lipaz üzerinde hiçbir inhibitör etkisi olmamıştır. Çeşitli reaksiyon parametrelerinin izoamil asetat sentezi üzerindeki etkileri incelenmiş ve maksimum dönüşüm, %16'lık (w/v) immobilize lipaz ile 40 °C ve 200 rpm'de elde edilmiştir. Bu koşullar altında 8 saatlik reaksiyon süresinin, 0,5 mol/L izoamil alkol ile %95 gibi yüksek bir ester dönüşümüne ulaşmak için yeterli olduğu görülmüştür. Transesterifiye ürünün yapısı, infrared spektroskopisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile doğrulanmıştır. İmmobilize lipaz, solventsiz bir sistemde izoamil asetat sentezi için sırasıyla 306,53 mmol/L ve 99 mmol/g  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerine sahip olduğu bulunmuştur.

Abdulla ve Ravindra (2013) *Burkholderia cepacia* lipazını öncelikle glutaraldehit ile çapraz bağlamış, ardından eşit miktarlarda aljinat ve karragenan doğal polimerlerinden oluşan hibrit taşıyıcı içine hapsedmiştir. İmmobilize lipazın tekrar kullanılabilirlik, enzim sızıntısı, çözücü ve depolama stabilitesi incelenmiş, sıcaklık ve pH'ın immobilize lipaz üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İmmobilizasyondan sonra %89,26 aktivite gözlenmiştir. İmmobilize lipaz ayrıca 4 °C'de iki haftalık depolamanın ardından ilk aktivitesinin %84,02'sini korumuştur. On döngü kullanımdan sonra immobilize lipaz, %75,54 aktivite göstermiştir. Kinetik parametreler,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, sırasıyla serbest lipaz için 3,15 mM ve 12,5 mmol/dk ve immobilize lipaz için 4,17 mM ve 11,11 mmol/dk olarak bulunmuştur. Bu hibrit taşıyıcı ile enzim sızmasında %65,76'lık önemli bir azalma gözlenmiştir. Daha yüksek termal stabilite, iyi depolama stabilitesi, azaltılmış enzim sızıntısı ve daha iyi zeytinyağı hidrolizi, bu enzim immobilizasyon yöntemiyle elde edilen göze çarpan özellikler olarak bildirilmiştir.

Ghasemi vd. (2014) çalışmalarında 1:1 ve 1:2 molar oranlarında  $Fe_3O_4/ZnO$  çekirdek/kabuk manyetik nanopartikülleri hazırlamış ve X-ışını kristalografisi, SEM, termogravimetrik analiz, FTIR spektrumları ve alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak karakterizasyonunu yapmıştır. *Thermomyces lanuginosa* lipazı (TLL) daha sonra her iki desteğin yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Devamında 1:1 molar

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnO oranında nanopartiküller için sırasıyla %94±2,5 ve %86±3,5 immobilizasyon verimi ölçülmüş ve 1:2 molar oranında immobilizasyon verimi sırasıyla %89±2,2 ve %81±3,1 bulunmuştur. Elde edilen sonuç, immobilizasyonun serbest enzime kıyasla termal, pH ve operasyonel stabiliteyi önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir.

Yücel vd. (2014) iki farklı lipazı (triacilgliserol hidrolaz, EC 3.1.1.3): Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388 hem adsorpsiyon hem de kovalent yöntem kullanarak üç farklı düşük maliyetli destek celite 545, silika jel ve stiren divinilbenzen kopolimeri üzerine immobilize etmiştir. Lipozyme TL-100L için maksimum immobilizasyon verimi %79 olarak elde edilmiş ve en yüksek spesifik aktivite Novozym 388 için 6,5 U/mg protein olmuştur. Desteğin ve immobilize türevlerin özellikleri FTIR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Maksimum metil ester verimi %98,3 olarak elde edilmiştir. Kovalent olarak immobilize edilen lipazların, tekrarlanan 10 kullanımdan sonra bile stabil olduğu rapor edilmiştir.

Aybastier ve Demir (2014) *Candida antarctica* lipaz A'yı, kitosan boncuklara kovalent olarak immobilize etmiş ve bu boncukları, atık kızartma kanola yağından yağ açıl metil ester üretimi için kullanmıştır. Optimum immobilizasyon koşulları %12 (v/v) enzim derişimi ve 24 saatlik immobilizasyon süresi olarak belirlenmiştir. Transesterifikasyon reaksiyonu, atık kızartma yağından yağ açıl metil ester üretimi için enzimatik kataliz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, optimum immobilizasyon koşulları altında %60 yağ asit metil ester veriminin elde edildiğini göstermiştir. Operasyonel stabilite, immobilize lipaz ile belirlenmiş ve her biri 24 saatlik ardışık beş parti için tekrar kullanımdan sonra %74 aktivitenin korunduğu gösterilmiştir.

Osuna vd. (2015) tek basamaklı birlikte çöktürme ile elde edilen kitosan kaplı manyetik nanopartiküller (CMNP) üzerine kovalent bağlanma ile *Aspergillus niger* lipazının immobilizasyonunu incelemiştir. Hidroksil ve amino grupları sırasıyla glisidol ve glutaraldehit kullanılarak aktive edilmiştir. FTIR, SEM ve termogravimetrik analiz kullanılarak bu kovalent ajanların enzim ile reaksiyonu ve başarılı bir immobilizasyonun elde edildiği doğrulanmıştır. Enzim, glutaraldehit ve glisidol ile işlenmiş CMNP için sırasıyla 309,5±2,0 ve 266,2±2,8 U/g aktivite göstermiştir. Immobilizasyon, serbest lipaza kıyasla pH ve sıcaklık değişikliklerine karşı enzim stabilitesini arttırmıştır. Ayrıca, serbest ve immobilize enzim için kinetik parametreler K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> belirlenmiştir. Glutaraldehit ile immobilize edilen enzim için ölçülen K<sub>m</sub> değeri serbest lipaza göre 1,7 kat daha düşük bulunmuştur. Immobilize enzim 50 gün boyunca yüksek depolama stabilitesi göstermiştir. Son olarak, immobilize enzim 15 hidrolitik

döngüden sonra başlangıç aktivitelerinin %80'inin üzerinde kalmışlardır. İmmobilize enzim, manyetik ayırmayı içeren çeşitli biyoteknolojik işlemlerde uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

X. Y. Wang vd. (2015) manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@kitosan nanopartikülleri, *in situ* birlikte çökeltme yöntemiyle hazırlanmış ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve FTIR ile karakterize etmiştir. Hazırlanan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@kitosan nanopartiküller elektrostatik tutuklama (CCEE) işleminden sonra kimyasal konjugasyon yoluyla *Thermomyces lanuginosus* lipazının kovalent immobilizasyonu için kullanılmıştır. Optimum immobilizasyon koşulları şu şekilde elde edilmiştir: enzim/destek 19,8 mg/g, pH 5.0; süre 4 saat ve sıcaklık 30 °C. Bu koşullar altında, %75'lik yüksek immobilizasyon verimi elde edilmiştir. İmmobilizasyon ile geniş pH toleransı ve yüksek termostabilite elde edilmiştir. İmmobilize lipaz 10 döngüden sonra başlangıç aktivitesinin %70'ini korumuştur. Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametreleri V<sub>max</sub> ve K<sub>m</sub> sırasıyla 5,72 mM/dk, 2,26 mM/dk ve 21,25 mM, 28,73 mM olarak belirlenmiştir. İmmobilize lipaz ile askorbil palmitat sentezi, 50 °C'de *tert*-butanol içinde gerçekleştirilmiş ve %50'den fazla askorbik asit dönüşümü elde edilmiştir. Bu sonuçlar, lipazın manyetik kitosan nanopartiküller üzerine CCEE yöntemi ile immobilizasyonunun, stabil lipazın hazırlanması için etkili ve basit bir yol olduğu belirtilmiştir.

J. Zhang vd. (2021) tarafından uygun kullanım ve geri dönüşüm için makro destekler üzerinde uygun maliyetli bir immobilizasyon performansı elde etmek için çevre dostu polilaktik asit (PLA) tabanlı 3D baskı makro-iskeleler tasarlanmış, farklı uzunlukta bağlayıcılara sahip fenil grupları eklenmiş ve PLA@AMTS-C7-Ph/PLA@AMTS-C9 kullanılarak lipaz YCJ01 immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda 2227,5 U/g'lık en yüksek enzim aktivitesi, %137,3'lük aktivite geri kazanımı ve 815,9 U/mg'lık artan spesifik aktivite elde edilmiştir. İmmobilize lipaz YCJ01, (S)-1-indanolün aşırı transesterleşmesini kontrol edebileceği ve iyi bir operasyonel stabilite ile 9 tekrar kullanımın gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak immobilize lipaz YCJ01'in yüksek saflıkta enantiyomerik ürünü elde etmek için kullanılabilmesi raporlanmıştır.

Naef ve Seeger (2021) *Candida antarctica* lipaz B enzimini farklı gözeneklere sahip bir dizi silikon nanofilament (SNF) kaplı matris üzerinde immobilize etmiştir. Nano yapının etkisini incelemek için SNF'leri olmayan kontrol örnekleriyle performans karşılaştırılması yapılmıştır. Tüm malzemeler yüzey ölçümleri ile karakterize edilmiş ve katalitik aktivitenin yanı sıra immobilize enzim ölçülmüştür. Enzim yükleri %3,85 w/w ile %2,53 w/w arasında taşıyıcı materyalin yüzey alanının 200 m<sup>2</sup>/g'dan 0,04 m<sup>2</sup>/g'a düşmesiyle azalmış, enzim başına aktivite ise 824 U'den 2040 U'ye yükselmiştir. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu,

enzim başına aktiviteyi 3129 U'ye daha da geliştiren daha ince bir enzim tabakası yaratılmasına izin vermiştir. Bu aktivite, 3073 U'li ticari Novozyme 435 ile kıyaslanabilir olsa da SNF bazlı sistem, katalizi yaklaşık 13 µm ince bir yüzey tabakasında gerçekleştirmiştir. Favori bir uygulama alanı olarak 89622 U.mg/m<sup>2</sup>'ye kadar olan yüzey alanı başına yüksek aktivitenin yüksek sinyal gücüne yol açacağı enzim bazlı algılama sistemlerinin oluşturulabileceği bildirilmiştir.

Stradomska vd. (2021) bu çalışmada enantiyoselektif sentez için en çekici yöntemlerden biri olan dinamik kinetik çözünürlük (DKR) yöntemini çalışmıştır. Farklı hidrofobik gruplarla fonksiyonelleştirilmiş mezogözenekli silis köpükler (MCF) üzerinde immobilize edilmiş *Candida antarctica* lipaz B (CALB) ve ikame edilmiş siklopentadienil ligandları ile iki rutenyum kompleksi (R)-1-feniletanol, kemoenzimatik DKR için Novozym 435 bir kıyaslama biyokatalizörü olarak kullanarak araştırılmıştır. Transesterifikasyon reaksiyonu üzerine yapılan çalışmalar, metil gruplarıyla aşılınmış MCF'ler üzerinde desteklenen CALB'nin umut verici bir biyokatalizör olduğunu ve izopropenil asetatın tercih edilen bir açılasyon maddesi olduğunu göstermiştir. K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> veya t-BuOK tarafından aktive edilen her iki Ru kompleksinin, rasemizasyon reaksiyonunun etkili katalizörleri olduğu kanıtlanmıştır. Seçilen tüm katalizör kombinasyonlarını kullanan son DKR deneyleri, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aktivatörü kullanılarak 8 saatte %96 dönüşüm ve (R)-1-feniletanol asetat enantiyomerik fazlalığı %98 olarak bulunmuştur.

Bordin vd. (2021) çalışmalarında niyobyumlu MCM-41 ve niyobyumlu MCM-48'i, 1-tetradecil-3-metilimidazolyum klorür [(Cl<sub>4</sub>MI)Cl] kullanarak başarılı bir şekilde sentezlemiştir. En iyi Si/Nb molar oranı seçilmiş (Si/Nb=20) ve *Candida antarctica* lipaz B (CALB) enzimi, sentezlenen Nb-MCM'de *in situ* olarak immobilize edilmiştir. SEM mikrografları 0,25 ile 0,75 µm arasında bir çapa sahip çok düzenli küresel aglomeraların oluşumunu göstermiştir. Malzeme Nb-MCM-41 ve Nb-MCM-48 için sırasıyla 954 ve 704 m<sup>2</sup>/g'lık bir yüzey alanı ve 0,321 ve 0,286 cm<sup>3</sup>/g'lık bir gözenek hacmi sunmuştur. Ayrıca, her iki malzeme de 2,261 nm'lik bir gözenek boyutu göstermiştir. Nb-MCM-41 ve Nb-MCM-48'de immobilize edilmiş CALB enzimi için elde edilen devir sayısı sırasıyla %49,62 birim aktivite ile 26 devir ve %53,01 birim aktivite ile 16 devir olmuştur. Her iki malzeme için de enzimatik aktivite oda sıcaklığında ve buzdolabında 5 aylık depolama için sabit kalmıştır. Destekler yüksek sıcaklıklar gerektiren reaksiyonlarda (40, 60 ve 80 °C) endüstriyel uygulamaya uygun olarak esterleşme reaksiyonunu kataliz edebilmiştir. Bu metodolojinin niyobyum ve [(Cl<sub>4</sub>MI)Cl] kullanılarak oldukça aktif ve seçici enzim katalizörlerinin hazırlanmasına izin verdiği rapor edilmiştir.

Sulym vd. (2021) polidimetilsiloksan (PDMS) modifiye MWCNT (modifiye çok duvarlı karbon nanotüpler) üzerinde *Candida antarctica* lipaz B (CALB) immobilizasyonu için oldukça kararlı ve aktif nanobiyokatalizörlerin üretimini gerçekleştirmiştir. Polimerin ağırlıkça %40'ını içeren MWCNT/PDMS nanokompozitleri adsorpsiyon modifikasyonu yoluyla başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. PDMS zincir uzunluğunun üretilen malzemelerin dokusal/yapısal özellikleri üzerindeki etkisi; azot adsorpsiyon-desorpsiyon tekniği, Raman spektroskopisi ve zayıflatılmış toplam yansıma fourier transform infrared spektroskopisi aracılığıyla incelenmiştir. P-MWCNT ve MWCNT/PDMS nanokompozitleri lipaz immobilizasyonu için destek olarak test edilmiştir. Enzimin P-MWCNT ve MWCNT/PDMS nanokompozit malzemelerinin yüzeyine başarılı bir şekilde immobilizasyonu, esas olarak ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak doğrulanmıştır. İmmobilize enzimin immobilizasyon etkinliği, stabilitesi ve katalitik aktivitesi belirlenmiş ve üretilen biyokatalitik sistemlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Sunulan sonuçlar ile üretilen yeni biyokatalizörlerin biyokatalitik uygulamalar için umut verici malzemeler olduğu vurgulanmıştır.

### 2.3. Ko-immobilizasyon Çalışmaları

Kumar vd. (2000) kolesterol oksidaz (ChOx) ve HRP'nin tetraetil ortosilikattan (TEOS) türetilmiş soljel filmler üzerine ko-immobilizasyonu için fiziksel adsorpsiyon, tutuklama ve mikrokapsülasyon tekniklerini kullanmıştır. Enzim aktivitesi ölçümleri, mikrokapsülasyon ve tutuklama ile ko-immobilizasyonda önemli bir enzim sızıntısı olmadığını göstermiştir. ChOx aktivitesi ve kolesterol derişimi spektrofotometrik ve elektrokimyasal teknikler kullanılarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler ile tutuklama, adsorpsiyon ve mikrokapsülasyon yöntemleri için sırasıyla 10, 30 ve 100 dakikalık bir yanıt süresi bulunmuş ve sonuçların elektrokimyasal ölçümler ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal ölçümlerde, üç yöntem için de 2-10 mM kolesterol ölçüm aralığı saptanmıştır. Tüm soljel filmlerin 25 °C'de yaklaşık 8 hafta ve 4-5 °C'de 12 hafta boyunca stabil olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak; ChOx ve HRP'nin bir TEOS soljel filmine fiziksel adsorpsiyon, tutuklama ve mikrokapsülasyon teknikleriyle ko-immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. ChOx/HRP/TEOS filmlerinin raf ömrünü oda sıcaklığında 8 haftanın üzerine çıkarmak için iyileştirme çalışmaları yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Chaubey vd. (2000) laktat oksidaz (LOD) ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzimlerini fiziksel adsorpsiyonla elektrokimyasal olarak hazırlanmış polianilin (PANI) filmleri üzerine ko-immobilize etmişlerdir. LOD/LDH immobilize elektrotlar, 0,1-1,0 mM laktat derişimi aralığında bir duyarlık ve 4-10 °C'de yaklaşık 3 hafta stabilite göstermiştir. PANI/LOD/LDH enzim elektrotlarının  $5 \times 10^{-5}$  M'lık bir saptama sınırı olduğu ve hücrelerde L-Laktat tayini için kullanılabilceğı belirtilmiştir. Çalışmanın sonunda LOD ve LDH'nin polianilin üzerine ko-immobilizasyonu ile elde edilmiş elektrotun, düşük laktat derişimlerinde daha yüksek hassasiyetle çalışmak için bir seçenek olabileceğı rapor edilmiştir.

H. Qiu vd. (2009) nanogözenekli altını (NPG), lignin peroksidaz (LiP) enziminin immobilizasyonu için bir destek olarak kullanmıştır. Gözenek boyutu 40-50 nm olan NPG, Au/Ag alaşımının (ağırlıkça %50:50) 17 saat boyunca alaşimsızlaştırılmasıyla hazırlanmıştır. LiP sulu çözeltisi inkübasyon yoluyla, NPG üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilize LiP'in optimum sıcaklığı, serbest LiP'dan 10 °C daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca 45 °C'de 2 saat inkübasyondan sonra, serbest LiP'in aktivitesi tamamen bitmişken immobilize edilmiş LiP'in başlangıç aktivitesinin %55'ini hala muhafaza etmiştir. Ek olarak, LiP ile immobilize edilmiş bir glukoz oksidaz kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salımı yoluyla yüksek ve sürdürülebilir bir LiP aktivitesi elde edilmiştir. Gerçekleştirilen ko-immobilizasyon yöntemi ile elde edilen sistemin LiP aracılı boya giderimi için çok etkili olduğu vurgulanmıştır.

Ölçer ve Tanriseven (2010) *Leuconostoc mesenteroid* dekstransükrazı ve *Penicillium lilacinum* dekstranazı, sükrözdan izooligosakkarit eldesinde kullanmak üzere ko-immobilize etmişler. İmmobilizasyon işlemi enzimlerin kovalent olarak bağlandığı Eupergit C'nin aljinat içerisinde tutuklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Enzim bağlı Eupergit C'nin aljinat içerisine tutuklanması boncuk, kapsül ve fiber formu olmak üzere üç farklı şekilde yapılmıştır. İmmobilizasyon işlemi kapsüllerde %71, boncuklarda %64 ve fiberlerde %70 verimle gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak yapılan immobilizasyon işlemleri başarılı olmuş ve endüstriyel önemi olan birçok enzim için kullanılabilir olduğu belirtilmiştir.

Odaci vd. (2010) maltoz analizi için  $\alpha$ -glukozidaz (AG) ve piranoz oksidazın (PyOx) ko-immobilizasyonu ile yeni bir enzimatik sistem tasarlamışlardır. İmmobilizasyon enzim karışımının, kitosan (CHIT) ve karbon nanotüp (CNT) destek materyaline glutaraldehit yoluyla çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık, pH ve uygulanan potansiyel gibi çalışma koşulları ile enzim, CHIT, glutaraldehit ve CNT miktarını kapsayan biyosensör yapısı optimize edilmiş ve daha sonra analitik karakterizasyon yapılmıştır. Biyosensörün 35 °C'de ve pH 6.0'da 0,25 ile 2,0 mM derişim aralığındaki maltoz için hızlı doğrusal tepkisi gözlenmiştir.

İmmobilizasyon matrisine CNT ilavesinin etkisi de araştırılmıştır. Sensör tepkisi ( $y$ ;  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) ile substrat derişimi ( $x$ ;  $\text{mM}$ ) arasındaki doğrusal ilişkiler AG/PyOx/CHIT ve AG/PyOx/CHIT-CNT biyosensörleri için sırasıyla;  $y=0,844x+0,029$  ( $R^2=0,999$ ) ve  $y=0,882x+0,0625$  ( $R^2=0,996$ ) olarak saptanmıştır. Örnek uygulaması olarak bira numunelerinde maltoz analizi yapılmıştır. Sonuç olarak doğal bira örneklerinin karmaşık matrisinin biyoalgılama tepkisi üzerinde hiçbir etkisi saptanmamış ve ayrıca sonuçların, spektrofotometrik ölçümlerle elde edilenlerle iyi bir uyum içinde olduğu raporlanmıştır.

Chauhan ve Pundir (2011) ticari olarak kullanılan kolesterol estera, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerini kovalent bağlama yöntemi ile polivinil klorür (PVC) şerit üzerine ko-immobilize etmişlerdir. PVC şerit toplamda %75,23 başlangıç enzim aktivitesi göstermiştir. PVC şerit en yüksek aktiviteyi pH 7.2 ve 45 °C'de 5 dakika boyunca göstermiştir. Üç farklı enzimin immobilize edildiği PVC şerit serumda toplam kolesterol miktarı tayini için tasarlanmış ve minimum tanı değeri 0,01 mM olarak bildirilmiştir. Yapılan şeritin klasik yöntemlerle kıyaslandığında aynı performansı gösterdiği bildirilmiş ve 4 °C'de saklamak suretiyle 4 ay boyunca 200 kere kullanılabilceği rapor edilmiştir.

Chauhan vd. (2014) serumdaki trigliserid (TG) seviyelerinin tespiti için ucuz ve stabil bir sistem geliştirmiştir. Lipaz, gliserol kinaz (GK), gliserol-3-fosfat oksidaz (GPO) ve peroksidazın (HRP) doğrudan glutaraldehit yoluyla plastikleştirilmiş polivinil klorür (PVC) şeridi üzerine ko-immobilizasyonu ile TG tayini için yeniden kullanılabilir bir enzim şeridi hazırlanmıştır. Yöntem geri kazanımı, hassasiyeti ve yeniden kullanılabilirliği incelenerek değerlendirilmiştir. Enzim şeridi pH 7.0 ve 35 °C'de optimum aktivite ve 0,1 ile 15 mM triolein derişimi aralığında doğrusal bir aktivite göstermiştir. Şerit serum TG'nin belirlenmesi için kullanılmıştır. Yöntemin tayin sınırı 0,1 mM olarak bulunmuştur. Serbest enzimlerin kullanıldığı standart kolorimetrik yöntemle, immobilize şerit yönteminin TG değerleri arasında iyi bir korelasyon ( $r=0,99$ ) bulunmuştur. Şerit, 4 °C'de depolandığında 100 günlük süre boyunca 200 kullanımdan sonra ilk aktivitesinin yüzde 50'sini kaybetmiştir. Yöntemin, farklı enzim şeritlerinin hazırlanması için de kullanılabilceği rapor edilmiştir.

Lang vd. (2014) çalışmalarında nişasta tayini için bir sensör geliştirmiştir. Tayin için gerekli olan glukoamilaz ve glukoz oksidaz enzimleri çok duvarlı karbon nanotüp üzerine gluteraldehit kullanarak çapraz bağlanmıştır. İmmobilize enzimleri içeren modifiye karbon elektrot kullanarak nişasta tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde geliştirilen sistem ile %0,005 (w/w) ile %0,7 (w/w) aralığındaki nişastanın tayin edilebildiği belirtilmiştir.



Sonuç olarak geliştirilen biyosensörün hızlı ve hassas bir şekilde nişasta tayini yapabildiği rapor edilmiştir.

Romo-Sánchez vd. (2014) endüstriyel uygulamalarda yeniden kullanılabilirlik açısından oldukça kararlı ve ekonomik olarak uygun enzimler olan selülaz ve ksilanazın stabilitesini iyileştirmek için immobilizasyon çalışması yapmışlardır. Çalışmada iki ticari enzimin (selülaz ve ksilanaz) immobilizasyonu, üç kimyasal yöntem (adsorpsiyon, retikülasyon ve çapraz bağlama-adsorpsiyon) ve iki polimerik destek (aljinat-kitin ve kitosan-kitin) kullanılarak yapılmıştır. Bağlanma için optimal pH selülaz için 4,5 ve ksilanaz için 5,0 bulunmuş ve optimal enzim derişimleri, kitosan ve ideal destek olmak üzere sırasıyla 170 µg/mL ve 127,5 µg/mL bulunmuştur. Glutaraldehit, düşük derişimlerde bir çapraz bağlayıcı olarak immobilizasyon işleminin kararlılığını iyileştirmiştir. Biyoteknolojik karakterizasyon, enzimlerin yeniden kullanılabilirliğinin, özellikle glutaraldehit kullanan immobilize selülazın en çarpıcı bulgusu olduğunu göstermiş ve 19 döngüden sonra aktivitesi %64 korunmuştur. Bu sonuçlar ile çeşitli endüstriyel uygulamalar için enzim immobilizasyonunun ekonomik ve biyoteknolojik avantajlarının doğrulandığı rapor edilmiştir.

Gustafsson vd. (2015) glukoz oksidaz (GOx) ve yaban turbu peroksidaz (HRP) enzimlerini katı silika destekler üzerine mezogözenekli silika nanopartiküller ve bir polikasyonik dendronize polimer (denpol) kullanarak birlikte immobilize etmişlerdir. Silika destek önce denpol ile kaplanmış, ardından mezogözenekli silika nanopartiküllerin yardımıyla GOx'ın adsorpsiyonu yapılmıştır. Son olarak, GOx yüklü silika nanopartiküller, bisaril hidrazon (BAH) bağları yoluyla kovalent olarak bağlanan birkaç HRP molekülünden oluşan bir denpol-HRP konjugatı ile kaplanmıştır. Ko-immobilize edilmiş enzimlerin aktiviteleri ve depolama kararlılıkları, GOx ve HRP'yi içeren iki aşamalı reaksiyonu analiz ederek belirlenmiştir. D-glikoz ve o-fenilendiamin (OPD) sırasıyla GOx ve HRP için substratlar olarak kullanılmıştır. Immobilize enzimler 4 °C'de pH 7.0'lik sulu bir çözelti ile temas halinde saklandığında, en az 2 hafta boyunca oldukça stabil kalmıştır. Genel olarak, mezogözenekli silika nanopartiküller içinde adsorbe edilen enzimler farklı enzim türlerinin basit bir şekilde ko-immobilizasyonu için yol gösterici olmuş ve konseptin olası uygulamalarının biyoelektrot üretimi için uygun olduğu belirtilmiştir.

Gür vd. (2018) α-amilaz, proteaz ve pektinazın ko-immobilizasyonu için iki farklı materyal: aljinat ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklar kullanmıştır. İlk olarak sodyum aljinat boncuklar ile multienzim immobilizasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum sodyum aljinat ve CaCl<sub>2</sub> derişimi sırasıyla %2,5 ve 0,1 M olarak

bulunmuş ve optimal enzim yükleme oranı pektinaz, proteaz ve  $\alpha$ -amilaz için sırasıyla 2:1:0,02 olarak belirlenmiştir. Daha sonra, birden fazla enzimin glutaraldehit ile aktifleştirilmiş kitosan boncuklar üzerinde immobilizasyonu optimize edilmiştir (%3 kitosan derişimi, %0,25 glutaraldehit ile 3 saat aktivasyon ve 3 saat birleştirme süresi). Her iki taşıyıcı ile immobilizasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilirken, enzimlerin spesifik aktivitelerinin, glutaraldehit ile aktive olan kitosan boncuklarda ko-immobilize edilen enzimler için daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aktif kitosan boncukların karakterizasyonu için SEM ve FTIR kullanılmıştır. Ayrıca, kitosan boncuklara immobilize edilen pektinaz ve  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin serbest formlarından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada ilk kez üç farklı enzimin; aljinat ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara ko-immobilizasyonunun yapıldığı rapor edilmiştir.

C. Li vd. (2017) metal koordineli hidrojel nanolifleri kullanarak birlikte immobilize edilmiş enzim ve manyetik nanopartiküller (MNP) hazırlamak için kolay bir yöntem sunmuştur. Hedef enzim olarak *Candida rugosa* lipaz (CRL) seçilmiştir. Sulu ortamda iyi dağılım, düşük fiyat ve diğer benzersiz özellikler için sitrik asitle modifiye edilmiş manyetik demir oksit nanopartiküller (CA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NP) immobilizasyon için kullanılmıştır. Sonuç olarak CA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Zn/AMP nanofibere immobilize edilmiş CRL'nin aktivitesi, serbest CRL'ye kıyasla 30 dakika reaksiyon süresinde pH 10.0' da 8 kat ve 50 °C su banyosunda yaklaşık 1 kat arttığı bildirilmiştir. Dahası, immobilize CRL'nin mükemmel uzun vadeli depolama kararlılığına sahip (13 gün depolamadan sonra yaklaşık %80 aktivite) olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucu olarak, metal-nükleotid nanofiberlerin enzimleri ve MNP'leri aynı anda verimli bir şekilde ko-immobilize edebileceği ve biyokatalizörlerin stabilitesini iyileştirebileceğini gösterdiği vurgulanmıştır.

Suganthi vd. (2019) bu çalışmada karmaşık moleküller içeren balık işleme katı atığının (FPSW) hidrolizi için çoklu enzimlerin manyetik nanopartiküller (MNP) ve yüzey işlevli manyetik nanopartiküller (SF-MNP) üzerine ko-immobilizasyonuna odaklanmıştır. MNP'ler kimyasal (cMNP ve SF-cMNP) ve biyolojik yöntemlerle (bIOMNP) sentezlenmiş ve yüzeyleri işlevselleştirilmiştir. *Streptomyces thermolineatus* kaynaklı lipaz ve proteaz, sentezlenmiş çıplak ve yüzey işlevli MNP'ler üzerinde ko-immobilize edilmiştir. Optimum koşullarda cMNP'nin lipaz ve proteaz yükleme kapasitesi sırasıyla 1000 ve 783 U/g olarak bulunurken, SF-cMNP'nin lipaz ve proteaz yükleme kapasitesi sırasıyla 2920 ve 2350 U/g ve bIOMNP'nin sırasıyla 2800 ve 2196 U/g olarak bulunmuştur. Ko-immobilize edilmiş enzimlerin termal, pH ve depo kararlılıkları, serbest enzimlere kıyasla büyük ölçüde artmış; serbest ve ko-immobilize

enzimlerin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri belirlenmiştir. Serbest ve ko-immobilize enzimler, FPSW'de lipitlerin ve proteinlerin hidrolizi için kullanılmıştır. FPSW'de lipitlerin ve proteinlerin hidroliz yüzdesi, LP-cMNP için sırasıyla %52,8 ve %61,8; LP-SF-cMNP için sırasıyla %76,2 ve %84,1 ve LP-bIOMNP için sırasıyla %73,9 ve %82,1 bulunmuştur.

Nadar ve Rathod (2019) hücre içi biyoaktif bileşenlerin verimli bir şekilde ekstraksiyonudaki ana engelin sert polisakkaritlerden oluşan oldukça karmaşık hücre duvarı yapısı olduğunu belirtmişler ardından bitkilerden ve meyvelerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için, hücre selülozik materyalin pektin ile hidroliz edilmesiyle kolaylaştırılabileceğini öngörmüşlerdir. Bu bağlamda ko-immobilize manyetik nanobiyokatalizr; Pectinex® ve Celluclast® enzimlerinin amino fonksiyonlu manyetik nanopartiküller (MNP) zerine 75 mM çapraz bağlayıcı (glutaraldehit) derişiminde 12,5 saatlik çapraz bağlama süresi sonunda eşzamanlı olarak immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Ko-immobilizasyon ile hazırlanan nanobiyokatalizr FTIR, TGA (Termogravimetrik Analiz), SEM ve XRD (X Işını Kristalografisi) ile karakterize edilmiştir. Termal stabilite çalışmalarında manyetik nanobiyokatalizr, doğal forma kıyasla 50-70 C sıcaklık aralığında iki kat artan yarı ömür göstermiştir. Ayrıca, manyetik biyokatalizör, birbirini takip eden on döngüden sonra bile %80'e kadar aktivitesini korumuştur. Sonuç olarak antioksidanlar ko-immobilize edilmiş manyetik nanobiyokatalizr ve serbest enzimlerin karışımı kullanılarak portakal, mango ve muzun soyulmuş kalıntılarında ekstrakte edilmiş ve geleneksel çözücü bazlı ekstraksiyona kıyasla iki kattan daha fazla serbest radikal süpürme aktivitesi göstermiştir.

Zhang vd. (2020) maltodekstrinden dört aşamalı enzimatik bir reaksiyon ile doğal tatlandırıcı olarak kullanılan D-tagatozun bir öncüsü olan glukoz 6-fosfat (G6P) retmek için Duolite A568 reçinesi üzerine  $\alpha$ -glukan fosforilaz ( $\alpha$ GP) ve fosfoglukomutazı (PGM) birlikte immobilize ederek katalitik kademeli bir ko-immobilizasyon sistemi oluşturmuşlardır. Çapraz bağlayıcı olarak özellikle glutaraldehitten daha etkili olduğu bulunan polietilen glikol diglisidil eteri kullanarak reçine üzerine enzimler başarıyla birlikte immobilize edilmiştir. Ko-immobilize edilmiş  $\alpha$ GP ve PGM'nin termal stabilitesinin serbest enzimlerle karışlaştırıldığında arttığı gösterilmiştir. Ko-immobilize edilmiş  $\alpha$ GP ve PGM, 75 C'de 36 saat inkübe edildikten sonra %63,4 aktivite gösterirken; serbest enzimler yalnızca %12 aktivite göstermişlerdir. Ayrıca ko-immobilize edilmiş  $\alpha$ GP ve PGM'nin aktivitesi, sekiz kullanım döngüsünden sonra tutarlı bir şekilde %78,5'in üzerinde kalmış ve saklama stabilitesi, 4 C'de 60 gün depolandıktan sonra serbest enzimlerden yaklaşık on bir kat daha yüksek bulunmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda, ko-immobilize edilmiş  $\alpha$ GP ve PGM sisteminin G6P retimi için umut verici bir

katalizör görevi görebileceği ve D-tagatozun daha fazla üretimi için başlangıç yolunda kullanılabilmesi rapor edilmiştir.

Long vd. (2020) çalışmalarında bi-enzim sisteminin stabilitesini arttırmak için  $\beta$ -fruktofuranosidaz ve glukoz oksidaz sol-jel enkasülasyonu ile immobilize etmişler ve bunun laktosükroz üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlar. Hazırlanan immobilize bi-enzimler taramalı elektron mikroskobu (SEM), fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), raman spektroskopisi ve termogravimetrik analiz ile karakterize edilmiştir. Immobilize bi-enzimler başlangıç aktivitelerinin %85,39'unu korumuş ve pH 6.5 seviyelerine kadar serbest enzimlerden belirgin şekilde daha iyi pH toleransı göstermiştir. Özellikle immobilizasyon serbest enzimler için neredeyse hiç aktivitenin gözlemlenmediği yüksek sıcaklıklarda ( $\geq 40$  °C) bi-enzimlerin termal stabilitesini önemli ölçüde ( $p < 0,01$ ) arttırmıştır. Immobilize bi-enzimler, 8 ardışık yeniden kullanımdan sonra ilk aktivitelerinin %82'sini koruyarak büyük operasyonel stabilite göstermiştir. Ayrıca, laktosükroz verimi (%40,2) immobilize bi-enzimlerin kullanılmasıyla önemli ölçüde ( $p < 0,05$ ) iyileştirilmiştir. Bu sonuçlar enzimlerin ko-immobilizasyonunun laktosükroz üretimini düşük maliyetlerle iyileştirmeye yardımcı olduğu belirtilmiştir.

Yu vd. (2021) çalışmalarında üç farklı enzimi (selülaz, glukoz oksidaz ve katalaz) çözünür bir Eudragit L-100 üzerinde başarılı bir şekilde immobilize etmiştir. Hazırlama koşullarının, enzimatik özelliklerin ve katalitik koşulların belirlenmesi sonucunda ko-immobilize edilmiş enzimler mısır samanının tek bsmakta glukonik aside dönüştürülmesinin katalitik reaksiyonuna uygulanmıştır. Glukonik asit verimi 0,28 mg'a ulaşmış; mısır samanındaki selülozun glukonik aside dönüşüm oranı %61,41'e ulaşmıştır. Ko-immobilize enzimlerin katı substrattan geri kazanılması, taşıyıcının geri dönüşümlü ve çözünür özellikleri kullanılarak sağlanmıştır., Çözünür taşıyıcı Eudragit L-100 kullanılarak gerçekleştirilen ko-immobilizasyon stratejisinin başarısını teyit edecek şekilde, altı kez kullanımdan sonra ko-immobilize enzimlerin aktivitesi %52,38 bulunmuştur.

X. Qiu vd. (2021) 2,2-binamin-di-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asidin neden olduğu potansiyel kirlilikten kaçınırken biyokatalizörün kirleticiler için uzaklaştırma kapasitesini geliştirmek için lakkaz ve ABTS ko-immobilize etmiştir. Lakkaz, Cu iyon şelatlamasına (MACS-NIL-Cu-lac) dayalı ABTS (MACS-NIL) içeren amino işlevli iyonik sıvı ile modifiye edilmiş manyetik kitosan nanoparçacıkları üzerinde immobilize edilmiştir. Taşıyıcı fourier transform infrared spektroskopisi, termogravimetrik analiz, X-ışını kırınımı ile karakterize edilmiş ve elektron paramanyetik rezonansı, taşıyıcı üzerindeki ABTS aracı molekülünün de elektron iletimi rolünü oynayabileceğini doğrulamıştır. MACS-NIL-Cu-lac, nispeten yüksek

immobilizasyon kapasitesi, arttırılmış aktivite (serbest lakkazın 1,7 katı), geliştirilmiş pH ve sıcaklık adaptasyonu ve arttırılmış termal ve depolama stabilitesi sunmuştur. Kirlilik giderim tayininde, konsantrasyon 50 mg/L'ye ulaştığında bile, MACS-NIL-Cu-lac'ın 25 °C'de suda 2,4-diklorofenol için %100 ile iyi bir giderim verimliliğine sahip olduğu bulunmuştur. Yeniden kullanılabilirlik çalışması 6 katalitik tekrardan sonra, 2,4-diklorofenolün MACS-NIL-Cu-lac tarafından uzaklaştırma verimliliğinin hala %93,2 olduğunu göstermiştir. Ek olarak MACS-NIL-Cu-lac, bisfenol A, indol ve antrasen için sırasıyla %100,0; %70,5 ve %93,3 ile daha yüksek katalitik verimlilik sergilemiştir.

#### 2.4. Enzimatik Atık Su Arıtım Çalışmaları

Jeganathan vd. (2006) çalışmalarında evcil hayvan yemi üretimi atık sularından kaynaklanan yağ ve gres (O&G) hidrolizini çalışmıştır. *Candida rugosa* lipazı kalsiyum aljinat boncuklarda immobilize edilmiş ve hidroliz denemesi yapılmıştır. Sonuçlar O&G'nin yaklaşık %50'sinin enzim aktivitesi nedeniyle hidroliz olduğunu göstermiştir. İmmobilize lipaz aktivitesi O&G hidrolizinden önce ve sonra p-nitrofenil palmitat (pNPP) ile ölçülmüştür. Üç günlük deney sonrasında, boncukların yaklaşık %65'i geri kazanılmış ve hidrolizden sonra, boncuklarda enzim aktivitesinin yaklaşık %70'i korunmuştur. Bu çalışmada, evcil hayvan yemi üretimi atık suyunun biyolojik arıtılmasında bir ön arıtma aşaması olarak, immobilize lipazın potansiyelinin ortaya konduğu rapor edilmiştir.

Auriol vd. (2007) hem doğal östrojenler (örneğin; estron-E1; 17- $\beta$ -estradiol-E2; ve estriol-E3) hem de sentetik östrojenler (örneğin; 17- $\alpha$ -etinilestradiol-EE2) dahil olmak üzere steroid östrojenler gibi endokrin bozucu bileşiklerin HRP ile enzimatik giderimini araştırmıştır. Östrojenlerin enzimatik oksidasyonunun tayini için, HRP ve hidrojen peroksit kullanarak steroid östrojenlerle kirlenmiş atık sularda çalışılmıştır. E1, E2 ve E3'ü gidermek için daha yüksek HRP derişimi (0,06 U/ml) gerekmesine rağmen, 0,02 U/ml HRP derişiminde başlangıç HRP aktivitesinin sentetik çözülden EE2'yi tamamen gidermek için yeterli olduğu görülmüştür. Optimal hidrojen peroksit ve substrat oranı yaklaşık olarak 0,45 olarak belirlenmiş ve Michaelis-Menten kinetiğine dayalı olarak, HRP'nin E1, E3, E2 ve EE2 ile artan bir aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Gerçek aktif atık su örneğinde, incelenen tüm östrojenlerin tamamen uzaklaştırılması için 8-10 U/ml HRP derişimi gerekliken aynı östrojen

derişimi içeren sentetik atık suyu arıtmak için sadece 0,032 U/ml HRP gerekli olduğu belirtilmiştir.

Forgiarini ve Souza (2007) fenolik bileşikleri ve aromatik aminleri sulu çözeltilerden ayırma ve ayrıca tekstil atıklarının rengini giderme kapasitesi ile bilinen yaban turbu peroksidaz enziminin (HRP) tekstil boya ve atık suların renk giderimindeki potansiyelini değerlendirmiştir. Enzim performansı için optimum koşulları belirlemek amacıyla pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ve enzim derişimi gibi faktörler değerlendirilmiştir. HRP pH 4.0'te optimum performans gösterirken 1x10<sup>-3</sup> ile 1,2x10<sup>-2</sup> mmol/L aralığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimine ihtiyaç duyduğu rapor edilmiştir. Test edilen boyalardan Remazol Turquoise Blue G için %59 renk giderimi, Lanaset Blue 2R için yaklaşık %94 renk giderimi, tekstil atık suyu için ise %52 renk giderimi elde edildiği belirtilmiştir. Bir su piresi türü olan *Daphnia magna* için toksisite testleri yapılmış ve enzimatik işlemden sonra tekstil atık suyunun toksisitesinde bir azalma olduğu söylenmiştir. Bunun yanında tekstil atık suyunun toksisitesi, enzimatik işlemden sonra *Artemia salina* için hiçbir değişiklik göstermemiştir. Bu çalışmada yaban turbu peroksidaz enziminin tekstil boya ve atıklarının biyolojik olarak parçalanmasında kullanımının doğrulandığı belirtilmiştir.

Rigo vd. (2008) domuz ve sığır eti endüstrisinden gelen yüksek yağ ve gres içeriğine sahip atık su arıtımı için anaerobik reaktörlerde enzimatik bir ön arıtma denemiştir. Ticari bir lipaz (Lipolase 100T, Novozymes) ve katı hal fermentasyonu ile elde edilen bir lipaz (Lipase SEP) olmak üzere iki farklı lipaz test edilmiştir. Farklı yağ ve gres derişimlerine (250 ile 3.000 mg/L) sahip et endüstrisi atık suları, anaerobik biyoreaktörlerde iki farklı enzim preparatı [%0,1 ve %5,0 (w/v)] ile arıtılmıştır. Ham atık su ile beslenen anaerobik biyoreaktör, önceden hidrolize edilmiş atık su ile beslenen bir anaerobik reaktör (test reaktörü) ile karşılaştırılmıştır. Lipaz SEP'in performansı atık sudaki lipolazın daha düşük aktivitesi ile ilişkili olabilecek Lipolase 100T'den daha iyi bulunmuştur. Yağ ve gres içeren (1.200 mg/L) atık sudan elde edilen lipaz preparatı ile ön arıtıldığında, kimyasal oksijen ihtiyacının (COD) giderilmesi, herhangi bir arıtma yapılmadan atık su ile beslenen bir kontrol reaktörüne kıyasla %22 fazla bulunmuştur.

Sergio vd. (2010) enginar (*Cynara cardunculus*) yapraklarından elde edilen peroksidazın (POD) zeytin karasuyunda (OMWW) bulunan fenollerini gidermek için kullanımını incelemiştir. Enzim ekstraksiyonu sulu iki fazlı bir polimer sistemi kullanılarak yapılmıştır. Fenol derişimi Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak test edilmiştir. En yüksek fenol giderimi 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 24 saatlik inkübasyon kullanılarak elde edilmiştir. Enzim geniş bir pH aralığında (4.0-7.0) ve sıcaklıkta (5-50 °C) iyi aktivite göstermiştir. Optimal enzimatik koşullarda

başlangıç fenol derişiminde %60'tan fazla azalma gözlenmiştir. İşlem görmemiş ve POD ekstraktıyla işlenmiş OMWW'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi, enzim işleminin orijinal OMWW polifenolik profilinde değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle verbaskozit, hidroksitirozol ve iki kafeik asit türevinin giderimi gözlemlenmiştir. Sonuç olarak enginar yapraklarından elde edilen çözünür POD'ın, geniş pH ve sıcaklık çalışma aralığı ve ucuz kaynağı nedeniyle OMWW fenol gideriminde umut verici bir perspektife sahip olabileceğı belirtilmiştir.

Barakat vd. (2010) iki fazlı zeytinyağı üreten bir tesisten alınan zeytin karasuyunu (OMWW) soğan yan ürünlerinden hazırlanan ham peroksidaz ekstraktı ile muamele etmiştir. İşlemler optimum çalışma koşullarını belirlemek için pH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in bir dizi kombinasyonunu kullanan fabrika tasarımına dayandırılmıştır. İşlem performansı toplam polifenollerin ayrılma yüzdesi tahmin edilerek değerlendirilmiştir. Oluşturulan model, verilerin tatmin edici bir şekilde uyarlanmasını sağlarken süreci açıklamak için kullanılan ikinci dereceden polinomial denklem ( $R^2=0,94$ ,  $p=0,0158$ ) seyreltilmiş OMWW'de peroksidaz katalizli polifenolün uzaklaştırılmasının düşük pH'da nispeten kolaylaştığını göstermiştir. Optimal çalışma koşulları altında tahmini %50,7±9,5 giderim hesaplanmıştır (pH 2.76; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=3,56 mM). Soğan yan ürünlerinden peroksidaz kullanımının enzimatik atık su giderimi uygulamalarında alternatif bir araç olabileceğı önerilmiştir.

Gholami-Borujeni vd. (2011) kalsiyum aljinat jel boncuklara immobilize edilmiş HRP renk giderici etkisinin belirlenmesi için başarılı bir şekilde tekstil atık suyuna uygulanmıştır. HRP'nin kalsiyum aljinat jel boncuklara immobilizasyonu optimum koşullarda 15 U/g spesifik aktiviteye yol açmıştır. İmmobilizasyona yükleme etkinliği, tutma etkinliği ve enzim sızıntısı dikkate alınarak en iyi jelleşme koşulunun %2 w/v sodyum aljinat çözeltisi ve %2 w/v kalsiyum klorür heksahidrat olduğu bulunmuştur. Boncuklar on döngüye kadar yeniden kullanılmış ancak verimlilikleri azalmıştır. En yüksek boya gideriminin gerçekleştiğı hidrojen peroksit/boya oranı 1,25 olarak bulunmuştur. Denenen boyalardan AO-7 ve AB-25'in giderimi için optimum koşullar; 90 dakika reaksiyon süresi, 0,8 U/g enzim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/boya oranı 1,25/1 olarak tespit edilmiştir. 25-50 °C sıcaklıkta AO-7 ve AB-25 çözeltisinde sırasıyla %75 ve %84 giderim bulunmuştur. Enzimatik işlemden sonra boya çözeltisinin toksisitesinde önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir.

Mohamed vd. (2013) daha önce aktif yüne immobilize ettikleri horseradish peroksidaz için kitosanın basit kimyasal yapısı ve biyoyumluluğu özelliklerinden dolayı uygun bir immobilizasyon materyali olacağını düşünmüştür. Yaptıkları çalışmada, horseradish

peroksidazı siyanür klorür ile kitosan üzerine çapraz bağlamışlar. Serbest enzim ile immobilize enzim arasında yaptıkları karşılaştırmalarda serbest enzimin optimum pH'nın 5.0 iken immobilize enzimin 5.5 olduğu, optimum sıcaklığın serbest enzim için 50° C iken immobilize enzim için 55° C olduğu görülmüştür. Ayrıca atık suda fenol giderimi için yapılan denemede immobilize enzimin serbest enzim ile aynı aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. Immobilize enzimin serbest enzime göre; üre, Triton X-100 ve organik çözücülere karşı daha dayanıklı olduğu ve tekrar tekrar kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir.

Sukan ve Sargin (2013) çalışmalarında düşük fenol içerikli (%5) endüstriyel atık sulardan enzimlerin fenol giderim kapasitesini değerlendirmeyi ve reaksiyon koşullarını optimize etmeyi amaçlamıştır. Bu amaçla lakkaz ve peroksidaz olmak üzere iki farklı enzimin fenol giderim kapasiteleri incelenmiştir. Enzimatik reaksiyon koşulları yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Sonuç olarak model bir atık su kullanılarak lakkaz ile %78 fenol giderimi sağlanmıştır. Yapılan çalışma neticesinde bu alanda daha fazla optimizasyona ihtiyaç olduğu açıklanmıştır.

Adulkar ve Rathod (2015) süt endüstrisi atık suyunun doğrudan anaerobik giderimindeki eksikliklerin üstesinden gelmek için enzimatik bir ön arıtma uygulamıştır. Yaklaşık 2.000 mg/mL yağ içeren sentetik bir süt endüstrisi atık suyunun enzimatik ön hidrolizini gerçekleştirmek için *Candida rugosa* lipaz Z kullanılmıştır. Sıcaklık, enzim derişimi, yağ derişimi ve NaCl derişimi gibi farklı proses parametreleri maksimum yağ giderimi için optimize edilmiştir. Maksimum yağ hidrolizi 30 °C'de, 2.000 mg/mL yağ derişiminde, %0,2 w/v enzim derişiminde, ve 100 mM NaCl derişiminde yaklaşık %75 olarak bulunmuştur. Anaerobik giderimden önce enzimatik ön hidrolizin anaerobik bozunma, iyileştirilmiş biyogaz oluşumu ve kimyasal oksijen ihtiyacının giderilmesi için gereken reaksiyon süresini azaltabileceği rapor edilmiştir.

Kalaiarasan ve Palvannan (2015) sentetik atık sudan fenol ve malahit yeşilinin giderimi için düşük maliyetli ve stabilize HRP geliştirmeyi amaçlamıştır. Enzim stabilizasyon deneylerinin ortaya koyduğu üzere guar zamkı ve galaktoz, sırasıyla pektin, karragenan veya nişasta gibi diğer katkı maddelerine kıyasla HRP'nin çözelti durumunun stabilitesini başarılı bir şekilde geliştirmiştir. HRP'nin stabilitesini arttırmak için galaktoz ve guar zamkı kombinasyonu, uygun bir RSM oluşturularak pH ile etkili bir şekilde optimize edilmiştir. RSM sonuçlarına göre HRP'nin 60 °C'de, pH 7.4'te maksimum stabilizasyonu için %18,25 galaktoz ve %0,35 guar zamkı gerekli olduğu belirtilmiştir. Stabilize edilmiş HRP kullanılarak fenol gideriminin optimizasyonu ve malahit yeşilinin renk giderimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.



Sulu pH (7.4) fazı, enzim derişimi (1,8 U/mL), fenol derişimi (0,1 mM) ve 180 dakikalık reaksiyon süresi gibi çeşitli proses parametreleri sentetik atık sudan maksimum fenol uzaklaştırılmasını sağlamak için etkili bir şekilde optimize edilmiştir. Boya renk giderme çalışmaları, stabilize edilmiş HRP'nin (1,2 U/mL), benzer renk giderme verimliliği elde etmek için doğal enzimden (2 U/mL) daha düşük derişim gerektirdiğini göstermiştir. Ek olarak, stabilize edilmiş enzim boyayı 60 °C'de, pH 7.2'de başarıyla renksiz hale getirdiği belirtilmiştir.

Jiang vd. (2014) çalışmalarında HRP immobilizasyonu için basit ve ucuz bir yöntem geliştirmiştir. Enzim CaCO<sub>3</sub> ile çöktürüldükten sonra glutaraldehit ile çapraz bağlanarak gözenekli CaCO<sub>3</sub> mikropartikülleri elde edilmiş ve yöntem optimize edilmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre sıcaklık ve pH değişimlerine karşı daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Serbest enzime kıyasla immobilize enzimin K<sub>m</sub> değeri daha yüksek, V<sub>max</sub> değeri daha düşük bulunmuştur. İmmobilize enzimin fenol ve boya giderimi denemeleri fenol ve Direct Black 38 üzerinde gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak immobilize HRP yüksek fenol ve boya giderimi sağladığı ve tekrar kullanılabilirliği sayesinde pratik kullanımda etkili olduğu rapor edilmiştir.

S. Wang vd. (2015) çeşitli endüstrilerden kaynaklı atık sularda yaygın olarak bulunan ve oldukça zehirli bir kirletici olan 2,4-diklorofenolün giderilmesi için immobilize HRP'nin kullanımını araştırmıştır. Sodyum hidroksit ve hidroklorik asitle muamele edilmiş poliakrilonitril (PAN) bazlı boncuklar etandiamin ve kitosan ile modifiye edilmiş ve daha sonra glutaraldehit ile aktive edilmiştir. HRP kovalent çapraz bağlama ile aktive edilmiş boncuklar üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize boncuğun yüzeyi EDX, SEM ve FTIR kullanılarak karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH'ı sırasıyla 6.0 ve 7.0 olarak belirlenmiş ve hidrojen peroksitin 2,4-diklorofenole optimum oranı 1 olarak bulunmuştur. Deney sonunda 2,4-diklorofenolün yaklaşık %90'ının immobilize kapsüller ile giderildiği fakat immobilize enzimin 2,4-diklorofenolün gideriminde serbest enzime kıyasla daha düşük bir etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. İlaveten, immobilize boncukların iyi bir operasyonel stabilite gösterdiği belirtilmiştir.

Jamie vd. (2016) yağlı atık su arıtma uygulaması için modifiye çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) üzerine *Candidia rugosa* lipaz enziminin kovalent immobilizasyonunu çalışmıştır. MWCNT'ler, kimyasal buhar biriktirme kullanılarak üretilmiş, nitrik asit ve organik çapraz bağlayıcılarla yüzey modifiye edilmiştir. Başarılı bağlanma ve ağırlıkça %30'a kadar yüksek enzim yüklemesi FTIR ve TGA analizleri ile doğrulanmıştır. Oksitlenmiş MWCNT yüzeylerine çapraz bağlayıcı türlerine ve derişimlerine bağlı olan enzimatik aktivite ve yükleme

mikro ortam koşullarında yüksek termal ve operasyonel stabilite ile sonuçlanmıştır. Bu durumun sistemin endüstriyel uygulamalardaki zorlu koşullara karşı geliştirilmiş direnç potansiyelini gösterdiği vurgulanmıştır. Ayrıca immobilize enzim bildirilen diğer destek materyalleri üzerine immobilize edilenlerden yaklaşık 93 kat daha yüksek bir katalitik aktivite göstermiştir. Dahası literatürde bildirilen aktivitelere göre (% 1-20) önemli bir iyileşmeye işaret ederek %98'e kadar biyolojik aktivite elde edilmiştir. MWCNT-Lipaz kullanılarak hidroliz edilmiş numunelerin titrasyon analizi (37 °C'de 1 saatlik reaksiyon süresinden sonra) liyofilize lipazdan gelenlere göre yaklaşık beş kat daha fazla enzimatik aktivite artışı ile sonuçlanmıştır.

