KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

GLİSERİNDEN LİPAZ KATALİZLİ GLİSERİN KARBONAT ÜRETİMİ

SELDA AYDOĞDU

KOCAELİ 2023

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

GLİSERİNDEN LİPAZ KATALİZLİ GLİSERİN KARBONAT ÜRETİMİ

SELDA AYDOĞDU

Doç.Dr. Nurcan KAPUCU	
Danışman, Kocaeli Üniv.	**.....**
Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ	
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.	**.....**
Doç.Dr. Başar UYAR	
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.	**.....**
Prof. Dr. Afife GÜVENÇ	
Jüri Üyesi, Ankara Üniv.	**.....**
Prof. Dr. Sevil YÜCEL	
Jüri Üyesi, Yıldız Teknik Üniv.	**.....**

Tezin Savunulduğu Tarih: 12.01.2023

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmasında,

- Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimler Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

☐ Bu tez/proje çalışmasının herhangi bir aşaması hiçbir kurum/kuruluş tarafından maddi/alt yapı desteği ile desteklenmemiştir.

■ Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi tarafından FDK-2022-2809 no'lu proje kapsamında maddi/alt yapı desteği alınarak gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selda AYDOĞDU

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimler Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanımı bana ait olacaktır.

Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan ***"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

☐ Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

☐ Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.

■ Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

Selda AYDOĞDU

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Dünya enerji ihtiyacının %81,1'i fossil yakıtlar (petrol, kömür ve doğalgaz) tarafından karşılanmaktadır. Fosil yakıtlar yanması sırasında oluşan gazlar çevre kirliliğine ve küresel ısınmaya neden olmaktadır. Biyoyakıt fosil yakıtlara alternatif temiz enerji kaynağı olup biyodizel de bu enerji türleri arasındadır. Biyoyakıtın yanması esnasında oluşan karbondioksit (CO_2), kükürtdioksit (SO_2), hidrokarbon ve parçacık madde salınımı fosil yakıtlara kıyasla çok daha düşüktür.

Biyodizel üretimi hayvansal ya da bitkisel yağların metanol ile reaksiyonunda oluşmaktadır ve biyodizel üretiminde yan ürün olarak gliserin üretilmektedir. Yan ürün olarak üretilen gliserinin katma değerli ürünlere dönüştürme ihtiyacı giderek artmaktadır.

Gliserin karbonat gliserinin katma değerli bir ürünü olup, yüksek oksijen içeriği nedeniyle yakıt katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Gliserin karbonat ayrıca kozmetik, sıvı-gaz ayırma prosesi, lityum/ lityum-iyon baterya, deterjan ya da çimento üretiminde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Bu doktora çalışmasında biyoyakıt yan ürünü potensiyeline sahip gliserin karbonatın ticari tutuklanmış enzimlere alternatif olarak, biyonanokompozit desteğe tutuklanan CalB ve Novozyme 51032 ile enzimatik üretimi gerçekleştirilmiştir.

Tez süreci boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Nurcan KAPUCU' a ve membran labındaki cihazları kullanmama ve manevi desteğinden ötürü sevgili hocam Prof. Dr. Nilüfer Hilmioğlu' a değerli katkıları için çok teşekkür ederim.

Manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Emel ENGİNTEPE ve ve Tuğba ÜNÜGÜL'e sonsuz teşekkürler. Doktora tez çalışma sırasında teknik desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Togayhan KUTLUK' a çok teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde yer almayı kabul eden ve tez sürecinde desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ ve Doç. Dr. Başar UYAR'a değerli destekleri ve katkıları için çok teşekkür ederim.

2018 yılı itibari ile 100/2000 öncelikli alanlara (Biyoyakıt) ait YÖK doktora bursu almamı sağlayan YÖK birimine teşekkür ederim. Doktora tez çalışmalarımda gerekli olan malzeme temini, analizler, konferans ve kongre katılımları için gerekli maddi destek veren Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine (KOU BAP-Proje Kodu FDK-2022-2809) teşekkür ederim.

Bu yaşıma kadar üzerimden emeğini esirgemeyen canım aileme, yurtdışında yüksek öğrenim eğitimi görmeme vesile olan sevgili anneannem ve rahmetli dedem ve amcama, manevi destekleri için sevgili yeğenlerime sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım. İyiki varsınız.

Doktora tez çalışmamı, biricik Aileme ithaf ediyorum…

Ocak – 2023 Selda AYDOĞDU

İÇİNDEKiLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ 1
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
TABLO DİZİNİ vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
ÖZET xii
ABSTRACT xiii
1.GİRİŞ 1
2. ENZİMATİK GLİSERİN KARBONAT (GlyC) ÜRETİMİ 3
2.1. Tutuklanmış Enzimlerin Avantajları 6
2.2. Tutuklama Destek Malzemeleri 11
2.3. Tutuklamayı Etkileyen Parametreler 16
2.4. Adsorpsiyon, Adsorpsiyon İzotermleri, Kinetiği ve Termodinamiği 17
2.4.1. Adsorpsiyona Etki Eden Faktörler 18
2.4.2. Adsorpsiyon İzotermleri 18
2.4.3. Adsorpsiyon Kinetiği 21
2.4.4. Adsorpsiyon Termodinamiği 22
2.5. Gliserin Karbonatın (GlyC) Enzimatik Üretimi 23
2.6. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) 30
3. MALZEME VE YÖNTEM 32
3.1. Malzemeler 32
3.2. Cihazlar 32
3.3. Deneysel Yöntem 33
3.3.1. Biyonanokompozit Destek Üretimi 33
3.3.2. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Tutuklama 34
3.3.2.1. Optimum Gla Derişimi ve Süresinin Belirlenmesi 34
3.3.2.2. Optimum pH ve Sıcaklığın Belirlenmesi 35
3.3.2.3. Optimum Destek Miktarı ve Enzim Miktarının Belirlenmesi 35
3.3.2.4. Optimum Tutuklama Süresinin Belirlenmesi 36
3.3.2.5. Tutuklanmış Desteğin Tekrar Kullanımı 36
3.3.3. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Adsorpsiyonunun İncelenmesi 36
3.3.3.1. Adsorpsiyon Izoterm 37
3.3.3.2. Adsorpsiyon Kinetiği 37
3.3.3.3. Adsorpsiyon Termodinamiği 37
3.3.4. Enzimatik GlyC Üretimi 38
3.3.4.1. GlyC Üretimine Tepkime Süresinin Etkisi 38
3.3.4.2. GlyC üretimine Sıcaklık Etkisi 39
3.3.4.3. GlyC üretimine DMC/Gly Mol Oranı Etkisi 39
3.3.4.4. GlyC üretimine Enzim Miktarının Etkisi 39
3.3.4.5. GlyC üretimine Su Miktarının Etkisi 39
3.3.4.6. GlyC üretimine Çözücü Miktarının Etkisi 39
3.3.4.7. GlyC üretimine Tutuklanmış Enzimin Tekrar Kullanımı 40
3.3.4.8.YYY ile GlyC Üretiminin Optimizasyonu 40
3.4. Analiz Yöntemler 42

3.4.1. Protein Tayini 42
3.4.2. Enzim Aktivite Tayini 43
3.4.3. Tutuklanan Desteğin Karakterizasyonu (FTIR,TGA,SEM,POM) 44
3.4.4. Gly ve GlyC Analizi 47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 49
4.1. Desteğin Karakterizasyonu 49
4.2. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Tutuklama 56
4.2.1. Gla Derişim ve Gla ile Çapraz Bağlama Süresinin Etkisi 56
4.2.2. pH Etkisi 61
4.2.3. Sıcaklık Etkisi 65
4.2.4. Enzim Miktarı Etkisi 68
4.2.5. ÇDKNT Etkisi 72
4.2.6. Destek Miktarı Etkisi 74
4.2.7. Süre Etkisi 75
4.2.8. Tutuklanmış Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği 77
4.3. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Adsorpsiyonu 83
4.3.1. Adsorpsiyon İzotermler 83
4.3.2. Adsorpsiyon Kinetiği 88
4.3.3. Adsorpsiyon Termodinamiği 92
4.4. Enzimatik Gliserin Karbonat (GlyC) Üretimi 94
4.4.1. Sıcaklığın Etkisi 95
4.4.2. DMC/Gly Mol Oranı Etkisi 97
4.4.3. Enzim Miktarı Etkisi 100
4.4.4. Sürenin Etkisi 102
4.4.5. Su Miktarı Etkisi 105
4.4.6. Çözücü Etkisi 107
4.4.7. GlyC Üretiminde Tutuklanmış Enzimin Tekrar Kullanımı 110
4.4.8. CalB ile GlyC Üretiminin YYY ile Optimizasyonu 111
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 134
KAYNAKLAR 136
EKLER 149
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 159
ÖZGEÇMİŞ 160

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 CO ve CO2 ile GlyC sentezi ..... ….3
Şekil 2.2. Fosgen ve üre ile GlyC sentezi..... 4
Şekil 2.3. DEC ve EC ile GlyC sentezi 5
Şekil 2.4. DMC ve Gly ile GlyC sentezi 5
Şekil 2.5. Enzim katalizindeki anahtar-kilit yönteminin şematik gösterimi..... 7
Şekil 2.6. Enzim tutuklama yöntemler 9
Şekil 2.7. Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan..... ..13
Şekil 2.8. ISI Web of Science Biyonanokompozit ile ilgili bilimsel makalelerin yıllara göre dağılımı……..……...15
Şekil 2.9. Çok duvarlı karbon nanotüp (ÇDKNT-(A)) ve karboksil fonksiyonlu karbon nanotüp (COOH-ÇDKNT (B))....15
Şekil 2.10. GlyC üretimi sırasındaki lipazın katalitik mekanizması 24
Şekil 3.1. Tutuklama deneylerinde kullanılan cihazlar…… 33
Şekil 3.2. FTIR spektroskopie (Perkin Elmer) 45
Şekil 3.3. TGA cihazı (Mettler Tolero) 46
Şekil 3.4. POM cihazı..... 47
Şekil 4.1. Biyonanokompozit desteğin FTIR spektrumları 50
Şekil 4.2 Tutuklanmış ve tutuklanmamış desteğin FTIR görüntüleri ..... ….51
Şekil 4.3 Kitosan ve biyonanokompozit desteğin ısıl bozunma termogramları..... ….53
Şekil 4.4. Biyonanokompozit desteğin tutuklama öncesi ve sonrası SEM görüntüsü……..…….....55
Şekil 4.5 Biyonanokompozit desteğin POM görüntüleri..... ….55
Şekil 4.6 Biyonanokompozit desteğin boyut analizi ..... ….56
Şekil 4.7 Gla derişiminin tutuklama verimi ve APM'a etkisi ..... ….57
Şekil 4.8. Gla derişiminin bağıl aktiviteye etkisi 57
Şekil 4.9. Gla ile çapraz bağlanma süresinin tutuklamaya etkisi 59
Şekil 4.10. Gla ile çapraz bağlanma süresinin bağıl aktiviteye etkisi 60
Şekil 4.11. pH' ın tutuklamaya etkisi (CalB) 62
Şekil 4.12. pH' ın bağıl aktiviteye etkisi (CalB) 62
Şekil 4.13. pH' ın tutuklama verimi ve APM' a etkisi (Novozyme 51032)..... 63
Şekil 4.14. pH' ın bağıl aktiviteye etkisi (Novozyme 51032)..... 64
Şekil 4.15. Sıcaklığın tutuklama verimi ve APM'a etkisi (CalB) 66
Şekil 4.16. Sıcaklığın bağıl aktiviteye etkisi (CalB) 66
Şekil 4.17. Sıcaklığın tutuklama verimi ve APM'ye etkisi (Novozyme 51032)..... 67
Şekil 4.18. Sıcaklığın bağıl aktiviteye etkisi (Novozyme 51032) 67
Şekil 4.19. Enzim miktarının tutuklama verimi ve APM'a etkisi (CalB) 69
Şekil 4.20. Enzim miktarının bağıl aktiviteye etkisi (CalB) 69
Şekil 4.21. Enzim miktarının tutuklama verimi ve APM'ye etkisi (Novozyme 51032) 70
Şekil 4.22. Enzim miktarının bağıl aktiviteye etkisi (Novozyme 51032) 70
Şekil 4.23. f-ÇDKNT miktarının tutuklama verim ve APM'ye etkisi 73
Şekil 4.24. f-ÇDKNT miktarının bağıl aktiviteye etkisi 73

Şekil 4.25. Destek miktarının tutuklama verim ve APM'ye etkisi..... 75
Şekil 4.26. Tutuklama süresinin tutuklama performansına etkisi (CalB)..... 75
Şekil 4.27. Tutuklama süresinin tutuklama performansına etkisi (Novozyme 51032)……...76
Şekil 4.28. CalB enziminin tekrar kullanımı ..... …77
Şekil 4.29. Novozyme 51032 enziminin tekrar kullanımı..... 78
Şekil 4.30. CalB lipazının üç boyutlu görüntüsü..... 78
Şekil 4.31. Aspergillus oryzae lipazının üç boyutlu görüntüsü..... 79
Şekil 4.32. CalB enziminin adsorpsiyonuna ait Langmuir İzotermi 84
Şekil 4.33. Novozyme 51032 enziminin adsorpsiyonuna ait Langmuir İzotermi..... 84
Şekil 4.34. CalB enzimine ait Freundlich İzotermi 85
Şekil 4.35. Novozyme 51032 enzimine ait Freundlich İzotermi..... 85
Şekil 4.36. CalB enzimine ait Temkin İzotermi 86
Şekil 4.37. Novozyme 51032 adsorpsiyonuna ait Temkin İzotermi 86
Şekil 4.38. CalB için 1.derece adsorpsiyon kinetiği..... 89
Şekil 4.39. Novozyme 51032 için 1.derece adsorpsiyon kinetiği 89
Şekil 4.40. CalB için 2.derece adsorpsiyon kinetiği..... 90
Şekil 4.41. Novozyme 51032 için 2.derece adsorpsiyon kinetiği 90
Şekil 4.42. CalB enzimi adsorpsiyonu termodinamik inceleme..... 93
Şekil 4.43. Novozyme 51032 enzim adsorpsiyonu termodinamik inceleme 93
Şekil 4.44. Sıcaklığın GlyC üretimine etkisi (CalB) 95
Şekil 4.45. Sıcaklığın GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032)..... 96
Şekil 4.46. DMC/Gly mol oranının GlyC üretimine etkisi (CalB)..... 98
Şekil 4.47. DMC/Gly mol oranının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) 98
Şekil 4.48. Enzim miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) 101
Şekil 4.49. Enzim miktarının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032)..... 101
Şekil 4.50. Tepkime süresinin GlyC üretimine etkisi (CalB)..... 104
Şekil 4.51. Tepkime süresinin GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) 104
Şekil 4.52. Su miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) 106
Şekil 4.53. Su miktarının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) 107
Şekil 4.54. Çözücü miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) 108
Şekil 4.55. Çözücü miktarının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) 109
Şekil 4.56. Tekrar kullanılabiliğin GlyC verimine etkisi (CalB) 110
Şekil 4.57. Tekrar kullanılabiliğin GlyC verimine etkisi (Novozyme 51032)..... 111
Şekil 4.58. Gly dönüşümüne ait hataların dağılım eğrisi 114
Şekil 4.59. Parametrelerin Gly dönüşümüne etkisi 115
Şekil 4.60. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly dönüşümüne etkisi 116
Şekil 4.61. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly dönüşümüne etkisine ait iki boyutlu grafik……..……...116
Şekil 4.62. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının Gly dönüşümüne etkisi.……117
Şekil 4.63. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının Gly dönüşümüne etkisi ait iki boyutlu grafik…..…….118
Şekil 4.64. GlyC seçimliliğine ait hata dağılım eğrisi..... 120
Şekil 4.65. Parametrelerin GlyC seçiciliğine etkisi..... 121
Şekil 4.66. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC seçiciliğine etkisi..... 122
Şekil 4.67. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC seçimliliğine etkisi ait 2 boyutlu grafik…….……..122
Şekil 4.68. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC seçiciliğine etkisi.....123

Şekil 4.69. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC seçiciliğine etkisine ait iki boyutlu grafik.....123
Şekil 4.70. GlyC verimine ait hata dağılım eğrisi.....125
Şekil 4.71. Parametrelerin GlyC verimine etkisi..... ….126
Şekil 4.72. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC verimine etkisi…… …..126
Şekil 4.73. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC verimine etkisine ait iki boyutlu grafik.....127
Şekil 4.74. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi…….....128
Şekil 4.75. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait iki boyutlu grafik.....128
Şekil 4.76. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi……130
Şekil 4.77. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait iki boyutlu grafik.....130
Şekil 4.78. CalB enzimi ile maksimum GyC verimine ait model optimizasyonu…..……..131
Şekil 4.79. GlyC tepkime sonundaki biyonanokompozit desteğin POM görüntüleri…...…….…...132

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Karbonat türevlerinin avantaj ve dezavantajları..... 6
Tablo 2.2. Inorganik ve organik destek malzemelerin avantaj ve dezavantajları..... 12
Tablo 2.3. Lipaz katalizli enzimatik DMC ve Gly ile GlyC sentezi……..25
Tablo 3.1. GlyC üretiminde bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri…...…….....41
Tablo 3.2. CalB enzimi ile GlyC üretiminde YYY deney tasarım tablosu……....41
Tablo 4.1. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyon izotermine ait parametreler…….....87
Tablo 4.2. CalB için hesaplanan RL değerleri..…….…….87
Tablo 4.3. CalB ve Novozyme 51032 için adsorpsiyon kinetik sabitleri.....…….91
Tablo 4.4. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyon kinetik verilerinin literatür ile karşılaştırması……...92
Tablo 4.5. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyonu için termodinamik parametreler……..94
Tablo 4.6. GlyC üretimine ait YYY tarafından önerilen üretim koşulları ve deneysel sonuçlar…...…….……112
Tablo 4.7. Gly dönüşümüne ait YYY ile önerilen model tablosu.…….…….....112
Tablo 4.8. Gly dönüşüme kuadratik modele uygun ANOVA tablosu.…….……...113
Tablo 4.9. GlyC seçiciliğine ait YYY ile önerilen model tablosu.…….……118
Tablo 4.10. GlyC seçiciliğine ait kuadratik modele uygun ANOVA tablosu.…..…....119
Tablo 4.11. GlyC verimine ait YYY ile önerilen model tablosu……...…….....124
Tablo 4.12. GlyC verimine ait kuadratik modele uygun ANOVA tablosu…...…….....124
Tablo 4.13. GlyC verimine ait YYY ve deneysel sonuçların karşılaştırılması…….132
Tablo 4.14. GlyC üretimine ait YYY sonuçların karşılaştırılması……...….134

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ΔG^0	: Standart Gibbs serbest enerji değişimi (kJ/mol)
º C	: Santigrat derece
G	: Gram
ΔH	: Standart entalpi değişimi (kJ/mol)
ΔS^0	: Standart entropi değişimi (kJ/mol.K)
µL	: Mikrolitre
K	: Kelvin
L	: Litre
J	: Joule
N_2	: Azot
rpm	: Karıştırma hızı birimi
V	: Hacim
R	: İdeal gaz sabiti (J/mol. K)
T	: Sıcaklık (ºC/ K)

Kısaltmalar

APM	: Destek başına adsorplanan protein miktarı
A.niger	*: Aspergillus niger*
Asp	: Aspartat
BC	*:* Butilen karbonat
b_0	: Kesişim katsayısı
b_i	: Birinci dereceden model katsayısı
C	: Conversion (Dönüşüm)
CalB	*: Candida antarctica* lipazı
CalBAcc	: Accurel MP1000’ e tutuklanmış CalB
CO	: Karbonmonoksit
CO_2	: Karbondioksit
CLEAs	: Cross linked enzyme aggregates (Çapraz bağlanmış enzim kümesi)
DGTC	: Digliserin trikarbonat
DSC	: Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
DMC	: Dimetil karbonat
DMF	: Dimetil formamit
DEC	: Dietil karbonat
DIC	: Diizopropil karbodiimid
e	: Rastgele bir sayı
EC	: Etilen karbonat
EDC	: 1-etil-3, (dimetil-aminopropil) karbodiimid hidroksiklorid
f-ÇDKNT	: Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbonnanotüp
FTIR	: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (Fourier DönüşümLü İnfrared Spektrometresi)
GDC	: Gliserin dikarbonat
Gla	: Gluteraldehit

Gly	: Gliserin
GlyC	: Gliserin karbonat
His	: Histidin
i,j	: Doğrusal ve ikinci dereceden katsayılar
k	: Faktörlerin sayısı
Kat.	: Katalizör
NHS	: N-hidrosüksinimid
Novozyme 435	: Ticari tutuklanmış *CalB* lipazı
PC	: Propilen karbonat
RSM	: Response Surface Methodology
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi
S	: Selectivity (Seçimlilik)
p	: Standart sapma
Ser	: Serin
TG	: Termogravimetri
TGA	: Termogravimetrik Analiz
THF	: Tetrahidrofuran
Thr	: Threonin
W-Gly	: Waste (Atık) Gliserin
Wt	: Ağırlık oranı
Y	: Yield (Verim)
Y_{YYY}	: Tepki faktörü

GLİSERİNDEN LİPAZ KATALİZLİ GLİSERİN KARBONAT ÜRETİMİ

ÖZET

Bu çalışmada gliserinin katma değerli bir ürünü olan gliserin karbonatın (GlyC) gliserin ve dimetilkarbonat (DMC) ile enzimatik üretimi amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada kitosan ve çok duvarlı karbonnanotüp (ÇDKNT) ile hazırlanmış olan biyonanokompozit desteğe *Candida antartica* B (CalB) ve Novozyme 51032 enzimleri çapraz bağlayıcı ajanı gluteraldehit (Gla) yardımı ile tutuklanmıştır. Tutuklamaya etki eden parametreler ve tutuklanan enzimlerin çözücülü/çözücüsüz ortamdaki tekrar kullanımı araştırılmıştır. CalB için en uygun tutuklama koşullarında (%4 Gla, 3 saat Gla ile bekleme süresi, 35 ºC, 400 µL enzim, pH 7, %0,2 ÇDKNT (w/w), 0,5 g destek ve 22 saat) tutuklama verimi %82,47, hidrolitik enzim aktivitesi 3,38 U/mg destek ve adsorplanan protein miktarı (APM) 20,66 mg/g olarak belirlenmiştir. Novozyme 51032 enzimi için belirlenen en uygun tutuklama koşullarında (300 µL enzim, pH 8, 40 ºC ve 20 saat, diğer koşullar CalB ile aynı) ulaşılan tutuklama verimi %64,06, hidrolitik enzim aktivitesi 9,43 U/mg destek ve APM 10,63 mg/g olarak elde edilmiştir.

2. aşamada her iki enzimin adsorpsiyon prosesi incelenerek, adsorpsiyon sürecine ait izotermler, adsorpsiyon kinetiği ve termodinamik parametreler belirlenmiştir.

3. aşamada ise, tutuklanmış CalB ve Novozyme 51032 ile enzimatik GlyC üretimine sıcaklık, enzim miktarı, DMC/Gly mol oranı, süre, su miktarı, çözücü (tert-butanol) ve tekrar kullanım etkisi incelenmiştir. Çözücüsüz ortamda, CalB enzimi ile GlyC üretim ön denemelerinde belirlenen en uygun çalışma koşullarında (50 ºC sıcaklık, 3/1 DMC/Gly mol oranı, %10 enzim miktarı, 24 saat süre) Gly dönüşümü ile GlyC seçimliliği ve verimi sırasıyla, %60,9, %44,5 ve %27,1 olarak elde edilmiş, enzimin beş tekrarlı kullanımı sonunda GlyC verimindeki düşme %31 olmuştur. Ayrıca CalB enzimi ile GlyC üretimi Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılarak optimize edilmiş; ön denemelerle belirlenen üç bağımsız değişkenin (sıcaklık:40-60°C, DMC/Gly mol oranı:2/1-4/1 ve enzim miktarı:%5-15) 24 saat süre sonunda yanıt değişkenlerine (Gly dönüşümü ile GlyC seçimliliği ve verimi) etkisi araştırılmıştır. YYY tarafından önerilen optimum tepkime koşullarında (52,2 ºC sıcaklık, 2,79/1 DMC/Gly mol oranı ve %11,7 enzim miktarı) belirlenen Gly dönüşümü ile GlyC seçimliliği ve verimi sırasıyla, %63,4, %45,3 ve %28,7 olmuş; bu koşullarda yapılan deney sonucunda elde edilen bu değerler ise sırasıyla, %64,7, %44,9 ve %29 olarak belirlenmiştir. 2. dereceden kuadratik modelin R^2 değeri ise 0,99'dur. Novozyme 51032 enzimi ile GlyC üretimi için ise 50ºC sıcaklık, 10/1 DMC/Gly mol oranı, %10 (w/w) enzim kullanılarak, ortama su ve çözücü eklemesi olmadığı durumda 24 h süre sonunda %80,3 Gly dönüşümü, % 99,8 GlyC seçimliliği ve %80 GlyC verimi elde edilmiş, enzimin beş tekrarlı kullanımı sonunda GlyC verimindeki düşme %28 olmuştur. Bu enzim ile yüksek değerlerde GlyC seçimliliği ve verimi elde edilmesi nedeniyle YYY kullanılmamıştır. Novozyme 51032, CalB enzimine kıyasla GlyC üretimi için daha yüksek seçimlilik ve verim değerlerine sahip olması nedeniyle ticari enzimlere alternatif ve umut verici olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adsorpsiyon, Biyonanokompozit, Gliserin Karbonat, Lipaz, Yanıt Yüzey Yöntemi.

LIPASE CATALYZED GLYCEROL CARBONATE PRODUCTION FROM GLYCERINE

ABSTRACT

In this study, enzymatic production of glycerine carbonate (GlyC), one of the most value-added products, from glycerine and dimethylcarbonate (DMC) was aimed. For this purpose, the study was carried out in three stages.
In first stage the CalB and Novozyme 51032 enzymes were immobilized on the bionanocomposite support by crosslinking agent gluteraldehyde (Gla), arisen from chitosan and carboxyl functionalized multi walled carbon nanotube (f-MWCNT). Parameters affecting the immobilization efficiency and the reusability of immobilized enzymes with/without solvent were also examined. The optimum immobilization parameters for CalB enzyme are; 4% Gla (gluteraldehyde), 3 hours, 35º C, 400 µL CalB, pH 7, 0,2% f-ÇDKNT (w/w), 0,5 g support, and 22 hours. In this immobilisation conditions the arrived immobilisation yield was 82,47%, the hydrolytic activity 3,38 U/mg support, 20,66 mg/g (adsorbed protein ammount (APM). The optimum immobilisation parameters of Novozyme 51032 enzymes are; 300 µL enzym, ph 8, 40 º, and 20 hours, the other conditions is same as CalB. In this immobilisation conditions of Novozyme 51032 enzymes the reached immobilisation performance are; 64,06% immobilisation yield, 9,43 U/ mg support hydrolytic activity, and 10,63 mg/g APM. Second, the adsorption process of same enzymes during immobilisation were examined and the adsorption isotherm, kinetic and thermodynamics were determined.
Last, the effect of parameters including temperature, enzym amount, DMC/Gly molar ratio, time, water, and solvent (tert-butanol) amount, and reusability on GlyC production using immobilized CalB, and Novozyme 51032 enzymes were analyzed.
In a solvent-free environment, in preliminary optimum conditions (50ºC temparature, 3/ DMC/Gly mole ratio, 10% enzyme ammount, 24 hours) for GlyC production by CalB enzym are performed. In this conditions the arrived Gly conversion, GlyC selectivity, and GlyC yields are respectively 60,9%, 44,5% and, 27,1%. After 5 reusability the decrease on GlyC yield was 31%. In addition, the GlyC Production by CalB was optimized using Response Surface Method (YYY), which is investigated the effect of independent variable (temperature: 40-60 ºC, DMC/Gly mole ratio: 2/1-4/1 and, enzyme ammount: 5-15%) on the response variable (Gly conversion, GlyC selectivity, and GlyC yield) after 24 hours.In the recommended reaction conditions (52,2 ºC, 2,79/1 DMC/Gly mole ratio and, 11,7% enzyme ammount) from YYY the determined Gly conversion, GlyC selectivity and, GlyC yield are respectively 63,4%, 45,3% and, 28,7%. In the same reaction conditions the experimental results are respectively 64,7%, 44,9% and, 29%. The optimal condition for the GlyC production with Novozyme 51032 are 50 ºC, 10/ 1 molar ratio, 10% enzyme ammount (w/w), 24 hours, without water and without solvent. In this conditions the 80,3% Gly conversion, 99,8% GlyC selectivity, and 80% GlyC yield are arrived. Novozyme 51032 enzyme shows in comparison to CalB a high selectivity, and yield, so that the Novozyme 51032 are an promising, and alternative and to commercial enzyme.

Keywords: Adsorption, Bionanocomposite, Glycerol Carbonate, Lipase, Response Surface Methodology.

1.GİRİŞ

Dünya enerji ihtiyacının %81,1'i fosil yakıtlar (petrol, kömür ve doğalgaz) tarafından karşılanmaktadır. Fosil yakıtlar çevre kirliliğine ve küresel ısınmaya neden olmaktadır. Biyoyakıt fosil yakıtlara alternatif temiz enerji kaynağı olup biyodizel de bu enerji türleri arasındadır (Halkos ve Gkampoura, 2020).

Biyodizel yanması sırasında oluşan karbondioksit (CO_2), kükürtdioksit (SO_2), hidrokarbon ve parçacık madde salınımı fosil yakıtlara kıyasla çok daha düşüktür (Dorado vd., 2003; Huang vd., 2012).

Biyodizel hayvansal ya da bitkisel yağların metanol ile reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. Bu üretim sırasında %10 (w/w) mertebesinde yan ürün olarak gliserin de üretilmektedir (Duane T, Taconi J, 2007; Quispe vd., 2013; Zhou vd., 2008). Biyodizel aynı zamanda bitkisel yağlar ile dialkil karbonat (örn. DMC) varlığında gliserin üretimi gerçekleşmeden de üretilmektedir ve bu üretim sırasında yan ürün olarak gliserin karbonat (GlyC) oluşmaktadır (Marx, 2016).

Dünya gliserin pazarı 2019 yılında yaklaşık 2,6 milyar dolar tutar olarak hesaplanmıştır. 2020 yılından 2027 yılına kadar gliserin üretiminin %4 oranda artması öngörülmektedir (Sahani vd., 2021).

Gliserin miktarının giderek artması gliserinin birim fiyatını düşürmekte ve gliserinin katma değerli ürünlere dönüştürme ihtiyacını arttırmaktadır. GlyC, gliserinin katma değerli bir ürünü olup, karbonat ester grubuna dâhil, biyobozunur, suda çözülebilen, viskoz ve toksik olmayan özelliklere sahiptir. Karbonat esterlerin biyoyakıtta %2-4 oranında yakıt katkı maddesi olarak kullanılması kurum oluşmasını %50 oranında azaltmaktadır (Rounce vd., 2010). GlyC, diğer karbonat esterlerine (DMC (%53,3), dietil karbonat (DEC; %40,7), propilen karbonat (PC; %47,1) ve butilen karbonat (BC; %41,4)) kıyasla yüksek oksijen içeriğine (%54,2) sahiptir (dos Santos, 2014). Bu özelliği nedeniyle yakıt katkı maddesi olarak kullanılma potensiyeli vardır. Yakıt katkı maddesi olarak kullanıldığında hidrokarbon, CO_2, parçacık madde salınımını azaltarak, temiz yanmaya katkı sağlamaktadır (Szori vd., 2018).

GlyC, moleküler yapısındaki hydroksil grupları ve 2-oxo-1,3-dioksolan grubu nedeniyle yüksek reaktif özelliğe sahiptir. Kosmetik, sıvı-gaz ayırma prosesinde, lityum/lityum-

iyon batarya, deterjan ya da çimento üretiminde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Sonnati vd., 2013). 2020 yılındaki GlyC market değeri 1,17 milyar dolar tutarına ulaşmıştır ve 2030 yılında bu tutarın 1,80 milyar dolara ulaşması öngörülmektedir (URL-1). GlyC birim fiyatı yaklaşık 8141 $/ton civarındadır (Teng vd., 2014). Dünyadaki en büyük GlyC üreticileri Huntsman ve Ube firmalarıdır (Ochoa-Gómez vd., 2012).

GlyC üretimi gerek kimyasal gerekse enzimatik katalizör ile üretilmektedir. GlyC üretiminde enzimatik katalizör (lipaz) kullanımı, bu katalizörlerin ılıman çalışma koşullarında (düşük sıcaklık ve basınç) çalışabilmeleri, çevre dostu olmaları, tepkime sırasında çözücüye ihtiyaç duymamaları ve ürün saflaştırma/ayırma adımlarının kolay olması nedeniyle kimyasal katalizörlerle üretime kıyasla avantaj sağlamaktadır (Aydogdu ve Kapucu, 2022).

Enzimatik GlyC üretiminde sıklıkla *Candida antartica* (CalB) enzimi ve *Aspergillus niger* enzimlernin serbest, ticari tutuklanmış ya da laboratuvarda farklı desteklere tutuklanmış formları kullanılmaktadır (Kim vd., 2007; Leão vd., 2016; Tudorache vd., 2014a).

Bu doktora tez çalışmasında, enzimatik GlyC üretimi ve GlyC üretimine etki eden parametreler incelenmiştir. Enzimatik GlyC üretimi öncesinde kitosan ve karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbonnanotüp (f-ÇDKNT) ile hazırlanmış biyonanokompozit desteğe CalB ve Novozyme 51032 enzimler tutuklanarak ticari enzimlere alternatif tutuklanmış enzimler hazırlanmış ve tutuklamaya etki eden parametreler araştırılmıştır.

Biyolojik kökenli (biyopolimer/biyomolekül) bileşenler ve 1-100 nm aralığına sahip (nanoboyutlu) parçacıkları içeren farklı kompozit malzemelerden oluşan malzemeler biyonanokompozit olarak adlandırılmaktadır. Bu malzemeler biyouyumlu ve biyobozunur olmaları nedeniyle, enzim tutuklama prosesinde destek olarak kullanımı tercih edilmektedir. Bu sebeple çalışma kapsamında biyonanokompozit malzeme bileşenleri olarak kitosan ve karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbonnanotüp (f-ÇDKNT) kullanılmıştır.

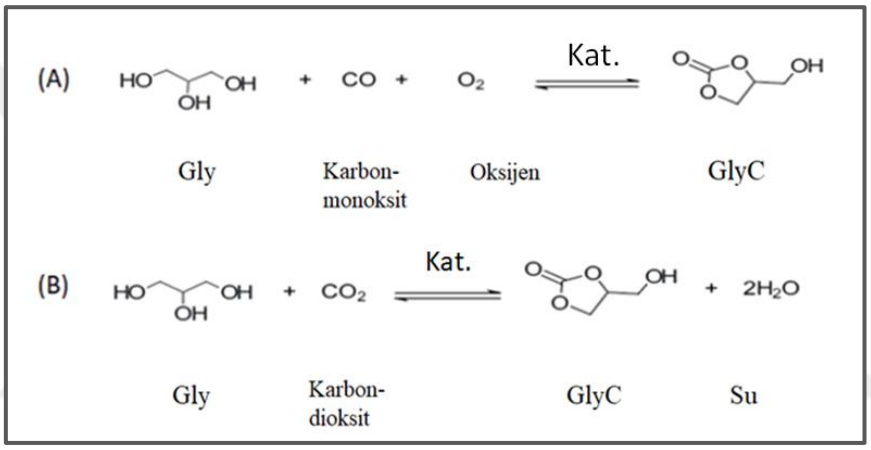
Selülozdan sonra en sık kullanılan biyopolimer kitosan olup, mantar, böcek ya da deniz kabuklu hayvanlardan elde edilen kitinin deasetillenmesi ile oluşan katyonik bir

biyomateryaldir. Biyonanokompozit malzemenin bir diğer bileşeni olan ÇDNKT ise geniş yüzey alanına sahiptir, tutuklanan enzimin kararlılığını artırır, aynı zamanda mekanik/termal dayanıklılık da sağlar.

Biyonanokompozit desteğe ilgili lipazların tutuklanmasına ek olarak, her iki enzimin biyonanokompozit desteğe adsorpsiyon süreci incelenerek, adsorpsiyon denge verileri Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermlerne uygulanmıştır. Adsorpsiyon kinetiğinin incelenmesi için yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece modelleri incelenmiş ve adsorpsiyon süreçlerine ait termodinamik parametreleri belirlenmiştir. Bu çalışmalara ek olarak tutuklanmış CalB ve Novozyme 51032 enzimler ile GlyC üretimi gerçekleştirilmiş ve CalB enzimi ile GlyC üretiminde Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılarak, GlyC verimini maksimize edecek optimum üretim koşulları belirlenmiştir.

2. ENZİMATİK GLİSERİN KARBONAT (GlyC) ÜRETİMİ

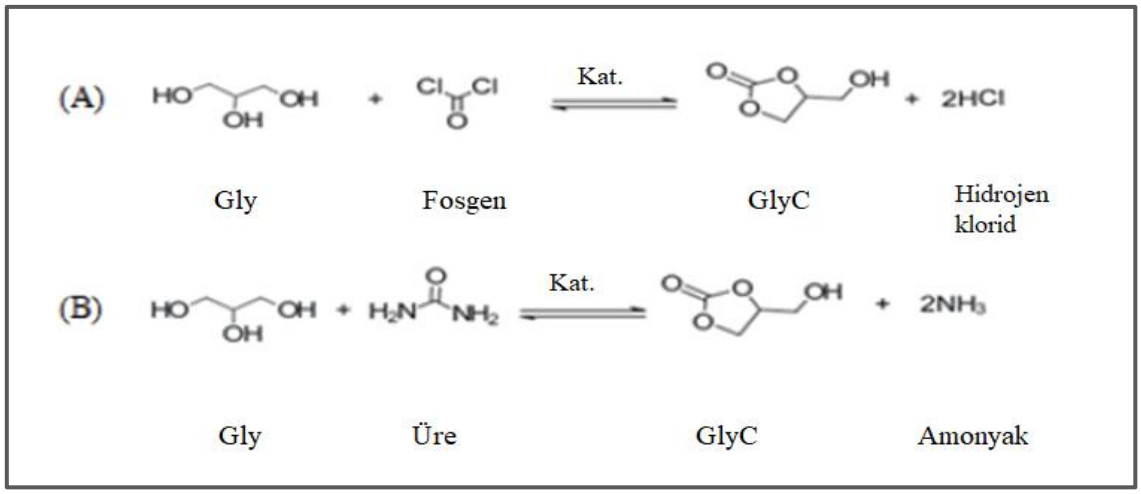
Gliserinden GlyC üretimi karbonatlaştırma ya da transkarbonatlaştırma reaksiyonları ile gerçekleştirilmektedir. Karbonatlaştırma tepkimesinde gliserin ile birlikte karbonmonoksit (CO) ve karbondioksit (CO_2) girdilerinden biri kullanılırken, transkarbonatlaştırma tepkimesinde bir karbonat kaynağı (fosgen, üre ya da karbonat türevleri; dietil karbonat (DEC), etil karbonat (EC) ve dimetil karbonat (DMC)) kullanılmaktadır (Caro vd., 2019; Sonnati vd., 2013). CO ve CO_2 ile gerçekleşen karbonatlaştırma reaksiyonları Şekil 2.1.'de verilmiştir (Li ve Wang, 2011a; Sonnati vd., 2013).



Şekil 2.1. CO ve CO_2 ile GlyC sentezi (Sonnati vd., 2013)

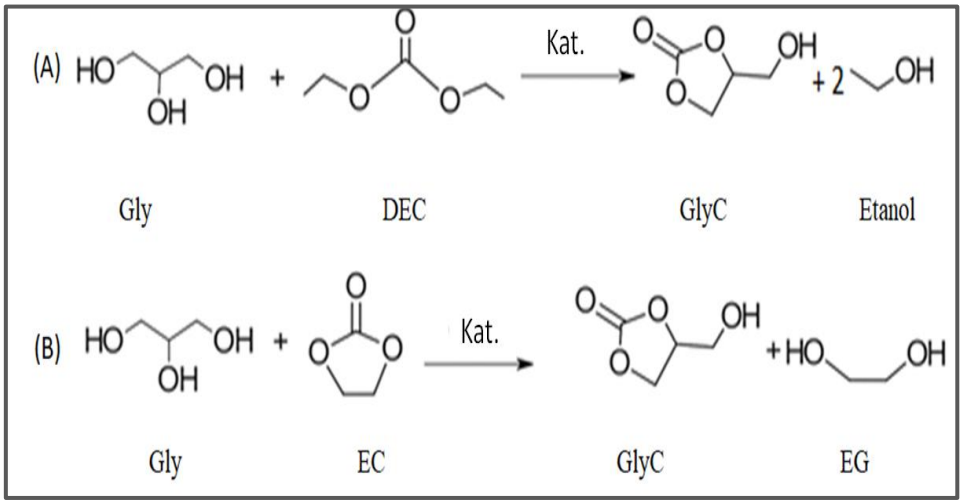
Karbonatlaştırma reaksiyonlarının dezavantajları olarak güvenli olmayan çalışma koşulu sunmaları; organik çözücüye ihtiyaç duymaları, yüksek tepkime sıcaklığı, yüksek basınç ihtiyacı, tepkime süresinin uzun olması ve kimyasal katalizörlerin geri kazanım problemler sayılabilir (Sonnati vd., 2013). Aynı zamanda CO toksik ve yanıcı bir gazdır (Ochoa-Gómez vd., 2009).

Transkarbonatlaştırma tepkimesinde, karbonatlaştırma tepkimelerine alternatif olarak alkol ve karbonat kaynakları arasında karbonat değişimi gerçekleşir. Fosgen (A) ve üre (B) ile gliserinin GlyC'a dönüşüm tepkimeleri Şekil 2.2.'de görülmektedir. Fosgen toksik bir reaktant olduğundan, GlyC üretimde kullanımı kısıtlıdır. Gliserinin üre ile tepkimesinde ise yan ürün olarak amonyak ortaya çıkmakta ve bu durum GlyC dönüşümünü azaltmaktadır (Sonnati vd., 2013).



Şekil 2.2. Fosgen ve üre ile GlyC sentezi (Sonnati vd., 2013)

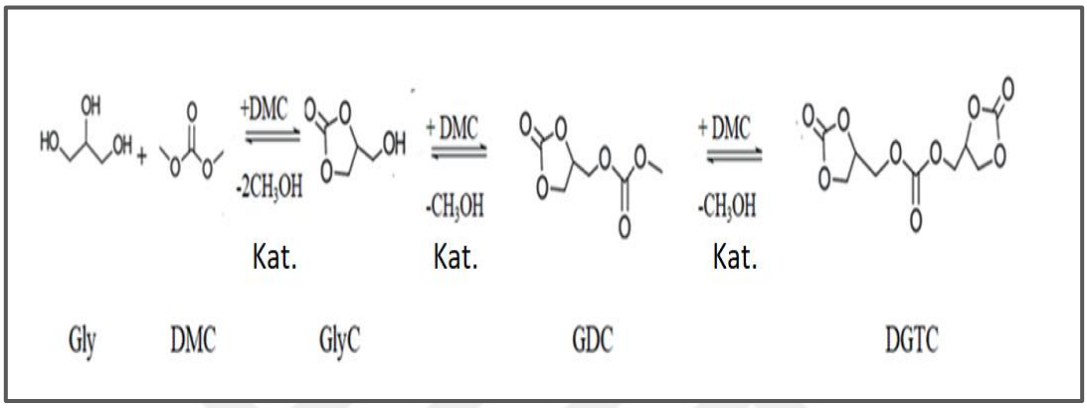
Transkarbonatlaştırma tepkimesinde Gly ile GlyC sentezinde karbonat türevleri (DEC (Alvarez vd., 2010), EC (Cho vd., 2010), DMC (Pan vd., 2012)) fosgen ve üreye alternatif daha güvenli reaktantlar grubundadır. DEC ve EC'ın Gly ile GlyC dönüşüm tepkimesi Şekil 2.3.'de verilmiştir. DMC, DEC'a kıyasla daha yüksek Gly dönüşüme sahiptir (Gutierrez-Lazaro vd., 2018). EC pahalı bir karbonat grubu olup, yan ürün olarak oluşan Etilen glikol (EG) yüksek kaynama noktasına sahip olduğundan, tepkime sonrasındaki saflaştırma işlemi güçtür (Lanjekar ve Rathod, 2013).



Şekil 2.3. DEC ve EC ile GlyC sentezi (Sonnati vd., 2013)

Tablo 2.1.'de farklı karbonat türevlerinin avantaj ve dezavantajları görülmektedir. DMC yüksek kimyasal reaktif özellliği, düşük kaynama noktası (90ºC), toksik yapıda olmaması ve biyobozunur olma özellikleri nedeniyle GlyC üretiminde en çok tercih edilen açil alıcıdır. Şekil 2.4.'de Gly ve DMC ile GlyC üretimine ait transesterleşme

reaksiyonu yeralmaktadır. Gliserinin DMC ile reaksiyonunda kısa zamanlı bir ara ürün ve metanol oluşmaktadır. Daha sonra stabil olmayan ara ürün halkalı GlyC'a dönüşmektedir. Üretilen GlyC'nin DMC ile tepkimeye girmesiyle yan ürün olarak gliserin dikarbonat (GDC) ve digliserin trikarbonat (DGTC) ortaya çıkmaktadır. Yan ürün oluşumu DMC/Gly oranı, enzim türü ve sıcaklığa göre farklılık göstermektedir (Du vd., 2018).



Şekil 2.4. DMC ve Gly ile GlyC sentezi (Du vd., 2018) (GDC: Gliserin dikarbonat, DGTC: Digliserin trikarbonat)

Tablo 2.1. Karbonat türevlerinin avantaj ve dezavantajları (Aydogdu ve Kapucu, 2022)

Karbonat Türevi	Avantajları	Dezavantajları
DEC (Yan ürün etanol)	Lipazlar için toksik değil Substratın artan zincir uzunluğu ile enzim aktif bölgesinde daha iyi fark edilme avantajı Çevre dostu ve çok yönlü bir kimyasal Yüksek reaktif kimyasal Saflaştırma sürecinde yüksek maliyete ihtiyaç duymazlar	DMC' e kıyasla düşük GlyC dönüşümü
EC (Yan ürün etilen glikol)	Düşük reaksiyon sıcaklığı yeterli	EC pahalı EG' un yüksek kaynama noktası (261 ºC) nedeniyle yüksek saflaştırma maliyetleri
DMC (Yan ürün metanol)	DMC ile enzim deaktivasyonu yok Yüksek reaktif kimyasal Düşük kaynama noktası (90 ºC) Toksik değil ve biyobozunur Saflaştırma sürecinde yüksek maliyete ihtiyaç duymazlar	Metanol ile azeotrop oluşturma

Gly ve DMC ile GlyC sentezi direk ve endüstriyel açıdan yüksek GlyC verimi ile uygulanabilir bir yöntemdir (Leão vd., 2016). Gly ve DMC ile enzimatik GlyC üretimi, çevre dostu, kimyasal katalizörlere alternatif bir yol olup, lipazlarla gerçekleşmektedir. Enzimatik GlyC sentezinde literatürde en çok kullanılan enzimler; serbest (tutuklanmamış) CalB lipazı ((Gutierrez-Lazaro vd., 2018; Leão vd., 2016), ticari tutuklanmış CalB (Novozyme 435), (Jung vd., 2012; Lanjekar ve Rathod, 2013; Leão vd., 2016; Lee vd., 2019; Waghmare vd., 2015), serbest *Aspergillus niger* (*A.niger*) lipazı (Tudorache vd., 2012a) ve bu enzimin tutuklanmış formudur (Tudorache vd., 2017; Tudorache vd., 2013a).

Bir sonraki bölümde tutuklanmış enzimlern avantajları ve enzim tutuklama yöntemler detaylı olarak açıklanacaktır.

2.1. Tutuklanmış Enzimlerin Avantajları

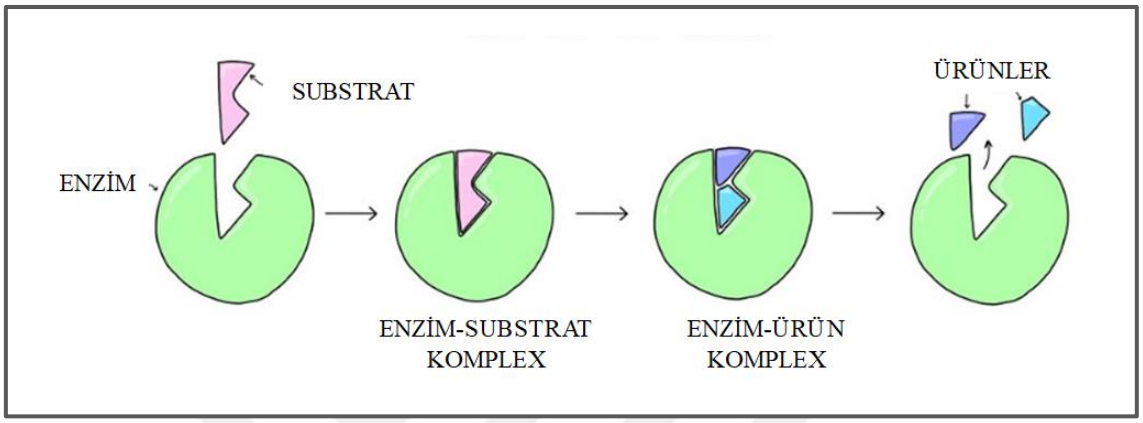
Enzimler, organik ürünlerin üretilmesinde homojen kimyasal katalizörlere alternatif biyouyumLu, biyobozunur ve çevre dostu olmaları nedeniyle katalizör olarak kullanımları giderek cazip hale gelmektedir (Thangaraj ve Solomon, 2019).

Enzimler canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler olup mantar, bakteri ya da maya gibi canlı kaynaklardan ekstrakte edilerek önemli ticari ürünlerin sentezlenmesinde kullanılırlar. ‘Enzim’ kelimesi ilk olarak Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından 1878 yılında kullanılmış olup, maya hücrelerinin şekerden alkol üretme yeteneğini tanımlayan ve Yunanca kelimeler olan en (‘içinde’ anlamına gelen) ve zume (‘maya’ anlamına gelen) kelimelerinden türetilmiştir.

Enzimlern isimler genelde tepkimedeki girdi ya da ürün ya da sentezlediği reaksiyona atıfta bulunduğu ‘–az’ eki ile (örn. Oksidaz, dehidrojenaz, karboksilaz, glukoz oksidaz, alkol dehidrogenase, katalaz) adlandırılır (Robinson, 2015).

Enzimler substratı bağlayarak, enzim-substrat kompleksi oluşturur ve sentezlenen tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürürler. Enzimler tepkime esnasındaki serbest-enerji değişimi ya da tepkimedeki denge sabitini etkilemezler. Enzim ve substrat arasında bağlar genelde van der Waals ya da hidrojen bağı gibi zayıf bağlardan oluşmuştur. Röntgen (x-ray) ya da Raman spektroskopisi yöntemi ile enzim-substrat

kompleksi tespit edilebilmektedir. Subsrat enzimdeki aktif bölge adı verilen belirli bir bölgeye bağlanmaktadır. Enzim-substat kompleksi enzimin kilidi ve substratın anahtarı temsil ettiği anahtar-kilit yöntemi ile de tarif edilmektedir (Shuler ve Kargı, 1992). Şekil 2.5.'de enzim-substrat kompleksinin anahtar-kilit yöntemi ile anlatıldığı şematik gösterimi görülmektedir.



Şekil 2.5. Enzim katalizindeki anahtar-kilit yönteminin şematik gösterimi (URL-2)

Enzimlern çoğu protein yapısında olup suda çözünebilmektedir, uygun olmayan pH ve sıcaklıklarda ise denatüre olabilmektedir (Shuai vd., 2017). Lipazlar (triaçilgliserin ester hidrolazı, EC 3.1.1.3) hidroliz, esterleşme ve transesterleşme gibi reaksiyonların gerçekleşmesine katkı sağlayan, regio- (bölgesel) seçimlilik, enantiyo/stereo seçimlilik özelliklere sahiplerdir (Jaeger ve Eggert, 2002; Norjannah vd., 2016).

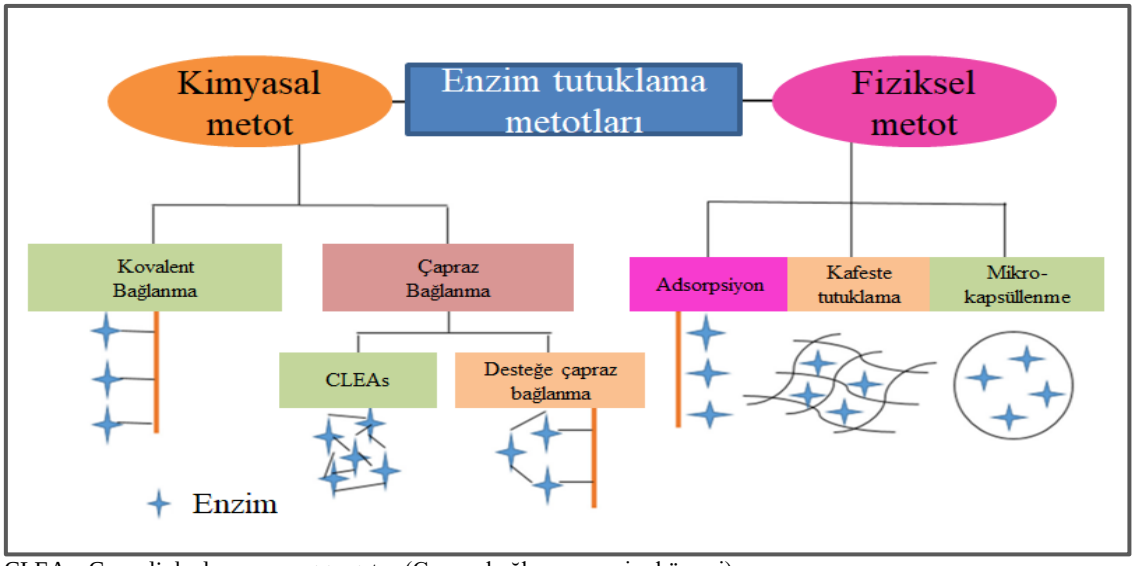
Serbest enzimin suda çözünür yapıda olması ve stabil yapıya sahip olmaması, enzimin reaksiyon ortamından ayrılmasını zorlamaktadır (Shuai vd., 2017). Serbest enzimin pahalı olması nedeniyle enzimin tutuklanması ve tekrar kullanımı kritik bir öneme sahiptir. Tutuklama, 'katalitik aktivitesinin korunarak enzimin fiziksel olarak sınırlandırılmış veya belirli bir yerde lokalize olmasını sağlayarak tekrar ve sürekli kullanılması' olarak tanımlanır (Brena vd., 2013; Khan, 2021). Literatürdeki başka bir tanıma göre ise; tutuklanma homojen ve serbest yapıdaki bir enzimin katı destek ya da çözünmeyen bir destek içine ya da üzerine sabitlenerek, heterojen immobilize sistemine dönüştürüldüğü teknik bir işlemdir (Homaei vd., 2013).

Tutuklanmış enzimler tekrar kullanılabilirlik, operasyonel kullanım kolaylığı ve reaksiyon ortamından gerek enzimin gerekse ürünün kolay uzaklaştırılması gibi avantajları nedeniyle serbest enzimlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir (Chapman

vd., 2018; Robinson, 2015) ve bu özelliği nedeniyle üretimi gerçekleşen ürünün yüksek saflıkta üretimine katkı sağlamaktadır (M.L.Shuler, 1992).

Tutuklama yöntemi fiziksel ve kimyasal yöntem olarak ikiye ayrılır. Literatüre göre fiziksel tutuklama yönteminde enzim tutuklama işlemindeki en temel faktör lipaz yüzeyinin aktive olmasıdır. Lipaz moleküllerinin aktif merkezi çoğunlukla kapak (lid) adı verilen polypeptid zincir ile kaplıdır. Hidrofobik yüzey varlığında lipazlar bu yüzeye adsorbe olmaktadır. Eğer bu işlem sırasında enzim aktif merkezindeki kapak açık ise, aktif merkez yüzeyi de açık pozisyonda olup, enzim yüzeye tutuklanmış olur (J. Liu vd., 2020).

Fiziksel tutuklama yönteminde enzim destek malzemesine elektrostatik ve hidrofobik etkileşim ile bağlanırken, kimyasal tutuklama yönteminde destek malzemesine kovalent bağlarla bağlanır. Fiziksel tutuklama yöntemi adsorpsiyon, kafeste tutuklama (entrapment) ve mikrokapsülleme (encapsulation), kimyasal yöntem ise kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma olarak sınıflandırılır. Şekil 2.6.'da enzim tutuklama yöntemlernin şematik gösterimi görülmektedir.



