

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇEVRE SAĞLIĞI DİSİPLİNLERARASI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SU KİRLETİCİSİ OLARAK YAĞLARIN  
PARÇALANMASINDA LİPAZ BAĞLI  
MİKROMOTORLARIN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**ELİF SEVER  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
FEF-22003 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2023**

## TEŞEKKÜR

"Su Kirleticisi Olarak Yağların Parçalanmasında Lipaz Bağlı Mikromotorların Kullanımının Araştırılması" konulu tez çalışması Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımnda benden desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat UYGUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımdaki ve tez yazım aşamalarımındaki yardımlarımndan dolayı, doktora öğrencisi Ulviye KİLİMCİ'ye, bu çalışmayı FEF-22003 nolu bilimsel araştırma projesi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Elif SEVER

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Lipidler.....	4
2.2. Atık Sudaki Lipidlerin Kaynakları ve Davranışları.....	5
2.3. Lipid Giderme Teknikleri.....	6
2.3.1. Kimyasal ve Mekanik Teknikler.....	6
2.3.2. Biyolojik Teknikler.....	7
2.4. Lipazlar.....	7
2.4.1. Lipazların Uygulama Alanları.....	10
2.4.1.1. Biyodizel Üretimi.....	10
2.4.1.2. Organik Sentez.....	10
2.4.1.3. Lipidçe Zengin Atık Suların Ön Arıtımı.....	10
2.4.2. Lipazların İmmobilizasyonu.....	11
2.5. Mikro-Nanomotorlar.....	11

2.5.1. Mikro-Nano Motor Nedir? .....	14
2.5.2. Mikro-Nanomotorların Tahrik Mekanizmaları .....	14
2.5.2.1. Kabarcık Tahriki.....	14
2.5.2.2. Kabarcık Tahriki/Manyetik İtme .....	16
2.5.2.3. Foretik Kendinden Tahrikli .....	16
2.5.2.4. Kaldırma Kuvveti Sürücülü Tahrik .....	17
2.6. Enzim İmmobilizasyonu.....	17
2.6.1. İmmobilizasyon Yöntemi .....	18
2.6.1.1. Kovalent Bağlama .....	19
2.6.1.2. Çapraz Bağlama.....	19
2.6.1.3. Adsorpsiyon.....	20
2.6.1.4. Tutuklama.....	20
2.6.2. Destek Materyali.....	21
2.7. Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunun Önemi ve Literatürde Yapılmış Çalışmalar .....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Cihazlar.....	27
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.2. Yöntem .....	27
3.2.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması.....	27
3.2.2. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Karakterizasyonu .....	28
3.2.3. Lipaz Enziminin PPy-COOH/Ni Mikromotora İmmobilizasyonu.....	28
3.2.4. Lipaz Aktivite Tayini.....	29
3.2.5. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	29
3.2.6. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi .....	30
3.2.7. Serbest ve İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi.....	30

3.2.8. Lipaz Bağlı PPy-COOH/Ni Mikromotorların Yağ Gideriminde Kullanımının Araştırılması .....	30
4. BULGULAR .....	32
4.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	32
4.2. Lipaz Bağlı Mikromotorların Hazırlanması .....	33
4.3. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi ..	35
4.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	37
4.5. İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi .....	38
4.6. Lipaz Bağlı Mikromotorların Yağ Gideriminde Kullanımının Araştırılması .....	40
5. TARTIŞMA.....	42
5.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	42
5.2. Lipaz Bağlı Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu .....	42
5.3. Serbest İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	43
5.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi .....	43
5.5. İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi .....	44
5.6. Lipaz Bağlı Mikromotorların Yağ Gideriminde Kullanımının Araştırılması .....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	46
KAYNAKLAR.....	47
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	54
ÖZ GEÇMİŞ.....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Asp</b>	: Aspartik Asit
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>E.C.</b>	: Enzim Komisyonu
<b>EDC</b>	: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodiimid Hidroklorür
<b>EDX</b>	: Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GO</b>	: Grafen Oksit
<b>His</b>	: Histidin
<b>K<sub>m</sub></b>	: Michaelis sabiti
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimid
<b>p-NPL</b>	: p-nitrofenillaurat
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopi
<b>Ser</b>	: Serin
<b>TEM</b>	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>TGA</b>	: Termogravimetrik Analiz
<b>V<sub>max</sub></b>	: Maksimum Reaksiyon Hızı
<b>VSM</b>	: Örnek Titreşimli Manyetometre
<b>XPS</b>	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
<b>XRD</b>	: X-ışını Difraktometresi
<b>ZIF-90</b>	: Zeolitik İmidazolat Çerçeve

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipidlerin sınıflandırılması. ....	4
Şekil 2. Çeşitli uygulamalar için "hareket halinde" mikro-nano motorların şematik gösterimi (Hu ve diğerleri, 2022). ....	12
Şekil 3. Atık su arıtımında mikro-nano motorların kullanımı (Ying ve Pumera, 2019). ....	13
Şekil 4. Konik (a) ve silindirik (b) ve Janus katalitik (c) ve Janus katalitik olmayan (d) mikro-nano motorların tipik kabarcık tahrik mekanizmaları (Chang, 2022). ....	15
Şekil 5. Enzim immobilizasyonu ve uygulama alanlarının şematik gösterimi (Maghraby ve diğerleri, 2023). ....	18
Şekil 6. Enzim immobilizasyonu yöntemleri (Nargotra ve diğerleri, 2023). ....	19
Şekil 7. Lipaz immobilize mikromotorların tribütirin giderimi üzerindeki etkisinin şematik gösterimi. ....	31
Şekil 8. Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine pH'ın etkisi. ....	36
Şekil 9. Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine sıcaklığın etkisi. ....	36
Şekil 10. Serbest ve immobilize lipaz için Lineweaver-Burk grafiği. ....	37
Şekil 11. Serbest ve immobilize lipazın ısı kararlılık profili. ....	38
Şekil 12. Serbest ve immobilize lipazın depo kararlılık profili. ....	39
Şekil 13. Serbest ve immobilize lipazın işlemsel kararlılık profili. ....	39
Şekil 14. Tribütirin % damlacık çapının zamana bağlı olarak değişimi.. ....	41

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> <i>Porcine Pankreas</i> lipazının farklı açılardan üç boyutlu yapısının gösterimi ( <a href="https://swissmodel.expasy.org">https://swissmodel.expasy.org</a> ). .....	9
<b>Resim 2.</b> PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM fotoğrafı.....	32
<b>Resim 3.</b> PPy-COOH/Ni manyetik mikromotorların mıknatıs ile ayrılması. ....	33
<b>Resim 4.</b> (a) Boş ve (b) Lipaz bağlı PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM fotoğrafı. ....	34
<b>Resim 5.</b> Lipaz bağlı PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM-EDX fotoğrafı. ....	34
<b>Resim 6.</b> Boş ve lipaz bağlı PPy-COOH/Ni mikromotorların FTIR spektrumu. ....	35
<b>Resim 7.</b> Lipaz bağlı mikromotorların tribütirin damlacığını parçalama etkinliği. ....	40

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Serbest ve immobilize lipaza ait kinetik parametre verileri. ....	37
---	----



## ÖZET

### SU KİRLLETİCİSİ OLARAK YAĞLARIN PARÇALANMASINDA LİPAZ BAĞLI MİKROMOTORLARIN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Sever E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çevre Sağlığı Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.

**Amaç:** Bu tezde su kirleticisi olarak yağların parçalanmasına yönelik lipaz enzimi içeren mikromotorların hazırlanma ve kullanılabilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu tezde PPy-COOH/Ni mikromotorları sentezlenmiş ve bu mikromotora lipaz enzimi kovalent olarak bağlanmıştır. Lipaz bağlı mikromotorlar SEM, EDX ve FTIR teknikleri ile karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize lipazın aktivitesi incelenmiş ve kararlılığı değerlendirilmiştir. Ayrıca, lipaz bağlı mikromotorların bir yağ damlacığını parçalama etkinliği de değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Lipaz bağlı mikromotorların optimum pH'ı 8.0 ve optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur. Serbest lipaza göre immobilize lipazın ısıl ve depo kararlılığı yüksek bulunmuş ve defalarca kullanılabilmiştir. Immobilize lipaz tribütirin yağ damlacığını 90 dakika sonunda %90 oranında parçalamıştır.

**Sonuç:** Bu tezde hazırlanan lipaz bağlı mikromotorların yağ parçalama potansiyelinin bulunduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, mikromotor, immobilizasyon, triaçilgliserol, yağ

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE USAGE OF THE LIPASE ATTACHED MICROMOTORS FOR DEGRADATION OF OILS AS WATER CONTAMINANT

Sever E. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Health Science, Environmental Health Interdisciplinary Master of Science Thesis, Aydın, 2023.

**Objective:** In this thesis, it is aimed to investigate the potential of preparation and use of micromotors containing lipase enzyme for the degradation of oils as water pollutants.

**Materials and Methods:** In this thesis, PPy-COOH/Ni micromotors were synthesized and lipase enzyme was covalently attached to these micromotors. Lipase attached micromotors were characterized by SEM, EDX and FTIR techniques. The activity of free and immobilized lipase was examined and its stability was evaluated. In addition, the efficiency of lipase-attached micromotors to break up an oil droplet was also evaluated.

**Results:** The optimum pH of the lipase attached micromotors was 8.0 and the optimum temperature was found to be 45 °C. Compared to free lipase, the thermal and storage stability of immobilized lipase was found to be higher and it could be used repeatedly. The immobilized lipase degraded the tributyrin oil droplet 90% after 90 minutes.

**Conclusion:** It has been observed that the lipase attached micromotors prepared in this thesis have the potential to degradation of fat.

**Keywords:** Lipase, micromotor, immobilization, triacylglycerol, fat

# 1. GİRİŞ

Her gün milyarlarca litre atık su üretilerek doğaya bırakılmakta ve bu da ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca dünya çapında artan nüfusun taleplerini karşılamak için tatlı su temininin sınırlı olması, verimli ve gelişmiş atık su stratejilerinin teşvik edilerek suyun mümkün olan her durumda korunmasını zorunlu kılmaktadır. Atık su arıtılarak doğa istenen su kalitesine kavuşmaktadır. Atık suların deşarj edilmeden önce arıtılması için birçok kimyasal/fiziksel atık su arıtma stratejisi kullanılmaktadır. Ancak bu sistemler yeterli oranda güvenli su sağlamada etkisiz kalmaktadırlar. Son zamanlarda, enzim bazlı arıtmadaki teknolojik sıçrama, suyu ılıman ortamlarda işleyerek taşınabilirlik derecesine kadar arıtmıştır.

Enzim mühendisliği, her alandaki komplikasyonlar için verimli çözümler bulmak için yeni tekniklerle gelişmiştir. Bir biyokatalizör olan enzimler birçok kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonu hızlandırır ve ilaç endüstrisinde, teşhiste, tekstil endüstrisinde, biyoyakıt endüstrisinde, gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılır. Zehirli bileşiklerin sudan uzaklaştırılması, nüfus ve kentleşmenin artmasıyla birlikte kirleticilerin de arttığı bu çağdaş dünyada çok ihtiyaç duyulan bir teknolojidir. Öte yandan, serbest enzimler nispeten kararsızdır ve endüstriyel uygulamalar söz konusu olduğunda bazı dezavantajlar vardır. Serbest enzimlerin ayrıca daha az kararlılık ve reaksiyon karışımından geri dönüştürülemez gibi çeşitli dezavantajları olduğu yaygın olarak bilinmektedir. İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre çok fazla avantaja sahiptir. Enzim molekülleri, bir hareketsizleştirme aracı olarak fiziksel veya kimyasal olarak veya her iki etkileşimle bir destek veya matriks üzerinde veya içinde hapsedilir. İmmobilizasyon için kullanılan farklı teknikler arasında mikrokapsülleme, kovalent bağlama, adsorpsiyon ve tutuklama yer alır. İmmobilize enzimler, çeşitli işlemlerle kararlı hale getirilerek birçok avantaj sunar. Bu avantajlar immobilize enzimlerin reaksiyon karışımından geri kazanıldıktan sonra tekrar kullanılabilmesi ve enzim aktivitesinin daha uzun süre muhafaza edilebilmesidir (Karthik ve diğerleri, 2021).

Yağ ve gres içeriği bakımından zengin atık su, potansiyel kirletici yağlı madde olduğundan endişe konusudur. Nüfus patlaması ve hızlı kentleşme, yağ ve gres içeren büyük hacimli atık suların üretilmesinden sorumludur. Yağ içeriği, sıvı fazda farklı formlarda

bulunur ve geniş bir konsantrasyon aralığında tek veya birden fazla tür içerir. Yağlı atık sularında bulunan yağın türü ve doğası, kaynaktan kaynağa değişir. Yağlı atık su katı yağlar, sıvı yağlar, kesme sıvıları, yağlayıcılar, yemeklik yağlar ile gres, ham yağlar ve mazotları içeren ağır hidrokarbonların yanı sıra kerosen, benzin, jet yakıtı gibi hafif hidrokarbonlar içerir. Uygun yağ ve su ayırma tekniği, yağlı atık suyun kaynakları ve özellikleri anlaşıldıktan sonra seçilebilir.

Kantinler, evlerin ve restoranların mutfakları, petrol rafinerileri, benzin istasyonları, atölye veya garajlar, bitkisel yağ ve diğer endüstriler, bilyalı rulman, öğütme ve metal işlemeden düzenli olarak büyük miktarda yağlı atık su oluşmaktadır. Bunun dışında yiyecek-içecek sanayi, tabakhane ve mezbaha, ticari ve askeri gemiler, iskele ve petrol terminal rıhtımlarında petrol yükleme ve boşaltma, şehir içinde petrol ürünlerinin depolama ve dolum istasyonları büyük miktarda yağlı maddeye katkıda bulunur. Yağlı atık sular arıtılmadan su kütlelerine, karaya ve kanalizasyon hatlarına deşarj edildiğinde çeşitli olumsuz etkiler gözlenmektedir. Su ortamında çiçek ve fauna dağılımı için farklı ekolojik etkiler, su yüzeyinde geçirimsiz bir tabaka oluşması nedeniyle alglerin ve su bitkilerinin fotosentezini engelleyerek balıkların ve diğer suda yaşayan organizmaların ölmesine sebep olur. Ayrıca doğal peyzajın tahrip edilmesi, mahsul üretiminde azalma, toprak, yüzey suları ve yer altı su kaynaklarının kirlenmesi ve kanalizasyonun tıkanması, ışık penetrasyonunda ve çözünmüş oksijende azalma görülen diğer etkilerdir. Yağlı atık suyun bazı bileşenleri çok toksik ve kanserojendir; böbrek, karaciğer ve kanı etkilediğinden ve sonuçta kanser riskini artırdığından insan sağlığı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Bu nedenle, yağlı atık suların arıtımı kadar ıslahı da en önemli konulardan biridir (Sanghamitra ve diğerleri, 2021).

Atık su arıtma yöntemleri temel olarak fizikokimyasal ve biyolojik yöntemleri içermektedir. Atık su arıtımında kimyasal oksidasyon, damıtma, membran bazlı ayırma teknikleri ve adsorpsiyon gibi fizikokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu stratejiler arıtma amaçlıdır, ancak çok pahalıdır ve daha fazla kirliliğe ve hasara neden olabilirler. Biyolojik yöntemler daha çevre dostudur ve atık sudaki kirleticilerin çoğunu giderebilir. Bu yöntemler, atık su arıtımı için bitkiler, mikroplar ve enzimleri kullanmaktadır. Bu teknolojilerde uygulanan organizmalar, süreç sırasında kirleticileri parçalayabilir veya toplayabilir. Bununla birlikte, bitkiler ve mikroplar, atık sulardan kaynaklanan bazı zehirli kirleticilere karşı hassasken, enzimler hızlı ve seçici bir şekilde çalışabilirler.

Enzimler, özellikle ılımlı koşullar altında maddeleri biyolojik olarak parçalayabilen etkili biyokatalizörlerdir. Atık su arıtımında en çok kullanılan enzimler hidrolazlar ve

oksidoredüktazlardır. Günümüzde lipaz, lakkaz, peroksidaz gibi enzimler ticari olarak kullanılmaktadır. Lakkaz ve peroksidaz, geniş substrat özgüllükleri ile bazı organik mikro kirleticileri uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim teknolojisi “yeşil kimya” kapsamında anılmaktadır ve geleneksel kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında, enzimatik işlemler daha yüksek reaksiyon kinetiğine sahiptir ve daha az su ve enerjiye ihtiyaç duyar. Ayrıca enzimler reaksiyonlar tarafından tüketilmez ve tekrar kullanılabilir. Bakteriler ve diğer biyolojik yöntemlerden farklı olarak, enzimler diğer mikrobiyal yaşam formlarıyla rekabet etmez. Bahsedilen sebeplerle, enzimatik prosesler, yağ, gres ve organik mikro kirleticiler gibi dirençli kirleticilerin atık sudan uzaklaştırılmasında umut vericidir (Feng ve diğerleri, 2021).