Na ve Lee (2017) HRP'nin katalitik (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sürecini, organik kirleticileri (mikrokirleticiler) ortadan kaldırmak için geliştirilmiş bir atık su arıtma teknolojisi olarak değerlendirmiştir. Sentetik çözeltilerde fenolik mikrokirletici olarak etinilestradiol (EE2) ile yapılan kinetik deneyler EE2 dönüşümünün birinci dereceden hız sabitinin artan HRP derişimi ile doğrusal olarak arttığı; ancak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve EE2 derişimlerinden bağımsız olduğu görülmüştür. Göl suyu ve atık su örnekleri kullanılarak yapılan deneylerde, fenolik mikrokirleticilerin önemli ölçüde bertaraf edilmesi (%20-%100): 1,4-5,6 nM (12-48 U/L) HRP, 20 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1 saat reaksiyon süresinde elde edilebileceği saptanmıştır. Fenolik kısımlar olmadan test edilen diğer mikrokirleticilerin bertarafı %5'ten az olarak bulunmuştur. Bununla birlikte fenolik mikrokirleticiler 1 µg/L'den yüksek olduğunda daha düşük bertaraf seviyeleri gözlemlenmiş, bu da çevresel olarak ilgili derişimlerde bulunan fenolik mikrokirleticileri bertaraf etmek için HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> işleminin performansında bir miktar düşüş olduğunu göstermiştir.

S. Liu vd. (2020) yaban turbu peroksidazı (HRP) gibi enzimlerin fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında büyük potansiyele sahip olduğunu belirtmiş ve genel immobilizasyon teknolojisinden farklı olarak enzimlerin tek tek nanojel içinde kapsüllenmesini gerçekleştirmiştir. İmmobilizasyon HRP'nin amid gruplarının açığa çıkarılmasını sağlayan modifikasyonu takiben enzimin karboksimetain akrilamid polimer membran ile kaplanması sonucu sağlanmıştır. Bu yöntem ile fenol ve bisfenol A'nın giderim verimleri serbest enzime kıyasla sırasıyla 7 kat ve 3,5 kat artmıştır. Gerçekleştirilen moleküler modellemeye dayalı olarak fenolik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, redoks potansiyelleri ve enzimlerle bağlanma afiniteleri kullanılarak çalışmanın atık sudan farklı fenolik bileşik türlerinin uzaklaştırılmasında umut verici bir strateji olması gerektiği rapor edilmiştir.

Kaur vd. (2021) yaptıkları çalışmada genellikle peroksidaz katalizi altında serbest radikal oluşturması beklenen fenolik ve birincil anilino fonksiyonel gruplarından yoksun oldukları için seçilen iki azo boyasının; Metil Orange (MO) ve Direct Yellow 12 (DY12) boyalarının soya

fasulyesi peroksidaz (SBP) katalizi ile giderimine odaklanmıştır. DY12'nin bir SBP substratı olmadığı bulunmuş ancak 0,50 mmol/L MO ve 1,0 mmol/L p-anisidin için sırasıyla 4.0 ve 5.5 pH optimumunda, 2/1 (hidrojen peroksit/substrat) ve SBP aktivitelerinde (0,0070 ve 0,0018 U/mL)  $\geq 95$  giderim sağlanmıştır. Substratlar için kütle spektroskopisi (MS) analizi, p-anisidin için dimer ve trimer oluşumunu ortaya çıkarmıştır. MO için yüksek performanslı sıvı kromatografisi, UV-vis spektrofotometri ve MS, azo-bağ bölünmesinin boyanın bölünme ürünü ile hetero-bağlanmasının ve ayrıca üçüncül amin aktivasyonu yoluyla boyanın kendi kendine bağlanmasının kanıtını sağladığı belirtilmiştir.

Suri vd. (2021) yaptıkları çalışmada kitosan (Cs) ile grafen oksidi (GO) elektrostatik etkileşim yoluyla çapraz bağlayarak yeşil nano adsorban (CsGOn) hazırlamıştır. Sonrasında yaban turbu peroksidazının (HRP) mekanik dayanıklılığını arttırmak ve endüstriyel uygulama için yüksek yeniden kullanılabilirlik elde etmek üzere HRP, CsGOn üzerine kovalent bağlama yoluyla immobilize edilmiştir. CsGOn ve HRP-CsGOn; SEM ve FTIR analizi, kitosanın GO ile çapraz bağlanmasını ve HRP'nin CsGOn üzerinde immobilizasyonunu doğrulamıştır. HRP-CsGOn'un enzim aktivitesi serbest enzim ile pH, sıcaklık, depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik gibi farklı proses koşullarında karşılaştırılmıştır. HRP-CsGOn, serbest enzimden daha iyi sıcaklık, pH stabilitesi ve depo kararlılığı göstermiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 378 (mg/g), 10 dakikalık bir denge süresinde ve 35 °C'lik bir sıcaklıkta elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen termodinamik parametreler  $\Delta H=2939,26$  (kJ/mol) ve  $\Delta S=10,10$  (kJ/mol K) pozitif değeri ve  $\Delta G$ 'nin (328-333 K) sıcaklıkta negatif değeri, mevcut sistemin kendiliğinden olduğunu ve endotermik olduğunu göstermiştir. Yeniden kullanılabilirlik çalışmaları HRP-CsGOn'un en az 5 döngü için yeniden kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın umut verici bir HRP-CsGOn yeşil nano adsorban sağladığı ve çeşitli uygulamalar için kullanılabilir olduğu savunulmuştur.

Helal vd. (2021) çalışmalarında kısmen saflaştırılmış *Rhizopus oryzae* R1 lipazının atık sudan biyodizel üretiminde kullanılmasını araştırmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzimin en yüksek aktivitesi 30 dakika boyunca yüksek stabilite ile pH 6.0 ve 40 °C'de kaydedilmiştir. Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri sırasıyla 0,3 mg/mL ve 208,3 U/mL bulunmuştur.  $Na^+$  (1 ve 5 mM) ve  $K^+$  (5 mM) gibi tek değerli metal iyonları lipazın aktivitesini sırasıyla %110, %105,5 ve %106,5 arttırmıştır. Kitosan hem adsorpsiyon hem de çapraz bağlama yoluyla immobilizasyon için mükemmel bir destek olarak kullanılmış ve bu yöntem ile %99,1 immobilizasyon verimliliğine ve 12 döngü tekrar kullanılabilirliğe ulaşılmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzimin oleik asidin esterleştirilmesi ve zeytinyağının

transesterifikasyonu yoluyla metil oleat (biyodizel) oluşturma yeteneğini kanıtladığı rapor edilmiştir.

C. Işık vd. (2021) son yıllarda insan beslenmesinin önemli bir parçası olan yemeklik yağların tüketimi sonrasında ortaya çıkan yağlı atık suyun giderimi için bu çalışmada *Acinetobacter haemolyticus* tarafından üretilen lipaz enzimini adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak yumurta kabuğu zarı (ESM) üzerine immobilize etmiş ve lipaz immobilizasyonunun optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. ESM ve lipaz immobilize edilmiş ESM, fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. 50 °C, 60 °C ve 70 °C sıcaklıkta immobilize enzim aktivitesinin %50'sini sırasıyla 150, 120 ve 80 dakika korumuştur. pH stabilite deneylerinde immobilize enzim serbest enzime göre özellikle asidik bölgede çok daha yüksek aktivite göstermiştir. Immobilize enzim 19 yeniden kullanımdan sonra aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumayı başarmıştır. Sonuç olarak yüksek oleik asit bileşimine sahip yağlar içeren atık suların arıtımında lipaz immobilize ESM kullanılarak yeni, ekonomik, tekrar kullanılabilir ve alternatif bir biyoremediasyon yönteminin geliştirildiği bildirilmiştir.

Geng vd. (2021) SEM ve FTIR ile karakterize edilen yeni bir bakır nanozim (CNZ) sentezlemiştir. Sentezlenen CNZ; 2,2'-azinodi-(3-etilbenziazolin)-6-sülfonata (ABTS) karşı tipik peroksidaz aktivitesi sergilemiştir. Metil Orange içeren yapay kirleticilerin giderimi için CNZ başarıyla uygulanmıştır. Optimum koşullar altında (pH 3.0; Sıcaklık 60 °C; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi 200 mM; CNZ dozajı 8 mg) 10 dakikadan daha kısa sürede boya giderim hızı %93 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca CNZ mükemmel yeniden kullanılabilirlik ve depolama stabilitesi sergilemiştir. Tüm bu deneyler sonucunda CNZ'nin endüstriyel atık su arıtımı için güçlü bir katalizör olarak kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Deneyleerde ADÜ Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Velp (Multistirrer 15) çoklu manyetik karıştırıcı, Shimadzu (UV 1601) spektrofotometre, Radwag (AS 220/C/2) 0,1 mg duyarlıkta hassas terazi, Memmert (UNB 400) etüv, Hanna (pH 211) pH metre, Elma Ultrasonic (LC 30) ultrasonikasyon cihazı, Heidolph (Promax 202) çalkalayıcı, GFL (2001/4) saf su cihazı, Millipore (Simplicity) ultra saf su cihazı, IKA (C-MAG HS7) sıcaklık ayarlı manyetik karıştırıcı, Sigma (3-30 KS) soğutmalı santrifüj cihazı, Wisebath su banyosu, Isolab ve Brand marka otomatik pipetler kullanılmıştır.

Boncukların karakterizasyonu için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM, Philips XL-30S FEG), İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde bulunan Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Varian FTS 7000, US) hizmet alımı yoluyla kullanılmıştır.

Deneyleerde kullanılan; aljinik asit sodyum tuzu (düşük viskoziteli), kitosan (düşük viskoziteli), peroksidaz (Horseradish, 150-250 U/mg), lipaz (*Aspergillus niger*, ~200 U/g), kalsiyum klorür, potasyum klorür, sodyum klorür, hidroklorik asit, pyrogallol (~%98, HPLC), p-nitrofenil laurat (4-nitrofenil dodekanoat, ~%98, HPLC), hidrojen peroksit, sodyum karbonat, Chlorazol Black, Orange G, Naphthol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue, Azure A, gallik asit, asetik asit, sodyum asetat, potasyum fosfat monobasic, potasyum fosfat dibasic, potasyum fosfat tribasic, sodyum hidroksit, sığır serum albümini (protein standartı, 66 kDa), Bradford Reaktif, aseton, etanol, metanol, demir (II,III) oksit Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Boncukların Üretimi

Boş aljinat boncukların üretimi uygun koşullar (25 °C, 100 rpm) altında sodyum aljinatın yapısında bulunan sodyum iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla sulu ortamda basitçe yer değiştirmesiyle kalsiyum aljinat jel yapısının oluşması sonucunda gerçekleştirilmiştir (Pasparakis ve Bouropoulos, 2006). Aljinat boncuk üretim yöntemi özellikle enzim, ilaç ve hücre immobilizasyonu gibi tutuklama çalışmalarında sıklıkla kullanılan; kolay, ucuz ve etkili bir yöntem olduğu için tercih edilmiştir.

Boş aljinat/kitosan boncukların üretimi ise uygun koşullar (25 °C, 100 rpm) altında sodyum aljinatın yapısında bulunan sodyum iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla sulu ortamda basitçe yer değiştirmesiyle kalsiyum aljinat jel yapısının oluşması ve aynı ortamda bulunan kitosan ile oluşan bu jel yapının kaplanması sonucunda gerçekleştirilmiştir. Aljinat/kitosan boncuk üretimi; aljinat boncukların yapısında bulunan karboksil grupları ile kitosanın yapısında bulunan amin gruplarının polielektrolit kompleks oluşturması sonucunda aljinat boncukların kitosan ile kaplanması yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Lawrie vd., 2007). Aljinat boncukların kitosan ile kaplanması sonucunda boncuklara immobilize edilen enzimlerin pH ve sıcaklık gibi ortam parametrelerindeki değişimlerden kitosan ile kaplanmamış boncuklara göre daha az etkilenmesi beklenmektedir.

Manyetik aljinat ve manyetik aljinat/kitosan boncukların üretimi için  $Fe_3O_4$  (demir II,III oksit) manyetit nanopartiküller, kalsiyum aljinat jel oluşumu sırasında bu jel yapının içerisine tutuklanarak immobilize edilmiştir. Bu sayede üretilen boncuklar manyetik özellik kazanmıştır (Teotia ve Gupta, 2002). Aljinat ve aljinat/kitosan boncuklara kazandırılan manyetik özellik sayesinde, enzim immobilize edilmiş boncukların reaksiyon ortamından uygun bir mıknatıs yardımıyla kolay bir şekilde alınabilmesi ön görülmüştür (Bilici vd., 2019).

#### 3.2.1.1. Boncuk Üretiminin Optimizasyonu

Boncuk üretimini optimizasyonu için farklı derişimlerde aljinat, kitosan ve kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ) çözeltileri kullanılarak aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik

aljinat/kitosan boncukların boş olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boncuklar üretim ortamından süzülerek alınmış, saf su ile 3 kez yıkanmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

Boş aljinat boncuklar için saf suda hazırlanan farklı yüzdelerdeki 2 mL düşük viskoziteli sodyum aljinat çözeltisi yine suda hazırlanmış 25 mL'lik beherde bulunan karışır durumda (100 rpm) farklı yüzdelerdeki 20 mL  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içine şırınga (5 mL; 0,8x38 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Boş manyetik aljinat boncuklar için saf suda hazırlanan farklı yüzdelerdeki 2 mL düşük viskoziteli sodyum aljinat çözeltisine 10 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  eklenerek 5 dakika ultrasonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen karışım suda hazırlanmış 25 mL'lik beherde karışır durumda (100 rpm) bulunan farklı yüzdelerdeki 20 mL  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içine şırınga (5 mL; 0,8x38 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Boş aljinat/kitosan boncuklar için saf suda hazırlanan farklı yüzdelerdeki 2 mL düşük viskoziteli sodyum aljinat çözeltisi 25 mL'lik beherde karışır durumda (100 rpm) bulunan suda hazırlanmış farklı yüzdelerdeki 20 mL  $\text{CaCl}_2$  ve %1'lik asetik asit çözeltisinde hazırlanmış farklı yüzdelerdeki 4 mL düşük viskoziteli kitosan içeren çözelti içine şırınga (5 mL; 0,8x38 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Boş manyetik aljinat/kitosan boncuklar için saf suda hazırlanan farklı yüzdelerdeki 2 mL düşük viskoziteli sodyum aljinat çözeltisine 10 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  eklenerek 5 dakika ultrasonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen karışım 25 mL'lik beherde karışır durumda (100 rpm) bulunan suda hazırlanmış farklı yüzdelerdeki 20 mL  $\text{CaCl}_2$  ve %1'lik asetik asit çözeltisinde hazırlanmış farklı yüzdelerdeki 4 mL düşük viskoziteli kitosan içeren çözelti içine şırınga (5 mL; 0,8x38 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Boncuk üretimi optimizasyon çalışmalarının, homojen büyüklükte olmaları ve mekanik kararlılıklarının yüksek olmasına bağlı olarak immobilizasyonda kullanılacak olan boncukların seçimine yön vermesi beklenmektedir. Çizelge 7'de boş boncukların üretiminde optimizasyon için denenen tüm  $\text{CaCl}_2$ , aljinat ve kitosan derişimleri % olarak verilmiştir.

**Çizelge 7.** Boş boncukların optimizasyon çalışmasında kullanılan kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>), aljinat ve kitosan yüzde (w/v) derişimleri.

<b>ÖRNEK</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b> <b>% (w/v)</b>	<b>Aljinat</b> <b>% (w/v)</b>	<b>Kitosan</b> <b>% (w/v)</b>
1	1	0,1	-
2	1	1	-
3	1	2	-
4	1	3	-
5	2	0,1	-
6	2	1	-
7	2	2	-
8	2	3	-
9	3	0,1	-
10	3	1	-
11	3	2	-
12	3	3	-
13	4	0,1	-
14	4	1	-
15	4	2	-
16	4	3	-
17	5	0,1	-
18	5	1	-
19	5	2	-
20	5	3	-
21	10	0,1	-
22	10	1	-
23	10	2	-
24	10	3	-
25	5	2	0,1
26	5	2	0,2
27	5	2	0,3
28	5	2	0,4
29	5	2	0,5
30	5	2	1

### 3.2.1.2. Boncukların Karakterizasyonu

Üretilen boncukların FTIR karakterizasyonu için aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boş boncuklar üretim ortamından alınarak süzölmüş ve saf su ile 3



kez yıkanmıştır. Sonrasında boncuklar 40 °C etüvde 48 saat kurutulmuş ve agat havanda toz haline getirilmiştir (Chan vd., 2011). Hazırlanan örnekler ile boncukların üretiminde kullanılan sodyum aljinat, kitosan ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin FTIR spektrumları alınmıştır. FTIR ölçümleri ile boncukların üretiminde kullanılan aljinat, kitosan ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin üretilen boncukların yapısına katılıp katılmadığının tespiti ön görülmüştür.

Üretilen boncukların SEM karakterizasyonu için aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boş ve enzim yüklü boncuklar üretim ortamından alınarak süzölmüş ve saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Sonrasında 40 °C etüvde 48 saat kurutulmuştur (Chan vd., 2011). Kurutulmuş örnekler altın ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiştir. SEM fotoğrafları ile üretilen boncukların gerçek boyutlarının, yüzey morfolojilerinin, boş ve enzim yüklü boncukların morfoloji farklılıklarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

### **3.2.1.3. Boncukların Mekanik Kararlılıklarının Belirlenmesi**

Boncukların mekanik kararlılıklarını belirlemek için farklı derişimlerde aljinat, kitosan ve CaCl<sub>2</sub> kullanılarak üretilen aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boş boncuklar ile çalışılmıştır. Bunun için her grup boncuktan 100'er adet alınmış, 50 mL saf su içeren 200 mL'lik erlenlere konarak çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve dakikada 130 devir olacak şekilde 3 saat boyunca çalkalanmıştır. Sürenin sonunda sağlam kalan boncuklar süzülerek ortamdaki alınmış, saf su ile 3 kez yıkanmış ve sayılmıştır. Sağlam kalan boncukların sayısı başlangıçtaki boncukların sayısına oranlanarak aşağıdaki formüle göre yüzde hesabı yapılmıştır.

$$\% \text{ Sağlam Boncuk} = (\text{Sağlam Boncuk Sayısı} / \text{Başlangıç Boncuk Sayısı}) \times 100$$

Ayrıca sağlam boncukların fotoğrafları çekilmiştir. Bu çalışma ile endüstriyel kullanım için hedeflenen enzimlerin immobilizasyonunda kullanılacak olan boncukların çalkalama gibi basit bir mekanik etkiye direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3.2.2. Serbest Yaban Turbu Peroksidaz (HRP) Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest HRP enzim aktivitesinin hesaplanması için substrat olarak pyrogallol kullanılmıştır (Bach vd., 2013; Monier vd., 2010; Raghu vd., 2013; Šekuljica vd., 2016). Optimum pH tayini için HRP çözeltisi (0,4 mg/mL) farklı pH değerlerinde [pH 3.0-5.5 asetat tamponu (0,1 M), pH 6.0-9.0 fosfat tamponu (0,1 M), pH 9.5-12 karbonat tamponu (0,1 M)] reaksiyon ortamlarına eklenerek doymuş substrat derişiminde (50 mg/mL) ve 25 °C’de Çizelge 8’de gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Mackova vd., 2001; Sarika vd., 2015). Elde edilen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest HRP optimum pH grafiği çizilmiştir.

**Çizelge 8.** Serbest HRP enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,42 mL Tampon (0,1 M)	2,42 mL Tampon (0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (0,1 M)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
↓	↓
1 Dakika (25 °C)	1 Dakika (25 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

Optimum sıcaklık tayini için HRP çözeltisi (0,4 mg/mL) farklı sıcaklık değerlerinde (10-80 °C) reaksiyon ortamlarına eklenerek doymuş substrat derişiminde (50 mg/mL) ve optimum pH (6.0) değerinde, Çizelge 9’da gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi ölçülmüştür (Mackova vd., 2001; Sarika vd., 2015). Ölçülen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile HRP optimum sıcaklık grafiği çizilmiştir.

**Çizelge 9.** Serbest HRP enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	0,1 mL HRP (0,4 mg/ mL)
↓	↓
1 Dakika (10-80 °C)	1 Dakika (10-80 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

Optimum pH ve sıcaklık tayini HRP enziminin hangi pH ve sıcaklık aralığında ne kadar aktivite gösterdiğinin, hangi pH ve sıcaklık değerinin altında ve/veya üstünde aktivite göstermediğinin ve maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu değerlerin elde edilmesi ile endüstriyel kullanımı hedeflenen enzimin ortam şartlarına uygunluğunun ve bu şartlarda nasıl performans göstereceğinin yorumlanabilir olması amaçlanmıştır.

### 3.2.3. Serbest HRP Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini

Serbest HRP enziminin kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için, enzim derişimi sabit tutularak, farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Pyrogallol substratının derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 16; 25; 37; 50; 68; 85; 100 mg/mL olacak şekilde tüm derişimlerde Çizelge 10'da gösterilen aktivite tayini işlem basamakları uygulanarak aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği için absorbans ölçümünden elde edilen  $\Delta A_{420}$  değerleri kullanılarak aşağıda verilen eşitliğe göre hız hesabı yapılmıştır. Aktivite tayinleri HRP enziminin optimum pH (6.0) ve optimum sıcaklık (40 °C) değerlerinde yapılmıştır.

$$U = \Delta A_{420} \times \text{Reaksiyon Hacmi} / \epsilon_{\text{ürün}} \times \text{Enzim Hacmi} \times \text{Zaman}$$

$\epsilon_{\text{ürün}}$ : 12 mL.mg<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Purpurogallin Molar Absorbsiyon Katsayısı)

$\Delta A_{420}$ : Absorbans<sub>ÖRNEK</sub> - Absorbans<sub>KÖR</sub>

Reaksiyon Hacmi: 3,0 mL

Enzim Çözeltisi Hacmi: 0,1 mL

Zaman: 1 Dakika

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP enziminin kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

**Çizelge 10.** Serbest HRP enziminin kinetik parametrelerinin tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

### 3.2.3.1. Serbest HRP Enziminin Lipaz ve p-Nitrofenil Laurat (pNPL) Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini

Serbest HRP enziminin lipaz enzimi ve lipaz enziminin substratı pNPL varlığında kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için HRP, lipaz ve pNPL derişimleri sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pyrogallol derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 16; 25; 37; 50; 68; 85; 100 mg/mL olacak şekilde tüm derişimlerde lipaz varlığında tayin için Çizelge 11’de gösterilen işlem basamakları, lipaz ve pNPL varlığında tayin için Çizelge 12’de gösterilen işlem basamakları uygulanmıştır. Tayinler HRP enziminin optimum pH (6.0) ve optimum sıcaklık (40 °C) değerlerinde yapılmıştır.

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

**Çizelge 11.** Lipaz varlığında serbest HRP aktivitesinin tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,32 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,32 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

**Çizelge 12.** Lipaz ve pNPL varlığında serbest HRP aktivitesinin tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,22 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,22 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
+	+
0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

### 3.2.4. Serbest Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest lipaz enzim aktivitesinin hesaplanması için substrat olarak p-nitrofenil laurat (pNPL) kullanılmıştır (M. Chen vd., 2020; Fuciños vd., 2005; Krzyczkowska ve Kozłowska, 2017; Moh'd ve Wiegel, 2010). Lipaz çözeltisi farklı pH'lardaki [pH 3.0-5.5 asetat tamponu (0,1 M), pH 6.0-9.0 fosfat tamponu (0,1 M), pH 9.5-12 karbonat tamponu (0,1 M)] reaksiyon ortamlarına eklenerek doygun substrat derişiminde (10 mM, etanolde) ve 25 °C'de Çizelge 13'te gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Camacho vd., 2009; Itoyama vd., 1994). Ölçülen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest lipaz optimum pH grafiği çizilmiştir.

Optimum sıcaklık tayini için lipaz çözeltisi farklı sıcaklık değerlerinde (10-80 °C) reaksiyon ortamlarına eklenerek doygun substrat derişiminde (10 mM, etanolde) ve optimum pH değerinde Çizelge 14'te gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Camacho vd., 2009; Itoyama vd., 1994). Ölçülen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest lipaz optimum sıcaklık grafiği çizilmiştir.

**Çizelge 13.** Serbest lipaz enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,8 mL Tampon (0,1 M)	2,8 mL Tampon (0,1 M)
+	+
0.1 mL Tampon (0,1 M)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
↓	↓
3 Dakika (25 °C)	3 Dakika (25 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

Optimum pH ve sıcaklık tayini lipaz enziminin hangi pH ve sıcaklık aralığında ne kadar aktivite gösterdiğinin, hangi pH ve sıcaklık değerinin altında ve/veya üstünde aktivite göstermediğinin ve maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu değerlerin belirlenmesi ile endüstriyel kullanımı hedeflenen enzimin ortam şartlarına uygunluğunun ve bu şartlarda nasıl performans göstereceğinin yorumlanabilir olması amaçlanmıştır.

**Çizelge 14.** Serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0.1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
↓	↓
5 Dakika (10-80 °C)	5 Dakika (10-80 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

### 3.2.5. Serbest Lipaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini

Serbest lipaz enziminin kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için enzim derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pNPL derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 10; 16; 25 mM olacak şekilde, tüm derişimlerde Çizelge 15'te gösterilen işlem basamakları uygulanarak optimum pH (7.0) ve sıcaklıkta (45 °C) aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği için absorbans ölçümünden elde edilen  $\Delta A_{405}$  değerleri kullanılarak aşağıda verilen eşitliğe göre hız hesabı yapılmıştır.

$$U = \Delta A_{405} \times \text{Reaksiyon Hacmi} / \epsilon_{\text{ürün}} \times \text{Enzim Hacmi} \times \text{Zaman}$$

$$\epsilon_{\text{ürün}}: 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (p-Nitrofenolün Molar Absorbsiyon Katsayısı)}$$

$$\Delta A_{405}: \text{Absorbans}_{\text{ÖRNEK}} - \text{Absorbans}_{\text{KÖR}}$$

Reaksiyon Hacmi: 3,0 mL

Enzim Çözeltisi Hacmi: 0,1 mL

Zaman: 3 Dakika

**Çizelge 15.** Serbest Lipaz enziminin kinetik parametrelerinin tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk



grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP enziminin kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

### 3.2.5.1. Serbest Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini

Serbest lipaz enziminin HRP enzimi ve HRP enziminin substratı pyrogallol varlığında kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için lipaz, HRP ve pyrogallol derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pNPL derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 10; 16; 25 mM olacak şekilde tüm derişimlerde HRP varlığında tayin için Çizelge 16'da gösterilen işlem basamakları, HRP ve pyrogallol varlığında tayin için Çizelge 17'de gösterilen işlem basamakları uygulanmıştır. Tayinler lipaz enziminin optimum pH (7.0) ve optimum sıcaklık (45 °C) değerlerinde yapılmıştır.

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

**Çizelge 16.** HRP varlığında serbest lipazın aktivite tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,7 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,7 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

**Çizelge 17.** HRP ve pyrogallol varlığında serbest lipazın aktivite tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,3 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,3 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	0,1 mL Lipaz (4 mg/mL)
+	+
0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)	0,1 mL HRP (0,4 mg/mL)
+	+
0,3 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,3 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,1 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

### 3.2.6. Aljinat ve Manyetik Aljinat Boncuklara HRP ve Lipaz İmmobilizasyonu, HRP ve Lipaz Ko-immobilizasyonu

Aljinat boncuklara HRP immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden; lipaz immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 4 mg/mL lipaz çözeltisinden; HRP ve lipaz ko-immobilizasyonu için 4 mL sodyum aljinat çözeltisine 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden ve 4 mg/mL lipaz çözeltisinden 1'er mL eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır (100 rpm). Manyetik aljinat boncuklara enzim immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ko-immobilizasyon için 4 mL sodyum aljinat çözeltisine 20 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> eklenerek 5 dakika ultrasonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen karışıma HRP immobilizasyonu için 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden, lipaz immobilizasyonu için 4 mg/mL lipaz çözeltisinden, HRP ve lipaz ko-immobilizasyonu için 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden ve 4 mg/mL lipaz çözeltisinden 1'er mL eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır (100 rpm).

Elde edilen çözeltiler karıştır durumda (100 rpm) 20 mL %5'lik CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içine şırınga (5 mL, 32 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak boncuk oluşumu sırasında enzimlerin

boncukların içinde tutuklanması ile immobilizasyon ve ko-immobilizasyon gerçekleştirilmiştir (Gholami-Borujeni vd., 2011; Ölçer ve Tanriseven, 2010; Taqieddin ve Amiji, 2004; F. Q. Wang vd., 2011). İmmobilizasyon ve ko-immobilizasyon işlemleri 25 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7. Aljinat/Kitosan ve Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuklara HRP ve Lipaz İmmobilizasyonu, HRP ve Lipaz Ko-immobilizasyonu**

Aljinat/kitosan boncuklara HRP immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden, lipaz immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 4 mg/mL lipaz çözeltisinden, HRP ve lipaz ko-immobilizasyonu için 4 mL sodyum aljinat çözeltisine 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden ve 4 mg/mL lipaz çözeltisinden 1'er mL eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır (100 rpm). Manyetik aljinat/kitosan boncuklara enzim immobilizasyonu için 2 mL sodyum aljinat çözeltisine 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ko-immobilizasyon için 4 mL sodyum aljinat çözeltisine 20 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> eklenerek 5 dakika ultrasonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen karışıma HRP immobilizasyonu için 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden, lipaz immobilizasyonu için 4 mg/mL lipaz çözeltisinden, HRP ve lipaz ko-immobilizasyonu için 0,4 mg/mL HRP çözeltisinden ve 4 mg/mL lipaz çözeltisinden 1'er mL eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır (100 rpm).

Elde edilen çözeltiler karışır durumda (100 rpm) 20 mL %5'lik CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ve 4 mL %1'lik kitosan çözeltisi içine şırınga (5 mL; 0,8x38 mm) ile 3 cm yükseklikten damlatılarak boncuk oluşumu sırasında enzimlerin boncukların içinde tutuklanması ile immobilizasyon ve ko-immobilizasyon gerçekleştirilmiştir (Gholami-Borujeni vd., 2011; Ölçer ve Tanriseven, 2010; Taqieddin ve Amiji, 2004; F. Q. Wang vd., 2011). İmmobilizasyon ve ko-immobilizasyon işlemleri 25 °C sıcaklıkta yapılmıştır.

### **3.2.8. Sığır Serum Albümin (BSA) Standart Grafiğinin Hazırlanması**

Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak 100 µg/mL protein derişimi ile 1500 µg/mL protein derişim aralığını kapsayacak şekilde BSA standart grafiği hazırlanmıştır. BSA standart grafiği için, %0,1'lik NaCl çözeltisi ile uygun derişimde hazırlanan stok BSA çözeltisinden

seyreltme yapılarak 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/mL'lik BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilere Bradford reaktifi eklenmiş, vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika beklenmiş ve 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri BSA derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek standart grafiği oluşturulmuştur.

### **3.2.9. Boncuklara Enzim Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi**

Farklı derişimlerdeki (1, 2, 3, 4, 5, 6 mg/mL) HRP ve lipaz çözeltileri kullanılarak enzimler boncuklara Bölüm 3.2.6. ve 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde immobilize ve ko-immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi tamamlandıktan 1 saat sonra immobilizasyon çözeltilerinden alınan örneklerde protein tayini yapılmış ve immobilizasyona katılmayan serbest protein miktarı belirlenmiştir. Böylece immobilizasyon ortamına eklenen toplam protein miktarından immobilize olmayan toplam protein miktarı çıkarılarak immobilize olan protein miktarı hesaplanmıştır.

### **3.2.10. İmmobilize HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini**

İmmobilize HRP enzim aktivitesinin hesaplanması için substrat olarak pyrogallol kullanılmıştır. Optimum pH tayini için HRP yüklü boncuklar farklı pH değerlerinde [pH 3.0-5.5 asetat tamponu (0,1 M), pH 6.0-9.0 fosfat tamponu (0,1 M), pH 9.5-12 karbonat tamponu (0,1 M)] reaksiyon ortamlarına eklenerek doygun substrat derişiminde (50 mg/mL) ve 25 °C'de Çizelge 18'de gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest HRP optimum pH grafiği çizilmiştir.

Optimum sıcaklık tayini için HRP yüklü boncuklar farklı sıcaklık değerlerinde (10-80 °C) reaksiyon ortamlarına eklenerek doygun substrat derişiminde (50 mg/mL) ve optimum pH değerinde Çizelge 19'da gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile immobilize HRP optimum sıcaklık grafiği çizilmiştir.

**Çizelge 18.** İmmobilize HRP enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,42 mL Tampon (0,1 M)	2,52 mL Tampon (0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (0,1 M)	HRP Yüklü Boncuklar
↓	↓
1 Dakika (25 °C)	1 Dakika (25 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

**Çizelge 19.** İmmobilize HRP enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,52 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,32 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	HRP Yüklü Boncuklar
↓	↓
1 Dakika (10-80 °C)	1 Dakika (10-80 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

İmmobilize HRP enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi ile endüstriyel kullanımı hedeflenen enzimin ortam şartlarına uygunluğunun ve bu şartlarda nasıl performans göstereceğinin yorumlanabilir olması amaçlanmıştır.

### 3.2.11. İmmobilize HRP Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini

İmmobilize HRP enziminin kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için enzim derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pyrogallol derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 16; 25; 37; 50; 68; 85; 100 mg/mL olacak şekilde tüm derişimler için Çizelge 20’de gösterilen aktivite tayini işlem basamakları uygulanarak optimum pH (6.0) ve sıcaklıkta (40 °C) aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği için absorbans ölçümünden elde edilen  $\Delta A_{420}$  değerleri alınarak aşağıda verilen eşitliğe göre hız hesabı yapılmıştır.

$$U = \Delta A_{420} / \epsilon_{\text{ürün}} \times \text{Zaman}$$

$\epsilon_{\text{ürün}}$ : 12 mL.mg<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Purpurogallin Molar Absorbsiyon Katsayısı)

$\Delta A_{420}$ : Absorbans<sub>ÖRNEK</sub> - Absorbans<sub>KÖR</sub>

Zaman: 1 Dakika

**Çizelge 20.** İmmobilize HRP enziminin kinetik parametrelerin tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,52 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	HRP Yüklü Boncuklar
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP enziminin kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

### 3.2.11.1. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin pNPL Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini

Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin lipaz enziminin substratı pNPL varlığında kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için HRP, lipaz ve pNPL derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pyrogallol derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 16; 25; 37; 50; 68; 85; 100 mg/mL olacak şekilde tüm derişimlerde lipaz varlığında aktivite tayini için Çizelge 21’de gösterilen işlem basamakları, lipaz ve pNPL varlığında aktivite tayini için Çizelge 22’de gösterilen işlem basamakları uygulanmıştır. Tayinler HRP enziminin optimum pH (6.0) ve sıcaklık (40 °C) değerlerinde yapılmıştır.

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

**Çizelge 21.** Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin aktivite tayini işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,52 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
Lipaz Yüklü Boncuklar	HRP ve Lipaz Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	HRP ve Lipaz Yüklü Boncuklar
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

**Çizelge 22.** Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL substratı varlığında aktivite tayini işlem basamakları.

<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
2,32 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	2,42 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)
+	+
0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,16 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,32 mL Pyrogallol	0,32 mL Pyrogallol
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
+	+
Lipaz Yüklü Boncuklar	HRP ve Lipaz Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL Tampon (pH 6.0; 0,1 M)	HRP ve Lipaz Yüklü Boncuklar
↓	↓
1 Dakika (40 °C)	1 Dakika (40 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (420 nm)	Absorbans Ölçümü (420 nm)

### 3.2.12. İmmobilize Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Tayini

İmmobilize lipaz enzim aktivitesinin hesaplanması için substrat olarak p-nitrofenil laurat (pNPL) kullanılmıştır. Lipaz yüklü boncuklar farklı pH'lardaki [pH 3.0-5.5 asetat tamponu (0,1 M), pH 6.0-9.0 fosfat tamponu (0,1 M), pH 9.5-12 karbonat tamponu (0,1 M)] reaksiyon ortamlarına eklenerek doymuş substrat derişiminde (10 mM, etanolde) ve 25 °C'de Çizelge 23'te gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest lipaz optimum pH grafiği çizilmiştir.

Optimum sıcaklık için lipaz yüklü boncuklar farklı sıcaklık değerlerinde (10-80 °C) reaksiyon ortamlarına eklenerek doymuş substrat derişiminde (10 mM, etanolde) ve optimum pH değerinde Çizelge 24'te gösterilen yöntem ile enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri ile serbest lipaz optimum pH grafiği çizilmiştir.



**Çizelge 23.** İmmobilize lipaz enziminin optimum pH tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,8 mL Tampon	2,9 mL Tampon
+	+
0.1 mL Tampon	Lipaz Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
↓	↓
3 Dakika (25 °C)	3 Dakika (25 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

**Çizelge 24.** İmmobilize lipaz enziminin optimum sıcaklık tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,9 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0.1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	Lipaz Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL pNPL (10 mM)	0,1 mL pNPL (10 mM)
↓	↓
3 Dakika (10-80 °C)	3 Dakika (10-80 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

### 3.2.13. İmmobilize Lipaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini

İmmobilize lipaz (aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan) enziminin kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için enzim derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pNPL derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 10; 16; 25 mM olacak şekilde tüm derişimler için Çizelge 25'te gösterilen aktivite tayini işlem basamakları uygulanarak optimum pH (7.0) ve sıcaklıkta (45 °C) aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği için absorbans ölçümünden elde edilen  $\Delta A_{405}$  değerleri alınarak aşağıda verilen eşitliğe göre hız hesabı yapılmıştır.

$$U = \Delta A_{405} / \epsilon_{\text{ürün}} \times \text{Zaman}$$

$\epsilon_{\text{ürün}}$ : 18 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (pNPL Molar Absorbsiyon Katsayısı)

$\Delta A_{405}$ : Absorbans<sub>ÖRNEK</sub> - Absorbans<sub>KÖR</sub>

Zaman: 3 Dakika

**Çizelge 25.** İmmobilize lipaz enziminin kinetik parametrelerin tayini için işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,9 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0.1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	Lipaz Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP enziminin kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

### 3.2.13.1. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Pyrogallol Substratı Varlığında Kinetik Parametrelerinin Tayini

HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin HRP enziminin substratı pyrogallol varlığında kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için lipaz, HRP ve pyrogallol derişimleri sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde aktivite tayini yapılmıştır. Substrat pNPL derişimleri 1; 1,3; 1,7; 2; 3,6; 5; 7; 10; 16; 25 mM olacak şekilde tüm derişimlerde HRP varlığında tayin için Çizelge 26'da gösterilen işlem basamakları, HRP ve pyrogallol varlığında

tain için Çizelge 27’de gösterilen işlem basamakları uygulanmıştır. Tayinler lipaz enziminin optimum pH (7.0) ve sıcaklık (45 °C) değerlerinde yapılmıştır.

**Çizelge 26.** HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin aktivite tayini işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,8 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,9 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	Lipaz ve HRP Yüklü Boncuklar
+	+
HRP Yüklü Boncuklar	Lipaz ve HRP Yüklü Boncuklar
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

**Çizelge 27.** HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında aktivite tayini işlem basamakları.

Kör	Örnek
2,4 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	2,5 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)
+	+
0,1 mL Tampon (pH 7.0; 0,1 M)	Lipaz ve HRP Yüklü Boncuklar
+	+
HRP Yüklü Boncuklar	Lipaz ve HRP Yüklü Boncuklar
+	+
0,3 mL Pyrogallol (50 mg/mL)	0,3 mL Pyrogallol (50 mg/mL)
+	+
0,1 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)	0,1 mL Hidrojen Peroksit (%0,5)
+	+
0,1 mL pNPL	0,1 mL pNPL
↓	↓
3 Dakika (45 °C)	3 Dakika (45 °C)
+	+
0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)	0,5 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
↓	↓
5 Dakika Santrifüj (10.000 g)	5 Dakika Santrifüj (10.000 g)
↓	↓
Absorbans Ölçümü (405 nm)	Absorbans Ölçümü (405 nm)

Enzimatik reaksiyonun hesaplanan hız değerleri (V) substrat derişimine (S) karşı grafiğe geçirilerek Michaelis-Menten ve (1/V) ve (1/S) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak HRP kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

### **3.2.14. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılık Tayini**

Serbest HRP (0,4 mg/mL) enziminin ayrı ayrı hazırlanan çözeltileri ısıl kararlılıklarının belirlenmesi için 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C sıcaklıklardaki su banyolarında bekletilmiştir (Lu vd., 2016; Machado ve Saraiva, 2005). Bekletilen enzim çözeltilerinden belirli aralıklarla alınıp Çizelge 9’da anlatılan yöntem ile serbest HRP aktivite tayini yapılmıştır.

Serbest lipaz (4 mg/mL) enziminin ayrı ayrı hazırlanan çözeltileri ısıl kararlılıklarının belirlenmesi için 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C sıcaklıklardaki su banyolarında bekletilmiştir (Branco vd., 2015; Rakesh vd., 2015). Bekletilen enzim çözeltilerinden belirli aralıklarla alınıp Çizelge 14’te anlatılan yöntem ile serbest lipaz aktivite tayini yapılmıştır.

Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.15. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının Tayini**

Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara ko-immobilize edilmiş HRP (0,4 mg/mL) ve lipaz (4 mg/mL) enzimlerinin ısıl kararlılıklarının belirlenmesi için ko-immobilize boncuklar 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C sıcaklıklardaki su banyolarında bekletilmiştir. Bekletilen enzim yüklü boncuklardan belirli aralıklarla alınıp Çizelge 9 ve Çizelge 14’te anlatılan yöntemler ile aktivite tayini yapılmıştır. Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.16. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılık Tayini**

Serbest HRP (0,4 mg/mL) enziminin ayrı ayrı hazırlanan çözeltileri pH kararlılıklarının belirlenmesi için 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 pH (0,1 M) değerlerindeki tamponlarda hazırlanmış ve bekletilmiştir (Eremin vd., 2002; Rakesh vd., 2015). Bekletilen enzim çözeltilerinden belirli aralıklarla alınıp Çizelge 8’de anlatılan yöntem ile serbest HRP aktivite tayini yapılmıştır.

Serbest lipaz (4 mg/mL) enziminin ayrı ayrı hazırlanan çözeltileri pH kararlılıklarının belirlenmesi için 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 pH (0,1 M) değerlerindeki tamponlarda hazırlanmış ve bekletilmiştir (Charoenpanich vd., 2011; Rakesh vd., 2015). Bekletilen enzim çözeltilerinden belirli aralıklarla alınıp Çizelge 13’te anlatılan yöntem ile serbest lipaz aktivite tayini yapılmıştır.

Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.17. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılık Tayini**

Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara ko-immobilize edilmiş HRP (0,4 mg/mL) ve lipaz (4 mg/mL) enzimlerinin pH kararlılıklarının belirlenmesi için ko-immobilize boncuklar 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 pH (0,1 M) değerlerindeki reaksiyon ortamlarında bekletilmiştir. Bekletilen enzim yüklü boncuklardan belirli aralıklarla alınıp Çizelge 8 ve Çizelge 13’te anlatılan yöntemler ile aktivite tayini yapılmıştır.

Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.18. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılık Tayini**

Serbest HRP enzim çözeltisi (0,4 mg/mL) buzdolabında +4 °C’de depolanmış ve her gün Çizelge 10’da anlatılan yöntem ile aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite tayinleri için depolanan

enzim çözeltisinden alınan miktar 15 dakika optimum sıcaklıkta reaksiyon ortamında bekletilmiş ve substratlar günlük olarak taze hazırlanmıştır (Kanthamneni vd., 2012; Sahu vd. 2019).

Serbest lipaz enzim çözeltisi (4 mg/mL) buzdolabında +4 °C’de depolanmış ve her gün Çizelge 15’te anlatılan yöntem ile aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite tayinleri için depolanan enzim çözeltisinden alınan miktar 15 dakika optimum sıcaklıkta reaksiyon ortamında bekletilmiş ve substrat çözeltileri günlük olarak taze hazırlanmıştır (Abdulla vd., 2017; Egwim vd. 2012).

Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.19. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılık Tayini**

HRP (0,4 mg/mL) ve lipaz (4 mg/mL) ko-immobilize edilmiş boncuklar buzdolabında +4 °C’de depolanmış ve her gün Çizelge 10 ve Çizelge 15’te anlatılan yöntemler ile aktivite tayinleri yapılmıştır. Aktivite tayinleri için depolanan boncuklardan alınan miktar 15 dakika optimum sıcaklıkta reaksiyon ortamında bekletilmiş ve substrat çözeltileri günlük olarak taze hazırlanmıştır.

Her iki enzim için en yüksek aktivite %100 kabul edilerek zamana karşı hesaplanan % aktivite değerleri ile grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.20. Boş Boncukların Sentetik Boya Adsorbsiyon Kapasitelerinin Tayini**

Boş boncukların; Chlorazol Black ( $C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$ ), Orange G ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Naphthol Blue Black ( $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ ), Brilliant Green ( $C_{27}H_{34}N_2O_4S$ ), Sunset Yellow ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Trypan Blue ( $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ ), Fast Green ( $C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$ ), Congo Red ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ), Brilliant Blue ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ) ve Azure A ( $C_{15}H_{16}ClN_3S$ ) sentetik boyalarının adsorbsiyon kapasiteleri incelenmiştir (Aravindhana vd., 2005; Rocher vd., 2008). Bunun için karışır durumdaki 0,005 mg/mL derişimdeki 5 mL’lik boya çözeltilerine aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncuklar eklenmiştir. Boncuklar eklendikten 5 dakika, 60 dakika ve 24 saat sonra absorbans ölçümü yapılmıştır. Başlangıç boya derişimi %100 kabul edilerek zamana bağlı boya adsorbsiyonu belirlenmiştir.

### 3.2.21. Serbest HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Gideriminin Tayini

Serbest HRP enziminin; Chlorazol Black ( $C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$ ), Orange G ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Naphthol Blue Black ( $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ ), Brilliant Green ( $C_{27}H_{34}N_2O_4S$ ), Sunset Yellow ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Trypan Blue ( $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ ), Fast Green ( $C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$ ), Congo Red ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ), Brilliant Blue ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ) ve Azure A ( $C_{15}H_{16}ClN_3S$ ) sentetik boya örneklerinde renk giderici etkisi incelenmiştir (Gholami-Borujeni vd., 2011; Haddaji vd., 2015; Jiang vd., 2014; Preethi vd., 2013). Bunun için karışır durumdaki 0,005 mg/mL derişimdeki 5 mL'lik farklı boya çözeltilerine 1 mL %0,5'lik  $H_2O_2$  ve 0,5 mL 0,4 mg/mL'lik HRP çözeltilisi eklenmiştir. Reaksiyon başladıktan 5 dakika, 60 dakika ve 24 saat sonra absorbans ölçümü yapılmıştır. Başlangıç boya derişimi %100 kabul edilerek zamana bağı renk giderimi belirlenmiştir.

### 3.2.22. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Gideriminin Tayini

Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin; Chlorazol Black ( $C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$ ), Orange G ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Naphthol Blue Black ( $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ ), Brilliant Green ( $C_{27}H_{34}N_2O_4S$ ), Sunset Yellow ( $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ), Trypan Blue ( $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ ), Fast Green ( $C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$ ), Congo Red ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ), Brilliant Blue ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ) ve Azure A ( $C_{15}H_{16}ClN_3S$ ) sentetik boya örneklerinde renk giderici etkisi incelenmiştir. Bunun için karışır durumdaki 0,005 mg/mL derişimdeki 5 mL'lik farklı boya çözeltilerine 1 mL %0,5'lik  $H_2O_2$  ve ko-immobilize boncuklar eklenmiştir. Reaksiyon başladıktan 5 dakika, 60 dakika ve 24 saat sonra absorbans ölçümü yapılmıştır. Başlangıç boya derişimi %100 kabul edilerek zamana bağı renk giderimi belirlenmiştir.

### 3.2.23. Gallik Asit Standart Grafiğinin Hazırlanması

Zeytin karasuyundan total fenolik bileşik gideriminin hesaplanabilmesi için gallik asit standart fenolik bileşik olarak kabul edilmiş ve gallik asit standart grafiğı hazırlanmıştır. Bunun için; 1 mg/mL gallik asit stok çözeltilisinden belli derişimlerde (0-250  $\mu g$  gallik asit) alınıp 23

mL'ye tamamlandıktan sonra 0,5 mL Folin reaktifiyle 3 dakika 100 rpm de karıştırılmış ve ortama 1,5 mL %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek 2 saat karıştırılmaya devam edilmiştir. Sürenin sonunda 760 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen absorbanslar µg gallik asit miktarına karşı grafiğe geçirilerek gallik asit standart grafiği oluşturulmuştur.

### **3.2.24. Serbest HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Giderim Tayini**

Total fenolik bileşik giderimi taze zeytin karasuyu ile yapılmıştır. Bunun için zeytin karasuyu klasik 3 fazlı sistem kullanan Tariş (İzmir-Selçuk) fabrikasından havuzlarda beklemeden çıkış borusundan taze olarak temin edilmiştir.

Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Elde edilen pirinasız süzöntüden 1 mL alınarak 23 mL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon ortamına 0,4 mg/mL'lik 1 mL serbest HRP enzimi ve 2 mL %0,5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Karışır durumda olan ortamdan 30 dakikada bir alınan örneğe Bölüm 3.2.23'te anlatılan total fenolik bileşik tayini yapılmıştır. Sürenin sonunda 760 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş, başlangıç total fenolik miktarı %100 alınarak total fenolik giderim grafiği çizilmiştir (Aybastier vd., 2011; Brighente vd., 2007; Daffodil ve Mohan, 2013; E. Işık vd., 2011; Pantić vd., 2021).

### **3.2.25. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Giderim Tayini**

Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Elde edilen pirinasız süzöntüden 1 mL alınarak 23 mL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon ortamına HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş boncuklar ve 2 mL %0,5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Karışır durumda olan ortamdan 30 dakikada bir alınan örneğe Bölüm 3.2.23'te anlatılan total fenolik bileşik tayini yapılmıştır. Sürenin sonunda 760 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş, başlangıç total fenolik miktarı %100 alınarak total fenolik giderim grafiği çizilmiştir.



### **3.2.26. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyunda Total Fenolik Bileşik Gideriminde Tekrar Kullanılabilirliğinin Tayini**

Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Elde edilen pirinasız süzöntüden 1 mL alınarak 23 mL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon ortamına HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş boncuklar ve 2 mL %0,5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Karışır durumda olan ortamdan 5 saat sonunda alınan örneğe Bölüm 3.2.23'te anlatılan total fenolik bileşik tayini yapılmıştır. Sürenin sonunda boncuklar ortamdan alınmış ve 760 nm dalga boyunda absorbans ölçölmüş, başlangıç total fenolik miktarı %100 alınarak total fenolik giderimi hesaplanmıştır. Ortamdan alınan boncuklar 3 kez saf su ile yıkanarak yeniden hazırlanan ortama eklenmiş ve işlemler tekrarlanmıştır. Bu işlemler boncuklar fenolik bileşikler üzerinde aktivite göstermeyinceye kadar devam etmiştir.

### **3.2.27. Serbest Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasitesinin Tayini**

Yağ hidroliz kapasitesi tayini taze zeytin karasuyu ile yapılmıştır. Bunun için zeytin karasuyu klasik 3 fazlı sistem kullanan Tariş (İzmir-Selçuk) fabrikasından havuzlarda beklemeden çıkış borusundan taze olarak temin edilmiştir.

Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Süzöntüden alınan 3,5 mL karasuya 4,5 mL tampon (optimum pH) ve 1,5 mL saf zeytinyağı eklenerek 10 dakika karışmaya bırakılmıştır. Karışan reaksiyon ortamına sürenin sonunda 1 mL lipaz (4 mg/mL) eklenmiştir. Reaksiyon 20 dakika sonra 20 mL aseton:etanol (1:1) karışımı eklenerek durdurulmuştur. Beş dakika karıştıktan sonra ortama 5 damla fenolftalein eklenerek 0,05 N NaOH ile pembe renk görölene kadar titrasyon yapılmıştır (Rosu vd., 1997).

Titrasyon sonucu harcanan NaOH miktarı kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre serbest yağ asidi yüzde oleik asit cinsinden hesaplanmıştır (El-Abassy vd., 2009).

$\% \text{ SYA (Oleik Asit Cinsinden Serbest Yağ Asidi)} = V \times C \times M_A / 10 \times g$

$M_A$ : 282.47 g/mol (Oleik Asidin Molekül Ağırlığı)

V: Harcanan NaOH (mL)

C: NaOH Derişimi (0,05 N)

g: Örnek (Yağ) Miktarı (g)

### **3.2.28. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasitelerinin Tayini**

Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Süzöntüden alınan 3,5 mL karasuya 4,5 mL tampon (optimum pH) ve 1,5 mL saf zeytinyağı eklenerek 10 dakika karışmaya bırakılmıştır. Karışan reaksiyon ortamına sürenin sonunda HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş boncuklar eklenmiştir. Reaksiyon 20 dakika sonra 20 mL aseton:etanol (1:1) karışımı eklenerek durdurulmuştur. Beş dakika karıştıktan sonra ortama 5 damla fenolftalein eklenerek 0,05 N NaOH ile pembe renk görölene kadar titrasyon yapılmıştır. Titrasyon sonucu harcanan NaOH miktarı kullanılarak Bölüm 3.2.27'de verilen eşitliğe göre serbest yağ asidi yüzde oleik asit cinsinden hesaplanmıştır (El-Abassy vd., 2009).

### **3.2.29. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidrolizinde Tekrar Kullanılabilirliğinin Tayini**

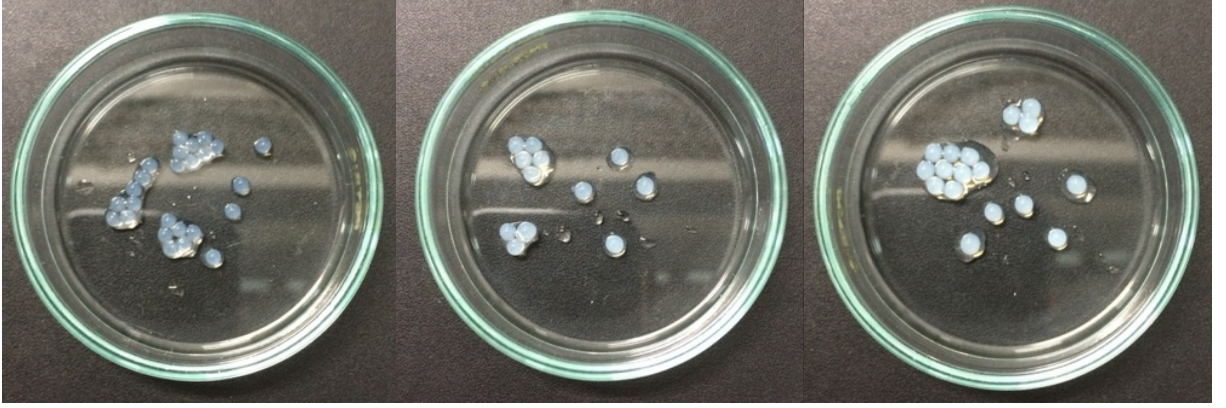
Zeytin karasuyundan 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pirininin uzaklaştırılması için süzölmüştür. Süzöntüden alınan 3,5 mL karasuya 4,5 mL tampon (optimum pH) ve 1,5 mL saf zeytinyağı eklenerek 10 dakika karışmaya bırakılmıştır. Karışan reaksiyon ortamına sürenin sonunda HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş boncuklar eklenmiştir. Reaksiyon 20 dakika sonra boncukları ortamdan alınarak durdurulmuştur. Ardından ortama 20 mL aseton:etanol (1:1) karışımı eklenmiştir. Beş dakika karıştıktan sonra ortama 5 damla fenolftalein eklenerek 0,05 N NaOH ile pembe renk görölene kadar titrasyon yapılmıştır. Reaksiyon ortamından alınan boncuklar saf su ile yıkanarak yeniden hazırlanan

ortama eklenmiş ve işlemler tekrarlanmıştır. Titrasyon sonucu harcanan NaOH miktarı kullanılarak Bölüm 3.2.27’de verilen eşitliğe göre serbest yağ asidi yüzde olarak oleik asit cinsinden hesaplanmıştır (El-Abassy vd., 2009).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Boncukların Görüntülenmesi

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan boncukların seçimine yön vermesi için farklı derişimlerdeki aljinat, kitosan ve  $\text{CaCl}_2$  kombinasyonları ile üretilen boncukların fotoğrafları Resim 1-9'da sunulmuştur. Yüzde 0,1 (w/v)'lik aljinat kullanılan örneklerden 1, 5, 9, 13, 17 ve 21'de boncuk oluşumu gözlenmemiştir.



