



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUKLAR ÜZERİNE
İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PEROKSİDAZ ENZİMİ İLE
SERBEST PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE ÇÖP SIZINTI SUYU
ANAEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖR(AnMBR)
ÇIKIŞ SUYUNA UYGULANMASI**

İREM AYRANPINAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUKLAR
ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PEROKSİDAZ
ENZİMİ İLE SERBEST PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE ÇÖP SIZINTI SUYU
ANAEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖR(AnMBR)
ÇIKIŞ SUYUNA UYGULANMASI**

İREM AYRANPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İrem AYRANPINAR



Bu çalışma KSÜ Bilimsel Araştırma Birimi (BAP Proje No: 2021/2-2 YLS) tarafından desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bilgilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUKLAR ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ
PEROKSİDAZ ENZİMİ İLE SERBEST PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE ÇÖP SIZINTI SUYU ANAEROBİK MEMBRAN
BİYOREAKTÖR(AnMBR) ÇIKIŞ SUYUNA UYGULANMASI
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

İrem AYRANPINAR

ÖZET

İnsanların yaşamı süresince oluşan evsel katı atıklar, atık yönetiminin en önemli parçalarından biridir. Atık yönetiminin ideal bir şekilde yapılabilmesi için sürdürülebilir olması gereklidir. Katı atıkların bertarafında her ne kadar ileri teknolojiler kullanılsada nihai bertarafı sağlamak için düzenli depolama sahalarının gereksinimi devam etmektedir. Düzenli depolama sahaları evsel katı atık yönetiminde kullanılan en yaygın bertaraf yöntemi olarak bilinmektedir. Bu tesislerde oluşan en büyük sorunlardan biri çöp sızıntı sularıdır. Çöp sızıntı suları, yüksek kirletici konsantrasyonu içeren kompleks yapıya sahip arıtımı zor atıksulardır. Bu sebeple günümüzde çöp sızıntı suyu arıtımı için birçok yöntem denenmektedir. Çöp sızıntı sularının sadece bir biyolojik prosesle arıtılması pek mümkün değildir. Birkaç arıtma yönteminin bir arada kullanılması tercih edilmektedir. Son yıllarda, ileri arıtım ya da ön arıtım prosesi olarak immobilizasyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzim immobilizasyonu; enzimlerin özelliklerinin iyileştirilmesi, birçok enzimin bir arada kullanılması, optimum şartlar altında yüksek giderim verimi, ortamdan kolay uzaklaştırılması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Immobilizasyon yöntemini etkileyen faktörlerden bazıları pH, sıcaklık ve seçilen destek malzemesinin özellikleridir. Destek malzemeleri; desteğe bağlanan enzimlere yüksek stabilite, elverişlilik, nispeten düşük fiyat ve yüksek afinite (çekim gücü) sağlayan malzemelerden seçilmelidir. Genel olarak klasik destek malzemesi ve yeni destek malzemesi olarak 2 şekilde sınıflandırılır. Klasik destek malzemeleri iyi derecede termal ve kimyasal stabilite ve ayrıca mükemmel mekanik direnç ile karakterize edilir. Bu malzemeler aynı zamanda iyi gelişmiş gözenekli yapılarının bir sonucu olan iyi soğurma özelliği ve etkili enzim immobilizasyonu için çok sayıda temas bölgesi sağlayan genellikle yüksek yüzey alanlarıyla da bilinmektedir. Klasik destek malzemesine örnek olan kitosan; düşük toksisiteye sahip olması ve çevre dostu biyolojik olarak kolay parçalanabilir özellikte olması gibi nedenlerden dolayı öne çıkan bir destek malzemesidir. Yeni destek malzemeleri sadece etkili enzim bağlanmasına izin vermekle kalmaz, aynı zamanda immobilizasyon sonucu ortaya çıkan biyokatalitik sistemlerin uygulanabilirliğini de artırır. Örneğin manyetik nanopartiküllerin manyetik alan oluşturarak kolay bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması, yeniden kullanıma kolaylık sağlaması ve geniş yüzey alan sunmasından dolayı immobilizasyonda tercih edilen destek materyali olmuştur.

Bu tez çalışmasında Fe₃O₄manyetik nanopartiküller oluşturulmuştur. Daha sonra kitosan pulları ve kil ile belirli oranlarda karıştırılarak manyetik kitosan kil boncuklar elde edilmiştir. Kitosan kil boncukların yapısı ve morfolojisi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Termogravimetrik analiz (TGA), Taramalı elektron mikroskopu (SEM), X-ışını kırınım yöntemi (XRD)analizleri ile karakterize edilmiştir. Peroksidaz enzimi glutaraldehit ile kovalent bağlanma ile hazırlanmıştır. Hazırlanan enzim manyetik kitosan kil boncuklara immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen enzimin fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir ve daha sonra çöp sızıntı suyu arıtımı yapan anaerobik membran biyoreaktör çıkış suyuna uygulanıp arıtımın daha ileri bir seviyeye taşınması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada optimum pH 3, sıcaklık 35°C, seyreltme oranı 1/4 olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda KOİ ve renk giderim verimleri sırasıyla %76 ve %89 olarak elde edilmiştir. Buna karşılık gelen konsantrasyonlar ise 1204 mg/L ve 750 Pt-Co'dır.

Anahtar Kelimeler: İmmobilizasyon, manyetik kitosan kil boncuk, anaerobik membran biyoreaktör çıkış suyu, peroksidaz

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimler Enstitüsü

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Temmuz/2022

Danışman: Prof. Dr. Kevser CIRIK

Sayfa Sayısı: 60

**COMPARISON OF PEROXIDASE ENZYME AND FREE PEROXIDASE
ENZYME IMMOBILIZED ON MAGNETIC CHITOSAN CLAY BEADS AND
APPLICATION TO WASTE LEAKAGE ANAEROBIC MEMBRANE
BIOREACTOR (AnMBR) OUTLET WATER
(M. Sc. THESIS)**

İrem AYRANPINAR

ABSTRACT

Domestic solid waste, which is for medduring the life of people, is one of the most important parts of waste management. In order for waste management to be carried out in an ideal way, it must be sustainable. Although advanced technologies are used in the disposal of solid wastes, the need forsantary landfills continues to ensure final disposal. Landfills are known as the most common disposal method used in domestic solid waste management. One of the biggest problem so curring in these facilities is garbage leachate. Landfill leachate is complex wastewater containing high pollutant concentration and difficult to treat. For this reason, many methods are being tried today for the treatment of waste leachate. It is not possible to treat garbage leachate with only one biological process. It is preferred to use several purification methods together. In recent years, the immobilization method has been widely used as an advanced treatment or pretreatment process. Enzyme immobilization; improving the properties of enzymes. It is preferred because of itsfeaturessuch as using many enzymes together, high removal efficiency under optimum conditions, and easy removal from the environment. Some of thefactors affecting the immobilization method are pH, temperature and the characteristics of the selected support material. Selection of supportmaterials; It should be selected from materials that provide high stability, availability, relatively low price, and highaffinity (attraction) totheenzymes attached to the support. Generally, it is classified in 2 ways as classical support material and new support material.

Conventional support materials are characterized by good thermal and chemical stability as well as excellent mechanical resistance. These materials are also known for their good absorbency as a result of their well developed porous structure and generally high surface areas which provide multiple contact zones for efficient enzyme immobilization. Chitosan, which is an example of a classical support material; It is a prominent supportmaterial for reasons such as low toxicity, environmentally friendly, biodegradable an deasily biodegradable. New support materials not only allow effective enzyme binding, but also increase the applicability of biocatalytic systems resulting from immobilization. For example, magnetic nanoparticles have been the preferred support material in immobilization because they can be easily removed from the environment by creating a magneticfield, facilitate re-useandoffer a large surface area.

In this study, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were formed. Then, magnetic chitosan clay beads were obtained by mixing with chitosan flakes and clay in certain proportions. The structure and morphology of chitosan clay beads were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric analysis (TGA), Scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction method (XRD), Surface area measurement (BET) analysis. The peroxidase enzyme was prepared by covalent bonding with glutaraldehyde. The prepared enzyme was immobilized on magnetic chitosan clay beads. The physical, chemical and biochemical properties of the immobilized enzyme were investigated, and then the anaerobic membrane that treats the waste leachate was applied to the bioreactor effluent, and it was aimed to carry the treatment to a higher level. In the study, the optimum pH was determined as 3, the temperature was 35°C, and the dilution ratio was 1/4. COD and color removal efficiencies of 76% and 89%, respectively, were obtained under optimum conditions. Corresponding concentrations are 1204 mg/L and 750 Pt-Co.

Keywords: Immobilization, magnetic chitosan clay beads, anaerobic membrane bioreactor outlet water, peroxidase

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Environmental Engineering Department, July/2022

Supervisor: Prof. Dr. Kevser CIRIK

Page number: 60

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, tez çalışmamın tüm safhalarında bilimsel desteğinin yanı sıra anlayış ve sabrını esirgemeyen, çalışmanın etkin bir şekilde ilerleyiői için fedakârlıklardan kaçınmayan, kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım Sayın hocam **Prof.Dr. Kevser CIRIK**'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimin boyunca bilgi ve birikimleriyle laboratuvar çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayış, sabır ve yardımlarından dolayı sayın hocalarım **Dr. Ahmet DUYAR, Serdar GÖÇER ve Melike KOZAK**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için maddi destek sağlayan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığı'na (**BAP**) (Proje No: 2021/2-2YLS) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen her koşulda yanımda olan çok değerli **Aileme, Dostlarıma ve Arkadaşlarıma** sonsuz teşekkür ederim.

İrem AYRANPINAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyolojik Arıtma.....	4
1.2. Fizikokimyasal Arıtma Yöntemleri	5
1.2.1. Adsorpsiyon yöntemi.....	5
1.2.2. Koagülasyon flokülasyon.....	5
1.2.3. Çökeltme	5
1.3. Atıksu Arıtımında Enzimler	6
1.4. İmmobilizasyon	7
1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri.....	8
1.4.2. İmmobilizasyon yönteminde kullanılan destek malzemesi ve özellikleri	10
1.4.3. İmmobilize enzim ile ilgili yapılan çalışmalar	14
2. MATERYAL VE METOT.....	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	15
2.1.2. Kullanılan cihazlar.....	15
2.2. Metot.....	16
2.2.1. Atıksu içeriği	16
2.2.2. Deney düzeneği	17
2.2.3. Deneysel plan	17
2.2.4. Serbest enzimin aktifleştirilmesi	19
2.2.5. Demir (II, III) oksit (Fe ₃ O ₄) sentezlenmesi.....	20
2.2.6. Manyetik kitosan kil boncuk sentezlenmesi.....	20
2.2.7. Peroksidaz enziminin immobilizasyonu	21
2.2.8. Analizler.....	21
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	24
3.1. Sentez ve Karakterizasyon	24
3.1.1. Fe ₃ O ₄ sentezi ve karakterizasyonu	24
3.1.2. Manyetik kitosan kil boncuk sentezi ve karakterizasyonu.....	25
3.1.2.1. SEM analizi.....	25
3.1.2.2. FTIR analizi.....	27
3.1.2.3. Manyetik kitosan kil boncuğun mıknatıs ile ayrılma kabiliyeti.....	27
3.2. Serbest Enzimin Arıtıma Etkisinin İncelenmesi	28

3.2.1. Seyreltme oranlarının ve temas süresinin etkisi	28
3.2.2. Sıcaklığın etkisinin değerlendirilmesi	29
3.2.3. pH etkisinin araştırılması	32
3.2.4. Enzim konsantrasyonunun arıtıma etkisinin değerlendirilmesi	33
3.3. Manyetik Kitosan Kil Boncuğunun Arıtıma Etkisinin İncelenmesi	34
3.4. İmmobilize Peroksidazın Arıtıma Etkisinin İncelenmesi	35
3.5. Serbest Enzim, Manyetik Kitosan Kil Boncuk ve İmmobilize Enzimin Arıtım Veriminin Karşılaştırılması.....	36
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ.....	42
EKLER.....	44



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AnMBR : Anaerobik Membran Biyoreaktör

ÇSS : Çöp Sızıntı Suyu

° : Derece

Fe₃O₄ : Demir (II, III) Oksit

g : Gram

KOİ : Kimyasal Oksijen İhtiyacı

L : Litre

MKKB : Manyetik kitosan kil boncuk

MBR : Membran Biyoreaktör

mg : Miligram

mL : Mililitre

°C : Santigrat derece

% : Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. a) Taşıyıcı üzerine adsorpsiyon b) Taşıyıcıya kovalent ve çapraz bağlama c) Taşıyıcı içinde tutuklama d) Kapsülleme.....	9
Şekil 1.2. Klasik destek malzemeleri.....	11
Şekil 1.3. Kitosan boncuk (Aydemir T. vd., 2015).....	12
Şekil 1.4. Yeni destek malzemeleri.....	13
Şekil 2.1. Tez çalışmasında kullanılan deney düzeneği.....	17
Şekil 2.2. Üretilen manyetik kitosan kil boncuk	21
Şekil 2.3. KOİ ve renk analizlerinin yapıldığı termoreaktör (a) ve spektrofotometre (b)	22
Şekil 2.4. KOİ tayini için oluşturulan korelasyon eğrisi.....	22
Şekil 3.1. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) parçacıklarının X ışını kırınım (XRD) grafiği.....	24
Şekil 3.2. Manyetik kitosan kil boncuğun SEM görüntüsü (a) 300x, (b) 80x, (c) 5.00x, (d) 80x çap	25
Şekil 3.3. İmmobilize enzimli manyetik kitosan kil boncuğun SEM görüntüsü (a) 5.00x, (b) 300x, (c) 70x, (d) 70x çap	26
Şekil 3.4. İmmobilize enzimli manyetik kitosan kil boncuğun arıtımda kullanıldıktan sonra SEM görüntüsü (a) 5.00x, (b) 300x, (c) 59x, (d) 59x çap	26
Şekil 3.5. Enzim immobilize MKKB (a), Arıtımda kullanılmış enzim immobilize MKKB (b), MKKB (c).....	27
Şekil 3.6. Manyetik kitosan-kil boncuklarının manyetik olarak ayrılmasının gösterilmesi.	28
Şekil 3.7. Oda sıcaklığında (25^0C) atıksu seyreltme oranlarının arıtım verimine etkisi.....	28
Şekil 3.8. Ham suda arıtım verimi grafiği	30
Şekil 3.9. 1:2 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi	30
Şekil 3.10. 1:3 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi.....	30
Şekil 3.11. 1:4 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi.....	31
Şekil 3.12. pH'ın arıtıma verimine etkisinin incelenmesi	32
Şekil 3.13. 1:4 seyreltme oranında KOİ giderim verimi (a), ham su 4 kat enzim ile KOİ giderim verimi (b).....	33
Şekil 3.14. 1:4 seyreltme oranında Renk giderim verimi (a), ham su 4 kat enzim ile Renk giderim verimi (b).....	33
Şekil 3.15. Optimum şartlarda manyetik kitosan kil boncuğun arıtıma etkisi	35
Şekil 3.16. Optimum şartlarda manyetik kitosan kil boncuğa immobilize edilmiş peroksidad enziminin arıtıma etkisi	36

Şekil 3.17. Serbest enzim, manyetik kitosan kil boncuk ve immobilize enzimin arıtım verimi karşılaştırılması..... 37



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Katı atık bertaraf tesislerinde oluşan sızıntı sularının alıcı ortama deşarj standartları (Su Kirliliđi Kontrol Yönetmeliđi Tablo 20.6)	3
Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	15
Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar.....	16
Çizelge 2.3. Biyolojik ön arıtmıdan geçmiş çöp Sızıntı Suyu karakterizasyonu.....	16
Çizelge 2.4. Deneysel Plan	18



EKLER DİZİNİ

EK 1.MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUĞUN FTİR ANALIZI.....	44
EK 2. ENZİM İMMOBİLİZE EDİLMİŞ MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUĞUN FTİR ANALİZİ.....	44
EK 3. ARITIM SONRASI İMMOBİLİZE PEROKSİDAZLI MANYETİK KİTOSAN KİL BONCUK.....	44



1. GİRİŞ

Endüstriyel ve ticari büyüme, yaşam standartlarının iyileşmesi, kullan at ürünlerin popüler olması, toplumun israfa yönelmesi gibi çeşitli nedenlerin sonucunda katı atık üretimi artmaktadır. Dünya genelinde oluşan katı atıklar görevli birimler tarafından günlük olarak toplanılarak bertaraf edilmek zorundadır. Endüstriyel alanda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde toplanılan evsel ve endüstriyel atıklar için en çok tercih edilen bertaraf yöntemi düzenli depolama alanlarıdır. Yatırım ve işletme maliyetleri açısından da oldukça avantajlı bir yöntem olan düzenli katı atık depolama sahaları, yakma ve kompostlaştırma gibi diğer atık bertaraf yöntemlerine kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Fakat düzenli depolama alanlarında, bertaraf edilen katı atıklardan bazılarının içerisinde nemli maddeler bulunmasının yanı sıra bazılarının ise içerisindeki organik maddelerin bozunması sonucunda çöp sızıntı suyu ortaya çıkmaktadır (Pi K. ve ark., 2009). Oluşan çöp sızıntı suyu yüksek konsantrasyonda biyolojik olarak zor parçalanabilen sert organik maddeler, amonyak azotu, ağır metaller, klorlu organik ve inorganik tuzlar içerir. Bu sebeple çöp sızıntı suları arıtılmadığı takdirde yakın çevrede yüzey ve yeraltı sularını potansiyel olarak kirleteceği göz önünde bulundurularak, çoğu gelişmiş ülkede düzenli depolama sahalarının tasarımına ve işletilmesine özen gösterilerek sızıntı suyunun doğal denge üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için yalıtım ve toplama sistemi dizayn edilmelidir. Tüm bu önlemlere ek olarak uzun süreli kapatma dönemi süresinde yakın çevresel izleme yapılması gerekmektedir (Renou S. ve ark., 2008).