Lipaz enzimleri triaçilgliseroller olarak bilinen yağları, yağ asitleri ve gliserole parçalayan hidrolaz sınıfı enzimlerdendir ve bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan saflaştırılarak kullanılırlar. Maliyetlerinin yüksek olması ve kararlılıklarını uzun süre koruyamamaları nedeniyle lipaz enzimleri farklı destek materyallerine immobilize edilmektedirler. İmmobilizasyon suda çözünmeyen bir desteğe enzimin bağlanması veya tutuklanması olup, enzimin tekrar kullanılabilmesi, kararlılığının artması ve düşük maliyet gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

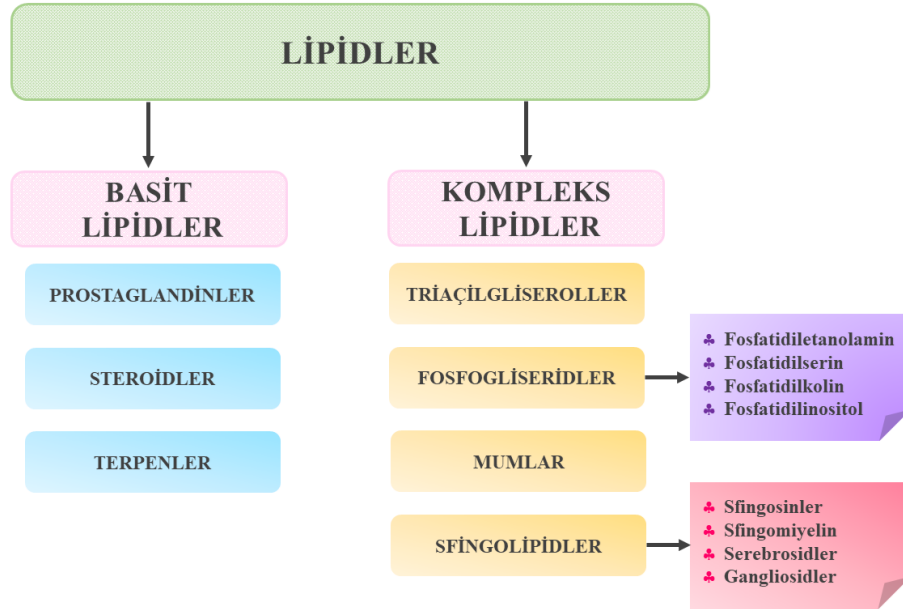
Bu tezin araştırma sorusu “sularda kirletici olarak bulunan yağların parçalanmasında lipaz bağlı mikromotorlardan yararlanılabilir mi ve bu mikromotorların etkinliği ne kadardır?” şeklinde kurgulanmıştır. Bu kapsamda destek materyali olarak manyetik özelliği bulunan mikromotorların hazırlanması, bu mikromotorlara lipaz enziminin kovalent olarak bağlanması ve yağların parçalanmasında kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lipidler

Lipidler suda çözünmeyen, apolar yapıdaki hidrofobik bileşiklerdir. Lipidlerin biyolojik işlevleri onların kimyası kadar çeşitlidir. Biyolojik enerji için depo ve transport maddesi olarak kullanılmaları, hücre membranının yapısal bileşeni olmaları, canlı organizmaların etrafında koruyucu bir kılıf olarak bulunmaları ve hücre yüzey bileşikleri olarak hücrelerin birbirini tanınmasında, tür özgüllüğünde ve doku immüncesinde rol almaları bilinen en temel biyolojik fonksiyonlarıdır. Ayrıca elektron taşıyıcı moleküller, ışık absorblayıcı pigmentler, hidrofobik kancalar, emülsifiye edici ajanlar, hormonlar ve hücre içi haberci moleküller olarak da görev alırlar.

Lipidler ana iskelet yapıları esas alınarak kompleks ve basit lipidler olarak sınıflandırılırlar (Şekil 1).



Şekil 1. Lipidlerin sınıflandırılması.

Kompleks lipidlerin esas bileşenleri yağ asitleridir. Katı ve sıvı yağlar olarak bilinen triaçilgliseroller veya trigliseridler kompleks lipidlerin en önemli ailelerinden biridir. Triaçilgliseroller her biri gliserol molekülü ile ester bağı yapmış üç tane yağ asidinden oluşur. Gliserole bağlanan yağ asitlerinin üçü de aynı ise basit triaçilgliserol, farklı ise karışık triaçilgliseroller meydana gelir. Gliserolün üç hidroksil grubu da yağ asitleri ile ester bağları oluşturduğundan oluşan triaçilgliseroller polar değildir ve suda çözünmezler. Çoğu ökaryot hücrelerinde sulu sitozol içinde mikroskobik yağ damlaları şeklinde ayrı bir faz oluşturan triaçilgliseroller, metabolik yakıt depoları olarak görev yaparlar. Omurgalılarda, adiposit ya da yağ hücreleri olarak adlandırılan özelleşmiş hücreler, büyük miktarlarda triaçilgliserolü neredeyse tüm hücreyi dolduran yağ damlacıkları şeklinde depolarlar. Triaçilgliseroller çoğu bitki türünün tohumlarında sıvı yağ olarak da depolanır ve tohumun çimlenmesi süresince gerekli enerji ve biyosentetik öncüllerin sağlanmasında kullanılır. Adipositler ve çimlenen tohumlar lipaz enzimlerini içerir, bu enzimler depolanmış triaçilgliserollerin hidrolizini katalizler ve salınan serbest yağ asitleri yakıt ihtiyacı duyulan yerlere ulaştırılır. (Nelson D.L, 2013)

## **2.2. Atık Sudaki Lipidlerin Kaynakları ve Davranışları**

Yağ ve gres gibi çeşitli lipidler kozmetik, petrol rafinerisi, tarım, ilaç, otomobil, kağıt hamuru, tabakhane ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu endüstriler atık suya çok miktarda lipid salmakta ve bu da ciddi çevresel hasara, bitkiler, hayvanlar vb. üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Herhangi bir atık sudaki lipid içeriği ve konsantrasyonu, atık üretiminin kaynağına bağlıdır. Gıda işleme endüstrilerinde yağ, çeşitli gıda maddelerini işlemek ve pişirmek için geniş ölçekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılmış yağ, yüksek sıcaklıkta ısıtma sırasında kimyasal ve fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişiklikler nedeniyle pişirme amaçlı olarak geri dönüştürülememekte ve bu tür kullanılmış yağlar atık suya karışmaktadır. Mutfak ve restoranlarda malzemeleri yıkama, kasıtsız dökülme ve gıda atıklarının bertarafı gibi çeşitli faaliyetler, kanalizasyon hatlarında lipid kontaminasyonuna katkıda bulunmaktadır. Et işleme endüstrilerinden boşaltılan atık su 250-5000 mg/L yağ/gres içerir. Süt endüstrisinde, atık su deşarjı süt yağları açısından zengindir (Nimkande ve Bafana, 2022).

## 2.3. Lipid Giderme Teknikleri

Atık sudan lipid giderimi çok önemli bir adımdır ve etkili atık su arıtımı için büyük bir zorluktur. Arıtma işleminden önce atık sudan yağ/gresi emülsifiye etmek veya çıkarmak için birçok teknik test edilmektedir. Başlıca lipid giderme yaklaşımları aşağıda tartışılmaktadır.

### 2.3.1. Kimyasal ve Mekanik Teknikler

Birincil atık su arıtımında lipidleri uzaklaştırmak için farklı mekanik yöntemler kullanılır. Sıyırma tankı ve yağ gres tutucu, yağ/gres gidermek için atık su arıtma tesislerinde yaygın olarak kurulur. Yağ tutucu, yağ ve su arasındaki yoğunluk farkından dolayı yerçekimi ayırımına dayanır. Daha hafif lipid parçacıklarının suyun üst yüzeyinde toplayarak  $\geq 150$   $\mu\text{m}$  damlacık boyutuna sahip serbest yağın uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Sıyırma tankı, yağlı tabakanın sıyırılmasını içerir. Bu geleneksel yöntemler, düşük verimlilik, daha yüksek işletme ve bakım maliyeti gibi çeşitli sınırlamalara sahiptir. Ayrıca emülsifiye olmuş lipidlerin uzaklaştırılmasında da etkili değildirlir. Yüzdürme ve hidro-siklon gibi bazı alternatif yöntemlerin de lipidleri atık sudan ayırdığı bildirilmektedir. Yüzdürme yöntemi daha önce mineral ve metal ayırmada kullanılmış, daha sonra çevresel uygulamalar bulmuştur. Bu yöntem, emülsifiye edilmiş lipidlerin uzaklaştırılmasında faydalıdır. Çözünmüş hava flotasyonunda, atık suya ince hava kabarcıkları pompalanır, bu da lipidlerin toplanmasını ve ardından uzaklaştırılmasını destekler.

Kimyasal aracılı arıtma, dağılmış yağı çıkarmak için yararlıdır. Yaygın olarak kullanılan bazı kimyasal yöntemler pıhtılaşma, flokülasyon ve çöktürmedir. Bu yöntemler, askıda kalan ve kolloidal yağ damlacıklarının daha büyük parçacıklar halinde toplanmasına yardımcı olur ve mekanik lipid giderme tekniklerinin performansını geliştirir. Çeşitli emici malzemelerin yüksek gözenekliliği ve/veya geniş yüzey alanı nedeniyle, lipidler adsorbe edilir ve kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Kimyasal pıhtılaştırıcılar kullanılarak yaklaşık %71 oranında yağ/gres giderimi rapor edilmiştir. Lipid gidermeye yönelik bu kimyasal yöntemler, düşük verimlilik, daha yüksek işletme maliyeti ve ikincil çevre kirliliği oluşumu gibi sorunlardan muzdariptir. Başlıca mekanik ve kimyasal lipid giderme teknikleri pahalıdır ve tehlikeli reaktifler kullanır. Ayrıca, mekanik ve kimyasal arıtma yöntemlerinden toplanan lipid atıkları ya yakılmakta ya da çöplüklere atılmakta ve bu da

çevre kirliliği yaratmaktadır. Bu sorunlar, lipid açısından zengin atık su arıtımı için çevre dostu ve sürdürülebilir yöntemlerin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (Nimkande ve Bafana, 2022).

### **2.3.2. Biyolojik Teknikler**

Kimyasal ve mekanik yöntemlerin ortaya çıkardığı sorunların üstesinden gelmek için dikkatler çevre dostu ve uygun maliyetli tekniklere kaymıştır. Atık su arıtma proseslerinde lipidlerin biyodegradasyonu için farklı yöntemler çalışılmıştır. Doğal biyoremediyasyon için, atık su arıtma tesisinde gerekli besin yükünün sağlanması esastır. Ayrıca birkaç araştırmacı, kirleticilerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayan biyolojik ajanların sürekli büyümesi için önceden kültürlenmiş mikropların eklenmesini tavsiye etmiştir. Mikroorganizmalar, lipidleri etkili bir şekilde parçalayan hücre dışı lipazları salgılayabilen yeteneğine sahiptir ve fizikokimyasal yöntemlere göre çevre dostu ve uygun maliyetlidir.

Mikroorganizmaların ve enzimlerin, değişken çevresel ve fizikokimyasal koşullara karşı duyarlı olduğu unutulmamalıdır (sıcaklık, pH, organik solventlerin varlığı, metaller, atık sudaki tuzlar vb.). Bu nedenle, kirletici giderme etkinlikleri, atık su bileşimine ve geçerli koşullara bağlıdır. Endüstriyel atıklar genellikle farklı türde organik, inorganik ve birçok inatçı bileşen içeren karmaşık bileşimlerdir. Bu nedenle, lipid bakımından zengin atık suyun etkili bir şekilde arıtılması, büyük ölçüde lipaz enziminin doğasına bağlıdır. İdeal lipaz, farklı sıcaklık (5–60 °C), farklı pH (5.0–9.0) ve etkili lipid giderimi için çözücülerin varlığı gibi karmaşık koşulları tolere etmelidir (Nimkande ve Bafana, 2022).

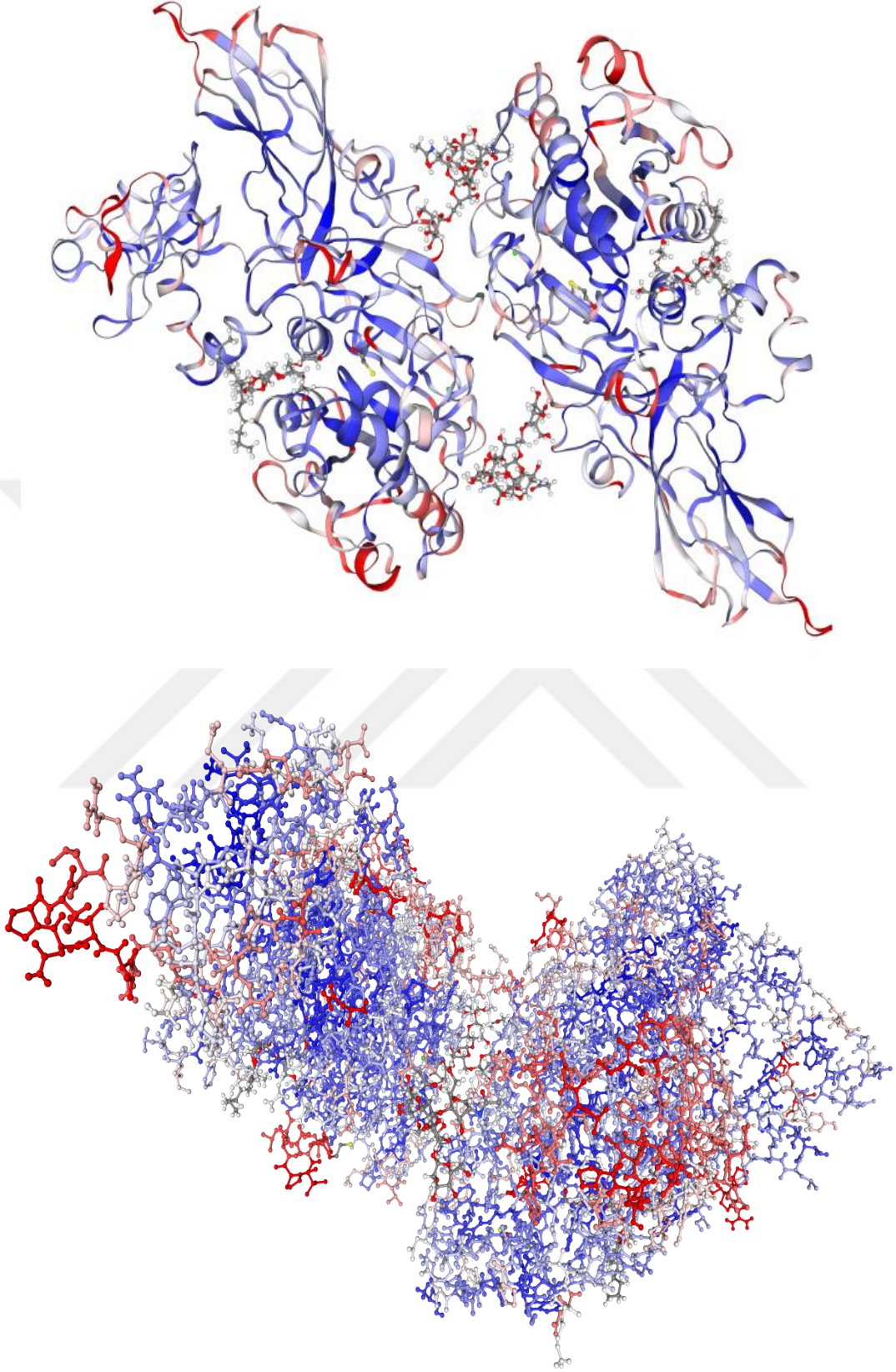
### **2.4. Lipazlar**

Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolaz, EC 3.1.1.3) uzun zincirli açilgliserollerin gliserol, serbest yağ asitleri ve mono ve diaçilgliserollere hidrolizini katalizleyen karboksilesterazlardır. Lipazlar iki fazlı sistemlerin arayüzeylerinde çalışacak şekilde uyarlanmışlardır ve bu yüzey aktivasyonu olarak bilinen bir olgudur. Lipazların arayüzeylerdeki aktivasyonu ilk olarak Sarda ve Desnuelle tarafından X-ışını yapısal analizi ile rapor edilmiş ve çok sayıda lipazın ortak bir özelliği olarak kabul edilmiştir.

Arayüzeylerin yokluğunda lipazlar aktif bölgelerini örten ve onları substratlar için erişilmez hale getiren (kapalı konformasyon) bazı ikincil yapı ekipmanlarına (“kapak” olarak adlandırılır) sahiptir. Bununla birlikte hidrofobik arayüzelerde (örneğin bir damla yağ veya gaz kabarcıkları) lipazların “açıl” yapısını oluşturan önemli konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, hidrofobik arayüz ile etkileşime giren ve enzime işlevsellik kazandıran hidrofobik yüzeylerin açığa çıkmasına neden olur. (Mendes ve diğerleri, 2012)

Lipazlar, yeşil kimyada baskın bir enzim sınıfı olarak değerlendirilmektedir. Serin hidrolazlar sınıfına aittirler ve çözünmeyen bir substrat fazı ile sulu faz arasındaki arayüzde ester bağlarının hidrolizini katalize ederler. Lipazları bu kadar çekici ve yaygın olarak kullanılan bir enzim sınıfı kılan onların yapısı ve özellikleridir. Birincisi, genellikle mükemmel stereoseçicilik, kemoseçicilik ve bölgesel seçicilik sergilerler. İkincisi, birçoğu mikroorganizmalardan, yeni mantarlardan ve bakterilerden üretilebildiği için kolay bulunabilirler. Üçüncü olarak, birçok lipazın kristal yapısının keşfi, gelişmiş kataliz ile rasyonel sentetik stratejilerin tasarımını kolaylaştırmış olmalarıdır. Ayrıca lipazların kofaktöre gereksinim duymamaları onları organik kimyanın önde gelen biyokatalizörlerinden kılmıştır (Bavandi ve diğerleri, 2020).

Lipaz enzimleri kaynağına (hayvan, bitki veya mikroorganizmalar) göre büyük farklılıklar gösterir ve ticari olarak bulunan en ucuz preparasyon domuz pankreasından izole edilmiştir. Mikrobiyal lipazlarla karşılaştırıldığında daha az kullanılmasına rağmen, domuz pankreatik lipaz enzimi esterleşme ve transesterleşme reaksiyonlarında olduğu gibi susuz ortamlarda yüksek stabilite ve aktiviteye sahiptir. Domuz pankreatik lipazı 50-52 kDa molekül ağırlığına sahip, 449 amino asitlik tek bir polipeptid zincirinden oluşan küçük küresel bir proteindir (Resim 1). Üç boyutlu yapısının belirlenmesi ile iyi tanımlanmış iki alanın varlığını ortaya çıkarmıştır. N-terminal olanı  $\alpha/\beta$  tipindedir ve bu 1-336 aminoasit birimlerini içerir ve sırasıyla 153, 177 ve 264 konumlarında korunan katalitik üçlü Ser, Asp ve His bulunmaktadır. C-terminal olanı bir  $\beta$ -sandviçtir ve yalnızca kolipaz ile etkileşime giren 337-449 birimlerini içerir. Pankreatik lipazların hidrolitik aktivitesi lipaz, kolipaz ve safra tuzlarının birleşik aktivitesinden kaynaklanır (Mendes ve diğerleri, 2012).



