



**BENTONİTE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LAKKAZ ENZİMİ İLE TEKSTİL
BOYAR MADDELERİNİN GİDERİMİ**

Ömer TOKUCU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ömer TOKUCU

04/11/2022

BENTONİTE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LAKKAZ ENZİMİ İLE TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN GİDERİMİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ömer TOKUCU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2022

ÖZET

Tekstil endüstrileri, yaş dokuma prosesleri için çok büyük miktarlarda su ve kimyasal tüketmektedirler. Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik formdaki bileşikler, alıcı sulara renkli atık sular olarak verilerek hem fotosentetik aktiviteyi azaltır, hem de ortamın pH dengesini bozarak biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyacını (BOD ve COD) artırır. Bu da sulara daha yoğun bir renk oluşmasına neden olur. Ayrıca boyar maddelerin bazı sucul organizmalarda birikmesi zehirli ve kanserojen ürünlerin meydana gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle boyar madde içeren tekstil endüstrisi atık sularının renk giderim prosesleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır. Ancak kompleks kimyasal yapılarına ve sentetik kökenlerine bağlı olarak, boyar maddelerin parçalanması oldukça zor bir işlemdir. Birçok fiziksel (filtrasyon, iyon değişimi, adsorpsiyon vb.), kimyasal (oksidasyon, kimyasal çöktürme vb.) ve biyolojik (aerobik ve anaerobik arıtım vb.) arıtma yöntemi, azo boyar maddelerin giderilerek suyun renksizleştirmesini sağlayabilmek için uygulanmaya çalışılmıştır. Fiziksel ve kimyasal arıtma yöntemlerinin yüksek maliyet gerektirmelerinin yanı sıra, yeni çevre problemleri oluşturmaları, kısa ömürlü olmaları ve her boyar madde çeşidine etki etmemeleri sebebiyle yeni yöntemler aranmaya başlanılmıştır. Bu da biyolojik arıtma yöntemlerini ucuz ve etkili olmalarından dolayı ön plana çıkarmaktadır. Bu çalışmada, lakkaz enzimi, destek malzeme olarak saf bentonite pH 5 ve 25°C’de immobilize edilmiştir. Immobilizasyon verimine; immobilizasyon süresi (4-24 saat) ve enzim derişiminin (1-3 mg/ml) etkisi incelenmiştir. En yüksek immobilizasyon verimi 4 saat immobilizasyon süresinde ve 2 mg/ml enzim derişiminde elde edilmiştir. Diğer yandan serbest enzim aktivitesi üzerinde farklı pH değerlerinin (pH 4 – pH 8) etkisi incelenmiş ve en yüksek aktivite pH 6’da elde edilmiştir. Saf bentonite immobilize edilmiş enzim ve serbest enzim Remazol Red RR boyar maddesinin giderim işlemlerinde kullanılmıştır. Immobilize lakkaz enzimi ile gerçekleştirilen boyar madde giderim çalışmalarında, en yüksek giderim 20 mg/L boyar madde derişiminde %52 olarak elde edilmiştir. Immobilize enzim ile boyar madde giderimine immobilize enzim miktarının ve boyar madde derişiminin etkisi incelenmiştir. Immobilize enzimin boyar madde gideriminde tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve 5 tekrar sonunda enzimin aktivitesinin %32’sini koruduğu gözlemlenmiştir. Son olarak, bentonit CTAB ve GPTMS ile modifiye edilmiş ve modifikasyonun boyar madde giderimindeki etkisi incelenmiştir. Boyar madde derişimi 20 mg/L, pH 5 ve 30°C ortamında GPTMS-lakkaz ile %14,39 ve CTAB-lakkaz ile %95,99 boyar madde giderimi elde edilmiştir.

Bilim Kodu : 91203

Anahtar Kelimeler : Immobilizasyon, immobilize enzim, boyar madde

Sayfa Adedi : 63

Danışman : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU

İkinci Danışman : Doç. Dr. Müjgan OKUR

REMOVAL OF TEXTILE COLOURANTS WITH BENTONITE IMMOBILIZED

LACCASE ENZYME

(M. Sc. Thesis)

Ömer TOKUCU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

November 2022

ABSTRACT

Textile industries consume huge amounts of water and chemicals for wet weaving processes. These organic and inorganic compounds, which are used both in dyeing and in other processes, are given to the receiving waters as colored wastewater, reducing the photosynthetic activity and increasing the biological and chemical oxygen demand (BOD and COD) by disrupting the pH balance of the environment. This results in a more intense color in the waters. In addition, the accumulation of dyestuffs in some aquatic organisms brings the risk of toxic and carcinogenic products. In this context, the color removal processes of textile industry wastewater containing dyestuffs gain ecological importance. However, depending on their complex chemical structures and synthetic origins, the degradation of dyestuffs is a very difficult process. Many physical (filtration, ion exchange, adsorption, etc.), chemical (oxidation, chemical precipitation, etc.) and biological (aerobic and anaerobic treatment, etc.) treatment methods have been tried to be applied to ensure the decolorization of water by removing azocolourants. In addition to the high cost of physical and chemical treatment methods, new methods have been sought because they create new environmental problems, they are short-lived and they do not affect every paint type. This brings biological treatment methods to the fore because they are cheap and effective. In this study, laccase enzyme was immobilized to bentonite clay as a support material at pH 5, 25°C. The effects of immobilization time (4-24 hours) and enzyme concentration (1-3 mg/ml) on immobilization efficiency were investigated. The highest immobilization efficiency was obtained at the immobilization time of 4 hours and at the enzyme concentration of 2 mg/ml. In addition, the effect of different pH values (pH 4 – pH 8) on free enzyme activity was studied and it was observed that the highest activity value was obtained at pH 6. Pure bentonite immobilized enzyme and free enzyme were used in the removal of Remazol Red RR dyestuff. In the dyestuff removal studies performed with immobilized laccase enzyme, the highest removal was obtained as 52% at 20 mg/L dyestuff concentration. The effect of immobilized enzyme amount and dyestuff concentration on dyestuff removal with immobilized enzyme was investigated. The reusability of the immobilized enzyme in dye removal was examined and it was observed that the enzyme retained 32% of its activity after 5 repetitions. Finally, bentonite was modified with CTAB and GPTMS, and the effect of the modification on dye removal was determined. At 20 mg/L, pH 5, 30°C environment, GPTMS-laccase and CTAB-laccase reached the highest removal rate. The percentage of removal was 14.39% for GPTMS-laccase and 95.99% for CTAB-laccase.

Science Code : 91203

Key Words : Immobilisation, immobilized enzyme, dye

Page Number : 63

Supervisor : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Müjgan OKUR

TEŞEKKÜR

Bu çalışma boyunca bana yol gösteren, her türlü yardımı ve katkılarını sunan değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU ile Doç. Dr. Müjgan OKUR'a, destek malzemenin temini konusunda yardımcı olan Çanbensan Çankırı Bentonit Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne, çalışmalarım sırasında yol gösteren Rüya HÜRMÜZLÜ'ye, desteklerini esirgemeyen iş arkadaşlarım Farah Diba OTURAKÇI, Hazal Mine SARIASLAN SENYEN ve Mustafa ÖZÇAĞLI ile eşim Ayşe GÖKBAYRAK TOKUCU'ya, eğitim hayatıma devam etmem için beni sürekli motive eden annem Zeynep TOKUCU ve babam Cafer TOKUCU'ya ve tüm yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
HARİTALARIN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEKSTİL ATIK SULARININ ARITIMI.....	3
2.1. Atık Su Arıtım Yöntemleri.....	4
2.1.1. Atık su arıtımında kullanılan biyolojik yöntemler	6
2.2. Enzimler	6
2.2.1. Enzim kinetiği	9
2.2.2. Spesifik aktivite.....	10
2.2.3. Lakkaz Enzimi.....	11
2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri ve Lakkaz Enzimi İmmobilizasyonu	13
2.3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	14
2.3.2. İmmobilize enzimlerin özellikleri	18
2.3.3. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemeler	19
2.3.4. Bentonit	20
2.3.5. Lakkaz enzimi immobilizasyonu	21
2.4. Lakkaz Enziminin Boyar Madde Giderimi	22
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	25
4. DENEYSEL ÇALIŞMA	31
4.1. Enzim Aktivite Tayini.....	31
4.1.1. Serbest lakkaz enziminin aktivite tayini	31
4.1.2. İmmobilize lakkaz enzim aktivitesi	32

	Sayfa
4.2. Protein Tayini.....	33
4.2.1. Serbest lakkaz enziminin protein tayini	34
4.2.2. İmmobilize lakkaz enziminin protein tayini.....	35
4.3. Yükleme ve İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması	35
4.4. pH Kararlılığı	36
4.5. Boyar Madde Giderimi	36
4.5.1. Boyar madde giderimine medyatör etkisi	37
4.5.2. Enzimin tekrar kullanılabilirliği	38
4.5.3. Bentonit modifikasyonu	38
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
5.1. Destek Malzeme Miktarı.....	39
5.2. İmmobilizasyon Süresi.....	40
5.3. Enzim Derişimi	41
5.4. pH Kararlılığı	42
5.5. Boyar madde giderimi.....	43
5.5.1. Boyar madde giderimine immobilizasyon etkisi.....	43
5.5.2. Boyar madde giderimine konsantrasyonun etkisi	43
5.5.3. Boyar madde giderimine medyatör etkisi	44
5.5.4. Enzimin boyar madde gideriminde tekrar kullanılabilirliği	45
5.5.5. Bentonit modifikasyonunun boyar madde giderimine etkisi	46
5.6. Karakterizasyon çalışmaları	48
5.6.1. FTIR analizi.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	59
EK-1. Dünyadaki bentonit üretim miktarları (2016-2020)	60
EK-2. Deneysel çalışmalar için kullanılan Çankırı bentonitinin özellikleri	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tekstil atık sularının parçalanması ve renk giderimi için kullanılan fizikokimyasal yöntemlerin avantaj ve dezavantajları	5
Çizelge 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması	7
Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunun çeşitli avantaj ve dezavantajları	14
Çizelge 2.4. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	18
Çizelge 2.5. Çeşitli lakkaz immobilizasyon yöntemlerinin karakteristikleri	22
Çizelge 4.1. Kullanılan bentonitin kimyasal özellikleri.....	31
Çizelge 4.2. Kalibrasyon grafiği için hazırlanan çözelti miktarları	34
Çizelge 4.3. pH kararlılığı için hazırlanan çözeltiler	36
Çizelge 5.1. Farklı pH'larda enzim aktivite değerleri.....	42

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Beş büyük sanayide üretilen boyar madde atık su miktarı	3
Şekil 2.2. Tekstil fabrikasında su tüketim oranları	4
Şekil 2.3. Enzimle katalizlenmiş ve katalizlenmemiş reaksiyonların aktivasyon enerjisi grafiği	8
Şekil 2.4. Enzim katalizinin anahtar kilit modelinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.5. Lineweaver-Burk grafiği	10
Şekil 2.6. Lakkaz enziminin aktif bölge yapısı ve katalitik döngüsü	12
Şekil 2.7. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	14
Şekil 2.8. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemeler.....	20
Şekil 2.9. Bazı azo boyar maddelerin yapısı.....	23
Şekil 2.10. Remazol Red RR boyar maddesinin moleküler yapısı	23
Şekil 2.11. Azo boyar maddelerin parçalanması için çeşitli yöntemlerin gösterilmesi..	24
Şekil 2.12. Lakkazın önerilen azo boyar madde parçalama mekanizması	24
Şekil 4.1. Bradford tayini için hazırlanan BSA kalibrasyon grafiği	34
Şekil 4.2. Remazol Red (RR) boyar maddesinin kalibrasyon grafiği.....	37
Şekil 5.1. Destek malzeme miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi.....	39
Şekil 5.2. İmmobilizasyon süresinin yükleme ve adsorplanan lakkaz verimine etkisi...	40
Şekil 5.3. Enzim derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi	41
Şekil 5.4. 20 mg/L boyar madde çözeltisinin farklı bentonit derişimlerindeki giderim miktarı.....	43
Şekil 5.5. Farklı konsantrasyonlarda boyar madde giderim yüzdesi	44
Şekil 5.6. Farklı medyatörlerin boyar madde giderim yüzdesi.....	45
Şekil 5.7. Enzimin tekrar kullanımının boyar madde giderimine etkisi	45
Şekil 5.8. Enzimin tekrar kullanımının aktiviteye etkisi.....	46

Sayfa

Şekil 5.9. CTAB ve GPTMS yapıları	46
Şekil 5.10. Modifiye edilmiş bentonitin lakkaz yükleme verimine etkisi	47
Şekil 5.11. Modifikasyonun boyar madde giderim yüzdesi	47
Şekil 5.12. Bentonit, CTAB-bentonit ve GPTMS-bentonit FTIR spektrumu	48
Şekil 5.13: Saf bentonit, GPTMS-Bentonit, CTAB Bentonit ve bu killerin immobilizasyonuna ait FTIR spektrumu	49



HARİTALARIN LİSTESİ

Harita	Sayfa
Harita 2.1. Türkiye’deki kil bentonit yatakları	21



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

k_m	Michaelis-Menten hız sabiti
U	Enzim ünitesi
v_m	Maksimum hız

Kısaltmalar

Açıklamalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ACS	Kısaltmalar alfabetik sırayla verilmelidir
BOD	Biyolojik oksijen ihtiyacı
BSA	Sığır serum albümini
COD	Kimyasal oksijen ihtiyacı
CTAB	Setil trimetilamonyum bromid
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPTMS	(3-Glisidiloksipropil) trimetoksisilan
HBT	1-Hidroksibenzotriazol
MTA	Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
TGA	Termogravimetrik Analiz
VLA	Violurik Asit
XRD	X-Işını Difraktometresi
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Ülkelerin gelişmesinde ve büyümesinde sanayiler önemli bir rol oynamaktadır. Bunlar, aynı zamanda çevreleri için çok büyük ve tehlikeli bir kirletici kaynağıdır. Boyar maddeler ve bunların karmaşık türevleri, bu kirleticilerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve atık su arıtma ve yönetiminde en büyük zorluk haline gelmiştir. Dünya çapında çeşitli tekstil, baskı, deri ve kağıt sanayiinde yaklaşık on bin farklı renk pigmenti kullanılmaktadır ve bunların %10-20'si unutulmakta ve endüstriyel atıklar yoluyla akan suya deşarj edilmektedir (Mehandia, Ahmad, Sharma, ve Arya, 2022).

Saf ve temiz suyun elde edilmesi insan için en yüksek değerdir. Dünya nüfusu arttıkça su tüketimi de artmaktadır. Su üzerinde çalışma yapan araştırmacılara göre, 2025 yılında dünya nüfusunun yarısı su kaynaklı hastalık veya su kriziyle karşı karşıya kalacaktır. Bu su krizi, flora ve fauna yaşamı da dahil olmak üzere biyolojik çeşitlilik üzerinde de büyük bir etkiye sahip olacaktır (Pandey, 2017). Bu sebeple, boyar madde bazlı atık suların arıtılması, günümüzde önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Mehandia, Ahmad, Sharma, ve Arya, 2022).

İndirgeyici substratlar için geniş substrat özgüllükleri sebebiyle, lakkaz enzimi; kağıt endüstrisinde kağıt hamuru ağartma, tekstil boyar maddelerinin renk giderimi, biyoyakıt hücreleri, biyosensörler, yeşil kimya, biyoremediasyon ve çevresel kirleticilerin detoksifikasyonu gibi endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere ön plana çıkmaktadır ve fazlaca araştırma konusudur (Daassi, Rodriguez-Couto, Nasri, ve Mechichi, 2014).

Yukarıda bahsedilen uygulamalar arasında, tekstil atıklarının arıtımında biyokatalizör olarak lakkazların kullanımı umut verici bir yaklaşım gibi görünmektedir. Lakkazın birçok sentetik boyar maddeyi parçalayarak, boyar madde rengini giderdiği rapor edilmektedir. Bununla birlikte, bu uygulamalarda kullanılan çözünür lakkaz, kararlılık kaybı ve yeniden kullanılamama gibi bazı dezavantajlar göstererek, lakkaz uygulamasını pahalı hale getirmektedir. Böylece lakkazların üretim maliyetini düşürmek ve uygulamalarını daha ekonomik hale getirmek için farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu tür yaklaşımlar arasında lakkaz immobilizasyonu, yeniden kullanımına izin vermekte ve enzim kararlılığını artırmaktadır (Daassi, Rodriguez-Couto, Nasri, ve Mechichi, 2014). Bu çalışmada, serbest

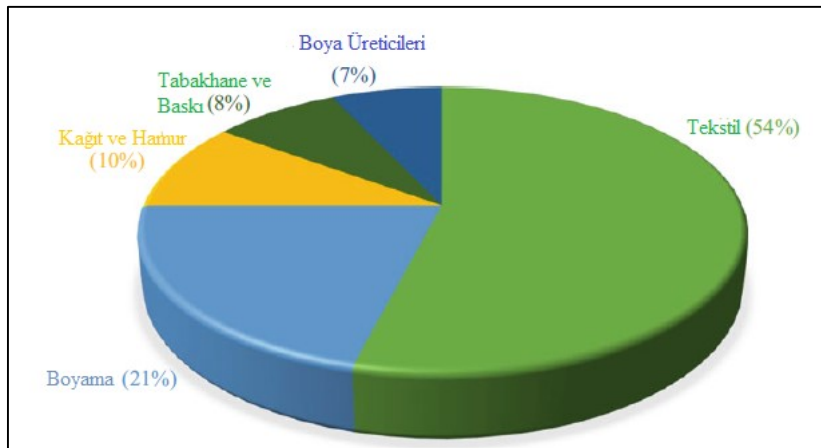
lakkaz enzimi destek malzeme olarak bentonit kiline immobilize edilmiştir. Böylelikle, lakkaz enziminin kararlılığının artırılması ve boyar madde gideriminden yüksek verim alınması hedeflenmiştir. İmmobilizasyon süresi optimize edilmiş, farklı enzim konsantrasyonlarının ve destek malzeme miktarının immobilizasyona etkisi gösterilmiştir. Farklı immobilize enzim miktarının, enzim medyatörlerinin ve destek malzemenin farklı modifikasyonlarının boyar madde giderimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.



2. TEKSTİL ATIK SULARININ ARITIMI

Tekstil sanayisi, tüketiciye ulaştırılan nihai tekstil ürününü elde etmek amacıyla, liflerin yetiştirilmesinden, çok sayıda ıslak işlemin gerçekleştirildiği proses döngülerine kadar çok yüksek miktarda su ve kimyasal tüketir. Bu işlemlerde kullanılan kimyasal reaktifler, inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik bileşiklere kadar değişen kimyasal bileşimlerinde çeşitlilik gösterir. Ayrıca, boyanmış kumaşların yüzeylerinden kalan boyar maddeleri çıkarmak için ihtiyaç duyduğu tekrarlanan yıkama döngüleri nedeniyle endüstri, aşırı su tüketiminden muzdariptir. Boyar maddeler, kimyasal yapıları gereği ışığa, suya ve birçok kimyasala maruz kaldığında solmaya karşı dayanıklıdır. Tekstil atık sularında genellikle 10-15 mg/L derişimde boyar madde bulunmaktadır. Su akıntılarındaki koyu renkler, ışık girişini azaltarak bitkilerin büyümesini etkiler ve diğer vahşi yaşam biçimlerini olumsuz etkiler. Ayrıca renkler, kullanımdan sonra atıldıkları çevredeki kara ve su kütleleri için estetik bir sorun oluşturmaktadır. (Chakrabarti, 2018)

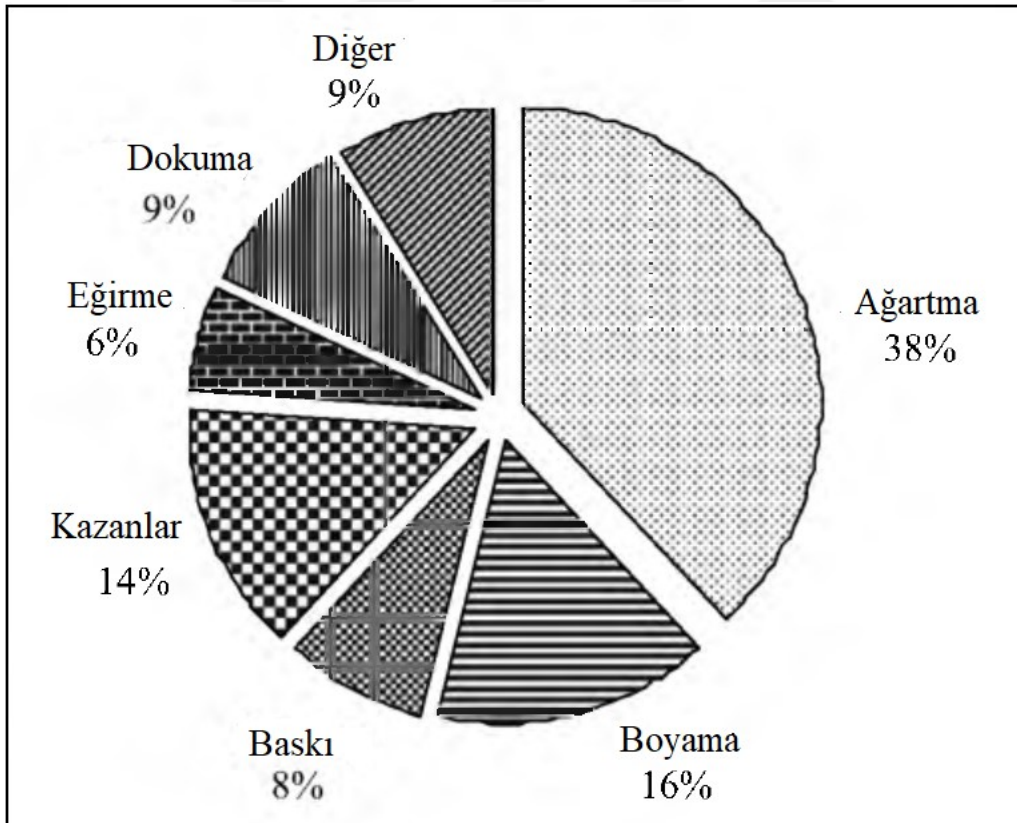
Boyar madde rengi, esas olarak içeriğindeki azo boyar maddelerin varlığından dolayı tekstil atık sularındaki birincil kirleticidir. Azo boyar maddeler, azo grupları ($-N=N-$) ile ikame edilmiş sentetik aromatik bileşiklerdir. (Singh, Singh, ve Singh, 2020). Tekstil, kâğıt, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan 3000'den fazla farklı azo boyar madde çeşidi vardır. Bazı azo boyar maddeler, yüksek suda çözünürlükleri ve düşük tükenmeleri nedeniyle uzaklaştırılması zor olduğu için tekstil atıklarında en sorunlu bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Chen ve Lin, 2007).