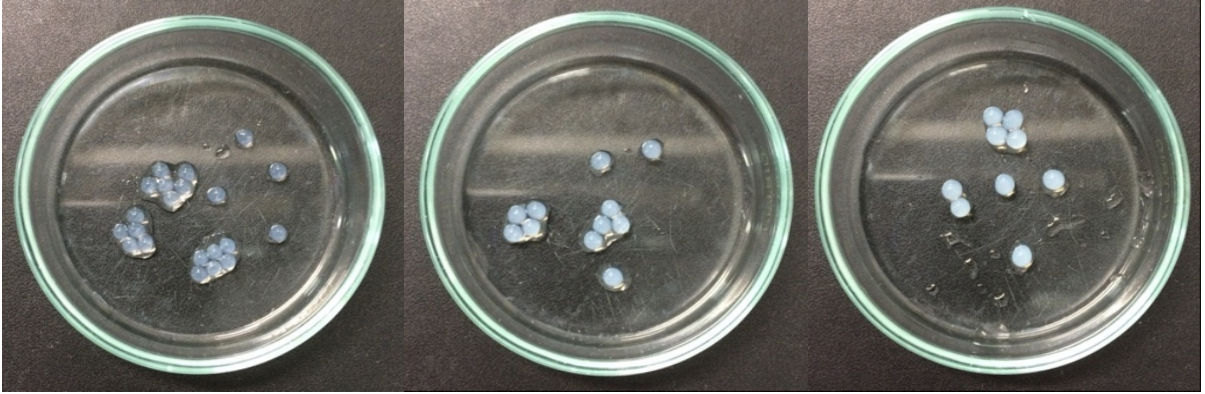
**Resim 1.** Örnek 2 (solda), 3 (ortada) ve 4 (sağda)'ün fotoğrafları (Örnek 2: %1  $\text{CaCl}_2$ , %1 aljinat; örnek 3: %1  $\text{CaCl}_2$ , %2 aljinat; örnek 4: %1  $\text{CaCl}_2$ , %3 aljinat).



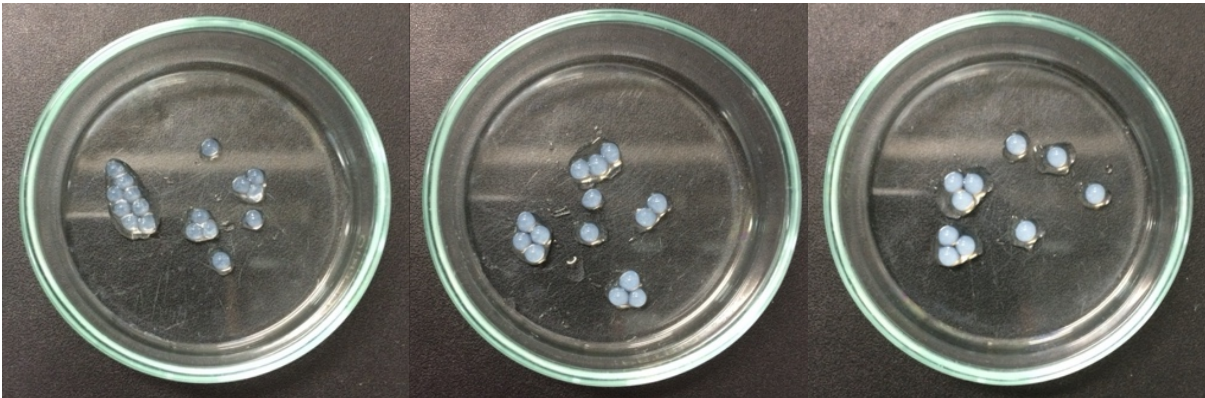
**Resim 2.** Örnek 6 (solda), 7 (ortada) ve 8 (sağda)'in fotoğrafları (Örnek 6: %2  $\text{CaCl}_2$ , %1 aljinat; örnek 7: %2  $\text{CaCl}_2$ , %2 aljinat; Örnek 8: %2  $\text{CaCl}_2$ , %3 aljinat).



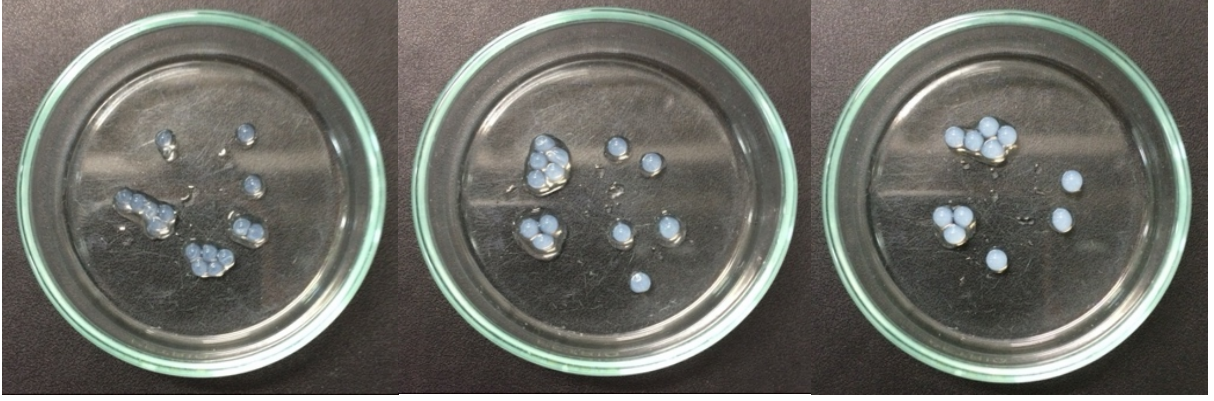
**Resim 3.** Örnek 10 (solda), 11 (ortada) ve 12 (sağda)'nin fotoğrafları (Örnek 10: %3 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 11: %3 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 12: %3 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



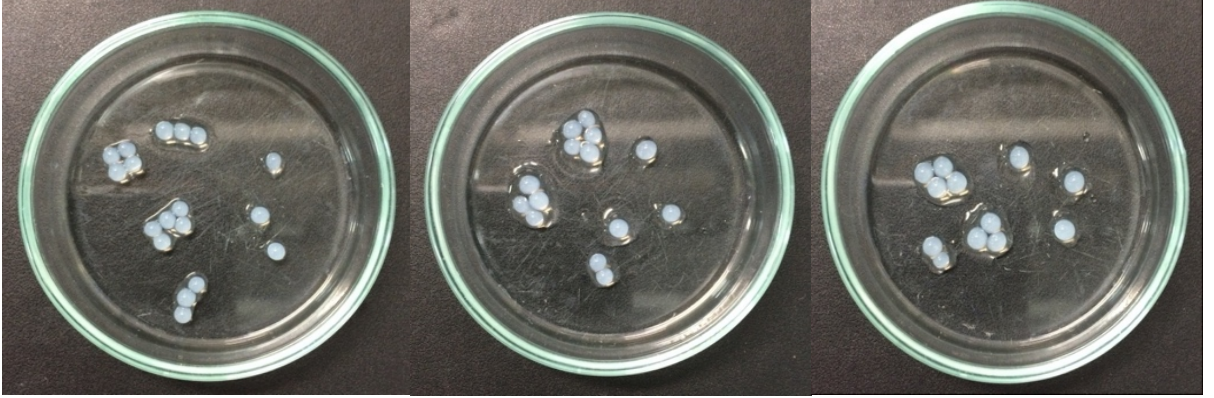
**Resim 4.** Örnek 14 (solda), 15 (ortada) ve 16 (sağda)'nin fotoğrafları (Örnek 14: %4 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 15: %4 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 16: %4 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



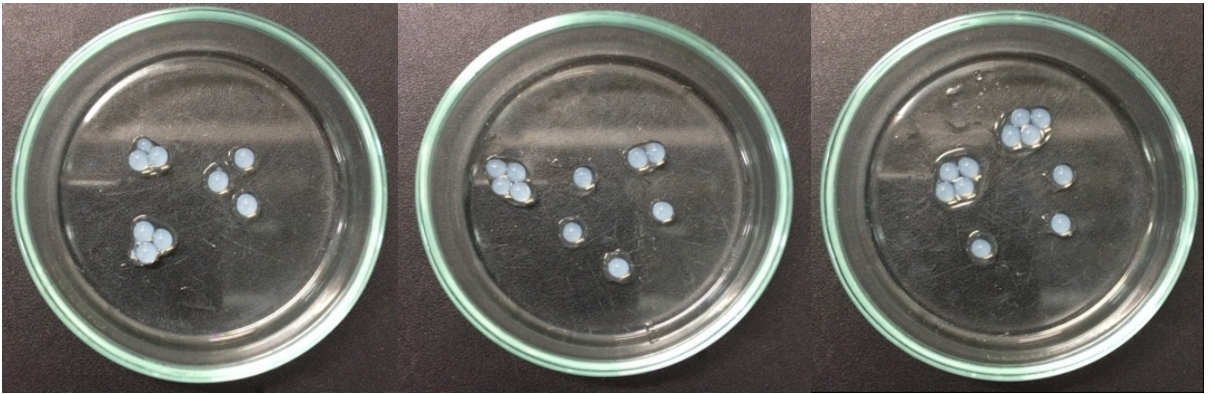
**Resim 5.** Örnek 18 (solda), 19 (ortada) ve 20 (sağda)'nin fotoğrafları (Örnek 18: %5 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 19: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 20: %5 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



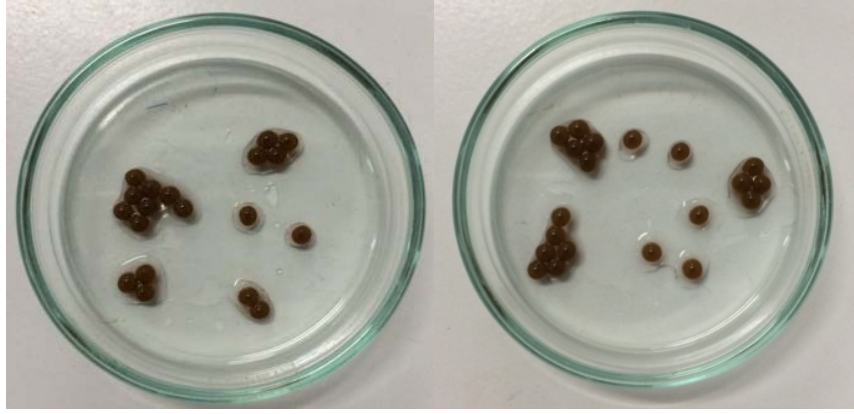
**Resim 6.** Örnek 22 (solda), 23 (ortada) ve 24 (sağda)'ün fotoğrafları (Örnek 22: %10 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 23: %10 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 24: %10 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



**Resim 7.** Örnek 25 (solda), 26 (ortada) ve 27 (sağda)'nin fotoğrafları (Örnek 25: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,1 kitosan; örnek 26: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,2 kitosan; örnek 27: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,3 kitosan).



**Resim 8.** Örnek 28 (solda), 29 (ortada) ve 30 (sağda)'un fotoğrafları (Örnek 28: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,4 kitosan; örnek 29: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,5 kitosan; örnek 30: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1,0 kitosan).

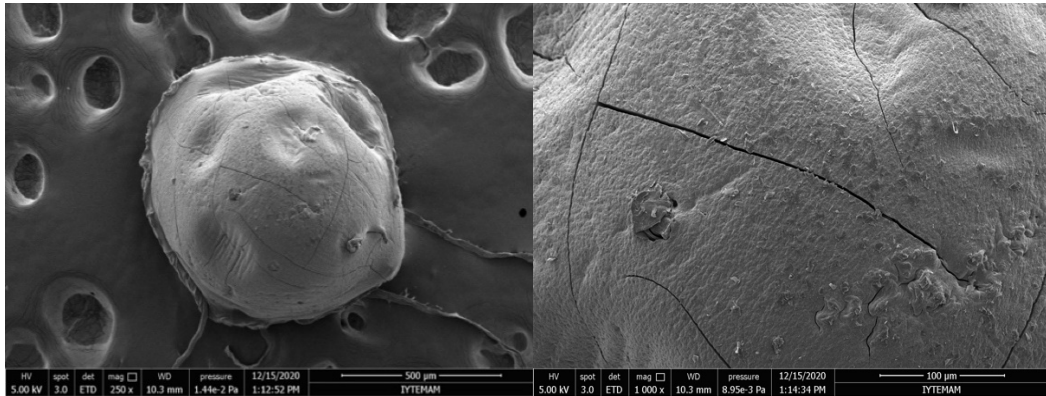


**Resim 9.** Manyetik aljinat (solda) ve manyetik aljinat/kitosan (sağda) boncukların fotoğrafları (Manyetik aljinat: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; manyetik aljinat/kitosan: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

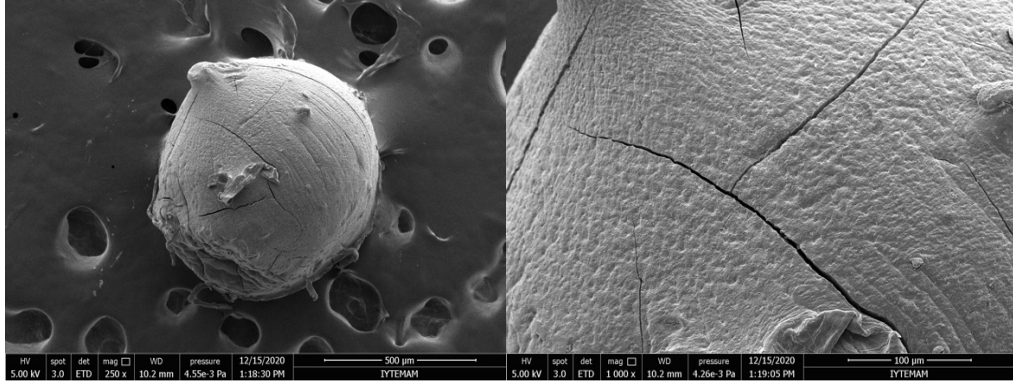
## 4.2. Boncukların Karakterizasyonu

### 4.2.1. SEM Fotoğrafları

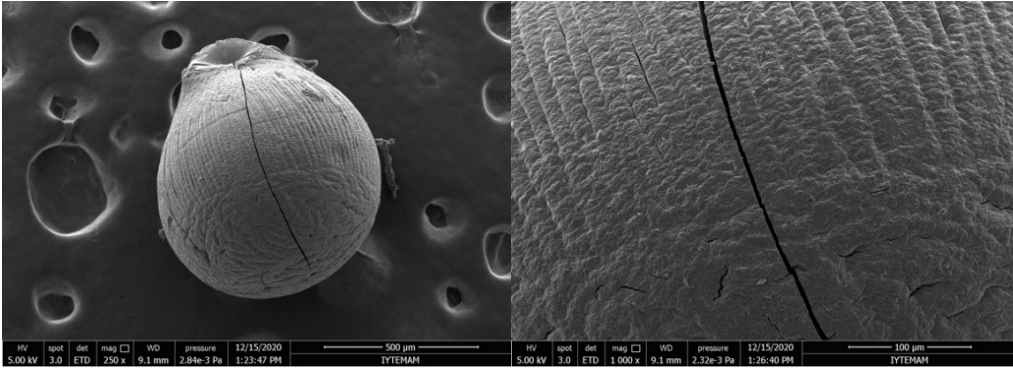
Boncukların morfolojileri hakkında bilgi vermek için her örneğin SEM fotoğrafı 250 ve 1000 kat büyütme olacak şekilde Resim 10-17’de gösterilmiştir.



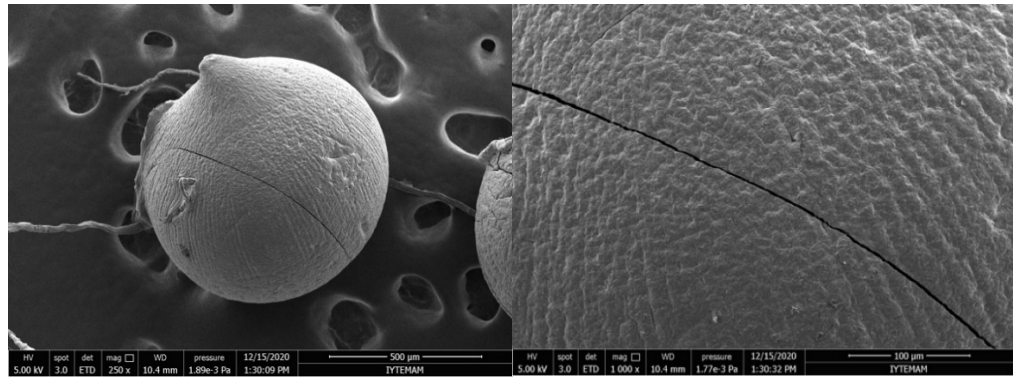
**Resim 10.** Boş aljinat boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Boş aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat).



**Resim 11.** Boş manyetik aljinat boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Boş manyetik aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

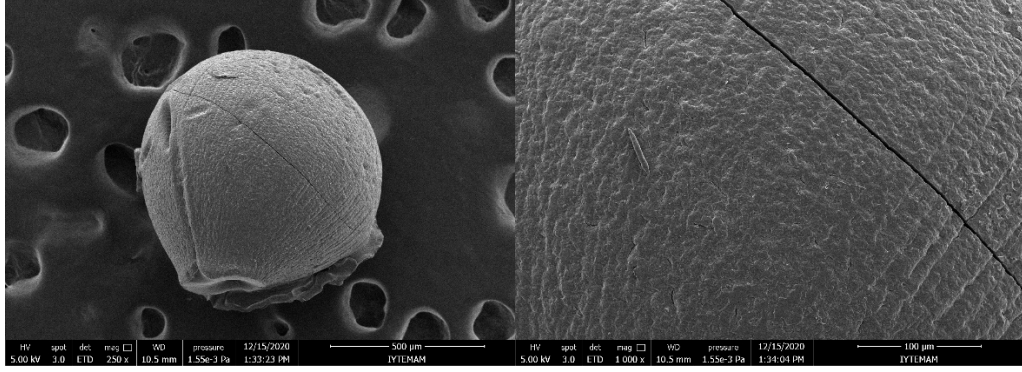


**Resim 12.** Boş aljinat/kitosan boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Boş aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan).

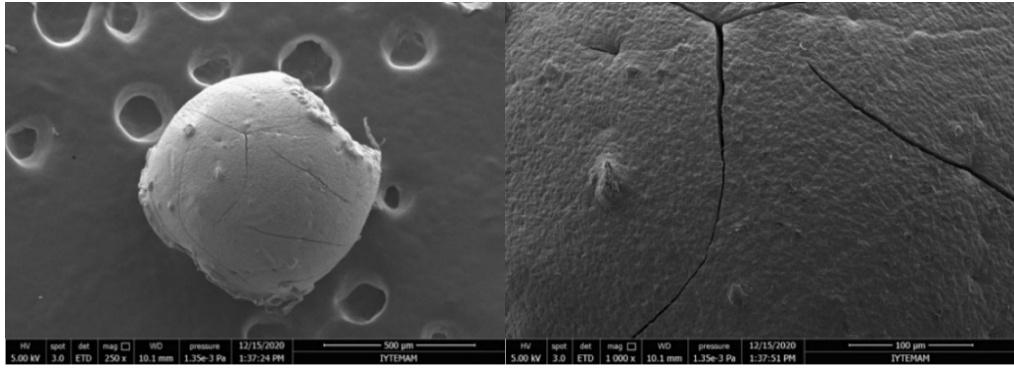


**Resim 13.** Boş manyetik aljinat/kitosan boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Boş manyetik aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

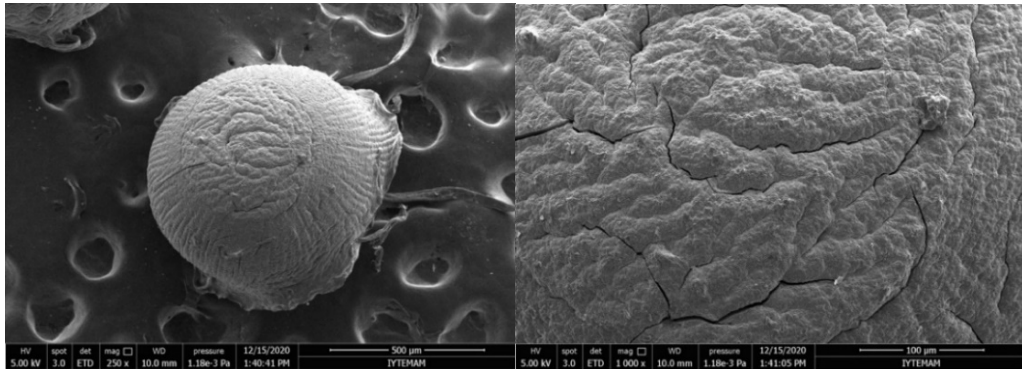




**Resim 14.** HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş aljinat boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Ko-immobilize aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; HRP: 0,4 mg/mL; lipaz: 4 mg/mL).



**Resim 15.** HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş manyetik aljinat boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Ko-immobilize manyetik aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; HRP: 0,4 mg/mL; lipaz: 4 mg/mL).



**Resim 16.** HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş aljinat/kitosan boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Ko-immobilize aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan; HRP: 0,4 mg/mL; lipaz: 4 mg/mL).

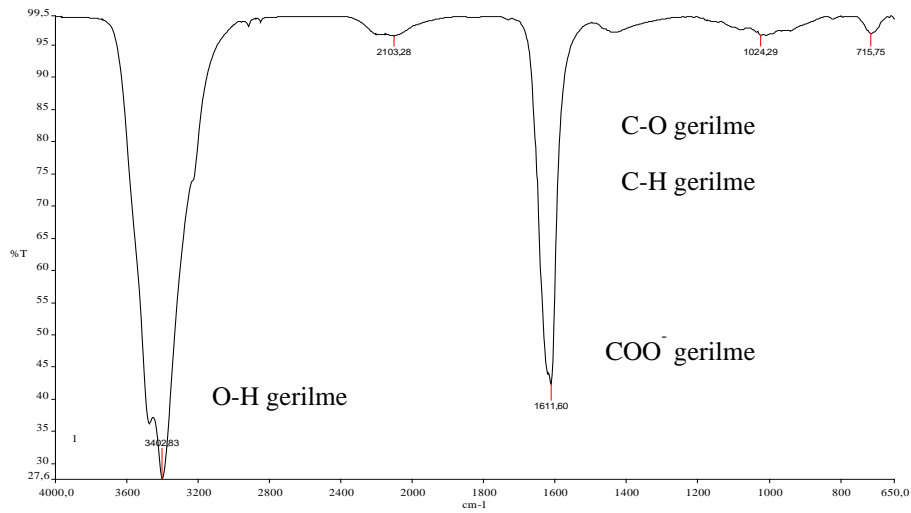


**Resim 17.** HRP ve lipaz ko-immobilize edilmiş manyetik aljinat/kitosan boncukların 250 kat (solda) ve 1000 kat (sağda) büyütülmüş SEM fotoğrafları (Ko-immobilize manyetik aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; HRP: 0,4 mg/mL; lipaz: 4 mg/mL).

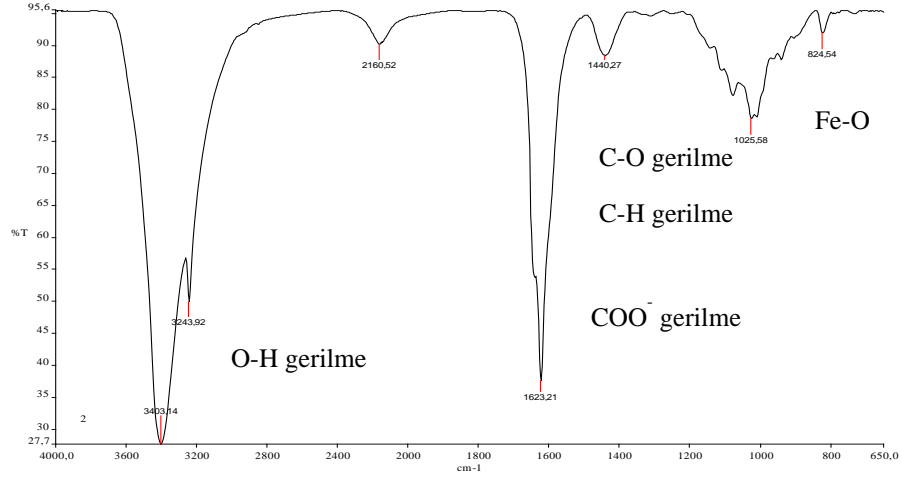
#### 4.2.2. FTIR Spektrumları

FTIR ölçümleri ile boncukların üretiminde kullanılan aljinat, kitosan ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin üretilen boncukların yapısına katılıp katılmadığını göstermek üzere aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncukların spektrumları sırasıyla Şekil 14-17'de sunulmuştur.

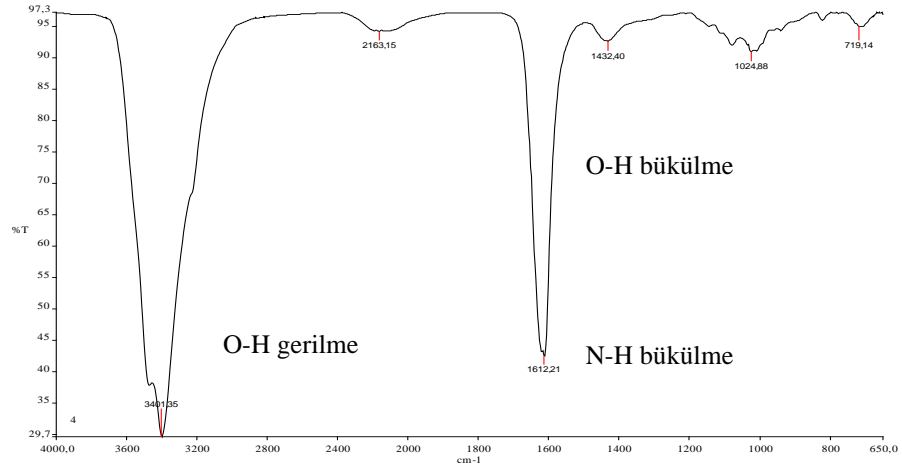
Karşılaştırma yapabilmek için boncukların üretiminde kullanılan aljinat, kitosan ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ün FTIR spektrumları da sırasıyla Şekil 18-20'de verilmiştir.



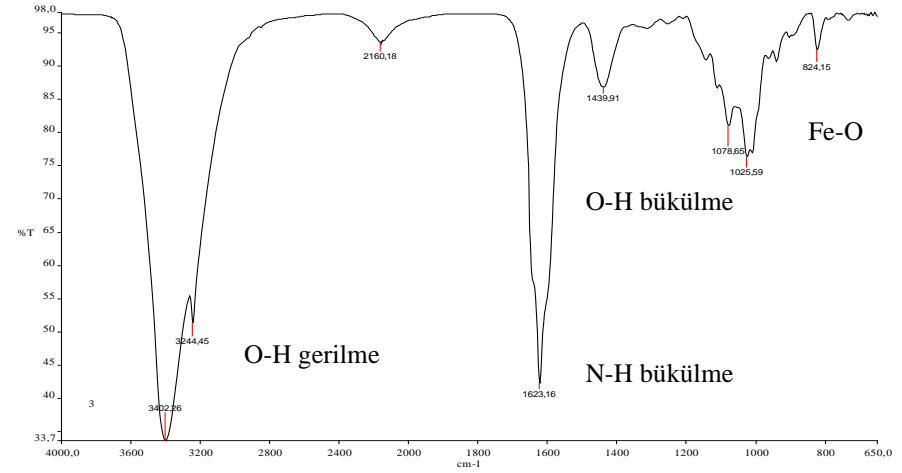
**Şekil 14.** Aljinat boncukların FTIR spektrumu (Aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat).



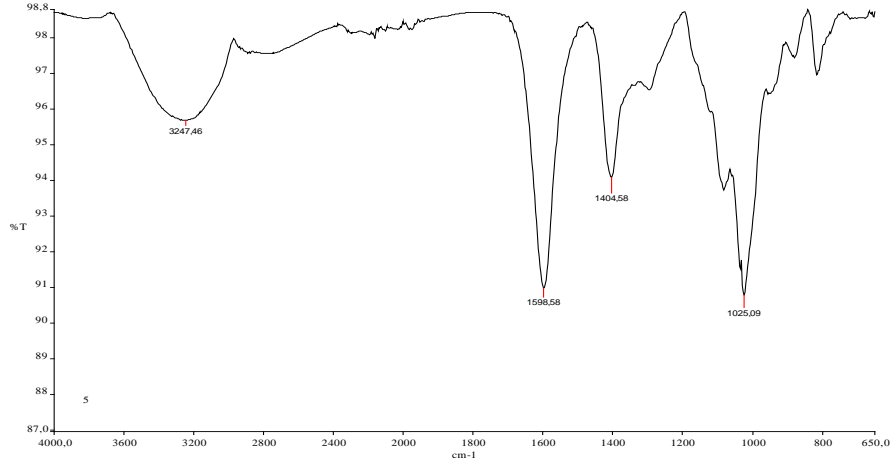
**Şekil 15.** Manyetik aljinat boncukların FTIR spektrumu (Manyetik aljinat boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).



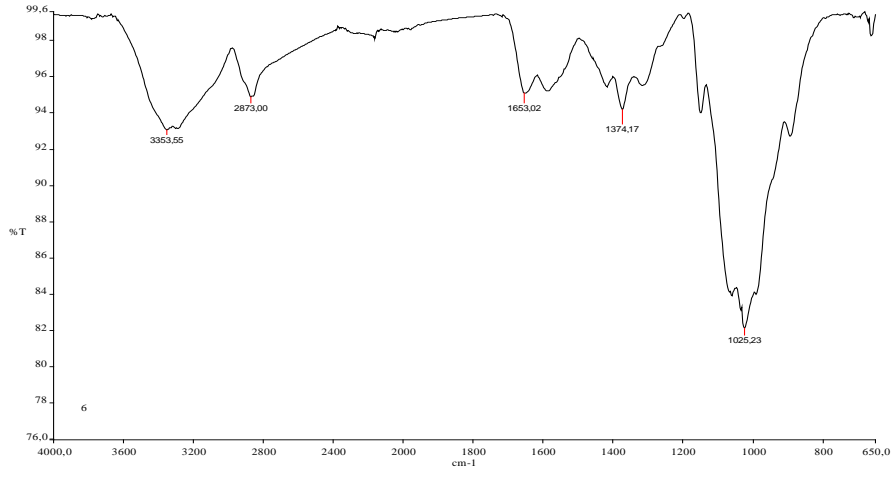
**Şekil 16.** Aljinat/kitosan boncukların FTIR spektrumu (Aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan).



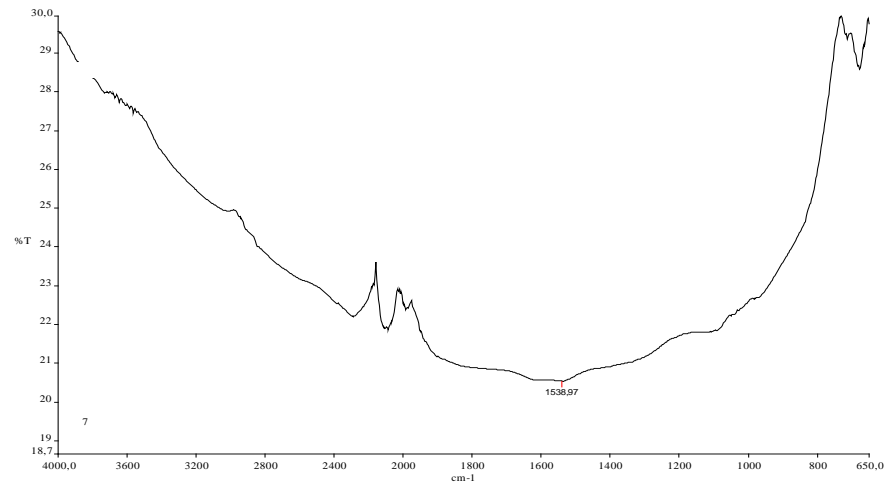
**Şekil 17.** Manyetik aljinat/kitosan boncukların FTIR spektrumu (Manyetik aljinat/kitosan boncuk: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).



Şekil 18. Aljinatın FTIR spektrumu.



Şekil 19. Kitosanın FTIR spektrumu.



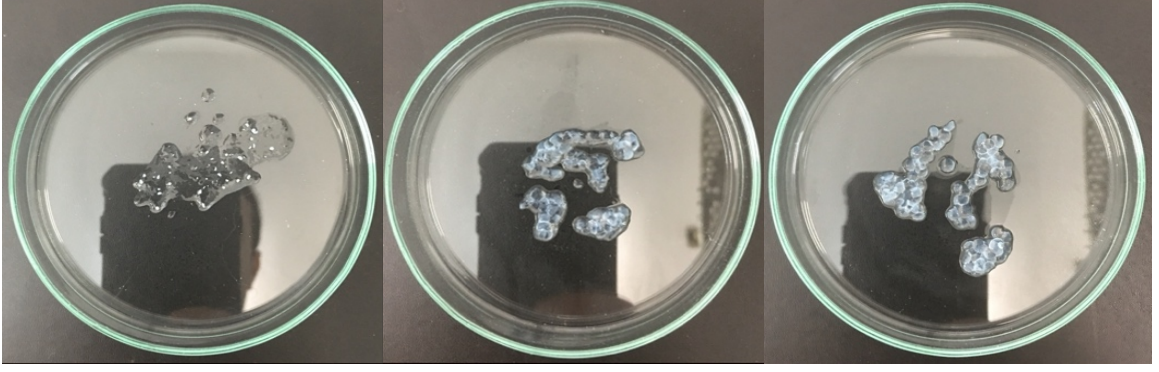
Şekil 20. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ün FTIR spektrumu.

### 4.3. Boncukların Mekanik Kararlılıkları

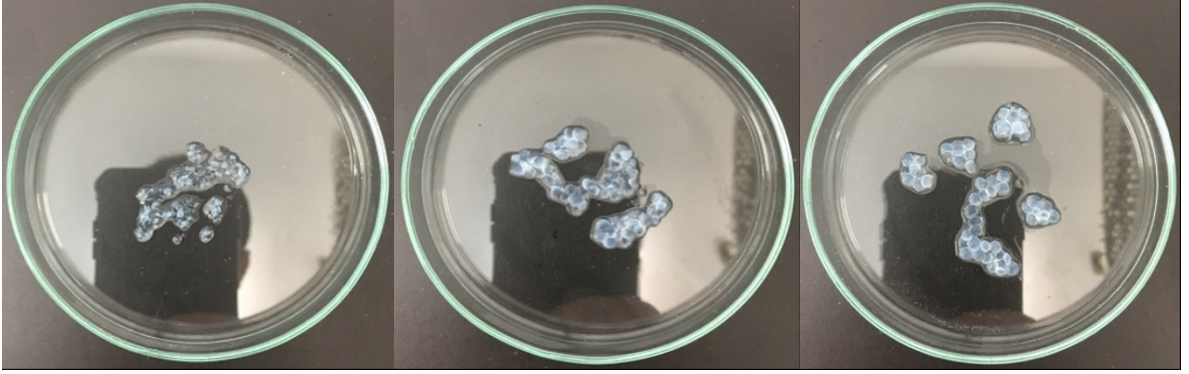
Endüstriyel kullanım için hedeflenen enzimlerin immobilizasyonunda kullanılacak olan boncukların çalkalama gibi basit bir mekanik etkiye karşı direncinin belirlenmesi için gerçekleştirilen mekanik kararlılık denemesi sonucunda elde edilen sağlam boncuk yüzdeleri Çizelge 28’de bu boncukların fotoğrafları da Resim 18-26’da verilmiştir. Örnek 1, 5, 9, 13, 17 ve 21’de boncuk oluşmadığı için Çizelge 28’de yer alamamaktadırlar.

**Çizelge 28.** Farklı bileşen yüzdeleri ile üretilen boncukların mekanik kararlılıkları.

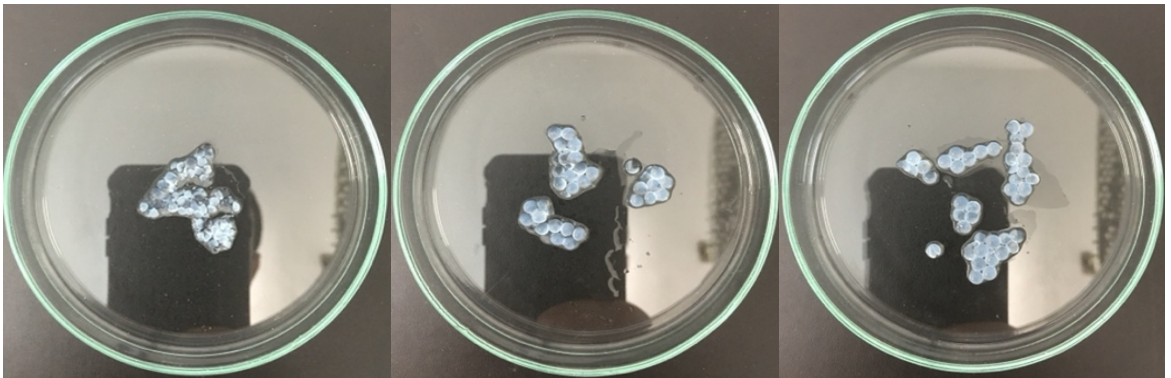
Örnek	CaCl <sub>2</sub> % (w/v)	Aljinat % (w/v)	Kitosan % (w/v)	Sağlam Boncuk %
2	1	1	-	42
3	1	2	-	75
4	1	3	-	81
6	2	1	-	58
7	2	2	-	80
8	2	3	-	86
10	3	1	-	73
11	3	2	-	90
12	3	3	-	95
14	4	1	-	85
15	4	2	-	92
16	4	3	-	95
18	5	1	-	88
19	5	2	-	100
20	5	3	-	100
22	10	1	-	90
23	10	2	-	100
24	10	3	-	100
25	5	2	0,1	100
26	5	2	0,2	100
27	5	2	0,3	100
28	5	2	0,4	100
29	5	2	0,5	100
30	5	2	1	100
31 (Manyetik)	5	2	-	100
32 (Manyetik)	5	2	1	100



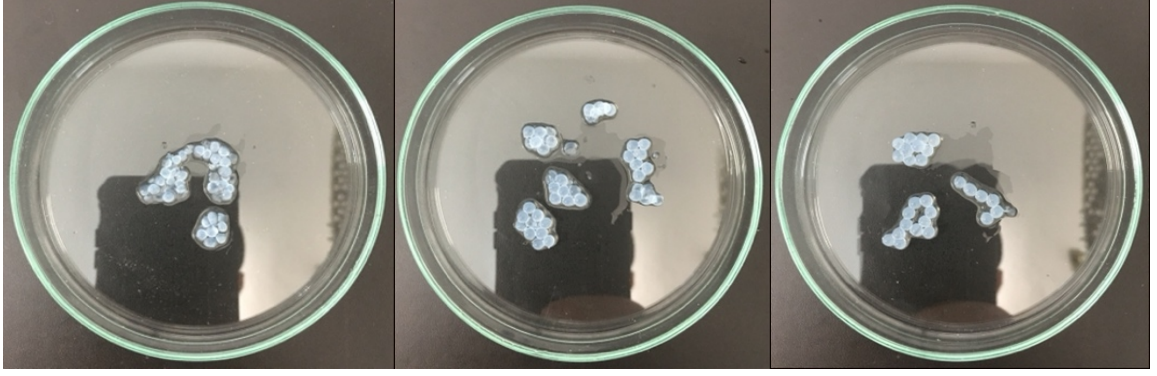
**Resim 18.** Örnek 2 (solda), 3 (ortada) ve 4 (sağda)'ün deneme sonundaki görünüşleri (Örnek 2: %1 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 3: %1 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 4: %1 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



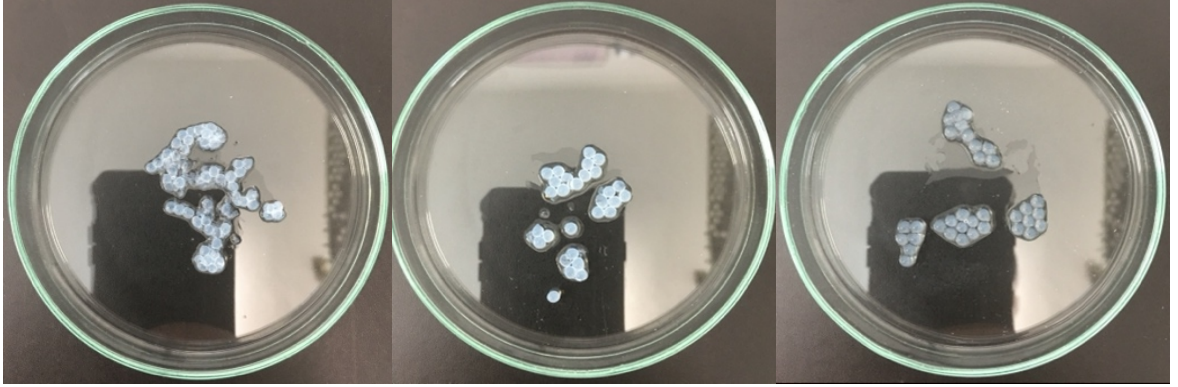
**Resim 19.** Örnek 6 (solda), 7 (ortada) ve 8 (sağda)'in deneme sonundaki görünüşleri (Örnek 6: %2 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 7: %2 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; Örnek 8: %2 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



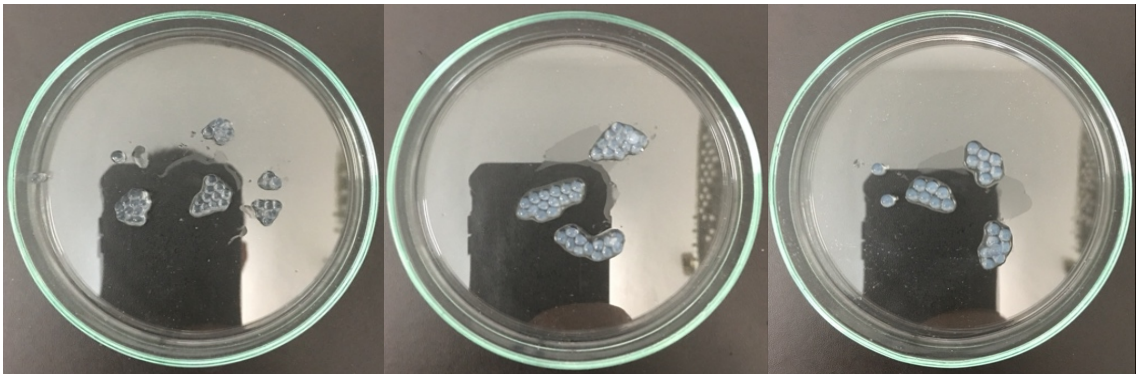
**Resim 20.** Örnek 10 (solda), 11 (ortada) ve 12 (sağda)'nin deneme sonundaki görünüşleri (Örnek 10: %3 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 11: %3 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 12: %3 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



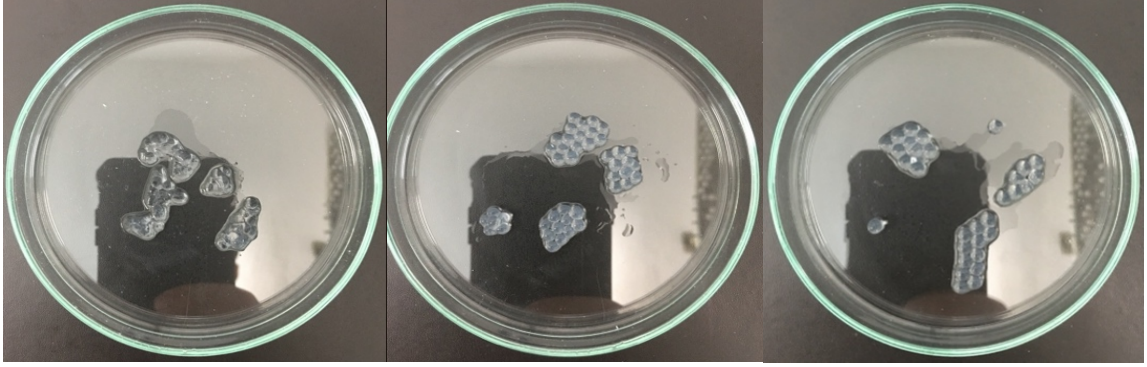
**Resim 21.** Örnek 14 (solda), 15 (ortada) ve 16 (sağda)'nın deneme sonundaki görünümüleri (Örnek 14: %4 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 15: %4 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 16: %4 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



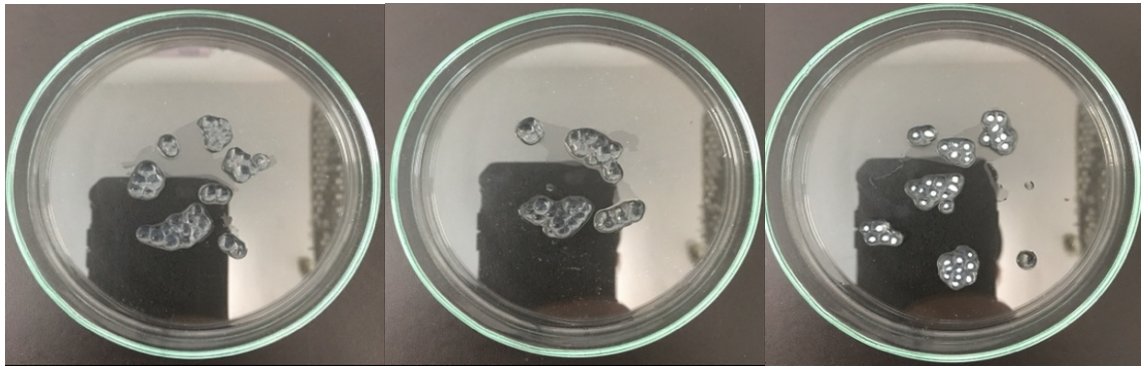
**Resim 22.** Örnek 18 (solda), 19 (ortada) ve 20 (sağda)'nin deneme sonundaki görünümüleri (Örnek 18: %5 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 19: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 20: %5 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



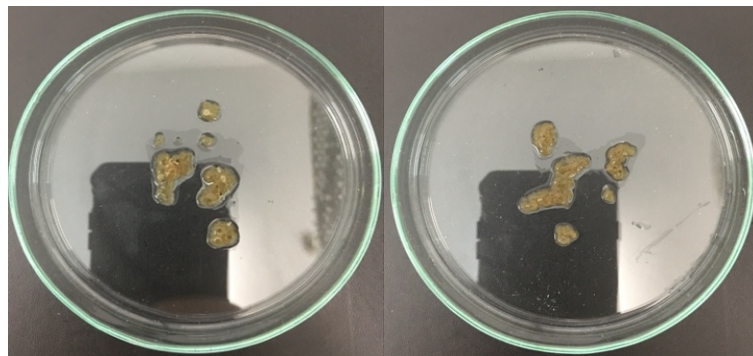
**Resim 23.** Örnek 22 (solda), 23 (ortada) ve 24 (sağda)'ün deneme sonundaki görünümüleri (örnek 22: %10 CaCl<sub>2</sub>, %1 aljinat; örnek 23: %10 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat; örnek 24: %10 CaCl<sub>2</sub>, %3 aljinat).



**Resim 24.** Örnek 25 (solda), 26 (ortada) ve 27 (sağda)'nin deneme sonundaki görünüşleri (Örnek 25: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,1 kitosan; örnek 26: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,2 kitosan; örnek 27: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,3 kitosan).



**Resim 25.** Örnek 28 (solda), 29 (ortada) ve 30 (sağda)'un deneme sonundaki görünüşleri (Örnek 28: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,4 kitosan; örnek 29: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %0,5 kitosan; örnek 30: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1,0 kitosan).

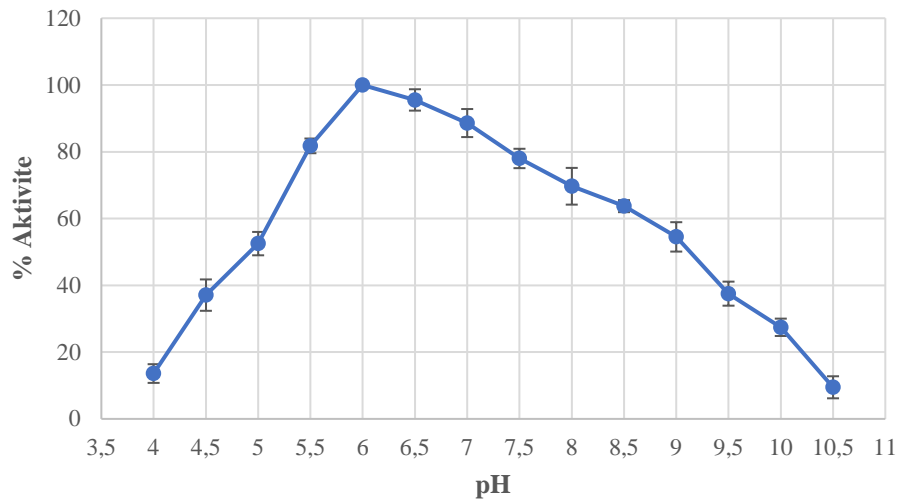


**Resim 26.** Manyetik aljinat (solda) ve manyetik aljinat/kitosan (sağda) boncuklarının deneme sonundaki görünüşleri (Manyetik aljinat: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; manyetik aljinat/kitosan: %5 CaCl<sub>2</sub>, %2 aljinat, %1 kitosan, 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

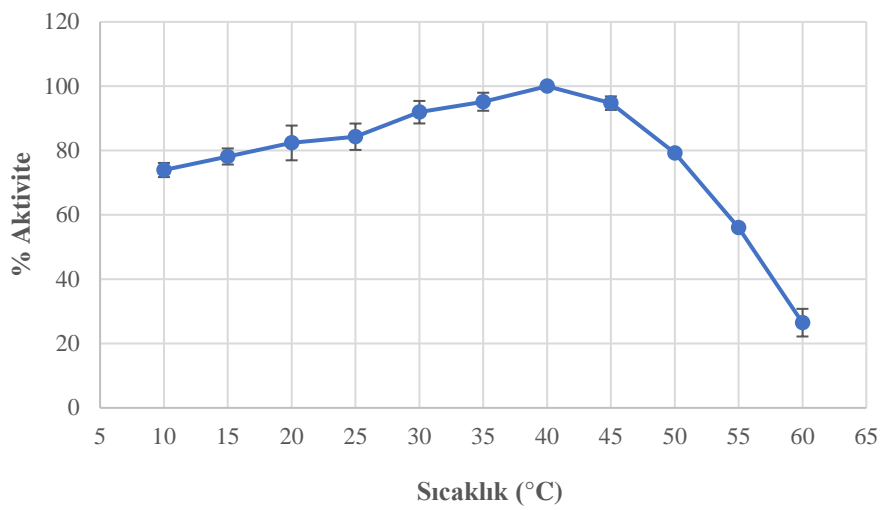


#### 4.4. Serbest HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları

Elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 21 ve Şekil 22’de verilmiştir. Serbest HRP enziminin optimum pH değeri 6.0 bulunmuştur. Serbest HRP enzimi pH 4.0’te %13,5; pH 10.5’ta %9,5; pH 5.5 ile pH 7.5 aralığında %80’in üzerinde aktivite göstermiştir. Serbest HRP enziminin optimum sıcaklık değeri 40 °C bulunmuştur. Serbest HRP enzimi 10 °C’de %74; 60 °C’de %26,5; 10 ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %70 üzerinde aktivite göstermiştir.



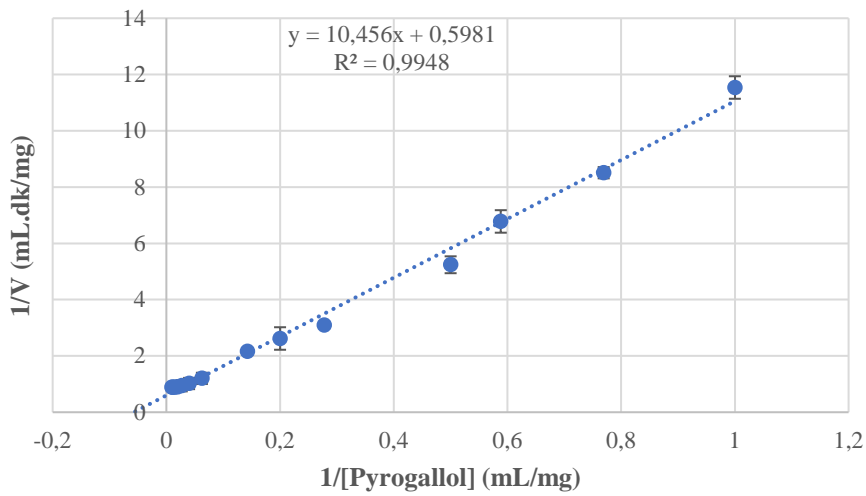
Şekil 21. Serbest HRP enziminin optimum pH grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=25$  °C).



Şekil 22. Serbest HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

#### 4.5. Serbest HRP Enziminin Kinetik Parametreleri

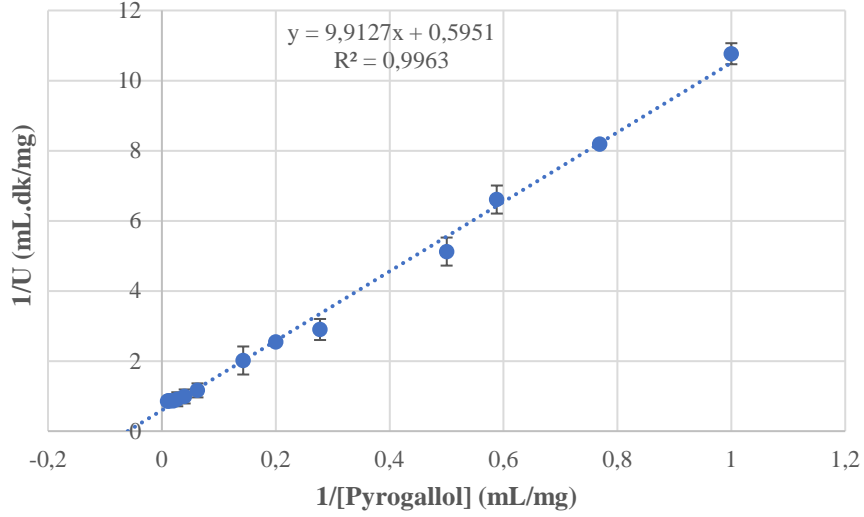
HRP'nin değişen pyrogallol derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 23'te gsterilmiştir. Bu alışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre serbest HRP'nin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,67 \pm 0,08$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $17,48 \pm 0,12$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $172,3 \pm 0,17$  bulunmuştur.