**Resim 1.** *Porcine Pankreas* lipazının farklı açılardan üç boyutlu yapısının gösterimi (<https://swissmodel.expasy.org>).

## **2.4.1. Lipazların Uygulama Alanları**

### **2.4.1.1. Biyodizel Üretimi**

Biyodizel, hayvansal ve bitkisel yağların triaçilgliserollerinden elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin bir monoalkil esteri olarak bilinir. Biyodizel üretimi birçok ülkenin stratejik planlarının en önemli bileşenlerinden biri haline gelmiştir. Biyodizel, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve geleneksel sıvı yakıtta (petro-dizel) alternatif yenilenebilir bir kaynak olarak dikkatleri üzerine çekerek partikül madde çıkışında ve CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> gibi sera gazlarında belirgin bir azalma sağlamıştır. Bu nedenle biyodizel, petro-dizele çevre dostu bir alternatif olarak güçlü bir verimlilik göstermektedir (İsmail ve Baek, 2020).

### **2.4.1.2. Organik Sentez**

Organik maddelerin kimyasal sentezinde lipazların kullanılması giderek daha önemli hale gelmektedir. Çünkü lipazlar çok çeşitli kemo, regio ve stereoseçicilik reaksiyonlarını katalize etme kabiliyeti göstermektedir. Lipaz kullanılarak sentezlenen organik maddeler gıda, ilaç, deri işleme, kozmetik ve deterjan endüstrilerinde kullanım bulmuştur (Shuai ve diğerleri, 2017).

### **2.4.1.3. Lipidçe Zengin Atık Suların Ön Arıtımı**

Lipidler atık sulara ciddi çevre kirliliğine neden olan önemli bileşenlerdir. Bu lipid kalıntılarının çıkarılması için çeşitli stratejiler önerilmiştir. Bunlar arasında, spesifik enzim (lipaz) kullanma alternatifi, sıkı çevre düzenlemeleri ve lipazların temiz ve kolay uygulanması nedeniyle son zamanlarda potansiyel olarak daha fazla dikkat çekmiştir (Mendes ve diğerleri, 2012).

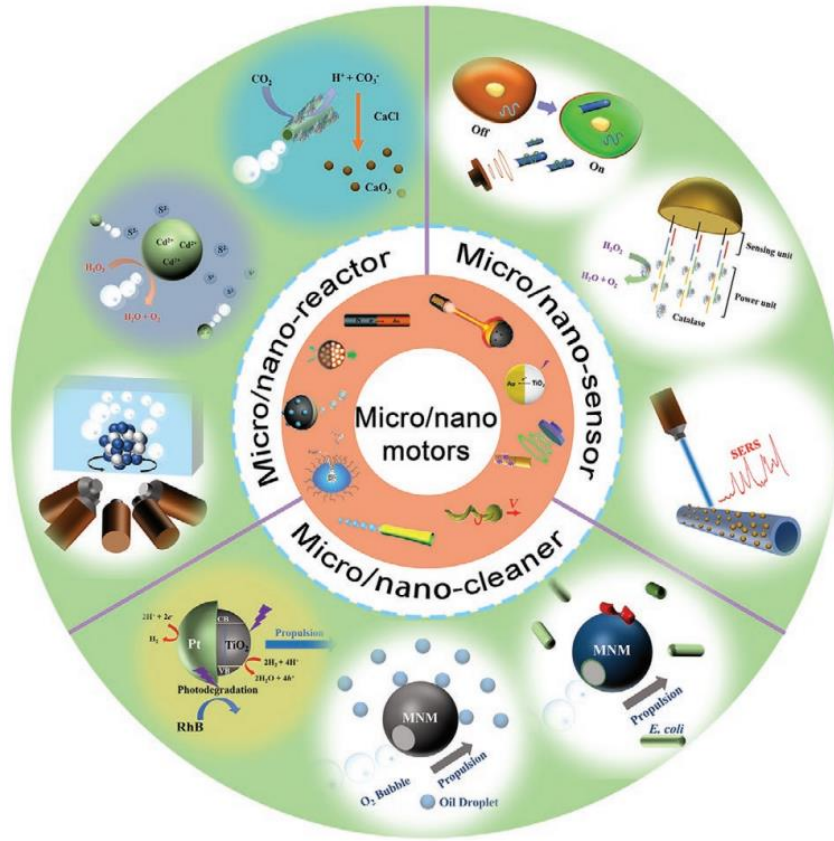
## 2.4.2. Lipazların İmmobilizasyonu

Lipazların canlı hücrelerdeki ana metabolik rolü, trigliseritleri yağ asitleri ve gliserole hidrolize etmeleridir. Bununla birlikte biyoteknoloji ve endüstride lipazlar, transesterifikasyon ve interesterifikasyon gibi esterleşmeler de dahil olmak üzere normal aktiviteleri ile ilgili çok sayıda reaksiyonu katalize etmek için verimli bir şekilde kullanılmıştır. Lipazlar biyodizel, farmasötikler, emülgatörler, kozmetikler, aromalar ve kokuların üretiminde kullanılmaktadır ve yeni desteklerin geliştirilerek lipaz immobilizasyonunda kullanılması endüstriyel biyoteknolojide oldukça önemlidir. Lipazlar, hedef reaksiyonu katalize etmek için enzim hızını arttıran yeterli gözeneklilik, yüzey alanı ve hidrofobik/hidrofilik dengeye sahip yeni destekler geliştirilerek immobilize edilebilirler (İsmail ve Baek, 2020).

## 2.5. Mikro-Nanomotorlar

Makineler ve motorlar insanoğlunun yaşam koşullarını kolaylaştırmış ve sanayinin gelişimini hızlandırmıştır. Kimyasal yakıt, elektrik, rüzgar ve su akışı ile çalışan bu cihazlar, medeniyetin yayılmasına ve gelişmesine ve insan faaliyetlerinin ölçeğinin genişlemesine büyük katkı sağlamıştır. Hemen hemen her alanda yer alan makinelerde muazzam başarılar elde edilmiş olsa da, nanoteknolojideki sınırlamalar ve makroskobik ve mikroskobik sürüş ilkeleri arasındaki farklar nedeniyle mikro/nano ölçekte motorlar/cihazlar tasarlamak ve imal etmek hala zordur. Düşük Reynolds sayısı sisteminde yüzen mikro/nano nesnelere için, atalet kuvveti artık hareket için baskın bir faktör olarak hareket etmez. Bunun yerine, nesnelere ve ortam molekülleri arasındaki çarpışmaların neden olduğu anlık net kuvvet, küçük cihazların hızını anında değiştirebilen önemli bir rol oynar. Yani, mikro-nano nesnelere Brownian hareketi tarafından yönetilir. Bu nedenle sürekli hareket için mikro/nanomotorlara etki eden net kuvveti korumak için sürekli enerji girişi esastır.

Yapay mikro/nanomotorlar, otonom olarak gezinebilen ve mikro/nano ölçekte belirli görevleri yerine getirebilen küçük aygıtlardır. Mikro/nano motorların sürekli hareket özellikleri ve ilgili hareket kaynaklı mikro karıştırma etkisi, bu cihazların karşılık gelen kimyasal/fiziksel süreçleri kolaylaştırmak için "hareket halinde" temizleyiciler, sensörler ve reaktörler olarak hareket etmelerini sağlar (Şekil 2).



**Şekil 2.** Çeşitli uygulamalar için "hareket halinde" mikro-nano motorların şematik gösterimi (Hu ve diğerleri, 2022).

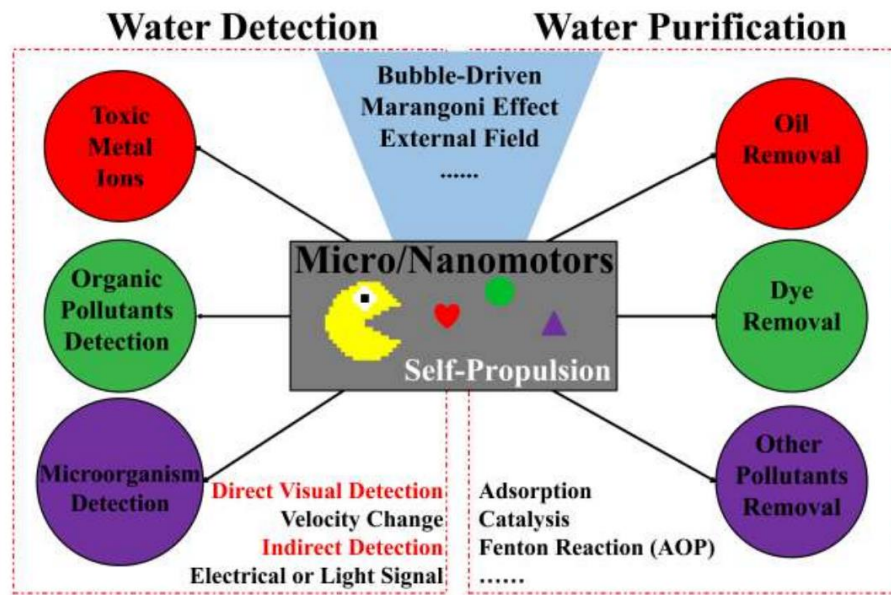
Uygun tasarım ve spesifik yüzey fonksiyonelleştirme ile mikro/nano motorlar çevresel algılama ve kimyasal uygulamalarda büyük umutlar vaat etmektedir (Hu ve diğerleri, 2022).

Su kıtlığı kritik bir sorundur ve sınırlı sürdürülebilir arıtma stratejileri ve artan insan faaliyetleri nedeniyle yakın gelecekte daha şiddetli hale geleceği tahmin edilmektedir. Hem endüstriyel hem de doğal kimyasal bileşikler içeren su kirliliği, kendini geri kazanma kapasitesi sınırlı olan su kaynakları için büyük bir çevresel tehdit oluşturmaktadır. Mutlak su kıtlığı sorunları olan ülke veya bölgelerde 1,8 milyar nüfusun zarar göreceği ve 2025 yılına kadar dünya nüfusunun üçte ikisinin su kaynakları kıtlığı koşullarıyla karşı karşıya kalacağı tahmin edilmektedir. Atık su geri kazanımı için geleneksel yöntemler kimyasal çöktürme, adsorpsiyon, iyon değişimi, gelişmiş oksidasyon süreçleri ve membran ayırmadır. Bilim insanları ve mühendisler, enerji açısından daha verimli ve uygun maliyetli sürdürülebilir su kaynağı sağlayabilen verimli su temizleme teknolojileri geliştirmek için önemli çabalar sarf etmektedirler. Gelişmiş su temizleme teknolojileri iki önemli kriteri karşılamalıdır: Detoksifikasyon yeteneği ve atık su arıtma işlemi sırasında ortaya çıkması

muhtemel ilave kirleticilerin en aza indirilmesi. Ayrıca, geleneksel su arıtma yöntemlerinin uygulanamadığı küçük borular, boşluklar ve mikro kanallar gibi sınırlı koşullar için yerinde temizleme teknolojileri gereklidir. (Ying ve Pumera, 2019)

Son yirmi yılda, nanoteknolojinin hızlı gelişimi, geleneksel su arıtma yöntemlerinde önemli gelişmeler sağlamıştır. Bu yöntemlerden bazıları, iki boyutlu malzemeler kullanılarak ultra ince membran ayırımı, nanoparçacık bazlı katalizörler kullanılarak kirleticilerin ayrıştırılması ve kirleticilerin manyetik olarak duyarlı emiciler tarafından adsorpsiyonu gibi atık su arıtımı için yeni nesil teknolojiler olarak önerilmiştir.

Geçtiğimiz yarım on yılda, gelişmiş mikro-nano motorlar büyük kirleticilerin tespiti veya kirlenmiş sahaların iyileştirilmesi gibi çevresel alanlarda derin bir etki yaratmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Atık su arıtımında mikro-nano motorların kullanımı (Ying ve Pumera, 2019).

Geleneksel remediasyon yaklaşımları difüzyonla sınırlıdır ve bu nedenle atık su arıtımını hızlandırmak için harici çalkalanma gerekir. Bununla birlikte, mikro-nano motorlar, kendi kendini itme yetenekleri sayesinde aktif karıştırma yoluyla potansiyel olarak difüzyon sınırını aşabilirler. Bu kendinden sürücülü mikro-nanomotorlar, malzemelerin mikro/nano yapısı, yani geniş yüzey alanı ve aktivitesi ile birleşerek su arıtma verimliliğini önemli ölçüde hızlandırırlar (Ying ve Pumera, 2019).

### **2.5.1. Mikro-Nano Motor Nedir?**

Kendinden sürücülü mikro-nano motorlar, çözeltilerde kendiliğinden hareket eden ve enerjiyi hareketlere ve kuvvetlere dönüştüren mikro ve nano ölçekli biyo-ilhamlı motorlardır. Bununla birlikte, nano ölçekte hareket zordur ve Brownian difüzyonu ve viskozite gibi parametreler mikro-nanomotorların hareketini engeller. ATP, bazı bakteriler ve sperm hücrelerinin hareketi gibi doğal olaylar, bilim insanlarına kimyasal reaksiyonlarla ve ayrıca manyetik, ışık, sıcaklık gradientleri ve akustik alanlar gibi dış alanlar tarafından harekete geçirilen mikro/nanomotorların yaratılması için ilham vermiştir (Zarei ve Zarei, 2018).

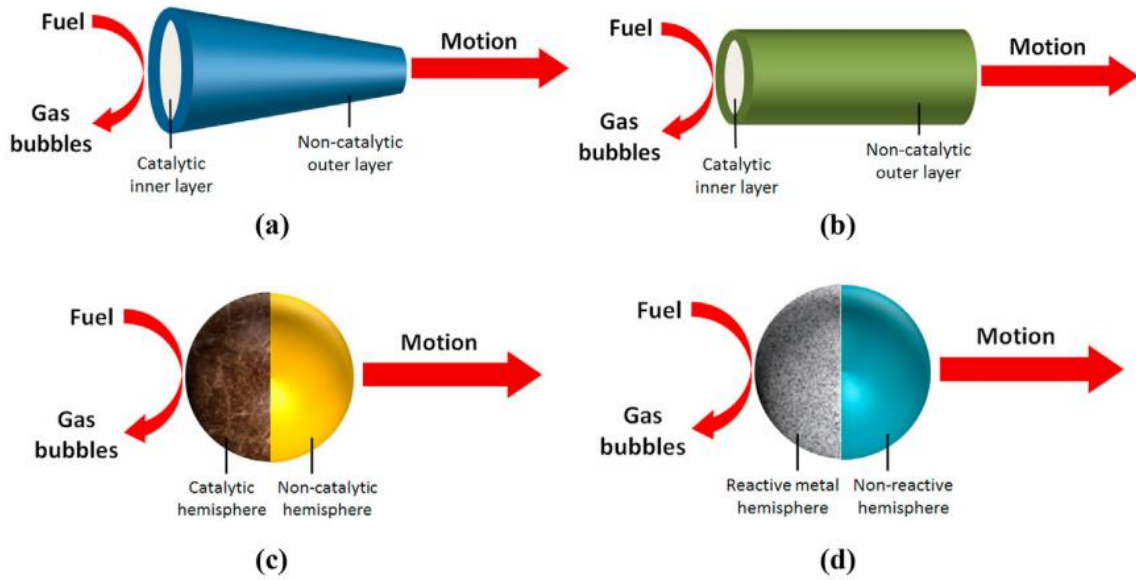
### **2.5.2. Mikro-Nanomotorların Tahrik Mekanizmaları**

Mikro-nano motorlar, makro ölçekli muadillerinden farklı olarak ataletleri ile hareketlerini sürdüremezler. Mikro-nanomotorların mikro-nano ölçekli boyutları, hareketlerine viskoz kuvvetler ve Brownian hareketinin hakim olduğu düşük Reynold sayılı bir rejimde hareket etmelerini sağlamıştır. Mikro-nanomotorlar sıvı ortamda otonom hareketini gerçekleştirmek için, doğada bulunan mikroorganizmalarını taklit eden mikro-nanomotorların hareket ettiği çeşitli tahrik mekanizmaları geliştirmiştir. Kabarcık tahriki incelenen tüm tahrik mekanizmalarının %54'ünü oluşturarak en yaygın kullanılanlar arasındadır ve bunu kabarcık tahriki ve manyetik tahrikin birleşimi olan kabarcık tahriki/manyetik tahrik (%29), foretik kendinden tahrik (%9), manyetik itme (%4) ve kaldırma kuvveti (%4) izler (Chang, 2022).

#### **2.5.2.1. Kabarcık Tahriki**

Kabarcık tahriki en güçlü, verimli ve yaygın olarak kullanılan hareket stratejisidir. Sanchez ve arkadaşları kabarcık oluşumunun yönlendirdiği fizyolojik sıcaklıklarla 10 mm/sn'den daha hızlı hareket davranışları gösteren olağanüstü performanslı bir mikrojet motoru geliştirmiştir (Ye ve diğerleri, 2021). Hem Janus parçacıkları hem de tübüler mikro motorlar, katalitik olarak üretilen mikro-kabarcıklarla hızlı ve verimli itiş gücü sergiler (Şekil

4). Bu reaktif kimyasal reaksiyonların dikkatli kontrolü, bu kabarcıklı mikromotorları tasarlamamanın önemli bir parçasıdır. En yaygın kullanılan tahrik katalitik reaksiyonları,  $H_2O_2$ 'in katalizör olarak platin, gümüş ve mangan oksitlerle katalitik ayrışmasıdır. Çok kısa ömürlerine rağmen hidrojen kabarcıkları oluşturmak için su veya asitle reaktif metallerin kullanılması umut verici stratejilerdendir. Gaz halindeki ürünler, gerekli itici gücü oluşturarak sıvıyı mikro-nanomotorlardan uzaklaştırmak için çekirdeklenme, kabarcık oluşumu, büyüme ve müteakip ayrılmaya uğrayacaktır. Mikro-kabarcıkların sürekli üretimi ve akışı kendinden tahrikli davranışlar için sabit bir itici güç uygular. Çoğu durumda mikromotolar kabarcık çıkarma yönlerinden uzaklaşır. İyi kontrol edilirse, mikromotorların hareketi baloncukların çıkışıyla aynı yönde olabilir. Motorların geometrik şeklinin, boyutunun ve mikro-kabarcıkların ve çözeltinin fiziksel-kimyasal özellikleri dahil olmak üzere birçok faktörün hareket modellerini etkilediği göz önünde bulundurulmalıdır. Kabarcık tahriki stratejisi, su saflaştırma, patojenik bakterilerin öldürülmesi, ilaç dağıtımı ve elektrokimya ile analitik algılama gibi birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmıştır (Chang, 2022).