Suyun, yer altı suyunun ve toprağın birçok alanda kirlenmesi, dünya genelinde büyük endişe yaratmaktadır. Bilim insanları bu konuyla ilgili çeşitli giderim yöntemleri üzerinde çalışmaktadır ve her geçen gün teknolojinin ilerlemesiyle yeni çalışmalar ortaya koyulmaktadır. Çöp sızıntı suyu arıtımında oksidasyon, adsorpsiyon, koagülasyon ve membran ayırma gibi fiziko-kimyasal yöntemler ve biyolojik prosesler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu prosesler arasında düşük maliyet, iyi derecede arıtım ve işletim kolaylığından dolayı membran biyoreaktörler etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Fiziko-kimyasal prosesler ise genellikle biyolojik arıtma öncesi ön arıtım veya biyolojik arıtma sonrasında ileri arıtım yöntemi olarak kullanılır. Bu nedenle etkili bir arıtım performansına ulaşmak için birden fazla arıtım yöntemi kullanılarak arıtım yapılması gerekmektedir. Son yıllarda, membran biyoreaktörlerin (MBR) çöp sızıntı suyu arıtımında etkili bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir.

Membran biyoreaktörlerin, düşük çevresel etki, yüksek arıtma performansı, yeniden kullanılabilir çıkış suyu eldesinin yanı sıra son çöktürme veya ileri arıtım ihtiyacının ortadan kaldırılması gibi özelliklerinden dolayı atıksu arıtma uygulamalarında tercih edilmektedir (Dijkvd V. ve ark., 1997). Bazı aktif çamur proseslerinde biyokimyasal oksidasyon ve su biyokütle ayrımı iki farklı tankta gerçekleşirken, MBR’de tek tankta gerçekleşmektedir. Bu nedenle MBR sistemleri aktif çamur prosesleri ile karşılaştırıldığında, az yer kaplaması, düşük çamur üretimi, nütrientlerin ve zor parçalanmış organik kirleticilerin daha yüksek arıtımı gibi birçok avantaja sahip olduğundan daha çok tercih edilmektedir.

Çöp sızıntı suları, düzenli depolama sahalarındaki katı atıkların özelliklerine göre şekillenmektedir. Bu atıklar; organik, inorganik ve ağır metal gibi malzemelerden oluşmaktadır. Bunun yanı sıra çöp sızıntı sularının kirletici madde özellikleri ve konsantrasyonları buldukları coğrafi bölgenin iklim şartlarına, jeolojik özelliklerine ve nüfus yoğunluğuna bağlı olarak şekillenmektedir. Dünya genelinde gelişen teknolojinin olumsuz bir etkisi olarak su kaynakları giderek azalmakta ve kirlenmektedir. Bu sebeple yasal düzenlemelerle deşarj limitleri giderek azaltılmıştır ve denetimler arttırılmıştır. Bu limitleri sağlamak ve yüksek atık bertaraf maliyetlerini azaltmak amacıyla uygulanabilir arıtım yöntemlerinin araştırılması, geliştirilmesi ve uygulanması büyük önem kazanmaktadır. Yüksek kirlilik miktarı içeren çöp sızıntı sularının son yıllarda deşarj kriterlerine uyum sağlaması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Biyolojik arıtım yöntemlerinin kimyasal ve fiziksel arıtım yöntemlerine göre az miktarda çamur oluşturması, düşük maliyetli olması ve alıcı ortamda tehlikeli yan ürün oluşturmaması gibi avantajlarından dolayı çöp sızıntı sularının arıtımı için öncelikli olarak tercih edilmektedir. Tüm bu avantajların yanı sıra, çöp sızıntı sularının kirlilik yükü çok yüksek olduğu için tek başına biyolojik arıtım prosesleri kullanıldığında yüksek oranda arıtım verimi elde etmek ve deşarj alıcı ortama deşarj standartlarını sağlamak zordur (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Katı atık bertaraf tesislerinde oluşan sızıntı sularının alıcı ortama deşarj standartları (Su Kirliliđi Kontrol Yönetmeliđi Tablo 20.6)

Parametreler	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)	(mg/L)	700	500
Askıda Katı Madde (AKM)	(mg/L)	200	100
Toplam Fosfor (P)	(mg/L)	2	1
Toplam Krom	(mg/L)	2	1
pH	-	6-9	6-9
Renk	(Pt-Co)	280	260
Yađ ve Gres	(mg/L)	20	10
Krom (Cr ⁺⁶)	(mg/L)	0.5	0.5
Kurşun (Pb)	(mg/L)	2	1
Toplam Siyanür (Cn ⁻)	(mg/L)	1	0.5
Kadmium (Cd)	(mg/L)	0.1	-
Demir (Fe)	(mg/L)	10	-
Florür (F ⁻)	(mg/L)	15	-
Bakır (Cu) (mg/L)	(mg/L)	3	-
Çinko (Zn) (mg/L)	(mg/L)	5	-
Balıkbiyodeneyi (ZSF)	-	10	

Bu sebeple çöp sızıntı suyu arıtımında genellikle fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlere ek olarak, ileri arıtım yöntemlerinden olan adsorpsiyon ve membran teknolojileri gibi yöntemler kullanılmaktadır (Renou S. ve ark., 2008). Çöp sızıntı suyunun miktar ve özellikleri depolama sahalarına gelen atıkların karakteristiğine ve depolama yaşına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Çöp sızıntı suyunun arıtılmasına etki eden faktörler; sızıntı suyunun karakterizasyonu, deşarj standartları, arıtım yöntemi, işletme ve maliyettir (Gocer S. ve ark., 2020). Bir kıyaslama yapılacak olursa, aerobik veya anaerobik koşullar altında askıda veya tutunarak büyüme yöntemini kapsayan biyolojik yöntemler çöp sızıntı suyundaki biyolojik olarak parçalanabilir kısmının arıtılabilmesi için genellikle en çok tercih edilen yöntemdir. Bu sebeple biyolojik arıtım prosesinin deşarj standartlarını sağlamadığı durumlarda ön arıtım veya ileri arıtım yöntemlerinin biyolojik arıtma ile kombine olarak kullanılması gerekmektedir.

1.1. Biyolojik Arıtma

Depolama sahalarındaki çöp sızıntı suyunun oluşumu, atığın parçalanması ve atıkların ayrıştırılması yoluyla meydana gelmektedir. Depolama sızıntı suyunun dolgu yaşına, yağışa, mevsimsel hava değişimlerine ve diğer faktörlerin yanı sıra atık karakterizasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (Renou S. ve ark., 2008). Bu sebeple karmaşık ve değişken bileşimi nedeniyle, çöp sızıntı suyunun arıtımı zordur (Çelik A. ve ark., 2011). Sızıntı suyunun verimli bir şekilde arıtılmadığı durumda alıcı ortamın olumsuz etkilendiği bilinmektedir (Forgiarini E. ve ark., 2007). Çöp sızıntı suyunun arıtımında birçok teknik kullanılabilmesine rağmen genellikle biyolojik arıtım teknikleri kullanılmaktadır. Biyolojik arıtma işlemleri sızıntı suyunda bulunan yüksek mukavemetli biyolojik olarak parçalanabilir organik maddelerin gideriminde etkili yöntemlerden biridir (Göçer S. ve ark., 2017). Nispeten yüksek BOİ içeriğine sahip genç sızıntı sularının biyolojik arıtım sayesinde yaklaşık %50 BOİ giderim verimi gözlemlenmiştir (Lin Y. ve ark., 2002). Ayrıca biyolojik arıtım metodu çöp sızıntı suyunda bulunan stabilize edilmemiş organik maddesinin bozunumundaki başarısı ve organik bileşikler ile toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında yüksek verimlilik göstermesi nedeniyle de dikkat çekmektedir (Lin Y. ve ark., 2002). Birçok parametre baz alındığında en yüksek giderim verimleri genellikle biyolojik arıtma sistemleri ile elde edilmektedir (Renou S. ve ark., 2008).

1.2. Fizikokimyasal Arıtma Yöntemleri

Fiziksel kimyasal arıtma prosesleri, biyolojik arıtma sistemlerinden önce bir ön arıtım sistemi veya biyolojik arıtmadan sonra bir ileri arıtım yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler çöp sızıntı suyunun kompleks yapısından dolayı yüzeysel sulara verilecek sızıntı suyunun kalitesini düzeltmek üzere sisteme eklenmiştir (Borat A. ve ark.,1995).

1.2.1. Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyon işlemi bir yüzey üzerinde çözünmüş halde bulunan maddelerin toplanması ve hapsedilmesi işlemidir. Adsorpsiyon yöntemi, nispeten kolay ve ucuz bir metot olup, enzimin yapısını kimyasal olarak değiştirmemektedir (Han F. ve ark., 2020). Günümüzde yüzey özelliklerine ve kimyasal yapılarına göre farklı adsorban türleri kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan adsorban türleri aktif karbon ve kitosan olmakla beraber, doğal zeolit, bentonit ve kil de kullanılabilir (Stokes ve ark., 1997).

1.2.2. Koagülasyon flokülasyon

Koagülasyon (hızlı karıştırma) işlemi alüminyum sülfat ($Al_2(SO_4)_3$), demir sülfat ($FeSO_4$), demir (III) klorür ($FeCl_3$) vb. kimyasalların hızlı karıştırıcı vasıtası ile yüksek hızda karıştırılarak optimum bekleme süresi ve uygun pH seviyesinde atıksuda küçük floklar oluşturulup uygun pH seviyesinde bazik veya asidik kimyasallar ile hazırlanarak daha sonra atıksu flokülasyon (yavaş karıştırma) ünitesine alınır. Koagülant maddeleri kullanılarak yoğunluğu artırılmış floklar flokülasyon ünitesinde alındığında polimer yapıdaki polielektrolit kimyasalları ile düşük devirli yavaş karıştırıcılarda karıştırılıp koagülasyon aşamasında oluşmuş flokların elektrik yükleri arasındaki iyon değişimi esasına dayanarak birbirlerine yapışması sağlanıp kendi ağırlıklarıyla çökmesi esasına dayanmaktadır. Flokülant ve koagülantlar ile reaksiyona giren atıksu 15-60 dk arasında bekletilerek oluşan çamurun tankın tabanından alınması ile gerçekleştirilir.

1.2.3. Çökeltme

Çökeltme suda bulunan askıda katı maddelerin kendi ağırlıkları ile aşağı inerek dipte birikmesine ve biriken maddelerin toplanarak sudan ayırması işlemine denir. Maddelerin genellikle kendi ağırlıklarıyla çökmesi beklenir. Ekstra bir işlem gerekmemektedir.

1.3. Atıksu Arıtımında Enzimler

Atıkların arıtımında enzimlerin kullanımı ilk kez 1970' lerde kirletici bir maddenin yıkımı olarak denenmiştir. Enzimlerle gerçekleştirilen kirleticiyi mikroorganizmalarla ortamdan uzaklaştırma (biyoremediyasyon) işlemleri günümüzde rutin olarak uygulanan kimyasal ve biyolojik arıtım yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilir. Enzimlerin arıtım işlemlerinde kullanımı mikroorganizmaların ya da kimyasalların kullanımından daha avantajlı olduğu için tercih edilmektedir.

Atıksuların ön arıtımı amacıyla çok çeşitli enzim sistemleri kullanılabilir. Bunlar arasında en yaygın olan üç enzim sistemi oksidoredüktazlar, liyazlar ve hidrolazlardır. Oksidoredüktazlar bir substrattan diğerine elektron transferini katalizleyen enzimlerdir. Spesifik olmamaları, fazla enerji tüketmeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca oksidasyon reaksiyonlarının kimyasal işlemlerle gerçekleştirilmesi sırasında hem çalışanlara hem de çevreye zararlı kimyasallar yaymaktadır. Oksidoredüktazlar oluşan kirliliğin kontrolü amacıyla zararlı kimyasalların alternatifi olarak yer alabilir. Yapılan çalışmalarda oksidoredüktaz grubunda yer alan peroksidaz enziminden yararlanılarak, atıksulardan fenol, kloroform, mikro kirleticiler, aromatik aminler, hidrokarbonlar ve petrokimyasallar gibi atıkların giderimi gerçekleştirilmiştir. Bu grupta bulunan enzimlerden lakkazlar ve tirozinazların ise fenol gideriminde avantaj sağladığı çeşitli çalışmalarda gözlemlenmiştir. Ayrıca peroksidaz ve lakkaz enzimi çeşitli renkli atıksuların renk gideriminde de kullanılmaktadır (Darwesh O. ve ark., 2019). Liyaz enzimleri kimyasal bağların kırılmasını katalizlemektedir. Bu gruptaki enzimlerden biri olan nitril hidrataz nitril atıklarının degradasyonunda, siyanür hidrataz atıksulardan siyanür gideriminde rol almaktadır. Hidrolaz grubu enzimler ise gıda üretilen endüstrilerinden oluşan atıkların arıtımında görev almaktadır. Oluşan bu atıklar nişastalar, karbonhidratlar, proteinler ve yağlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar enzim odaklı işlemlerin, fiziksel ve kimyasal giderme yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sağladığını göstermektedir (Bezerra C. Ve ark., 2015, Xu Y. ve ark., 2015, Hou X. ve ark., 2014, Başak B. ve ark., 2013, Fernández C. ve ark., 2013). Enzimlerin arıtmada kullanılmasının avantajları; önemli yan etkiler oluşturmaması, kirletici maddeleri etkin şekilde uzaklaştırması, enzimlerin işletilmesinin kolay olması, yalnızca eser miktarda enzim kullanılması, düşük

konsantrasyonlardaki kirletici maddeleri uzaklaştırma yeteneği ve aynı zamanda büyük hacimlerdeki atık sularda kullanılabilmesi olarak verilebilir. Peroksidazlar, lakkazlar ve tirozinazlar atıksudaki fenolik kirleticilerin ve renk sorununun giderilmesinde önemli ölçüde etki göstermektedir (Aydemir T. ve ark., 2015). Peroksidaz enzimi; 308 amino asidi yapısında içeren polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Katalaz, bitki ve hayvan peroksidazları olmak üzere üç farklı grupta incelenmektedirler. Bitki peroksidazları, ökaryot ve prokaryot kökenli olup, amino asit sıralamasına bağlı olarak üç gruba ayrılırlar. Peroksidazlar enzimleri; biyokimya, biyosensörler, gıda mühendisliği, biyoteknoloji, biyoinformatik, protein mühendisliği, biyokataliz ve genetik transfer gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bazı fenollerin veya aromatik grupların toksik etkilerini gidermesi özelliğinden dolayı atıksu arıtımında da son yıllarda kullanımı gündeme gelmiştir (Ariaenejad S. ve ark., 2021). Ancak tüm bu avantajların yanısıra enzimlerin biyolojik uygulamalar dışında kullanımı için çeşitli sınırlamaları vardır. Bu nedenle enzimler, çeşitli uygulamalarda uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir özellik taşıyabilmesi için immobilize edilmesi gerekir (Bezerra C. ve ark., 2015, Xu Y. ve ark., 2015, Şanlıer S ve ark., 2013). Enzimlerin immobilizasyonu için farklı destek malzemeleri kullanılmıştır. Örneğin kitosan; biyoyumlu, kimyasal değişikliklerden etkilenmemesi, hidrofiliklik, mekanik stabilite ve yenilenebilirlik gibi birçok özelliğe sahiptir. Bu özelliklerden dolayı son yıllarda yapılan çalışmalar, kullanılacak olan materyalin çözünürlüğünü arttırmak ve çevresel uygulamalarını geliştirmek için kitosanın kimyasal veya fiziksel reaksiyonlarda kullanılmasına odaklanmaktadır (Başak A.ve ark., 2013, Xu Y. ve ark., 2013).

1.4. İmmobilizasyon

Enzimlerin endüstriyel uygulamaları genellikle sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Enzimler ise suda çözünebilen katalizörlerdir. Bu sebeple serbest halde bulunan enzimlerin katalizör olarak kullanılmaları önemli sorunlara yol açabilmektedir. Enzim kullanılarak gerçekleştirilen bir tepkimede reaksiyonun durdurulması istendiğinde, enzim serbest halde bulunduğu ortamdan çıkarılarak uzaklaştırılmaz. Yapılan çalışmalarda kullanılan materyalleri ortamdan uzaklaştırma işlemi için inhibitörler kullanılmaktadır. Ancak inhibitör kullanılmadığında ise reaksiyonda oluşan ürünlerin etkilenebildiği gözlemlenmiştir. Ürünlerin etkilenmesini engellemek ise oldukça zordur. Ayrıca enzimatik reaksiyonları duraklatmak için inhibitör kullanılması enzimin verimli çalışmasını

engellemektedir ve reaksiyona giren serbest enzimin, reaksiyon bitiminde aktifliğini yitirmeden geri kazanılması pek mümkün değildir. Bu sebeple enzimlerin tekrar kullanımını engellemektedir ve enzimlerin pahalı olmaları nedeniyle ürün maliyetinin yükselmesine yol açmaktadır (Bilen Ç. ve ark., 2009).