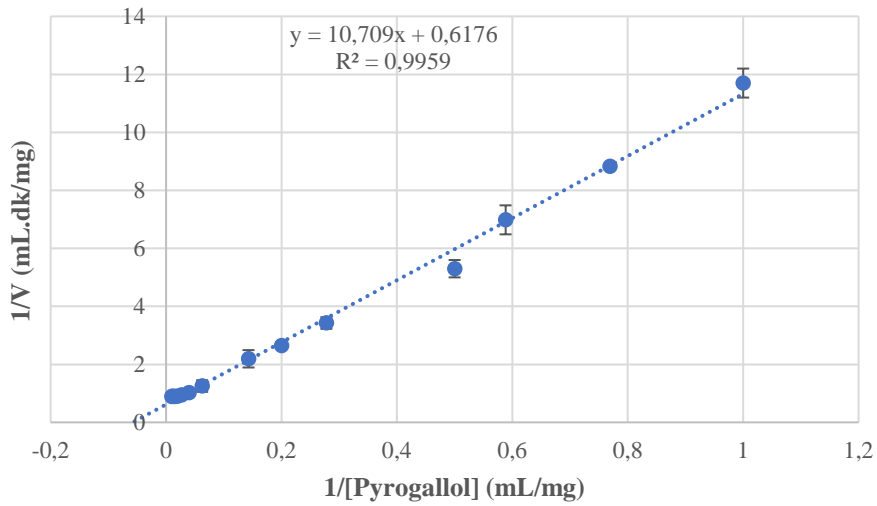
**Şekil 23.** Serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

#### 4.6. Serbest HRP Enziminin Lipaz ve pNPL Varlığında Kinetik Parametreleri

Serbest HRP'nin değişen pyrogallol derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda lipaz varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 24'te; lipaz ve p-nitrofenil laurat (pNPL) varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 25'te gsterilmiştir. Lipaz varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; serbest HRP'nin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,68 \pm 0,07$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $16,66 \pm 0,19$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $173,2 \pm 0,22$  bulunmuştur. Lipaz ve pNPL varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; serbest HRP'nin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,61 \pm 0,11$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $17,36 \pm 0,25$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $166,89 \pm 0,09$  bulunmuştur.



**Şekil 24.** Lipaz varlığında serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Lipaz: 4 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

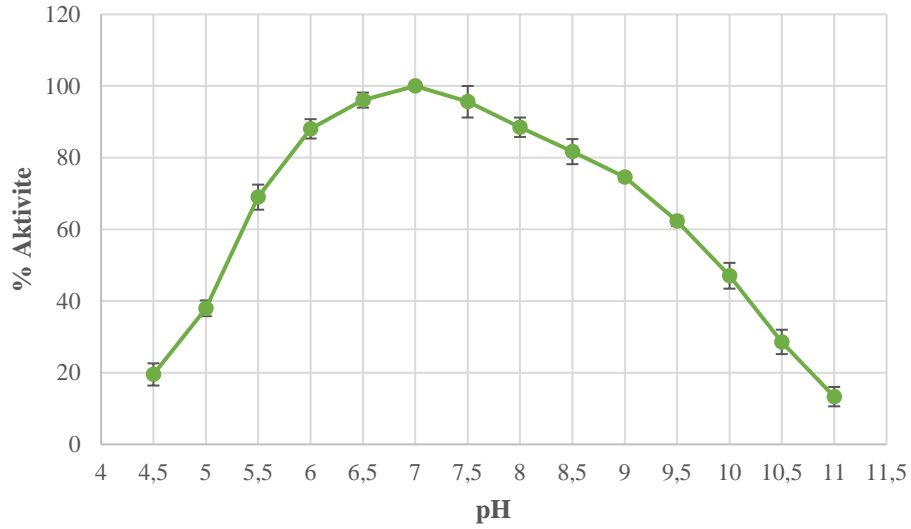


**Şekil 25.** Lipaz ve pNPL varlığında serbest HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Lipaz: 4 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

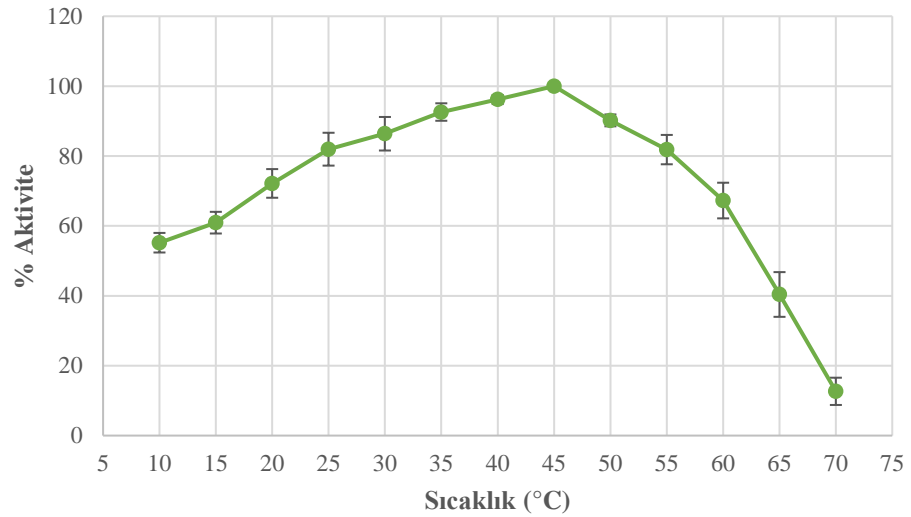
#### 4.7. Serbest Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları

Serbest lipaz optimum pH ve sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 26 ve Şekil 27’de verilmiştir. Serbest lipaz optimum pH değeri 7.0 bulunmuştur. Serbest lipaz enzimi pH 4.5’te %19,5; pH 11’de %13,3; pH 6.0 ile

pH 8.5 aralığında %80'in üzerinde aktivite göstermiştir. Serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık değeri 45 °C bulunmuştur. Serbest lipaz enzimi 10 °C'de %55; 70 °C'de %12,6; 10 ile 55 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %80 üzerinde aktivite göstermiştir.



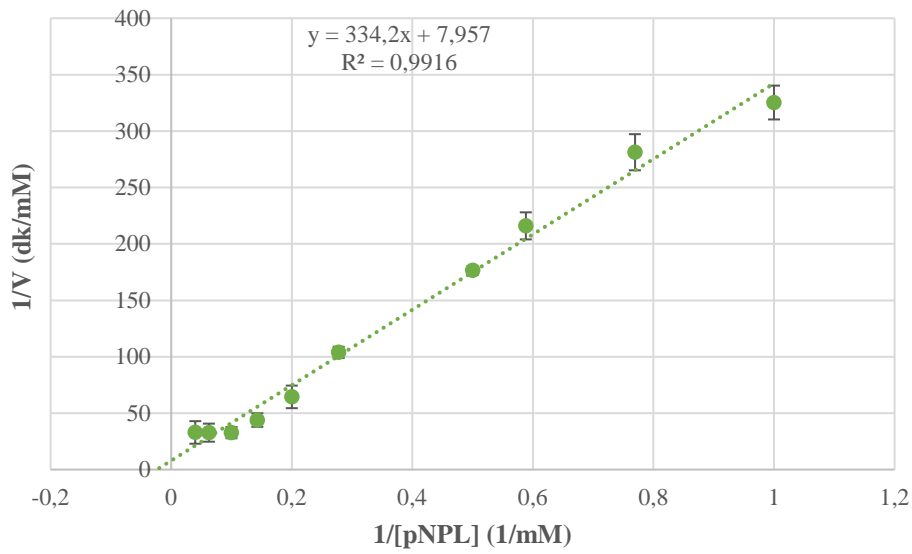
**Şekil 26.** Serbest lipaz enziminin optimum pH grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; T=25 °C).



**Şekil 27.** Serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

#### 4.8. Serbest Lipaz Enziminin Kinetik Parametreleri

Serbest lipazın değişen p-nitrofenil laurat (pNPL) derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 28’de gösterilmiştir. Bu alışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; serbest lipaz  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,12 \pm 0,005$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $42,02 \pm 0,33$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,36 \pm 0,02$  bulunmuştur.

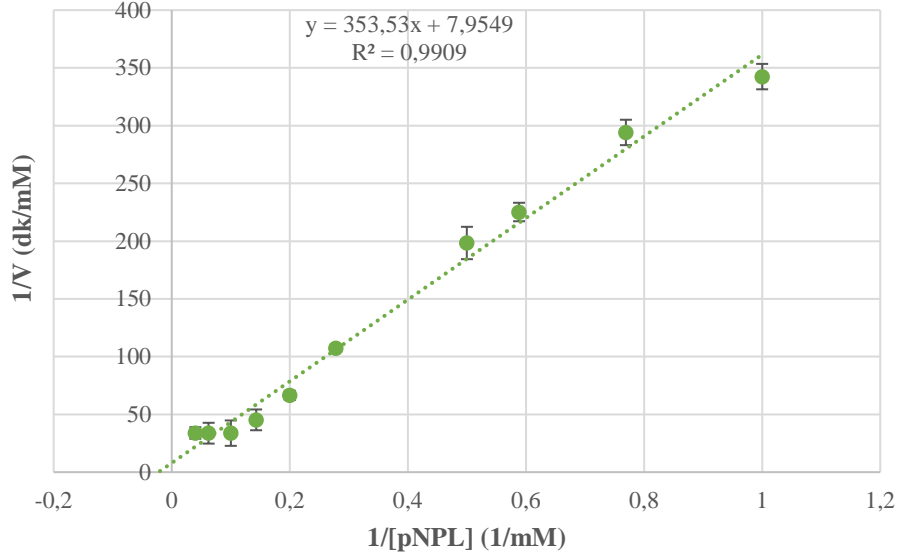


Şekil 28. Serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

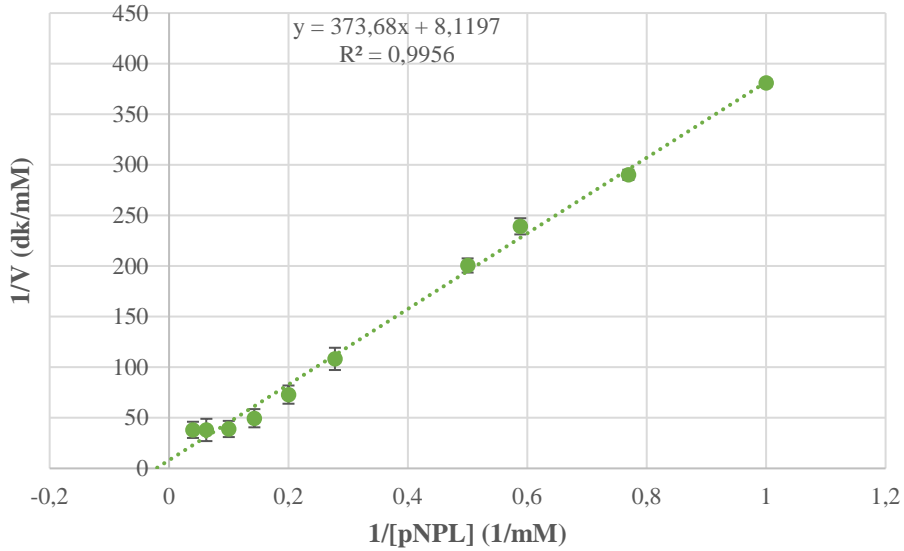
#### 4.9. Serbest Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Varlığında Kinetik Parametreleri

Serbest lipazın farklı pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda HRP varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 29’da; HRP ve pyrogallol varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 30’da verilmiştir. HRP varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; serbest lipazın  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,12 \pm 0,01$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $44,44 \pm 0,16$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,37 \pm 0,12$  bulunmuştur. HRP ve pyrogallol varlığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin

doğru denklemini esas alınarak yapılan hesaplamalara gore; serbest lipaz  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,12 \pm 0,006$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $46,12 \pm 0,29$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,34 \pm 0,08$  bulunmuştur.



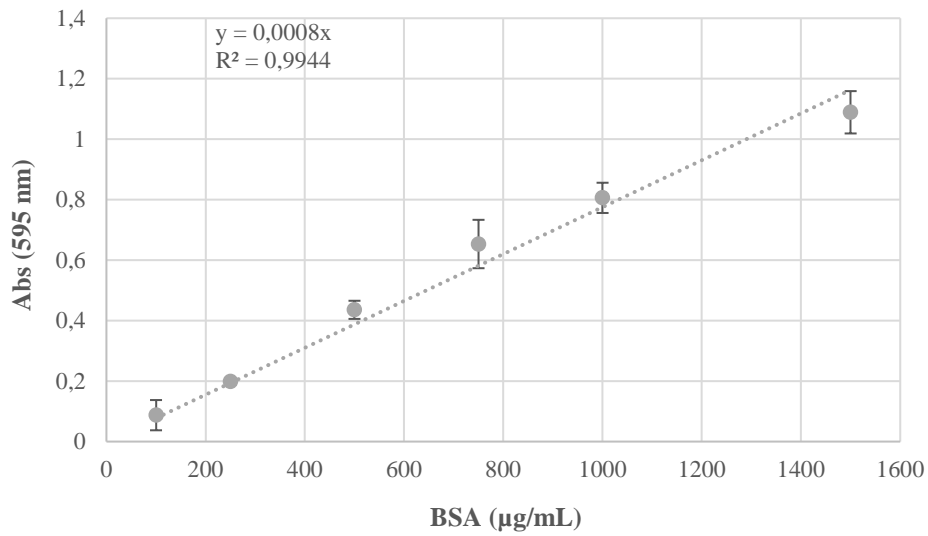
**şekil 29.** HRP varlığında serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; HRP: 0,4 mg/mL; pH: 7,0;  $T=45$  °C).



**şekil 30.** HRP ve pyrogallol varlığında serbest lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; HRP: 0,4 mg/mL; pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

#### 4.10. Sığır Serum Albümin (BSA) Standart Grafiği

Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak 100-1500 µg/mL protein derişim aralığını kapsayacak şekilde çizilen BSA standart grafiği Şekil 31’de sunulmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan enzimlerin spesifik aktivitelerinin hesaplanması ve boncuklara enzim yükleme kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan BSA standart grafiği iki enzim için de uygun tayin aralığında hazırlanmıştır.

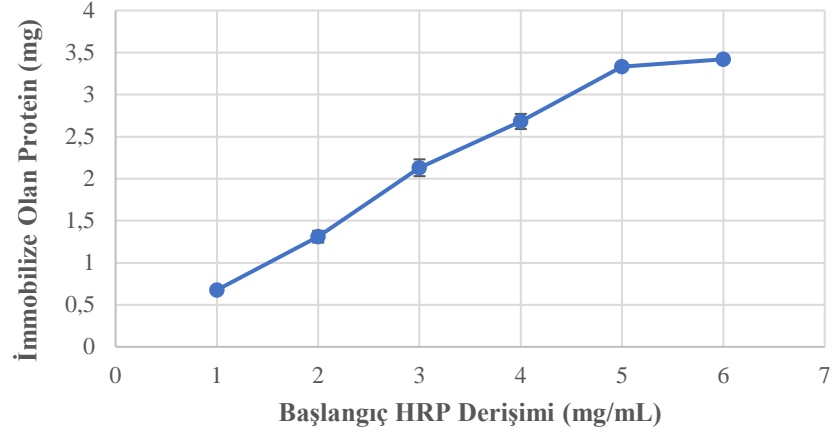


Şekil 31. Sığır serum albümin standart grafiği ( $T=25$  °C).

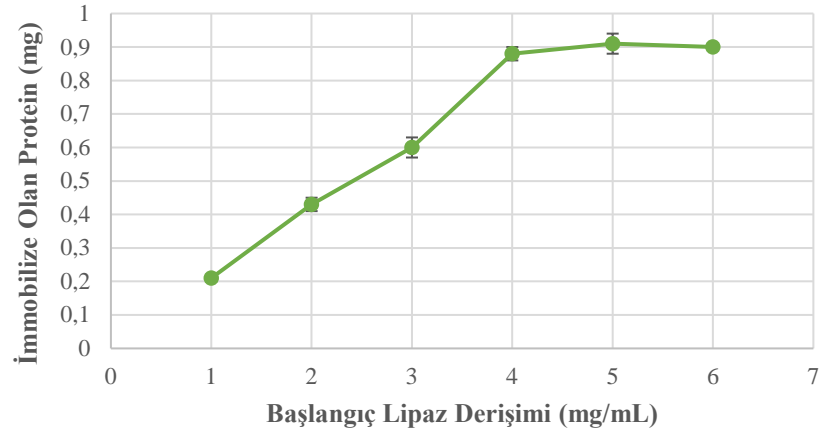
#### 4.11. Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri

##### 4.11.1. Aljinat ve Manyetik Aljinat Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri

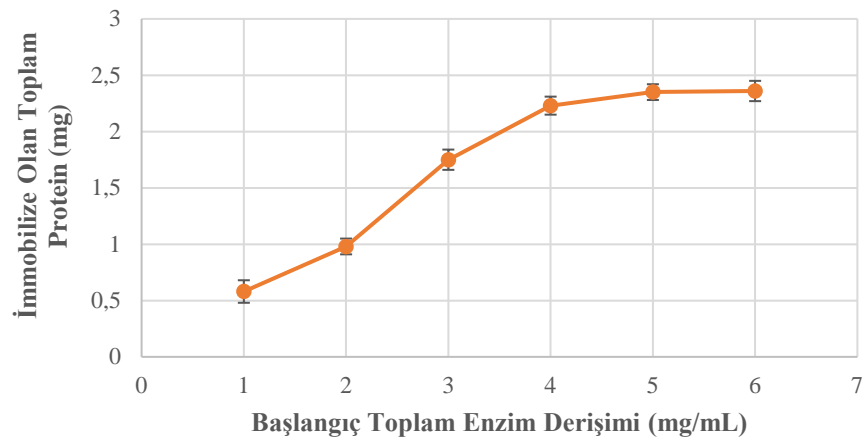
Aljinat boncuklara enzim yükleme kapasitesi tayinleri sonucu elde edilen grafikler Şekil 32-34’te gösterilmiştir. HRP için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç HRP derişiminde 3,42 mg protein ve lipaz için elde edilen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç lipaz derişiminde 0,91 mg protein olarak bulunmuştur. HRP ve lipaz ko-immobilizasyonunda maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç toplam enzim derişiminde 2,36 mg protein olarak bulunmuştur.



Şekil 32. Aljinat boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25$  °C).



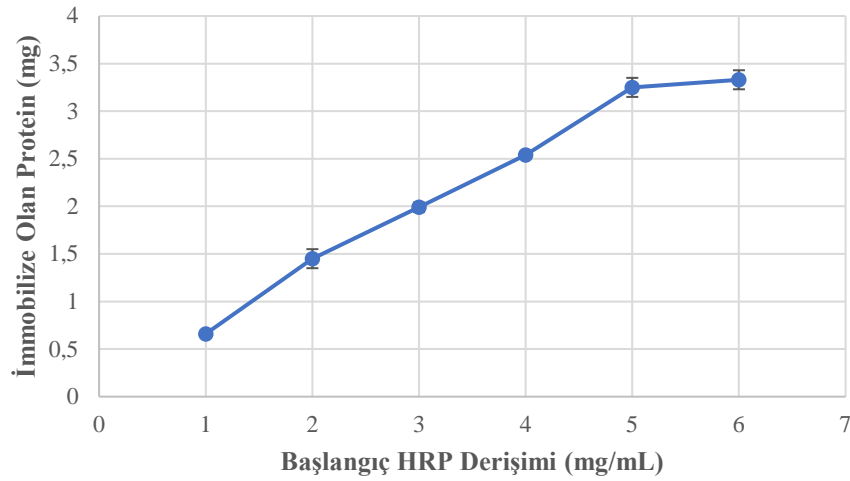
Şekil 33. Aljinat boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25$  °C).



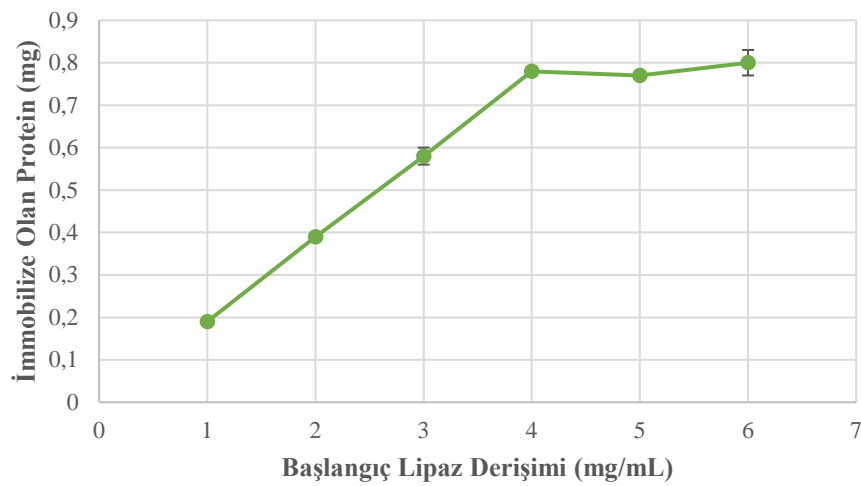
Şekil 34. Aljinat boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25$  °C).



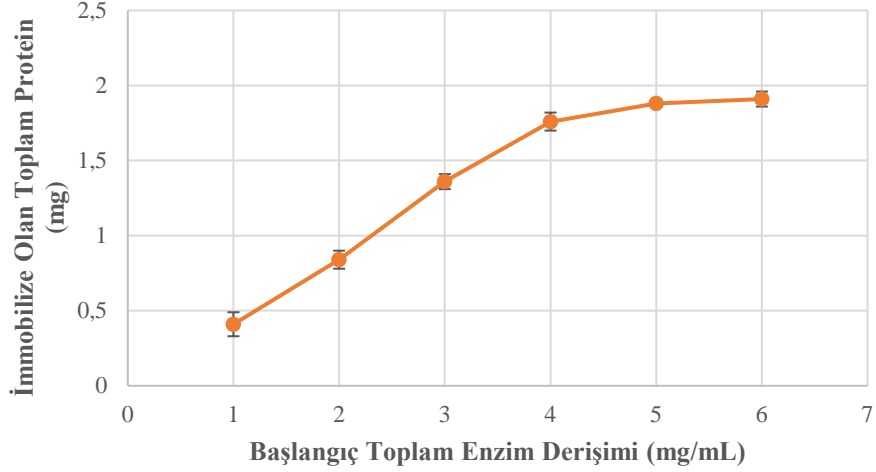
Manyetik aljinat boncuklara enzim yükleme kapasitesi tayinleri sonucu elde edilen grafikler Şekil 35-37’de gösterilmiştir. HRP için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç HRP derişiminde 3,33 mg protein ve lipaz için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL stok lipaz derişiminde 0,8 mg protein olarak bulunmuştur. HRP ve lipaz ko-immobilizasyonunda maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç toplam enzim derişiminde 1,91 mg protein olarak bulunmuştur.



Şekil 35. Manyetik aljinat boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



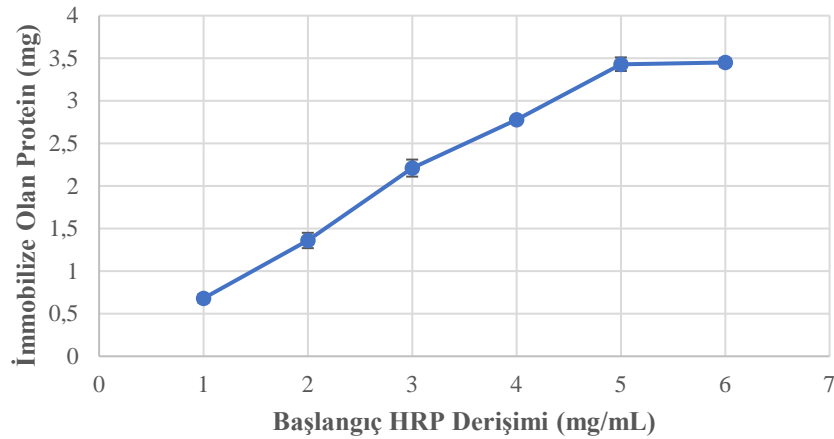
Şekil 36. Manyetik aljinat boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



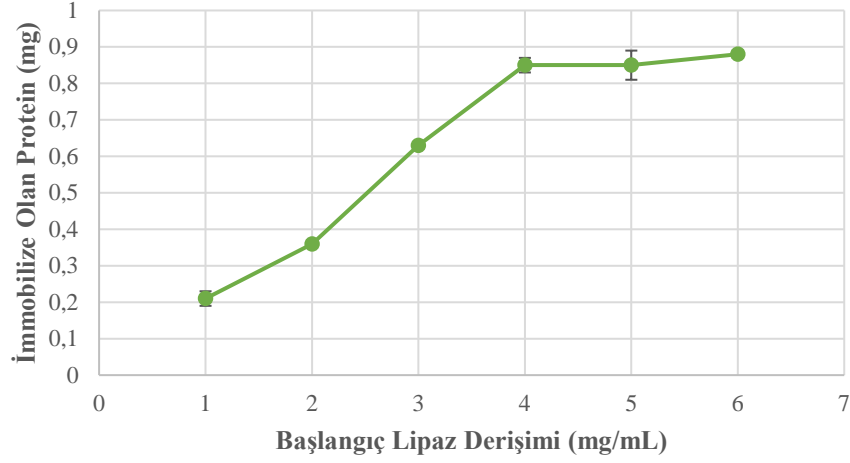
**Şekil 37.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.11.2. Aljinat/Kitosan ve Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuklara Enzim Yükleme Kapasiteleri

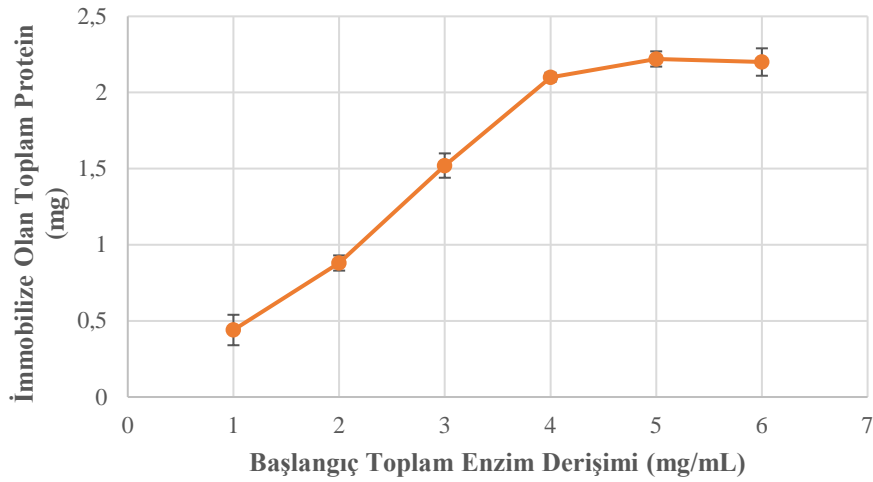
Aljinat/kitosan boncuklara enzim yükleme kapasitesi tayinleri sonucu elde edilen grafikler Şekil 38-40'ta gösterilmiştir. HRP için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç HRP derişiminde 3,45 mg protein ve lipaz için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL stok lipaz derişiminde 0,88 mg protein olarak bulunmuştur. HRP ve lipaz ko-immobilizasyonunda maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç toplam enzim derişiminde 2,22 mg protein olarak bulunmuştur.



**Şekil 38.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

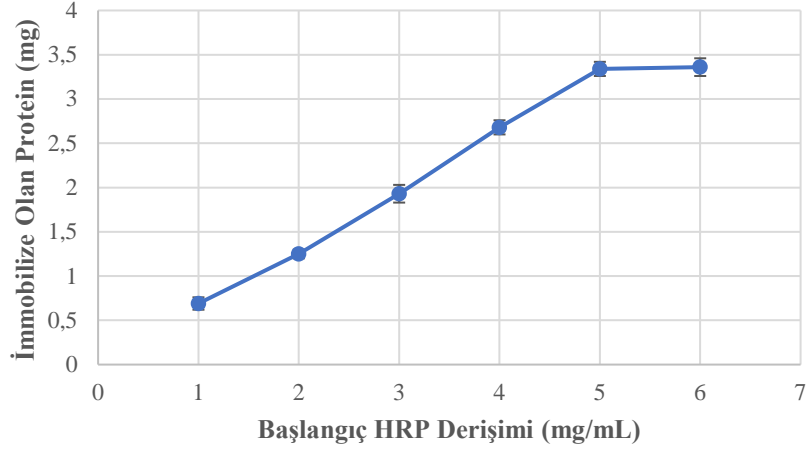


**Şekil 39.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz enzimi yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

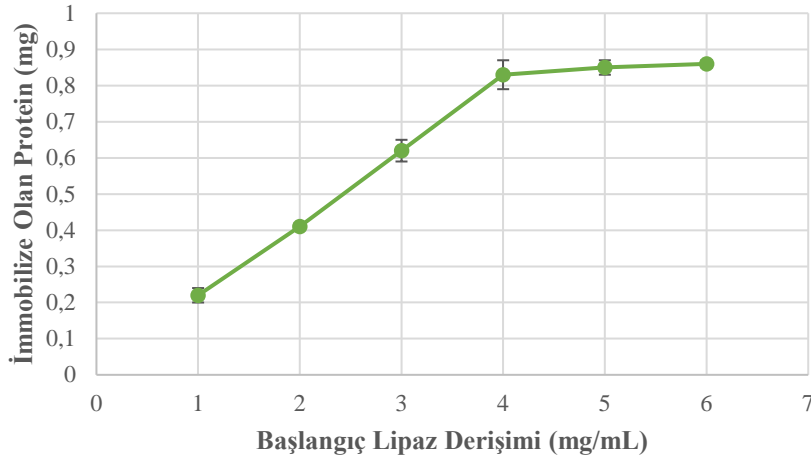


**Şekil 40.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP ve lipaz enzimlerinin birlikte yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

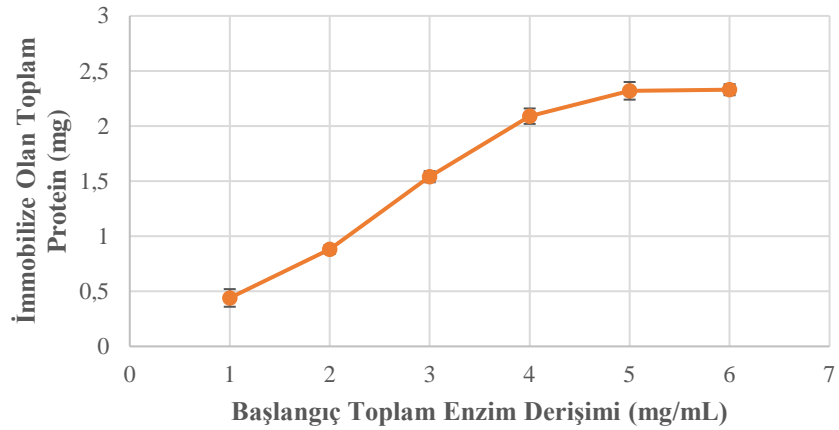
Manyetik aljinat/kitosan boncuklara enzim yükleme kapasitesi tayinleri sonucu elde edilen grafikler Şekil 41-43'te gösterilmiştir. HRP için ölçülen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç HRP derişiminde 3,36 mg protein ve lipaz için elde edilen maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç lipaz derişiminde 0,86 mg protein olarak bulunmuştur. HRP ve lipaz ko-immobilizasyonunda maksimum yükleme kapasitesi 6 mg/mL başlangıç toplam enzim derişiminde 2,33 mg protein olarak bulunmuştur.



**Şekil 41.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



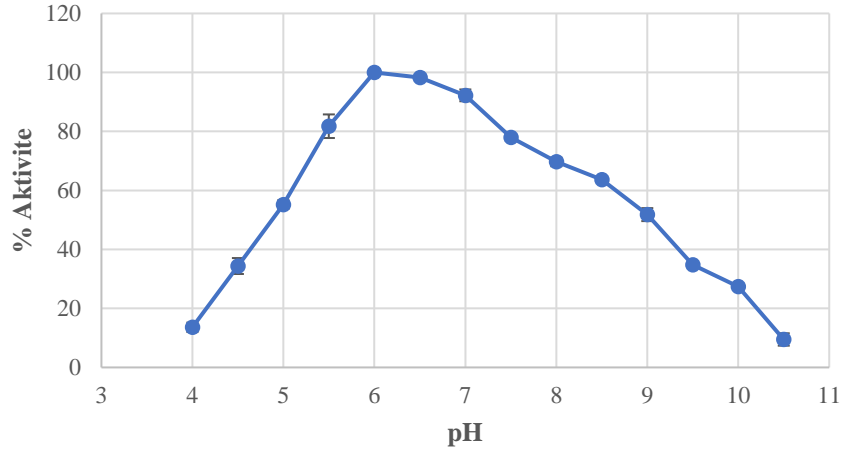
**Şekil 42.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



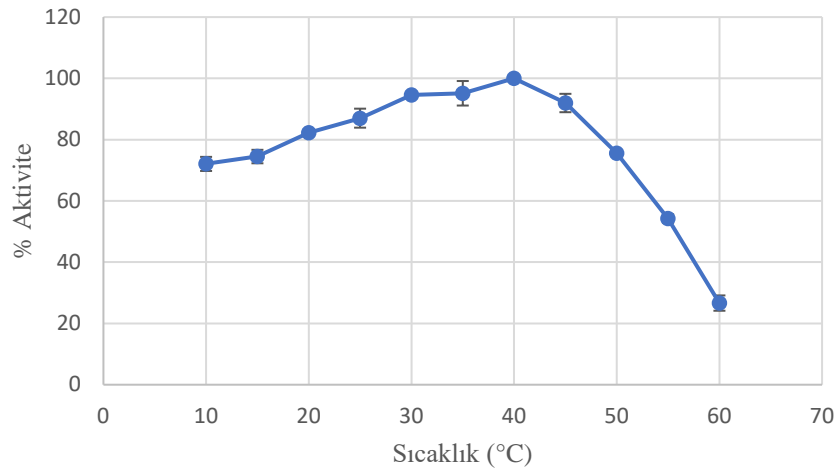
**Şekil 43.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ve lipaz yükleme kapasitesine enzim derişiminin etkisi ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.12. İmmobilize HRP Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları

Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 44 ve Şekil 45'te verilmiştir. Aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6,0 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.0'te %13,6; pH 10.5'ta %9,5; pH 5.5-7.5 aralığında %80'in üzerinde aktivite göstermiştir. Aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 40 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C'de %72; 60 °C'de %26,6; 10 ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %70 üzerinde aktivite göstermiştir.

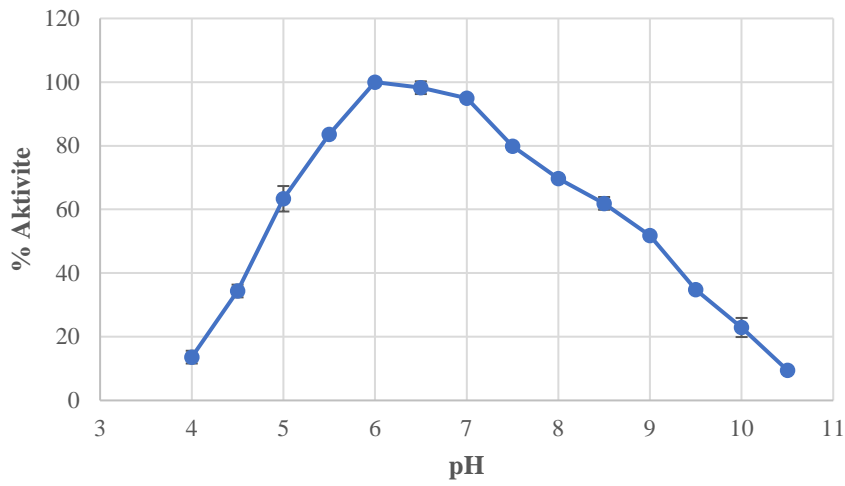


**Şekil 44.** Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=25$  °C).

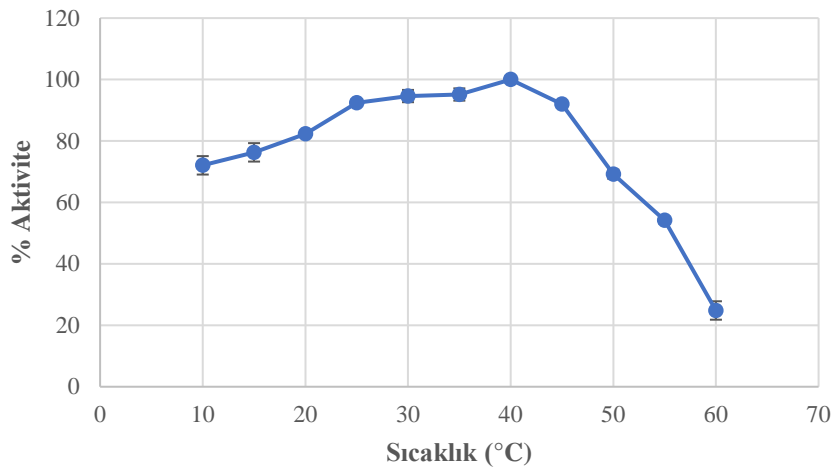


**Şekil 45.** Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 46 ve Şekil 47’de verilmiştir. Manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6,0 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.0’te %13,6; pH 10.5’te %9,5; pH 5.5-7.5 aralığında %80’in üzerinde aktivite göstermiştir. Aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 40 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C’de %72; 60 °C’de %24,8; 10 ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %70 üzerinde aktivite göstermiştir.

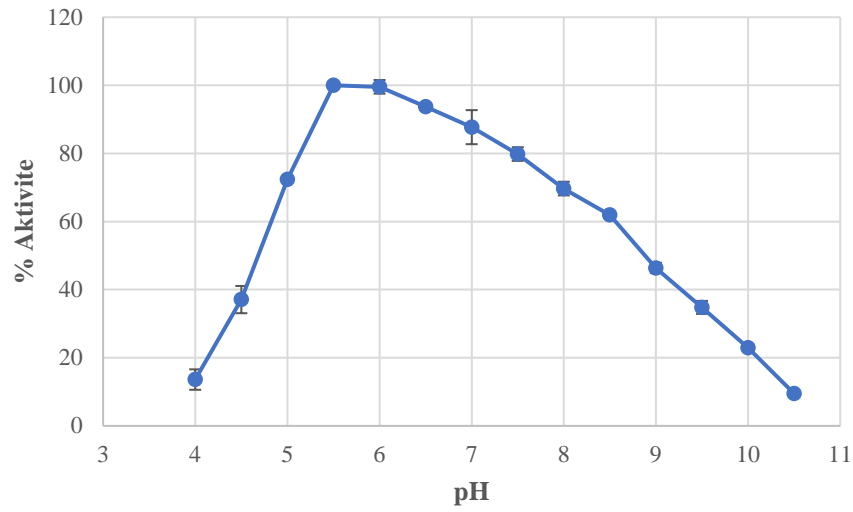


**Şekil 46.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=25$  °C).

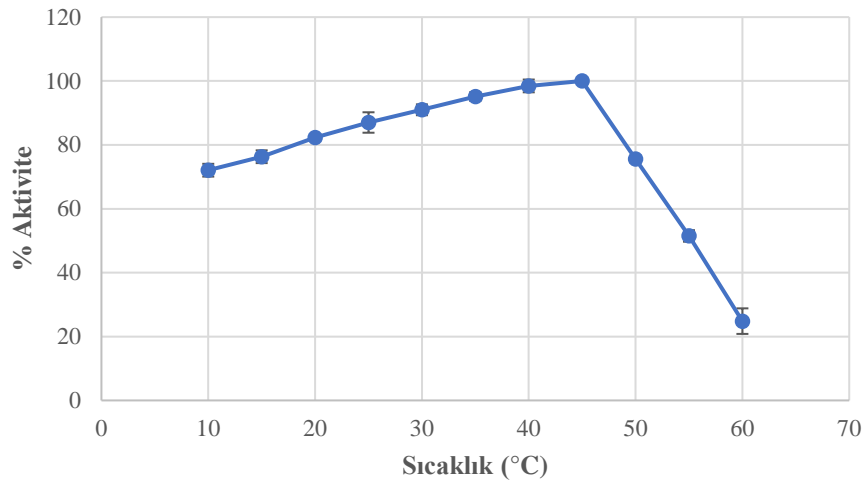


**Şekil 47.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 48 ve Şekil 49'da verilmiştir. Aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 5.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.0'te %13,6; pH 10.5'ta %9,5; pH 5.0-8.0 aralığında %70'in üzerinde aktivite göstermiştir. Aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 45 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C'de %72; 60 °C'de %24,8; 10 ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %70 üzerinde aktivite göstermiştir.

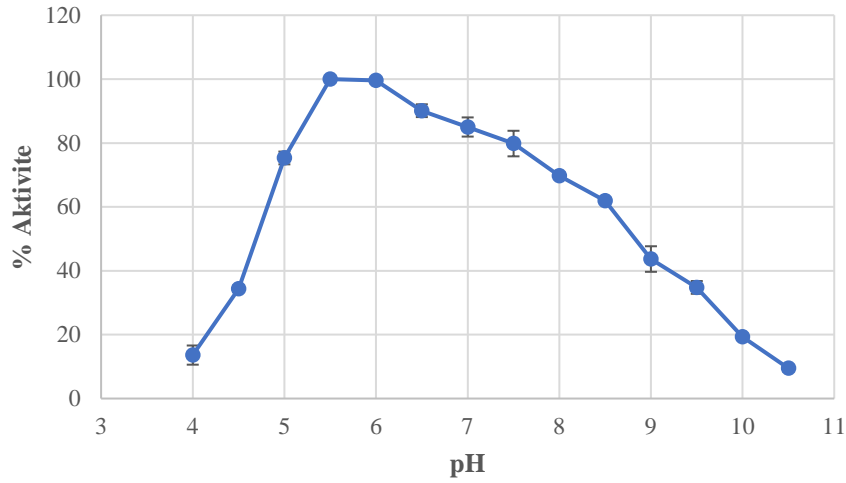


**Şekil 48.** Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=25$  °C).

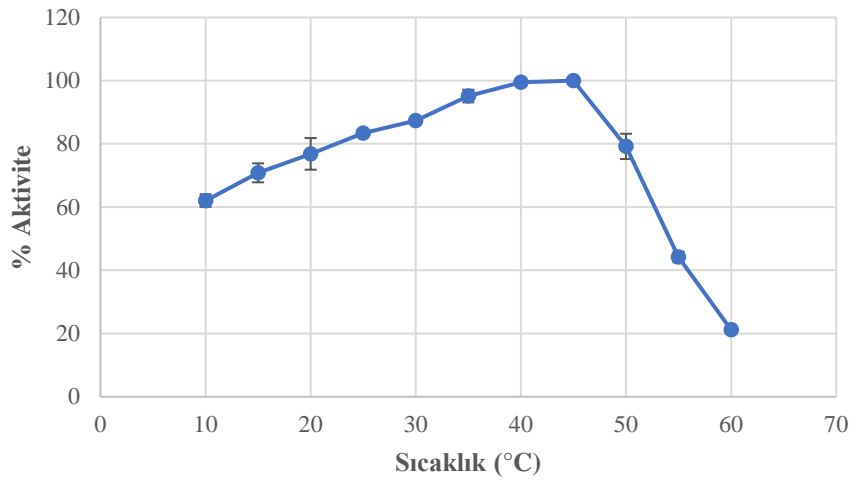


**Şekil 49.** Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 50 ve Şekil 51’de verilmiştir. Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 5.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.0’te %13,6; pH 10.5’ta %9,5; pH 5.0-8.0 aralığında %70’in üzerinde aktivite göstermiştir. Manyetik aljinatkitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 45 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C’de %62; 60 °C’de %21,2; 10 ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %60 üzerinde aktivite göstermiştir.



**Şekil 50.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=25$  °C).



**Şekil 51.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin optimum sıcaklık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).



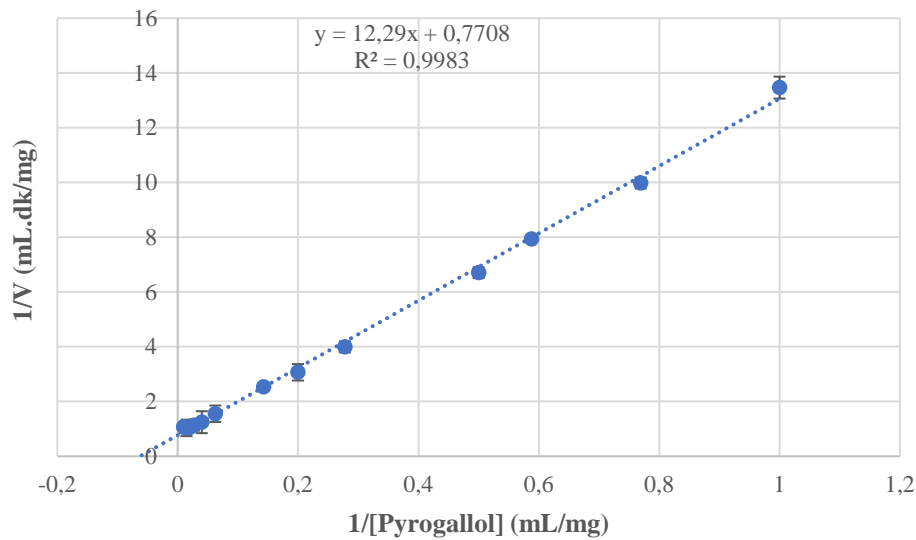
Sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için immobilize ve serbest HRP enzimlerinin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri Çizelge 29’da verilmiştir.

**Çizelge 29.** Immobilize ve serbest HRP enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri.

HRP	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Serbest	6.0	40
Aljinat Boncuk	6.0	40
Manyetik Aljinat Boncuk	6.0	40
Aljinat/Kitosan Boncuk	5.5	45
Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuk	5.5	45

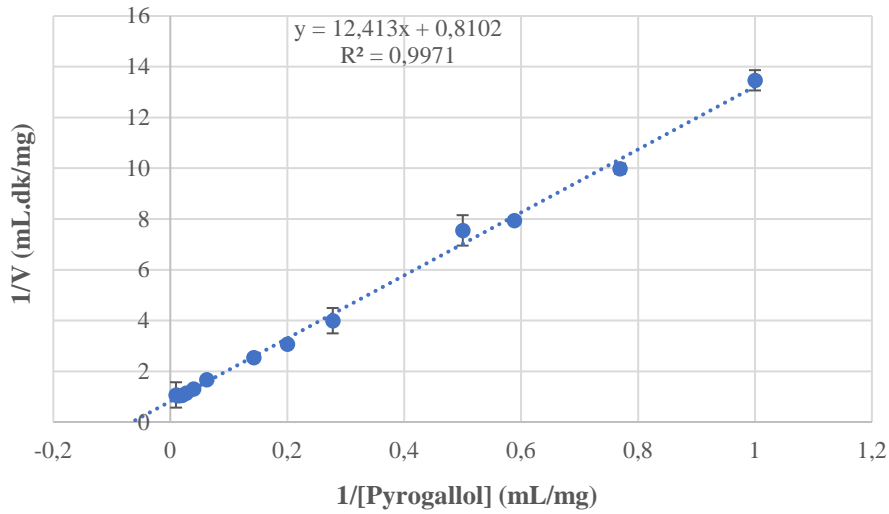
#### 4.13. Immobilize HRP Enziminin Kinetik Parametreleri

Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 52’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,29 \pm 0,12$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $25,94 \pm 0,61$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $133,74 \pm 1,51$  bulunmuştur.



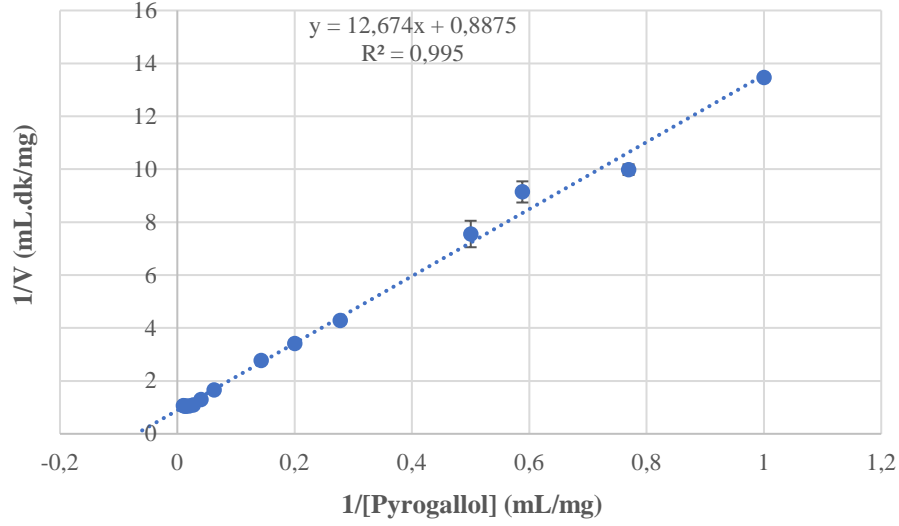
**Şekil 52.** Aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 53'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,23 \pm 0,08$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $25,38 \pm 0,84$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $127,16 \pm 1,94$  bulunmuştur.



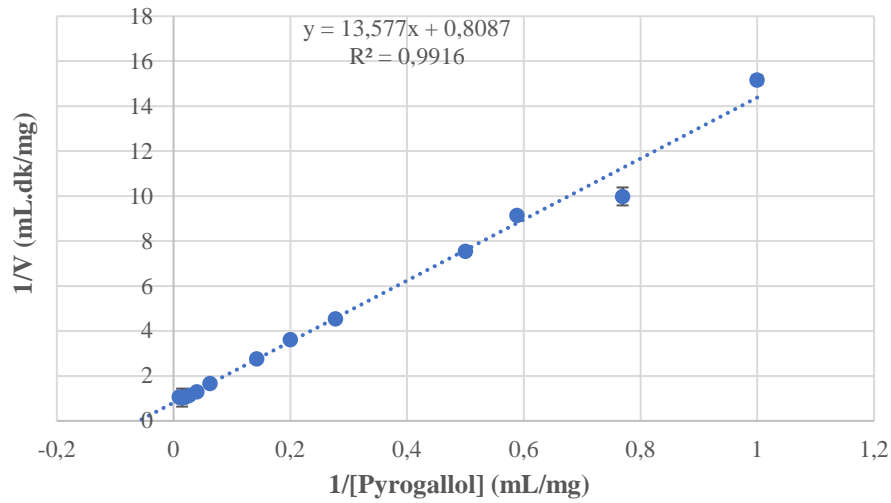
**Şekil 53.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 54'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,13 \pm 0,17$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $34,28 \pm 1,21$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $116,16 \pm 1,52$  bulunmuştur.



**Şekil 54.** Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

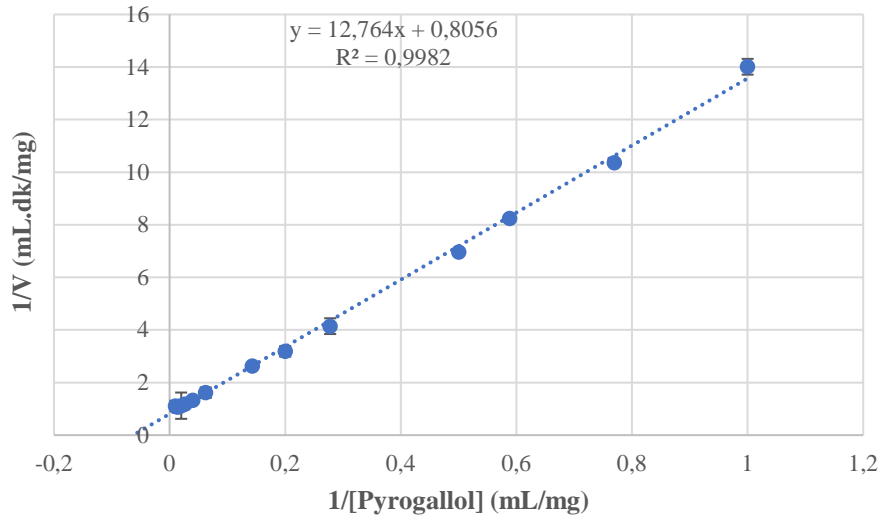
Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 55'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,03 \pm 0,22$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $36,94 \pm 0,98$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $127,33 \pm 1,46$  bulunmuştur.



**Şekil 55.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

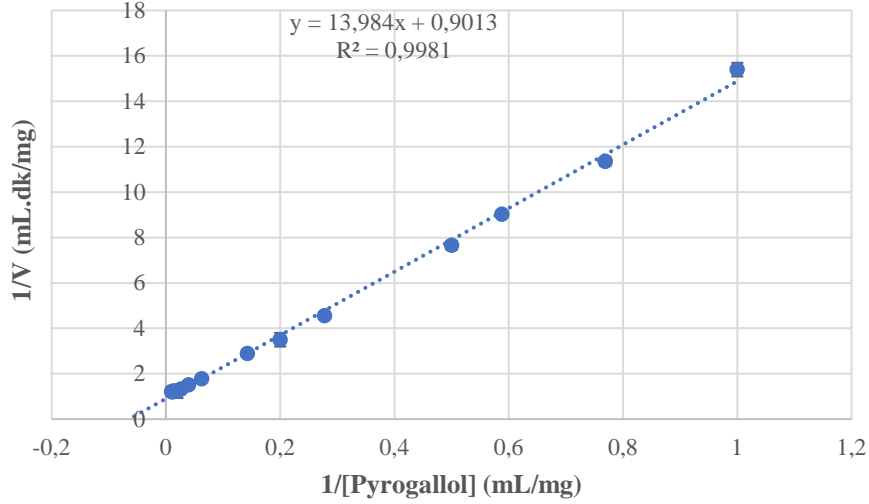
#### 4.14. Ko-immobilize HRP Enziminin Lipaz ve pNPL Varlığında Kinetik Parametreleri

Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 56'da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,24 \pm 0,3$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $25,84 \pm 0,74$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $127,97 \pm 2,21$  bulunmuştur.



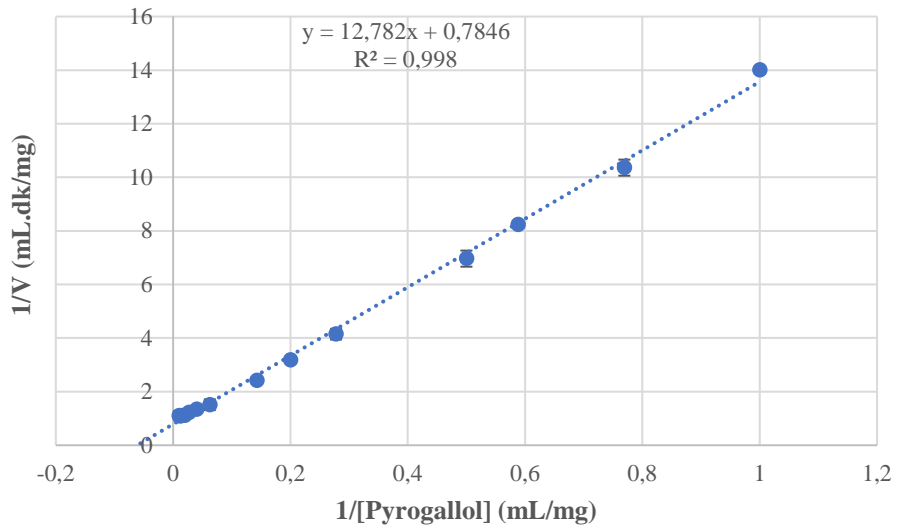
Şekil 56. Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 57'de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,31 \pm 0,19$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $25,52 \pm 1,22$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $114,36 \pm 2,57$  bulunmuştur.



