

T.C.  
ORDU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ ENZİMİNİN ARMUT KABUĞU, AKASYA YAPRAĞI VE  
KAOLİN ADSORBANLARI ÜZERİNDEKİ  
İMMOBİLİZASYONUN İZOTERM VE KİNETİĞİNİN  
İNCELENMESİ

ÜMİT TURGUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2017

## TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Ümit TURGUT tarafından hazırlanan ve Doç. Dr. Salih ALKAN danışmanlığında yürütülen “Lipaz Enziminin Armut Kabuğu, Akasya Yaprağı ve Kaolin Adsorbanları Üzerindeki İmmobilizasyonun İzoterm ve Kinetiğinin İncelenmesi ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 17 / 05 / 2017 tarihinde oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Salih ALKAN

Başkan : Doç. Dr. Salih ALKAN  
Kimya, Ordu Üniversitesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Sedat KELEŞ  
Kimya, Karadeniz Teknik Üniversitesi

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ  
Kimya, Ordu Üniversitesi

İmza : 

ONAY:

31 / 05 / 2017 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01 / 06 / 2017 tarih ve 2017 / 242 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

 Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Kürşat KORKMAZ

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İmza

Ümit TURGUT



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

## ÖZET

### LİPAZ ENZİMİNİN ARMUT KABUĞU, AKASYA YAPRAĞI VE KAOLİN ADSORBANLARI ÜZERİNDEKİ İMMOBİLİZASYONUN İZOTERM VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Ümit TURGUT

Ordu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı, 2017  
Yüksek Lisans Tezi, 64s.

Danışman: Doç. Dr. Salih ALKAN

Bu çalışmada, adsorban olarak Van yöresinde elde edilen armut kabuğu, akasya yaprağı (Trabzon) ve kaolin killerine lipaz enziminin (E.Ü. 5-15 units/mg. Protein) adsorpsiyonu incelendi. Sodyum fosfat tamponunun farklı pH (4-10) değerlerinde aktivite tayinleri yapılarak immobilize enzim için optimum pH değeri 9 civarında belirlendi. Serbest ve bağlı enzimlerle farklı sıcaklıklarda (20-70°C) çalışıldı ve optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi.

Farklı substrat konsantrasyon miktarları alınarak aktivite tayini yapıldı.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek için Micheals Menten denklemi ve Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanılarak serbest enzim için  $V_{max}$ :2.50µmol/dk ve  $K_m$ :2.23mM, immobilize enzim(arbut kabuğu) için  $V_{max}$ :4.71µmol/dk ve  $K_m$ :2.18mM, immobilize enzim (kaolin) için  $K_m$ :2.24 mM - $V_{max}$ :7.69 µmol/dk, immobilize enzim (akasya yaprağı) için ise  $K_m$ :2,21mM - $V_{max}$ :3,5µmol/dk olarak bulundu.

Lagergren yalancı birinci derece hız denklemi dikkate alınarak adsorban maddenin adsorplama gücünün etkisi olan  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri belirlendi. Sonuç olarak Armut Kabuğu için  $q_e$ : 1.43,  $k_1$ : 0.144, Kaolin için  $q_e$ : 37.2,  $k_1$ : 0.088 ve Akasya Yaprığı için  $q_e$ : 9.94,  $k_1$ :0.103 değerleri bulundu. Endüstriyel üretimde kullanılacak aktif kömür iki ay boyunca aktivitesini % 78.09'nu kaolin aktivitesini % 81.81 oranında ve akasya yaprağı ise aktivitesini % 73.7 'ni koruduğu tespit edildi.

Termodinamik parametrelerden adsorpsiyon entalpisi ( $\Delta H$ ), Gibbs serbest entalpisi ( $\Delta G$ ) ve adsorpsiyon entropisi ( $\Delta S$ ) değerleri hesaplandı.

Sonuç olarak elde edilen verilerden kaolin ve aktif karbonun daha iyi adsorban olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Adsorpsiyon, Armut kabuğu, Akasya yaprağı, Lipaz enzimi ve Kaolin

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ISOTHERMS AND KINETICS OF IMMOBILIZATION OF LIPASE ENZYME ON PEAR SHELL, ACACIA LEAF AND KAOLIN ADSORBENTS

Ümit TURGUT

University of Ordu  
Institute for Graduate Studies in Science and Technology  
Department of Chemistry, 2017  
MSc. Thesis, 64p.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih ALKAN

In this study, the adsorption of lipase enzyme in pear peel, acacia leaf and kaolin clay obtained in van region as adsorbent was investigated. The activity of sodium phosphate buffer was determined at different pH values and the optimum pH value for the immobilized enzyme was determined as 9. Free and bound enzymes were studied at different temperatures and the optimum temperature was determined to be 40 degrees.

Activity determinations were made by taking different amounts of substrate concentration.  $V_{max}$ : 2.50mmol / min and  $K_m$ : 2.23mM for the free enzyme,  $V_{max}$ : 4.71mmol / min and  $K_m$ : 2.18mM for the immobilized enzyme (pear shell), by using the micheals menten equation and Lineweaver-Burk graph to determine  $V_{max}$  and  $K_m$  values for immobilized enzyme (kaolin)  $K_m$ : 2.24mM- $V_{max}$ :7.69mmol/ min for immobilized enzyme (acacia leaf),  $K_m$ : 2.21mM- $V_{max}$  3.5mmol/min.

Taking into account the Lagergren pseudo first-order velocity equation, the values of  $k_1$  and  $q_e$ , which are influenced by the adsorption power of the adsorbent, were determined. As a result, the values of  $q_e$ : 1.43,  $k_1$ : 0.144,  $q_e$ : 37.2  $k_1$ : 0.088 and  $q_e$ : 9.94,  $k_1$ : 0.103 were found for Pear shells, kaolin and acacia leaf, respectively. It was found that active coal used in industrial production maintained activity for two months at 78.09%, kaolin activity 81.81% and acacia leaf activity 73.7%. Adsorption enthalpy, Gibbs free enthalpy and adsorption entropy values were calculated from the thermodynamic parameters.

As a result, kaolin and active carbon were found to be better adsorbent according to the obtained data.

**Keywords:** Acacia leaf, Adsorption, Kaolin, Lipase enzyme and Pear Shell

## TEŞEKKÜR

Tüm çalıőmalarım boyunca her zaman bilgi ve deneyimleriyle yolumu aan değerli hocam Doç. Dr. Salih ALKAN'a en içten teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmada malzeme ve materyal temini için yardım eden Kimya Bölümü Lab. Sorumlusu İlhan İRENDE' ye teşekkür ederim. Hem bu zorlu ve uzun süreçte hem de hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleőtirmemi sağlayan değerli aileme yürekten teőekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalıőmalarım boyunca destek ve yardımlarını aldığım değerli arkadaşlarım Mehmet YAMAN, Mehmet Sani MAT, Derya YAMAN, Nilgün DÜKAR, Songül KIRLAK, Nesrin KURT ve Selma TUNÇ'a teşekkür ederim.

Ayrıca TF-1536 numaralı Yüksek Lisans Tez Projesi olarak destek veren Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	VI
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....	VII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	VIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Aktif Karbon.....	3
1.2. Aktif Karbon Özellikleri.....	3
1.2.1. Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu.....	4
1.2.2. Aktif Karbon Türleri.....	5
1.2.3. Aktivasyon Teknikleri.....	5
1.2.4. Aktif Karbon Kullanım Alanları.....	5
1.3. Kaolin.....	5
1.4. Adsorpsiyon.....	7
1.4.1. Adsorpsiyon Çeşitleri.....	7
1.4.2. Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler.....	8
1.4.2.1. Adsorpsiyon Ortamının pH Değeri.....	8
1.4.2.2. Adsorpsiyon Sıcaklığı.....	9
1.4.2.3. Adsorpsiyon Hızı.....	9
1.4.2.4. Adsorban Maddeler.....	9
1.4.3. Adsorpsiyon İzotremleri.....	10

1.4.3.1.	Langmuir İzoterm Denklemi.....	10
1.4.3.2.	Freundlich İzoterm Denklemi.....	10
1.4.4.	Adsorpsiyon Kinetiği.....	11
1.4.5.	Adsorpsiyon Termodinamiği.....	12
1.5.	Enzim İmmobilizasyonu.....	13
1.5.1.	Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
1.6.	Lipaz Enzimi.....	14
1.6.1.	Lipazların Özellikleri.....	17
1.6.1.1.	Optimum pH.....	17
1.6.1.2.	Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılık.....	18
1.6.1.3.	Lipazın Aktivasyon ve İnhibisyonu.....	18
1.6.1.4.	Lipazın İzoelektrik Noktası (pI).....	18
1.6.2.	Lipazların Kaynakları.....	18
1.6.3.	Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	18
<b>2.</b>	<b>ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>26</b>
3.1.	Materyal.....	26
3.1.1.	Kullanılan Araç ve Gereçler.....	26
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	26
3.2.	Aktif Karbon ve Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	26
3.2.1.	Aktif Karbon Hazırlanması.....	26
3.2.2.	Akasya Yaprağının Hazırlanması.....	27
3.2.3.	Kaolinin Hazırlanması.....	27
3.2.4.	0.1M NaOH Hazırlanması.....	27
3.2.5.	0.1M Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....	27
3.2.6.	0.1M NaCl Hazırlanması.....	27
3.2.7.	0.1M Lipaz Enzim Çözeltisinin Hazırlanması.....	27



3.2.8.	0.1M Substrat Çözeltisinin Hazırlanması.....	27
3.3.	Yöntem.....	28
3.3.1.	Serbest ve Bağlı Enzimlere pH'nın Etkisi.....	28
3.3.2.	Serbest ve Bağlı Enzimlere Sıcaklığın Etkisi.....	28
3.3.3.	Serbest ve Bağlı Enzimlere İyonik Şiddetin Etkisi.....	29
3.3.4.	Bağlı Enzimlerin Operasyon Süresinin Belirlenmesi.....	29
3.3.5.	Serbest ve Bağlı Enzimlerin Vmax ve Km Değerlerinin belirlenmesi.....	29
3.3.6.	Bağlı Enzimlerin Maksimum Tutunma sürelerinin Belirlenmesi.....	29
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>30</b>
4.1.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait Çizelge ve Grafikler.....	30
4.1.1.	Serbest Enzim İçin Kinetik ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Sabit Değerlerinin Belirlenmesi.....	30
4.1.2.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğinden Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	32
4.1.3.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğinden Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	33
4.1.4.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğinden Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi.....	35
4.1.5.	Bağlı Enzimin (Armut Kabuğu) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri.....	36
4.1.6.	İmmobilize Enzim (Armut Kabuğu) İçin Lagargen Grafikleri.....	36
4.1.7.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait İmmobilize Enzim İçin Hesaplanan Değerleri.....	37
4.2.	Kaolin Örneğine Ait Çizelge ve Grafikler.....	39
4.2.1.	Kaolin Bağlı Enzim İçin Kinetik ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Sabit Değerlerinin Belirlenmesi.....	39
4.2.2.	Kaolin Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	40
4.2.3.	Kaolin Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	41
4.2.4.	Kaolin Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi.....	42

4.2.5.	Bağlı Enzimin (Kaolin) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri.....	43
4.2.6.	İmmobilize Enzim (Kaolin) İçin Lagargen Grafikleri.....	44
4.2.7.	Kaolin Örneğine Ait İmmobilize Enzim İçin Hesaplanan Değerler.....	45
4.3.	Akasya Yapradı Örneğine Ait izelge ve Grafikler.....	47
4.3.1.	Akasya Yapradı Bağlı Enzim İçin Kinetik ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Sabit Değerlerinin Belirlenmesi.....	47
4.3.2.	Akasya Yapradı Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	47
4.3.3.	Akasya Yapradı Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	48
4.3.4.	Akasya Yapradı Örneğinde Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi.....	49
4.3.5.	Bağlı Enzimin (Akasya Yapradı) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri.....	50
4.3.6.	İmmobilize Enzim (Akasya Yapradı) İçin Lagargen Grafikleri.....	51
4.3.7.	Akasya Yapradı Örneğine Ait İmmobilize Enzim İçin Hesaplanan Değerleri.....	52
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>59</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>64</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Kaolin Mineralinin Yapısı.....	6
Şekil 1.2.	Humicola Lanuginosa Lipazının Üç Boyutlu Yapısı.....	15
Şekil 1.3.	Açık ve Kapalı Kısımlarında Eklendiği Cadida Rugosa Lipazın Üç Boyutlu Yapısı.....	17
Şekil 4.1.	Serbest Enzim İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri Grafiği.....	31
Şekil 4.2.	İmmobilize Enzim İçin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerleri Grafiği.....	32
Şekil 4.3.	Serbest Ve Bağlı Enzimin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Grafiği.....	33
Şekil 4.4.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait Serbest Ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafiği.....	34
Şekil 4.5.	Serbest Ve Bağlı Enzim Üzerine İyonik Şiddet Etkisi Grafiği.....	35
Şekil 4.6.	İmmobilize Enzimin (Armut Kabuğu) İki Ay Süresindeki Aktive Değişimi Grafiği.....	36
Şekil 4.7.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi Grafiği.....	37
Şekil 4.8.	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait $\ln k_d/T-1/T$ Grafiği.....	39
Şekil 4.9.	Kaolin İmmobilize (Bağlı) Enzim İçin $V_{max}$ ve $K_m$ Grafiği.....	40
Şekil 4.10.	Serbest ve Bağlı Enzim (Kaolin) Aktivitesi Üzerine pH Etkisi Grafiği.....	41
Şekil 4.11.	Serbest ve İmmobilize Enzim (Kaolin) Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafiği.....	42
Şekil 4.12.	Serbest ve Bağlı (Kaolin) Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi Grafiği .....	43
Şekil 4.13.	İmmobilize Enzimin (Kaolin) İki Ay Süresindeki Aktivite Değişimleri Grafiği.....	44
Şekil 4.14.	Kaolin Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi Grafiği.....	45
Şekil 4.15.	Kaolin Örneğine Ait $\ln k_d/T-1/T$ Grafiği.....	46

<b>Şekil 4.16.</b>	İmmobilize (Akasya Yaprağı) Enzim İçin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerleri Grafiğı.....	47
<b>Şekil 4.17.</b>	Serbest ve Bağlı (Akasya Yaprağı) Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi Grafiğı.....	48
<b>Şekil 4.18.</b>	Akasya Yaprağı Örneğine Ait Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafiğı.....	49
<b>Şekil 4.19.</b>	Serbest ve Bağlı (Akasya) Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi Grafiğı.....	50
<b>Şekil 4.20.</b>	İmmobilize Enzimin (Akasya) İki Ay Süresindeki Aktivite Değişimleri Grafiğı.....	51
<b>Şekil 4.21.</b>	Akasya Yaprağı Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi Grafiğı.....	52
<b>Şekil 4.22.</b>	Akasya Yaprağı Örneğine Ait $\ln k_d/T-1/T$ Grafiğı.....	53

## ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 4.1.</b>	Serbest Enzim İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri.....	30
<b>Çizelge 4.2.</b>	İmmobilize Enzim İçin Kinetik ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Bağlı Enzim Değerleri.....	31
<b>Çizelge 4.3.</b>	Serbest Enzim İçin pH Değerleri.....	32
<b>Çizelge 4.4.</b>	Bağlı Enzim İçin pH Değerleri.....	33
<b>Çizelge 4.5.</b>	Serbest Enzim İçin Sıcaklık.....	34
<b>Çizelge 4.6.</b>	Bağlı Enzim İçin Sıcaklık.....	34
<b>Çizelge 4.7.</b>	Serbest Enzim Üzerine İyonik Şiddet Etkisi.....	35
<b>Çizelge 4.8.</b>	Bağlı Enzim İçin İyonik Şiddet Etkisi.....	35
<b>Çizelge 4.9.</b>	İmmobilize Enzim İçin İki Ay Süresi Boyunca Aktivite Değişimi...	36
<b>Çizelge 4.10.</b>	İmmobilize Enzim İçin $\ln(q_e - q_t) - T$ .....	37
<b>Çizelge 4.11.</b>	Aktif Katrbon İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler.....	37
<b>Çizelge 4.12.</b>	Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait Farklı Derişimlerde $\Delta H$ , $\Delta S$ , $\Delta G$ , $R^2$ ve Reaksiyon Denklemleri.....	38
<b>Çizelge 4.13.</b>	İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri.....	39
<b>Çizelge 4.14.</b>	Serbest Enzim İçin pH Değerleri.....	40
<b>Çizelge 4.15.</b>	İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin pH Dğerleri.....	40
<b>Çizelge 4.16.</b>	Serbest Enzim İçin Sıcaklık.....	41
<b>Çizelge 4.17.</b>	İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin Sıcaklık.....	41
<b>Çizelge 4.18.</b>	Serbest Enzim Üzerine İyonik Şiddet Etkisi.....	42
<b>Çizelge 4.19.</b>	Bağlı Enzim (Kaolin) İçin İyonik Şiddet Etkisi.....	42
<b>Çizelge 4.20.</b>	İmmobilize Enzim (Kaolin) İki Ay Süresi Boyunca Aktivite Değerleri.....	43

<b>Çizelge 4.21.</b>	İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin $\ln(q_e - q_t) - T$ .....	44
<b>Çizelge 4.22.</b>	Kaolin İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler.....	45
<b>Çizelge 4.23.</b>	Kaolin Örneğinin Ait Farklı Derişimlerde $\Delta H$ , $\Delta S$ , $\Delta G$ , $R^2$ Ve Reaksiyon Denklemleri.....	46
<b>Çizelge 4.24.</b>	İmmobilize (Akasya Yaprağı) Enzim İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri.....	47
<b>Çizelge 4.25.</b>	Serbest Enzim İçin pH Değerleri.....	47
<b>Çizelge 4.26.</b>	İmmobilie (Akasya Yaprağı) Enzim İçin pH Değerleri.....	48
<b>Çizelge 4.27.</b>	Serbest Enzim İçin Sıcaklık .....	48
<b>Çizelge 4.28.</b>	İmmobilize (Akasya Yaprağı) Enzim İçin Sıcaklık.....	48
<b>Çizelge 4.29.</b>	Serbest Enzim İçin İyonik Şiddet Etkisi.....	49
<b>Çizelge 4.30.</b>	Bağlı Enzim (Akasya) İçin İyonik Şiddet Etkisi.....	49
<b>Çizelge 4.31.</b>	İmmobilize Enzim İçin İki Ay Süresi Boyuncaaktivite Değerleri....	50
<b>Çizelge 4.32.</b>	İmmobilize (Akasya Yaprağı) Enzim İçin $\ln(q_e - q_t) - T$ .....	51
<b>Çizelge 4.33.</b>	Akasya Yaprağı İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler.....	52
<b>Çizelge 4.34.</b>	Akasya Yaprağının Farklı Derişimlerde $\Delta H$ , $\Delta S$ , $\Delta G$ , $R^2$ ve Reaksiyon Denklemleri.....	53

## SİMGELER ve KISALTMALAR

A	: Toplam Yüzey
aL	: Langmuir Sabiti
B	: Adsorplayıcıya Bağlı Bir Sabit
C <sub>e</sub>	: Adsorplanan Maddenin Doygunluk Konsantrasyonu
C <sub>o</sub>	: Çözültideki Adsorplanan Maddenin Doygunluk Konsantrasyonu
C <sub>s</sub>	: Çözünen Doygunluk Derişimi
C <sub>t</sub>	: Her Bir Temas Zamanında Çözültide Kalan Adsorban Derişimi
E	: Serbest Enzim
E <sub>a</sub>	: Enzimin Aktivasyon Enerjisi
K	: Boltzmann Sabiti
k <sub>1,ad</sub>	: Lagergren Adsorpsiyon Hız Sabiti
k <sub>2,ad</sub>	: Yalancı İkinci Dereceden Adsorpsiyon Hız Sabiti
K <sub>a</sub>	: Adsorpsiyon Hız Sabiti
K <sub>F</sub>	: Deneysel Olarak Hesaplanan Adsorpsiyon Kapasitesi
K <sub>L</sub>	: Adsorbantın Adsorptivitesine Bağlı Olan Sabit (1/g)
K <sub>m</sub>	: Michaelis Menten Sabiti
K <sub>p</sub>	: Parçacık İçi Difüzyon Hız Sabiti
M	: Moleküllerin Kütlesi
N	: Adsorpsiyon Yoğunluğu
P	: Gazın Basıncı
p/p <sub>o</sub>	: Rölatif
q <sub>e</sub>	: Dengede Adsorplayıcı Yüzeyinde Tutunan Madde Miktarı
q <sub>eq</sub>	: Hesaplanan, Adsorbe Edilen Madde Miktarı
q <sub>m</sub>	: Tek Tabaka Kapasitesi yada Doygunluk Kapasitesi
q <sub>max</sub>	: Adsorbantın Maksimum Adsorplama Kapasitesi
q <sub>t</sub>	: Herhangi Bir Zamandaki Adsorbe Edilmiş Olan Madde Miktarı

$R$	:	İdeal Gaz Sabiti
$R_L$	:	Ayırma Faktörü Veya Denge İle İlgili Parametre
$S$	:	Substrat
$T$	:	Adsorpsiyon Sıcaklığı
$V$	:	Tepkime Hızı
$V_m$	:	Tek Tabaka Kapasitesi
$V_{max}$	:	Enzimin Katalitik Gücü
$\Delta G^\circ$	:	Standar Serbest Entalpi Değişimi
$\Delta H^\circ$	:	Standart Entalpi Değişimi
$\Delta S^\circ$	:	Standart Entropi Değişimi



## 1.GİRİŞ

Canlılarda yaşamsal olaylarının devamı birkaç kimyasal reaksiyonun oluşmasına bağlıdır. Enzim adı verilen özel moleküllerin aracılığı ile reaksiyonlar gerçekleşir. Enzimlerin olmaması biyokimyasal olayların çoğunun yavaş gerçekleşmesi hatta oluşmamasını sağlar. Bu sebeple canlı dokularında az miktarda bulunmalarına rağmen organik molekül olan enzimler çok önemli rollere sahiptir. Kimyasal tepkimelerin başlayabilmesi için bir miktar enerjiye ihtiyaç vardır. Bir reaksiyonun başlayabilmesi için en düşük enerji miktarına aktivasyon enerjisi denir. Canlılar aktivasyon enerjisi engelini geçmek için enzimleri kullanırlar (Anonim, 2015). Ayrıca enzim canlı hücrelerinde yapılan, fakat etkisi için hücreye gereksinim duymayan, ısıya dayanıksız, protein yapılı organik katalizördür (Ertan, 2009).

Bütün enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir ve aminoasit dizilimi kendine özgüdür. Pepsin ve üreaz gibi bazı enzimler yalnız proteinden oluşmuştur. Diğer çoğunluğu iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bunlar: Enzimin Apoenzim kısmı: bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Koenzim kısmı: koenzim kısmı genellikle apoenzim kısmından ayrılabilir ve analizlerinde birçok vitamini barındırdığı (tiyamin, niasin, riboflavin vs.) görülmüştür. İnorganik yada organik, çok defa fosfattan meydana gelmiş, apoenzim kısmına göre çok daha küçük moleküllü bir kısımdır. Enzimde esas iş yapan kısım bu kısımdır. Ne apoenzim ne de koenzim kısmı yalnız başına etkin değillerdir. Bazı enzimler ortama belirli iyonlar eklendiğinde aktiftirler. Örneğin  $Mg^{+2}$  iyonu bazı enzim zincirine eklenince glikozu laktik aside çevirebilir (Anonim, 2013).