İmmobilizasyon sözcüğünü kelime anlamı olarak ele alacak olursak, “tutuklanmış, hareketi kısıtlanmış” demektir. İmmobilizasyon, enzimlerin, mikroorganizmaların ya da bakterilerin fiziksel ve kimyasal yöntemlerle mevcut katalitik aktivitesini koruyarak, tekrar kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutulmasıdır (Yetim N. ve ark., 2019).

İmmobilizasyonun avantajları;

- Tekrar kullanılabilir olması,
- Sürekli sistemlerde uygulanabilmesi,
- Reaksiyon sona erdiğinde ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi,
- Serbest enzime kıyasla daha kararlı olması,
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklı olması,
- Ürün oluşumunun kontrol altında tutulabilmesi,
- Kesikli sistemler için uygun olması,
- Serbest halde bulunan enzimlerden daha yüksek aktiviteye sahip olması,
- Enzimin kendi kendine parçalanabilme ihtimalini azaltması olarak sıralanabilir.

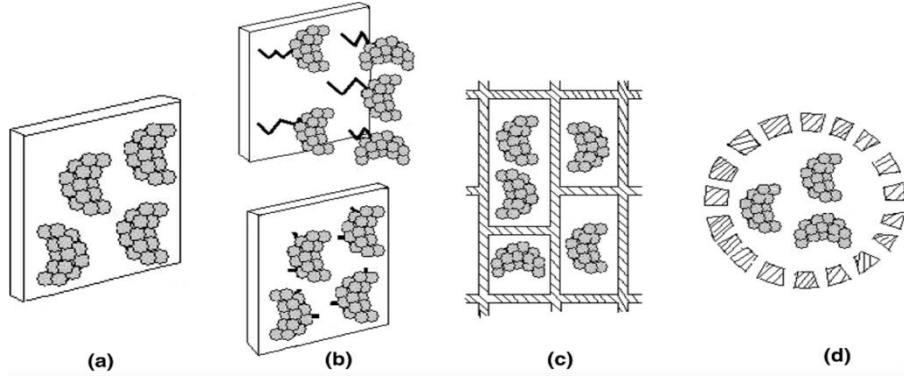
Diğer yandan immobilizasyonun dezavantajları ise:

- Hücre içerisinde istenmeyen reaksiyonların gerçekleşmesinde rol oynayan enzimleri içerebileceği için istenmeyen yan ürün oluşması,
- Hücre duvarı ve hücre membranlarından dolayı reaksiyon bileşiklerinin hücre içine ve dışına geçişini engellemesi,
- Ürünlerin taşıyıcıdan kopan hücreler ile kontamine olabilmesi,
- Besin ve enerji kaynağı arttığında substrat tüketiminin artması ve ürün veriminin azalması olarak sıralanabilir.

1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

Çeşitli taşıyıcılara enzim veya mikroorganizmaları bağlamak için farklı immobilizasyon yöntemleri uygulanmıştır (Uygun M. ve ark., 2006). Uygulanan bu

yöntemler; Adsorpsiyon(a), Kovalent bağlama(b), Tutuklama(c) ve Kapsülleme(d). Bahsedilen yöntemler aşağıda Şekil 1.1' de verilmiştir.



Şekil 1.1. a) Taşıyıcı üzerine adsorpsiyon b) Taşıyıcıya kovalent ve çapraz bağlama c) Taşıyıcı içinde tutuklama d) Kapsülleme

Adsorpsiyon; Kullanılan en eski immobilizasyon yöntemidir. Kısaca özetlenecek olursa enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanmasıdır. Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir.

Kovalent bağlanma; Hücrenin destek malzemesine kovalent olarak bağlanmasıdır. Immobilizasyon bağlayıcı bir ajan varlığında gerçekleşir. Hücre immobilizasyonundan çok enzim immobilizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde çeşitli bağlayıcı ajanlar kullanılır, bu ajanların en önemlileri; Glutaraldehit ve Hidroklorür 'dür.

Çapraz bağlanma; Enzimlerin çapraz bağlanma ile immobilizasyonu, ortamdaki protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcının üzerindeki fonksiyonel gruplara, moleküler grupların çaprazlanarak bağlanmasını sağlamaktadır. Tek başına kullanılması mümkün değildir. Bu yüzden genellikle kovalent bağlama yöntemiyle birlikte kullanılır.

Tutuklama yöntemi; Tutuklama metoduyla immobilizasyonda enzim kafes gibi çevreleme görevi gören polimer matris veya membran içerisinde tutuklanmaktadır. Bu tutulma yönteminin çalışma prensibinde, substratın içeri girmesine izin verilirken, proteinin de içeride muhafaza edilmesini sağlamaktadır.

Kapsülleme yöntemi; Enzimler yarı geçirgen polimer membran içerisinde hapsedilmektedir. Bu metodun avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlamanın yanı sıra sadece bir enzim değil, değişik tipte birçok enzimin aynı anda immobilize edilebilir olmasıdır (Uygun M. ve ark., 2006).

1.4.2. İmmobilizasyon yönteminde kullanılan destek malzemesi ve özellikleri

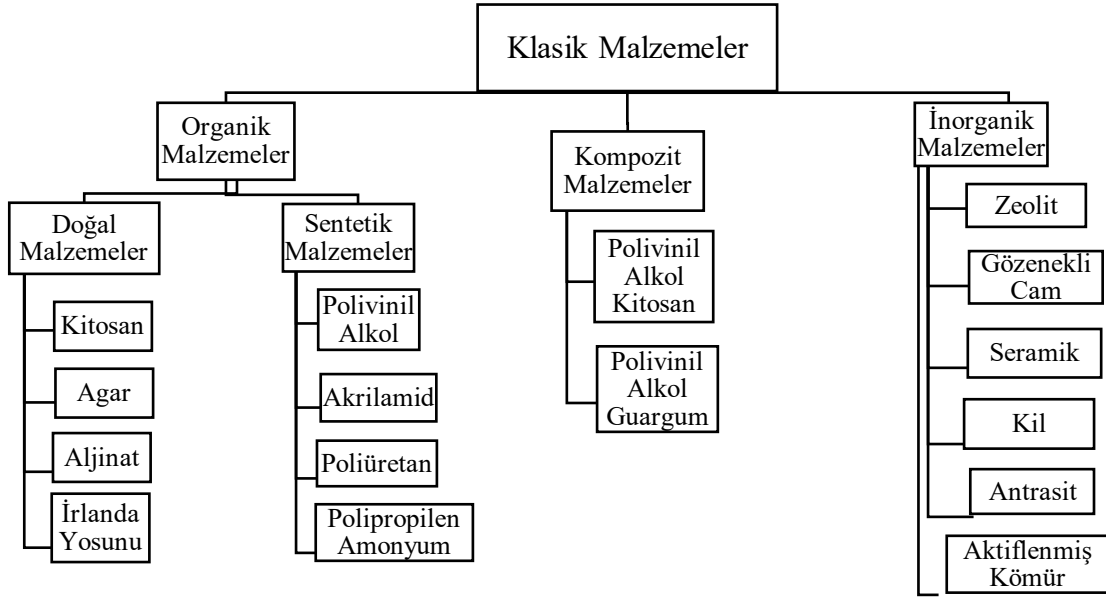
Kullanılan destek malzemesi, immobilizasyon yönteminin anahtar parçasıdır. Uygun taşıyıcı malzemelerin seçilmesi, enzimin aktivite kapasitesini ve immobilize biyokütlenin stabilitesini artırmak için elverişlidir. İmmobilize mikroorganizmaların yaşamsal aktivitesini etkilediği ve bu sebeple immobilizasyon sisteminde kullanılacak olan atık su arıtma işleminin verimliliğine etki gösterdiği için immobilizasyon sürecinde verilecek çok önemli bir karardır (Bilal M. ve ark., 2018).

Destek malzemesi;

- Çözünmez olmalı,
- Biyokütle tarafından biyolojik olarak parçalanmamalı,
- Toksik olmamalı,
- Ucuz, kullanımı ve yenilenmesi kolay olmalı,
- Biyoyumlu olmalı,
- Biyolojik aktivitelerini sabitleyip enzimlerin doğal yapısını koruyarak sabit bir ortam sağlamalıdır.

Destek malzemeleri organik malzeme, inorganik malzeme ve kompozit malzeme olmak üzere üçe ayrılır:

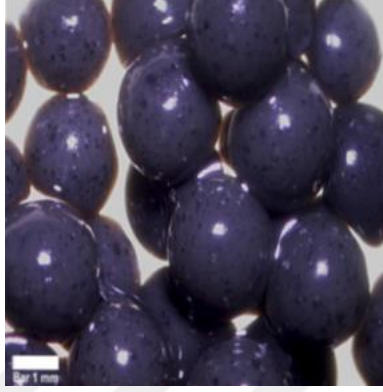
1. **İnorganik malzemeler;** İnorganik malzemelere örnek olarak aktif kömür, kil, zeolit, antrasit, seramikler ve gözenekli cam verilebilir.
2. **Organik malzemeler;** Organik malzemelere örnek olarak kitosan, agar, aljinat ve İrlanda yosunu gibi doğal taşıyıcılar ve polivinil alkol (PVA), poliüretan ve akrilamid gibi sentetik polimerler verilebilir.
3. **Kompozit malzemeler;** Kompozit malzemeler hem organik hem de inorganik malzemelerin bir kombinasyonunu temsil eder; bu iki türün performansının entegrasyonunu sağlar. Kompozit malzemelere örnek olarak polivinil alkol kitosan, polivinil alkol guar gum verilebilir (Zdarta J. ve ark., 2018). Klasik destek malzemeler aşağıda Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Klasik destek malzemeleri

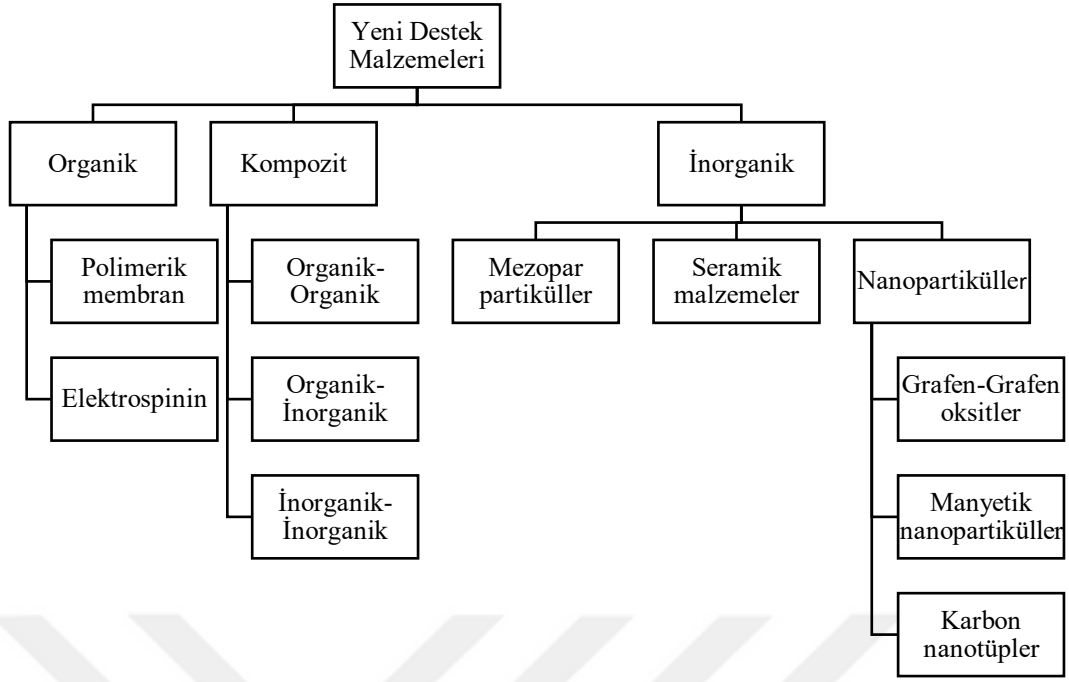
Kitosan; karides, ıstakoz ve yengeç gibi sert kabuklu eklem bacaklıların kabuklarında, bazı bakterilerin ve mantarların ise hücre duvarlarında bulunur. Kitosan yapı olarak reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip, selülozdan sonra doğada en yaygın bulunan polimer türü olan kitinin ((1-4)-poli-Nasetil-D-glukozamin) deasetilasyonu ile elde edilen bir türüdür. Kitosanın ortalama molekül ağırlığı 3.200- 2.000.000 g/mol arasındadır. Kitosanın kitine kıyasla en ilgi çekici malzeme olmasının temel nedeni ticari olarak elde edilebilir ve birçok formda kullanılabilir olmasıdır. Beyaz renkli yarı şeffaf, tatsız, kokusuz, partikül veya toz halinde bulunan bir madde olan kitosan, sindirim enzimlerine karşı da oldukça dayanıklı bir madde olmasına rağmen bazı bakteriler tarafından ise kolayca parçalanır özelliktedirler. Sadece asidik ortamlarda (<6.0 pH) çözünürler, suda çözünmezler. Kitosanın vücut içerisinde tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanmasından dolayı insanlar üzerinde de herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır. Kitosana etki eden parametreler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, renk, viskozite ve çözünürlük olarak verilebilir. Deasetilasyon derecesi; kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlem sayesinde kitosanın yapısında yalnızca amin grupları kalmaktadır. Kitosanın deasetilasyon derecesi, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde etki etmektedir. Kitinin belli derecede deasetilasyonu (%60 ve üzeri) sonucunda “kitosan” elde edilmektedir. Kitin ve kitosanın moleküler ağırlığı, elde edilen ham maddeye, sıcaklığa, zamana ve NaOH konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarı, kitosanın parçalanmasına sebep olmakta ve molekül ağırlığını

düşürmektedir. Öte yandan yüksek sıcaklık kitosanın molekül ağırlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Genellikle 4°C’de depolanan kitosan çözeltisi viskozite açısından en iyi stabiliteyi gösterdiği gözlemlenmiştir. Kitosanın çözünmesinde genel olarak asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kullanılırken kitinin çözmesi için ise lityum klorür ve dimetilasetamid gibi toksik özellikte çözeltiler kullanılmaktadır (Demir A. ve ark., 2009). Kitosan boncuklar Şekil 1.3’de görülmektedir.



Şekil 1.3. Kitosan boncuk (Aydemir T. vd., 2015)

Klasik destek malzemelerinin yanı sıra yeni destek malzemeleri üretilerek immobilizasyon yönteminin atıksu arıtımında kullanılmasının artırılması hedeflenmiştir. Bu sebeple, enzime göre uyarlanmış yeni malzemelerin keşfi ve kullanımı son zamanlarda giderek önem kazanmaktadır. Hem organik hem de inorganik yapıdaki bu malzemelerin, olağanüstü termal ve kimyasal kararlılık özelliği sayesinde kolay bir şekilde karakterizasyonu sağlanmaktadır. İmmobilize biyoreaktörler artırılmış katalitik verimlilik sergiler ve reaksiyon ürünlerinin saflığı ve kalitesini artırır (Zdarta J. ve ark., 2018). Yeni destek malzemeleri Şekil 1.4’te görülmektedir.



Şekil 1.4. Yeni destek malzemeleri

Manyetik Nanopartiküller; Enzim stabilizasyonu ve enzim moleküllerinin immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağlayan çeşitli nano yapılar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yapılar nano taşıyıcılar grubu manyetik nanopartiküller (MNP'ler) kullanışlı ve kolay üretilir olması bakımından öne çıkmaktadır (Govan G. ve ark., 2014). Manyetik olmayan malzemeler ile karşılaştırıldığında, manyetik parçacıkların; yüksek süper para manyetizma kuvveti, geniş yüzey alanı, harici manyetik alanlar altında kolay ayırma gibi benzersiz özellikleri yüklem kapasitesini büyük ölçüde iyileştirir ve difüzyon sınırlamasını azaltır (Xu Y. ve ark., 2014). En yaygın kullanılan manyetik parçacıklar, düşük toksisite ve biyouyumluluk nedeniyle manyetit (Fe_3O_4) ve maghemittir ($\gamma-Fe_2O_3$) (Xu Y. ve ark., 2014). Bu materyaller, immobilizasyon verimini ve elde edilen biyokatalitik sistemin verimliliğini önemli ölçüde artırmayı hedefler.

Manyetik nanopartiküller, enzim bağlanması için matris yüzeyinde daha yüksek enzim yüklenmesine ve artan immobilizasyon verimine yol açan geniş bir yüzey alanı sağlar. Bununla birlikte, nanopartiküllerin diğer inorganik malzemelere göre en büyük avantajı, difüzyon sınırlamalarını en aza indirme yetenekleridir. Enzim molekülleri, gözeneksiz partiküllerin yüzeyine bağlanır ve aktif bölgeleri substratlarla geniş temasa maruz kalır. Bu, nanopartiküllere dayalı biyokatalitik sistemlerin genellikle yüksek katalitik aktivite sağladığı anlamına gelir.