CLEAs: Cross linked enzyme aggregates (Çapraz bağlanmış enzim kümesi)

Şekil 2.6. Enzim tutuklama yöntemler (Rafiee ve Rezaee, 2021)

Fiziksel Tutuklama Yöntemleri

Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon tutuklamada kullanılan en eski yöntemlerden biridir. İlk olarak, 1916 yılında J.M. Nelsol ve Edward G. Griffin tarafından mayadan ekstrakte edilen invertaz enzimi aktif kömüre adsorplanmış ve sonrasında tutuklanmış olan enzim sakaroz hidrolizinde kullanılmıştır (Robinson, 2015).

Fiziksel adsorpsiyon enzimin suda çözünmeyen bir destek malzemesine enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması işlemine dayanır. Enzim destek malzemesine van der Waals, hidrofobik etkileşim ya da hidrojen bağı gibi zayıf bağlarla bağlanır. Adsorplanan enzimin aktif bölgesi etkilenmeden enzimin aktivitesi neredeyse korunur (M.L.Shuler, 1992), fakat destek ve enzim arasındaki zayıf bağlar nedeniyle enzimin destek malzemesinden sıyrılması fiziksel adsorpsiyonun en büyük dezavantajıdır (Günal, 2014). Bir hidrojen bağı 20 kJ/mol bağlanma enerjisine sahiptir (Robinson, 2015). Adsorban (destek malzemesi) olarak sellüloz, polistiren, kollojen, silika jel ya da cam gibi malzemeler kullanılır. Bu tutuklama süreci çok basit bir işlem olup, adsorban ile enzimin belli bir süre karıştırılması (dakika/saat) ile tamamlanan bir prosestir (Robinson, 2015).

Kafeste Tutuklama (Entrapment) ve Mikrokapsülleme (encapsulation)

Kafeste tutuklama ve mikrokapsülleme tersinmez, az maliyetli, kolay bir tutuklama yöntemidir. Her iki yöntemde enzim, girişinin mümkün olduğu ve enzimin içinde kaldığı polimer destek ağına (jel ya da fiber) ya da mikrokapsüle tutuklanmaktadır. Fiziksel adsorpsiyona kıyasla enzim yığılma ve sıyrılmasının önlenebilmesi nedeniyle daha kararlı bir tutuklama yöntemidir. Enzim ve destek arasında herhangi bir kovalent bağlanma olmayıp herhangi bir etkileşim de olmadığından enzim konfirmasyonu sabit kalmakla beraber enzimin denatüre olması da engellenir (Rafiee ve Rezaee, 2021). Bu avantajların yanısıra, enzimin destek malzemesinden sıyrılması ve makromoleküler yapıdaki substratın destek ağından geçişinin kısıtlanmasından dolayı enzim aktif merkezi ile substrat arasında kütle aktarım problemler olabilir. Bu gibi dezavantajları nedeniyle bu yöntemin endüstriyel boyutta kullanımı sınırlıdır (Zhao vd., 2015).

Kimyasal Tutuklama Yöntemleri

Kovalent Bağlanma

Enzimin destek malzemesine belirli fonksiyonel gruplarla (amino, karboksil, hidroksil ve sülfhidril grupları) kovalent bağlanmasıdır. Tutuklama işlemi öncesinde destek malzemesi çapraz bağlayıcı ajanları ile aktifleştirilirler (Shuler and Kargı, 1992). Gluteraldehit büyük ölçekli işletimlerde kullanımına sıklıkla rastlanan, ucuz ve etkili bir çapraz bağlayıcıdır (Thangaraj ve Solomon, 2019). Bunun dışında kullanılan diğer çapraz bağlayıcı ajanlar ise glioksal, tris(hidroksimetil)fosfin P (CH_2OH), heksametilendiamin, etilendiamin, karbodiimidler (diizopropil karbodiimid (DIC), 1-etil-3,(dimetil-aminopropil) karbodiimid hidroksiklorid (EDC), ya da N-hidroksüksinimid (NHS)), epiklorohidrin ve N-hidroksisüksinimit olarak sıralanabilir (Krajewska, 2004; Rafiee ve Rezaee, 2021).

Kovalent bağlanma sürecinde enzim moleküllerinin yüzeyinde bulunan Schiff baz bağlantısındaki amino asit fonksiyonel grupları ile destek malzemesindeki aktif grupların kovalent bağlanma işlemi gerçekleştirilir (Thangaraj ve Solomon, 2019).

Kovalent bağlanma işlemindeki en büyük avantajlar, enzimin sıcaklık, çözücü vb. denatüre edicilere karşı yüksek direnç kazanması ve enzim destek arasında oluşan fonksiyonel grup kaynaklı kimyasal bağlar nedeniyle enzimin destekten sıyrılma işleminin zorlaşmasıdır (Günal, 2014). Standart bir kovalent bağlanma enerjisi yaklaşık 200-500 kJ/mol'dür (Robinson, 2015).

Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanma yöntemi, enzimin desteğe çapraz bağlanması ve enzimlern birbirine çapraz bağlanması olarak iki sınıfa ayrılır. Desteğe çapraz bağlama ile tutuklama yönteminde enzimler desteğe fonksiyonel gruplar aracılığıyla kovalent olarak bağlanır. Destek malzemelerin aktif fonksiyonel grupları yoktur. Bu nedenle destek malzeme yüzeyinin karboksil ya da amino gruplar içeren çapraz bağlayıcılar ile aktifleştirilmesi gerekir (Rafiee ve Rezaee, 2021).

Enzimlerin birbirine çapraz bağlanması ise, destek malzemesi olmadan enzimlern birbirine çapraz bağlayıcılar yardımı ile (örn. gluteraldehit) üç boyutlu bir yapı kazanarak bifonksiyonel ya da multifonksiyonel çapraz bağlanma işlemidir. Bu yöntemde enzimlern birbirlerine çoklu kovalent bağlanmaları nedeniyle güçlü bir bağ oluşur, fakat çapraz bağlayıcı ajanlarının enzim konformasyonda değişikliğe neden olmasından dolayı enzim aktivitesinde azalma meydana gelebilir (Rafiee ve Rezaee, 2021).

2.2. Tutuklama Destek Malzemeleri

Tutuklama işlemi ile homojen yapıdan heterojen yapıya getirilen enzimin pH, sıcaklık, organik çözücü gibi reaksiyon ortam şartlarından kolayca ayrılabilmesi ve endüstriyel kullanıma uygun hale getirmesi için doğru tutuklama işleminin ve doğru destek/ matris seçilmesi son derece önemlidir.

Doğru destek seçimi, bir yandan ürünün reaksiyon ortamından uzaklaştırılması sırasında kontamine olma riskini azaltırken, diğer taraftan enzimin tekrar kullanımını mümkün kılması ile enzim maliyetlerini düşürür.

Destek üzerine tutuklama yönteminde seçilen desteğin tutuklama işlemi sırasında kimyasal, fiziksel ve biyolojik ortama ve sonrasında kullanılacak kimyasal tepkime şartlarına dayanıklılık göstermesi gerekmektedir. Bunun dışında kullanılacak destek malzemesi gerek enzim gerekse tepkime sırasında üretilecek ürün için zararlı olmamalı, uygun fonksiyonel gruba sahip olmalı, yüksek tutuklama kapasitesine sahip, yeteri kadar gözenekli yapıda, biyobozunur, proteinler için yüksek uyumlu, enzim aktif bölgesini koruyabilen, az maliyetli ve çevre dostu olmalıdır. Ayrıca çoğu lipazın desteğin hidrofilik yapısına bir eğilimi vardır.

Destekler organik ve inorganik destekler olarak ikiye ayrılır. Silika, titanyum, alüminyum, zirkanyum, kaolinit, kil, aktif karbon, f-ÇDKNT inorganik destek malzemeleri olup, sentetik polimerler (örn. polistiren, poliüretan, PVA) ve biyopolimerler (örn. kitosan, kitin, aljinat, sellüloz) organik destek malzemesine örneklerdir.

Organik ve inorganik desteklerin avantajları ve dezavantajları Tablo 2.2.'de verilmiştir.

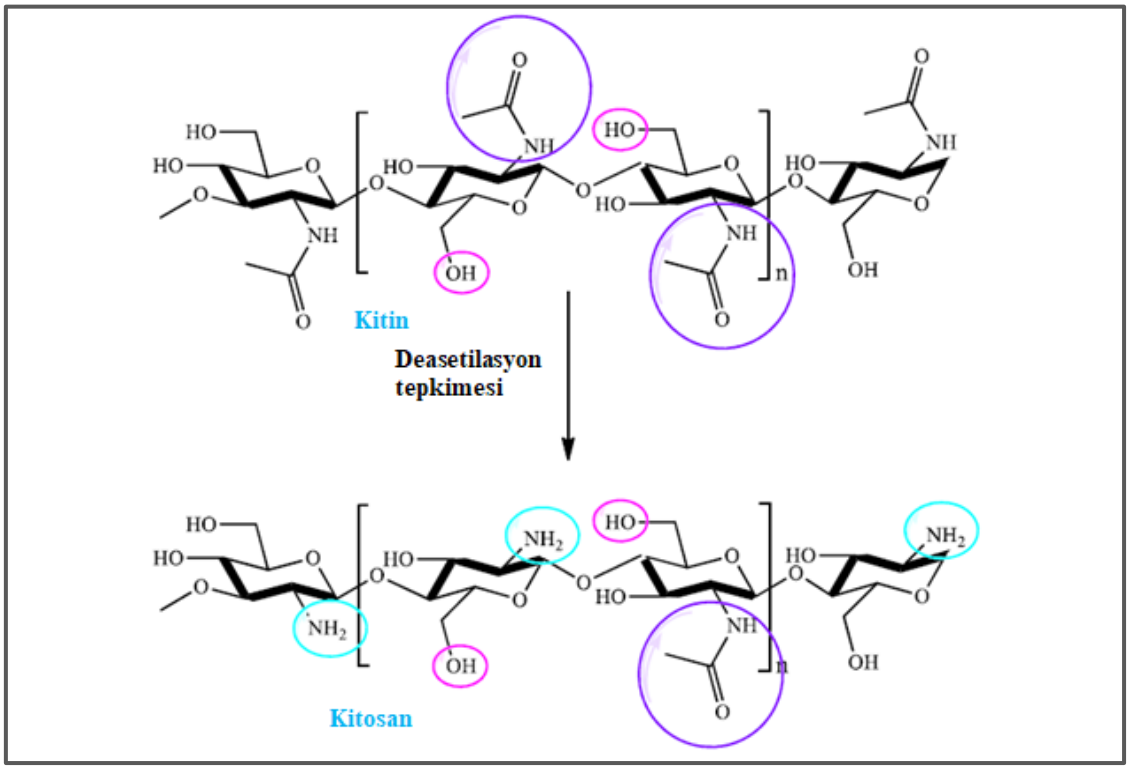
Tablo 2.2. İnorganik ve organik destek malzemelerin avantaj ve dezavantajları (Rafiee ve Rezaee, 2021)

Inorganik	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Inorganik oksitler (örn. silika, titanyum, zirkanyum)	Stabil, iyi adsorpsiyon kapasitesi, mekanik dayanıklılık	
Mineraller (örn. Kaolinit, kil)	Az maliyetli, kolay kullanılabilir, reaktif gruplara sahip	Sınrlı biyouyumluluk (enzime uyumu az), Farklı geometrik şekillere uyumlu değil
Organik	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Sentetik polimerler (örn. polistiren, poliüretan)	Istenilen monomer sayısıyla serbest polimer tasarımı, yüksek mekanik dayanım, aktif gruplara sahip, enzim ve destek arasında mesafe kontrolü	Zaman alan polimer sentezi
Biyopolimer (örn. kitosan, kitin, aljinat, sellüloz)	Zararlı değil, biyobozunur, biyouyumlu, enzim ile uyumlu, maliyeti az, kolay kullanım	Düşük mekanik dayanım, sınırlı difüzyon kapasitesi, kısmi pH aralığında aktif

İnorganik destek malzemelerinden inorganik oksitler (örn. silika, titanyum, zirkanyum) stabil moleküler yapı ve mekanik dayanıklılık gibi avantajlara sahipken, inorganik mineraller (örn. Kaolinit, kil) reaktif gruplara sahip ve, az maliyetli destek malzemeleridir. İnorganik destek malzemelerin en büyük dezavantajı enzim ile yüksek spesifik etkileşim ve biyouyumluluk gösterememeleridir (Rafiee ve Rezaee, 2021)

Organik destek malzemesi olan sentetik polimerlerin yüksek mekanik dayanımları vardır, aktif gruplara sahiptirler ve enzim ile polimer arasındaki mesafe kontrolü mümkündür. Sentetik polimerlerin dezavantajı polimer sentez sürecinin uzun olmasıdır. Organik destek malzemelerinin bir diğer grubu olan biyopolimerlerin ise zararlı yapıda olmama, biyobozunur, biyouyumlu, enzim ile uyum sağlayabilme, düşük maliyet ve kullanım kolaylığı gibi birçok avantajları vardır. Bu nedenle tutuklama prosesinde destek malzemesi olarak sıklıkla tercih edilirler. Biyopolimerlerin dezavantajları düşük

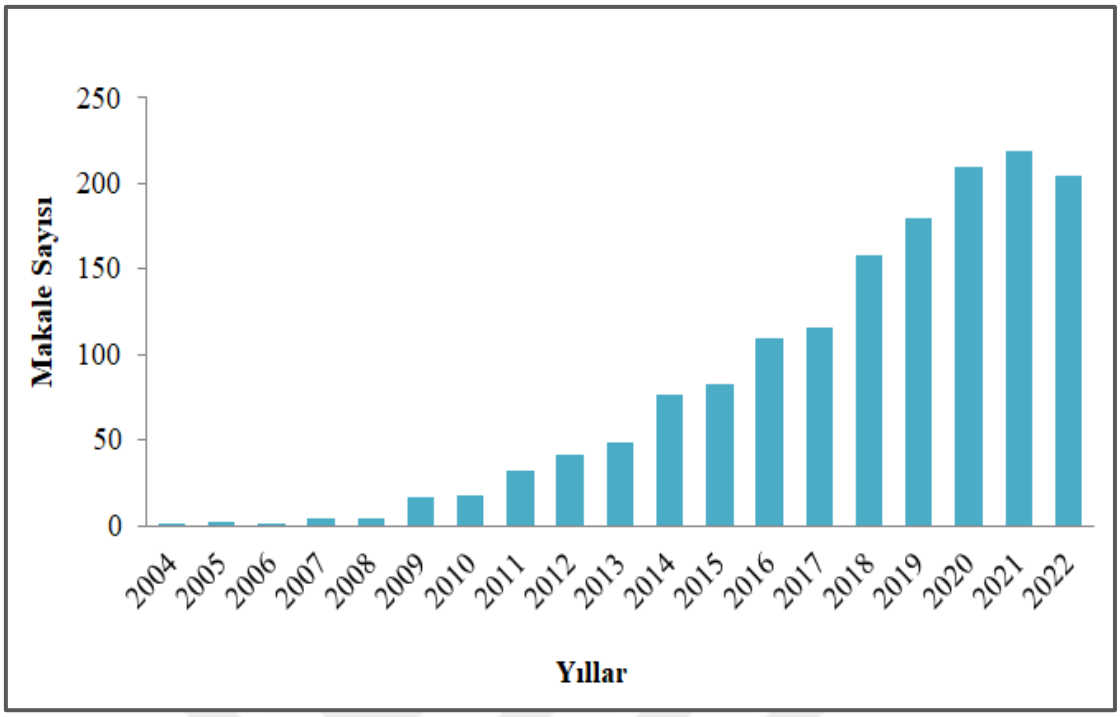
mekanik dayanıklılık, sınırlı difüzyon kapasitesine sahip olma ve dar bir pH aralığında aktif olmaları şeklinde sıralanabilir. En sık kullanılan biyopolimerler karbohidratlar ve proteinlerdir. Kitosan karbohidrat grubuna dâhil bir biyopolimerdir. Selülozdan sonra dünyada en çok kullanılan ikinci biyopolimer olan kitosan, mantar, böcek ya da kabuklu deniz hayvanlardan elde edilen kitinin deasetillenmesi ile elde edilen katyonik bir biyomateryaldir (Yury Shchipunov, 2012). Kitinin kitosana deasetilasyon tepkimesi Şekil 2.7.'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan (Rafiee ve Rezaee, 2021)

Biyonanokompozit malzemeler biyolojik kökenli (biyopolimer / biyomolekül) bileşenler ile 1-100 nm aralığına sahip (nano boyutlu) parçacıkları içeren kompozit malzemelerdir.

Biyonanokompozit sentezi kullanıma ait son 20 yılda bilimsel makale sayılarının yıllara göre dağılımı Şekil 2.8.'de görülmektedir. Biyonanokompozit konulu makale ve çalışmaların artan trende olup, giderek popüler hale geldiği gözlemlenmiştir.



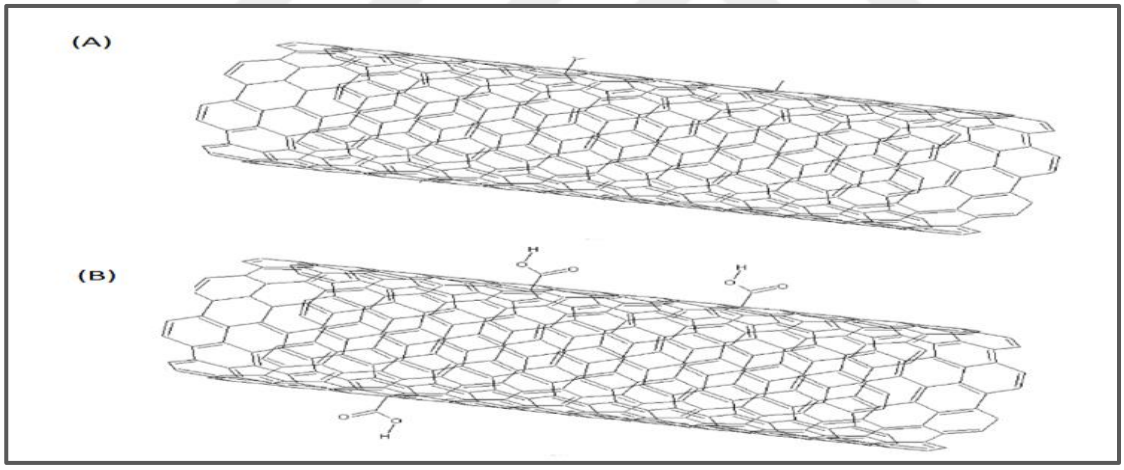
Şekil 2.8. ISI Web of Science verilerine göre Biyonanokompozit ile ilgili bilimsel makalelerin yıllara göre dağılımı (URL-3)

Bu tez çalışmasında sentezlenen biyonanokompozit destek, kitosan ve f-ÇDKNT bileşenlerinden oluşmaktadır. Kitosan, enzim tutuklama proseslerinde sıklıkla kullanılan biyobozunur hidrofobik bir polimerdir. Biyonanokompozitin bir diğer bileşeni olan çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT), birbirleri içine geçmiş karbon tüplerden oluşmaktadır. ÇDKNT'ün dış çapları 4-30 nm ve yaklaşık 1 mm uzunluğa sahip, içiçe geçmiş grafen silindirlerden oluşmaktadır (Savi vd., 2019). Nanotüpler tek duvarlı, çift duvarlı ve çok duvarlı karbon nanotüpler olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Karbonnanotüplerin yüzey alanları 50- 1315 m^2/g arasında değişkenlik göstermektedir (Peigney vd., 2001). Tek duvarlı karbon nanotüpler tek katmanlı grafen silindirlerden oluşurken, çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT), birbirleri içine geçmiş karbon tüplerden oluşmaktadır. ÇDKNT' lerin kimyasal, mekanik ve elektriksel dayanım gücü tek duvarlı karbon nanotüpe kıyasla çok daha yüksektir. Çift katmanlı karbon nanotüp tek katmanlı ve çok duvarlı karbon nanotüpün bir karışımıdır ve 0,35-0,40 nm' lik bir mesafe ile ayrılmış iki eş merkezli nanotüp içerir. Çift katmanlı karbontüpler yarı iletken yapı gösterir ve böylece metal gibi davranırlar. Fakat yüksek kaliteli çift katmanlı karbontüpün üretim aşamalarının zorluğu endüstride kullanımlarını sınırlar (Tison vd., 2008).

ÇDKNT'ler küçük çap, sert yapısal özellik, yüksek mukavemeti, yüksek elastik

modül, yarı iletken ve metal davranış özelliği, yüksek termal kararlılık, kesme gerilmesine yüksek dayanım, elektronik ve mekanik dayanım gibi mükemmel özelliklere sahiptir (Singh ve Chauhan, 2020). Bu mükemmel özellikleri nedeniyle; enzim tutuklama, nanosensör, alan emisyon gösterge ekranları ve elektronik cihazlarla sıklıkla kullanımına rastlanmaktadır (Kuzmany vd., 2004). Bu özellikleri ile enzim tutuklama için kullanıldıklarında, enzim kararlılığının yanısıra, mekanik-termal dayanıklılığını arttırdığı ve enzimin destekten sıyrılmasını azaltarak enzim yüklemesini artırdığı görülmüştür (Verma vd., 2013). Kitosan ve ÇDKNT kompozitine tutuklanan bir enzime ait literatür çalışmasında enzimin 13 kez tekrar kullanılabildiği tespit edilmiştir (Günal, 2014). İşlem görmemiş ÇDKNT'ler yapısal olarak herhangi kimyasal yapı taşımadıklarından, yüzeylerini amino-silan, gluteraldehit, karboimid gibi kimyasalla extra bir işleme tabi tutularak aktifleştirilebilmektedir.

Bu çalışmada karboksil grubları (-COOH) ile aktifleştirilmiş ÇDKNT kullanılmıştır. Şekil 2.9.'da ÇDKNT'ün ve karboksil grubu ile aktifleştirilmiş ÇDKNT (f-ÇDKNT) yapısına ait görüntü bulunmaktadır.



Şekil 2.9. Çok duvarlı karbon nanotüp (ÇDKNT- (A)) ve karboksil fonksiyonlu karbon nanotüp (COOH-ÇDKNT (B)) (Kuzmany vd., 2004)

2.3. Tutuklamaya Etki Eden Parametreler

Kovalent bağlanma ile enzim tutuklanmasına etki eden en önemli parametreler, çapraz bağlayıcı derişimi ve biyonanokompozit desteğin çapraz bağlayıcı ile bekleme süresi olup, bunun yanısıra pH, sıcaklık, destek miktarı, enzim miktarı ve tutuklama süresi de bu prosesi etkileyen diğer parametreler arasında yeralmaktadır.

Tutuklama prosesini etkileyen parametrelere ait detaylar aşağıda açıklanmıştır.

Çapraz bağlayıcı derişimi: Çok düşük çapraz bağlayıcı derişimi, enzim ile çapraz bağlayıcı arasında düşük/yetersiz mekanik kuvvete neden olurken (Çelik vd., 2016), çapraz bağlayıcı miktarı artıkça artan fonksiyonel gruplarla birlikte enzim aktivitesinde önce artış görülür. Çapraz bağlayıcı derişiminin çok fazla arttırılması ise enzim konformasyonunun kısıtlanması nedeniyle enzim aktivitesinin azalmasına neden olur (Guo vd., 2018; Rong vd., 2019).

Çapraz bağlayıcı ile bekleme süresi: Çapraz bağlanma süresinin kısa olması durumunda çapraz bağlanmanın yetersiz olmasına bağlı olarak, destek başına düşen enzim miktarının az olması ve buna bağlı olarak enzim aktivitesinin düşük olmasına neden olur. Çapraz bağlanma süresinin artması ile çapraz bağlanma kademeli olarak tamamlanmış olup, enzim aktivitesi de artar (Chen vd., 2013). Çapraz bağlanma süresi çok uzun olması durumunda ise enzimin aktif merkezinin kısıtlanmasına ve enzim aktivitesinin düşmesine neden olur (Y. Cai vd., 2020).

pH: Tutuklama verimine etki eden bir diğer parametre kullanılan tampon çözeltinin pH'ıdır. Bazı enzimlern aktif bölgelerinde iyonik gruplar mevcuttur ve bu iyonik grupların çalışabilmesi için uygun ortam şartlarının (asidik, nötral veya bazik) sağlanması gerekir. Tutuklamaki en ideal pH değeri tutuklama işlemi yapılan enzimin izoelektrik noktasına en yakın pH değeri olup, bu pH değerinde maksimum tutuklama verimine ulaşılır (Secundo vd., 2008). Ortam pH değişiklikleri, enzim aktif bölgenin iyonik formunda ve böylece enzimin aktivitesinde doğrudan değişiklere neden olur (Shuler and Kargı, 1992). Bu nedenle ortam pH'ının doğru şekilde seçilmesi son derece önemlidir.

Sıcaklık: Tutuklama ortam sıcaklığı tutuklamaya etki eden bir diğer önemli parametredir. Düşük sıcaklıklar kütle aktarım hızını olumsuz yönde etkileyerek, enzim aktivitesinin düşmesine neden olur. Artan sıcaklıkla enzim aktivitesi artarken, çok yüksek sıcaklıklarda ise enzim yapısı bozulur (Wang vd., 2018).

Destek miktarı: Destek miktarı da tutuklamaya etki eden bir diğer parametre olup, destek miktarının düşük değerlerinde destek başına düşen enzim miktarı (adsorplanan

protein miktarı, APM) en fazla iken, destek miktarının artırılması durumunda enzimin tüm destek yüzeyine maksimum miktarda tutuklanması ile APM sabit kalır, destek miktarının çok fazla olması durumunda ise APM miktarı düşer.

Enzim miktarı: Enzim miktarı arttıkça destek başına düşen APM'nın artmasına eşdeğer olarak tutuklama verimi ve aktivite artar. Enzim miktarının çok fazla arttırılması ise enzim moleküllerinin destek yüzeyi üzerinde yığılmasına (agglomerasyon), kütle aktarımının düşmesine ve enzim konformasyonunun kısıtlanarak enzim aktivitesinin düşmesine neden olur (Guo vd., 2018).

Tutuklama süresi: Tutuklama süreci, destek yüzeyi ve enzim arasında çok noktalı kovalent bağlanmaya dayalı yavaş ve zamana bağlı bir süreçtir (Mateo vd., 2007). Tutuklama süresi, enzim aktivitesinin maksimum olduğu, yeterli tutuklama verimi sağlayacak ve APM'nı optimize edecek şekilde belirlenmelidir.

2.4. Adsorpsiyon, Adsorpsiyon İzotermleri, Kinetiği ve Termodinamiği

Atom, iyon ya da moleküllerin katı bir yüzeye tutunma işlemi adsorpsiyon olarak adlandırılır. Yüzeyinde adsorpsiyon gerçekleşen katılar adsorban, katı yüzeyde tutunan madde ise adsorbant olarak tanımlanır (Sarıkaya, 2004).

Katının yüzeyinde adsorpsiyon fiziksel ya da kimyasal olarak gerçekleşebilmektedir. Fiziksel adsorpsiyonda tanecikler katı yüzeyinde molekülerarası van der Waals kuvveti ile bağlıdır. Bu kuvvet, molekülleri elektrostatik yüklerle (polarizasyon, dipol alanı vs.) katı yüzeyine bağlı tutar. Kimyasal adsorpsiyonda ise moleküller katı yüzeyine kimyasal bağlarla tutunur (Hellmut G. Karge, 2008). Kimyasal adsorpsiyonda entalpi değişimleri, diğer bir deyişle adsorpsiyon ısısı, fiziksel adsorpsiyona kıyasla oldukça büyüktür (Levine, 2015). Kimyasal adsorpsiyon tek ya da çok katmanlı olabilir ve katının aktif merkez adı verilen belli noktalarında gerçekleşir, fiziksel adsorpsiyon ise çok tabakalı yani multimoleküler yapıda gerçekleşir. Kimyasal adsorpsiyon tersinmezken, fiziksel adsorpsiyon tersinirdir (Hellmut G. Karge, 2008).

Adsorplayıcının bir gramında adsorplanan madde miktarı adsorplanan madde cinsine göre kütle, mol ya da hacim olarak verilir. Adsorplanan madde miktarı genelde x/m

olarak ifade edilir. Bu ifade bulunan ‘m’ adsorplayıcı kütlesini ve ‘x’ ise adsorplanan madde miktarı olarak tanımlanır.

2.4.1. Adsorpsiyona Etki Eden Faktörler

Adsorpsiyon iyon ya da moleküllerin katı yüzeyine (adsorban) aktarımı ile gerçekleşen bir denge prosesidir (Weber, 1972). Adsorpsiyon sürecini etkileyen faktörler; adsorbanın kimyasal yapısı, yüzey alanı, tanecik büyüklüğü, ortam sıcaklığı, ortam pH’sı ve adsorban-adsorbat temas süresidir (Duman, 2012).

Enzimin biyonanokompozit desteğe tutuklanmasına etki eden parametrelerin birçoğuna tutuklama prosesi bölümünde detaylı olarak yer verilmiştir.

2.4.2. Adsorpsiyon İzotermleri

Sabit sıcaklık ve pH değerlerinde, adsorban üzerine adsorplanan madde miktarı (qe, mg g-1) ile çözeltide adsorplanmadan kalan madde derişimi (Ce, mg/L) arasındaki denge

durumunu ifade eden grafikler adsorpsiyon izotermi olarak adlandırılır. Bu izotermler ifade etmek için kullanılan en yaygın eşitlikler Langmuir, Freundlich ve Temkin eşitlikleridir. Bu eşitlikler yardımıyla adsorpsiyon prosesindeki adsorban-adsorbat arasındaki ilgi, adsorbanın yüzey özellikleri, adsorpsiyon kapasitesi, maksimum adsorpsiyon yoğunluğu ve adsorpsiyon ısısı da belirlenebilir (Çelik Okumuş ve Doğan, 201.9; Elmorsi vd., 2014).

Aşağıda adsorpsiyon izotermlernin eşitlikleri ve modelin detaylarına ait bilgiler bulunmaktadır.

Langmuir İzotermi

Langmuir izoterm modelinde adsorpsiyon prosesinin homojen bir yüzey üzerinde tek tabakalı gerçekleştiği varsayılır. Bu model 1914 yılında Langmuir tarafından önerilmiş olup, bütün adsorplanacak moleküller için aynı enerji ve eşit afiniteye (ilgi) sahip olduğu ve aktif noktaların adsorplanan moleküller arasında hiçbir etkileşim ya da engel olmadığını kabul etmektedir (Langmuir, 1919).

Langmuir izoterm eşitliğinin lineer formu eşitlik 2.1 ile ifade edilir. Eşitliğin her iki tarafının C_e’ye bölünmesi ile eşitlik 2.2’ye sadeleşir.

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{q_{max}.K_L} + \frac{c_e}{q_{max}} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{c_e(q_{max}.K_L)} + \frac{1}{q_{max}} \quad (2.2)$$

q_e: Adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

q_{max}: Çözeltinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)

C_e: Çözeltideki adsorbatın denge derişimi (mg/mL)

K_L: Langmuir sabiti (mL/mg)

$\frac{1}{C_e}$ değerinine karşı $\frac{1}{q_e}$ değerleri doğrusal olarak grafiğe taşındığında, bu grafiğin eğiminden K_L ve kaymasından q_{MAX} değerleri hesaplanır.

Langmuir izoterminde R_L boyutsuz faktörü Eşitlik 2.3 ile tanımlanmış olup, adsorpsiyon sürecinin Langmuir modeline uyumlu olup olmadığı hakkında bilgi verir. $R_L > 1$ adsorpsiyonun uygun olmadığını, $R_L = 1$ adsorpsiyonun doğrusal olduğunu, $0 < R_L < 1$ ise adsorpsiyonun uygun olduğunu, $R_L = 0$ ise prosesin tersinmez olduğunu ifade eder.

$$R_L = \frac{1}{1+K_L C_0} \quad (2.3)$$

C_0: Çözeltideki adsorbatın başlangıç derişimi (mg/L)

Eşitlik 2.2 ile hesaplanan K_L değerinden R_L kolaylıkla bulunmaktadır.

Freundlich İzotermi

Freundlich izoterm modeli sıvı sistemlerdeki adsorpsiyonu tanımlamak için 1906 yılında Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından keşfedilmiştir (Ahmaruzzaman, 2008; Sarıkaya, 2004). Bu model adsorplayıcı yüzeyinin, adsorpsiyon alanları ve enerjisi bakımından adsorpsiyonun heterojen ve çok tabakalı olduğunu kabul ederek (Okumuş ve Doğan, 2019), ideal olmayan ve tersinir adsorpsiyonu tanımlayan ilk bilinen modeldir.

Freundlich izotermine ait model denklemi lineer formda eşitlik 2.4 ile verilir.

$$Inq_e = InK_F + \frac{1}{n} InC_e \quad (2.4)$$

q_e: Adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

C_e: Çözeltideki adsorbatın denge derişimi (mg/mL)

K_F ve n, Freundlich izoterm sabitleri olup, adsorpsiyon prosesinin türü n parametresi ile belirlenir. n=1 ise adsorpsiyon prosesi doğrusaldır, n>1 ise adsorpsiyon kimyasal olarak gerçekleşir, ve n<1 olduğunda ise adsorpsiyon fizikseldir (Gündüz ve Bayrak, 2017).

Eşitlik (2.4)'de InC_e'ye karşı Inq_e doğrusal olarak grafiğe taşındığında, grafiğin kaymasından K_F, eğiminden ise n değeri hesaplanır.

Temkin İzotermi

Temkin modeline göre moleküllerin adsorpsiyon ısısındaki azalış, doğrusal bir düzende meydana gelir ve bağlanma enerjisi homojendir (Temkin, M.J. Pyzhev, 1940).

Temkin izoterm modelini ifade eden eşitlik (2.5) lineer formda aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$q_e = B_T InK_T + B_T InC_e \quad (2.5)$$

$$B_T = \frac{RT}{b} \quad (2.6)$$

q_e: Adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

C_e: Çözeltideki adsorbatın denge derişimi (mg/mL)

b: Temkin izoterm sabiti

T: Mutlak sıcaklık (K)

R: İdeal gaz sabiti (8.314 J/mol.K)

K_T: Denge bağlanma sabiti (mL/g)

B_T Eşitlik (2.6)'ya göre tanımlanmış olup; InC_e'ye karşı q_e doğrusal olarak grafik edildiğinde, doğrunun eğiminden B_T, kaymasından ise K_T sabitleri elde edilir.

2.4.3. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği adsorban yüzeyindeki mekanizmaların adsorpsiyona olan katkısını ve adsorpsiyon hızını tespit etmek için incelenir. Adsorpsiyon kinetiği için en sık

kullanılan modeller, yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece kinetik modellerdir (Bilir, 2009).

Yalancı Birinci Derece Kinetik Model

1898 yılında Lagergren tarafından geliştirilen yalancı birinci derece kinetik model (Bilir, 2009), lineer formda aşağıdaki eşitliğe (2.7) göre ifade edilir (Okumuş ve Doğan, 2019).

In (qe-qt)=In(q_e)-kt (2.7)

q_e: Denge anındaki adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

q_t: Herhangi bir andaki adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

k: Yalancı birinci mertebe hız sabiti (dk^{-1})

t: Zaman (dk)

Zamana (t) karşı, $\log(q_e - q_t)$ değerlerinin grafiğe aktarılmasıyla, grafikte okunan eğim ile k hız sabiti belirlenirken, grafiğin kesim noktası teorik q_e değeri verir.

Yalancı ikinci derece kinetik model

Yalancı ikinci derece kinetik model 1998 yılında Y.S. Ho tarafından geliştirilmiş olup, lineer formdaki eşitlik (2.8) ile ifade edilmektedir (Jamal vd., 2014).

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2} * \frac{1}{q_e} + \frac{1}{q_e^2} * t \quad (2.8)$$

Burada:

q_e: Denge anındaki adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

q_t: Herhangi bir andaki adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

k_2: Yalancı ikinci mertebe hız sabiti (dk^{-1})

t: Zaman (dk)

Zamana (t) karşı $\frac{t}{q_t}$ değerlerinin grafiğe aktarılmasıyla, grafikte okunan eğim ile teorik q_e değeri hesaplanırken, grafiğin kesim noktası ile k_2 hız sabiti belirlenir.

2.4.4. Adsorpsiyon Termodinamiği

Adsorpsiyon süreci devam ederken meydana gelen entalpi, entropi ve serbest enerji değişimler denge sabiti ile ifade edilmektedir. Termodinamik parametrelerden Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG^o), entalpi değişimi (ΔH^o) ve entropi değişimi (ΔS^o) aşağıdaki eşitlikler ((2.9)- (2.13)) yardımı ile hesaplanmaktadır. Adsorpsiyon denge sabitinin entropi ve entalpi değişimine göre değişimi van't Hoff denklemine göre eşitlik (2.11)'deki gibi hesaplanmaktadır (Bayramoglu vd., 2009).

Adsorpsiyon prosesi endotermik ya da ekzotermik olarak gerçekleşebilmektedir. Endotermik adsorpsiyonda entropi artarken, ekzotermik adsorpsiyonda entropi azalır (Okur, 2013; Orbak, 2009). Negatif ΔG^0 değeri adsorpsiyon prosesinin kendiliğinden gerçekleştiğini gösterir.

Entalpi değişimi, ΔH^o 20 - 40 kJ/mol ise, fiziksel adsorpsiyon, 80 kJ/mol değerinin üstünde ise kimyasal adsorpsiyon prosesine işaret eder (Orbak, 2009).

$$K_c = \frac{q_e}{c_e} \tag{2.9}$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \tag{2.10}$$

$$\Delta G^0 = -RTIn(K_c) \tag{2.11}$$

$$In(K_c) = \text{In}\left(\frac{q_e}{c_e}\right) = \frac{-(\Delta G^0)}{RT} = \frac{-(\Delta H^0 - T\Delta S^0)}{RT} \tag{2.12}$$

$$\text{In}\left(\frac{q_e}{c_e}\right) = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{R} * \frac{1}{T} \tag{2.13}$$

Yukarıdaki denklemlerdeki semboller:

K_c: Termodinamik denge sabiti (mL/g)

q_e: Denge anındaki adsorbanın kütlesi başına adsorblanan madde miktarı (mg/g)

c_e: Çözeltideki adsorbatın denge derişimi (mg/mL)

ΔG^0: Gibbs serbest enerji değişimi (kJ/mol)

ΔH^0: Entalpi değişimi (kJ/mol)

ΔS^0 : Entropi değişimi (kJ/mol K)

T: Mutlak sıcaklık (K)

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

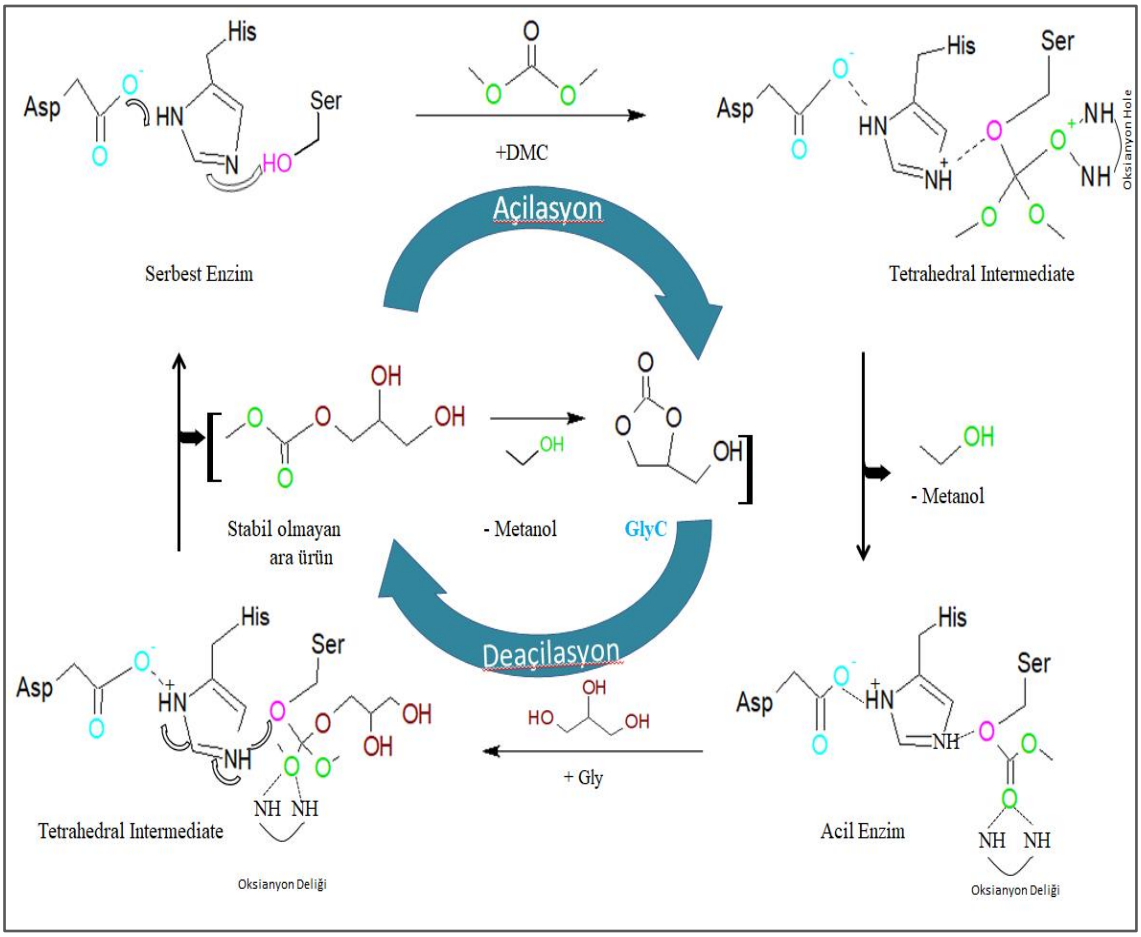
Eşitlik (2.13)'de 1/T'e karşı In $\left(\frac{q_e}{c_e}\right)$ diğer bir deyişle In (K_c) grafiğe taşındığında ilgili grafiğin kaymasından ΔS^0 ve eğiminden ise ΔH^0 hesaplanır.

2.5. Gliserin Karbonatın (Glyc) Enzimatik Üretimi

Enzim katalizli GlyC sentezi kimyasal katalizörlere alternatif ılıml çevre şartlarında (düşük sıcaklık ve basınç) gerçekleşen çevre dostu ve yenilikçi bir yöntemdir. Enzimatik GlyC üretimi esnasında kullanılan enzimatik katalizörler olan, lipazlar genellikle çözücüye gerek duymazlar. Tutuklanmış enzimler özellikle tekrar kullanıma elverişli yapıları ve tepkime ortamından kolayca uzaklaştırılabilmeleri nedeniyle tercih edilir. Enzim katalizli tepkimelerde istenilen ürünün elde edilmesi için gereken ayırma ve saflaştırma prosesi kimyasal katalizli tepkimelere kıyasla daha az enerji ihtiyacı gerektirir (Tang vd., 2019).

Lipaz ile enzim katalizli tepkimeler enzimin aktif merkezinde gerçekleşir. Her lipazın aktif merkezi farklı form, boyut, derinlik ve geometriye sahiptir (Pleiss vd., 1998). Lipazın aktif merkezi Serin (Ser), Histidin (His) ve Aspartat (Asp) üçlü amino asitlerden ve bir oksianyon deliğinden oluşur (Gandhi vd., 2000). Çoğu lipaz aktif merkez civarında α-Helix'den oluşan lid adı verilen bir kapağa sahiptir ve bu kapak aktif merkezdeki geçişleri kontrol eder (Khan vd., 2017). Helikal kapağın yağ-su arayüzünde katalitik üçlü üzerindeki hareketi ile lipaz aktifleşir (Shuler and Kargı, 1992; Panadare ve Rathod, 2016). Yağ-su arayüzünde lipaz kapağı açılır ve böylece lipaz etkili bir şekilde çalışmaya uygun hale gelir (Maruyama vd., 2000). Şekil 2.10.'de GlyC üretimi sırasında lipazın katalitik mekanizması yeralmaktadır (Aydogdu ve Kapucu, 2022). Görüldüğü gibi katalitik mekanizma Ser, His ve Asp üçlüsü üzerinde proton taşınması ve Ser'deki hidroksil gruplarının aktifleştirilmesini sağlayan açileşme adımı ile başlar (Castillo vd., 2016). Asp'deki karboksil grubu His'deki hidrojen atomuna bağlanırken, His'deki nitrojen atomu da Ser'deki -OH grubundaki hidrojen atomuna bağlanır. Serindeki –OH grubu DMC'deki ester bağına hücum ederek, tetrahedral bir ara ürün oluşumunu sağlar, oxianyon deliğini stabil hale getirir. Sonraki

adımda ester bağı kopar, metanol ortamdan uzaklaşır ve açil-enzim kompleksi oluşur. Sonrasındaki deaçilleşme prosesinde ise, açil-enzim Gly'e His ve Asp üzerinden nükleofilik hücum yapar. En son stabil olmayan ara ürün, moleküler arası çemberleşme ile GlyC'a dönüşür ve eş zamanlı yan ürün olarak metanol oluşur (Aydogdu ve Kapucu, 2022).



Şekil 2.10. GlyC üretimi sırasındaki lipazın katalitik mekanizması (Aydogdu ve Kapucu, 2022)

Tablo 2.3.'de gliserin ve DMC ile enzimatik GlyC üretimine ait transesterleşme tepkimelerinin çalışma koşulları; kullanılan enzim, enzim miktarı, reaktant mol oranı, çözücü/çözücüsüz ortam, sıcaklık, tepkime süresi ve Gly dönüşüm/GlyC seçimlilik/verim verileri ile beraber özet halinde verilmiştir.

Tablo 2.3. Lipaz katalizli enzymatik DMC ve Gly ile GlyC sentezi (Aydogdu ve Kapucu, 2022)

Katalizör	**Katalizör Derişimi (wt, %)[a,b]**	**Reaktant Mol Oranı** DMC/Gly	**Çözücü**	**Sıcaklık (º C)**	**Süre [saat]**	**GlyC Verim (Y) (%) Dönüşüm (C) (%) Seçimlilik (S) (%)**	**Referans**
Novozym 435	27 [a]	1/1	THF	60	28	C=99	(Kim vd., 2007)
Cal B (Serbest) Novozym 435	5 [a]	10/1	-	70	48	C=93	(Lee vd., 2010)
A.niger (Serbest)	12 [a]	10/1	-	60	4	C= 74 S=80, 4	(Tudoracheve vd., 2012a)
A. niger (Manyetik nanoparçacık tutuklanmış)	5 [a]	10/1	-	60	6	Y=55	(Tudoracheve vd., 2013b)
Novozym 435	13[b]	3/1	Tert-butanol	60	4	C= 99,75	(Waghmare vd., 2015)
A. niger (Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış (Gla)	5[a]	10/1	-	60	6	C=61 S=90	(Tudoracheve vd., 2013a)

Tablo 2.3. (Devam) Lipaz katalizli enzymatik DMC ve Gly ile GlyC sentezi (Aydogdu ve Kapucu, 2022)

Katalizör	**Katalizör Derişimi (wt, %)[a,b]**	**Reaktant Mol Oranı** DMC/Gly	**Çözücü**	**Sıcaklık (º C)**	**Süre [saat]**	**GlyC Verim (Y) % Dönüşüm (C) % Seçimlilik (S) (%)**	**Referans**
A. niger (Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış)	5 [a]	10/1	-	60	6	C_{Gly}=45 S_{Gly}=92 $C_{w\text{-}Gly,cru}$= 26,8 $S_{w\text{-}Gly,cru}$=95 $C_{w\text{-}Gly,res}$=35,3 $S_{w\text{-}Gly,res}$ =90	(Tudorache vd., 2014c)
A. niger (Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış)	5 [a]	10/1	-	60	6	Y=95	(Tudorache vd., 2014b)
A.niger (Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış)	5[a]	10/1	Tween 20 (yüzey aktif madde)	60	6	C= 87,7	(Tudorache vd., 2017)
Novozym 435	22[b]	1.5/1	Tert-butanol	60	14	C= 94,85	(Lanjekar ve Rathod, 2013)
Novozym 435	75 [c]	2/1	Aceto-nitrile	60	48	C= 96,25	(Jung vd., 2012)
Cal B LypozmeTL 100L Eversa Transforma Novozym 435	3	3/1	Tert-butanol	60	100	Y= 81	(Gutierrez-Lazaro vd., 2018)

Tablo 2.3. (Devam) Lipaz katalizli enzymatik DMC ve Gly ile GlyC sentezi (Aydogdu ve Kapucu, 2022)

Katalizör	**Katalizör Derişimi (wt, %)[a,b]**	**Reaktant Mol Oranı** DMC/ Gly	**Çözücü**	**Sıcaklık (º C)**	**Süre [saat]**	**GlyC Verim(Y) Dönüşüm C) Seçimlilik (S) (%)**	**Referans**
Novozym 435 CalBAcc (Accurel MP1000'e tutuklanmış)	20	2/1	-	60	48	C= 80	(Leão vd., 2016)
Cal B Lipase (Manyetik organosilikaya tutuklanmış)	10[c]	20/1	-	50	27	S= 94,13	(Du vd., 2018)
Novozym 435	5[a]	10/1	Tert-butanol	50	12	C= 97	(Cushing ve Peretti, 2013)
LP@ Colloidosome	6.1[b]	10/1	Tert-butanol	50	24	C= 85,2 Y= 64,7	(Gao vd., 2017)
ECR8214	15[a]	0.3/1	-	60	48	C=46 S=85	(de Souza vd., 2018)
A. niger Manyetik nano-parçacığa tutuklanmış	-	10/1	-	60	6	C=70 S=80	Tudorache vd., 2014a)

[a] (wt, %, gliserin ağırlığı baz alınmış)

[b] (wt, %, gliserin ve DMC toplam ağırlığı baz alınmış)

[c] (g/L)

(Gla: Gluteraldehit (çapraz bağlayıcı))

Literatürde enzimatik GlyC üretime ait yapılan çalışmalardan birkaçı özetlenecek olursa; Gly ve DMC ile Novozyme 435 kullanılarak GlyC sentezinde tetrahidrofuran (THF) çözücüsü kullanılarak, 1/1 DMC/Gly mol oranı ve 28 saat tepkime süresinde %99'e varan Gly dönüşümü analiz edilmiştir (Kim vd., 2007). Çözücüsüz ortamda yüksek miktarda DMC ve atık gliserin kullanılarak manyetik nanopartikül desteğe tutuklanan *A. niger* enzimi ile 60 ºC sıcaklık, 10/1 DMC/Gly mol oranı, 6 saat tepkime süresinde çözücüsüz ortamda % 47,5 GlyC verimi elde edilirken, %0,1'lik Tween 20 çözücü ilavesi ile % 87,7 Gly verimi elde edilmiştir (Tudorache vd., 2017). Accurel MP1000'e tutuklanmış CalB enzimi (CalBAcc) kesikli ortamda 60ºC sıcaklık, 2/1 DMC/Gly mol oranı, %20 enzim derişimi ve 48 saat tepkime süresinde %80 Gly dönüşümü analiz edilmiştir (Leão vd., 2016).

Enzimatik GlyC üretimi tepkime sıcaklığı, kullanılan Gly kaynağı, girdilerin mol oranı, enzim türü ve derişimi, tepkime süresi gibi parametrelere bağlı olup, aşağıda bu parametrelerin etkileri detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

GlyC Üretimine Sıcaklık Etkisi

Enzimatik tepkimelerde tepkime hızı enzim stabilitesi, reaktant çözünürlüğü ve tepkime kinetik sabitine bağlıdır. Arrhenius modeline göre tepkime hızı artan sıcaklıkla birlikte artar (Go vd., 2013). Tepkime sıcaklığın artması ile bir yandan, reaksiyon hızı ve enzim aktivitesi artarken, diğer yandan yüksek tepkime sıcaklığı enzimin denatüre olmasına neden olur. Bu nedenle optimum tepkime sıcaklığında çalışmak son derece önemlidir. Enzimatik GlyC üretimlerne ait literatürlerde tepkime sıcaklıkları analiz edildiğinde optimum tepkime sıcaklığının 50ºC - 70ºC arasında olduğu tespit edilmiştir. Gly ve DMC ile GlyC üretiminde sıcaklığın 30 ºC'den 70 ºC'ye çıkarılmasıyla kimyasal denge sabiti sırasıyla 0.221 değerinden 0.239 değerine artmıştır (Li ve Wang, 2011b).

GlyC Üretimine DMC/Gly Mol Oranının Etkisi

Tepkime stokiyometrisine göre 1 mol GlyC üretimi (Bakınız Şekil 2.4.) 1 mol DMC ile 1 mol Gly reaksiyona girerek gerçekleşmektedir. Bu tepkime sonucunda yan ürün olarak 2 mol metanol ortaya çıkmaktadır. Yüksek Gly derişimi tutuklanmış enzim yüzeyinde tabaka oluşmasına (Halim vd., 2009), ve substrat ve ürün difüzyonunun kısıtlanmasına (Soumanou ve Bornscheuer, 2003) neden olmaktadır.

Reaktant girdileri Gly ve DMC bire bir mol oranı ile tepkimeye girmesine rağmen, GlyC denge tepkimesinin sağ tarafa kaydırılması için, yüksek DMC/ Gly mol oranına gerek duyulmaktadır (Sonnati vd., 2013).

GlyC Üretimine Enzim Miktarının Etkisi

Enzim derişimi üretim maaliyeti için önemli bir parametredir. Optimum enzim derişimi belirlenirken yeterli GlyC derişimi ile enzim maaliyeti arasında dengenin sağlanması son derece önemlidir. Enzim derişimin arttırılması, yüksek Gly dönüşümü ve hızlı enzim-substrat komplex oluşumuna katkı sağlayarak, reaksiyon hızının artmasına neden olur (Panadare ve Rathod, 2016). Enzimin substrat ile doygunluğa ulaşmasıyla maksimum reaksiyon hızına ulaşılır (Tudorache vd., 2012a). Enzim miktarının çok daha fazla miktarda arttırılması ise, tepkime ortamında karıştırma problemine neden olur ve kütle aktarım kısıtlaması meydana gelir (Tudorache vd., 2017).

GlyC Üretimine Tepkime Süresi Etkisi

Enzimatik transesterleşme tepkimelerinde uzun tepkime süresinin işletim maliyetlerini artırması nedeniyle tepkime süresinin genellikle kısa olması arzu edilir. Tepkime süresinin uzamasıyla oluşan yan ürünlerin GlyC seçimliliğin ve GlyC veriminin düşmesine neden olmaktadır (Tang vd., 2019).

GlyC Üretimine Su Miktarı Etkisi

Su miktarı enzim katalizli tepkimelerde direk enzim aktivitesi ile ilişkili olduğundan kritik bir parametredir. Birçok lipaz aktif merkezinde bulunan lid adı verilen helikal kapağa sahiptir. Bu helikal kapağın yağ-su arayüzeyinde katalitik üçlü üzerindeki hareketi ile lipaz aktifleşmektedir (Shuler and Kargı, 1992; Panadare ve Rathod, 2016) ve etkili bir şekilde çalışmaya uygun hale gelmektedir.

GlyC Üretimine Çözücü Miktarının Etkisi

Çözücü birçok kimyasal tepkimede tepkime ortamı homojenliğini sağlamak ve kütle aktarım sürecini iyileştirmek için kullanılmaktadır. GlyC üretiminde kullanılan girdilerden Gly hidrofilik, DMC ise hidrofobik yapıya sahiptir ve bu nedenle her iki kimyasal sadece kısmi olarak birbiri ile karışabilmekte, Gly ile DMC arasında iki faz oluşumu meydana gelmektedir (Lanjekar ve Rathod, 2013). Ortama çözücü eklenmesi

ile bu durumun önüne geçilebilir. Gliserin gibi polar molekül yapıdaki moleküller hidrofilik yapıdaki destek malzemesinde adsorbe olma probleminden dolayı tepkime esnasında düşük esterleşme hızlarına neden olmaktadır (Balcão vd., 1996; Castillo vd., 1997).

2.6. Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY), matematiksel ve istatiksel teknikler kullanılarak çalışılan bağımsız değişkenler (girdi değişkenlerin) ve birkaç bağımsız değişkenin etkilediği yanıtın (çıktı değişkenleri) arasındaki ilişkinin belirlenmesi, modellenmesi, analizi ve sürecin optimize edilmesi için kullanılmaktadır (Box ve Draper, 1987).

Yanıt yüzey yöntemi ile deneysel analiz ve optimizasyon işleminde Design Expert v13 paket programı içerisindeki YYY ile birlikte Merkezi Kompozit Tasarım (CCD: Central Composite Design) kullanılır. Bu yöntem, ikinci dereceden bir yüzeyin fit edilmesi için uygundur ve minimum sayıda deney ile etkin parametrelerin optimize edilmesine yardımcı olur, aynı zamanda değişkenler arasındaki etkileşimi analiz etmeye yardımcı olur.