Enzimler çoğu durumda sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha fazla katalitik bir güce sahiptir. Substratları için yüksek özgülüğe sahip ve kimyasal tepkimeleri yüksek derecede hızlandırma etkisine sahiptir. Sıcaklığın ve pH'nın optimum olduğu koşullarda sıvı çözeltilerde işlev görürler. Biyolojik olmayan çok az katalizör bu özelliklerin hepsine sahiptir. Enzimler düzenli tepkime aktiviteleriyle besin moleküllerinin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalize ederler, bu sayede kimyasal enerjiyi korur,

dönüştürür ve basit moleküllerden biyolojik makromoleküller üretirler (Güler, 2014).

Enzimlerin spesifik bir katalizör olması ve suda çözünmesinden dolayı endüstriyel uygulamaları sulu ortamda gerçekleşir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen taşıyıcıya kimyasal ve fiziksel olarak bağlanarak, enzim molekülünün monomer olarak suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona katılarak ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

Enzim molekülünün immobilizasyonunda kil, cam, aktif karbon, metaller ve metal asitler gibi inorganik taşıyıcılar, iyon değiştirici reçineler, selüloz, nişasta, kollagen, kitin, ipek gibi doğal polimerler, vinil ve alil polimerler, bentonit gibi sentetik polimer, yüksek adsorpsiyon kapasiteli ucuz katı tutucu absorbanlar kullanılmaktadır (Ertan, 2009).

Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonunda hidrojen bağlanması, Van der Waals güçler ve hidrofobik etkileşimler matrikse bağlanmada etkilidir. Adsorpsiyon ile immobilizasyon ılımlı koşullarda, kimyasal madde kullanımına gerek olmaması, uygulamanın kolay olması ve genellikle enzimin katalitik aktivitesinin korunması açısından avantaj sağlamaktadır (Naslıyan, 2012).

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri;

- Reaksiyon sonunda kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve enzimlerin ürünü kirletmesi gibi sorun yaşanmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı dayanıklıdır.
- Defalarca ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime göre daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol edilebilir.
- Birbirini tekrarlayan çok adımlı reaksiyonlarda uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.

- Enzimlerin kendilerini parçalama olasılığı azalır (Yener, 2007)

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3) yağ-su ara yüzeyinde, uzun zincirli açilgliserollerin, ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerdir. Endüstriyel uygulamalarda geniş kapsamlı yönlülüğü nedeniyle faydalı biyokatalizörler olarak kabul edilmiştir (Diaz ve ark., 1999).

Lipazlar bitkisel, hayvansal ve doğal veya genetik olarak düzenlenmiş mikroorganizmalardan gibi kaynaklardan elde edilir. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en çok kullanım imkanı ise mikrobiyal kaynaklı lipazlardır. Doğal metabolik reaksiyonlar çevreye uygun olmasına rağmen lipaz tarafından katalizlenmiş reaksiyonlar daha çevrecidir. Ayrıca düşük aktivasyon enerjisi sebebiyle daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür ve de ürün ve substratlara daha karşı aktiviteleri çok yüksektir. Bu aktivite özellikle substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bu kavrama ara yüzey aktivasyonu denir. Bu nedenle, en yüksek aktivitelere, substrat için yüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır (Öztürk, 2002).

### **1.1. Aktif Karbon**

Geniş yüzey alanına, büyük kristal formu ve gelişmiş gözenek yapısı sahip karbon adsorbentlerin genel adıdır (Türkoğlu, 2010). Aktif karbonlar odun, turba, linyit, kömür, mangal kömürü, fındık kabuğu, pirinç kabuğu armut kabuğu, Hindistan cevizi kabuğu ve yağ ürünlerinden elde edilen karbonların çeşitli işlemlerden geçirilerek aktive edilmesiyle elde edilir (Jankowska ve ark., 1991; Kirk-Othmer, 1997).

### **1.2. Aktif Karbonun Özellikleri**

Aktiflenmiş karbon da kısmen kristal yapısı gösteren bir maddedir. Aktiflenmiş karbon, tohum kabuklarında olduğu gibi organik maddelerin ısıtılarak kömürleşmesinden elde edilir. Aktif karbon, birim kütle başına çok geniş bir alan gösterir. Bir gram aktif karbonun gösterdiği yüzey alanı 1000 m<sup>2</sup> dir. Bu nedenle, zehirli gazların tutulmasında fayda sağlayacağından aktif karbon sıkça kullanılır. Aktif karbon, bileşim olarak % 87-97 oranlarında karbon içermekte

olup geri kalan oranlarda ise hidrojen, oksijen, kükürt ve azot içerebilir. Ayrıca kullanılan hammaddeye ve proseste katılan diğer kimyasal maddelerin içeriğine bağlı olarak daha farklı elementleri de içerebilmektedir. Aktif karbon bünyesinde düşük oranlarda yararsız maddelerde bulunabilir, ancak kullanım öncesi bu tür maddelerin uzaklaştırılması gerekir ve bu işlemede kül içeriğinin düşürülmesi denilmektedir. Adsorban olarak kullanımında kül içeriğinin % 0.1-0.2 oranına getirilmesi gerekmektedir. Aktif karbon sıvı veya gaz fazında çeşitli maddelerin adsorpsiyonu için kullanılmaktadır. İç yüzeyinde çok çeşitli molekülleri adsorplayabilmektedir (Küçükgül, 2004).

### **1.2.1. Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu**

Aktif karbonun özelliklerin anlaşılmasında, gözenek büyüklüğü oldukça önemlidir (Erol, 2012). Aktif karbonun aktifleştirilmiş yüzeyi genellikle Brunauer – Emmett – Teller (BET) yüzeyi olarak ( $m^2 g^{-1}$ ) ifade edilir (Kahraman, 2010). Yüzey alanı 400-1000  $m^2 g^{-1}$  aralığında olmakla birlikte özel amaçlı üretimlerde bu değer aşılabilmektedir (Küçükgül, 2004). Azot ( $N_2$ ) gazı kullanılarak yüzey alanı belirlenir. Kirlilik yapan maddelerin ortamdan uzaklaşması için yüzey alanının büyük olması, kirliliğin giderilmesin etkin rol oynar. Çünkü kirlilik yapan maddelerin aktif karbon yüzeyinde daha geniş alana tutunarak atılması sağlanır (Ertan, 2009).

Mikro ve mezo gözenekler aktivasyon prosesi boyunca meydana gelirler. Aktif karbona adsorplama kapasitesi kazandıran yapılar mikro ve mezo gözeneklerdir (Küçükgül, 2004). Mikro gözenekler iç yüzeyin yaklaşık % 95'ni teşkil ederken, makro gözenekler ise adsorpsiyon için pek bir önem teşkil etmesede mikro gözeneklere doğru difüzyonun hızlı olması için iletici olarak gereklidirler. Makro gözenekler molekülün aktif karbon içerisine girmesini, mezo gözenekler ise molekülü daha iç bölgelere doğru taşınmasını sağlar, mikro gözenekler ise adsorpsiyon olayı için kullanılırlar (Ertan, 2009).

### **1.2.2. Aktif Karbon Türleri**

Aktif karbonlar sınıflandırılması güç olan kompleks ürünlerdir. Ancak yüzey özellikleri, hazırlama yöntemleri, fiziksel özellikleri ve aktive karbonların davranışlarına göre türlere ayrılabilir. Bu farklı özelliklere göre aktif karbon

türleri toz aktif karbon, granül aktif karbon, küresel aktif karbon ve pelet aktif karbondur. (Türkoğlu, 2010).

### **1.2.3. Aktivasyon Teknikleri**

Karbonca zengin olan tüm maddeler, çeşitli aktifleştirme yöntemleriyle aktifleştirilerek aktif karbon üretilebilir. Bu aktifleştirme yöntemleri kimyasal aktivasyon ve fiziksel aktivasyon (gaz aktivasyonu) olmak üzere ikiye ayrılır (Kılıçer, 2006).

### **1.2.4. Aktif Karbon Kullanım Alanları**

Aktif karbonun başlıca kullanım alanları:

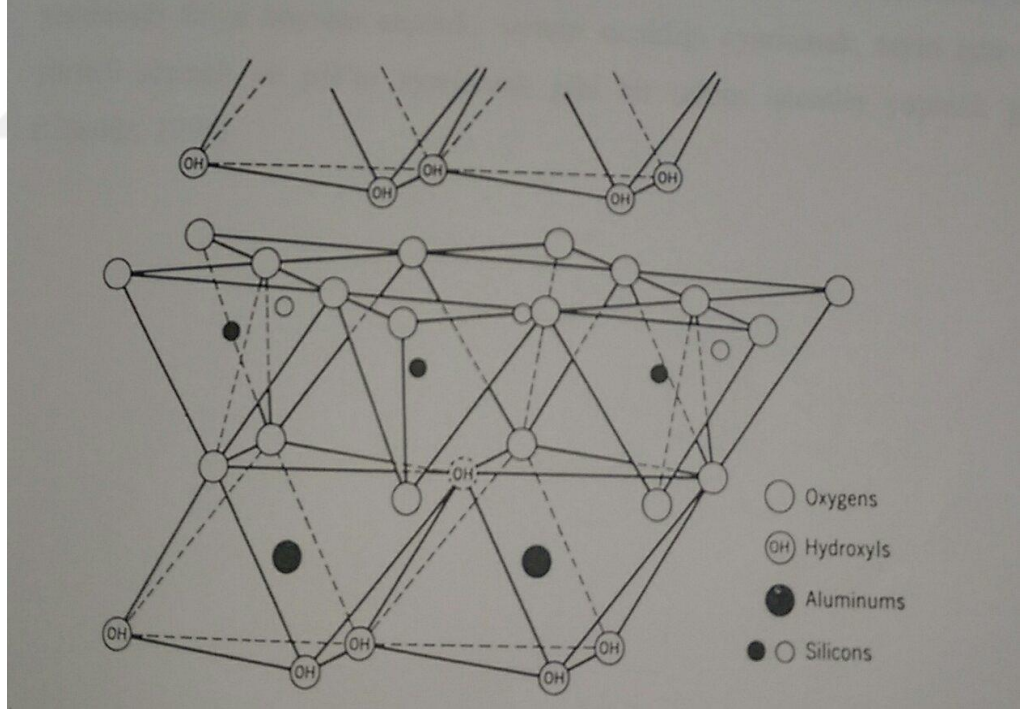
- Atık su arıtımı
- İstenmeyen tat, koku, renk giderimi
- Çözeltilerin ve gazların saflaştırılması
- Katalizör ve katalizör destek maddesi olarak
- Adsorpsiyon prosesleri
- Solunum aygıtları ve gaz maskeleri
- Uçucu çözücülerin geri kazanılmasında
- Tıp
- Nükleer biyolojik kimyasal (NBC) koruyucu elbise ve filtreler (Kahraman, 2010).

### **1.3. Kaolin**

Kaolin ismi “Kau-Ling” kelimesinde türetilmiş ve ana minerali kaolinit, halloysit yada ikisinin karışımı olan killere kaolin denir. Çin kili olarak da bilinen kaolin, mineral kaolinitin % 10-95'ini içeren bir kil ve genellikle ağırlıklı olarak kaolinitten (% 85-95) oluşur. Kaolinite ek olarak, kaolin genellikle kuvars ve mika içerir ve daha az sıklıkla da feldispat, illit, montmorillonit, ilmenit, anastaz, hematit, Boksit, zirkon, rutil, kyanit, silliminate, grafit, attapuggit ve Halloysite içermektedir. Kaolinitin yapısı, tetrahedral bir silis levhası ile bir oktahedral alüminyum levhası şeklindedir. Bu yapılar, Silika tetrahedronların uçları ve oktahedralin bitişik katmanları ile ortak bir katman oluştururlar. Ortak katmanında Oktahedral ve tetrahedral gruplar bulunur ve oksijen atomlarının üçte ikisi Silikon ve alüminyum

tarafından paylaşılır daha sonra O atomları OH'ya dönüşür. Moleküler formül  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$  ve Kaolinit grubu (kaolinit, nakrit, dickit) için ortaktır (Adamis ve Fodor, 2005).

Önemli bir kil minerali olan kaolin, birçok sektörde fiziksel, kimyasal, reolojik, elektrokinetik ve sorptif özellikleri nedeniyle çok çeşitli amaçlar için tercih edilen endüstriyel hammaddelerden biridir. Örneğin, beyaz veya beyaza çok yakın tonlardaki ham ve/veya pişme rengi, yüksek  $Al_2O_3$  içeriği, su ile etkileştiğinde plastik özellik kazanması, şekillendirilebilmesi ve kurutulduğunda ve/veya pişirildiğinde dayanıklılık kazanması gibi özellikleri, kaolini vazgeçilemez bir seramik ve çimento hammaddesi yapmıştır. Ayrıca, diğer kil mineralleri gibi tabakalı yapıda olması ve tabakaları arasında az da olsa değişebilir katyonlar barındırması nedeniyle ilaç, kozmetik, boya, plastik ve kâğıt kaplama gibi uygulamalarda dolgu maddesi olarak kullanımını sağlamıştır (Eygi ve Ateşok, 2010).



Şekil 1.1. Kaolin Mineralinin Yapısı

#### 1.4. Adsorpsiyon

Bir maddenin (atom, iyon veya molekülün) diğer bir madde yüzeyinde veya iki faz arasındaki ara yüzeyde konsantrasyonunun artması ya da bir başka ifadeyle

moleküllerin, temas ettikleri yüzeydeki çekme kuvvetlerine bağlı olarak birbirine tutulmasına adsorpsiyon, tutunan taneciklerin yüzeyden uzaklaşmasına desorpsiyon, adsorplayıcıya adsorbent, katı yüzeyinde tutunan maddeye ise adsorplanan (ad

sorban) adı verilir. Adsorpsiyonun hızı ve miktarı için aktif karbon gibi kütesine oranla yüzey alanı büyük olan maddeler kullanılır. Çözeltinin adsorpsiyonu, adsorplanacak maddenin doğasına, çözeltideki derişime ve sıcaklığa bağlıdır. Gazların ve sıvıların (çözeltideki) adsorpsiyonunda, üç ardışık hız basamağı vardır (Karaman, 2010).

#### **1.4.1. Adsorpsiyon Çeşitleri**

Adsorpsiyon işlemi; sıvı-sıvı, gaz-sıvı, gaz-katı, sıvı-katı fazlarında meydana gelir. Üç tip adsorpsiyon çeşidi vardır:

- Fiziksel
- Kimyasal
- Elektostatik (iyon değişimi)

Fiziksel adsorpsiyon genellikle tersinirdir. Fiziksel adsorpsiyonda adsorbat ile adsorban arasındaki bağlantıyı Van der Waals kuvvetleri sağlar. Adsorban, adsorbent yüzeyinde birikir ve yumuşak bir tabaka oluşturur. Proses esnasında açığa çıkan ısı 2-5 kcal/mol'dür. Burada bir aktivasyon enerjisi mevcut değildir, ancak elektostatik kuvvetler aracılık etmektedir.

Kimyasal adsorpsiyonda adsorban ve adsorbent arasında kimyasal bağlanma olur. Genellikle adsorbat yüzeyde bir molekül kalınlığında bir tabaka oluşturur. Moleküller yüzey üzerinde hareket etmezler. Adsorban yüzeyi monomoleküler tabaka ile tamamen kaplandığında, adsorbanın adsorplama kapasitesi sıfırlanır. Bu tür adsorpsiyon çok nadir olarak geri dönüşümlüdür (tersinmez). Açığa çıkan aktivasyon enerjisi 10-50 kcal/mol'dür. Bu sebeple yüksek sıcaklıkta kimyasal adsorpsiyon daha hızlı gerçekleşir. Bu durumda oluşan bağlar fiziksel adsorpsiyondaki bağlardan kuvvetlidir.

Kimyasal adsorpsiyon yalnızca tek tabakalı olduğu halde, fiziksel adsorpsiyon tek tabakalı veya çok tabakalı olabilir. Derişim, sıcaklık, basınç gibi işlemlerin

değiştirilmesi ile desorpsiyon meydana gelirken kimyasal adsorpsiyon, kuvvetli bağ oluşumu söz konusu olduğu için tersinmez bir işlemdir. Sıcaklığın artması fiziksel adsorpsiyonu azalttığı halde, kimyasal adsorpsiyonda ise sıcaklığın yüksetilmesi adsorpsiyonun ekzotermik veya endotermik olmasına ve aktivasyon enerjisine bağlı olarak artış veya azalma gösterebilir.

Değişim adsorpsiyonu, adsorbat ile yüzey arasındaki çekim ile olmaktadır. Burada, zıt elektrik yüklerine sahip olan adsorbent ve adsorban yüzeylerinin birbirlerini çekmesi önem kazanmaktadır. Çapı küçük ve elektrik yükü fazla olan iyonlar daha iyi adsorbe olurlar. Birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlerde adsorpsiyon olayı tercih edilmekte ve özellikle endüstriyel uygulamalarda su ve atık suların arıtılmasında aktif karbon sıklıkla kullanılmaktadır (Şahan, 2007).

#### **1.4.2. Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler**

##### **1.4.2.1. Adsorpsiyon Ortamının pH Değeri**

Adsorpsiyonu etkileyen en önemli faktör pH'dır. Adsorpsiyonun gerçekleştiği çözeltinin pH'sı bir veya birkaç nedenden dolayı adsorpsiyon miktarını etkilemektedir. Hidrojen ( $H^+$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) iyonlarının kuvvetli bir şekilde adsorbe olmaları, diğer iyonların adsorpsiyon çözeltilerinde pH'ından etkilenmektedir. Asidik veya bazik bileşiğin iyonlaşması adsorpsiyonunu etkilemektedir. pH iyonlaşma derecesini kontrol etmese de adsorpsiyonu etkilemektedir. Adsorpsiyon işleminde farklı iyonların farklı pH değerlerinde adsorblanması ancak spesifik pH değerlerinde önemli iken, anyonik iyonlarda ise düşük pH değerlerinde gerçekleşerek hemen hemen %100 iyon giderme verimine sahip olmaktadır.

##### **1.4.2.2. Adsorpsiyonun Sıcaklığı**

Adsorpsiyon reaksiyonları sıcaklığa bağlı olarak endotermik veya ekzotermik oluşuna göre değişir. Genel olarak reaksiyonlarda sıcaklık artması reaksiyon hızını arttırırken, adsorpsiyon işleminde sıcaklık önemli bir kriter olup, adsorpsiyon hızını etkilemektedir.



### **1.4.2.3. Karıştırma Hızı**

Adsorpsiyon hızı, ortamın karıştırma hızına bağlı olarak film difüzyonu ya da por difüzyonu ile kontrol edilmektedir. Düşük karıştırma hızlarında partikülün etrafındaki sıvı film kalınlığı çok olacak ve film difüzyonu hızı adsorpsiyonu sınırlayan etmen olacaktır. Sistemde yeterli bir karışım sağlanır ise, film difüzyon hızı, hızı sınırlandıran etmen olan por difüzyon noktasına doğru artar (Duman, 2012).

### **1.4.2.4. Adsorban Maddeler**

Su arıtımında, adsorpsiyon teknikleri için çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Adsorplama gücü yüksek olan bazı doğal katılar; doğal kabuklar (ceviz kabuğu, fındık kabuğu, badem kabuğu, kayısı çekirdeği kabuğu, şeftali çekirdeği kabuğu, yer fıstığı kabuğu, Antep fıstığı kabuğu, ağaç kabukları vb.), diğer tarımsal atıklar (arpa sapı, buğday sapı, çavdar sapı, yulaf sapı, talaşlar, çay artığı, meyve kabukları, ağaç yaprakları vb.), kömürler, killer, zeolitler ve çeşitli metal filizleri şeklinde; yapay katılar ise aktif kömürler, moleküler elekler (yapay zeolitler), silikajeller, metal oksitleri, katalizörler ve bazı özel seramikler şeklinde sıralanırlar. Makroporöz reçineler, aktif silika ve aktif karbon en çok bilinen adsorban maddelerdir.

Adsorplama gücü yüksek olan katılar deniz süngerini andıran bir gözenekli yapıya sahiptir. Katıların içinde ve görünen yüzeyinde bulunan boşluk, oyuk, kanal ve çatlaklara genellikle gözenek adı verilir. Katının bir gramında bulunan gözeneklerin toplam hacmine özgül gözenek hacmi, bu gözeneklerin sahip olduğu duvarların toplam yüzeyine ise özgül yüzey alanı denir. Gözeneklerin büyüklük dağılımına adsorplayıcının gözenek boyut dağılımı denir. Bir katının adsorplama gücü bu katının doğası yanında özgül yüzey alanı, özgül gözenek hacmi ve gözenek boyut dağılımına bağlı olarak değişmektedir.

### **1.4.3. Adsorpsiyon İzotermi**

Adsorplayıcı ile dengede bulunan adsorplanan madde miktarını, çözelti denge derişimine ya da basıncına bağlayan grafiğe adsorpsiyon izotermi denir. İzoterm, sabit sıcaklıkta denge koşullarının bir grafiğidir. Bir adsorpsiyon, izotermi iyi olduğu anlaşılabilmesine rağmen izotermi adsorpsiyon

hızı hakkında bilgi edinilemez. Adsorpsiyon izotermi bir adsorplayıcının yüzey alanını ve gözenekliliğini anlama açısından fayda sağlamaktadır. Adsorban tarafından tutulan maddenin miktarı, tutulan maddenin konsantrasyonunun ve sıcaklığın birer fonksiyonudur. Genellikle tutulan maddenin büyüklüğü sabit bir sıcaklıkta konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak belirlenir ve bu durum adsorpsiyon izotermi olarak adlandırılır. Adsorpsiyon yoğunluğunu (birim adsorban ağırlığı başına tutulan boyar madde miktarı) maddenin çözelti fazındaki denge konsantrasyonuyla ( $C_e$ ) ilişkilendiren Langmuir ve Freundlich izotermi en bilinen izoterm modelleridir.

#### **1.4.3.1. Langmuir İzoterm Denklemi**

Langmuir adsorpsiyon izotermi fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon için verilen kuramların başı olup izoterm denklemi her konsantrasyon aralığında kullanılabilir, aşağıdaki gibi deneysel olarak ifade edilir.

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{c_e}{A_s} + \frac{1}{A_s K_b} \quad (1.1)$$

Langmuir izoterm kuramı, tek tabaka fiziksel sorpsiyonu ve kimyasal sorpsiyonu yansıtır. Adsorpsiyonda birbirine ters iki etki düşünülmektedir; Çözeltinin yüzeyde adsorpsiyonu ve yüzeyde tutulan çözelti moleküllerinin yüzeyden desorpsiyonu. Bu iki olayın hızı eşit olduğunda adsorpsiyon dengesi kurulur.