Manyetik nano partiküllere örnek olarak;

- Titanyum Dioksit
- Çinko Oksit
- Demir Oksit
- Sıfır Değerlikli Demir
- Nano Killer verilmektedir (Zdarta J. ve ark., 2018)

1.4.3. İmmobilize enzim ile ilgili yapılan çalışmalar

Atıksuların ön arıtmaları amacıyla kullanılan enzimlerin başında amilaz, proteaz, lipaz, selüloz ve peroksidaz enzimleri gelmektedir. Enzimlerin arıtıma katkı sağlamasına rağmen tekrar kullanımının mümkün olmaması, çevresel faktörlerden etkilenmesi gibi dezavantajlarından dolayı günümüzde atıksu arıtım sistemlerinde enzimler; mikroorganizmalarla, nutrientler ve partiküllerle kombine olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda atıksuların arıtımında uygulanan immobilizasyon tekniği ile immobilize enzimlerin serbest enzimlerden daha etkili oldukları tespit edilmiştir (Bilal M. ve ark., 2018).

Husain Q. ve ark., (2019) yapmış oldukları bir çalışmada katyon değiştirici bir reçineye immobilize edilmiş olan peroksidaz enziminin fenol gideriminde serbest haldeki enzimle kıyaslandığında daha başarılı olduğunu rapor etmişlerdir.

Tekstil endüstrisi atıksularında yer alan antrakinon ve azo boyalarının renk giderimi amacıyla immobilize ve serbest peroksidaz enziminin kullanıldığı bir çalışmada ise immobilize enzimin sıcaklık stabilitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve immobilize enzim kullanıldıktan sonra ortamdan kolaylıkla ayrışabilmektedir. Ancak enzim aktivitesinde bir miktar düşüş meydana geldiği görülmüştür (Erol B. ve ark., 2019).

Peroksidaz enziminin immobilizasyonunda Cebre Sakaroz 4B destek materyalinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise ambalaj atıklarından oluşan rengin gideriminde immobilize enzimlerle elde edilen giderim oranının serbest enzimle elde edilenden 2,7 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Fatima A. ve ark., 2007).

İmmobilize lakkaz enziminin atıksulardaki renk gideriminde kullanıldığı bir başka çalışmada ise reaktif tekstil boyalarının depolarizasyonunda immobilize haldeki enzimin yüksek etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (depolarizasyonunda R. ve ark., 2011).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Yapılan çalışmalarda çeşitli kimyasal malzemeler kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal malzemelerin listesi ve markası Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Amonyak çözeltisi	NH ₄ OH	Merck
2,2-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu	ABTS	Merck
Deasetile kitin, Poli (D-glukozamin)		Merck
Glutarikdialdehit çözeltisi		Merck
Sodyum trifosfatpentabazik	TPP	Merck
Nanokil, hidrofilikbentonit		Merck
Yaban turpu peroksidaz		Merck
Asetik Asit	CH ₃ COOH	Merck
Sığır serum albümini	BSA	Merck
Demir (III) klorür	FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck
Demir sülfat heptahidrat	FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Sülfirik asit	H ₂ SO ₄	Merck
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	Merck
Fosfat	PO ₄ ³⁻	Merck

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmalarda laboratuvarda bulunan çeşitli cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan cihazların listesi, marka modeli ve çalışmaya katkısı Çizelge 2.2’te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka / Model	Kullanım Amacı
Termoreaktör	ECO 16 Thermoreaktör, Velp Scientifica, Milano, İtalya.	Renk analizi
pH metre	WTW marka prob (WTW Multi 340i, Weilheim, Almanya).	pH ölçümü
Hassas terazi	Ohaus, pioneer tm, pine brook, nj, ABD	Miktar ölçümü
Spektrometre	HACH-DR 5000 marka spektrometrede hach-lange, dusseldorf, Almanya	KOİ, renk analizi
SEM	SEM, carl zeiss, evo 50 model, Almanya.	Partikül sentezleme
XRD	Bruker, Almanya	Partikül sentezleme
Etüv	Ecocell, ec111, planegg, Almanya	Deneyisel malzeme sterilizasyonu
Manyetik karıştırıcı	M TOP shsd150, Almanya	Sistem homojenizasyon
Ultrasonik banyo	Kudos hp series 53khz, Çin	Partikül sentezleme
Çalkalayıcı (shaker)	New brunswick sicientific incubator shaker series 126, Almanya	Enzim immobilizasyonu
Santrifüj	Labortechnik, wehingen, Almanya	KOİ, renk analizi

2.2. Metot

2.2.1. Atıksu içeriği

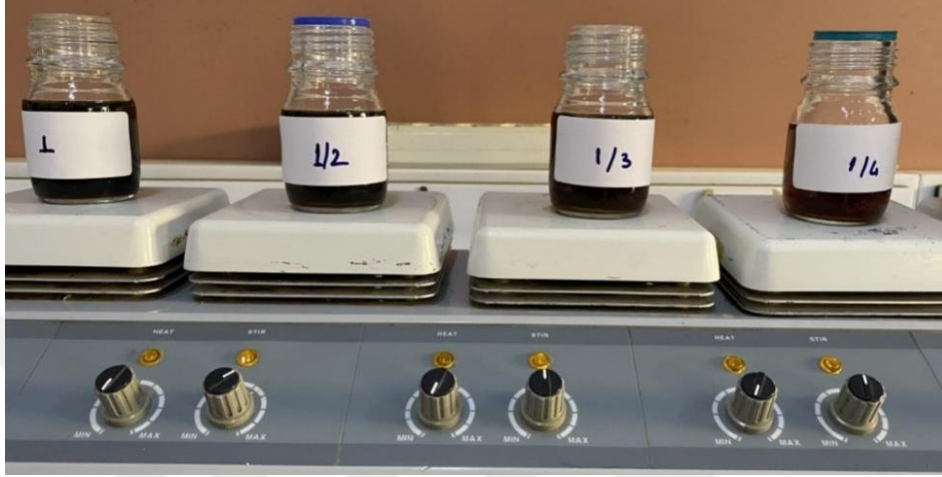
Atık su, Kahramanmaraş ili katı atık tesisinin çöp sızıntı suyundan toplanmıştır. Üniversitemizde bulunan laboratuvarında anaerobik membran biyoreaktör sistemi kurularak biyolojik arıtma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sistem sonunda %50 KOİ ve %40 renk giderim verimi elde edilmiştir. Deşarj standartlarını sağlamadığı için ileri arıtma yapılması uygun görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan biyolojik olarak arıtılmış çöp sızıntı suyunun (ÇSS) özellikleri büyük ölçüde değişkendir ve arıtılmış atık suyun ortalama değerleri Çizelge 2.3’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Biyolojik ön arıtmadan geçmiş çöp Sızıntı Suyu karakterizasyonu

Parametreler	KOİ (mg/L)	RENK (Pt-Co)
Ham LFL (Depolama sızıntı suyu)	16000	9000
AnMBR Atık Konsantrasyon (mg/L)	7837	5400

2.2.2. Deney düzeneği

Tez kapsamında çalışma için kullanılacak reaktör hacmi 1L olarak belirlenmiştir (şekil 2.1) ve 4 farklı konsantrasyon için 4 adet reaktör eř zamanlı olarak işletilmiştir. Deneysel planda belirlenen süre boyunca sistem çalıştırılıp, belirtilen aralıklarda numune alınmıştır.



şekil 2.1. Tez çalışmasında kullanılan deney düzeneği

2.2.3. Deneysel plan

Proje kapsamında laboratuvar koşullarında biyolojik ön arıtımı sağlanmış SS'nin immobilize peroksidaz enzimi ile arıtım çalışmalarında izelge 2.4'deki deneysel plan kullanılmıştır ve bu deneysel plan doğrultusunda yöntemler geliştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Deneysel Plan

İş Paketi (İP)	Çalışmalar					
İP 1	Laboratuvar Koşullarında Kullanılacak Malzemelerin Tedarik Edilmesi ve Reaktör Kurulumu					
İP 2: Aktifleştirilmiş Serbest Enzimin Atıksu Arıtma Performansına Etkisi	İP 2.1: Seyreltme Oranlarının ve Sıcaklığın Değerlendirilmesi	Seyreltme Oranları (v:v)	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	pH	Enzim Konsantrasyonu (U/mL)
		1				
		1:2				
		1:3				
	1:4					
	İP 2.2: pH Etkisinin Araştırılması	Opt.	Opt.	Opt.	3-5-10	5
	İP 2.3: Enzim Konsantrasyonunun Etkisinin Değerlendirilmesi	1	Opt.	Opt.	Opt.	5
1:4		20				
İP 3: Manyetik Kitosan Kil Boncuğun Atıksu Arıtma Performansına Etkisi	-	Opt.	Opt.	5-10-15-20-25-30	Opt.	5
İP 4: İmmobilize Peroksidaz Enziminin Atıksu Arıtma Performansına Etkisi	-	Opt.	Opt.	5-10-15-20-25-30	Opt.	5

İP 1: Tez kapsamında satın alınması gereken sarf malzemeler tedarik edilmiştir. Merck marka enzim aktivite edilip reaksiyon için hazırlanmıştır. Sistem pH propu, termometre, sıcaklık ayarlı manyetik karıştırıcı ve karışımı sağlayacak balık ile dizayn edilerek reaksiyona uygun hale getirilmiştir.

İP 2: Bu iş paketinde aktifleştirilmiş serbest enzimin atıksu arıtma performansına etkisi değerlendirilmiştir. İlk olarak serbest haldeki enzim ile işletilen reaktörde farklı atıksu seyreltme oranları (1- 1:4 v:v), sıcaklık (25-65 °C) ve reaksiyon süreleri (5-30 dk) test edilmiştir (İP 2.1). Optimum seyreltme oranı reaksiyon süresi ve sıcaklığı belirlendikten sonra farklı pH (3-5-10) değerlerinde reaksiyon gerçekleştirilerek optimum pH değeri belirlenmiştir (İP 2.2). Daha düşük seyreltme oranında yüksek arıtım verimi elde edebilmek için 2 farklı enzim konsantrasyonunda (5-20 U/mL) reaksiyon gerçekleştirilerek optimum enzim konsantrasyonu belirlenmiştir (İP 2.3).

İP 3: Çalışmanın bu aşamasında manyetik kitosan kil boncuk sentezlenmiştir ve elde edilen boncuğun optimum koşullar altında arıtım performansı incelenmiştir.

İP 4: Son olarak sentezlenen boncuğa peroksidaz enzimi immobilize edilerek, arıtıma etkisi araştırılmıştır.

2.2.4. Serbest enzimin aktifleştirilmesi

Tez kapsamında laboratuvar ölçekli bir sistem dizayn edilip serbest enzim kullanılarak atıksu arıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Aktifleştirme işleminde kullanılmak üzere 0,1 M fosfat tamponu hazırlanmıştır. Sistemde kullanılan enzim hazır olarak alınmış olup, katı halde bulunan enzimden belirlenen miktarda alınarak 0.1 M 50 ml fosfat tamponu içerisine eklenilerek 4 °C'de 12 saat boyunca karıştırılmıştır.

Deneyde kullanılan enzim miktarı Denklem 1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Aktive enzim ise reaksiyona katılmak üzere sisteme eklenip arıtım performansına etkisi gözlemlenmiştir. Atıksu ile enzimin temas yüzeyini arttırmak amacıyla sistem sürekli olarak karıştırılmıştır.

$$1000 \text{ U} = 3,6 \text{ mg}$$

1gr enzim maddesinde = 279 U enzim bulunmaktadır.

$$\begin{array}{rclcl} 1000 \text{ U} & 3,6 \text{ mg} & 1 \text{ mg} & 279 \text{ U} & \\ 5 \text{ U} & X \text{ mg} & X \text{ mg} & 5 \text{ U} & \\ \hline X = 0,018 \text{ mg} & & X = 0,018 \text{ mg} & & (2.1) \end{array}$$

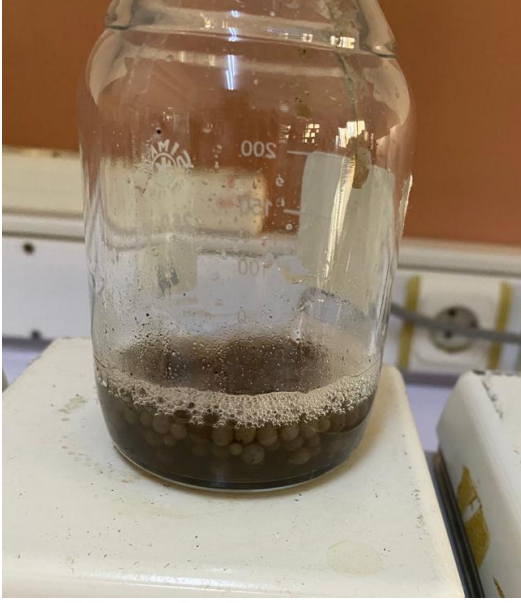
2.2.5. Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) sentezlenmesi

Fe₃O₄ manyetik nano partikülün sentezlenmesi için hazır olarak alınan demir (III) klorür (FeCl₃.6H₂O) ve demir sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) 8,109 gr ve 4,170 gr olacak şekilde cam şişeye eklenmiştir. Ardından 30 ml saf su eklenerek 15 dk karıştırılmıştır. 15 dakika sonunda önceden hazırlanmış %10'luk amonyak çözeltisinden 60 ml damlalar halinde karışıma eklenmiştir. Amonyak çözeltisi eklenildikten sonra 60 °C'de 450 rpm'de 90 dk boyunca karıştırılmıştır. Karışım sonunda saf su eklenerek soğumaya bırakılmıştır.

Karışımındaki amonyak kokusu gidene kadar saf su ile yıkanmıştır (7 kez). Manyetik parçacıklar tamamen çökelediğinde üst suyu alınarak 80 °C'de 16 saat boyunca etüvde kurutulmuştur.

2.2.6. Manyetik kitosan kil boncuk sentezlenmesi

Manyetik kitosan kil boncuk sentezinde ilk olarak kullanılacak olan kitosan ve kil malzemelerin aktifleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kitosan pulların aktifleştirilmesi için 2gr kitosan pulları alınarak önceden hazırlanmış %2'lik asetik asit çözeltisi içerisine eklenilmiştir. 100 ml asetik asit ile karıştırılan kitosan pullar çözelti içerisinde çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra 50 gr nanokil 1M 250 ml sülfürik asit (H₂SO₄) içerisine eklenerek 80 °C'de 2 sa karıştırılır. Karıştırıldıktan sonra saf su ile yıkanarak 110 °C'de 12 sa boyunca etüvde kurutulmuştur. Boncuk elde etmek için 1 gr aktifleştirilmiş kil, 2 gr kitosan ve 1 gr demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) 100 ml asetik asit içerisine ilave edilerek 10 dk boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. 10 dk sonunda ultra ses cihazına yerleştirilerek oluşan kabarcıklar yok edilmiştir. Hazırlanan karışım 20 ml soğuk TPP solüsyonuna (pH 8.2) damlalık yardımı ile eklenmiş ve 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışım işleminden sonra boncuk nötr hale gelene kadar saf su ile yıkanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Üretilen manyetik kitosan kil boncuk

2.2.7. Peroksidaz enziminin immobilizasyonu

Peroksidaz enzimi bölüm 2.2.6'da üretilen manyetik kitosan kil boncuklar kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyondan önce MKKB'ları aktif hale getirebilmek için 5 gr etanol eklenerek 10 dk sonikasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 10 ml %10'luk glutaraldehit çözeltisi ilave edilmiş ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından deiyonize su ile yıkama yapılmıştır.

İmmobilizasyon işleminde ilk olarak aktive edilen MKKB'lar 12 saat boyunca 0.1 M fosfat tamponunda 4°C'de saklanmıştır. 12 saat sonunda peroksidaz enzimi içeren (5U/ml) 50 ml fosfat tampon çözeltisi içerisine eklenmiştir (pH:6). Enzim miktar hesabı Denklem 1'de verilmiştir. Karışım 100 rpm'de çalkalanarak 4°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda deiyonize su ile yıkanarak 4°C'de saklanmıştır

2.2.8. Analizler

Biyolojik olarak ön arıtımı gerçekleşmiş ÇSS'nin arıtılabilirlik çalışmaları boyunca sistem performansını değerlendirmek amacıyla; pH, renk, sıcaklık, KOİ parametreleri belirli aralıklarla takip edilmiştir.