**Şekil 4.** Konik (a) ve silindirik (b) ve Janus katalitik (c) ve Janus katalitik olmayan (d) mikro-nano motorların tipik kabarcık tahrik mekanizmaları (Chang, 2022).

### 2.5.2.2. Kabarcık Tahriki/Manyetik İtme

Kabarcık tahrikinin, simetri kırılması yoluyla mikro-nanomotorların spontan yönlü hareketine izin verirken güçlü bir itici güç ve yüksek hız gibi olağanüstü avantajları olmasına rağmen dalgalanan kabarcık oluşturma süreci, mikro-nanomotorların hızını istikrarsızlaştırarak hareketlerini kontrol etmeyi zorlaştırır. Bu nedenle çok sayıda araştırmacı kabarcık tahrikli mikronanomotorların yönselliği üzerinde hareket kontrolünü gerçekleştirmek için kabarcık itme/manyetik çalışma (Wu ve diğerleri, 2019), kabarcık itme/elektroforez (Guo ve diğerleri, 2018), kabarcık itme/ışıkla çalışma (Zhou ve diğerleri, 2021), kabarcık itme/ultrasonik çalışma (Xu ve diğerleri, 2014) gibi başka bir itme mekanizmasıyla kabarcık tahrikini birleştirmiştir.

Manyetik itme, sınırlı kimyasal yakıtlar ve diğer çevresel faktörlerin herhangi bir girişimi olmadan, esas olarak sabit mıknatıslardan veya elektronik mıknatıslardan üretilen uzaktan uygulanan bir manyetik alan yoluyla, manyetik malzemeler içeren mikro-nanomotolara manyetik kuvvetler ve torklar uygulayarak yürütülen bir tahrik mekanizmasıdır. Kolay manevra kabiliyeti, hassas oryantasyon manipülasyonu, hızlı yönsel hareket kontrolü, minimum istila, şeffaflık ve iyi biyolojik güvenliği nedeniyle mikro-nanomotorların uzaktan kontrolü ve kablosuz kontrolü için güçlü bir tahrik mekanizması olarak büyük ilgi görmüştür. Metal iyonu tespiti ve sudan uzaklaştırılması için manyetik olarak yönlendirilebilir kabarcık tahrikli mikromotorlar, sadece kabarcık veya manyetik tahrikli mikromotora göre daha hızlı ve iki yönlü hareket kontrolü sergiler (Chang, 2022).

### 2.5.2.3. Foretik Kendinden Tahrikli

Foretik kendi kendine itme, net harekete ulaşmak için yüzeylerindeki asimetric kimyasal reaktiviteyi izleyen mikro-nanomotorlar boyunca kendi kendine üretilen kimyasal gradyanlara dayanan mikro-nanomotorların kuvvet, tork ve kabarcıksız bir hareket mekanizmasıdır. Genel olarak mikro-nanomotorların kendi etraflarında sırasıyla elektrik alanı, çözünen konsantrasyon ve sıcaklık gradyanlarını üreterek hareket ettiği kendi kendine elektroforez, kendi kendine difüzyonoforez ve kendi kendine termoforez olarak ayrılabilir. Hem kendi kendine elektroforez hem de kendi kendine difüzyon, mikro-nanomotorları ilerletmek için kendi kendine termoforezden daha yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte

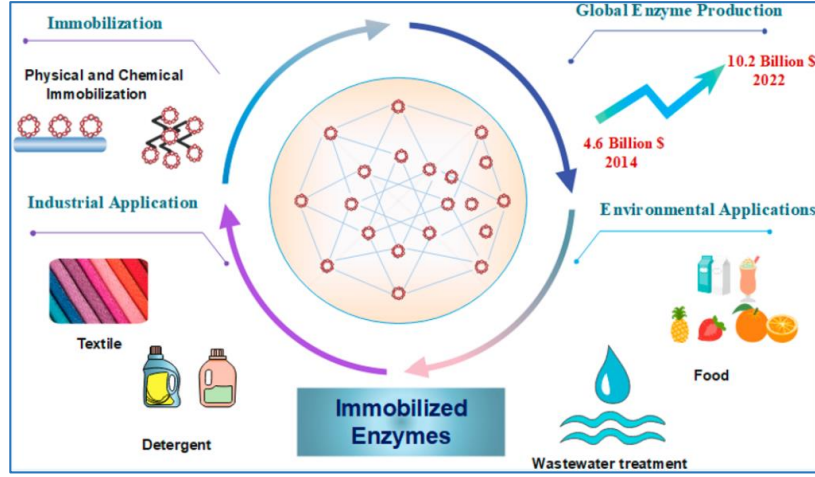
mikro-nanomotorları itmek için kullanılan en eski itme mekanizmalarından da olsalar foretik kendi kendine itme, kendi kendine elektroforez veya kendi kendine difüzyonoforez iyonik kuvvet, pH, sıcaklık ve hapsedilenlerin doğası gibi çevresel faktörlere karşı hassastır ve bu da onların biyolojik ortamlar kadar kompleks atık su uygulamalarını da engeller (Chang, 2022).

#### **2.5.2.4. Kaldırma Kuvveti Sürücülü Tahrik**

Kaldırma kuvveti sürücülü tahrik, mikro-nanomotorların yüzeylerinde üretilen kabarcıkların kaldırma kuvveti ile mikro-nanomotora etki eden yerçekimi kuvveti arasındaki farka dayalı olarak bir yakıt çözeltisinde mikro-nanomotorların yönlü dikey yukarı ve aşağı hareketlerini hassas bir şekilde kontrol edebilen gelişmekte olan bir hareket mekanizmasıdır (Chang, 2022).

### **2.6. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimler, birçok biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonu katalize eden katalizörlerdir. Üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve yeşil kimyası nedeniyle bu biyokatalizörler gıda, tekstil, sağlık, ilaç, kağıt ve kağıt hamuru yapımı ve deterjan gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin bir diğer önemli uygulaması atık yönetimi, özellikle katı atık arıtma ve atık su arıtma içindir. Enzimlerin biyodizel, biyoetanol, biyohidrojen ve biyokütle dönüşümünden biyogaz gibi biyoyakıtların üretiminde kullanım alanı bulmaları enzimlerin önemine işaret etmiştir. Enzimlerin tüm bu arzu edilen özellikleri ve yaygın endüstriyel uygulamaları, uzun vadeli operasyonel kararlılık, raf ömrü, geri kazanım ve yeniden kullanılabilirlik eksiklikleri nedeniyle çoğu zaman engel teşkil etmektedir (Ahmad ve Sardar, 2015). Enzim immobilizasyonu bu problemlerin üstesinden gelme stratejilerinden biridir (Şekil 5).



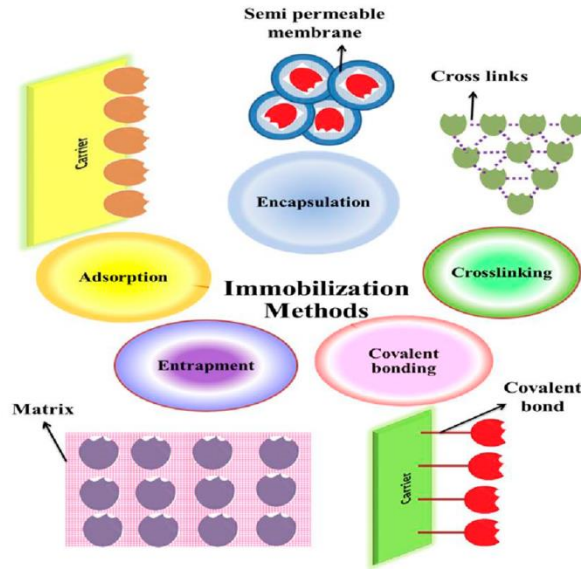
**Şekil 5.** Enzim immobilizasyonu ve uygulama alanlarının şematik gösterimi (Maghraby ve diğerleri, 2023).

“İmmobilize enzimler” terimi, fiziksel ve/veya kimyasal olarak hapsedilmiş veya tutuklanmış, katalitik aktivitesi korunmuş ve sürekli ve tekrar kullanılabilen enzimler olarak tanımlanır (Brena ve Batista-Viera, 2006). Enzim immobilizasyonu, ilk kez Nelson ve Griffin tarafından 1916'da invertaz enziminin kömüre adsorbe edildikten sonra sü krozu hidrolize edebildiğinin farkedilmesiyle ortaya çıkmıştır. 1960'lardan itibaren ilgi çekici bir araştırma konusu olan enzim immobilizasyon stratejileri kademeli olarak gelişmiş, bununla birlikte, biyoteknolojik/nanoteknolojik gelişmeler enzimlerin immobilizasyon stratejilerine olan ilgiyi büyük ölçüde canlandırmıştır (Maghraby ve diğerleri, 2023).

Enzim immobilizasyon sistemlerinde üç temel faktör etkilidir: Enzim, taşıyıcı sistem (destek materyali) ve immobilizasyon yöntemi.

### 2.6.1. İmmobilizasyon Yöntemi

Enzim immobilizasyon yöntemleri, enzim ve destek materyali arasındaki etkileşim türlerine göre fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Kimyasal yöntemler kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma, fiziksel yöntemler ise enzim ile destek materyali arasında kovalent etkileşimin olmadığı adsorpsiyon ve tutuklama işlemlerini içerir (Şekil 6). Bazı durumlarda, enzim immobilizasyonu için çoklu enzim-destek etkileşimlerinden yararlanır (Liu ve diğerleri, 2018).



Şekil 6. Enzim immobilizasyonu yöntemleri (Nargotra ve diğerleri, 2023).

### 2.6.1.1. Kovalent Bağlama

Bu yöntemde, enzim ile destek materyali diazotasyon, amino bağı, Schiff bazı oluşumu, amidasyon reaksiyonları, tiyol-disülfit, peptit bağı ve alkilasyon gibi reaksiyonlar sonucu kovalent bağlarla bağlanır (Dwevedi, 2016). Enzimin destek materyali ile kovalent bağlanması, enzim yüzeyindeki arjinin, aspartik asit, histidin gibi amino asit yan zinciri ve destek materyali yüzeyinde bulunabilecek imidazol, indolil, fenolik hidroksil gibi farklı fonksiyonel gruplar sayesinde gerçekleşir (Ahmad ve Sardar, 2015).

Kovalent bağlama ile immobilizasyon enzimlerin fiziksel ve kimyasal koşullara (örn. sıcaklık, denatüranlar, organik çözücüler) karşı kararlılığını arttırmaya yardımcı olur. Bununla birlikte, bu immobilizasyon yöntemi, enzimin destek materyali ile etkileşimi sırasında enzimin konformasyonel ve katalitik özelliklerinde ciddi değişikliklere yol açabilir (Dwevedi, 2016).

### 2.6.1.2. Çapraz Bağlama

Bu yöntemde, enzim molekülleri bi veya mutlifonksiyonel reaktifler veya ligandlar aracılığıyla birbirine bağlanır. Çapraz bağlama yöntemi herhangi bir destek materyali

kullanılmadığı için tercih edilen bir immobilizasyon yöntemi değildir. Kovalent türde bir bağ içerdiğinden, bu şekilde immobilize edilen enzimler sıklıkla konformasyonel değişikliklere uğrar ve sonuç olarak aktivite kaybı olur. Bununla birlikte, diğer immobilizasyon yöntemleriyle kombinasyonu ile enzim sızıntısını en aza indirmek için kullanım alanı bulmaktadır (Dwevedi, 2016).

### **2.6.1.3. Adsorpsiyon**

Adsorpsiyon yönteminde enzim, destek materyaline iyonik veya hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri dahil olmak üzere kovalent olmayan bağlarla ve destek materyalinin herhangi bir ön aktivasyonu olmaksızın bağlanır. Enzim ve destek materyali etkileşimi pH, sıcaklık, çözücü, iyonik kuvvet, enzim ve adsorban konsantrasyonu gibi değişkenler ile optimize edilir. Yöntem, herhangi bir konformasyonel değişiklik olmaksızın enzim immobilizasyonunun yanı sıra eş zamanlı saflaştırmaya yardımcı olması açısından avantajlıdır (Dwevedi, 2016).

### **2.6.1.4. Tutuklama**

Tutuklama yöntemi, enzimlerin bir kafes yapıya sahip olan bir destek materyali veya lif içinde veya polimerlerin zarlarında tutulması olarak tanımlanır. Yöntemde, substratın veya ürünün serbest difüzyonuna izin veren polimerik ağın gözenek boyutunun kontrol edilmesi sayesinde enzim sızıntısı kolayca önlenir. Bu immobilizasyon yöntemi, enzimlerin yüksek yükleme kapasitesi, düşük üretim maliyetleri, tutuklanan enzimlerin gelişmiş mekanik stabilitesi ve daha düşük kütle transferi dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Ayrıca, enzimler polimerlerle reaksiyona girmez; sonuç olarak, denatürasyon genellikle önlenir (Maghraby ve diğerleri, 2023)

## 2.6.2. Destek Materyali

Enzim immobilizasyonu için organik/inorganik çok sayıda destek materyali bulunmaktadır. Destek materyalinin özellikleri, immobilize enzim sisteminin başarısında anahtar rol oynar. İdeal bir destek materyali, iyi bir stabiliteye sahip olmalı, fonksiyonelleştirilebilmeli, gözenekli yapıda ve yüksek immobilizasyon verimliliği için geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Ayrıca, düşük maliyetli, bol ve çevre dostu olmalıdır (Ahmad ve Sardar, 2015).

## 2.7. Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunun Önemi ve Literatürde Yapılmış Çalışmalar

Artan nüfus, sanayileşme ve uygarlık nedeniyle temiz su ve çevreye olan talep artmaktadır. Atık su arıtımı, yüksek oranlarda atık su üretimi ve geri dönüşüm ihtiyacı nedeniyle önemli zorluklar taşımaktadır. Uygun atık su arıtımı, atık deşarjının kaynağı (endüstriyel, evsel), kimyasal bileşimi (ağır metaller, inorganik ve organik madde içeriği), atık sudaki askıda ve çözülmüş bileşenler (yüksek iyonik güç, mevcudiyet) gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yağ ve gres gibi lipidler, gıda işleme endüstrileri, restoranlar, süt ürünleri, petrol rafinerisi, et işleme, tabakhane, kozmetik ve ilaç endüstrilerinden atık suya boşaltılan önemli bileşenlerdir. Süt ürünleri atık suyu 8288 mg/L yağ/gres içerirken, petrol rafinerisi, restoranlar ve evsel atık sularının yağ/gres içeriği sırasıyla 110–26,4150, 100–1000 ve 50–100 mg/L arasında değişmektedir.

İşlenmiş veya kısmen işlenmiş lipidlerin yukarıdaki endüstrilerden boşaltılması, su yüzeyinde oksijen ve güneş ışığının nüfuz etmesini engelleyen yağlı bir tabakanın gelişmesine yol açarak su ekosistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olur. Ayrıca, yağ damlacıkları atık suda askıda kalan partiküllerle birleşerek kanalizasyon hatlarında tıkanıklıklar oluşturarak arıtma sürecini ve atık su akışını kesintiye uğratar. İlâveten, yemeklik yağlar açık havada yüksek sıcaklıkta ısıtıldığında oksitlenir ve özelliklerini değiştirerek kanserojen yan ürünlerin oluşmasına neden olur. Avrupa Birliği, biyolojik birikim yoluyla insan yaşamı için tehdit oluşturmaları nedeniyle yemeklik yağların hayvan yemi olarak bile yeniden kullanılmasını yasaklamıştır. Böylece atık sudaki lipidler sadece ekosistem için tehdit oluşturmaz, aynı zamanda insan sağlığı için de risk oluştururlar.

Yukarıda bahsedilen hususlar nedeniyle, atık sudan lipid giderimi büyük önem taşımaktadır ve bu amaçla farklı mekanik ve kimyasal teknikler kullanılmaktadır, ancak bunların yüksek maliyeti ve olumsuz çevresel etkileri nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Biyoremediyasyon, kirleticileri doğal olarak arıtmak için etkili ve popüler olan yöntemlerden biridir. Birçok bakteri ve mantar, biyoremediyasyonda yardımcı olan diğer hidrolitik enzimlerle birlikte lipaz üretir. Lipazlar, Enzim Komisyonu (E.C.) numarası 3.1.1.3 olan triaçilgliserol açilhidrolazlar sınıfına ait enzimlerdir. Bu enzim, triaçilgliserolü gliserol ve yağ asitlerine hidrolize etme kabiliyeti nedeniyle kapsamlı endüstriyel uygulamalara sahiptir. Ayrıca enzimatik reaksiyon için herhangi bir ek kofaktöre ihtiyaç duymaması önemli bir avantajdır. Yapılan çalışmalar, endüstriyel uygulamalar için gerekli olan farklı kimyasalların (asitler, bazlar, çözücüler, deterjanlar ve tuzlar) varlığında ve farklı çevresel koşullarda (sıcaklık, pH) bile çok az lipazın oldukça etkili olduğunu bildirmiştir (Nimkande ve Bafana, 2022).

Lipazlar bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunur ve yağların metabolizmasında anahtar bir role sahiptir. Lipidlerin depolanması, transferi ve metabolizmasında rol alırlar. Lipazlar trigliseridlerdeki karboksil ester bağlarını yağ asitleri ve glisorele parçalayan hidrolaz sınıfı enzimlerdir (E.C.3.1.1.3). Lipazlar lipid-su ara yüzeyindeki bir reaksiyonu katalizlerler ve bir oyuk içerisine yerleşmiş nükleofilik dirsek üzerinde serin aktif merkezini içeren merkezi bir L levhasına sahiptirler. Bu oyuk bir peptit kapağı ile kaplanır, lipaz lipid-su yüzeyi ile etkileştiğinde bu kapak açıl birimlerinin aktif bölgeye ulaşılabilirliğini sağlamak için konformasyonel değişime uğrar. Lipazlar hidrolaz aktiviteleri yanında esterifikasyon ve transesterifikasyon (alkoliz ve asidoliz) gibi endüstriyel olarak önemli çeşitli reaksiyonların gerçekleşmesini de sağlarlar (Mendes ve diğerleri, 2012).