#### **1.4.3.2. Freundlich İzoterm Denklemi**

Çoğu sistem, Langmuir denkleminde sapmalar gösterir. Bunun sebebi genelde yüzeylerin homojen olmaması ve adsorplanmış moleküller arasında etkileşmelerin olmasıdır. İdeal olmayan sistemler bazı ampirik izotermelere uyabilirler. Bunlardan biri Freundlich adsorpsiyon izotermidir. Genel olarak, van der Waals adsorpsiyonunda genel sonuçların çoğunluğu, orta konsantrasyon aralığında Freundlich denklemi yardımıyla ifade edilebilir. Freundlich adsorpsiyon izotermi, sınırlı bir konsantrasyon aralığında adsorplanmış miktar ile konsantrasyon arasındaki ilişkiyi temsil eder ve aşağıdaki gibi ifade edilir (Tasmakıran, 2010).

$$\left(\frac{x}{m}\right)=k c_e^{1/n} \quad (1.2)$$

Freundlich izoterm denkleminin çizgisel şekli;

$$\log \left(\frac{x}{m}\right)=\log k +\frac{1}{n} \log c_e \quad (1.3)$$

#### 1.4.4. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbat-adsorban temas süresi yani alıkonma süresi bulunur. Adsorpsiyon kinetiğinin incelenmesi ve belirlenmesi adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır.

Adsorpsiyon hızını belirlemek için kullanılan eşitlikler şunlardır:

Birinci derece Lagergren eşitliği:

$$\log \frac{(q_e-q_t)}{q_e} = -\frac{K_{1,ad}t}{2.303} \quad (1.4)$$

Yalancı ikinci dereceden reaksiyon hız eşitliği:

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{k_{2,ad}q_{eq}^2} + \frac{1}{q_{eq}} t \quad (1.5)$$

$k_{1,ad}$  : Lagergren adsorpsiyon hız sabiti (dakika<sup>-1</sup>)

$k_{2,ad}$ : Yalancı ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.dakika)

$k$ : İkinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.dakika)

$q_e$ : Denge meydana geldiği zaman adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

$q_{eq}$ : Hesaplanan, adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

$q_t$ : Herhangi bir zamandaki adsorbe edilmiş olan madde miktarı (mg/g)  $\log(q_e-q_t)$ ,  $t/q_t$  ve  $1/(q_e-q_t)$  değerlerinin  $t$  değerine karşı ayrı ayrı grafiğe konulmalarıyla  $k_{1,ad}$ ,  $k_{2,ad}$  ve  $k$  değerleri hesaplanır.

Deneylerden elde edilen veriler, grafikler yardımıyla değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulunur.

#### 1.4.5. Adsorpsiyon Termodinamiği

Adsorpsiyonda adsorbat, birikim ile düzenli hale geçtiği için entropi azalır. Adsorpsiyonun kendiliğinden olabilmesi için denklem 1.6'da  $\Delta H$  ve  $\Delta G$  değerlerinin negatif (ekzotermik) olması gerekir.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (1.6)$$

$\Delta G^0$  : Standart serbest enerji değişimi, Gibbs serbest enerjisi (kJ/mol)

$\Delta H^0$  : Standart entalpi değişimi (kJ/mol)

$\Delta S^0$  : Standart entropi değişimi (kJ/mol K)

T: Mutlak sıcaklık (Kelvin)

Belirli bir sıcaklıkta yapılan adsorpsiyon işleminin Gibbs serbest enerjisini bulmak için öncelikle denge sabiti olan  $K_c$  Denklem 1.7 yardımı ile hesaplanır.

$$K_c = \frac{C_a}{C_e} \quad (1.7)$$

$K_c$ : Denge sabiti

$C_a$ : Adsorban tarafından tutulan madde konsantrasyonu (mg/l)

$C_e$ : Çözeltide kalan madde konsantrasyonu (mg/l)

Denklem 1.7 yardımı ile bulunan  $K_c$ 'nin  $C_e$ 'ye karşı grafiğe geçirilmesi ile bulunan  $K_c^0$  Denklem 1.8'e yerleştirilerek adsorpsiyonun Gibbs serbest enerjisi bulunur.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_c^0 \quad (1.8)$$

$$\ln K_c^0 = \frac{\Delta S^0 - \Delta H^0}{R} \times \frac{1}{T} \quad (1.9)$$

R: Gaz sabiti (8,314 J/mol K)

Denklem 1.9 kullanılarak,  $\ln K_c^0$  değerinin  $1/T$  değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşan doğrunun eğimi ve kesim noktası ile  $\Delta H^0$  ve  $\Delta S^0$  hesaplanmaktadır.

$\Delta H^0$  'ın pozitif değerleri adsorpsiyonun endotermik,  $\Delta H^0$  'nin negatif değerleri adsorpsiyonun ekzotermik olduğunu göstermektedir. Diğer bir değişle

adsorpsiyon işleminin uygulanabilirliği entalpi ve Gibbs serbest enerjisinin negatif olması ile anlaşılabilir.  $\Delta S^0$  'nin pozitif değerleri ise katı/çözelti ara yüzeyindeki rastlantısallığın artışı göstermektedir (Savcı, 2005).

### **1.5. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimler, aktivasyon enerjisini azaltarak canlı hücrelerde kimyasal reaksiyonları hızlandıran geneli protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Optimum şartlarda enzim, aktivitesini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olması, enzimin pek çok alanda kullanılma imkânını sağlamaktadır. Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımı sırasında bazı problemler ortaya çıkmaktadır. Endüstriyel alandaki çalışmaların büyük bir bölümü sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden, kullanılan enzimlerin geri eldesi mümkün değildir. Bu alanda reaksiyon kontrolü açısından serbest enzimin ortamdan çekmek ve aktivitesini kaybetmeden tekrar kullanımı olanaksızdır. Ayrıca, serbest enzim ortamda kirliliğe neden olmasından dolayı ortamdan uzaklaştırılması sistem maliyetini daha da yükseltmektedir. Bazı enzimlerin daha spesifik olmaları bu enzimlerin saflaştırılma işlemini zorlaştırmakta, bu da üretim maliyetlerini arttırmaktadır. Bu sorunları ortadan kaldırmak için ve enzimleri endüstriyel uygulamalarda daha aktif kullanmak için birçok yöntem gerçekleştirilmektedir. Bunlardan en önemli yöntemlerden biri de immobilizasyon yöntemleridir.

Enzimin çeşitli fiziksel veya kimya yollardan destek materyali vasıtasıyla hareketinin sınırlandırılmasına immobilizasyon denir. Enzimlerin immobilizasyonun farklı uygulama alanlarına sahiptir. Immobilize enzimlerin endüstriyel alanda kullanımlarının çok fazla avantajı bulunmaktadır. Enzimin katalitik aktivitelerinin önemli ölçüde kararlı hale gelmesi, ürünlerin saf olarak kolaylıkla elde edilebilmesi, tekrar kullanılabilirliği, çevresel etkilere karşı yüksek stabilitesi, üretimin sürekliliği ve maliyetin azalması enzim immobilizasyonunun avantajları arasında yer almaktadır. Immobilizasyon ve taşıyıcı sistem türüne bağlı olarak, immobilize enzim aktivitesi sıfırdan yüksek değerlere kadar değişebilmektedir (Naslıyan, 2012).

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar; immobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir yada kaybolabilir. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır. Enzim taşıyıcıların maliyetini arttırır.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destek materyallerinin önemi büyüktür. İmmobilizasyon için seçilen destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını yükseltir. Destek materyalin iyi olması büyük yüzeyel alanı, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözülmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özelliklere sahip olmalıdır. Organik destekler, doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere sınıflandırabilir (Erol, 2012).

### **1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri**

Enzimler suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren ve kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklamalarla immobilize edilir. İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler ise şunlardır:

- Adsorpsiyon
- Kovalent bağlama
- Tutuklama
- Çapraz bağlama (Palüzar, 2013).

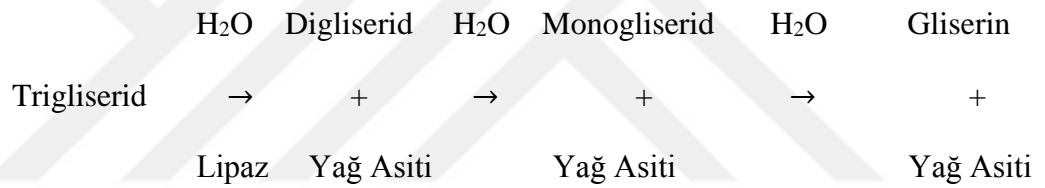
### **1.6. Lipaz Enzimi**

Lipazlar biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Lipazlar yağları parçalayarak yağ asitlerini ayıran hidrolazlar olarak bilinmelerine rağmen su yokluğunda esterifikasyon ve transesterifikasyon tepkimelerinde katalizleyebildiği gibi biyodönüşüm işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimin kullanım amacına uygun bir tepkimeden yararlanarak lipaz aktivitesi ölçülebilmektedir. Lipaz enziminin hidrolitik

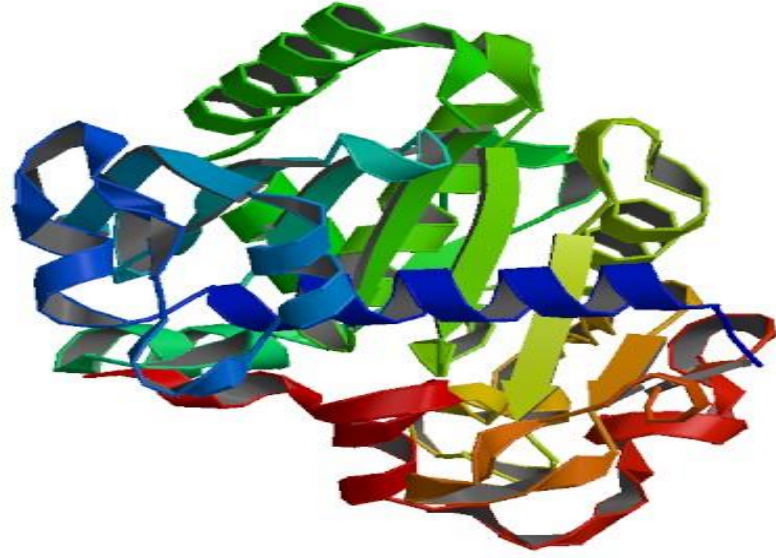
aktivitesinin ölçülmesinde titrimetrik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemlerle lipaz aktivitesi ölçümünde renk oluşmasına neden olan substratlar örneğin p-Nitrofenil esterlerinin enzimatik hidrolizine dayanan spektrofotometrik yöntemin oldukça kullanışlı, kolay ve hassas olduğu belirtilmektedir (Özarlaner ve Albayrak, 2013).

Lipazlar (trigliserol açilhidrolazlar; EC 3.1.1.3), hidrolitik enzimlerden serin hidrolazlar grubunda bulunmaktadır. Serin hidrolazlar grubuna giren enzimler aktif bölgelerinde, serin, histidin ve aspartik asitten oluşan bir katalitik üçlü taşır. Serin kalıntısı, başlangıç nükleofil görevi görerek ürün oluşumunu katalizler. Hidrolitik enzimler arasında lipazlar en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir (Ünlü, 2004).

Lipazların etkin olduğu hidroliz reaksiyonu genel olarak şu şekilde verilmektedir;



Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. Şekil(1.2)' de lipaz enziminin tam bir yapısı görülmektedir. *Humicola lanuginosa* lipazının kristal yapısı kullanılarak gösterilmiştir.



**Şekil 1.2.** *Humicola lanuginosa* Lipazının Üç Boyutlu Yapısı (Tutar, 2009)

Son yıllarda yeni lipaz uygulamalarının kullanıldığı proseslerde, özellikle tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı lipaz katalizli süreçlerin teknik uygulamalarına lipazların enzim pazarındaki kullanım payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat aralığı gibi özellikleri etkili olmuştur. Üç boyutlu yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar, lipazların yapı-işlev ilişkilerine ışık tutacak araştırmalara temel oluşturmaktadır.

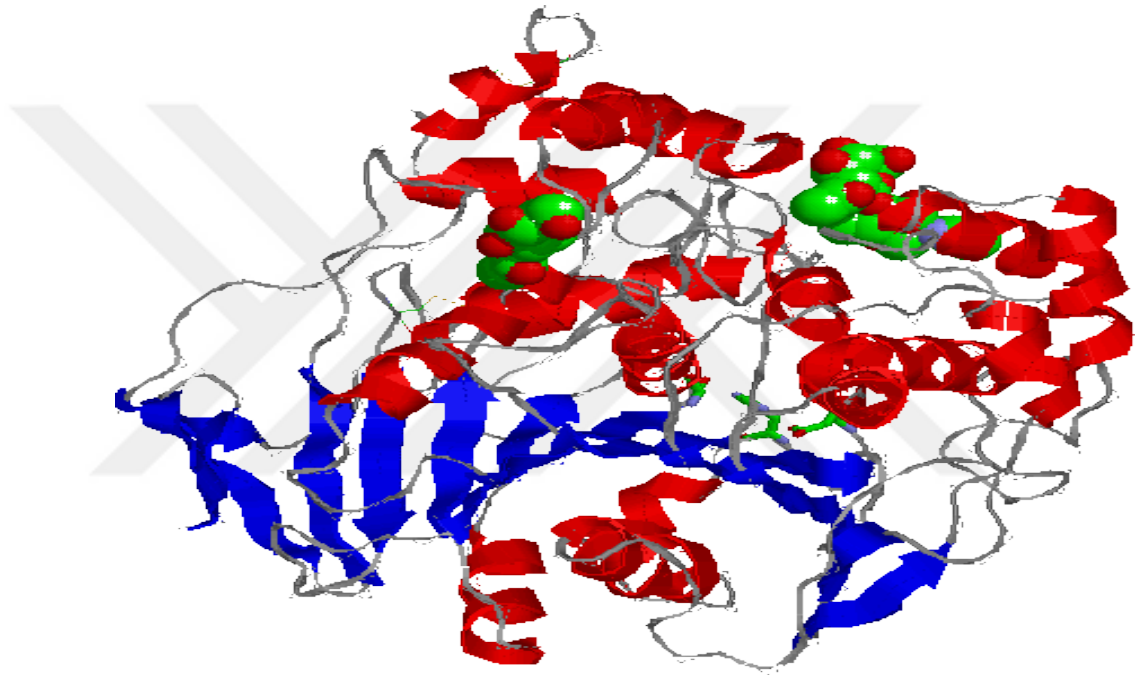
Lipazları önemli olmasında, öncelikle mükemmel bir kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve çift yönlü seçicilik göstermeleridir. Daha sonra fungi ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından yüksek verimlerle üretildiğinden büyük miktarlarda kullanılabilir olmaları ve son olarak çoğu lipazın kristal yapılarının sırları bilimsel araştırmalarla çözülmüş olmaları ve mühendislik stratejilerinin tasarımını oldukça kolaylaştırmalarıdır.

Lipazlar, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida antarctica* gibi bakteri hücrelerinden elde edildiği gibi, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum* ve *Trishosporon fermentas* gibi maya hücrelerinden de elde edilebilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu mikrobiyal lipazlar,



üretildiği mikroorganizmadan mikrobiyolojik işlemlerle izole edilip saflaştırılarak elde edilir ve ilgili süreçlerde kullanılır hale getirilirler.

Lipazlar açık ve kapalı form olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Aktif konumdaki katalitik üçlüyü kaplayan yapısal elementlerin ( $\alpha$ -heliks) olduğu yapı aktif olmayan form, diğeri ise ara yüzey aktivasyonu sırasında bu kapağın açılması ile ara yüzey alanının artması ve böylece aktif konumun daha fazla substrat almak için substrata izin verdiği yapı; Şekil (1.3)'deki aktif formudur (Tutar, 2009).



Şekil 1.3. Açık ve Kapalı Kısımlarında Eklendiği *Candida rugosa* Lipazının Üç Boyutlu Yapısı

### 1.6.1. Lipazların Özellikleri

#### 1.6.1.1. Optimum pH

Yüksek pH'larda enzimler genelde etkinliklerini kaybederler. Enzimlerin en yüksek etkinlik ile çalıştıkları pH değeri "optimum pH" olarak adlandırılır. Pepsin gibi pH 1,8'de ya da arginaz gibi pH 10,0'da olan enzimlerin dışında çoğu enzimler pH 4,5-8,5 aralığında en yüksek etkinliği gösterirler. Yüksek pH'larda yapılarındaki proteinlerin yapısının bozulmasıyla enzim etkinliği, geri dönülemez olarak düşer. 30-40°C sıcaklığında ve pH 7,0-9,0 aralığında en yüksek etkinliği göstermeleri, mikrobiyal lipazların en önemli karakteristik

özelliklerindedir. Lipazlar belli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftir. Çoğu için optimum pH 7,0–8,0 arası değişir. Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar pH 6,0–7,5 civarında yüksek kararlılık gösterirler.

#### **1.6.1.2. Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılık**

Lipazların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık genellikle 30-40°C'dir. Hayvan ve bitki lipazları, genellikle mikrobiyal (mantar ve bakteri) lipazlara göre daha az termal kararlılık gösterir.

#### **1.6.1.3. Lipazın Aktivasyon ve İnhibisyonu**

Lipaz aktivitesine, iyonların ve reaktiflerin etkilerinin incelenmesinde, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği, alkali metal iyonlarının ise yükselttiği görülmüştür. Lipaz aktifliği üzerine en etkili iyon  $Ca^{2+}$ 'dır. Lipaz aktivitesini inhibe eden maddelere  $CO^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,nin bazı tuzları, boronik asitler ve dietil-pdinitrofenil fosfat örnek olarak verilebilir.

#### **1.6.1.4. Lipazın İzoelektrik Noktası (pI)**

Net yükü sıfır olan noktadır. pI civarında proteinler daha az çözünürken pI dan uzaklaştıkça daha fazla çözünürler( Tutar, 2009).

#### **1.6.2. Lipazların Kaynakları**

Lipazlar, bitki ve hayvan dokularından ekstraksiyonla veya mikroorganizmalardan fermentasyon yoluyla üretilir. Ticari lipazlar genelde mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteriler, fungi ve mayalardır. Bakteriler daha çok proteaz kaynağı olarak kullanılmakta, bakteri lipazlarının endüstriyel üretimi fazla yapılmamaktadır(Şengel, 2007).

#### **1.6.3. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları**

Günümüzde yaklaşık 4000 kadar enzim bilinmektedir. Enzimlerin yaklaşık 200 kadarı ise ticari amaçlı kullanılmaktadır. Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin geneli mikrobiyal kaynaklıdır. Lipazlar deterjan endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, gıda endüstrisinde, deri endüstrisinde kozmetik endüstrisinde, oleokimya endüstride, biyosensör olarak kullanılan lipaz ve kâğıt endüstrisinde kullanılmaktadır(Marul, 2007).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Alcántara ve ark., (2004), ticari ham bir lipaz olan *Candida rugosa*, rasemik karışımların çözünmesinde ve hidratlanmış organik çözücülerinin sentezinde kullanmıştır. Elde edilen ham lipaz farklı izoenzimlerin varlığı ile yeniden üretilebilir durumda olduğu belirlenmiştir. Maya *Candida rugosa*, ATCC 14380 indükleyicilerin karbon kaynağı olarak, farklı maddeler kullanılarak ve en az bir kültür ortamında yetiştirilmiştir. Hücre dışı lipazlar optimum verimliliği verdiği uyarıcıların yüzdesi belirlenmiştir. Liyofilize hücre dışı enzimler, SDS-PAGE elektroforez ve izoelektrik odaklama (IEF) ile karakterize edilmiştir. Karbon kaynağının doğasına bağlı olarak, farklı izoenzimin çeşitli oranlarda üretildiği belirlenmiştir. Bu örnekler kısmen amonyum sülfat ya da organik çözücüler ile diyaliz, adsorpsiyon kromatografisi ve çökeltme gibi farklı yöntemler ile saflaştırılmıştır.

Ülker ve ark., (2010), çalışmada, yeni bir suş olan *Trichoderma harzianum* IDM14D topraktan izole etmişlerdir. İzole edilen bu suş, lipaz üretimi için çalkalamalı kültürde 30 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Lipaz üretimi için en iyi karbon kaynağı glukoz, en iyi azot kaynağının pepton olduğu belirlenmiştir. Maksimum biyokütle üretimi 7 gün sonunda 1.25 g/L olarak belirlenmiştir. Enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH 8.5, sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. *T. harzianum* lipazı pH 8.0-10.0 aralığında 40 °C'de 60 dakika kararlılığını koruduğu belirlenmiştir. Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonlarının lipaz aktivitesini artırdığı, fakat diğer metal iyonlarının enzim aktivitesini etkilemediği gözlenmiştir. p-nitrofenil butirat hidrolizi ile ölçülen ham enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 7.15 mM ve 7.067 mM/dk olarak belirlenmiştir.

Nath ve Hindumathy, (2012), çalışmada izole edilmiş *Myroides odoratimimus* enzimi ve lipaz aktivitesi ile konsantrasyonunu artırılmış daha sonra geniş pH değerlerinde (pH 8.2) ve alt-tabaka artışı etkin duruma gelmesi sağlanarak optimum sıcaklığı 37 °C ulaşmıştır ve sonuç olarak farklı fizikokimyasal özelliklere optimize edilmiş duruma geldiği belirlenmiştir. Lipaz enzimi aktivitesi CaCl<sub>2</sub> ile inhibe edilmiş, Ca<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> ile uyarılmıştır. Lipaz aktivitesi titrimetrik ve kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür, CM-selüloz

(karboksimetil selüloz), DEAE –selüloz (dietil aminoetil selüloz) sırasıyla Sephadex G-75 kromatografisi ile saflaştırılmıştır; Saflaştırılmış enzim jeli süzme ile arttırılmıştır.

Farias ve ark., (2014), yağların çıkartılmasından elde edilen çeşitli kalıntılarının (küspe), özellikle katı-hal fermentasyonu (SSF) tekniğinde, lipazlar fermentatif üretimi için destek ve alt-tabaka olarak kullanılmıştır. Çeşitli tarımsal artıkların lipaz üretimi için etkili olduğu bildirilmiştir ve *Yarrowia lipolytica* biyoürünleri, yağ kek, küspe ve soya çamuru (SSF ek olarak kullanılmak üzere) dahil edilmiştir. Bu durumda, alt-tabakalar olarak pamuk ve soya kek kullanımı ekonomik bir proses olmanın ötesinde, mikrobiyal lipaz üretilmesi için, bu artıklar mikroorganizma büyümesi için gerekli besleyici bileşimi tekniği için umut vermiştir. Mikrobiyal lipaz üretimi konusunda, *Yarrowia lipolytica* biyoürünlerin büyük bir çeşitliliği olarak tanınmış, ancak lipaz bu maya tarafından üretilen en uygun biyomolekül olduğunu kanıtlamıştır. Bu şekilde, soya fasulyesi keki ve çamur SSF *Y. lipolytica* lipaz üretiminde sinerji kullanılmıştır.

Lotrakul ve Dharmstithi, (1997), Çiğ süttten izole edilen *Aeromonas sobria* LP004, aktivitesi için optimum sıcaklığı 45°C olduğu koşulda lipaz üretildiğini bulmuşlardır. Enzim pH 9.5 kadar alkalın koşullar altında son derece kararlı olduğu ve şişe kültüründe, % 0.5 (ağırlık / hacim) (w / v) maya hülasesi ve mineral tuzları % 25 (h / h) peynir altı suyu, % 1.0 (ağ / hac), soya fasulyesi unu, % 0.1 glikoz ihtiva eden bir ortam içinde lipazın üretiminin besleyici sıvı içinde daha yüksek, yaklaşık on kat (450 birim / ml) (40 birim / ml) olduğu bulunmuştur. Bu enzim verimin de 7 litrelik fermente edici içinde 4 litre üretim ölçüğünde elde etmişlerdir.