Şekil 2.1. Beş büyük sanayide üretilen boyar madde atık su miktarı (Azam, ve diğerleri, 2022)

2.1. Atık Su Arıtım Yöntemleri

Su, insan hayatı ile bitkiler ve hayvanlar gibi yaşayan organizmalar için en temel hayat kaynağı olarak sınıflandırılmaktadır. İçme suyu, tarım, temizlik, sanayi ve madencilik gibi çok çeşitli alanlarda yoğun olarak su kullanılmaktadır. Suyun kalitesi, tarımsal faaliyetler, insan faaliyetleri, madencilik, enerji üretimi, ormansızlaşma, endüstriler ve kentsel yerleşimlerden kaynaklanan kirlilik nedeniyle tehlikeye girmektedir. Endüstrilerden kaynaklanan atık sular, doğrudan veya dolaylı olarak su kütlelerine ve çevredeki ortama deşarj edilmekte veya bazı durumlarda sulama amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle de atık suların insan ve su canlılarının hayatını korumak için deşarjdan önce arıtılması gerekmektedir. Dünyada her yıl yaklaşık 300-400 milyon ton ağır metal, zehirli çamur, solvent ve diğer organik atıkların, endüstriyel tesisler tarafından çevreye bırakıldığı kaydedilmiştir (Choudhary, ve diğerleri, 2020)



Şekil 2.2. Tekstil fabrikasında su tüketim oranları (Choudhury, 2018)

Sanayide, kimyasal ürünlerin, boyar maddelerin ve suyun en büyük tüketicilerinden biri tekstil endüstrisidir. Buna bağlı olarak, tekstil sektörü yüksek miktarda fazlaca zehirli ve potansiyel olarak kanserojen ve mutajenik atık suyun tahliyesinden sorumludur (Júnior, ve

diğerleri, 2022). Bu endüstrilerden gelen atık sular genellikle biyolojik olarak kolayca parçalanamayan boyar madde kalıntıları içerir. Bu boyar madde kalıntılarını içeren atık sular, özellikle su kütlelerine girdiklerinde çevre üzerinde bazı olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Boyar madde, ışığın suya girmesini engeller ve bu da su sistemindeki fotosentez sürecini etkiler (Choudhary, ve diğerleri, 2020). Boyama ve terbiye işlemlerindeki verimsizlik nedeniyle de toplam boyar maddelerin yüzde 10-15'i atık su ile birlikte çevreye deşarj edilmektedir.

Boyar madde içeren tekstil atıklarının arıtmak için çeşitli fiziko-kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemler adsorbantların ve filtrasyon tekniklerinin kullanımını içerirken, kimyasal yöntemler ozonlama, elektrokimyasal oksidasyon ve ışınlamayı içerir. Bu yöntemlerden bazılarının etkili olduğu gözlemlenmiştir; ancak bu yöntemler hem yüksek maliyetlidir hem de atık su çamuru gibi farklı çevresel problemlere de sebep olmaktadır. Biyolojik yöntemler ise, fiziksel yöntemlerin aksine, tekstil atıklarının arıtılması için etkili, ekonomik, spesifik, daha az enerji yoğun ve çevre dostu bir alternatiftir. Biyolojik arıtma prosesleri, farklı mikroorganizma gruplarının parçalayıcı yeteneklerine dayanmaktadır. Bu mikroorganizmalar, atık sularda bulunan boyar maddeleri renksizleştirme ve parçalama yeteneğine sahiptir (Singh, Singh, ve Singh, 2020).

Çizelge 2.1. Tekstil atık sularının parçalanması ve renk giderimi için kullanılan fizikokimyasal yöntemlerin avantaj ve dezavantajları (Singh, Singh, ve Singh, 2020)

Fiziksel/Kimyasal Metot	Avantajlar	Dezavantajlar
Koagülasyon/ Flokülasyon	Düşük maliyet	Yüksek miktarda atık çamur üretimi
Cucurbituril	Bazı boyaların adsorplanabilmesi	Yüksek maliyet
Fenton reaktifi	Çözünebilen ve çözünemeyen boyaların giderilebilmesi	Fazla atık üretilmesi
İyon değişimi	İyon değiştiricide kayıp olmaması	Tüm boyalarda verimli olmaması
Membran filtreleme	Tüm boyalarda etkili olabilmesi	Derişik atık çamur üretimi
NaOCl	Azo bağlarının kırılabilmesi	Zehirli aromatik amin üretimi
Ozonlama	Gaz fazında uygulanabilme	Yarılanma ömrünün çok kısa olması, kanserojen aromatiklerin salgılanması
Fotokimyasal	Atık çamur üretilmemesi	Yan ürün oluşumuyla sonlanması
Silika jel	Temel boyalar için uygunluk	Ticari uygulamaların kazandırmaması
Talaş	Asit boyaların adsorpsiyonu için uygunluk	Daha fazla zaman harcanması

Geçmişten beri birçok fiziksel ve kimyasal yöntem, boyar madde içeren tekstil atık sularının işlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak, fizikokimyasal yöntemlerden daha üstün yeni arıtma alternatifleri sağlamak için canlı organizmaların (biyolojik yöntemler) kullanılması önerilmektedir (Singh, Singh, ve Singh, 2020).

2.1.1. Atık su arıtımında kullanılan biyolojik yöntemler

Boyar madde bazlı atık suların arıtılması, günümüzde önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Araştırmacılar, bu atıkları temizlemek için kimyasal bozunma, çökeltme, çözücü ekstraksiyonu ve adsorpsiyon gibi çeşitli yöntemler önermişlerdir. Ancak bu yöntemler, yüksek maliyet, uzun işlem süresi ve zehirli yan ürünlerin üretilmesi nedeniyle kirleticilerin arıtılması için uygulanamamaktadır. Bu sebeple, araştırmacılar daha az toksisite ve düşük enerji gereksinimleri nedeniyle mikrop veya enzim kullanmaya odaklanmaktadır. Peroksidazlar, lakkaz ve diğer polifenol oksidazlar gibi çalışılan çeşitli enzimler arasında, lakkaz çevre dostu ve güvenli bir enzim olarak kabul edilmiştir (Mehandia, Ahmad, Sharma, ve Arya, 2022).

2.2. Enzimler

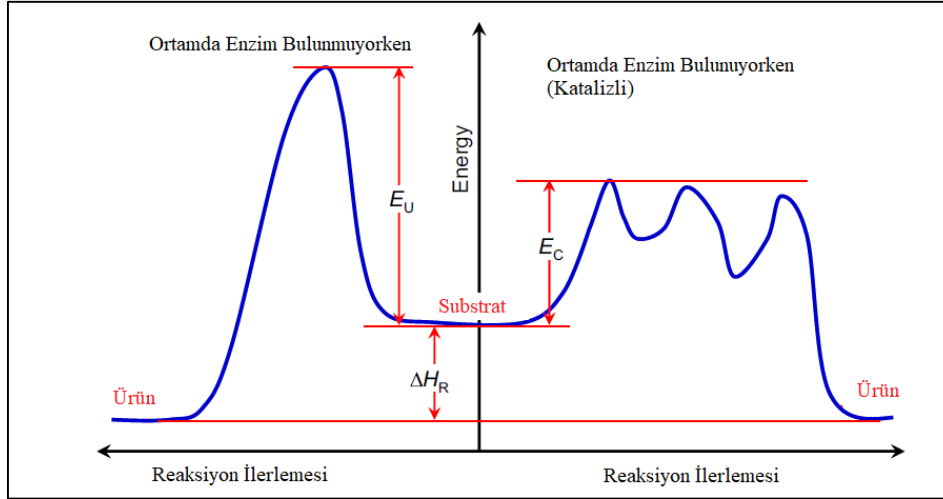
Enzimler, kataliz olarak davranan genellikle yüksek moleküler ağırlıklı ($15\ 000 < MW <$ birkaç milyon dalton) proteinlerdir. Enzimler, ortam koşulları altında kimyasal olarak katalize edilen reaksiyonlara kıyasla çok daha yüksek reaksiyon hızlarıyla sonuçlanan spesifik, çok yönlü ve çok etkili biyolojik katalizörlerdir. Bilinen 2000'den fazla enzim vardır. Enzimler, üreaz gibi substratın veya alkol dehidrojenaz gibi reaksiyonun katalizlediği reaksiyonun sonuna -az eki getirilerek adlandırılır. Bazı enzimler, katlanmış bir polipeptit zinciri (çoğu hidrolitik enzimin tipik özelliği) gibi basit bir yapıya sahiptir. Birçok enzimin birden fazla alt birimi vardır. Bazı protein enzimleri, aktiviteleri için protein olmayan bir gruba ihtiyaç duyar. Bu grup, metal iyonları, Mg, Zn, Mn, Fe gibi bir kofaktör veya karmaşık bir organik molekül, NAD, FAD, CoA veya bazı vitaminler gibi bir koenzimdir. Protein olmayan bir grup içeren enzime holoenzim denir. Bu enzimin protein kısmı apoenzimdir (holoenzim = apoenzim + kofaktör). Bazı enzimler, enzim kompleksleri oluşturmak için birlikte gruplandırılır. Enzimler substrata özeldir ve katalize ettikleri reaksiyona göre sınıflandırılır (Liu, 2013).

Enzimleri inorganik katalizörlerden en çok ayıran özelliklerinden biri, yüksek derecede özgülükleridir. Bu, bir enzimin protein yapısının kimyasal ve fiziksel özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Enzimler normalde belirli bir reaksiyon tipine ve sadece belirli bir substrat tipine spesifiktir. Çoğu enzim, substratları olarak bir dizi kimyasal olarak ilişkili bileşiği kabul etmektedir. Nispeten az sayıda enzim ise tek bir substrat için mutlak özgülük gösterir. Enzimler, genellikle şu altı kategoriden birine ait olarak sınıflandırılırlar: oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar (Çizelge 2.2) (Roberts ve Gibb, 2013).

Çizelge 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması

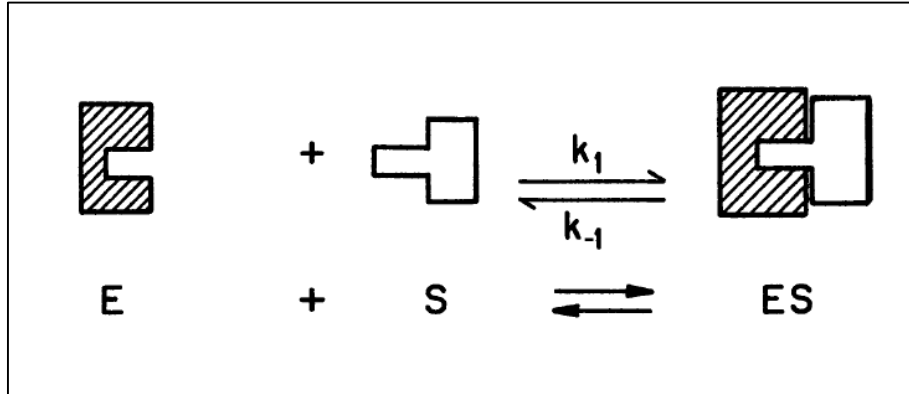
Enzim Kategorisi	Örnekler	Katalizlenen Reaksiyon Tipleri
Oksidoredüktazlar		Oksidasyon ya da substratın indirgenmesi
	Dehidrojenaz	Substrattan kofaktöre H transferi
	Redüktaz	Substrata H eklenmesi
	Oksidaz	Substrattan oksijene H transferi
Transferazlar		Bir molekülden diğerine grup transferi
	Aminotransferaz	Amino grupların transferi
	Transasetilaz	Asetil grupların transferi
	Fosforilaz	Fosfat gruplarının transferi
Hidrolazlar		Substratın hidrolizi
	Glikosidaz	Glikosit bağlarının hidrolizi
	Esteraz	Ester bağlarının hidrolizi
	Peptidaz	Peptit bağlarının hidrolizi
Liyazlar		Eleme ya da ekleme reaksiyonları
	Hidrataz	Çift bağlara su eklenmesi
	Dekarboksilaz	Substrattan CO ₂ çıkarılması
	Aldolaz	Aldol yoğunlaşması
İzomerazlar		Moleküler yeniden düzenleme
	Rasemaz	o- ve L-isomer karşılıklı dönüşümü
	<i>cis-trans</i> izomeraz	Geometrik izomerizasyon
	Mutaz	Karşılıklı molekül gruplarının transferi
Ligazlar		Enerjiye bağlı bağ oluşumu
	Sintetaz	İki molekülün yoğunlaşması
	Karboksilaz	Substrata CO ₂ eklenmesi

Enzimler, substratı bağlayarak ve bir enzim-substrat kompleksi oluşturarak katalize edilen reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürür. Enzimler, serbest enerji değişimini veya denge sabitini etkilemez. Şekil 2.3, aktivasyon-enerji açısından bir enzimin hareketini gösterir. (Liu, 2013).



Şekil 2.3. Enzimle katalizlenmiş ve katalizlenmemiş reaksiyonların aktivasyon enerjisi grafiği ($E_U > E_C$)

Enzim (E)-substrat (S) etkileşiminin moleküler yönleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu etkileşim bir enzim-substrat kompleksinden diğerine değişir. X-ışını ve Raman spektroskopisini kullanan çeşitli çalışmalar, enzim-substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Enzim ve substratı arasındaki etkileşim genellikle zayıf kuvvetlerle olur. Çoğu durumda, ES komplekslerinin oluşumundan van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı sorumludur (Clarke, 2013).



Şekil 2.4. Enzim katalizinin anahtar kilit modelinin şematik gösterimi (Shuler ve Kargi, 2001)

2.2.1. Enzim kinetiği

Tek substratlı enzim katalizli reaksiyonların kinetiğinin matematiksel bir modeli ilk olarak 1902'de V. C. R. Henri ve 1913'te L. Michaelis ve M. L. Menten tarafından geliştirilmiştir. Basit enzim katalizli reaksiyonların kinetiği genellikle Michaelis-Menten kinetiği veya doyma kinetiği olarak adlandırılmaktadır (Shuler ve Kargi, 2001). Temel enzim kinetiği, Eşitlik 2.1 ile temsil edilen bir enzim reaksiyonunda serbest enzim (E), substrat (S), enzim-substrat kompleksi (ES) ve ürünler (P) arasındaki denge göz önüne alınarak anlaşılabilir. Bu reaksiyonda, k_1 ve k_2 hız sabitleri sırasıyla ileri ve geri reaksiyonları ifade etmektedir. Enzim-substrat kompleksinin oluşum hızı daha sonra $k_1[E][S]$ ile ve enzim-substrat kompleksinin yıkım hızı $k_2[ES] + k_3[ES]$ ile gösterilmektedir. Enzim-substrat kompleksinin değişim hızı ihmal edilebilir olduğundan, enzim-substrat kompleksinin oluşum ve yıkım hızları arasındaki ilişki Eşitlik 2.2'yi verecek şekilde eşitlenebilmektedir. Burada K_m Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılmaktadır (Clarke, 2013).



$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = k = K_m \quad (2.2)$$

Eşitlik 2.3'de de görülebileceği üzere, dengede, ürün oluşum hızı, reaksiyonun toplam hızının (v) bu hız tarafından belirlendiği şekilde sınırlayıcı adımdır.

$$v = k_3[ES] \quad (2.3)$$

Belirli bir enzim miktarı için maksimum hız, enzimin tamamı enzim-substrat kompleksi biçiminde olduğunda elde edilen hızdır, yani başlangıçta mevcut olan toplam enzim miktarıyla ilgili hızdır. (Eşitlik 2.4)

$$v_{\max} = k_3([E] + [ES]) \quad (2.4)$$

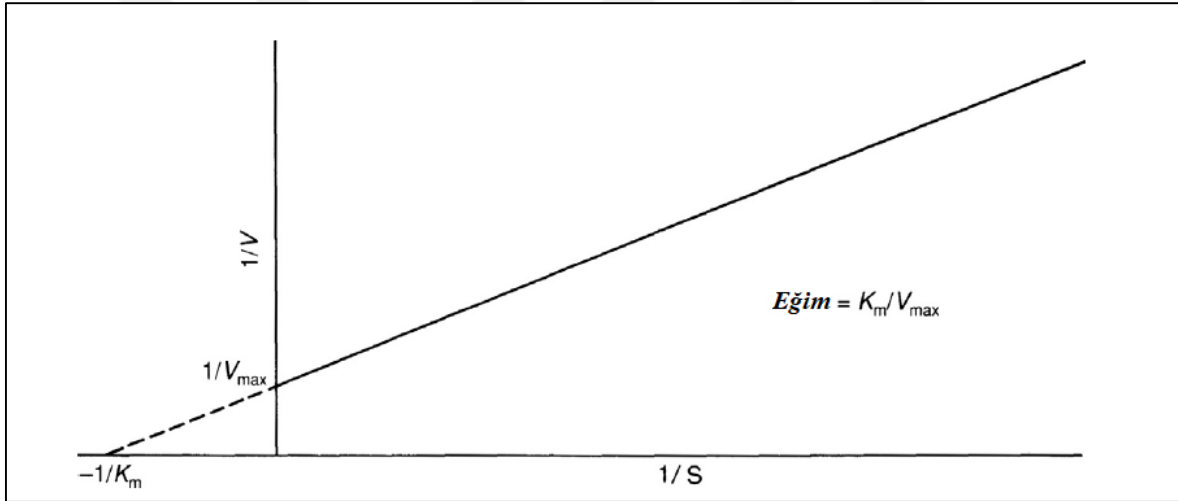
Her üç eşitliği birleştirilmesi ile (Eşitlik 2.5) reaksiyon hızının tahmini için Michaelis-Menten denklemi hesaplanır ve Michaelis-Menten sabiti cinsinden ifade edilir (Clarke, 2013).

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

Bu denklem ayrıca Eşitlik 2.6 olarak da ifade edilebilir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2.6)$$

Bu nedenle, substrat konsantrasyonunun tersi ile hızın tersini gösteren bir grafik, Şekil 2.5’de gösterildiği gibi düz bir çizgi verecektir. Bu grafik Lineweaver-Burk grafiği olarak adlandırılır (Roberts ve Gibb, 2013).



Şekil 2.5. Lineweaver-Burk grafiği

Eksenlerdeki kesişmeler 1/V_{max} ve 1/K_m'ye karşılık geldiğinden ve eğim de K_m/V_{max} olduğundan, bu grafik, deneysel verilerden kinetik sabit V_{max} ve denge sabiti K_m'yi belirlemenin yararlı bir yolunu sağlamaktadır (Roberts ve Gibb, 2013).

2.2.2. Spesifik aktivite

Enzim derişimi, mol ya da kütle derişimi yerine genel olarak “ünite” cinsinden belirtilmektedir. Genellikle enzimin mikroorganizmalardan ve hayvan ya da bitki dokularının izolasyonu yoluyla hazırlanması sebebiyle ve sıklıkla miktarı numuneden numuneye değişebilen miktarda katalik olmayan protein içerdiğinden, bir numunedeki enzim kütlesi nadiren bilinmektedir. Bu sebeple enzim konsantrasyonu için farklı bir yaklaşım benimsenerek spesifik aktivite birimi oluşturulmuştur (Liu S. , 2013). Enzim

ünitesi, 1 µmol substratı belirli pH ve sıcaklık altında katalizleyerek dönüştürecek enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bir enzimin spesifik aktivitesi, miligram protein başına düşen ünite sayısı olarak ifade edilmektedir (Eşitlik 2.7) (Roberts ve Gibb, 2013).

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{mg-protein}} = \frac{\text{mmol-ürün}}{\text{mg-protein} \times dk \times ml} \quad (2.7)$$

Eğer enzimin molekül ağırlığı biliniyorsa, spesifik aktivite Eşitlik 2.8’de gösterildiği şekilde de ifade edilebilir (Liu S. , 2013).