Lipazlar geniş kullanım alanı olan enzimler olmakla birlikte yüksek maliyetleri, reaksiyon koşulları altında uzun süreli kararlılıklarının olmaması, çok adımlı işlemlerde yeniden kullanımlarının imkansızlığı ile ayırma, geri kazanım ve yeniden kullanımdaki zorlukları nedeniyle sınırlılıklar içermektedir (Cheng ve diğerleri, 2020). Bahsedilen bu sınırlamaların üstesinden gelmek için uygun bir destek materyaline lipaz enziminin immobilizasyonu akıllıca bir çözüm olarak kullanılmaktadır. Lipaz enziminin immobilizasyonuna ilişkin literatürde yapılmış çalışmalar aşağıdaki özetlenmiştir.

Shang ve diğerleri (2014), ZnO nanotelleri ve makrogözenekli silikadan oluşan bir kompozit yapısı hazırlamışlar ve elde edilen kompozitlerin karakterizasyonunu SEM ve

XRD teknikleri ile gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra bu destek üzerine *Candida Antartica* lipaz enzimini adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişlerdir. Kompozite bağlanan lipaz miktarını 196,8 mg/g bulmuşlar ve 48 saat boyunca immobilize lipazın aktivitesinin değişmediğini rapor etmişlerdir. İmmobilize lipaz (R,S)-2-oktanolün, kinol ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Shang ve diğerleri (2015), Zn nanotelleri/nanogözenekli SiO<sub>2</sub> kompozit yapılarına *Candida Rugosa* lipazını immobilize etmişler ve fitosterol esterlerinin sentezinde kullanmışlardır. İmmobilize lipaz yaygın ısıtma yöntemleri ile kıyaslandığında mikrodalga ısıtması altında 55 °C’de yüksek termal kararlılık göstermiştir.

Yüce-Dursun ve diğerleri (2016), hibrid epoksi-silika polimer filmleri, sol-jel metodu ile hazırlamışlar ve *Candida Rugosa* lipazının kovalent immobilizasyonunda kullanmışlardır. Polimerik desteğin morfolojisini SEM ve FTIR teknikleri ile incelemişler ve karakterize etmişlerdir. Hazırlanan immobilize lipaz iki farklı reaksiyon sistemi olarak sulu ortamdaki p-nitrofenil palmitatın hidrolizinde ve n-hekzan ortamındaki p-nitrofenil linoleatın sentezinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Araştırmacılar, serbest ve immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliğini ve depo kararlılığını değerlendirmişlerdir.

Jamie ve diğerleri (2016), *Candida Rugosa* lipaz enzimini çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Hazırlanan immobilize lipaz yapılarını SEM, TEM, TGA ve FTIR teknikleri ile karakterize etmişlerdir. İmmobilize lipaz %98 oranında aktivitesini korumuş ve yağlı atık suyun arıtımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Costa-Silva ve diğerleri (2017), *Cercospora kikichii* lipaz enzimini kitosan mikrokürelerine immobilize edebilmek için farklı çapraz bağlayıcı ajanlar (glutaraldehit, sodyum metaperiyodat, epiklorohidrin) kullanmışlar ve %1,5’lik glutaraldehit ile en yüksek aktiviteyi gözlemlemişlerdir. Hazırlanan immobilize lipaz ile hindistan cevizi yağının transesterifikasyonu incelenmiş ve %97,9 gibi yüksek ester içeriği elde edilmiştir.

Gao ve diğerleri (2017), monodispers çekirdek-kabuk manyetik organosilika nanoçiçek yapılarını hazırlamışlar ve SEM, XPS ve VSM teknikleri ile karakterizasyonlarını yapmışlardır. Hazırlanan nanoçiçek yapıları lipaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanılmış ve maksimum lipaz yüklemesi 93 mg/g destek ve spesifik hidrolitik aktivitesi 22,700 U/g destek olarak bulunmuştur. Hazırlanan lipaz bağlı nanoçiçek yapıları, farklı zincir uzunluğuna sahip alkoller (n-bütül alkol, n-kaprilik alkol, n-lauril alkol) kullanılarak

levulinik asidin esterifikasyonu ile alkil levulinotların sentezinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Adetunji ve Olaniran (2018), lipidçe zengin atık sulardan izole edilen *Bacillus aryabhatai* SE3-PB mikroorganizmasının ekstraselüler lipaz enzimini, tutuklama yoluyla aljinat kürelere immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisini incelemişler ve her iki enzim için pH'ı, 9.5 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca serbest ve immobilize lipazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenerek depo kararlılığı ile tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

Miao ve diğerleri (2018),  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküller hazırlayarak APTES ile fonksiyonelleştirmişler ve lipaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanmışlardır. Hazırlanan enzim bağlı nanoyapılar TEM, TEM-EDS, XRD, FTIR ve magnetometer kullanılarak karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize lipazın optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri incelenmiş ve yağ asidi metil esterleri dönüşümünde %89,4 verim sağladıkları görülmüştür. Araştırmacılar lipaz bağlı bu nanoyapıların biyodizel üretiminde çevre dostu bir araç olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang ve diğerleri (2019), mezogözenekli silika nanomotorlar hazırlayarak bunlara lipaz enzimi bağlamışlar ve trioasetin ve tributirin varlığında hareketini ve yağ giderimini incelemişlerdir. Lipaz bağlı mikromotorların tributirini yüksek oranda parçaladığını rapor etmişlerdir.

Bacha ve diğerleri (2019), *Staphylococcus aureus* ALA1 lipaz enzimini Celit 545,  $CaCO_3$  ve silika jel üzerine immobilize etmişler ve en yüksek immobilizasyon verimini  $CaCO_3$  ile elde etmişlerdir.  $CaCO_3$  üzerine immobilize edilen lipazın optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ile aktiviteleri üzerine çeşitli metal iyonlarının ve ajanlarının etkilerini incelemişlerdir. Serbest ve immobilize lipazın zeytinyağı, palm yağı, mısır tohumu yağı, ayçiçek yağı ve hindistan cevizi yağı üzerindeki hidroliz etkisini araştırmışlardır. Ayrıca Sudi Arabistan Wadi Hanifah nehrindeki yağların biyoremediyasyonunu da başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir.

Brito ve diğerleri (2020), aktive karbonu fonksiyonelleştirerek lipaz immobilizasyonunda kullanmışlardır. Hazırlanan aktive ve fonksiyonelleştirilmiş karbonun SEM ve FTIR analizleri yapılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Lipaz immobilizasyon kapasitesine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Immobilize enzim pH 5.0 ve 30 °C immobilizasyon koşullarında en yüksek spesifik aktiviteyi (<0,450 U/mg)

göstermiştir. İmmobilize lipaz substrat olarak asetik asit ve izoamil alkol kullanılarak esterifikasyon reaksiyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Wang ve diğerleri (2020), üç farklı strateji (iyonik adsorpsiyon, glutaraldehit yardımıyla kovalent bağlama ve hidrofobik etkileşimler) ile mezogözenekli silika nanopartiküllere *Candida rugosa* lipaz enzimini bağlayarak, farklı lipaz konformasyon ve yönelmesinin motorun performansına etkisini değerlendirmişlerdir.

Xing ve diğerleri (2020), Janus nanomotorlar (DMS/C@Pt) hazırlamışlar ve TEM analizini yaparak karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar bu janus motorların lipaz, ışık ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sürücülü olarak kullanımlarını göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen bilgilerle biyomedikal uygulamalardaki karmaşık görevleri yerine getirebilecek çok fonksiyonlu mikro/nanomotorların hazırlanabileceğini rapor etmişlerdir.

Xing ve diğerleri (2021), karbon@silika nanomotorları hazırlayarak bu nanomotorların yakın kızılötesi ışığı sürücülü olarak trigliseritlerin parçalanmasını başarılı bir şekilde gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir.

Zhou ve diğerleri (2021), manyetik kovalent organik çerçeveler hazırlamışlar ve SEM, XRD, TGA ve VSM ile karakterize etmişlerdir. Lipaz enziminin hazırlanan desteğe immobilizasyonu fiziksel adsorpsiyon yolu ile gerçekleştirilmiş ve substrat ve immobilize enzimin aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi değerlendirilmiştir. Hazırlanan biyokompozit yapıları, kurkas yağdan biyodizel üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Işık ve diğerleri (2021), yumurta kabuğu membranına *Acinetobacter haemolyticus* lipaz enzimini adsorpsiyon ve çapraz bağlama metodlarını kullanarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize lipazın optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ile kinetik parametrelerini belirlemişlerdir. Ayrıca mısır özü yağı, zeytinyağı, soya yağı ve ayçiçek yağı gibi yenilenebilir yağların hidrolizini serbest ve immobilize lipaz ile gerçekleştirerek karşılaştırmışlar.

Yao ve diğerleri (2022), grafen oksit üzerine immobilize edilmiş lipaz enziminin, kesikli sistemde endüstriyel atık su atıklarından azo boyalarının gideriminde kullanımını araştırmıştır. Sonuçlar enzim aktivitesinin lipaz derişimi, pH ve sıcaklık ile arttığını göstermiştir. Boya giderme performansını araştırmak için adsorpsiyon izotermi ve kinetik çalışmalar yapılmıştır. Azo boya giderme etkinliği, 240 dakikalık temas süresinde ve 5 mg/L başlangıç boya konsantrasyonunda %89,47 olarak bulunmuştur.

Bacha ve diğerleri (2022), ısıya ve çözümlere dayanıklı alkalın lipaz olan termofilik *Bacillus stearothermophilus* lipazını kısmen saflaştırmış ve enzimin çalışma koşullarını

belirlemişlerdir. Daha sonra bu enzimi  $\text{CaCO}_3$  üzerine adsorpsiyon yoluyla immobilize ederek farklı substrat ortamlarında (palm, mısır özü, ayçicek ve hindistan cevizi yağı) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca hazırlanan immobilize lipaz atık su arıtımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Mulinari ve diğerleri (2023), Everse Transform 2.0 Lipazını (ET2) bir alümina membran üzerine tek adımlı ve iki adımlı işleme immobilize ederek karşılaştırmışlardır. Her iki strateji kullanılarak immobilize edilen enzim, yağlı atık su filtrasyonunda mükemmel kirlenme direnci ve kendi kendine temizleme performansı göstermiştir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Cihazlar

Deneyleerde Palm Sens4 potansiyostat, Beko no frost buzdolabı, Radwag (AS220 C/2) analitik terazi, Memmert (Beschicung-Loading Model 100-800) etüv, Hanna (pH 211) pH metre, Sigma (3-30 KS) santrifüj cihazı, Shimadzu (UV-1900i) UV-Vis spektrofotometre, Velp (multistirrer) 15 çoklu manyetik karıştırıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Millipore Simplicity UV ultra saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler ve Heidolph Reax top vorteks kullanıldı.

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Whatman siklopor polikarbonat membran (2 µm), 3,4-etilendioksitiyofen (EDOT), pirol 2-karboksaldehit (PPy), potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>), sodyum dodesil sülfat (SDS), nikel (II) sülfat (NiSO<sub>4</sub>), nikel (II) klorür (NiCl<sub>2</sub>), borik asit (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), alümina, metilen klorür (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), izopropil alkol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O), etil alkol (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), lipaz enzimi Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan temin edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması

Mikromotorlar kalıp yönelmeli elektrobiriktirme yöntemi kullanılarak sentezlendi. Bu amaçla, 2 µm çapında konik şekilli mikrogözenekli polikarbonat membran (Katalog No:

7060-2511) kullanıldı. Membranın bir yüzü, çalışma elektrodu olarak kullanılmak üzere 50 nm kalınlığında altın tabakası ile kaplandı. Hazırlanan membran Teflon kaplama hücresi içine yerleştirildi ve iletkenliğin sağlanması için araya alüminyum folyo yerleştirilerek çalışma elektrodu olarak kullanıldı. Platin tel, Ag/AgCl sırasıyla karşıt ve referans elektrot olarak kullanıldı. Poli(3,4-etilendioksitiofen) (PEDOT) mikromotorlar 15 mM EDOT, 3 mM PPy, 7.5 mM KNO<sub>3</sub> ve 100 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren kaplama çözeltisinin +0.80 V'da 3C yükte elektropolimerizasyonu ile hazırlandı. Ardından nikel biriktirilmesi için nikel standart çözeltisi hazırlanarak membran yüzeyinde oyuklar oluşturulması için -20 mA akım ile 10 kez pulse uygulandı ve kronopotansiyometri yöntemi ile oluşturulan oyuklara nikelin biriktirilmesi için -6 mA akım 360 s boyunca uygulandı. Elektrobiriktirme işlemlerinden sonra membran, kaplama hücresinden alınarak saf su ile yıkandı. Daha sonra altın tabaka önce kalın çaplı alümina ile sonrasında ise ince çaplı alümina ile sıyrıldı ve membranın çözündürme amacı ile 1.0 mL diklor metan içinde 30 dakika boyunca çalkalandı. Ardından 8.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak çözgen atıldı. Diklor metan ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Daha sonra 1.0 mL izopropil alkol ile yıkama yapıldı ve 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Ardından mikromotorlar 1.0 mL etil alkol ile yıkandı ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Son olarak 1.0 mL saf su ile yıkanan mikromotorlar 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Su ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve saf su içinde süspansiyon edilen mikromotorlar daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı (Uygun ve diğerleri, 2017).

### **3.2.2. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Karakterizasyonu**

Hazırlanan mikromotorların şekil, boyut ve yüzey özellikleri hakkında bilgi edinmek için İYTE MAM'da bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını analiz (EDX) cihazları kullanıldı. Hazırlanan mikromotorların manyetikliği bir mıknatıs yardımı ile kontrol edildi.

### **3.2.3. Lipaz Enziminin PPy-COOH/Ni Mikromotora İmmobilizasyonu**

Sentezlenen PPy-COOH/Ni mikromotorların karbonil fonksiyonel gruplarının

aktivasyonu ve lipaz enziminin immobilizasyonu EDC/NHS kimyası ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, mıknatıs ile çöktürülen mikromotorların üzerine 0,4 M EDC, 0,1 M NHS ve 2 mg/mL derişiminde lipaz enzimi içeren çözelti ( pH 5.5 PBS tamponunda) eklendi ve +4 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda mikromotorlara bağlanan lipaz miktarı başlangıç ve denge anındaki lipaz derişimlerinin belirlenmesi ile hesaplandı. Boş ve lipaz bağlı mikromotorların FTIR analizi Kimya Bölümü, Biyokimya ABD araştırma laboratuvarında bulunan. FTIR-ATR cihazı (Spektrum 2, Perkin Elmer) ile gerçekleştirildi.

### **3.2.4. Lipaz Aktivite Tayini**

Lipaz aktivitesi substrat olarak p-nitrofenillaurat, 4-nitrofenil dodekanoat (p-NPL) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Sigurgisladottir ve diğerleri, 1993).

Bu amaçla, 100 µL p-NPL (10 mM, etanolde) çözeltisi ve 0,1 mg/mL derişiminden 100 µL lipaz enzimi, 800 µL Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) tamponuna edilerek 40 °C’ de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımına 0,25 mL 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi ve reaksiyon durduruldu. Karışım 10.000 × g’de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatanın 410 nm’deki absorbansı, spektrofotometrede ölçüldü. Bir ünite lipaz aktivitesi, reaksiyon koşulları altında 1 dakikada p-NPL’den 1 µmol p-nitrofenol oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı. İmmobilize lipaz ile aktivite tayinlerinde mikromotorlara bağlı lipaz enzimi kullanıldı.

### **3.2.5. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi**

Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine pH’ın etkisi farklı pH’larda (pH 4.0-5.0 asetat tamponu (0,1 M), pH 6.0-8.0 fosfat tamponu (0,1 M), pH 9.0 karbonat tamponu (0,1 M)) aktivite ölçümleri yapılarak incelendi. Bu amaçla aktivite ölçümleri yukarıda anlatılan şekilde yapıldı ve en yüksek aktivite değeri 100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplandı. Yüzde aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize lipazın optimum pH’sı belirlendi.

Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 25-65 °C arasında aktivite

ölçümleri yapılarak belirlendi ve sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize lipazın optimum sıcaklık değeri belirlendi.

### **3.2.6. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi**

Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için enzim derişimi sabit tutularak farklı substrat derişimlerinde (1.0-25 mM) aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak lipaz enzimlerinin kinetik parametreleri hesaplandı.

### **3.2.7. Serbest ve İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi**

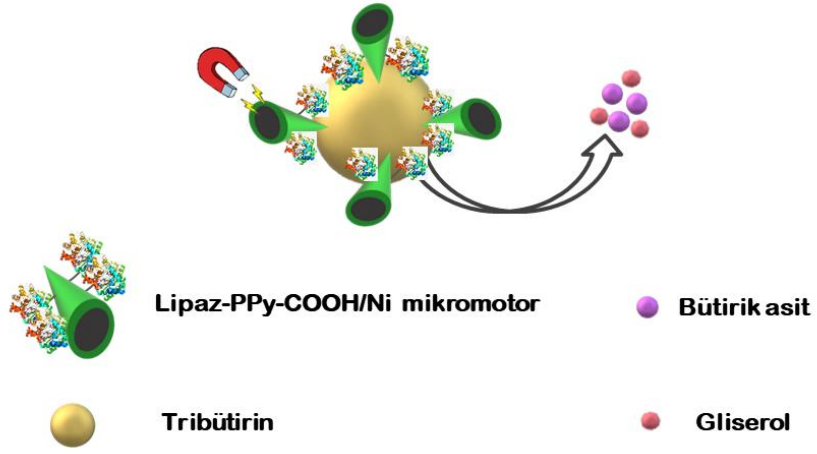
Serbest ve immobilize lipazın ısıl kararlılığı 45 °C’de incelendi. Bu amaçla, serbest ve immobilize lipaz çözeltileri 45 °C’de inkübe edilerek belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı ve zamana karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

Serbest ve immobilize lipazın depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla +4 °C’de 30 gün boyunca inkübe edilen serbest ve immobilize lipaz çözeltilerinden belirli zaman aralıklarında alınarak aktivite değerleri ölçüldü ve zamana karşı grafiğe geçirildi.