Kumar ve ark., (2013), çalışmada 20 bakteri (suşu) hindistanda ineklerin bulunduğu alanlardan izole etmişlerdir. İzole edilmiş suş agar petri içindeki agar ortamında tributyrin levhaları içeren Rhodamine B ile ilgili boya kullanılarak taranmıştır. Diğerlerinden yüksek lipaz aktivitesini gösteren ve daha geniş temiz bir bölgede sergilenen suş, *Acinetobacter* sp. olarak tanımlanmıştır.

Yapaşan, (2008), alışmada *Pseudomonas* suşundan elde edilen lipaz farklı analitik yöntemler kullanılarak varlığı kanıtlamış, kısmen saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırma işlemi boyut dışlamalı kromatografi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı poli akrilamit jel elektroforezi kullanılarak tespit edilmiştir. Spektrofotometrik alışma ile enzim karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca bunun yanında enzimin kinetik çalışması da belirlenmiştir. Elektroforez işleminden sonra, potansiyel lipaz aktivitesi gosteren protein bantları jel üzerinde gorntlenilmiştir. Topraktan izole edilmiş *Pseudomonas* suşunun farklı denemelerde ortaya çıkan lipaz aktivite sonuçları gozlendikten sonra, enzimin hücre içinde çalışan bir enzim olduğuna ve yapılacak saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarının bu bilgi goz onne alınarak yapılmasına karar verilmiştir. Enzim, p-nitrofenil laurate'in substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesini gostermiştir. Lipaz enziminin çalışması için en uygun pH aralığının pH 8.0-9.0 civarında, alkali pH aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Iftıkhar ve ark., (2011), bu çalışma, lipazların *Bacillus* sp. Suşu tarafından mikrobiyal biyosentezi ile ilgilidir. Yağlı ürünlerden 15 suş izole edilmiştir. Bu suşlar, 250mL erlenmeyer Őiřeleri içinde katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimi için taranmıştır. *Bacillus* lipazın deterjanlarda iyi bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Őinknien ve ark., (2008), bu çalışmada çözünür ve hareketsiz hale getirilmiş *Enterobacter aerogenes* 13 lipazın temel ozelliklerini tahmin etmek için lipidleri hidrolize edebilen bir bakteri türü olarak *Enterobacter aerogenes* 13 türü seçilmiştir. Lignin ve poliüretan lipaz üzerindeki serbest ve hareketsiz olanların, hafif alkalın koşullarda (pH 8.0 – 9.0) ve 30 - 40 C sıcaklık aralığında en aktif olduğu belirlenmiştir. Enzim, oda sıcaklığında bile uzun sreler boyunca geniş bir pH aralığında kararlı olduğu bulunmuştur. Dondurma sonrası termostabilite üzerinde onemli bir iyileşme sağlanamamıştır; ancak katı destek üzerinde lipaz bağlanması, optimum sıcaklıkların biraz daha yüksek ve daha düşük pH ile sonuçlanmıştır. Hem serbest hem de hareketsizleştirilmiş

lipaz, orta zincir uzunluğundaki yağlı asit esterlerini hidroliz etmeyi tercih ederken, ayrıca transesterifikasyon reaksiyonları etkili olmuştur.

Diaz ve ark., (1999), flüoresan bazlı lipaz aktivite testi, lipolitik organizmaları tanımlamak ve lipolitik enzimlerin bazı özelliklerini incelemek için mükemmel bir araç sağlamışlardır. Bu sistemin olağanüstü duyarlılığı, hızı ve sadeliği, literatürde bildirilen lipaz etkinlik tespiti için geleneksel yöntemlerin çoğunun getirdiği zorlukların ortadan kaldırılmasına yardımcı olabileceğini göstermişlerdir.

Hoi ve ark., (1999), (i) yulaf karyopsilerinin lipaz aktivitesinin geniş anlamda kalıtsallığını tahmin etmek, (ii) lipaz aktivitesi ile diğer önemli agronomik özellikler arasındaki genetik ve fenotipik korelasyonların belirlenmesini ve (iii) test ağırlığı için tekrar ortaya çıkma seçimi için diğer faktörleri test etmektedir. Lipaz aktivitesinde korelasyonlu bir yanıt vermiştir. Başlıca döngüden (C0) 10 rastgele seçilen S0'den türetilmiş çizgiler ve ABD'de orta batıya uyarlanan yulaf çeşitleri ve hatları rastgele çiftleştirmek suretiyle geliştirilen bir popülasyonun C5'den 19'tan S0 türeviden çizgiler dahil edilmiştir.

Görgün ve Akpınar, (2012), Tödürge Gölü'nde yaşayan *Cyprinus carpio* Linnaeus (1758)'nin karaciğerinden 90.38  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 75,50 katlık saflaştırma parametreleri ile bir lipaz saflaştırılmıştır. Saflaştırma prosedürü homojenatın hazırlanması, poletilen glikol-6.000 (PEG-6000) ile çöktürme ve Q sefaroza, sefakril S 200 HR, fenil sefaroza CL4B'yi kapsayan kromatografik tekniklerden oluşmuştur. Saflaştırılmış lipaz, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yaklaşık 74 kDa'luk bir molekül ağırlığı ile tek bant göstermiştir. Optimum pH ve sıcaklık, substrat olarak p-nitrofenil butirat (p-NPB) kullanarak sırasıyla 8,0 ve 37°C olarak belirlenmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, sırasıyla, 0.17 mM p-NPB ve 2.6  $\mu\text{mol/ml.dk}$  olarak bulunmuştur. Sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100 ve Nataurokolat gibi yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesi üzerinde inhibitör olarak etki ettikleri gözlenmiştir.

Özarslaner ve Albayrak, (2013), lipaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesinde p-nitrofenol esterleri tercih edilmiştir. Yöntem, bu substratlardan

lipaz hidrolizi ile açık sarı renkli p-nitrofenol (pNP) oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu çalışmada, lipaz aktivite ölçümünde kullanılan p-nitrofenil propiyonat (pNPP) substratının kararlılığına ve pNP ürününün ışık soğurmasına çevresel koşulların etkisi incelenmiştir. Bekletme sıcaklığı veya süresi arttıkça, daha fazla oranda pNPP'nin kendiliğinden parçalandığı görülmüştür.

Borrelli ve Trono, (2015), lipazlar ve fosfolipazlar sırasıyla triasilgliserollerin ve fosfolipidlerin hidrofobik ester bağlantılarını hidrolize eden ara yüzey enzimleridir. Bu enzimler, esteraz olarak rollerine ilaveten, diğer reaksiyonların bolluğunu katalize eder; Aslında lipazlar esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonlarını da katalize eder ve fosfolipazlar ayrıca asiltransferaz, transasilaz ve transfosfatidilasyon aktivitelerini de gösterir. Bu nedenle, lipazlar ve fosfolipazlar, biyodizel, gıda, nutrasötikler, yağ degumming ve deterjanlar gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan çok yönlü biyokatalizörleri temsil eder; Küçük uygulamalar arasında biyoremediasyon, tarım, kozmetik, deri ve kağıt endüstrileri de bulunmaktadır. Bu enzimler çoğu organizmada, hayvanlarda, bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde bulunur. Mikrobiyal lipazlar ve fosfolipazlar hayvan ve bitkilerden türetilenlere göre daha yüksek bulunabilirlik ve üretim kolaylığı açısından tercih edilir.

Margesin ve ark., (2002), toprakta lipaz aktivitesinin saptanması için bir kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir. P-nitrofenil butiratı substrat olarak kullanarak, toprak numuneleri 30 ° C'de ve pH 7.25'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Buz üzerinde soğutulduktan ve santrifüj edildikten sonra, salınan p-nitrofenol 400 nm'de tespit edilmiştir. p-nitrofenolün toprağa adsorpsiyonuna izin vermek için toprak varlığında bir kalibrasyon eğrisi hazırlamışlardır

Usmani ve Patil, (2010), yenilebilir amaçlar için kullanılmayan geleneksel olmayan yağlar, katma değerli ürünler haline dönüştürülmelidir. Bu nedenle oleo kimyasalları üretmek üzere lipaz ile katalize edilen bu tür yağların ara esterifikasyonu bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Burada, interesterifikasyon, tamamen farklı özelliklere sahip oleo kimyasalları üretmek için Neem, Karanja

ve Pirinç kepeği yağı gibi geleneksel olmayan yağlara katalizör olarak L-aspergin monohidrat lipaz kullanılarak yapıldığını ispatlamışlardır.

Nigam ve ark., (2014), lipaz immobilizasyonu, yani adsorpsiyon, kovalent bağlanma, tuzaklama, çapraz bağlı enzim aglomeraları ve tüm hücre biyokatalizörleri üzerinde incelenen çeşitli teknikler ele alınırken, yararları ve sakıncaları da vurgulanmıştır. Ayrıca, enzim immobilizasyonunun geleceği ve endüstriyel uygulamaları üzerine ışık tutmuşlardır.

Nasratun ve ark., (2010), *Candida rugosa*'dan lipazın immobilizasyonu için, gözenekli, kitozan boncuk kullanılmıştır. Lipaz, çitoz boncuklar üzerinde fiziksel adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir. Hareketsizleştirilmiş lipazın pişirme yağının transesterifikasyonunu katalizleme kabiliyeti araştırılmıştır. Transesterifikasyon reaksiyonunda serbest lipaz ve hareketsiz lipaz arasındaki performans karşılaştırmasını tanımlamak için tepkime süresi ve yağ / metanol mol oranlarına ilişkin önemli parametreler çalışılmıştır. Çalışmada immobilize lipaz ve serbest lipaz kullanarak esterin maksimum dönüşümünün sırasıyla %73 ve %77 olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar optimum koşullardaki 1: 4 molar oranlarda ve 48 saatlik reaksiyon süresinde elde edilmiştir. Sonuç olarak, kitosan boncukları ester dönüşümü serbest lipazdan daha düşük olsa bile, transesterifikasyon reaksiyonunda immobilize lipaz için uygun bir destek olduğunu görmüşlerdir.

Cesarini ve ark., (2014), *pseudomonas* türlerinden elde edilen dört ticari olmayan lipaz hazırlanmış, farklı düşük maliyetli desteklerle hareketsiz hale getirilmiş ve potansiyel biyoteknolojik uygulamalar incelenmiştir. Değerlendirilen enzimler, *Pseudomonas* sp. 'Den LipA ve LipC'dir. 42A2, LipC'nin termostabil bir mutanı ve *Pseudomonas* CR611'den LipI, homolog ya da heterolog konaklarda üretilmiştir. En iyi immobilizasyon sonuçları LipA için Accurel EP100 ve LipC için Accurel MP1000 ve termostabil varyant üzerinde elde edilmiştir. Hareketsizleştirilmiş lipazların davranışını test etmek için, Accurel MP1000'de hareketsizleştirilmiş lipazlar için en iyi sonuçların elde edildiği, triolein transesterifikasyonunda denenmiştir. Bu nedenle, lipaz hazırlama ve immobilizasyon için hızlı, basit ve ekonomik bir yöntem



kurulmuştur. Test edilen desteklerin düşük fiyatı ve prosedürün sadeliği ve pahalı saflaştırma aşamalarını atlamak, biyoteknolojik lipaz katalizli işlemlerde maliyet düşüşüne katkıda olduğunu kanıtlamışlardır.

Hanefeld ve ark., (2008), enzim immobilizasyonunu tanıma üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin yüzey özelliklerinin simülasyonu uygun destek malzemelerinin tasarımında yardımcı olduğunu belirlemiş olsalarda sabitleme stratejileri moleküler simülasyon yöntemlerindeki uygulamada sınırlı olduğunu belirlemişlerdir. Homoloji modelleme yöntemleri kullanarak üç boyutlu enzim elde edilebildiğini kanıtlamışlardır. İmmobilize enzimlerin örnekleri sabitleme yönteminin seçimi sadece enzimin en çok kullanılması ve aktivitesiyle değil katalize edilecek reaksiyonların özgül konfigürasyonu ile de saptamışlardır.

Spahn ve ark., (2008), enzim immobilizasyonunu biyoteknolojik alanda kullanmak üzere kanser tedavisi ve malzeme mühendisliğinde patent haline gelmesini belirlemişlerdir. Ayrıca biyosensörlerde immobilize enzimler kullanımının tümör analizi, ilaç dağıtımı konusunda etkileri belirlemişlerdir. Biyoreaktörlerde kullanımı ile de verimliliği arttırdığını ispatlamışlardır.

Nisha ve ark., (2012), yılında immobilize enzimlerin özelliklerinin uygulama metodları üzerindeki incelemeler sonucu hareketsizleştirilmiş enzimlerin reaksiyon karışımlardan ayrılıp ve yeniden kullanılabilirliği ve aynı zamanda sert koşullar, yüksek sıcaklıkta yüzey aktif maddelere maruz kalması immobilize enzimlerinde gıda endüstrisinde kullanılabileceğini saptamışlardır. Ayrıca deterjan sanayi, tekstil sanayi v.b. alanda kullanılacağını belirlemişlerdir. Atık su tekniğinde ise maliyeti düşürdüğünü incelemişlerdir.

Sheldon ve ark., (2007), enzim immobilizasyonunun optimum performansının araştırması sonucu immobilize enzimlerin performansını optimize etmek için üç katagoride incelemeye almıştır. Bunlar taşıyıcı bağlanma, organik ve inorganik polimerlerin matrisleri ve ayrıca enzim moleküllerinin çapraz bağlayıcı durumları gibi gözenekli silikalar, hidrojellerin ve akıllı polimerler yeni yöntemler olduğunu belirlemişlerdir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler**

- Vortekmikser (IKA GENIUS 3 MODEL)
- Etüv (Binder ED 53)
- pH Metre (ISOLAB)
- Hassas Terazı (METLER TOLEDO)
- Elek Sallama Makinesi (LOYKA ESM-200)
- UV Spektrofotometresi( SHİMADZU UV-1800)
- Minisantrifüj (BIOSAN FVL-2400N)
- Derin Dondurucu
- Fırın (1200°)
- Laboratuvar Malzemeleri (Erlen, mezür, beher, pipet, spatül ve balon)

##### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

- Lipaz Enzimi (5-15 units/mg protein) (SİGMA)
- 4-Nitro Fenil Bütirat (PNFB) (SİGMA)
- Sodyum di Hidrojen Fosfat
- Sodyum Hidroksit
- Sodyum Klorür
- Gümüş Nitrat
- Hidroklorik Asit
- Hidrojen Klorür
- 2-propanol

#### **3.2. Aktif Karbon ve Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **3.2.1. Aktif Karbon Hazırlanması**

Van yöresinde yetişen armut kabuklarından 200 g alındı. Örneğe 500 ml saf su eklendi. Örnek, gün ışığı görmeyen karanlık bir ortamda en az 24 saat beklemeye alınarak aktifleşmeye bırakıldı.

Bu şekilde hazırlanan örnek 350-400 °C lik fırında azotlu ortamda yaklaşık 1 saat yanması sağlandı. Kimyasal aktifleşme ile akleştiren kabuklar bol miktarda saf su ile yıkandıktan sonra hazırlanan AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile klorür tayini yapıldı. Klorür kalmadığından emin olduktan sonra çözelti 60 °C etüvde kurumaya bırakıldı.

### **3.2.2. Akasya Yaprağının Hazırlanması**

Trabzon yöresinden toplanan akasya yaprakları saf su ile yıkanarak kurtuldu. Kurutulan yapraklar havanda dövülerek öğütüldü. Daha sonra 0.038 mm' lik (400 mesh) elekten geçirilerek toz hali getirildi.

### **3.2.3. Kaolinin Hazırlanması**

Kaolin kili havanda dövülerek öğütüldü. Daha sonra 0.038 mm' lik (400 mesh) elekten toz haline getirildi.

### **3.2.4. 0.1 M NaOH Hazırlanması**

0.4 g katı NaOH alınır ve bir miktar saf suda çözündü ve saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

### **3.2.5. 0.1 M Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması**

3.9 g katı NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> alındı ve saf suda çözündü. Çözelti saf su ile 250 ml ye tamamlandı. Hazırlanan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi 0.1M NaOH ile pH'ı 7.25 getirildi.

### **3.2.6. 0.1 M NaCl Hazırlanması**

0.117 g katı NaCl alındı ve bir miktar saf suda çözündü. Çözelti saf su ile 20 ml ye tamamlandı.

### **3.2.7. 0.1 M Lipaz Enzim Çözeltisinin Hazırlanması**

Hazır olarak aldığımız lipaz enziminden 0.1 g alınarak üzerine 10 ml sodyum fosfat tamponu ilave edildi. Hazırlanmış olan 10 ml 0.1M lipaz enzimi üzerine 10 ml 0.1M NaCl eklenerek lipaz enzim çözeltisi hazırlandı.

### **3.2.8. 0.1M Substrat Çözeltisinin Hazırlanması (PNFB)**

Hazır olarak alınan 4-Nitro Fenil Bütirattan 1 g alındı, 47.84 ml 2 propanol içerisinde çözündü.

### 3.3. Yöntem

Bu çalışmada adsorban olarak Van yöresinde elde edilen armut kabuğu, akasya yaprağı (Trabzon) ve kaolin kullanıldı. Çalışmada enzim olarak da buğday tohumunda elde edilen ve hazır olarak temin edilen lipaz enzimi (E.Ü. 5-15 units/mg. Protein) kullanıldı.

Lipaz enziminin aktif karbon (armut kabuğu), akasya yaprağı ve kaolin üzerindeki adsorpsiyonu için değişik zaman periyotlarında sabit pH'da (pH=7.25) 0.1M sodyum fosfat tamponu ile belirli konsantrasyonlarda süspansiyon edildi. Lipaz enzimi bu süspansiyonu ile farklı sürelerde ve farklı oranlarda muamele edilerek adsorpsiyon şartları belirlendi (optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet).

Öğütülmüş üç ayrı kilden 1.5 g alınarak ayrı ayrı erlenlere konuldu. Bu numunelere 60 ml saf su ilave edilerek kil süspansiyonları hazırlandı. Daha sonra 4 ml kil süspansiyonu ( Aktif karbon, Aksaya yaprağı ve Kaolin) ve 1 ml enzim çözeltisi vortekste 30 ° C de ve 60 dakika çalkalanarak karıştırıldı. Vorteksten alınan enzim-kil kompleksleri 15 dakika boyunca santrifüj (3000 devir/dk) edildi. Santrifüj sonunda oluşan örneğin üzerindeki sıvı (süperant) bir behere aktarıldı. Altta kalan katı ise 0.1M sodyum fosfat tamponu ile üç kez yıkanarak tekrar santrifüjlendi (3000 devir/dk). Altta kalan katı alınarak üzerine 5 ml sodyum fosfat tamponu ilave edilip karıştırıldı ve bağlı enzim çözeltileri elde edildi. Elde edilen bağlı enzim çözeltileri üzerine pH, sıcaklık ve konsantrasyona etkisini belirlemek için denemeler yapıldı. Lineweaver – Burk denkleminde yararlanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  tespit edildi.

#### 3.3.1. Serbest ve Bağlı Enzimlere pH'nın Etkisi

1M sodyum fosfat tamponu içinde serbest ve bağlı enzim çözeltilerinin aktivitelerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla yapılan denemelerde pH=4-10 aralığı kullanıldı.

#### 3.3.2. Serbest ve Bağlı Enzimlere Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve bağlı enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini tayin etmek için, numuneleri (20-70°C) sıcaklıklarda ve 15 dakika etüvde bekletildikten sonra analizleri yapıldı.

### **3.3.3 Serbest ve Bağlı Enzimlere İyonik Şiddetin Etkisi**

Enzimlerin aktivitelere iyonik şiddetin etkisini tespit etmek için 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1M sodyum fosfat tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki tamponları 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda 15 dakika ısıldıktan sonra analizleri yapıldı. Bu işlemler aktif karbon, akasya yaprağı ve kaolin içinde benzer şekilde uygulandı.

### **3.3.4. Bağlı Enzimlerin Operasyon Süresinin Belirlenmesi**

Enzimin aktivitesinin ne kadar süre etkili olduğunu tespit etmek amacıyla iki ay boyunca 20 günlük zaman periyotlarında bağlı enzim çözeltilerinin aktivitelere bakıldı.

### **3.3.5. Serbest ve Bağlı Enzimlerin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Belirlenmesi**

Lipaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri kullanılarak enzim aktivite belirlendi.