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{mmol-protein}} = \frac{\text{mmol-ürün}}{\text{mmol-protein} \times dk \times ml} \quad (2.8)$$

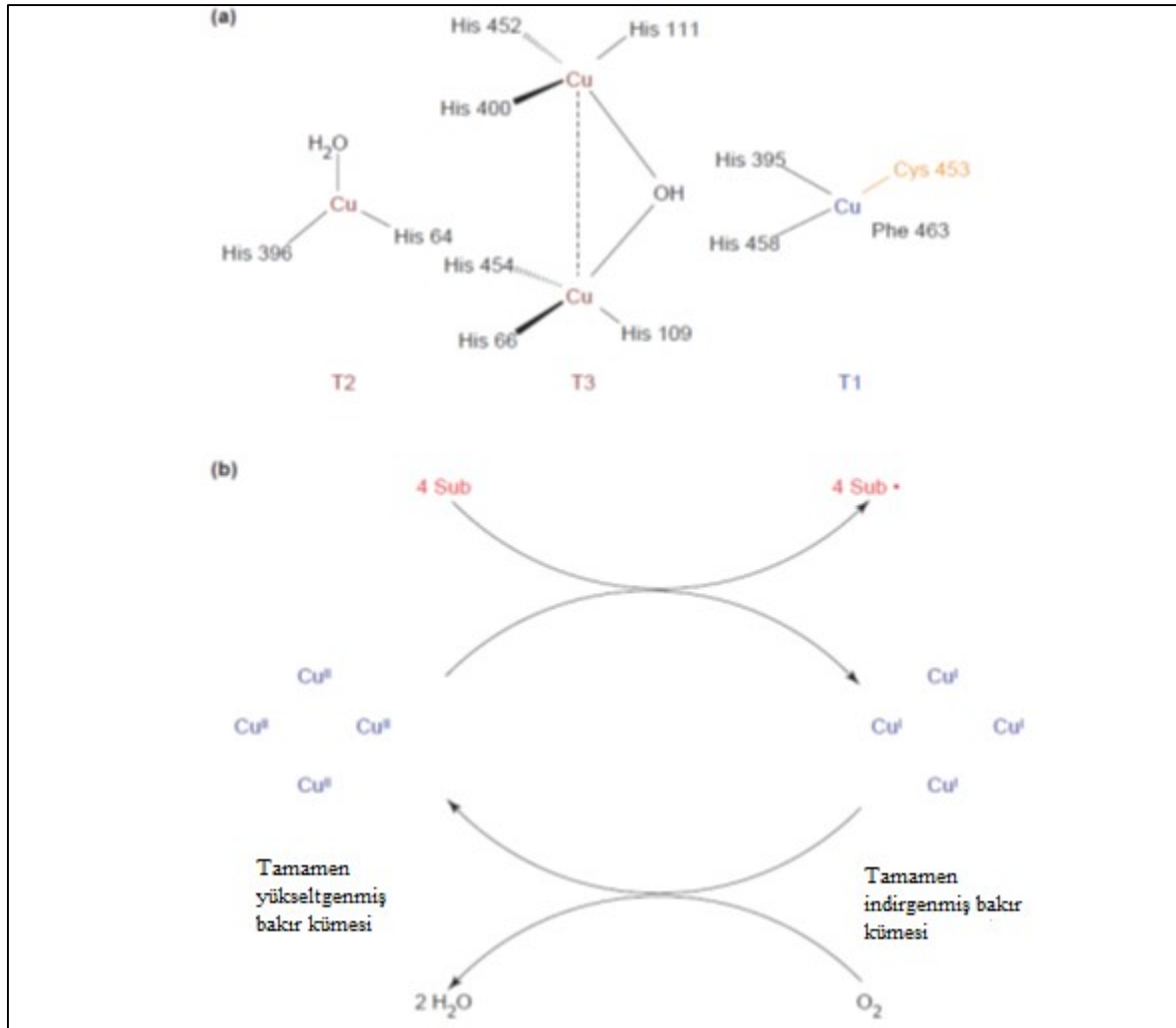
2.2.3. Lakkaz enzimi

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-diphenol:dioxygen oxidoreductases, Lignin Oksidaz Aile 1), doğal olarak elde edilen, multibakır oksidaz protein ailesine ait bir oksidoredüktazdır (Wen, ve diğerleri, 2019), (Hürmüzlü, Okur, ve Saraçoğlu, 2021). Bu enzimler, moleküler oksijenin suya dört elektron indirgenmesiyle birlikte dört indirgeyici substrat molekülünün tek elektronlu oksidasyonunu katalize eder. Lakkazlar çok çeşitli substratları, tercihen fenolik bileşikleri oksitler (Piontek, Antorini, ve Choinowski, 2002).

Lakkaz, ilk olarak Japon cila ağacı (lacquer tree) *Rhus vernicifera*'da keşfedilmiştir. O zamandan beri, bu enzimler çeşitli bitki türlerinde, böceklerde ve bakterilerde bulunmuştur. Bununla birlikte, literatürde açıklanan lakkazların çoğu, yüksek mantarlardan izole edilmiştir. Bu lakkazlar, yumuşak çürüklerin fungal etken maddelerinde, beyaz çürümeye neden olan çoğu braket mantarında, toprak saprotroflarında, bitki patojenlerinde ve ekili yenilebilir mantarlar, örneğin champignon, *Pleurotus* ve tıbbi *Lentinula edodes* dahil olmak üzere birçok agarikte meydana gelir. Bununla birlikte, en yaygın lakkaz üreticileri, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* ve *Pleurotus eryngii* gibi neredeyse tüm ahşap çürüten mantarlarıdır (Fernandez-Fernandez, Sanroman, ve Moldes, 2013).

Lakkazlar, çeşitli sektörlerde kullanılan çok çeşitli substratları oksitleme yeteneklerinden dolayı büyük biyoteknolojik potansiyele sahiptirler. Fenolik bileşikleri parçalama kapasiteleri, onları atık suların arıtımında boyar madde renklerinin giderilmesi veya ksenobiyotiklerin bozunması için uygun hale getirmektedir (Fernandez-Fernandez,

Sanroman, ve Moldes, 2013). Şekil 2.6’da görülebileceği üzere, lakkazlar tarafından katalize edilen reaksiyonlar, uygun bir substrat molekülünün (fenoller ve aromatik veya alifatik aminler), karşılık gelen reaktif radikale monoelektronik oksidasyonu ile ilerler. Redoks işlemi, enzimin katalitik çekirdeğini oluşturan dört bakır atomundan oluşan bir kümenin yardımıyla gerçekleşir. Katalitik döngünün genel sonucu, bir oksijen molekülünün iki molekül suya indirgenmesi ve dört substrat molekülünün eşzamanlı oksidasyonu ile dört radikal üretilmesidir. Bu reaktif ara ürünler daha sonra dimerler, oligomerler ve polimerler üretebilir (Riva, 2006).



Şekil 2.6. Lakkaz enziminin aktif bölge yapısı ve katalitik döngüsü (Riva, 2006)

Lakkaz, mikro kirleticilerin giderilmesi ve su arıtımı için umut verici bir biyokatalizördür (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021). Lakkaz kullanımı aynı zamanda atık su arıtımı sırasında ikincil kirlilikten arınmış bir yöntem sunmaktadır (Wen, ve diğerleri, 2019). Lakkaz enzimi hava ile çalışmaktadır ve tek yan ürün olarak sadece su üretmektedir (Riva, 2006). Bununla

birlikte, lakkaz önemli katalitik rolünü ancak etkin immobilizasyondan sonra oynayabilir. Immobilizasyon işlemi, termal, pH, depolama kararlılığı açısından lakkaz stabilitesini iyileştirir. Ayrıca, hareketsizleştirilmiş lakkazın yeniden kullanılabilirliği, onu serbest lakkaza kıyasla pratik su arıtma uygulamalarında daha avantajlı hale getirir (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021). Immobilizasyon, enzim özelliklerini geliştirerek lakkaz uygulamasının sınırlarının üstesinden gelebilir (Wen, ve diğerleri, 2019).

2.3. Immobilizasyon Yöntemleri ve Lakkaz Enzimi Immobilizasyonu

Enzimler de dahil tüm proteinler, sulu ya da susuz çözeltilerde hızlıca deforme olurlar. Enzim sistemlerinin çeşitli endüstriyel ve teknolojik işlemlerdeki birçok uygulaması nedeniyle, uygulamalı enzimolojideki ana araştırma yönlerinden biri de enzim moleküllerinin kararlılığını incelemektir. Immobilizasyon da enzim kararlılığını sağlamak için kullanılan yollardan biridir (Sedaghat, Ghiaci, Aghaei, ve Soleimani-Zad, 2009).

Enzim immobilizasyonu, sabit bir alanda enzim hareketliliğinin kısıtlanması olarak tanımlanabilir (Liu S. , 2013, s. 354). Bir diğer deyişle; immobilizasyon, tekrar tekrar ve sürekli olarak kullanılabilen, katalitik aktivitelerini geliştirmek/sürdürmek amacıyla bir molekülün uygun bir destekle bağlanması anlamına gelmektedir (Melo, ve diğerleri, 2021).

Enzimler pahalı olduğundan, katalizörün yeniden kullanımı birçok işlem için kritik öneme sahiptir. Birçok uygulamada, enzimlerin immobilizasyonu, enzimin yeniden kullanılması ve enzim geri kazanımı ve saflaştırma işlemlerinin ortadan kaldırılması gibi önemli avantajlar sağlar ve enzim aktivitesi için daha iyi bir ortam sağlayabilir (Liu S. , 2013). Bunun yanı sıra, enzimin üründen kolayca ayrılması, enzim uygulamalarını basitleştirir ve güvenilir ve verimli bir reaksiyon teknolojisini destekler. Öte yandan, enzimlerin yeniden kullanımı, ilk etapta enzim katalizli bir işlemin kurulması için genellikle temel bir ön koşul olan maliyet avantajları sağlar (Tischer ve Wedekind, 1999).

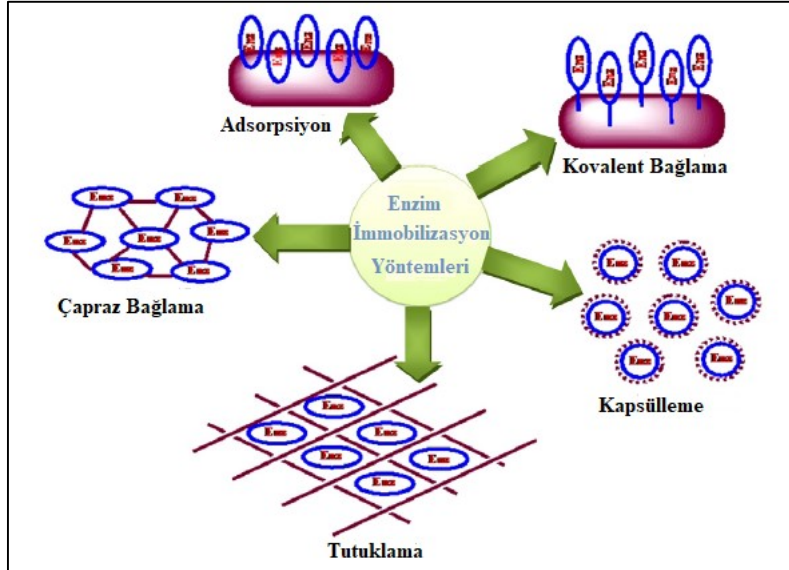
Enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.3’de detaylı olarak belirtilmiştir (Bilal, ve diğerleri, 2017).

Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunun çeşitli avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Yüksek enzim substrat oranı Yüksek oranda tekrar kullanım Kontaminasyon riskinin az olması Arttırılmış/iyileştirilmiş hiperaktivite Geliştirilmiş/iyileştirilmiş proses kontrolü Geliştirilmiş/iyileştirilmiş fonksiyonel etki Geliştirilmiş/iyileştirilmiş ürün kararlılığı	Yüksek maliyet oranı Sınırlı uygulanabilirlik Destek/taşıyıcı sınırlamaları Destek/taşıyıcı yüzey özellikleri Sistemde oluşan ısı kaynaklı inaktivasyon

2.3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonu, tutuklama ve yüzey immobilizasyonu olmak üzere iki ana kategoride incelenebilir (Liu S. , 2013, s. 355). Yüzey immobilizasyonu; adsorpsiyon, çapraz bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere üçe ayrılırken, tutuklama da tutuklama ve kapsülleme alt başlıklarında olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Şekil 2.7’de enzim immobilizasyon metotları görülebilir (Asgher, Shahid, Kamal, ve Iqbal, 2014).



Şekil 2.7. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Adsorpsiyon ile immobilizasyon en basit immobilizasyon yöntemidir. Enzim/hücre ve destek materyali arasındaki tersinir yüzey etkileşimlerini içerir. Adsorpsiyon, enzimlerin Van der Waals veya dispersiyon kuvvetleri gibi zayıf fiziksel kuvvetler tarafından destek

partiküllerinin yüzeylerine bağlanmasıdır (Bickerstaff, 1997). Adsorplanan enzimin aktif bölgesi genellikle etkilenmez ve neredeyse tam aktivite korunur (Liu S. , 2013). İmmobilizasyon yöntemi, pH, sıcaklık, çözücünün doğası, iyonik kuvvet, enzim konsantrasyonu ve adsorban gibi değişkenlerin optimizasyonunu içerir. Burada enzim, yıkama sırasında adsorbe olmayan herhangi bir enzim çıkarılmadan doğrudan yüzeye (aktif adsorban) eklenir. İmmobilizasyon yöntemi, pH, sıcaklık, çözücünün doğası, iyonik kuvvet, enzim konsantrasyonu ve adsorban gibi değişkenlerin optimizasyonunu içerir. Burada enzim, yıkama sırasında adsorbe olmayan herhangi bir enzim çıkarılmadan doğrudan yüzeye (aktif adsorban) eklenir. Yöntem, herhangi bir konformasyonel değişiklik olmaksızın eşzamanlı saflaştırmanın yanı sıra enzim immobilizasyonuna (örneğin, CM-selüloz üzerinde Asparaginaz) yardımcı olan çok çeşitli taşıyıcılarla basit ve hafiftir (Dwevedi, 2016). Bununla birlikte, zamanın bir fonksiyonu olarak yüzeyden tipik olarak enzim sızması olması genellikle sorun teşkil etmektedir (Moehlenbrock ve Minter, 2011). Prosedür, biyolojik bileşen(ler) ile adsorpsiyon özelliklerine sahip bir desteğin uygun pH, iyonik güç vb. koşullar altında bir inkübasyon süresi boyunca karıştırılması, ardından hareketsizleştirilmiş materyalin toplanması ve bağlı olmayan biyolojik bileşenleri uzaklaştırmak için kapsamlı yıkamadan oluşmaktadır (Bickerstaff, 1997).

Kovalent bağlama ve çapraz bağlama, enzimin yüzeylere veya diğer enzimlere kovalent bağlanmasına izin veren tekniklerdir. Bu yüzeyler, bir biyoreaktörün iç duvarları veya endüstriyel biyo-işleme için dolgu yataklı bir reaktör için cam veya polimerik küreler gibi destekler olabilir (Moehlenbrock ve Minter, 2011).

Kovalent bağlama metodunda, enzim, destek materyalinin yüzeyine kovalent bağ oluşumu ile tutunmaktadır. Bu yöntemde, enzim molekülleri amino, karboksil, hidroksil ve sülfidril gibi belirli fonksiyonel gruplar aracılığıyla destek malzemesine bağlanmaktadır (Liu S. , 2013). Enzim molekülleri, ya doğrudan matris üzerinde bulunan reaktif gruplara ya da çeşitli kimyasal reaksiyonlar (örneğin, diazotizasyon) yoluyla matrise yapay olarak bağlanan bir uzatma kolu ile bağlanır. Belirli bir matrisin seçimi, çeşitli uygulamalar sırasında maliyetine, kullanılabilirliğine, bağlama kapasitesine, hidrofilikliğine, yapısal sertliğine ve dayanıklılığına bağlıdır. (Dwevedi, 2016). Kovalent bağlama metodu en verimli immobilizasyon metodudur. Bu metotla enzim, aktivite, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik oranını arttırmak için çoklu noktalardan immobilize edilebilir (Asgher, Shahid, Kamal, ve Iqbal, 2014). Silanizasyon, aldimin yoğunlaştırması, hidrojen bromür

aktivasyonu ve diazotizasyon yaygın kovalent bağlama yöntemleri arasında sayılabilir (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021).

Kovalent bağlanma için çok çeşitli destek malzemeleri mevcuttur. Geniş destek malzeme yelpazesi, bu yöntem için ideal bir desteğin olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, belirli bir enzim immobilizasyonu için desteğin avantajları ve dezavantajları dikkate alınmalıdır. Belirli bir desteğin seçiminde çeşitli faktörler etkili olabilmektedir. Araştırmalar, bu faktörler arasında hidrofilikliğin, destek ortamında enzim aktivitesinin devamlılığı açısından en önemli faktör olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak da fazlaca hidrofilik olan polisakkarit polimerleri enzim immobilizasyonu için popüler bir destek malzemesidir. Örneğin, selüloz, dextran, nişasta ve agaroz enzim immobilizasyonu için kullanılan polisakkaritlerdir (Bickerstaff, 1997).

Genellikle immobilizasyon, enzim aktivitesinde ve stabilitede kayıpla sonuçlanır. Ancak bazı durumlarda immobilizasyon, daha uygun mikroçevre koşulları nedeniyle enzim aktivitesinde ve stabilitede artışa neden olabilir. Enzimler genellikle yüzeye bağlanabilen birden fazla fonksiyonel bölgeye sahip olduğundan, hareketsizleştirilmiş bir enzim preparasyonu çok heterojen olabilir. Bağlanma enzim yapısını değiştirmese bile, bazı enzimler, substrat çözeltisinden uzağa ve destek yüzeyine doğru yönlendirilmiş aktif bölge ile bağlanabilir, bu da substratın enzime erişimini azaltır. Aktivitenin tutulması, kullanılan yöntemle göre değişir (Liu S. , 2013).

Çapraz bağlama metodunda, immobilizasyon için destek malzeme kullanılmaz. Bu yöntemde hücreler (veya enzimler) büyük, üç boyutlu karmaşık bir yapı oluşturmak için birbirine fiziksel ya da kimyasal metotlarla bağlanabilmektedir (Bickerstaff, 1997). Çapraz bağlamanın kimyasal metodu, normal olarak, örneğin glutaraldehit ve toluen diizosiyanat gibi iki veya çok işlevli bir reaktif vasıtasıyla hücreler arasında kovalent bağ oluşumunu içermektedir. Ancak zararlı maddelerden dolayı canlı hücreler ve birçok enzim için bu yöntemde sınırlayıcı faktörler kullanılabilir. Tek enzimin çapraz bağlanması nedeniyle bulunabilecek yakın sorunları en aza indirmek için bağlayıcı olarak hem albümin hem de jelatin kullanılmaktadır (Hassan, Tamer, ve Omer, 2016). Bu yöntemin ana avantajı basitliğidir. Ancak reaksiyonun düzenlenmemesi nedeniyle büyük miktarda enzim kaybına yol açar. Ayrıca, bu enzim immobilizasyon yöntemi, difüzyonun neden olduğu sınırlamalara da maruz kalır (Dwevedi, 2016).

Enzim immobilizasyonun son yöntemleri tutuklama ya da polimerik bir matris içerisinde kapsüllemektir. Tutuklama, proteini bir yüzey üzerinde yakalamak için proteinin etrafındaki bir monomer veya düşük moleküler ağırlıklı polimerin polimerize edilmesi prosedürüdür. (Moehlenbrock ve Minter, 2011). Bu yöntem, enzimin bir polimere (poliakrilamid, aljinat vb.) her yönde çapraz bağlanmasını ve polimer kafesi içinde fiziksel tutuklama ile enzimin yüzeyinde bulunan hemen hemen her yan zinciri kapsamaktadır (Dwevedi, 2016). Tutuklama, enzimin katı desteğe iyonik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları yoluyla bağlandığı basit adsorpsiyon olarak tarif edilebilir. Bu yöntem; hazırlanması kolay, ucuz ve stabil olduğu için diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir (Asgher, Shahid, Kamal, ve Iqbal, 2014).

Enzimlerin ve/veya hücrelerin kapsüllemesi, biyolojik bileşenlerin çeşitli yarı geçirgen zar formları içinde kaplanmasıyla sağlanabilir (Bickerstaff, 1997). Bu teknikte mikroskobik içi boş küreler oluşturulmaktadır. Küreler, enzim çözeltisini içerirken, küre, gözenekli bir zar içine alınmaktadır. Membran, polimerik veya bir mikro damla etrafında oluşturulmuş zenginleştirilmiş bir ara yüzey fazı olabilir (Liu S. , 2013). Kapsülleme yönteminin basitlik, enzim özelliklerinde değişiklik olmaması, kimyasal modifikasyon gerektirmemesi ve minimum enzim gereksinimi olması gibi birçok avantajı vardır. Ancak bunun yanı sıra; enzim sızıntısı, sadece küçük boyutlu substrat kullanılabilmesi ve difüzyon kısıtlamaları gibi birçok da dezavantajı bulunmaktadır (Dwevedi, 2016).

Her bir immobilizasyon tekniği çeşitli avantajlar ve dezavantajlar sunmaktadır. Bunun yanı sıra, en uygun tekniğin seçimi, enzimin doğasına (biyokimyasal ve kinetik özellikleri) ve destek/taşıyıcı malzemenin özelliklerine (kimyasal karakteristikleri ve mekanik özellikleri) göre de değişmektedir (Brena, Gonzalez-Pombo, ve Batista-Viera, 2013). Çizelge 2.4'te farklı immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları görülebilmektedir (Bilal, ve diğerleri, 2017).

Çizelge 2.4. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

Immobilizasyon tipi	Avantajları	Kusurları
Adsorpsiyon	✓ Uygulanması kolay ✓ Reaktif ihtiyacı yok ✓ Gözenek difüzyon sınırlaması yok ✓ Minimum aktivasyon adımı gerekli ✓ Görece ucuz ✓ Kimyasal metotlara göre daha az zarar verici	× Düşük etki seviyesi × Enzimin destekten salınması
Kovalent bağlama	✓ Geniş uygulama alanı ✓ Görece kolay yöntem ✓ Sızıntı ya da salma problemi yok ✓ Çeşitli destekler/taşıyıcılar mevcut ✓ Enzimin desteğe sıkı bağlanması ✓ Destek/taşıyıcılarda çok fonksiyonlu grupların varlığı	× Rekabetçi engelleme × Enzimin kimyasal değişimi × Enzimin fonksiyonel yapısının kaybı
Tutuklama	✓ Hafif koşullar gerekli ✓ Küçük ölçülerde kolay uygulama ✓ Hızlı immobilizasyon yöntemi ✓ Hassas uygulamalarda kullanılabilir ✓ Ucuz ✓ Daha az yapısal çeşitlilik	× Enzimin sızması × Gözenek difüzyon sınırlamaları × Mikrobiyal kontaminasyon ihtimali × Düşük endüstriyel uygulanabilirlik
Çapraz Bağlama	- Matris ya da desteğe ihtiyaç olmaması - Görece basit - Sanayide geniş kullanım	- Çok fonksiyonlu reaktif ihtiyacı - Çapraz bağlayıcının yapısının bozulması
Kapsulleme	✓ Ucuz ✓ Enzimler uzun süre kararlı kalabilir ✓ Ekstraksiyon ya da saflaştırma gerekmez ✓ Çoklu enzimler tek seferde immobilize edilebilir ✓ Enzimin doğal yapısı en iyi şekilde korunur ✓ Hücre organelleri immobilize edilebilir	× Düşük enzim derişimi × İstenmeyen ürünlerin oluşumu × Son ürünün diğer enzimler tarafından değiştirilmesi

2.3.2. İmmobilize enzimlerin özellikleri

Enzim immobilizasyonu sırasında, matrislerin substratlar/ürünler ile fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişen etkileşimlerinden dolayı mikroçevresinde bir değişiklik olmaktadır. Enzim immobilizasyonu sırasında etkilenen önemli parametreler şunlardır:

Optimum pH: Optimum pH'daki değişiklikler, immobilize enzimin, çözünebilir enzime göre durumunda gözlenebilir. pH aralığı genişleyebilir veya asidik ya da bazik tarafa kayabilir.