YYY' ın gerçekleşebilmesi 3 basamaklı bir çalışmadan oluşmaktadır. Birinci aşamada prosesteki bağımsız değişkenlerin deneme bölgeleri belirlenmelidir. İkinci aşamada bağımsız değişkenlerin bölge incelemesi yapılarak optimuma yakın değerleri belirlenmeli ve böylece YYY için gerekli olan orta değerler belirlenmelidir. Tepkime parametrelerinin çıktı parametreleri üzerindeki etkisini tanımlamak için, ikinci aşamada belirlenen orta değerler sayesinde programın CCD ile YYY için gerekli deney koşulları verilmektedir. Üçüncü aşama ise ikinci aşamada gerekli deney sonuçlarının çıktı parametrelerinin optimizasyon işlemidir.

Deney çıktıları programa tanımlanarak, aşağıdaki eşitlik temelinde değişkenlerin kodlanmış değerleri (x_ι) formüle (2.14) göre tanımlanmıştır.

$$x_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \tag{2.14}$$

x_ι: i' inci değişkenin şifrelenmemiş değeri

x_0: i' inci test değişkenin kodlamasız değeri

İ: Merkez noktası

YYY'de 2 farklı faktöriyel nokta bulunmaktadır. İlk faktöriyel nokta eksenel nokta olup, +α ve –α düzeylerinden oluşmaktadır. + ve – ilgili bağımsız değişkenin en yüksek ve en düşük değerini temsil etmektedir. İkinci faktöriyel nokta ise merkezi noktalar olup, orta noktalar 0 kodu ile verilmekte olup, tekrar noktaları olarak da adlandırılmaktadır. Bu merkezi noktalar deneysel hatanın tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (Bai vd., 2018; Khor ve Abdullah, 2012).

Yanıt fonksiyonunun optimum bölgeye yaklaştığı yerdeki eğrilik durumunun tahmin edilmesi için gerekli olan işlemdir. Optimum nokta katsayı değerleri en küçük kareler yöntemi ile tahmin edilmekle beraber, bölgesel minimum ve maksimum noktaları bir tane olduğundan dolayı yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki ikinci mertebeden bir polinom denklemi kullanılması kolaylık sağlamaktadır (Bai vd., 2018; Khor ve Abdullah, 2012).

İkinci dereceden polinom denklemi, Y, bağımsız değişkenlerin fonksiyonu olarak denklem (2.15)' e göre tanımlanmıştır (Bai vd., 2018; Khor ve Abdullah, 2012).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{4} b_i \chi_i + \sum_{i=1}^{4} b_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i<j}^{k} b_i x_i x_j \qquad (2.15)$$

Y: Tepki faktörü (Gly dönüşüm (%), GlyC seçimlilik (%) ve GlyC verimi (%)

X: Bağımsız değişken

b_0: Kesişim katsayısı

b_i: Birinci dereceden model katsayısı

b_{ii}: İkinci dereceden model katsayısı

k: Faktörlerin sayısı

Yanıt fonksiyonunu ikinci dereceden polinom olarak tahmin etmek için regresyon analizi Design Expert v13 paket programı tarafından yapılır. Modelin yeterliliğinin belirlenmesi için varyans analizinde (ANOVA) modeli kullanılır. Değişkenlerin GlyC üretimi üzerine bireysel ve etkileşimli ektilerini belirlemek için tepki yüzeyleri oluşturulur.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzemeler

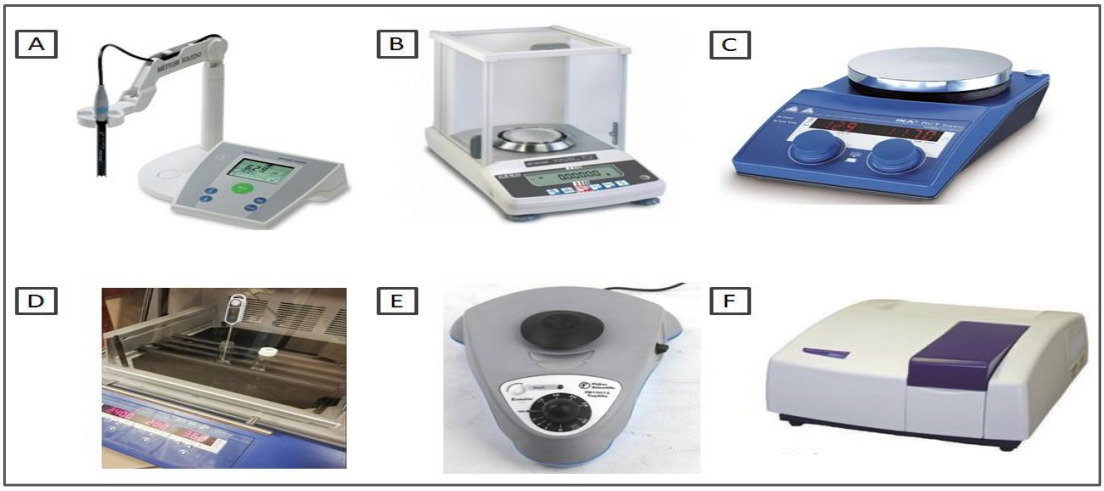
Tez çalışmasında kullanılan CalB (*Candida antartica*) ve Novozyme 51032 (*Aspergillus oryzae*) serbest lipazları Novozymes (Danimarka) firmasından tedarik edilmiştir.

Biyonanokompozit destek üretimde kullanılan bileşenlerinden kitosan Sigma-Aldrich firması, f-ÇDKNT (30-50 nm boyutunda, 65 m^2/g yüzey alanına sahip), Nanografi Nano Teknoloji A.Ş. firması, çapraz bağlayıcı ajanı gluteraldehit (Gla) ise Merck firması tarafından temin edilmiştir. Kitosanın çözünmesi için kullanılan asetik asit ve protein tayin için kullanılan Brilliant Blue G çözeltisi Sigma Aldrich firmasından tedarik edilmiştir. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan potasyum dihidrojen fosfat Merk firmasından temin edilmiştir. Aktivite tayini kullanılan zeytinyağı yerel bir marketten, dietileter ve etanol Isolab firmasından tedarik edilmiştir. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. GlyC reaksiyon girdileri Gly, DMC ve tert-butanol Merck tarafından temin edilmiştir.

3.2. Cihazlar

Tutuklama deneylerde tampon çözeltinin pH ayarı için pH metre (Mettler Toledo) kullanıldı. Deneylerde kullanılan tüm tartımlar hassas terazide (KERN) alınmıştır. Biyonanokompozit oluşturabilmek için hazırlanan çözeltiler manyetik karıştırıcıda (IKA RTC standard) karıştırılmış olup, tutuklama öncesinde numunelerin karıştırılması için vorteks cihazı (VELP Scientifica) kullanılmıştır.

Enzim tutuklama deneyleri sıcaklık ve karıştırma hız kontrollu inkübatörde (NewBrunswick Scientific Innova 40) gerçekleştirilmiş olup, tutuklama işlemindeki çözeltilerin Bradford yöntemi ile enzim tayini için UV/ Vis spektrofotometre (Jenway 6800 UV /Vis.) kullanılmıştır. Şekil 3.1.'de enzim tutuklama, aktivite ölçüm ve GlyC üretim deneylerinde kullanılan cihazlar görülmektedir.



Şekil 3.1. Tutuklama deneylerinde kullanılan cihazlar (A: pH Metre, B: Hassas terazi, C: Karıştırıcı, D: Inkübatör, E: Vortex, D: UV/Vis Spektrometre)

3.3. Deneysel Yöntem

3.3.1. Biyonanokompozit Destek Sentezi

Enzim tutuklamasında kullanılmak üzere kitosan ve f-ÇDKN'den biyonanokompozit destek hazırlanmıştır. Biyonanokompozit desteklerin üretimi için 2 g kitosan %2'lik (v/v) asetik asit çözeltisinde 24 saat boyunca, 500 rpm'de, 30º C sıcaklıkta çözünmesi sağlanarak, % 2'lik (w/v) kitosan çözeltisi hazırlanmıştır (Ögretmen, 2021; Soundararajan, 2015).

Sonrasında farklı bir yerde 2 mL saf su ile karıştırılmış 0,2 g fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (f-ÇDKNT) çözeltisi 100 rpm ve 30 ºC'de 5 dk karıştırıldıktan sonra bu karışımın üzerine 2'lik (w/v) kitosan çözeltisi ilave edilmiştir ve her iki çözelti homojen süspansiyon bir karışım elde edene kadar karıştırılmıştır. Homojen bir dağılım elde edildikten sonra bu karışımın içerisine gluteraldehit (Gla) çözeltisinden %2 (v/v) derişim olacak şekilde eklenmiş 37 ºC'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır.

Biyonanokompozit kürelerin üretimi için Gla çözeltili bu karışım 1 M NaOH çözeltisi içerisine 100 rpm hızındaki manyetik karıştırıcı kullanılarak 100mL'lik enjektör yardımıyla yavaş yavaş damlatılarak biyonanokompozit kürecikler elde edilmiştir. Biyonanokompozit kürecikler formunun ve stabil yapısının korunması adına 1 saat boyunca NaOH içinde bekletilmiş ve bu küreler pH değeri 7'ye gelene kadar saf su ile

yıkanmış ve tutuklama işlemi için oda sıcaklığında distile su içerisinde muhafaza edilmiştir (Ögretmen, 2021; Soundararajan, 2015).

3.3.2. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Tutuklama

Tutuklama işlemi öncesinde destek yüzeyinin çapraz bağlayıcı ile muamele edilmesi amacıyla, 6 mL' lik fosfat tampon çözeltisinde, yaklaşık 0,5 g biyonanokompozit destek ve %4'lük Gla ile 4 ºC'de 3 saat boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Gla ile bekleme süresi ve Gla derişimine ait çalışmaların sonuçları bulgular kısmında detaylı bir şekilde verilmiştir.

Biyonanokompozit desteğin tutuklanma işlemi öncesinde gece boyunca %4'lük Gla'a bekletilen biyonanokompozit destekler süzüldükten sonra ilgili pH değerine sahip tampon çözeltisinde yıkanmıştır. Tutuklama prosesi 15 mL hacimli kapaklı cam viallerde sabit sıcaklık ve karıştırmalı inkübatörde, 200 rpm karıştırma hızında gerçekleşmiştir. Her analiz numunesinden 2 farklı ölçüm alınarak deneysel sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır.

Tutuklama işlemi için 6 mL fosfat tamponu inkübatörde tutuklama işleminin yapılacağı sıcaklığa getirildikten sonra CalB ve Novozyme 51032 enzimi ilave edilerek başlangıç anında bir örnek alınmıştır. Sonrasında Gla ile çapraz bağlanma işlemine tabi tutulan 0,5 g destek ilgili tampona ilave edilerek tutuklama işlemi başlatılmış, 24 saat sonunda analiz için tekrar örnekler alınmıştır.

Tutuklama performansının analizi için, alınan örneklerde protein miktarı tayin edilerek tutuklama verimler ve APM değerleri hesaplanmış, enzim aktiviteleri ise zeytinyağı hidroliz yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.2.1. Optimum Gla Derişimi ve Süresinin Belirlenmesi

Tutuklama prosesinde çapraz bağlayıcı (Gla) derişimi ve biyonanokompozit desteğin Gla ile çapraz bağlanma süresi önemlidir. Gla derişiminin tutuklamaya etkisini analiz etmek için %1-%5 (v/v, Gla hacmi/tampon çözelti hacmi) arasındaki Gla derişimlerinde 6 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 0,5 g destek ile 3 saat boyunca buzdolabında çapraz bağlanma işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında farklı Gla derişimi ile çapraz bağlanma işlemi gören bu destekler kullanılarak belli koşullarda (0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 35

ºC sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızı, 300 µL CalB enzimi ve 24 saat süre) tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Gla ile çapraz bağlamanın süresinin analizi için 0,5 g destek ve 6 mL 0,1 M fosfat tamponunda buzdolabında farklı sürelerde (1-4 saat) çapraz bağlama işlemine tabi tutulmuştur. Farklı çapraz bağlama süresine tabi tutulan bu desteklerle yukarda belirtilen koşullarda tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

CalB enziminin Gla derişimi ve Gla ile çapraz bağlama süresi için belirlenen en iyi koşullar kullanılarak Novozyme 51032 enziminin biyonanokompozit desteğe çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.2. Optimum pH ve Sıcaklığın Belirlenmesi

Tutuklama prosesinin bir diğer önemli parametresi olan optimum pH'ın belirlenmesi için gerek CalB gerekse Novozyme 51032 enzimi için, 6 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 0,5 g destek ile %3 Gla ile 3 saat çapraz bağlama işlemine tabi tutulan destekler, 35 ºC sıcaklık, 300 µL enzim ve 24h boyunca farklı pH' larda (5-9) tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.

Tutuklama prosesinde optimum sıcaklığın belirlenmesi için Gla ile çapraz bağlama işlemine tabi tutulan (%4 Gla, 3 saat boyunca) destekler, pH 7 (Calb enzimi) ve pH 8 (Novozyme 51032) olan 6 mL 0,1 M fosfat tamponunda, 0,5 g destek, 300 µL enzim, farklı sıcaklıklarda (25-45 ºC) 24 saat boyunca tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.

3.3.2.3. Optimum Destek Miktarı ve Enzim Miktarının Belirlenmesi

Biyonakompozit desteğe CalB enziminin tutuklamasında optimum destek miktarının belirlenmesi için Gla ile farklı destek miktarlarında (0,1-0,7 g) çapraz bağlama işlemine tabi tutulan (%3 Gla, 3 saat) biyonanokompozit destekler, pH 7'lik 6 mL'lik 0,1 M fosfat tamponunda, 300 µL CalB enzimi, 35 ºC sıcaklık ve 24 saat boyunca tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.

CalB enzimi için belirlenen optimum destek miktarı, Novozyme 51032 enziminin tutuklama işleminde aynen kullanılmıştır. Calb ve Novozyme 51032 enzimler ile optimum enzim miktarı belirlenmesi amacıyla 6 mL 0,1 M (pH7- CalB ve pH 8- Novozyme 51032) fosfat tamponunda %3 Gla ve 3 saat çapraz bağlanma işlemine tabi

tutulan 0,5 g destek, 35 ºC sıcaklık, farklı enzim miktarları ile (100-500 µL, hacimce %1,66-8,30 v/v, enzim hacmi/tampon çözelti hacmi; 19,66-98,33 mg CalB /mL tampon; 16,88- 84,42 mg Novozyme 51032/mL tampon) ve 24 saat boyunca tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.

3.3.2.4. Optimum Tutuklama Süresinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum tutuklama süresinin belirlenmesi amacıyla çapraz bağlama işlemine tabi tutuklanan 0,5 g biyonanokompozit destek, 6 mL'lik 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7 CalB, pH 8 Novozyme 51032), 300 µL enzimi miktarı, 35 ºC sıcaklık, farklı tepkime sürelerinde örnekler alınarak 24 saat boyunca tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.

3.3.2.5. Tutuklanmış Desteğin Tekrar Kullanım

Biyonanokompozit desteğe tutuklanmış CalB ve Novozyme 51032 enzimlerinin tekrar kullanılabilirliğinin analizi için tutuklanmış enzimlerin zeytinyağı hidroliz yöntemi aktivite tayinleri yapılmış ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Tutuklanan enzimler tepkime sonrasında saf su ile yıkanarak yeni tepkime ortamına alınmış; çözücü kullanımının etkisini gözlemek için çözücü olarak n-butanol kullanılarak üç kere yıkama yapıldıktan sonra desteklerin yüzeyindeki çözücünün uzaklaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika bekletilmiş ve yeni tepkime ortamına alınmıştır. Kalan aktivite, t0 anında ölçülen aktivite ile t anındaki enzim aktivitesi arasındaki farkın t0 anındaki aktivite oranından; denklem (3.1)'ye göre hesaplanmaktadır (Min ve Lee 2011).

$$A_{\%} = \frac{A_{t,0} - A_t}{A_{t,0}} \tag{3.1}$$

$A_{\%}$: Kalan Aktivite (%)

$A_{t,0}$: t_0 anındaki tutuklanmış desteğin aktivitesi (U/mg enzim)

A_t: t anındaki tutuklanmış desteğin aktivitesi (U/mg enzim)

3.3.3. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Adsorpsiyonun İncelenmesi

Bu bölümde biyonanokompozit desteğe adsorplanan CalB ve Novozyme 51032

enzimlerin adsorpsiyon izotermi, kinetiği ve termodinamiğine inceleme için deney koşulları verilmiştir.

3.3.3.11. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, tutuklama sürecinde enzim derişimi haricindeki en iyi tutuklama parametreleri (örn. sıcaklık, pH, Gla, Gla ile bekleme süresi) ve farklı enzim derişimler kullanılarak destek başına adsorplanan protein miktarlarının (q_e) ve çözeltideki adsorbatın (enzim) denge derişiminin belirlenmesi yardımıyla tespit edilmiştir.

CalB enziminin adsorpsiyon izotermlernin belirlenmesi için 35 ºC, pH 7 fosfat tampon, 100-400 µL CalB enzimi ile; Novozyme 51302 enziminin adsorpsiyon izotermlernin belirlenmesi için ise 40 ºC, pH 8 fosfat tampon, 100-300 µL Novozyme 51032 enzimi ile yapılan tutuklama sırasında sıvı çözeltideki protein miktarı ile c_e, APM sonuçları ile elde edilen verilerle de qe değerleri belirlenmiştir. Langmuir, Freundlich ve Temkin diyağramları oluşturulmuş; Eşitlik 2.2 ile Langmuir, Eşitlik 2.4 ile Freundlich ve Eşitlik 2.5 ile Temkin sabitleri belirlenmiştir.

3.3.3.2. Adsorpsiyon Kinetiği

CalB ve Novozyme 51032 enzimlernin adsorpsiyon kinetiği belirlenirken, adsorpsiyon (tutuklama) işleminde farklı sürelerde ölçülen adsorbanın kütlesi başına adsorplanan enzim miktarı (q_t) yardımı ile enzimin adsorpsiyon sürecinin dengeye ulaştığı süre zarfına kadarki enzim denge derişimi (q_e) analiz edilmiştir.

CalB enziminin adsorpsiyon kinetiği çalışma koşulları 35 ºC sıcaklık, 400 µL enzim, pH 7 fosfat tampon ve 0-22 saat süredeki enzim adsorpsiyonu iken, Novozyme 51032 enziminin adsorpsiyon kinetiği çalışma koşulları 40 ºC sıcaklık, 300 µL enzim, pH 8 fosfat tampon ve 0-20 saat aralığındaki farklı sürelerde alınan numelerle denge anındaki adsorbanın kütlesi başına adsorplanan madde miktarı (AMP) ve farklı zamanlardaki AMP değerleri ile q_e ve q_t hesaplanmıştır. Yalancı 1. mertebe kinetik için Eşitlik 2.7, yalancı 2. mertebe kinetik için Eşitlik 2.8 kullanılarak k hız sabiti ve teorik q_e değeri hesaplanmıştır.

3.3.3.3. Adsorpsiyon Termodinamiği

CalB ve Novozyme 51032 enzimlernin adsorpsiyon termodinamiği, adsorpsiyon işlemindeki farklı sıcaklıklarda (belirlenen maksimum sıcaklık adsorpsiyon prosesinde optimum sıcaklık olarak seçilmiştir) çözeltideki enzimin denge derişimi ve çözeltideki enzimin başlangıç derişimi verileri ile analiz edilmiştir.

CalB enziminin termodinamik analizi için 400 µL enzim, 6 mL pH 7 fosfat tamponu, 25-35 ºC sıcaklık aralığında yapılan tutuklama işlemi sırasındaki adsorpsiyon verileri kullanılırken; Novozyme 51032 enziminin termodinamik analizi için 300 µL enzim, 6 mL pH 8 fosfat tamponu, 30-40 ºC sıcaklıklarda yapılan tutuklama işlemi sırasındaki adsorpsiyon verileri kullanılmıştır. Çözeltideki adsorbatın denge derişimi (C_e) ve çözeltideki adsorbatın başlangıç derişimi (C_0) ile hesaplanan Kc değeri (C_0/C_e) ve 1/T ile grafiğe taşınmış; Eşitlik 2.17 kullanılarak termodinamik parametreler belirlenmiştir.

3.3.4. Enzimatik GlyC Üretimi

GlyC üretimi 15 mL hacimli kapaklı cam viallerde kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Uygun miktarlarda tepkime girdileri olan DMC ve Gly'nin (toplam hacim, 1,1 mL) ortama eklenerek karıştırılmasının ardından gereken miktarda tutuklanmış CalB ya da Novozyme 51032 biyokatalizörleri eklenmiştir. Cam vial kapağı kapatıldıktan sonra teflon bant ve sonrasında şeffaf bant ile sarılarak kapağın dış hava akışı ile teması önlenmiş, böylece tepkime girdisi DMC ile yan ürün metanolün buharlaşması engellenmiştir. Cam vialler sabit sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollu inkubatöre yatay şeklinde yerleştirilerek, 200 rpm karıştırma hızında deneyler yapılmıştır. Belli zaman aralıklarında alınan örnekler gaz kromatografi cihazında analiz edilmek üzere hazırlanmıştır. Her deney iki set halinde tekrar edilmiş ve her deney setinin iki kez tekrarlı analizi gerçekleştirilmiştir.

Biyonanokompozit desteğe tutuklanmış olan CalB ve Novozyme 51032 kullanılarak enzimatik GlyC üretimine etki eden her bir parametre için deney koşulları aşağıda verilmiştir.

3.3.4.1. GlyC Üretimine Tepkime Süresinin Etkisi

Tutuklanmış CalB enzimiyle GlyC üretiminin belirlenmesi için 3-48 saat reaksiyon süresince, 2/1 DMC/Gly mol oranı, 60º C sıcaklık ve %20 enzim miktarı (w/w,

tutuklanmış enzim/reaktant kütle toplamı) ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Tutuklanmış Novozyme 51032 enzimiyle GlyC üretiminin belirlenmesi için 3-48 saat reaksiyon süresince, 6/1 DMC/Gly mol oranı, 50º C, ve %10 enzim miktarı (w/w, tutuklanmış enzim/reaktant kütle toplamı) ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.2. GlyC Üretimine Sıcaklık Etkisi

Tutuklanmış CalB ile GlyC üretimine sıcaklık etkisinin analizi için 2/1 DMC/Gly mol oranı, 40-60 ºC sıcaklık, %20 enzim miktarı (w/w) ve 24 saat tepkime süresi ile inceleme yapılmıştır.

Tutuklanmış Novozyme 51032 enzimi ile GlyC üretimine sıcaklık etkisinin analizi için 6/1 DMC/Gly mol oranı, 40-70 ºC sıcaklık, 24 saat tepkime süresi, %10 enzim miktarı (w/w) kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.3. GlyC Üretimine DMC/Gly Mol Oranının Etkisi

Tutuklanan CalB enzimi ile GlyC üretimine DMC/Gly mol oranının etkisinin analizi için 1/1-10/1 mol oranı, %20 enzim miktarı (w/w), 24 saat tepkime süresi ve 60 ºC sıcaklık koşullarında çalışılmıştır.

Tutuklanan Novozyme 51032 enzimi ile GlyC üretimine DMC/Gly mol oranı etkisinin incelenmesi için için 1/1-20/1 mol oranı, 50 ºC sıcaklık, 24 saat ve % 10 enzim miktarı (w/w) ile üretim gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.4. GlyC Üretimine Enzim Miktarının Etkisi

GlyC üretimine tutuklanmış CalB enzim miktarının analizi için %5-20 enzim miktarı (w/w), 60 ºC, 2/1 DMC/Gly mol oranı ve 9 saat tepkime süresince deneyler gerçekleştirilmiştir.

Novozyme 51032 enzim miktarının analizi için %5-20 enzim miktarı, 50 ºC sıcaklık, 18 saat tepkime süresi ve 2/1 DMC/Gly mol oranı ile GlyC üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.5. GlyC Üretimine Su Miktarının Etkisi

Tutuklanmış CalB (3/1 DMC/Gly mol oranı) ve Novozyme 51032 (10/1 DMC/Gly mol oranı)) enzimi ile GlyC üretiminde su miktarı etkisinin belirlenmesi için %0-%1,2 su miktarı (v/v) (su hacmi/ toplam reaktant hacmi (DMC+Gly)), 50º C sıcaklık, %10 enzim miktarı ve 24 saat tepkime süresince GlyC üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.6. GlyC Üretimine Çözücü Miktarının Etkisi

GlyC üretiminde çözücü miktarının analizi için çözücü olarak tert-butanol kullanılmıştır. Tutuklanmış CalB (3/1 DMC/Gly mol oranı) ve Novozyme 51032 (10/1 DMC/Gly mol oranı)) enzimi ile %0-%15 tert-butanol (v/v) (tert-butanol hacmi/ toplam reaktant hacmi (DMC+Gly)), 50º C sıcaklık, %10 enzim miktarı ve 24 saat tepkime süresince GlyC üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.7. GlyC Üretiminde Tutuklanmış Enzimin Tekrar Kullanımı

Enzimler pahalı biyokatalizörler olmaları nedenle enzim kullanımlarını ekonomik kılmak için aktivitelerini fazla kaybetmeden tepkime ortamında tekrar tekrar kullanılabilirlikleri önemlidir. Tekrar kullanım öncesinde tutuklanmış destek malzemesinin farklı çözücüler kullanılarak destek üzerindeki ürün, substrat ya da çözücülerin uzaklaştırılması için sıklıkla asetonun kullanıldığı (Lanjekar ve Rathod, 2013; Min ve Lee, 2011; Waghmare vd., 2015) ve bu kimyasalın dışında DMC (Du vd., 2018) ya da tert-butanol (Cushing ve Peretti, 2013) kullanıldığı literatür çalışmaları mevcuttur.

GlyC üretimine ait literatür çalışmaları analiz edildiğinde enzimin tekrar kullanılabilirliği, her GlyC üretim tepkimesi sonundaki kalan enzim aktivitesi belirlenerek ya da Gly dönüşümü/GlyC verimi hesaplanarak belirlenmiştir. Tutuklanmış olan CalB (3/1 DMC/Gly mol oranı) ve Novozyme 51032 (10/1 DMC/Gly mol oranı) enzimlerinin tekrarlı kullanımının araştırılması için, 50ºC, %10 (w/w) enzim miktarı ve 24 saat tepkime süresi koşullarında, ara yıkamalarda tert-bütanol çözücüsü kullanılarak enzimlerin beş tekrarlı kullanımı ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonrasında enzimler süzülerek ortamdan ayırılmıştır. Daha sonra süzüntü üç kez tert-bütanol ile yıkanmış ve çözücü ile yıkanan tutuklanmış enzimler taze üretim ortamına konarak GlyC üretimi tekrarlanmıştır. Her tekrarlı GlyC üretim sonrasında GlyC verimi belirlenmiştir.

3.3.4.8. YYY ile GlyC Üretiminin Optimizasyonu

CalB enzimi ile YYY ile GlyC üretiminde CCD ve Design Expert v13 programı kullanılmıştır.Tepkime süresi (24 saat) sabit tutularak GlyC üretime etki eden bağımsız değişkenler DMC/Gly mol oranı, enzim derişimi ve sıcaklık olarak seçilmiş, yanıt değişkenleri ise Gly dönüşümü ile GlyC seçimliliği ve GlyC verimidir. GlyC üretimine ait ön deneme sonuçlarından elde edilem en iyi orta değerler, %10 enzim miktarı, 3/1 DMC/Gly mol oranı ve 50º C olarak alınmıştır. Tablo 3.1.'de GlyC üretimine etki eden bağımsız değişkenlerin (Faktör) kodlanmış ve gerçek değerleri verilmiştir.

Tablo 3.1. GlyC üretiminde bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Bağımsız Değişkenler		**Kodlanmış ve Gerçek Değerler**				
Faktör	Parametreler	-2	-1	0	1	+2
A	Sıcaklık (ºC)	33,18	40	50	60	66,82
B	DMC/Gly mol oranı	1,32	2	3	4	4,68
C	Enzim miktarı (%)	1,59	5	10	15	18,41

Tablo 3.2. CalB enzimi ile GlyC üretiminde YYY deney tasarım tablosu

Deney Seti-türü	**Sıcaklık (ºC)**	**DMC/Gly mol oranı**	**Enzim miktarı (%)**
1- faktoriyel	60	2	5
2- faktoriyel	40	2	15
3- faktoriyel	40	4	15
4- merkezi	50	3	10
5- merkezi	50	3	10
6 –faktoriyel	60	2	15
7- merkezi	50	3	10
8- eksenel	33,18	3	10
9- eksenel	50	4,68	10
10 –faktoriyel	40	4	5
11- eksenel	66,82	3	10
12- eksenel	50	3	18,41
13- merkezi	50	3	10
14- merkezi	50	3	10
15- faktoriyel	60	4	5
16- eksenel	50	3	1,59
17- faktoriyel	40	2	5
18- merkezi	50	3	10
19- eksenel	50	1,32	10
20- faktoriyel	60	4	15

Tablo 3.2.'de belirlenen kodlanmış ve gerçek değerlere göre YYY'nin önerdiği 20 farklı deney seti görülmektedir. Bu deney seti, 6 eksenel, 8 faktöriyel nokta ve 6 orta noktadan oluşmaktadır. Programın önerdiği koşullardaki deneyler, 2 eş zamanlı konulan deney seti ve her bir deney setinin 2 ölçüm tekrarının ortalamaları alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Analiz Yöntemler

Bu bölümde tutuklama performansı için gerekli olan analiz yöntemler (protein tayini, adsorplanan protein miktarı ve enzim aktivite tayini) ve tutuklanan desteğin karakterizasyon analizleri (FTIR, TGA, SEM ve POM), Gly ve GlyC'nin gaz kromatografi (GC) cihazı ile analizinin yanısıra tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanımın analizi için kalan aktivite hesaplama yöntemi anlatılmıştır.

3.4.1. Protein Tayini

Tutuklama işlemi sonrasında biyonanokompozit destekler ortamdan süzülerek uzaklaştırılmıştır.

Immobilizasyon işlemi öncesindeki ve sonrasında çözeltide kalan protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu yöntem, çözelti içindeki proteinlere bağlanan Coomassie Brillant Blue G250 boyasının UV-VIS spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda absorbans verme prensibine dayanan spektrofotometrik bir metotdur. Referans protein olarak bovine serum albumin kullanılmıştır. Bradford çözeltisi için, 1 mL etanol, 2 mL fosforik asit, 0,45 mL Brilliant Blue solüsyonu, 15 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır. 2,4 mL Bradford çözeltisine 100 µL örnek eklenerek vortekslenmiş ve 595 nm'de enzim içermeyen kör çözeltiye karşı kuartz küvette alınarak absorbans değeri okunmuştur (Bradford, 1976; Melis, 2016). 595 nm dalga boyunda okunan absorbansa karşılık gelen protein miktarı (µg/µL) hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği (Ek. 1) kullanılarak hesaplanmıştır (Ögretmen, 2021).

Tutuklama Performansı

Tutuklama verimi tutuklamaya başlamadan önceki (t=0 anındaki) ve tutuklama sonrasındaki tampon çözeltisindeki protein (enzim) miktarı arasındaki farkın başlangıçtaki enzim miktarına oranından hesaplanmış olup, Eşitlik (3.2)'e göre

hesaplanmaktadır.

$$Y_l = \frac{c_{t0} - c_t}{c_{t0}} \quad (3.2)$$

Y_I: Tutuklama verimi (%);

c_{t0}: Tutuklama öncesi tampon çözeltisindeki enzim miktarı (mg/mL enzim);

c_t: Tutuklama sonrası tampon çözeltisindeki enzim miktarı (mg/mL enzim)

Destek başına adsorplanan protein miktarı (APM) t_0 ve t_{24} anında tampon çözeltisindeki protein (enzim) miktarlarının farkının toplam tutuklama hacmi ile çarpımının destek miktarına oranı olan eşitlik (3.3)'ye göre hesaplanmıştır.

$$APM = \frac{(c_{t0} - c_t)}{m_D} * V \quad (3.3)$$

APM: Adsorplanan protein miktarı (mg protein/ g destek)

V: Tutuklama sırasındaki mevcut hacmi (mL)

m_D: Destek miktarı (g)

3.4.2. Enzim Aktivite Tayini

Biyonanokompozit desteğe tutuklanan enzimin hidrolitik aktivitesi zeytinyağı hidrolizi yöntemi ile belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntem olup uygulaması kolaydır. Standart koşullarda, bir ünite enzim (U), zeytinyağından 1 dk'da 1 µmol yağ asidi hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanır. Enzim aktivitesi, sarf edilen NaOH miktarından yola çıkılarak hesaplanır. 25 mL hacmindeki erlenlerde 2,5 mL zeytinyağı ve 0,1M pH 7,0 fosfat tamponundan 2.5mL alınarak 37°C sıcaklıktaki çalkalamalı inkübatöre konur. Tepkime ortamının bu sıcaklığa ulaşması ile ortama 0,1 g tutuklanmış enzim eklenir. Hidroliz, enzimin tepkime ortamına eklenmesi ile başlar ve 30 dk süreyle devam eder. Hidrolizi sonlandırmak için hacimce 1/1 oranında hazırlanmış eter/etanol karışımından 2,5 mL tepkime ortamına eklenir ve 3-4 damla %1 fenoftalein çözeltisi damlatılır. Bu karışım 0,1M NaOH çözeltisi ile titre edilir. Her bir lipaz için ikişer tekrar yapılarak harcanan NaOH çözeltisi miktarından denklem (3.4)'e göre hesaplama yapılır (Melis, 2016; Stoytcheva vd., 2012). İlgili denklemde şahit numune (blank) olarak bahsedilen ise enzim ilavesiz

titrasyon hacmidir.

$$\frac{U}{mg\ Enzim} = \frac{(V_{numune} - V_{blank})_{NaOH} \times M_{NaOH} \times 1000}{m_{enzim} \times t} \quad (3.4)$$

V_{numune}: Tutuklanmış enzim varlığında titre edilen NaOH hacmi (mL)

V_{blank}: Tutuklanmış enzim ilave edilmeksizin titre edilen NaOH hacmi (mL)

M_{NaOH}: Titre edilen NaOH molaritesi (mol/L)

t: Tepkime süresi (dk)

3.4.3. Tutuklama Desteğinin Karakterizasyonu

Tutuklama desteği olarak kullanılmak üzere hazırlanan biyonanokompozit desteğin karakterizasyonu için yapılan analizlerde Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) cihazı, Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Polarize Optik Mikroskobu (POM) kullanılmıştır.

Desteğin FTIR analizi: FTIR spektroskopisi analizi gerçekleşen bileşiklerin kimyasal fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Elektomanyetik spektrumda kızıl ötesi bölgesi 14000 cm-1 – 10 cm-1 arasında olup, üç ana bölgeden oluşmaktadır; yakın dalga kızıl ötesi (4000~14000 cm-1), orta dalga kızıl ötesi (400~4000 cm-1) ve uzak dalga kızıl ötesi (4~400 cm-1).

Kızıl ötesinde meydana gelen radyasyon, bu kimyasal bağlarda gerilme, eğilme ve büzülme gibi atom gruplarının yapısındaki dipol momentlerde değişim ve absorbsiyon nedeniyle spektral piklerin meydana gelmesini sağlar (Başyigit Kılıç ve Karahan, 2010).

Orta dalga boyundaki IR spektrumlar, mevcut birçok moleküler grubun titreşim enerjisini içine aldığından, analiz edilen maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimi sonucunda oluşan frekanslara karşılık gelmiş absorpsiyon pikini göstererek, maddenin parmak izine erişimine sağlar.

Araştırma grubumuz tarafından daha önce üretilmiş olan biyonanokompozit desteğin kimyasal bağ analizi Şekil 3.2.'deki görülen Perkin Elmer marka 100 Model FTIR cihazı ile Germanium kristal başlığı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyonanokompozit

destek, analiz öncesinde oda sıcaklığında kurutulmuş ve ölçümler 650-4000 cm^{-1} dalgaboyu aralığında yapılmıştır (Ögretmen, 2021).



Şekil 3.2. FTIR spektroskopie (Perkin Elmer)

Desteğin TGA Analizi: TGA diğer bir adıyla termogravimetri (TG) polimer kütlesinin termal stabilitesini belirlemek için, kontrollü bir atmosfer basıncı ve kontrollü sıcaklık programı altında sürenin ve sıcaklığın fonksiyonu olarak ölçüm gerçekleştirilir.

Bu ölçüm yönteminde sıcaklık yardımıyla moleküler franksiyonlama işlemi ile analiz edilen numunenin bozunma sıcaklığı, nem içeriği, organik ve inorganik bileşenlerinin yüzdesi belirlenebilir (Kristl vd., 2016; Raghunadh Acharyulu vd., 2013). Bileşimi bilinmeyen bir numunenin azot atmosfer altında gerçekleşen TGA taramasında 300 ºC sıcaklığa görülen kütle kaybı genellikle su gibi düşük moleküler kütleli bileşenlerdir. 300-550 ºC sıcaklık arasındaki kütle kaybı ise, makromoleküler bozulma olduğunu gösterir.

Üretimi gerçekleştirilen biyonanokompozit desteğin ısıl bozunma sıcaklıkları Şekil 3.3.'de görülen Mettler Toledo TGA cihazı kullanılarak Araştırma grubumuz tarafından belirlenmiştir. Biyonanokompozit desteğin termal karakterizasyonu için, 0,5-0,7 mg kurutulmuş numune alınmış ve 25-800 ºC arasında dakikada 10 ºC hızla ısıtma yapılmıştır.



Şekil 3.3. TGA cihazı (Mettler Toledo)

Desteğin SEM analizi: SEM, malzemenin yüksek enerjili elektron ışını altında yüksek kaliteli ve yüksek çözünürlükte görüntüsünün elde edildiği elektron mikroskobudur. Elektron-numune etkileşimi kaynaklı oluşan sinyal, analiz edilen numuneyi oluşturan malzemelerin oryantasyonu, dış morfoloji (doku) ve kimyasal bileşimi hakkında bilgi verir (Akhtar vd., 2018). Hazırlanan biyonanokompozit desteklerin enzim tutuklanmış ve tutuklanmamış yüzey morfolojilerinin görüntülenmesi için SEM analizinden yararlanılmıştır. Sem analizi, BAP FDK-2022-2809 projesi kapsamında hizmet alımı karşılığında Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarında Quanta 400F Field Emission markalı cihaz ile farklı boyutlardaki büyütme işlemleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Desteğin POM ile Yüzey Analizi: Üretimi gerçekleştirilen biyonanokompozit desteklerin mikroskobik boyutta yüzey görüntülerinin incelenmesi amacıyla, Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Polimer Laboratuvarında bulunan ve Şekil 3.4.'de gösterilmiş olan Nikon Eclipse LV100 Pol markalı POM cihaz ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. POM cihazı (Nikon Eclipse)

3.4.4. Gly ve GlyC Analizi

GlyC üretimi gerçekleştirildikten sonra cam viallerden alınan yaklaşık 1 mL örnek, GC cihazında analiz edilmek üzere hazırlanmıştır. Alınan örneklere iç standart olarak 0,65 mL n-butanol ve 5 mL DMF eklenmiştir. Bu çözelti karışımı 0,20 µm gözenek büyüklüğüne sahip tek kullanımlık şırınga ucu filtreden süzülerek GC viallerine aktarılmıştır.

GlyC derişiminin GC cihazı ile tayini için, alev iyonizasyon dedektörü (FID) entegre edilmiş ve 30m x 0,25 mm x 0,25 µm boyutlarındaki DB-Wax kolonu ile donatılmış olan GC 7820 Agilent GC cihazı kullanılmıştır. Enjektör ve detektör sıcaklıkları sırasıyla 260 ºC ve 280 ºC olarak ayarlanmış olup, iç standart olarak n-butanol kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı, 40 ºC'de 2 dakika bekledikten sonra 25 ºC/dk artışla 250 ºC'ye çıkarılmış, bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilerek 40 ºC/dk artışla 280 ºC'ye ulaşmış ve bu sıcaklıkta da 3 dakika kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır. GlyC analizinin yapılacağı numune ölçüm öncesi DMF (Dimetil formamit) ve belli miktarda iç standart ile seyreltildikten sonra cihaza verilmiştir (Ochoa-Gómez vd., 2011).

EK-B1'de GlyC analizine ait GC kromatogramı yeralmaktadır. GC'deki toplam analiz süresi 25 dk 40 sn olarak ayarlanmıştır. İlgili pik süreleri, Gly 11,62 dk; GlyC 15,81

dk; DMC 4,68 dk; DMF 7,28 dk; ve n-butanol 5,80 dk'dır. Gly (t:0) derişim aralığı 0,000028-0,00466 mol/mL iken, GlyC derişim aralığı 0,00021-0,00227 mol/mL' dir.
Analiz edilen her örneğin iki kere ölçümü gerçekleşmiştir. Gaz kromatografi analiz yöntemi güvenli olup, analizler Membran Araştırma Laboratuvarı alt yapısında var olan GC cihazında gerçekleşmiştir.
Saf GlyC, Gly, n-butanol ve DMF çözeltileri kullanılarak GlyC ve Gly miktarları değiştirilerek, alan oranı hesaplanmış, GlyC ve Gly için hazırlanmış kalibrasyon eğrileri sırasıyla, Ek-B2 ve Ek-B3'de verilmiştir. Oluşturulan her iki kalibrasyon grafiği yardımı ile; Gly dönüşümü ile GlyC seçimliliği ve verimi aşağıdaki formüller yardımı ile hesaplanmıştır (Gao vd. 2017).
Gliserin dönüşümü (C_{GlyC}), ortamda harcanan Gly'nin tepkimeye giren Gly miktarına molce oranı olarak tanımlanmış olup, aşağıda verilen eşitlik (3.5)'e göre hesaplanmıştır.

$$C_{Gly} = \frac{n_{Gly,0} - n_{Gly}}{n_{Gly,0}} . 100 \quad (3.5)$$

GlyC seçimliliği (S_{GlyC}), ortamda üretilen GlyC'ın reaksiyon sırasında harcanan gliserin miktarına oranı olup, eşitlik (3.6)'e göre hesaplanmıştır.

$$S_{GlyC} = \frac{n_{GlyC}}{n_{Gly,0} - n_{Gly}} .100 \quad (3.6)$$

GlyC verimi (Y_{GlyC}), ortamda üretilen GlyC'ın reaktöre beslenen Gly mol miktarına oranı olup, denklem (3.7)'e göre hesaplanmış olup aynı zamanda Gly dönüşüm ve GlyC seçmliliğinin çarpımına eşittir.

$$Y_{GlyC} = \frac{n_{GlyC}}{n_{Gly,0}} 100 \quad (3.7)$$

C_{Gly}: Gly dönüşümü (%)

S_{GlyC}: GlyC seçimliliği (%)

Y_{GlyC}: GlyC verimi (%)

n_{Glyc}: Tepkime sonunda üretilen GlyC mol miktarı (mol)

n_{Gly}: Tepkime sonunda ortamda kalan Gly mol miktarı (mol)

$n_{Gly,0}$: Başlangıçta reaktöre beslenen Gly mol miktarı (mol)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde öncelikle tutuklama desteğinin karakterizasyonu ve biyonanokompozit desteğe CalB ve Novozyme 51032 lipazlarının tutuklamasında tutuklamaya etki eden parametreler incelenmiştir. Aynı zamanda biyonanokompozit desteğe CalB ve Novozyme 51032 enzimlernin adsorpsiyon prosesine ait izoterm, kinetik ve termodinamik inceleme de yapılmıştır. Daha sonra tutuklanmış olan CalB ve Novozyme 51032 enzimler ile GlyC üretimi ön denemeleri ardından CalB ile GlyC üretiminin YYY optimizasyonuna ait deneysel verilerin sonuçları literatür ile karşılaştırılarak verilmiştir.

4.1. Biyonanokompozit Desteğin Karakterizasyonu

Bu bölümde kitosan ve f-ÇDKNT ile üretilen biyonanokompozit desteğin kimyasal bağ yapısının incelenmesi amacıyla FTIR, termal dayanımının saptanması için TGA, yüzey morfolojik karakterizasyonu için SEM ve POM cihazları kullanılmıştır.

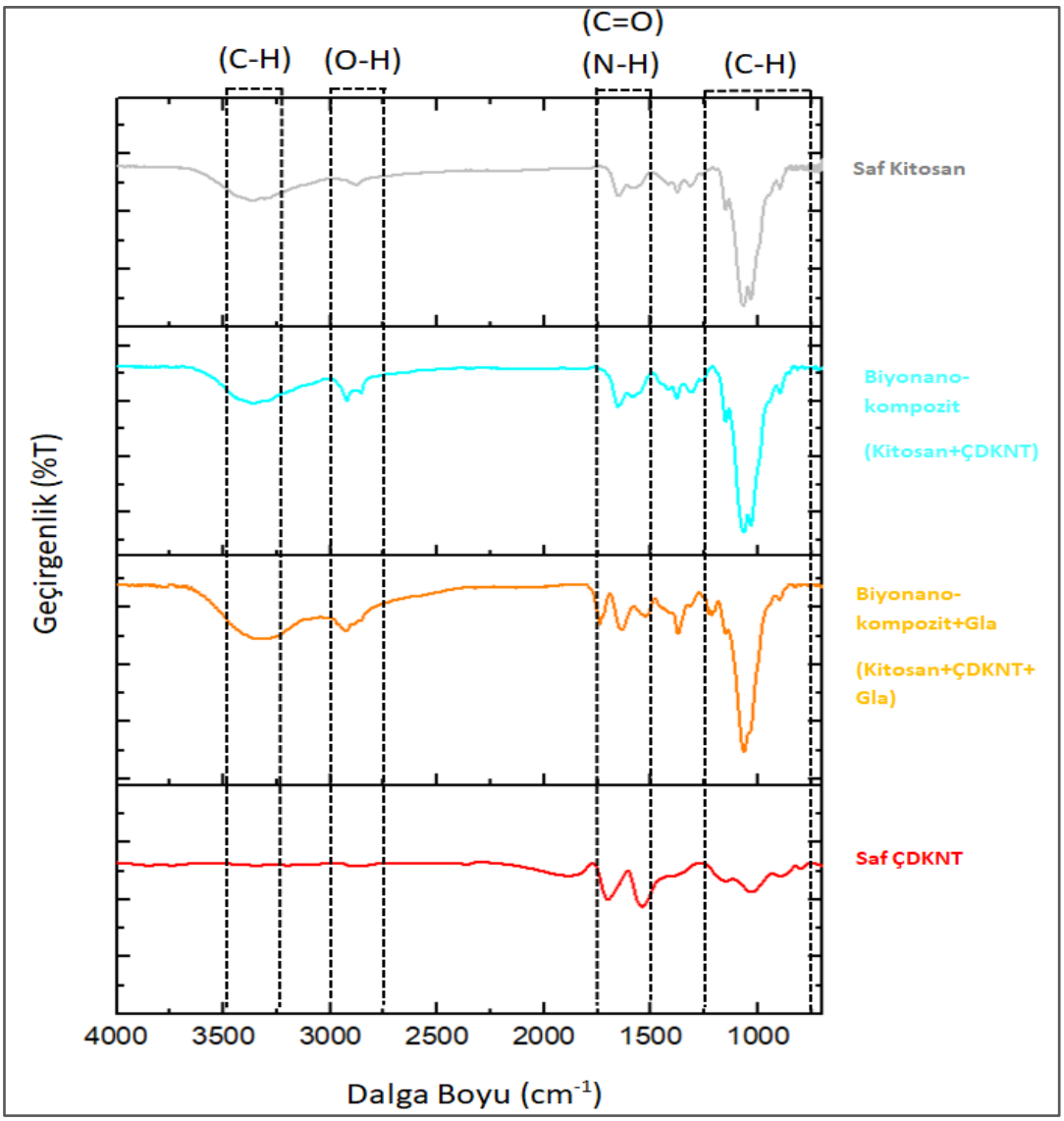
FTIR analizi:

Araştırma grubumuz tarafından kitosan ve f-ÇDKNT temelli sentezlenen biyonanokompozit desteğin kimyasal fonksiyonel analizi Fourier dönüşümLü kızılötesi spektroskopisi ile incelenmiş olup, Şekil 4.1.' de FTIR sonuçları görülmektedir (Ögretmen, 2021).

FTIR spektrumları analiz edildiğinde 3354-3279 cm^{-1} aralığında görülen pikler (0-H) gruplarına ait frekansa denk gelirken, 2923-2854 cm^{-1} aralığındaki pikler ise (C-H) gerilmesinin olduğunu göstermektedir. Yaklaşık 1560 cm^{-1} de f-ÇDKNT' de görülen pik aromatik karbon molekülleri arasındaki C=C bağına işaret ederken (A. H. Liu vd., 2007), 1643 cm^{-1}' deki pik (C=O) bağının varlığını COOH grubu ile fonksiyonlaştırılmış çok duvarlı karbonnanotüpün yapısındaki C=O; C-O eğilmelerine yani karboksil yapısına işaret etmektedir.

Biyonanokompozitteki (Kitosan+f-ÇDKNT) 1571 cm^{-1}' de meydana gelen pik kitosandaki NH_2 bağı ile f-ÇDKNT' deki (–COOH) bağlarının reaksiyonu sonucu oluşan amid bağının (N-H) oluştuğunu göstermektedir. FTIR spektrumda 1060-1022 cm^{-1} aralığında gözüken derin pikler; alifatik (C-H) düzlem içi eğilmelere işaret

etmektedir. Biyonanokompozit desteğin kitosana kıyasla (0-H) pikindeki azalması kompozit üretiminin başarılı olduğunu göstermektedir (Ögretmen, 2021).



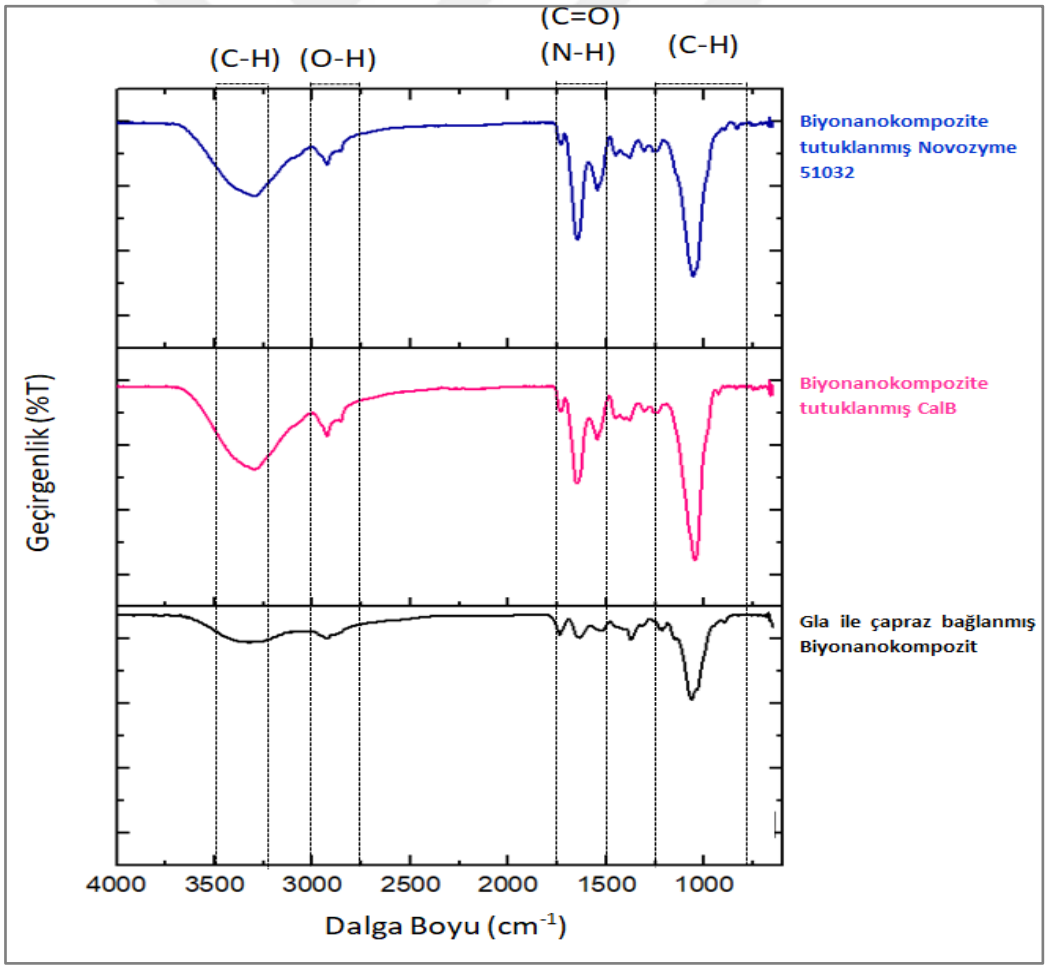
Şekil 4.1. Biyonanokompozit desteğin FTIR spektrumları (Ögretmen, 2021)

Literatürde kitosan, polivinilpirolidon ve ÇDKNT kullanılarak yapılan bir çalışmada kitosana ait karakteristik (O-H) piklerin 3318 cm-1 frekansına, (C-H) piklerinin ise 2885 cm^{-1} frekansına ait olduğu, 1600-1700 cm-1' de Amid I ve (C=O) bükülmelerin olduğu, 1540 cm^{-1} frekansı kitosan ve f-ÇDKNT arasındaki amid bağına işaret ederken, 1649 cm^{-1}' deki pikin ise; çapraz bağlayıcı gluteraldehit yapısında bulunan aldehit grubu ile kitosandaki amino grupları arasındaki reaksiyonu sonucu oluşan imid (C=N) bağının varlığını gösterdiği belirtilmiştir (Aisverya, 2014).

Şekil 4.2’ de çapraz bağlanmış biyonanokompozit destek ve bu tutuklanmış CalB ve Novozyme 51032 enzimlernin FTIR sonuçları yeralmaktadır.

Görüldüğü gibi tutuklanmış CalB ve Novozyme 51032 enzimlerinde 1649 cm^{-1}’deki pikde derinleşme olmuşştur. Çapraz bağlama işlemine tabi tutulmuş olan biyonanokompozit desteğin (Gla ile çapraz bağlanmış biyonanokompozit) yüzeyinde arta kalan gluteraldehitin aldehit grupları ile enzim yapısındaki amino gruplarının birleşerek imid bağı oluşturduğu ve bu nedenle bu pikin bariz bir şekilde derinleştiği analiz edilmiştir (Coşkun vd., 2021).

Ayrıca tutuklanmış enzimlerin yapısındaki 1540 cm^{-1} civarındaki pikin derinleşmesinin de, enzim yapısındaki amino grupları ile f-ÇDKNT yapısındaki karboksil (COOH) gruplarının birleşmesiyle oluşan amid I bağı (C=0) kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Coşkun vd., 2021).



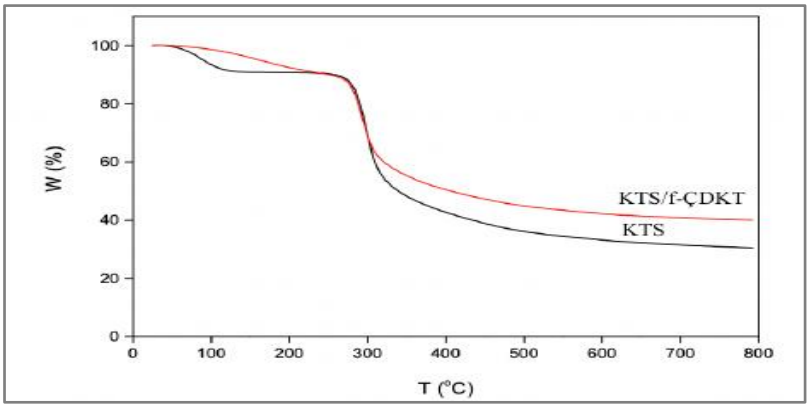
Şekil 4.2. Tutuklanmış ve tutuklanmamış biyonanokompozit desteğin FTIR görüntüleri

TGA Analizi: Kitosan ve biyonanokompozit desteğin termogravimetrik analizi ile ısıl bozunma sıcaklığının analizi kapsamında 0,5-0,7 mg kuru destek ile azot (N_2) ortam şartlarında 25 ºC sıcaklıktan başlanıp, dakikada 10 ºC artış hızıyla 800 ºC'ye çıkarılarak gerçekleşen ısıl bozunma sıcaklıklarına ait TGA ölçüm sonuçları şekil 4.3.'de verilmiştir (Ögretmen, 2021).

Kitosana ait termogram analiz edildiğinde yaklaşık iki basamaklı bir termal bozunma görülmektedir. İlk bozunma sıcaklık 168,4 ºC sıcaklık yaklaşık %10' luk (%9,1) bir kütle kaybı gerçekleşmiştir. Üretimi gerçekleştirilen biyonanokompozit desteğin ilk bozunma sıcaklığının ise 231,9 ºC olduğu ve bu bozunma sıcaklığında başlangıç kütlesini % 90,8 koruduğu tespit edilmiştir. Biyonanokompozit destek üretimde ilave edilen f-ÇDKNT ısıl bozunma sıcaklığını 63,4 ºC arttırarak, ısıl kararlılığı arttırdığı görülmektedir (Ögretmen, 2021).