### **3.3.6. Bağlı Enzimlerin Maksimum Tutunma Süresinin Belirlenmesi**

Sabit pH'da ve sıcaklıkta bağlı enzimin maksimum tutunma süresini tespit etmek amacıyla (1:4) (Enzim: Kil) alındı ve 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika çalkalanarak karıştırıldı. Bütün aktivite tayinleri 405 nm' de ultraviyole spektroskopisi ile yapıldı. Süspansiyondaki aktivite tayinleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Lipaz enzimi (E.C. 3.1.1.3 Triaçilgliserol Açıl Hidrolaz) (E.Ü. 5-15 units/mg. Protein) için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespiti için farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini tayin etmek için Michailis – Menten eşitliği kullanıldı.

$$V = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad (1.10)$$

Michailis – Menten eşitliği aşağıdaki şekilde düzenlenirse; y eksenini kesim noktası  $1/V_{max}$  ve x eksenini kesim noktası  $-1/K_m$  değerlerini gösterir. Eğim  $K_m/V_{max}$  olarak belirlenir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} \quad (1.11)$$

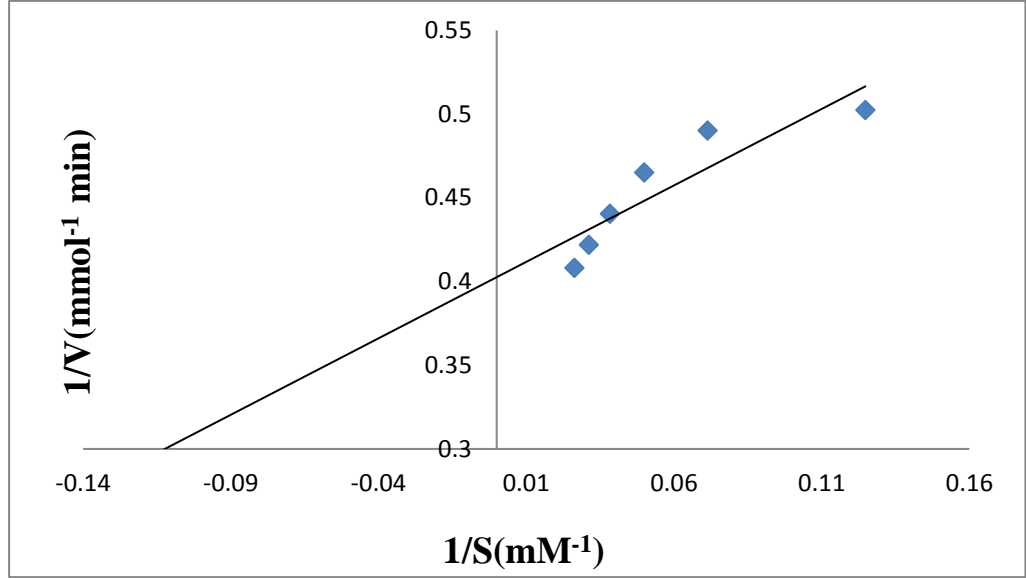
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.12)$$

#### 4.1. Aktif Karbon (Amut kabuğu) Örneğine Ait Çizelge ve Grafikler

##### 4.1.1. Serbest Enzim için ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Kinetik Sabit Değerlerinin Belirlenmesi

**Çizelge 4.1.** Serbest Enzim İçin  $K_m$  ve  $V_{max}$  Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri

Substrat miktarı (ml)	0.019	0.016	0.013	0.01	0.007	0.004	0.001
E. Ü.	0.145	0.127	0.123	0.115	0.104	0.099	0.077
1/S	0.026	0.031	0.038	0.050	0.071	0.125	0.500
1/V	0.689	0.787	0.813	0.869	0.961	1.010	1.298

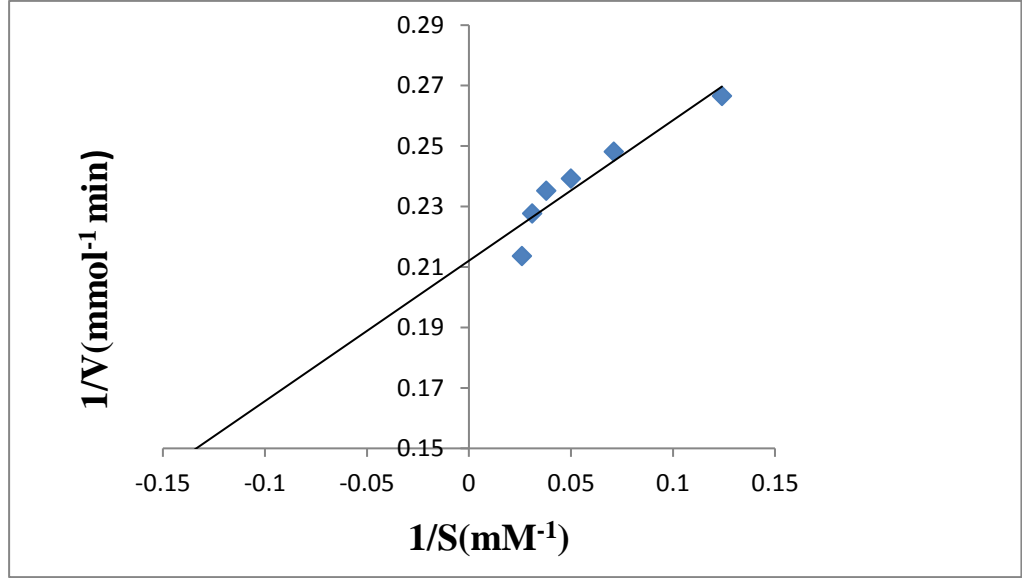


**Şekil 4.1.** Serbest Enzim için  $K_m$  ve  $V_{max}$  Değerleri Grafiği

Şekil 4.1’de  $1/S$  ve  $1/V$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Lipaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile  $K_m$ : 2.23mM ve  $V_{max}$ :2.50 $\mu$ mol/dk olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.2.** İmmobilize Enzim İçin Kinetik Sabitlerinin ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Bağlı Enzim Değerleri

Substrat miktarı (ml)	0.019	0.016	0.013	0.01	0.007	0.004	0.001
E. Ü.	0.468	0.439	0.425	0.418	0.383	0.375	0.362
1/S	0.026	0.031	0.038	0.050	0.071	0.125	0.500
1/V	0.213	0.227	0.235	0.239	0.242	0.266	0.276



**Şekil 4.2.** İmmobilize Enzim İçin  $V_{max}$  ve  $K_m$  Değerleri Grafiği

Şekil 4.2’de  $1/S$  ve  $1/V$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Lipaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile  $K_m$ : 2.18mM ve  $V_{max}$ : 4.71  $\mu\text{mol/dk}$  olarak tespit edildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri kullanılarak elde edilen enzim aktivitelerinden  $1/S$  ve  $1/V$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden belirlendi (Lineweaver ve Burk. 1934).

#### 4.1.2. Aktif Karbon (Armut kabuğu) Örneğinden elde edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Serbest ve immobilize enzimler için pH-aktivite grafikleri elde edilen değerlerden çizilmiştir. Enzimler için optimal aktivite pH 3.0-10.0 arasında gözlenir. pH’ daki değişiklik enzim bağlanma bölgesinde ve katalitik aktivitesinde farklılıklara neden olmaktadır.

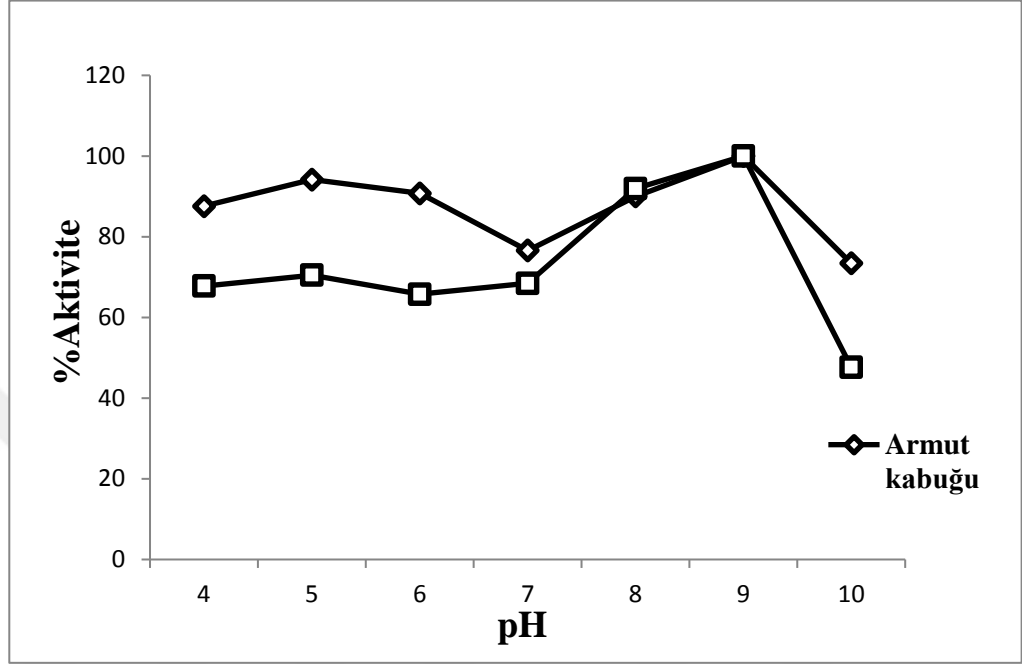
**Çizelge 4.3.** Serbest Enzim İçin pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	0.101	0.105	0.098	0.102	0.137	0.149	0.071
%Aktivite	67.78	70.47	65.77	68.46	91.95	100	47.65



**Çizelge 4.4.** Bağlı Enzim için pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	0.359	0.386	0.372	0.314	0.369	0.41	0.301
%Aktivite	87.56	94.15	90.73	76.58	90	100	73,41



**Şekil 4.3.** Serbest ve Bağlı enzimin Aktivitesi Üzerine pH'nin Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı enzimin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi şekil (4.3)'te görülmektedir. Serbest ve bağlı enzim için optimum pH'nın 9 civarında olduğu belirlenmiştir.

#### **4.1.3. Aktif Karbon (Armut kabuğu) Örneğinden elde edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi**

Serbest ve bağlı enzimler üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için optimum eğriler çizilerek incelendi. Isı enzimlerin katalizlediği tepkimelerin hızını etkilemektedir. Sıcaklıktaki artışa doğru orantılı olarak tepkime hızında artma gözlenir. Fakat enzimlerin katalizlediği tepkime hızı genellikle ısının optimum noktaya ulaşınca kadar yükselme gözlenir daha sonra optimum sıcaklık aşıldığında tepkime hızı azalır sıcaklığın her 10 °C artışı limyasal reaksiyon hızını bir kat artırırken enzimatik reaksiyon hızında artırır. Bu artış 40 °C kadar devam eder inkübasyon zamanına bağlı olarak bir duraklama daha

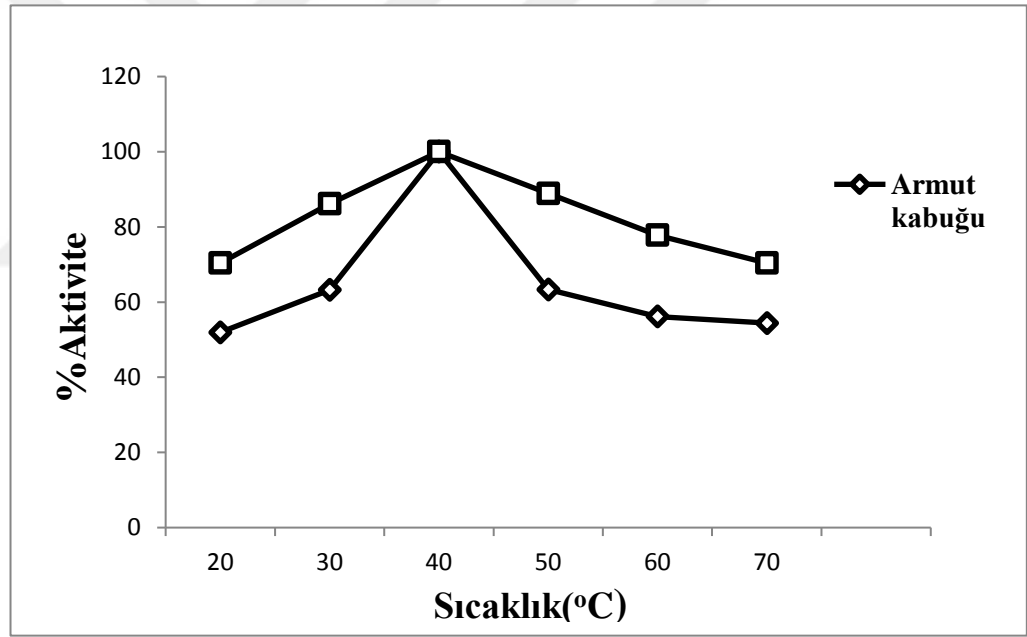
sonrada azalma meydana gelir. Sıcaklığın artması işle enzimlerin aktiviteleri azalmaktadır

**Çizelge 4.5.** Serbest Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (° C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.076	0.093	0.108	0.096	0.084	0.076
%Aktivite	70.37	86.11	100	88.88	77.77	70.37

**Çizelge 4.6.** Bağlı Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (° C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.36	0.438	0.693	0.439	0.389	0.377
%Aktivite	51.95	63.2	100	63.35	56.13	54.4



**Şekil 4.4.** Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafiği

Aktif karbona bağlanan enzimin aktivitelerinin sıcaklıkla değişimi şekil (4.4)'de verilmiştir. Serbest ve bağlı enzim için eğri hemen hemen aynıdır. Maksimum aktivite 40 °C de görülmektedir. Şekil (4.4) göre bağlı enzimin daha kararlı olduğunu söyleyebiliriz.

#### 4.1.4. Aktif Karbon (Armut kabuğu) Örneğinden elde edilen Bağlı ve Serbest Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi

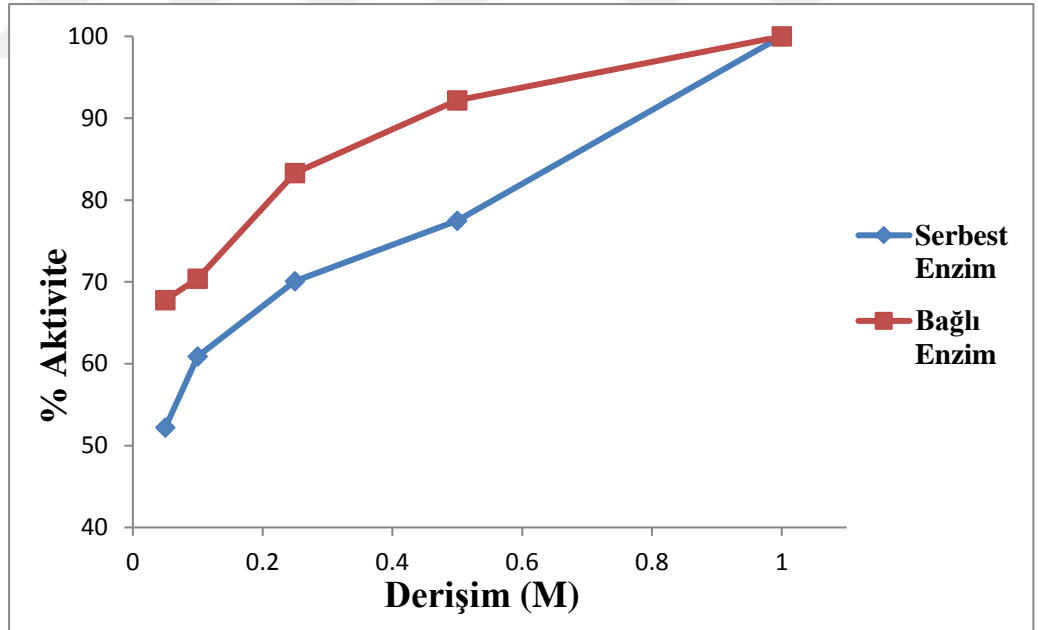
Sıcaklık ve pH sabit tutulması, enzim- substrat derişimi arasındaki orana bağlı olarak bir tepkime hızı görülür. Bu yüzden serbest ve bağlı enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile sabit pH ve sıcaklıkta 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1M'lık konsantrasyonlarda sodyum fosfat reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri belirlendi.

**Çizelge 4.7.** Serbest Enzim Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.098	0.106	0.122	0.135	0.174
% Aktivite	52.2	60.9	70.1	77.5	100

**Çizelge 4.8.** Bağlı Enzim İçin İyonik Şiddet Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.184	0.191	0.225	0.25	0.271
% Aktivite	67.8	70.4	83.3	92.2	100



**Şekil 4.5.** Serbest ve Bağlı Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi Grafiği

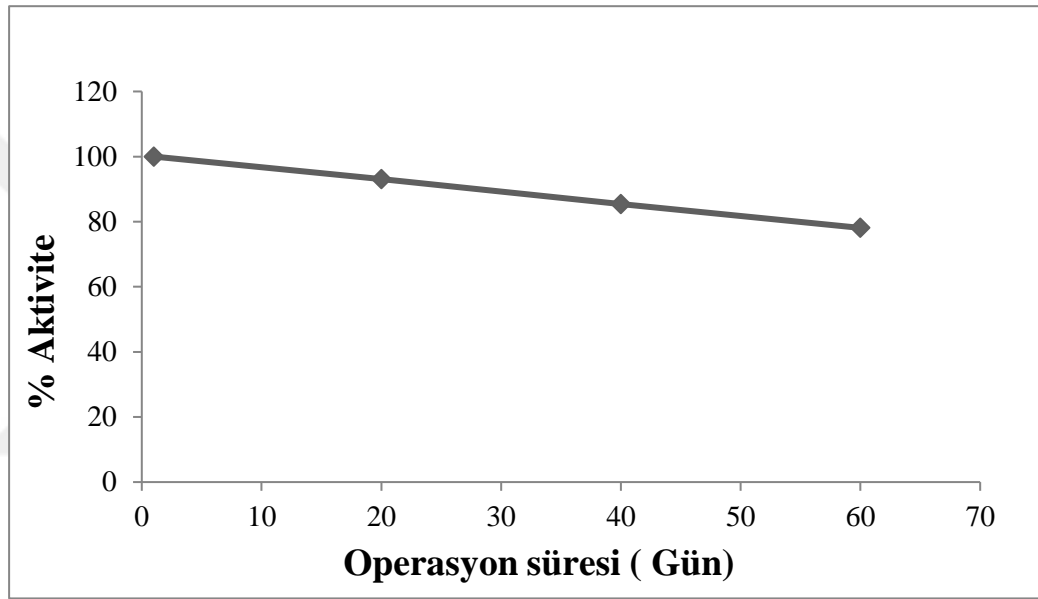
Aktif karbon üzerine bağlanan enzim aktivitesine iyonik şiddetin etkisi şekil (4.5) de verilmiştir. Aynı şartlarda doğal enzim için elde edilen eğri benzerdir.

Fakat bağılı enzimin serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

#### 4.1.5. Bağılı Enzimin (Armut Kabuğu) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri

Çizelge 4.9. İmmobilize Enzim İçin İki Ay Süresi Boyunca Aktivite Değerleri

Zaman(Gün)	1	20	40	60
E.Ü.	0.347	0.323	0.305	0.271
Aktivite	100	93.08	85.43	78.09



Şekil 4.6. İmmobilize Enzimin(Armut Kabuğu) İki Ay Süresindeki Aktivite Değişimleri Grafiği

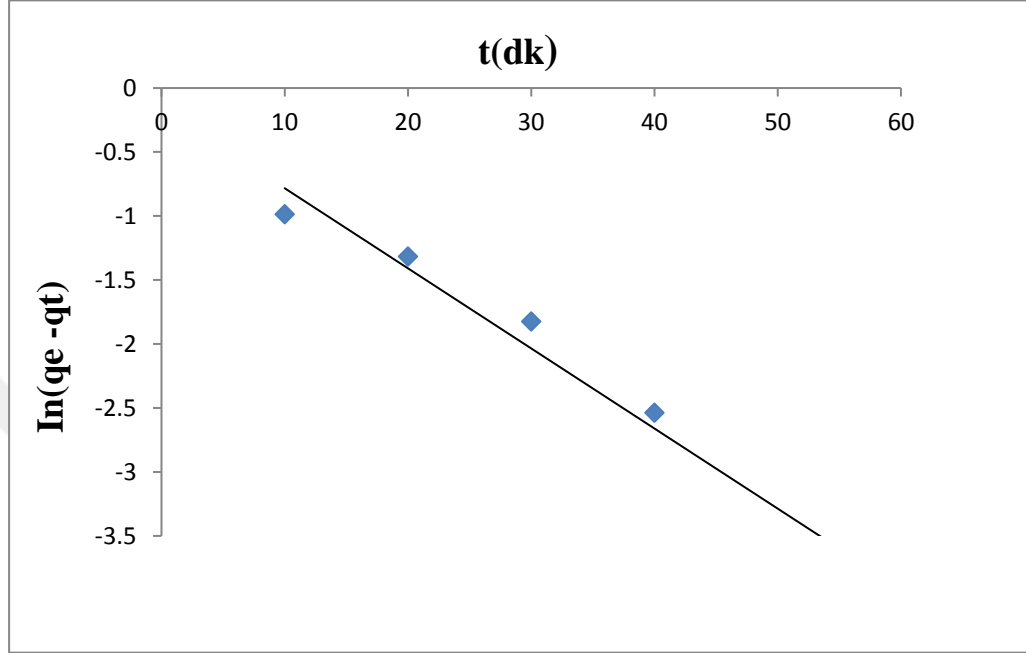
İmmobilize enzimin aktifliğinin depolanma süresinin etkisi incelemek amacıyla 4 °C’de buzdolabında saklandı. Belirli zaman (20 gün) aralıklarda yapılan aktivite ölçümleri sonucu şekil (4.6)’da görüldüğü gibi adsorbe enzim iki ay boyunca aktivitesini % 78.09 oranında koruduğu gözlenmiştir.

#### 4.1.6. İmmobilize Enzim ( Armut Kabuğu) için Lagergen Grafikleri

Aktif karbon adsorpsiyonunun kinetik parametreleri belirlenerek, denge zamanına kadar geçen sürede adsorpsiyonun durumu incelenerek elde edilen veriler grafiğe alınmıştır. Bu grafikten Lagergren yalancı birinci derece hız denklemini dikkate alınarak  $\ln(q_e - q_t) - t$  grafiğinin eğim ve kaymasından yararlanılarak  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri belirlenmiştir.

**Çizelge 4.10.** İmmobilize Enzim için  $\ln(q_e - q_t) - T$  Çizelgesi

Zaman(dk)	10	20	30	40	50
$\ln(q_e - q_t)$	-0.987	-1.317	-1.826	-2.538	-3.506
E.Ü.	0.313	0.421	0.528	0.61	0.689



**Şekil 4.7.** Aktif karbon(Armut Kabuğu) Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denkleminin Grafiği (30 °C)

**Çizelge 4.11.** Aktif Karbon İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler

Kullanılan kil	$q_e$ ( mg.g <sup>-1</sup> )	$k_1$ (dk <sup>-1</sup> )	$R^2$	Denklem
Aktif karbon (Armut Kabuğu)	1.43	0.144	0.96	-0.0626x-0.1571

Grafikten elde edilen korelasyon değerlerinin yüksek olması, adsorpsiyonun yalancı birinci dereceden kinetik modele uyduğunu söyleyebiliriz.

#### **4.1.7. Aktif Karbon (Armut kabuğu) Örneğine Ait İmmobilize Enzim için Hesaplanan Değerler**

Armut kabuğundan elde edilen aktif karbon çözeltilerinin adsorpsiyon ile ilgili  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  gibi termodinamik parametreler belirlenmiştir.

$$\Delta G = -RT \ln K_d \quad (1.13)$$

$$\ln K_d = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (1.14)$$

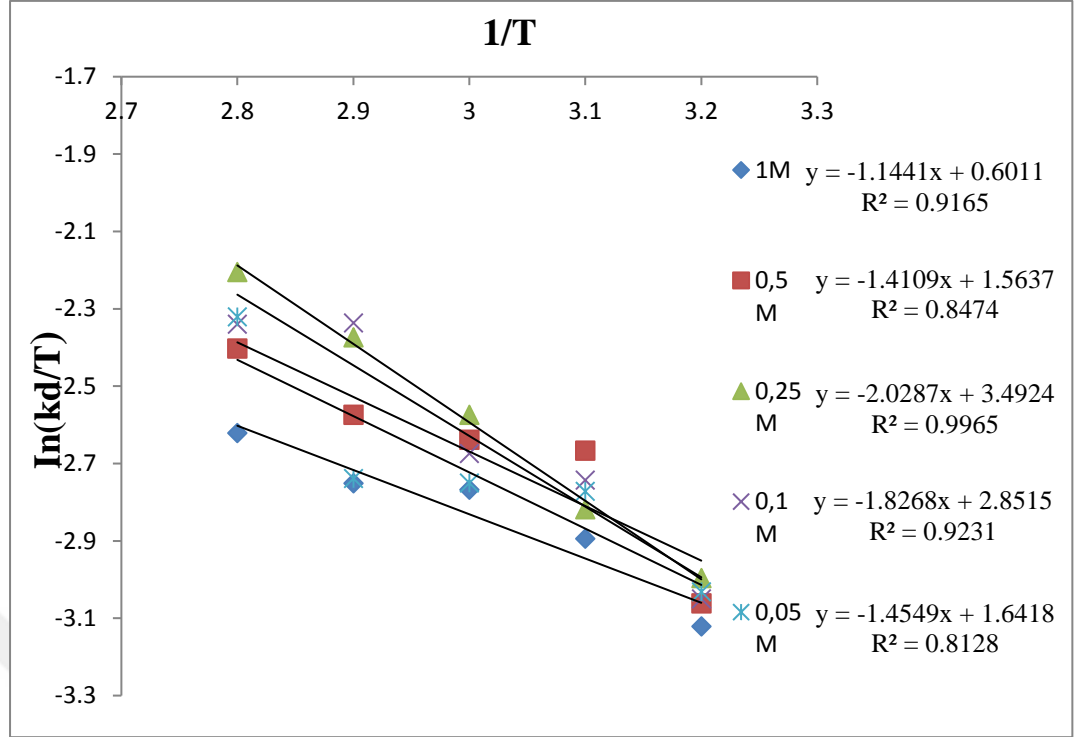
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.6)$$

In Kd değerinin bulunması için In Kd- 1/T grafiği çizilir.