İmmobilize lipazın işlemsel kararlılığının belirlenebilmesi için aktivite ölçümleri aynı mikromotor-lipaz sistemi kullanılarak 5 kez tekrar edildi. Aktivite ölçümleri döngü sayısına karşı % aktivite olarak grafiğe geçirildi.

### **3.2.8. Lipaz Bağlı PPy-COOH/Ni Mikromotorların Yağ Gideriminde Kullanımının Araştırılması**

Lipaz bağlı mikromotorların yağ giderim potansiyelini araştırmak amacıyla substrat olarak tribütirin kullanıldı (Şekil 7). Bu amaçla, tribütirin damlacığı üzerine immobilize lipaz ilave edildi ve mikroskop altında zamana bağlı olarak damlacığın çapındaki azalma takip edildi.

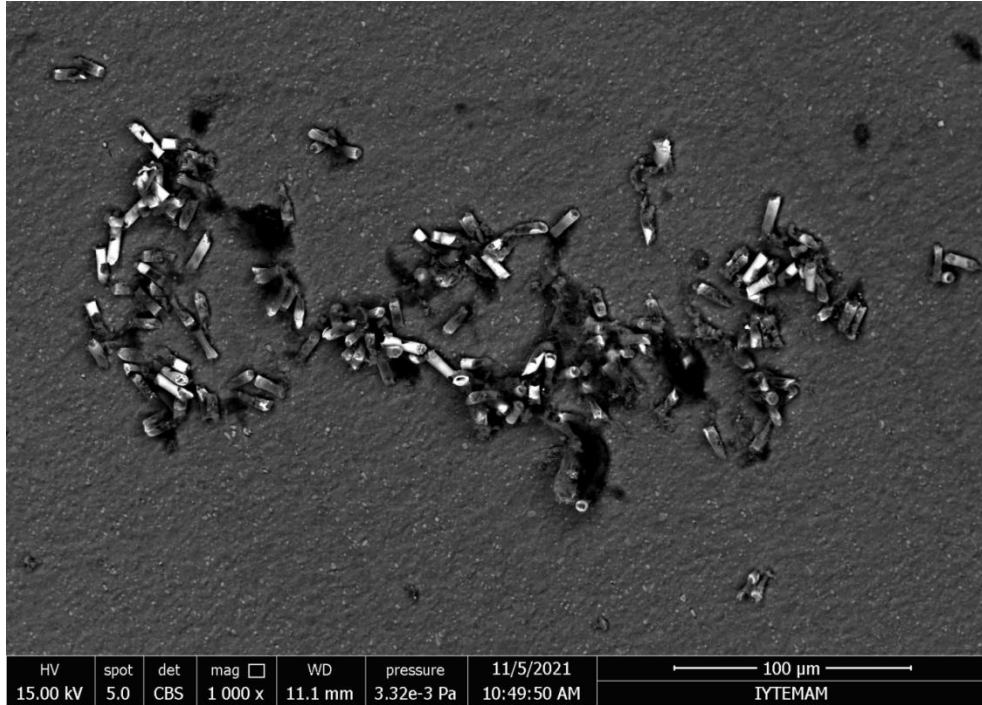


Şekil 7. Lipaz immobilize mikromotorların tribütirin giderimi üzerindeki etkisinin şematik gösterimi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PPy-COOH/Ni mikromotorlar kalıp yönelmeli elektrobiriktirme yöntemi ile sentezlenmiş ve elde edilen mikromotorların SEM fotoğrafı Resim 2’de 1000X büyütme ile gösterilmiştir. Görüntülenen fotoğraflardan mikromotorların benzer morfolojide silindirik yapıda olduğu anlaşılmaktadır. Mikroroketlerin manyetikliği bir mıknatıs yardımıyla kontrol edilmiş ve elde edilen fotoğraflar Resim 3’de gösterilmiştir. Mikromotorlar mıknatıs varlığında Ni segmentinden dolayı hareket etme kabiliyetine sahiptir ve bu mikromotorların manyetik sürücülü olarak davranmasına izin vermiştir.



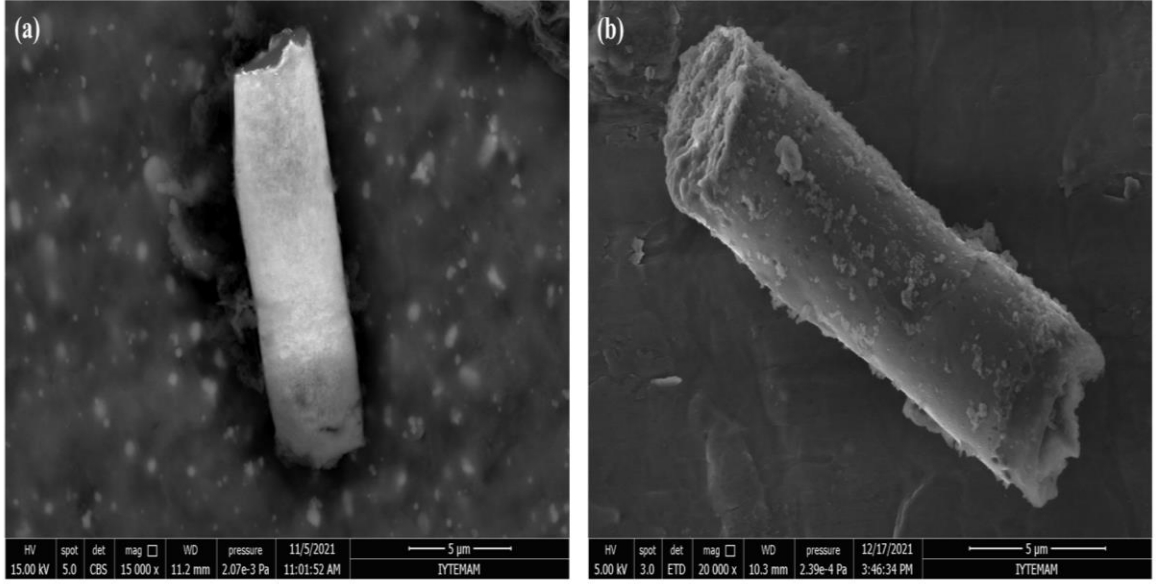
Resim 2. PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM fotoğrafı.



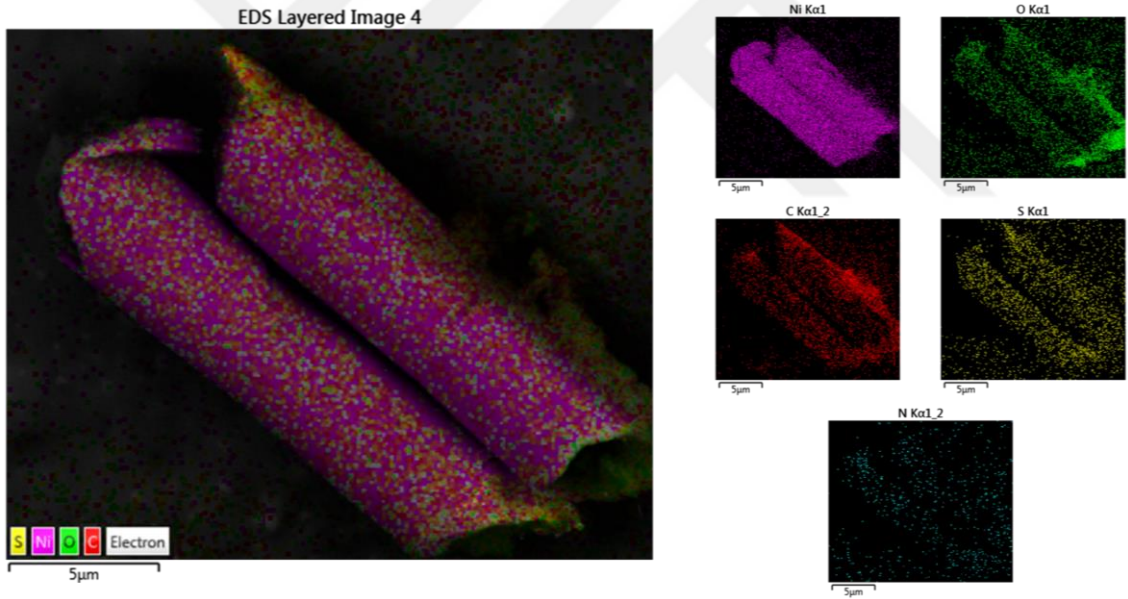
**Resim 3.** PPy-COOH/Ni manyetik mikromotorların mıknatıs ile ayrılması.

#### **4.2. Lipaz Bağlı Mikromotorların Hazırlanması**

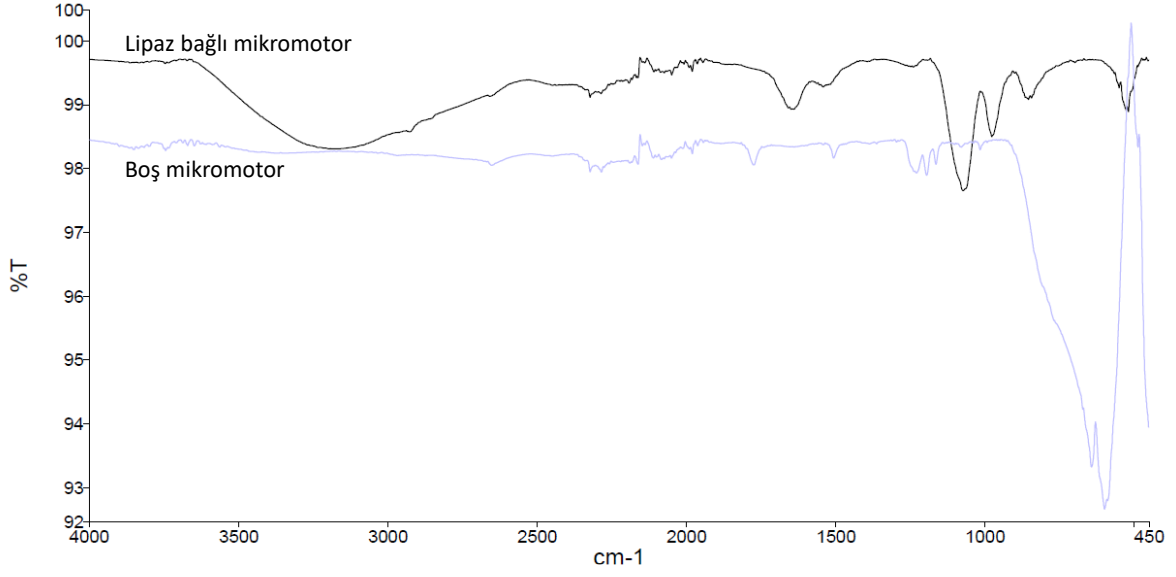
PPy-COOH/Ni mikromotorlarına lipaz enzimi EDC/NHS kimyası kullanılarak kovalent immobilizasyon yöntemi ile bağlanmış ve bağlanma miktarı 322,5 mg/g olarak bulunmuştur. Boş ve lipaz bağlı mikromotorların SEM fotoğrafları Resim 4'te sunulmuştur. Boş mikromotorların yüzeyi pürüzsüz iken, lipaz bağlı mikromotorların yüzeyi pürüzlü olarak görülmektedir. Lipaz bağlı mikromotorların SEM-EDX görüntüleri Resim 5'te sunulmuştur. Elde edilen görüntülerdeki Ni, O, C ve N atomları mikromotorların yapısından kaynaklanırken, S atomları lipaz enziminin varlığına işaret etmektedir. Boş ve lipaz bağlı mikromotorların FTIR fotoğrafları Resim 6'te verilmiştir. Boş mikromotor için elde edilen spektrumdan,  $1700\text{ cm}^{-1}$  civarında C=O gerilmeleri ve  $1510\text{ cm}^{-1}$  civarında pirol halkası kaynaklı gerilmeler görülmektedir. Lipaz immobilize mikromotor için elde edilen spektrumda,  $1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$  ve  $1240\text{ cm}^{-1}$  civarında bantlar görülmektedir ve bunlar lipaz enzimi yapısında bulunan sırasıyla amid I, amid II ve amid III bağları nedeniyle olabilir.



**Resim 4.** (a) Boş ve (b) Lipaz bağılı PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM fotoğrafı.



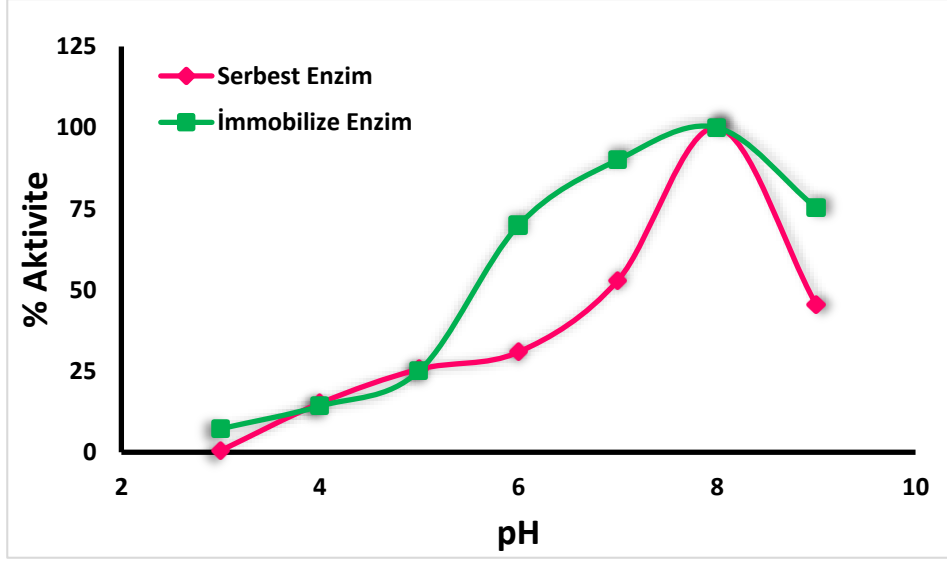
**Resim 5.** Lipaz bağılı PPy-COOH/Ni mikromotorların SEM-EDX fotoğrafı.



**Resim 6.** Boş ve lipaz bağlı PPy-COOH/Ni mikromotorların FTIR spektrumu.

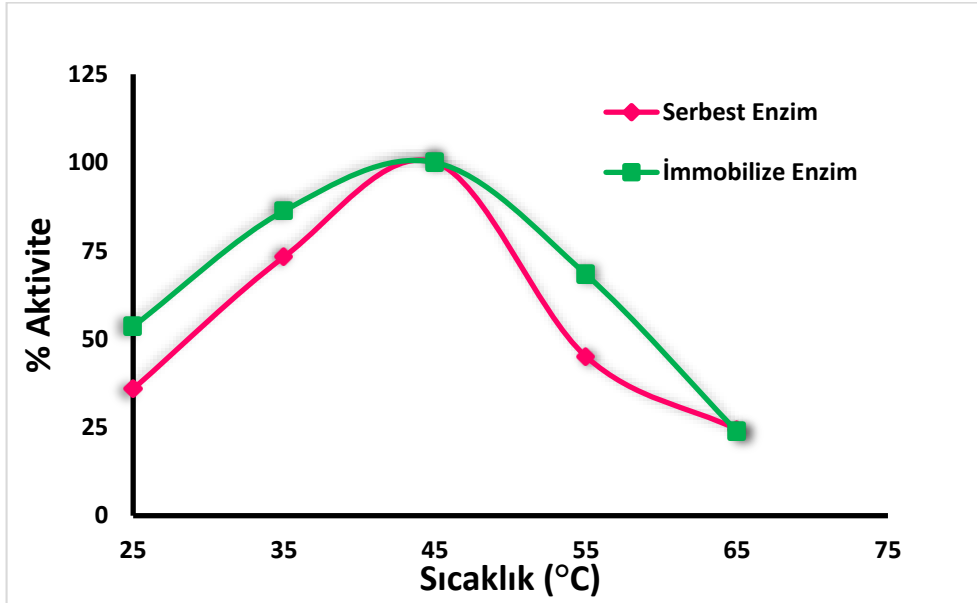
#### **4.3. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi**

Mikromotora bağlı lipazın aktivitesi pH 3.0-9.0 aralığında farklı tampon çözeltiler kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 8'de gösterilmiştir. Şekil 8 incelendiğinde asidik koşullarda serbest ve immobilize lipazın aktivitesinin oldukça düşük olduğu ve her iki formun optimum pH'ının 8.0 olduğu bulunmuştur. İlâveten immobilize lipazın, serbest lipaza göre pH 6.0, 7.0 ve 9.0'da daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 8. Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine pH'ın etkisi.