Optimum sıcaklık: İmmobilize enzimlerin optimum sıcaklığında daha yüksek sıcaklıklara doğru kayma vardır. Enzim immobilizasyonu sırasında, daha yüksek sıcaklıklarda bile enzim moleküllerinin serbest hareketi engellenir. Böylece daha yüksek sıcaklıklarda substrat dönüşümü devam ederken hem aktif bölgede hem de yüzeyde amino asitlerin korunması nedeniyle enzim denatürasyonu gözlenmez. Sıcaklık arttıkça, substrat molekülleri kinetik enerji kazanır ve immobilize enzimin aktif bölgesine hızla ulaşır, bu da optimum sıcaklığı daha yüksek sıcaklıklara kaydırır.

Kinetik parametreler: Enzim immobilizasyonu sırasında kinetik parametrelerde (K_m , V_{max} , k) değişiklikler gözlenir. Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin doğru biçimde (örneğin, aktif bölgeden uzaktaki kalıntıları içeren) bağlanmasını sağlamaz, bu da enzimin V_{max} 'ını güçlü bir şekilde etkiler.

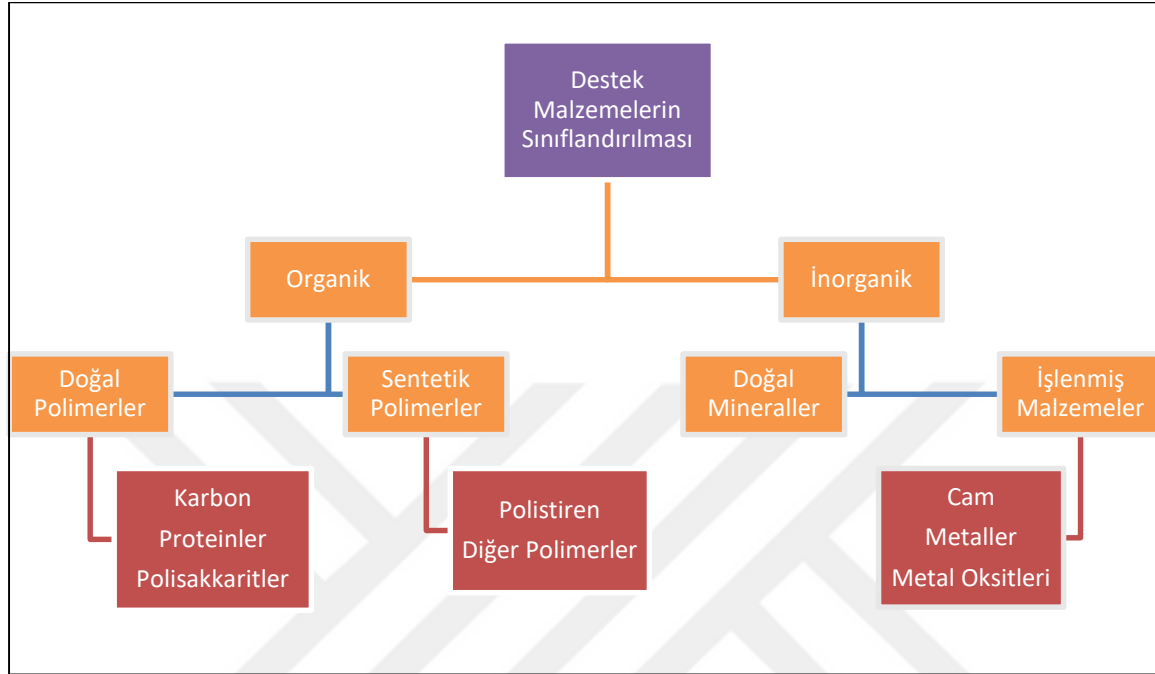
Kararlılık: İmmobilize enzimlerin stabilitesi, matris tipine ve enzim ile matris arasındaki etkileşime bağlı olarak artabilir veya azalabilir (Dwevedi, 2016).

2.3.3. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemeler

Destek malzeme, lakkaz immobilizasyonu için anahtar bir parçadır. Uygun destek malzemeler, enzimin katalitik kapasitesini ve kararlılığını artırır. Serbest lakkazlar ile karşılaştırıldığında, immobilize lakkaz sadece enzim aktivitesinin kaybını azaltmakla kalmaz, aynı zamanda termal kararlılığı, depolama kararlılığını ve operasyonel kararlılığı da geliştirir. Geleneksel ve yeni destek malzemeler olarak da adlandırılabilir çok çeşitli destek malzemeler bulunmaktadır. Geleneksel malzemelerle karşılaştırıldığında, yeni malzemelerin manyetizma ve iletkenlik gibi özel yapıları veya özellikleri vardır. Bu nedenlerle, immobilize lakkazlar benzersiz avantajlara sahiptir (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021).

Geleneksel destek malzemeler: Geleneksel taşıyıcılar arasında inorganik malzemeler, polimer malzemeler, sentetik makromolekül malzemeler ve kompozit malzemeler bulunmaktadır.

Yeni destek malzemeler: Nanomalzemeler, manyetik malzemeler, manyetik nanokompozitler ve mezogözenekli malzemeler yeni taşıyıcılar olarak kabul edilebilir (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021).



Şekil 2.8. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemeler (Bilal, ve diğerleri, 2017).

2.3.4. Bentonit

Bentonit, esas olarak simektit grubunun bir kil minerali olan montmorillonitten oluşan yüksek kolloidal ve plastik killerden oluşan bir kayadır ve volkanik külün yerinde devitrifikasyonu ile üretilir. Montmorillonite ek olarak, bentonit feldspat, kristobalit ve kristal kuvars içerebilir. Bentonitin özel özellikleri, su ile tiksotropik jeller oluşturma yeteneği, büyük miktarlarda suyu emme yeteneği ve yüksek katyon değişim kapasitesidir. Bentonitin özellikleri, iki tetrahedral silika tabakası arasında bir oktahedral alümina tabakası olan smektit grubunun kristal yapısından türetilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2005).

Bentonit, herhangi bir mineral kilin en yüksek emme kapasitesine ve aynı zamanda yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip bir kildir. Özellikle düşük yoğunluğu ve yüksek özgül yüzeyi ile ilgili olarak diğer minerallere göre avantajları uzun süredir kabul edilmektedir ve bentonitin mevcut kullanımlarının çoğunu oluşturmaktadır (Alkan, Ceylan, & Arslan, 2005). İlk olarak ABD'nin Wyoming şehrinde bulunan bentonit, bugün neredeyse bütün dünyada yıllık olarak yaklaşık 20 milyon metrik ton üretilmektedir (Maden Tetkik ve Arama Genel

Lakkazların immobilizasyonu, enzimin bazı özelliklerini geliştirerek yukarıda belirtilen sınırlamaların bazılarının üstesinden gelebilir. Lakkaz immobilizasyonunun başlıca avantajları, enzimin termal kararlılığındaki artış ve aşırı koşullara ve kimyasal reaktiflere karşı direncidir. Ek olarak, immobilize lakkazlar reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilir ve bu da enzimlerin sürekli biyoreaktör işlemlerinde kullanılmasına izin verir (Fernandez-Fernandez, Sanroman, ve Moldes, 2013).

Lakkaz enziminin farklı immobilizasyon çeşitlerine göre karakteristikleri Çizelge 2.5’de gösterilmektedir (Zhou, Zhang, ve Cai, 2021).

Çizelge 2.5. Çeşitli lakkaz immobilizasyon yöntemlerinin karakteristikleri

Karakteristikler	Adsorpsiyon	Tutuklama	Kapsülleme	Kovalent bağlama
Fiyat	+	+	+	+
Hazırlanma zorluğu	+	+	+	+
Kararlılık	+	+	+	+
Bağlanma kuvveti	+	+	+	+
Enzim sızıntısı	+	+	×	×
Difüzyon direnci	×	+	+	+
Lakkaz korunması	×	+	+	×
Aktivite kaybı	+	+	+	+
Uygulanabilirlik	+	+	+	+

×: Mevcut değil +: Mevcut

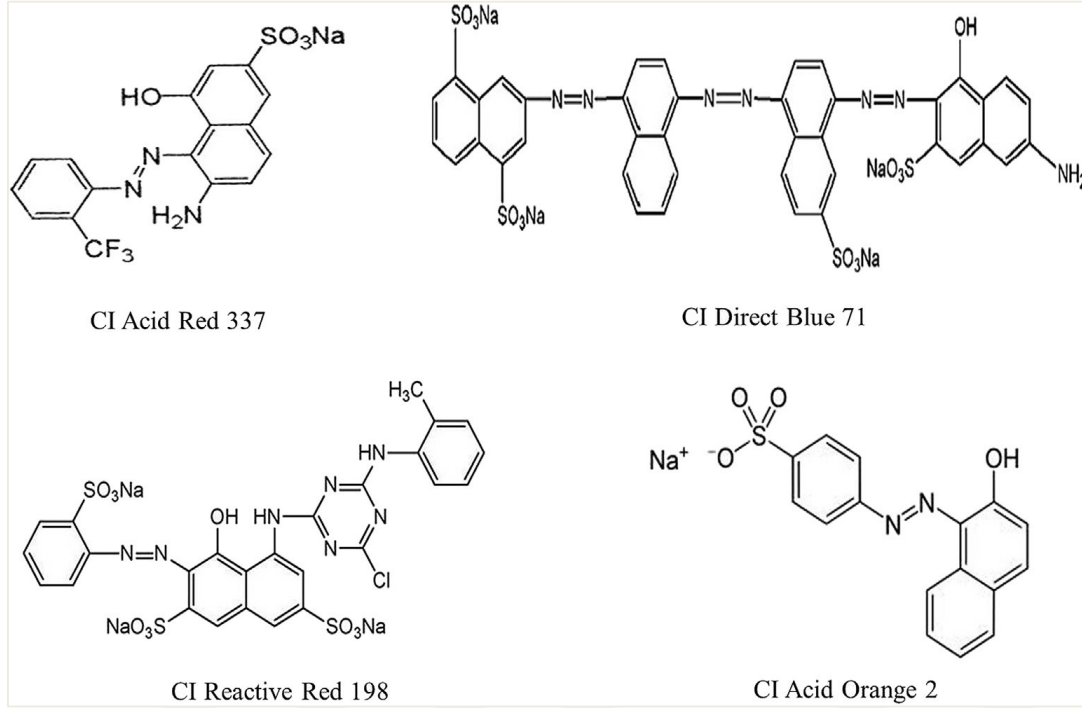
2.4 Lakkaz Enziminin Boyar Madde Giderimi

Boyar maddeler; tekstil, deri, matbaacılık, gıda, plastik vb. sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Boyar maddelerin endüstriyel atık sulardan uzaklaştırılması büyük bir problemdir. Atık sudan boyar maddelerin uzaklaştırılması için geleneksel yöntemler, katı substratlar üzerine adsorpsiyon, kimyasal pıhtılaşma, oksidasyon, filtrasyon ve biyolojik arıtma gibi yöntemler kullanılmaktadır (Eren, 2009).

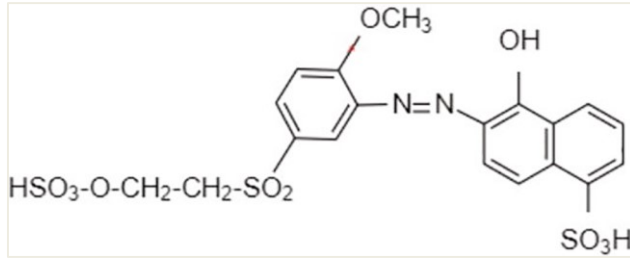
Genel olarak boyar maddelerin kimyasal yapısı, konjuge bir çift bağ sisteminden ve aromatik halkalardan oluşur. Ana boyar madde sınıfları antrokinoid, indigoit ve azo aromatik yapılara sahiptir (Chacko ve Subramaniam, 2011).

Anaerobik veya aerobik koşullarda azo boyarların bakteriyel renk giderimindeki birincil adım, azo bağı ($-N=N-$) kromofor grubunun indirgenmesidir. Bu indirgeme; enzimler, düşük moleküler ağırlıklı redoks araçları, sülfür gibi biyolojik indirgeyiciler tarafından kimyasal

indirgeme veya bunların bir kombinasyonu gibi çeşitli mekanizmaları kapsayabilmektedir. Bu reaksiyonların yeri hücre içi veya hücre dışı bölgeler olabilmektedir. (Singh, Singh, ve Singh, 2015).

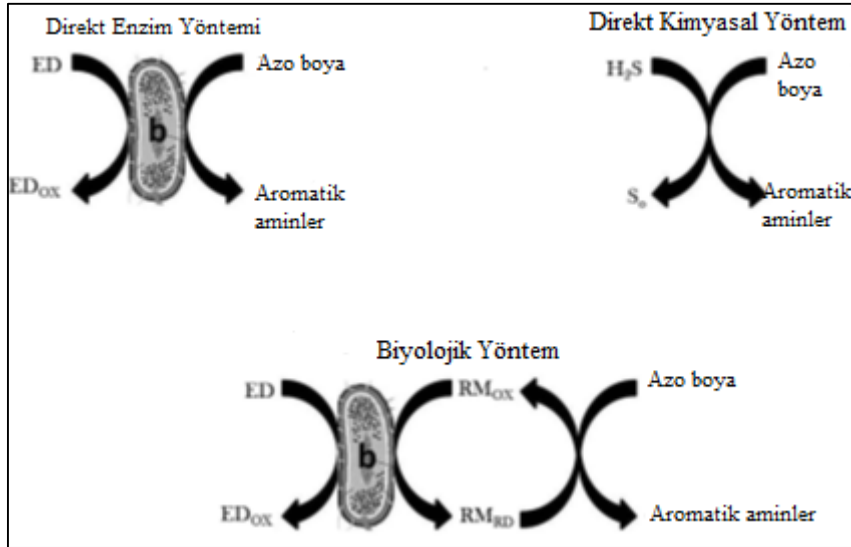


Şekil 2.9. Bazı azo boyar maddelerin yapısı (Singh, Singh, ve Singh, 2015)

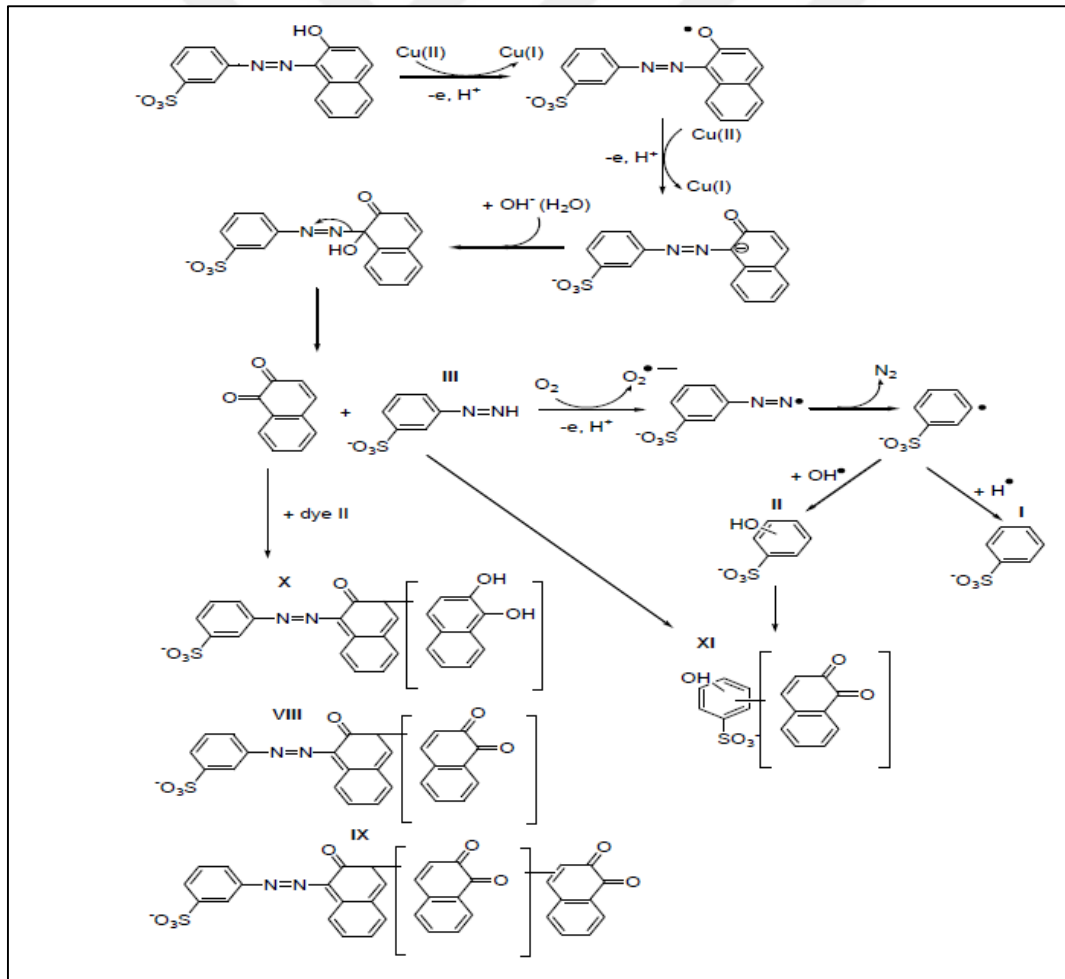


Şekil 2.10. Remazol Red RR boyar maddesinin moleküler yapısı (Hürmüzlü, Okur, ve Saraçoğlu, 2021)

Lakkazlar, azo boyar maddelerin parçalanması hususunda fazlaca araştırılmıştır (Chacko ve Subramaniam, 2011). Lakkazlar, çok bilinen çeşitli endüstriyel boyar maddelerin rengini gidermek için büyük bir potansiyele sahiptir (Singh, Singh, & Singh, Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review, 2015). Lakkazın önerilen boyar madde parçalama mekanizması Şekil 2.12’de gösterilmektedir (Chacko ve Subramaniam, 2011).



Şekil 2.11. Azo boyar maddelerin parçalanması için çeşitli yöntemlerin gösterimi (RM: Redox medyatörü, ED: Elektron donör, b: bakteri)



Şekil 2.12. Lakkazın önerilen azo boyar madde parçalama mekanizması

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Atık sulardaki boyar maddelerin giderim çalışmalarında, serbest ve immobilize enzimler ile bentonit kili sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları, bu bölümde aktarılmaktadır.

Toor ve diğ. (2015) doğal bentoniti aktive ederek, atık sularda bulunan Congo-red boyar maddesinin giderimini incelemişlerdir. Bentonit aktivasyon çalışmalarında üç farklı yöntem benimsenmiştir: termal aktivasyon, asit aktivasyonu ve her ikisinin kombinasyonu. Yüzey alanının genişletilmesinde %70 oranla termal ve asit aktivasyonunun birlikte kullanıldığı modifikasyon metodu en etkili yöntem olmuştur. Bu aktivasyon ile birlikte, atık sulardaki Congo-red boyar maddesinin gideriminin %25 oranında arttığı belirtilmiştir. Bu metodun, doğal killerde adsorpsiyon kapasitesini, uygulanabilirliği ve seçiciliği arttıracığından, atık su arıtımındaki maliyetleri düşüreceğinden bahsedilmiştir (Toor, Jin, Dai, ve Vimonses, 2015).

Huang ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada kitosan ve bentoniti çapraz bağlama metoduyla immobilize ederek sulu çözeltilerdeki Congo red boyar maddesinin giderimini incelemişlerdir. Çalışmada, kitosan kendi içerisinde çapraz bağlanmış daha sonra da bentonit ile immobilize edilmiştir. Her iki ürünün de karakterizasyon çalışmaları yapılarak, adsorpsiyon kapasiteleri tespit edilmiştir. Kullanılan malzemeler için en uygun pH'ın çapraz bağlanmış kitosan için 5,93; bentonit ile immobilize edilen kompozit için 6,08 olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, Congo red boyar madde gideriminde çapraz bağlanmış kitosanla immobilize edilmiş bentonit kompozitinin, farklı bir destek malzemeye immobilize edilmemiş çapraz bağlı kitosana oranla %30 daha etkili olduğu görülmüştür (Huang, Zhang, Hu, ve Wang, 2016).

Liu ve diğ. (2015) kitosan ve glutaraldehit arasındaki reaksiyondan faydalanarak, kitosanı bentonit ile çapraz bağlama metoduyla immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları kompozit malzemenin Amido Black 10B azo boyar maddesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Oluşturulan kompozit malzemenin FTIR, SEM, XRD ve TGA analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, hazırladıkları kitosan bentonit kompozitinin Amido Black 10B azo boyar madde adsorpsiyonu için pH 2'de en optimum seviyede etkili olduğunu ve adsorpsiyon

kapasitesinin maksimum 323,6 mg/g olduğunu tespit etmişlerdir (Liu, Yang, Zhang, ve Huang, 2015).

Tan ve Ting (2014) gerçekleştirdikleri çalışma ile bentonit kiline alginat immobilize ederek sulu çözeltilerden Cu (II) giderimindeki etkisini ve yeniden kullanılabilirliğini incelemişlerdir. İmmobilize bentonit, herhangi bir işlem görmemiş alginat kürelerine nazaran daha yüksek adsorplama kapasitesi göstermiştir. Yapılan çalışmada, immobilize bentonitin 114,70 mg Cu (II) adsorpladığı tespit edilirken, işlem görmemiş alginat küreleri 94,04 mg Cu (II) adsorplayabilmiştir. İmmobilize malzemenin 6 saat sonunda dengeye ulaştığı görülmüştür ve dengede 400 mg l⁻¹ ile en yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaştığı tespit edilmiştir (Tan ve Ting, 2014).

Cengiz ve diğ. (2012) katalaz enziminin immobilizasyonunda bentonit ve sepiyolit destek malzeme olarak kullanılmasını incelemişlerdir. Bu çalışmada; katalaz enzimi, bentonit ve sepiyolit ile immobilize edilerek optimum sıcaklık, pH ve iyonik güç hem serbest enzim için hem de immobilize enzim için tespit edilmiştir. Serbest enzim için 35°C, pH=7 ve 50 mM optimum koşullar olarak bulunurken, immobilize enzim için 35°C, pH=9 ve 50 mM optimum koşullar olarak bulunmuştur. İmmobilize katalaz enziminin, serbest katalaz enzimine göre depolama kararlılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, 45°C sıcaklık altında 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda serbest katalaz ilk aktivitesini %50,7 oranında kaybederken, sepiyolit ile immobilize edilen katalaz %41,1 ve bentonit ile immobilize edilen katalaz %32,6 oranında kaybetmiştir. On çevrim sonrası ise bentonit immobilizasyonu için %34,4 ilk aktivitede kayıp olurken sepiyolit için %9,8 kayıp olduğu gösterilmiştir (Cengiz, Çavaş, ve Yurdakoç, 2012).