**Çizelge 4.12.** Aktif Karbon (Armut kabuğu) Örneğine Ait Farklı Derişimlerdeki  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ,  $R^2$  ve Reaksiyon Denklemleri

Derişim (M)	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Denklem	-1.4549x+1,6418	-1.8268x+2.8515	-2.0287x+3.4924	-1.4109x+1.5637	-1.1441x+0.6011
$R^2$	0.8128	0.9231	0.9925	0.8474	0.9165
$\Delta H$	12.096	15.188	16.8666	11.7302	9.512
$\Delta S$	13.6499	23.7074	29.0358	13.0006	4.9975
$\Delta G_{313}$	-4260.32	-7405.23	-9017.34	-4057.45	-1554.71
$\Delta G_{323}$	-4396.82	-7642.33	-9361.05	-4187.46	-1604.16
$\Delta G_{333}$	-4533.32	-7879.38	-9652.05	-4317.47	-1652.16
$\Delta G_{343}$	-4669.82	-8116.45	-9942.41	-4447.48	-1702.06
$\Delta G_{353}$	-4806.32	-8353.52	-10232.771	-4577.48	-1751.96

Elde edilen sonuçlara göre,  $\Delta H$ 'nın pozitif olması adsorpsiyonun endotermik olduğunu gösterir.  $\Delta S$  değerlerinin pozitif olması ise entropi değişiminin adsorbantla adsorplanan madde arasındaki bazı yapısal değişikliklere bağlı olabilir.



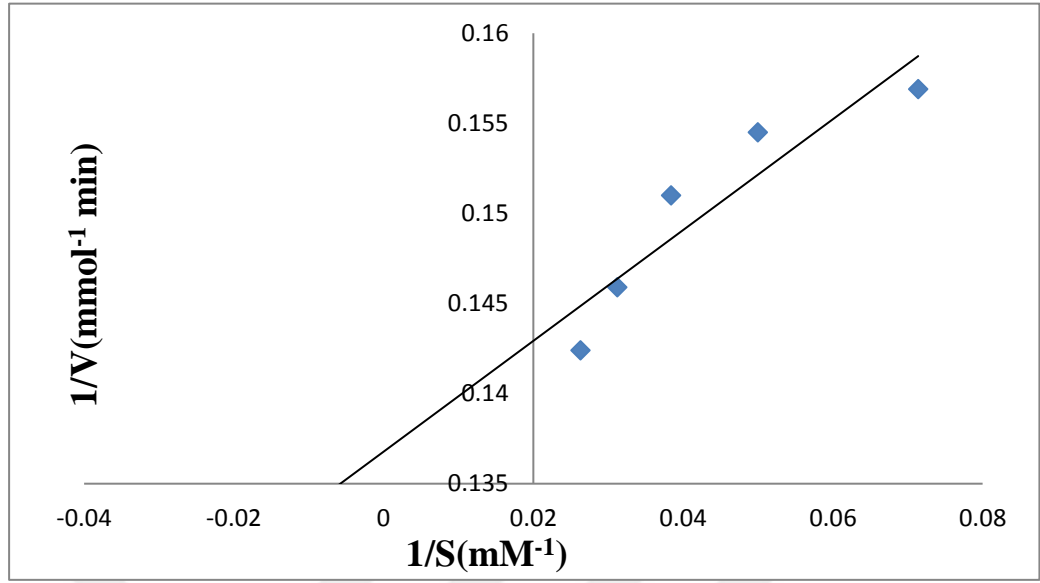
Şekil 4.8. Aktif Karbon (Armut Kabuğu) Örneğine Ait  $\ln K_d/T - 1/T$  Grafiği

## 4.2. Kaolin Örneğine Ait Çizelge ve Grafikler

### 4.2.1. Kaolin Bağlı Enzim için ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Kinetik Sabit Değerlerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.13. İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin  $K_m$  ve  $V_{max}$  Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri

Substrat miktarı (ml)	0.019	0.016	0.013	0.01	0.007	0.004	0.001
E. Ü.	0.727	0.685	0.662	0.647	0.637	0.628	0.616
1/S	0.026	0.031	0.038	0.050	0.071	0.125	0.500
1/V	0.142	0.145	0.151	0.154	0.156	0.159	0.162



**Şekil 4.9.** Kaolin İmmobilize (Bağlı) Enzim İçin  $V_{max}$  ve  $K_m$  Değerleri Grafiği

Şekil 4.9.'da  $1/S$  ve  $1/V$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Lipaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile  $K_m:2.24$  ve  $mM$   $V_{max}:7.69$   $\mu\text{mol/dk}$  olarak bulundu.

#### 4.2.2. Kaolin Örneğinden elde edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

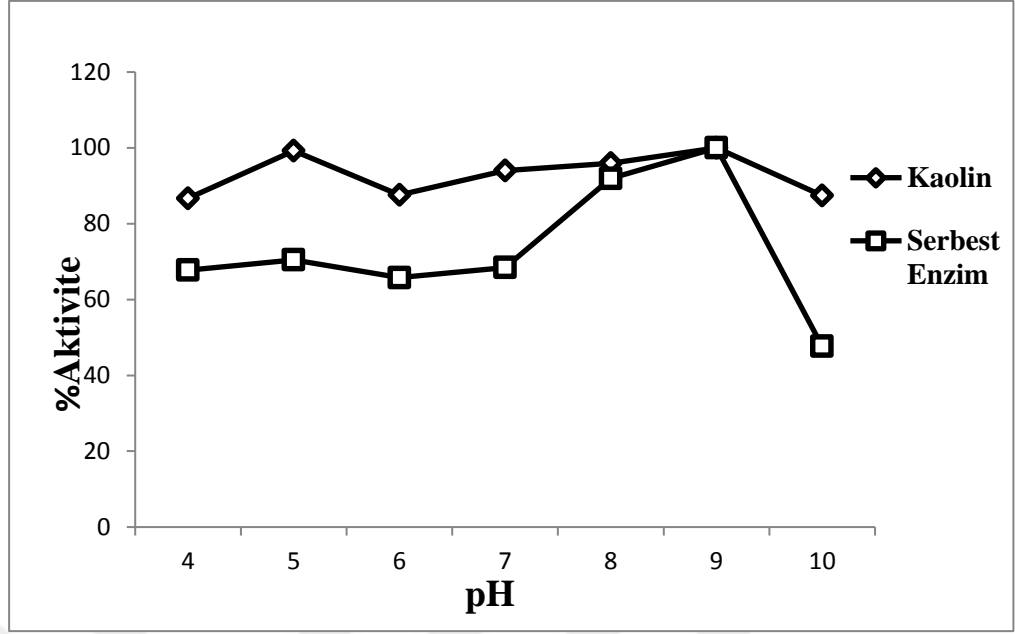
**Çizelge 4.14.** Serbest Enzim İçin pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	0.101	0.105	0.098	0.102	0.137	0.149	0.071
%Aktivite	67.78	70.47	65.77	68.46	91.95	100	47.65

**Çizelge 4.15.** immobilize (Kaolin) Enzim için pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	058	0.667	0.586	0.629	0.942	0.669	0.585
%Aktivite	86.7	99.25	87.6	94.02	95.96	100	87.44





Şekil 4.10. Serbest ve Bağlı enzim(Kaolin) Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı enzimin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi şekil (4.10)'da görülmektedir. Serbest ve bağlı enzimin optimum pH'nın 9 civarında olduğu belirlenmiştir.

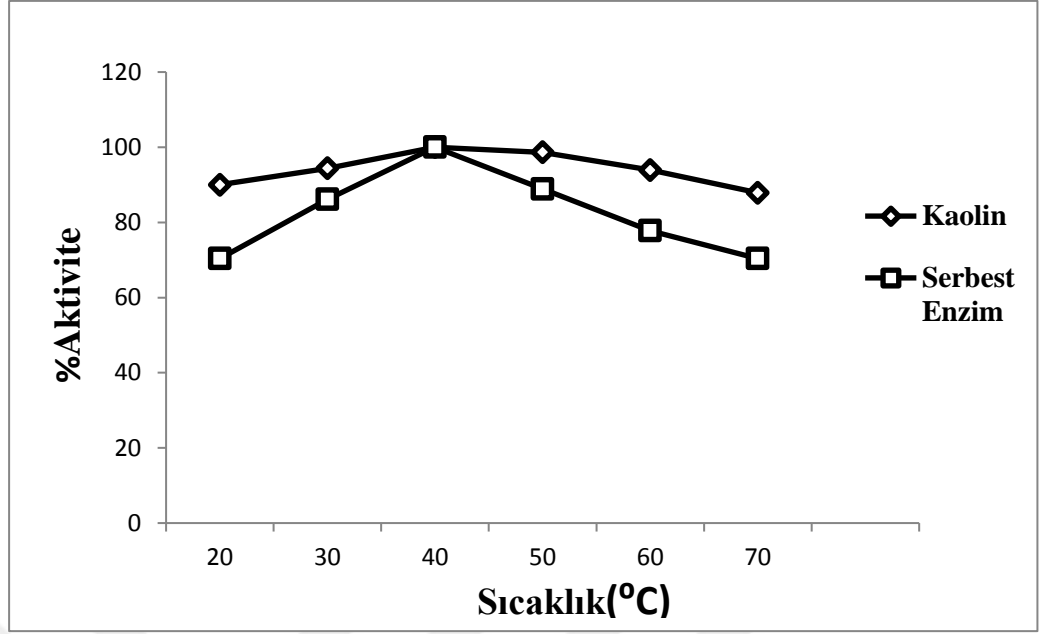
#### 4.2.3. Kaolin Örneğinden elde edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Çizelge 4.16. Serbest Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.076	0.093	0.108	0.096	0.084	0.076
%Aktivite	70.37	86.11	100	88.88	77.77	70.37

Çizelge 4.17. İmmobilize (Kaolin) Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.594	0.623	0.66	0.651	0.62	0.58
%Aktivite	90	94.4	100	98.64	93.94	87.88



**Şekil 4.11.** Serbest ve İmmobilize Enzim (Kaolin) Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı enzimin yaklaşık maksimum aktivitesi 40 °C’de görülmektedir. Bağlı enzimin daha kararlı olduğunu söyleyebiliriz.

#### 4.2.4. Kaolin Örneğinden elde edilen Bağlı ve Serbest Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi

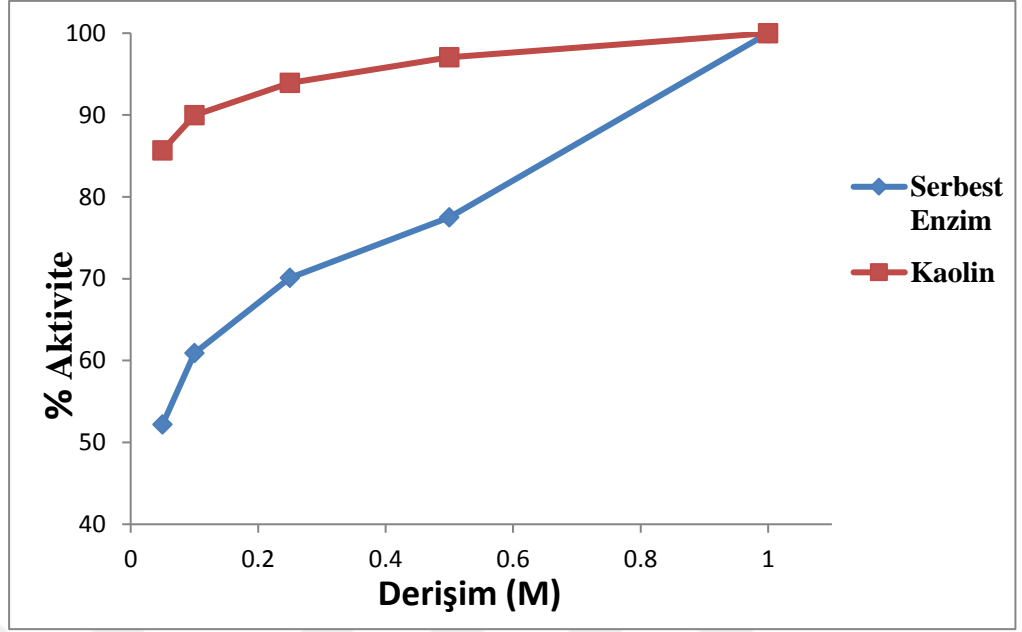
Serbest ve bağlı enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile sabit pH ve sıcaklıkta 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1M’lık konsantrasyonlarda aktivite tayinleri belirlendi.

**Çizelge 4.18.** Serbest Enzim Üzerine İyonik şiddetin Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.098	0.106	0.122	0.135	0.174
%Aktivite	52.2	60.9	70.1	77.5	100

**Çizelge 4.19.** Bağlı Enzim (Kaolin) İçin İyonik şiddet Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.551	0.577	0.604	0.624	0.643
%Aktivite	85.69	89.98	93.93	97.04	100



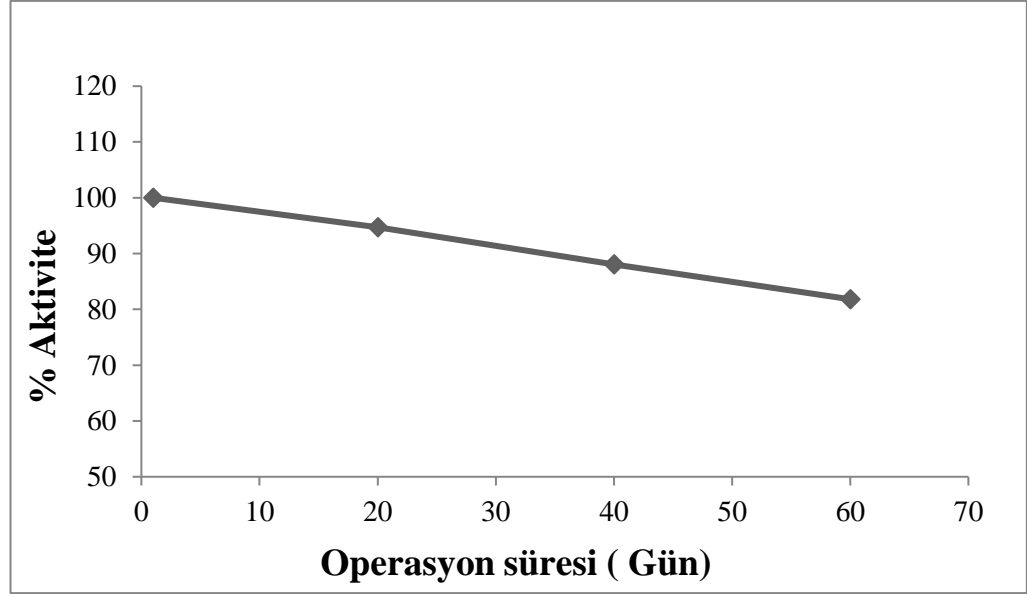
Şekil 4.12. Serbest ve Bağlı (Kaolin) Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı (Kaolin) enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi şekil (4.12)'de görüldüğü üzere bağlı enzim daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

#### 4.2.5. Bağlı Enzimin (Kaolin) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri

Çizelge 4.20. İmmobilize Enzim İçin İki Ay Süresi Boyunca Aktivite Değerleri

Zaman(Gün)	1	20	40	60
E.Ü.	0.627	0.594	0.552	0.513
%Aktivite	100	94.73	88.03	81.81



**Şekil 4.13.** İmmobilize Enzimin(kaolin) İki Ay Süresindeki Aktivite Değişimleri Grafiği

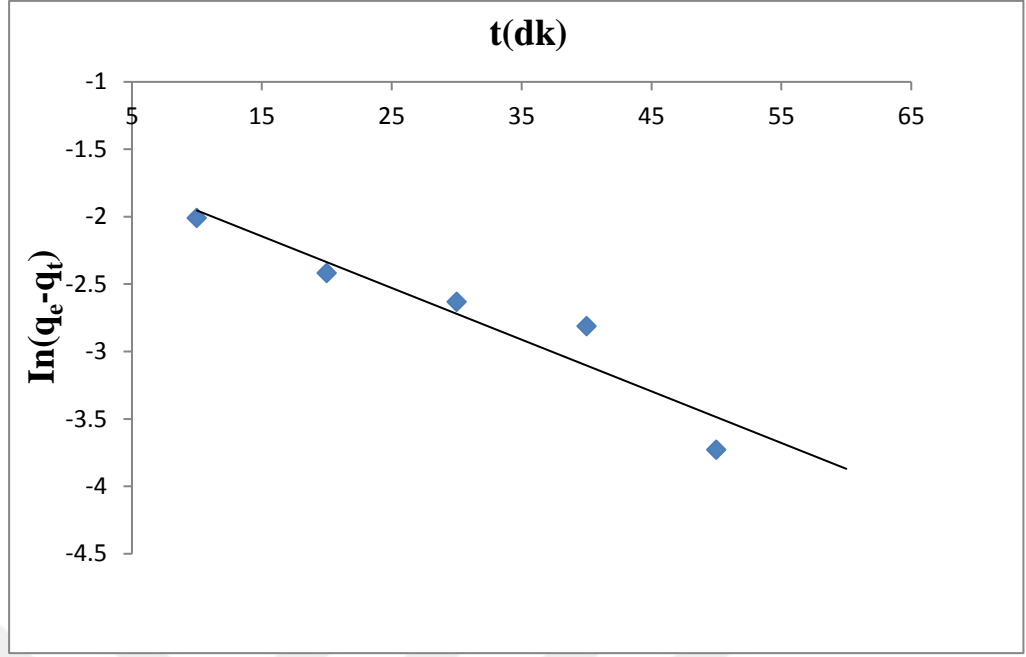
İmmobilize enzimin aktifliğinin depolanma süresinin etkisi incelemek amacıyla 4 °C’de buzdolabında saklandı. Belirli zaman (20 gün) aralıklarda yapılan aktivite ölçümleri sonucu şekil (4.13)’de görüldüğü gibi adsorbe enzim iki ay boyunca aktivitesini % 81,81 oranında koruduğu gözlenmiştir.

#### 4.2.6. İmmobilize Enzim ( Kaolin) için Lagergen Grafikleri

Kaolin adsorpsiyonun kinetik parametreleri belirlenerek, denge zamanına kadar geçen sürede adsorpsiyonun durumu incelenerek elde edilen veriler grafiğe alınmıştır. Bu grafikten Lagergren yalancı birinci derece hız denklemi dikkate alınarak  $\ln(q_e - q_t) - t$  grafiğinin eğim ve kaymasından yararlanılarak  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri belirlenmiştir.

**Çizelge 4.21.** İmmobilize (Kaolin) Enzim için  $\ln(q_e - q_t) - T$  Çizelgesi

Zaman(dk)	10	20	30	40	50
$\ln(q_e - q_t)$	-2.01	-2.419	-2.631	-2.813	-3.729
E.Ü.	0.421	0.466	0.483	0.495	0.531



**Şekil 4.14.** Kaolin Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denkleminin Grafiği (30 °C)

**Çizelge 4.22.** Kaolin İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler

Kullanılan kil	q <sub>e</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (dk <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Denklem
Kaolin	37.2	0.088	0.9012	-0.0383x-1.5708

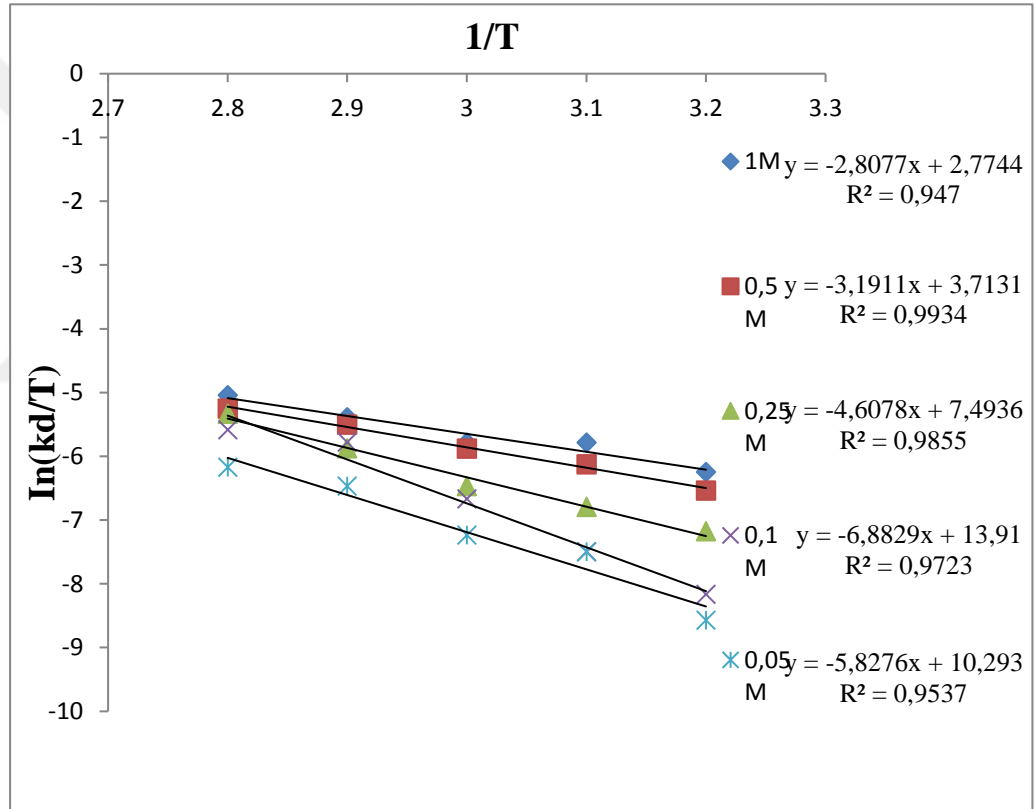
Grafikten elde edilen korelasyon değerlerinin yüksek olması, adsorpsiyonun yalancı birinci dereceden kinetik modele uyduğunu söyleyebiliriz.

#### 4.2.7. Kaolin Örneğine Ait İmmobilize Enzim için Hesaplanan Değerler

Kaolinden elde edilen çözeltilerinin adsorpsiyon ile ilgili  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  gibi termodinamik parametreler belirlenmiştir. Farklı sıcaklık ve farklı derişimlerden hazırlanan sodyum fosfat tamponunu reaksiyon ortamına ilave ederek aktiviteleri belirlendi.  $\ln K_d - 1/T$  grafiği çizilerek  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri bulunmuştur.