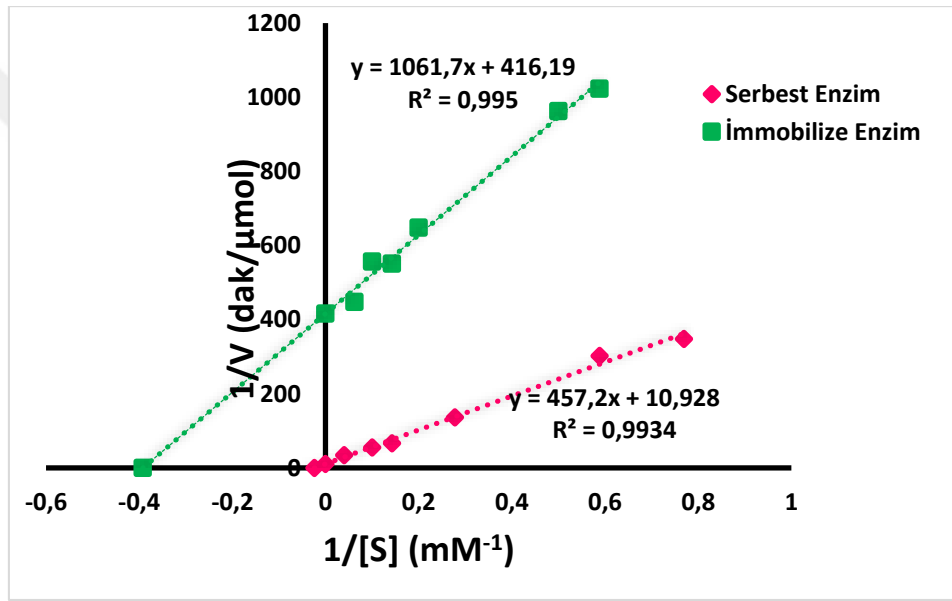
Mikromotora bağlı lipazın aktivitesi 25 °C-65 °C aralığında incelenmiş ve sıcaklığa karşı % aktivite grafiği çizilerek Şekil 9'da sunulmuştur. Hem serbest hem de immobilize lipazın sıcaklık karşısında sergilediği aktivite grafiği çan eğrisi şeklinde iken, immobilize lipazın daha geniş bir eğri grafiği sunduğu görülmektedir. Şekil 9'dan serbest ve immobilize lipazın optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 9. Serbest ve immobilize lipaz aktivitesine sıcaklığın etkisi.

#### 4.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi için 1,0-25 mM derişim aralığında p-NPL substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapılarak hız hesaplanmış ve  $1/[S]$ 'e karşı  $1/V$  grafiği çizilerek Şekil 10'da verilmiştir. Çizilen bu Lineweaver-Burk grafiklerinden serbest lipaz için  $K_m$  değeri 41.84 mM, immobilize lipaz için  $K_m$  değeri 2,55 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca serbest lipaz için  $V_{max}$  değeri 0,0915  $\mu\text{mol/dak}$  ve immobilize lipaz için  $V_{max}$  değeri 0,0024  $\mu\text{mol/dak}$  olarak hesaplanmıştır.



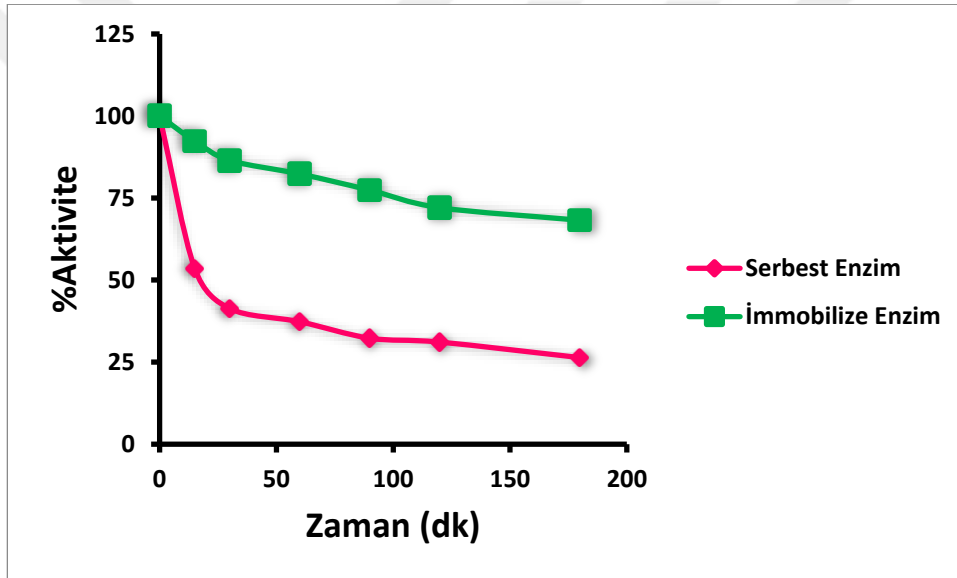
Şekil 10. Serbest ve immobilize lipaz için Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 1. Serbest ve immobilize lipaza ait kinetik parametre verileri.

	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dak}$ )
Serbest Enzim	41,84	0,0915
İmmobilize Enzim	2,55	0,0024

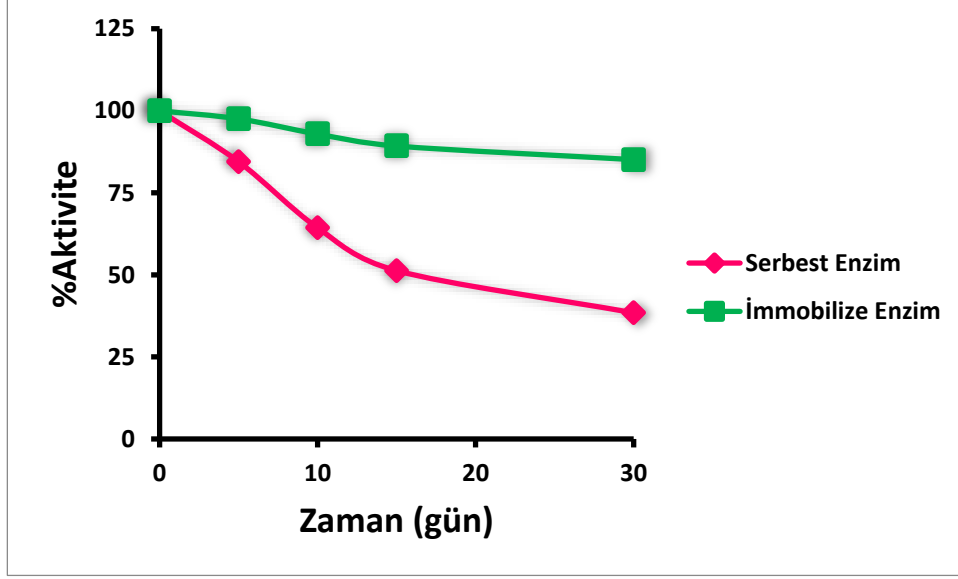
#### 4.5. İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize lipazın ısıl kararlılığı 45 °C’de 180 dakika boyunca belli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapılarak incelenmiş ve elde edilen grafik Şekil 11’de gösterilmiştir. Bu grafikten serbest lipazın zamana bağlı olarak aktivitesini kaybettiğini ve ilk 15 dakika sonunda aktivitesinin %53,5’nu koruyabildiği görülürken immobilize lipazın 15 dakika sonunda aktivitesinin %92,3’ünü koruduğu görülmektedir. İlaveten 180 dakika sonunda serbest lipaz %26,3 aktivite gösterirken immobilize lipaz %68,2 oranında aktivite göstermiştir.



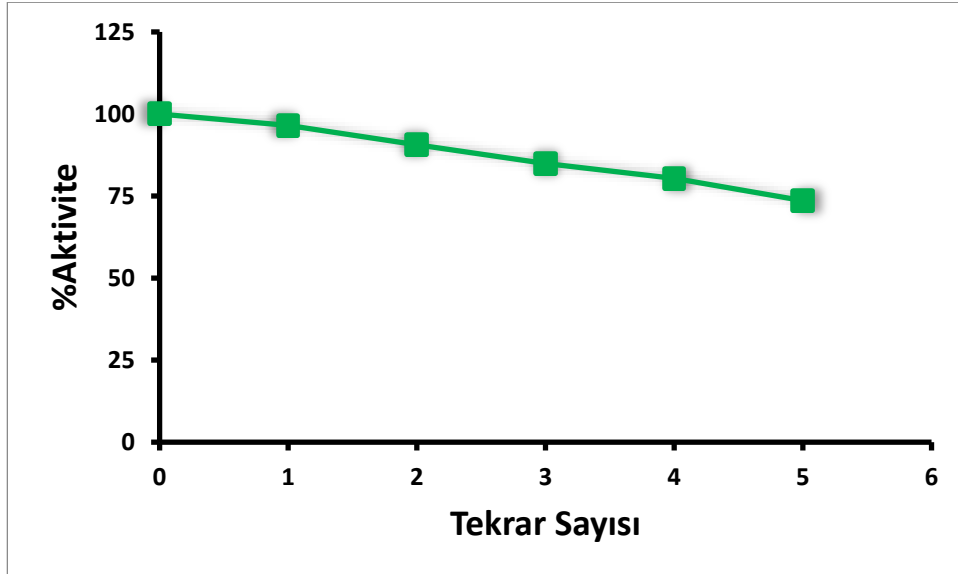
Şekil 11. Serbest ve immobilize lipazın ısıl kararlılık profili.

İmmobilize lipazın depo kararlılığı 30 gün boyunca aktivite ölçümleri ile izlenmiş ve serbest lipaz ile karşılaştırılarak Şekil 12’de sunulmuştur. 30 gün sonunda serbest lipaz başlangıç aktivitesinin %38,4’ünü korurken, immobilize lipaz başlangıç aktivitesinin %85,1’ini korumuştur.



Şekil 12. Serbest ve immobilize lipazın depo kararlılık profili.

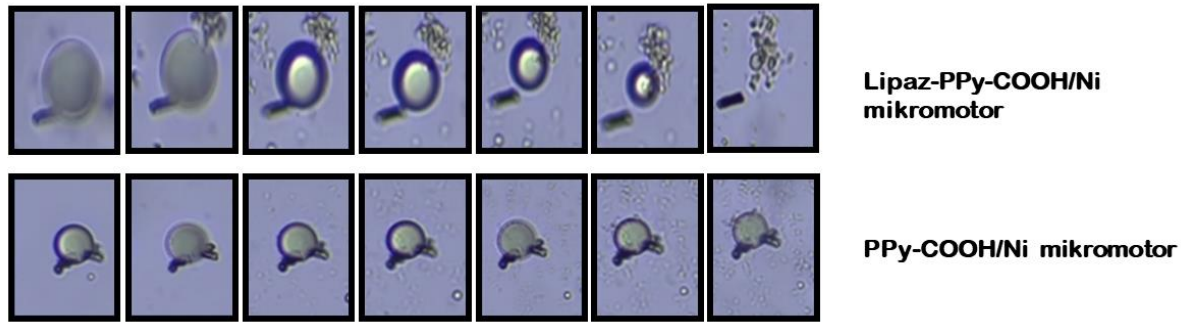
İmmobilize lipazın işlemsel kararlılığı art arda beş kez kullanılarak aktivitesinin belirlenmesi yoluyla değerlendirilmiş ve elde edilen grafik Şekil 13’de verilmiştir. Bu grafikte beş kullanım sonunda immobilize lipazın başlangıç aktivitesinin %73,5’ini koruduğu görülmektedir.



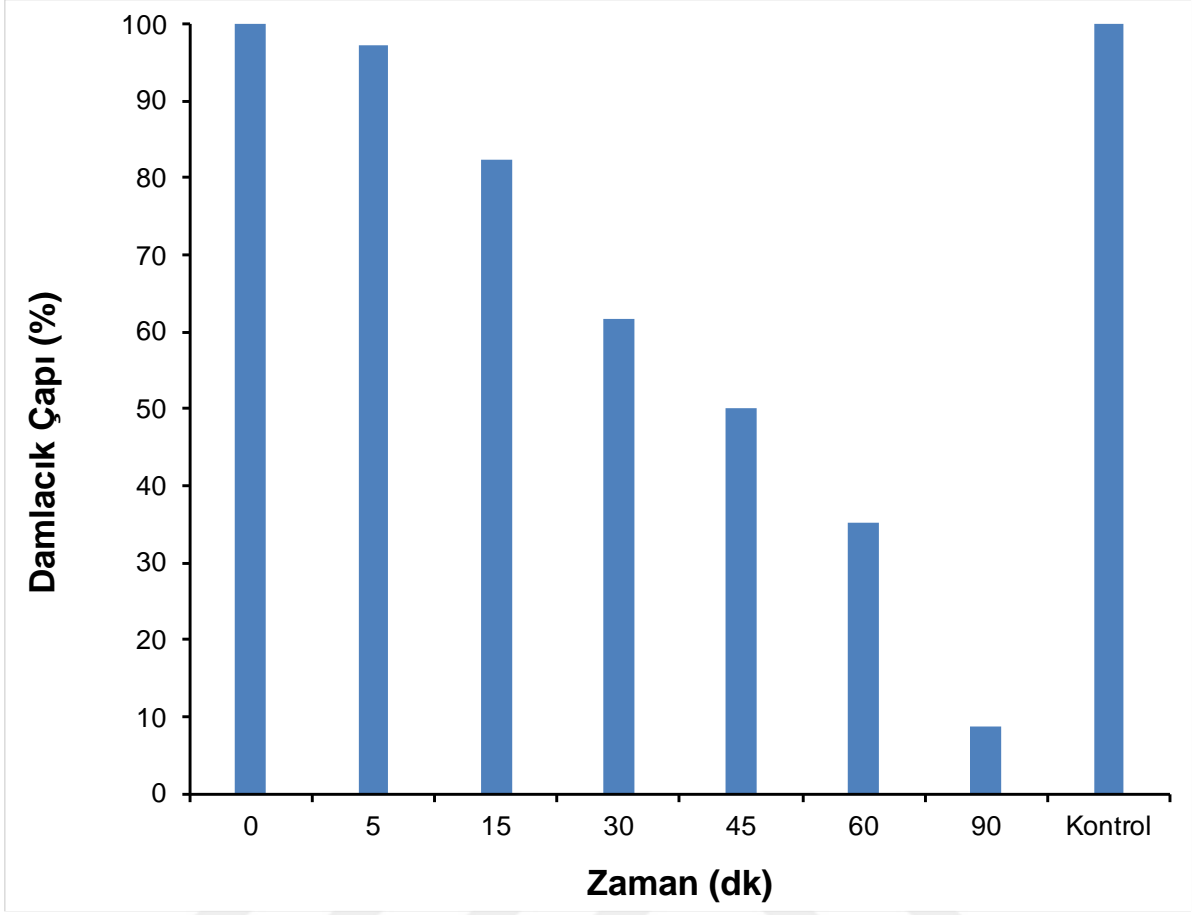
Şekil 13. Serbest ve immobilize lipazın işlemsel kararlılık profili.

#### 4.6. Lipaz Bağlı Mikromotorların Yağ Giderimde Kullanımının Araştırılması

Lipaz bağlı mikromotorların yağ giderim potansiyelini araştırmak üzere substrat olarak tribütirin kullanılmıştır. Lipaz bağlı mikromotorların tribütirin damlacığını parçalama etkinliği bir optik mikroskop altında damlacığın çapındaki azalma takip edilerek belirlenmiş ve elde edilen mikroskop görüntüleri Resim 7’de gösterilmiştir. Elde edilen görüntülerden boş motorun damlacık çapında değişiklik oluşturmadığı ve lipaz bağlı mikromotorların tribütirin damlacığını zamana bağlı olarak ortadan kaldırdığı anlaşılmıştır. Şekil 14’de zamana bağlı olarak tribütirin % damlacık çapındaki değişim sunulmuştur. Elde edilen sonuçlardan 90 dakika sonunda kontrol damlacığının çapında değişiklik olmazken, lipaz bağlı mikromotorla muamele edilen tribütirin damlacığının %90 oranında parçalandığı görülmüştür.



**Resim 7.** Lipaz bağlı mikromotorların tribütirin damlacığını parçalama etkinliği.



Şekil 14. Tribütirin % damlacık çapının zamana bağlı olarak değişimi.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. PPy-COOH/Ni Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hidrojen peroksit gibi bir bileşimin yıkımı ile meydana gelen itici gazın etkisiyle hareket eden mikro/nanomotorların aksine yakıt gerektirmeden manyetik alan etkisi ile hareket eden mikromotorlar; yakıt tüketimlerinin olmaması, yan ürün oluşturmamaları, kolay ve kontrollü manipüle edilebilmeleri nedeniyle son yıllarda son yıllarda oldukça dikkat çekmiştir. Bu tezde de Ni segmentinden dolayı manyetik özelliği olan PPy-COOH/Ni mikromotorlar kalıplı elektrobiriktirme yöntemiyle hazırlanmış SEM fotoğrafları Resim 2’de gösterilmiştir. Sentezlenen mikromotorlar; silindirik yapıda, yaklaşık 5 µm çapında ve 15 µm boyutundadır. Mikromotorların manyetik özelliği mıknatıs varlığındaki hareketleri ile gösterilmiştir ve Resim 3’de sunulmuştur. Boş ve lipaz enzimi bağlı mikromotorların FTIR spektrumları Resim 6’de verilmiştir ve bu spektrumlar mikromotora lipaz enziminin bağlandığını göstermiştir.

### 5.2. Lipaz Bağlı Mikromotorların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Enzimler çevre dostu olmaları nedeniyle diğer geleneksel yöntemlere göre çok tercih edilmekte ve son yıllarda çevresel uygulamaları giderek artmaktadır. Yüksek özgüllük ve seçicilikleri yanında düşük kararlılıkları ve tekrar kullanılabilirliklerini sağlamak üzere bir destek materyaline immobilizasyonları tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu tez çalışmasında da PPy-COOH/Ni mikromotorları hazırlanmış ve bu mikromotora lipaz enzimi EDC/NHS kimyası kullanılarak kovalent olarak bağlanmıştır. Enzimin manyetik mikromotorların yüzeyine bağlandığı Resim 4’te gösterilen SEM fotoğraflarındaki yüzey morfolojisinin değişmesinden ve SEM-EDX analizinde yapıya katılan S atomlarından anlaşılmaktadır. Ayrıca Resim 6’da sunulan FTIR fotoğraflarından mikromotora enzimin bağlandığı görülmektedir.

### 5.3. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH ve Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Enzimlerin immobilizasyon işleminden sonra pH ve sıcaklığa karşı kararlılıklarının artması istenen bir özelliktir. Bu tez çalışmasında Şekil 8’de görüldüğü üzere immobilize lipazın optimum pH’ı 8 olarak bulunmuş ve serbest lipaza göre immobilize lipazın pH 6.0-7.0 ve 9.0’da daha yüksek aktivite sergilediği gözlenmiştir. Ayrıca immobilize lipazın daha geniş bir eğri profili sunarak optimum sıcaklığı 45 °C bulunmuş ve elde edilen profil şekil 9’da sunulmuştur. Benzer sonuçlar Suo ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir çalışmada sunulmuştur. Suo ve diğerleri (2019) manyetik kitosan nanopartiküllere domuz pankreas lipazını immobilize etmişler ve triasetin substratı varlığında serbest lipazın optimum pH’ını 7.5 ve immobilize lipazın optimum pH’ını 8.0 olarak bulmuşlardır. Sıcaklığın aktiviteye etkisini incelediklerinde serbest lipaz için optimum sıcaklığı 45 °C ve immobilize lipaz için 50 °C olarak rapor etmişlerdir.