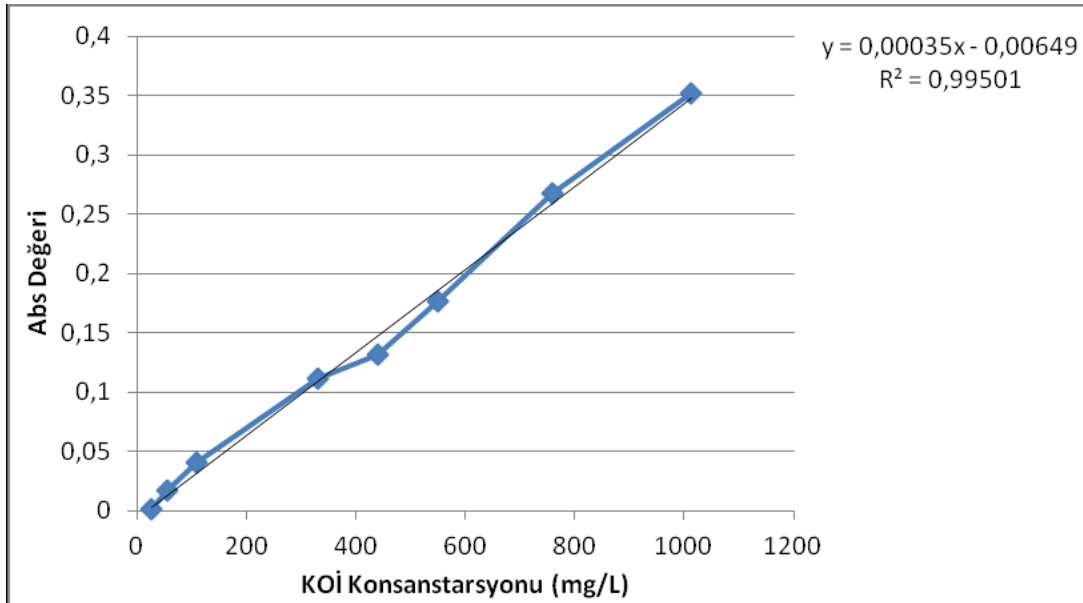
pH Ölçümü:pH ölçümleri WTW marka prob (WTW Multi 340i, Weilheim, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal oksijen ihtiyacı tayini (KOİ, mg/L):2 ml alınan numune üstüne 1,5 ml parçalama çözeltisi (15,324 gr K₂Cr₂O₇, 49,95 gr HgSO₄ ve 250,5 gr H₂SO₄ balon jöjeye

eklenerek 1000 ml ye tamamlanmış) ve 3,5 ml sülfirik asit-civa sülfat çözeltisi (10,12 gr Ag_2SO_4 balon joje içerisinde 1000 ml'ye H_2SO_4 ile tamamlanmış) eklenerek termoreaktörde (Şekil 2.3. a) (ECO 16 Thermoreaktör, Velp Scientifica, Milano, İtalya) $150^{\circ}C$ 'de 2 saat bekleddikten sonra 600 nm'de HACH-DR 5000 marka spektrometrede (Hach-Lange, Dusseldorf, Germany) (Şekil 7b). 600 nm'de absorbans değeri okutulmuştur. Sonuçların okunmasında 0-1000 mg/L aralığında potasyum hidrojen ftalat ile yapılan korelasyon eğrisi kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. KOİ ve renk analizlerinin yapıldığı termoreaktör (a) ve spektrofotometre (b)



Şekil 2.4. KOİ tayini için oluşturulan korelasyon eğrisi

Korelasyon eğrisi sonucu elde edilen denklem ise;

$$x=[y+0,00649] /0,00035 \quad (2.2)$$

olarak ifade edilmiştir. Burada;

x: Kimyasal oksijen ihtiyacı konsantrasyonu (mg/L)

y: Spektrofotometrede okunan Abs değerini ifade etmektedir.

Renk Analizi: Tez kapsamında renk ölçüm birimi olarak Pt-Co kullanılmıştır. Renk analizleri HACH DR 5000 (Loveland, CO., ABD) spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir (Şekil 7b). Analizi yapılacak tüm sıvı numuneler analiz öncesinde Hermle Z 200A marka santrifüj cihazında (Labortechnik, Wehingen, Almanya) 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

SEM analizi: Çalışma periyotlarının öncesinde ve sonrasında, sentezlenen manyetik kitosan kil boncuklardan numune ayrılarak %2,5 paraformaldehit çözeltisi ile sabitlenmiştir. Hazırlanan örnekler altın ve palladium karışımı ile kaplanmış ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Carl ZEISS, EVO 50 model, Almanya) ile görüntüleri alınmıştır.

FTIR analizi: FT-IR spektrumu, KBr peleti ile FT-IR Spektrofotometre Model 2000'e (Perkin Elmer) kaydedilmiştir. Kullanılan dedektör, döteryumlu triglisin sülfat (DTGS) idi. Spektrumların kaydı sırasında 4 cm⁻¹ spektral çözünürlükte toplam tarama sayısı 50 idi.

XRD analizi: X-Işınları difraktometresi işlemi, malzemelerin kristallografik yapıdaki özelliklerinin ve içerdikleri fazların belirlenmesini sağlayan hasarsız bir analiz yöntemidir. Genellikle toz numunelere uygulanan X-ışını difraksiyonu sonucu maddenin kristal yapısının yanısıra, tane boyutu ve tercihli yönelmesi gibi özellikleri belirlenmektedir. (XRD, Bruker Amerika) cihazı tarafından analiz edilmektedir.

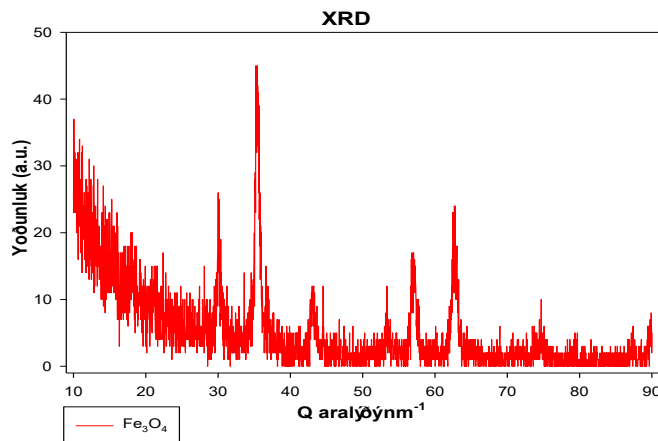
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) sentezlenmiştir. Daha sonra satın alınan kitosan ve kil ile karıştırılarak manyetik kitosan kil boncuklar elde edilmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik ve analitik yöntemlerle (FTIR, SEM, XRD) belirlenmiştir. Manyetik kitosan kil boncuk sentezinden sonra serbest enzim, boncuk ve immobilize boncuğun artıma etkisi incelenerek karşılaştırılmıştır.

3.1. Sentez ve Karakterizasyon

3.1.1. Fe_3O_4 sentezi ve karakterizasyonu

Sentezlenen manyetik nanopartikül maddenin (bkz başlık 2.2.5) karakterizasyonu X-ışını kırınımı (XRD) tekniği ile değerlendirilmiştir. Nanopartikül maddenin X-ışını kırınım modelleri Şekil 10'da gösterilmektedir. Fe_3O_4 nanopartikül madde sırasıyla (26.03), (45.22), (16.87) ve (23.93) yansımalarına karşılık gelen $2\theta=29.97$, 35.47, 57.05, 62.43 dört karakteristik zirveye sahiptir. Bu zirvelerle malzemelerin kristal yapısı oluşturulabilir. XRD çizgi genişlemesinde Scherrer denklemini kullanarak, Fe_3O_4 'ün hesaplanan ortalama partikül boyutunun 10 nm olduğu elde edilmiştir. $2\theta=35.47$ 'de düzlem ortalama kırınım zirvesi, yoğun yapısı nedeniyle manyetik nanopartikül (Fe_3O_4) maddenin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

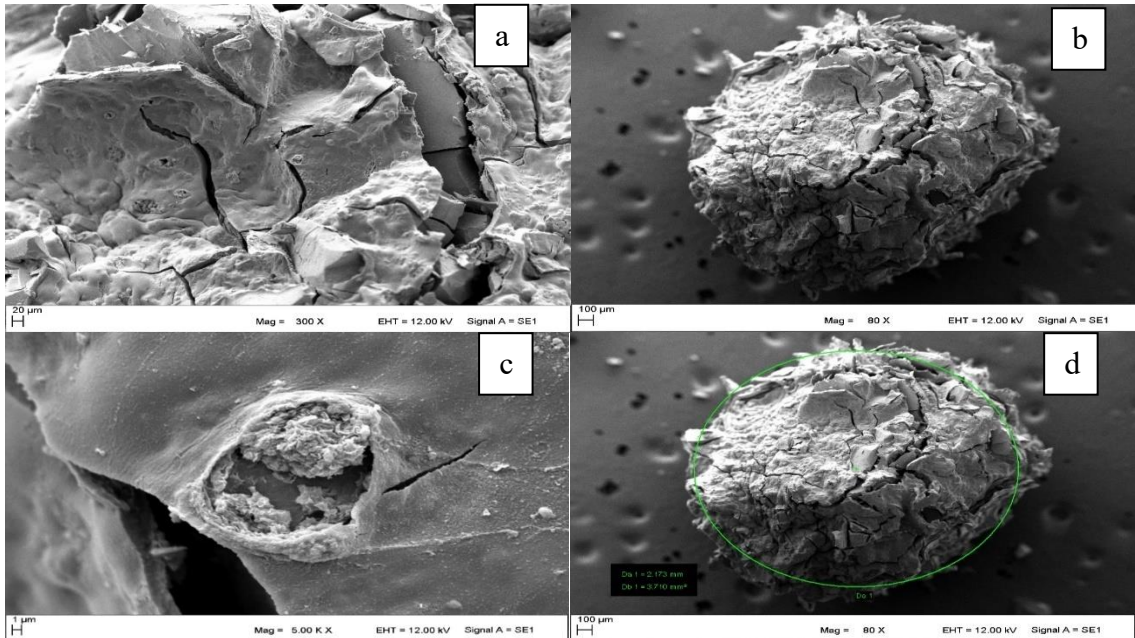


Şekil 3.1. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) parçacıklarının X ışını kırınım (XRD) grafiği

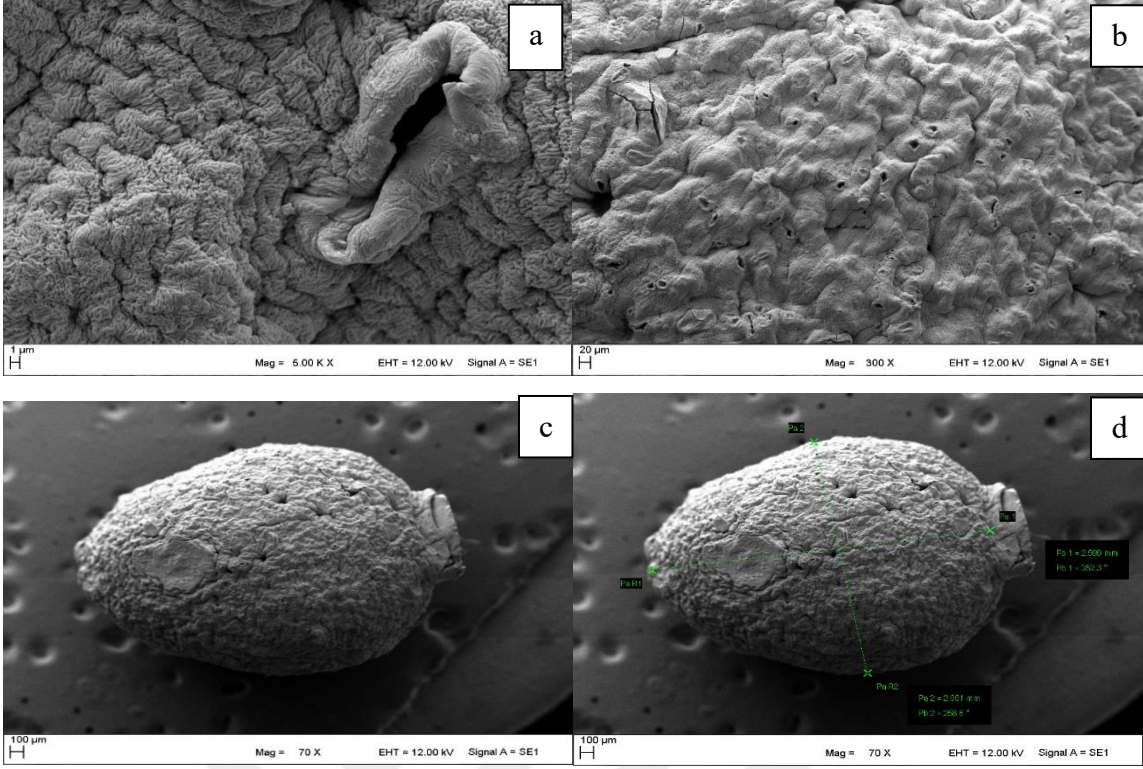
3.1.2. Manyetik kitosan kil boncuk sentezi ve karakterizasyonu

3.1.2.1. SEM analizi

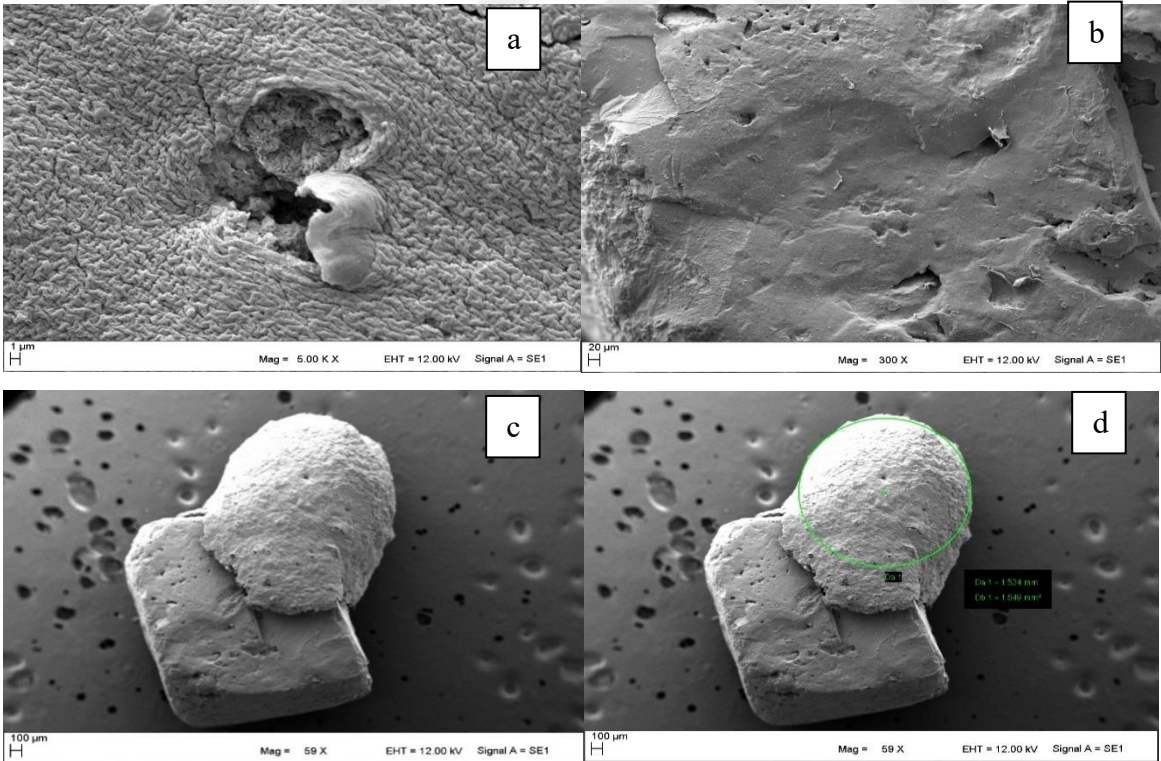
Manyetik kitosan kil (Fe_3O_4 -kil-kitosan) kompozit boncukların (bknz başlık 2.2.6') SEM görüntüleri Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12'de gösterilmektedir. SEM analizi, manyetik boncuklardaki, bileşenlerin homojen bir kombinasyon oluşturduğunu ve kitosan yüzeyleri üzerinde dağılım sağladığı gözlemlenmiştir. Boncukların ortalama çapları sırasıyla 2.173 mm, 2.66 mm ve 1.534 mm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen morfolojik görüntüler daha önceki araştırmacılar tarafından yapılan çalışma bulgularına benzer özellikler göstermiştir (Xu. Y ve ark., 2013, Dinçer A. ve ark., 2012, Aydemir T. ve ark., 2015). Şekil 2.3 a-b-c 'de MKKB'un SEM görüntüsü verilmektedir. Yapısal olarak diğerlerine oranla daha gözenekli bir yapıya sahiptir. Ayrıca yüzeyinde Fe_3O_4 maddesinin varlığı gözlemlenmektedir. Şekil 11 a-b-c 'de ise MKKB'a peroksidaz enziminin immobilizasyonu sonrasındaki SEM görüntüsü verilmiştir. Bu görüntülerde boncukta bulunan gözeneklerin enzim ile kaplanması sonucunda boncuğun Şekil 10'e oranla gözenekli yapısının azaldığı ve homojenize bir boncuğa dönüştüğü görülmektedir. Son olarak Şekil 3.3. a-b-c'de peroksidaz immobilize edilmiş MKKB'un atıksu arıtımında kullanıldıktan sonradaki SEM görüntüleri verilmiştir. Yüzeyinden anlaşılacağı üzere boncuk atıksudaki kirletici maddeleri enzim yardımı ile adsorbe ettiğinden gözenekler kirletici maddeler ile kaplanmış ve bazı kısımlarında deformasyon oluşmaya başlamıştır.