Literatür verilerine göre saf kitosanda 100-200 ºC sıcaklık arasında gerçekleşen ilk bozunma nem kaybı kaynaklıdır (Mallakpour ve Madani, 2015). İkinci bozunma ise 248-600 ºC sıcaklıkta deasetilasyon, buharlaşma ve uçucu ürünlerin uzaklaştığı sıcaklıktır (Chandra Dey vd., 2016; S. F. Wang vd., 2005).

İkinci bozunma esnasında polisakkaritlerin pirolizi sonucu glikozidik bağların rastgele kopması ile asetik asit, bütirik asit ve C2, C3 ve C6 karbon atomlarının baskın olduğu düşük yağ asitlerine ayrışmaktadır (Nieto vd., 1991).



Şekil 4.3. Kitosan ve biyonanokompozit desteğin ısıl bozunma termogramları (Ögretmen, 2021)

Biyonanokompozitin SEM, POM ve Boyut Analizi:Biyonanokompozit desteğin tutuklama öncesi ve sonrası taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri x100, x10000, x50000 büyütme oranında elde edilen sonuçları Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Tutuklanmamış desteğin SEM görüntüleri analiz edildiğinde biyonanokompozit desteğin küresel bir formda olduğu ve yüzeyinin bazı kesitlerinde derin boşluklar olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan SEM çalışmalarına bakıldığında Gla ile çapraz bağlama sonrasında kitosanın yüzey morfolojisi pürüzsüz ve düz bir form aldığı bilinmektedir (Li vd., 2013). SEM görüntülerinde analiz edilen derin boşluklar biyonanokompozit bileşenlerinden biri olan f-ÇDKNT kaynaklı olabileceği tahmin edilmektedir.

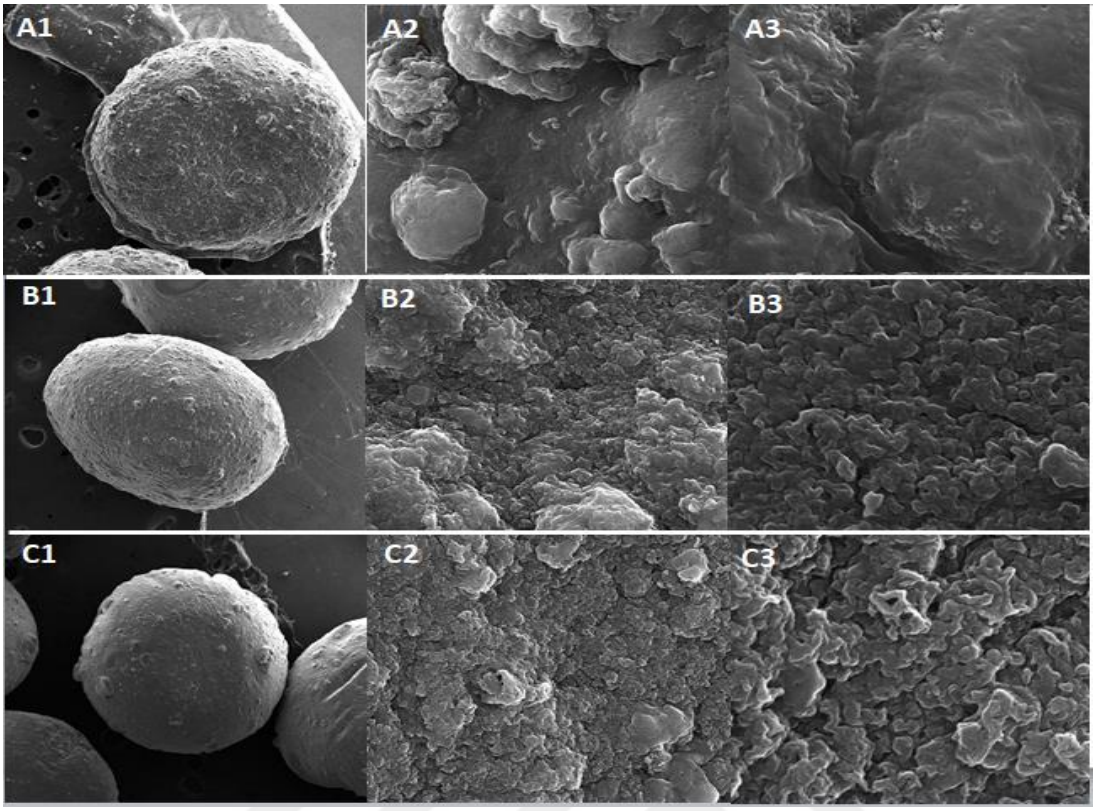
CalB (B1-B3) ve Novozyme 51032 (C1-C3) enzimlerinin tutuklandığı biyonanokompozit görüntüleri analiz edildiğinde, kümelenmeler halinde görülen yüzey morfolojileri enzimin biyonanokompozit desteğe tutuklanmış olduğunu göstermektedir. Kitosan ve f-ÇDKNT temelli biyonanokompozite tutuklanan Novozyme TL 100L enzimi için de şekil ve yüzey morfolojisi olarak benzer görüntüye rastlanılmıştır (Ögretmen, 2021).

Fe_3O_4 temelli manyetik nanoparçacık desteğe tutuklanan Glukoz oksidaz enzimine ait SEM görüntüsünde de benzer şekil ve yüzey morfolojisi gözlenmiştir (Rusu vd., 2022).

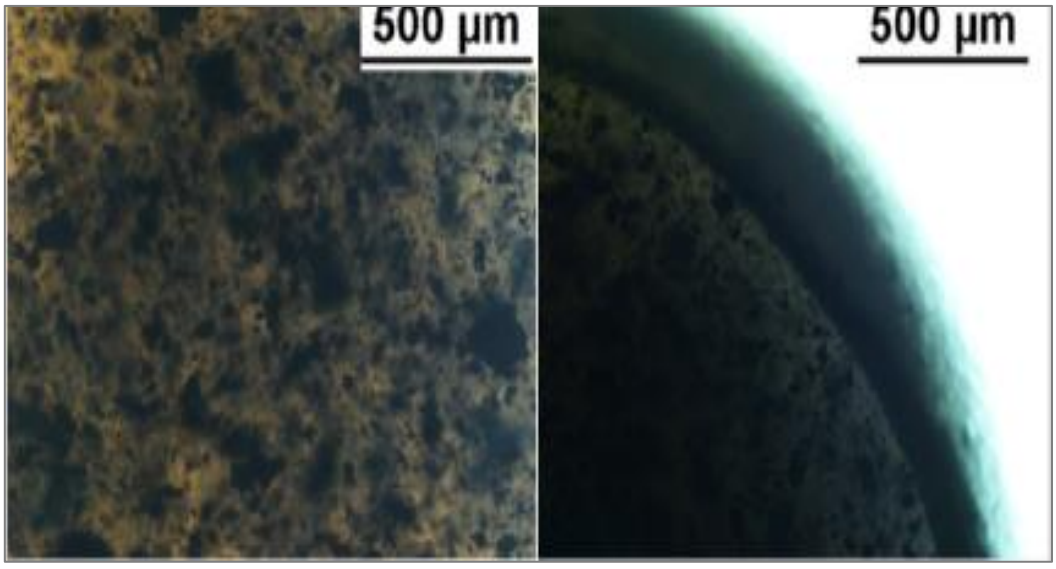
Şekil 4.5.'de biyonanokompozit desteğin Polarize Optik Mikroskobu (POM) altında 500 μm boyut altındaki görüntüsü görülmektedir.

POM'daki görüntülerden f-ÇDKNT'ın bölgesel olarak agremasyonları görülmektedir (Ögretmen, 2021).

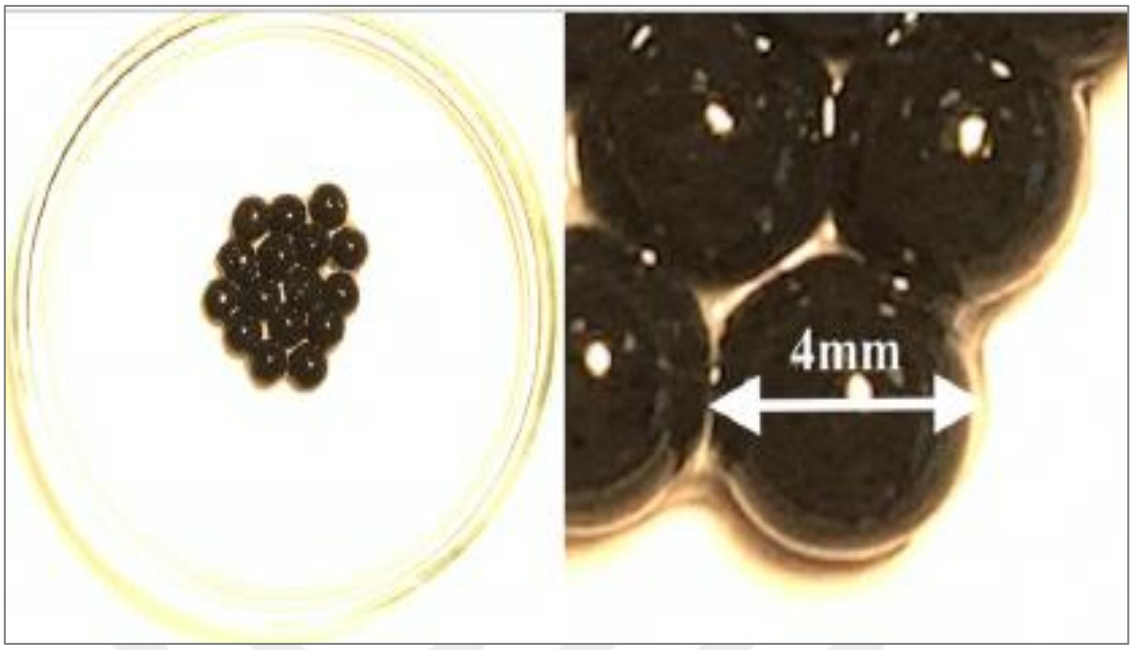
Şekil 4.6.'da ise biyonanokompozit desteğin 12 megapiksel fotoğraf makinesi kullanılarak belirlenen boyut analizi görülmektedir. Biyonanokompozit desteğin POM görüntüsünde bir küreciğin ortalama boyutu, yaklaşık 4 mm olarak ölçülmüştür (Ögretmen, 2021).



Şekil 4.4. Biyonanokompozit desteğin tutuklama öncesi ve sonrası SEM görüntüsü A: Tutuklanma işlemi gerçekleşmemiş biyonanokompozit destek, B: CalB enziminin tutuklandığı biyonanokompozit destek, C: Novozyme 51032 enziminin tutuklandığı biyonanokompozit destek (1: 100x, 2: 10 000x 3: 50 000 kat büyültme işlemi)



Şekil 4.5. Biyonanokompozit desteğin POM görüntüleri (Ögretmen, 2021)



Şekil 4.6. Biyonanokompozit desteğin boyut analizi (Ögretmen, 2021)

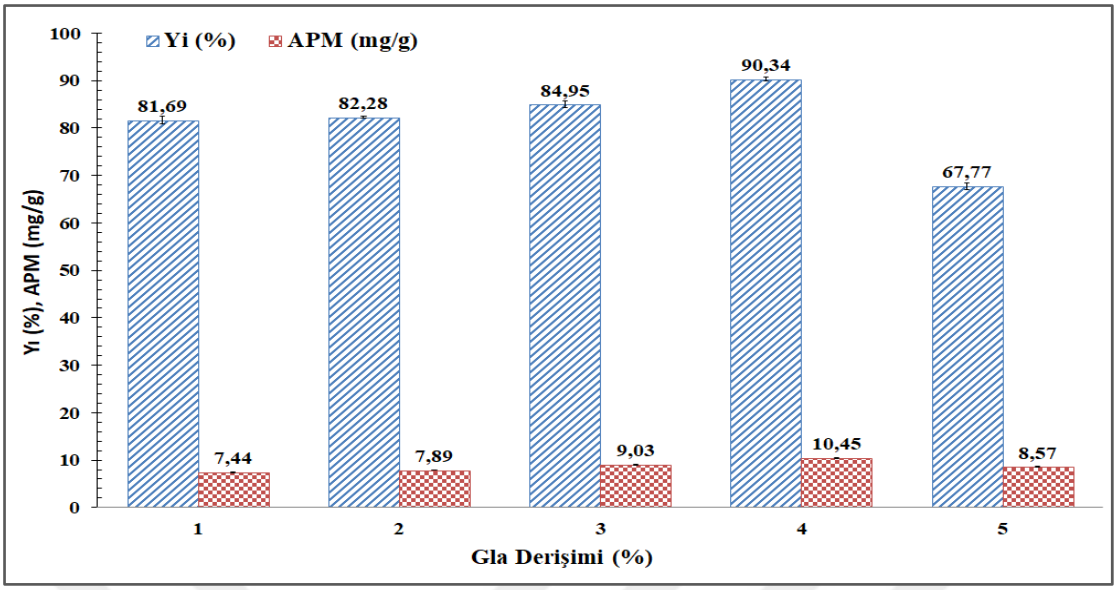
4.2. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Tutuklama

Bu bölümde biyonanokompozit desteğe CalB ve Novozyme 51032 enzimlernin tutuklama işlemine etki eden parametreler (gluteraldehit (Gla) derişimi, Gla ile çapraz bağlanma süresi, sıcaklık, pH, biyonanokompozit destek ve enzim miktarı, tutuklama süresi ve ÇDKNT miktarı) incelenmiş olup ve deneysel sonuçlar literatür ile karşılaştırılmıştır.

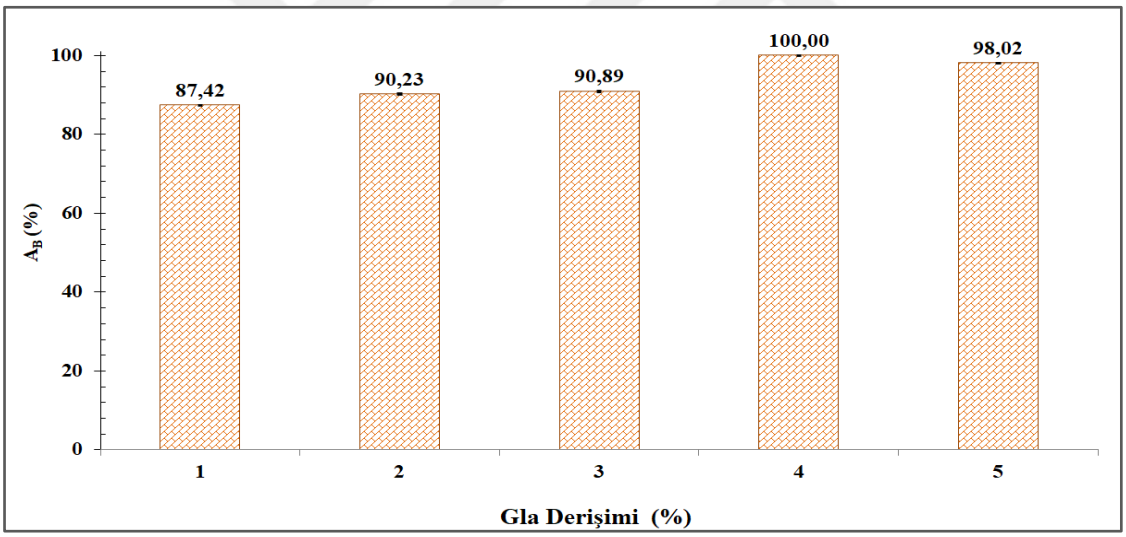
4.2.1. Gla Derişim ve Gla ile Çapraz Bağlama Süresinin Etkisi

Düşük Gla derişiminde destek ile çapraz bağlayıcı arasında bağlar zayıf ve yetersizken, yüksek Gla derişimlerinde enzim denatüre olmaktadır. Bu nedenle Gla derişimi tutuklama için önemli parametreler arasındadır.

CalB'nin biyonanokompozit desteğe tutuklanmasında Gla derişiminin tutuklama verimine ve adsorplanan protein miktarına (APM) etkisi Şekil 4.7.'de görülürken, enzim bağıl aktivitesine etkisi Şekil 4.8.'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Gla derişiminin tutuklama verimi ve APM'a etkisi (0,5 g destek, pH:7, 35ºC, 300 µL CalB, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.8. Gla derişiminin bağıl aktiviteye etkisi (0,5 g destek, pH:7, 35ºC, 300 µL CalB, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi Gla ortam derişimi, % 1'den % 4'e arttıkça tutuklama veriminin %90,34 olarak en yüksek değere ulaştığı, daha sonra artan Gla derişimi ile düştüğü görülmektedir. Benzer şekilde %4 Gla ile ulaşılan APM'nın 10,45 mg/g değeri ile maksimum değerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bağıl aktivite sonuçları incelendiğinde ise % 4 Gla derişimi ile maksimum bağıl aktiviteye (%100) ulaşılmıştır (Şekil 4.8). Çapraz bağlayıcı Gla miktarının %1'den %4'e arttırılmasıyla, destek ve çapraz bağlayıcı ajanı arasındaki bağlar derişime paralel olarak artmış, buna bağlı olarak

tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesinde artış görmüştür. %1-%3 Gla derişimlerinde destek ile çapraz bağlayıcı arasında bağların zayıf ve yetersiz olduğu ve %4 Gla derişiminde optimum seviyede olduğu analiz edilmiştir. %5 Gla kullanımında ise yüksek derişim nedeniyle enzimin denatüre olduğu ve enzim aktivitesinin de düştüğü görülmüştür. Bu nedenle %4 Gla miktarının CalB enziminin biyonanokompozit desteğe tutuklanmasında gerek tutuklama verimi gerekse bağıl aktivite yönünden en uygun derişim olduğu tespit edilmiştir.

Kitosan ve KNT biyonanokompozit desteğe β-Glucosidaz enziminin tutuklandığı bir çalışmada %0,5-%3 Gla derişim kullanılarak 0,05 M, pH 5' lik sodyum sitrat tampon ortamında 2 saat boyunca 37 ºC çapraz bağlama işlemine tabi tutulmuştur. Tutuklama performansı spezifik enzim aktivite sonuçlarına göre analiz edilmiştir. Gla derişiminin % 0,5'den %1,5'a çıkarılmasıyla spesifik enzim aktivitenin 1 U/mg'dan 2,5 U/mg'a yükseldiği ve Gla derişiminin %3'e artırılmasıyla spesifik enzim aktivitesinin tekrar düştüğü gözlemlenmiştir. %1 Gla derişiminin tutuklama için yeterli olduğu analiz edilmiştir (Çelik vd., 2016).

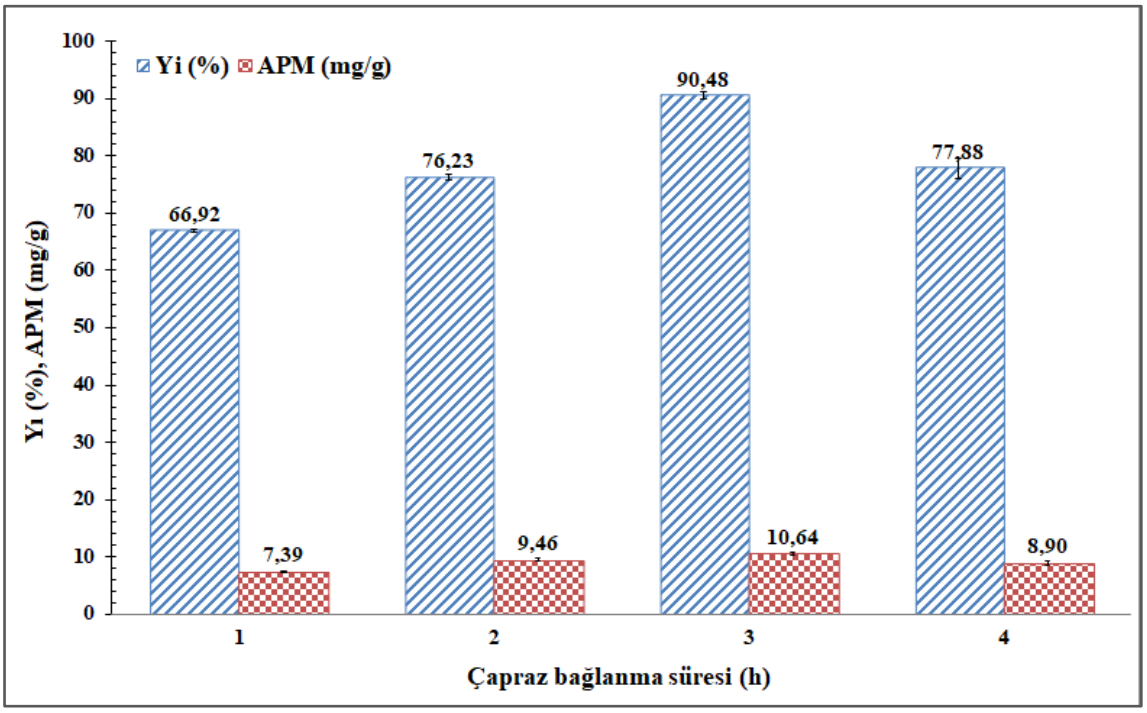
CalB enziminin amino-fonksiyonlu mezogözenekli silica mikroküreciklere tutuklandığı başka bir çalışmada ise; 1; 4 ve 7 mM Gla derişiminin farklı tampon çözeltilerde (pH 4 asetat, pH 6,5 fosfat, pH 9 amonyum tampon) 12 saat boyunca tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş olup; pH 6.5 fosfat tamponu kullanımı ile en uygun Gla derişimi 4 mM Gla olarak belirlenmiş, bu koşullarda %82,4 tutuklama verimine ulaşılmıştır (Saikia vd., 2020).

Candida rugosa lipazı gluteraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan destek malzemesine tutuklanmış, çalışmada farklı Gla derişiminlerinde (%2-10 v/v) 2 saat Gla ile inkube edilen 0,2 g kitosan desteğine, 40 saat oda sıcaklığında tutuklama işlemi yapılmış, YYY kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasında %2 Gla derişimi ile elde edilen tutuklama performansı için ,%41 tutuklama verimi ve 46 IU lipaz aktivitesi değerleri elde edilmiştir (Gonawan vd., 2022).

Çok düşük Gla derişimler enzim ile çapraz bağlayıcı arasında düşük mekanik kuvvete neden olmaktadır (Çelik vd., 2016). Gla miktarı artıkça biyonanokompozit destek yüzeyinde Gla ile çapraz bağlama sonucu artan aldehit grupları (RCOH) ile enzim aktivitesinde artış görülmektedir. Gla derişiminin çok fazla arttırılmasıyla enzim ve

çapraz bağlayıcı etkileşimi enzimin denatüre olma riskini artırmakta, enzim konformasyonunun değişmesi ile enzim aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Cabuk, Burcu, Tari Canan, Harsa, 2014; Rong vd., 2019).

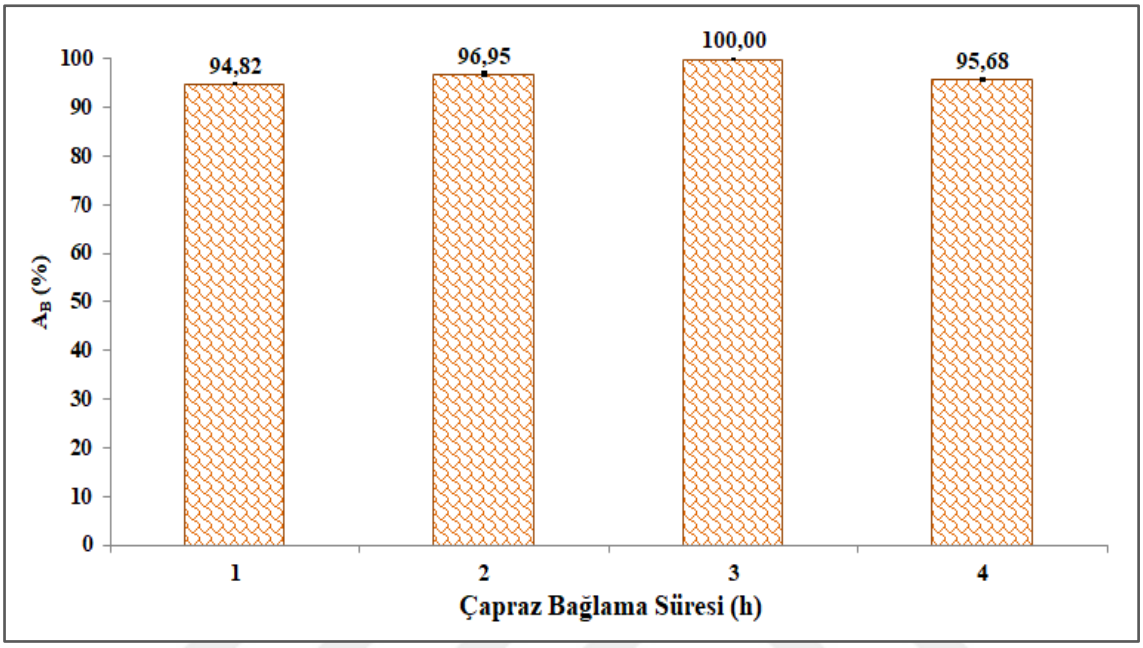
Gla ile çapraz bağlama süresi de tutuklama için önemli parametreler arasındadır. Çapraz bağlama süresinin yeterli olması, çapraz bağlanma prosesinin tamamlanması ve enzimin çapraz bağlanma sırasındaki en yüksek aktiviteyi sağlaması açısından önemlidir. Şekil 4.9.' da Gla ile çapraz bağlanma süresinin tutuklama verimine ve APM'ye etkisi, şekil 4.10.'da ise Gla ile çapraz bağlanma süresinin bağıl aktiviteye etkisi görülmektedir.



Şekil 4.9. Gla ile çapraz bağlanma süresinin tutuklamaya etkisi (0,5 g destek, 6 mL fosfat tampon (pH:7), 35ºC, 300 µL CalB, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

Çapraz bağlanma süresi 1 saatten 3 saate çıkarıldığında tutuklama verimi biraz artmış, daha sonra süredeki artış ile düşme gözlenmiştir (Şekil 4.9). Maksimum tutuklama verimi (% 90,48), maksimum APM (10,64 mg/g) (Şekil 4.9) ve maksimum bağıl aktiviteye (Şekil 4.10) 3 saat çapraz bağlama süresi kullanımında ulaşılmıştır. Çapraz bağlanma süresinin 1 saatten 3 saate arttırılmasıyla tutuklama çapraz bağlanma sürecinin kademeli olarak devam etmesi ile tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Çapraz bağlama süresinin 4 saate çıkarılmasıyla, uzun

çapraz bağlanma süresine bağlı olarak enzimin aktif merkezinin kısıtlanmasına ve böylece tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesinin düşmesine neden olmuştur. Bu sonuçlara göre CalB'nin tutuklanması için Gla ile 3 saat çapraz bağlama süresinin uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Gla ile çapraz bağlanma süresinin bağıl aktiviteye etkisi (0,5 g destek, 6 mL fosfat tampon (pH:7), 35 ºC, 300 µL CalB, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

Kitosan ve Fe_3O_4-KNT biyonanokompozit desteklere peroksidaz enziminin tutuklandığı bir çalışmada, Gla ile çapraz bağlama bekleme süresinin (0,5-4 saat) etkisi incelenmiştir. Sürenin 0,5 saatten 4 saate çıkarılmasıyla, tutuklama veriminin yaklaşık %45'den %70'e çıktığı gözlemlenmiştir. En yüksek bağıl aktiviteye 1 saatte ulaşılması nedeniyle, bu değer Gla ile optimum çapraz bağlanma süresi olarak alınmıştır (Cai vd., 2020).

Çapraz bağlayıcı ile bekleme süresini etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada, kitosan desteğe β-Galaktosidaz enzimi tutuklanmıştır. Gla bekleme süreleri 1-5 saat kullanılarak, % 0,3 Gla derişimi, 1 g kitosan destek, 25 ºC sıcaklık, 10 mL pH 6,5 fosfat tampon çözeltisinde 6 saat süre boyunca tutuklama işlemi gerçekleştirmiştir. Gla bekleme süresinin 1 saatten 3 saate arttırılmasıyla enzim aktivitesi artarken, 3 saat sonrasında enzim aktivitesinde düşüş analiz edilmiştir. Bu nedenle optimum Gla ile bekleme süresi 3 saat olarak belirlenmiştir (Chen vd., 2013).

Bir diğer çalışmada ise, lakkaz enziminin kitosan desteğe Gla çapraz bağlayıcı ile tutuklanmasında %0.1-1 Gla derişimi ve 1-10 saat aralığında Gla ile bekleme süresi kullanılarak, 7 mL enzim içeren ortamda 8 saat süre ile tutuklama işlemi yapılmış, lakkaz bağıl aktivitesi analiz edilmiştir. 4 saat Gla ile bekleme süresi ve %0,7 v/v Gla derişim ile maksimum bağıl aktiviteye (%100 bağıl aktivite) ulaşıldığı ve 7 kez tekrar kullanım sonrası enzim bağıl aktivitesinin %80'e düştüğü görülmüştür (Hao vd., 2021).

Çapraz bağlanma süresinin kısa olması çapraz bağlanmanın yetersiz olmasına neden olmakta, bunun sonucunda da APM ve enzim aktivitesi düşük değerlerde olmaktadır. Çapraz bağlanma süresinin artması ile çapraz bağlanma kademeli olarak tamamlanmış olup, enzim aktivitesi artmaktadır (Chen vd., 2013).

Çapraz bağlanma süresi çok uzun olduğunda ise enzimin aktif merkezinin kısıtlanmasına ve enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır (Y. Cai vd., 2020).

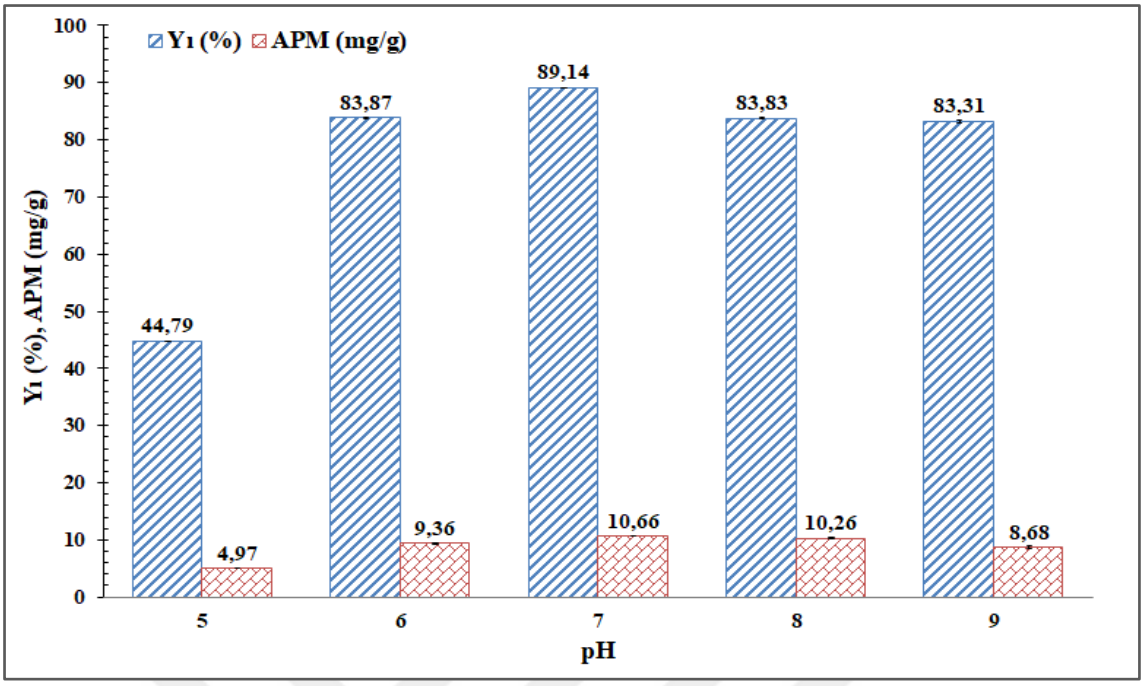
Çalışmamızda, CalB enziminin tutuklanması için en uygun Gla derişimi %4, Gla ile bekleme süresi ise 3 saat olarak belirlenmiştir. Bu değerler Novozyme 51032 enziminin biyonanokompozit desteğe tutuklanmasında aynen kullanılmıştır.

4.2.2. pH Etkisi

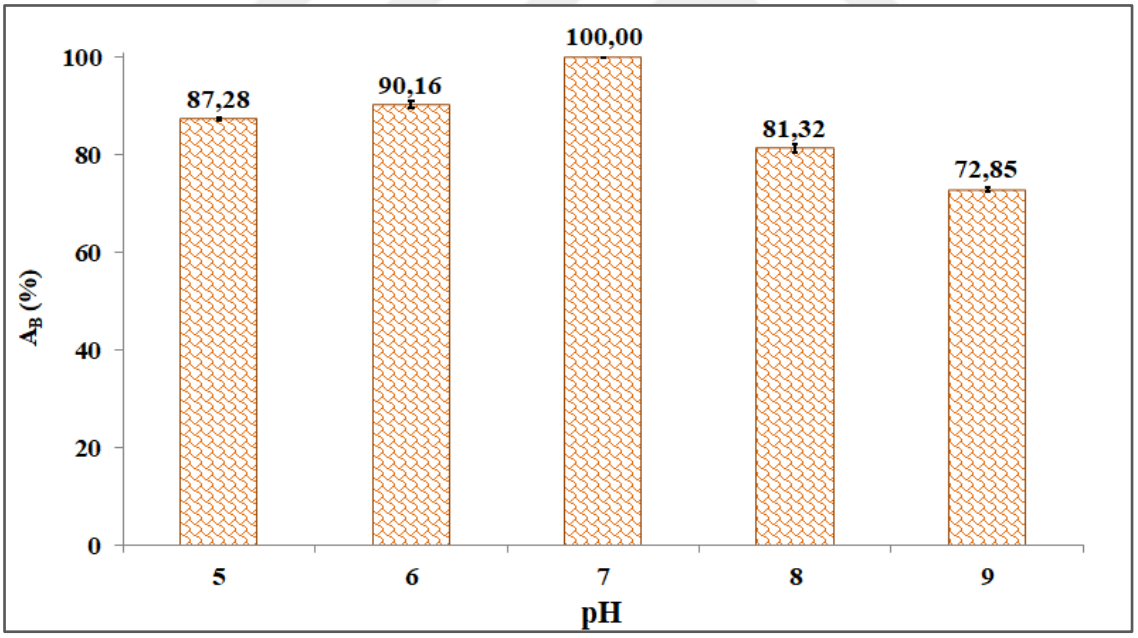
Tutuklama verimine etki eden bir diğer parametre tutuklama prosesinde kullanılan tampon çözeltinin pH'ıdır. Bazı enzimlern aktif bölgelerinde iyonik gruplar mevcuttur ve bu iyonik grupların çalışabilmesi için uygun ortam şartlarına (asit ya da baz) sahip olması gerekmektedir.

Ortam pH değişiklikleri, enzim aktif bölgenin iyonik formunda ve böylece enzimin aktivitesinde doğrudan değişiklere neden olmaktadır (Shuler and Kargı, 1992). Bu nedenle ortam pH'ının doğru şekilde seçilmesi son derece önemlidir.

Biyonanokompozit desteğe enzim tutuklanmasında pH'ın tutuklama verimi, APM ve bağıl aktiviteye etkisi CalB enzimi kullanımında sırasıyla, şekil 4.11 ve şekil 4.12'de Novozyme 51032 kullanımında ise sırasıyla, şekil 4.13 ve şekil 4.14'de görülmektedir.



Şekil 4.11. pH'ın tutuklama verimi ve APM' ye etkisi (CalB) (0,5 g destek, 35 ºC, 24 h, 300 µL enzim,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

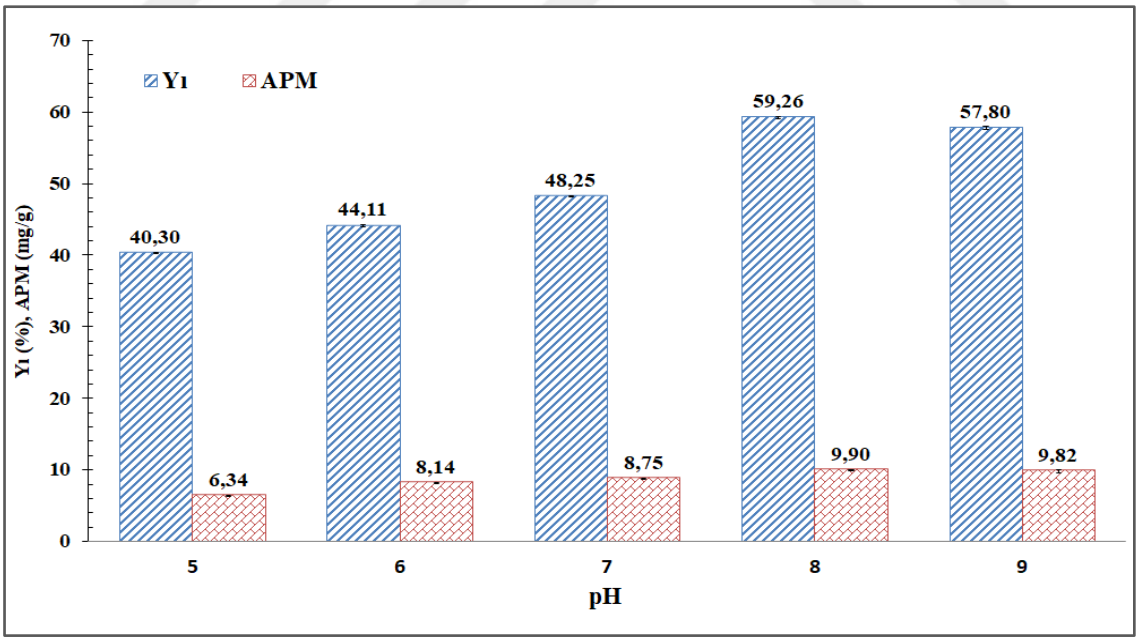


Şekil 4.12. pH'ın bağıl aktiviteye etkisi (CalB) (0,5 g destek, 35 ºC, 24 h, 300 µL enzim,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

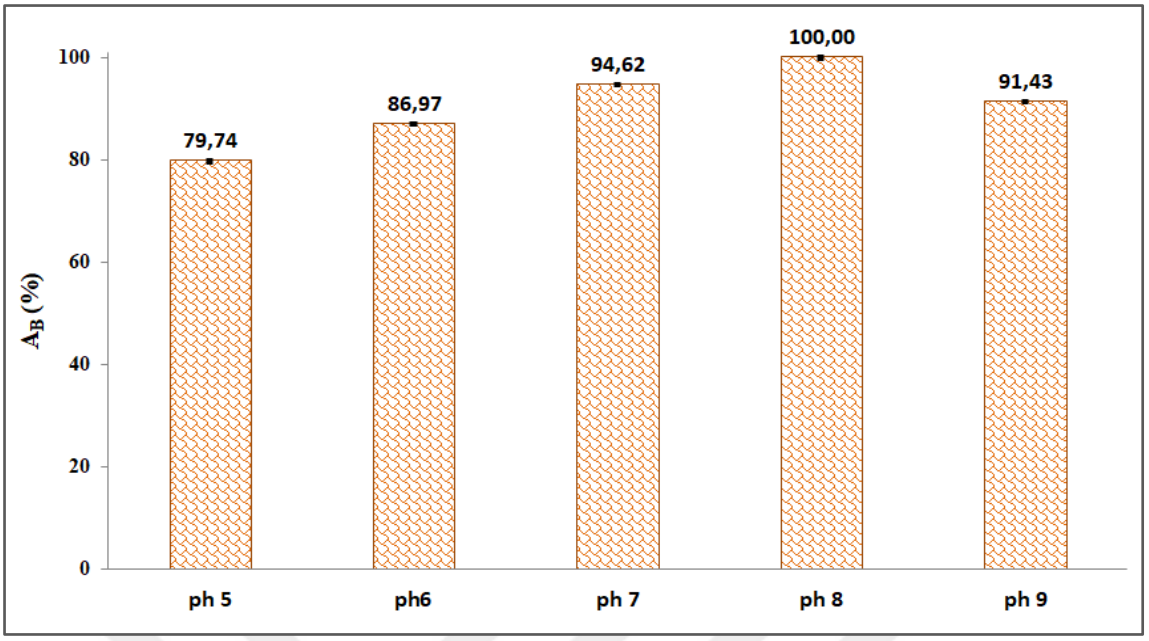
CalB tutuklanmasında, artan pH ile tutuklama verimi ve APM'nin önce arttığı pH 7'de maksimum vererek % 89,14 verim ve 10,66 mg APM /g değerlerine ulaşıldığı, sonrasında pH'ın 9'a çıkarılmasıyla her iki değerin düştüğü görülmüştür (şekil 4.11.). pH'ın bağıl aktiviteye etkisi de benzer şekilde olmuştur (şekil 4.12.). CalB tutuklanması

için pH 7 değerinin uygun olduğu belirlenlenmiştir. Serbest CalB enzimi pH 6-10 aralığında aktif halde bulunmaktadır. pH 5 ve altında CalB enzimi positif yüklü iken, pH 8 üstünde negatif yüklü halde bulunmaktadır (Trodler vd., 2008). CalB enziminin izoelektrik noktası pH 6.8'dir (Bukhari vd., 2014). Bu nedenle CalB enzimininde isoelektrik noktaya yakın pH değerinde (pH 7) tutuklama verimi ve enzim aktivitesi için en yüksek değerler elde edilmiştir. pH 8 ve üzerinde ise enzimin negatif yüklenmesi ve buna bağlı olarak konformasyon değişimi nedeniyle, tutuklama verimi ve enzim aktivitesinde düşme görülmüştür.

Novozyme 51032 tutuklanmasında CalB'ye benzer olarak artan pH ile tutuklama verimi, APM ve bağıl aktivite değerleri önce artmış, pH 8'de en yüksek değerlere (% 59 verim, 9,90 mg/g APM) ulaşmış (şekil 4.12. ve şekil 4.13.) artan pH değeri ile bu değerlerin düştüğü gözlemlenmiştir. Tutuklama için pH 8 fosfat tampon kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Novozyme firmasından tedarik edilen bu enzimin optimum çalışma aralığı pH 7-10 olup, rekombinant (Aspergillus orzyae lipazının humicola insolens cutinası enziminin ekspresyonu ile üretimi gerçekleşmektedir) bir enzim olduğundan bu türe ait bir izoelektrik noktası literatürde rastlanılmamıştır.



Şekil 4.13. pH'ın tutuklama verimi ve APM'ye etkisi (Novozyme 51032) (0,5 g destek, 35 ºC, 24 h, 300 µL enzim, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.14. pH'ın bağıl aktiviteye etkisi (Novozyme 51032) (0,5 g destek, 35 ºC, 24 h, 300 µL enzim, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

CalB enziminin Fe_3O_4@SiO_2–epoxy nanokompozite tutuklamasında pH (5-9) etkisinin incelendiği bir çalışmada, 50 µL enzim, 2 mL tampon (10 mM) çözeltisi kullanılarak, 25ºC sıcaklıkta 24 h tutuklama süresi ile maksimum bağıl aktivite pH 7,5 değerinde tespit edilmiştir (Mohammadi vd., 2016).

Amino grubu ile aktifleştirilmiş mezogözenekli silika malzemesine CalB enziminin Gla çapraz bağlayıcı kullanılarak tutuklanmasına pH etkisinin analiz edildiği bir diğer çalışmada; 0,1 M derişimde tampon için pH 6-9 aralığı kullanılmış , 45 ºC sıcaklık, 5 h tutuklama süresi sonunda bağıl aktivite analiz edilmiş ve pH 7 değerinin tutuklama için uygun olduğu belirlenmiştir (Yu vd., 2021).

Aspergillus oryzae lipazının polyakrilonitril (PAN) nanofiber elektrolif membrana Gla çapraz bağlayıcı ile tutuklanmasında 50 mM tris-HCl tamponu pH 4-9 aralığında kullanılarak enzim aktivitesine pH etkisi incelenmiştir. pH 7'de bağıl aktivitenin maksimum olduğu tespit edilmiştir (Paitaid ve H-Kittikun, 2021).

Aspergillus niger lipazının celite fiziksel adsorpsiyonla tutuklanmasına pH etkisini inclendiği bir diğer çalışmada, pH 3-10 aralığında 5 mL tampon çözelti kullanılarak, 0,1 g lipaz, 20 dk tutuklama işlemine tabi tutulmuş olup, pH 6 da, 30-40 ºC sıcaklık

aralığında maksimum (yaklaşık %95) bağıl aktivite analiz edilmiştir (Da Silva vd., 2008).

4.2.3. Sıcaklık Etkisi

Tutuklama ortam sıcaklığı tutuklamaya etki eden bir diğer önemli parametredir. Düşük sıcaklıklar kütle aktarım hızını olumsuz yönde etkileyerek aktivitenin düşmesine neden olmaktadır. Artan sıcaklıkla enzim aktivitesi artmaktadır. Çok yüksek sıcaklıklarda ise, enzim yapısı denatüre olmaktadır (Wang vd., 2018).

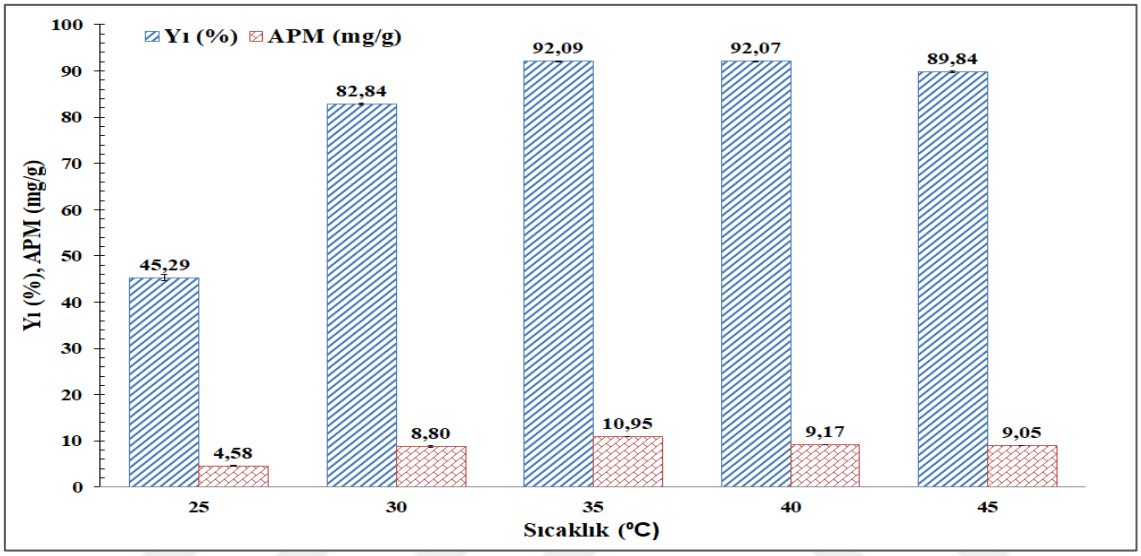
Enzim tutuklanmasında sıcaklığın tutuklama verimi, APM ve bağıl aktiviteye etkisi CalB enzimi kullanımında sırasıyla, şekil 4.15. ve şekil 4.16.'da, Novozyme 51032 kullanımında ise sırasıyla, şekil 4.17. ve şekil 4.18.'de verilmiştir. CalB kullanımında, Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi sıcaklığın artmasıyla tutuklama verimi ve APM'nin önce arttığı, 35 ºC'de % 92 verim ve 10,95 mg APM /g ile en yüksek değerlere ulaştığı ve sonra artan sıcaklıkla bu değerlerde bir miktar düştüğü görülmüştür. Benzer şekilde bağıl aktivite 35 ºC'de en yüksek değere ulaşmış, sıcaklığın 45 ºC'ye artırılmasıyla CalB enzim yapısında bozulmaya bağlı olarak tutuklama verimi ve APM'ın azaldığı ve bağıl enzim aktivitesinin % 83'e düşmesine neden olmuştur. 35 º C altındaki düşük sıcaklıklarda ise kütle aktarım hızının yetersiz olması nedeniyle düşük enzim aktivitesine ve böylece düşük tutuklama verimi ve APM'ye neden olduğu öngörülmektedir. Bu sonuçlara göre biyonanokompozit desteğe CalB enziminin tutuklanması için en uygun sıcaklık 35 ºC olarak belirlenmiştir.

Novozyme 51032 kullanımında, CalB'ye benzer olarak sıcaklığın artmasıyla tutuklama verimi, APM ve bağıl enzim aktivitesinin önce arttığı, en yüksek APM değeri (10,63 mg/g), en yüksek verim değeri (%64) ve bağıl aktivite değerleri ise 40 ºC'de elde edilmiştir (şekil 4.16 ve şekil 4.17), daha yüksek sıcaklıkta bu değerlerin düştüğü gözlemlenmiştir. CalB enziminde olduğu gibi yüksek sıcaklıklarda (40 ºC sıcaklık üstünde) enzim denatüre olması nedeniyle enzim aktivitesi, tutuklama verimi ve APM'da düşme trendi gözlemlenmiştir. Novozyme 51032 enziminin biyonanokompozit desteğe tutuklanması için 40 ºC sıcaklığın uygun olduğu tespit edilmiştir.

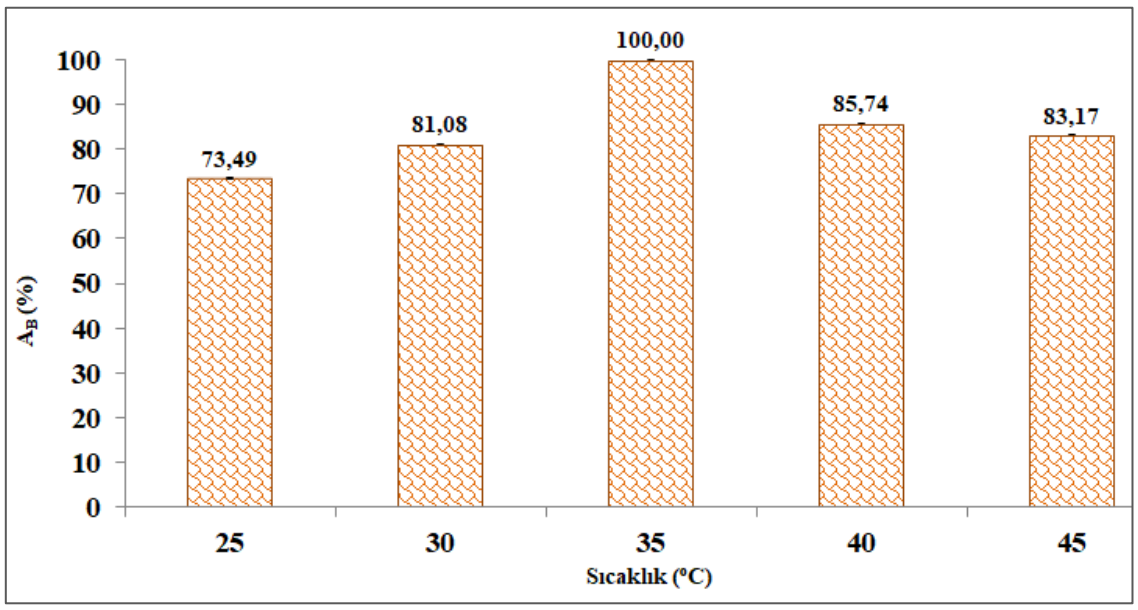
CalB enziminin ÇKDNT temelli bir desteğe tutuklandığı bir çalışmada 20-60 ºC sıcaklık ve 3 saat tutuklama süresinde bağıl aktivite tayini ile tutuklama performansı

analiz edilmiş, maksimum bağıl aktivitenin 35 ºC tutuklama sıcaklığında olduğu belirlenmiştir (Wang vd., 2018).

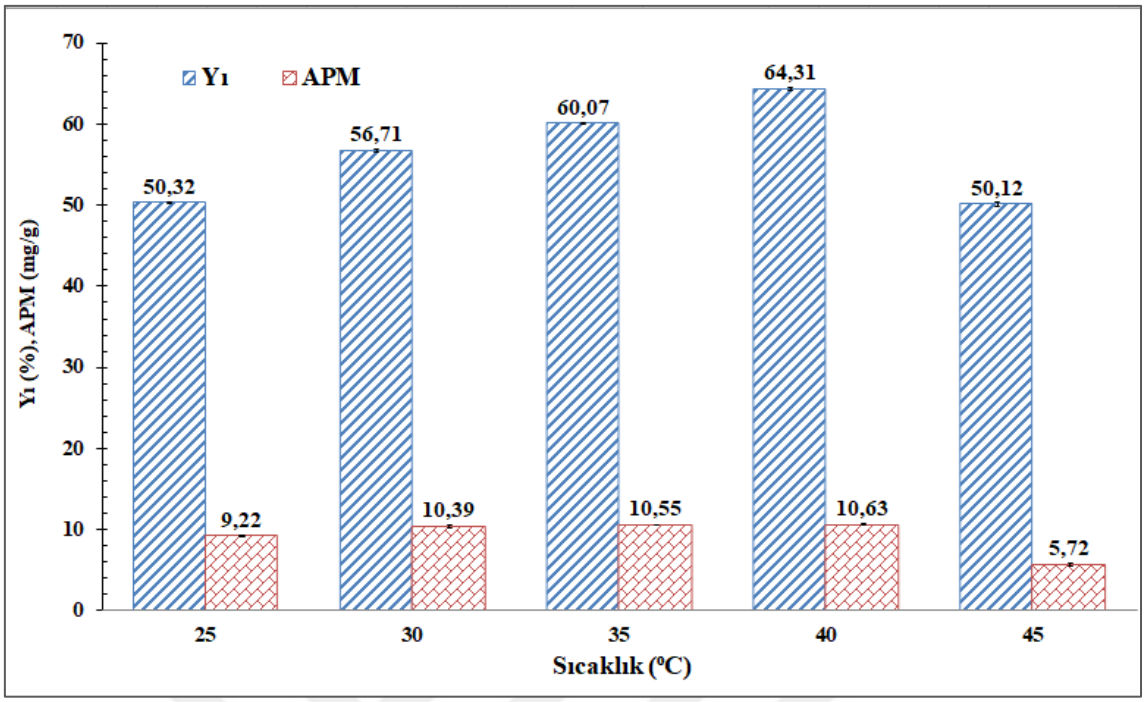
CalB enziminin doğal ÇDKNTe ve polidimetilsiloksan polimerinden oluşan polimer nanokompozit desteğe tutuklanmasında sıcaklık etkisinin incelenmiş, 10-80 ºC sıcaklık aralığı kullanılarak pH 7 fosfat tamponu oratamında 24 saat tutuklama süresi sonunda, maksimum bağıl aktiviteye 30 ºC'de ulaşılmıştır (Sulym vd., 2021).



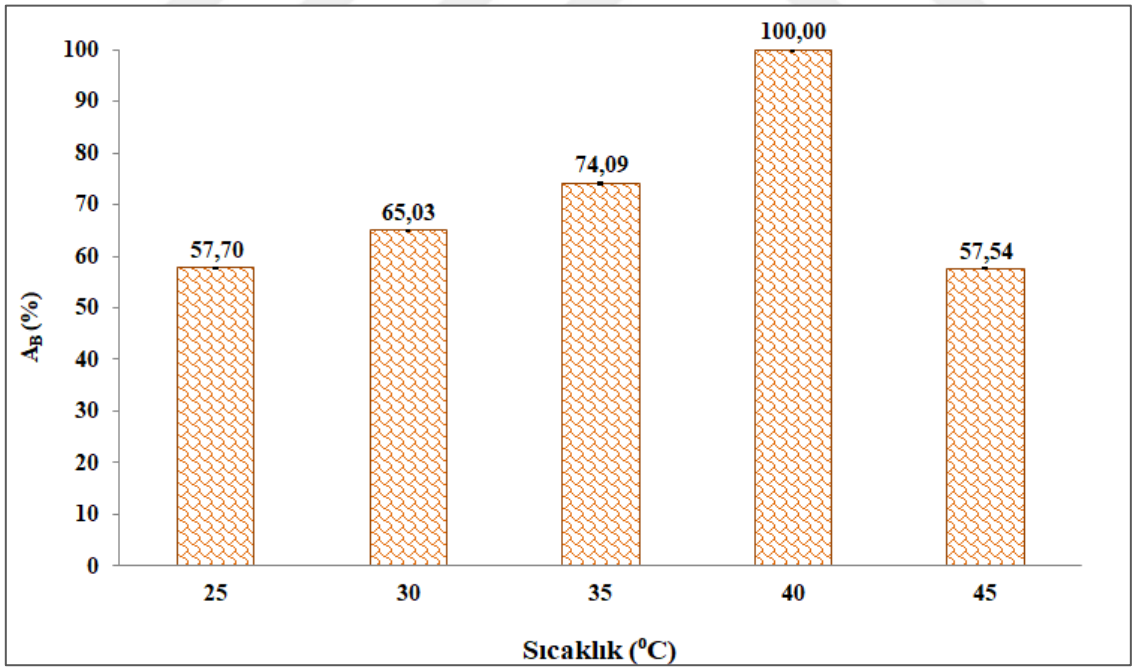
Şekil 4.15. Sıcaklığın tutuklama verimi ve APM'e etkisi (CalB) (0,5 g destek, 24 h, 300 µL enzim, pH7, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.16. Sıcaklığın bağıl aktiviteye etkisi (CalB) (0,5 g destek, 24 h, 300 µL enzim, pH7, ,%4 Gla, 3h bekleme süresi, %.0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.17. Sıcaklığın tutuklama verimi ve APM'e etkisi (Novozyme 51032) (0,5 g destek, 24 h, 300 µL enzim, pH 8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.18. Sıcaklığın bağıl aktiviteye etkisi (Novozyme 51032) (0,5 g destek, 24 h, 300 µL enzim, pH8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

CalB enziminin Fe_3O_4 manyetik parçacıklarına tutuklandığı başka bir çalışmada; 30-60 ºC sıcaklık aralığı kullanılarak sıcaklık etkisi araştırılmış; 0,1 M fosfat tampon (pH 7,4) varlığında, sıcaklığın 30 ºC'den 60 ºC'ye arttırılmasıyla enzim aktivitesinin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Maksimum bağıl aktivite 30 ºC'de ölçülmüştür (Samui vd., 2016).