Alkan ve diğ. (2005) katalaz enziminin bentonit ile immobilizasyonunun karakterizasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma neticesinde enzim aktivitesinde herhangi bir kayıp olmadığı gözlemlenirken, iyonik gücünün de arttığı tespit edilmiştir. Optimum pH'ın serbest enzim için 7,0 olduğu belirtilirken, immobilize enzim için 8,0 olduğu belirtilmiştir. Aktivitenin en yüksek 35°C'de olduğu ve 60°C'den sonra da enzimin bozunmaya uğradığı gösterilmiştir (Alkan, Ceylan, ve Arslan, 2005).

Daassi ve diğ. (2014) gerçekleştirdikleri çalışma ile *Coriolopsis gallica*'dan elde edilmiş lakkaz enzimin Ca-alginat kürelerine immobilizasyonu ile çeşitli tekstil boyar maddelerine

etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hem serbest enzimin hem de immobilize enzimin antrakinin boyar madde Remazol Brilliant Blue R üzerinde yüksek giderim etkisi olduğu tespit edilirken, diazo boyar maddeler olan Reactive Black 5 ve Bismark Brown R ile metal boyar maddesi olan Lanaset Grey G'de düşük giderim etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ortama HBT medyatörünün eklenmesinin boyar madde giderimini arttırdığı belirtilmiştir. Dört boyar madde giderim çevrimi sonunda immobilize enzimin Bismark Brown R boyar maddesi hariç %70 oranında aktivitesini koruduğu görülmüştür (Daassi, Rodriguez-Couto, Nasri, ve Mechichi, 2014).

Tabak ve diğ. (2007) çalışmalarında Türk bentonitinin (Reşadiye) karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Reşadiye bentonitini Wyoming, ABD bentoniti ile 150-700°C sıcaklıkları arasındaki kütle kaybı yönüyle kıyaslamışlardır ve her iki bentonitteki kütle kaybının birbirine yakın olduğunu tespit etmişlerdir. Yine 400-600°C arasında gerçekleştirilen kalsinasyon işlemi sonunda yüzey alanın %13 azaldığını tespit etmişlerdir (Tabak, Afsin, Caglar, ve Koksall, 2007).

Mehandia ve diğ. (2022) akışkan yatak reaktöründe, tekstil atık sularındaki boyar maddelerin giderimi için kitosan-kil kompozit kürelerine immobilize edilmiş lakkaz enzimini kullanmışlardır. Sistemde lakkaz medyatörü olarak ACS kullanılmıştır. Bu yöntem ile reaktör sisteminde %78 oranında boyar madde giderimi gerçekleştirilmiştir. Boyar maddenin yanı sıra, BOD ve COD seviyeleri de sırasıyla, %91 ve %87 azaltılmıştır (Mehandia, Ahmad, Sharma, ve Arya, 2022).

Peralta-Zamora ve diğ. (2003) *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enziminin silika ile immobilizasyonunun çeşitli azo boyarlardaki (Remazol Brilliant Blue R, Remazol Black B, Reactive Orange 122, Reactive Red 251) renk giderimini incelemişlerdir. Immobilize lakkaz enziminin, bu renklerin gideriminde yüksek verim gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, sisteme art arda boyar madde eklendiği durumlarda destek malzemenin adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı ve sistemin doyuma ulaştığı açıklanmıştır (Peralta-Zamora, ve diğerleri, 2003).

Ghiaci ve diğ. (2009) çalışmalarında modifiye edilmiş ve edilmemiş bentonit desteğinde *Candida rugosa*'dan elde edilmiş lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Desteğin hidrofilik ve hidrofobik doğası, yeniden kullanım verimi ve immobilize lipazın kinetik davranışı

çalışılmıştır. İncelemeler sonucunda tek katman yüzeyli modifiye edilmiş bentonitin immobilizasyon için en iyi destek malzeme olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, immobilize enzimin aktivitesi; enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, karıştırma ve değişik termodinamik parametreler altında çalışılmıştır. Optimum pH altında lipaz aktivitesi modifiye edilmemiş sodyum bentonit için %7,2 olurken, tek katmanlı bentonit için %56,6; çift katmanlı bentonit için %3,6 olarak bulunmuştur. İmmobilize edilen lipaz miktarına göre aktivite ise; modifiye edilmemiş sodyum bentonit için %42,6; tek katmanlı bentonit için %61,2 ve çift katmanlı bentonit için %28,3 olarak tespit edilmiştir (Ghiaci, Aghaei, Soleimanian, ve Sedaghat, 2009).

Ghiaci ve diğ. (2009) yaptıkları çalışmanın ikinci bölümünde büyükbaş bağırsak mukozasından elde edilen alkalın fosfataz enziminin sodyum bentonit ve modifiye bentonit ile immobilizasyonu incelenmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, karıştırma ve farklı termodinamik koşullar gibi farklı faktörler altında incelenmiştir. pH=10 altında optimum enzim aktivitesine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Manyetik karıştırma için en uygun sürenin 2 saat olduğu belirtilmiştir (Ghiaci, Aghaei, Soleimanian, ve Sedaghat, 2009).

Sedaghat ve diğ. (2009) α -amilaz enzimini sodyum bentonit ve setil trimetilammonyum bromid (CTAB) ile modifiye edilmiş bentonitin immobilizasyonunda kullanmışlardır. Çalışmada modifiye bentonit ile immobilize edilmiş enzimin V_{max} ve K_m değerlerinde neredeyse hiç değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Sedaghat, Ghiaci, Aghaei, ve Soleimanian-Zad, 2009).

Hürmüzlü ve diğ. (2021) gerçekleştirdiği çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enziminin kitosan/halloysit destek malzemesi ile immobilizasyonu ile Remazol Red RR boyar maddesinin giderimini incelemiştir. Çalışmada kitosan/halloysit küreleri glutaraldehit varlığında lakkaz enzime çapraz bağlanmıştır. Kürelerin SEM, FT-IR, XRD, TGA ve XPS analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak pH (4-10), sıcaklık (25-55°C) ve depolama kararlılığının serbest ve immobilize enzim üzerine etkisi incelenmiştir. 59 günlük depolama sonunda serbest enzimin, ilk aktivitenin %23'ünü koruduğu görülürken; immobilize enzim, ilk aktivitenin %56'sını korumuştur. On beş çevrim sonunda da %42 ve %54 oranlarında boyar madde gideriminin gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Hürmüzlü, Okur, ve Saraçoğlu, 2021).

Wen ve diğ. (2019) çalışmalarında bentonitten türetilmiş gözenekli bir malzemenin lakkaz ile immobilize edilerek tetrasilin giderimindeki etkisini incelemiştir. Çalışmada, bentonit alkali ve asit altında modifiye edilmiş ve gözenekler genişletilerek lakkaz ile adsorpsiyon metoduyla immobilize edilmiştir. Çalışma neticesinde hazırlanan modifiye bentonitin %60 üzerinde tetrasilin gideriminde etkili olduğu belirlenmiştir (Wen, ve diğerleri, 2019).

Bu çalışmada, serbest lakkaz enzimi destek malzeme olarak bentonit kiline immobilize edilmiştir. Böylelikle, lakkaz enziminin kararlılığının arttırılması, tekrar kullanımının sağlanması ve boyar madde gideriminden yüksek verim alınması hedeflenmiştir. İmmobilizasyon süresi optimize edilmiş, farklı enzim konsantrasyonlarının ve destek malzeme miktarının immobilizasyona etkisi gösterilmiştir. Farklı immobilize enzim miktarının, enzim medyatörlerinin ve destek malzemenin farklı modifikasyonlarının boyar madde giderimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.



4. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu çalışmada, serbest lakkaz enzimi, bentonit kiline adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilerek, tekstil atık sularındaki giderim miktarı incelenmiştir. Boyar madde giderim çalışmasından önce, farklı parametreler (immobilizasyon süresi, enzim derişimi ve destek malzeme miktarı) değerlendirilerek optimum bir sonuca varılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada, *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enzimi, bentonit kili ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon destek malzemesi olarak Çankırı bölgesi bentoniti seçilmiştir. Bentonit Çanbensan Çankırı Bentonit Sanayi ve Ticaret A.Ş'den temin edilmiştir. Bentonitin kimyasal özellikleri Çizelge 4.1'de, teknik özellikleri Ek-2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan bentonitin kimyasal özellikleri

SiO ₂	%	62,01
Al ₂ O ₃	%	15,21
Fe ₂ O ₃	%	6,58
CaO	%	1,19
MgO	%	2,28
K ₂ O	%	1,13
Na ₂ O	%	1,59

4.1. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi ünite cinsinden ölçülmektedir. Enzim ünitesi, 1 µmol substratı belirli pH ve sıcaklık altında katalizleyecek enzim miktarı olarak tanımlanabilir (Roberts ve Gibb, 2013).

4.1.1. Serbest lakkaz enziminin aktivite tayini

Serbest lakkaz enziminin aktivite tayini için *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enzimi kullanılmıştır. Lakkaz enzimi Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir (>0,5 U). Aktivite tayini için ayrıca ABTS (2.2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) ve 0,1 M Sodyum asetat çözeltisi kullanılmıştır.

Enzim aktivitesi, spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 0,5 mM ABTS çözeltisi, 0,1 M Sodyum asetat tamponunda hazırlanmıştır. ABTS, substrat olarak kullanılmıştır. Hazırlanan

tampon çözeltiden 1 mg/mL derişim sağlayacak şekilde enzim çözeltisi oluşturulmuştur. UV küvetine, 0,1 ml enzim çözeltisi ve 0,9 ml ABTS çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan numune, spektrofotometrede, 25°C’de 1 dk boyunca 420 nm dalga boyunda absorbans ölçümüne tabi tutulmuştur. 10 sn’de bir elde edilen absorbans verileri ile absorbansın zamana bağlı grafiğı elde edilmiştir. Grafikten elde edilen sonuçlar ile enzim ünitesi miktarı Eşitlik 4.1 ile tayin edilmiştir. Bu değere bağlı olarak da spesifik aktivite miktarı Eşitlik 4.2 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Ünite} \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{Abs \times V \times 10^6}{\epsilon \times \Delta t \times v \times d} \quad (4.1)$$

Abs: Absorbans değeri

V: Toplam hacim, *ml*

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı, $M^{-1}cm^{-1}$

Δt : Reaksiyon zamanı, *dk*

v: Enzim miktarı, *ml*

d: Işık yolu, *cm*

$$\text{Spesifik Aktivite} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Ünite} \frac{U}{L}}{\text{Protein miktarı} \left(\frac{\mu g}{ml} \right)} \quad (4.2)$$

4.1.2. İmmobilize lakkaz enzim aktivitesi

Enzim immobilizasyonu, *Trametes versicolor*’dan elde edilmiş lakkaz enziminin Ek-2’de teknik özellikleri belirtilmiş olan bentonit ile 25°C’de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından geçirilerek immobilizasyon tamamlanmıştır.

İmmobilize lakkaz enziminin aktivite tayini için bentonit ile immobilize edilen lakkaz enzimi kullanılmıştır. Aktivite tayini için ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ve 0,1 M Sodyum asetat çözeltisi kullanılmıştır.

Deney metodu

İmmobilize lakkaz enzimi aktivite tayini, spektrofotometre metoduyla yine Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır. İmmobilize edilen lakkaz enziminden 5 mg alınarak

20 ml sodyum asetat çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. İmmobilize enzimin aktivitesi belirlenirken UV küvetine 0,9 ml ABTS ile 0,1 ml sodyum asetat çözeltisinde hazırlanan immobilize lakkaz enzimi ilave edilmiştir. Referans malzeme olarak da UV küvetine 0,1 ml sodyum asetat çözeltisi ve 0,9 ml ABTS çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen numune spektrofotometrede absorbans ölçümüne tabi tutulmuştur. Absorbans ölçümü 25°C’de 5 dk boyunca ölçüm alınarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda yine absorbans-zaman grafiği oluşturulmuş ve Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2 kullanılarak immobilize enzimin aktivitesi hesaplanmıştır.

4.2. Protein Tayini

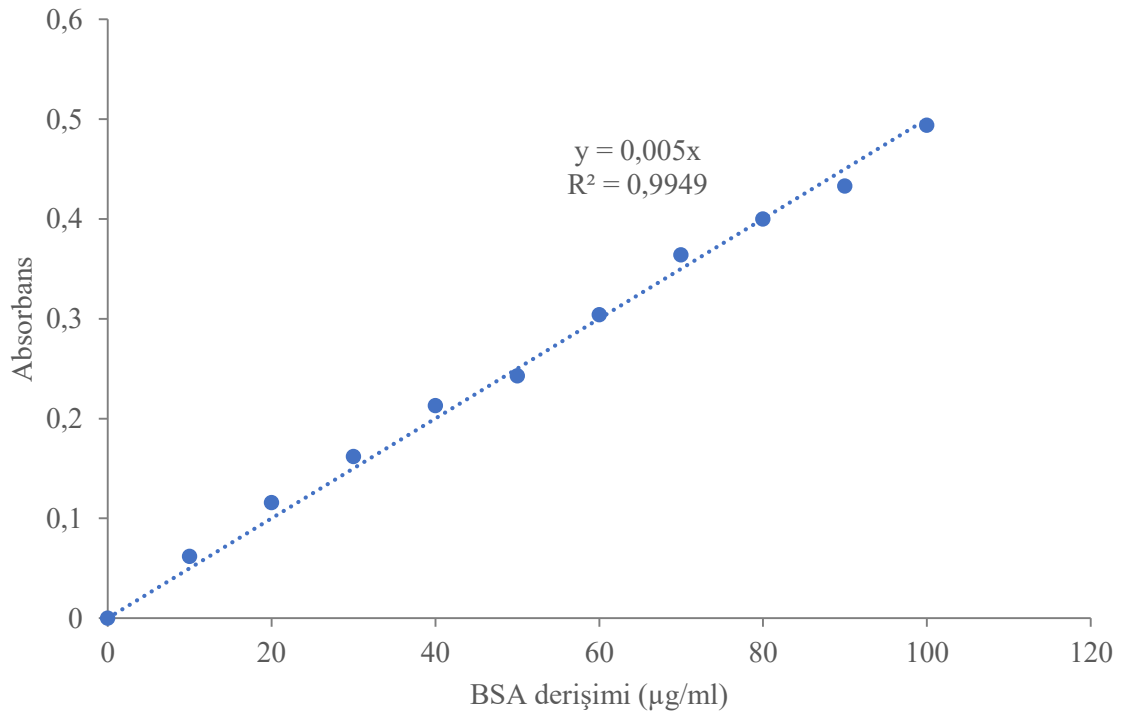
Protein tayini için, Sigma Aldrich’ten temin edilen BSA, %0,9 NaCl çözeltisi, distile su ve Bradford çözeltisi kullanılmıştır. Bradford çözeltisi, 50 ml %96’lık etanol içerisinde 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesinin çözündürülerek, oluşan çözeltiye 100 ml, %85’lik fosforik asidin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan çözelti 1 litreye seyreltilmiştir.

Deney metodu

Serbest ve immobilize enzimin protein tayinini belirlemek için öncelikle absorbans-BSA konsantrasyonu grafiği oluşturularak kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için %0,9 NaCl çözeltisinde BSA (1 mg/ml) hazırlanmıştır. Daha sonra, Çizelge 4.2’de belirtilen konsantrasyonlarda BSA çözeltileri elde edebilmek için yine Çizelge 4.2’de belirtilen oranlarda BSA ile %0,9’luk NaCl çözeltileri, toplam hacim 5 ml olacak şekilde karıştırılmıştır. Absorbans-BSA grafiğini oluşturabilmek için UV küvetine 0,1 ml BSA çözeltisi ile 1 ml Bradford çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan numunede renk oluşumunun gerçekleşebilmesi için 2 dk. boyunca beklenilmiştir. 2 dk. sonunda, 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve absorbans-BSA konsantrasyonu grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Kalibrasyon grafiği için hazırlanan çözelti miktarları

Numune No	BSA derişimi (µg/ml)	1 mg/ml BSA derişimi (µg/ml)	%0,9 NaCl (ml)	BSA-NaCl çözeltisi (ml)	Bradford çözeltisi (ml)
1	10	0,05	4,95	0,1	1
2	20	0,1	4,9	0,1	1
3	30	0,15	4,85	0,1	1
4	40	0,2	4,8	0,1	1
5	50	0,25	4,75	0,1	1
6	60	0,3	4,7	0,1	1
7	70	0,35	4,65	0,1	1
8	80	0,4	4,6	0,1	1
9	90	0,45	4,55	0,1	1
10	100	0,5	4,5	0,1	1



Şekil 4.1. Bradford tayini için hazırlanan BSA kalibrasyon grafiği

4.2.1. Serbest lakkaz enziminin protein tayini

0,1 ml lakkaz enzimi ile 1 ml Bradford çözeltisi UV küvetine alınarak, hazırlanan numune 2 dk bekletildikten sonra 595 nm dalga boyu altından absorbans değeri ölçülmüştür. Ölçülen değer, kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi kullanılarak, serbest lakkaz enziminin protein miktarı hesaplanmasında kullanılmıştır.

4.2.2. İmmobilize lakkaz enziminin protein tayini

İmmobilize enzimin protein miktarı, immobilizasyon öncesi hazırlanan lakkaz enziminin protein miktarı ile immobilizasyon sonrası elde edilen süzöntü içerisindeki protein miktarının farkı alınarak hesaplanmıştır. Süzöntü içerisindeki protein miktarını hesaplamak için de 0,1 ml süzöntü ile 1 ml Bradford çözeltisi UV küvetine alınarak, hazırlanan numune 2 dk bekletilmiş ve 595 nm dalga boyu altında absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen sonuç ile kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi kullanılarak süzöntüdeki protein miktarı hesaplanmıştır.

4.3.Yükleme ve İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması

İmmobilizasyon işlemi sırasında ideal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı oranlarda destek malzeme (bentonit), hazırlanan enzim çözeltisi ile farklı sürelerde karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Yine, enzim miktarı da değiştirilerek, enzim miktarının immobilizasyon üzerindeki etkileri görülmek istenmiştir. Bu amaçla 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml derişimlerde lakkaz enzimi çözeltisi farklı miktarlarda destek malzeme (200 mg, 600 mg) ile farklı sürelerde (4, 12, 24 saat) immobilize edilmiştir. Bu çalışmalar sırasında enzim aktivitesi Eşitlik 4.2 ile hesaplanırken, enzim yükleme verimi ve enzim immobilizasyon verimi Eşitlik 4.3 ve Eşitlik 4.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Yükleme Verimi (\%)} = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \quad (4.3)$$

C_i : Serbest enzim protein miktarı, $\mu\text{g/ml}$

C_f : Süzöntü içerisindeki protein miktarı, $\mu\text{g/ml}$

V_i : Serbest enzim hacmi, ml

V_f : Süzöntü hacmi, ml

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{A_i}{A_f} \times 100 \quad (4.4)$$

A_i : İmmobilize enzim aktivitesi, U/mg

A_f : Serbest enzim aktivitesi, U/mg

4.4. pH Kararlılığı

Serbest ve farklı killeri immobilize edilmiş enzimin optimum çalışma pH'ını belirlemek amacıyla Çizelge 4.3'de belirtilen çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere 1 mg/ml oranını sağlayacak şekilde serbest ve immobilize lakkaz enzimi eklenmiştir. Lakkaz enzimi, pH çözeltileri içerisinde 15 dk boyunca bekletilmiştir ve ardından Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2'de belirtilen denklemler ile serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi hesaplanmıştır. pH kararlılığı pH 4 ve pH 8 aralığında kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.3. pH kararlılığı için hazırlanan çözeltiler

pH	Tampon Çözelti
4	82 mL 0,1 M asetik asit + 18 mL 0,05 M sodyum asetat
5	1 adet fosfat-sitrat tampon tableti + 100 mL saf su
6	100 mL 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 11,2 mL 0,1 M NaOH
7	100 mL 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 58,2 mL 0,1 M NaOH
8	100 mL 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 93,4 mL 0,1 M NaOH

4.5. Boyar Madde Giderimi

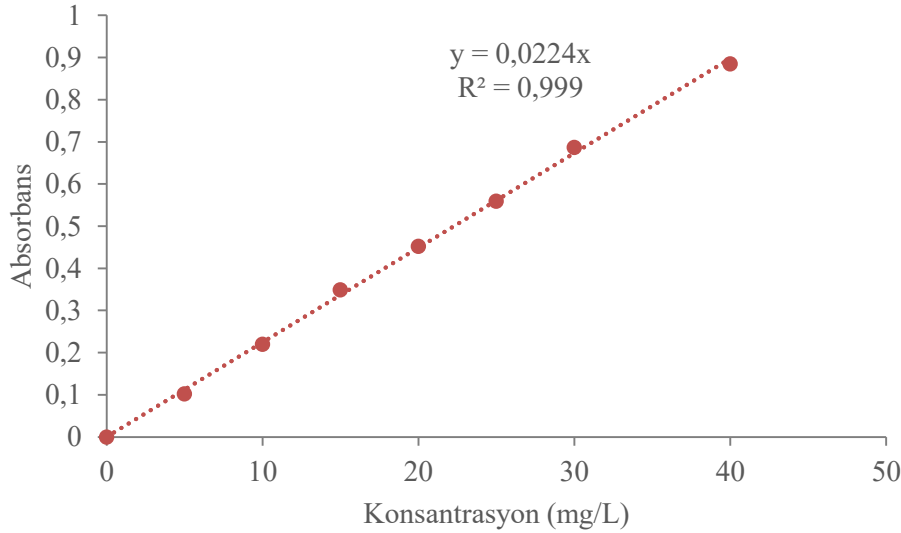
Boyar madde giderimi için Remazol Red RR boyar maddesi ile çalışılmıştır. Öncelikle, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 mg/L boya çözeltileri hazırlanarak Remazol Red (RR) boyar maddesinin en yüksek pik yaptığı 524 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve Remazol Red (RR) boyar maddesi için kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2) (Hürmüzlü, Okur, ve Saraçoğlu, 2021). Ardından, 2 mg/ml derişiminde lakkaz enzimi ile bentonit 4 saat boyunca karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan immobilize enzimden Wen ve diğ. (2019) yaptığı çalışmaya paralel olarak 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml alınmış ve 10 ml hacimde; pH 5, 20 mg/L konsantrasyonunda hazırlanan Remazol Red RR boyar maddesine eklenmiştir (Wen, ve diğerleri, 2019). Hazırlanan çözeltiler, 30°C'de, 100 rpm çalkalamalı su banyosunda 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırılan çözeltilerden alınan 1 ml örneğin 524 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Boyar madde giderim verimi Eşitlik 4.5 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Giderim} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad (4.5)$$

A₀: Boyar madde çözeltisinin başlangıç absorbansı

A_f: Boyar madde çözeltisinin son absorbansı

Boyar madde giderimine farklı konsantrasyonların etkisini ölçmek amacıyla pH 5, 20, 50, 80 ve 100 mg/L derişiminde farklı boyar madde çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml oranında immobilize bentonit-lakkaz eklenmiş ve çözeltiler 30°C’de, 100 rpm çalkalamalı su banyosunda 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırılan çözeltilerden alınan 1 ml örneğin 524 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Boyar madde giderim verimi Eşitlik 4.5 ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. Remazol Red (RR) boyar maddesinin kalibrasyon grafiği

4.5.1. Boyar madde giderimine medyatör etkisi

Lakkaz enziminin etkinliğini arttırmak için Sigma-Aldrich’den temin edilen VLA (Violurik Asit), HBT (1-Hidroksibenzotriazol), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) ve TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl) medyatör çözeltileri, son boyar madde derişimi 50 mg/L olacak şekilde Remazol Red (RR) boyar madde çözeltisine eklenmiştir. Hazırlanan çözeltilere 1 mg/ml oranında immobilize bentonit-lakkaz eklenmiştir. Son çözelti, 30°C, 100 rpm çalkalamalı su banyosunda 20 dk boyunca karıştırılmıştır. 20 dk sonunda alınan örneğin 524 nm dalga boyunda absorbansı belirlenmiştir. Alınan ölçümler sonucunda Eşitlik 4.5 kullanılarak boyar madde giderimi belirlenmiştir.