Şekil 3.2. Manyetik kitosan kil boncuğun SEM görüntüsü (a) 300x, (b) 80x, (c) 5.00x, (d) 80x çap



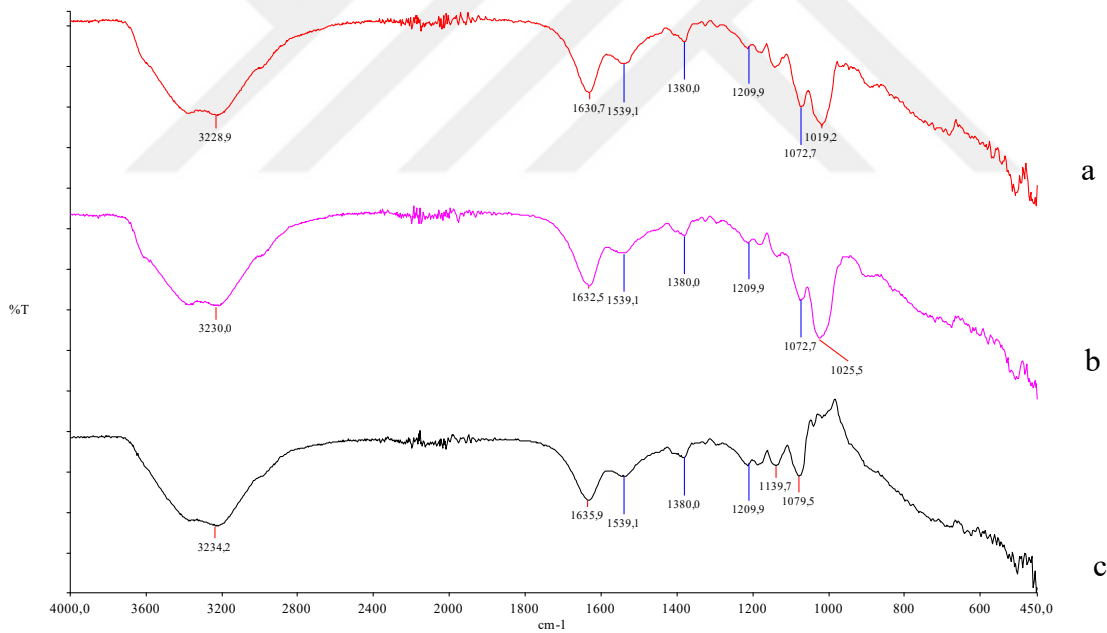
Şekil 3.3. İmmobilize enzimli manyetik kitosan kil boncuğun SEM görüntüsü (a) 5.00x, (b) 300x, (c) 70x, (d) 70x çap



Şekil 3.4. İmmobilize enzimli manyetik kitosan kil boncuğun arıtımda kullanıldıktan sonra SEM görüntüsü (a) 5.00x, (b) 300x, (c) 59x ve (d) 59x çap

3.1.2.2. FTIR analizi

Manyetik kitosan kil boncuk (Şekil 13a), enzim immobilize edilmiş manyetik kitosan kil boncuk (Şekil 13b) ve arıtımda kullanılmış manyetik kitosan kil boncuklarına (Şekil 13c) karşılık gelen FTIR spektrumları gösterilmektedir. Şekil 13'te görüldüğü gibi, 3220-3240 cm^{-1} civarındaki tepe noktası -OH grubuna atfedilir. C-O'nun gerilme titreşimleri 1635 cm^{-1} 'de bulunur. Karakteristik adsorpsiyon bantları, N-H eğilme titreşimine atanabilen 1539 cm^{-1} 'de ortaya çıktı ve 1380 cm^{-1} 'de tepe noktaları, kitosandaki birincil alkolik grubun C-O gerilmesinden dolayı ortaya çıkmıştır. MKKB, enzim immobilize edilmiş MKKB ve arıtımda kullanılmış MKKB için benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda literatür ile benzer sonuçlar göstermektedir (Auta M. ve ark., 2014, Bayramoglu G. ve ark., 2008, Aydemir T. ve ark., 2015). 600- 450 cm^{-1} civarındaki tepe noktalarının manyetik nanoparçacıkların varlığını doğrulayan Fe-O titreşiminden kaynaklandığını bildirmiştir (Wu X. ve ark., 2012). Spektrumları ayrıca nanokompozitlerin yüzeyinde birçok oksijen içeren grup olduğunu gösterir.



Şekil 3.5. Enzim immobilize MKKB (a), Arıtımda kullanılmış enzim immobilize MKKB (b), MKKB (c)

3.1.2.3. Manyetik kitosan kil boncuğun mıknatıs ile ayrılma kabiliyeti

Manyetik kitosan kil boncukların harici bir mıknatıs tarafından ayrılma kabiliyeti Şekil 14'de gösterilmektedir. MKKB manyetizasyon özelliğini yapısında bulunan Fe_3O_4 nanoparçacıklarından almaktadır. Manyetik olmayan taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, manyetik kitosan boncuklarının manyetik özelliği, enzim immobilizasyonu için önemli bir

avantajdır. Manyetik özellik sayesinde kullanıldıktan hemen sonra bir mıknatıs yardımı ile sistemden ayrılabilir. Bu nedenle manyetik parçacıkların kullanılması sermaye ve işletme maliyetini azaltabilir (Xiao H. ve ark., 2006, Aydemir T. ve ark., 2015).

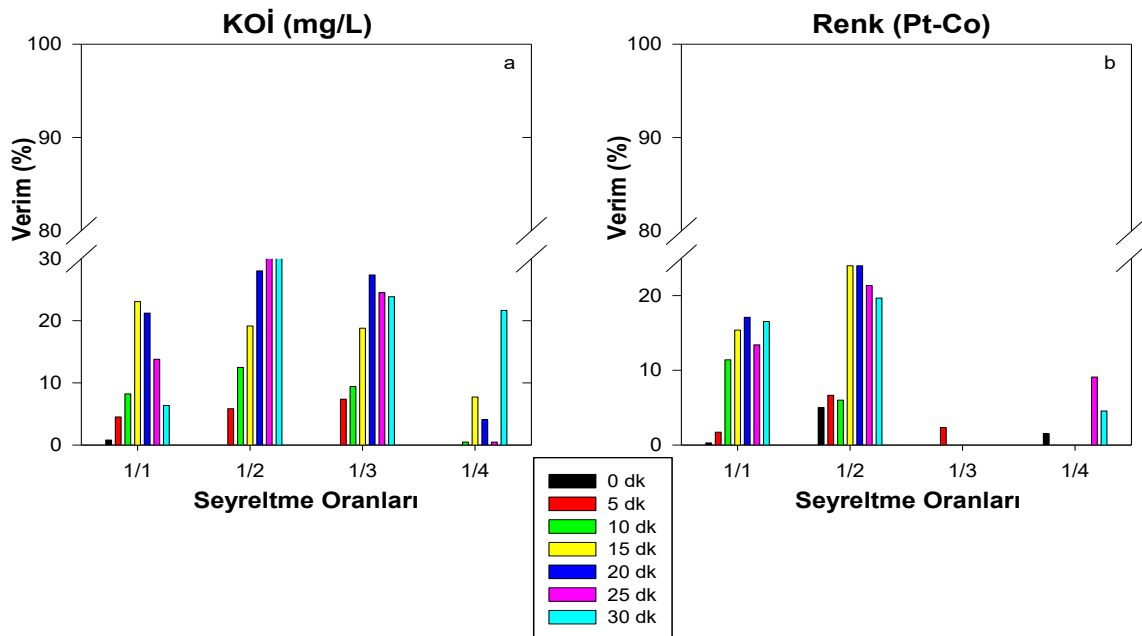


Şekil 3.6. Manyetik kitosan-kil boncuklarının manyetik olarak ayrılmasının gösterilmesi

3.2. Serbest Enzimin Arıtıma Etkisinin İncelenmesi

3.2.1. Seyreltme oranlarının ve temas süresinin etkisi

Çalışmamızın bu bölümünde serbest halde bulunan enzimin 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 oranlarında saf su ile seyreltilmiş atık suların KOİ ve renk giderim verimleri incelenmiştir.



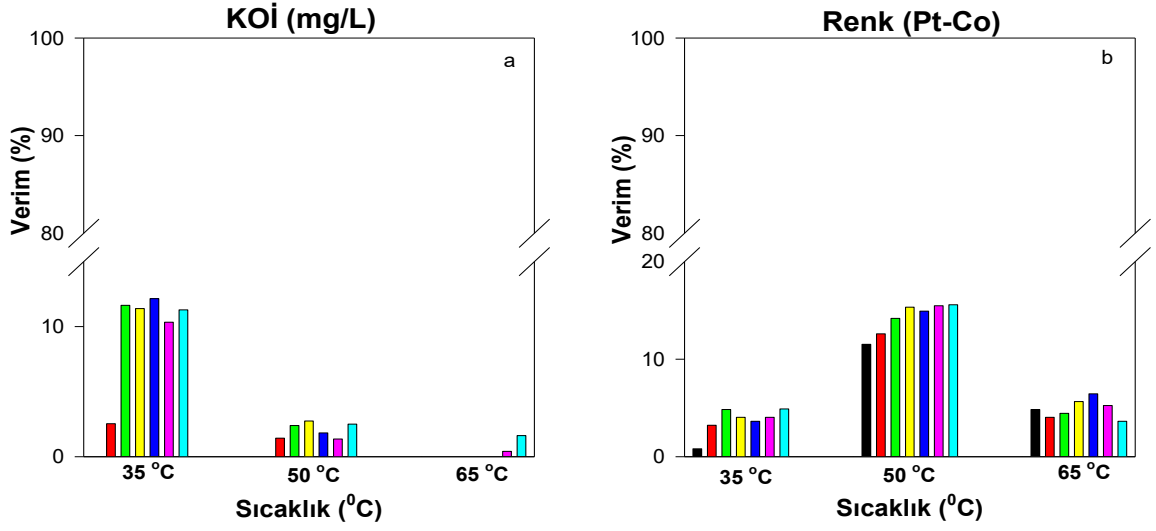
Şekil 3.7. Oda sıcaklığında (25°C) atıksu seyreltme oranlarının arıtım verimine etkisi

Reaktör 25°C'de ve pH 7'de 30dk'lık reaksiyon süresi boyunca işletilmiştir. Arıtım verimini net olarak gözlemlemek amacıyla 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarda numuneler

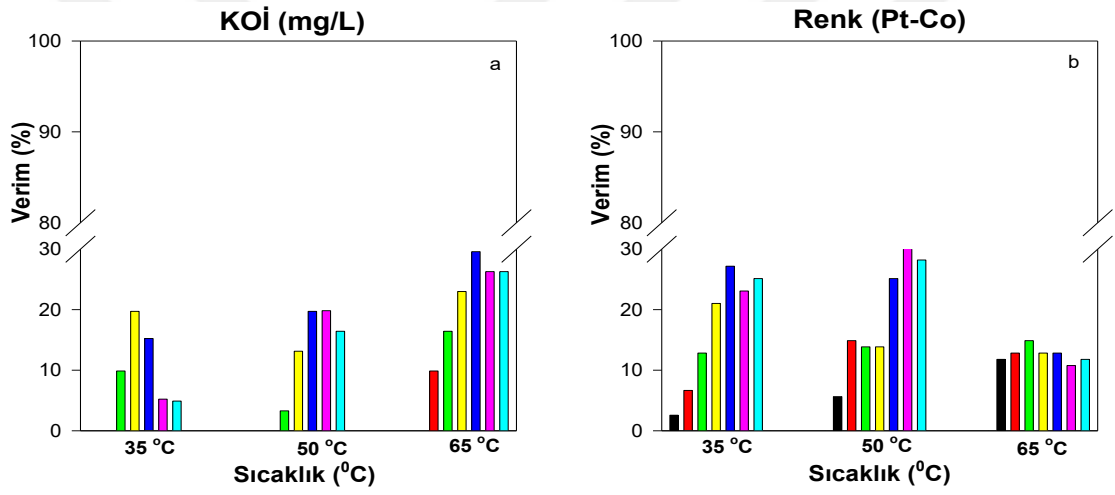
alınmıştır. Giriş KOİ konsantrasyonları ham, 1:2, 1:3 ve 1:4'te sırasıyla 7890, 5935, 3917 ve 2072 mg/L'dir. Alınan numuneler doğrultusunda ham suda maksimum giderim verimi 15.dk'da %23 iken buna karşılık gelen KOİ konsantrasyonu 646 mg/L olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.7. a). 1:2, 1:3 ve 1:4 seyreltme oranlarında en düşük KOİ konsantrasyonu 3389, 2860 ve 1632 mg/L iken sırasıyla ortalama KOİ giderim verimleri %43, %27 ve %21 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7. a). Giriş renk değeri ise ham, 1:2, 1:3 ve 1:4'te sırasıyla 5400, 2750, 1800 ve 1350 Pt-Co olarak ölçülmüştür. Alınan numuneler doğrultusunda ham suda maksimum giderim verimi 20.dk'da %17 iken buna karşılık gelen renk konsantrasyonu 4482 Pt-Co olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.7. b). 1:2, 1:3 ve 1:4 seyreltme oranlarında en düşük renk değeri 2090, 1710 ve 1229 Pt-Co iken sırasıyla ortalama renk giderim verimleri %24, %5 ve %9 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7. b). Arıtım verimi 15 ve 20. dakikalarda %24 renk ve %43 KOİ ile maksimum seviyeye ulaşarak daha sonra giderim verimi olumsuz yönde etkilenmektedir.

3.2.2. Sıcaklığın etkisinin değerlendirilmesi

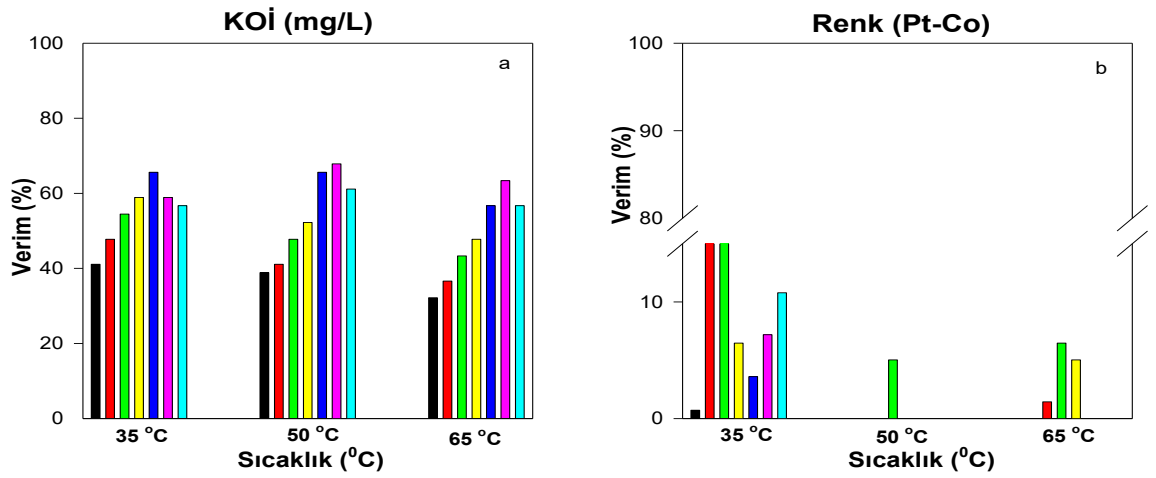
Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Çelebi M. ve ark., (2013) immobilize peroksidaz enzim kullanılarak farklı sıcaklıklarda 60 dakika boyunca R-aktif Blue 19 boyasının giderim verimini incelemiş ve boya giderme veriminin maksimum 30-50°C'de olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Benzer şekilde Sökmen B., ve ark., (2018) immobilize tirozinaz enzimine sıcaklığın etkisini incelemişlerdir ve 35-50°C'de arıtım veriminin %47'ye ulaştığını gözlemlenmişlerdir. Bu bilgilerden yola çıkarak Şekil 16'da 25°C sıcaklıkta arıtım verimlerinin incelenmesinden sonra peroksidaz enziminin maksimum arıtım veriminin hangi sıcaklıklarda gerçekleşeceğini belirlemek adına Şekil 3.8. -3.9. - 3.10. - 3.11'de 35-50 ve 65°C'de ham su, 1:2, 1:3 ve 1:4 seyreltme oranlarında KOİ ve renk giderim verimleri test edilmiştir.