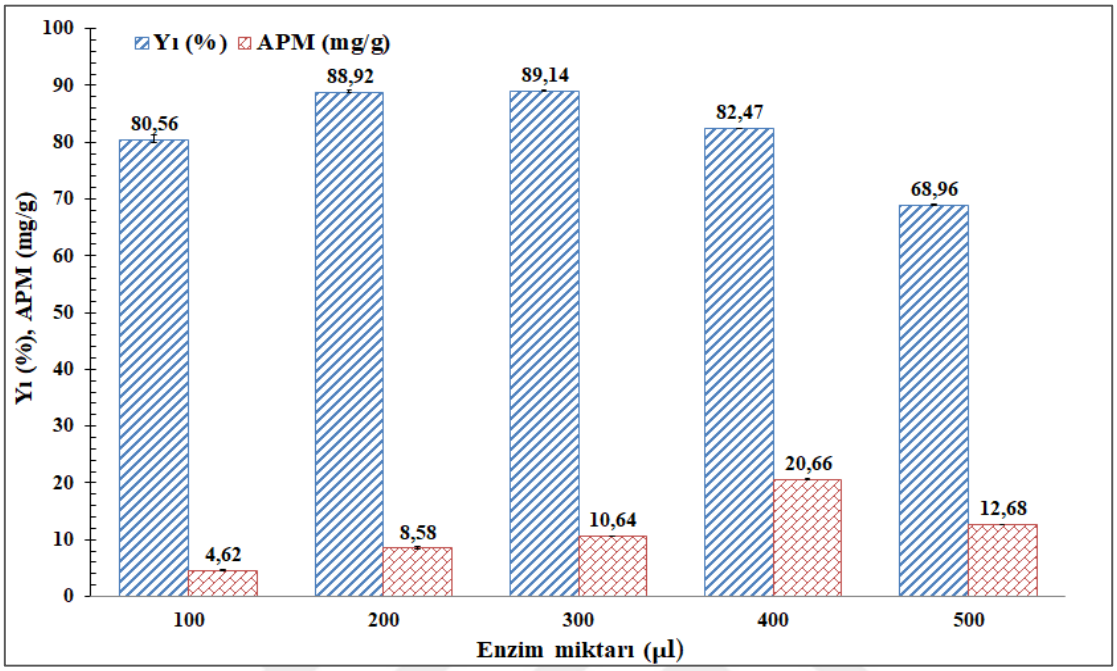
$FeSO_4.7H_2O$ temelli manyetik mikro parçacık ve kitosandan oluşan destek üzerine *Aspergillus niger* lipazını tutuklanmasına sıcaklık etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 30-70 ºC sıcaklık aralığı kullanılarak 10 saat süre ile tutuklama yapılmış; 40 ºC'de maksimum enzim aktivitesi (0,14 Unit) tespit edilmiştir (Hombalimath vd., 2020). *Aspergillus niger* lipazının polianilin-gümüş kaplamalı grafen oksitli nanokomposit desteğe tutuklanmasına sıcaklık etkisini inceleyen bir diğer çalışmada ise, 25-55 ºC sıcaklık aralığı kullanılmış, 0,05 M pH 7 fosfat tampon çözeltisi ile tutuklama işlemi yapılmıştır. Maksimum bağıl aktivite için 45 ºC sıcaklığın uygun olduğu tespit edilmiştir (Asmat vd., 2017).

4.2.4. Enzim Miktarının Etkisi

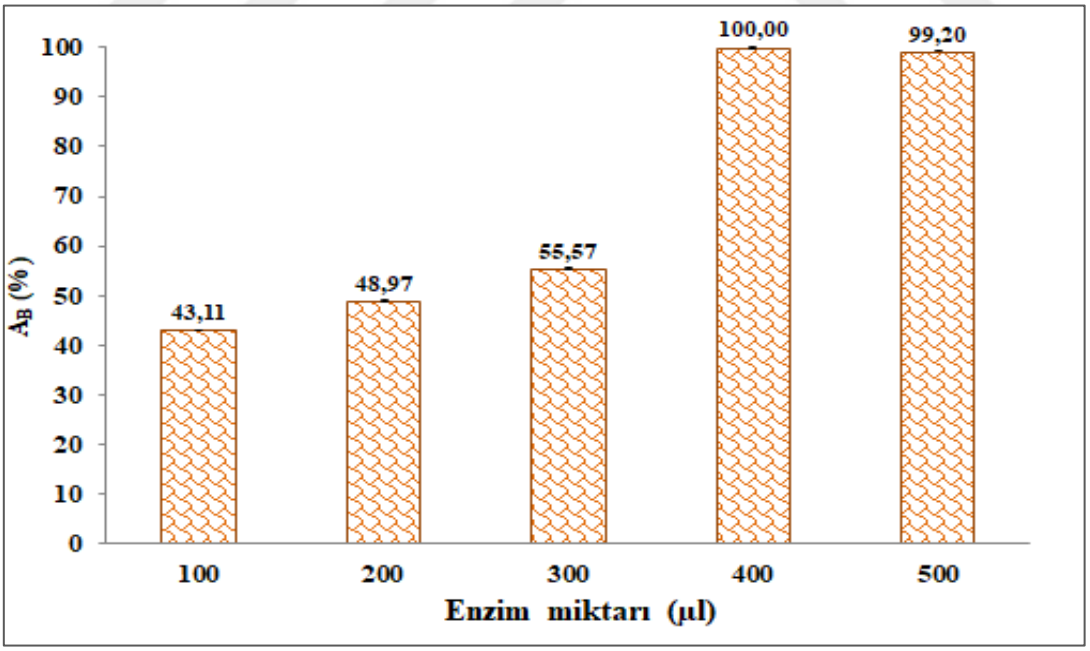
Tutuklamaya etki eden bir diğer parametre enzim miktarıdır. Enzim miktarının tutuklama verimi, APM ve bağıl aktiviteye etkisi CalB için sırasıyla şekil 4.19. ve şekil 4.20.'de, Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.21. ve şekil 4.22.'de verilmiştir. CalB kullanımında enzim miktarının artmasıyla, verim, APM ve aktivite değerleri önce artmakta, 300 µl enzim (%5 v/v enzim hacmi/tampon çözelti hacmi) ile en yüksek tutuklama verimi (%89) elde edilirken, en yüksek APM (20,66 mg/g) ve bağıl aktivite değerlerine 400 µl enzim (%6,7 v/v) enzim kullanımında ulaşılmış (şekil 4.19. ve 4.20.), daha yüksek enzim miktarı tüm bu değerlede düşmeye neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, 400 µl enzim kullanımı bu enzimin tutuklanması için uygun miktar olarak değerlendirilebilir.

Novozyme 51032 kullanımında ise, CalB'nin aksine artan enzim miktarı ile tutuklama verimi düşmüş, 100 µL enzim (%1,7 v/v) varlığında en yüksek tutuklama verimine (%87) ulaşılmıştır. Artan enzim miktarı ile APM ve bağıl enzim aktivitesi ise artarak 300 µL (%5,1 v/v) enzim kullanımında en yüksek değere (10,13 mg APM/g) ulaşılmış (şekil 4.21 ve 4.22); bu değerin üzerindeki enzim miktarlarında ise bu değerde düşme

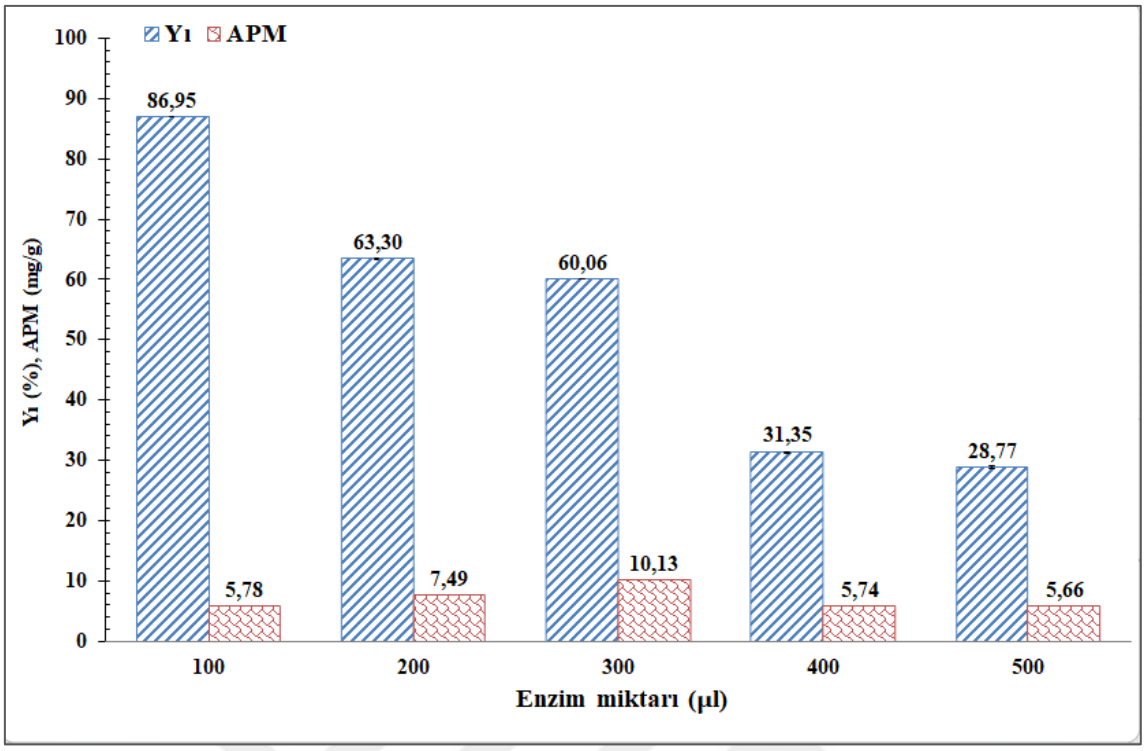
gözlenmiştir. APM ve bağıl enzim aktivitesi değerlerine göre 300 µL enzim kullanımının Novozyme 51032 için uygun olduğu belirlenmiştir.



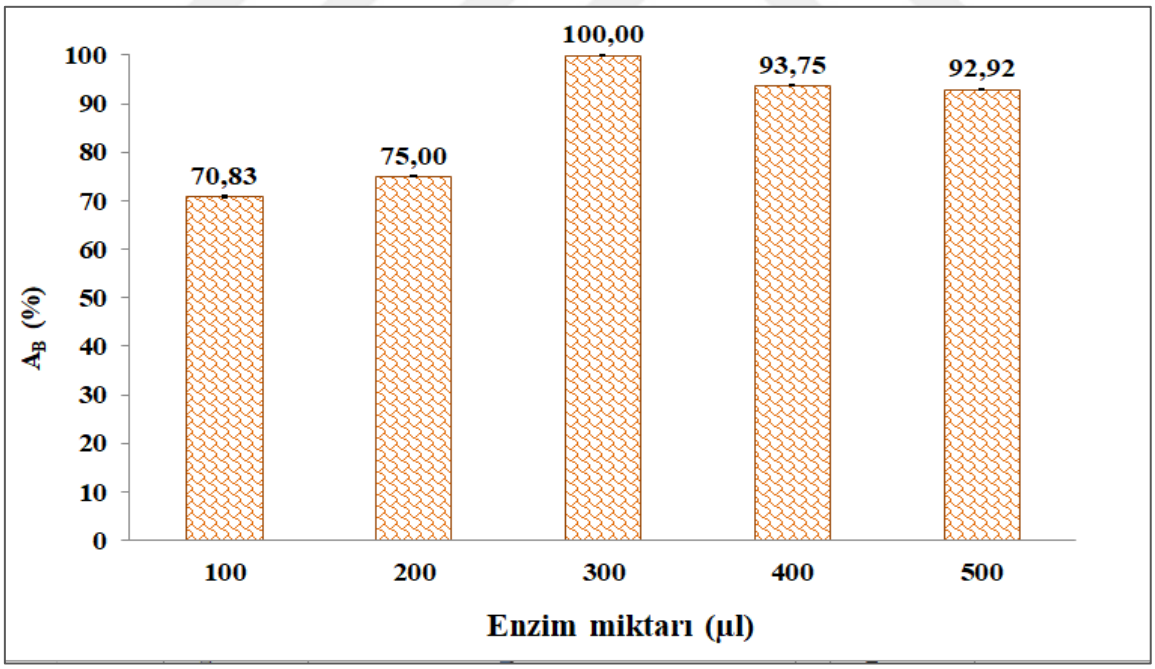
Şekil 4.19. Enzim miktarının tutuklama verimi ve APM'e etkisi (CalB) (0,5 g destek, 35º C, 24 h, pH 7, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.20. Enzim miktarının bağıl aktiviteye etkisi (CalB) (0,5 g destek, 35º C, 24 h, pH 7, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.21. Enzim miktarının tutuklama verimi ve APM'e etkisi (Novozyme 51032) (35 ºC, 0,5 g destek, 24 h, pH 8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.22. Enzim miktarının aktiviteye etkisi (Novozyme 51032) (35 ºC, 0,5 g destek, 24 h, pH 8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

Enzim miktarı arttıkça destek başına düşen protein miktarının artmasına eşdeğer olarak tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesinin CalB enziminde 300µL ve Novozyme 51032 enzimi ile 400 µL enzim miktarına kadar arttığı gözlemlenmiştir. Enzim miktarının çok fazla arttırılması ile enzim moleküllerinin destek yüzeyi üzerinde yığılmasına (agglomerasyon) kütle aktarımının azalmasına ve enzim konformasyonunun kısıtlanmasına bağlı olarak (Guo vd., 2018), enzim aktivitesi tutuklama verimi ve APM'de azalmaya neden olmuştur.

Karboksil grupları ile aktifleştirilmiş ÇDKNT'e CalB tutuklanmasına enzim derişiminin etkisinin incelendiği bir çalışmada, 2-8 mg/mL enzim derişim aralığı, 2-3 mg/mL aralığında ÇDKNT derişimi ve 0,05 M pH 7 fosfat tampon kullanılarak tutuklama yapılmıştır. Enzim derişiminin 2 mg/mL'den 7 mg/mL'ye arttırılmasıyla enzim aktivitesinin arttığı ve tutuklama veriminin ise buna ters orantılı şekilde %87'den % 66'a düştüğü görülmüştür (Khan vd., 2019).

Kitosan-HAP kompozit desteğe β-Glucosidase enziminin tutuklamasında pH 7,5 fosfat tamponu kullanılarak, 20 ºC sıcaklık, 150 rpm karıştırma hızında, 24 saat süre deneyler yapılarak destek başına 0,23-2,57 g/g enzim derişiminin tutuklama verimi ve enzim aktiviteye etkisini incelemişlerdir. Enzim miktarı artıkça, spesifik aktivitenin ve tutuklama veriminin düştüğünü gözlemlenmiştir (Cabuk vd., 2014).

CalB lipazının hem perlit hemde hidrotalsite tutuklanmasında enzim miktarının etkisinin araştırıldığı çalışmada; 100-700 µL aralığında enzim miktarı kullanılmış, 0,2 g destek, 45 ºC sıcaklık, 6 mL pH 8 tris-HCl tampon ve 24 saat boyunca yapılan tutuklama sonunda 100 µL enzim miktarında maksimum tutuklama verimi (perlit destek için %75; hidrotalsit destek için %79) elde edilmiştir (Aydın, 2014).

Polistiren bazlı ticari bir reçineye *Aspergillus oryzae* lipazının tutuklanmasına enzim miktarının etkisini araştıran bir diğer çalışmada, 10-60 mg/mL aralığında enzim kullanılarak 0,1 M pH 9 glisin-NaOH tampon ortamında, 30 ºC sıcaklık, 200 rpm koşullarında 1,5 saat süre ile tutuklama işlemi yapılmış; maksimum tutuklama verimi %98,4 ve bu koşullardaki lipaz aktivitesi 147,62 U/g olarak belirlenmiş; enzim miktarı arttıkça tutuklama veriminin düştüğü ve APM'nin arttığını gözlemlenmiş olup, optimum enzim derişiminin 30 mg/mL olduğu analiz edilmiştir (Cai vd., 2015).

4.2.5. ÇDKNT Etkisi

Tutuklamayı etkileyen bir diğer parametre ÇDKNT olup, literatür de yapılan çalışmalara göre destek malzemeye ÇDKNT eklenmesi, biyonanokompozit destek yüzeyinde karbonnanotüp kaynaklı geniş yüzey alanı sağlayarak enzim aktivitesini iyileştirmektedir (Lee vd., 2010).

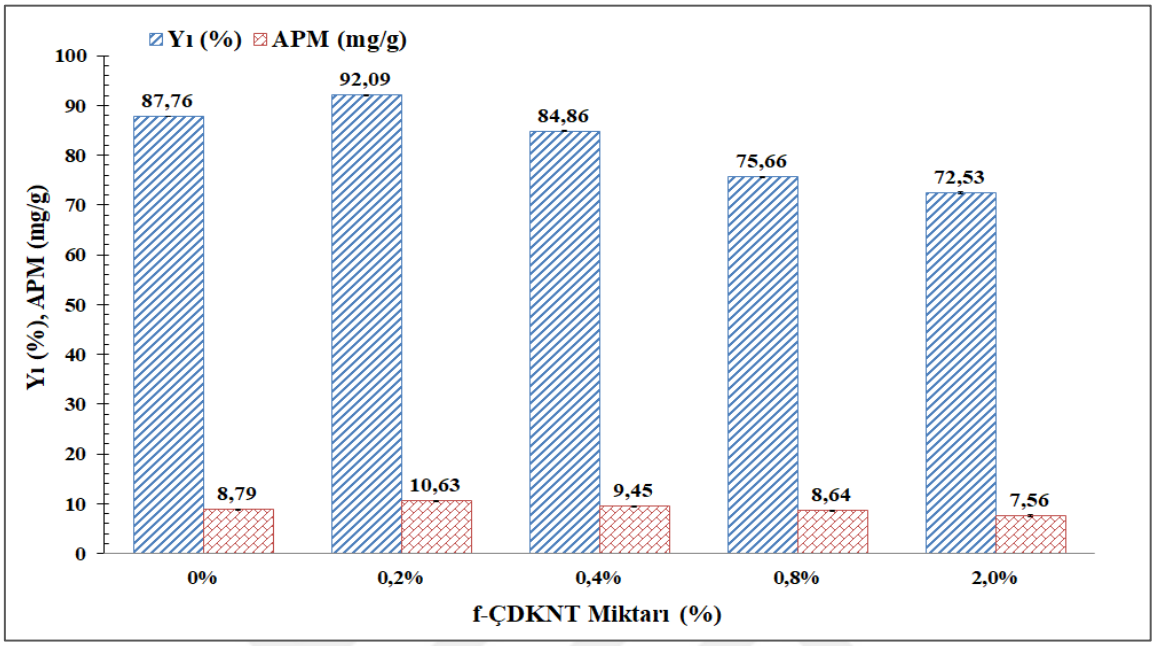
ÇDKNT miktarının tutuklama verimi ve APM'ye etkisi şekil 4.23.'de ve bağıl aktiviteye etkisi ise şekil 4.24.'de görülmektedir. ÇDKNT miktarının artmasıyla tutuklama verimi, APM ve bağıl enzim aktivite değerleri artarak ortamda 0.2 g destek kullanımı ile en yüksek değerlere (% 92 verim, 10,63 mg APM /g) ulaşılmış (şekil 4.23), daha yüksek miktarlarda destek kullanımında ise tüm bu değerlerde düşme gözlenmiştir. Bu nedenle CalB enzimi tutuklamasında sonraki deneylerde 0.2 g ÇDKNT miktarı ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Destek malzemesine katkı olarak karbonanotüp kullanımı, geniş yüzey alanına imkan tanımasının yanısıra, lipazın tutuklama sırasındaki stabilitesini artırma ve destek malzemesini mekanik yönden güçlendirme özelliklerine sahiptir (Lee vd., 2010). Bu nedenle destekte f-ÇDKNT'nin kullanılmadığı duruma kıyasla %0,2 oranda kullanımı ile tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesinde artışa neden olmuş, bu miktarın %0,4 ve üzerine çıkarılması durumunda ise, bu değerlerin azaldığı analiz edilmiştir. f-ÇDKNT miktarı arttıkça, f-ÇDKNT gözenek bölgesindeki lipaz moleküllerinin kısıtlanması ve enzim moleküllerinin gerilmesi ve hareketsizleşmesi nedeniyle enzim aktivitesinde ve tutuklama veriminde düşmeye neden olmaktadır.

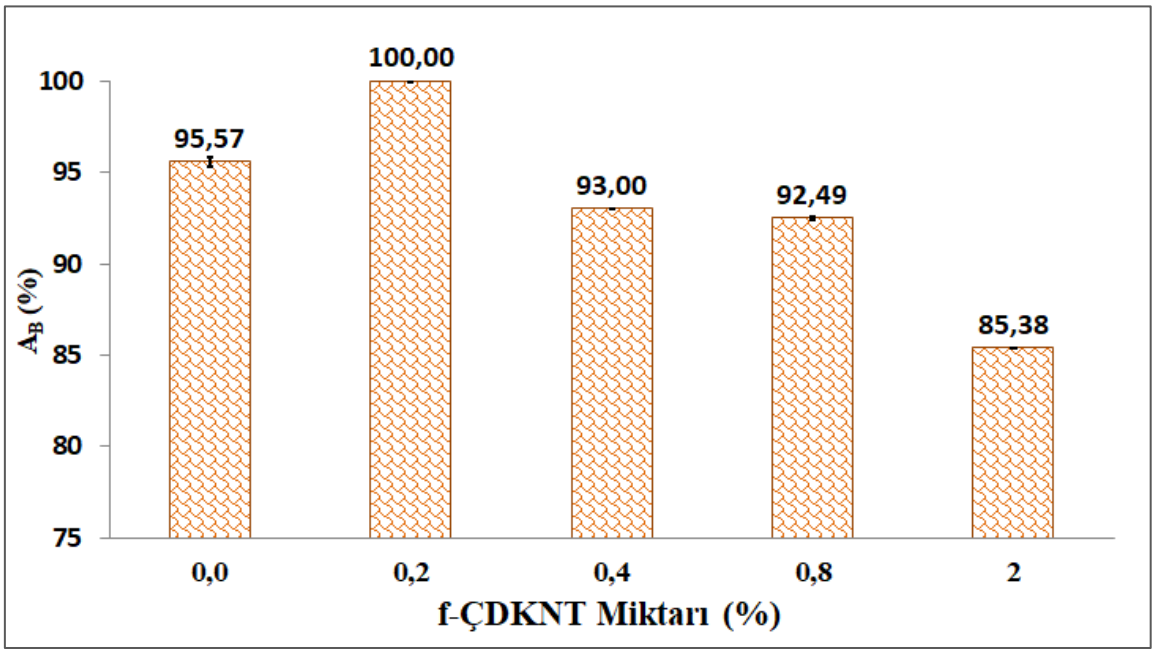
Novozyme 51032 enzimi için bu incleme yapılmamış olup bu enzimin tutuklanması için sonraki deneylerde %0.2 ÇDKNT miktarı aynen kullanılmıştır.

Araştırma grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, kitosan ve ÇDKNT bazlı biyonanokompozit desteğe *Thermomyces lanuginosus* lipazı tutuklanmış, ÇDKNT miktarının tutuklama verimi, APM ve enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. ÇDKNT miktarı %0 -%1 aralığında alınarak, 0,1 M tris-HCl tampon, 35 ºC sıcaklık, 24 saat tutuklama süresi ve 100 µL enzim miktarı ile yapılan tutuklama işlemi sonunda, en uygun ÇDKNT miktarının %0,2 olduğu ve bu derişimde elde edilen tutuklama verimi (%92), APM (13,84 mg/g) ve enzim aktivitesi 44,9 U/mg olarak analiz edilmiştir.

ÇDKNT miktarının %1'e arttırılmasıyla bu değerlerde düşme gözlemlenmiştir (Ögretmen, 2021).



Şekil 4.23. f-ÇDKNT miktarının tutuklama verim ve APM'a etkisi (CalB) (35 ºC, 0,5 g destek, 300 µL enzim, 24 h, pH 7, %4 Gla, 3h bekleme süresi)



Şekil 4.24. ÇDKNT miktarının bağıl aktiviteye etkisi (35ºC, 0,5 g destek, 300 µl enzim, 24h, ph7, %4 Gla, 3h bekleme süresi)

KNT-silika nanokompozite CalB tutuklanmasında KNT miktarının tutuklamaya etkisini incelendiği bir diğer çalışmada, %0-%3 aralığında KNT miktarı kullanılarak 25 ºC sıcaklık, 5 mg destek, 10 mL fosfat tamponda ortamında deneyler yapılmış; % 0,33 KNT kullanımı ile KNT eklenmemiş nanokompozite oranla enzim aktivitesinin iki kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Lee vd., 2010).

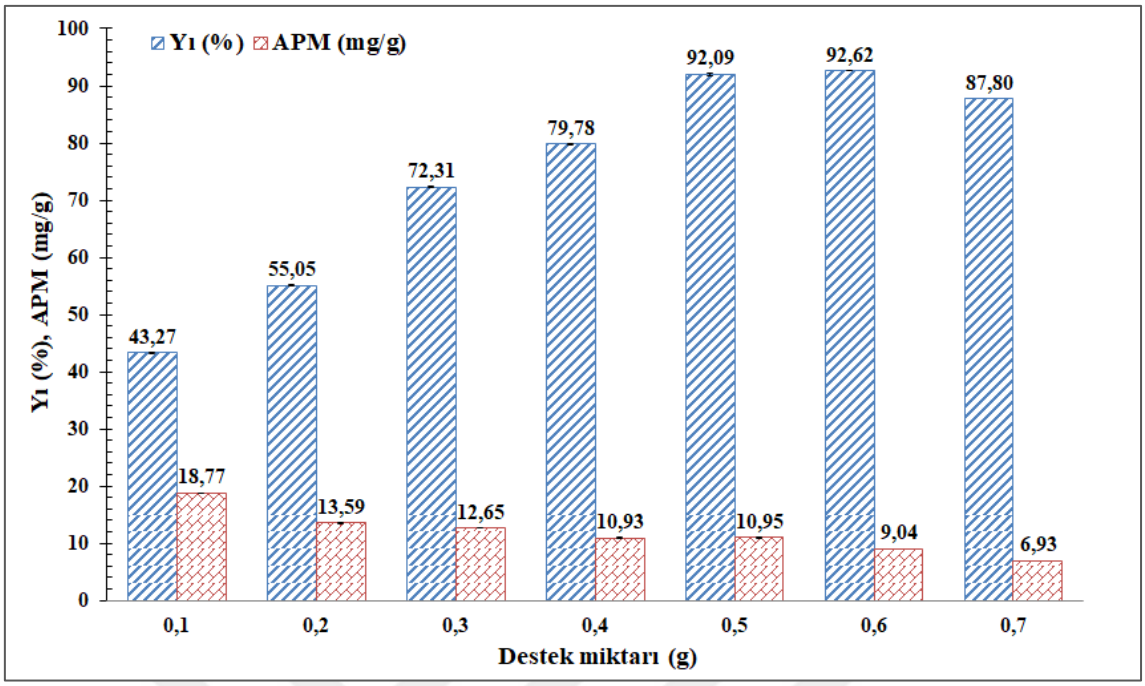
4.2.6. Destek Miktarı Etkisi

Tutuklamaya etki eden parametrelerden bir diğeri de destek miktarıdır. Şekil 4.25.'de CalB tutuklanmasında destek miktarının tutuklama verimi ve APM'ye etkisi görülmektedir. Şekil 4.25.' de destek miktarının artmasıyla tutuklama veriminin öncelikle arttığı 0,5 g destek miktarında %92,09 ile maksimum değere ulaştığı ve desteğin artan değerlerinde bu değerin biraz düştüğü görülmüştür. 0,1 g destek miktarı ile APM en yüksek değerde (18,77 mg/g) olup artan destek miktarları ile bu değerde düşme görülmüştür. En düşük destek miktarında, desteğin lipaz ile maksimum yükleme kapasitesine ulaşması nedeniyle en yüksek APM'ye ulaşılmıştır.

Destek miktarının 0,7 g'a arttırılmasıyla APM miktarı düşerken, tutuklama veriminin 0,6 g destek miktarına kadar destek yüzeyinde çapraz bağlayıcı miktarının artan desteğe oranla daha fazla olması ve enzimin çapraz bağlayıcı tarafından sunulan bağlantı noktalarını doyurduğu görülmüştür. Destek miktarının 0,7 g'a arttırılmasıyla destek yüzeyindeki artan çapraz bağlayıcı bağlantı noktalarının maksimum doyuma ulaştığı ve ortamdaki sabit enzim miktarına bağlı olarak, tutuklama veriminin düşme trendine geçtiği gözlemlenmiştir. 0,5 g destek miktarının 0,6 g destek miktarına kısayla daha yüksek APM sağlaması nedeniyle CalB ile yapılan sonraki deneylerde bu miktar ile çalışmalara devam edilmiştir.

Novozyme 51032 enzimi için de sonraki deneylerde 0,5 g destek miktarının kullanılması planlanmıştır.

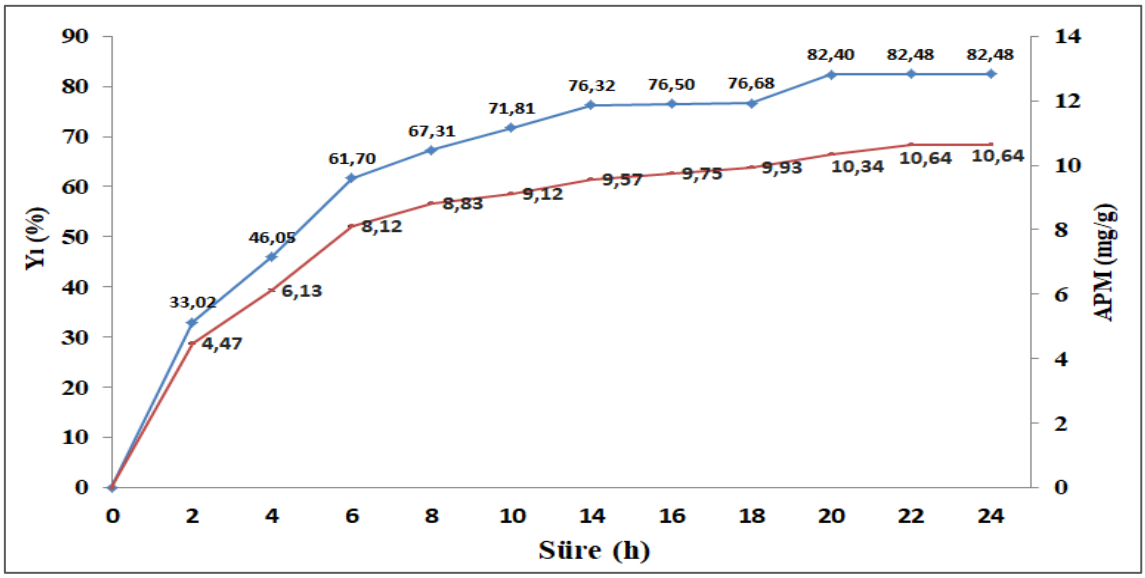
ÇKDNT temelli bir desteğe CalB enziminin tutuklandığı bir çalışmada, destek miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiş; % 1-6 (wt) aralığında destek miktarı kullanılarak, 35 ºC sıcaklıkta 3 saat süre ile tutuklama yapılmış; %4 wt destek miktarı ile maksimum aktiviteye (69.1 U) ulaşıldığı görülmüş ve bu değer optimum destek miktarı olarak ifade edilmiştir (Wang vd., 2018).



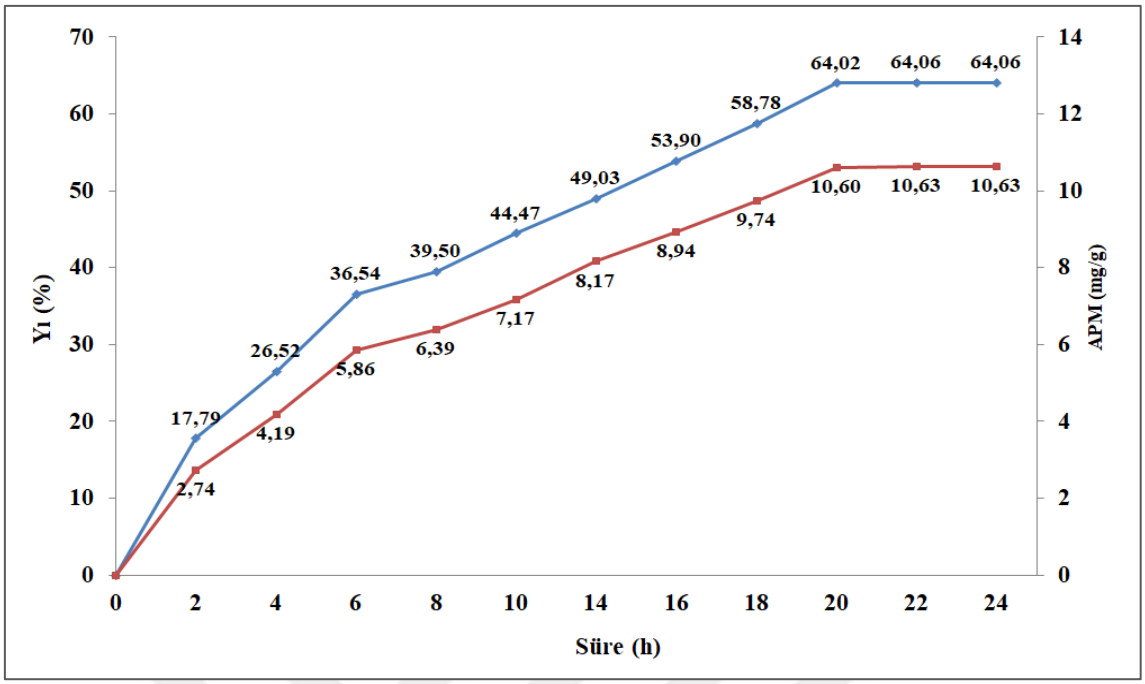
Şekil 4.25. Destek miktarının tutuklama verimi ve APM'e etkisi (CalB) (pH 7, 35 ºC, 300 µL CalB, 24 h, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

4.2.7. Sürenin Etkisi

Tutuklama süresinin tutuklama verimi ve APM'a etkisi CalB için şekil 4.26.'da, Novozyme 51032 için ise şekil 4.27.'de verilmiştir.



Şekil 4.26. Tutuklama süresinin tutuklama performansına etkisi (CalB) (35 ºC, 300 µL enzim, 0,5 g destek, 24 h, pH 7, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)



Şekil 4.27. Tutuklama süresinin tutuklama performansına etkisi (Novozyme 51032) (35 ºC, 300 µL enzim, 0,5 g destek, pH 8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT)

Her iki enzim için sürenin artmasıyla tutuklama verimi ve APM değerleri artmış, 20 saat ve sonrasında bu değerler sabit kalmış, CalB için % 89 verim ve 10,6 mg APM/g değeri elde edilirken bu değerler Novozyme 51032 için sırasıyla, % 64 ve 10,6 mg/g olarak belirlenmiştir.

Tutuklama prosesi, destek yüzeyi ve enzim arasında çok noktalı kovalent bağlanmaya dayalı yavaş ve tutuklama süresine bağlı gelişen bir süreçtir (Mateo vd., 2007). Bu nedenle zamana bağlı olarak tutuklama verimi ve APM'nın arttığı ve CalB enziminin 22 saat ve Novozyme 51032 enziminin ise 20 saat sonrasında tutuklama verimi ve APM değerinin sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle en uygun tutuklama süresinin CalB enzimi için 22 saat ve Novozyme 51032 enzimi için 20 saat olduğuna karar verilmiştir.

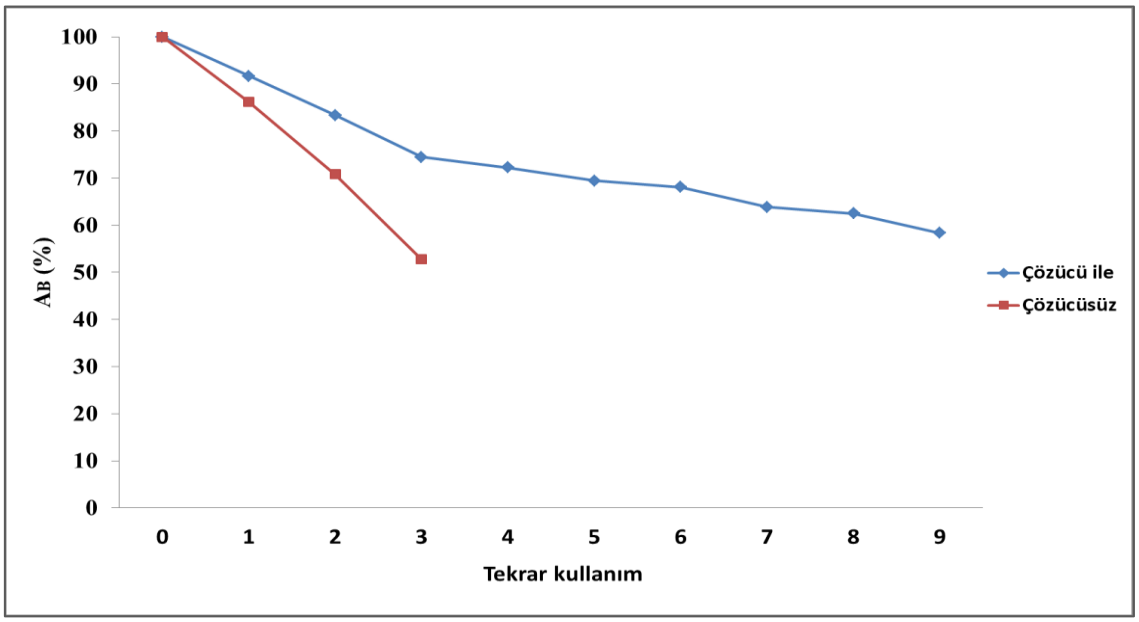
CalB enziminin manyetik Fe_3O_4–silika yüzeyine tutuklanmasında 0-24 saat arasında tutuklama süresinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, maksimum enzim aktivitesine 15 saatte ulaşıldığı tespit edilmiştir (Sreeharsha vd., 2019).

Candida antartica lipazının gallik asit-formaldehit reçinesi ile kaplanmış manyetik demir oksit nanoparçacığına tutuklanmasına tutuklama süresinin etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, 50 mg nanoparçacık, 0,7 mL fosfat tampon (pH 7,5), 3-24 saat

süresince tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş; 15 saat ve sonrasında enzim aktivitesinin sabit kalması nedeniyle tutuklama süresi 15 saat olarak belirlenmiştir (Sreeharsha vd., 2019).

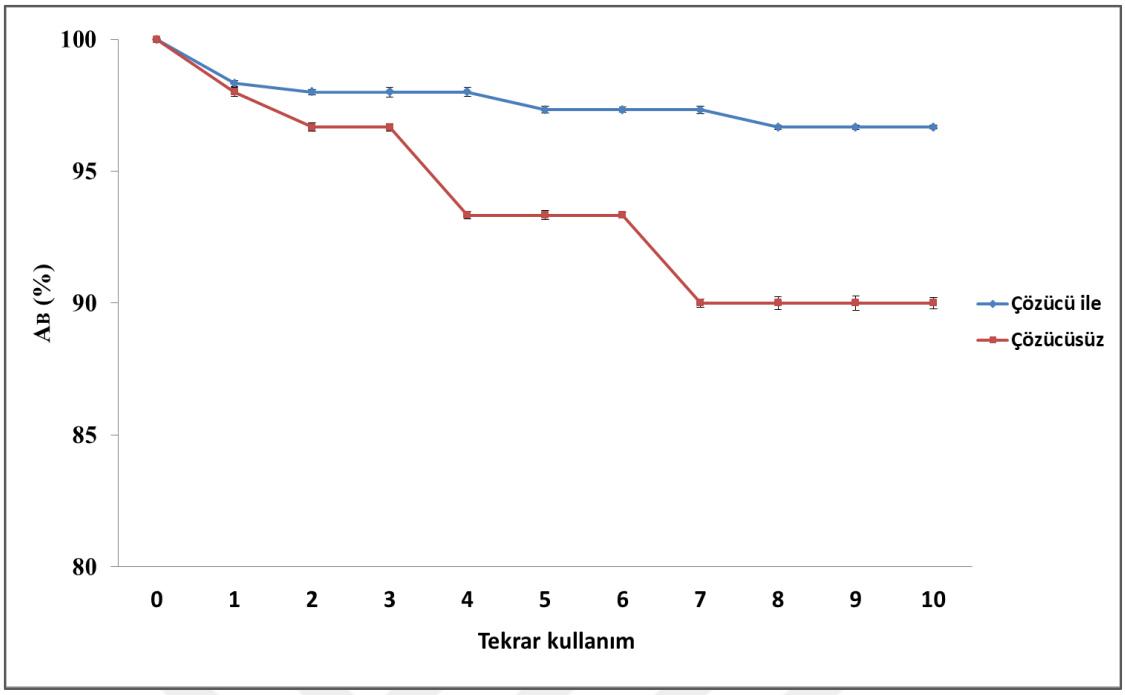
4.2.8. Tutuklanmış Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Çözücü varlığında ve çözücü olmadan enzim tekrar kullanımının bağıl aktiviteye etkisi CalB için şekil 4.28.'da, Novozyme 51032 için ise şekil 4.29.'da verilmiştir.



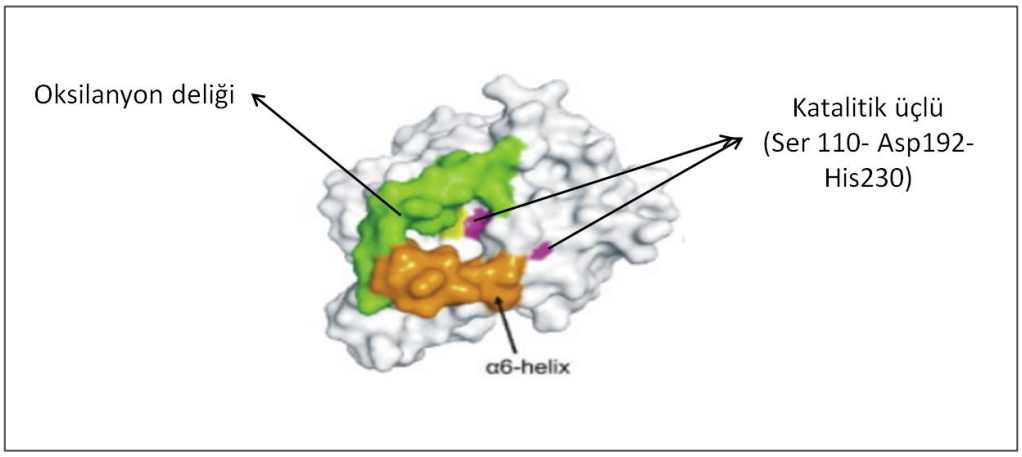
Şekil 4.28. CalB enziminin tekrar kullanımı (400 µL, 35 ºC, pH 7, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT, çözücü: n-butanol)

Her iki enzim karşılaştırıldığında çözücü kullanılmadığı durumda CalB enzimi tekrarlı kullanımda Novozyme 51032'ye kıyasla çok daha hızlı bir şekilde aktivite kaybına uğramış, üç kullanım sonrasında CalB aktivitesi %53'e düşmüş (şekil 4.28.); Novozyme 51032 için on kullanım sonrası bu değer %90 olarak gözlemlenmiştir (şekil 4.29.). Tekrarlı kullanımda çözücü varlığı her iki enzim için aktivite düşüşünü azaltmıştır. n-butanol kullanıldığında enzim bağıl aktivitesi, CalB için dokuz tekrarlı kullanımda %58'e düşerken Novozyme 51032 için bu değer on tekrarlı kullanım sonunda %97 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Novozyme 51032 enziminin tekrar kullanımı (300 µL, 40 ºC, pH 8, %4 Gla, 3h bekleme süresi, %0,2 ÇDKNT, çözücü: n-butanol)

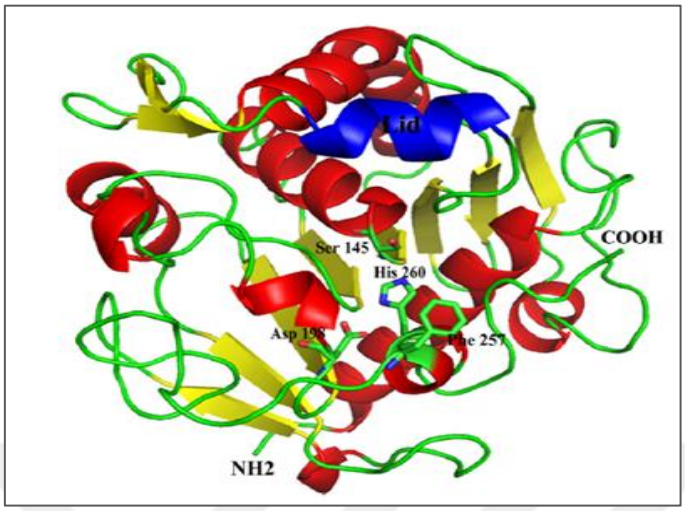
CalB ve *Aspergillus orzyae* enzimlerinin üç boyutlu görünümleri sırasıyla şekil 4.30. ve şekil4.31.'de yeralmaktadır.



Şekil 4.30. Candida antartica B lipazının üç boyutlu görüntüsü (Cai vd., 2022)

Şekil 4.30.'da CalB enziminin üç boyutlu protein yapısında mor ile belirtilen kısımlar katalitik aminoasit üçlüsü (Ser 110- Asp192-His230), yeşil ile belirtilen kısım oksilanyon deliği ve turuncu olarak belirtilen kısım ise α-6 Heliks yapısı görülmektedir. α6- Heliks yapısı, kapak (lid) işlevini görmektedir. Bu kapak birçok enzim yapısına

kıyasla koruyucu, esnek kısa yarı kapalı bir kapak işlevi görerek aktif merkezin korunmasını sağlamaktadır (Ganjalikhany vd., 2012).



Şekil 4.31. Aspergillus orzyae lipazının üç boyutlu görüntüsü (Liu vd., 2013)

Şekil 4.31.'den görüldüğü gibi *Aspergillus orzyae* lipazının protein yapısı sarmal helikal yapıdan oluşmaktadır. Lipazın aktif merkezini oluşturan aminoasitler ise yine serin, aspartat ve histidin (Ser145-Asp198-His260) üçlüsünden oluşmaktadır (Liu vd., 2013).

CalB enzimi ile çözücü kullanılmadığında aktivitenin daha hızlı düşmesinin nedeni, her bir tutuklama işlemi öncesinde biyonanokompozit destek yüzeyinin zeytinyağı hidroliz işlemine maruz kalması sırasında kullanılan kimyasallarla destek yüzeyinin kontamine olması nedeniyle, enzim aktif merkezdeki koruma özelliğine sahip esnek kısa yarı kapalı kapağın bu durumdan etkilenerek aktif merkezin kısıtlanmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Novozyme 51032 enzimi ile çözücü kullanılmaması ya da kullanılmasının enzim tekrar kullanımına fazla bir etkisi olmamış ve enzim aktivitesinde fazla düşüş de gözlenmemiştir. Bunun potensiyel nedeninin *Aspergillus oryzae* kaynaklı Novozyme 51032 enziminin aktif bölgesindeki kapak yapısı nedeniyle (Lan vd., 2021) bu bölgenin dış ortam şartlarından daha az zarar gördüğü öngörülmektedir.

Candida rugosa lipazının farklı destek malzemelere (kitosan, Sephadex G-25 ve selit-545) fiziksel adsorpsiyon ile tutuklandığı bir çalışmada, destekler aseton ve etanol çözücüleri içinde bekletilerek tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanımları zeytinyağı hidroliz aktivite yöntemi ile analiz edilmiştir. Altı tekrar kullanım sonrasında kalan

aktivite, destek malzeme olarak selite kullanımı ile %38 (çözücü aseton ya da etanol), kitosana ile %40 (aseton) ve %43 (etanol) ve sephanex ile %61 (aseton) ve %56 (etanol) olarak analiz edilmiştir (Kaja vd., 2018).

Amino grubu ile aktifleştirilmiş mezogözenekli silika malzemesine CalB enziminin Gla kullanılarak tutuklandığı bir çalışmada enzimin tekrar kullanımının etkisi analiz edilmiştir. Çalışmada çözücü kullanıp kullanmadığı bilgisi yeralmamaktadır. Zeytinyağı hidroliz yöntemi ile yapılan enzim aktive tayininde sekiz tekrar kullanım sonrasında enzim bağıl aktivitesinin %83'e düştüğü analiz edilmiştir (Yu vd., 2021).

Aspergillus lipazının selite fiziksel adsorpsiyonla tutuklandığı bir çalışmada, zeytinyağı hidroliz yöntemi ile enzim aktivitesi tayin edilerek tutuklanmış enzimin tekrar kullanımı incelenmiş; altı kullanım sonrasında enzim bağıl aktivitesinin %70'e düştüğü gözlemlenmiştir (Da Silva vd., 2008).

$FeSO_4.7H_2O$ temelli manyetik mikro parçacık ve kitosandan oluşan destek üzerine *Aspergillus niger* lipazının tutuklandığı bir çalışmada tekrar kullanılabilirlik analizi için; her tutuklama prosesi sonrasında pH 7,5 fosfat tampon ile yıkanan desteklerin kalan aktiviteleri ölçülmüş ve altı tekrar kullanım sonunda kalan aktivite %55 olarak ölçülmüştür (Hombalimath vd., 2020).

Her iki enziminin tutuklama işlemine ait elde edilen deneysel sonuçların literatür ile karşılaştırılması tablo 4.1.'de verilmiştir. Tutuklanmış olan CalB ve Novozyme 51032 karşılaştırıldığında her iki enzim için belirlenen ve tabloda verilen uygun tutuklama koşulları ile CalB kullanımında daha yüksek tutuklama verimi (% 82,47) ve APM (20,66 mg/g) değerleri elde edimiş olmakla beraber, Novozyme 51032 kullanımı ile ulaşılan hidrolitik enzim aktivitesi (9,43 U/mg; 5,09 U) CalB aktivitesinden (3,38 U/mg; 1,79 U) 2.8 kat daha yüksek olmuştur.

Belirtilen tutuklama koşulları ile Novozyme 51032 için tutuklama verimi ve APM değerleri ise sırasıyla, % 64,06 ve 10,63 mg/g olarak belirlenmiştir. Novozyme 51032 için verilen aktivite değeri literatürde verilen değerlerden daha yüksek olup GlyC üretimi için ümit verici olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1. CalB ve Novozyme 51032 tutuklama sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Lipaz Türü	**Destek Türü**	**Optimum Çalışma Koşulları**	**Yi (%) AMP (mg/g) Aktivite (A) (U/mg)/ (U)**	**Literatür**
CalB (*Candida antartica B*)	Biyonanokompozit destek (Kitosan-ÇDKNT)	pH: 7 T:35 ºC c:400µL / 58,98 mg/mL t: 20 h	Yi: % 82,47 APM: 20,66 mg/g A: 3,38 U/mg (1,79 U)	Bu çalışma
Novozyme 51032 (*Aspergillus oryzae*)	Biyonanokompozit destek (Kitosan-ÇDKNT)	pH: 8 T:40 ºC c:300µL / 50,65 mg/mL t: 22 h %4 Gla-3h	Yi: % 64,06 APM: 10,63 mg/g A: 9,43 U/mg (5,09 U)	Bu çalışma
CalB	Fe3O4@SiO2–Epoxy-nanokompozite	pH: 7.5 t: 24 h T: 55ºC	Yi: %84 A: 6.3 U/mg	(Mohammadi vd., 2016)
CalB	Amino grubu ile aktifleştirilmiş mezogözenekli silika	pH: 7 t: 5 h T: 45ºC	Yi: %93 APM: 87,4 mg/g	(Yu vd., 2021)
CalB	ÇDKNT ve polidimetilsilok-san temelli nanokompozit	pH: 7 t: 24 h T: 45ºC	AB: %94	(Sulym vd., 2021)
CalB	Fe_3O_4 manyetik parçacık	pH:8 t: 6h T: 30 ºC c:0,10 mg/mL	APM: 280 mg/g	(Samui vd., 2016)

Tablo 4.1. (Devam) CalB ve Novozyme 51032 tutuklama sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Lipaz Türü	**Destek Türü**	**Optimum Çalışma Koşulları**	**Yi (%) AMP (mg/g) Aktivite (A) (U/mg)/ (U)**	**Literatür**
CalB	Karboksil grupları ile aktifleştirilmiş ÇDKNT'e	pH: 6 T: 30 ºC c: 3 mg/mL t: 2,5 h	Yi: % 79	(Khan vd., 2019)
Aspergillus oryzae	Polistiren bazlı ticari bir reçine	pH: 9 T: 30 ºC c: 20 mg/mL t: 1,5 h	Yi: % 98,4 A: 0,148 U/mg	(Cai vd., 2015)
Aspergillus niger	Manyetik parçacıklı Kitosan ($FeSO_4.7H_2O$) (Biyodizel üretimi)	pH: 7,5 T: 40 º C c: 1 mg/mL t:10 h %5 Gla-3h	A: 0,14 U	(Hombalimath vd., 2020)
Aspergillus oryzae	Polyakrilonitril (PAN) nanofiber elektrolif	pH: 7 T: 40 ºC t: 2 h 40 mM Gla	Yi: % 86,9 A: 0,43 U/mg	(Paitaid ve H-Kittikun, 2021)
Aspergillus niger	Cellit	pH: 6 T: 30-40 ºC t: 20 dk	A: 0,54 U/mg	(Da Silva vd., 2008)
Aspergillus niger	Polianilin-gümüş kaplamalı grafen oksitli nanokomposit	pH: 7 T: 45 ºC t: 4 h %2,5 (v/v) Gla	Yi: % 94 AB:% 88,5	(Asmat vd., 2017)

4.3. Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Adsorpsiyonu

Bu bölümde CalB ve Novozyme 51032 için adsorpisyon türünü belirlemek üzere adsorpsiyon izotermler araştırılmış, ilgili izoterm sabitleri belirlenmiştir. Adsorpsiyon için uygun olan kinetik modelin belirlenmesi amacıyla kinetik inceleme yapılmıştır. Adsorpsiyon prosesi hakkında daha detaylı bilgi için termodinamik inceleme de gerçekleştirilmiştir.