4.5.2. Enzimin tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzim ortamdan kolayca ayrılabilirdiğinden ötürü, enzimin tekrar kullanımı çalışılmıştır. pH 5 tamponunda, 2 mg/ml oranında lakkaz ile 4 saat boyunca immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından, 20 mg/L derişiminde boyar madde çözeltisi içerisinde 1 mg/ml oranında immobilize bentonit-lakkaz eklenmiştir. Son çözelti, 30°C, 100 rpm çalkalamalı su banyosunda 20 dk boyunca karıştırılmıştır. 20 dk'nın sonunda boyar madde çözeltisinden 1 ml örnek alınarak Eşitlik 4.5'ten boyar madde giderim verimi hesaplanmıştır. İlk boyar madde gideriminden sonra ortamdan alınan immobilize enzimden 5 mg alınarak Bölüm 4.1.2'de anlatıldığı gibi aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Kalan immobilize enzim pH 5 tamponunda yıkanarak 1 mg/ml oranı değiştirilmeden toplam 5 kez boyar madde giderimi gerçekleştirilmiştir.

4.5.3. Bentonit modifikasyonu

Dünyada ve Türkiye'de sodyum bentonit rezervleri sınırlıdır. Bunun yanı sıra kalsiyum ve sodyum-kalsiyum bentonit rezervleri ise oldukça fazladır. Kalsiyum ve sodyum-kalsiyum bentonitlerin daha düşük şişme ve viskozite değerlerinden ötürü sanayideki kullanımları zorlaşmaktadır. Bu sebeple bentonitler kullanım alanlarına göre çeşitli teknolojik işlemlere tabi tutulmaktadırlar (Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, 2018, s. 14).

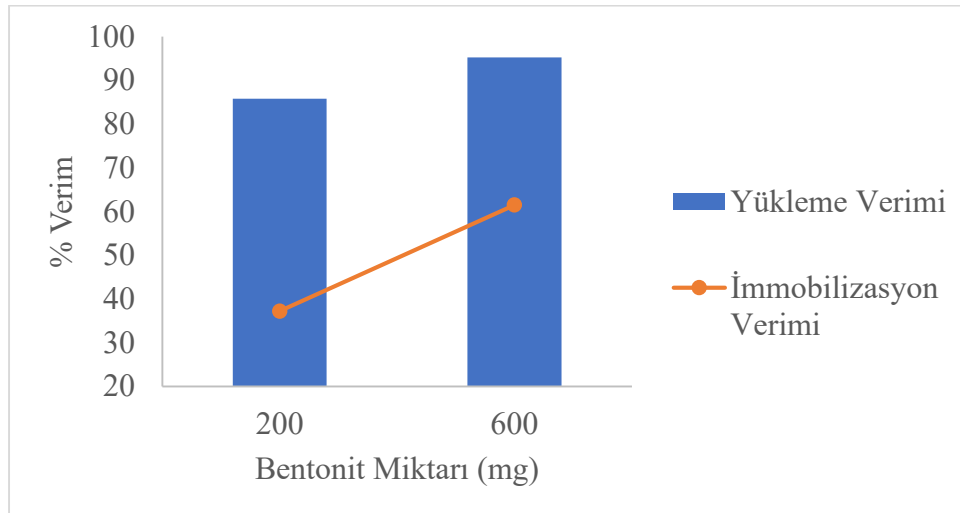
Bu çalışmada bentonit CTAB (Setil trimetilamonyum bromid) ve GPTMS ((3-Glisidiloksipropil) trimetoksisilan) ile aktive edilmiştir. Modifikasyon sonucunda homojen bir dağılım elde etmek için bentonit önce sıcak suda süspansiyeye edilmiştir ve saf su içerisinde çözdürülen modifikasyon malzemeleri ile karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 6 saat boyunca 60°C'de karıştırıldıktan sonra santrifüjlenmiştir. Modifiye bentonit AgNO₃ ile titre edildiğinde çökelti görülmeyinceye kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra kil filtre kağıdından geçirilmiş ve 80°C'de 12 saat boyunca etüvde kurutulmuştur.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Lakkaz enziminin bentonit destek malzemesi ile immobilizasyonuna etki eden faktörler çalışılmıştır. Yüksek immobilizasyon veriminin elde edildiği enzim konsantrasyonu, immobilizasyon süresi ve destek malzeme miktarı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, immobilize enzimin boyar madde giderimi incelenmiştir.

5.1. Destek Malzeme Miktarı

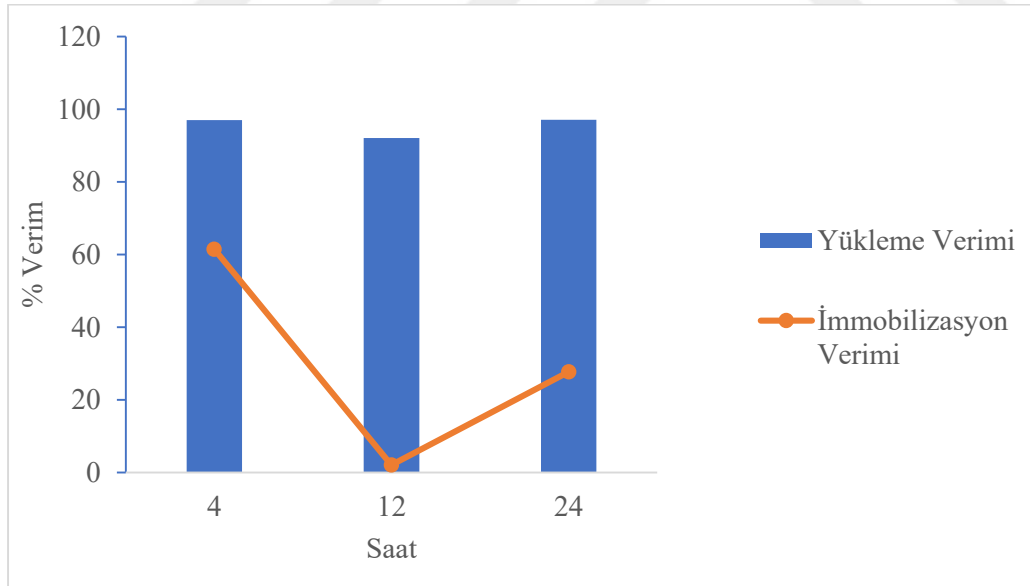
İmmobilizasyon için öncelikle destek malzeme miktarı tayini gerçekleştirilmiştir. Destek malzeme miktarının yükleme ve immobilizasyon verimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 1 mg/ml derişiminde lakkaz enzimi 10 ml sodyum asetat tamponunda (pH: 5,2) hazırlanmış olup, bu çözelti farklı miktarlarda (200 mg ve 600 mg) destek malzeme ile 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 300 rpm’de karıştırılmıştır. Süzdürülen çözeltide aktivite ve protein tayinleri yapılarak yükleme ve immobilizasyon verimleri tespit edilmiştir. Şekil 5.1’de de görülebileceği üzere destek malzeme miktarındaki değişim yükleme verimi üzerinde düşük bir etki göstermiştir. 200 mg destek malzeme kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda %85,8 oranında yükleme verimi gözlenirken; 600 mg destek malzeme kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda %95,25 oranında yükleme verimi gözlenmiştir. Bununla beraber, destek malzeme miktarı arttıkça, yüksek immobilizasyon verimi görülmüştür. 600 mg bentonit kullanılarak hazırlanan immobilizasyonun verimi, 200 mg’lık immobilizasyona göre yaklaşık 2 katlık bir artış göstermiştir.



Şekil 5.1. Destek malzeme miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

5.2. İmmobilizasyon Süresi

İmmobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla; 1 mg/ml derişiminde lakkaz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti destek malzemeye 4, 12 ve 24 saatlik sürelerde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon için, belirtilen süreler boyunca lakkaz enzimi ile bentonit manyetik karıştırıcıda 300 rpm’de karıştırılmıştır. İmmobilizasyon sonucunda elde edilen karışım filtre kağıdından süzdürülmüş olup, aktivite ve protein tayinleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.2’de görüldüğü üzere, en yüksek yükleme verimi 24 saatlik immobilizasyon sonucunda görülmüştür (%97,15). Lakkaz enziminin destek malzemeye en çok 4 saatlik immobilizasyon süresi sonucunda yüklendiği tespit edilmiştir (%61,46). 24 saatlik immobilizasyon ile 4 saatlik immobilizasyon arasında yükleme verimi açısından ihmal edilebilir bir fark olması, 4 saatlik karışımın immobilizasyon verimi açısından daha verimli olması ve immobilizasyon hazırlama süresinin düşüklüğü sebebi ile çalışma boyunca 4 saatlik immobilizasyon süresi kullanılmıştır. Benzer şekilde, Mehendia ve diğerlerinin yaptığı çalışmada da lakkaz enzimi destek malzemeye 4 saatlik süre ile immobilize edilmiştir (Mehandia, Ahmad, Sharma, & Arya, 2022).



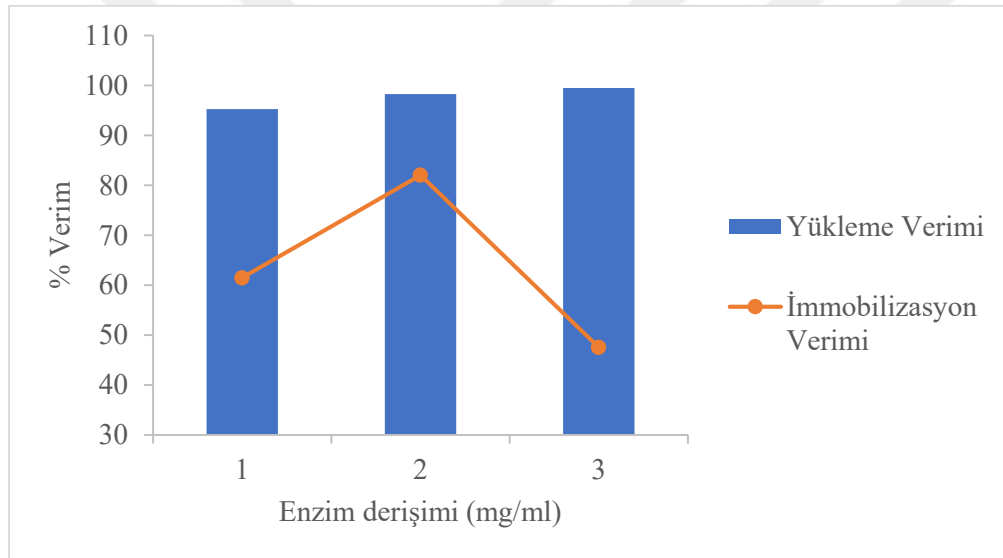
Şekil 5.2. İmmobilizasyon süresinin yükleme ve adsorplanan lakkaz verimine etkisi

İmmobilize enzimlerin aktivitesi, enzim proteininin doğasına bağlıdır. Zaman ilerledikçe, immobilizasyon sırasında olası inaktif lakkaz miktarı artmış ve lakkaz esnekliği de azalmıştır. Fiziksel adsorpsiyon, immobilizasyon süresindeki artış ile bentonitler üzerindeki adsorpsiyon bölgelerini elimine etmiş olabilir. İlgili sterik engelleme ve difüzyon

sınırlamaları da lakkaz aktivitesinde azalmaya neden olmuş olabilir (Wen, ve diğerleri, 2019).

5.3. Enzim Derişimi

Enzim konsantrasyonunun immobilizasyon üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla farklı derişimlerde (1 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml) lakkaz enzimleri hazırlanmış olup, tüm çözeltiler aynı miktarda (600 mg) destek malzeme ile lakkaz yükleme miktarının en yüksek olduğu 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda elde edilen çözelti, filtre kağıdında süzdürülmüş olup, aktivite ve protein tayinleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.3. Enzim derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

Başlangıç lakkaz derişimi 1'den 3 mg/mL'e yükseltildiğinde bentonite yüklenen lakkaz miktarı da artmıştır. Wen ve diğ. (2019) yaptığı çalışmada da görüldüğü üzere, enzim konsantrasyonu 2 mg/ml'ye kadar arttırıldığında yükleme ve immobilizasyon veriminin de arttığı görülmüştür (Şekil 5.3). Ancak enzim konsantrasyonunun 2 mg/ml'yi geçmesi durumunda immobilizasyon verimi azalma eğilimine girmektedir. Bu durum, destekler üzerindeki lakkazın aşırı yüklenmesine bağlanabilir. Desteklerin yüzeyinde lakkazın aşırı yüklenmesi, lakkaz moleküllerinin tıkanmasına veya yığılmasına neden olmaktadır. Lakkaz yüklemesi yüksek olduğunda difüzyon kontrollü sınırlamalar ortaya çıkmaktadır. Lakkazın aglomerasyonu veya yığılması da lakkaz moleküllerinin yapısal değişikliğine neden olmaktadır ve lakkaz aktivitesini sürdürmek için uygun bir lakkaz konsantrasyonunun

önemli olduğu görülmüştür (Wen, ve diğerleri, 2019). En yüksek yükleme verimi 2 mg/ml lakkaz derişimi ile gerçekleştirilen immobilizasyonda elde edilmiştir (%82,01). Bu sebeple sonraki çalışmalar 2 mg/ml derişimde lakkaz ile gerçekleştirilmiştir.

5.4. pH Kararlılığı

Serbest enzimin en etkin çalıştığı pH değerini belirlemek amacıyla, pH 4 ve pH 8 aralığında serbest enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Serbest enzim en yüksek aktiviteyi pH 6'da gösterirken, en düşük aktivite pH 4'te gözlemlenmiştir. Serbest enzim aktivitesi pH 4'ten pH 6'ya kadar artış gösterirken, pH 6'dan sonra aktivite değerinde düşüş görülmüştür. Zheng ve diğ. 2016 yılında yaptıkları çalışmada serbest lakkaz enzimi için aktivite değerlerini bulunan sonuçlara benzer olarak göstermiştir. Yine bu çalışmada en yüksek aktivite değeri pH 6'da gözlemlenmiştir. (Zheng, ve diğerleri, 2016). Lakkaz ile immobilize edilen bentonit 5 ile 8 pH arasında geniş bir çalışma aralığında aktivite gösterirken, modifiye edilen bentonitler dar bir çalışma aralığında aktivite göstermiştir.

Çizelge 5.1. Farklı pH'larda enzim aktivite değerleri

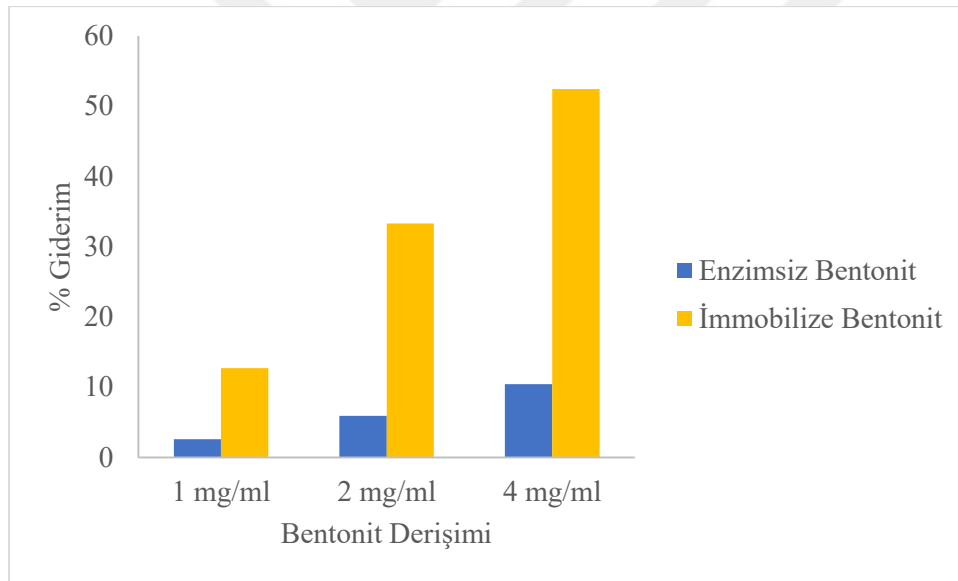
pH	Lakkaz Aktivitesi %			
	Bentonit	CTAB-Bentonit	GPTMS-Bentonit	Serbest Enzim
4	0	0	0	7,2
5	7,6	3,14	3,1	39,3
6	4,55	1,57	9,4	71,9
7	9,1	0	0	56,6
8	3,03	0	0	61,8

Optimum pH'daki değişiklik, daha önce manyetik çift modlu mezogözenekli karbon üzerinde immobilize lakkazda da incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda, pH'daki değişim, lakkaz çevresindeki destek mikro ortamından etkilenen elektrostatik etkileşime atfedilmiştir. Farklı pH değerleri, farklı mikro ortamlara yol açmaktadır. İzoyonik nokta, lakkaz ve desteğin net yükünü, lakkaz aktivitesinin engellenebileceği veya başlatılabileceği şekilde etkilemektedir (Wen, ve diğerleri, 2019). Bentonit ile immobilize edilen lakkaz pH 5 ve 8 aralığında adaptasyon göstermektedir. Bu sonuç da bentonit ile immobilizasyonun lakkaz aktivitesini belli bir dereceye kadar koruyabileceğini kanıtlamaktadır.

5.5. Boyar madde giderimi

5.5.1. Boyar madde giderimine immobilizasyon etkisi

Boyar madde giderimine immobilizasyonun etkisini göstermek için 20 mg/L boyar madde konsantrasyonunda immobilize edilmiş ve immobilize edilmemiş bentonit ile Remazol Red (RR) giderimi incelenmiştir. Immobilizasyon için verimin en yüksek olduğu 2 mg/ml derişiminde lakkaz enzim çözeltisi bentonit ile karıştırılmıştır. Boyar madde giderim çalışması sırasında ortama farklı oranlarda immobilize bentonit eklenerek enzim miktarının da etkisi gösterilmiştir. 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml oranında enzimsiz bentonit ile yapılan çalışmalarda düşük miktarda giderim yapıldığı gözlemlenmiştir (Sırasıyla; %2,6; %5,9; %10,4). Ancak ortama lakkaz ile immobilize edilmiş bentonit aynı oranlarda eklendiğinde, giderim miktarının oldukça yükseldiği belirlenmiştir (Sırasıyla; %12,7; %33,3; %52,4).



Şekil 5.4. 20 mg/L boyar madde çözeltisinin farklı bentonit derişimlerdeki giderim miktarı (pH: 5, 30°C)

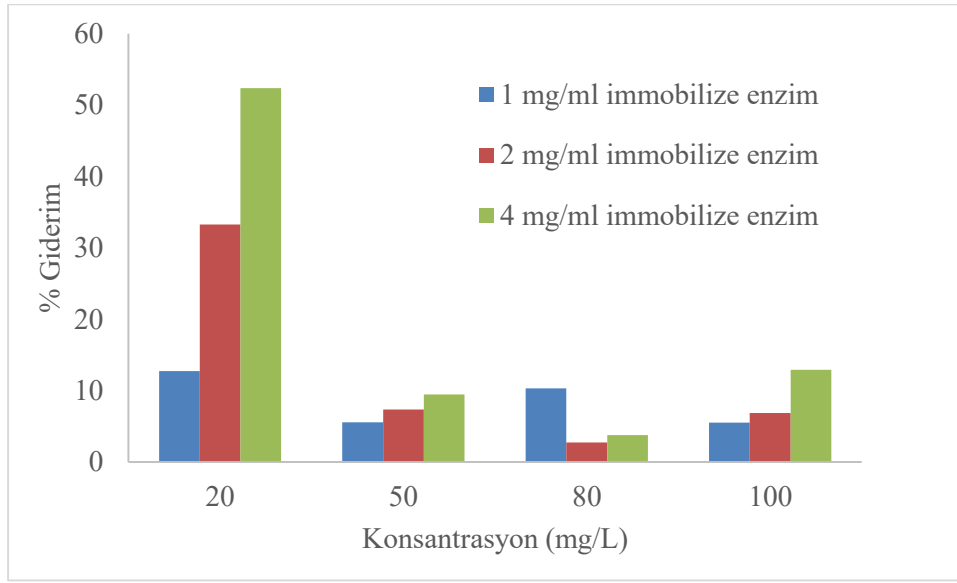
Ortamda bulunan immobilize enzim oranı arttıkça boyar madde gideriminin arttığı ve boyar madde konsantrasyonunun düştüğü gözlemlenmiştir. Immobilize enzimle gerçekleştirilen boyar madde giderim çalışmalarında hem bentonit ile boyar madde adsorpsiyonu hem de enzimle boyar madde giderimi söz konusu olmaktadır.