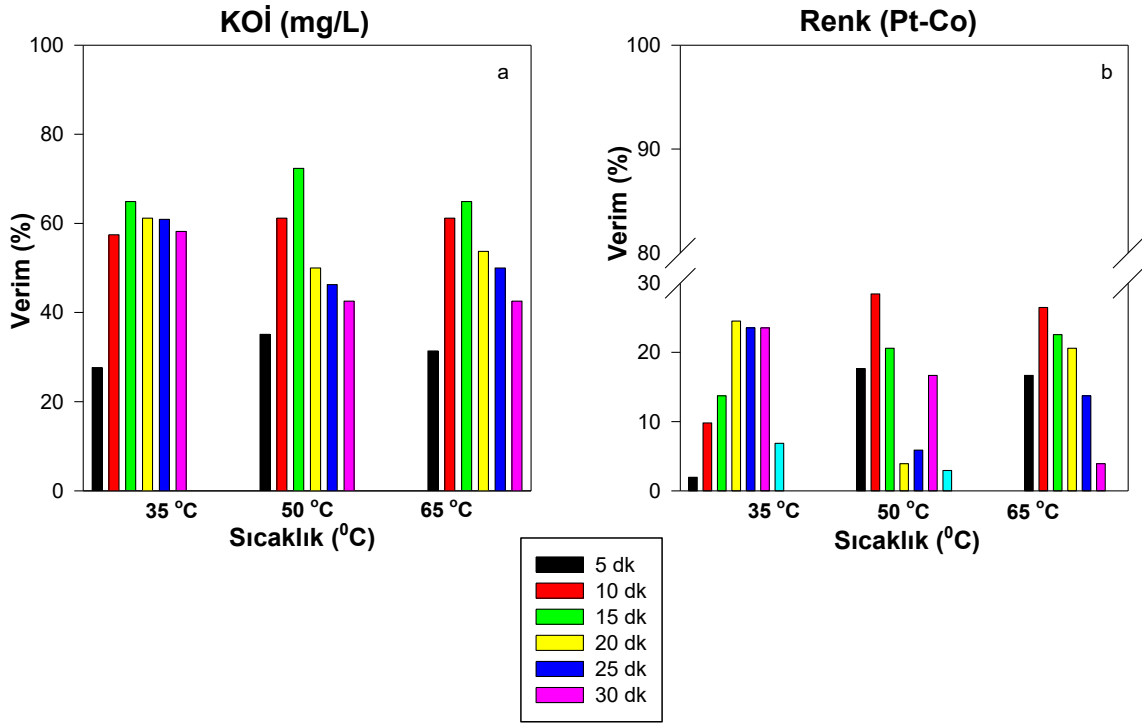
Şekil 3.8. Ham suda arıtım verimi grafiği



Şekil 3.9. 1:2 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi



Şekil 3.10. 1:3 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi



Şekil 3.11. 1:4 seyreltme oranının sıcaklık üzerindeki etkisi

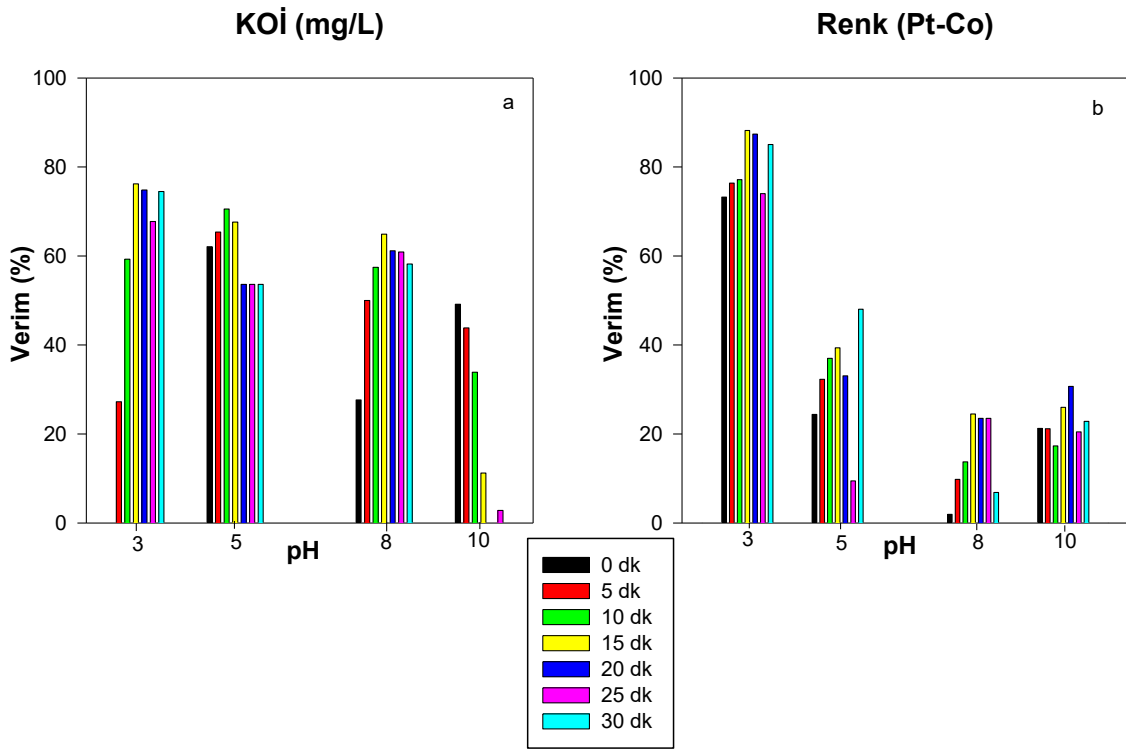
Arıtım verimini net olarak gözlemlemek amacıyla 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakikalarda numuneler alınmıştır. Giriş KOİ konsantrasyonları ham, 1:2, 1:3 ve 1:4'te sırasıyla 7890, 5935, 3917 ve 2072 mg/L'dir Alınan numuneler doğrultusunda ham suda maksimum giderim verimi 35°C'de 20.dk'da %12 iken buna karşılık gelen KOİ konsantrasyonu 6944 mg/L olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.8. a). 1:2, 1:3 ve 1:4 seyreltme oranlarında en düşük KOİ konsantrasyonu 65°C'de 20.dk'da 4214 mg/L, 50°C'de 25.dk'da 1293 mg/L ve 50°C'de 15.dk'da 581 mg/L iken sırasıyla maksimum KOİ giderim verimleri %29, %67 ve %72 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9. a, 3.10. a, 3.11. a). Giriş renk değerleri ise ham, 1:2, 1:3 ve 1:4'te sırasıyla 5400, 2750, 1950 ve 1350 Pt-Co olarak ölçülmüştür. Alınan numuneler doğrultusunda ham suda maksimum giderim verimi 50°C'de 30.dk'da %15 iken buna karşılık gelen renk değeri 4950 Pt-Co olarak gözlemlenmiştir (Şekil 17b). 1:2, 1:3 ve 1:4 seyreltme oranlarında en düşük renk değeri 50°C'de 25.dk'da 1898 Pt-Co, 35°C'de 10.dk'da 1404 Pt-Co ve 50°C'de 5.dk'da 1017 Pt-Co iken sırasıyla maksimum renk giderim verimleri %31, %28 ve %28 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9. b, 3.10. b, 3.11. b).

Grafiklerden de gözlemlendiği gibi arıtım verimi 35°C'de yüksek seviyelerde seyretmektedir. Reaksiyon süresi dikkate alındığında 15 ve 20 dakikalarda maksimum arıtma seviyeleri tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında Üsküp O. ve ark., (2019)

yaptıkları çalışmada serbest enzim ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık değerini 40°C olarak belirlemişlerdir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise enzimin protein yapısının bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmada optimum sıcaklık 35°C olarak belirlendiği için literatür ile benzerlik göstermektedir.

3.2.3. pH etkisinin araştırılması

Bu aşamada AnMBR çıkış suyunun serbest haldeki peroksidaz enzimi ile arıtılmasında pH'ın etkisi incelenmiştir. Önceki çalışmalarda optimum sıcaklık 35°C ve optimum seyreltme oranı 1:4 olarak tespit edildiği için reaktör 35°C sıcaklıkta 1:4 seyreltme oranında işletilmiştir.



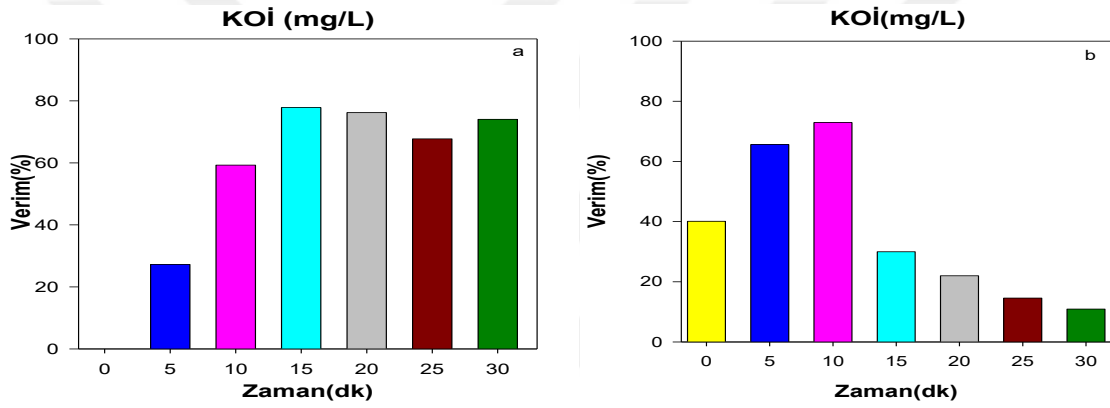
Şekil 3.12. pH'ın arıtıma verimine etkisinin incelenmesi

pH ortamın asit bazlılığını belirleyen bir parametredir. Enzimlerin genellikle optimum pH değeri 5-8 arasındadır. Bunun yanı sıra bazı enzimler daha asidik veya bazik ortamda maksimum verime ulaşabilirler (Morellon S. ve ark., 2022). Han F. ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada pepsin enziminin pH 2'de maksimum giderim verimine ulaştığını gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışma göz önüne alınarak optimum pH'ın belirlenmesi için pH değerleri 3-5-7-8 olarak seçilmiştir. Giriş KOİ ve renk değerleri sırasıyla 2072 mg/L, 1350 Pt-Co'dir. Maksimum giderim verimleri pH 3'te 15.dk'da %76 ve %88 iken buna karşılık gelen KOİ ve renk değeri 498 mg/L, 612 Pt-Co olarak

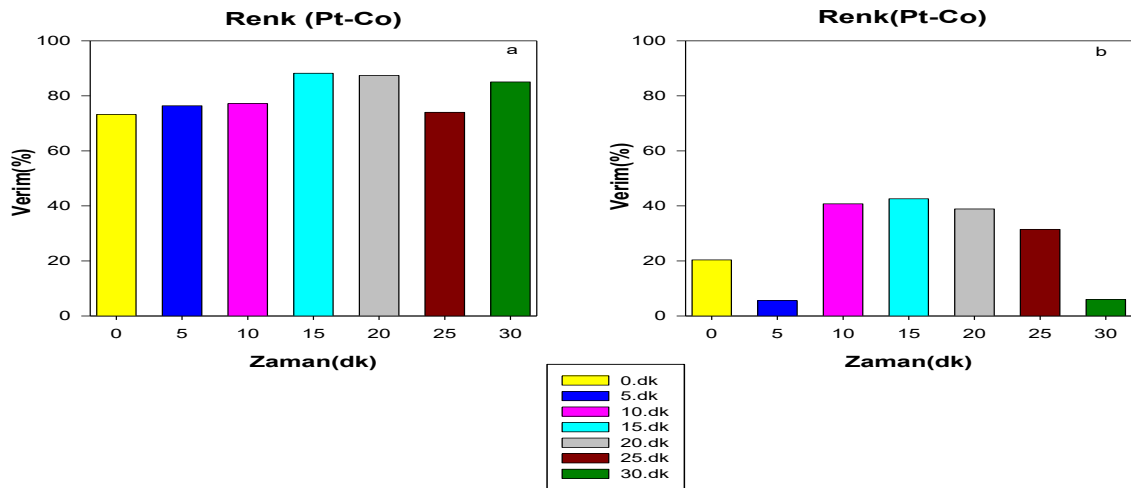
gözlemlenmiştir (Şekil 3.12 a-b). KOİ ve renk bakımından bütüncül olarak değerlendirildiğinde arıtım verimi pH 3'te 15.dk'da maksimum seviyeye ulaşmıştır.

3.2.4. Enzim konsantrasyonunun arıtıma etkisinin değerlendirilmesi

Optimum süre, pH, sıcaklık ve seyreltme oranı belirlendikten sonra uygulanabilir ölçekte olması açısından düşünüldüğünde seyreltme oranının ekstra bir iş yükü olarak görülmesinden yola çıkarak seyreltme oranının 1:4 olması yerine reaksiyonda kullanılan enzim konsantrasyonunun 4 kat artırılmasının sisteme nasıl bir etkisi olacağını incelemek üzere 1:4 oranında seyreltilmiş suya 1 birim enzim eklenirken ham atıksuya 4 birim enzim eklenerek karşılaştırılması sonucunda oluşan değerler yukarıdaki Şekil 3.13. ve 3.14. 'te verilmiştir.



Şekil 3.13. 1:4 seyreltme oranında KOİ giderim verimi (a), ham su 4 kat enzim ile KOİ giderim verimi (b)

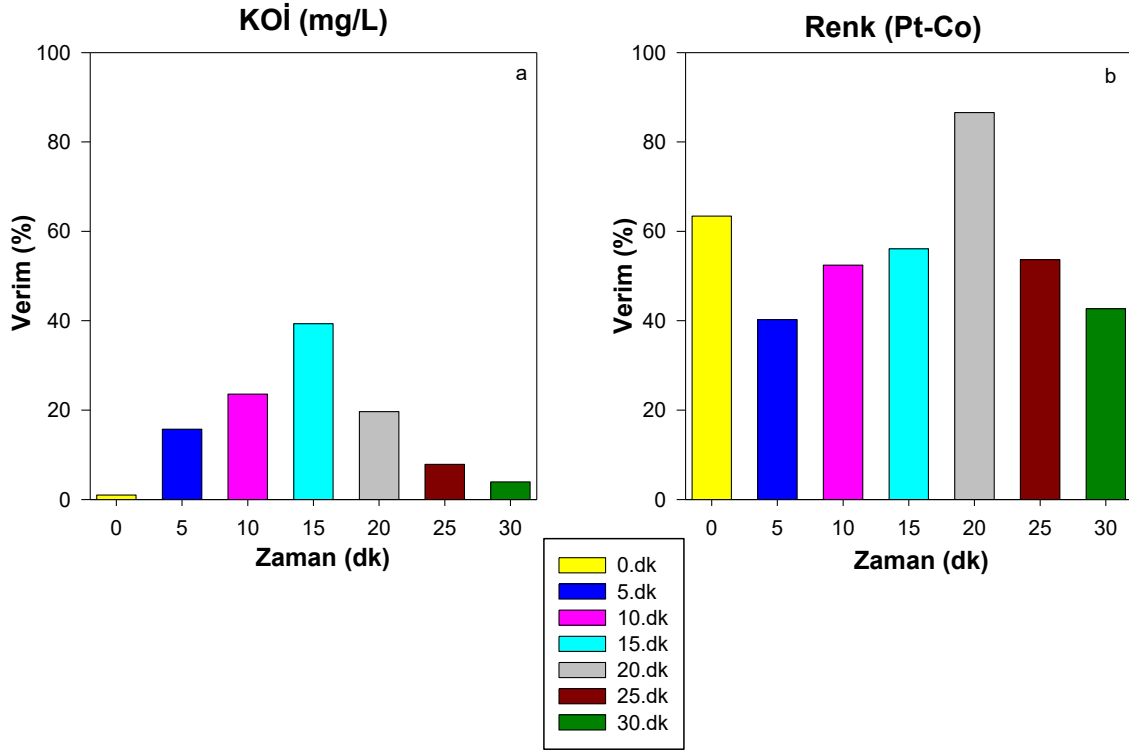


Şekil 3.14. 1:4 seyreltme oranında Renk giderim verimi (a), ham su 4 kat enzim ile Renk giderim verimi (b)

1:4 seyreltilmiş atıksuyun (Şekil 3.13. a) giriş KOİ ve renk konsantrasyon değerleri sırasıyla 2072 mg/L ve 1350 Pt-Co olarak ölçülmüştür. En yüksek KOİ giderim verim 15.dk'da %76 olarak bulunmuştur. Seyreltilmemiş ham atıksuda (Şekil 3.13. b) ise maksimum giderim verimi 10.dk'da %70 olarak gözlemlenmiştir. Renk giderim verimleri ise Şekil 23'de gösterilmiştir. Şekil 3.14. a'da renk giderim veriminin maksimum değeri 15.dk'da %88 olarak bulunmuş ve çıkış konsantrasyon değeri 648 Pt-Co olarak ölçülmüştür. Şekil 3.14. b'de ise ham suda renk giderim verimi 15.dk'da %42 gözlemlenmiştir. Maksimum KOİ verimleri her ne kadar benzerlik gösterse de renk giderimi açısından herhangi bir benzerlik göstermemiştir. Sonuç olarak enzim miktarının artırılmasına rağmen giderim KOİ ve renk giderim verimlerinde farklılık meydana gelmediği gözlemlenmiştir.

3.3. Manyetik Kitosan Kil Boncuğun Arıtıma Etkisinin İncelenmesi

Enzimlerin atıksu arıtımı üzerindeki etkisi uzun süredir araştırılmaktadır (Forgiarini E. ve ark., 2007). Bir destek malzemesine immobilize edilerek kullanılması ise son yıllarda gündeme gelmektedir (Zhou W. ve ark., 2022). Fakat birçok çalışmada kullanılan destek malzemesinin arıtım üzerindeki etkisi göz ardı edilmesine rağmen nanopartiküllerin arıtıma etkisi birçok çalışma ile kanıtlanmaktadır (Perwez M. ve ark., 2017). Bu bilgilerden yola çıkarak enzim immobilize edilecek destek materyalinin arıtıma etkisini incelemek için üretilen boncuklar optimum koşullarda atıksu arıtımında kullanılarak analiz sonuçları Şekil 3.15. 'te verilmiştir.