**Çizelge 4.23.** Kaolin Örneğine Ait Farklı Derişimlerdeki  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ,  $R^2$  ve Reaksiyon Denklemleri

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
Denklemler	$-5.8276x+10.293$	$-6.8829x+13.91$	$-4.6078x+7.4936$	$-3.1911+3.7131$	$-2,8077x+2,7744$
$R^2$	0.9537	0.9723	0.9855	0.9934	0.947
$\Delta H$	48.4506	57.2244	38.3092	26.5308	23.3432
$\Delta S$	85.576	115.6477	62.3017	30.8707	23.0664
$\Delta G_{313}$	-26736.84	-36140.5	-19462.12	-9635.99	-7196.44
$\Delta G_{323}$	-27592.6	-37296.98	-20085.14	-9944.7	-7427.1
$\Delta G_{333}$	-28448.36	-38453.46	-20708.16	-10253.41	-7657.77
$\Delta G_{343}$	29304.12	-39609.99	-21331.17	-10562.12	-7888.43
$\Delta G_{353}$	-30159.88	-40766.41	-21954.19	-10870.83	-8119.09



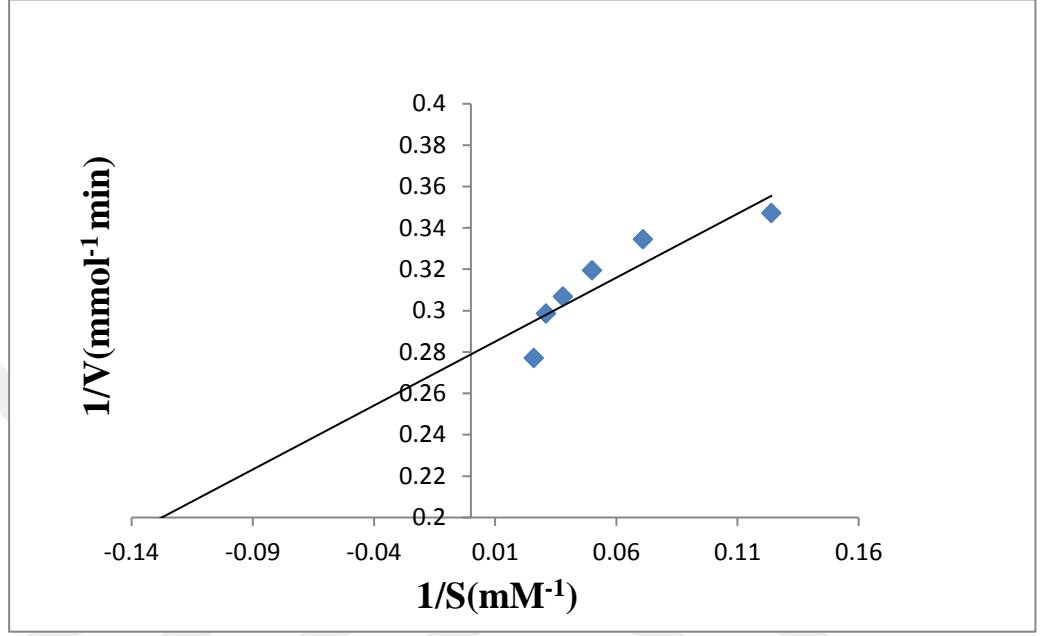
**Şekil 4.15.** Kaolin Örneğine Ait  $\ln K_d/T - 1/T$  Grafiğı

### 4.3. Akasya Yaprığı Örneğine Ait Çizelge ve Grafikler

#### 4.3.1. Akasya Yaprığı Bağlı Enzim için ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Kinetik Sabit Değerlerinin Belirlenmesi

**Çizelge 4.24.** İmmobilize (Akasya Yaprığı) Enzim İçin  $K_m$  ve  $V_{max}$  Sabitlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat ve Enzim Değerleri

Substrat miktarı (ml)	0.019	0.016	0.013	0.01	0.007	0.004	0.001
E. Ü.	0.371	0.335	0.326	0.313	0.299	0.288	0.284
1/S	0.0855	0.087	0.0885	0.09	0.0915	0.093	0.0945
1/V	3.71	3.35	3.26	3.13	2.99	2.88	2.84



Şekil 4.16. İmmobilize (Akasya yaprağı) Enzim İçin  $V_{max}$  ve  $K_m$  Değerleri Grafiği

Şekil 4.16.'de 1/S ve 1/V değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Lipaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile  $K_m$ :2.21mM ve  $V_{max}$ :3.58 olarak bulundu.

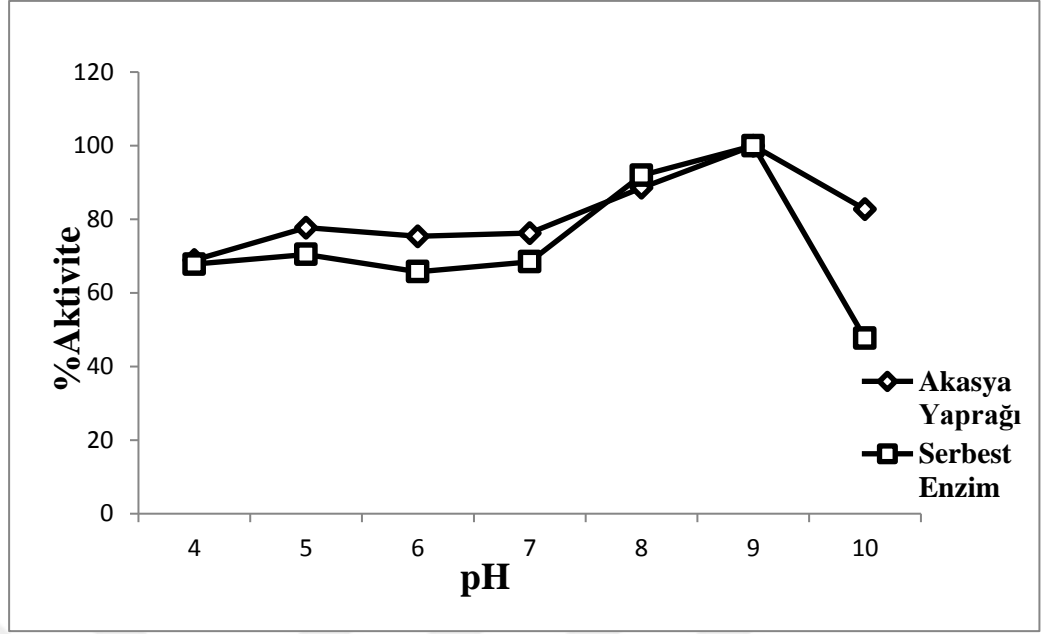
#### 4.3.2. Akasya Yaprağı Örneğinden Elde Edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Çizelge 4.25. Serbest Enzim İçin pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	0.101	0.105	0.098	0.102	0.137	0.149	0.071
%Aktivite	67.78	70.47	65.77	68.46	91.95	100	47.65

Çizelge 4.26. İmmobilize (Akasya yaprağı) Enzim için pH Değerleri

pH	4	5	6	7	8	9	10
E.Ü.	0.235	0.265	0.257	0.26	0.302	0.341	0.282
%Aktivite	68.91	77.71	75.36	76.25	88.56	100	82.7



Şekil 4.17. Serbest ve Bağlı (Akasya Yaprağı) enzim Aktivitesi Üzerine pH'nin Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı enzimin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi şekil (4.17)'de görülmektedir. Serbest ve bağlı enzimin optimum pH'nın 9 civarında olduğu belirlenmiştir.

#### 4.3.3. Akasya Yaprağı Örneğinden elde edilen Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

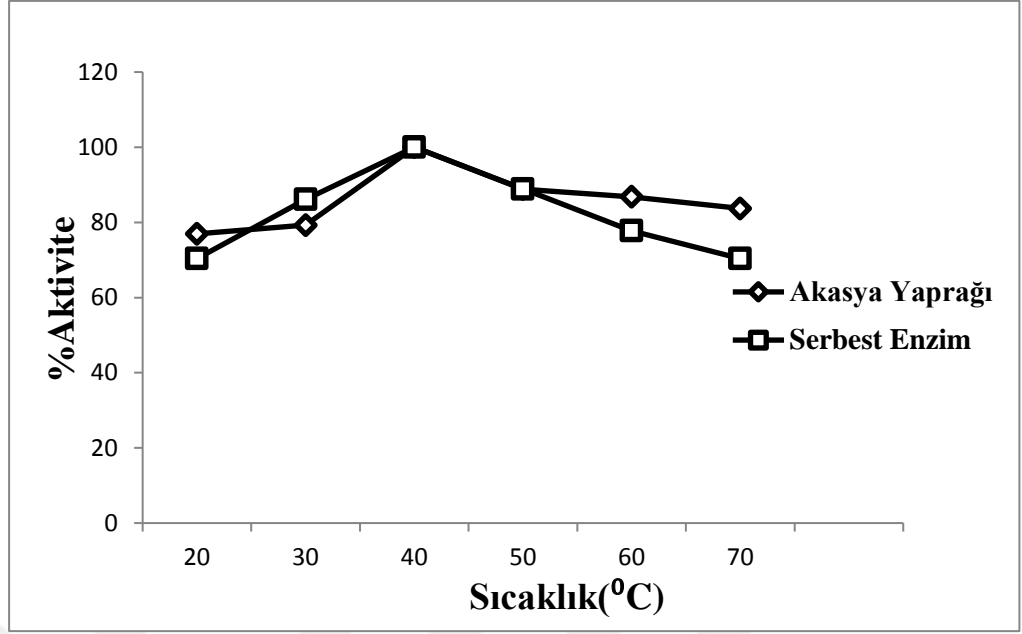
Çizelge 4.27. Serbest Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.076	0.093	0.108	0.096	0.084	0.076
%Aktivite	70.37	86.11	100	88.88	77.77	70.37

Çizelge 4.28. İmmobilize (Akasya yaprağı) Enzim İçin Sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70
E.Ü.	0.297	0.306	0.386	0.343	0.335	0.323
%Aktivite	76.94	79.27	100	88.86	86.79	83.68





**Şekil 4.18.** Akasya Yaprığı Örneğine Ait Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi Grafığı

Serbest ve bağlı (Akasya) enzim 40 ° C' de maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

#### 4.3.4. Akasya Yaprığı Örneğinden Elde Edilen Bağlı ve Serbest Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet Etkisi

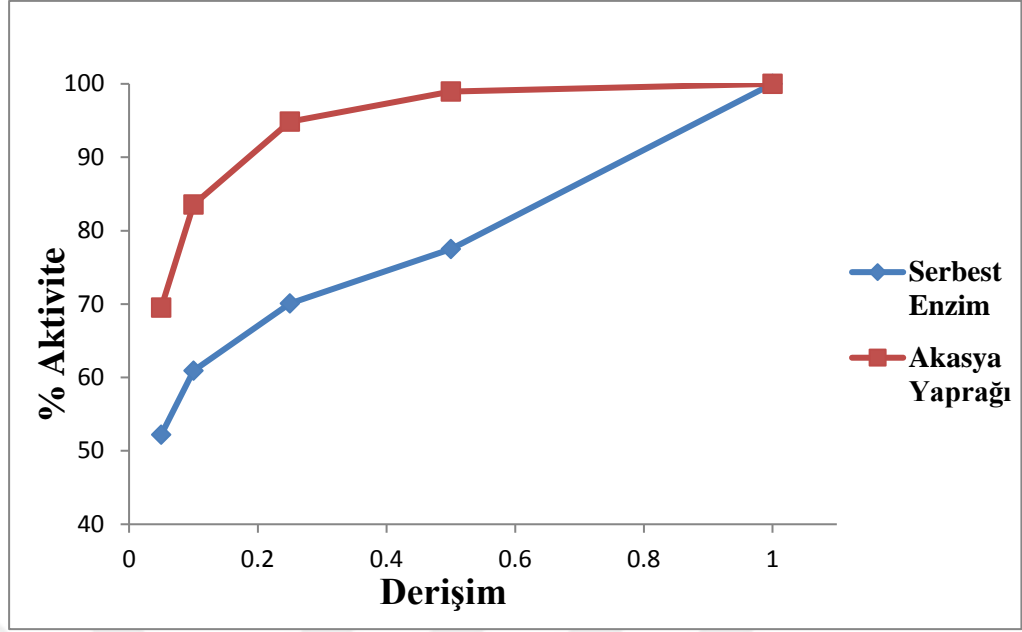
Serbest ve bağlı enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile sabit pH ve sıcaklıkta 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1M'lık konsantrasyonlarda sodyum fosfat reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri belirlendi.

**Çizelge 4.29.** Serbest Enzim Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.098	0.106	0.122	0.135	0.174
%Aktivite	52.2	60.9	70.1	77.5	100

**Çizelge 4.30.** Bağlı Enzim (Akasya) İçin İyonik Şiddet Etkisi

Derişim (M)	0.05	0.1	0.25	0.5	1
E.Ü.	0.203	0.244	0.277	0.289	0.292
Aktivite	69.52	83.56	94.86	98.97	100



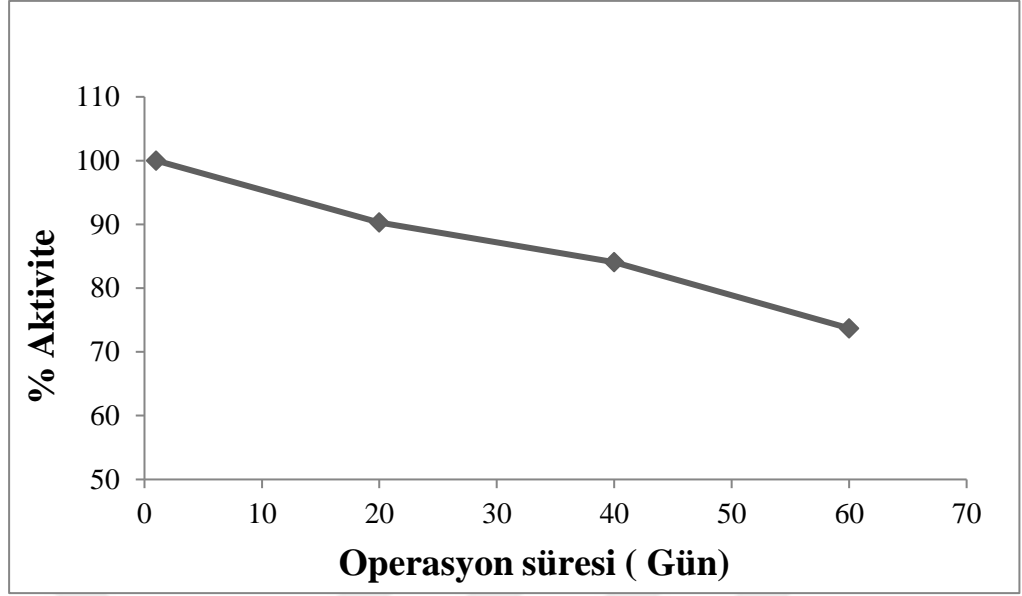
Şekil 4.19. Serbest ve Bağlı (Akasya) Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi Grafiği

Serbest ve bağlı (Akasya Yaprağı) enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi şekil (4.19)'da görüldüğü üzere görüldüğü üzere bağlı enzim daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

#### 4.3.5. Bağlı Enzimin (Akasya Yaprağı) İki Ay Boyunca Aktivite Değişim Değerleri

Çizelge 4.31. İmmobilize Enzim İçin İki Ay Süresi Boyunca Aktivite Değerleri

Zaman(Gün)	1	20	40	60
E.Ü.	0.289	0.261	0.243	0.213
%Aktivite	100	90.31	84.08	73.70



**Şekil 4.20.** İmmobilize Enzimin(Akasya) İki Ay Süresindeki Aktivite Değişimleri Grafiği

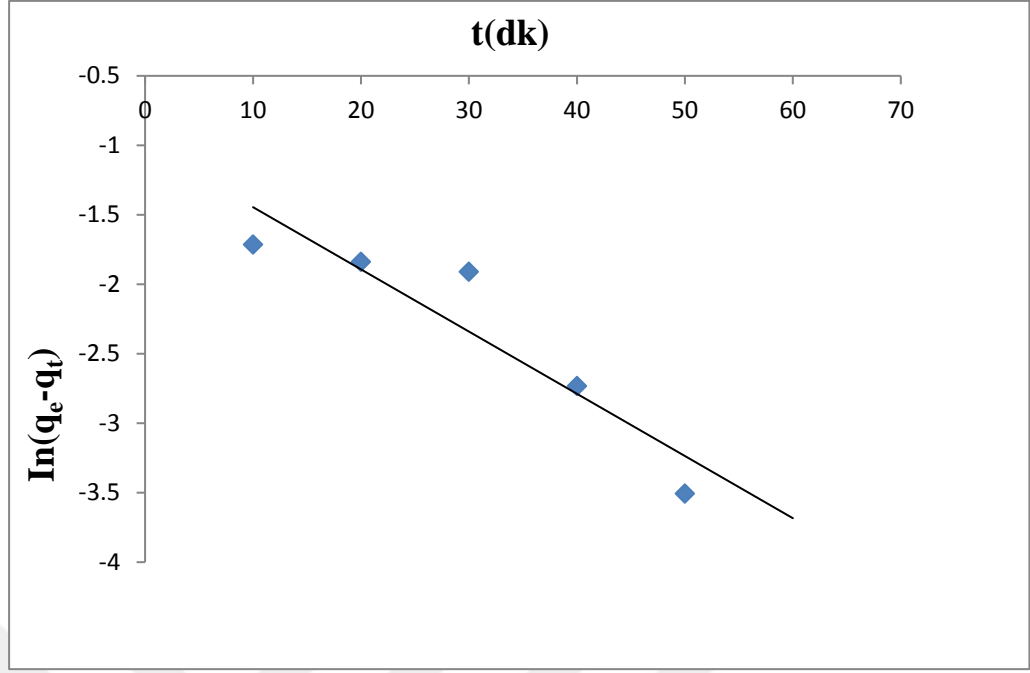
İmmobilize enzimin aktifliğinin depolanma süresinin etkisi incelemek amacıyla 4 °C’de buzdolabında saklandı. Belirli zaman (20 gün) aralıklarda yapılan aktivite ölçümleri sonucu şekil (4.20)’de görüldüğü gibi adsorbe enzim iki ay boyunca aktivitesini % 73.7 oranında koruduğu gözlenmiştir

#### 4.3.6. İmmobilize Enzim (Akasya Yaprağı) için Lagergen Grafikleri

Akasya Yaprağı adsorpsiyonun kinetik parametreleri belirlenerek, denge zamanına kadar geçen sürede adsorpsiyonun durumu incelenerek elde edilen veriler grafiğe alınmıştır. Bu grafikten Lagergren yalancı birinci derece hız denklemini dikkate alınarak  $\ln(q_e - q_t) - t$  grafiğinin eğim ve kaymasından yararlanılarak  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri belirlenmiştir.

**Çizelge 4.32.** İmmobilize (Akasya Yaprağı) Enzim için  $\ln(q_e - q_t) - T$  Çizelgesi

Zaman(dk)	10	20	30	40	50
$\ln(q_e - q_t)$	-1.715	-1.838	-1.9105	-2.733	-3.506
E.Ü.	0.267	0.288	0.299	0.382	0.417



**Şekil 4.21.** Akasya Yaprığı Örneğinin Adsorpsiyonu İle İlgili Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denkleminin Grafiği (30 °C)

**Çizelge 4.33.** Akasya Yaprığı İçin Lagergren Yalancı Birinci Derece Hız Denklemi ve Kinetik Parametreler

Kullanılan kil	q <sub>e</sub> ( mg.g <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (dk <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Denklem
(Akasya Yaprığı)	9.94	0.103	0.8563	-0.0448x-0.9975

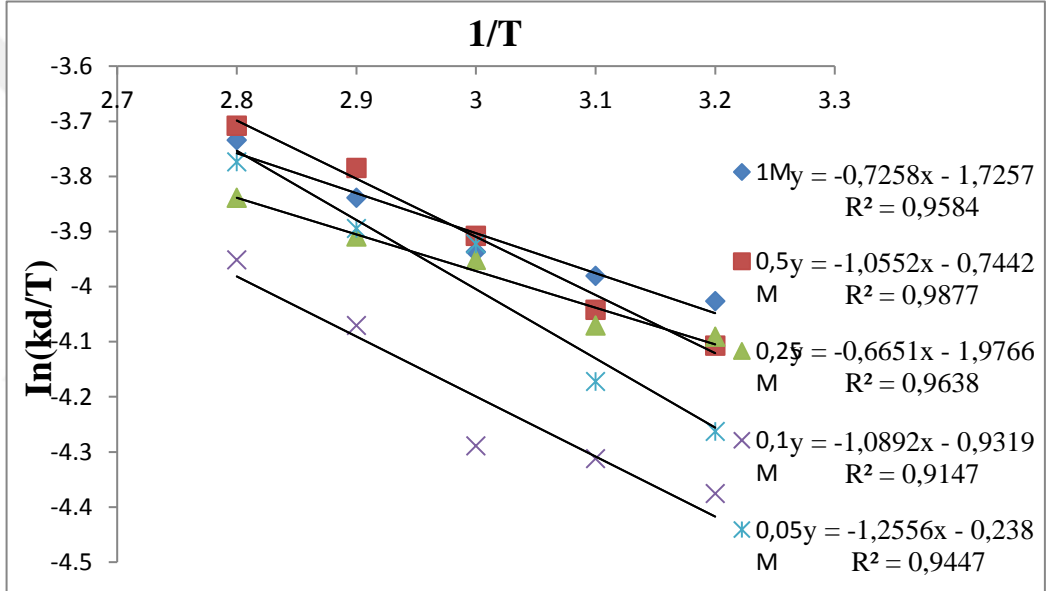
Grafikten elde edilen korelasyon değerlerinin yüksek olması, adsorpsiyonun yalancı birinci dereceden kinetik modele uyduğunu söyleyebiliriz.

#### 4.3.7. Akasya Yaprığı Örneğine Ait İmmobilize Enzim için Hesaplanan Değerler

Akasya yaprağından hazırlanan çözeltinin adsorpsiyon ile ilgili  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  gibi termodinamik parametreler belirlenmiştir. Farklı sıcaklık ve farklı derişimlerden hazırlanan sodyum fosfat tamponunu reaksiyon ortamına ilave ederek aktiviteleri belirlendi.  $\ln K_d - 1/T$  grafiği çizilerek  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri bulunmuştur.

**Çizelge 4.34.** Akasya Yaprağının Farklı Derişimlerdeki  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ,  $R^2$  ve Reaksiyon Denklemleri

Derişim (M)	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Denklem	-1.2556x-0.238	-1.0892x-0.9319	-0.6651x-1.9766	-1.0552x-0.7442	-0.7258x-1.7257
$R^2$	0.9447	0.9147	0.9638	0.9877	0.9584
$\Delta H$	10.439	9.0556	5.5296	8.7729	6.0343
$\Delta S$	-1.9783	-7.7478	-16.5997	-6.1873	-14.3475
$\Delta G_{313}$	629.65	2434.12	5201.23	1945,4	4496.8
$\Delta G_{323}$	649.43	2511.59	5367.23	2007.33	4640.28
$\Delta G_{333}$	669.21	2589.06	5533.23	2069.14	4783.75
$\Delta G_{343}$	688.99	2666.55	5699.23	2131.02	4927.23
$\Delta G_{353}$	708.77	2744.02	5865.23	2192.89	5070.7



**Şekil 4.22.** Akasya Yaprağı Örneğine Ait  $\ln Kd/T - 1/T$  Grafiği

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, lipaz enzimi (E.Ü. 5-15 units/mg. Protein) armut kabuğundan elde edilen aktif karbon, kaolin ve akasya yaprağı üzerine adsorbe edilerek adsorpsiyon şartları ve kinetik özellikleri U.V. spektrofotometresi yardımıyla araştırılmıştır.