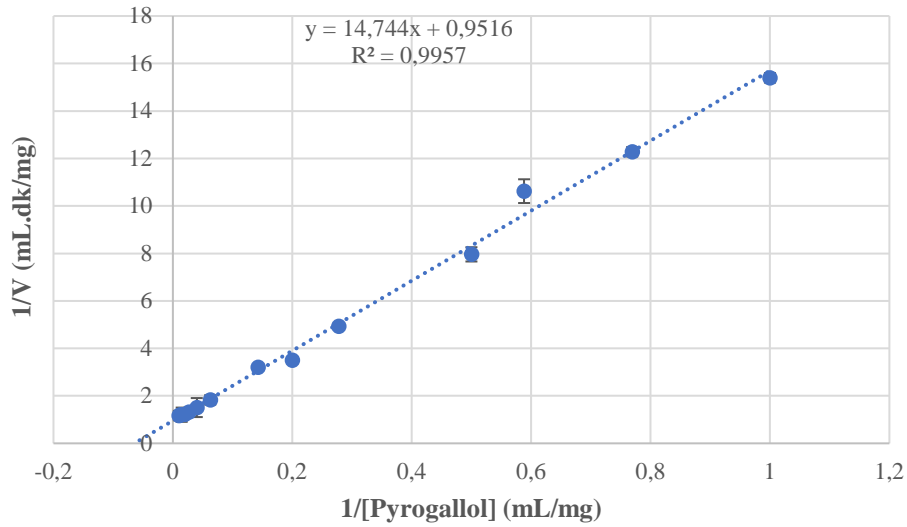
**Şekil 57.** Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 58’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,27 \pm 0,09$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $26,39 \pm 0,91$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $131,29 \pm 1,77$  bulunmuştur.



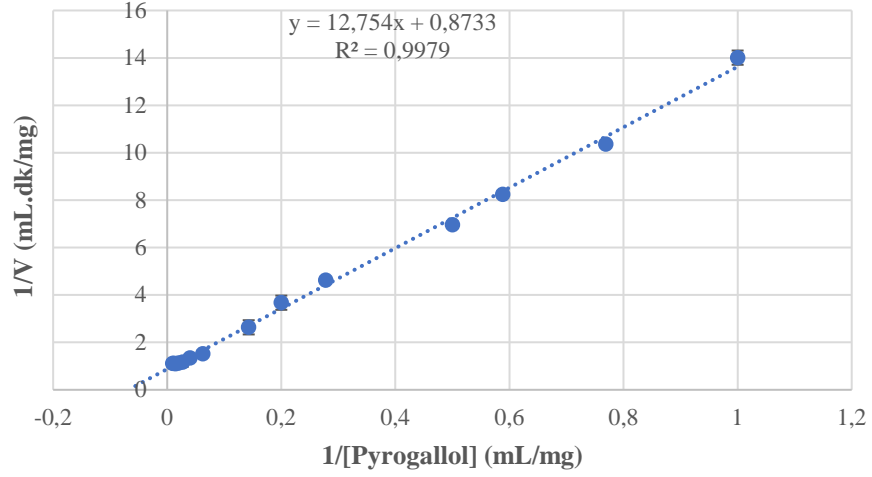
**Şekil 58.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 59'da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,35 \pm 0,11$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $25,62 \pm 1,22$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $108,22 \pm 1,63$  bulunmuştur.



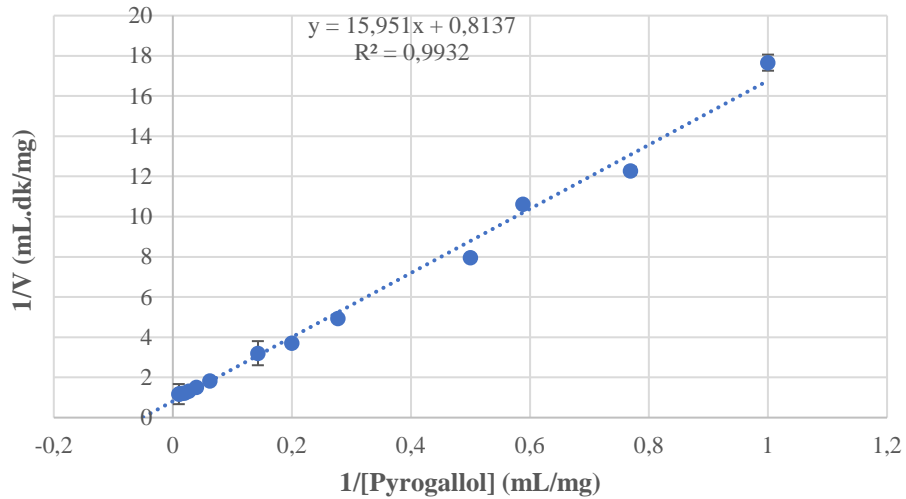
**Şekil 59.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 60'ta gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,14 \pm 0,21$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $34,71 \pm 1,36$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $117,95 \pm 1,1$  bulunmuştur.



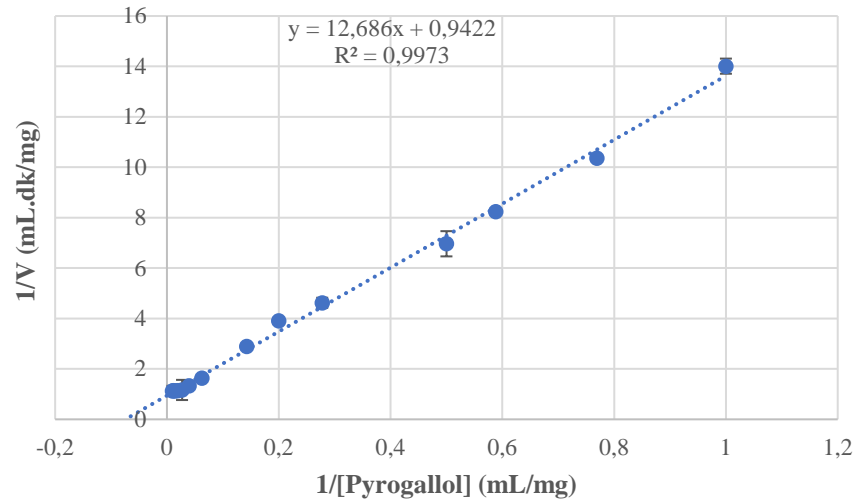
**Şekil 60.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 61'de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL/dk) değeri  $1,13 \pm 0,15$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $32,61 \pm 1,14$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $126,69 \pm 0,96$  bulunmuştur.



**Şekil 61.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 62’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/ mL/ dk) değeri  $1,06 \pm 0,31$ ;  $K_m$  (mg/ mL) değeri  $33,51 \pm 1,25$ ; spesifik aktivitesi (U/ mg)  $109,37 \pm 1,47$  bulunmuştur.

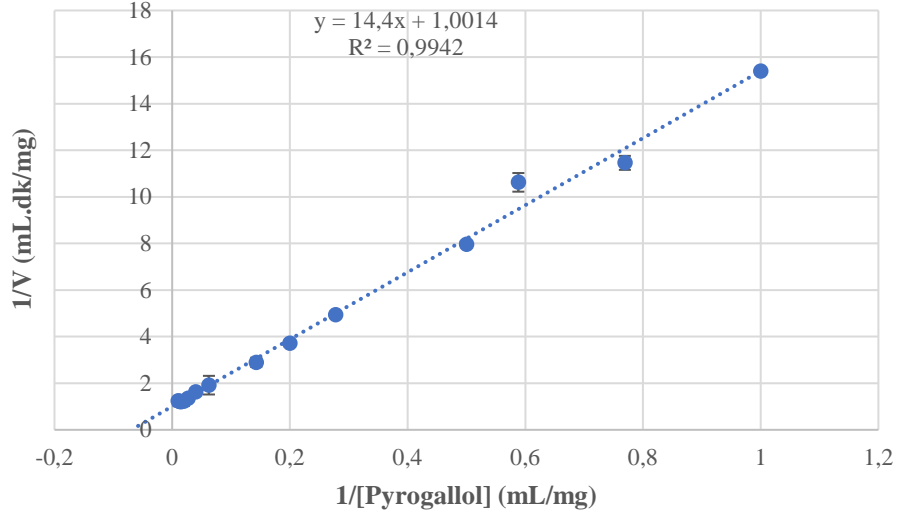


**Şekil 62.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40$  °C).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında değişen pyrogallol derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 63’te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize HRP enziminin  $V_{max}$  (mg/mL dk) değeri  $0,99 \pm 0,1$ ;  $K_m$  (mg/mL) değeri  $34,49 \pm 1,42$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $102,85 \pm 1,05$  bulunmuştur.

Tüm sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için immobilize, ko-immobilize ve serbest HRP enzimlerinin hesaplanan kinetik parametreleri Çizelge 30’da sunulmuştur.





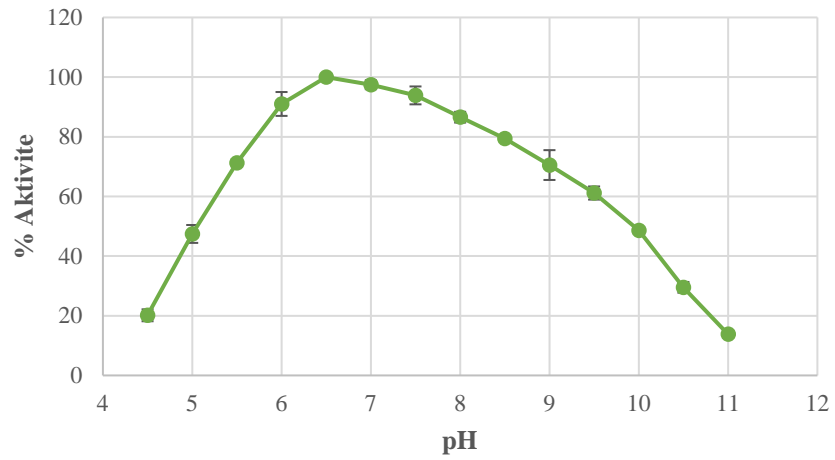
**Şekil 63.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin pNPL varlığında Lineweaver-Burk grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6,0;  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

**Çizelge 30.** İmmobilize, ko-immobilize ve serbest HRP enzimlerinin kinetik parametreleri.

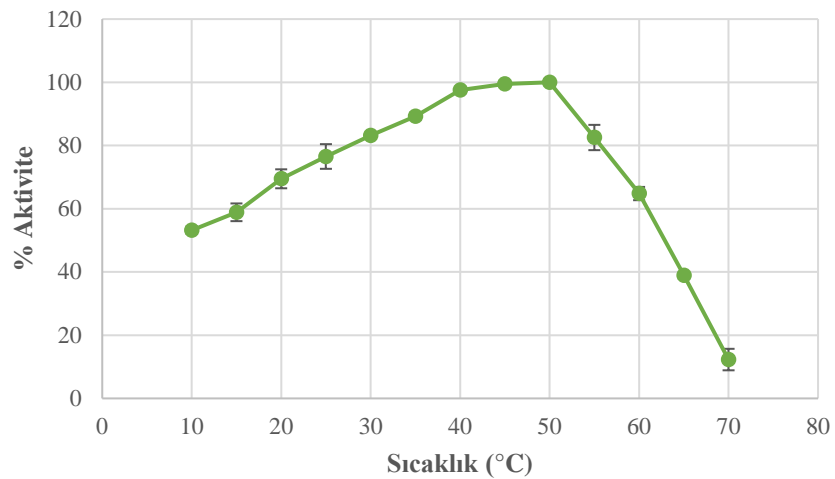
HRP	$V_{\max}$ (mg/mL/dk)	$K_m$ (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Serbest	1.67±0.08	17.48±0.12	172.3±0.17
Serbest+Lipaz	1.68±0.07	16.66±0.19	173.2±0.22
Serbest+Lipaz+pNPL	1.61±0.11	17.36±0.25	166.89±0.09
Aljinat	1.29±0.12	25.94±0.61	133.74±1.51
Aljinat+Lipaz	1.24±0.3	25.84±0.74	127.97±2.21
Aljinat+Lipaz+pNPL	1.31±0.19	25.52±1.22	114.36±2.57
M.Aljinat	1.23±0.08	25.38±0.84	127.16±1.94
M.Aljinat+Lipaz	1.27±0.09	26.39±0.91	131.29±1.77
M.Aljinat+Lipaz+pNPL	1.35±0.11	25.62±1.22	108.22±1.63
Aljinat/Kitosan	1.13±0.17	34.28±1.21	116.16±1.52
Aljinat/Kitosan+Lipaz	1.14±0.21	34.71±1.36	117.95±1.1
Aljinat/Kitosan+Lipaz+pNPL	1.13±0.15	32.61±1.14	126.69±0.96
M.Aljinat/Kitosan	1.03±0.22	36.94±0.98	127.33±1.46
M.Aljinat/Kitosan+Lipaz	1.06±0.31	33.51±1.25	109.37±1.47
M.Aljinat/Kitosan+Lipaz+pNPL	0.99±0.1	34.49±1.42	102.85±1.05

#### 4.15. İmmobilize Lipaz Enziminin Optimum pH ve Optimum Sıcaklıkları

Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 64 ve Şekil 65'te verilmiştir. Aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.5'te %20,1; pH 11.0'de %13,8; pH 5.5-10.0 aralığında %60'ın üzerinde aktivite göstermiştir. Aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 50 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C'de %53,2; 70 °C'de %12,3; 10 ile 60 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %50 üzerinde aktivite göstermiştir.

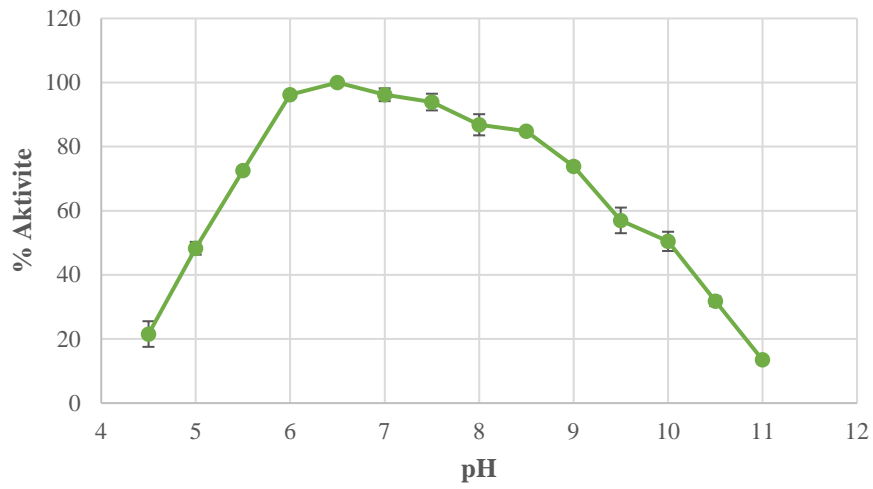


Şekil 64. Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; T=25 °C).

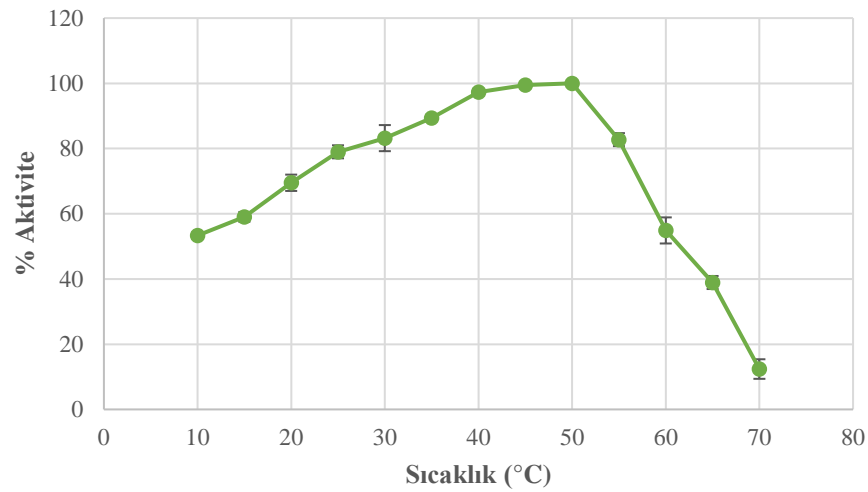


Şekil 65. Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 66 ve Şekil 67’de verilmiştir. Manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.5’te %21,5; pH 11.0’de %13,4; pH 5.5-9.0 aralığında %70’in üzerinde aktivite göstermiştir. Manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 50 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C’de %53,3; 70 °C’de %12,4; 10 ile 60 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %50 üzerinde aktivite göstermiştir.

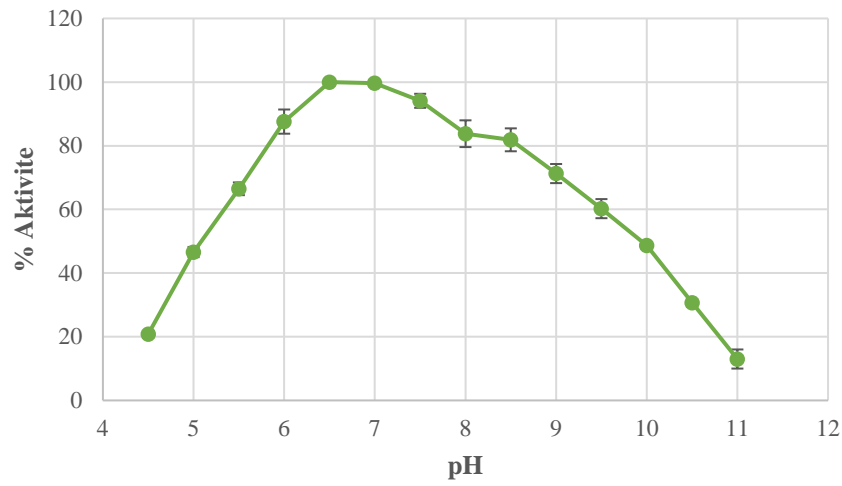


**Şekil 66.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=25$  °C).

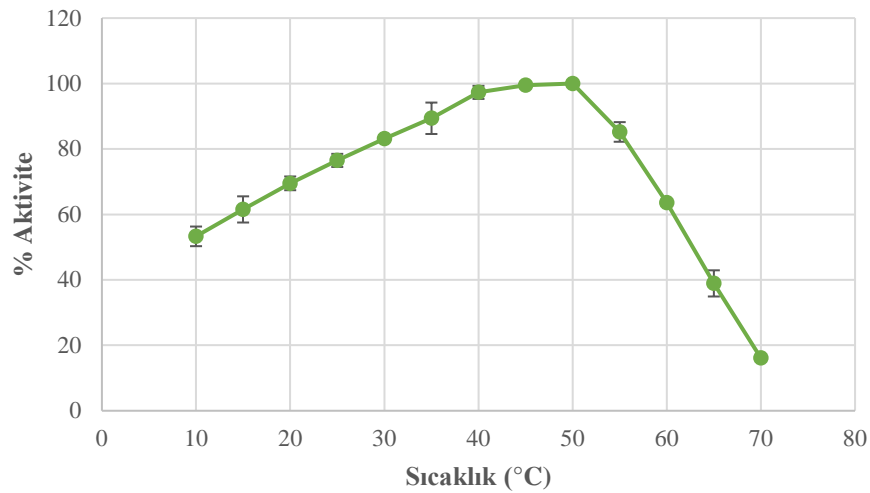


**Şekil 67.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH:7.0).

Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 68 ve Şekil 69’te verilmiştir. Aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.5’te %20,8; pH 11.0’de %13; pH 5.5-9.5 aralığında %60’ın üzerinde aktivite göstermiştir. Aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 50 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C’de %53,2; 70 °C’de %16; 10 ile 60 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %50 üzerinde aktivite göstermiştir.

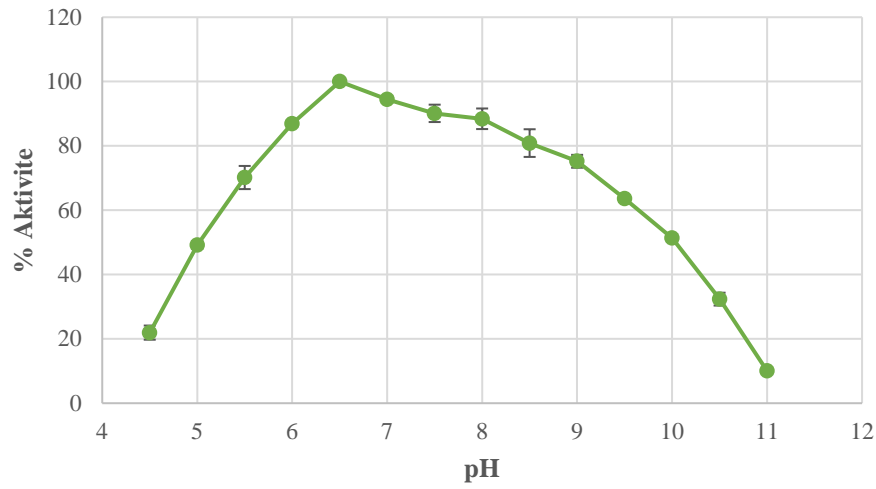


**Şekil 68.** Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=25$  °C).

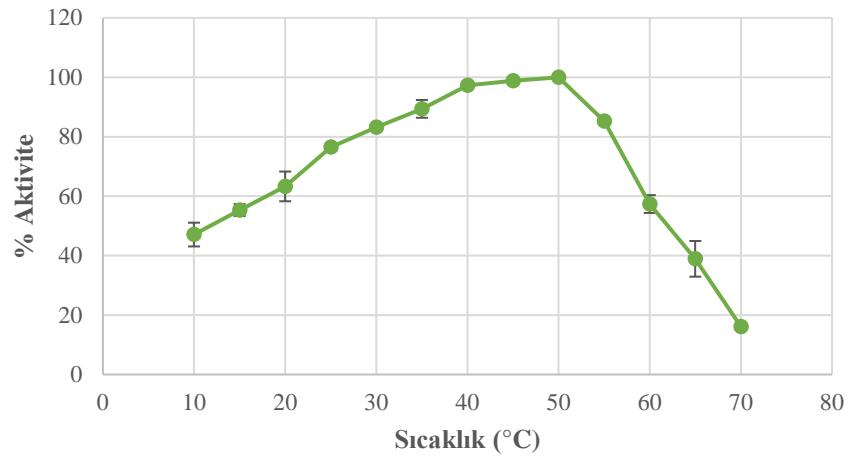


**Şekil 69.** Aljinat/Kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık denemesi sonucunda elde edilen optimum pH ve optimum sıcaklık grafikleri sırasıyla Şekil 70 ve Şekil 71’de verilmiştir. Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değeri 6.5 bulunmuştur. İmmobilize HRP 4.5’te %22; pH 11.0’de %10; pH 5.5-9.5 aralığında %60’ın üzerinde aktivite göstermiştir. Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi optimum sıcaklık değeri 50 °C bulunmuştur. İmmobilize HRP enzimi 10 °C’de %47; 70 °C’de %16; 10 ile 60 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %40 üzerinde aktivite göstermiştir.



**Şekil 70.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum pH grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=25$  °C).



**Şekil 71.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH 7.0).

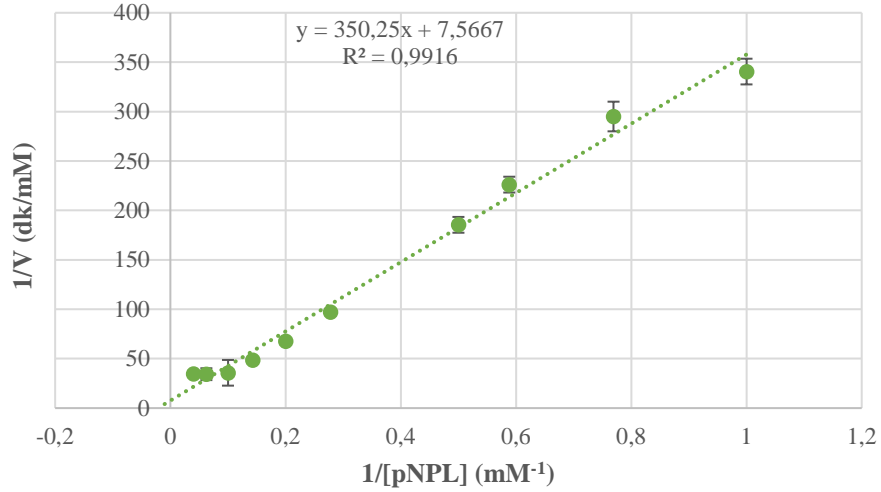
Sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri Çizelge 31’de verilmiştir.

**Çizelge 31.** İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri.

Lipaz	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Serbest	7.0	45
Aljinat Boncuk	6.5	50
Manyetik Aljinat Boncuk	6.5	50
Aljinat/Kitosan Boncuk	6.5	50
Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuk	6.5	50

#### 4.16. İmmobilize Lipaz Enziminin Kinetik Parametreleri

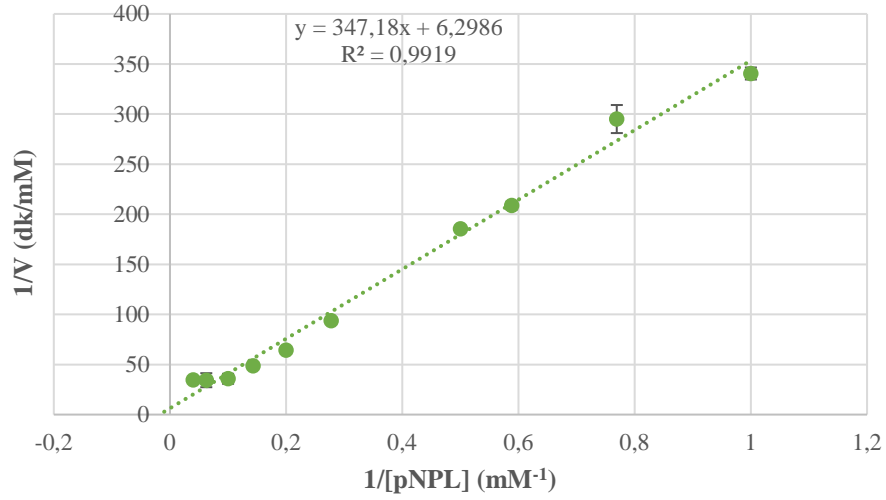
Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen (pNPL) derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 72’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,09 \pm 0,012$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $49,94 \pm 0,99$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,13 \pm 0,14$  bulunmuştur.



**Şekil 72.** Aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

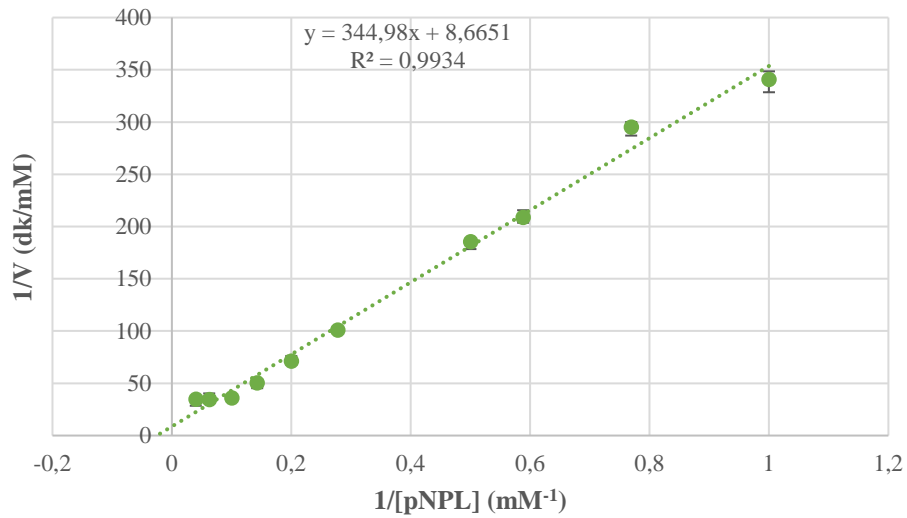
Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 73’te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk)

değeri  $0,08 \pm 0,016$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $55,24 \pm 1,45$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,22 \pm 0,09$  bulunmuştur.



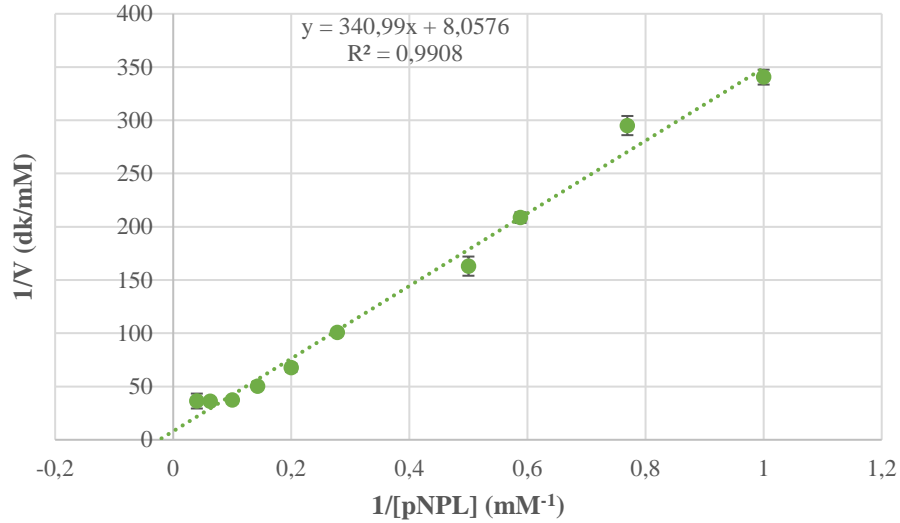
**Şekil 73.** Manyetik aljinat boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 74'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,05 \pm 0,009$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $60,13 \pm 1,41$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,15 \pm 0,21$  bulunmuştur.



**Şekil 74.** Aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 75'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,02 \pm 0,018$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $82,37 \pm 1,62$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,05 \pm 0,19$  bulunmuştur.

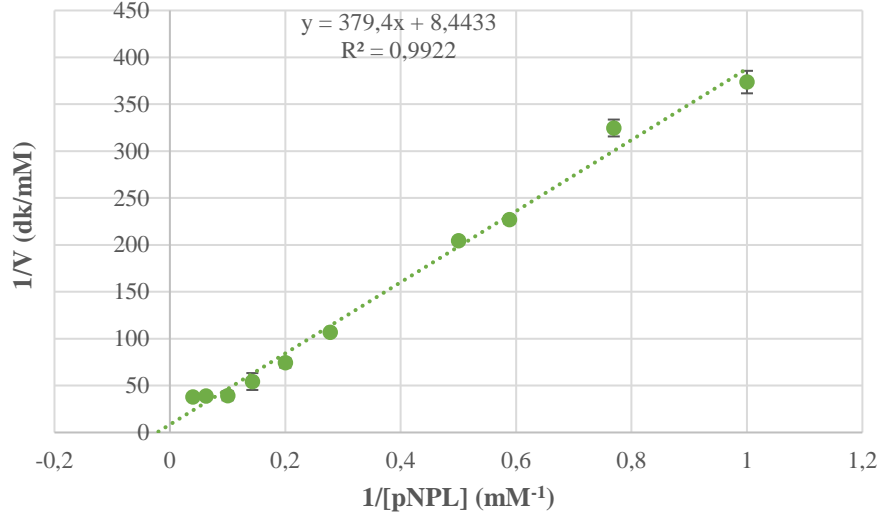


**Şekil 75.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

#### **4.17. Ko-immobilize Lipaz Enziminin HRP ve Pyrogallol Varlığında Kinetik Parametreleri**

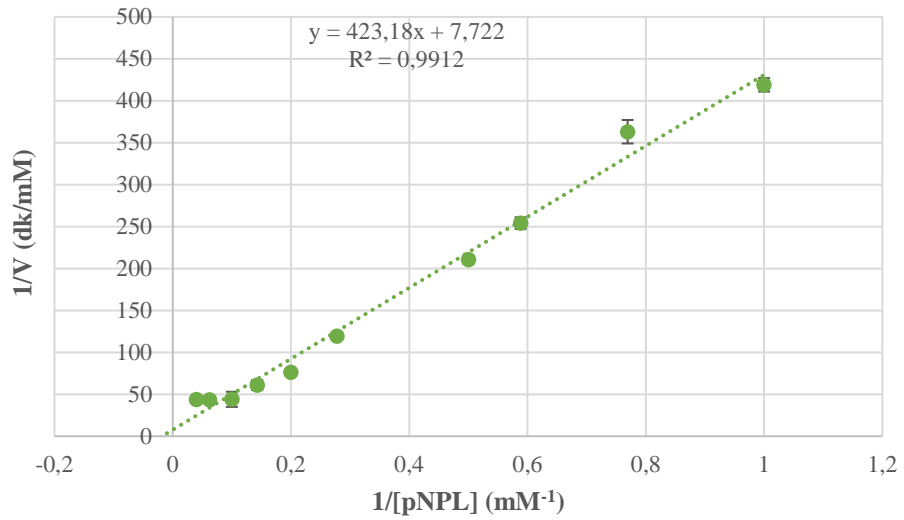
Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 76'da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,11 \pm 0,008$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $47,04 \pm 1,22$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,28 \pm 0,12$  bulunmuştur.





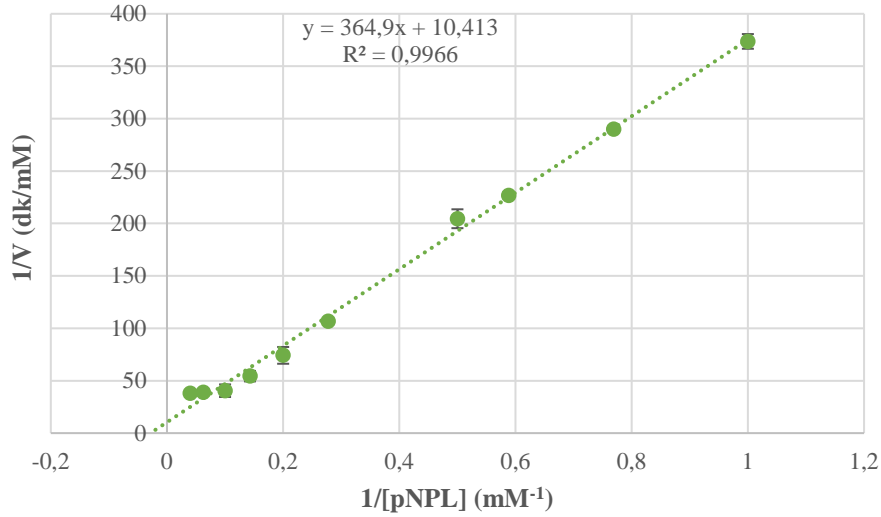
**Şekil 76.** Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında değişen pNPL derişimlerindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 77'de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,01 \pm 0,011$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $54,94 \pm 2,21$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,24 \pm 0,28$  bulunmuştur.



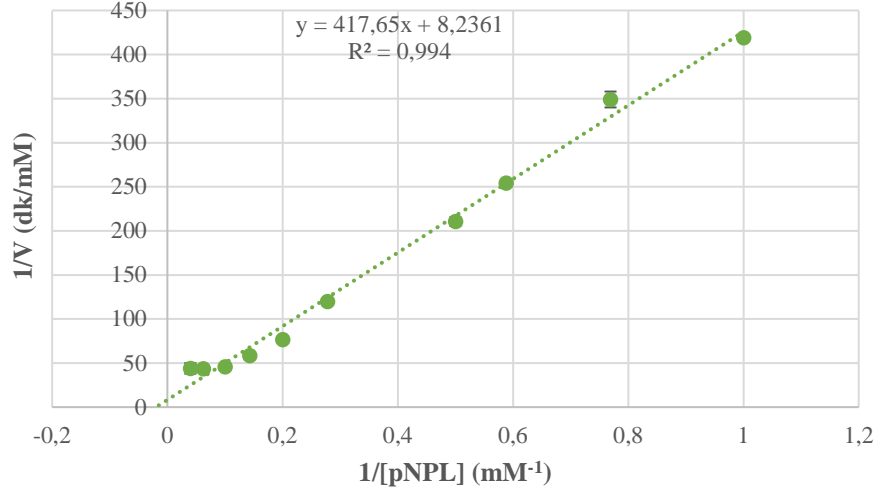
**Şekil 77.** Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 78’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,09 \pm 0,015$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $55,08 \pm 1,63$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,04 \pm 0,1$  bulunmuştur.



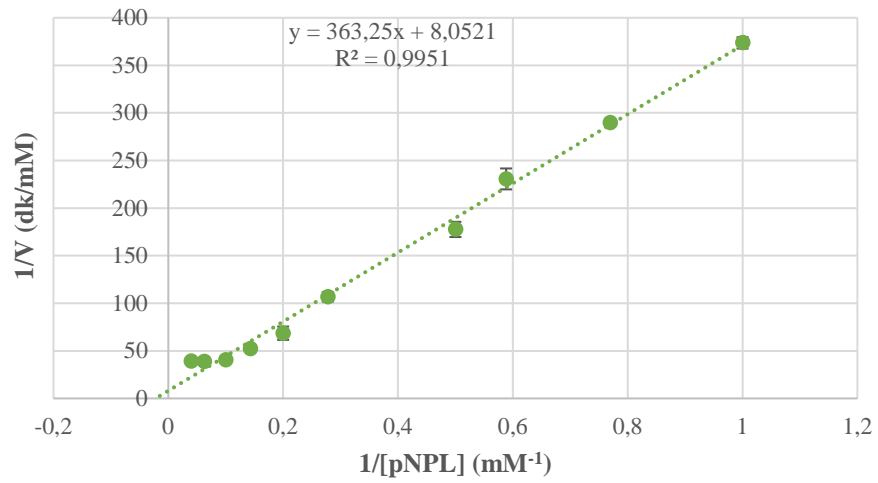
**Şekil 78.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 79’da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,11 \pm 0,015$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $50,76 \pm 0,85$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,11 \pm 0,18$  bulunmuştur.



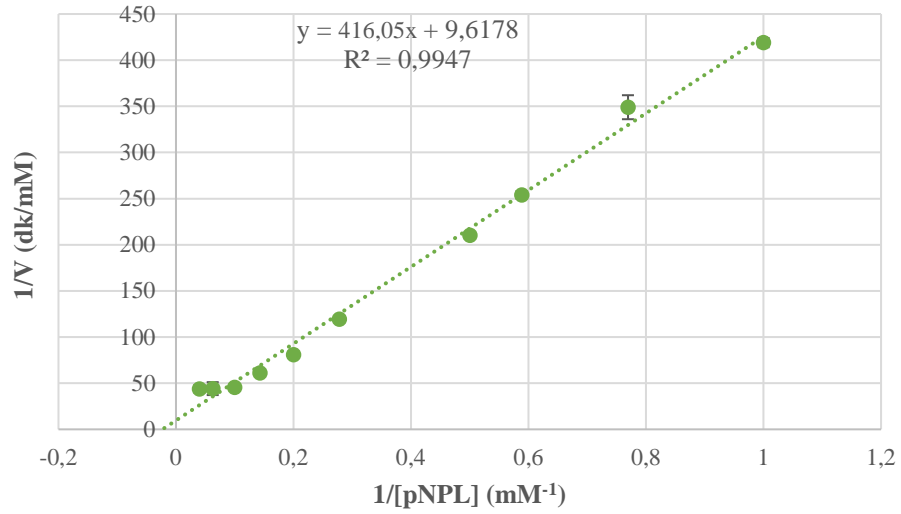
**Şekil 79.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 80’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{\max}$  (mM/dk) değeri  $0,04\pm 0,013$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $65,24\pm 0,83$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,04\pm 0,17$  bulunmuştur.



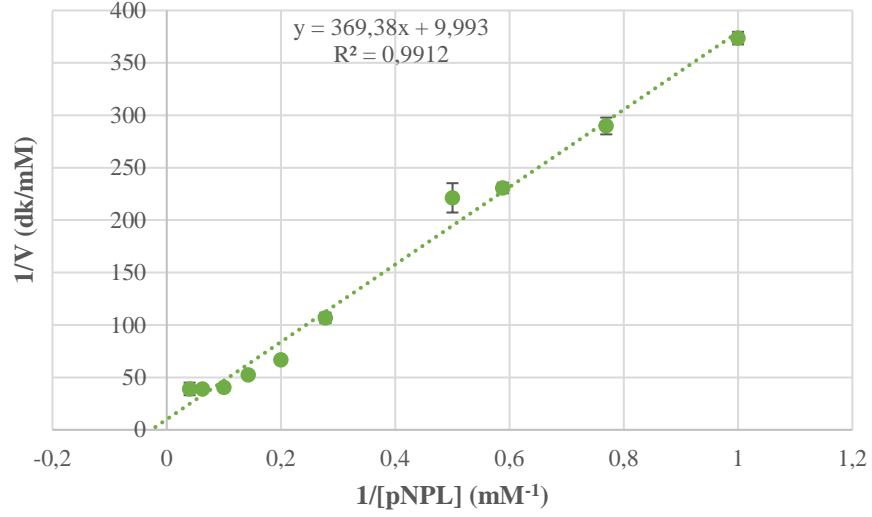
**Şekil 80.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 81’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,07 \pm 0,007$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $73,29 \pm 1,06$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,03 \pm 0,19$  bulunmuştur.



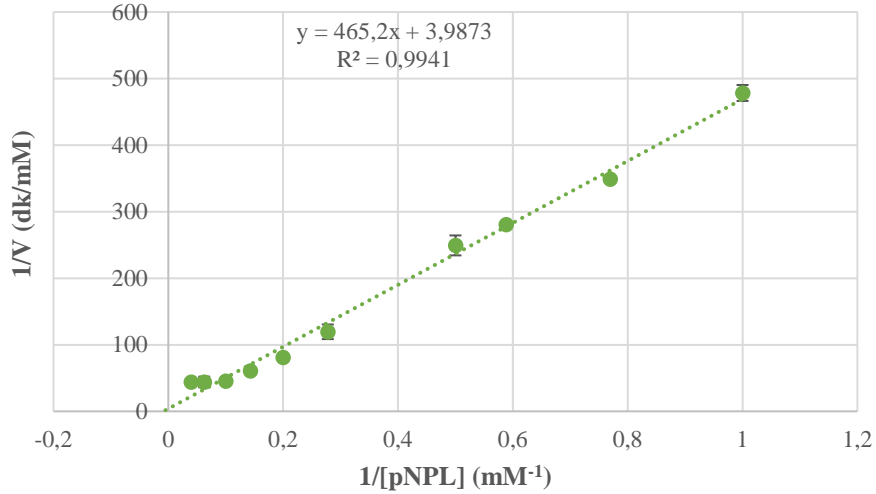
**Şekil 81.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin değişen pNPL derişimlerdeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 82’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{max}$  (mM/dk) değeri  $0,07 \pm 0,01$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $77,03 \pm 1,11$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,08 \pm 0,05$  bulunmuştur.



**Şekil 82.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında değişen pNPL derişimindeki aktivite denemeleri sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 83'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi esas alınarak yapılan hesaplamalara göre; ko-immobilize lipaz enziminin  $V_{\max}$  (mM/dk) değeri  $0,05\pm 0,012$ ;  $K_m$  (mM) değeri  $67,64\pm 1,74$ ; spesifik aktivitesi (U/mg)  $1,02\pm 0,14$  bulunmuştur.



**Şekil 83.** Manyetik aljinat/ kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin pyrogallol varlığında Lineweaver-Burk grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7,0;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

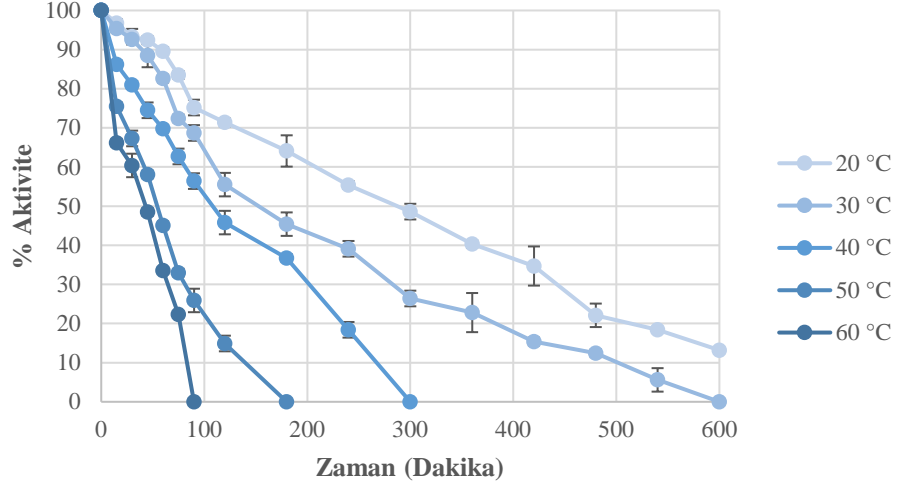
Tüm sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için immobilize, ko-immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin hesaplanan kinetik parametreleri Çizelge 32’de sunulmuştur.

**Çizelge 32.** İmmobilize, ko-immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin kinetik parametreleri.

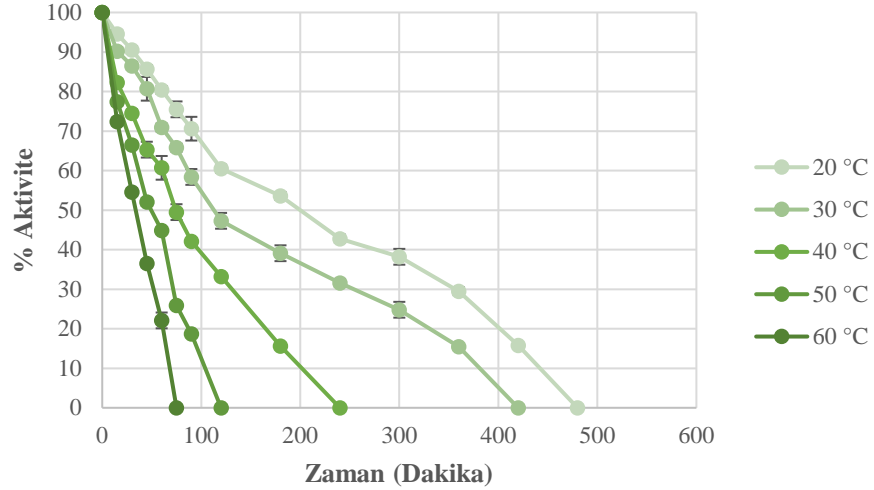
<b>Lipaz</b>	<b>V<sub>max</sub></b> <b>(mM/dk)</b>	<b>K<sub>m</sub></b> <b>(mM)</b>	<b>Spesifik Aktivite</b> <b>(U/mg)</b>
<b>Serbest</b>	0.12±0.005	42.02±0.33	1.36±0.02
<b>Serbest+HRP</b>	0.12±0.013	44.44±0.16	1.37±0.12
<b>Serbest+HRP+pyrogallol</b>	0.12±0.006	46.12±0.29	1.34±0.08
<b>Aljinat</b>	0.09±0.012	49.94±0.99	1.13±0.14
<b>Aljinat+HRP</b>	0.11±0.008	47.04±1.22	1.28±0.12
<b>Aljinat+HRP+pyrogallol</b>	0.1±0.011	54.94±2.21	1.24±0.28
<b>M.Aljinat</b>	0.08±0.016	55.24±1.45	1.22±0.09
<b>M.Aljinat+HRP</b>	0.09±0.015	55.08±1.63	1.04±0.1
<b>M.Aljinat+HRP+pyrogallol</b>	0.11±0.015	50.76±0.85	1.11±0.18
<b>Aljinat/Kitosan</b>	0.05±0.009	60.13±1.41	1.15±0.21
<b>Aljinat/Kitosan+HRP</b>	0.04±0.013	65.24±0.83	1.04±0.17
<b>Aljinat/Kitosan+HRP+pyrogallol</b>	0.07±0.007	73.29±1.06	1.03±0.19
<b>M.Aljinat/Kitosan</b>	0.02±0.018	82.37±1.62	1.05±0.19
<b>M.Aljinat/Kitosan+HRP</b>	0.07±0.01	77.03±1.11	1.08±0.05
<b>M.Aljinat/Kitosan+HRP+pyrogallol</b>	0.05±0.012	67.64±1.74	1.02±0.14

#### **4.18. Serbest HRP ve Serbest Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları**

Serbest HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık tayin sonuçlarına göre optimum pH değerindeki tamponda çözelti olarak bekletilen enzimlerin 20-60 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 84 ve 85’te sunulmuştur. Serbest enzimlerin bekletildiği ortam sıcaklığı ile yaşadıkları aktivite kaybının doğru orantılı olduğu görülmüştür.



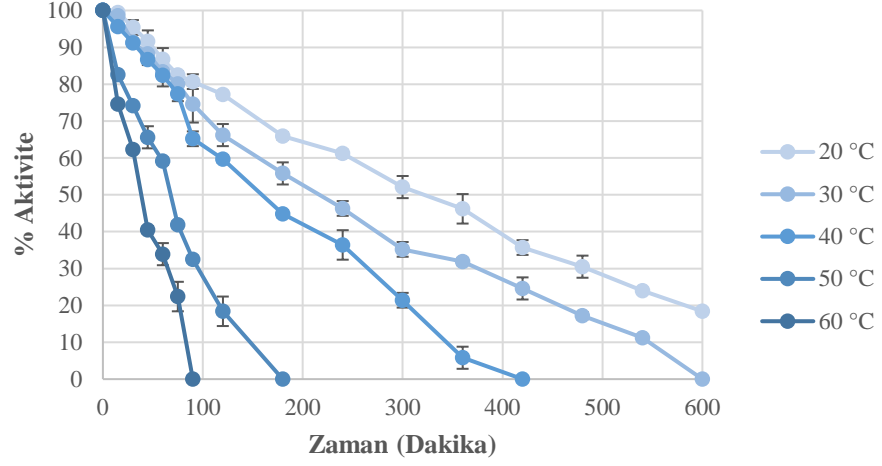
**Şekil 84.** Serbest HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).



**Şekil 85.** Serbest lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

#### 4.19. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık tayin sonuçlarına göre aljinat boncuklarda ko-immobilize olarak bekletilen enzimlerin 20-60 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 86 ve 87'de sunulmuştur. Aljinat boncuklarda ko-immobilize enzimlerin bekletildiği ortam sıcaklığı ile yaşadıkları aktivite kaybının doğru orantılı olduğu görülmüştür.



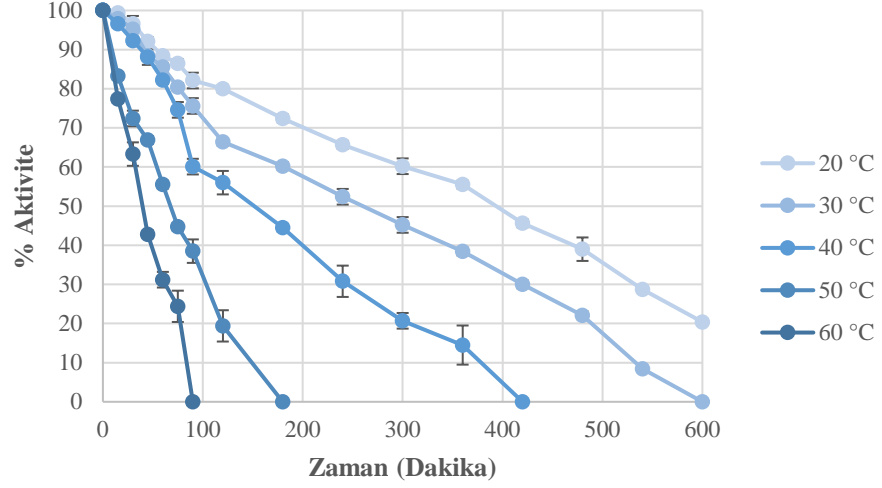
**Şekil 86.** Aljinat boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).



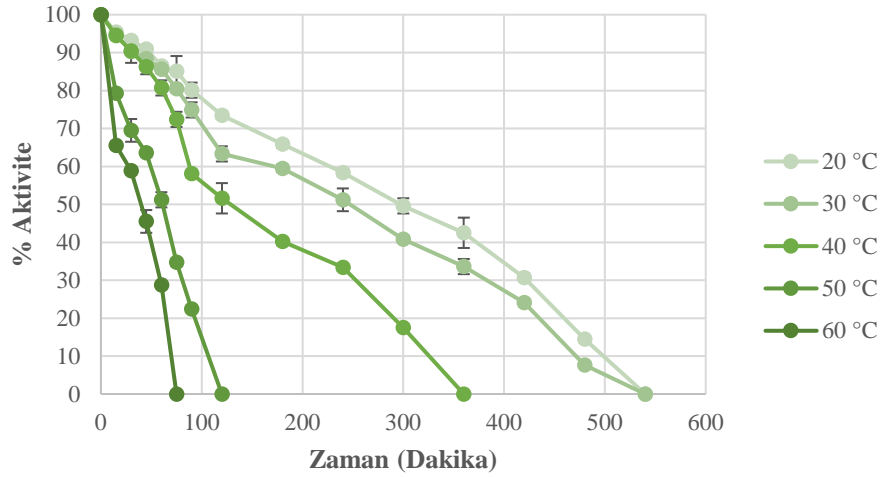
**Şekil 87.** Aljinat boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık tayin sonuçlarına göre manyetik aljinat boncuklarda ko-immobilize olarak bekletilen enzimlerin 20-60 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 88 ve 89’da sunulmuştur. Manyetik aljinat boncuklarda ko-immobilize enzimlerin bekletildiği ortam sıcaklığı ile yaşadıkları aktivite kaybının doğru orantılı olduğu görülmüştür.



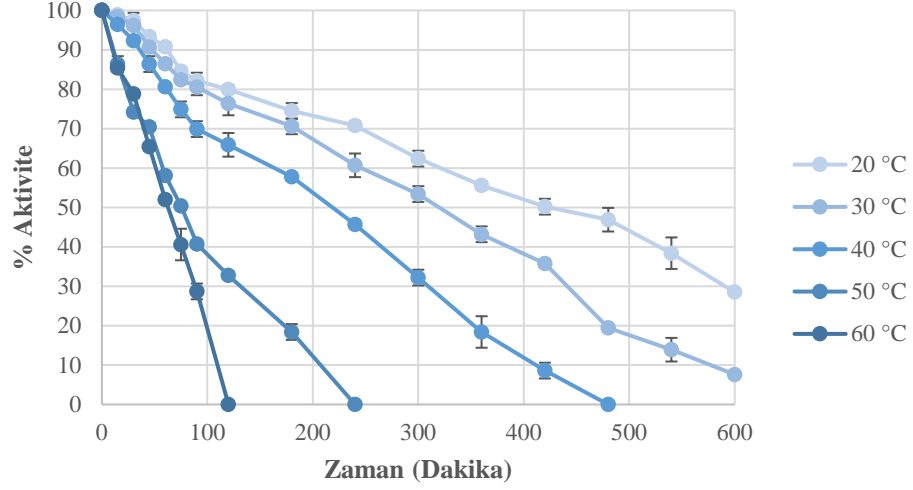


**Şekil 88.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

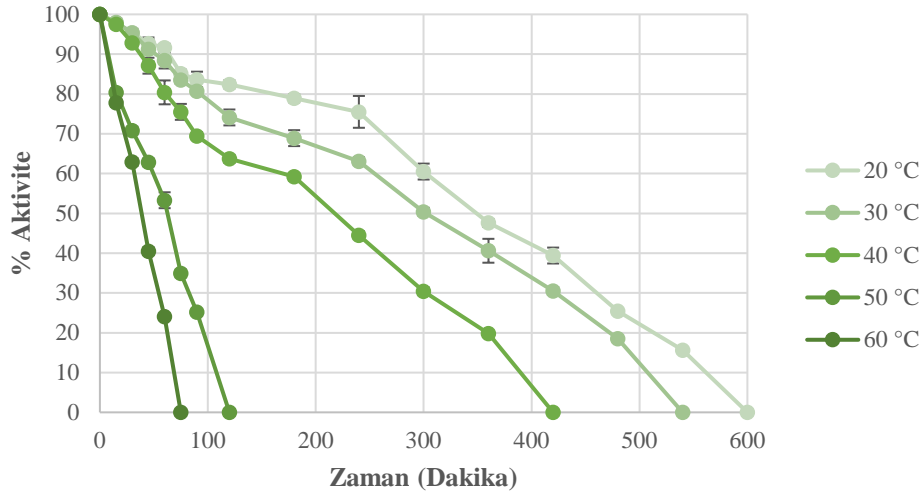


**Şekil 89.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık tayin sonuçlarına göre aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize olarak bekletilen enzimlerin 20-60 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 90 ve 91’de sunulmuştur. Aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize enzimlerin bekletildiği ortam sıcaklığı ile yaşadıkları aktivite kaybının doğru orantılı olduğu görülmüştür.