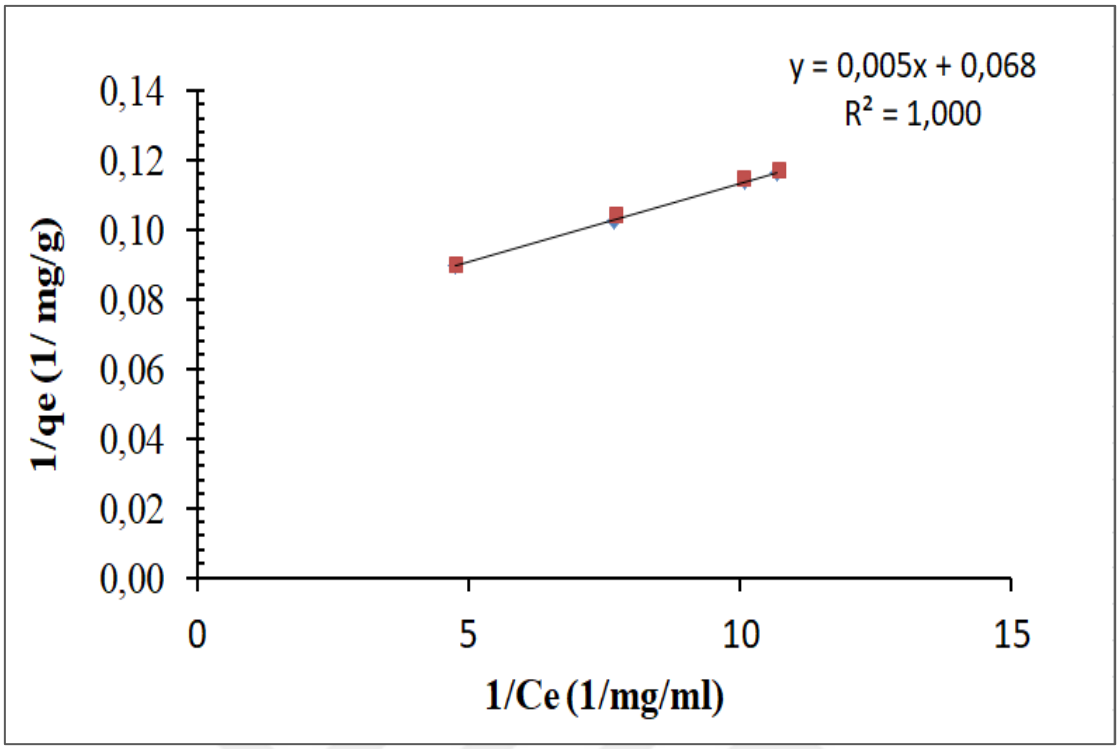
4.3.1. Adsorpsiyon İzotermleri

CalB ve Novozyme 51032 enziminin biyonanokompozit desteğe adsorpsiyonunda Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermlernin belirlenmesi için farklı enzim derişimler kullanılarak adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Destek başına adsorplanan protein miktarları (q_e) ve çözeltideki adsorbatın (enzim) denge derişimi (Ce) yardımıyla Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermler oluşturulmuştur.

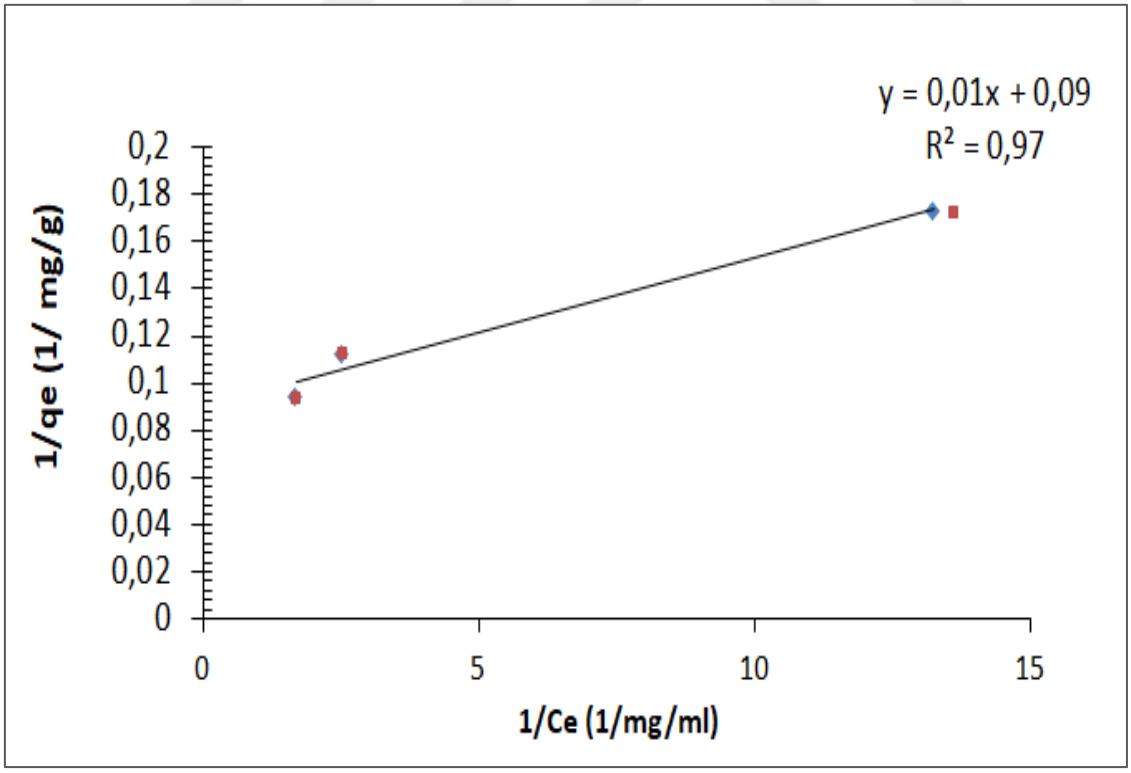
Eşitlik 2.2 kullanılarak Langmuir diyagramının oluşturulması için $\frac{1}{C_e}$ ye karşı $\frac{1}{q_e}$ değerleri doğrusal olarak CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.32. ve şekil 4.33.'deki gibi grafiğe taşındığında, bu grafiğin eğiminden K_L ve kaymasından q_{MAX} değerleri hesaplanmıştır. Her iki enzim için elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Eşitlik 2.4 kullanılarak, Freundlich izotermine ait diyagramın oluşturulması için $\log(C_e)$'ye karşı $\log(q_e)$ doğrusal olarak CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.32. ve şekil 4.33.'deki gibi grafiğe taşınmış olup, grafiğin eğiminden K_f ve kaymasından n değeri hesaplanmıştır. Her iki enzim için elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir. (40 ºC, pH 8, 100-300 µL enzim, 0,5g destek)

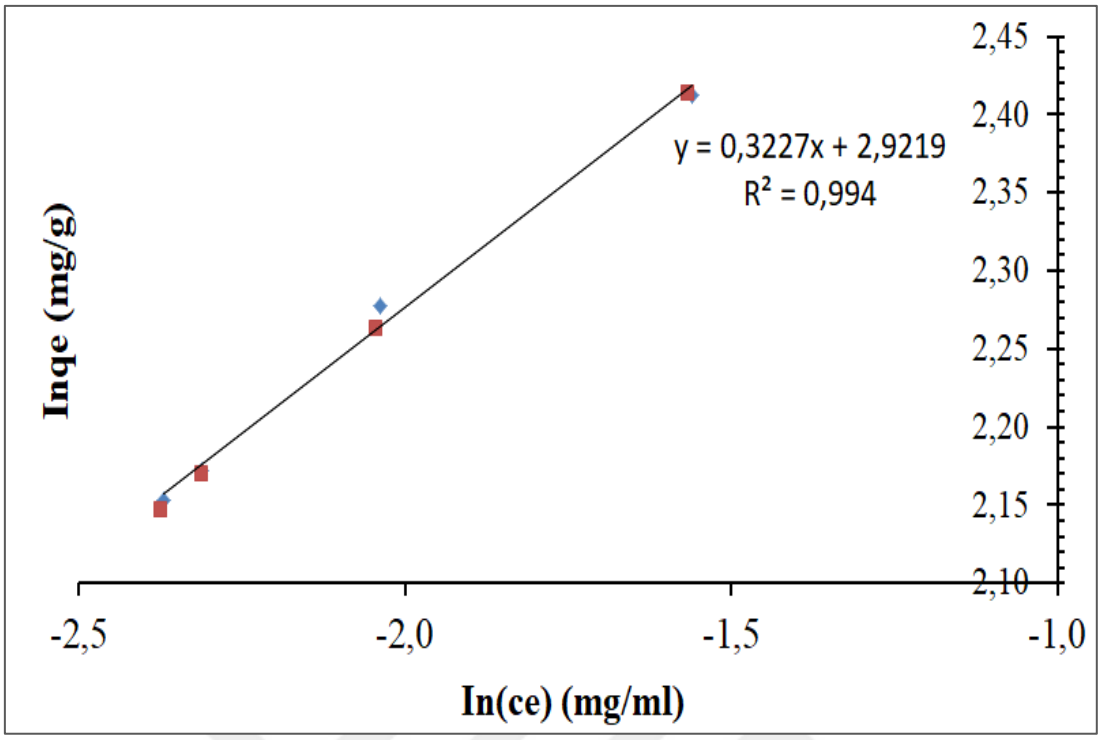
Eşitlik 2.5 kullanılarak, Temkin izotermine ait diyagramının oluşturulması için $In(C_e)'$ye karşı q_e değerleri doğrusal olarak CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.34. ve 4.35.'de grafiğe taşınmıştır. Bu grafiğin eğiminden B_T ve kaymasından K_T sabitleri hesaplanmıştır. Her iki enzim için elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.



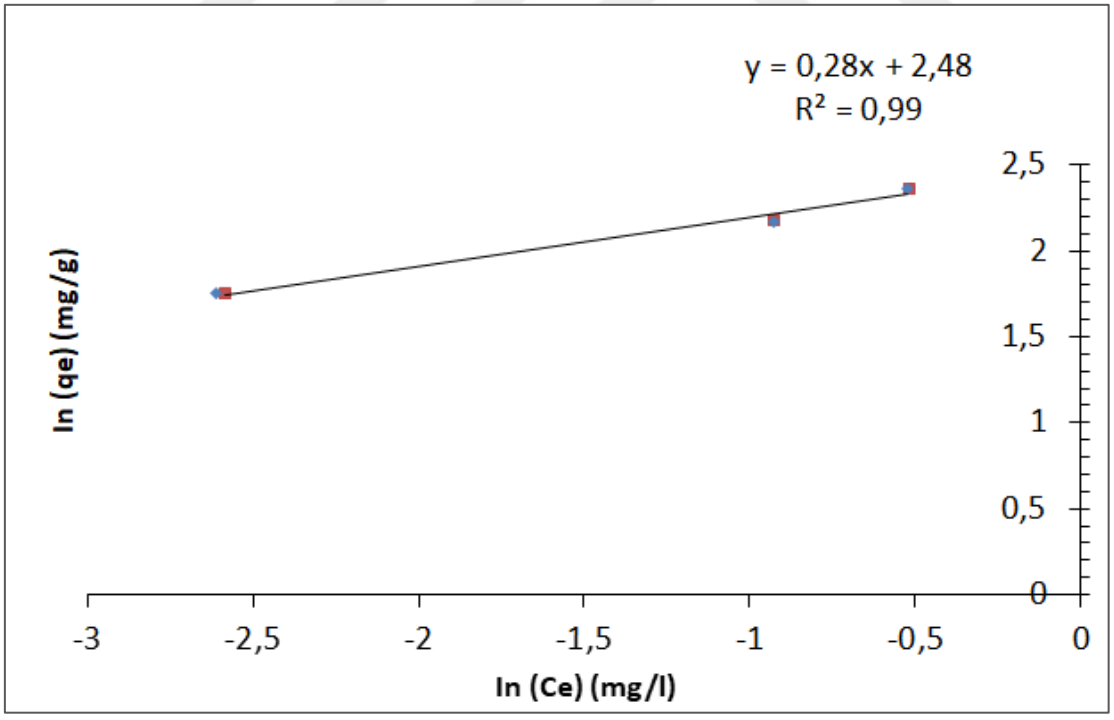
Şekil 4.32. CalB adsorpsiyonuna ait Langmuir İzotermi (35 ºC, pH 7, 0,5 g destek, 100-400µL enzim))



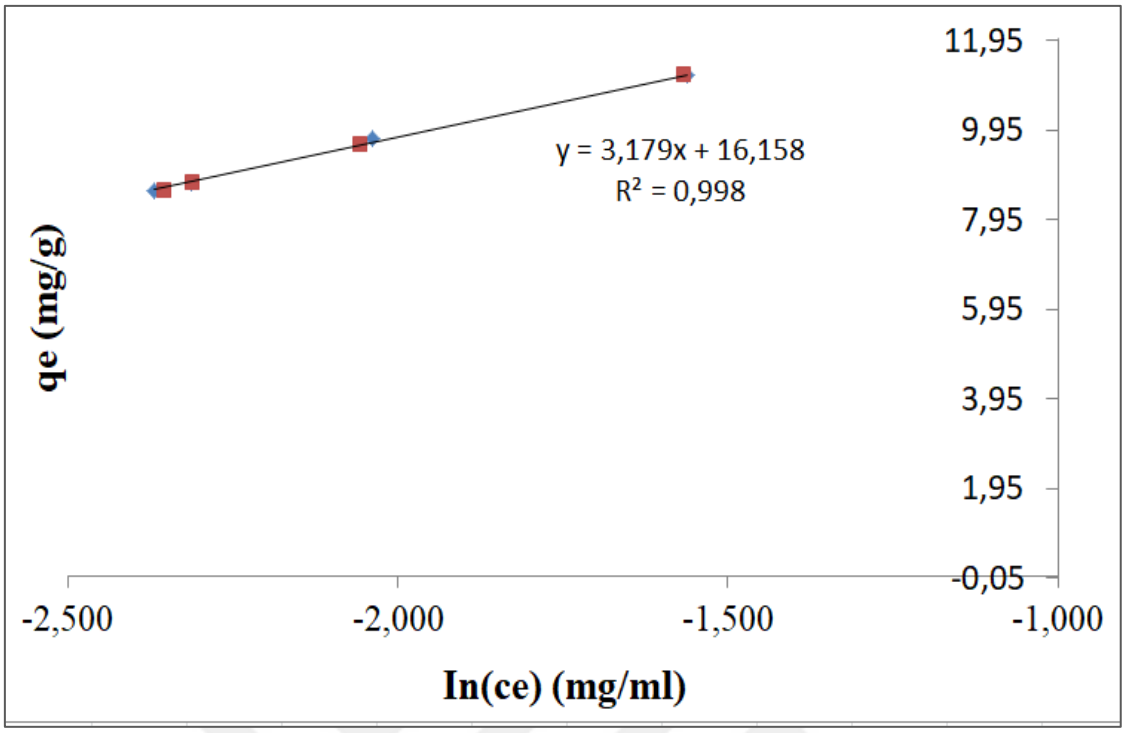
Şekil 4.33. Novozyme 51032 adsorpsiyonuna ait Langmuir İzotermi (40 ºC, pH 8, 100-300 µL enzim, 0,5g destek)



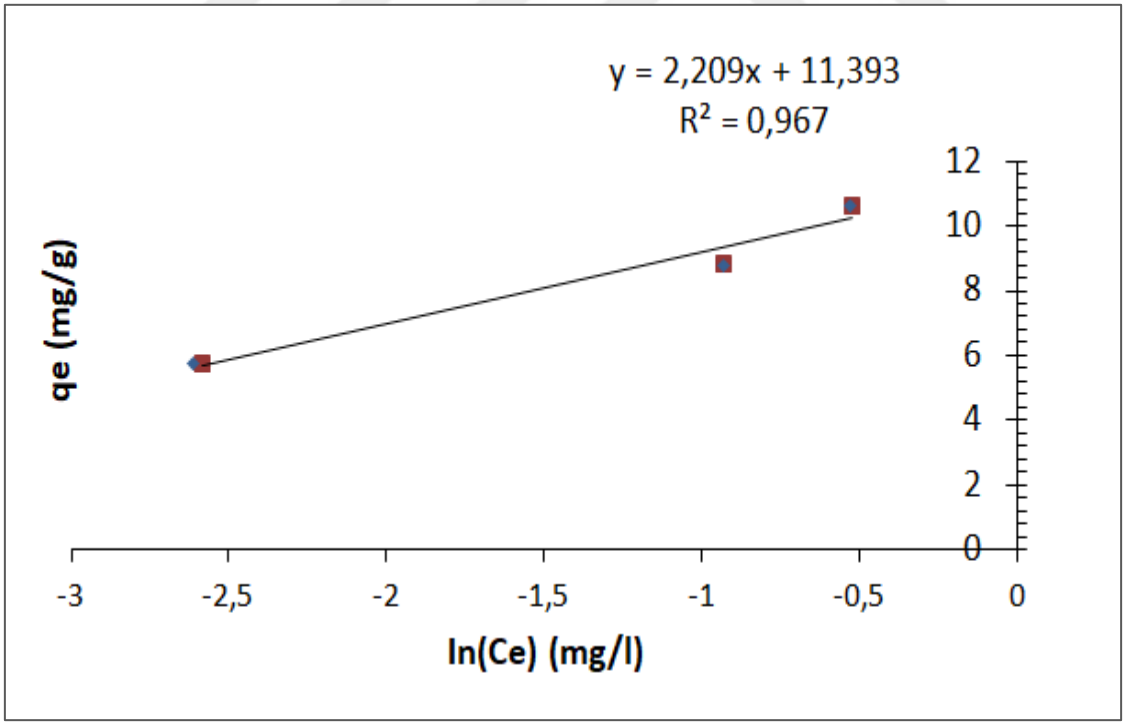
Şekil 4.34. CalB adsorpsiyonuna ait Freundlich İzotermi (35 ºC, pH 7, 100-400 µL enzim, 0,5g destek)



Şekil 4.35. Novozyme 51032 adsorpsiyonuna ait Freundlich İzotermi (40 ºC, pH 8, 100-300 µL enzim, 0,5g destek)



Şekil 4.36. CalB adsorpsiyonuna ait Temkin İzotermi (35 ºC, pH 7, 100-400 µL enzim, 0,5g destek)



Şekil 4.37. Novozyme 51032 adsorpsiyonuna ait Temkin İzoter (40 ºC, pH 8, 100-300 µL enzim, 0,5g destek)

CalB ve Novozyme 51032 lipazlarının biyonanokompozit desteğe adsorpsiyonuna ait üç farklı izoterme ait adsorpsiyon parametreleri ve regressiyon sabitleri (R^2) Tablo 4.1.'de görülmektedir.

Tablo 4.1. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyon izotermlerne ait parametreler

	Langmuir model			**Freundlich model**			**Temkin model**		
	qmax (mg/g)	**K_L (mL/mg)**	**R^2**	**K_F (mg/g)**	**n (g/mL)**	**R^2**	**K_T (L/g)**	**B_T (L/g)**	**R^2**
CalB	14,71	13,6	1,00	18,58	3,10	0,994	161,3	3,18	0,998
Novozyme 51032	11,11	9,00	0,97	12,01	3,57	0,99	177,55	2,19	0,97

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi CalB enziminin adsorpsiyon sürecine ait izoterm modellerine regression sabitleri karşılaştırıldığında R^2=1 ile adsorpsiyonun Langmuir modeline uygun olduğu ifade edilebilir. Langmuir modeline göre adsorpsiyon tek tabakalı olarak gerçekleşir. Adsorpsiyon prosesinin Langmuir modeline uyumlu olup olmadığı hakkında ek bir bilgi veren R_L boyutsuz faktörü dört farklı CalB enzim derişimi için hesaplanmış Tablo 4.2.'de verilmiştir. İlgili tablodan görüldüğü gibi tüm başlangıç enzim derişimler için R_L değerleri 1 civarında hesaplanmıştır. R_L değerinin 1 olması adsorpsiyonun doğrusal olduğunu göstermektedir.

Novozyme 51032 için adsorpsiyon izoterm modellerinin regression sabitleri incelendiğinde, Freundlich izoterm modelinin en uygun model (R^2 =0.99) olduğu görülmektedir. Freundlich izotermindeki grafik denkleminin eğiminden hesaplanan n değeri n>1 (n=3,57) olup adsorpsiyon prosesinin kimyasal olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.2. CalB için hesaplanan Langmuir modeli R_L değerleri

Enzim derişimi (µL)	100	200	300	400
R_L	1,001	1,001	1,001	1,003

CalB lipazının 50mM sodium fosfat tamponunda EDC çapraz bağlayıcı ile aktifleştirilmiş karbonnanotüp (10 mg) desteğe tutuklanma prosesinin hangi adsorpsiyon modeline uygun olduğunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, 10 mg destek kullanılarak 30 dk oda sıcaklığında enzim inkube edilmiş, adsorpsiyon

izotermleri incelenmiştir. Biyonanokompozit desteğe CalB adsorpsiyonu için Langmuir izoterminin en uygun model olduğu analiz edilmiştir (Min vd., 2012).

CalB lipazı poliamid mikrokürecik desteğe tutuklanmasında adsorpsiyon prosesinin Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğunu araştıran başka bir çalışmada, 0,05 g destek ve %1'lik Gla çapraz bağlayıcı kullanılarak, 10 mL Triton X-100 içeren tampon çözelti içinde 25 ºC sıcaklıkta tutuklama işlemi yapılmış, Langmuir izoterm modelinin adsorpsiyon prosesine en uygun model olduğu analiz edilmiştir (Wang vd., 2014).

Candina rugase lipazının COOH- fonksiyonlu ÇDKNT yüzeyine adsorpsiyonunnu incelendiği bir diğer çalışmada, 5-150 mg enzim derişim aralığı kullanılarak 50 mg ÇDKNT, 5 mL pH 7,5 fosfat tamponu (100 mM) ile tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş, adsorpsiyon prosesi Langmuir izoterm modeline uymuştur (Rastian vd., 2014). *Asparaginase* enziminin ÇDKNT destek malzemesine tutuklanma işlemi, $4x10^{-5}$ - $3x10^{-3}$ g/mL enzim derişim aralığında, pH 8 Tris HCl tamponu (50 mM), 45 dk adsorpsiyon süresi, 2 g ÇDKNT kullanılarak yapılmış, Langmuir izoterm modelinin adsorpsiyon için uygun olmuştur (Cristovao vd., 2020). Aspergillus oryzae lakkaz enziminin -NO2 grupları ile aktifeştirilen grafen nano tabakaya fiziksel ve kimyasal bağlanma (çapraz bağlayıcı Gla) yöntemi ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kimyasal adsorpsiyon işleminde enzim destek üzerinde daha uzun süre kalabilmiş ve daha yüksek enzim aktivitesine ulaşılmıştır. Enzim adsorpsiyon prosesi için Freundlich izoterminin daha uygun olduğu belirlenmiştir (Skoronski vd., 2017).

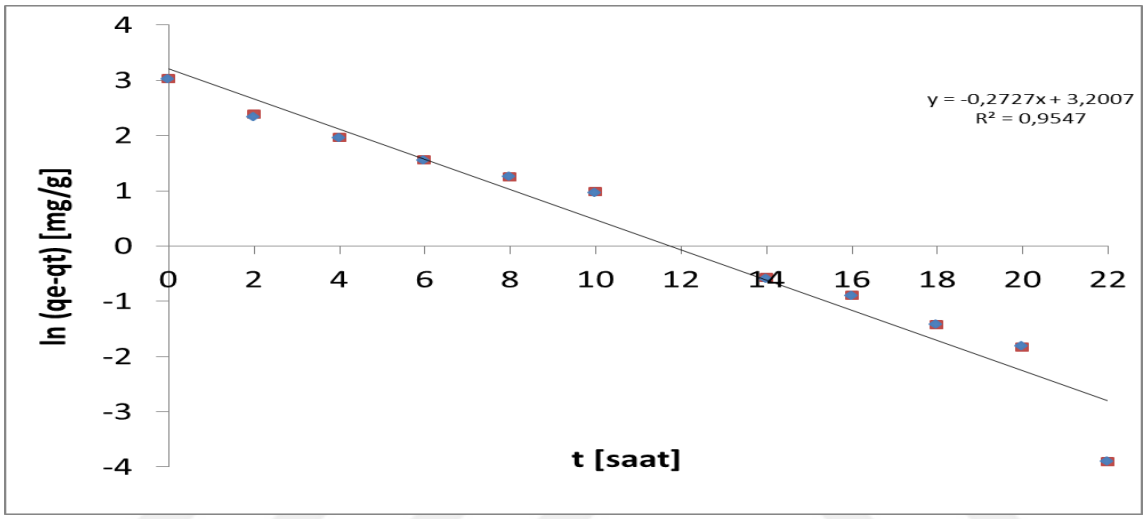
Daoud ve ark. (2010) *Aspergilllus niger* sellülaz enzimini aktif karbona tutuklamışlardır. Adsorpsiyon deneyleri 2-16 g/L enzim derişim aralığında 25 mg destek miktarı, 10 mL pH 4,8 asetat tamponu, 20-60 ºC sıcaklık aralığı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Langmuir izoterm modelinin enzimin aktif karbona adsorpsiyonu için en uygun model olduğu tesbit edilmiştir (Daoud vd., 2010).

4.3.2. Adsorpsiyon Kinetiği

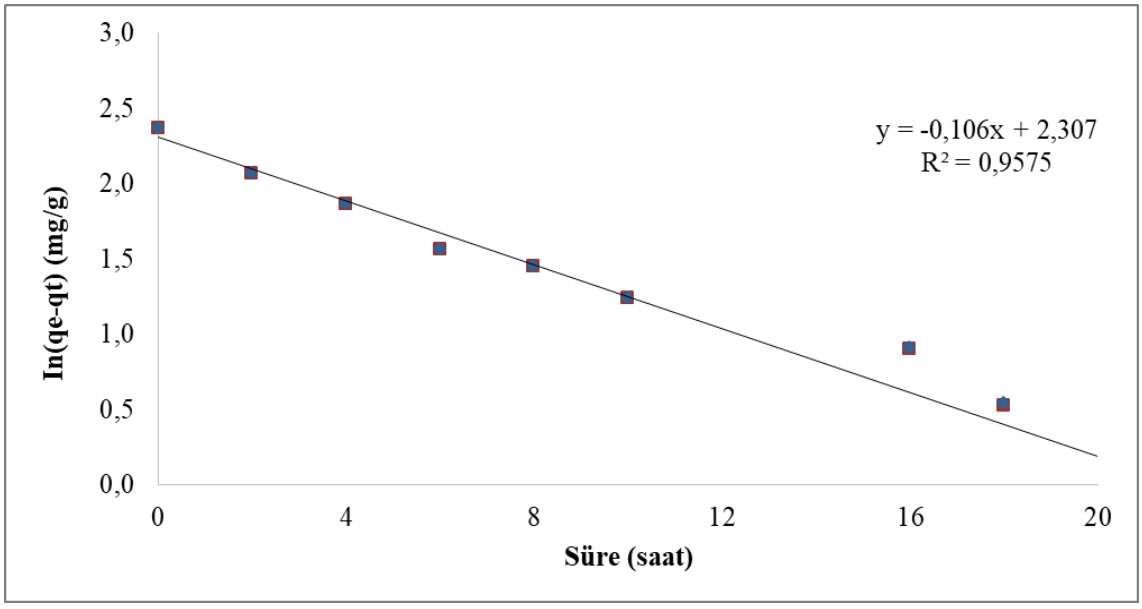
CalB ve Novozyme 51032 enziminin adsorpsiyon kinetiğinin incelenmesi amacıyla, zamana karşı alınan örneklerin analiz edilmesiyle adsorpsiyon prosesinin dengeye

ulaştığı andaki enzim denge derişimi (q_e) ile herhangi bir t anındaki adsorbanın kütlesi başına adsorplanan enzim miktarı (q_t) yardımı ile birinci ve ikinci derece kinetiğe uygunluğu analiz edilmiştir.

Eşitlik 2.7 kullanılarak, 1. dereceden kinetik modelinin değerlendirilmesi için zamana karşı çizilen $\ln(q_t - q_e)$ grafiği eğiminden k hız sabiti ve kesim noktasından ise teorik q_e değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.38. ve şekil 4.39.'de sırasıyla, CalB ve Novozyme 51033 lipazlarının 1. derece kinetik model grafikleri yer almaktadır.

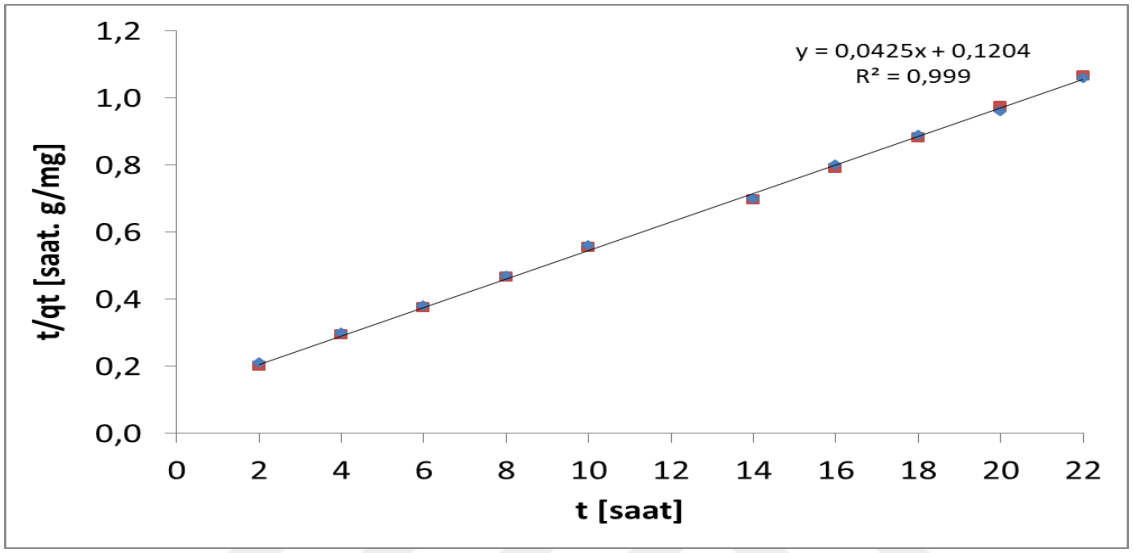


Şekil 4.38. CalB için 1. derece adsorpsiyon kinetiği (35 ºC, pH 7, 400 µL enzim, 22 h)

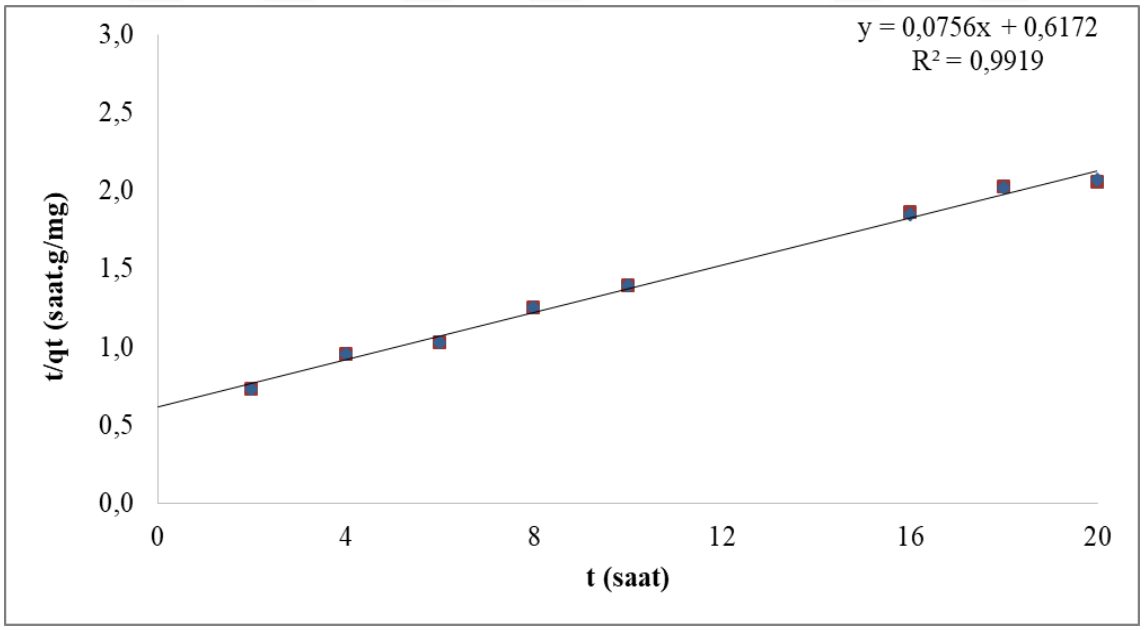


Şekil 4.39. Novozyme 51032 için 1. derece adsorpsiyon kinetiği (40 ºC, pH 8, 300 µL enzim, 20 h)

Eşitlik 2.8 kullanılarak, 2. dereceden kinetik modelinin değerlendirilmesi için zamana karşı çizilen t/q_t grafiğinin eğiminden teorik q_e değeri ve kaymasından k_2 sabiti hesaplanmıştır. Şekil 4.40. ve şekil 4.41.'de sırasıyla, CalB ve Novozyme 51032 lipazlarının 2. derece kinetik model grafikleri yer almaktadır.



Şekil 4.40. CalB için 2. derece adsorpsiyon kinetiği (35 ºC, pH 7, 400 µL enzim, 22 h)



Şekil 4.41. Novozyme 51032 için 2. derece adsorpsiyon kinetiği (40 ºC, pH 8, 300 µL enzim, 20 h)

Regression katsayıları CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, 0,999 ve 0,992 olarak belirlenmiş olup adsorpsiyonun 2. derece kinetik modele daha uygun olduğu ifade edilebilir. İncelenen kinetik modeller için her iki enzim deneysel qe değerleri teorik değerden daha düşük olarak belirlenmiştir. Bunun olası nedeni tutuklama esnasındaki destek yüzeyindeki ya da tutuklama prosesindeki tampon ya da enzim çözeltisinden gelen safsızlıklar olduğu düşünülmektedir. Tablo 4.3.'de CalB ve Novozyme 51032 için kinetik sabitler, teorik ve deneysel q_e değerleri ile regression sabitleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. CalB ve Novozyme 51032 için adsorpsiyon kinetik sabitleri

		Pseudo birinci derece kinetik			Pseudo ikinci derece kinetik		
Enzim Türü	qe (deney) (mg/g)	k1 (1/dk)	qe (teorik) (mg/g)	R^2	k2 (1/dk)	qe (teorik) (mg/g)	R^2
Calb	20,66	0,06	24,72	0,955	0,74	23,53	0,999
Novozyme 51032	10,63	0,64	15,12	0,958	0,01	13,23	0,992

Deneysel olarak belirlenen qe değerlerinin (CalB için 20,66 mg/g, Novozyme 51032 için 10,63 mg/g) yalancı 2. derece kinetik modelden elde edilen qe değerlerine (CalB için 23,53 mg/g, Novozyme 51032 için 13,23 mg/g) daha yakın olduğu belirlenmiştir. Her iki enzimin R^2 (0,99) değerleri her iki enzimin 2. derece kinetik modeline daha uygun olduğunu göstermektedir.

Diatome toprağına *Candida rugosa* enziminin adsorpsiyon kinetiğinin incelendiği bir çalışmada, adsorpsiyon deneyleri, 4 mL hacim, pH 7 sodyum fosfat tamponu, 25 ^oC sıcaklık, 0,5 g/L lipaz derişimi koşullarında yapılmış, adsorpsiyon prosesinin pseudo 2. mertebe kinetiğe uygun olduğunu tespit edilmiştir (Demirbas vd., 2019).
Aspergilllus niger lipazının mezogözenekli malzemeye (Santa Barbara Amorf, SBA-15) adsorpsiyon kinetiğinin incelendiği bir diğer çalışmada, 0,05 mg destek, pH 7 fosfat tamponu, 0,5 mg/mL lipaz derişimi ile 30°C sıcaklık ve 12 saat boyunca tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş, adsorpsiyon için pseudo 2. mertebe kinetik uygun olmuştur (Arumugam vd., 2017).

Aspergilllus Niger sellülaz enziminin aktif karbona tutuklandığı başka bir çalışmada, 25 mg destek, 10 mL pH 4,8 asetat tamponu, 2-16 g/L enzim derişimi, 20-60 ^{o}C sıcaklık koşullarında dneeyler yapılmış, diğer çalışmalara benzer olarak 2. derece kinetik model

yaklaşımının adsorpsiyon prosesine uygun olduğu analiz edilmiştir (Daoud vd., 2010).

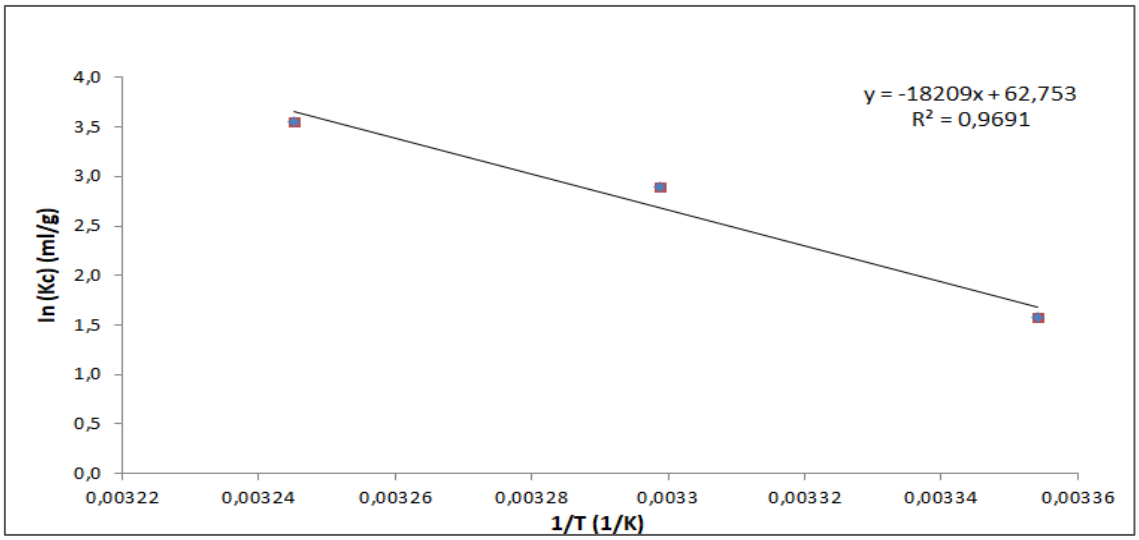
Tablo 4.4.'de CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyon kinetik verilerinin literatür ile karşılaştırılması yeralmaktadır. Tabloda da görüldüğü gibi enzimin adsorpsiyon kinetik çalışmasının incelendiği literatürlerde sıklıkla fiziksel adsorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Adsorpsiyon kinetiğinin ise dah çok 2. derece kinetik modellerine uyduğu görülmektedir.

Tablo 4.4. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyon kinetik verilerinin literatür ile karşılaştırılması

Enzim Türü	**Destek**	**qe (deney) (mg/g)**	**qe (teorik) (mg/g)**	**Fiziksel /Kimyasal Adsorpsiyon**	**Kinetik Çeşidi**	**Literatür**
CalB	Biyonano kompozit destek	20,66	23,53	Kimyasal	İkinci derece	Bu çalışma
Novozyme 51032	Biyonano kompozit destek	10,63	13,23	Kimyasal	İkinci derece	Bu çalışma
Thermomyces lanuginosus lipazı	Grafen	1,15 (g/g)	1,17 (g/g)	Fiziksel	İkinci derece	(Gong vd., 2017)
Sellülaz	Ticari aktif karbon	1565	1624	Fiziksel	İkinci derece	(Daoud vd., 2010)
Thermomyces lanuginosus lipazı	Mezo gözenekli poly-stiren divinilben zen reçine	128,5	135,2	Fiziksel	Birinci derece	(Alves vd., 2017)
Candida Rugosa lipazı	Elma Ağacı Kabuğu	0,165	0,1645	Fiziksel	İkinci derece	(Demirbaş vd., 2019)

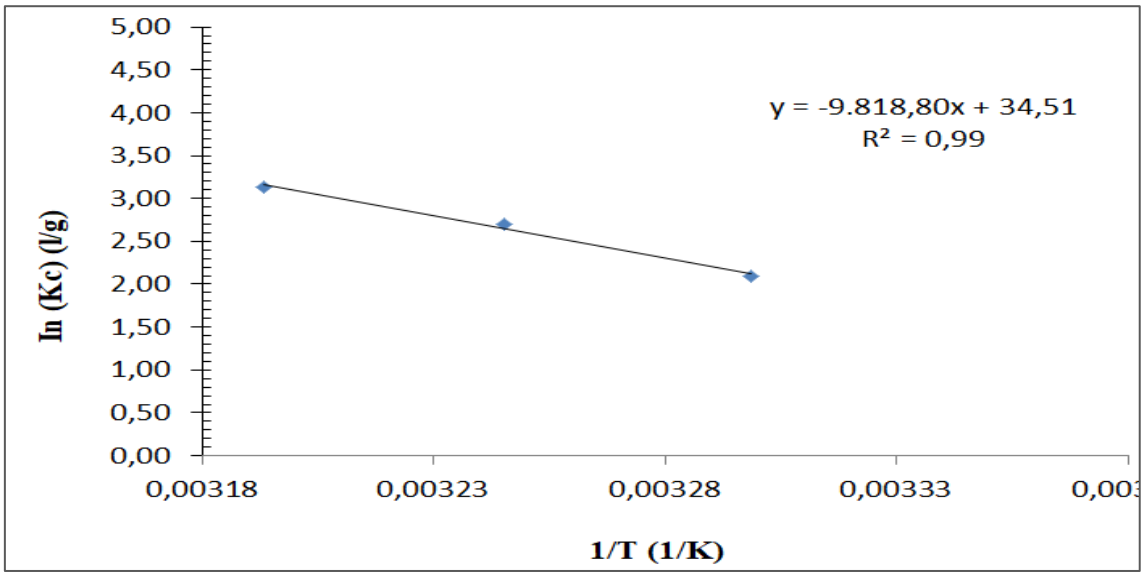
4.3.3. Adsorpsiyon Termodinamiği

Enzimlerin adsorpsiyon prosesinin termodinamik açıdan incelenmesi amacıyla farklı sıcaklıklarda tutuklama deneyleri yapılmıştır. Tutuklama deney sonuçlarında çözeltideki başına adsorblanan madde miktarı q_e ve çözeltideki adsorbatın başlangıç derişimi ile hesaplanan Kc değerleri yardımıyla 1/T'ye karşı ln Kc arasında grafik çizilmiştir. Enzim adsorpsiyon prosesinin termodinamik olarak değerlendirilmesi için ilgili grafikler CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.42. ve 4.43.'de görülmektedir.



Şekil 4.42. CalB adsorpsiyonu için termodinamik inceleme (T: 25-35 ºC, pH 7, 400µL enzim, 24 h)

Eşitlik 2.13 kullanılarak bu grafiğin eğiminden ΔH^0 ve kaymasından ΔS^0 değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan ΔH^0 ve ΔS^0 değerleri kullanılarak Eşitlik 2.10 yardımıyla incelenen her bir sıcaklık için ΔG^0 değerleri belirlenmiştir. CalB ve Novozyme 51032 biyonanokompozit desteğe adsorpsiyonuna ait termodinamik parametreler Tablo 4.5.'de görülmektedir. Her iki enzim için elde edilen negatif ΔG^0 değeri adsorpsiyon prosesinin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.43. Novozyme 51032 adsorpsiyonu için termodinamik inceleme (T: 30-40 ºC, pH 8, 300µL enzim, 24 h)

Her iki enzim için ΔH^0 değerlerinin (CalB için 151,39 kJ/mol, Novozyme 51032 için 81,64 kJ/mol) pozitif olarak elde edilmiş olması nedeniyle adsorpsiyonun endotermik ve 80 kJ/mol değerinin üzerinde olduğu için kimyasal adsorpsiyon varlığına işaret etmektedir. FTIR sonuçlarına göre de her iki enzimin biyonanokompozit desteğe kimyasal bağlarla bağlandığına dair piklerin varlığı kimyasal adsorpsiyon işlemini doğrulamaktadır.

CalB ve Novozyme 51032 enzimler için ΔSº değerinin (0,522 ve 0,287 J/mol.K) pozitif olması ise biyonanokompozit desteğe enzim afinitesinin arttığını (da Silva vd., 2010) ve buna bağlı olarak arayüzeyde düzensizliğin de arttığını göstermektedir (Çiçekçi vd., 2020).

Literatürde sıklıkla fiziksel adsorpsiyon yolu ile destek malzemesine adsorpsiyon çalışmalarına rastlanılmış olmakla beraber kimyasal adsorpsiyon prosesinin gözlemlendiği çalışmalar da vardır. Eversa Transform 2.0 (*Aspergillus oryzae*) lipazının ZIF-67, ZIF-8 ve HKUST adı verilen zeolitik imidazolat desteğine adsorbe edildiği bir çalışmada, adsorpsiyon termodinamiği analizi için sıcaklık aralığı 35-45 ºC ve adsorpsiyon süresi 24h olarak alınmıştır. Termodinamik parametreler incelendiğinde HKUST kullanımında ΔH^0 değeri 196 kJ/mol ve ΔSº değeri ise 0,63 kJ/mol.K olarak hesaplanmış olup, bu değerler adsorpsiyon prosesinin kimyasal olduğunu ($\Delta H^0 >$ 80 kJ/mol) ve positif entropi değeri ise lipazın HKUST desteğe afinitesinin olduğunu göstermektedir (Shomal vd., 2022).

Tablo 4.5. CalB ve Novozyme 51032 adsorpsiyonu için termodinamik parametreler

Enzim Türü (Destek)	Sıcaklık (ºC)	ΔGº (kJ/mol)	ΔSº (kJ/mol.K)	ΔHº (kJ/mol)	Literatür
CalB (Biyonanokompozit)	25	-3,90	0,522	151,39	Bu çalışma
	30	-7,28			
	35	-9,12			
Novozyme 51032 (Biyonanokompozit)	30	-5,55	0,287	81,64	Bu çalışma
	35	-6,83			
	40	-8,11			
Eversa Transform 2.0 (HKUST)	35	1,225	0,63	196,37	(Shomal vd., 2022)
	40	0,104			
	45	-5,09			

4.4. Enzimatik Gliserin Karbonat (GlyC) Üretimi

Bu bölümde GlyC üretimine etki eden parametrelere ait deney sonuçları değerlendirip, literatür ile karşılaştırılmıştır.

4.4.1. Sıcaklığın Etkisi

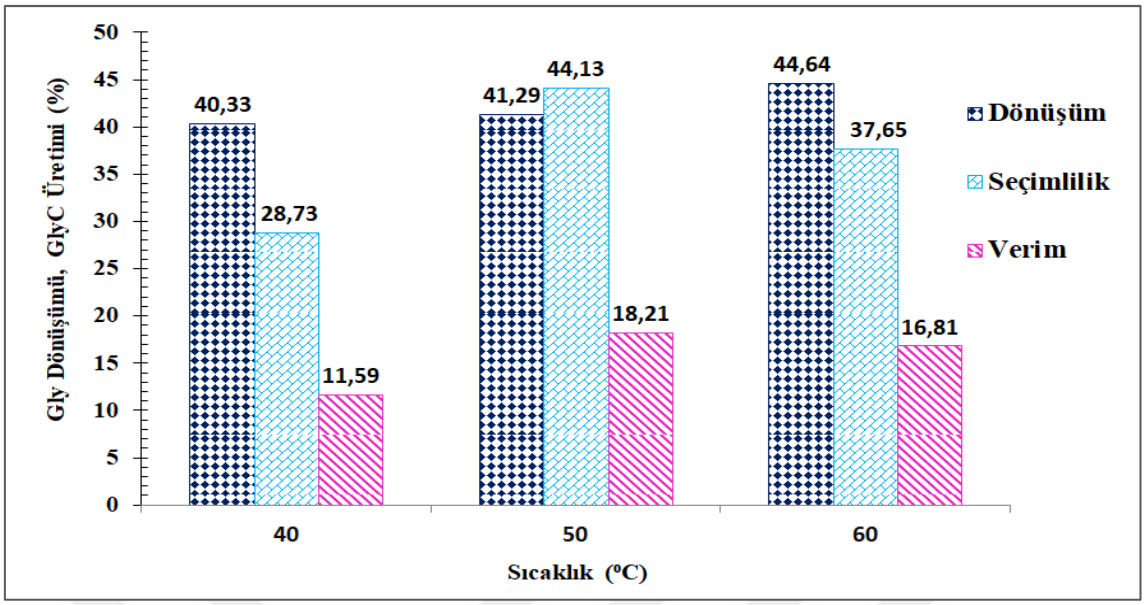
Sıcaklığın Gly dönüşüm ve GlyC üretimine etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla şekil 4.44 ve şekil 4.45'de görülmektedir.

CalB kullanılarak GlyC üretiminde, sıcaklığın artmasıyla Gly dönüşümü biraz artarak 60 ºC'de %44,64 en yüksek değerine ulaşmıştır. En yüksek GlyC seçimliliği (%44) ve en yüksek GlyC verimi ise (%18) 50 ºC sıcaklıkta elde edilmiş, sıcaklığın 60 ºC'ye çıkarılmasıyla bu değerlerde düşme olmuştur (şekil 4.44.). Bu sonuçlara göre GlyC üretimi için en uygun sıcaklığın 50 ºC olduğu tespit edilmiştir. 50 ^{o}C sıcaklık aynı zamanda GlyC üretiminin YYY ile optimizasyonunda sıcaklık için orta değer olarak belirlenmiştir.

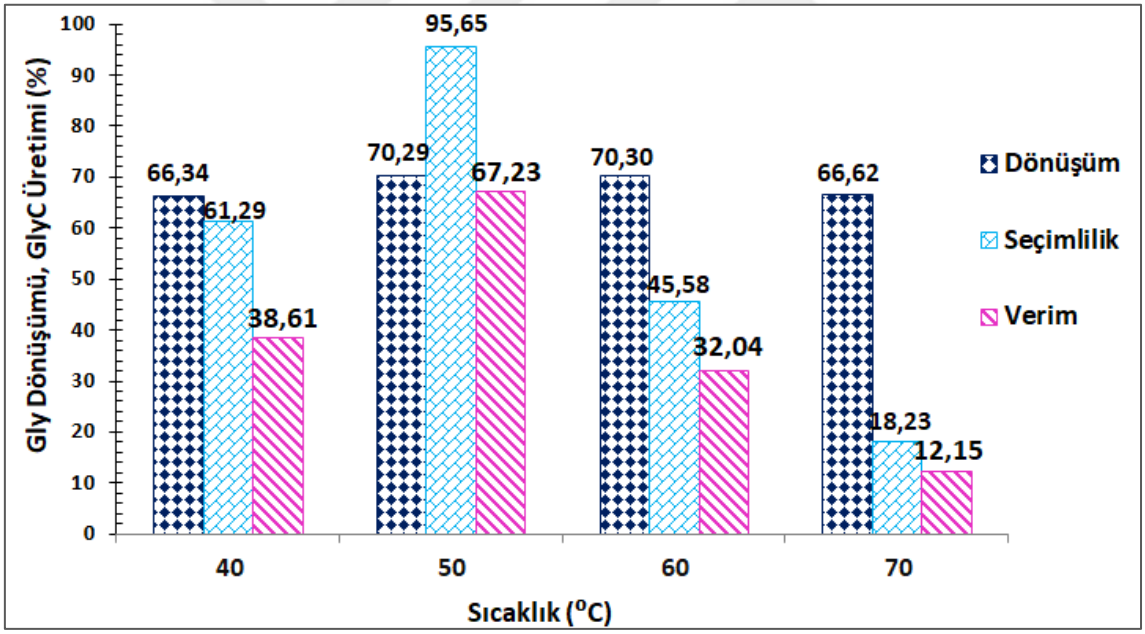
Novozyme 51032 kullanılarak GlyC üretiminde ise, şekil 4.45'de görüldüğü gibi sıcaklığın 40 ºC'den 50 ºC'ye arttırılmasıyla Gly dönüşümü artarak en yüksek değere (%70) ulaşmış ve sabit kalmış, bu değerin üzerinde ise dönüşümde düşme gözlemlenmiştir. En yüksek GlyC seçimliliğine (%96) ve en yüksek GlyC verimine (%67) 50 ºC sıcaklıkta ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Tutuklanmış Novozyme 51032 enzimi ile GlyC üretimine ait en uygun sıcaklığın CalB kullanımına benzer olarak 50ºC sıcaklık olduğu analiz edilmiştir.

Enzimatik GlyC üretiminde, tepkime sıcaklığı düşük olduğunda (örn. 40 ºC) girdilerin yüksek viskozitesi nedeniyle enzim tepkime ortamında yeterince çözünememektedir. Tepkime girdisi olan Gly yüksek vizkositeye sahip olup, Gly sıcaklığının 30 ºC'den 60 ºC'ye arttrılmasıyla viskositesi 648.4 mPa.s'den 84.20 mPa.s'ye düşmektedir (Ferreira vd., 2017).

Artan tepkime sıcaklığı, reaksiyon ortamının vizkositesinde azalmaya neden olmakta ve böylece reaktantların birbirleri arasındaki çarpışma oranını arttırmaktadır (Lanjekar ve Rathod, 2013).



Şekil 4.44. Sıcaklığın GlyC üretimine etkisi (CalB) (DMC/Gly: 2/1, 200 rpm, %20 CalB (w/w), 24 h))



Şekil 4.45. Sıcaklığın GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) (DMC/Gly: 6/1, 200 rpm, %10 Novozyme 51032 (w/w), 24 saat)

Arrhenius denklemine göre sıcaklık artışı ile tepkime hızı artmaktadır ve bu nedenle GlyC üretiminde (verim) de artan sıcaklıkla birlikle önce bir artış görülmektedir. 60 ºC sıcaklıkta GlyC seçimliliğin ve verimin düşmesinin olası nedeni enzim üç boyutlu yapısının termal deaktivasyon nedeniyle bozunması ve enzim aktivitesinin artan sıcaklıkla düşmesidir. Artan sıcaklıkla seçiciliğin ve Gly dönüşümünün düştüğüne dair

çalışmalara literatür de sıklıkla rastlanmaktadır (Du vd., 2018; Kim vd., 2007; Tudorache vd., 2012a).

GlyC üretimine sıcaklığın etkisinin incelendiği bir çalışmada, 40 ºC- 70 ºC sıcaklık aralığı kullanılarak, tert-butanol çözücüsü oramında, 1,5/1 DMC: Gly mol oranı, 400 rpm, %22 Novozyme 435 (w/w (enzim miktarı/ reaktant toplam kütlesi), 60 ºC, 14 saat süre koşullarında deneyler yapılmış % 95 Gly dönüşümü elde edilmiştir. 60 ºC'de 8.75 U/g olan enzim aktivitesi, sıcaklığın 70 ºC ve üstüne çıkarılması durumunda 6.27 U/g değerine düştüğü belirlenmiştir (Lanjekar ve Rathod, 2013).

4.4.2. DMC/Gly Mol Oranı Etkisi

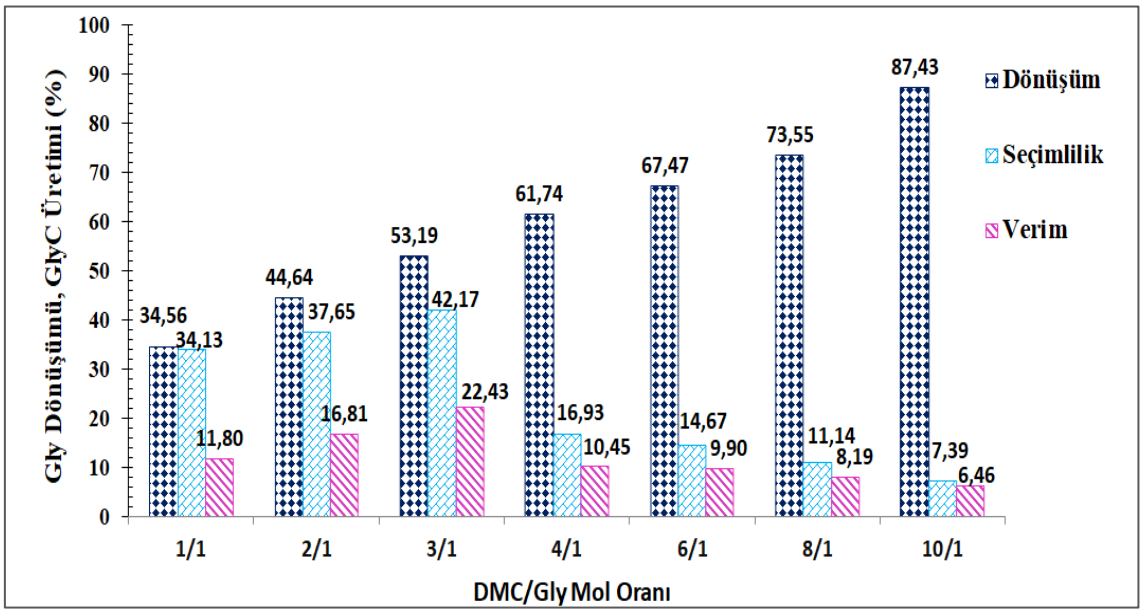
Reaktant girdileri Gly ve DMC bire bir mol oranı ile tepkimeye girmesine rağmen, GlyC denge tepkimesinin sağ tarafa kaydırılması için, yüksek DMC/Gly mol oranına ihtiyaç duyulmaktadır (Sonnati vd., 2013). 1/1 DMC/Gly mol oranı ile üretilmesi planlanan GlyC'de herhangi bir ürün üretimi gerçekleşmemiştir (Tudorache, vd., 2012a). Literatürde enzimatik transesterleşme tepkimesinde 2/1-10/1 DMC/Gly mol oranı aralığında çalışıldığına rastlanmaktadır (Du vd., 2018; Jung vd., 2012; Leão vd., 2016; Waghmare vd., 2015).