### 5.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lipaz enzimleri için Lineweaver-Burk profilleri Şekil 10’da verilmiş ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin immobilizasyon ile azaldığı görülmüştür.  $K_m$  bir enzimin substratına olan ilgisini gösterdiğinden, bu çalışmada ilgi artmışken, enzimin doymuş substrat konsantrasyonunda sergilediği maksimum hız olan  $V_{max}$  azalmıştır. Benzer sonuçlar Qi ve diğerleri (2018) yılında yapılan bir çalışmada elde edilmiştir. Söz konusu çalışmada poli(karboksibetain metakrilat) ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik kompozit partiküllere domuz pankreas lipazı immobilize edilmiş ve p-nitrofenil laurat substratı varlığında serbest lipaz için  $K_m$  2,803 mM ve immobilize lipaz için  $K_m$  1,526 olarak bulunmuştur. İlâveten serbest lipaz için  $V_{max}$  değeri  $9,196 \times 10^{-5}$  mM/dak ve immobilize lipaz için  $7,471 \times 10^{-5}$  mM/dak olarak rapor edilmiştir.

## 5.5. İmmobilize Lipazın Isıl, Depo ve İşlemsel Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilizasyonla enzimlerin ısı, depo ve işlemsel kararlılıklarının artması beklenir. Bu tezde immobilize lipazın ısı kararlılığı 45 °C’de incelenmiş ve Şekil 11’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar immobilize lipazın ısı kararlılığının serbest lipaza göre yüksek olduğunu (180 dakika sonunda %68 aktivite) göstermiştir. Qiu ve diğerleri (2020) mezo gözenekli silika-kitosan nanokompozitine lipaz enzimini kovalent olarak bağlamışlar ve 65 °C’de 150 dakika boyunca inkübe ettiklerinde immobilize lipazın başlangıç aktivitesini %60’ın üzerinde koruduğunu bulmuşlardır.

İmmobilize lipazın depo kararlılığı 30 gün boyunca izlenmiş ve Şekil 12’te gösterilmiştir. İmmobilize lipaz 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %85,1’ini korumuştur. Suo ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir çalışmada iyonik sıvılarla modifiye manyetik kitosan kompozitlere lipaz enzimi immobilize edilmiş ve grafen oksit (GO) ile kaplayarak immobilize lipazın kararlılığı artırılmıştır. Söz konusu çalışmada GO ile korunmuş immobilize lipazın depo kararlılığı 35 gün boyunca izlenmiş ve 35 günün sonunda immobilize lipazın lipaz başlangıç aktivitesinin %87,5’ini korumuştur.

Tekrar tekrar kullanılabilirlikleri immobilize enzimlerin en önemli özellikleridir. Bu tezde immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği yani işlemsel kararlılığı beş kez kullanım sonundaki aktivitesi ölçülerek hesaplanmış ve %73,5 olarak bulunmuştur. Taghizadeh ve diğerleri (2021) zeolitik imidazolat çerçevelerine (ZIF-90) porsin pankreas lipaz enzimini immobilize etmişler ve altı kez kullanım sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin %39’unu gösterdiğini bulmuşlardır.

Bu tezde hazırlanan lipaz bağlı mikromotorların ısı, depo, işlemsel kararlılığı yukarıdaki örneklerde verildiği şekilde literatürle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

## 5.6. Lipaz Bağlı Mikromotorların Yağ Gideriminde Kullanımının Araştırılması

Bu tezde, lipaz bağlı mikromotorların tribütirin trigliseridini parçalama yeteneği araştırılmıştır. Yağ damlacığının küçülmesi Resim 7’de gösterilmiş ve damlacık çapındaki azalma Şekil 14’de gösterilerek kontrol örneği ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar lipaz bağlı mikromotorların tribütirin trigliseridini 90 dakika sonunda %90 oranında parçaladığını göstermiştir. Evli ve diğerleri (2022) redükte grafen oksit/Nikel/Platin nanoteller hazırlamışlar ve lipaz immobilizasyonunda kullanmışlardır. Lipaz bağlı

nanotelleri tribütirin parçalanmasında kullanmışlar ve 65 dakika sonunda yağ damlacığının tümüyle kaybolduğunu rapor etmişlerdir. Bu tezde hazırlanan lipaz bağlı mikromotorlar da yüksek bir oranda (%90) yağ giderimi sağlamışlardır. Bu sonuçlar bize lipaz bağlı mikromotorların çevresel uygulamalarda kullanılma potansiyelinin olduğunu göstermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde çevresel uygulamalarda kullanım bulma potansiyeli bulunan lipaz bağı mikromotorlar hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle PPy-COOH/Ni mikromotorlar sentezlenerek SEM fotoğrafları çekilmiş ve manyetikliği bir mıknatıs yardımı ile kontrol edilmiştir. Lipaz enzimi bu mikromotorlara kovalent bağlanarak SEM, SEM-EDX ve FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen mikromotorlar yaklaşık 15 µm boyutunda ve 5 µm çapındadır. Mikromotorlara bağlanan lipaz miktarı 322,5 mg/g'dır. İmmobilize lipazın optimum pH'ı 8.0 ve optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonla  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri azalmıştır. İmmobilize lipazın ısıl, depo ve işlemsel kararlılıkları serbest lipaza göre oldukça yüksektir. Lipaz bağı manyetik mikromotorlar tribütirin trigliseridini gidermekte kullanılmış ve 90 dakika sonunda yağ damlacığının %90 oranında küçüldüğü görülmüştür.

Atık sulardan yağların gideriminde mekanik ve kimyasal yöntemlerin kullanımı yüksek maliyetli ve çevredeki olumsuz etkileri nedeniyle sınırlılıklar taşımaktadır. Enzim temelli biyoremediyasyon yöntemleri oldukça ilgi çekmektedir ve bu konudaki çalışmalar daha az denenmiştir. Bu tezde yağlar olarak bilinen triaçilgliserolü gliserol ve yağ asitlerine hidrolize etme yeteneği olan lipaz enzimi, elektrokimyasal biriktirme ile sentezlenen PPy-COOH/Ni mikromotorlarına bağlanmış ve çalışma koşulları araştırılmıştır. İlaven bir triaçilgliserol olan tribütirinin hidrolize edilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerçek bir atık su örneğinde yağların parçalanmasının gerçekleştirilmesi ve bu parçalanmanın GC-MS sistemleri ile de gösterilmesi yapılması planlanan çalışmalardandır.

Yapılan bu tezle atık sularda yağların parçalanmasında kullanılan kimyasal ve mekanik tekniklere alternatif olarak lipaz bağı mikromotorların kullanılabilme potansiyelinin olduğu görülmekle birlikte, bu araştırmanın saha denemeleri daha geniş çaplı bir çalışma (doktora tezi) olarak gelecekte yapılabilir. "Su Kirleticisi Olarak Yağların Parçalanmasında Lipaz Bağı Mikromotorların Kullanımının Araştırılması" başlıklı bu tezin Çevre Sağlığı alanındaki çalışmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adetunji, A. I., Olaniran, A. O. (2018). Immobilization and characterization of lipase from an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB isolated from lipid-rich wastewater. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(10), 898-905. doi.org/10.1080/10826068.2018.1514517
- Ahmad, R., Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1. doi: 10.4172/2161-1009.1000178
- Bacha, A. B., Abid, I., Nehdi, I., Horchani, H. (2019). Hydrolysis of oils in the Wadi Hanifah River in Saudi Arabia by free and immobilized *Staphylococcus aureus* ALA1 lipase. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 38(3), e13000. doi.org/10.1002/ep.13000
- Bacha, A., Alonazi, M., Alanazi, H., Alharbi, M. G., Jallouli, R., Karray, A. (2022). Biochemical Study of *Bacillus stearothermophilus* Immobilized Lipase for Oily Wastewater Treatment. *Processes*, 10(11), 2220. doi.org/10.3390/pr10112220
- Bavandi, H., Habibi, Z., Yousefi, M. (2020). Porcine pancreas lipase as a green catalyst for synthesis of bis-4-hydroxy coumarins. *Bioorganic Chemistry*, 103, 104139. doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104139
- Brena, B. M., Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of enzymes. In *Immobilization of enzymes and cells* (pp. 15-30). Humana press
- Brito, M. J. P., Bauer, L. C., Santos, M. P. F., Santos, L. S., Bonomo, R. C. F., Fontan, R. D. C. I., Veloso, C. M. (2020). Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials*, 309, 110576. doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110576
- Cheng, D., Liu, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., ... Liu, Y. (2020). A review on application of enzymatic bioprocesses in animal wastewater and manure treatment. *Bioresource technology*, 313, 123683. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123683

- Chang, S. H. (2022). Micro/nanomotors for metal ion detection and removal from water: A review. *Materials Today Sustainability*, 100196. doi.org/10.1016/j.mtsust.2022.100196
- Costa-Silva, T. A., Carvalho, A. K. F., Souza, C. R. F., De Castro, H. F., Said, S., Oliveira, W. P. D. (2017). Enzymatic transesterification of coconut oil using chitosan-immobilized lipase produced by fluidized-bed system. *Energy & Fuels*, 31(11), 12209-12216. doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02033
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization*. Springer International Publishing Switzerland 2016.
- Evli, S., Öndeş, B., Uygun, M., Uygun, D. A. (2022). Lipase loaded motion-based multisegmental nanowires for pollutant tributyrin degradation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10. Doi.org/10.1007/s13762-022-04564-3
- Feng, S., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Cheng, D., ... Liu, Y. (2021). Roles and applications of enzymes for resistant pollutants removal in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.*, 335, 125278. doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125278
- Gao, J., Kong, W., Zhou, L., He, Y., Ma, L., Wang, Y., ... Jiang, Y. (2017). Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization. *Chemical Engineering Journal*, 309, 70-79. doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.021
- Guo, J., Gallegos, J. J., Tom, A. R., Fan, D. (2018). Electric-field-guided precision manipulation of catalytic nanomotors for cargo delivery and powering nanoelectromechanical devices. *ACS nano*, 12(2), 1179-1187. doi.org/10.1021/acsnano.7b06824
- <https://swissmodel.expasy.org>
- Hu, Y., Liu, W., Sun, Y. (2022). Self-Propelled Micro-/Nanomotors as “On-the-Move” Platforms: Cleaners, Sensors, and Reactors. *Advanced Functional Materials*, 32(10), 2109181. doi.org/10.1002/adfm.202109181

- Ismail, A. R., Baek, K. H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1624-1639. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021
- 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.org/10.1039/d0nj05175f
- 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.org/10.1002/ep.12375
- Karthik, V., Senthil Kumar, P., Vo, D. V. 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. doi.org/10.1007/s10311-020-01158-8
- Liu, D. M., Chen, J., Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342. doi:10.1016/j.trac.2018.03.011
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196. doi.org/10.1021/acsomega.2c07560
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., de Castro, H. F. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 119-134. doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004
- Miao, C., Yang, L., Wang, Z., Luo, W., Li, H., Lv, P., Yuan, Z. (2018). Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Fuel*, 224, 774-782. doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.149

- Mulinari, J., Ambrosi, A., Feng, Y., He, Z., Huang, X., Li, Q., ... Oliveira, J. V. (2023). Polydopamine-assisted one-step immobilization of lipase on  $\alpha$ -alumina membrane for fouling control in the treatment of oily wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 141516. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141516>
- Nargotra, P., Sharma, V., Lee, Y. C., Tsai, Y. H., Liu, Y. C., Shieh, C. J., ... Kuo, C. H. (2023). Microbial Lignocellulolytic Enzymes for the Effective Valorization of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Catalysts*, 13(1), 83. [doi.org/10.3390/catal13010083](https://doi.org/10.3390/catal13010083).
- Nelson D. L. ve Cox M. M. (2013). *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*. Ankara: Palme Yayınları.
- Nimkande, V. D., Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102591. [doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591)
- Qi, H., Du, Y., Hu, G., Zhang, L. (2018). Poly (carboxybetaine methacrylate)-functionalized magnetic composite particles: A biofriendly support for lipase immobilization. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2660-2666. [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.150](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.150)
- Qiu, X., Xiang, X., Liu, T., Huang, H., Hu, Y. (2020). Fabrication of an organic–inorganic nanocomposite carrier for enzyme immobilization based on metal–organic coordination. *Process Biochemistry*, 95, 47-54. [doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.007](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.007)
- Sanghamitra, P., Mazumder, D., Mukherjee, S. (2021). Treatment of wastewater containing oil and grease by biological method-a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 56(4), 394-412. [doi.org/10.1080/10934529.2021.1884468](https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1884468)
- Shang, C. Y., Li, W. X., Zhang, R. F. (2014). Immobilized *Candida antarctica* lipase B on ZnO nanowires/macroporous silica composites for catalyzing chiral resolution of (R, S)-2-octanol. *Enzyme and microbial technology*, 61, 28-34. [doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.014](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.014)
- Shang, C. Y., Li, W. X., Jiang, F., Zhang, R. F. (2015). Improved enzymatic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on ZnO nanowires/macroporous SiO<sub>2</sub> microwave absorbing supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113, 9-1. [doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.016](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.016)

- Shuai, W., Das, R. K., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M. (2017). A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnology and applied biochemistry*, 64(4), 496-508. ; doi: 10.1002/bab.1515
- Sigurgisladdottir, S., Kanarosdottir, M., Jonsson, A., Kristjansson, J.K., Mathiasson, E. (1993) Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnol. Lett.* 15, 361-366.
- Suo, H., Gao, Z., Xu, L., Xu, C., Yu, D., Xiang, X., ... Hu, Y. (2019). Synthesis of functional ionic liquid modified magnetic chitosan nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 356-364. doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.041
- Suo, H., Xu, L., Xu, C., Qiu, X., Chen, H., Huang, H., Hu, Y. (2019). Graphene oxide nanosheets shielding of lipase immobilized on magnetic composites for the improvement of enzyme stability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(4), 4486-4494. doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06542
- Taghizadeh, T., Ameri, A., Talebian-Kiakalaieh, A., Mojtavavi, S., Ameri, A., Forootanfar, H., ... Faramarzi, M. A. (2021). Lipase@ zeolitic imidazolate framework ZIF-90: A highly stable and recyclable biocatalyst for the synthesis of fruity banana flavour. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1301-1311. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.011
- Uygun, M., Jurado-Sánchez, B., Uygun, D. A., Singh, V. V., Zhang, L., Wang, J. (2017). Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells. *Nanoscale*, 9(46), 18423-18429. doi:10.1039/c7nr07396h
- Wang, L., Hortelao, A. C., Huang, X., Sánchez, S. (2019). Lipase-powered mesoporous silica nanomotors for triglyceride degradation. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(24), 7992-7996. doi.org/10.1002/ange.201900697
- Wang, L., Marciello, M., Estévez-Gay, M., Soto Rodriguez, P. E., Luengo Morato, Y., Iglesias-Fernández, J., ... Sanchez, S. (2020). Enzyme conformation influences the performance of lipase-powered nanomotors. *Angewandte Chemie*, 132(47), 21266-21273. doi.org/10.1002/anie.202008339

- Wu, F., Yang, D., Huang, X., Yi, L., Liu, M., Pan, L. (2019). Ultrafast bubble-propelled and magnetic-field-navigated porous catalytic Janus micromotor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(7), 4154-4159. doi.org/10.1166/jnn.2019.16337
- Xing, Y., Du, X., Xu, T., Zhang, X. (2020). Janus dendritic silica/carbon@ Pt nanomotors with multiengines for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, near-infrared light and lipase powered propulsion. *Soft Matter*, 16(41), 9553-9558. doi.org/10.1039/D0SM01355B
- Xing, Y., Tang, S., Du, X., Xu, T., Zhang, X. (2021). Near-infrared light-driven yolk@ shell carbon@ silica nanomotors for fuel-free triglyceride degradation. *Nano Research*, 14, 654. doi.org/10.1007/s12274-020-3092-2
- Xu, T., Soto, F., Gao, W., Garcia-Gradilla, V., Li, J., Zhang, X., Wang, J. (2014). Ultrasound-modulated bubble propulsion of chemically powered microengines. *Journal of the American Chemical Society*, 136(24), 8552-8555. doi.org/10.1021/ja504150e
- Yao, L. W., Khan, F. S. A., Mubarak, N. M., Karri, R. R., Khalid, M., Walvekar, R., ... Dehghani, M. H. (2022). Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. *Journal of Molecular Liquids*, 354, 118849. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118849
- Ye, H., Wang, Y., Xu, D., Liu, X., Liu, S., Ma, X. (2021). Design and fabrication of micro/nano-motors for environmental and sensing applications. *Applied Materials Today*, 23, 101007. doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101007
- Ying, Y., Pumera, M. (2019). Micro/nanomotors for water purification. *Chemistry–A European Journal*, 25(1), 106-121. doi.org/10.1002/chem.201804189.
- Yuce-Dursun, B., Cigil, A. B., Dongez, D., Kahraman, M. V., Ogan, A., Demir, S. (2016). Preparation and characterization of sol–gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 18-25. doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.007
- Zarei, M., Zarei, M. (2018). Self-propelled micro/nanomotors for sensing and environmental remediation. *Small*, 14(30), 1800912. doi.org/10.1002/sml.201800912.

- Zhou, H., Wu, B., Dekanovsky, L., Wei, S., Khezri, B., Hartman, T., ... Sofer, Z. (2021). Integration of BiOI nanosheets into bubble-propelled micromotors for efficient water purification. *FlatChem*, 30, 100294. doi.org/10.1006/j.flatc.2021.100294
- Zhou, Z. W., Cai, C. X., Xing, X., Li, J., Hu, Z. E., Xie, Z. B., ... Yu, X. Q. (2021). Magnetic COFs as satisfactory support for lipase immobilization and recovery to effectively achieve the production of biodiesel by maintenance of enzyme activity. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 1-12. doi.org/10.1186/s13068-021-02001-0