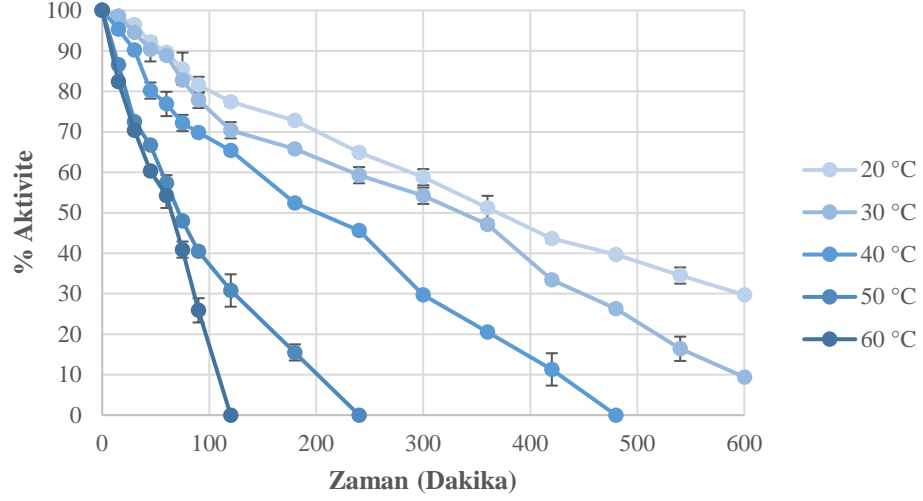


**Şekil 90.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

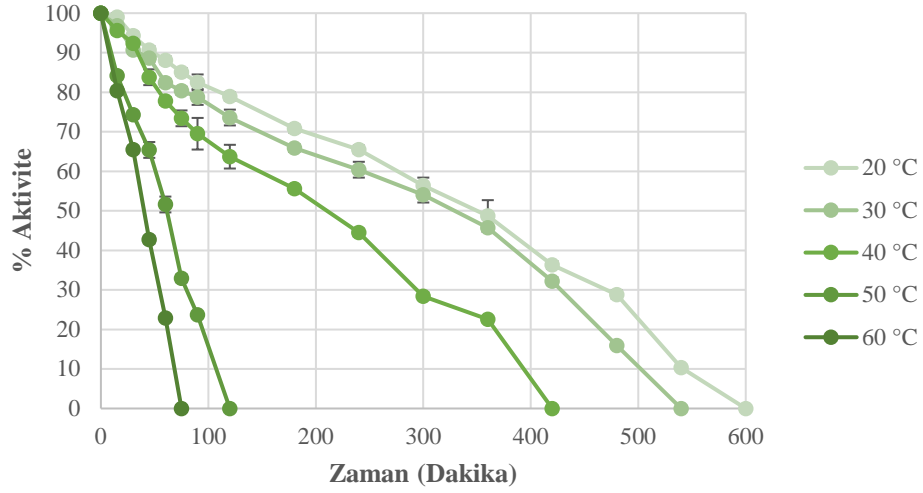


**Şekil 91.** Aljinat/Kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipazın farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık tayin sonuçlarına göre manyetik aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize olarak bekletilen enzimlerin 20-60 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 92 ve 93'te sunulmuştur. Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize enzimlerin bekletildiği ortam sıcaklığı ile yaşadıkları aktivite kaybının doğru orantılı olduğu görülmüştür.



**Şekil 92.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0).

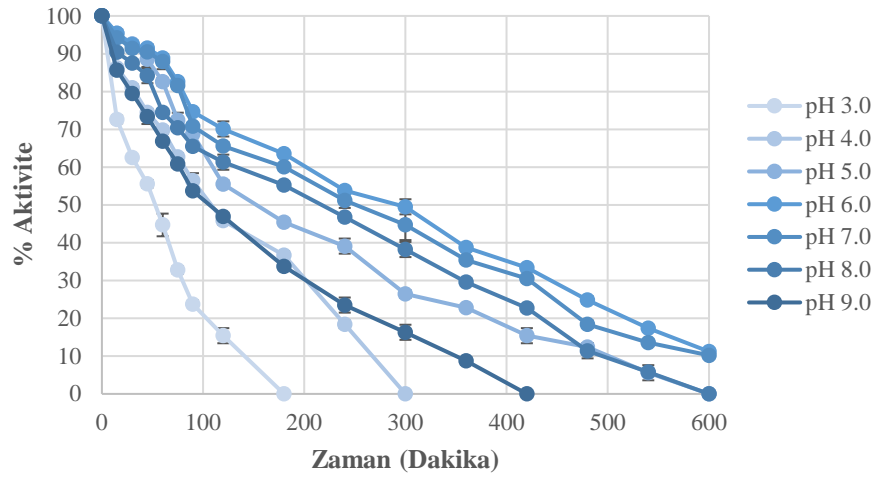


**Şekil 93.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0).

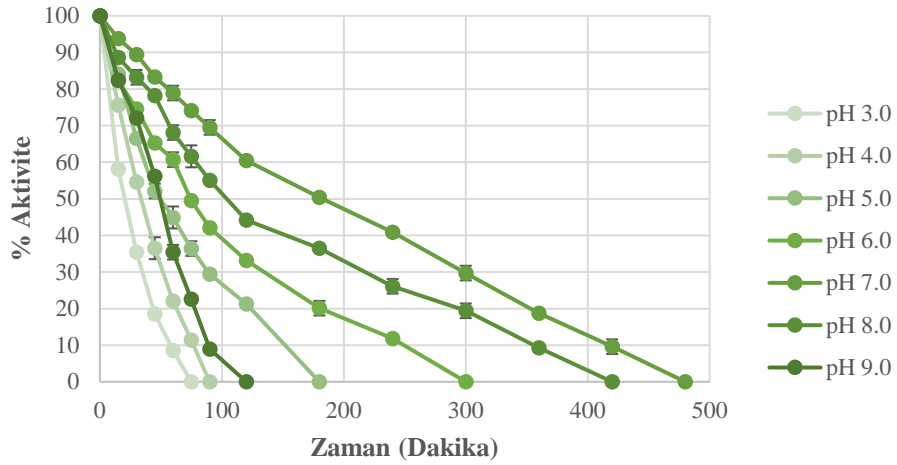
#### 4.20. Serbest HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılıkları

Serbest HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılığı tayin sonuçlarına göre oda sıcaklığında farklı pH değerlerindeki tamponlarda çözelti olarak bekletilen enzimlerin pH 3.0-9.0 aralığındaki tamponlarda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite

değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 94 ve 95'te sunulmuştur. Enzimlerin aktivitelerini optimum pH değerlerinde uzun süre korudukları görülmüştür.



Şekil 94. Serbest HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

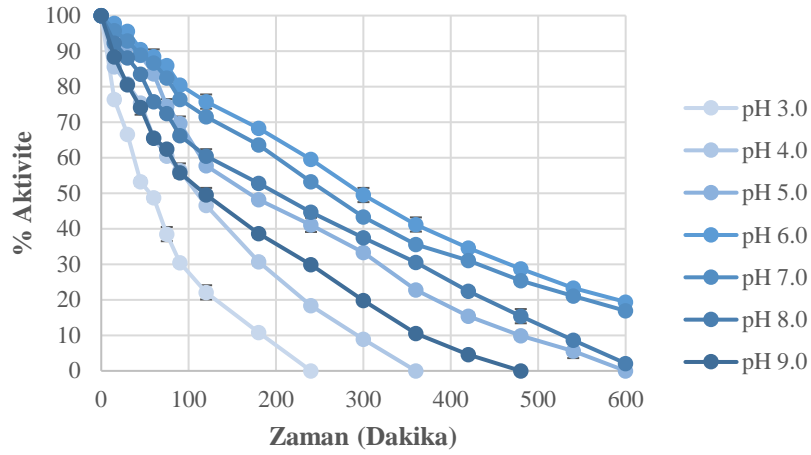


Şekil 95. Serbest lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

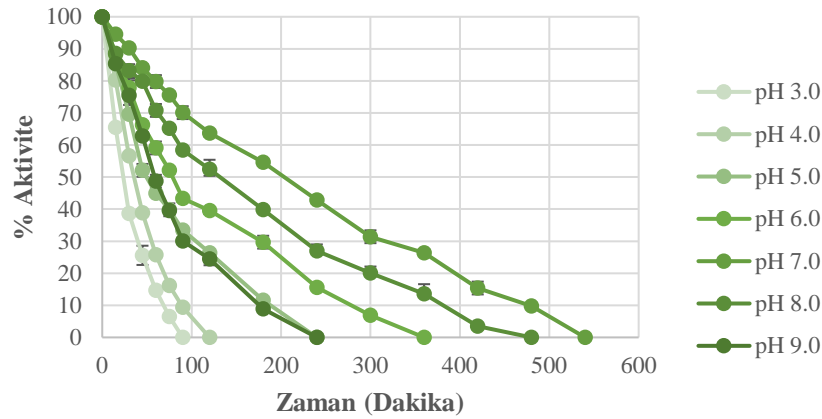
#### 4.21. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin pH Kararlılıkları

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılığı tayin sonuçlarına göre oda sıcaklığında farklı pH değerlerindeki tamponlarda aljinat boncuklarda ko-immobilize olarak

bekletilen enzimlerin pH 3.0-9.0 aralığındaki tamponlarda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 96 ve 97’de sunulmuştur. Aljinat boncuklarda ko-immobilize enzimlerin aktivitelerini optimum pH değerlerinde uzun süre korudukları görülmüştür.



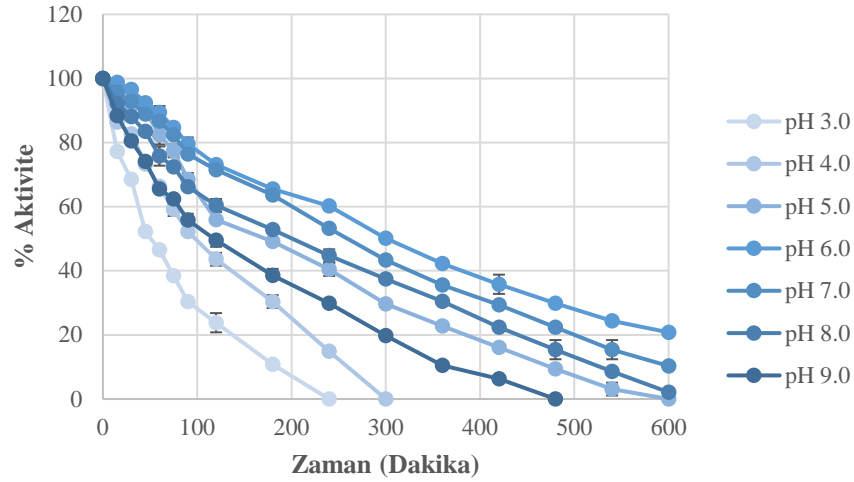
**Şekil 96.** Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



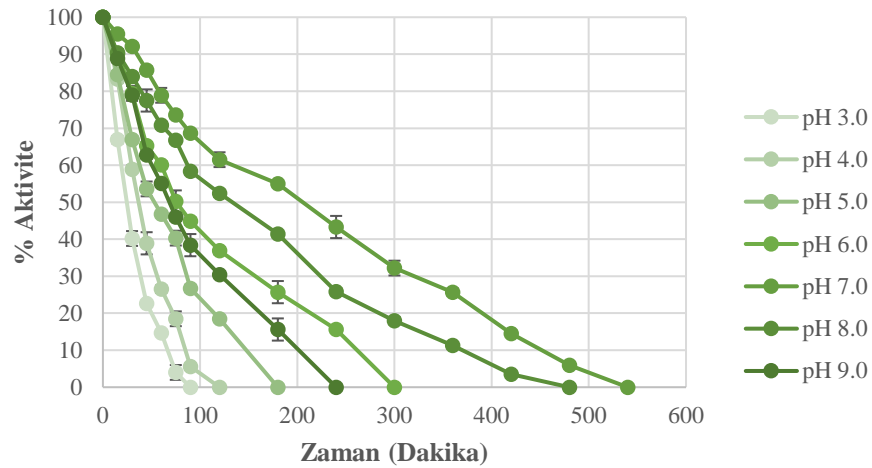
**Şekil 97.** Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılığı tayin sonuçlarına göre oda sıcaklığında farklı pH değerlerindeki tamponlarda manyetik aljinat boncuklarda ko-immobilize olarak bekletilen enzimlerin pH 3.0-9.0 aralığındaki tamponlarda başlangıç aktiviteleri %100

kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 98 ve 99'da sunulmuştur. Manyetik aljinat boncuklarda ko-immobilize enzimlerin aktivitelerini optimum pH değerlerinde uzun süre korudukları görülmüştür.



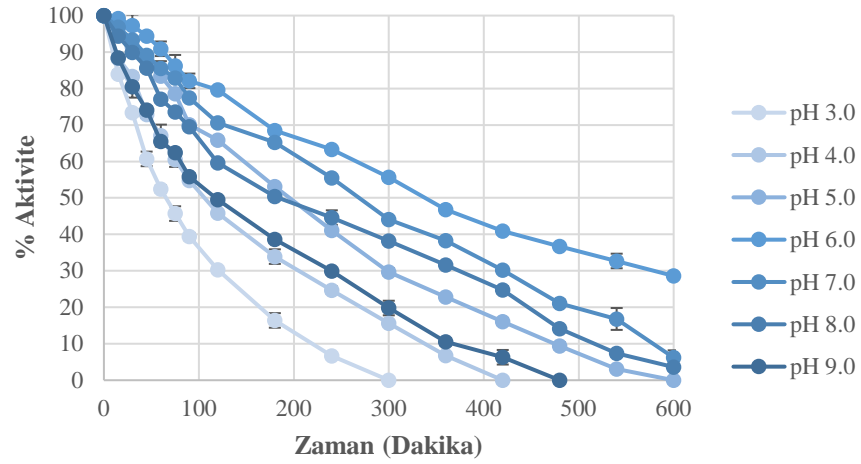
**Şekil 98.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=40^{\circ}\text{C}$ ).



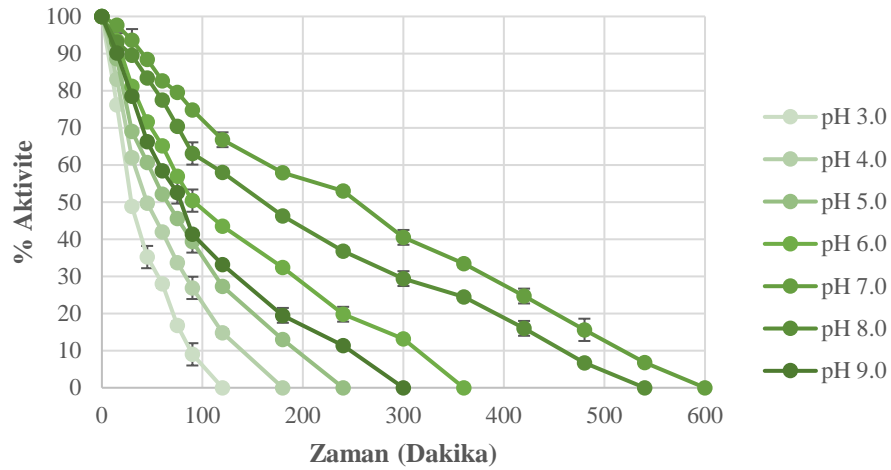
**Şekil 99.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=45^{\circ}\text{C}$ ).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılığı tayin sonuçlarına göre oda sıcaklığında farklı pH değerlerindeki tamponlarda aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize

olarak bekletilen enzimlerin pH 3.0-9.0 aralığındaki tamponlarda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 100 ve 101’de sunulmuştur. Aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize enzimlerin aktivitelerini optimum pH değerlerinde uzun süre korudukları görülmüştür.



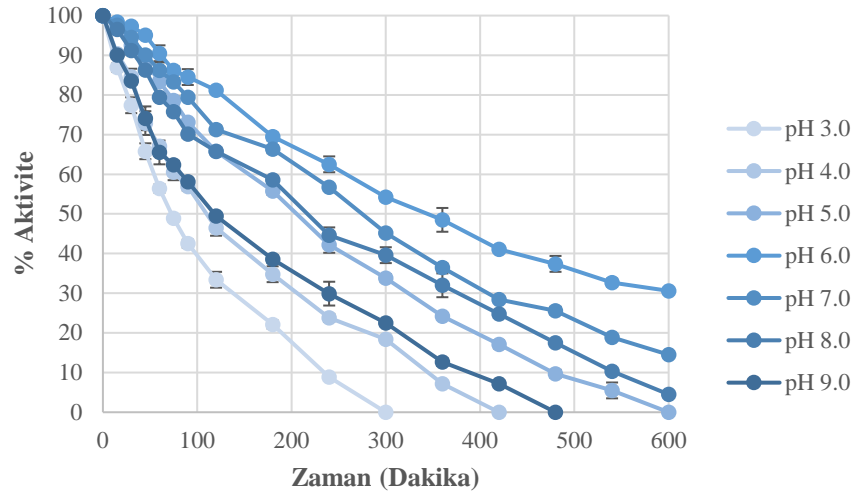
**Şekil 100.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



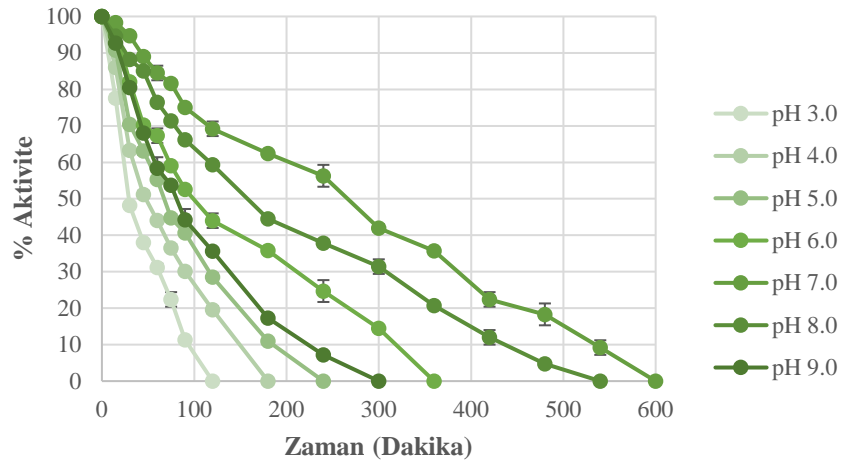
**Şekil 101.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipazın farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılığı tayin sonuçlarına göre oda sıcaklığında farklı pH değerlerindeki tamponlarda manyetik aljinat/kitosan boncuklarda ko-

immobilize olarak bekletilen enzimlerin pH 3.0-9.0 aralığındaki tamponlarda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 102 ve 103'te sunulmuştur. Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize enzimlerin aktivitelerini optimum pH değerlerinde uzun süre korudukları görülmüştür.



**Şekil 102.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL;  $T=40$  °C).

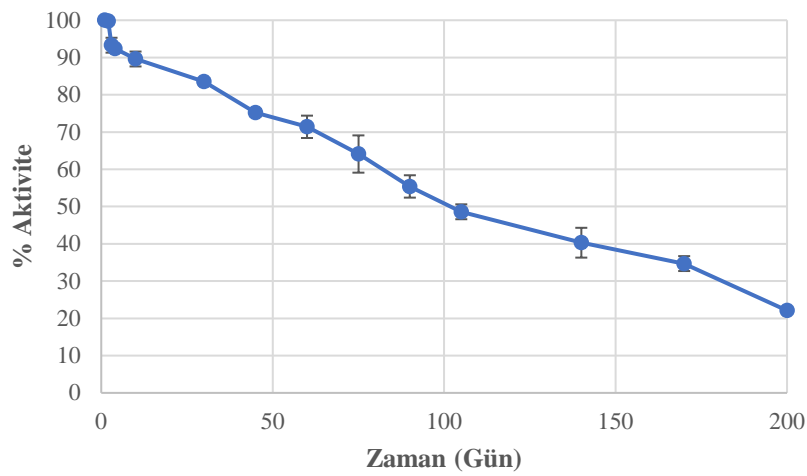


**Şekil 103.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin farklı tamponlardaki pH kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM;  $T=45$  °C).

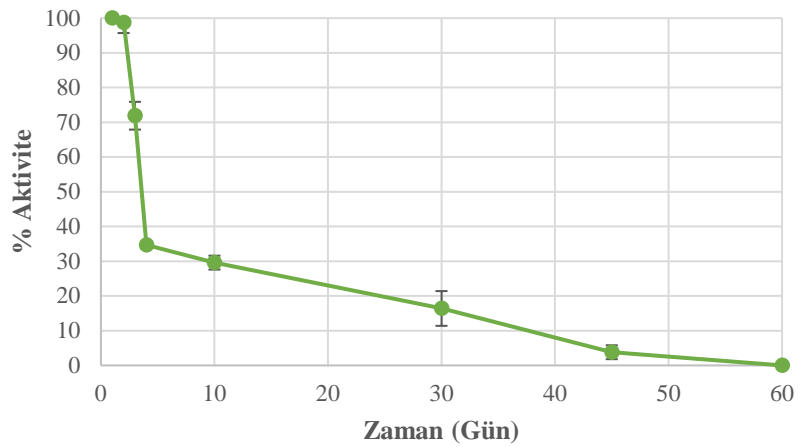


#### 4.22. Serbest HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları

Serbest HRP ve lipaz enzimlerinin depo kararlılık tayini sonucunda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 104 ve 105'te sunulmuştur. Depo kararlılık tayini sonucunda serbest HRP enziminin 200 günün sonunda hala %22,1 aktivite gösterdiği; serbest lipaz enziminin de 60 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür.



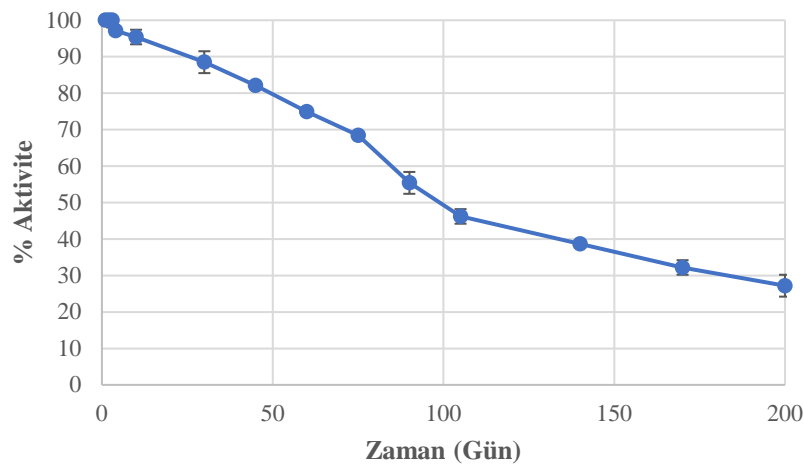
Şekil 104. Serbest HRP enziminin depo kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).



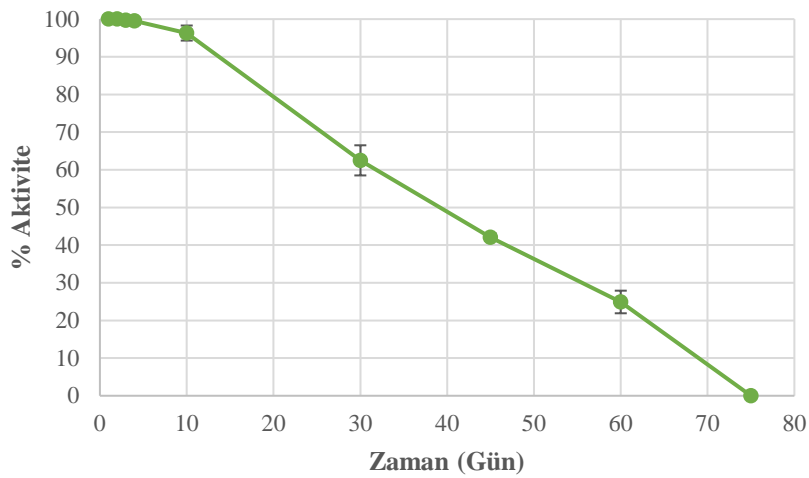
Şekil 105. Serbest lipaz enziminin depo kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

#### 4.23. Ko-immobilize HRP ve Lipaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları

Aljinat boncuklarda ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin depo kararlılık tayini sonucunda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 106 ve 107’de sunulmuştur. Depo kararlılık tayini sonucunda ko-immobilize HRP enziminin 200 günün sonunda hala %27,2 aktivite gösterdiği; ko-immobilize lipaz enziminin de 75 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür.

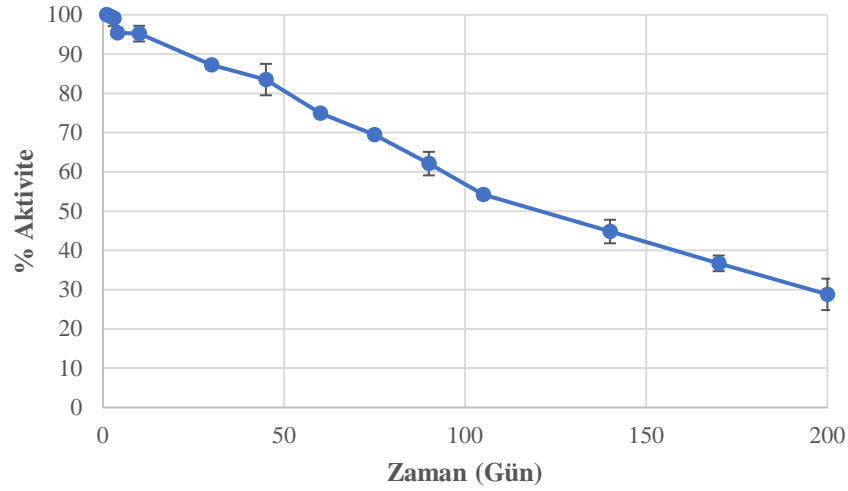


**Şekil 106.** Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

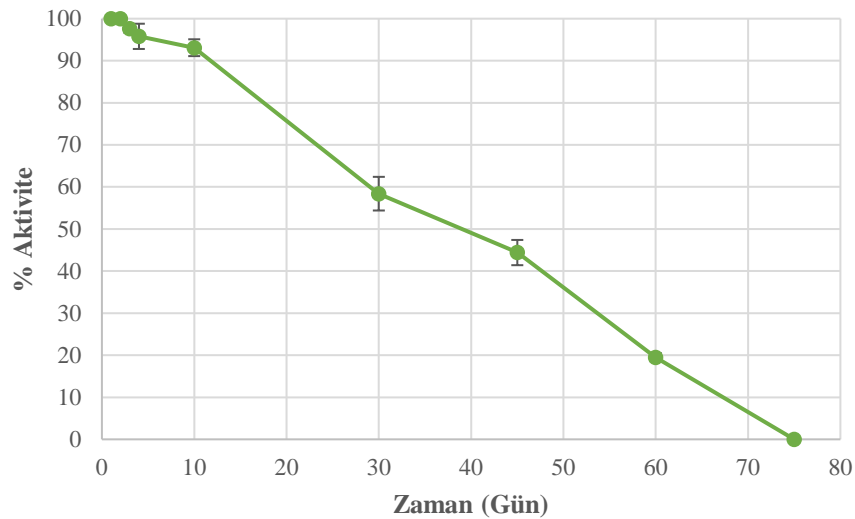


**Şekil 107.** Aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat boncuklarda ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin depo kararlılık tayini sonucunda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 108 ve 109’da sunulmuştur. Depo kararlılık tayini sonucunda ko-immobilize HRP enziminin 200 günün sonunda hala %28,8 aktivite gösterdiği; ko-immobilize lipaz enziminin de 75 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür.

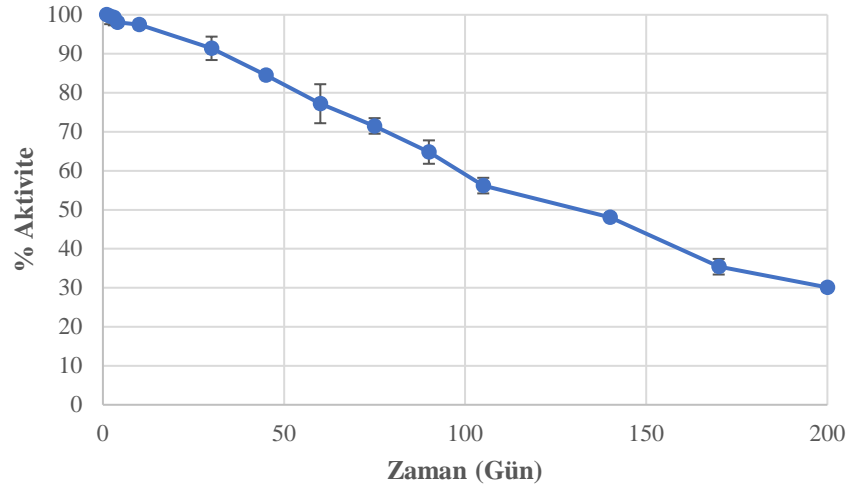


**Şekil 108.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

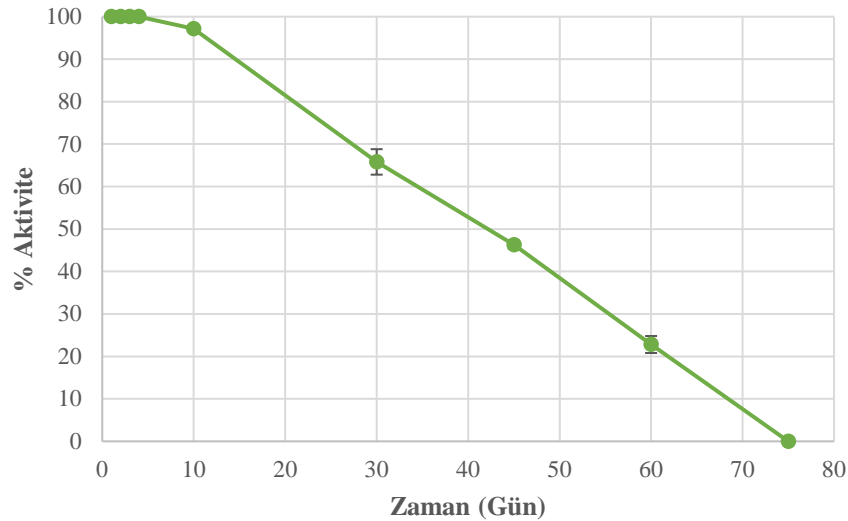


**Şekil 109.** Manyetik aljinat boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

Aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin depo kararlılık tayini sonucunda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 110 ve 111’de sunulmuştur. Depo kararlılık tayini sonucunda ko-immobilize HRP enziminin 200 günün sonunda hala %30,1 aktivite gösterdiği; ko-immobilize lipaz enziminin de 75 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür.

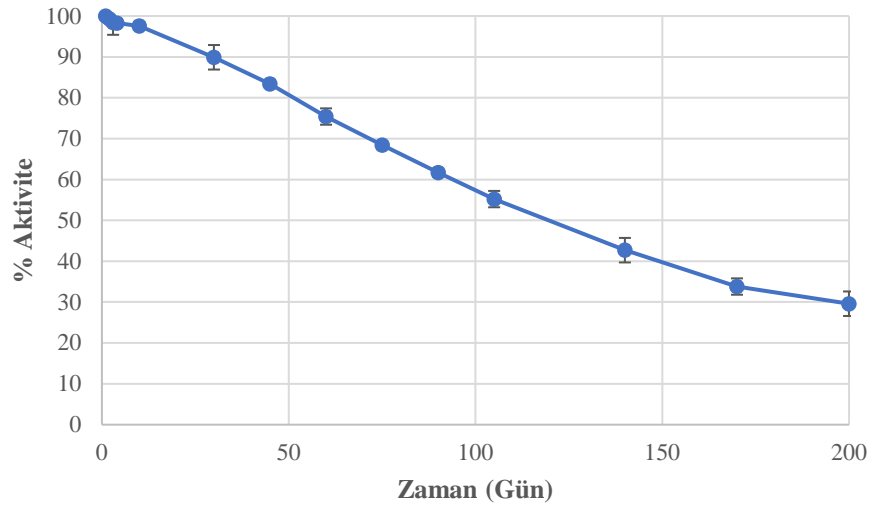


**Şekil 110.** Aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).

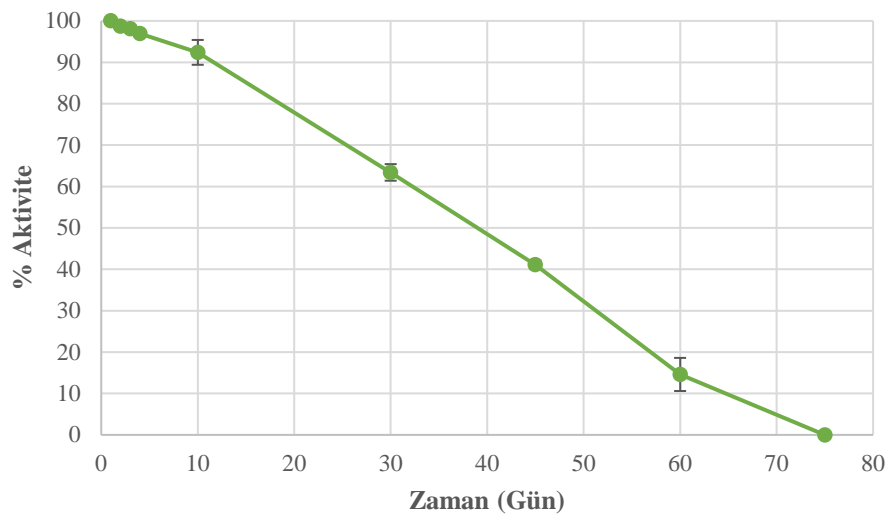


**Şekil 111.** Aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

Manyetik aljinat/kitosan boncuklarda ko-immobilize HRP ve lipaz enzimlerinin depo kararlılık tayini sonucunda başlangıç aktiviteleri %100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerlerinin zamana karşı grafikleri sırasıyla Şekil 112 ve 113'te sunulmuştur. Depo kararlılık tayini sonucunda ko-immobilize HRP enziminin 200 günün sonunda hala %29,6 aktivite gösterdiği; ko-immobilize lipaz enziminin de 75 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür.



**Şekil 112.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin depo kararlılık grafiği (HRP: 0,4 mg/mL; Pyrogallol: 50 mg/mL; pH: 6.0;  $T=40$  °C).



**Şekil 113.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin depo kararlılık grafiği (Lipaz: 4,0 mg/mL; pNPL: 10 mM; pH: 7.0;  $T=45$  °C).

#### 4.24. Boş Boncukların Sentetik Boya Adsorbsiyon Kapasiteleri

Boş boncukların; Chlorazol Black, Orange G, Napthol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A kullanılarak gerçekleştirilen boya adsorbsiyon kapasitesi tayin sonuçları % olarak Çizelge 33'te verilmiştir.

Çizelge 33. Boş boncukların sentetik boya adsorbsiyon kapasiteleri.

SENTETİK BOYA	Aljinat Boncuk	Manyetik Aljinat Boncuk	Aljinat/Kitosan Boncuk	Manyetik Aljinat/Kitosan Boncuk
Chlorazol Black	%1,9	%1,5	%1,7	%1,6
Orange G	%2,3	%2,1	%2,0	%2,4
Napthol Blue Black	%3,2	%2,8	%2,9	%2,5
Brilliant Green	%2,8	%2,8	%3,0	%2,5
Sunset Yellow	%2,0	%1,4	%1,6	%2,0
Trypan Blue	%4,2	%3,5	%3,8	%3,7
Fast Green	%1,0	%1,2	%1,1	%1,2
Congo Red	%1,7	%1,5	%1,5	%1,9
Brilliant Blue	%4,8	%4,4	%4,0	%4,2
Azure A	%4,1	%3,5	%3,8	%3,5

#### 4.25. Serbest HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Giderimi

Serbest HRP enziminin; Chlorazol Black, Orange G, Napthol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A olmak üzere sentetik boyalarda renk giderimi tayin sonuçları % olarak Çizelge 34'te verilmiştir.

**Çizelge 34.** Serbest HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.

SENTETİK BOYA	5 Dakika	60 Dakika	24 Saat
<b>Chlorazol Black</b>	%16,7	%47,7	%47,7
<b>Orange G</b>	%27,8	%41,6	%42,9
<b>Naphtol Blue Black</b>	%28,9	%48,7	%48,4
<b>Brilliant Green</b>	%42,8	%100	%100
<b>Sunset Yellow</b>	%28,5	%49,1	%48,6
<b>Trypan Blue</b>	%32,4	%49,8	%51,3
<b>Fast Green</b>	%30,6	%50,7	%51,3
<b>Congo Red</b>	%35,1	%57,3	%56,1
<b>Brilliant Blue</b>	%46,2	%100	%100
<b>Azure A</b>	%31,8	%40,9	%41,8

#### 4.26. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Sentetik Boya Örneklerinde Renk Giderimi

Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin; Chlorazol Black, Orange G, Naphtol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A sentetik boya örneklerinde renk giderimi tayin sonuçları % olarak Çizelge 35’te verilmiştir.

**Çizelge 35.** Aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.

SENTETİK BOYA	5 Dakika	60 Dakika	24 Saat
Chlorazol Black	%10,6	%39,7	%40,7
Orange G	%23,8	%39,9	%39,8
Naphtol Blue Black	%16,8	%44,4	%44,4
Brilliant Green	%44,8	%100	%100
Sunset Yellow	%26,8	%45,5	%45,9
Trypan Blue	%20,4	%40,4	%40,9
Fast Green	%26,5	%51,1	%50,8
Congo Red	%39,7	%58,4	%58,9
Brilliant Blue	%71,2	%100	%100
Azure A	%26,7	%45,7	%45,7



Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin; Chlorazol Black, Orange G, Naphtol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A sentetik boya örneklerinde renk giderimi tayin sonuçları % olarak Çizelge 36’da verilmiştir.

**Çizelge 36.** Manyetik aljinat boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.

<b>SENTETİK BOYA</b>	<b>5 Dakika</b>	<b>60 Dakika</b>	<b>24 Saat</b>
<b>Chlorazol Black</b>	% 14,1	%44,5	%43,4
<b>Orange G</b>	%22,5	%43,1	%43,3
<b>Naphtol Blue Black</b>	% 17,8	%45,4	%45,5
<b>Brilliant Green</b>	%39,7	%97,7	% 100
<b>Sunset Yellow</b>	%22,4	%46,4	%46,4
<b>Trypan Blue</b>	%25,8	%40,9	%40,3
<b>Fast Green</b>	%26,5	%55,7	%55,1
<b>Congo Red</b>	%33,4	%55,7	%55,5
<b>Brilliant Blue</b>	%74,2	%97,7	% 100
<b>Azure A</b>	%28,8	%49,4	%49,8

Aljinat/Kitosan boncuklara immobilize edilmiş yaban turbu peroksidazının (HRP); Chlorazol Black, Orange G, Naphtol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A sentetik boya örneklerinde renk giderimi tayin sonuçları % olarak Çizelge 37’de verilmiştir.

**Çizelge 37.** Aljinat/kitosan boncuklara ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.

<b>SENTETİK BOYA</b>	<b>5 Dakika</b>	<b>60 Dakika</b>	<b>24 Saat</b>
<b>Chlorazol Black</b>	%6,5	%35,5	%35,5
<b>Orange G</b>	%16,2	%42,8	%43,5
<b>Naphtol Blue Black</b>	%16,8	%42,5	%41,9
<b>Brilliant Green</b>	%44,6	%98,2	%100
<b>Sunset Yellow</b>	%26,4	%48,6	%49,2
<b>Trypan Blue</b>	%25,1	%44,4	%44,4
<b>Fast Green</b>	%29,5	%51,4	%52,2
<b>Congo Red</b>	%43,8	%54,7	%54,4
<b>Brilliant Blue</b>	%77,2	%99,5	%100
<b>Azure A</b>	%25,1	%49,5	%49,9

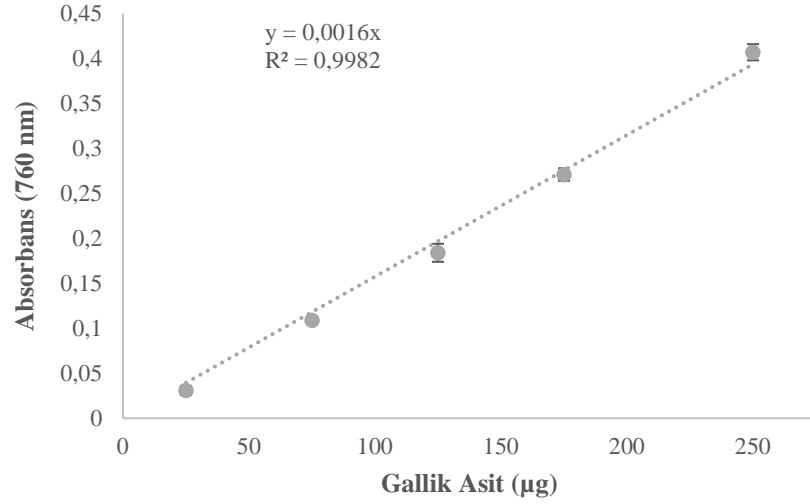
Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin; Chlorazol Black, Orange G, Naphthol Blue Black, Brilliant Green, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red, Brilliant Blue ve Azure A sentetik boya örneklerinde renk giderimi tayin sonuçları % olarak Çizelge 38’de verilmiştir.

**Çizelge 38.** Manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi.

<b>SENTETİK BOYA</b>	<b>5 Dakika</b>	<b>60 Dakika</b>	<b>24 Saat</b>
<b>Chlorazol Black</b>	%8,9	%36,5	%37,1
<b>Orange G</b>	%24,2	%43,5	%42,4
<b>Naphthol Blue Black</b>	%11,1	%44,2	%44,5
<b>Brilliant Green</b>	%46,2	%99,4	%100
<b>Sunset Yellow</b>	%27,3	%46,6	%46,6
<b>Trypan Blue</b>	%20,8	%44,2	%44,7
<b>Fast Green</b>	%25,4	%55,7	%54,2
<b>Congo Red</b>	%36,8	%45,2	%45,8
<b>Brilliant Blue</b>	%77,5	%96,9	%100
<b>Azure A</b>	%22,8	%40,4	%41,4

#### 4.27. Gallik Asit Standart Grafiği

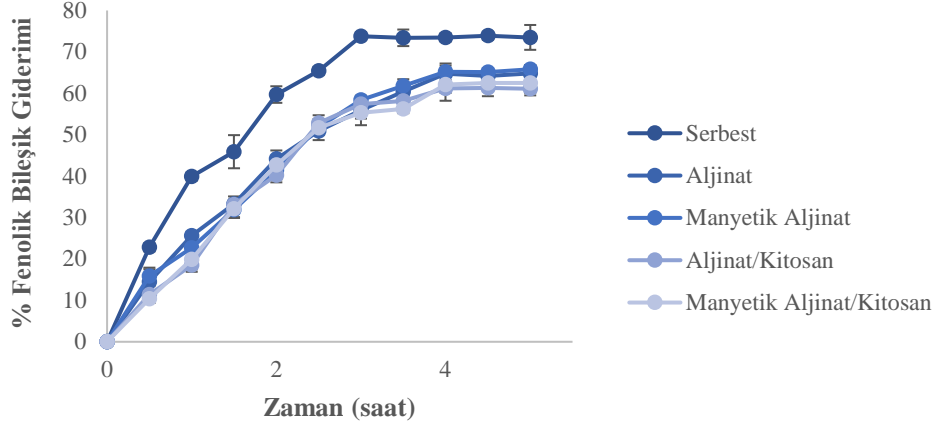
Zeytin karasuyundan total fenolik bileşik gideriminin hesaplanabilmesi için hazırlanan 0-250 µg gallik asit aralığındaki gallik asit standart grafiği Şekil 114'te verilmiştir.



Şekil 114. Gallik asit standart grafiği ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.28. Serbest HRP Enziminin ve Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyundan Total Fenolik Bileşik Giderimi

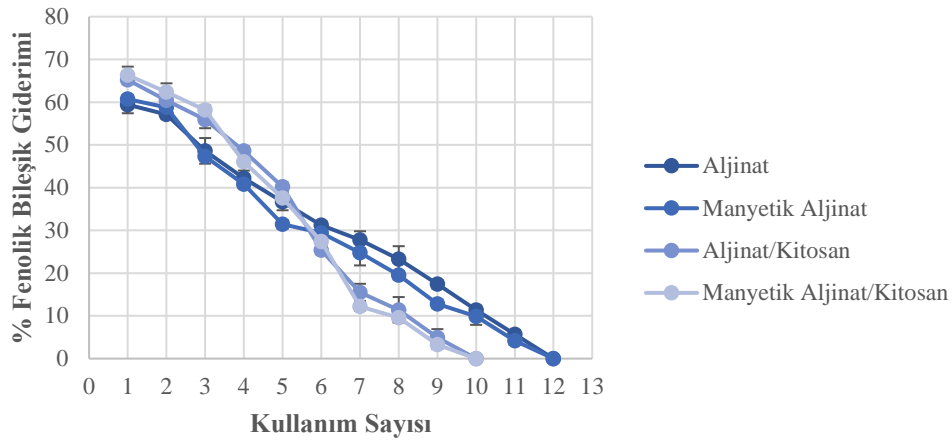
Total fenolik bileşik giderimi tayini sonucunda serbest HRP enziminin 3 saat sonunda maksimum %73,8 total fenolik bileşik giderdiği ve 5 saatin sonunda da bu değerin aynı kaldığı görülmüştür. Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 4 saat sonunda maksimum total fenolik bileşik giderimine ulaşarak sırasıyla %64,7; %65,2; %61,2 ve %62,1 giderim yaptığı ve bu değerlerde sabit kaldığı saptanmıştır. Serbest HRP enziminin ve lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin total fenolik bileşik giderimi Şekil 115'te gösterilmiştir.



**Şekil 115.** Serbest HRP enziminin ve lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin total fenolik bileşik giderimi (HRP: 0,4 mg/mL;  $T=25$  °C).

#### 4.29. Lipaz ile Ko-immobilize Edilmiş HRP Enziminin Zeytin Karasuyundan Total Fenolik Bileşik Gideriminde Tekrar Kullanılabilirliği

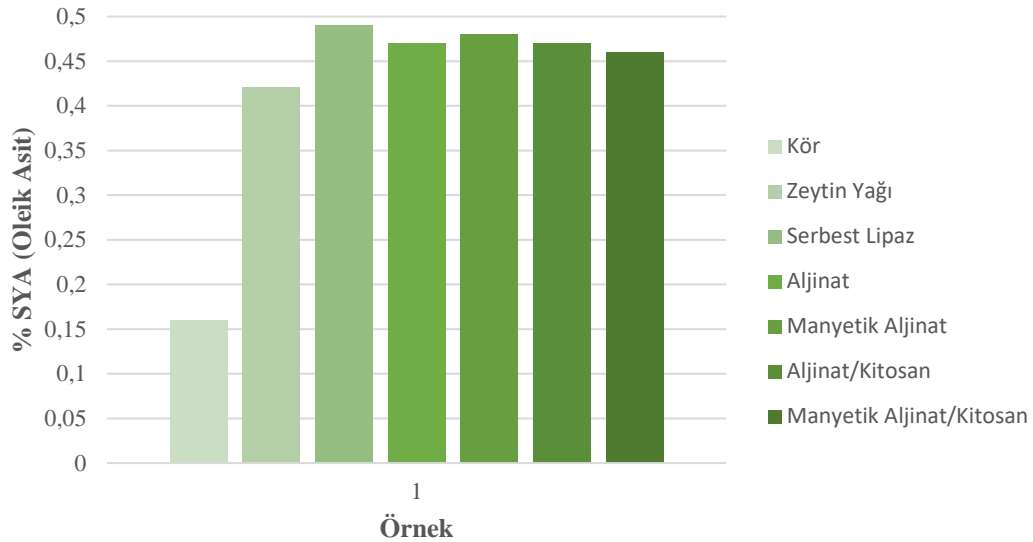
Total fenolik bileşik gideriminde tekrar kullanılabilirliğin belirlenmesi için yapılan denemeler sonucunda aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 12 tekrar kullanım sayısı gösterdiği bulunmuştur. Aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 10 tekrar kullanım sayısı gösterdiği saptanmıştır. Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin fenolik bileşik giderimi için kullanım sayısı Şekil 116'da sunulmuştur.



**Şekil 116.** Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin total fenolik bileşik giderimi için kullanım sayısı (HRP: 0,4 mg/mL;  $T=25$  °C).

#### 4.30. Serbest Lipaz Enzimi ve HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidroliz Kapasiteleri

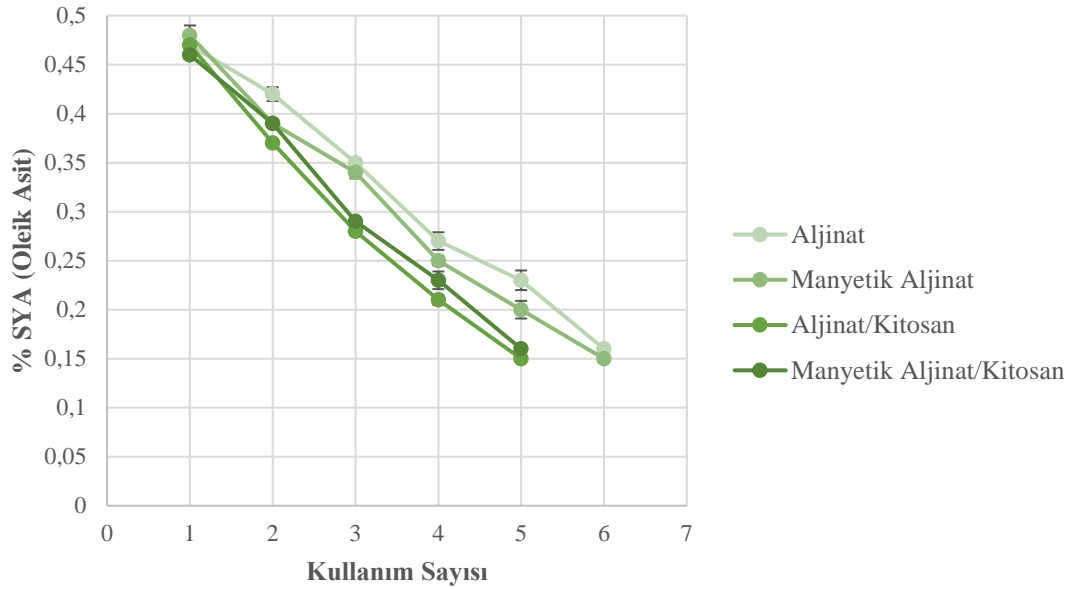
Tayin sonucunda saf zeytinyağı için hesaplanan serbest yağ asidi (SYA) miktarı oleik asit cinsinden %0,16 olarak bulunmuştur. Saf zeytinyağının serbest lipaz ile hidroliz reaksiyonu sonucunda hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden %0,42 olarak bulunmuştur. Reaksiyon ortamına zeytin karasuyu eklendikten sonra lipaz ile reaksiyon sonrasında hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden %0,49 olarak bulunmuştur. Serbest lipaz enzimi ve HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidroliz kapasiteleri Şekil 117’de verilmiştir. Ayrıca aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enzimi ile reaksiyonu sonucunda hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden sırasıyla %0,47; %0,48; %0,47 ve %0,46 olarak bulunmuştur.



**Şekil 117.** Serbest lipaz ve HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidroliz kapasiteleri (SYA: Serbest Yağ Asidi) (Lipaz: 0,4 mg/mL;  $T=25$  °C).

#### 4.31. HRP ile Ko-immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin Zeytin Karasuyunda Yağ Hidrolizinde Tekrar Kullanılabilirliği

Yağ hidrolizinde tekrar kullanılabilirliğin belirlenmesi için yapılan denemeler sonucunda aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin 5 tekrar kullanım sayısı gösterdiği bulunmuştur. Aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin ise 4 tekrar kullanım sayısı gösterdiği saptanmıştır. HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidrolizi için kullanım sayısı Şekil 118’de verilmiştir.



**Şekil 118.** HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidrolizi için kullanım sayısı (SYA: Serbest Yağ Asidi) (Lipaz: 0,4 mg/mL;  $T=25$  °C).

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasını yapmanın temel amacı, yaban turbu peroksidazı (HRP) ve *Aspergillus niger* lipazı enzimlerinin ko-immobilizasyonunu gerçekleştirmek, optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametrelerini belirlemek, ayrıca termal kararlılık, pH kararlılığı ve depo kararlılıklarını tayin ederek endüstriyel kullanıma uygun olup olmadıklarını tartışmak olmuştur. Çalışmada özellikle endüstriyel atık sulardaki en yaygın kirleticiler olan sentetik boyar maddeler, fenolik bileşikler ve yağlar hedeflenmiştir. Bunun için yapılan literatür taraması sonucunda seçilen kirleticilerden, sentetik boyar madde ve fenolik bileşiklerin gideriminde sıklıkla tercih edilen yaban turbu peroksidazı (HRP) enzimi kullanılmıştır. Endüstriyel atık sularda bulunan diğer bir kirletici olan yağların giderimi için de *Aspergillus niger* lipaz enzimi seçilmiştir. Endüstriyel atık su örneği olarak hedef kirleticilerden fenolik bileşikler ve yağ içeren, bu sebeple dünya genelinde kontrolsüz olarak çevreye ve özellikle su kaynaklarına bırakılması durumunda tehdit oluşturan, zeytin karasuyu kullanılmıştır (Justino vd., 2012; Paraskeva ve Diamadopoulou, 2006). Her iki enzimin de serbest ve immobilize formları ile yapılan çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Fakat iki enzimin aynı taşıyıcıya birlikte immobilize edildiği ko-immobilizasyon çalışmasına literatürde rastlanmamıştır. Literatür incelendiğinde genellikle ko-immobilizasyon çalışmalarında kullanılan enzimler ardışık reaksiyonları katalizleyen enzimler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yani çalışmada kullanılan bir enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünü diğer enzimin substratı olmaktadır. Bu duruma verilebilecek en iyi örnek glukoz tayini için biyosensör tasarlanan çalışmalarda glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin ko-immobilizasyonudur. W. Jia vd. (2012) ile L. Zhu vd. (2007) yaptıkları çalışmalarda glukoz biyosensöründe kullanılmak üzere glukoz oksidaz ve yaban turbu peroksidazının ko-immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu tez çalışmasında ise ardışık iki reaksiyonu katalizleyen enzimler değil birbirinden bağımsız iki farklı reaksiyonu katalizleyen enzimlerin ko-immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim ko-immobilizasyon çalışmalarına farklı bir bakış açısıyla yapılan bu çalışmanın özellikle atık suların arıtılmasında kullanılmasının yanı sıra ko-immobilizasyonu gerçekleştirilen enzimlerin katalizlediği birçok reaksiyon için de değerlendirilebileceği unutulmamalıdır. Bu açıdan bakıldığında geniş bir alana hitap eden bu çalışmanın literatüre sağlayacağı katkı da değerli olacaktır.