5.5.2. Boyar madde giderimine konsantrasyonun etkisi

Boyar madde giderimine konsantrasyonun etkisini göstermek amacıyla, 20, 50, 80 ve 100 mg/L konsantrasyonda boyar madde çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere, 1

mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml oranında immobilize enzim içeren bentonit ayrı ayrı eklenerek, çözeltiler 20 dk boyunca 30°C sıcaklık ve 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır.

Boyar madde çözeltisinin derişimi yükseldiğinde giderimin azaldığı gözlemlenmiştir. En yüksek giderim 20 mg/L boyar madde çözeltisinde gerçekleşirken, en düşük giderim 80 mg/L'de gerçekleşmiştir. Ortamdaki enzim immobilize edilmiş bentonit miktarı arttıkça 20, 50 ve 100 mg/L için boyar madde giderim miktarının da arttığı gözlemlenmiştir.



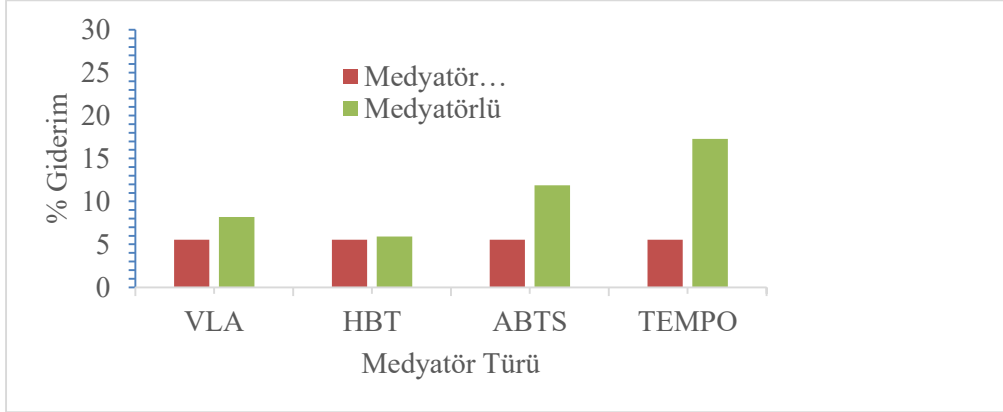
Şekil 5.5. Farklı konsantrasyonlarda boyar madde giderim yüzdesi (pH: 5, 30°C)

5.5.3. Boyar madde giderimine medyatör etkisi

Redoks potansiyeli yüksek olan substratlar, lakkazlar tarafından doğrudan yükseltgenemezler. Lakkaz medyatör sistemleri, lakkaz tarafından yükseltgenebilen bileşiklerin sayısında çarpıcı bir artışa yol açmaktadır (Fernandez-Fernandez, Sanroman, ve Moldes, 2013). Bazı medyatörlerin kullanımı, karmaşık moleküllerin yükseltgenmesi için lakkazın etkinliğini arttırmaktadır (Mehandia, Ahmad, Sharma, ve Arya, 2022).

Boyar madde giderimine medyatörlerin etkisini göstermek amacıyla VLA, HBT, ABTS ve TEMPO medyatörleri ortama eklenmiştir. Ortamdaki son boyar madde konsantrasyonu 50 mg/L olurken, bu derişimdeki çözeltiler 20 dk boyunca 30°C, 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda karıştırılmışlardır. Tek başına düşük bir giderim gösteren immobilize enzim, ortamdaki medyatör varlığı ile giderim yüzdesini arttırmıştır. 50 mg/L boyar madde

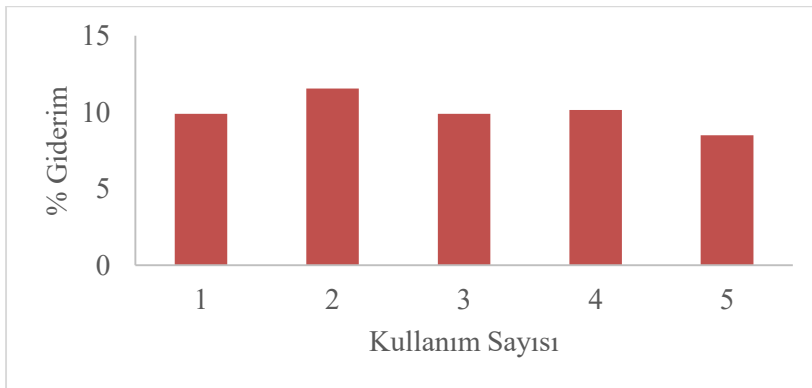
konsantrasyonunda, immobilize enzim %5,55 boyar madde giderimi gerçekleştirirken, ortama VLA, HBT, ABTS ve TEMPO eklendiğinde giderim sırasıyla %8,19; %5,93; %11,86 ve %17,27'ye çıkmaktadır.



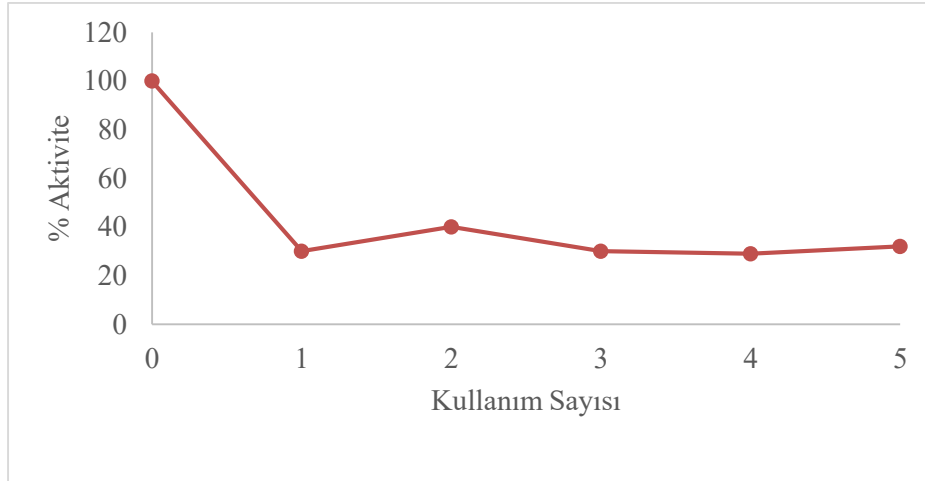
Şekil 5.6. Farklı medyatörlerin boyar madde giderim yüzdeleri

5.5.4. Enzimin boyar madde gideriminde tekrar kullanılabilirliği

Boyar madde giderim çalışmalarında enzimin tekrar kullanılabilirliği önemli bir parametredir. Enzimin tekrar kullanılabilirliğinin ölçülmesi amacıyla 20 mg/L boyar madde çözeltisi hazırlanarak, immobilize enzim ile boyar maddenin giderimi ölçülmüştür. pH 5 ortamında 30°C sıcaklık ve 100 rpm'lik çalkalamalı su banyosunda 20 dk boyunca boyar madde giderimi yapılmıştır. Aynı işlem 5 kez tekrar edilerek, boyar madde giderim miktarı ve aktivite yüzdeleri ölçülmüştür. Deney sırasında ortamda enzim aktivitesini arttırmak için herhangi bir medyatör kullanılmamıştır. Beşinci tekrar sonucunda enzimin aktivitesinin %32'sini koruduğu belirlenmiştir. Aktivite tayini Eşitlik 4.2 ile belirlenmiştir. İlk tekrarda yaklaşık %10 olan boyar madde gideriminin 5. tekrarda %8,50'ye düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 5.7. Enzimin tekrar kullanımının boyar madde giderimine etkisi (20 mg/L derişim)

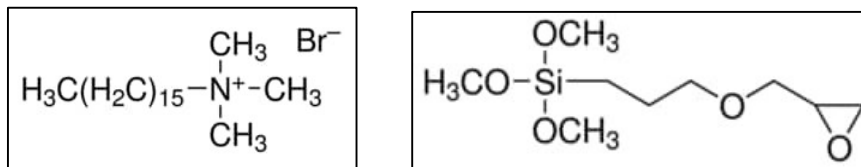


Şekil 5.8. Enzimin tekrar kullanımının aktiviteye etkisi

Fiziksel adsorpsiyon diğer yöntemlere göre daha ucuz olmasına rağmen, yüksek sıcaklıklara karşı zayıf duyarlılığı ve düşük kuvvetlerle bağlanan bir yöntem olması nedeniyle enzim ile taşıyıcının ayrılmasına neden olma eğilimindedir. Bu yöntem, boyar madde giderimi için kullanıldığında enzim sızma problemi yaşayabilmektedir (Chen, Oh, ve Yap, 2022). Wen ve diğerlerinin yaptığı çalışmada da beş tekrar sonunda bentonit ile immobilize edilmiş lakkaz enziminin aktivitesinin %64'ünün kaybolduğu gösterilmiştir (Wen, ve diğerleri, 2019).

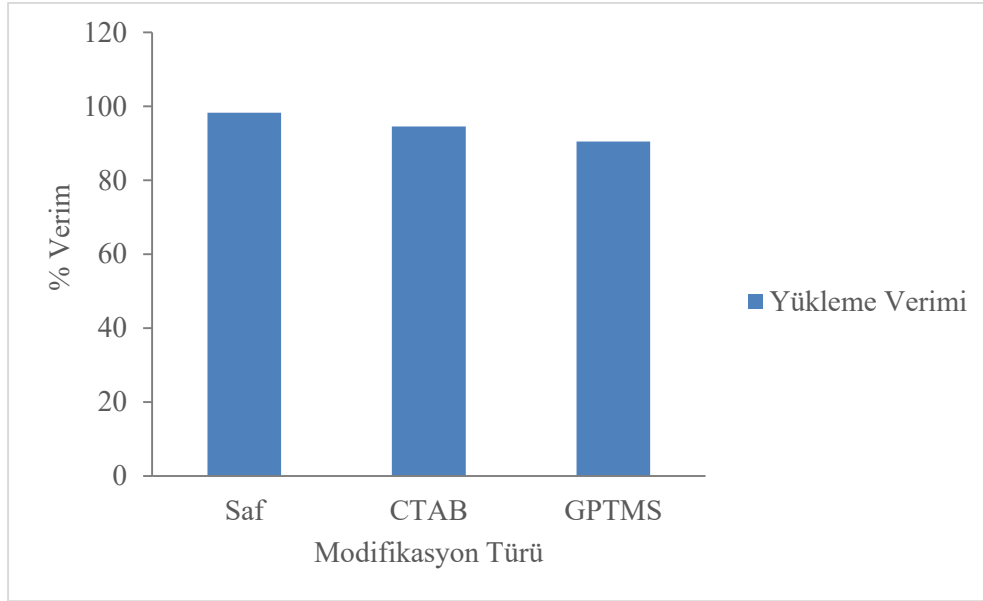
5.5.5. Bentonit modifikasyonunun boyar madde giderimine etkisi

Tabakalı bir yapıya sahip olan bentonitin tabakaları arasındaki genişliği arttırmak ve daha fazla enzim yüklemesi sağlayabilmek amacıyla bentonit, CTAB ve GPTMS ile modifiye edilmiştir (Şekil 5.9)



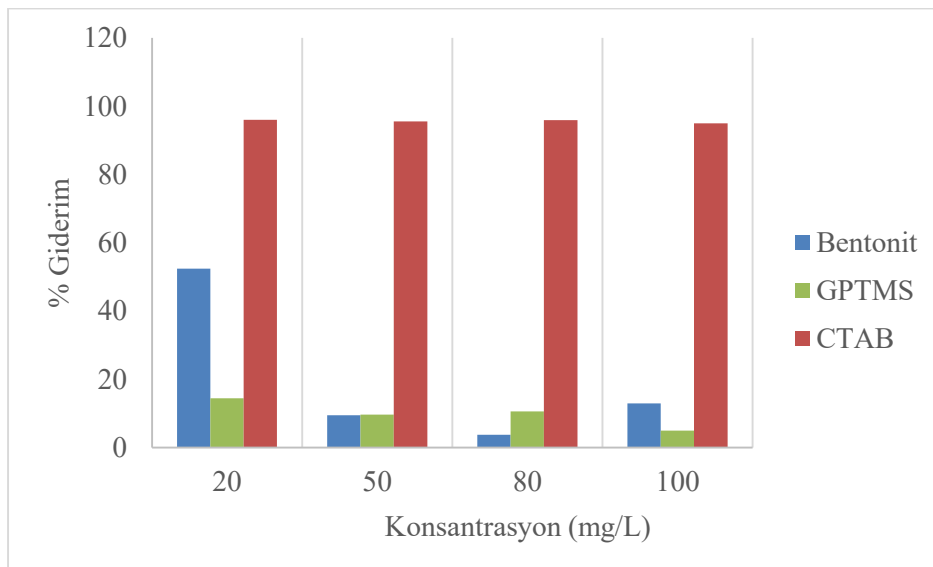
Şekil 5.9. CTAB (sol) ve GPTMS (sağ) yapıları

Modifikasyon sonucunda yükleme veriminin CTAB için yaklaşık %4, GPTMS için yaklaşık %8 oranında düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. Modifiye edilmiş bentonitin lakkaz yükleme verimi

Modifiye edilen bentonitler 20, 50, 80 ve 100 mg/L derişimde boyar madde çözeltilerinde giderim için kullanılmıştır. Saf bentonit yüksek konsantrasyonlarda düşük boyar madde giderim yüzdesi verirken, CTAB ile modifiye edilmiş bentonit, boyar madde giderim yüzdesini bariz bir şekilde artırmıştır. Şekil 5.11’de farklı bentonit türlerinin farklı derişimdeki boyar madde çözeltilerindeki giderim yüzdeleri belirtilmiştir. CTAB ile modifiye edilmiş bentonit ile boyar madde giderim yüzdesinin yüksek olması CTAB ile boyar madde arasındaki etkileşim nedeniyle olabilir (Asranudin, Purnomo, Prasetyoko, Bahruji, ve Holilah, 2022).

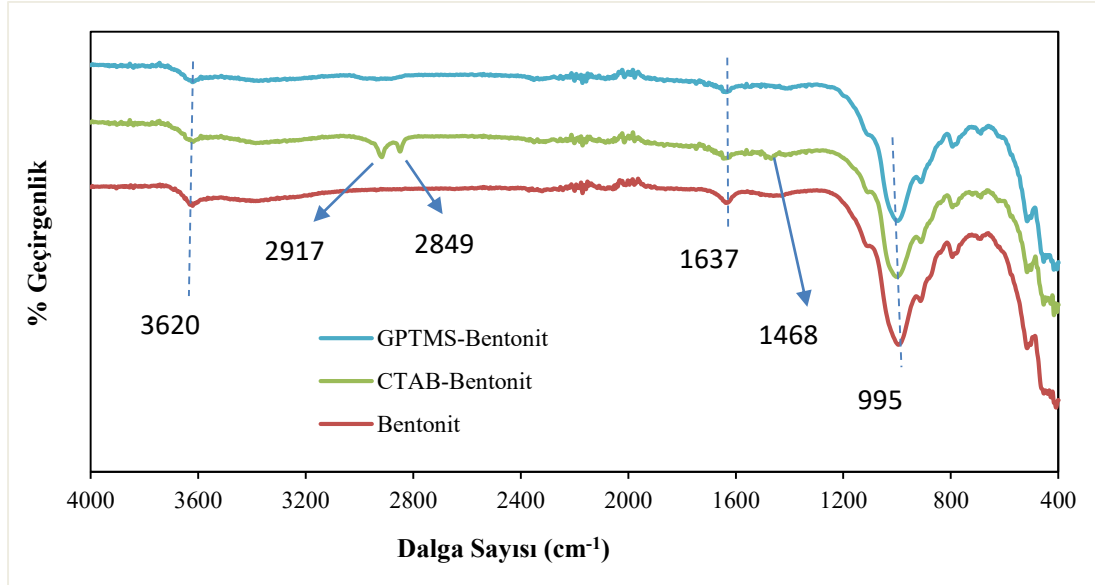


Şekil 5.11. Modifikasyonun boyar madde giderim yüzdesi (pH: 5, 30°C)

5.6. Karakterizasyon çalışmaları

5.6.1. FTIR analizi

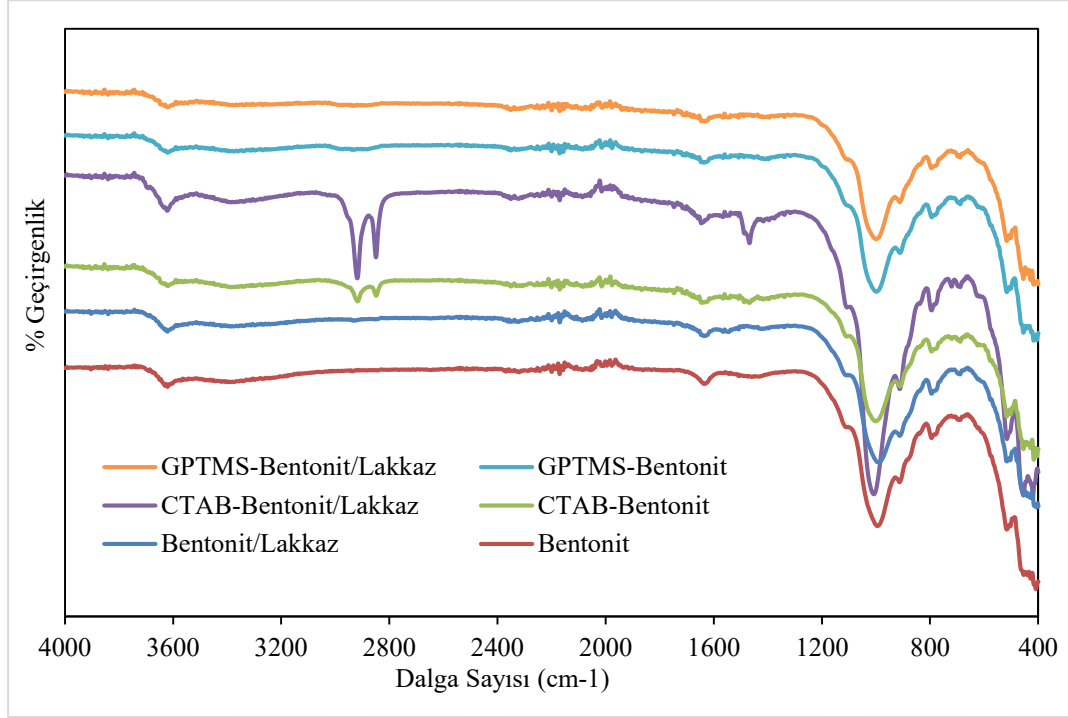
Saf bentonit, GPTMS-bentonit, CTAB-bentonit ve bu killere immobilize edilen lakkaz enzimine ait FTIR spektrumu Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Bentonit, CTAB-bentonit ve GPTMS-bentonit FTIR spektrumu

Saf bentonite ait karakteristik pikler 3620, 1637, 995, 913, 794, 688 ve 454 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelmektedir. Bu piklerden 3620 cm^{-1} 'e karşılık gelen pik bentonit yapısında tabakalar arasına adsorplanmış su moleküllerindeki hidroksil gruplarını göstermektedir. 1637 cm^{-1} 'e karşılık gelen pik kristal suya işaret etmektedir. 995 cm^{-1} ve 688 cm^{-1} 'deki pikler Si-O-Si ve Si-O titreşim gerilimlerini göstermektedir (Wen, ve diğerleri, 2019). CTAB ile modifiye edilmiş bentonit yapısına ait FT-IR piklerinde saf bentonit yapısına ait piklerin yanı sıra yeni pikler ortaya çıkmıştır. 2917 ve 2849 cm^{-1} 'de bu pikler CTAB yapısındaki C-H'ye ait asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1468'deki yeni pik ise üçüncül aminlerdeki CH₃ bağlarını göstermektedir (El-Dib, Tawfik, Eshaq, Hefni, ve ElMetwally, 2016). GPTMS modifiye bentonite ait FT-IR spektrumunda ise 2937'de gözlenen pik GPTMS'ye ait C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. CTAB ve GPTMS ile modifiye edilmiş bentonit yapısında gözlenen yeni pikler bentonitin başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir. Enzim immobilize edilmiş FTIR spektrumlarında ise yeni bir pik gözlenmemiştir. Bu durum yapıya immobilize edilmiş

lakkaz miktarının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Buna ilaveten lakkaz immobilize edilmiş CTAB/bentonite ait spektrumda karakteristik piklerin şiddetinde artış görülmüştür.



Şekil 5.13. Saf bentonit, GPTMS-Bentonit, CTAB Bentonit ve bu killerin immobilizasyonuna ait FTIR spektrumu



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, tekstil atık sularında zehirli etki gösteren Remazol Red RR boyar maddesinin bentonit kiline immobilize edilmiş lakkaz enzimi ile giderimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, aşağıda belirtilmiştir.

1. Destek malzeme miktarının immobilizasyon üzerine etkisi gösterilmiştir. 200 mg ve 600 mg destek malzeme ile hazırlanan immobilizasyon sonucunda yükleme verimi sırasıyla %85,8 ve %95,3 olarak bulunmuştur. Destek malzeme miktarı arttıkça immobilizasyon veriminin arttığı tespit edilmiştir. İmmobilizasyon verimi 200 mg ve 600 mg bentonit için sırasıyla, %37,2 ve %61,46 olarak tespit edilmiştir.

2. Serbest lakkaz enzimi ile immobilize lakkaz enziminin aktivitesi belirlenerek, immobilize lakkaz enziminin aktivitesine etki eden immobilizasyon süresi belirlenmiştir. 4, 12 ve 24 saatlik immobilizasyonlar sonucunda sırasıyla, %97; %92,07 ve %97,15 yükleme verimi elde edilmiştir. Bununla beraber lakkaz enziminin destek malzemeye yükleme miktarı 4, 12 ve 24 saatlik immobilizasyon için sırasıyla, %61,46; %2,04 ve %27,70 olarak bulunmuştur.