DMC/Gly mol oranının Gly dönüşüm ve GlyC üretimine etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.46 ve şekil 4.47'de verilmiştir.

CalB kullanılarak GlyC üretimi için şekil 4.46. incelendiğinde DMC/Gly mol oranının artmasıyla Gly dönüşümü artmış, 10/1 mol oranında %87,4 en yüksek değerine ulaşmıştır. GlyC seçimliliği ve GlyC verimi incelendiğinde ise, mol oranının artmasıyla bu değerler önce biraz artmış, 3/1 mol oranında en yüksek değerlerine (%42 seçimlilik ve %22,7 verim) ulaşmış, daha sonra artan mol oranlarında ise her ikisi de düşmüştür. Belli bir mol oranından sonra artan mol oranı ile dönüşüm artmaya devam ederken seçimlilik ve verim değerleri de en yüksek değerlerini verdikten sonra azalma eğiliminde olmuştur. Gly ve DMC'den GlyC sentezini gösteren şekil 2.4'e göre bunun nedeni, ortamda fazla miktarda bulunan DMC'nin üretilen GlyC ile yan ürün olan DGC'yi oluşturması ve bu yan ürünün de tekrar DMC ile tepkimeye girerek DGTC yan ürünlerini oluşturması şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle yüksek seçimlilik ve verim

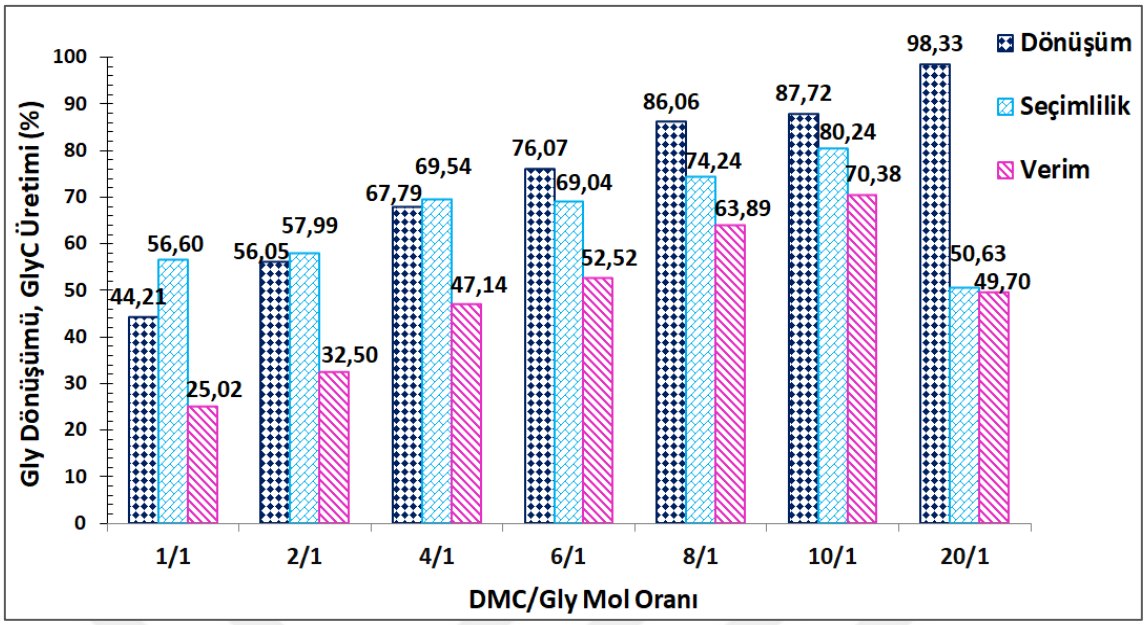
değerleri veren 3/1 DMC/Gly mol oranı, GlyC üretiminin YYY ile optimizasyon çalışmalarında orta değer olarak belirlenmiştir.

Novozyme 51032 kullanımında ise, şekil 4.47'den görüldüğü gibi DMC/Gly mol oranının artmasıyla, CalB kullanımına benzer olarak, Gly dönüşümü artmış, 20/1 mol oranında en yüksek değerine (%98,3) ulaşmıştır. GlyC seçimliliği ve GlyC verimi inclendiğinde yine DMC/Gly mol oranının artmasıyla artarak 10/1 mol oranında en yüksek seçimlilik (%80) ve verim (%70) değerlerine ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle yüksek GlyC seçimlilik ve verim değerleri veren 10/1 DMC/Gly mol oranı Novozyme 51032 ile GlyC üretimi için uygun olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.46. DMC/Gly mol oranının GlyC üretimine etkisi (CalB) (60 ºC, 200 rpm, %20 CalB (w/w), 24 h)

Gly ve DMC mol oranının Novozyme 435 (ticari tutuklanmış CalB) enzimi ile GlyC üretimine analizinin incelendiği bir çalışmada, 1/1-4/1 DMC/Gly mol oranı, 60 ºC sıcaklık, %13 enzim miktarı (w/w, enzim miktarı/Gly ve DMC toplam kütlece ağırlığı), 5 saat tepkime süresi, tert-butanol çözücü ortamı ve 25 kHz ultrasonik banyoda 10 dk arayla dur kalk çalışması ile GlyC üretimi gerçekleştirilmiştir. DMC/Gly mol oranı artmasıyla Gly dönüşümünün önce arttığı, 3/1 mol oranında maksimum değere (%99,7) ulaştığı, DMC/Gly mol oranı daha da artmasıyla Gly dönüşümünün biraz düştüğü analiz edilmiştir (Waghmare vd., 2015).



Şekil 4.47. DMC/Gly mol oranının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) (50 ºC, 18 h, % 10 wt enzim)

Çözücü içermeyen ortamda, ticari tutuklanmış CalB (Novozyme 435) ile GlyC üretiminin incelendiği bir diğer çalışmada ise, 2/1 DMC/Gly mol oranı, 50º C sıcaklık, 350 rpm, %2 (w/w) enzim miktarı ile %49 GlyC dönüşümü elde edilirken, tert-butanol çözücü ortamında ise dönüşüm artarak %97 değerine ulaşmıştır (Cushing ve Peretti, 2013).

Novozyme 435, CalB enziminin hidrofobik bir yapıya sahip akrilik reçineye (Lewatit VP OC 1600) tutuklanmasıyla elde edilen ticari bir enzimdir. GlyC üretimde sıklıkla bu enzimin kullanımına literatürde rastlamak mümkündür. Bu enzimin yüzeyinin gliserin tarafından kaplanması nedeniyle substatın enzim yüzeyine ulaşımının zorlaştığı ve enzimin aktif çalışmasını önlediğine dair çalışmalar mevcuttur (Dossat vd., 1999; K. H. Lee vd., 2010). DMC/Gly mol oranının artırılmasıyla DMC ortamda aynı zamanda çözücü özelliği de göstermekte ve yukarda belirtilen Gly ile ilgili sorunun kısmen önüne geçilebildiği öngörülmektedir.

*A.*niger serbest enzimi ile GlyC üretiminin incelendiği bir çalışmada, DMC/Gly mol oranı 100/1- 1.3/1 kullanılarak 60 ºC sıcaklık, %12 enzim miktarı (w/w) ve 48 saat süre koşullarında inceleme gerçekleştirilmiştir. DMC/Gly mol oranının 1.3/1 olduğu durumda %46 dönüşüme ulaşıldığı fakat buna rağmen GlyC üretilmediği görülmüştür. 10/1 DMC/Gly mol oranında %74 Gly dönüşümü ve %80 GlyC seçimliği elde edilmiş,

mol oranının 40/1'e arttırılmasıyla GlyC seçimliğinin sabit kalması nedeniyle 10/1 DMC/Gly mol oranının uygun olduğu analiz edilmiştir (Tudorache vd., 2012a).

Manyetik nano parçacıklara tutuklanan *A.niger* enzimi ile çözücüsüz ortamda GlyC üretiminin inclendiği bir diğer çalışmada ise, 60 ºC sıcaklık, 6 saat tepkime süresi, 10/1 DMC/Gly mol oranı ile %87,7 Gly dönüşümü tesbit edilmiştir (Tudorache vd., 2017).

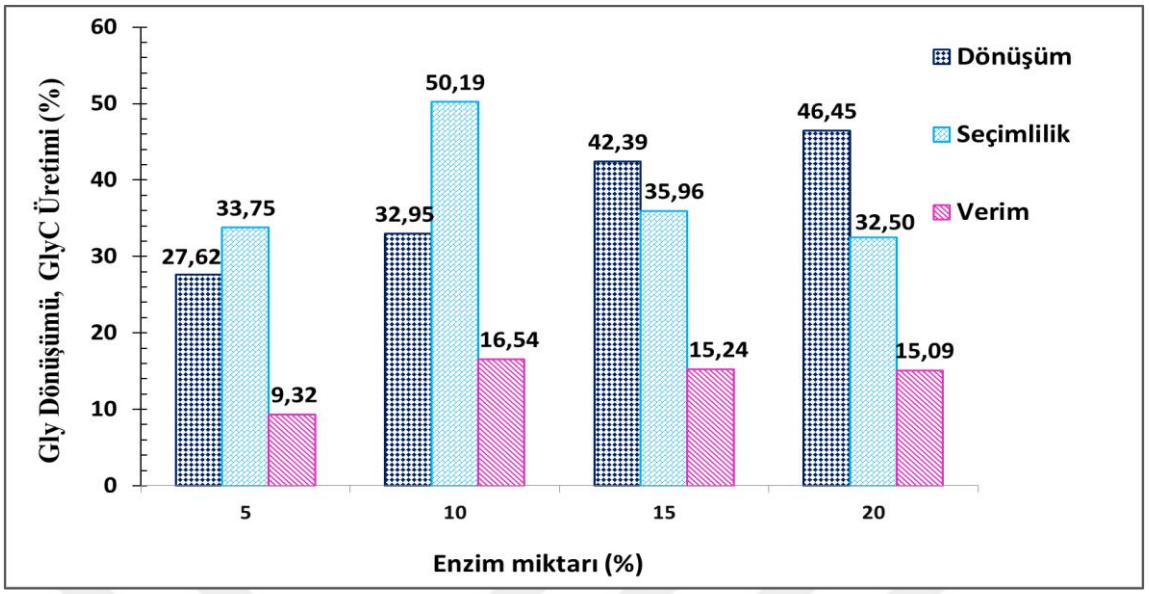
4.4.3. Enzim Miktarı Etkisi

Enzimatik üretimde hem enzimlern maaliyetli olması nedeniyle hem de enzim-substrat kompleksinin oluşmasını sağlayarak tepkime hızını direk etkilemesi nedeniyle enzim derişimi önemli bir parametredir. Yüksek dönüşüm, verim ve seçimlilikte ürün elde etmek için ortama eklenecek olan enzim miktarının da belirlenmesi gerekir.

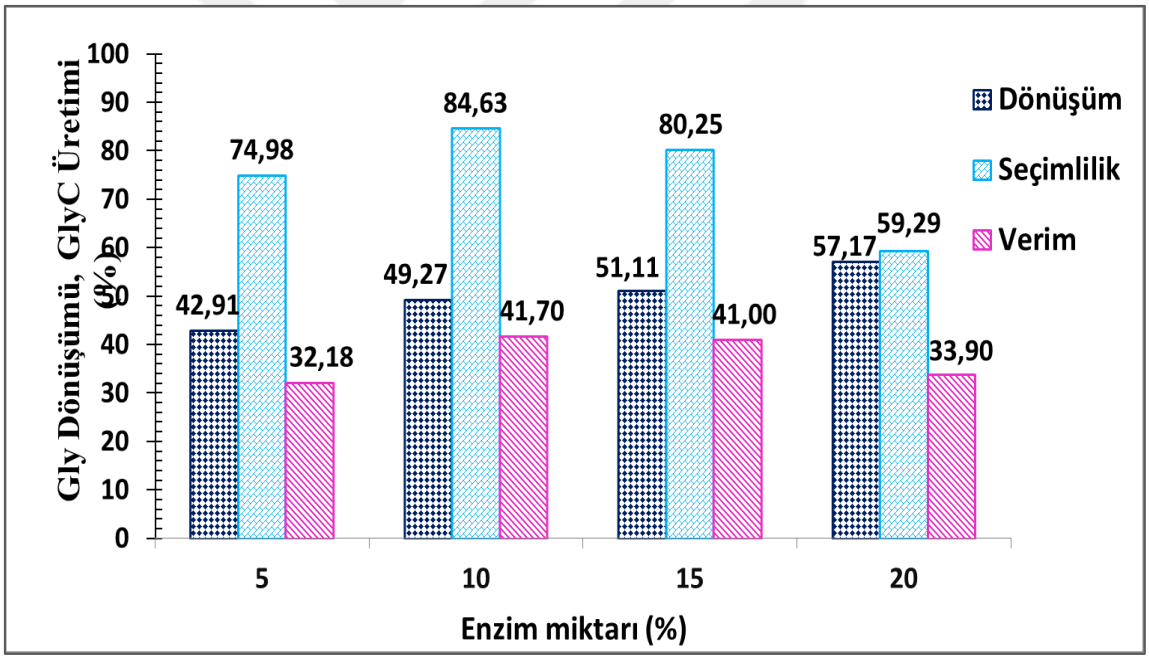
Enzim miktarının Gly dönüşüm ve GlyC üretimine etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.48 ve şekil 4.49'de verilmiştir.

Şekil 4.48.' de görüldüğü gibi tutuklanmış CalB enzimi ile GlyC üretiminde, Gly dönüşümü, artan enzim miktarı ile sürekli artarak ortamda %20 enzim varlığında %46,45 en yüksek değerine ulaşmıştır. GlyC seçicimliği ve verimi ise, enzim miktarının artmasıyla önce artmış, %10 enzim kullanımıyla en yüksek değerlerine (%50 seçimlilik ve (%16,5 verim) ulaşmış, bu değerin üzerindeki enzim miktarlarında ise her ikisi de düşmüştür. Bu sonuçlara göre tutuklanmış CalB enzimi ile GlyC üretimin YYY ile optimizasyonunda, yüksek seçimlilik ve verim değerleri veren %10 enzim miktarı, orta değer olarak belirlenmiştir.

Novozyme 51032 kullanılarak GlyC üretiminde ise, şekil 4.49.'den görüldüğü gibi CalB kullanımına benzer olarak, enzim miktarı arttırılmasıyla Gly dönüşümü sürekli artarak %20 enzim kullanılması durumunda %57 en yüksek değerine ulaşmıştır. %10 enzim kullanımında ise, GlyC seçimliliği (%84.6) ve verimi (%41,7) en yüksek mertebede olmuş, daha fazla miktarda enzim kullanımı CalB'ye benzer olarak seçimlilik ve verimde düşüşe neden olmuştur.



Şekil 4.48. Enzim miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) (9 h, 200 rpm, 60ºC, DMC/Gly: 2/1)



Şekil 4.49. Enzim miktarının GlyC performansına etkisi (Novozyme 51032) (50 ºC, 18 h, DMC/Gly mol oranı: 2/1)

Gerek CalB gerekse Novozyme 51032 enzimlerindeki %10'a kadar hızlı Gly dönüşüm ve seçiciliğindeki artış, enzim-substrat kompleksinin hızlı bir şekilde oluşması ile beraber reaksiyon hızında artış sağlarken (Panadare ve Rathod, 2016), %10'un üzerindeki enzim derişimlerinde seçimliliğin azalmasının nedenleri, enzim-substrat kompleks oluşumunun doyma noktasına gelmesi nedeniyle, daha fazla enzim miktarının

GlyC üretimi için gerekli olmaması ve artan enzim miktarının kütle aktarım kısıtlamalarına neden olmasıdır (Gharat ve Rathod, 2013). Aynı zamanda her iki enzim için artan enzim miktarı ile Gly dönüşümü artmakla beraber yan ürünlerin oluşumunun artmasına bağlı olarak seçimlilik ve verim değerlerinde azalmaya neden olduğu ifade edilebilir.

Organosilika destek malzemesine tutuklanan CalB enzimi varlığında enzim miktarının GlyC üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 2-40 g/L enzim derişim aralığı kullanılarak çözücüsüz ortamda, 24 saat, 50 ºC sıcaklık koşullarında çalışılmış, 10 g/L enzim derişiminde %89 en yüksek dönüşüm elde edilmiş, derişimin 40 g/L'ye arttırılmasıyla GlyC seçimliliğinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle en uygun enzim derişimi 10 g/L olarak alınmıştır. Enzim derişiminin arttırılması tepkime ortamında yan ürünlerin (gliserindikarbonat (GDC) ve digliserintrikarbonat (DGTC)) oluşumuna ve buna bağlı olarak GlyC seçimliliğinin düşmesine neden olmaktadır (Du vd., 2018).

Aspergillus Niger serbest lipazı ile enzimatik GlyC üretiminde enzim derişiminin GlyC üretimine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, %3-26 enzim derişim (w/w) aralığı kullanılarak, 10/1 DMC/Gly mol oranı, 60 ºC sıcaklık ve 48 saat süre ile yapılan deneyler sonunda, %81 Gly dönüşümü ve % 60 GlyC verimi ile optimum enzim derişiminin %12 (w/w) olduğu tespit edilmiştir (Tudorache vd., 2012a).

Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış *Aspergillus niger* lipazı ile GlyC üretimine enzim miktarının etkisinin inclendiği bir diğer çalışmada; %1- %20 (w/w) aralığında enzim miktarı kullanılarak 60 ºC sıcaklıkta 6 saat süre ile yapılan inceleme sonunda, enzim miktarı arttıkça Gly dönüşümü artmış, %5 enzim kullanımıyla %45 en yüksek dönüşüm değerine ulaşmış, enzim miktarının %7,5 değerinin üzerine çıkarıldığında ise dönüşüm düşmüştür. GlyC seçimliliği ise enzim miktarının %7,5'a kadar arttırılmasıyla %90 değerine ulaşmış ve artan enzim miktarları ile seçimlilik sabit kalmıştır. Bu nedenle en uygun enzim miktarı %5 olarak seçilmiştir (Tudorache, Negoi, Protesescu, vd., 2014).

4.4.4. Tepkime Süresinin Etkisi

Enzimatik tepkimelerde sürenin kısa olmasının gerek işletim maliyetlerinin azaltılması gerekse uzun süreli tepkimelerde oluşabilecek yan ürün kaynaklı ürün seçiciliğinin düşmesini önlemek için tepkime süresi önemli bir parametredir.

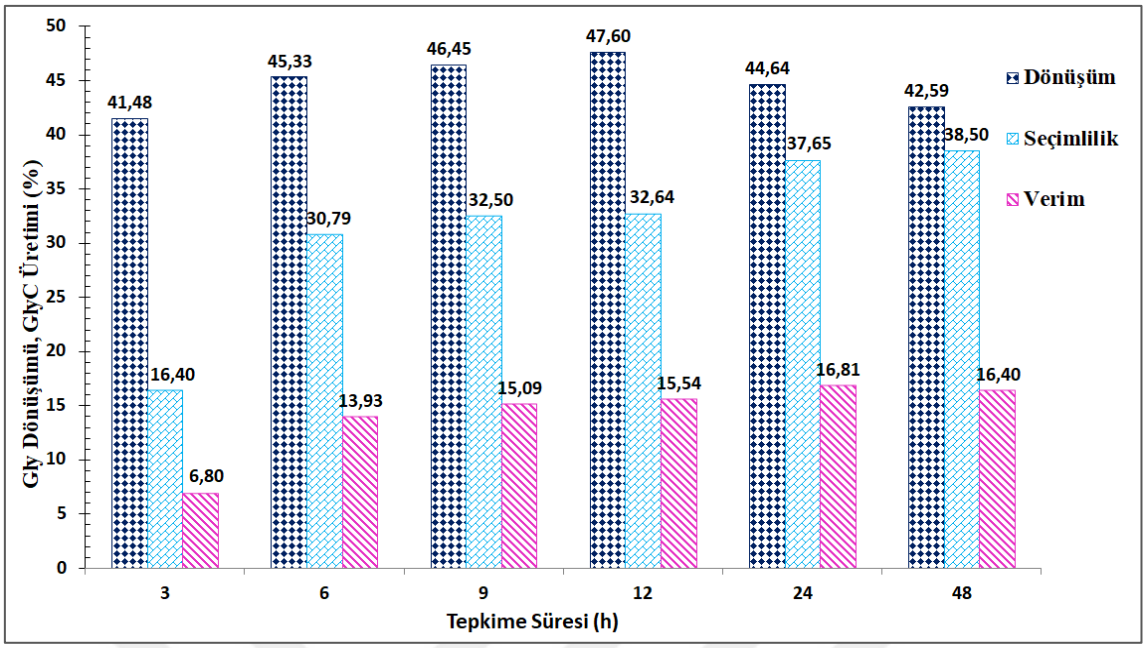
Tepkime süresinin Gly dönüşümü, GlyC seçimiliği ve verimine etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.50 ve şekil 4.51'da verilmiştir.

CalB kullanımında, şekil 4.50.'de görüldüğü gibi, tepkime süresini artmasıyla Gly dönüşümü önce artmış 12 saatte en yüksek değerine (%47,6) ulaşmış, süreinin daha da artırılmasıyla dönüşüm değerleri düşmüştür. GlyC seçimliliği ve verimi ise tepkime süresinin artmasıyla sürekli artmış, 24 saat sonunda elde edelen GlyC seçimliliği %37,6, verim ise %16,8 olarak gözlemlenmiştir. 48 saat süre sonunda ise ulaşılan seçimlilik ve verimi değerleri ise bu değerlere çok yakın olması nedeniyle CalB kullanılarak GlyC üretimi için 24 saat tepkime süresi uygun olarak belirlenmiştir.

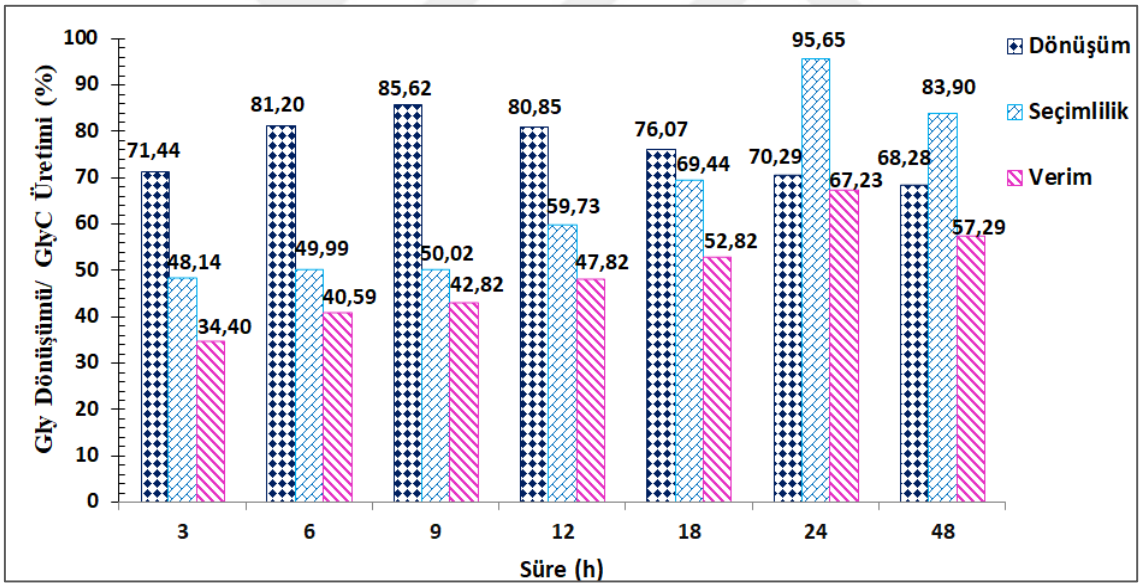
Novozyme 51032 kullnımında ise şekil 4.51'da görüldüğü gibi, tepkime süresinin artmasıyla 9 saatte Gly dönüşümü (%86) en yüksek değere ulaşmış, daha sonra artan süre ile dönüşümde düşme gözlenmiştir. GlyC verim ve seçimliliği ise artan tepkime süresi ile artarak 24 saate en yüksek değerlere (%67 verim ve %96 seçimlilik) ulaşmıştır, sürenin artmasıyla bu değerlerde düşme gözlenmiştir. Bu nedenle en uygun tepkime süresinin 24 saat olduğu tespit edilmiştir.

24 saat sonundaki GlyC seçimliliğindeki düşmenin ortamda oluşan yan ürün (digliserin trikarbonat) nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. Nitekim literatürde de seçimlilikteki bu düşüş için benzer bir yorum yapılmıştır (Tudorache vd., 2014b). Çalışmamızda, GlyC ve Gly analizinin gerçekleştirildiği GC cihazında var olan DB-wax kolonu ile her iki yan ürünün de analiz edilememesi nedeniyle, yan ürün üretimine ait kantitatif analiz yapılamamıştır.

Manyetik yapıdaki organo silika desteğine tutuklanmış Calb ile GlyC üretimine tepkime süresinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 50 ºC sıcaklık, 10 g/L enzim derişimi (w/w (enzim/Gly+DMC)), 20/1 DMC/Gly mol oranı ve çözücüsüz ortamda elde edilen %94 GlyC seçiciliği için uygun tepkime süresi 24 saat olarak belirlenmiştir (Du vd., 2018).



Şekil 4.50. Tepkime süresinin GlyC üretimine etkisi (CalB) (DMC/Gly mol oranı: 2/1, 60 ºC, %20 wt enzim)



Şekil 4.51. Tepkime süresinin GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) (DMC/Gly mol oranı: 6/1, 50 ºC, %10 wt enzim)

Silika nanokürecik ve manyetik F_3O_4'den oluşan bir desteğe tutuklanmış CalB enzimi kullanılarak GlyC üretiminin incelendiği bir diğer çalışma, tert-butanol ortamında, 50º C sıcaklık, 10/1 DMC/Gly mol oranı, %6,1 enzim w/w, enzim/(Gly+DMC) koşullarında yapılmış, 24 saat tepkime süresi sonunda %85 Gly dönüşümü ve %65 GlyC seçimliliğine ulaşılmıştır (Gao vd., 2017).

Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış *A.niger* enzimi ile ham gliserinden GlyC üretiminin yapıldığı başka bir çalışmada tepkime süresinin etkisi incelenmiş, 1-24 saat sürelerde, 10/1 DMC/Gly mol oranı ve %5 (w/w) enzim kullanılarak deneyler yapılmıştır. Tepkime süresinin arttırılmasıyla, GlyC seçimliliğinin önce artıp sonra azaldığı, 6 saat sonunda en yüksek %45 Gly dönüşüm ve %92 GlyC seçimliliği belirlenmiştir. Tepkime süresinin 24 saat olması durumunda Gly dönüşümü (%45.3) sabit kalırken GlyC seçimliliği (%60) düşmüş ve en uygun tepkime süresinin 6 saat olduğu analiz edilmiştir (Tudorache vd., 2014b).

4.4.5. Su Miktarının Etkisi

Enzimatik tepkimelerde bir miktar suyun varlığı direk enzim aktivitesi ile ilişkisi olduğundan kritik bir öneme sahiptir. Birçok lipazın aktif merkezinde bulunan ve lid adı verilen helikal kapak vardır. Bu helikal kapağın yağ-su arayüzünde katalitik üçlü üzerindeki hareketi ile lipaz aktifleşmekte (Shuler and Kargı, 1992; Panadare ve Rathod, 2016, Maruyama vd., 2000) ve etkili bir şekilde çalışmaya uygun hale gelmektedir.

Gly dönüşümü, GlyC seçimiliği ve verimine ortama eklenen su miktarının etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.52 ve şekil 4.53'de verilmiştir.

CalB kullanımımında, ortama su eklenmemesi durumunda, en yüksek Gly dönüşümü (%60,9) elde edilmiş ve artan su miktarları ile dönüşüm değerleri azalarak ortama %1,2 su eklenmesiyle %57,5'a düşmüştür. GlyC seçimliliği ve verimi ise, ortama %0,8 su eklenmesiyle en yüksek değerlerde (%47,8 seçimlilik, %28 verim) olmuş, artan su miktarı ile bu değerlerde de biraz düşme gözlenmiştir. Buna göre su eklenmemesi durumuna göre dönüşüm değeri biraz düşmüş olsa da %0,8 su eklenerek GlyC veriminde % 3 artış tespit edilmiştir (Şekil 4.52)

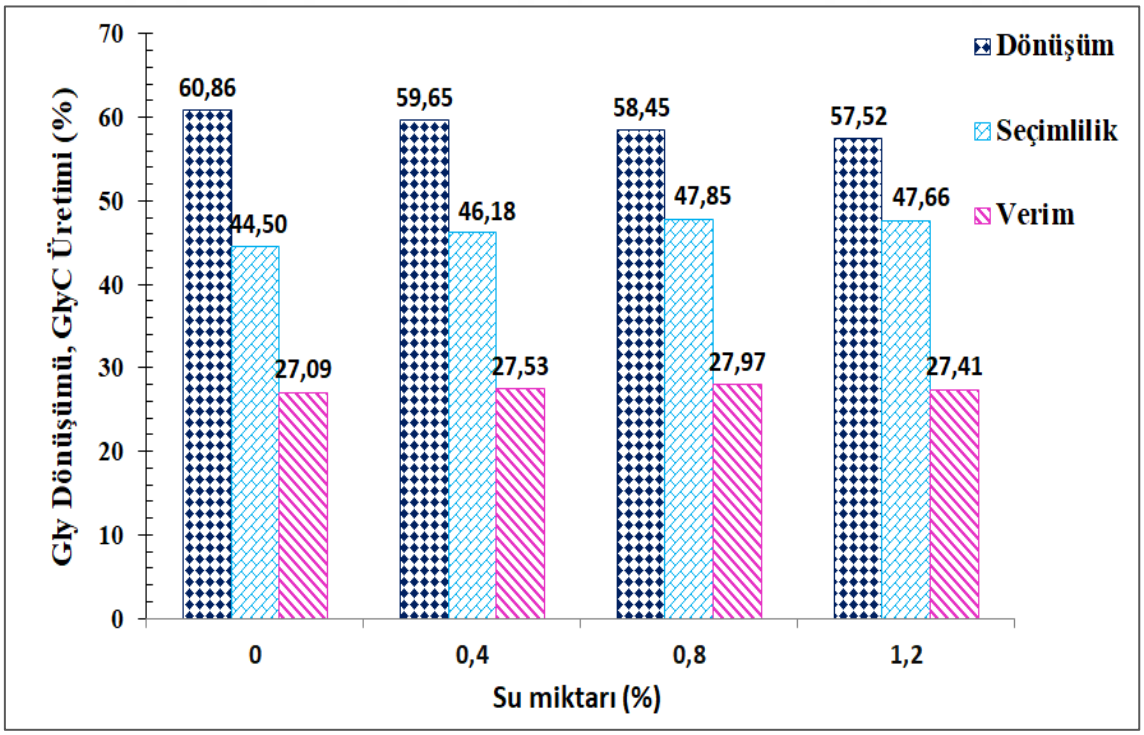
Novozyme 51032 kullanılarak GlyC üretiminde, ortama eklenen su miktarının etkisini veren Şekil 4.53'den görüldüğü gibi bu değerin % 1,2'e çıkarılmasıyla Gly dönüşümünün (%80) yaklaşık sabit kaldığı ve GlyC seçimliliğinin ortama su eklenmemesi durumunda, %100'den suyun %1,2 mertebesinde eklenmesiyle %98'e düştüğü gözlemlenmiştir. Ortama hiç su eklenmemesi durumunda GlyC verimi %80

olmuş, su varlığında bu değerde de az miktar düşme gözlenmiştir. Bu nedenle ortama su eklenmeden GlyC üretiminin uygun olduğu analiz edilmiştir.

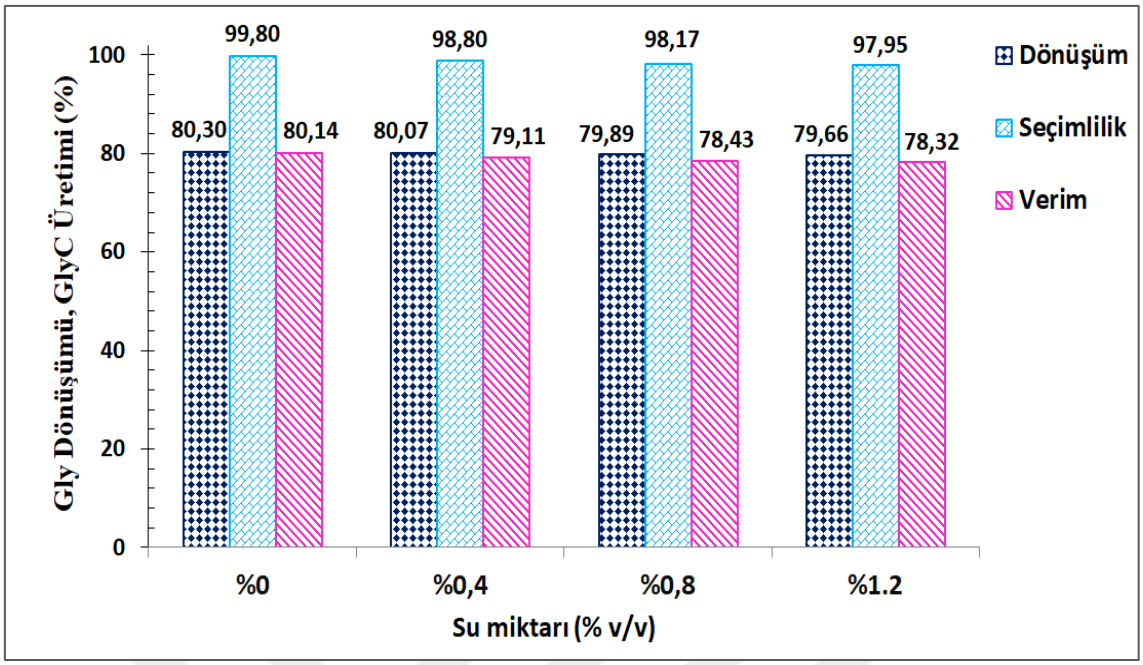
Lipazlarla transesterleşme reaksiyonun gerçekleştirildiği biyodizel üretimine ait farklı literatürler analiz edildiğinde, ortama su eklenmesinin transesterleşme tepkimesini olumsuz yönde etkilediği çalışmalara da rastlanmıştır (Kumari vd., 2009; Seong vd., 2011).

Novozyme 435 kullanılarak GlyC üretimine su miktarının etkisinin incelendiği bir çalışmada, %0-1,25 (v/v) aralığında ortama su eklenerek, asetonitril çözücü ortamında, 48 saat tepkime süresi, 60 ºC sıcaklık, 2/1 DMC/Gly mol oranı, 180 rpm karıştırma hızı, 75 g/L enzim miktarı ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Ortama su eklenmemesi durumunda en yüksek Gly dönüşümü (%77,6) elde edilmiş, su miktarının arttırılmasıyla dönüşüm değerlerinin düşmesi nedeniyle ortama su eklenmesi olmadan üretim yapılması önerilmiştir (Jung vd., 2012).

Aspergillus türü bir lipaz ile GlyC üretimine ortama eklenen suyun etkisinin incelendiği bir çalışmaya bilgimiz dâhilinde rastlanmamıştır.



Şekil 4.52. Su miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) (DMC/Gly mol oranı: 3/1, 50 ºC, %10 wt enzim miktarı, 24h)



Şekil 4.53. Su miktarının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) (DMC/Gly mol oranı: 10/1, 50 ºC sıcaklık, %10 wt enzim, 24h)

4.4.6. Çözücü Etkisi

GlyC üretiminde kullanılan girdilerden Gly hidrofilik ve DMC ise hidrofobik yapıya sahiptir ve bu nedenle her iki kimyasal sadece kısmi olarak birbiri ile karışabilmekte ve Gly ile DMC arasında iki faz oluşumu meydana gelmektedir (Lanjekar ve Rathod, 2013). Bu nedenle tepkimelerde tepkime ortamının homojen olmasını sağlamak ve kütle aktarımını iyileştirmek için çözücü kullanılabilmektedir.

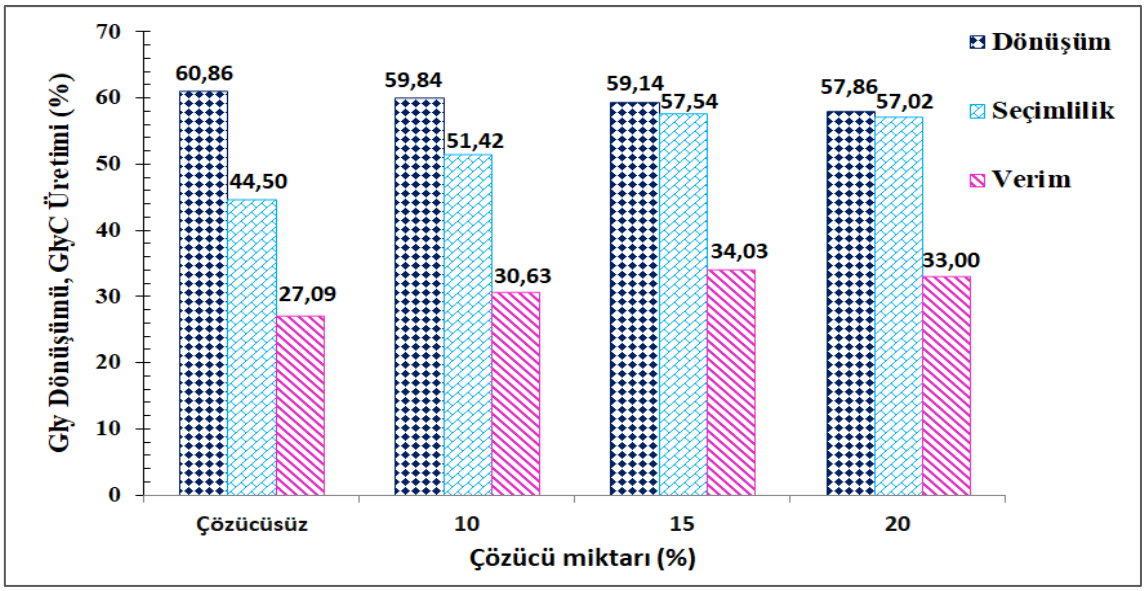
Gly dönüşümü, GlyC seçimiliği ve verimine çözücü olarak ter-butanol kullanımının etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.54 ve şekil 4.55'de verilmiştir.

CalB kullanımında Şekil 4.54.' de görüldüğü gibi, çözücüsüz ortam kullanımında en yüksek dönüşüm %60,9 olarak elde edilmiş, çözücü kullanımı ile az miktarda düşüş gözlenmiştir. GlyC seçimliliği ve verimi ise çözücü miktarın %15'e (v/v) arttırılmasıyla en yüksek değerlere (%57,54 seçimlilik, %34 verim) ulaşmış, %20 oranında çözücü kullanımıyla bu değerlerin yaklaşık olarak sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Çözücü olarak ortama tert-butanol eklenmesinin GlyC veriminde % 25,6'lik bir artışa neden olduğu analiz edilmiştir.

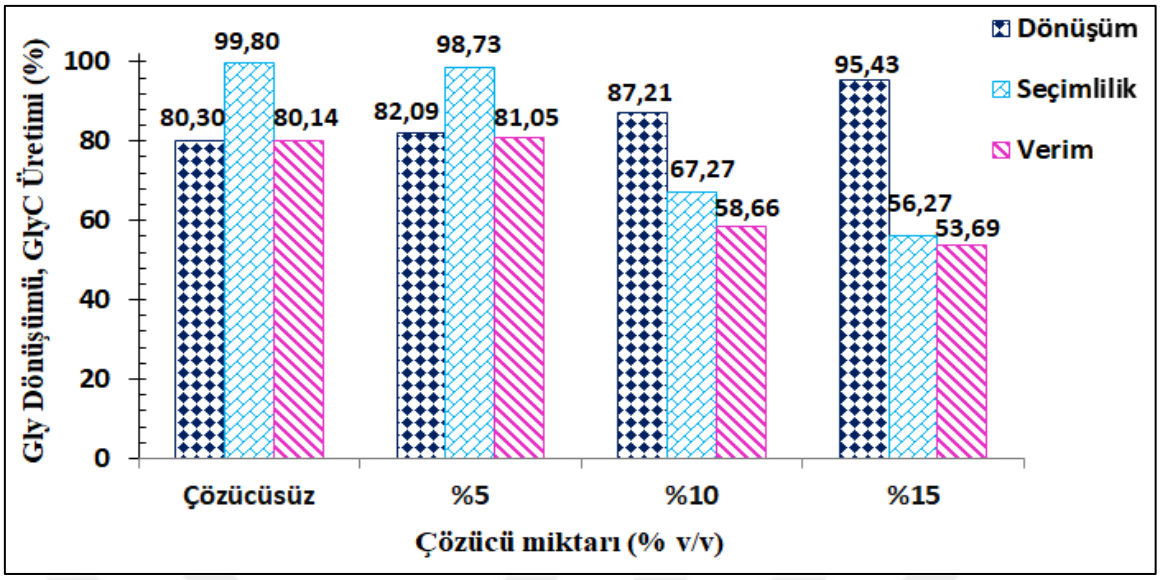
Novozyme 51032 kullanımında ise, Şekil 4.55.'de görüldüğü gibi, çözücü miktarının arttırılmasıyla, Gly dönüşümünün artarak %20 çözücü varlığında %95,4 en yüksek değere ulaşmıştır. En yüksek GlyC seçicimliliği (%99.8) ve GlyC verimi (%80.1) ise çözücüsüz ortam kullanımında elde edilmiş, bu koşullardaki Gly dönüşümü ise %80.3 olmuştur. Çözücü varlığı seçimlilik ve verim değerlerini düşürmüştür. Tepkime sonrası çözücü uzaklaştırma ve geri kazanım işlemler de düşünüldüğünde Novozyme 51032 için çözücüsüz ortam kullanımının daha uygun olduğu değerlendirilmiştir.

Novozyme 435 kullanılarak GlyC üretimine çözücü etkisinin analiz edildiği bir çalışmada, çözücüsüz ve çözücülü ortamda (tert-butanol, hekzan, toluen, 1 mL (%100 v/v, çözücü miktarı/ DMC+Gly), 50 ºC sıcaklık, 12 saat tepkime süresi, 350 rpm, %2 (wt) enzim ve 2:1 DMC/Gly mol oranı koşullarında inceleme yapılmıştır. Çözücüsüz ortamda Gly dönüşümü %49 iken, tert-butanol kullanımı ile %97, hexan ve toluen varlığında ise %55 Gly dönüşümü elde edilmiştir. Buna göre, GlyC üretim ortamında çözücü olarak tert-butanol kullanılmasının uygun olduğu belirtilmiştir (Cushing ve Peretti, 2013).

A.niger enziminin serbest ve tutuklanmış hali ile enzimatik GlyC üretimine ait aynı araştırma grubu tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda çözücü yerine yüzey etken maddesi (surfactant) kullanılmıştır.



Şekil 4.54. Çözücü miktarının GlyC üretimine etkisi (CalB) (DMC/Gly mol oranı: 3/1, 50 ºC, %10 wt enzim miktarı, 200 rpm, 24h, çözücü: tert-butanol)



Şekil 4.55. Çözücü miktarının GlyC üretimine etkisi (Novozyme 51032) (DMC/Gly mol oranı: 10/1, %10 wt enzim, 50 ºC, 200 rpm, 24 h, çözücü: tert-butanol)

Manyetik nanopartikül desteğe tutuklanan *A. niger* lipazı ile GlyC üretimine çözücü kullanımının etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, atık gliserin ile, 60 ºC sıcaklık, 10/1 DMC/Gly mol oranı, 6 saat tepkime süresi ile gerçekleştirilen deneylerde çözücüsüz ortam kullanımında, GlyC verimi % 47,5 olarak elde edilirken, ortama %0,1 Tween 20 çözücü eklenmesi ile % 87,7'ye yükselmiştir (Tudorache vd., 2017). Hidrofilik yapıdaki DMC ve hidrofobik yapıdaki Gly nedeniyle tepkime ortamında iki faz oluşumu kütle aktarım kısıtlamalarına neden olmaktadır (Cushing ve Peretti, 2013; Lanjekar ve Rathod, 2013). Hidrofilik yapıya sahip tert-butanolün tepkime ortamına eklenmesi, iki faz oluşumu kısmen önler, çözeltideki reaktanların daha iyi karışmalarını sağlar, böylece kütle aktarım kısıtlamasının önlenmesine katkı sağlar (Cushing ve Peretti, 2013).

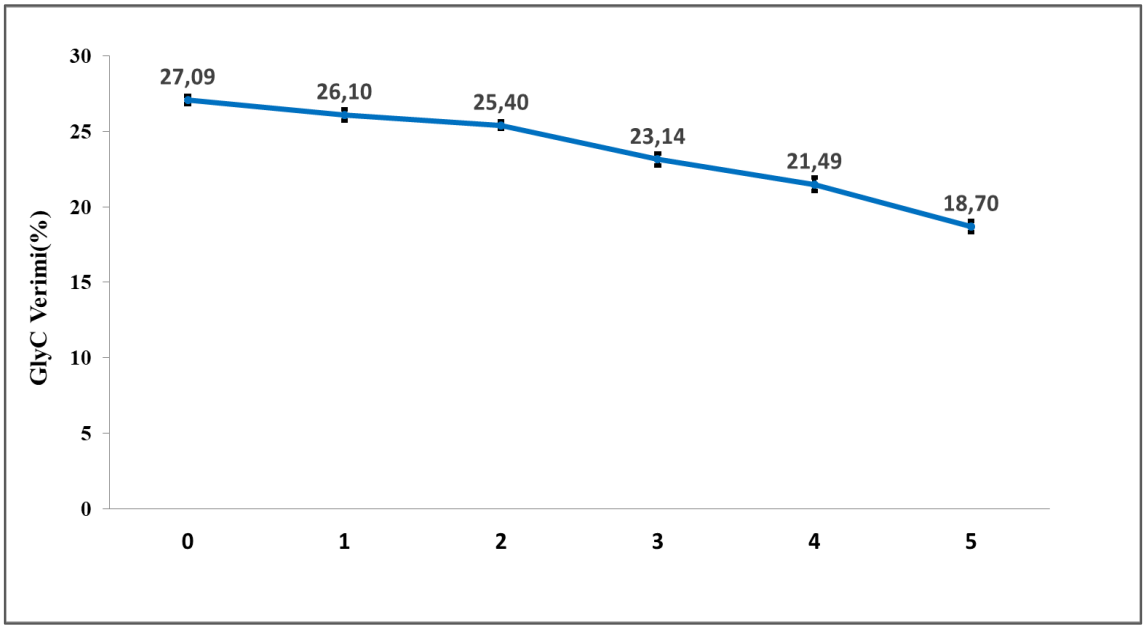
Novozyme 435 ile GlyC üretiminde, Gly'nin hidrofobik yapısı nedeniyle enzimin etrafında tabaka oluşturarak, enzim ile substrat arasında bir bariyer oluşturduğu, böylece kütle aktarım kısıtlamasına neden olduğunu bildiren literatür çalışmaları bulunmaktadır. Enzim yüzeyindeki gliserin katmanının uzaklaştırılması için yüzey aktif maddeleri (Tween 20 ve Tween 80) ve silika jel etkisinin incelendiği bir çalışmada, 10/1 DMC/Gly mol oranı, 60º C sıcaklık, 0,0275 g enzim (%5 wt, enzim kütlesi/Gly kütlesi), 1,1 g silika jel ve 0,55 g (%9,9) yüzey aktif madde kullanılarak 48 saat tepkime süresi ile deneyler yapılmıştır. Gly dönüşümü, silika jel ve yüzey aktif madde eklenmeden

%11,5 iken, silika jel varlığında %100 değerinde olmuş, Tween 20 ile %45 ve Tween 80 ile %75 olarak belirlenmiştir (Lee vd., 2010).

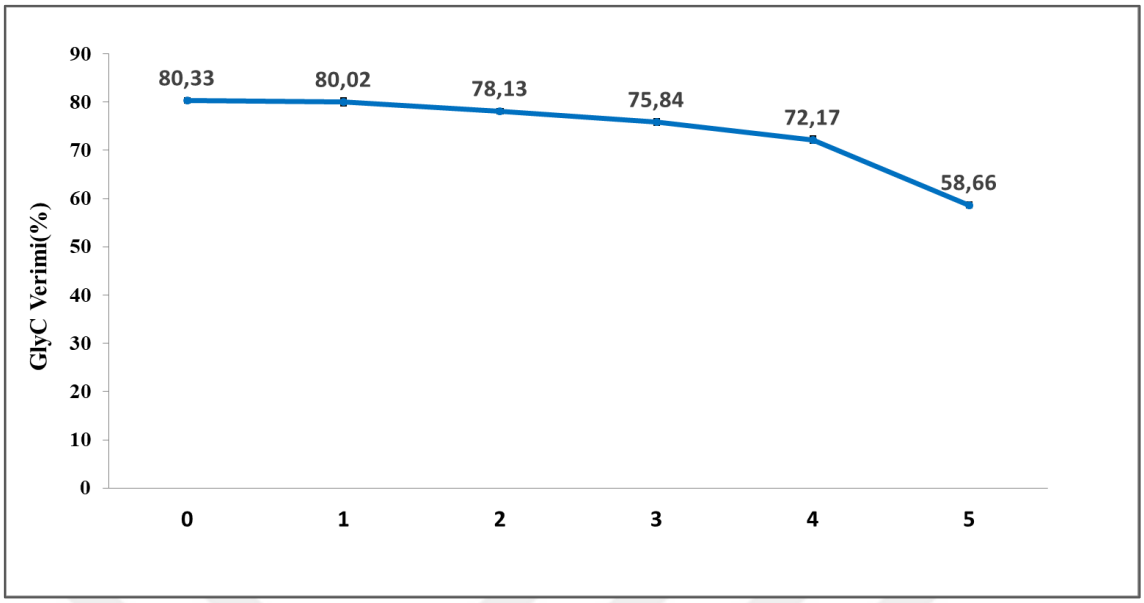
4.4.7. GlyC Üretiminde Tutuklanmış Enzimin Tekrar Kullanımı

Enzimler pahalı biyokatalizörler olmaları nedenle enzim kullanımlarını ekonomik kılmak için aktivitelerini fazla kaybetmeden tepkime ortamında tekrar tekrar kullanılabilirlikleri önemlidir. Tekrar kullanım öncesinde tutuklanmış destek malzemesinin farklı çözücüler kullanılarak destek üzerindeki ürün, substrat ya da çözücülerin uzaklaştırılması için sıklıkla asetonun kullanıldığı (Lanjekar ve Rathod, 2013; Min ve Lee, 2011; Waghmare vd., 2015) ve bu kimyasalın dışında DMC (Du vd., 2018) ya da tert-butanol (Cushing ve Peretti, 2013) kullanıldığı literatür çalışmaları mevcuttur.

Gly verimine tutuklanmış enzimin tekrar kullanımının etkisi CalB ve Novozyme 51032 için sırasıyla, şekil 4.56 ve şekil 4.57'de verilmiştir. CalB ile GlyC üretiminde, enzimin beş tekrarlı kullanımı sonunda, GlyC veriminin % 31 oranında bir düşüşle % 27'den %18,7'ye azaldığı tesbit edilmiştir (şekil 4.56). Novozyme 51032 kullanımında ise bu düşüş %28 mertebesinde olmuş, GlyC veriminin % 80,3'den %58,7'ye düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.56. Tekrar kullanılabilirliğin GlyC verimine etkisi (CalB) (DMC/Gly mol oranı: 3/1, 50 ºC, %10 wt enzim, 24 h)



Şekil 4.57. Tekrar kullanılabiliğin GlyC verimine etkisi (Novozyme 51032) (DMC/Gly mol oranı: 10/1, 50 ºC, %10 wt enzim, 24 h)

Ticari tutuklanmış Novozyme 435 enziminin tekrar kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada, tepkime sonrası ara yıkama işlemler aseton kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 60 ºC sıcaklık, %13 enzim (wt), 3/1 DMC/Gly mol oranı ve 25 kHz ultrasonik banyoda 10 dk arayla dur kalk çalışması ile gerçekleştirilen üretim sonunda, Gly dönüşümünün ilk kullanımda %100 iken, beş tekrar kullanım sonunda %50 ve altı tekrar kullanım sonunda % 35'e düştüğü tespit edilmiştir (Waghmare vd., 2015). Novozyme 435 enziminin kullanıldığı ve tekrar kullanılabilirliğin analiz edildiği bir diğer çalışmada, beş tekrar kullanım sonunda enzimin aktivitesinin %85'ini koruduğu analiz edilmiştir (Cushing ve Peretti, 2013).

Manyetik nanoparçacığa tutuklanmış *A.niger* lipazının tekrar kullanılabilirliğinin analiz edildiği başka bir çalışmada ise, 60ºC sıcaklık, 6 saat süre ile deneyler yapılmış, 15 tekrar kullanım sonunda Gly dönüşümünün %45,8 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Tudorache vd., 2012b).