İmmobilizasyon yöntemi ve destek maddesi (taşıyıcı) seçimi enzim immobilizasyon çalışmalarına yön veren iki önemli parametredir. Çalışılması planlanan enzim ve/veya



enzimlerin belirlenmesinin ardından taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi belirlenmelidir. Bu tez çalışmasında enzim ko-immobilizasyonu için taşıyıcı olarak aljinat ve kitosan temelli 4 farklı boncuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Aljinat boncuk oluşumu kalsiyum klorür çözeltisine eklenen sodyum aljinatın yapısında bulunan sodyum iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla yer değiştirmesi sonucunda kalsiyum aljinat jel yapısının oluşması ile gerçekleştirilmiştir (Pasparakis ve Bouropoulos, 2006). Aljinatın kalsiyum klorür içerisine damla damla eklenmesi ile yuvarlak şekilli bir jel yapının oluşması sağlanmış ve bu jel yapı literatürde sıklıkla rastlanan bir ifade olan “boncuk” olarak adlandırılmıştır. Örneğin: Aravindhan vd. (2005), Aybastier vd. (2011), Bedade vd. (2019), Bilici vd. (2019) ile Sahu vd. (2019) yaptıkları çalışmalarda ürettikleri yuvarlak şekilli kalsiyum aljinat jel yapıları boncuk olarak adlandırmıştır. Aljinat/kitosan boncuk oluşumu ise aljinat boncukların yapısında bulunan karboksil grupları ile aynı ortamda bulunan kitosanın yapısında bulunan amin gruplarının polielektrolit kompleks oluşturması sonucunda aljinat boncukların kitosan ile kaplanması yoluyla gerçekleştirilmiştir (Becherán-Marón vd., 2004; Lawrie vd., 2007). Aljinat ve aljinat/kitosan boncukların üretimi sırasında kalsiyum klorür içerisine damlatmadan önce aljinata eklenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküller jel oluşumu sırasında tutuklanarak boncuklara manyetik özellik kazandırmıştır (Bilici vd., 2019; Teotia ve Gupta, 2002).

Boncukların karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) fotoğrafları çekilmiştir. SEM görüntülemesi bu tür polimerik yapıların yüzey morfolojilerini ve boyutlarını belirlemek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Pasparakis ve Bouropoulos, 2006). Cihaz tarafından gönderilen yüksek enerjili elektron demetinin numune yüzeyindeki elektronları uyarma kabiliyetinin numune yüzeyi ile ilişkili olması nedeniyle uyarılan elektronların dönüş sinyalinin işlenmesi ile oluşturulan numune fotoğrafı sayesinde yüzey morfolojisi ve boyut hakkında bilgi toplanır (McMullan, 1995). Boncukların SEM fotoğraflarına (Resim 10-17) bakıldığında aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boş boncukların çaplarının sırasıyla 785, 733, 764, 789 µm; HRP ve lipaz enzimlerinin ko-immobilize edildiği aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncukların çaplarının ise sırasıyla 789, 729, 752, 715 µm olduğu görülmektedir. Boş ve ko-immobilize boncuklar arasında belirgin bir boyut farkı olmayıp tüm boncukların çapları 700-800 µm aralığında bulunmaktadır. Boncukların boyutlardaki küçük farklar µm ölçekte belirlenebilirken mm ölçekte bakıldığında tüm boncuklar için eşdeğer boyutta üretilmiştir demek mümkündür. Bu durum boncukların üretim yönteminin aynı olmasıyla açıklanabilir. Boncukların yüzey morfolojilerine bakıldığında (Resim 10-17) ise aralarında belirgin farklar olmamakla beraber

aljinat/kitosan boncukların yüzeylerinin daha pürüzsüz olduğunu gözlemek mümkündür. Bu sonuç aljinat boncukların yüzeyinin kitosan ile kaplandığı tezini desteklemektedir. Ayrıca manyetik boncukların yüzeylerine 5000 kat büyütülerek bakıldığında bazı yerlerde  $Fe_3O_4$  nanopartiküller olarak yorumlanabilecek 150-200 nm boyutlarında partiküller görülmektedir. Bu görüntü boncukların manyetik özellikte olduğunu destekleyen bir bulgudur.

Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) moleküler yapıdaki kimyasal bağların aydınlatılmasına yardımcı olmak üzere polimerik yapıların karakterizasyonu için sıklıkla kullanılır (Lawrie vd., 2007). Aljinatın ve aljinat boncukların FTIR spektrumları (Şekil 14, 15 ve 18) incelendiğinde aljinatın yapısında bulunan hidroksil gruplarının  $2900\text{ cm}^{-1}$  ile  $3500\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki O-H gerilme titreşiminin bandı görülmektedir (Bedade vd., 2019). Aljinatın karakteristik O-H gerilme titreşiminin  $3247\text{ cm}^{-1}$ 'de vermiş olduğu pikin aljinat boncuk oluşumundan sonra  $3492\text{ cm}^{-1}$ 'e kaydığı ve yoğunlaştığı görülmektedir. Bu değişimin aljinat boncuk oluşumunda yapıya katılan kalsiyum iyonlarının aljinatın yapısındaki oksijenler ile yapmış oldukları etkileşim ve nispeten suyun varlığıyla gerçekleştiği önerilmiştir (Ramos vd., 2018). Aljinat karakteristik piklerinden olan  $COO^-$  gerilme titreşimleri  $1404\text{ cm}^{-1}$  ve  $1598\text{ cm}^{-1}$ 'de pik olarak görülmüştür. Bu pikler aljinatın yapısındaki sodyum iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla yer değiştirmesi ile  $COO^-$  yük yoğunluğunun değişmesi sebebiyle  $1611\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır (Lestari ve Helmiyati, 2020). Ayrıca  $1025\text{ cm}^{-1}$ 'de C-O gerilmesinin piki ve  $800\text{ cm}^{-1}$  ile  $900\text{ cm}^{-1}$  aralığında da mannuronik asidin C-H gerilmesinin bandı görülmektedir. Aljinatın C-O ve C-H karakteristik pik ve bandı, aljinat boncuk oluşumundan sonra  $650\text{ cm}^{-1}$  ile  $1200\text{ cm}^{-1}$  aralığında yoğun olmayan bir bant şeklini almıştır. Kitosanın ve aljinat/kitosan boncukların FTIR spektrumlarına (Şekil 16, 17 ve 19) bakıldığında  $1439\text{ cm}^{-1}$ 'de aljinat kaynaklı O-H bükülmesi ve  $1623\text{ cm}^{-1}$ 'de kitosan kaynaklı N-H bükülmesi görülmektedir (Mauricio-Sánchez vd., 2018). Ayrıca  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  aralığında geniş bir bant şeklinde O-H gerilme titreşimlerini de görmek mümkündür (Melo vd., 2020). Kitosanın karakteristik pik ve bantlarının görülmesi, aljinat boncukların üretimi esnasında reaksiyon ortamında bulunan kitosanın da yapıya katıldığını göstermektedir. Ayrıca manyetik boncukların üretiminde kullanılan  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin karakteristik Fe-O gerilme titreşiminin piki  $687\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir (Kamakshi vd., 2019).

Boncukların mekanik kararlılıklarını belirlemek için yapılan denemede endüstriyel kullanım için hedeflenen enzimlerin immobilizasyonunda kullanılacak olan boncukların çalkalama gibi basit bir mekanik etkiye direnci ölçülmüştür. Bunun için ortama eklenen boncuk sayısı ile işlem sonrasında ortamdan alınan boncuk sayısına göre yüzde hesabı yapılmıştır.

Sonuçlar (Çizelge 28) incelendiğinde  $\text{CaCl}_2$  derişiminin artmasıyla direncin arttığı net bir şekilde görülmektedir. Çünkü kalsiyum aljinat jel oluşumunda  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlayıcı olarak görev almaktadır. Bu yüzden  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının artmasına bağlı olarak daha sıkı bir kalsiyum aljinat jel oluşumu ile mekanik kararlılık da artmaktadır (Rahiminezhad vd., 2020; Ramdhan vd., 2020). Ayrıca  $\text{CaCl}_2$  derişiminin sabit tutulup aljinat derişiminin arttığı durumlarda da direnç artışı görülmektedir. Bu durum ise ortamda jel oluşturabilecek olan yapının yani aljinatın derişiminin artmasıyla jel yoğunluğunda meydana gelen artış ile açıklanabilir (Rahiminezhad vd., 2020; Ramdhan vd., 2020). Yine de bu çalışmanın sonucunda mekanik kararlılık için asıl belirleyicinin  $\text{CaCl}_2$  olduğu söylenebilir. Boncukların kitosan ile kaplanmasının ise mekanik kararlılığa bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

HRP enziminin pyrogallol, pyrogallol red, *o*-dianisidine, guaiacol, fenol, ABTS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi birçok substratı vardır ve literatüre bakıldığında enzim aktivitesi tayinlerinde farklı substratların kullanıldığını görmek mümkündür. Bach vd. (2013), Monier vd. (2010), Raghu vd. (2013) ile Šekuljica vd. (2016) yaptıkları çalışmalarda peroksidaz enzim aktivitesini hesaplamak için substrat olarak pyrogallol kullanmıştır. Bu çalışmada da HRP enzim aktivitesinin hesaplanması için substrat olarak pyrogallol seçilmiştir. HRP diğer peroksidazlar gibi katalizlediği reaksiyonda hidrojen peroksiti hidrojen atomu akseptörü, diğer substratı ise hidrojen atomu donörü olarak kullanır. Böylece HRP, pyrogallol varlığında hidrojen peroksiti indirgeyip su oluştururken pyrogallol de yükseltgenmektedir.

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değeri vardır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için sabit enzim derişimi, sabit substrat derişimi ve sabit sıcaklıkta farklı pH değerlerinde aktivite ölçümlerinin yapılması gerekir. Benzer şekilde, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için sabit enzim derişimi, sabit substrat derişimi ve sabit pH değerinde farklı sıcaklıklarda aktivite ölçümlerinin yapılması gerekir.

Bu çalışmada serbest HRP'nin optimum pH'ı 6.0 ve optimum sıcaklığı ise 40 °C bulunmuştur. Benzer şekilde R. Singh vd. (2020) yaptıkları çalışmada HRP'nin optimum pH'ını 6.0 ve optimum sıcaklığını 40 °C bulmuştur. Literatür incelendiğinde HRP enzimi için genellikle benzer optimum pH ve sıcaklık değerlerine rastlanmaktadır. Örneğin, Nayak ve Kale (2020) yaptıkları çalışmada HRP'nin optimum pH'ını 6.4 olarak; Emamdadi vd. (2021) çalışmalarında HRP'nin optimum pH'ını 7.0 ve optimum sıcaklığını 50 °C olarak; Melo vd. (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada HRP'nin optimum pH'ını 7.0 ve optimum sıcaklığını 40 °C olarak; Keshta vd. (2021) çalışmalarında HRP'nin optimum pH değerini 5.6 ve optimum

sıcaklık değerini 40 °C olarak bulmuştur. Bu tez çalışmasında HRP, 10 °C ile 50 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %70 üzerinde aktivite göstermiştir. Ayrıca 60 °C'de %26,4 aktivite gösteren HRP'nin yüksek sıcaklıklarda kısmi aktivite gösterebilen bir enzim olduğu görülmektedir. Optimum pH'ın altında hızlı bir aktivite kaybı yaşayan HRP optimum pH üzerinde ise daha yavaş bir aktivite kaybı göstermiştir. HRP, pH 3.5'ta aktivite göstermezken pH 4.0'te %13,5 aktivite göstermiştir. Bazik bölgede ise pH 11.0'de aktivite göstermeyen HRP, pH 10.5'ta %9,5 aktivite göstermiştir. Sonuçlara bakıldığında HRP'nin asidik ve bazik bölgede yaşadığı aktivite kaybı ve pH 5.5 ile pH 7.5 aralığında %80'in üzerinde aktivite göstermesi dikkate alındığında nötral bölgede daha etkin olduğu sonucuna varılmaktadır. Literatürle karşılaştırıldığında benzer sonuçlara ulaşmak mümkündür. Örneğin, Keshta vd. (2021) HRP'nin aktivite gösterdiği son sıcaklığı 60 °C olarak bulmuştur. Yine bu çalışmada HRP'nin %80 üzeri aktivite gösterdiği pH aralığı 5.0 ile 6.0 olarak tespit edilmiştir. Melo vd. (2020) HRP'nin aktivite gösterdiği son pH değerini 9.0 olarak belirlemiştir. R. Singh vd. (2020) yaptıkları çalışmada HRP'nin 30 °C ile 50 °C sıcaklık aralığında %80 üzeri aktivite gösterdiğini bulmuştur. Bir enzimin aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Enzimler söz konusu olduğunda pH ve sıcaklık, enzimlerin aktivite, stabilite ve kinetik parametrelerini etkilemektedir. Özellikle, enzim aktivitesi, enzimin yapısında bulunan amino asit yan zincirlerinin iyonizasyonundan dolayı pH'dan oldukça etkilenir (Vitolo, 2020). Enzim yapısında bulunan amino asit yan zincirlerinin proton vermesi veya almasına bağlı olarak aktivitede değişimler meydana gelmektedir. Özellikle enzimin katalitik bölgesinde bulunan amino asit yan zincirlerinde iyonizasyon meydana geliyorsa aktivite kaybı daha büyük olmaktadır. Sonuç olarak bir enzimin aktivitesinin pH'dan etkilenmesi enzimin amino asit bileşimine ve üç boyutlu yapısına bağlıdır. Aktivitenin sıcaklıktan etkilenmesi ise biraz farklıdır. Enzimatik katalizde, reaksiyon sıcaklığı arttıkça hem aktivasyon hem de denatürasyon aynı anda meydana gelir. Genel olarak 50-60 °C'ye kadar reaksiyon hızlarındaki artış, termal denatürasyonu aşar bu yüzden bu sıcaklıklara kadar hala aktivite görmek mümkündür. Fakat termofilik enzimler hariç 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda termal denatürasyon baskındır ve bu sıcaklığın üzerinde reaksiyon hızı giderek yavaşlar ve durur. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında HRP için elde edilen optimum pH ve sıcaklık sonuçlarına bakıldığında literatür ile uyumlu olduğunu söylemek mümkündür.

Enzimatik katalizin yorumlanabilmesi için optimum pH ve sıcaklığın yanında kinetik parametrelerin de belirlenmesi gerekmektedir. Özellikle  $V_{max}$  ve  $K_m$ , enzimin nasıl çalıştığını anlamak için önemlidir. Sabit enzim derişiminde, substrat derişiminin artmasıyla artan

reaksiyon hızı enzim substratına doyduğunda sabit hale gelir ve enzim maksimum hızına ulaşmış olur. Enzim maksimum hızına, reaksiyon ortamındaki tüm enzim molekülleri substrat ile enzim-substrat kompleksi oluşturduğunda ulaşır. Maksimum hız Michaelis-Menten eşitliğinde  $V_{max}$  olarak gösterilen kinetik bir ifadedir ve enzimin katalizi ne kadar hızlı gerçekleştirdiği hakkında bilgi verir (Vitolo, 2020).  $K_m$  değeri maksimum hızın yarısındaki substrat derişimidir ve enzimin subtrata olan ilgisinin bir ifadesidir.  $K_m$  değeri ne kadar düşükse enzimin substratına olan ilgisi o kadar yüksek,  $K_m$  değeri ne kadar büyükse enzim substratına olan ilgisi o kadar düşüktür.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri Michaelis-Menten eşitliğini temel alan grafikten hesaplanabileceği gibi Lineweaver-Burk eşitliğini temel alan grafikten de hesaplanabilmektedir. Lineweaver-Burk eşitliği, Michaelis-Menten eşitliğini grafik üzerinde doğrusal hale getirmek için türetilmiş bir eşitlik olup kullanılabilirliği Michaelis-Menten'e göre daha basittir.

Bu çalışmada HRP'nin  $V_{max}$  değeri  $1,76\pm0,08$  mg/mL/dk olarak,  $K_m$  değeri  $17,48\pm0,12$  mg/mL olarak ve spesifik aktivitesi  $172,3\pm0,17$  U/mg olarak bulunmuştur. Emamdadı vd. (2021) pyrogallolü substrat olarak kullandıkları çalışmalarında HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini  $25$  °C sıcaklıkta, pH 6.0'da sırasıyla  $2,308\pm0,002$  mmol/dk ve  $8,739\pm0,001$  mM olarak bulmuştur. Monier vd. (2010) da çalışmalarında pyrogallolü substrat olarak tercih etmiş ve  $37$  °C sıcaklıkta, pH 9.0'da HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $1,153$  mmol/dk/mg ve  $2,235$  mmol/L olarak hesaplamıştır.

Ko-immobilizasyon çalışmalarında özellikle iki farklı reaksiyonu katalizleyen enzimlerin birbirinin hızını ve kendi substratlarına olan ilgilerini nasıl etkilediklerini yorumlayabilmek için birbirleri yanında  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin belirlenmesinin önemli olduğu öngörülmektedir. Bu tez çalışması da bir ko-immobilizasyon çalışması olduğu için HRP'nin birlikte immobilize edileceği diğer enzim olan *Aspergillus niger* lipazının yanında kinetik parametrelerinin nasıl etkileneceğini belirlemek üzere kinetik parametreler lipaz ve lipazın substratının varlığında da hesaplanmıştır. Lipaz varlığında, HRP enzimine ait  $V_{max}$   $1,68\pm0,07$  mg/mL/dk,  $K_m$   $16,66\pm0,19$  mg/mL ve spesifik aktivite  $173,2\pm0,22$  U/mg olarak bulunmuştur. Lipaz ve substratı olan p-nitrofenil laurat varlığında; HRP enzimine ait  $V_{max}$   $1,61\pm0,11$  mg/mL/dk,  $K_m$   $17,36\pm0,25$  mg/mL ve spesifik aktivite  $166,89\pm0,09$  olarak hesaplanmıştır. Literatür incelendiğinde bu iki enzimin birbiri yanında hesaplanmış olan  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerine ulaşamadığı görülmektedir. Sonuçlar kendi içerisinde değerlendirilecek olursa HRP'nin lipaz ve substratının varlığında  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı söylenebilir. Bu sonuca göre HRP, lipaz ve onun substratının varlığından etkilenmeden kendi reaksiyonunu katalizleyebilmektedir.

Benzer sonucun ko-immobilizasyon gerçekleştirildikten sonra da devam etmesi beklenmektedir.

Lipaz enzimleri, bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilmektedir. Endüstriyel çalışmalar incelendiğinde üretim kolaylığı ve ucuz olmaları nedeniyle çoğunlukla mikroorganizma kaynaklı lipazların kullanıldığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında da kullanılan lipaz enziminin kaynağı *Aspergillus niger* adlı bir mantardır. Lipazın doğal substratı açıl gliserollerdir ve lipaz enzimi yağ asidi ile gliserol arasındaki ester bağının hidrolizini katalizler. Literatür incelendiğinde, lipaz çalışmalarında substrat olarak çoğunlukla zeytinyağı ve triolein gibi doğal bileşikler substrat olarak kullanılmasına rağmen p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat gibi yapay substratlar da kullanılmaktadır. Örneğin, Elgharbawy vd. (2018) çalışmalarında p-nitrofenil palmitat; Muley vd. (2021) p-nitrofenil bütirat; El-Ghonemy vd. (2021) p-nitrofenil palmitat; M. Chen vd. (2020) çalışmalarında p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitatı substrat olarak kullanmıştır. Bu çalışmada da *A. niger* lipazının aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak p-nitrofenil laurat kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında *A. niger* lipazının optimum pH değeri 7.0 ve optimum sıcaklık değeri de 45 °C olarak bulunmuştur. Benzer şekilde *A. niger* lipazının Muley vd. (2021) optimum pH'ını 7.0 ve optimum sıcaklığını 40 °C olarak; El-Ghonemy vd. (2021) optimum pH'ını 8.0 ve optimum sıcaklığını 45 °C olarak; R. Zhu vd. (2021) optimum pH'ını 6.5 ve optimum sıcaklığını 35 °C olarak; Souza vd. (2020) optimum pH'ını 6.0 ve optimum sıcaklığını 55 °C olarak; Qian vd. (2020) optimum pH'ını 8.0 ve optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuştur. Bu tez çalışmasında *A. niger* lipazı; 10 °C ile 60 °C arasındaki tüm sıcaklıklarda %50 üzerinde aktivite gösterirken, 70 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta ise %12,6 aktivite göstermiştir. Optimum pH grafiği (Şekil 26) incelendiğinde optimum pH'ın altında ve üstünde eşdeğer sayılabilecek bir aktivite kaybından kaynaklanan ve birçok enzimde karşılaşılabilecek tipik bir çan eğrisi görülmektedir. Bu çan şeklindeki eğri enzimin moleküler konformasyonuna pH etkisinin bir göstergesidir (Vitolo, 2020). *A. niger* lipazı, pH 4.0'te aktivite göstermezken pH 4.5'ta %19,5 aktivite göstermiştir. Bazik bölgede ise pH 11.5'ta aktivite göstermeyen lipaz, pH 11.0'de %13,3 aktivite göstermiştir. Sonuçlar incelendiğinde *A. niger* lipazının asidik ve bazik bölgede yaşadığı aktivite kaybı ve pH 6.0 ile pH 8.5 aralığında %80'in üzerinde aktivite göstermesi nötral bölgede daha etkin olduğunu ifade etmektedir. Literatürle karşılaştırıldığında benzer sonuçlara ulaşmak mümkündür. Örneğin; Quian vd. (2020) çalışmalarında pH 5.0 ve pH 9.0 aralığında %80 üzeri aktivite ayrıca 30 °C ile 60 °C aralığında %60 üzeri aktivite tespit etmiştir.

R. Zhu vd. (2021) yaptıkları çalışmada *A. niger* lipazının aktivite gösterdiği son sıcaklık değerini 55 °C ve en yüksek pH değerini 9.0 olarak bulmuştur.

Bu tez çalışmasında *A. niger* lipazının kinetik parametreleri HRP'nin kinetik parametrelerinin hesaplandığı şekilde Lineweaver-Burk grafiğinin doğru denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. *A. niger* lipazının  $V_{max}$  değeri  $0,12 \pm 0,05$  mM/dk olarak,  $K_m$  değeri  $42,02 \pm 0,33$  mM olarak ve spesifik aktivitesi  $1,36 \pm 0,02$  U/mg bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı kaynaklardan elde edilen lipazların aynı substrat ile benzer  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerine sahip olduğunu görmek mümkündür. Örneğin Elgharbawy vd. (2018) p-nitrofenil palmitatı substrat olarak kullandıkları çalışmalarında pH 8.0 ve 25 °C sıcaklıkta, *Burkholderia cepacia* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $4,91 \pm 1,02$  mM/dk ve  $1,52 \pm 0,25$  mM olarak; *Candida rugosa* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $3,56 \pm 1,02$  mM/dk ve  $1,55 \pm 0,35$  mM olarak; *Rhizopus niveus* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $3,37 \pm 1,32$  mM/dk ve  $1,38 \pm 0,92$  mM olarak; *Candida antartica* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $3,18 \pm 1,02$  mM/dk ve  $1,25 \pm 0,25$  mM olarak; *Aspergillus oryzae* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $2,03 \pm 0,91$  mM/dk ve  $0,61 \pm 0,04$  mM olarak bulmuştur. Tek bir kaynaktan elde edilen lipaz enziminin farklı substratlar kullanılarak hesaplanan kinetik parametreleri incelendiğinde ise daha belirgin farklar olduğu söylenebilir. Bu durum enzimin substrat spesifikliğı ile ilişkilidir (Chahinian vd., 2005; Vitolo, 2020). Osuna vd. (2015) p-nitrofenil propiyonatı substrat olarak kullandıkları çalışmalarında *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 3,6 mM/dk ve 27,2 mM olarak bulmuştur. Muley vd. (2021) çalışmalarında p-nitrofenil bütiratı substrat olarak kullanmış ve pH 8.0 ve 25 °C sıcaklıkta *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $42,87 \pm 0,6$  mmol/dk ve  $0,57 \pm 0,02$  mM olarak hesaplamıştır. *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini, zeytin yağını substrat olarak kullanan R. Zhu vd. (2021) sırasıyla 15,9 mmol/L/dk ve 44,3 g/L olarak; Souza vd. (2020) sırasıyla 2,0 U/mg ve 34,6 mM olarak bulmuştur. Literatür incelendiğinde *A. niger* lipazının p-nitrofenil laurat kullanılarak kinetik parametrelerinin hesaplandığı çalışmaya rastlanmamıştır.

*A. niger* lipazı HRP ile ko-immobilize edileceğinden lipazın kinetik parametrelerinin HRP varlığında nasıl etkileneceğini belirlemek için  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri HRP ve HRP'nin substratı olan pyrogallol varlığında da hesaplanmıştır. HRP varlığında, lipaz enzimine ait  $V_{max}$   $0,12 \pm 0,01$  mg/mL/dk,  $K_m$   $44,44 \pm 0,16$  mg/mL ve spesifik aktivite  $1,37 \pm 0,12$  U/mg olarak bulunmuştur. HRP ve pyrogallol varlığında; lipaz enzimine ait  $V_{max}$   $0,12 \pm 0,01$  mg/mL/dk,  $K_m$   $46,12 \pm 0,29$  mg/mL ve spesifik aktivite  $1,34 \pm 0,08$  olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde *A. niger* lipazının HRP ve pyrogallol varlığında  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinde bir

değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu sonuçla birlikte lipaz ve HRP enzimlerinin birbirlerinin varlığından etkilenmeden aynı ortamda kendi reaksiyonlarını katalizleyebildikleri söylenebilir. Serbest enzimlerden elde edilen bu sonucun ko-immobilizasyon gerçekleştirildikten sonra da devam etmesi beklenmektedir.

İmmobilizasyon, enzimlerin geri kazanımı ve yeniden kullanılmasını kolaylaştırdığı gibi çalışma koşulları altında sıcaklık ve pH gibi ortam şartlarına karşı genellikle daha dayanıklı olmasını sağlar (Nisha vd., 2012). Avantajlarından dolayı enzimlerin immobilize edilerek kullanılması güncel bir konudur. Çalışma koşullarının zorlu olduğu endüstriyel alanlarda immobilize enzimler özellikle tercih sebebidir (Sheldon, 2007). İmmobilizasyonun en büyük dezavantajı ise enzim aktivitesinde yaşanabilecek kayıplardır. Bu yüzden doğru immobilizasyon yönteminin seçimi çok önemlidir. Özellikle kovalent ve çapraz bağlama gibi taşıyıcı ile enzim arasında güçlü kimyasal etkileşimlerin olduğu immobilizasyon yöntemleri enzim aktivitesinde kayıplara neden olabilmektedir (Yang vd., 2014). Bunun nedeni enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanmanın enzimin katalitik merkezinde bulunan amino asitler üzerinden gerçekleşmesidir. Enzimin taşıyıcıya kovalent olarak bağlanması neticesinde yaşanan denatürasyona bağlı aktivite kaybını engellemek için hızlı ve kolay bir yöntem olan tutuklama yöntemi uygun bir tercih olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasında da *A. niger* lipazı ve HRP enzimleri aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara tutuklama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Tutuklama yönteminde taşıyıcı genellikle polimerik bir jeldir ve jelin sentezi sırasında aynı ortamda bulunan enzim taşıyıcıya hapsolmektedir. Bu tez çalışmasında aljinat ve aljinat/kitosan boncukların üretimi sırasında kalsiyum klorür içerisine damlatmadan önce aljinata eklenen HRP ve *A. niger* lipazı enzim molekülleri tutuklanarak boncuklara enzimler immobilize edilmiştir.

Bu çalışmada HRP ve *A. niger* lipazı enzimleri tek olarak immobilize edilmelerinin yanında aynı taşıyıcıya birlikte de immobilize edilmiştir. Literatür incelendiğinde aynı taşıyıcıya iki veya daha fazla enzimin birlikte immobilize edilmesi ko-immobilizasyon olarak tanımlanmaktadır (F. Jia vd., 2014; Costantini vd., 2013; Long vd., 2020; Yu vd., 2021; X. Qiu vd., 2021). Ardışık enzimatik reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ko-immobilizasyonuna özellikle biyosensör çalışmalarında rastlanırken; birbirinden bağımsız enzimatik reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ko-immobilizasyonuna literatürde az rastlanmaktadır. Bu tez çalışmasında birbirinden bağımsız, iki farklı enzimatik reaksiyonu katalizleyen, HRP ve *A. niger* lipazı enzimleri aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan



boncuklara ko-immobilize edilmiştir. HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin ko-immobilizasyonuna literatürde rastlanmamıştır.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında serbest ve immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametrelerinin karşılaştırıldığı görülmektedir (R. Zhu vd., 2021; Aldhahri vd., 2021; Bedade vd., 2019; Zhang vd., 2020; Sulym vd., 2021). Bu karşılaştırmanın amacı enzimin serbest halde ölçülen optimum pH, optimum sıcaklık,  $V_{max}$  ve  $K_m$  gibi parametrelerinin immobilizasyondan ne kadar etkilendiğini belirlemektir. Yapılan karşılaştırma neticesinde immobilizasyon yönteminin enzim için uygun olup olmadığı, immobilizasyondan sonra enzimin beklenen aktiviteyi gösterip göstermediği ve immobilize enzimin ortam şartlarına dayanıklı olup olmadığı hakkında bilgi edinilmektedir. Özellikle ortam şartlarının değişken olduğu endüstriyel atık sular ve benzeri örneklerde kullanılması hedeflenen immobilize enzimler için bu karşılaştırma daha da önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında da serbest, immobilize ve ko-immobilize enzimlerin optimum pH, optimum sıcaklık,  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri karşılaştırılmıştır.

Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değerleri sırasıyla 6.0; 6.0; 5.5 ve 5.5 olarak; optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40 °C; 40 °C; 45 °C ve 45 °C olarak tespit edilmiştir. Aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilen HRP'nin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin serbest HRP enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri ile kıyaslandığında değişmediği, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilen HRP'nin optimum pH değerlerinde 0.5 birim azalma; optimum sıcaklık değerlerinde 5 °C artış olduğu görülmektedir. Aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilen HRP'nin optimum pH değerindeki azalmanın ve optimum sıcaklık değerindeki artışın boncukların kitosan ile kaplanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Ramdhan vd., 2020). Bu tespit, boncukların kitosan ile kaplanması sonucu taşıdıkları enzimlerin pH ve sıcaklık gibi ortam şartlarına karşı daha dayanıklı olabileceğine işaret etmektedir (Bedade vd., 2019). Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP'nin  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,29±0,12; 1,23±0,08; 1,13±0,13 ve 1,03±0,22 mg/mL/dk olarak;  $K_m$  değerleri de sırasıyla 25,95±0,61; 25,38±0,84; 34,28±1,21 ve 36,94±0,98 mg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar serbest HRP ile karşılaştırıldığında HRP'nin immobilize edildikten sonra maksimum hızının ve substratına olan ilgisinin azaldığı görülmektedir. İmmobilizasyon ile enzimin boncuk içerisine hapsolması sonucunda substratın enzime ulaşması kısıtlanmış ve yavaşlamıştır. Bu yüzden, substratına ulaşamayan enzimin hızı

düşmüş ve aynı sebepten dolayı substratına olan ilgisi azalmıştır (Brena ve Batista-Viera, 2006; Vitolo, 2020). Literatür örnekleri HRP için bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Jiang vd. (2014) hidrojen peroksiti substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 7.0 ve 25 °C sıcaklıkta serbest HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 2,53 mM/dk ve 1,98 mM olarak; aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 0,53 mM/dk ve 8,21 mM olarak bulmuştur. Melo vd. (2020) guaiacolu substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 6.0 ve 25 °C sıcaklıkta serbest HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $5,07 \pm 0,11$  mM/dk ve  $17,78 \pm 0,68$  mM olarak; kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $3,82 \pm 0,15$  mM/dk ve  $18,28 \pm 1,28$  mM olarak; kitosan/poliyetilen glikol boncuklarda immobilize edilmiş HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $4,11 \pm 0,01$  mM/dk ve  $19,92 \pm 0,04$  mM olarak bulmuştur. Spasojević vd. (2014) substrat olarak pyrogallol kullanılan çalışmada pH 7.0 ve 25 °C sıcaklıkta serbest HRP'nin  $K_m$  değerini 2,24 mM; aljinat boncuklarda immobilize HRP'nin  $K_m$  değerini 4,86 mM olarak bulmuştur. Lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP'nin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin tek başına immobilize edilmiş HRP'nin değerleri ile neredeyse aynı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP'nin serbest ve tek başına immobilize edilmiş HRP'ye benzer kinetik özellikler gösterdiği söylenebilir.

İmmobilize lipaz enziminin tüm boncuk türlerinde optimum pH değeri 6.5; optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak bulunmuştur. İmmobilize lipaz enziminin optimum pH değeri serbest lipaz enziminin optimum pH değeri ile karşılaştırıldığında 0.5 birim azaldığı görülmektedir. Literatürde lipazın immobilizasyon sonrasında optimum pH değerinin 0.5-1.0 birim azaldığını gösteren örnekler vardır. Muley vd. (2021) yaptıkları çalışmada serbest *A. niger* lipazının optimum pH değerini 7.5; gluteraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiş lipazın pH değerini 6.0 olarak bulmuştur. Qian vd. (2020) serbest *A. niger* lipazının optimum pH değerini 8.0; sodyum tripolifosfat ile çapraz bağlanmış immobilize lipazın optimum pH değerini 7.5 olarak bulmuştur. Optimum pH değerindeki bu azalma kalsiyum aljinat gibi katyonik karakterli bir taşıyıcının enzimi reaksiyon ortamından ayırması neticesinde boncuk içindeki ve dışındaki ortamın farklı pH değerlerine sahip olabileceği görüşü ile açıklanabilir (Alemzadeh ve Nejati, 2009). İmmobilize lipaz enziminin optimum sıcaklık değeri serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık değeri ile karşılaştırıldığında 5 °C arttığı görülmektedir. Literatürde bu durumun örneklerine rastlanmıştır. Abdulla vd. (2017) serbest *Bulkholderia cepacia* lipazının optimum sıcaklığını 40 °C olarak; yumurta kabuğu kullanarak ürettikleri membranda immobilize ettikleri lipazın optimum sıcaklığını 45 °C olarak bulmuştur.

El-Ghonemy vd. (2021) serbest *A. niger* lipazının optimum sıcaklığını 45 °C olarak; agaroz jelde immobilize edilmiş lipazın optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuştur. C. Işık vd. (2021) *Acinetobacter haemolyticus* lipazının serbest halde optimum sıcaklığını 45 °C; yumurta kabuğundan üretilmiş membranda immobilize edilmiş lipazın optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuştur. Muley vd. (2021) serbest *A. niger* lipazının optimum sıcaklığını 45 °C; immobilize lipazın optimum sıcaklığını 50 °C bulmuştur. Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat kitosan boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,09±0,012; 0,08±0,016; 0,05±0,009 ve 0,02±0,018 mM/dk olarak;  $K_m$  değerleri de sırasıyla 49,94±0,99; 55,24±1,45; 60,13±1,41 ve 82,37±1,62 mM olarak bulunmuştur. HRP enziminin sonuçlarına benzer bir şekilde lipaz enziminin immobilize edildikten sonra maksimum hızının ve substratına olan ilgisinin azaldığı görülmektedir. Literatürde benzer sonuçlar görmek mümkündür. C. Işık vd. (2021) p-nitrofenil palmitatı substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 8.0 ve 37 °C sıcaklıkta serbest *Acinetobacter haemolyticus* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 8,97 U/mg ve 0,38 mM; yumurta kabuğundan üretilen membranda immobilize edilmiş lipazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 6,88 U/mg ve 0,45 mM olarak bulmuştur. Muley vd. (2021) p-nitrofenil bütiratı substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 7.0 ve 37 °C sıcaklıkta serbest *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 42,87±0,6 mM/dk ve 0,57±0,02 mM; glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiş lipazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 35,74 mM/dk ve 0,62±0,02 mM olarak bulmuştur. Osuna vd. (2015) p-nitrofenil propiyonatı substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 8.0 ve 37 °C sıcaklıkta serbest *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini sırasıyla 3,6 mM/dk ve 27,2 mM; kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş lipazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 2,9 mM/dk ve 23,9 mM olarak bulmuştur. R. Zhu vd. (2021) zeytinyağını substrat olarak kullandıkları çalışmada pH 6.4 ve 34 °C sıcaklıkta serbest *A. niger* lipazının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 15,9 mmol/L/dk ve 44,3 g/L; glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiş lipazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 15,7 mmol/L/dk ve 60,0 g/L olarak bulmuştur. HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri incelendiğinde tek başına immobilize edilmiş lipaz enziminin değerleri ile benzer olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre HRP ile ko-immobilize edilmiş lipazın serbest ve tek başına immobilize edilmiş lipaz enzimine benzer kinetik özellikler gösterdiği söylenebilir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde serbest HRP ve lipaz enzimlerinin birbiri yanında gösterdikleri uyumun ko-immobilizasyondan sonra da devam ettiğini söylemek mümkündür.

Enzim immobilizasyonunun önemi vurgulanırken; tekrar kullanılabilirlik, ısıl kararlılık, pH kararlılığı ve depo kararlılığı gibi parametreler ön plana çıkmaktadır. İmmobilize bir enzimin tekrar kullanılabilirliği, ilgili reaksiyonda o enzimin kaç kere kullanılabileceğini ifade eder. Serbest enzimin tekrar kullanılabilmesi mümkün değildir çünkü reaksiyon ortamından enzimin geri kazanımı zor ve maliyetli bir işlemdir. Zaten bu yüzden enzim immobilizasyonunun en önemli avantajı enzimin tekrar kullanılabilir olmasıdır (Vitolo, 2020; Nisha vd., 2012). İmmobilize enzimler için önemli olan diğer parametreler pH ve ısıl kararlılıktır. İmmobilize enzimin pH ve ısıl kararlılığı, sabit pH ve sıcaklık değerinde enzimin aktivitesini ne kadar koruyabildiğini gösteren değerlerdir. Özellikle reaksiyon şartlarının sert olduğu endüstriyel örneklerde immobilize enzimlerin pH ve ısıl kararlılığın bilinmesi önemlidir (Verma vd., 2012; Nisha vd., 2012). İmmobilize enzimler için önemli olan bir diğer parametre depo kararlılığıdır. İmmobilize enzimin depo kararlılığı, enzimin immobilize olarak depolama şartlarında ne kadar süre aktivitesini koruyabildiğini gösterir. Tüm bu parametrelerin belirlenmesi immobilizasyon çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır (Sahu vd., 2019; Mohamed vd., 2013; Lu vd., 2016; S. Liu vd., 2020; Keshta vd., 2021; El-Ghonemy vd., 2021; Osuna vd., 2015; R. Zhu vd., 2021; S. Wang vd., 2015; Sulym vd., 2021).

Serbest HRP ve lipaz enzimlerinin pH kararlılık denemesi sonuçlarına (Şekil 94 ve 95) göre asidik ve bazik pH değerlerine gidildikçe aktivite kaybı olduğu görülmektedir. Bu durum enzimin amino asit bileşimine bağlı olarak özellikle katalitik bölgesinde bulunan amino asit yan zincirlerinde ortam pH değişikliği ile meydana gelen iyonizasyon sonucunda enzimin aktivite kaybı yaşaması ile açıklanabilir (Vitolo, 2020). İlâveten her iki enzim de optimum pH değerlerinde başlangıç aktivitelerini uzun süre korumuştur. Serbest HRP enziminde görüldüğü üzere optimum pH değeri olan 6.0'da ve ona yakın bir değer olan pH 7.0'de 10 saatin sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin %11,2'sini ve %10,2'sini koruyabilmiştir. Fakat serbest HRP enziminin pH 3.0; pH 4.0 ve pH 9.0'da sırasıyla 3 saat, 5 saat ve 7 saatin sonunda aktivitesi sıfırlanmıştır. İmmobilize HRP enziminin pH kararlılık grafiklerine (Şekil 96, 98, 100 ve 102) bakıldığında benzer sonuçlar görülmektedir. Fakat immobilize enzimlerde başlangıç aktivitelerinin sıfırlanması daha uzun sürede gerçekleşmiştir. Örneğin, pH 3.0'te 3 saatte sıfırlanan serbest HRP aktivitesi, aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminde 4 saatte; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminde 5 saatte sıfırlanmıştır. Benzer şekilde pH 9.0'da 7 saatte sıfırlanan serbest HRP aktivitesi, immobilize HRP enziminde 8 saatte sıfırlanmıştır. İlâveten serbest HRP enziminin optimum pH değeri olan 6.0'da 10 saatin sonunda %11,2 aktivite görülürken,

immobilize HRP enziminde aynı şartlarda 10 saatin sonunda başlangıç aktivitesi %20'nin üzerinde bulunmuştur. B. Chen vd. (2021) titanyum oksit nanopartiküllere immobilize ettikleri HRP enziminin pH 3.0'te 1 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %45'ini koruduğunu fakat serbest HRP enziminin aynı pH değerinde 1 saatin sonunda %25 aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada pH 9.0'da 1 saatin sonunda serbest enzim %45, immobilize enzim %80 aktivite göstermiştir. İlâveten optimum pH olan pH 7.0'de serbest ve immobilize enzim 1 saatin sonunda başlangıç aktivitesini korumuştur. Bu tez çalışmasında serbest lipaz enziminin pH kararlılık denemesi sonucunda pH 3.0'te 75 dakika; pH 4.0'te 90 dakika ve pH 9.0'da 120 dakika sonunda aktivitesi sıfırlanmıştır. İlâveten, optimum pH değeri olan pH 7.0'de 8 saat aktivitesini korumuştur. Aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin pH 7.0'de 9 saat; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin 10 saat sonunda aktivitesini sıfırlanmıştır. Aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin pH 3.0'te 90 dakika; pH 4.0'te 2 saat ve pH 9.0'da 4 saat sonra aktivitesi sıfırlanmıştır. Aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin pH kararlılık sonuçları ise HRP enziminin sonuçlarına benzer bulunmuştur. Örneğin, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin aktivitesi pH 3.0'te 120 dakika; pH 4.0'te 3 saat ve pH 9.0'da 5 saatin sonunda sıfırlanmıştır. Benzer sonuçlara literatürde rastlanmıştır. Örneğin R. Zhu vd. (2021) glutraldehit ile çapraz bağladıkları *A. niger* lipazının pH 4.0'te 2 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %85'i korunurken serbest lipazın aktivitesi aynı koşullarda %15'e düşmüştür. Sulym vd. (2021) çalışmalarında modifiye çok duvarlı karbon nanotüplere *Candida antarctica* lipazını immobilize etmiştir. Yapılan denemeler sonucunda serbest lipazın pH 7.0'de 3 saatin sonunda %20 aktivitesinin kaldığı; immobilize lipazın ise %65 aktivite gösterdiği bulunmuştur. C. Işık vd. (2021) *Acinetobacter haemolyticus* lipazının yumurta kabuğundan ürettikleri membranda immobilizasyonunu yapmıştır. Aynı çalışmada serbest lipazın pH 7.0'de aktivitesi 1 saatin sonunda %58; immobilize lipazın %100 ölçülmüştür. Ayrıca pH 3.0'te serbest lipazın aktivitesi 1 saatin sonunda sıfırlanırken immobilize lipazın aktivitesi %20 olarak hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde özellikle kitosan ile kaplanmış boncuklarda enzimin pH değişikliklerine karşı daha kararlı olduğu görülmektedir. Öte yandan büyük ölçekli endüstriyel örneklerde immobilize enzimin uzun süre reaksiyon ortamında kalması gerekebilmektedir. Bu nedenle immobilize enzimin ortam şartlarında belirli sürelerde yaşayabileceği aktivite kayıplarını öngörmek için pH ve ısı kararlılık çalışmaları literatürde önemli bir yer tutmaktadır (Kirk vd., 2002).

Serbest HRP ve lipaz enzimlerinin ısıl kararlılık sonuçlarına göre (Şekil 84 ve 85) sıcaklık artışıyla doğru orantılı olan bir aktivite kaybı görülmektedir. Bu durum sıcaklığa bağlı protein denatürasyonu ile açıklanabilir. Enzimler protein yapıdadır ve termofilik mikroorganizmalardan saflaştırılan enzimler hariç genellikle 60 °C sıcaklık ve üzerinde tersiyer yapılarındaki bozulma nedeniyle denatürasyona uğrarlar (Vitulo ,2020). Yaşanan denatürasyon sebebiyle katalitik merkezde meydana gelen yapısal bozulmalar sonucunda enzim aktivitesini kaybeder. Serbest HRP enziminde de görüldüğü üzere 20 °C gibi düşük bir sıcaklık değerinde 10 saatin sonunda hala başlangıç aktivitesinin %13,2'si korunurken 60 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta 90 dakikanın sonunda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir. İmmobilize HRP enziminin ısıl kararlılık grafiklerine (Şekil 86, 88, 90 ve 92) bakıldığında da serbest enzime benzer şekilde sıcaklık artışıyla orantılı bir aktivite kaybı görülmektedir. Aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edilmiş HRP enzimi 60 °C sıcaklıkta serbest enzime benzer sonuçlar göstermiştir. Fakat 20 °C sıcaklıkta 10 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %13,2'si kalan serbest HRP enziminin aljinat boncuklarda immobilize edildikten sonra başlangıç aktivitesinin %18,4'ü ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edildikten sonra başlangıç aktivitesinin %20,4'ü korunmuştur. Serbest HRP enziminin 60 °C sıcaklıkta 90 dakikanın sonunda aktivitesinin sıfırlanmasına karşı aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP 60 °C sıcaklıkta 90 dakikanın sonunda sırasıyla %28,7 ve %25,9 aktivite göstermiştir. Bu durum aljinat boncukların kitosan ile kaplanmasıyla ortam şartlarına karşı daha dayanıklı hale geldiğini göstermektedir. İlâveten aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP 20 °C sıcaklıkta 10 saatin sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin %28,5'unu ve %29,7'sini korumuştur. Literatürde benzer sonuçlar görmek mümkündür. Sahu vd. (2019) grafen oksit/manyetik kitosan boncuklarda HRP immobilizasyonu gerçekleştirmiş ve 35 °C sıcaklıkta 2 saatin sonunda serbest HRP enziminin aktivitesini %60; immobilize enzimin aktivitesini %80 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada 75 °C sıcaklıkta serbest HRP enziminin 2 saat sonunda aktivitesi sıfırlanırken immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %35'ini korumuştur. Mohamed vd. (2013) kitosan boncuklarda HRP immobilizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmada 65 °C sıcaklıkta 15 dakika sonunda serbest HRP enziminin aktivitesini %45 ve immobilize enzimin aktivitesini %75 olarak bulmuştur. Lu vd. (2016) organik nanotüplerde immobilize ettikleri HRP enziminin ısıl kararlılık çalışmasını yapmıştır. Serbest HRP enziminin 55 °C sıcaklıkta 8 saatin sonunda %80'in üzerinde aktivite kaybı yaşadığını; fakat aynı şartlarda immobilize HRP enziminin 14 saatin sonunda başlangıç aktivitesine yakın aktivite gösterdiği bulunmuştur. S. Liu vd. (2020) akrilamid esaslı nanojel kullanarak HRP immobilizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmada serbest

HRP enziminin 60 °C sıcaklıkta 90 dakikanın sonunda aktivitesinin %5'in altına düştüğünü bulmuştur. Aynı çalışmada immobilize enzimin 60 °C sıcaklıkta 90 dakikanın sonunda başlangıç aktivitesinin %25'inin ve 3 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %10'unun korunduğunu bulmuştur. Keshta vd. (2021) çalışmalarında 70 °C sıcaklıkta 30 dakikanın sonunda serbest HRP enziminin aktivitesinin sıfırlandığını ve süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerde immobilize edilmiş HRP'nin aynı koşullarda 30 dakikanın sonunda %25 aktivite gösterdiğini bulmuştur. Lipaz enziminin sonuçlarına bakıldığında benzer sonuçlar görmek mümkündür. Serbest lipaz enziminin 20 °C sıcaklıkta 8 saatin sonunda aktivitesi sıfırlanırken 60 °C sıcaklıkta 75 dakikanın sonunda aktivitesi sıfırlanmıştır. İmmobilize lipaz enzimlerinin sonuçlarına bakıldığında immobilize HRP enziminin sonuçlarına benzer şekilde immobilizasyon ile ısıl kararlılığın arttığını söylemek mümkündür. İmmobilize edilmiş lipazın aktivitesi serbest lipazın aktivitesine benzer şekilde 60 °C sıcaklıkta 75 dakikanın sonunda sıfırlanmıştır. Fakat 20 °C sıcaklıkta 8 saatin sonunda aktivitesi sıfırlanan serbest lipazın, aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda immobilize edildikten sonra 9; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edildikten sonra 10 saatin sonunda aktivitesi sıfırlanmıştır. Bu durum HRP enzimi için olduğu gibi lipaz enzimi için de aljinat boncukların kitosan ile kaplanmasının ısıl kararlılığı arttırdığını göstermektedir. Lipaz enzimi için de immobilizasyon sonucunda ısıl kararlılığın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Abdulla ve Rawindra (2013) *Bulkholderia cepacia* lipazını aljinat/karragenan hibrit matrikste immobilize ettikleri çalışmada serbest lipazın 60 °C sıcaklıkta 1 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %50'sini; immobilize lipazın ise aynı şartlarda başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğunu bulmuştur. El-Ghonemy vd. (2021) *A. Niger* lipazının serbest halde 60 °C sıcaklıkta 1 saatin sonunda aktivitesinin %43,8'ini kaybettiğini fakat agaroz jel membranda immobilize ettikleri lipazın aynı şartlarda başlangıç aktivitesinin %71,6'sını koruduğunu bulmuştur. Osuna vd. (2015) *A. niger* lipazını kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere immobilize ettikleri çalışmada serbest lipazın 50 °C sıcaklıkta 4 saatin sonunda aktivitesinin %50'nin altına düştüğünü ve immobilize lipazın aktivitesinin aynı şartlarda %90'ın üzerinde kaldığını bulmuştur. X. Y. Wang vd. (2015) manyetik kitosan nanopartiküllerde immobilize ettikleri *Thermomyces lanuginosus* lipazının 60 °C sıcaklıkta 3 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin %80'inin korunduğunu; serbest lipazın aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin %65'ini kaybettiğini bulmuştur. Isıl kararlılık denemeleri ile sonucunda elde edilen sonuçlar ve literatürde; benzer çalışmaların sonuçları immobilize olan enzimin yüksek sıcaklık değerlerinde daha kararlı hale geldiği ve aktivitesini daha uzun süre koruduğunu doğrulamaktadır.

Serbest HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin depo kararlılık sonuçlarına (Şekil 104 ve 105) göre serbest HRP enziminin 200 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %22,1'inin korunduğu; serbest lipaz enziminin ise 60 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür. Enzimler tampon gibi sulu ortamlarda pH ve iyon şiddetine bağlı olarak zamana yayılan bir denatürasyona maruz kalırlar (Iyer ve Ananthanarayan, 2008). Enzimde yaşanan denatürasyon ile birlikte enzimin aktivitesi giderek azalır ve sonunda sıfırlanır. Hangi enzimin aktivitesinin sulu ortamda daha erken sıfırlanacağı enzimin katalitik bölgesindeki amino asitlerin pH ve iyon şiddetine ne kadar dayanıklı olduğuna bağlıdır. Elde edilen sonuçlarda HRP enziminin lipaz enzimine kıyasla optimum pH değerindeki tamponda çözelti olarak daha uzun süre depolanabileceği görülmektedir. Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 200 günün sonunda sırasıyla %27,2; %28,8; %30,1; %29,6 aktivite gösterdiği bulunmuştur. Tüm boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin de 75 günün sonunda aktivitesinin sıfırlandığı görülmüştür. Ko-immobilize HRP enziminin 200 günün sonunda kalan aktivitesi serbest enzimin 200 günün sonundaki aktivitesine göre daha yüksektir. Bu sonuçlar enzimin immobilize olarak depolanmasının enzim aktivitesinin korunmasında daha etkili olduğunu göstermektedir. Literatür incelendiğinde benzer sonuçlar görmek mümkündür. R. Zhu vd. (2021) glüteraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiş *A. niger* lipazının 4 °C'de 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %83'ünün korunduğunu serbest enzimin 30 günün sonundaki aktivitesinin ise %25 olduğunu bulmuştur. Suri vd. (2021) kitosan nanokompozit materyalde immobilize edilmiş HRP enziminin +4 °C'de 15 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %75'inin korunduğunu fakat serbest enzimin 15 gün sonunda %41 aktivitesinin kaldığını belirtmiştir. Başka bir çalışmada Sulym vd. (2021) serbest *Candida antarctica* lipazının +4 °C'de 30 günün sonunda %20'nin altına düşen aktivitesinin, enzimin çok duvarlı karbon nanotüpte immobilize edilmesinden sonra 30 gün sonunda %90'ın üzerinde aktivite gösterdiği bulmuştur. R. Singh vd. (2020) poliakrilamid jelde tutuklanmış HRP enziminin +4 °C'de 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin tamamının korunduğunu fakat serbest enzimin 30 günün sonunda %75 aktivitesinin kaldığını belirtmiştir. Sahu vd. (2019) grafen oksit/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin +4 °C'de 90 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %70'inin; serbest enzimin başlangıç aktivitesinin ise %28'inin kaldığını bulmuştur. Osuna vd. (2015) kitosan kaplı manyetik nanopartiküllerde immobilize edilmiş *A. niger* lipazının +4 °C'de 50 günün sonunda aktivitesini %95; serbest enzimin aktivitesini %75 olarak bulmuştur. Benzer şekilde Muley vd. (2021) *A. niger* lipazının glüteraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edildiği çalışmada serbest lipazın +4 °C'de 10 günün sonunda başlangıç



aktivitesinin yarısını kaybettiğini ve immobilize lipazın 16 gün boyunca başlangıç aktivitesinin yarısını koruduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında her iki enzim için de elde edilen depo kararlılığı denemesinin sonuçları ile literatürde karşılaşılan çalışmalar benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikten yola çıkarak, enzimlerin immobilize edilerek depolanmasının aktivite kaybını yavaşlatacağını söylemek mümkündür.