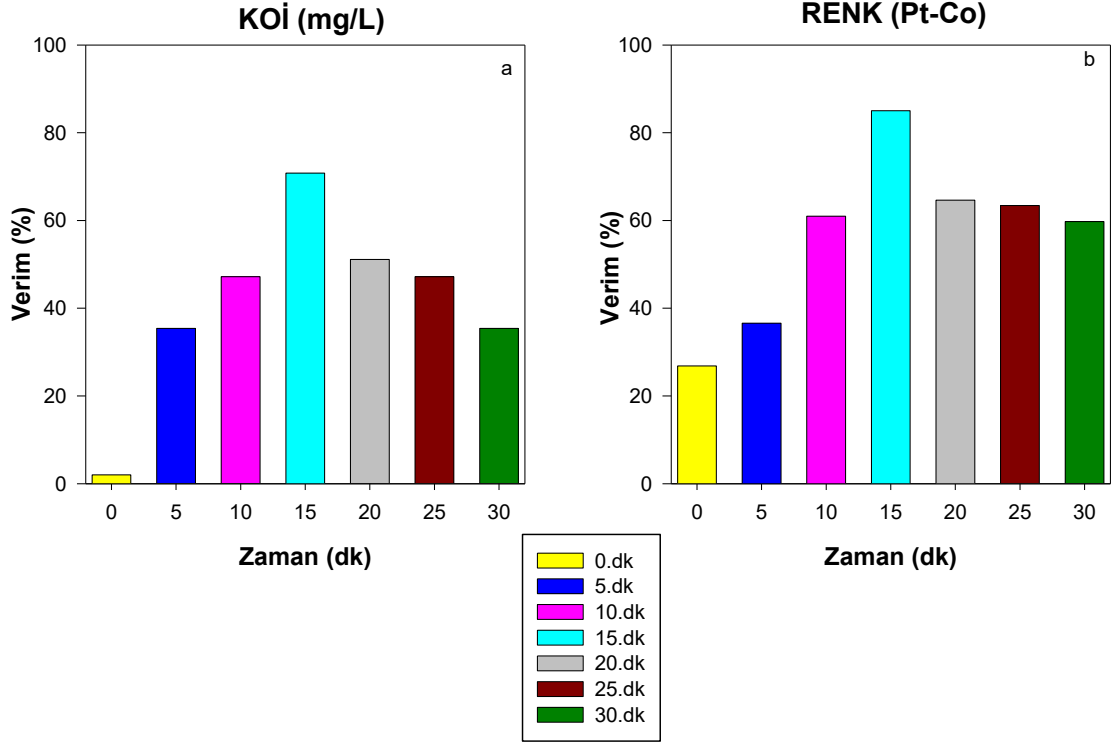


Şekil 3.15. Optimum şartlarda manyetik kitosan kil boncuğun arıtıma etkisi

Manyetik kitosan kil boncuklar 35°C'de pH 3'te ve 1/4 seyreltme oranında hazırlanmış sisteme eklenerek 5-30 dk aralığında numuneler alınmıştır. Giriş KOİ ve renk değerleri 2080 mg/L, 1400 Pt-Co olarak ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda MKKB'un maksimum KOİ ve renk giderim verimi sırasıyla %39 ve %86 iken kirlilik değerleri 1269 mg/L ve 196 Pt-Co'a düşmüştür. Bölüm 3.3'te yapılan serbest enzim deneyleri ile kıyaslandığında KOİ ve renk giderim veriminin %76 ve %88 olduğu bilgisinden yola çıkarak manyetik kitosan kil boncukların enzim kadar olmasada arıtım performansına etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

3.4. İmmobilize Peroksidazın Arıtıma Etkisinin İncelenmesi

Bu bölümde üretilen manyetik kitosan kil boncuklara peroksidaz enzimi immobilize edilmiştir.

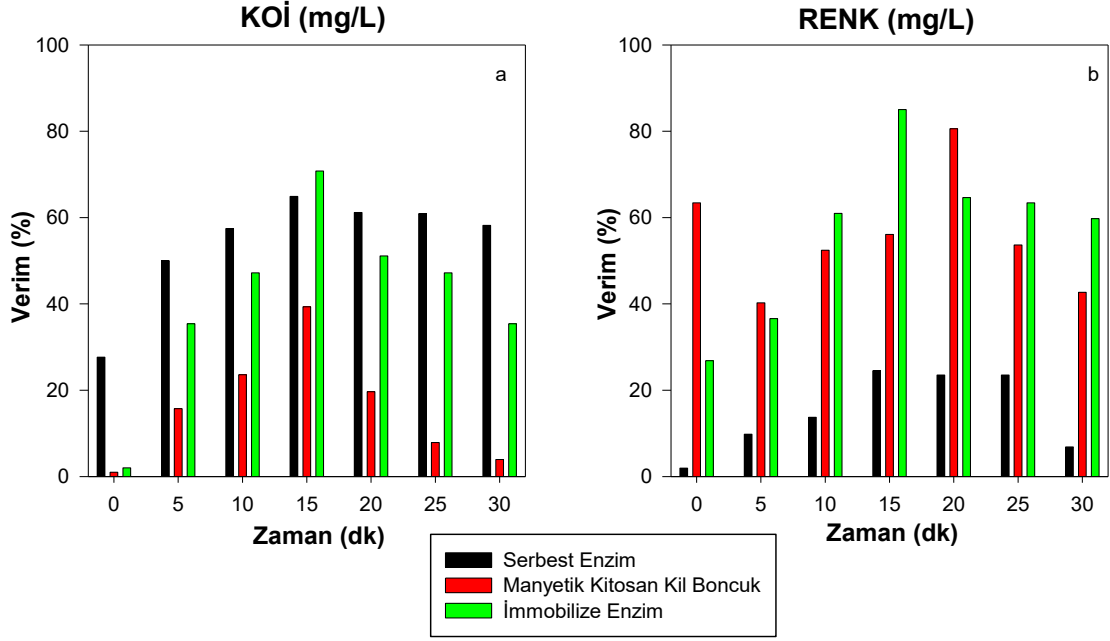


Şekil 3.16. Optimum şartlarda manyetik kitosan kil boncuğa immobilize edilmiş peroksidaz enziminin arıtıma etkisi

Peroksidaz immobilize edilmiş MKKB'lar optimum pH (3), sıcaklık (35°C) ve seyreltme oranında (1:4) 5-30 dakika boyunca test edilmiştir. Numunelerden elde edilen KOİ ve renk analiz sonuçları Şekil 24 a-b'de gösterilmiştir. Giriş KOİ ve renk değerleri 2080 mg/L ve 1350 Pt-Co olarak ölçülmüştür. Maksimum KOİ giderim verimi 15.dk'da %76 iken buna karşılık gelen KOİ konsantrasyonu 500 mg/L olarak gözlemlenmiştir. (Şekil 3.16. a). Renk giderim verimi ise 15.dk'da %89 iken buna karşılık gelen renk değeri 250 Pt-Co olarak ölçülmüştür.

3.5. Serbest Enzim, Manyetik Kitosan Kil Boncuk ve İmmobilize Enzimin Arıtım Veriminin Karşılaştırılması

Tez kapsamında yapılan çalışmaların karşılaştırılması doğrultusunda elde edilen grafik Şekil 3.17. 'de verilmiştir.



Şekil 3.17. Serbest enzim, manyetik kitosan kil boncuk ve immobilize enzimin arıtım verimi karşılaştırılması

Grafikte görüldüğü gibi serbest enzimin, MKKB ve MKKB immobilize edilmiş enzimin maksimum KOİ giderim verimleri 15.dk'da sırasıyla %64, %39 ve %76 olarak belirlenmiştir. Renk giderim verimlerini incelediğimizde ise sırasıyla %24, %56 ve %89 olarak bulunmuştur. Grafikte açıkça görünmektedir ki immobilizasyon ile enzim immobilize edilmiş MKKB'ta diğer materyallere göre daha yüksek bir arıtım verimi elde edilmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, farklı seyreltme oranları, reaksiyon süreleri, pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu içeren işletme koşulları altında, AnMBR kullanılarak biyolojik olarak arıtılmış çöp sızıntı sularının adsorpsiyon prosesi ile serbest enzim, manyetik kitosan kil boncuk ve immobilize peroksidaz enzimi kullanılarak atıksularının arıtılabilirliği incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- KOİ ve renk gideriminde pH (3-10), sıcaklık (35-65°C), seyreltme oranları (1:1, 1:2, 1:3, 1:4), enzim konsantrasyonu (5-20 U/mL) ve reaksiyon süresinin (5-30 dk) önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir.
- Optimum koşullar; 5 U/mL enzim konsantrasyonu, pH 3, 1:4 seyreltme oranı, 35°C sıcaklık ve 15 dk reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir.
- Belirlenen optimum koşullarda, en yüksek KOİ ve renk giderim verimleri sırasıyla %76 ve %89 olarak gözlenmiştir.
- FTIR sonuçlarına göre; 600- 450 cm^{-1} civarındaki tepe noktalarının manyetik nanoparçacıkların varlığını doğrulayan Fe-O titreşiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir.
- Sentezlenen Fe_3O_4 nanopartikül maddenin XRD sonuçlarına göre; $2\theta=35.47'$ de düzlem ortalama kırınım zirvesi, yoğun yapısı nedeniyle manyetik nanopartikül (Fe_3O_4) maddenin varlığı tespit edilmiştir.
- Sonuçlar doğrultusunda, manyetik nanopartiküle immobilize edilmiş enzimin AnMBR kullanılarak biyolojik olarak arıtılmış çöp sızıntı suları üzerinde KOİ ve renk konsantrasyonlarının giderimi açısından oldukça etkili bir performans gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, çöp sızıntı sularının ileri arıtımına yönelik çalışmalar sağlayan immobilizasyon yöntemi deşarj standartları sınır değerlerindedir. Tam olarak sağlamaması durumunda çeşitli arıtma proseslerinin kirlilik yükünü azaltmak için ileri arıtım olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir.

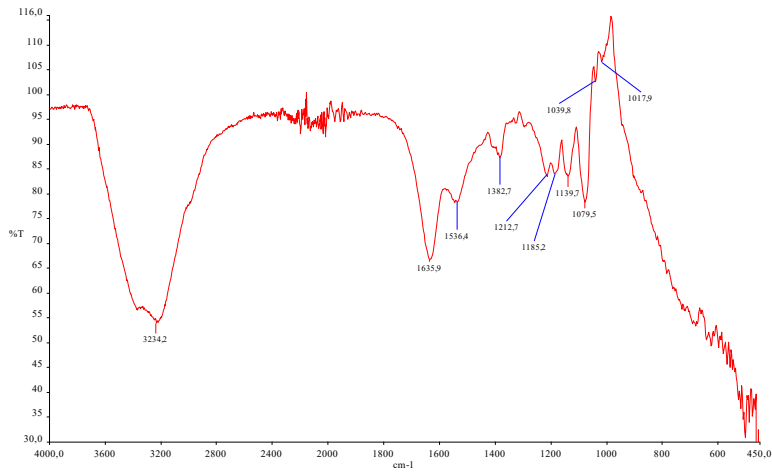
KAYNAKLAR

- Ariaeenejad, S., Motamedi, E., Salekdeh, G. H. (2021). Application of the immobilized enzyme on magnetic graphene oxide nano-carrier as a versatile bi-functional tool for efficient removal of dye from water. *Bioresource Technology*, 319, 124-228.
- Auta, M., Hameed, B. H. (2014). Chitosan–clay composite as highly effective and low-cost adsorbent for batch and fixed-bed adsorption of methylene blue. *Chemical Engineering Journal*, 237, 352-361.
- Aydemir, T., Güler, S. (2015). Characterization and immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetic chitosan–clay composite beads for phenol removal. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43, 425-432.
- Bayraktaroğlu, M., (2010). *Peroksidaz immobilize mikro roketlerin üretimi ve fenolik bileşiklerin gideriminde kullanılması* Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta, 34.s.
- Bayramoğlu, G., Arıca, M., (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme-adsorbent: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal Of Hazardous Materials*, 156, 148-155.
- Bilal, M., Zhao, Y., Rasheed, T., Iqbal, H., (2018). Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 120, 2530-2544.
- Cristóvão, R. O., Tavares, A. P., Brígida, I., Loureiro, M., Boaventura, A., Macedo, A., Coelho, Z., (2011). Immobilization of commercial laccase on to green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*, 72, 6-12.
- Çelik, A., (2011). *Süt endüstrisi atık sularının arıtma alternatifleri* Doktora Tezi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tekirdağ, 69.s.
- Darwesh, M., Matter, A., Eida, F., (2019). Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 102-805.

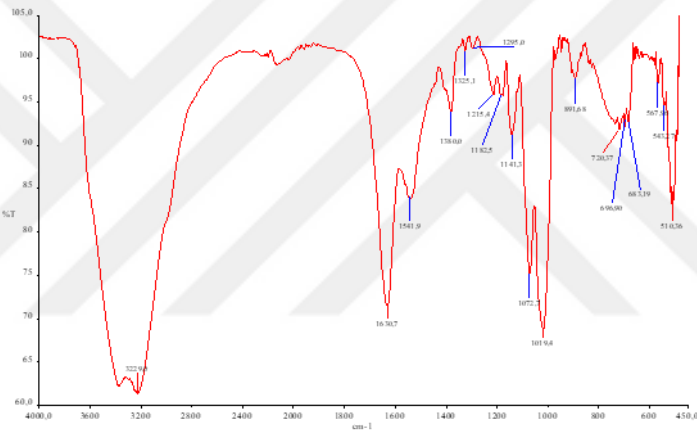
- Erol, B., (2019). *Katalaz ve peroksidaz enzimlerinin parafin destekte immobilize edilerek tekstil boyası giderilmesinde kullanımının incelenmesi* Doktora Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kayseri, 82.s.
- Fatima, A., Husain Q., (2007). Poly clonal antibody esmediated immobilization of a peroxidase from ammonium sulphate fractionated bitter gourd (*Momordicacharantia*) proteins. *Biomolecular Engineering*, 24, 223-230.
- Forgiarini, E., Souza, U., (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 147, 1073-1078.
- Han, F., (2020). *Ferrosen küpeli çitosanın enzim immobilizasyonu* Doktora Tezi. Medeniyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 47.s.
- Husain, Q., (2019). Remediation of phenolic compounds from polluted water by immobilized peroxidases. *In Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*, 241, 329-358.
- Karthik, V., Senthil Kumar, P., Vo, N., Selvakumar, P., Gokulakrishnan, M., Keerthana, P., Jeyanthi, J., (2021). Enzyme-loaded nanoparticles for the degradation of wastewater contaminants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 2331-2350.
- Lin, Y.L., Sah, J.G. (2002). Nitrogen removal using carroussel-activated sludge treatment process. *J. Environ. Sci. Health A*, 37, 1607–1620.
- Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Bolivar, J. M., Berenguer-Murcia, Á., Vela-Gutiérrez, G., Sabir, J. S., Fernandez-Lafuente, R., (2022). A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline Ph values. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 432-437.
- Perwez, M., Ahmad, R., Sardar, M., (2017). A reusable multi purpose magnetic nanobio catalyst for industrial applications. *International journal of biological macromolecules*, 103, 16-24.
- Pi, K. W., Li, Z., Wan, D. J., Gao, X., (2009). Pretreatment of municipal land fill leachate by a combined process. *Process Safety and Environmental Protection*, 87, 191-196.

- Renou, S., Givaudan, J. G., Poulain, S., Dirassouyan, F., Moulin, P., (2008). Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of hazardous materials*, 150, 468-493.
- Sanlier, S. H., Gider, S., Köprülü, A., (2013). Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41, 259-263.
- Sökmen, B., Yılmazoğlu, B., (2017) *Tirozinaz enziminin giresun yöresinde yetişen yenilebilir kanlıca mantarından saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Trabzon, 8, 10-23.
- Sunna, Ç., (2021). Lipaz ve peroksidaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu ve endüstriyel atıkların arıtılmasında kullanılmasının araştırılması. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 58, 72-81.
- Üsküp, O., (2019) *Horseradish peroxidase-inorganik hibrit nano yapıların (nanoflowers) hazırlanması, katalitik aktiviteleri ve stabilitelerinin incelenmesi* Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya, 172, 21-30.
- Wu, X. C., Zhang, Y., Wu, C. Y., Wu, H. X., (2012). Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄/CRGO nanocomposites for enzyme immobilization. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22, 162-168.
- Xiao, H. Y., Huang, J., Cheng, L. I. U., Jiang, D. S., (2006). Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutar aldehyde adsorption using method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 16, 414-418.
- Yetim, N., Hasanoğlu, Y., Özkan, A., (2019). *Polimerik Nanoküreler Üzerine Enzim Immobilizasyonu ve Optimizasyonu* Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. Isparta, 14, 97-104.
- Zhou, W., Zhang, W., Cai, Y. (2022). Enzyme-enhanced adsorption of laccase immobilized graphene oxide for micro-pollutant removal. *Separation and Purification Technology*, 294, 121-178.

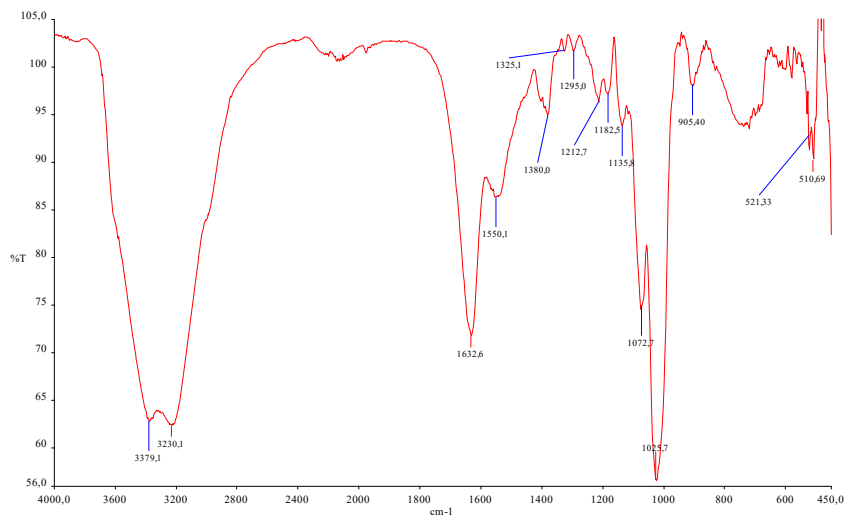
EKLER



Ek 1. Manyetik kitosan kil boncuğun FTIR analizi



Ek 2. Enzim immobilize edilmiş manyetik kitosan kil boncuğun FTIR analizi



Ek 3. Arıtım sonrası immobilizeperoksidazlı manyetik kitosan kil boncuk