$V_{max}$  reaksiyon hızı ve  $K_m$  Micheals Menten sabiti Lineweaver- Burk grağinden faydalanılarak belirlendi.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin belirlemek için farklı substrat miktarları kullanarak ölçüm sonucunda serbest enzim ve elde edilen immobilize enzimlerin grafiklerinden (Şekil:4.1, 2, 9 ve 16)  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerler serbest enzim için  $K_m$ : 2.23 mM -  $V_{max}$ :2.50  $\mu$ mol/dk, Armut kabuğu için  $K_m$ : 2.18mM-  $V_{max}$ : 4.71  $\mu$ mol/dk, Kaolin için  $K_m$ :2.24 mM - $V_{max}$ :7.69  $\mu$ mol/dk, Akasya Yaprığı için  $K_m$ :2,21mM - $V_{max}$ :3,58 $\mu$ mol/dk olarak tespit edilmiştir. Buna göre serbest enzim ve adsorplanan enzimler için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri birbirine yakındır.

Tutar, (2009), *candida rugosa* lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu çalışmasında,  $K_m$  değerindeki artış immobilize enzimin substrata olan ilgisinin az olduğunu gösterir. İmmobilize lipazın  $K_m$  değeri (1.52 mM) serbest lipazın  $K_m$  değerinden (0.44 mM) daha yüksek bulmuştur. İmmobilize lipazın  $V_{max}$  değeri 29.0 U/mg-protein serbest lipazın  $V_{max}$  değeri ise 115.0 (U/mg-protein) olarak hesaplamıştır.

Karaca, (2006), *Homicola lanuginosa* lipazının poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) desteğine immobilize edildiği bir çalışmada ise serbest lipaz için  $K_m$  değeri 3.58 mM ve  $V_{max}$  değeri 10.72 mM.dak-1, immobilize lipaz için  $K_m$  değeri 7.36 mM ve  $V_{max}$  değeri 7.13 mM.dak-1 olarak bulmuştur. Ye ve ark., (2007) *Candida Rugosa* lipazının kitosanla modifiye edilmiş membran yüzeyine immobilize edildiği bir çalışmada, serbest lipaz için  $K_m$  değeri 0.45 mM ve  $V_{max}$  değeri 46,4 U/mg-protein, immobilize lipaz için  $K_m$  değeri 1.43 mM ve  $V_{max}$  değeri 21.2 U/mg-protein olarak bulmuşlardır.

Palmieri ve ark. (1994), İmmobilizasyon yönteminin enzimin yapısında meydana getirdiği yapısal değişiklikten yada immobilize enzimin aktif bölgelerine substratın yeterli düzeyde ulaşamamasından  $K_m$  değerinde

farklılıklar gözlenebilir. İmmobilizasyondan sonra lipazın  $K_m$  değerindeki artışı gösteren benzer bir çalışma literatürde mevcuttur. Buna göre, lipaz enzimi immobilizasyonu ile enzimin yapısının çok fazla değişmediği sonucu çıkarılır.

Elde edilen immobilize enzimlere (Armut Kabuğu, Kaolin ve Akasya Yaprağı) en yüksek aktivite gösteren pH' sını belirlemek için farklı pH'larda (4,5,6,7,8,9,10) sodyum fosfat tamponu ile muamele edilerek aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar % aktivite olarak hesaplandı ve grafikler sırasıyla (Şekil: 4.3, 10 ve 17) çizilerek optimum pH'ları serbest enzim ve immobilize enzim için yaklaşık 9.0 civarında olduğu belirlendi.

Shaw ve ark., (1990) lipaz enzimin altı değişik katı desteğe (polivinil klorür , kitosan, kitin, agaroz, sefaroze ve trisakril) immobilize etmişler ve immobilizasyondan sonra optimum pH'nın 7.5'dan 8.5'a yükseldiğini bulmuşlardır.

Tutar, (2009), yaptığı aynı çalışmada serbest lipaz için optimum pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur. Sporopollenin kullanılarak immobilize edilen enzim için ise optimum pH 6.0-7.0 olarak saptamıştır.

Koolman ve Roehm (2005), enzimlerin maksimum reaksiyon hızına ulaştıkları pH değerine optimum pH olarak adlandırılır. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların yapılarında değişimler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar. Margesin ve ark., (2002), Literatürde de topraktaki lipaz aktivitelerini belirlemek için kullanılan kolometrik yöntemle lipazların optimum aktivitelerinin pH (7.5-9.0) arasında değiştiğini gözlemlediler.

Enzimlerle katalizlen reaksiyonun hızları sıcaklıkla artma gözlenir ancak enzimlerin protein yapıda olmalarından dolayı sıcaklığın daha fazla artması yapısında bozulmaya ve aktivitelerinde azalmaya hatta durmaya yol açmaktadır. Yaptığımız çalışmada serbest ve bağlı enzimlerin (Armut Kabuğu, Kaolin ve Akasya Yaprağı) üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için enzimleri farklı sıcaklıklarda (20-70°C) çalışıldı. İmmobilize enzimlerin bağlı aktivitelerinin doğal enzime göre yüksek olduğu gözlenmiştir.

İmmobilizasyondan sonra enzimin üç boyutlu daha stabil hale gelmiştir (Şekil:4.4, 11 ve 18).

Dovile ve ark., (2008), Enterobacter ve Aerogenesin immobilizasyon için optimum reaksiyon sıcaklığını serbest enzim için 35 °C iken immobilize enzim için 40 °C bulunmuştur.

Gillies ve ark. (1987), immobilize lipaz tarafından kokulu esterlerin üretimi çalışmasında Immobilize enzim için optimum sıcaklığın 20°C ile 30°C arasında olduğunu ve daha yüksek sıcaklıklarda enzimin aktivitesinin düştüğü görülmüştür. (Shaw ve ark., 1990), çalışmalarının immobilize enzime sıcaklığını etkisi incelenmesi aşamasında immobilizasyondan sonra optimum sıcaklığını 35°C'den 45-55°C'ye yükseldiğini bulmuşlardır.

Serbest ve immobilize enzimlerin iyonik şiddet etkisini belirlemek için sabit pH'da ve sabit sıcaklıkta farklı konsantrasyonlarda aktivite tayinleri yapıldı ve grafikleri (Şekil:4.5, 12 ve 19) verildi. Bağlı enzimlerin serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi ve maksimum aktivite için 1M olduğu tespit edildi. Serbest enzimler içinde yaklaşık aynı sonuçlar elde edilmiştir. Mustafaev, (1987), iyonik şiddet, enzimin aktivitesi üzerine etki eden önemli parametrelerden birisidir.

Aktif kömür, kaolin ve akasya üzerine lipaz enzimin sabit sıcaklık (30°C) ve sabit pH'da (pH:7.25) inkübasyon süresi araştırıldı. 60 dakikayı aşan karıştırma süresinin enzim adsorpsiyona önemli etkisi olmadığı belirlenmiştir. Endüstriyel üretimde kullanılacak bağlı enzim (Aktif kömür) iki ay boyunca aktivitesini % 78.09 olarak korumaktadır. Aynı şekilde ağı enzim (Kaolin) aktivitesini % 81.81 oranında ve adsorbe- enzim (Akasya yaprağı) ise aktivitesini % 73.7 'ni koruduğu tespit edilmiştir.

Akalın, (2011), Jelatin hidrojellerinin sentezlenmesi, şişme/bozunma davranışlarının incelenmesi ve uygun immobilize lipaz-jelatin hidrojel sisteminin oluşturulması çalışmasında Immobilize lipazın 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktivitesinin %68'ini koruduğu saptandı. 4°C'de depolamada 48. günde serbest lipazın başlangıç aktivitesinin %32'sini, immobilize lipazın ise başlangıç aktivitesinin %92'ini koruduğu belirlenmiştir.



Huang ve ark., (2007), lipaz immobilizasyonu için kararlı chitosan nanofibröz membranın hazırlanması ve karakterizasyonu çalışmasında, 4°C’de saklanan immobilize lipazın 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 56’sını koruduğu, serbest lipazın ise başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir. Chiou ve ark., (2004) Candida Rugosa lipazının kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiği diğer bir çalışmada ise 30 gün sonunda immobilize lipaz aktivitesinin % 54’ünü koruduğu, serbest lipaz enzimi ise aktivitesinin tamamını kaybettiği bulunmuştur.

Armut kabuğu (aktif karbon), kaolin ve akasya yaprağının adsorpsiyonun kinetik parametreleri belirlenerek, denge zamanına kadar geçen sürede adsorpsiyonun durumu incelenerek elde edilen değerlerden  $\ln(q_e - q_t)$  sonuçlarına hesaplandı. Lagergren yalancı birinci derece hız denklemi dikkate alınarak  $\ln(q_e - q_t) - t$  grafiklerinden (Şekil:4.7, 14 ve 21) eğim ve kaymasından yararlanılarak  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri belirlenmiştir. Armut Kabuğu için  $q_e$ : 1.43,  $k_1$ : 0.144 ve  $R^2$ : 0.96, Kaolin için  $q_e$ : 37.2,  $k_1$ : 0.088 ve  $R^2$ : 0.9012 ve Akasya Yaprığı için  $q_e$ : 9.94,  $k_1$ :0.103 ve  $R^2$ : 0.8563 değerleri bulunmuştur. Aktif karbon ve Kaolin için korelasyon değerlerinin yüksek olması, adsorpsiyonun yalancı birinci dereceden kinetik modele uyduğu, Akasya yaprağı için ise  $R^2$  değerinin düşük olması nedeniyle bu modele uymadığını söyleyebiliriz.

Armut kabuğundan elde edilen aktif karbon, kaolin ve akasya yaprağında hazırlan çözeltilerinin adsorpsiyon ile ilgili  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  gibi termodinamik parametreler belirlenmesi için farklı konstrasyon ve farklı sıcaklıklarda yapılan aktivite tayini yapılarak  $\ln(kd/T)$  ve  $1/T$  değerleri hesaplanarak grafikleri (Şekil:4.8, 15, 22) çizildi. Grafiklerdeki sonuçlara göre  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  gibi termodinamik parametreleri hesaplandı.

Termodinamik sabitler  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri (Çizelge:4.12, 23, 34) verilmiştir. Her üç bağlı enzim için  $\Delta H$  değerleri pozitif bulunmuştur. ,  $\Delta H$ ’ nın pozitif olması sorbent üzerindeki adsorpsiyonun endotermik olduğunu gösterir.

$\Delta S$  değerlerinin aktif karbon ve kaolin için pozitif akasya yaprağı için ise negatif değerler elde edilmiştir. Aynı şekilde  $\Delta G$ ’ ninde aktif karbon ve kaolin

negatif, akasya yaprağı için ise pozitif değerler bulunmuştur. Gibbs serbest enerjisi değerlerinin negatif olması adsorpsiyonun kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir.  $\Delta S$ ' nin pozitif değer olması ise entropi değişimlerinin adsorbantla adsorplanan madde arasındaki bazı yapısal değişikliklere bağlı olabilir.

Ackacha, (2012), Bir katı yüzeyde adsorplanan atom, iyon veya moleküller hareketlerinde bir azalma olur ve entropileri ( $\Delta S$ ) düşer. Çözelti ortamında adsorpsiyon durumlarında entropi değişim bazen pozitif olabilmektedir. Sabit sıcaklık ve basınçta adsorpsiyon genellikle kendiliğinden gerçekleştiği için adsorpsiyon esnasındaki serbest entalpi değişimi veya Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G$ ) negatif işaretli olur yadav ve ark., (1991). Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G$ )'nin negatif olması adsorpsiyonun kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir

Sonuç olarak, aktif karbon, kaolin ve akasya yaprağının immobilizasyon için adsorban madde olarak kullanılacağı görülmüştür. Bağlı enzimin aktivitesi ve stabil özellikleri seçilen adsorbanlar ve kullanılan yöntemin avatajlı olduğu, enzimin endüstride tekrar kullanılabilirlik özelliğe olduğunu söyleyebiliriz.

## KAYNAKLAR

- Ackacha, M. A., Elsharif, L. A. 2012. Adsorption removal of lead ions by *Acacia Tortilis* leaves: equilibrium, kinetics and thermodynamics int. you. of. env sciand development, 3(6):584-589.
- Adamis, Z., Fodor, J. 2005. Bentonite, kaolin and selected clay minerals, environmental health criterio 231, world health organization Geneva, 11-12 pp.
- Akalın, G. O. 2011. Jelatin hidrojellerinin sentezlenmesi, şişme/bozunma davranışlarının incelenmesi ve uygun immobilize lipaz-jelatin hidrojel sisteminin oluşturulması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Alcántara, A. R., Domínguez de María, P., Fernández, M., Hernaíz, M. J., Montero, J. M. A., Sinisterra, J. V. 2004. Resolution of Racemic Acids, Esters and Amines by *Candida rugosa* Lipase in Slightly Hydrated Organic Media. Food Technol. Biotechnol, 42(4):343-354.
- Anonim, 2013. <https://www.forumlordum.net/merak-edilenler/135595-enzimlerin-yapisi-ve-ozellikleri-htm/> (Erişim tarihi 22.12.2016).
- Anonim, 2015. <https://www.hurbilgi.com/index.php/2015/08/06/enzim-nedir-ozellikleri-konu-anlatimi/> (Erişim Tarihi 22.12.2016).
- Borrelli, G. M., Trono, D. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications, Int. J. Mol. Sci, (16) 20774-20840.
- Cesarini, S., Infanzon, B., Pastor, F. I. J., Diaz, P. 2014. Fast and economic immobilization methods described for non-commercial *pseudomonas* lipases. BMC Biotechnology, 14:27.
- Chiou S. H., Wu W.T. 2004 “Immobilization of *Candida Rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups”, Biomaterials, 25:197204.
- Diaz, P., Prim, N., Pastor, F. I. J. 1999. Direct fluorescencebased lipase activity assay university of barcelona Barcelona, Spain. BioTechniques, 27:696-700.
- Dovile, S., Kirišauskaitė, V., Bendikienė, B., Juodko, B. 2008. Properties and immobilization of *Enterobacter Aerogenes* 13 lipase, original paper 13(5):1-8
- Duman, O. 2012. Doğal Nano killer ile atıksulardan Zn<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+2</sup> ağır metallerin giderilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- Erol, N. 2012. Polifenol oksidaz enziminin (E.C.1.14.18.1) fındık kabuğundan elde edilen aktif karbon üzerine adsorpsiyonu ve kinetiğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.
- Ertan, M. 2009. Cevizden çeşitli yollarla elde edilen doğal ve modifiye aktif karbonlar üzerinde katalaz enzim adsorpsiyonu ve kinetiğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.
- Eygi, M. S., Ateşok, G. 2010. Anyonik polielektrolitlerin kaolen üzerindeki adsorplanma mekanizması. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Maden Mühendisliği Programı. 9(3) :75-86.

- Farias, M. A., Valoni, E. A., Castrob, A. M., Coelho M. A. Z. 2014. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agro industrial residues, 38: 301-306.
- Gillies, B., Yamazaki, H., Armstrong, D.W., 1987, "Production of flavor esters by immobilized lipase", *Biotechnology Letters*, 9: 709-714.
- Görgün, S., Akpınar, M. A. 2012. Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), Living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). 12: 207-215.
- Güler, U. 2014. Mitokondrial Glutmat dehidrogenaz enziminin koyun karaciğerinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Hanefeld, U., Gardossib, L., Magnerc, E. 2008. Understanding enzyme immobilisation. 38: 453-468.
- Hoi, S. W., Holland, J. B., Hammond E. G. 1999. Heritability of lipase activity of oat caryopses. 39:1055-1059.
- Hoshino K., Taniguchi M., Katagiri M., Fujii M. 1992. "Properties of amylase immobilized on a new reversibly soluble-insoluble polymer and its application to repeated hydrolysis of soluble starch", *J Chem Eng Jap*, 25: 569
- Huang, X. J., Ge, D., Xu, Z. K. 2007. "Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization", *European Polymer Journal*, 43: 3710-3718.
- Hung, T.C., Giridhar,R., Chrou, S.H., Wu, W.T. 2003. Binnary immobilization of *Candida Rugosa* lipase on chitosan. 26:69-78
- Ifukhar, T., Niazl, M., Anjum, Z. M., Jabeen, R., Aftab, M. N. 2011. Biosynthesis of extracellular lipases by *bacillus* sp. (mblb-3) in relation to the nutritional conditions. *Pak. J. Bot.*, 43(5): 2587-2591.
- Jankowska, H., Swiotkowski, A., Choma, J. 1991. Active carbon ellis harwood series in physical chemistry. 279 p.
- Karaca, N., 2006. Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli(N-izopropilakrilamitko-akrilamit)/K-Karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karaman, İ. 2010. Soma Linyitinin Fiziksel Aktivasyonu Ve Aktiflenmiş Ürüne Boyar Madde Adsorpsiyonu Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Ankara.
- Kayacan, S. 2007. Kömür ve koklerle sulu çözeltilerden boyar maddelerin uzaklaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Ankara.
- Kılıçer, T. 2006. Malatya 1. organize sanayi bölgesi atık suyunun aktif karbon, zeolit ve ozan kullanılarak arıtımının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Malatya.
- Koolman, J., Roehm, K. H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry* 2nd Edition 94:1-476

- Kumar, A., Ram, H., Thomas, L., Singh, V. P. 2013. Selection of culture media and optimization of media composition for extracellular production of lipase by *Acinetobacter* sp. AH-19. (26):175-182
- Küçükgül, E. Y. 2004. Ticari aktif karbon üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Fen Ve Mühendislik Dergisi, 6(3):41-56
- Lotrakul, P., Dharmsthiti, S. 1997. Lipase production By *Aeromonas Sobria* LP004 İn a medium containing whey and soybean meal. Biotechnology, 13: 163-166.
- Margesin, R., Feller, G., Hämmerle, M., Stegner, U., Schinner, A. 2002. A Colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. Biotechnology Letters, 24: 27–33.
- Marul, B. 2007. Fabrika atıklarından izole edilen *Bacillus* Sp.'den aktif ve kararlı lipaz üretim koşullarının ve üretilen enzimin deterjan endüstrisinde kullanımının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Mustafaev, M. I. 1987. Studies of the reactions between polyelectrolytes and proteins by sedimentation measurement. analücal ultracentrifuge in chemistry and Biology, Dusbance. 62-85
- Nashyan, M. V. 2012. Çeşitli dokularda aldoz redüktaz enziminin izolasyon ve immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara.
- Nasratun, M., Hasrul, A.S., Sureena, A., Nuru Laini, M. A., Ruwaida, A. R., Shalyda, M. S., Ideris, A., Rozaimi, A. S., Sharifuddin, J. H., Ahamad Nordin, N. I. A. 2010. Immobilization of lipase from candida rugosa on chitosan beads for transesterification. 10(21): 2701-2704.
- Nath, M., Hindumaty, C. K. 2012. Isolation, optimization and purification of lipase from *Myroides Odoratimumus* ( 3 ) :239-246.
- Nigam, S., Mehrotra, S., Vani, B., Mehrotra, R. 2014. lipase immobilization techniques for biodiesel production. An Overview, 16.
- Nisha, S., Arun Karthick, S., Gobi, N. 2012. Review on methods, application and properties of immobilized enzyme 1(3): 148-155.
- Othmer, K. 1997. Encyclopedia of chemical technology a wiley- interscience publition. Fourth Edition, USA. 24: 1-26.
- Özarslaner, E., Albayrak, N.2013. Lipaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesinde çevresel koşulların p-nitrofenil propiyonat substratının kararlılığına etkisi. 38 (3): 143-149.
- Öztürk, B.2002. [http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/dd48ab31d016ffc\\_ek.pdf?dergi=12](http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/dd48ab31d016ffc_ek.pdf?dergi=12), İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Palmieri G., Giardina P., Desiderio B., Marzullo L., Giamberrini M., Sannia G.A., 1994, "New enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase", Enzyme Microb. Technol, 16:151-8.
- Palüzar, H. 2013. Pestisitlerin vücut savunma sistemi üzerine etkilerini invitro incelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne.

- Pronk, W., Kerkhof, P.J.A. M., Van Helden, C., Van't Riet, K., 1988, "The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 512-518.
- Savcı, S. 2005. Basic Blue 41 boyar maddesinin canlı ve inaktif sucul bitki *myriophyllum spicatum* tarafından adsorplanabilirliğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana
- Shaw, J.F., Changı, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J., 1990, "Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials", *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 132-137.
- Sheldon, R. A. 2007. Enzyme Immobilization: the quest for optimum performance. 349(8-9): 1289–1307.
- Spahn, C., Minteer, S.D. 2008. Enzyme Immobilization in *Biotechnology*, (2) :195-200.
- Şahan, A. 2007. Farmosetik maddelerin aktif çamur arıtma prosesine abiyotik gideriminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Şengel, B. Ş. 2007. deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşullarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Tasmakıran, A.F. 2010. Zirai Yan Ürünlerin Modifiye Edilerek Yeni Adsorbanların Hazırlanması Ve Boyaların Adsorpsiyonu Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Konya.
- Tutar, H. 2009. *Candida Rugosa* lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorpsiyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- Türkoğlu, S. 2010. Sudaki fenolik kirleticilerin farklı adsorplayıcılara adsorpsiyonu ve katının mikrodalga rejenarasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Usmani, G. A., Patil, H. V. 2010. Lipase catalysed interesterification for the production of oleochemicals from non traditional oils. 3(2):354-358.
- Ülker, S., Özel, A.,Çolak, A., Karaoğlu, Ş. A. 2010. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma Harzianum* isolated from soil, 35(2011):543-550.
- Ünlü, A. E. 2004. *Candida Rugosa* Lipazının özellikleri ve enantiyo seçimliliğinin artırılması seminer. Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Yadav, A., Jackson, R. M., Holbrook, J. J., Warshel, A. 1991. role of solvent reorganization energies in the catalytic activity at enzymes, 113(13): 4800-4805
- Yapaşan, E. 2008. Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
- Ye, P., Jiang, J., Xu, Z. K. 2007 "Adsorption and activity of lipase from *Candida Rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-comaleic acid) membrane surface", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 60: 62–67.

Yener, F. 2007. Pektinaz Enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyon ve karakterizasyon. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana.

Yılmaz, E. 2010. Farklı teknikler kullanılarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir anti- inflammatör olan *s*- naproksenin oluşumunda kullanılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Ümit TURGUT  
**Doğum Yeri** : Kayseri  
**Doğum Tarihi** : 05.07.1990  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-mail** : [umitturgut38@gmail.com](mailto:umitturgut38@gmail.com)  
**İletişim Bilgileri** : Ordu Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi / Kimya Bölümü

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Ordu Üniversitesi	2009-2014
Y. Lisans	Kimya	Ordu Üniversitesi	2015-2017