Aljinat ve kitosan gibi doğal polimerler kullanılarak üretilen jel yapıların atık sulardan boya ve ağır metal gibi toksik maddeleri adsorblama yeteneği vardır (Aravindhan vd., 2005). Bu bilgidен yola çıkarak bu tez çalışmasında enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere üretilen aljinat ve aljinat/kitosan boş boncukların sentetik boya adsorbsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Boş boncukların boya adsorbsiyon kapasiteleri immobilize enzim ile yapılan renk gideriminin hesaplanmasında kullanılmıştır. Burada amaç, boş (enzimsiz) boncukların boya adsorbsiyonunu hariç tutarak immobilize HRP enziminin gerçekleştirdiği renk giderimini hesaplayabilmektir. Hesaplamalar sonunda boş boncukların boya adsorbsiyonu %1 ile %5 arasında bulunmuştur. Adsorbsiyon fiziksel bir işlem olduğu için adsorbsiyonu yapan materyalin arttırılması adsorbsiyonun da artmasına neden olacaktır (Aravindhan vd., 2005). Bu tez çalışması serbest ve lipaz ile ko-immobilize olmuş HRP enziminin sentetik boyaların renk giderimine odaklandığı için adsorbsiyon detaylı incelenmemiştir. Boş boncukların boya adsorbsiyon kapasitesi çalışmaları özellikle büyük ölçekli çalışmalar için ileriye dönük geliştirilebilecek bir alandır.

Bu tez çalışmasında endüstriyel atık sulardaki en yaygın kirleticilerden olan sentetik boyaların renk giderimi için serbest ve lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enzimi kullanılmıştır. Bunun için literatür taraması sonucunda endüstriyel atık sularda yaygın olarak bulunan 10 farklı sentetik boya seçilmiştir (Bansal ve Kanwar, 2013; Sudha vd., 2014; R. L. Singh vd., 2015). Kullanılan sentetik boyalardan Brilliant Green ve Brilliant Blue triarilmetan boya; Chlorazol Black, Orange G, Napthol Blue Black, Sunset Yellow, Trypan Blue, Fast Green, Congo Red ve Azure A azo boyadır. Sentetik boyalar organik aromatik bileşiklerdir ve indirgeme potansiyelleri nedeniyle toksiktirler. Azo boyalara adını veren azo (-N=N-) grubu moleküldeki aromatik halkalar arasında bulunur ve elektronların molekülün tamamında delokalize olmalarını sağlar. Böylece daha büyük bir konjuge sistem oluşturarak görünür bölgede ışığın absorblanmasını sağlar (R. L. Singh vd., 2015). Benzer şekilde triarilmetan grubu da molekülün renkli olmasını sağlayan gruptur ve bu gruplar “kromofor” olarak adlandırılırlar (Gholami-Borujeni vd., 2011). Azo ve triarilmetan boyalar genellikle tekstil endüstrisinde kullanılmak üzere üretildikleri için renk verme potansiyelleri oldukça yüksektir. Bu

özelliklerinden dolayı ışık, ısı ve ozona karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca mikroorganizmaların kullanıldığı geleneksel yöntem olan biyolojik atık su arıtımı sentetik boyaların gideriminde yetersiz kalmaktadır (Sudha vd., 2014). Bu nedenle atık sularda daha spesifik ve etkili bir yöntem olan enzimatik arıtım tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasında da oksidatif bir enzim olan HRP enzimi sentetik boyaların renk gideriminde kullanılmıştır. HRP enzimatik olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında sentetik boyayı yükseltgeyerek indirgeme potansiyeli olmayan renksiz bir molekül oluşmasını sağlar. Böylece boyanın rengi ve toksik etkisi bertaraf edilmiş olur (Gholami-Borujeni vd., 2011; Sudha vd., 2014). Serbest HRP enziminin farklı boyalardaki renk giderimi 1 saatte maksimum düzeye ulaşmış ve 24 saat sonra yapılan ölçümlerde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Serbest HRP enzimi ile azo boyalarda 24 saatte %40-60 arası bir renk giderimi sağlanırken triarilmetan boyalarda 24 saatte %100 renk giderimi elde edilmiştir. Benzer sonuçlar lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enzimi ile de elde edilmiştir. Bu da immobilize HRP enziminin lipaz varlığında renk giderim etkisinin değişmediği ve serbest enzim benzeri bir performans gösterdiği anlamına gelmektedir. Jankowska vd. (2021) poliakrilamid bazlı elektrospun fiberlere immobilize ettikleri HRP enzimi ile azo boya Reactive Black 5 örneğinde %70 renk giderimi; triarilmetan boya Malachite Green örneğinde %83 renk giderimi elde etmiştir. Jiang vd. (2014) titanyum partiküllere immobilize ettikleri HRP enzimi ile azo boya Direct Black 38 örneğinde %46,82 renk giderimi elde etmiştir. Preethi vd. (2013) azo boya Acid Blue 113 örneğinde serbest HRP enzimi ile %80 renk giderimi; aljinat boncuklarda immobilize ettikleri HRP enzimi ile %76 renk giderimi sağlamıştır. Literatür örnekleri incelendiğinde farklı sonuçlar görmek mümkündür. Bu durum kullanılan enzim ve boyanın türüne göre değişebildiği gibi, enzim derişimi, boya derişimi, pH ve sıcaklığa göre değişebilmektedir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında renk giderimi denenen boya örnekleri için farklı enzim ve boya derişimlerinde ayrıca farklı pH ve sıcaklık değerlerinde çalışmalar yapılması ileriye dönük bir araştırma alanı olarak görülebilir.

Zeytinyağı üretimi sırasında ortaya çıkan zeytin karasuyu birçok kirletici içeren kompleks bir endüstriyel atık su örneğidir. Özellikle, içerdiği yağ ve fenolik bileşik miktarı diğer endüstriyel atık sular ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Fenolik bileşikler zeytin karasuyunun kirletici karakterinin temelini oluşturur. Çevreye bırakıldığında canlılar için tehlike oluşturan zeytin karasuyunda fenolik bileşik miktarı 80g/L'ye kadar çıkabilmektedir (Barakat vd., 2010). Bu özellikleri nedeniyle zeytin karasuyu bu tez çalışmasında endüstriyel atık su örneği olarak seçilmiştir. Zeytin karasuyunda bulunan askıda katı maddeleri ortamdan uzaklaştırmak için zeytin karasuyu süzölmüştür. Ayrıca total fenolik bileşik tayini içi bu

çalışmada kullanılan yöntem spektrofotometrik olduğu için zeytin karasuyu seyreltilerek kullanılmıştır. Tüm hesaplamalar seyreltmeler dikkate alınarak yapılmıştır. Total fenolik bileşik tayin yönteminde kullanılan Folin-Ciocalteu reaktifinde bulunan fosfomolibdik ve fosfotungustik asit, örnekteki fenolik bileşikler tarafından indirgenirken fenolik bileşikler de yükseltgenmektedir. Bu sayede oluşan mavi-yeşil renk spektrofotometrik olarak 760 nm'de absorpsiyon ölçümü ile belirlenir. Serbest HRP enziminin 5 saat sonunda maksimum %73,8; aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 5 saat sonunda %64,7; %65,2; %61,2 ve %62,1 fenolik bileşik giderdiği hesaplanmıştır. Serbest HRP 3 saat sonunda maksimum giderime ulaşırken ko-immobilize HRP 4 saat sonunda maksimum giderime ulaşmıştır. Bu durum polimerik jel içerisinde tutuklanmış HRP enziminin substratlarına ulaşımının kısıtlanması neticesinde reaksiyon hızının yavaşlaması ile açıklanabilir. Literatür incelendiğinde peroksidaz ve lakkaz gibi oksidatif enzimler kullanılarak endüstriyel atık su örneklerinden fenol ve fenolik bileşik giderimi yapılan çalışmalara rastlamak mümkündür. Örneğin, Sukan ve Sargin (2013) endüstriyel atık su örneğinde, aljinat boncuklarda immobilize ettikleri *Aspergillus oryzae* lakkaz enzimi ile %78; aljinat boncuklarda immobilize ettikleri *Aspergillus oryzae* peroksidaz enzimi ile %50 fenol giderimi elde etmiştir. Sergio vd. (2010) enginar yapraklarından ekstrakte ettikleri peroksidaz enzimi ile zeytin karasuyundan %50 fenolik bileşik giderimi gerçekleştirmiştir. S. Liu vd. (2020) nanoenkapsülasyon yöntemi ile immobilize ettikleri HRP enzimi ile yaklaşık %80 fenol giderimi elde etmiştir. B. Chen vd. (2021) titanyum oksit nanopartiküllere immobilize ettikleri HRP enzimi ile yapay atık su örneğinde %100 fenolik bileşik giderimi elde etmiştir. Benzer şekilde Suri vd. (2021) kitosan ile çapraz bağlanmış grafen oksit nanokompozit üzerinde immobilize ettikleri HRP enzimi ile %100 fenolik bileşik giderimi elde etmiştir. Literatürde karşılaşılan fenolik bileşik giderim çalışmalarında kullanılan enzim, hedeflenen fenolik bileşik, immobilizasyon yöntemi ve atık su örneğinin farklı olmasına bağlı olarak giderimin de farklı olduğu görülmektedir. İlavefen fenolik bileşik gideriminde enzim derişimi, fenolik bileşik derişimi, sıcaklık ve pH gibi ortam şartları da giderim yüzdesine etki etmektedir. Sentetik boya örneklerinde renk giderim çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da ileriye dönük farklı derişim, sıcaklık ve pH değerlerinde denemeler yapılarak fenolik bileşik giderim yüzdesi artırılabilir.

Literatürdeki enzim immobilizasyon çalışmaları incelendiğinde immobilize enzimin kullanım sayısını belirlemek için tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının yapıldığı görülmektedir (R. Zhu vd., 2021; Zhang vd., 2020; Suri vd., 2021; Souza vd., 2020; Qiu vd., 2021; Nadar ve

Rathod, 2019). Burada amaç immobilize enzimin aynı reaksiyonu kaç kez tekrarlayabileceği ve her tekrar sonunda karşılaşılabilecek aktivite kayıplarını belirlemektir. Bu yüzden tekrar kullanılabilirlik denemesinin hedeflenen örnek ile gerçekleştirilmesinin daha doğru olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple immobilize HRP enziminin tekrar kullanılabilirlik denemeleri zeytin karasuyu kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon şartlarının enzime göre ayarlandığı, substratı ile yapılan aktivite ölçümlerine kıyasla daha karmaşık bir ortam olan zeytin karasuyu örneğinde gerçekleştirilen total fenolik bileşik gideriminde tekrar kullanılabilirlik denemesi sonucunda; aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 12 tekrar kullanım sayısı; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 10 tekrar kullanım sayısı gösterdiği saptanmıştır. Serbest enzimin tekrar kullanılabilirliğinin mümkün olmadığı göz önüne alındığında, immobilize HRP enziminin 4 kullanıma kadar %40 üzeri fenolik bileşik giderimi ile iyi bir performans gösterdiği düşünülmektedir.

Lipazlar yağ asitlerinin gliserol veya başka alkoller ile yapmış oldukları ester bağlarının hidroliz reaksiyonunu kataliz ederler. Bu özellikleri neticesinde atık sulardaki yağların hidrolizinde kullanılırlar (Verma vd., 2012). Yağlar atık sularda diğer bileşenlerden farklı olarak su yüzeyinde birikirler. Yağ içeren atık suların kullanılabilir su kaynaklarına bırakılması sonucunda bu yağ su üzerinde birikerek suyun oksijen dengesini bozar ve canlı hayatını tehlikeye atar. Bu tez çalışmasında yağ içeren atık su örneği olarak zeytin karasuyu kullanılmıştır. Atık su arıtım yöntemlerinde sudaki yağın uzaklaştırılması için fiziksel yöntemler pahalı ve yüksek enerji ihtiyacı olan işlemler olduğu için; kimyasal yöntemler ise kullanılan kimyasalların çevreye verdiği zararlar nedeniyle tercih edilmezler. Biyolojik arıtımda ise mikroorganizmaların ortam şartlarından etkilenmesi gibi olumsuzluklar vardır. Enzimatik arıtım yöntemi spesifik ve çevreye zararlı olmaması ile tercih sebebidir (Adulkar ve Rathod, 2015). Lipazların yağları yağ asitlerine hidroliz etmesi bir ön arıtma işlemi olarak kabul edilebilir (Jaganathan vd., 2006). Bu tez çalışmasında da zeytin karasuyunda yağ hidrolizi için serbest ve HRP ile ko-immobilize edilmiş *A. niger* lipazı kullanılmıştır. Zeytin karasuyu %3,5-15 aralığında organik madde içerir. Organik madde miktarının içinde yağlar da mevcuttur. Zeytin karasuyundaki yağ miktarı zeytin türüne ve zeytinin işleme yöntemine göre farklılık göstermektedir (Justino vd., 2012).

Bu tez çalışmasında lipaz enziminin hidroliz kapasitesinin belirlenmesi için zeytin karasuyuna saf zeytinyağı eklenmiş (standart katma) ve titrasyon ile serbest yağ asidi tayini yapılmıştır. Saf zeytinyağı için hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden %0,16;

saf zeytinyağının serbest lipaz ile reaksiyonu sonunda hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden %0,42 olarak bulunmuştur. Sonrasında zeytin karasuyuna saf zeytinyağı eklendikten sonra serbest lipaz ile reaksiyon sonrasında hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden %0,49 olarak bulunmuştur. Ayrıca aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enzimi ile reaksiyonu sonucunda hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden sırasıyla %0,47; %0,48; %0,47 ve %0,46 olarak bulunmuştur. Saf zeytinyağının serbest yağ asidi yüzdesi ile saf zeytinyağı eklenmiş zeytin karasuyunun hesaplanan serbest yağ asidi yüzdesi arasındaki fark zeytin karasuyundaki serbest yağ asidini göstermektedir. Burada amaç serbest ve ko-immobilize lipaz enziminin zeytin karasuyu ortamında yağ hidrolizini gerçekleştirebildiğini görmektir. Sonuçlara bakıldığında hem serbest hem de HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyunda yağ hidrolizi yapabildiği görülmektedir. İlâveten zeytin karasuyunda yağ hidrolizinde tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için yapılan denemeler sonucunda aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin 5; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin ise 4 tekrar kullanım sayısı gösterdiği bulunmuştur. Zeytin karasuyunda yağ hidrolizinin tekrar kullanım sayılarının total fenolik bileşik gideriminin tekrar kullanım sayılarından daha az olması yağın boncuk gözeneklerini tıkaması sonucunda gerçekleşmiş olabilir. Yine de serbest lipaz ile benzer hidroliz kapasitesi gösteren ko-immobilize lipaz enziminin zeytin karasuyu gibi kompleks bir atık su ortamında yağ hidrolizinde/gideriminde beklenen performansı gösterdiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara ko-immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık, optimum pH,  $V_{max}$ ,  $K_m$  değerleri başarıyla belirlenmiştir. İlâveten endüstriyel atık sular için kullanımı hedeflenen ko-immobilize enzimlerin sıcaklık, pH ve depo kararlılıkları belirlenmiştir. Ko-immobilize HRP enziminin sentetik boya örneklerinde renk giderimi ve zeytin karasuyunda total fenolik bileşik gideriminde mantıklı olduğu düşünülen sonuçlar elde edilmiştir. Ko-immobilize lipaz enziminin zeytin karasuyu gibi kompleks bir atık su ortamında yağ hidroliz kapasitesi belirlenmiştir. İlâveten ko-immobilize enzimlerin zeytin karasuyu örneğinde tekrar kullanılabilirlikleri saptanmıştır. Birbirinden bağımsız iki farklı enzimatik reaksiyonu katalizleyen enzimlerin aynı taşıyıcıda ko-immobilize edilmesi ve zeytin karasuyunda total fenolik bileşik giderimi ve yağ hidrolizinde denenmesi sonucunda elde edilen verilerin literatüre sağlayacağı katkının önemli olduğu düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin ko-immobilizasyonu için aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Boncuk üretiminin optimizasyonu farklı  $\text{CaCl}_2$ , aljinat ve kitosan derişimleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve boncukların karakterizasyonu SEM ve FTIR kullanılarak yapılmıştır. Boncuk çaplarının 700-800  $\mu\text{m}$  aralığında olduğu bulunmuştur.

Boncukların mekanik kararlılık denemesi yapılmış ve boncuk üretiminde kullanılan aljinat ve  $\text{CaCl}_2$  derişiminin artmasıyla boncukların mekanik olarak daha kararlı hale geldiği belirlenmiştir.

Serbest HRP enziminin optimum pH değeri 6.0 ve optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak bulunmuştur. Serbest HRP enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayini sonucunda  $V_{\text{max}}$  değeri  $1,76 \pm 0,08$  mg/mL/dk,  $K_m$  değeri  $17,48 \pm 0,12$  mg/mL ve spesifik aktivitesi  $172,3 \pm 0,17$  U/mg bulunmuştur. Serbest lipaz enzimi varlığında, serbest HRP enzimine ait  $V_{\text{max}}$   $1,68 \pm 0,07$  mg/mL/dk,  $K_m$   $16,66 \pm 0,19$  mg/mL ve spesifik aktivite  $173,2 \pm 0,22$  U/mg olarak; serbest lipaz enzimi ve p-nitrofenil laurat varlığında; HRP enzimine ait  $V_{\text{max}}$   $1,61 \pm 0,11$  mg/mL/dk,  $K_m$   $17,36 \pm 0,25$  mg/mL ve spesifik aktivite  $166,89 \pm 0,09$  olarak hesaplanmıştır.

Serbest *A. niger* lipazı enziminin optimum pH değeri 7.0 ve optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak bulunmuştur. Serbest lipaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayini sonucunda  $V_{\text{max}}$  değeri  $0,12 \pm 0,05$  mM/dk,  $K_m$  değeri  $42,02 \pm 0,33$  mM ve spesifik aktivitesi  $1,36 \pm 0,02$  U/mg bulunmuştur. Serbest HRP enzimi varlığında, serbest lipaz enzimine ait  $V_{\text{max}}$   $0,12 \pm 0,01$  mg/mL/dk,  $K_m$   $44,44 \pm 0,16$  mg/mL ve spesifik aktivite  $1,37 \pm 0,12$  U/mg olarak; serbest HRP enzimi ve pyrogallol varlığında, lipaz enzimine ait  $V_{\text{max}}$   $0,12 \pm 0,01$  mg/mL/dk,  $K_m$   $46,12 \pm 0,29$  mg/mL ve spesifik aktivite  $1,34 \pm 0,08$  olarak hesaplanmıştır.

Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda immobilize edilmiş HRP enziminin optimum pH değerleri sırasıyla 6.0; 6.0; 5.5 ve 5.5; optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40 °C; 40 °C; 45 °C ve 45 °C;  $V_{\text{max}}$  değerleri sırasıyla

1,29±0,12; 1,23±0,08; 1,13±0,13 ve 1,03±0,22 mg/mL/dk; Km değerleri de sırasıyla 25,95±0,61; 25,38±0,84; 34,28±1,21 ve 36,94±0,98 mg/mL bulunmuştur.

İmmobilize lipaz enziminin tüm boncuk türlerinde optimum pH değeri 6.5; optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak bulunmuştur. Aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat kitosan boncuklarda immobilize edilmiş lipaz enziminin  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,09±0,012; 0,08±0,016; 0,05±0,009 ve 0,02±0,018 mM/dk; Km değerleri de sırasıyla 49,94±0,99; 55,24±1,45; 60,13±1,41 ve 82,37±1,62 mM bulunmuştur.

HRP ve lipaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, ko-immobilize enzimlerin kinetik parametreleri hesaplanmış ve her iki enzimin de birbirlerinin yanında kendi katalitik reaksiyonlarını sorunsuz bir şekilde gerçekleştirdikleri belirlenmiştir.

Atık su arıtımında kullanılması hedeflenen HRP ve lipaz enzimlerinin hem serbest hem de ko-immobilize olarak pH, sıcaklık ve depo kararlılıkları belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında ko-immobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyasla ortam pH ve sıcaklık değişimlerinde daha uzun süre aktivitelerini koruyabildikleri belirlenmiştir. İlâveten serbest lipazın aktivitesi 60 gün depolamanın sonunda sıfırlanırken immobilizasyon sonucunda 15 gün daha aktivite gösteren lipazın aktivitesi 75 günün sonunda sıfırlanmıştır.

Özellikle tekstil endüstrisinde kullanılan 10 farklı sentetik boya ile boş boncukların adsorpsiyon denemesi ve HRP enziminin renk gideriminin tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre boş boncukların boya adsorpsiyonu %1 ile %5 arasında bulunmuştur. Serbest HRP ve ko-immobilize HRP enzimi ile azo boyalarda 24 saatte %40-60 arası bir renk giderimi sağlanırken triarilmetan boyalarda 24 saatte %100 renk giderimi elde edilmiştir.

Birçok kirleticiyi bir arada içeren kompleks bir endüstriyel atık su örneği olan zeytin karasuyunda total fenolik bileşik giderimi tayini yapılmıştır. Sonucunda serbest HRP enziminin 3 saat sonunda maksimum %73,8 total fenolik bileşik giderdiği; aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklara lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 4 saat sonunda maksimum total fenolik bileşik giderimine ulaşarak sırasıyla %64,7; %65,2; %61,2 ve %62,1 giderim yaptığı saptanmıştır. Total fenolik bileşik gideriminde aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 12 tekrar kullanım sayısı; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda lipaz ile ko-immobilize edilmiş HRP enziminin 10 tekrar kullanım sayısı gösterdiği belirlenmiştir.

Zeytin karasuyu ortamına saf zeytin yağı eklenerek gerçekleştirilen zeytin yağının serbest lipaz enzimi ile yağ asitlerine yıkımı sonrasında hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit

cinsinden %0,49 olarak bulunmuştur. Ayrıca zeytin karasuyu ortamında aljinat, manyetik aljinat, aljinat/kitosan, manyetik aljinat/kitosan boncuklara HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enzimi ile zeytin yağının reaksiyonu sonucunda hesaplanan serbest yağ asidi miktarı oleik asit cinsinden sırasıyla %0,47; %0,48; %0,47 ve %0,46 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar neticesinde ko-immobilize lipaz enziminin zeytin karasuyu gibi kompleks bir ortamda katalitik reaksiyonunu gerçekleştirebildiği görülmektedir. Aljinat ve manyetik aljinat boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin zeytin karasuyu ortamında zeytin yağının yağ asitlerine yıkımında 5 tekrar kullanım sayısı; aljinat/kitosan ve manyetik aljinat/kitosan boncuklarda HRP ile ko-immobilize edilmiş lipaz enziminin ise 4 tekrar kullanım sayısı gösterdiği saptanmıştır.

HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin ko-immobilizasyonunun gerçekleştirildiği ve ko-immobilize enzimlerin endüstriyel atık sularda karşılaşılan sentetik boyalar, fenolik bileşikler ve yağların arıtımında kullanılmasının araştırıldığı bu doktora tez çalışmasında olumlu, verimli ve literatürle benzerlik gösteren sonuçlar elde edilmiştir. HRP ve *A. niger* lipazı enzimlerinin ilk kez ko-immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmanın ileriye dönük benzer çalışmaların önünü açtığı düşünülmektedir. Örneğin, üretilen boncuklarda farklı enzimlerin ko-immobilizasyonunun çalışmaya farklı bir bakış açısı getirebileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde ko-immobilize HRP enziminin renk giderimi farklı sentetik boyalar kullanılarak belirlenebilir. İlaveten bu tez çalışmasında detaylı incelenmeyen boş boncukların boya adsorbsiyon çalışması atık su örneklerinden boya giderimi için geliştirilebilir. Son olarak bu tez çalışmasında ko-immobilizasyonu gerçekleştirilen enzimlerin substrat olarak kullandığı herhangi bir bileşiği içeren atık su örneklerinde kullanılabilmesi umut vadetmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdulla, R., Sanny, S. A., & Derman, E. (2017). Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. In *IOP conference series: materials science and engineering* (Vol. 206, No. 1, p. 012032). IOP Publishing. doi:10.1088/1757-899X/206/1/012032
- Abdulla, R., & Ravindra, P. (2013). Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and  $\kappa$ -carrageenan hybrid matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(4), 545-551. doi:10.1016/j.jtice.2013.01.003
- Adulkar, T. V., & Rathod, V. K. (2015). Pre-treatment of high fat content dairy wastewater using different commercial lipases. *Desalination and Water Treatment*, 53(9), 2450-2455. doi:10.1080/19443994.2013.871582
- Aldahri, M., Almulaiky, Y. Q., El-Shishtawy, R. M., Al-Shawafi, W. M., Salah, N., Alshahrie, A., & Alzahrani, H. A. (2021). Ultra-thin 2D CuO nanosheet for HRP immobilization supported by encapsulation in a polymer matrix: characterization and dye degradation. *Catalysis Letters*, 151(1), 232-246. doi:10.1007/s10562-020-03289-7
- Alemzadeh, I., & Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 1082-1086. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.12.026
- Aravindhan, R., Fathima, N., Rao, J. R., Nair, B. U. (2005). Utilization of calcium alginate beads as adsorbent for removal of dyes from tannery wastewaters. *Journal of American Leather Chemists Association*. 101(6), 217 – 250.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., & Adams, C. D. (2007). Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater. *Chemosphere*, 68(10), 1830-1837. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.045
- Aybastıer, Ö., Şahin, S., Işık, E., & Demir, C. (2011). Determination of total phenolic content in Prunella L. by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Analytical Methods*, 3(10), 2289-2297. doi:10.1039/C1AY05218G
- Aybastıer, Ö., & Demir, C. (2014). Immobilization of Candida antarctica lipase A on chitosan beads for the production of fatty acid methyl ester from waste frying oil. *Energy Sources*,

*Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 36(21), 2313-2319.  
doi:10.1080/15567036.2011.567233

- Bach, C. E., Warnock, D. D., Van Horn, D. J., Weintraub, M. N., Sinsabaugh, R. L., Allison, S. D., & German, D. P. (2013). Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: effect of assay conditions and soil type. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 183-191. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.022
- Bansal, N., & Kanwar, S. S. (2013). Peroxidase (s) in environment protection. *The Scientific World Journal*, 2013. doi:10.1155/2013/714639
- Barakat, N., Makris, D. P., Kefalas, P., & Psillakis, E. (2010). Removal of olive mill waste water phenolics using a crude peroxidase extract from onion by-products. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 271-275. doi:10.1007/s10311-009-0216-z
- Becherán-Marón, L., Peniche, C., & Argüelles-Monal, W. (2004). Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2), 127-133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2004.03.010
- Bedade, D. K., Sutar, Y. B., & Singhal, R. S. (2019). Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: process parameters and removal of acrylamide from coffee. *Food chemistry*, 275, 95-104. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.090
- Bilici, Z., Işık, Z., Aktaş, Y., Yatmaz, H. C., & Dizge, N. (2019). Photocatalytic effect of zinc oxide and magnetite entrapped calcium alginate beads for azo dye and hexavalent chromium removal from solutions. *Journal of Water Process Engineering*, 31, 100826. doi:10.1016/j.jwpe.2019.100826
- Bordin, I., de Aguiar Pedott, V., Oro, C. E. D., Junges, A., Dallago, R. M., & Mignoni, M. L. (2021). Nb-MCM-Type mesoporous material synthesis using ionic solid as structure-directing agent for in situ lipase immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(4), 1072-1085. doi:10.1007/s12010-020-03484-7
- Branco, R. V., Gutarra, M. L., Guisan, J. M., Freire, D. M., Almeida, R. V., & Palomo, J. M. (2015). Improving the thermostability and optimal temperature of a lipase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by covalent immobilization. *BioMed research international*, 2015. doi:10.1155/2015/250532

- Brena, B. M., & Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of enzymes. In *Immobilization of enzymes and cells* (pp. 15-30). Humana press.
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., & Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical biology*, 45(2), 156-161. doi:10.1080/13880200601113131
- Camacho, R. M., Mateos, J. C., González-Reynoso, O., Prado, L. A., & Córdova, J. (2009). Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 901-909. doi:10.1007/s10295-009-0568-1
- Chahinian, H., Ali, Y. B., Abousalham, A., Petry, S., Mandrich, L., Manco, G., ... & Sarda, L. (2005). Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1-3), 29-36. doi:10.1016/j.bbailip.2005.11.003
- Chan, E. S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., ... & Yim, Z. H. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate polymers*, 83(1), 225-232. doi:10.1016/j.carbpol.2010.07.044
- Charoenpanich, J., Suktanarag, S., & Toobbucha, N. (2011). Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Science Asia*, 37(2), 105-114. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2011.37.105
- Chaubey, A., Pande, K. K., Singh, V. S., & Malhotra, B. D. (2000). Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films. *Analytica chimica acta*, 407(1-2), 97-103. doi:10.1016/S0003-2670(99)00797-7
- Chauhan, N., Narang, J., & Pundir, C. S. (2014). Covalent immobilization of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase & horseradish peroxidase onto plasticized polyvinyl chloride (PVC) strip & its application in serum triglyceride determination. *The Indian journal of medical research*, 139(4), 603.
- Chauhan, N., & Pundir, C. S. (2011). Co-immobilization of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase on PVC strip for serum cholesterol determination. *Analytical Methods*, 3(6), 1360-1365. doi:10.1039/C1AY05082F

- Chen, M., Gao, X., Yang, W., Sun, C., Yang, J., Zhang, H., & Song, Y. (2020). Discovery and characterization of a stable lipase with preference toward long-chain fatty acids. *Biotechnology letters*, *42*(1), 171-180. doi:10.1007/s10529-019-02765-4
- Chen, B., Wang, X., Gao, X., Jiang, J., Hu, M., Li, S., ... & Jiang, Y. (2021). DNA directed immobilization of horseradish peroxidase on phase-transitioned lysozyme modified TiO<sub>2</sub> for efficient degradation of phenol in wastewater. *Materials & Design*, *201*, 109463. doi:10.1016/j.matdes.2021.109463
- Costantini, F., Tiggelaar, R., Sennato, S., Mura, F., Schlautmann, S., Bordi, F., ... & Manetti, C. (2013). Glucose level determination with a multi-enzymatic cascade reaction in a functionalized glass chip. *Analyst*, *138*(17), 5019-5024. doi:10.1039/c3an00806a
- Daffodil, E. D., & Mohan, V. R. (2013). Total phenolics, flavonoids and in vitro antioxidant activity of *Nymphaea Pubescens* wild rhizome. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *2*(5), 3710-3722.
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3*(1), 1-9. doi:10.1007/s132-012-0071-7
- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: environmental*, *28*(2), 83-99. doi:10.1016/S0926-3373(00)00168-5
- Egwim, E. C., Adeshina, A. A., Oyewole, O. A., & Okoliegbe, I. N. (2012). Optimization of Lipase immobilised on Chitosan Beads for Biodiesel Production.
- El-Abassy, R. M., Donfack, P., & Materny, A. (2009). Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *86*(6), 507-511. doi:10.1007/s11746-009-1389-0
- El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., Hassanein, N. M., Abdellah, E. M., Fadel, M., Awad, G. E., & Abdou, D. A. (2021). Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *51*(3), 225-240. doi:10.1080/10826068.2020.1805759
- El-Naggar, M. E., Abdel-Aty, A. M., Wassel, A. R., Elaraby, N. M., & Mohamed, S. A. (2021). Immobilization of horseradish peroxidase on cationic microporous starch: Physico-bio-

chemical characterization and removal of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 734-742. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.171

Elgharbawy, A. A., Hayyan, A., Hayyan, M., Rashid, S. N., Nor, M. R. M., Zulkifli, M. Y., ... & Mirghani, M. E. S. (2018). Shedding light on lipase stability in natural deep eutectic solvents. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(3), 359-370. doi:10.15255/CABEQ.2018.1335

Emamdadi, N., Gholizadeh, M., & Housaindokht, M. R. (2021). Investigation of static magnetic field effect on horseradish peroxidase enzyme activity and stability in enzymatic oxidation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 189-195. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.034

Eremin, A. N., Budnikova, L. P., Sviridov, O. V., & Metelitsa, D. I. (2002). Stabilization of diluted aqueous solutions of horseradish peroxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(2), 151-158.

Forgiarini, E., & de Souza, A. A. U. (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1073-1078. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.003

Fuciños, P., Domínguez, A., Angeles Sanromán, M., Longo, M. A., Luisa Rúa, M., & Pastrana, L. (2005). Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species. *Biotechnology progress*, 21(4), 1198-1205. doi:10.1021/bp050080g

Geng, X., Xie, X., Liang, Y., Li, Z., Yang, K., Tao, J., ... & Wang, Z. (2021). Facile Fabrication of a Novel Copper Nanozyme for Efficient Dye Degradation. *ACS omega*, 6(9), 6284-6291. doi:10.1021/acsomega.0c05925

Ghasemi, S., Heidary, M., Faramarzi, M. A., & Habibi, Z. (2014). Immobilization of lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 121-128. doi:10.1016/j.molcatb.2013.12.006

Gholami-Borujeni, F., Mahvi, A. H., Naseri, S., Faramarzi, M. A., Nabizadeh, R., & Alimohammadi, M. (2011). Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. *Res J Chem Environ*, 15(2), 217-222.

- Gustafsson, H., Küchler, A., Holmberg, K., & Walde, P. (2015). Co-immobilization of enzymes with the help of a dendronized polymer and mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(30), 6174-6184. doi:10.1039/c5tb00543d
- Gür, S. D., İdil, N., & Aksöz, N. (2018). Optimization of enzyme co-immobilization with sodium alginate and glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(2), 538-552. doi:10.1007/s12010-017-2566-5
- Haddaji, D., Bousselmi, L., Saadani, O., Nouairi, I., & Ghrabi-Gammar, Z. (2015). Enzymatic degradation of azo dyes using three macrophyte species: *Arundo donax*, *Typha angustifolia* and *Phragmites australis*. *Desalination and Water Treatment*, 53(4), 1129-1138. doi:10.1080/19443994.2014.884475
- Helal, S. E., Abdelhady, H. M., Abou-Taleb, K. A., Hassan, M. G., & Amer, M. M. (2021). Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-13. doi:10.1186/s43141-020-00094-y
- Hoang, D. Q., Tran, T. V., Tran, N. Q., Nguyen, C. K., Nguyen, T. H., Truong, M. D., & Nguyen, D. H. (2016). Functionalization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with biodegradable chitosan-grafted-mPEG for paclitaxel delivery. *Green Processing and Synthesis*, 5(5), 459-466. doi:10.1515/gps-2016-0093
- Işık, E., Şahin, S., Demir, C., & Türkben, C. (2011). Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 944-949. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.016
- Işık, C., Saraç, N., Teke, M., & Uğur, A. (2021). A new bioremediation method for removal of wastewater containing oils with high oleic acid composition: *Acinetobacter haemolyticus* lipase immobilized on eggshell membrane with improved stabilities. *New Journal of Chemistry*, 45(4), 1984-1992. doi:10.1039/d0nj05175f
- Itoyama, K., Tokura, S., & Hayashi, T. (1994). Lipoprotein lipase immobilization onto porous chitosan beads. *Biotechnology progress*, 10(2), 225-229.
- Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. *Process biochemistry*, 43(10), 1019-1032. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.004

- Jamie, A., Alshami, A. S., Maliabari, Z. O., Ali Ateih, M., & Al Hamouz, O. C. S. (2016). Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for oily wastewater treatment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *35*(5), 1441-1449. doi:10.1002/ep
- Jankowska, K., Zdarta, J., Grzywaczyk, A., Degórska, O., Kijeńska-Gawrońska, E., Pinelo, M., & Jesionowski, T. (2021). Horseradish peroxidase immobilised onto electrospun fibres and its application in decolourisation of dyes from model sea water. *Process Biochemistry*, *102*, 10-21. doi:10.1016/j.procbio.2020.11.015
- Jeganathan, J., Bassi, A., & Nakhla, G. (2006). Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials*, *137*(1), 121-128. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.11.106
- Jia, W., Jin, C., Xia, W., Muhler, M., Schuhmann, W., & Stoica, L. (2012). Glucose oxidase/horseradish peroxidase co-immobilized at a CNT-modified graphite electrode: Towards potentially implantable biocathodes. *Chemistry—A European Journal*, *18*(10), 2783-2786. doi:10.1002/chem.201102921
- Jia, F., Narasimhan, B., & Mallapragada, S. (2014). Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: a review. *Biotechnology and bioengineering*, *111*(2), 209-222. doi:10.1002/bit.25136
- Jiang, Y., Tang, W., Gao, J., Zhou, L., & He, Y. (2014). Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. *Enzyme and microbial technology*, *55*, 1-6. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.11.005
- Justino, C. I., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A., Panteleitchouk, T. S., & Duarte, A. C. (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, *21*(2), 615-629. doi:10.1007/s10646-011-0806
- Kalaiarasan, E., & Palvannan, T. (2015). Efficiency of Carbohydrate Additives on the Stability of Horseradish Peroxidase (HRP): HRP-Catalyzed Removal of Phenol and Malachite Green Decolorization from Wastewater. *CLEAN—Soil, Air, Water*, *43*(6), 846-856. doi:10.1002/clen.201300858

- Kamakshi, T., Sundari, G. S., Erothu, H., & Singh, R. S. (2019). Effect of nickel dopant on structural morphological and optical characteristics of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Rasayan J. Chem*, 12(2), 531-536. doi:10.31788/RJC.2019.1225054
- Kanthamneni, N., Sharma, S., Meenach, S. A., Billet, B., Zhao, J. C., Bachelder, E. M., & Ainslie, K. M. (2012). Enhanced stability of horseradish peroxidase encapsulated in acetalated dextran microparticles stored outside cold chain conditions. *International journal of pharmaceuticals*, 431(1-2), 101-110. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.043
- Kaur, A., Taylor, K. E., & Biswas, N. (2021). Soybean peroxidase-catalyzed degradation of a sulfonated dye and its azo-cleavage product. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(2), 423-430. doi:10.1002/jctb.6555
- Kaushik, P., & Malik, A. (2009). Microbial decolourization of textile dyes through isolates obtained from contaminated sites. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 68, 325-331.
- Keshta, B. E., Gemeay, A. H., & Khamis, A. A. (2021). The assisting-approach of horseradish peroxidase immobilized onto amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a biocatalyst. doi:10.21203/rs.3.rs-300199/v1
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2
- Krzyczkowska, J., & Kozłowska, M. (2017). Effect of oils extracted from plant seeds on the growth and lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(5), 661-671. doi:10.1007/s11746-017-2975-1
- Kumar, A., Malhotra, R., Malhotra, B. D., & Grover, S. K. (2000). Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film. *Analytica Chimica Acta*, 414(1-2), 43-50. doi:10.1016/S0003-2670(00)00792-3
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V. K., Banerjee, R., & Dasgupta, S. (2009). Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 13.



- Lang, Q., Yin, L., Shi, J., Li, L., Xia, L., & Liu, A. (2014). Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, *51*, 158-163. doi:10.1016/j.bios.2013.07.021
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, *8*(8), 2533-2541.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, *37*(1), 106-126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- Lestari, I., & Helmiyati, H. (2020). Calcium alginate-TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposite for glucose conversion to 5-hydroxymethylfurfural. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 763, No. 1, p. 012037). IOP Publishing. doi:10.1088/1757-899X/763/1/012037
- Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., ... & Chen, W. R. (2013). Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*. doi:10.1155/2013/387023
- Li, C., Jiang, S., Zhao, X., & Liang, H. (2017). Co-immobilization of enzymes and magnetic nanoparticles by metal-nucleotide hydrogel nanofibers for improving stability and recycling. *Molecules*, *22*(1), 179. doi:10.3390/molecules22010179
- Liang, J. F., Li, Y. T., & Yang, V. C. (2000). Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of pharmaceutical sciences*, *89*(8), 979-990. doi:10.1002/1520-6017(200008)89:8
- Liu, W., Wang, L., & Jiang, R. (2012). Specific enzyme immobilization approaches and their application with nanomaterials. *Topics in Catalysis*, *55*(16-18), 1146-1156. doi:10.1007/s11244-012-9893-0
- Liu, S., Huang, B., Zheng, G., Zhang, P., Li, J., Yang, B., & Liang, L. (2020). Nanocapsulation of horseradish peroxidase (HRP) enhances enzymatic performance in removing phenolic compounds. *International journal of biological macromolecules*, *150*, 814-822. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.043

- Long, J., Pan, T., Xie, Z., Xu, X., & Jin, Z. (2020). Co-immobilization of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase improves the stability of Bi-enzymes and the production of lactosucrose. *Lwt*, *128*, 109460. doi:10.1016/j.lwt.2020.109460
- Lu, Q., Kim, Y., Bassim, N., Raman, N., & Collins, G. E. (2016). Catalytic activity and thermal stability of horseradish peroxidase encapsulated in self-assembled organic nanotubes. *Analyst*, *141*(7), 2191-2198. doi:10.1039/c5an02655e
- Machado, M. F., & Saraiva, J. M. (2005). Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology letters*, *27*(16), 1233-1239. doi:10.1007/s10529-005-0023-y
- Mackova, M., Ferri, E. N., Demnerova, K., & Macek, T. (2001). Quantitative Chemiluminiscent Detection of Plant Peroxidases Using a Commercial Kit Originally Designed for Blotting Assays. *Chemické listy*, *95*(2).
- Mauricio-Sánchez, R. A., Salazar, R., Luna-Bárceñas, J. G., & Mendoza-Galván, A. (2018). FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. *Vibrational Spectroscopy*, *94*, 1-6. doi:10.1016/j.vibspec.2017.10.005
- McMullan, D. (1995). Scanning electron microscopy 1928–1965. *Scanning*, *17*(3), 175-185. doi:10.1002/sca.4950170309
- Melo, M. N., Pereira, F. M., Rocha, M. A., Ribeiro, J. G., Diz, F. M., Monteiro, W. F., ... & Fricks, A. T. (2020). Immobilization and characterization of horseradish peroxidase into chitosan and chitosan/PEG nanoparticles: A comparative study. *Process Biochemistry*, *98*, 160-171. doi:10.1016/j.procbio.2020.08.007
- Mirdamadian, S. H., Moghimi, H., Asad, S., Dastgheib, S. M. M., & Karimian, F. (2021). Horseradish peroxidase-calcium peroxide core-shell microcapsules as a novel permeable reactive barrier for bioremediation of phenol-contaminated waters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-12. doi:10.1007/s13762-021-03458-0
- Moh'd A, S., & Wiegel, J. (2010). Effects of detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkalithermophilic lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *The open biochemistry journal*, *4*, 22. doi:10.2174/1874091X01004010022
- Mohamed, S. A., Al-Malki, A. L., Kumosani, T. A., & El-Shishtawy, R. M. (2013). Horseradish peroxidase and chitosan: activation, immobilization and comparative

results. *International journal of biological macromolecules*, 60, 295-300. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.003

- Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., & Sarhan, A. A. (2010). Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 324-330. doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.12.018
- Mugdha, A., & Usha, M. (2012). Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems. *Sci Rev Chem Commun*, 2(1), 31-40.
- Muley, A. B., Awasthi, S., Bhalerao, P. P., Jadhav, N. L., & Singhal, R. S. (2021). Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *Aspergillus niger*: process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(7), 1383-1404. doi:10.1007/s00449-021-02509-7
- Murty, V. R., Bhat, J., & Muniswaran, P. K. A. (2002). Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(2), 57-66.
- Na, S. Y., & Lee, Y. (2017). Elimination of trace organic contaminants during enhanced wastewater treatment with horseradish peroxidase/hydrogen peroxide (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catalytic process. *Catalysis Today*, 282, 86-94. doi:10.1016/j.cattod.2016.03.049
- Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2019). A co-immobilization of pectinase and cellulase onto magnetic nanoparticles for antioxidant extraction from waste fruit peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 470-479. doi:0.1016/j.bcab.2018.12.015
- Naef, N. U., & Seeger, S. (2021). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on silicone nanofilaments. *Journal of Nanomaterials*, 2021. doi:10.1155/2021/8812240
- Nayak, S., & Kale, P. (2020). Inhibition assays of horseradish peroxidase by hexavalent chromium and other heavy metals. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-13. doi:10.1080/03067319.2020.1776864
- Nisha, S., Karthick, S. A., & Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3), 148-155.
- Odaci, D., Telefoncu, A., & Timur, S. (2010). Maltose biosensing based on co-immobilization of  $\alpha$ -glucosidase and pyranose oxidase. *Bioelectrochemistry*, 79(1), 108-113. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.12.010

- Osuna, Y., Sandoval, J., Saade, H., López, R. G., Martinez, J. L., Colunga, E. M., ... & Ilyina, A. (2015). Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(8), 1437-1445. doi:10.1007/s00449-015-1385-8
- Ölçer, Z., & Tanriseven, A. (2010). Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. *Process Biochemistry*, 45(10), 1645-1651. doi:10.1016/j.procbio.2010.06.011
- Pantić, N., Prodanović, R., Đurđić, K. I., Polović, N., Spasojević, M., & Prodanović, O. (2021). Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101211. doi:10.1016/j.eti.2020.101211
- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(9), 1475-1485. doi:10.1002/jctb.1553
- Park, B. W., Ko, K. A., Yoon, D. Y., & Kim, D. S. (2012). Enzyme activity assay for horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes. *Enzyme and microbial technology*, 51(2), 81-85. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.04.004
- Pasparakis, G., & Bouropoulos, N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *International journal of pharmaceutics*, 323(1-2), 34-42. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.054
- Preethi, S., Anumary, A., Ashokkumar, M., & Thanikaivelan, P. (2013). Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. *SpringerPlus*, 2(1), 1-8.
- Qian, J., Zhao, C., Ding, J., Chen, Y., & Guo, H. (2020). Preparation of nano-enzyme aggregates by crosslinking lipase with sodium tripolyphosphate. *Process Biochemistry*, 97, 19-26. doi:10.1016/j.procbio.2020.06.026
- Qiu, H., Li, Y., Ji, G., Zhou, G., Huang, X., Qu, Y., & Gao, P. (2009). Immobilization of lignin peroxidase on nanoporous gold: Enzymatic properties and in situ release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by co-immobilized glucose oxidase. *Bioresource technology*, 100(17), 3837-3842. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.016

- Qiu, X., Wang, S., Miao, S., Suo, H., Xu, H., & Hu, Y. (2021). Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal. *Journal of Hazardous Materials*, *401*, 123353. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123353
- Raghu, P., Reddy, T. M., Reddaiah, K., Jaidev, L. R., & Narasimha, G. (2013). A novel electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles/poly (l-arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of pyrogallol/hydroquinone. *Enzyme and microbial technology*, *52*(6-7), 377-385. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.02.010
- Rahiminezhad, Z., Gahruie, H. H., Esteghlal, S., Mesbahi, G. R., Golmakani, M. T., & Hosseini, S. M. H. (2020). Oxidative stability of linseed oil nano-emulsions filled in calcium alginate hydrogels. *LWT*, *127*, 109392. doi:10.1016/j.lwt.2020.109392
- Rakesh, K., Nisha, C., Ranvir, S., Pushpender, K. S., & Jagdeep, K. (2015). Engineering of a lipase towards thermostability: studies on additive effect of the two thermo-stabilising mutations at protein surface. *Adv. Genet Eng*, *4*, 126. doi:10.4172/2169-0111.1000126
- Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2020). Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology*. *106*, 150-159. doi:10.1016/j.tifs.2020.10.002
- Ramos, P. E., Silva, P., Alario, M. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2018). Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food Hydrocolloids*, *77*, 8-16. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.08.031
- Rigo, E., Rigoni, R. E., Lodea, P., Oliveira, D. D., Freire, D. M., & Luccio, M. D. (2008). Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environmental Engineering Science*, *25*(9), 1243-1248. doi:10.1089/ees.2007.0197
- Rocher, V., Siaugue, J. M., Cabuil, V., & Bee, A. (2008). Removal of organic dyes by magnetic alginate beads. *Water research*, *42*(4-5), 1290-1298. doi:10.1016/j.watres.2007.09.024
- Romo-Sánchez, S., Camacho, C., Ramirez, H. L., & Arévalo-Villena, M. (2014). Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two

polymeric supports. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(06), 517. doi:10.4236/abb.2014.56062

- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y., & Yamane, T. (1997). Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(4), 445-450. doi:10.1007/s11746-997-0104-2
- Sahu, S., Shera, S. S., & Banik, R. M. (2019). Enhanced reusability of horseradish peroxidase immobilized onto graphene oxide/magnetic chitosan beads for cost effective cholesterol oxidase assay. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Sarika, D., Kumar, P. S. S. A., Arshad, S., & Sukumaran, M. K. (2015). Purification and evaluation of horseradish peroxidase activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(7), 367-375.
- Sassi, A. B., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., & Boussaid, A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41(1), 74-78. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.074
- Satvekar, R. K., Rohiwal, S. S., Raut, A. V., Karande, V. A., Tiwale, B. M., & Pawar, S. H. (2014). A silica-dextran nanocomposite as a novel matrix for immobilization of horseradish peroxidase, and its application to sensing hydrogen peroxide. *Microchimica acta*, 181(1-2), 71-77. doi:10.1007/s00604-013-1065-9
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12
- Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Grbavčić, S. Ž., Mijin, D. Ž., & Knežević-Jugović, Z. D. (2016). Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye. *Hemijaska industrija*, 70(2), 217-224. doi:10.2298/HEMIND150220028S
- Sergio, L., Paola, A. D., Linsalata, V., Cardinali, A., Vanadia, S., & Venere, D. D. (2010). The use of artichoke peroxidase to remove phenols from olive mill waste water. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(12a), 3028-3036.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. doi:10.1002/adsc.200700082

- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *104*, 21-31. doi:10.1016/j.ibiod.2015.04.027
- Singh, R., Jha, A. B., Misra, A. N., & Sharma, P. (2020). Entrapment of enzyme in the presence of proline: effective approach to enhance activity and stability of horseradish peroxidase. *3 Biotech*, *10*(4), 1-8. doi:10.1007/s13205-020-2140-7
- Souza, F. M., Soares, C. M. F., Lima, A. S., & de Aquino Santana, L. C. L. (2020). Characterisation of a “green” lipase from *Aspergillus niger* immobilised on polyethersulfone membranes. *Acta Scientiarum. Technology*, *42*, e44498-e44498. doi:10.4025/actascitechnol.v42i1.44498
- Spasojević, D., Prokopijević, M., Prodanović, O., Pirtea, M. G., Radotić, K., & Prodanović, R. (2014). Immobilization of chemically modified horse radish peroxidase within activated alginate beads. *Hemijska industrija*, *68*(1), 117-122. doi:10.2298/HEMIND121122036S
- Stradomska, D., Heba, M., Czernek, A., Kuźnik, N., Gillner, D., Maresz, K., ... & Szymańska, K. (2021). Lipase immobilized on MCFs as biocatalysts for kinetic and dynamic kinetic resolution of sec-alcohols. *Catalysts*, *11*(4), 518. doi:10.3390/catal11040518
- Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., & Sivakumar, N. (2014). Microbial degradation of azo dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(2), 670-690.
- Suganthi, S. H., Swathi, K. V., Biswas, R., Basker, S., & Ramani, K. (2019). Co-immobilization of multiple enzymes onto surface-functionalized magnetic nanoparticle for the simultaneous hydrolysis of multiple substrates containing industrial wastes. *Applied Nanoscience*, *9*(7), 1439-1457. doi:10.1007/s13204-019-01125-y
- Sukan, A., & Sargin, S. (2013). Enzymatic removal of phenol from industrial wastewaters. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *4*, 300-307. doi:10.4236/jbnb.2013.43038
- Sulym, I., Zdarta, J., Ciesielczyk, F., Sternik, D., Derylo-Marczewska, A., & Jesionowski, T. (2021). Pristine and poly (Dimethylsiloxane) modified multi-walled carbon nanotubes as supports for lipase immobilization. *Materials*, *14*(11), 2874. doi:10.3390/ma14112874

- Suri, A., Khandegar, V., & Kaur, P. J. (2021). Ofloxacin exclusion using novel HRP immobilized chitosan cross-link with graphene-oxide nanocomposite. *Groundwater for Sustainable Development*, 12, 100515. doi:10.1016/j.gsd.2020.100515
- Szabó, L., Gerber-Lemaire, S., & Wandrey, C. (2020). Strategies to functionalize the anionic biopolymer Na-alginate without restricting its polyelectrolyte properties. *Polymers*, 12(4), 919. doi:10.3390/polym12040919
- Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016). Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016. doi:10.1155/2016/7697031
- Taqieddin, E., & Amiji, M. (2004). Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25(10), 1937-1945. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.034
- Teotia, S., & Gupta, M. N. (2002). Magnetite-alginate beads for purification of some starch degrading enzymes. *Molecular biotechnology*, 20(3), 231-237.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, 3(2), 182-196. doi:10.1007/s11947-009-0202-2
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.022
- Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). *Int Res J Biol Sci*, 1(8), 88-92.
- Vinueza Galárraga, J. C., Santos, A. F. D., Bassan, J. C., Goulart, A. J., & Monti, R. (2013). Bromofhenol blue discoloration using peroxidase immobilized on highly activated corncob powder. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 321-326.
- Vitolo, M. (2020). Brief review on enzyme activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 60-76.
- Wang, F. Q., Li, P., Zhang, J. P., Wang, A. Q., & Wei, Q. (2011). pH-sensitive magnetic alginate-chitosan beads for albendazole delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 16(3), 228-236. doi:10.3109/10837451003592217



- Wang, S., Fang, H., Wen, Y., Cai, M., Liu, W., He, S., & Xu, X. (2015). Applications of HRP-immobilized catalytic beads to the removal of 2, 4-dichlorophenol from wastewater. *RSC advances*, 5(71), 57286-57292. doi:10.1039/c5ra08688d
- Wang, X. Y., Jiang, X. P., Li, Y., Zeng, S., & Zhang, Y. W. (2015). Preparation Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *International journal of biological macromolecules*, 75, 44-50. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.01.020
- Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W., & Moon, S. J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process biochemistry*, 40(6), 2149-2154. doi:10.1016/j.procbio.2004.08.014
- Xu, R., Chi, C., Li, F., & Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology*, 149, 111-116. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.030
- Yang, H., Wei, W., & Liu, S. (2014). Monodispersed silica nanoparticles as carrier for co-immobilization of bi-enzyme and its application for glucose biosensing. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 125, 183-188. doi:10.1016/j.saa.2014.01.004
- Yavaşer, R. (2019) Poliakrilamid-aljinat kriyojellere lakkaz immobilizasyonu ve uygulamalarının araştırılması Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Yetim, N. K., Özkan, E. H., & Sarı, N. (2019). Polimerik nanoküreler üzerine enzim immobilizasyonu ve optimizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(1), 97-104. doi:10.29233/sdufeffd.479246
- Yu, X., Zhang, Z., Li, J., Su, Y., Gao, M., Jin, T., & Chen, G. (2021). Co-immobilization of multi-enzyme on reversibly soluble polymers in cascade catalysis for the one-pot conversion of gluconic acid from corn straw. *Bioresource Technology*, 321, 124509. doi:10.1016/j.biortech.2020.124509
- Yücel, Y., Demir, C., Dizge, N., & Keskinler, B. (2014). Methods for lipase immobilization and their use for biodiesel production from vegetable oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 36(11), 1203-1211. doi:10.1080/15567036.2010.545805

- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. doi:10.3390
- Zhang, J., Dai, Y., Jiang, B., Zhang, T., & Chen, J. (2020). Dual-enzyme co-immobilization for the one-pot production of glucose 6-phosphate from maltodextrin. *Biochemical Engineering Journal*, 161, 107654. doi:10.1016/j.bej.2020.107654
- Zhang, J., Gao, B., Lv, K., Kumissay, L., Wu, B., Chu, J., & He, B. (2021). Specific immobilization of lipase on functionalized 3D printing scaffolds via enhanced hydrophobic interaction for efficient resolution of racemic 1-indanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 546, 111-117. doi:10.1016/j.bbrc.2021.02.003
- Zhu, L., Yang, R., Zhai, J., & Tian, C. (2007). Bionzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(4), 528-535. doi:10.1016/j.bios.2007.07.002
- Zhu, R., Li, C., Chen, C., Xing, S., Cai, Y., Zeng, X., & He, L. (2021). Effect of cross-linked enzyme aggregate strategy on characterization of sn-1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5), 1925-1941. doi:10.1007/s00253-021-11160-x

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“LİPAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN KO-İMMOBİLİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN ARITILMASINDA KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Çağdaş SUNNA

... / ... / ...