3. Lakkaz enzimi derişiminin immobilizasyon üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Bu sebeple hazırlanan; 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml derişimlerdeki lakkaz enzimi immobilize edilen bentonitin yükleme verimi sırasıyla, %95,25; %98,25 ve %99,43 olarak belirlenmiştir. Enzim miktarı arttıkça da immobilizasyon veriminin arttığı tespit edilmiştir. İmmobilizasyon verimi, 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml derişimlerdeki lakkaz enzimi için sırasıyla, %61,46; %82,01; %47,55 olarak bulunmuştur.

4. Lakkaz enziminin farklı pH ortamlarındaki aktivitesi pH 4 ve pH 8 aralığında çalışılmıştır. Serbest enzim aktivitesinin pH 4 çözeltisinde en düşük olduğu belirlenmiştir. Serbest enzim aktivitesi pH 4'ten pH 6'ya kadar artarken, pH 6'dan sonra azalma göstermiştir. Aktivite, pH 6 ortamında en yükseğe ulaşmıştır. Bentonit ile immobilize edilen lakkaz enzimi pH 5 ile pH 8 aralığında aktivite göstermiştir. CTAB ve GPTMS ile modifiye edilen bentonit dar bir aralıkta aktivite göstermektedir (pH 5 ve pH 6).

5. İmmobilize bentonit boyar madde giderimi için kullanılmıştır. 20 mg/L konsantrasyonundaki Remazol Red (RR) boyar maddesi giderimi için 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml oranında enzimsiz bentonit ve immobilize bentonit pH 5 ortamında bekletilmiştir. 20 dk sonunda, enzimsiz bentonit giderimi 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml için sırasıyla, %2,6; %5,9 ve %10,4 olarak bulunurken, immobilize bentonit kullanılarak aynı şartlarda gerçekleştirilen parçalama sonucu boyar madde giderimi sırasıyla, %12,7; %33,3 ve %52,4 olarak tespit edilmiştir. Ortamdaki immobilize bentonit, enzimsiz bentonite kıyasla giderim verimini yaklaşık 6 kat arttırmıştır.

6. İmmobilize enzimin farklı konsantrasyonlardaki giderim verimi çalışılmıştır. 20, 50, 80 ve 100 mg/L Remazol Red RR boyar maddesi konsantrasyonlarında hazırlanan boyar madde çözeltileri üzerinde pH 5 ortamında ve 20 dk sonunda immobilize enzimin giderim miktarı belirlenmiştir. İmmobilize enzim miktarı her farklı boyar madde konsantrasyonu için 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml olarak değiştirilmiştir. 20, 50, 80 ve 100 mg/L konsantrasyonlardaki giderim yüzdesi 1 mg/ml immobilize bentonit için sırasıyla, %12,74; %5,55; %10,34 ve %5,52 olarak bulunurken, 2 mg/ml immobilize bentonit için sırasıyla, %33,25; %7,36; %2,75 ve %6,87; 4 mg/ml immobilize bentonit için ise sırasıyla, %52,36; %9,47; %3,76 ve %12,93 olarak bulunmuştur.

7. Boyar maddelerin giderimi için kullanılan enzimin aktivitesini arttırmak amacıyla ortama enzim medyatörleri eklenmiştir ve boyar madde giderimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Medyatör olarak VLA, HBT, ABTS ve TEMPO kullanılmıştır. 50 mg/L boyar madde konsantrasyonunda, ortama eklenen medyatörün boyar madde giderimin arttırdığı gözlemlenmiştir. Medyatörlü ortamdaki boyar madde giderim verimi VLA, HBT, ABTS ve TEMPO için sırasıyla; %8,19; %5,93; %11,86; %17,27 olmuştur. Boyar madde giderim veriminde en az artış HBT kullanılan ortamda olurken, en çok artış TEMPO kullanılan ortamda gözlemlenmiştir.

8. Bentonit tabakaları arasındaki genişliği arttırmak ve immobilizasyon sonucu daha yüksek bir verime ulaşmak için bentonit CTAB ve GPTMS ile modifiye edilmiştir. Modifiye bentonitlerde yükleme veriminin az bir miktar düştüğü görülürken, ortama yüklenen lakkaz miktarının ise arttığı tespit edilmiştir. Yükleme verimi saf bentonit için %98,25; CTAB bentonit için %94,54 ve GPTMS bentonit için %90,47 olarak tespit edilmiştir. Bentonit

tabakaları arasına yüklenen lakkaz yükleme verimi ise saf bentonit için %9,14; CTAB bentonit için %26,56 ve GPTMS bentonit için %14,89 olarak bulunmuştur. Modifikasyon sonucu ortamda bulunan lakkaz miktarı GPTMS bentonit için saf bentonite göre yaklaşık %60 oranında artış gösterirken, CTAB bentonit için yaklaşık %200 artış göstermiştir.

9. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır. Bu sebeple immobilize enzim 20 mg/L boyar madde konsantrasyonunda pH 5, 30°C sıcaklık ortamında 5 kez tekrar kullanılmıştır. Boyar madde giderimi ilk kullanımda %9,91 iken, 5 tekrar sonucunda boyar madde giderimi %8,49'a düşmüştür. 5 tekrar sonucunda enzim aktivitesinin %32'sini korumaya devam etmektedir.

Gelecek çalışmalar için öneriler aşağıda belirtilmiştir:

1. Farklı boyar maddeler üzerinde çalışılabilir,
2. Çapraz bağlayıcılar kullanılarak etkileri incelenebilir,
3. Farklı sıcaklıkta serbest enzimin davranışı incelenebilir,
4. Farklı pH ve sıcaklıkta immobilize enzimin davranışı gözlemlenebilir,
5. Farklı destek malzeme ve immobilizasyon süreleri ile çalışma zenginleştirilebilir,
6. Destek malzemenin farklı modifikasyonları çalışmaya dahil edilebilir,
7. İmmobilize enzimin depolama kararlılığı incelenebilir,
8. Medyatörlü ortamdaki davranış modifiye bentonitler için immobilizasyon, pH ve sıcaklık açısından çalışılabilir.



KAYNAKLAR

- Alkan, S., Ceylan, H., and Arslan, O. (2005). Bentonite-supported catalase. *Journal of The Serbian Chemical Society*, 70(5), 721-726.
- Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S., and Iqbal, H. M. (2014). Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (101), 56-66.
- Asranudin, Purnomo, A. S., Prasetyoko, D., Bahruji, H., and Holilah. (2022). Single-step synthesis and modification of CTAB-hectorite for efficient adsorption of methyl orange dye. *Materials Chemistry and Physics*, (291), 126749.
- Azam, A., Muhammad, G., Raza, M. A., Iqbal, M. M., Aslam, M. S., Ashraf, A., and Saif, T. (2022). Aerobic Biological Units in Dye Removal. A. Khadir, & S. S. Muthu içinde, *Sustainable textiles: production, processing, manufacturing & chemistry; biological approaches in dye-containing wastewater*, (No.1) Hong Kong: Springer, 59.
- Bickerstaff, G. F. (1997). *Immobilization of enzymes and cells*. (No.1). New Jersey: Humana Press, 1-10.
- Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., and Iqbal, H. M. (2017). Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants - A review. *Science of the Total Environment*, (576), 646-659.
- Brena, B., Gonzalez-Pombo, P., and Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. J. M. Guisan içinde, *Immobilization of enzymes and cells*. Madrid: Humana Press, 15-31.
- British Geological Survey. (2022). *World mineral production 2016-20*. (No.1). Nottingham: UK Research and Innovation (UKRI), 8-9.
- Cengiz, S., Çavaş, L., and Yurdakoç, K. (2012). Bentonite and sepiolite as supporting media: Immobilization of catalase. *Applied Clay Science*, (65-66), 114-120.
- Chacko, J. T., and Subramaniam, K. (2011). Enzymatic Degradation of Azo Dyes - A Review. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6), 1250-1260.
- Chakrabarti, R. (2018). Textile Effluents: Types and Prominent Hazards. M. Yusuf içinde, *Handbook of textile effluent remediation*, (No.1). Singapore: Pan Stanford Publishing, 44.
- Chen, J.-P., and Lin, Y.-S. (2007). Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate-silica sol-gel beads. *Process Biochemistry*, (42), 934-942.
- Chen, Z., Oh, W.-D., and Yap, P.-S. (2022). Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review. *Chemosphere*, (307), 135824.

- Choudhary, M., Peter, C. N., Shukla, S. K., Govender, P. P., Joshi, G. M., and Wang, R. (2020). Environmental Issues: A Challenge for Wastewater Treatment. M. Naushad, & E. Lichtfouse içinde, *Environmental chemistry for a sustainable world: green materials for wastewater treatment*. (No.1). Riyadh:Springer, 1-12.
- Choudhury, A. K. (2018). Textile Effluents: Types and Prominent Hazards. M. Yusuf içinde, *Handbook of textile effluent remediation*, (No.1). Singapore: Pan Stanford Publishing, 1-42.
- Clarke, K. G. (2013). *Bioprocess Engineering An Introductory Engineering and Life Science Approache*, Woodhead Publishing, 75-96.
- Daassi, D., Rodriguez-Couto, S., Nasri, M., and Mechichi, T. (2014). Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (90), 71-78.
- Dünya Sağlık Örgütü. (2005). Environmental Health Criteria. *Bentonite, kaolin, and selected clay minerals*. Geneva: Dünya Sağlık Örgütü, 9.
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme immobilization advances in industry, agriculture, medicine, and the environment*, (No.1). New Delhi: Springer, 21-44.
- El-Dib, F., Tawfik, F., Eshaq, G., Hefni, H., and ElMetwally, A. (2016). Remediation of distilleries wastewater using chitosan immobilized Bentonite and Bentonite based organoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, (86), 750-755.
- Eren, E. (2009). Removal of basic dye by modified Unye bentonite. *Journal of Hazardous Materials*, (162), 1355-1363.
- Fernandez-Fernandez, M., Sanroman, M. A., and Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, (31), 1808-1825.
- Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., and Sedaghat, M. (2009). Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science*, (43), 289-295.
- Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., and Sedaghat, M. (2009). Enzyme immobilization: Part 2 Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, (43), 308-316.
- Hassan, M. E., Tamer, T. M., and Omer, A. M. (2016). Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(6), 385-392.
- Huang, R., Zhang, L., Hu, P., and Wang, J. (2016). Adsorptive removal of Congo red from aqueous solutions using crosslinked chitosan and crosslinked chitosan immobilized bentonite. *International Journal of Biological Macromolecules*, (86), 496-504.
- Hürmüzlü, R., Okur, M., and Saraçoğlu, N. (2021). Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on chitosan/halloysite as a biocatalyst in the Remazol Red RR dye. *International Journal of Biological Macromolecules*, (192), 331-341.

- İnternet: Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü (MTA). *Türkiye Maden Yatakları Haritaları*. URL: https://www.mta.gov.tr/v3.0/sayfalar/hizmetler/images/b_h/kil_bentonit.jpg Son Erişim Tarihi: 20-05-2019.
- Júnior, L. P., Câmara, I. R., A. B. S. da Silva, F. M., Motteran, F., Fernandes, B. S., and Gavazza, S. (2022). Overview of Biological Technologies for Azo Dye Removal. A. Khadir, & S. S. Muthu içinde, *Sustainable textiles: production, processing, manufacturing & chemistry biological approaches in dye-containing wastewater*, (No.1). Hong Kong: Springer, 1.
- Liu, Q., Yang, B., Zhang, L., and Huang, R. (2015). Adsorption of an anionic azo dye by cross-linked chitosan/bentonite composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, (72), 1129-1135.
- Liu, S. (2013). *Bioprocess engineering kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*, (No.1). New York: Elsevier, 323-390.
- Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü. (2018). *Dünyada ve Türkiye'de bentonit*. Ankara: Fizibilite Etütleri Daire Başkanlığı, 14.
- Mehandia, S., Ahmad, S., Sharma, S. C., and Arya, S. K. (2022). Decolorization and detoxification of textile effluent by immobilized laccase-ACS into chitosan-clay composite beads using a packed-bed reactor system: An ecofriendly approach. *Journal of Water Process Engineering*, (47), 102662.
- Melo, J. S., Triphati, A., Kumar, J., Mishra, A., Sandaka, B. P., and Bhainsa, K. C. (2021). Immobilization: Then and Now. A. Triphati, & J. S. Melo içinde, *Immobilization strategies biomedical, bioengineering and environmental applications*, (No.1). Berdfordshire: Springer Nature Singapore, 4.
- Moehlenbrock, M. J., and Minter, S. D. (2011). Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. S. D. Minter içinde, *Enzyme stabilization and immobilization methods and protocols*, (No.1). St. Louis: Humana Press, 1-7.
- Pandey, S. (2017). A comprehensive review on recent developments in bentonite-based materials used as adsorbents for wastewater treatment. *Journal of Molecular Liquids*, (241), 1091-1113.
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., and Duran, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*, (42), 131-144.
- Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002). Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663-37669.
- Pusch, R. (2015). *Bentonite clay environmental properties and applications*, (No.1). North Western: CRC Press, 23.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 24(5), 219-226.

- Roberts, S. M., and Gibb, A. J. (2013). Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. In R. Ganellin, S. Roberts, & R. Jefferis (Eds), *Introduction to biological and small molecule drug research and development*, Oxford: Academic Press, 1-55.
- Sedaghat, M., Ghiaci, M., Aghaei, H., and Soleimanian-Zad, S. (2009). Enzyme immobilization. Part 3 Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, (46), 125-130.
- Shuler, M. L., and Kargi, F. (2001). *Bioprocess engineering basic concepts*. (No.2). New Jersey:Prentice Hall, 57-105.
- Singh, R. L., Singh, P. K., and Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (104), 21-31.
- Singh, R. L., Singh, P. K., and Singh, R. P. (2020). *Recent advances in decolorization and degradation of dyes in textile effluent by biological approaches*. Uttar Pradesh: CRC Press, 11-31.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, (96), 2563-2606.
- Tabak, A., Afsin, B., Caglar, B., and Koksall, E. (2007). Characterization and pillaring of a Turkish bentonite (Resadiye). *Journal of colloid and Interface Science*, (313), 5-11.
- Tan, W. S., and Ting, A. S. (2014). Alginate-immobilized bentonite clay: Adsorption efficacy and reusability for Cu (II) removal from aqueous solution. *Biosource Technology*, (160), 115-118.
- Tischer, W., and Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatalysis - from discovery to application. Topics in current chemistry içinde* (No.200). Berlin, Heidelberg: Springer, 95-126.
- Toor, M., Jin, B., Dai, S., and Vimonses, V. (2015). Activating natural bentonite as a cost effective adsorbent for removal of Congo-red in wastewater. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, (21), 653-661.
- Wen, X., Zeng, Z., Du, C., Huang, D., Zeng, G., Xiao, R., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Wan, J., Hu, L., Yin, L., Zhou, C., and Deng, R. (2019). Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere*, (222), 865-871.
- Zheng, F., Cui, B.-K., Wu, X.-J., Meng, G., Liu, H.-X., and Si, J. (2016). Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (110), 69-78.
- Zhou, W., Zhang, W., and Cai, Y. (2021). Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, (403), 126272.



EKLER

EK-1. Dünyadaki bentonit üretim miktarları (2016-2020) (British Geological Survey, 2022)

Ülke	2016	2017	2018	2019	2020
Ermenistan					
Bentonit	5 543	11 724	21 029	32 424	5 956
Azerbaycan					
Bentonit	49 328	225 288	212 336	222 519	155 112
Bosna Hersek					
Bentonit	102 858	92 344	87 358	94 601	69 183
Bulgaristan					
Bentonit	37 100	54 100	* 54 000	* 54 000	* 54 000
Güney Kıbrıs					
Bentonit	117 184	95 593	98 800	83 113	92 645
Çekya					
Bentonit	374 000	254 000	277 000	357 000	226 000
Danimarka					
Bentonit	66 278	69 594	56 173	48 197	40 054
Fransa					
Bentonit	42 567	24 497	35 696	* 36 000	* 36 000
Gürcistan					
Bentonit	* 20 000	* 21 000	25 894	27 872	25 872
Almanya					
Bentonit	393 000	416 000	379 000	366 000	335 000
Yunanistan					
Bentonit	883 220	1 087 800	1 355 000	1 300 000	1 170 000
Attapulgit	44 500	54 280	53 300	36 700	28 050
Macaristan					
Bentonit	16 006	9 852	35 156	33 166	* 30 000
İtalya					
Bentonit	45 978	86 106	100 067	82 720	65 989
Kuzey Makedonya					
Bentonit	1 968	912	2 945	682	2 196
Polonya					
Bentonit	1 000	—	560	500	920
Romanya					
Bentonit	26 758	33 777	34 809	41 964	45 495
Rusya					
Bentonit	589 000	91 000	50 100	* 50 000	* 50 000
Slovakya					
Bentonit	158 000	226 082	270 000	251 000	275 570
Slovenya					
Bentonit	182	147	113	99	77
İspanya					
Bentonit	155 038	177 565	178 463	160 477	221 495
Attapulgit	28 809	58 952	28 021	30 348	30 653
Sepiolit	518 699	482 550	698 058	595 448	531 660
Türkiye					
Bentonit	1 744 912	1 481 617	1 331 955	1 533 547	1 658 837
Sepiolit	56 038	15 624	26 300	68 999	65 427
Ukrayna					
Bentonit	* 210 000	113 000	178 000	180 000	* 180 000
Cezayir					
Bentonit	37 200	35 600	36 000	36 700	* 36 000
Angola					
Sabun Kili	* 98 000	* 98 000	* 98 000	* 98 000	* 98 000
Mısır					
Bentonit	* 1 900	* 4 600	* 9 600	* 6 900	* 500
Kenya					
Bentonit	* 110	* 110	* 110	* 110	* 110
Fas					
Bentonit	103 266	174 546	172 749	188 080	* 188 000
Sabun Kili	141 760	119 070	99 256	99 790	* 99 000
Mozambik					
Bentonit	322	284	* 290	77 734	80 189
Senegal					
Attapulgit	172 300	165 900	177 900	197 673	201 919
Güney Afrika					
Bentonit	148 742	165 141	173 486	105 084	85 688
Attapulgit	16 374	18 333	17 121	11 422	11 957

EK-1 (devam). Dünyadaki bentonit üretim miktarları (2016-2020) (British Geological Survey, 2022)

Ülke	2016	2017	2018	2019	2020
Kanada					
Bentonit	468	*—	*—	*—	*—
Küba	389	589	630	504	486
Bentonit					
Guatemala					
Bentonit	18 081	20 562	16 953	850	371
Meksika					
Bentonit	109 176	148 475	264 800	24 321	* 24 000
Sabun Kili	111 713	110 860	—	*—	—
ABD					
Bentonit	3 600 000	4 430 000	4 670 000	4 490 000	* 4 300 000
Sabun Kili	1 860 000	1 840 000	1 880 000	1 920 000	* 2 000 000
Arjantin					
Bentonit	145 723	121 735	184 969	113 750	46 288
Bolivya	525	68	2	*—	*—
Bentonit					
Brezilya Bentonit	352 920	* 350 000	* 350 000	* 350 000	* 350 000
Sili					
Bentonite	1 288	1 584	525	395	170
Kolombiya	* 9 000	* 9 000	* 9 000	* 9 000	* 9 000
Bentonit					
Peru					
Bentonit	19 410	756	2 384	46 887	25 532
Uruguay					
Bentonit	6 650	6 640	7 760	6 726	16 550
Burma					
Bentonit	600	600	—	* 500	* 500
Cin					
Bentonit	* 5 600 000	* 5 600 000	* 5 600 000	* 2 000 000	* 2 000 000
Hindistan					
Bentonit	2 837 896	3 313 358	3 385 450	* 3 400 000	* 3 500 000
Sabun Kili	478 204	797 684	553 294	* 550 000	* 730 000
Endonezya					
Bentonit	* 6 000	* 6 000	* 6 000	* 6 000	* 6 000
İran					
Bentonit	842 421	723 718	731 908	1 021 481	* 1 100 000
Irak					
Bentonit	* 6 300	* 6 300	* 6 300	* 6 300	* 6 300
Japonya					
Bentonit	* 420 000	* 420 000	* 420 000	* 420 000	* 420 000
Güney Kore					
Bentonit	63 834	47 306	31 824	43 886	5 314
Sabun Kili	81 688	115 568	118 177	185 718	71 855
Pakistan					
Bentonit	42 038	42 770	74 268	47 525	* 45 000
Sabun Kili	13 740	18 185	9 188	12 529	* 12 000
Filipinler					
Bentonit	3 361	1 249	658	* 650	* 650
Özbekistan					
Bentonit	* 40 000	* 40 000	12 559	32 588	48 739
Avustralya Bentonit					
Bentonit	90 917	116 762	87 330	56 215	42 713
Sabun Kili	12 200	11 871	* 10 000	* 8 000	* 9 000
Yeni Zelanda					
Bentonit	* 750	* 750	* 750	* 750	* 750
Dünyadaki toplam	19 500 000	20 400 000	21 000 000	17 400 000	17 100 000
Dünyadaki toplam sabun	3 600 000	3 900 000	3 800 000	3 800 000	3 900 000

EK-2: Deneysel çalışmalar için kullanılan Çankırı bentonitinin özellikleri

Özellikler	Birim	Sonuç
Nem miktarı	%	9,5
Şişme miktarı	ml	26
Kireç (Asit ile köpürme)	var/yok	Yok
Metilen Blue	ml	26
Yanma kaybı	%	6,1
Sinter miktarı	°C	1150
İlave su miktarı	ml	35
Gaz geçirgenliği	cm ³ /g	220
Likit-limit miktarı		630
Kompaktbilité	%	40
Karışım nem	%	2,66
Numune ağırlığı	g	148
Yaş mukavemet	N/cm ³	24,5
Kuru mukavemet	N/cm ³	42
Ezme mukavemet	N/cm ³	4,1
Kesme mukavemeti	N/cm ³	6,25
Yaş çekme mukavemeti	N/cm ³	0,42
E- faktörü		3
Jelleşme miktarı	ml/g	20
pH miktarı		9,5
Çökme miktarı	%	0
Yoğunluk	g/cm ³	0,9
Ensilin miktarı	100 ml/g	650
Montmorillonit miktarı	mg MB/g	78
150 µm elek üstü	%	1,2
75 µm elek üstü	%	9,25
SiO ₂	%	62,01
Al ₂ O ₃	%	15,21
Fe ₂ O ₃	%	6,58
CaO	%	1,19
MgO	%	2,28
K ₂ O	%	1,13
Na ₂ O	%	1,59



Gazili olmak ayrıcalıktır