4.4.8. CalB ile GlyC Üretiminin YYY ile Optimizasyonu

Bu bölümde CalB kullanılarak Gly ve DMC'den GlyC üretiminde etkili olan parametrelerin etkisi incelenerek YYY'e göre optimizasyon yapılmıştır

YYY'de öngörülen deney seti ve elde edilen sonuçların ortalama değerleri üzerinden elde edilen sonuçlar üç yanıt değişkeni (Gly dönüşüm, GlyC seçimlilik ve GlyC verim) için Tablo 4.6.'da verilmiştir. Optimizasyon bu yanıt değişkenleri için ayrı ayrı incelenmiş ve aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4.6. GlyC üretimine ait YYY tarafından önerilen üretim koşulları ve deneysel sonuçlar

Deney Seti	**Sıcaklık (ºC)**	**DMC/Gly mol oranı**	**Enzim Miktarı (%)**	**Gly Dönüşümü (%)**	**GlyC Seçimliliği (%)**	**GlyC Verimi (%)**
1	60	2	5	53,9	27,20	14,66
2	40	2	15	47,8	19,31	9,23
3	40	4	15	60,21	25,82	15,24
4*	50	3	10	63,14	45,17	28,52
5*	50	3	10	63,41	45,42	28,80
6	60	2	15	65,87	32,82	21,62
7*	50	3	10	63,25	45,27	28,63
8	33,18	3	10	50,78	28,8	15,21
9	50	4,68	10	62,69	15,84	9,93
10	40	4	5	55,23	24,50	13,53
11	66,82	3	10	66,48	32,19	21,4
12	50	3	18,41	64,7	28,21	17,42
13*	50	3	10	63,49	45,47	28,74
14*	50	3	10	63,30	45,3	28,67
15	60	4	5	55,6	15,72	8,74
16	50	3	1,59	47,87	21,62	10,35
17	40	2	5	43,29	18,66	7,49
18*	50	3	10	63,52	45,4	28,84
19	50	1,32	10	52,07	19,62	10,22
20	60	4	15	71,10	21,14	15,03

*: merkez noktadaki koşul

Gly Dönüşümünün YYY ile Optimizasyonu

GlyC üretiminde yanıt olarak Gly dönüşümüne ait YYY ile önerilen modeller Tablo 4.7.'da verilmiştir. YYY ile önerilen kuadratik model, p değeri<0,0001 ($p<0.05$) ile en etkileşimli model olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Gly dönüşümüne ait YYY ile önerilen model tablosu

Kaynak	**Ardışık p-değeri**	**Uyumsuzluğun p-değeri**	**Düzeltilmiş R^2**	**Tahmini R^2**	
Lineer	<0,0001	<0,0001	0,7091	0,6275	
2FI	0,1785	<0,0001	0,7514	0,5249	
Kuadratik	**<0,0001**	0,004	**0,9918**	**0,9663**	**Önerilen**
Kübik	0,0149	0,0029	0,9978	0,8687	

Gly dönüşümünde kuadratik modele ait etkileşim denkleminin oluşturulması için Gly dönüşümünü etkileyen parametreler (A: Sıcaklık; B: DMC/Gly mol oranı, C: Enzim miktarı) ile bu parametrelerin birbiri ile etkileşimi (AB, AC, BC) ve parametrelerin kendileri ile olan etkileşimine (A^2, B^2, C^2) ait katsayılar ile ilgili katsayıların F ve p değerlerini veren ANOVA sonuçları Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Gly dönüşümüne ait kuadratik modele uygun ANOVA tablosu

Kaynak	**Katsayı Tahmini**	**Karelerin Toplamı**	**Df**	**F-Ddeğeri**	**p-değeri**
Model	68,37	1069,47	9	257,06	<0,0001
A- Sıcaklık	4,86	322,32	1	697,28	<0,0001
B-DMC/Gly Mol Oranı	3,60	176,76	1	382,38	<0,0001
C-Enzim Miktarı	4,78	311,92	1	674,77	<0,0001
AB	-2,18	37,96	1	82,12	<0,0001
AC	2,25	40,42	1	87,43	<0,0001
BC	0,4992	1,99	1	4,31	0,0645
A^2	-1,76	44,83	1	96,98	<0,0001
B^2	-2,21	70,12	1	151,69	<0,0001
C^2	-2,59	96,88	1	209,59	<0,0001

Std. Sap.= 0,6799, R^2=0,9957, Düzenlenmiş R^2=0,9918, Tahmini R^2=0,9963

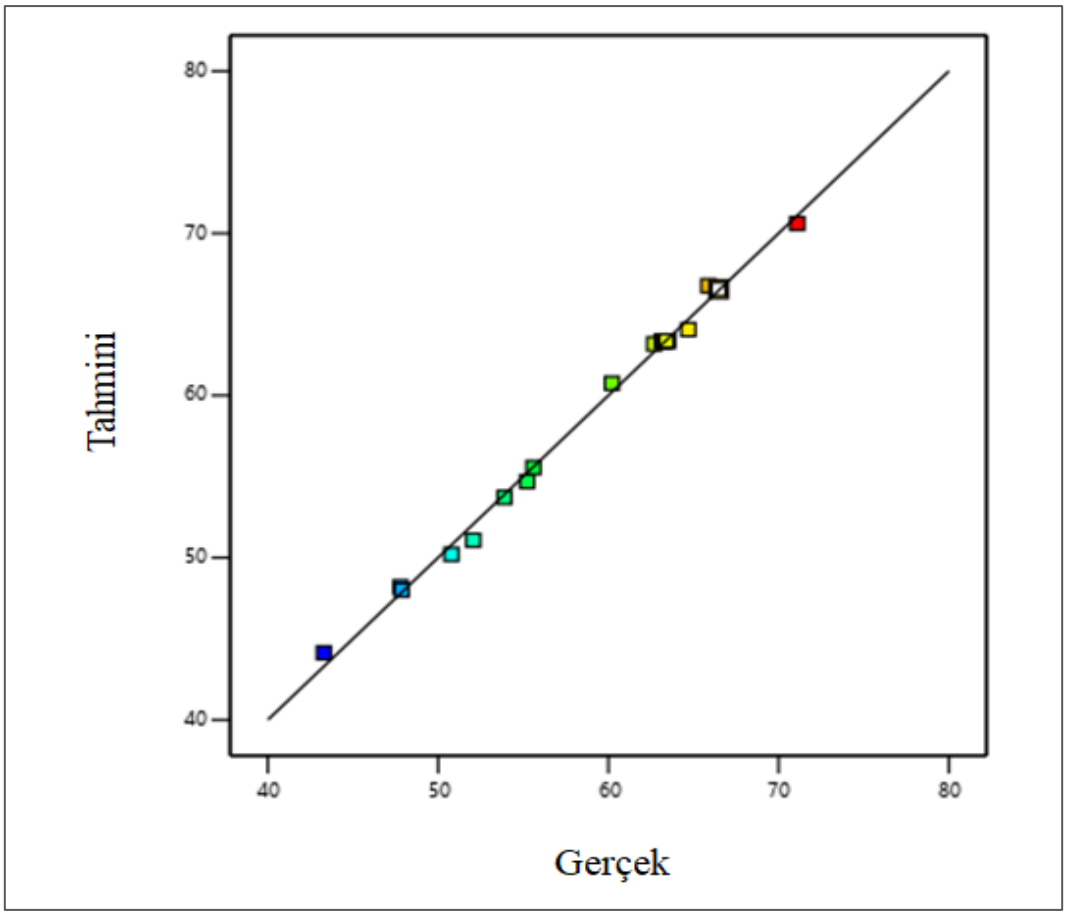
Kuadratik model için hesaplanan etkileşime ait Tablo 4.8.'de görülen faktör ya da etkileşimin Gly dönüşümüne etkisi p değerine bakılarak değerlendirilmektedir. %95 güven aralığında, p değerinin <0,05 olması etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Tablo 4.8. incelendiğinde modelin F oranı 257,06 olup, p-değerinin<0,0001 (<0,05) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Parametreler p değerine göre analiz edildiğinde ise; Gly dönüşümüne ait modeli anlamlı kılan parametrelere (p<0,0001) göre, incelenen üç parametrenin (sıcaklık, DMC/Gly mol oranı, enzim miktarı) de etkili olduğu; ikili etkileşimlerde ise sıcaklık-DMC/Gly mol oranı ile sıcaklık-enzim miktarı etkili iken üç parametrenin kendileri ile olan etkileşimlernin (A^2, B^2 ve C^2) de anlamlı olduğu gözlemlenmiştir.

Gly dönüşümüne (X_{Gly}) kuadratik modeli anlamlı kılan parametreler temel alınarak oluşturulan etkileşim denklemi (4.1)'de verilmiştir.

$$X_{Gly} = 68{,}37 + 4{,}86 \cdot A + 3{,}60 \cdot B + 4{,}78 \cdot C - 2{,}18 \cdot AB + 2{,}25 \cdot AC - 1{,}76 \cdot A^2 - 2{,}21 \cdot B^2 - 2{,}59 \cdot C^2 \quad (4.1)$$

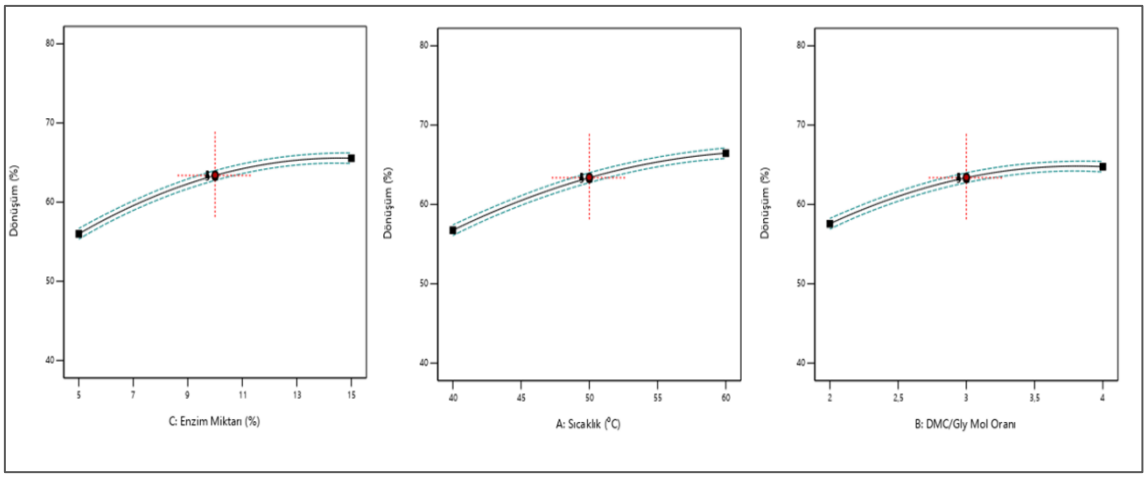
Modelin regresyon katsayısı R^2 değeri 0,9957 olup, modelden değişimi ölçen düzenlenmiş R^2 0,9918 ve tahmini R^2 ise 0,9963'dir. Düzenlenmiş R^2 ile tahmini R^2 arasındaki farkın (0,0045) 0,2'den küçük olması, girilen değerlerin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.58.'da Gly dönüşümüne ait hataların dağılım eğrisi yeralmaktadır. Kuadratik modelin hata dağılımları analiz edildiğinde sabit varyansla dağıldığını ve bu da oluşturulan modelin güvenirliğini göstermektedir.



Şekil 4.58. Gly dönüşümüne ait hataların dağılım eğrisi

Her bir parametrenin (sıcaklık, DMC/Gly mol oranı, enzim miktarı) Gly dönüşümüne etkileri model denklem yardımıyla tek tek incelenerek, grafikler YYY'ne göre çıkarılmıştır. Şekil 4.59.'de her bir parametrenin Gly dönüşümüne etkisi verilmiş ve grafikler incelenen parametrenin alt ve üst değerli ile diğer parametrenin merkez noktası temel alınarak hazırlanmıştır.

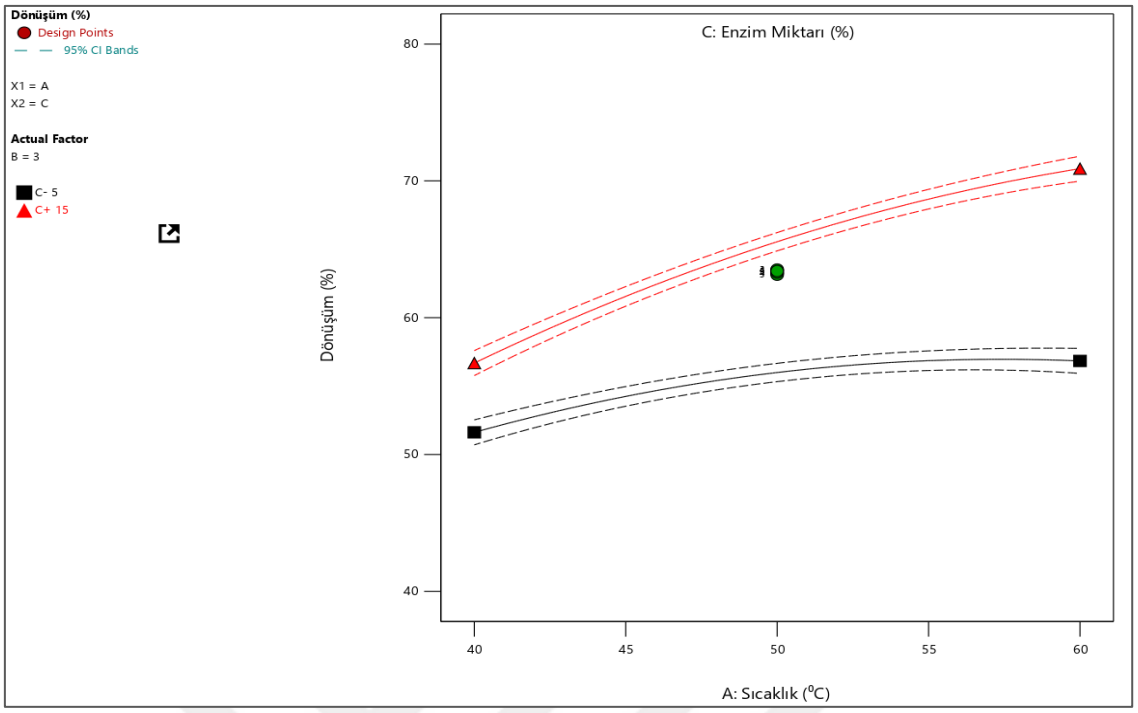


Şekil 4.59. Parametrelerin Gly dönüşümüne etkisi, A) Enzim miktarı, B) Sıcaklık, C) DMC/Gly mol oranı

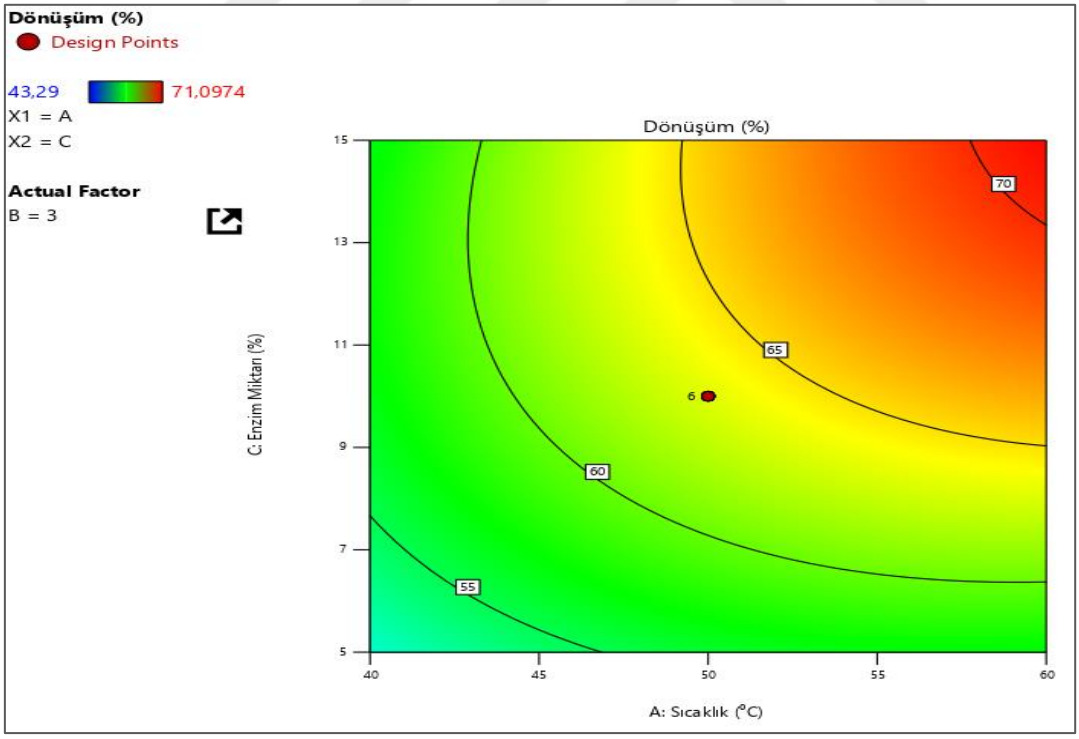
Şekil 4.59.'de görüldüğü gibi Gly dönüşümüne en çok sıcaklık daha sonra enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranı etki etmektedir. Sıcaklık, enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranı arttıkça dönüşümün arttığı görülmektedir.

DMC/Gly mol oranı orta noktada (3/1 DMC/Gly mol oranı) iken, sıcaklık ve enzim miktarının ikili etkileşiminin Gly dönüşümüne etkisi Şekil 4.60.'de, bu etkinin iki boyutlu grafiği ise Şekil 4.61.'da yeralmaktadır. Üç boyutlu grafik olarak ise EK-C1'de görülmektedir. DMC/Gly mol oranı orta değerde (3/1 DMC/Gly) iken, %5 enzim miktarında sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye arttırılmasıyla Gly dönüşümü hafif artış eğiliminde iken, %15 enzim miktarında sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye çıkarılmasıyla Gly dönüşümü artmıştır. Parametrelerin orta değerlerinde elde edilen dönüşüm (%63) değerine ise %15 enzim miktarı kullanımında ve sıcaklığın 48 ºC'ye yükseltilmesiyle ulaşılmıştır (Şekil 4.60). 60 ºC sıcaklık, %15 enzim kullanılarak orta değere karşı gelen dönüşüm değeri aşılarak %70 dönüşüm değerine ulaşılmıştır.

Şekil 4.61. incelendiğinde Gly dönüşüm değerleri, sabit enzim derişiminde sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye artmasıyla artmaktadır. Benzer şekilde sıcaklık sabit tutularak enzim derişiminin %5'den %15'e yükseltilmesi durumunda dönüşümün yine arttığı gözlemlenmiştir, 60 ºC sıcaklık ve %15 enzim kullanımıyla dönüşüm %70'in üzerinde olmuştur.



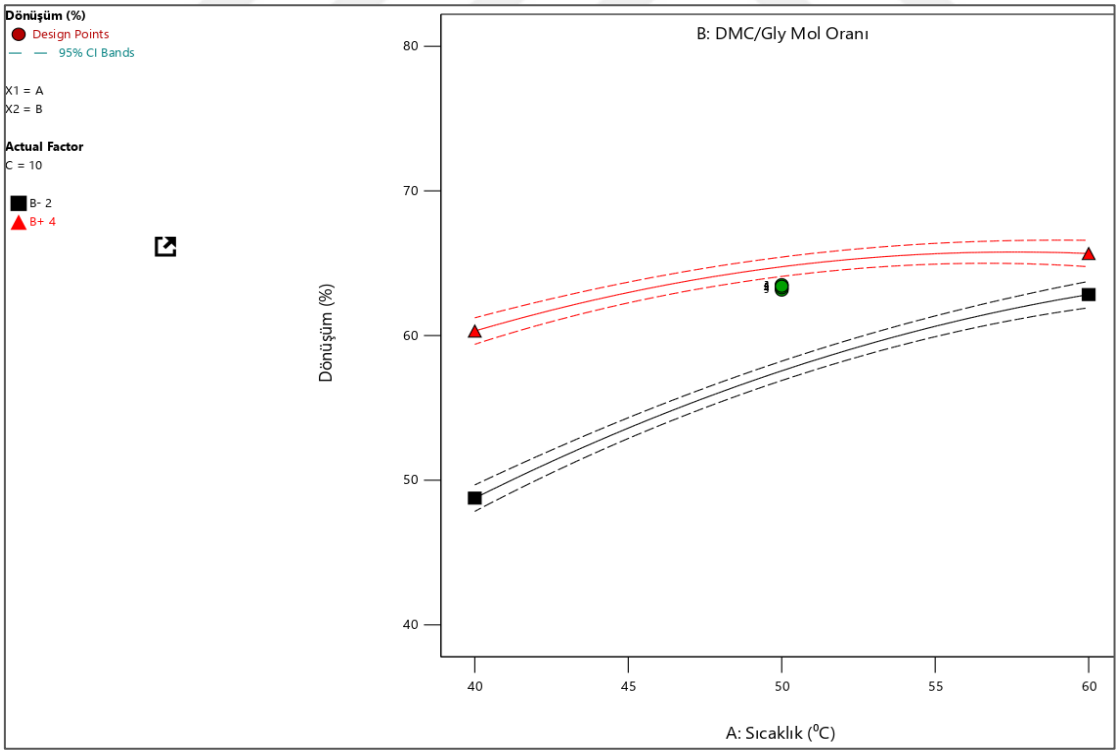
Şekil 4.60. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly dönüşümüne etkisi (DMC/Gly Mol oranı: 3/1)



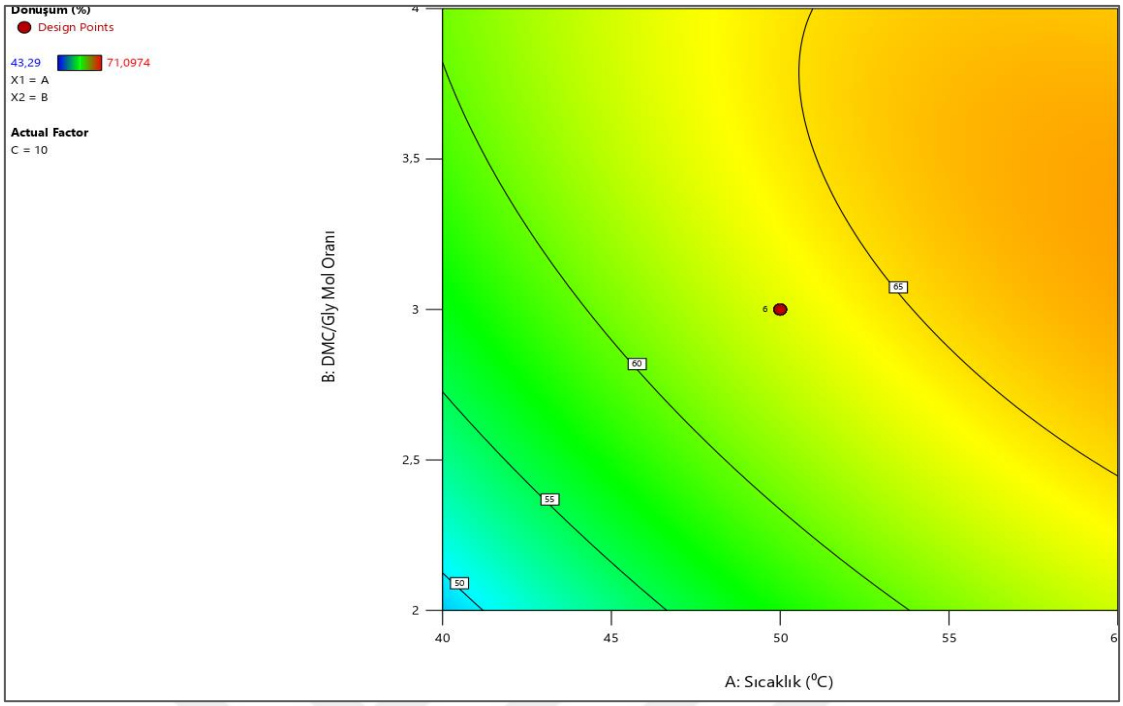
Şekil 4.61. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly dönüşümüne etkisine ait iki boyutlu grafik (DMC/Gly Mol oranı: 3/1)

Enzim miktarı orta noktada (%10) iken, sıcaklık ve DMC/Gly mol oranı ikili etkileşiminin Gly dönüşümüne etkisi Şekil 4.62.'da, bu ikili etkileşimin iki boyutlu grafiği ise Şekil 4.63'de verilmiştir. DMC/Gly mol oranı 2/1'de sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye çıkarılmasıyla Gly dönüşümü artmıştır. DMC/Gly mol oranının 4/1 olması durumunda ise sıcaklığın artırılmasıyla Gly dönüşümünün daha hafif bir ivmeyle artış eğiliminde olmuştur (şekil 4.60). Parametrelerin orta değerlerinde elde edilen dönüşüm (%63) değerine 2/1 mol oranı kullanımında ve sıcaklığın 60 ºC'ye yükseltilmesiyle ulaşılmıştır (Şekil 4.62.) Benzer şekilde sıcaklık sabit tutularak DMC/Gly mol oranı 2/1'den 4'1'e arttırıldığında dönüşümün yine arttığı gözlemlenmiştir. Bu ikili etkileşiminin Gly dönüşümüne etkisi üç boyutlu grafik olarak EK-C2'de görülmektedir.

Şekil 4.63. incelendiğinde enzim miktarı orta noktada iken (%10) Gly dönüşüm değerleri, sabit DMC/Gly mol oranında sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye artmasıyla artmaktadır. Benzer şekilde sıcaklık sabit tutularak DMC/Gly mol oranı 2/1'den 4'1'e arttırıldığında dönüşümün yine arttığı gözlemlenmiştir. Üç boyutlu grafik olarak ise EK-C3'de görülmektedir.



Şekil 4.62. Sıcaklık ve DMC/Gly Mol oranının Gly dönüşümüne etkisi (Enzim miktarı: %10)



Şekil 4.63. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının Gly dönüşümüne etkisine ait iki boyutlu grafik (Enzim miktarı: %10)

GlyC Seçimliliğinin YYY ile Optimizasyonu

GlyC seçimliliğine ait YYY programı tarafından önerilen modeller Tablo 4.3.'de verilmiş olup kuadratik model ($p<0,0001$) en uygun model olarak önerilmiştir. İlgili kuadratik modelin düzeltilmiş R^2 değeri 0,9994 ve tahmini R^2 değeri 0,9978 olup, her iki R^2 arasındaki farkın (0,0016) 0,2'den az olması, modelin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.9. GlyC seçimliliğine ait YYY ile önerilen model tablosu

Kaynak	**Ardışık p-değeri**	**Uyumsuzluğun p-değeri**	**Düzeltilmiş R^2**	**Tahmini R^2**	
Lineer	0,9063	<0,0001	-0,1481	-0,3601	
2FI	0,7963	<0,0001	-0,3100	-1,2290	
Kuadratik	<0,0001	0,0048	**0,9994**	**0,9978**	**Önerilen**
Kübik	0,0012	0,5330	0,9999	0,9996	

GlyC seçimliliği için kuadratik modele ait etkileşim denklemine ait katsayılar ile ilgili katsayıların F ve p değerlerini veren ANOVA sonuçları Tablo 4.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.10. GlyC seçimliliğine ait kuadratik modele uygun ANOVA tablosu

Kaynak	**Katsayı Tahmini**	**Karelerin Toplamı**	**Df**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	45,30	2381,04	9	3814,42	<0,0001
A- Sıcaklık	1,05	14,95	1	215,54	<0,0001
B-DMC/Gly Mol Oranı	-1,26	21,57	1	311,04	<0,0001
C-Enzim Miktarı	1,76	42,53	1	613,17	<0,0001
AB	-4,44	157,56	1	2271,69	<0,0001
AC	1,13	10,29	1	148,35	<0,0001
BC	0,0584	0,0273	1	0,3936	0,5445
A^2	-5,23	394,01	1	5680,83	<0,0001
B^2	-9,74	1367,70	1	19719,49	<0,0001
C^2	-7,20	747,42	1	10776,28	<0,0001

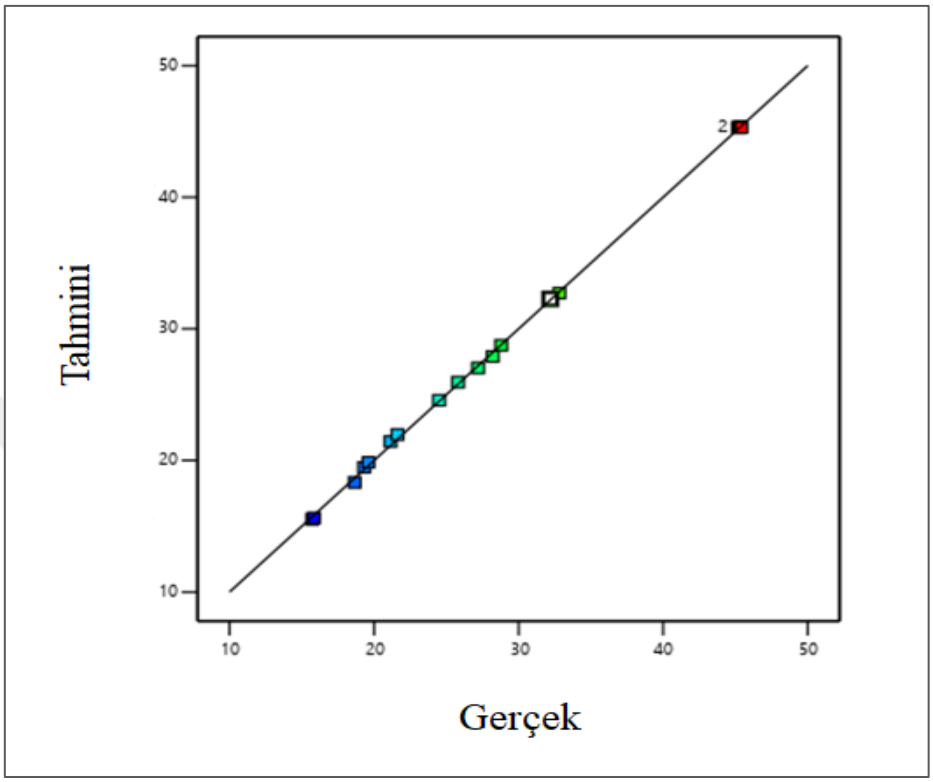
Std. Sap.= 0,2634, R^2=0,9997, Düzenlenmiş R^2=0,9994, Tahmini R^2=0,9978

Kuadratik model için hesaplanan etkileşime ait Tablo 4.10'da gerek modelin F değeri (3814) ve p değeri (p<0,0001), gerekse parametrelerin faktör ya da etkileşimine ait p değerleri modelin %95 güven aralığında olduğunu ve etkileşiminin anlamlı olduğunu göstermektedir.

GlyC seçimliliğine (S_{GlyC}) kuadratik modeli anlamlı kılan parametreler değerlendiğinde, Gly dönüşümüne benzer olarak, p<0,0001 değerleri ile incelenen üç parametrenin (enzim miktarı, sıcaklık ve DMC/Gly mol oranı) de etkili olduğu, bunlar asında en etkili parametre enzim miktarı olup modele pozitif yönde katkı sağlamaktadır. İkili etkileşimlerde ise, sıcaklık- mol oranı (modele negatif yönde) ve sıcaklık-enzim miktarı (modele pozitif yönde) etkili iken, parametrelerin kendileri ile olan etkileşimlerinin (A^2, B^2 ve C^2) de (modele negatif yönde etki ile) anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu veriler göz önüne alınarak oluşturulan etkileşim eşitlik (4.2)'de verilmiştir.

$$S_{Glyc} = 45{,}30 + 1{,}05 \cdot A - 1{,}26 \cdot B + 1{,}76 \cdot C - 4{,}44 \cdot AB + 1{,}13 \cdot AC - 5{,}23 \cdot A^2 - 9{,}74 \cdot B^2 - 7{,}20C^2 \quad (4.2)$$

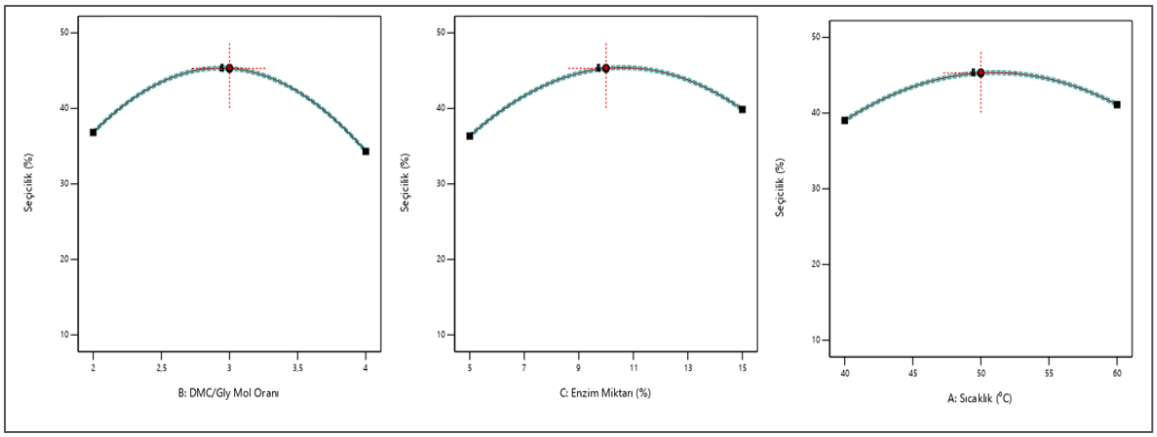
Kuadratik modelin hata dağılımı şekil 4.64.'de verilmiştir. Kuadratik modelin hata dağılımları analiz edildiğinde sabit varyansla dağıldığını ve bu da oluşturulan modelin güvenirliğini göstermektedir.



Şekil 4.64. GlyC seçimliliğine ait hata dağılım eğrisi

Parametrenin (sıcaklık, DMC/Gly mol oranı, enzim miktarı) GlyC seçimliliğine etkileri model denklem yardımıyla incelenmiş olup, incelenen parametrenin alt ve üst değeri ile diğer parametrenin merkez noktası temel alınarak şekil 4.65.'de verilmiştir. Her üç parametrenin orta değerlerinde (3/1 DMC/Gly mol oranı, %10 enzim, 50 ºC sıcaklık) GlyC seçimliliği % 45 değeri ile en yüksek değerde olmuş, bu parametrelerin daha düşük ve daha yüksek değerlerinde ise seçimlilik daha düşük değerlerde olmuştur.

Enzim miktarı orta noktada (%10) iken, sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC seçimliliğine etkisi Şekil 4.66.'de, bu ikili etkileşim iki boyutlu grafiği şekil 4.67.'de, üç boyutlu grafik olarak ise EK-D.1'de görülmektedir.



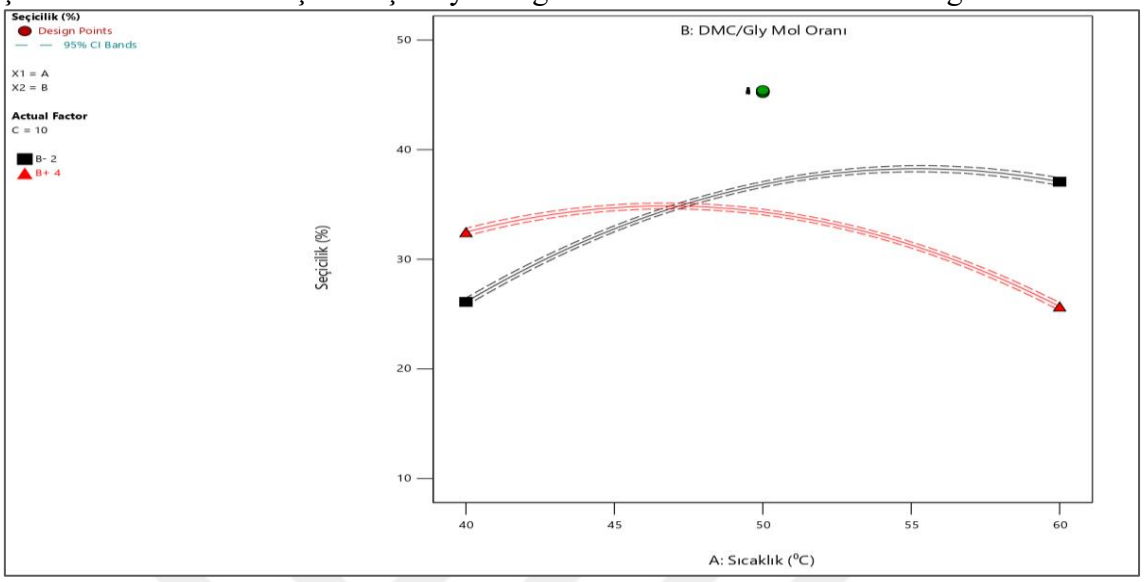
Şekil 4.65. Parametrelerin GlyC seçimliliğine etkisi, A) DMC/Gly mol oranı, B) Enzim miktarı, C) Sıcaklık

DMC/Gly mol oranı 2/1 iken sıcaklığın 54 ºC'ye kadar çıkarılmasıyla GlyC seçimliliği artarken, bu sıcaklığın üzerinde seçimlilik hafif düşmüştür. DMC/Gly mol oranının 4/1 olması durumunda ise, diğer mol oranına benzer olarak, sıcaklığın 45 ºC'ye çıkarılmasıyla GlyC seçimliliğinin arttığı ve bu sıcaklığın üzerinde ise düştüğü görülmüştür. Her iki mol oranında (2/1 ve 4/1) ve çalışılan tüm sıcaklık aralığında parametrelerin orta değerinde elde edilen GlyC seçimliliğinden (%45) daha düşük seçimlilik değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.66.). Bu durum, sıcaklık ve DMC/Gly mol oranı ikili etkileşiminin modeli negatif yönde etkilemesiyle ilişkilidir. GlyC seçimliliği için sıcaklık-mol oranı ikili etkileşimini veren Şekil 4.67. incelendiğinde, sıcaklık sabit tutulduğunda, DMC/Gly mol oranının 2/1'den 3/1'e artmasıyla GlyC seçimliliği artarken, DMC/Gly mol oranının daha da yüksek değerlerinde GlyC seçiciliğinin düştüğü gözlemlenmiştir.

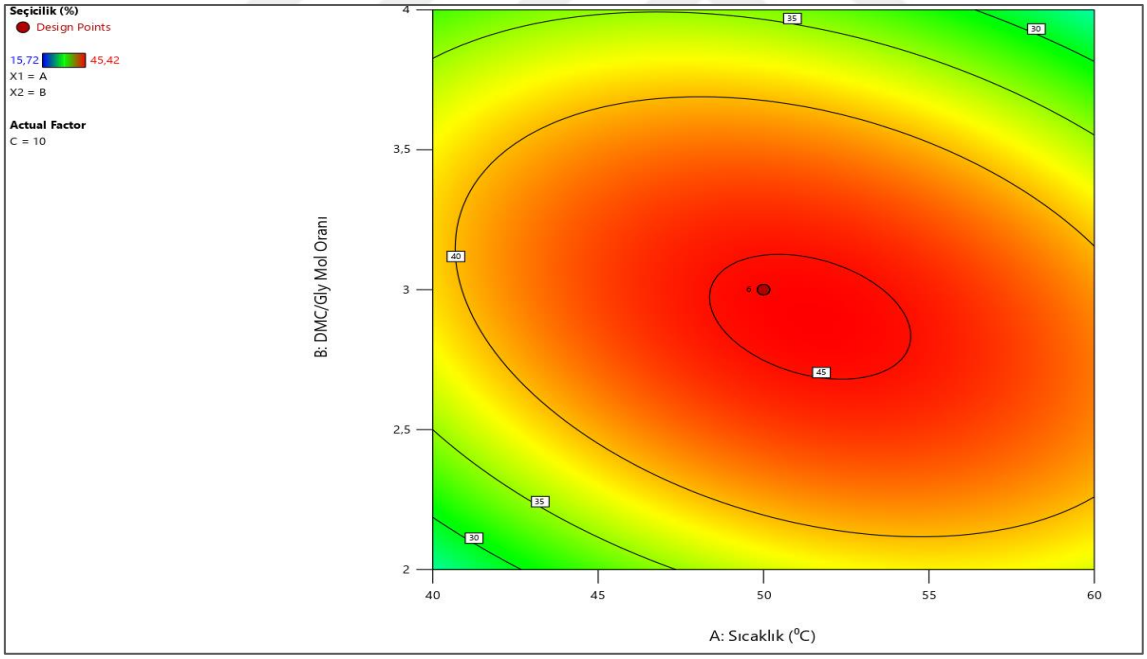
GlyC seçimliliği, sabit sıcaklıkta enzim miktarının artmasıyla artmakta, yine benzer olarak sabit enzim miktarında sıcaklığın artmasıyla da artmaktadır. Enzim miktarı %10'a ve sıcaklık değeri 50 ºC'ye yaklaştıkça GlyC seçimliliğin arttığı, %10 enzim miktarının altında ve üzerinde; benzer şekilde 50 ºC'nin altında ve üzerinde GlyC seçimliliği düşmektedir.

Şekil 4.66. incelendiğinde sıcaklık sabit tutulduğunda, DMC/Gly mol oranı 2/1'den 3/1'e yükseldikçe GlyC seçiciliği artarken, DMC/Gly mol oranının 3/1'den 4/1'e yükseldikçe GlyC seçiciliğinin düştüğü gözlemlenmiştir.

DMC/Gly mol oranı orta noktada iken (3/1) sıcaklık ve enzim miktarının ikili etkileşiminin GlyC seçiciliğine etkisi Şekil 4.68.'de, bu etkinin iki boyutlu grafiği ise şekil 4.69.'de verilmiştir. Üç boyutlu grafik olarak ise EK-D3' de görülmektedir.

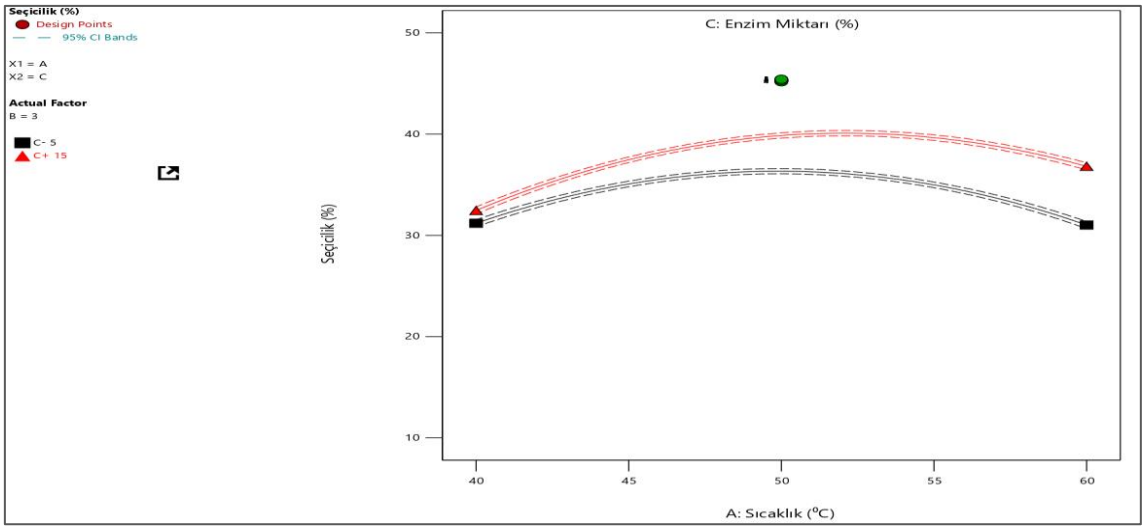


Şekil 4.66. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının miktarının GlyC seçimliliğine etkisi (Enzim miktarı: %10)



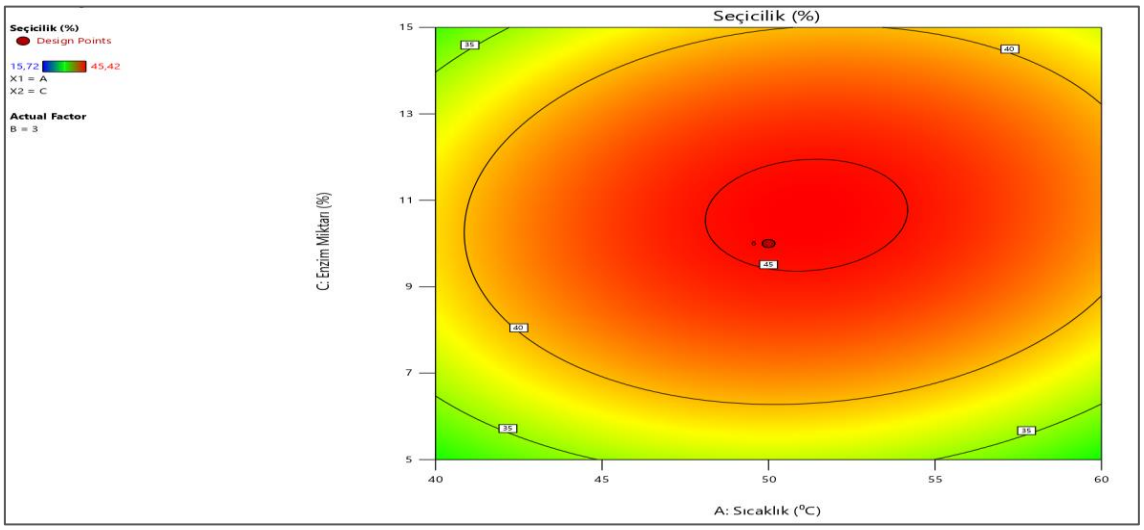
Şekil 4.67. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının miktarının GlyC seçimliliğine etkisine ait iki boyutlu grafiği (Enzim miktarı: %10)

DMC/Gly mol oranı 3/1 olarak sabit alındığında, sıcaklık ve enzim miktarının ikili etkileşimi şekil 4.68. ve bu etkinin iki boyutlu grafiği ise şekil 4.69.'da görülmektedir.



Şekil 4.68. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly seçimliliğine etkisi (DMC/Gly Mol oranı: 3/1)

Şekil 4.68. ve şekil 4.69.'dan görüldüğü gibi seçimlilik, sabit sıcaklıkta enzim miktarının artmasıyla artmakta, yine benzer olarak sabit enzim miktarında sıcaklığın artmasıyla da artmaktadır. Enzim miktarı %10'a ve sıcaklık değeri 50 ºC'ye yaklaştıkça GlyC seçiciliğin arttığı, %10 enzim miktarının altında ve üzerinde; benzer şekilde 50 ºC'nin altında ve üzerinde GlyC seçiciliği düşmektedir. İncelenen üç parametrenin orta değerinde (DMC/Gly Mol oranı 3/1, Enzim miktarı %10, sıcaklık 50 ºC) elde edilen GlyC seçimliliği %45 değerinde olmuştur.



Şekil 4.69. Sıcaklık ve enzim miktarının Gly seçimliliğine etkisine ait iki boyutlu grafik (DMC/Gly Mol oranı: 3/1)

GlyC Veriminin YYY ile Optimizasyonu

GlyC verimine ait YYY programı tarafından önerilen modeller Tablo 4.11.'de verilmiş olup kuadratik model en uygun model olarak önerilmiştir. İlgili kuadratik modelin düzeltilmiş R^2 değeri 0,9998 ve tahmini R^2 değeri 0,9995 olup, her iki R^2 arasındaki farkın (0,0003) 0,2'den az olması, modelin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.11. GlyC verimine ait YYY ile önerilen model tablosu

Kaynak	**Ardışık p-değeri**	**Uyumsuzluğun p-değeri**	**Düzeltilmiş R^2**	**Tahmini R^2**	
Lineer	0,6856	<0,0001	-0,0851	-0,2836	
2FI	0,7778	<0,0001	-0,2312	-1,1064	
Kuadratik	**<0,0001**	**0,5823**	**0,9998**	**0,9995**	**Önerilen**
Kübik	0,3921	0,8983	0,9998	0,9999	

GlyC verimi kuadratik modele ait etkileşim denklemine ait katsayılara ve ilgili katsayıların F ve p değerlerini veren ANOVA sonuçları Tablo 4.12.' da yeralmaktadır.

Tablo 4.12. GlyC verimine ait kuadratik modele uygun ANOVA tablosu

Kaynak	**Katsayı Tahmini**	**Karelerin Toplamı**	**Df**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	28,70	1224,48	9	10924,46	<0,0001
A- Sıcaklık	1,83	45,66	1	3666,06	<0,0001
B-DMC/Gly Mol Oranı	-0,0694	0,0657	1	5,28	0,0445
C-Enzim Miktarı	2,09	59,83	1	4804,04	<0,0001
AB	-3,07	75,40	1	6054,06	<0,0001
AC	1,22	12,00	1	963,88	<0,0001
BC	-0,0875	0,0613	1	4,92	0,0508
A^2	-3,68	194,91	1	15650,27	<0,0001
B^2	-6,59	625,35	1	50212,76	<0,0001
C^2	-5,24	395,83	1	31783,27	<0,0001

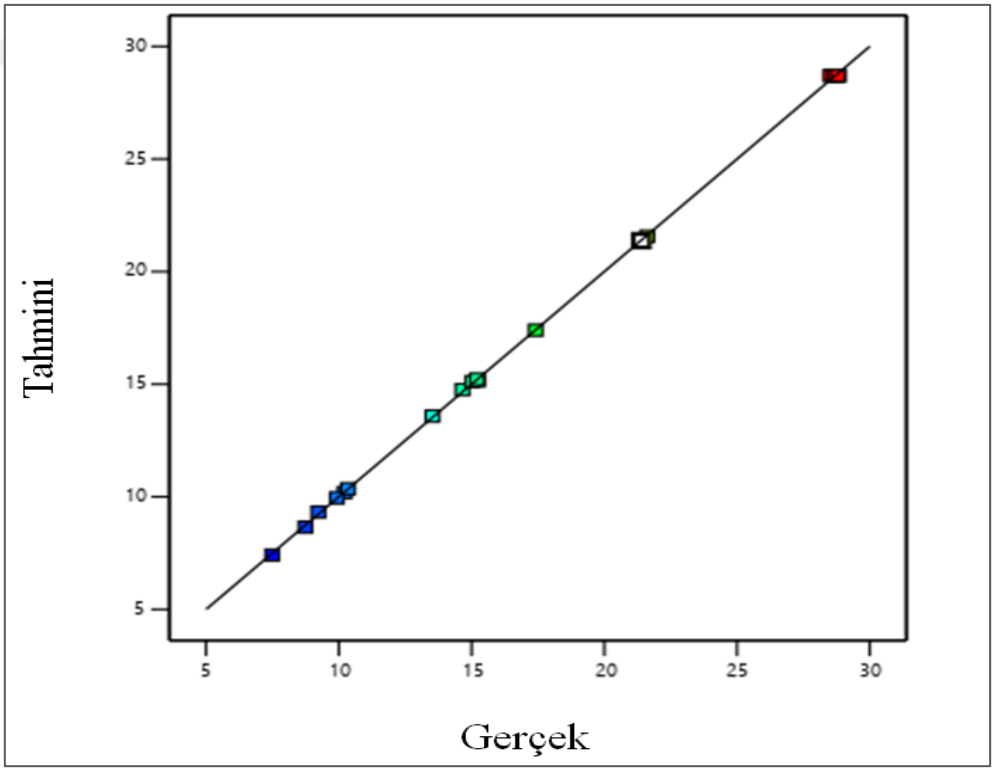
Std. Sap.= 0,1116, R^2=0,9999, Düzenlenmiş R^2=0,9998, Tahmini R^2=0,9995

Kuadratik model için hesaplanan etkileşime ait Tablo 4.12'de model ve faktör ya da etkileşime ait p değerlerinin p<0,0001'de olması modelin %95 güven aralığında olduğunu ve ilgili etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. GlyC verimine (Y_{GlyC}) kuadratik modelini anlamlı kılan parametreler (p<0,0001) tekli parametrelerde ilk sırada enzim miktarı ve ikinci sırada sıcaklık modele pozitif yönde etki ederken, DMC/Gly

mol oranının katkısı ihmal edilebilir düzeyde olmuştur. İkili etkileşimlerde ise sıcaklık-enzim miktarı positif yönde ve sıcaklık- mol oranı negatif yönde GlyC verimine etki etmektedir. Parametrelerin kendileri ile olan etkileşimleri (A^2, B^2 ve C^2) de modele negatif yönde etki etmiştir. Bu veriler göz önüne alınarak oluşturulan etkileşim denklemi eşitlik (4.3)'de verilmiştir.

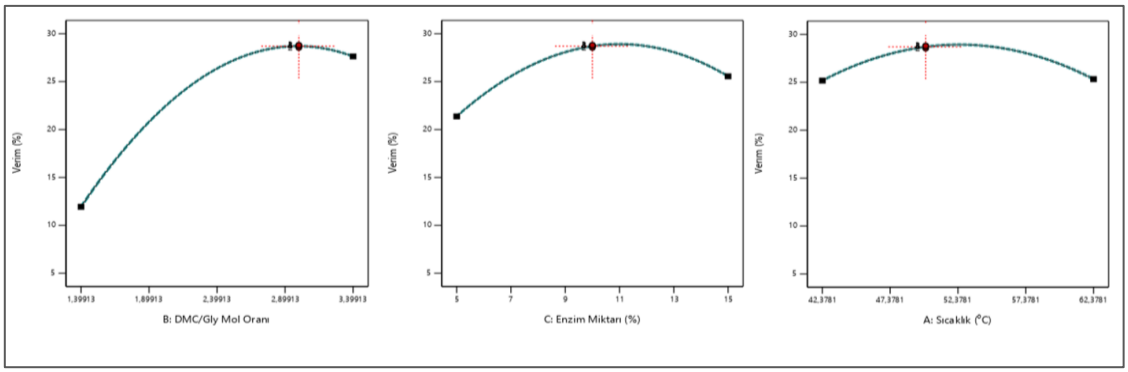
$$Y_{Glyc} = 28{,}70 + 1{,}83 \cdot A - 2{,}09 \cdot C - 3{,}07 \cdot AB + 1{,}22 \cdot AC - 3{,}68 \cdot A^2 - 6{,}59 \cdot B^2 - 5{,}24C^2 \quad (4.3)$$

Kuadratik modelin hata dağılımı Şekil 4.70.'de verilmiş olup, hata dağılımlarının sabit varyansla dağıldığı ve oluşturulan modelin güveni olduğu görülmektedir.



Şekil 4.70. GlyC verimine ait hata dağılım eğrisi

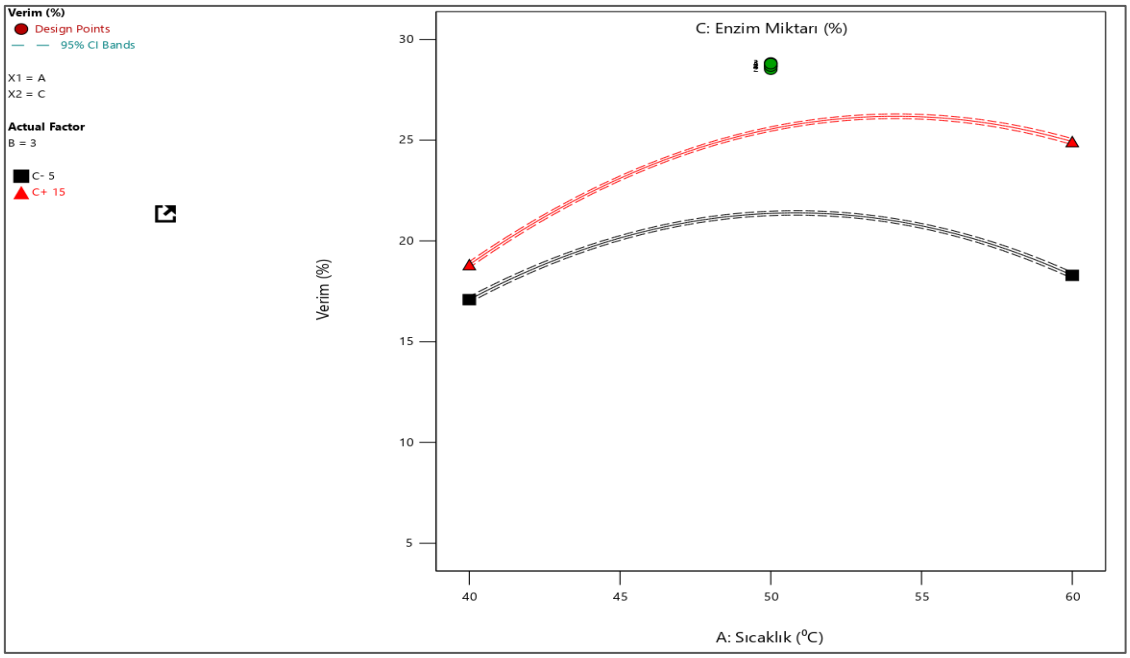
Parametrenin (sıcaklık, DMC/Gly mol oranı, enzim miktarı) GlyC verimine etkileri model denklem yardımıyla incelenmiş olup, incelenen parametrenin alt ve üst değeri ile diğer iki parametrenin merkez noktaları temel alınarak şekil 4.71'da verilmiştir. Parametrelerin orta değerinde en yüksek GlyC verimi %28,6 olarak belirlenmiş, orta değerin öncesinde ve sonrasında daha düşük verim değerleri elde edilmiştir. Her iki mol oranında ve incelenen tüm sıcaklık aralığında orta değerlerde elde edilen verim değerinin altında verim değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.71. Parametrelerin GlyC verimine etkisi A) DMC/Gly mol oranı, B)Enzim miktarı, C)Sıcaklık

Şekil 4.71.' de görüldüğü gibi GlyC verimine en çok etki eden parameterden ilk sırada sıcaklık daha sonra enzim miktarı ve en son sırada DMC/Gly mol oranıdır. İkili etkileşimlerde ise sıcaklık-enzim miktarı positif yönde GlyC verimini etki ederken, sıcaklık-DMC/Gly mol oranı negatif yönde etkilemektedir.

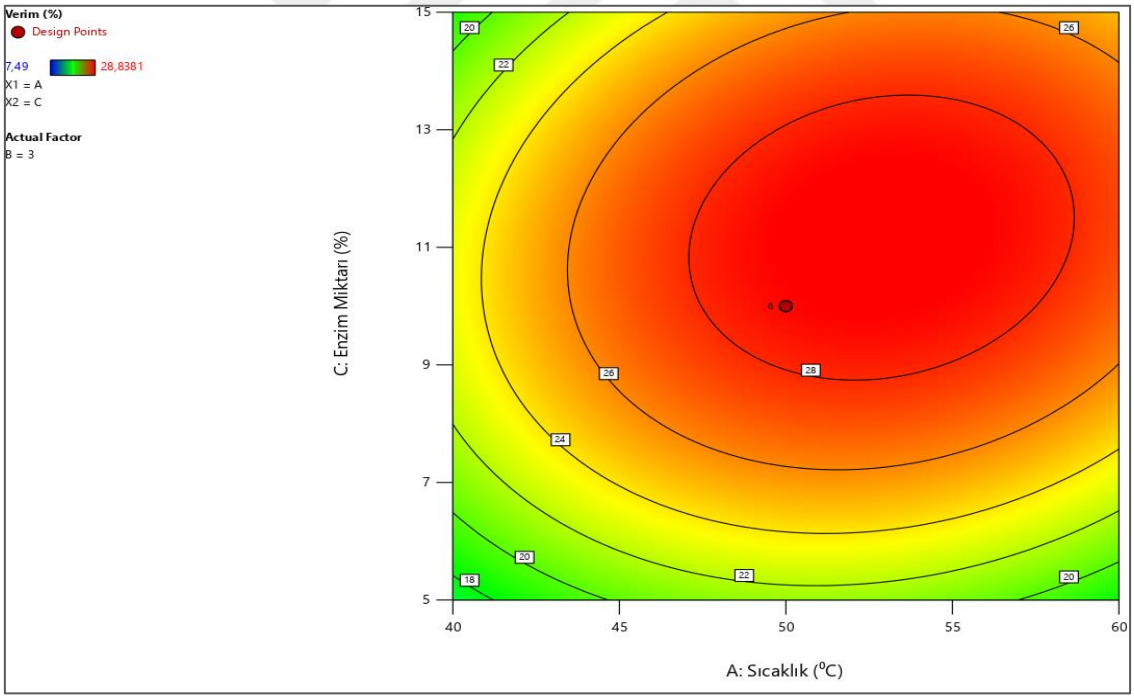
Mol oranı orta noktada (3/1 DMC/Gly) iken, sıcaklık ve enzim miktarının ikili etkileşiminin GlyC verimine etkisi şekil 4.72.'de, bu etkileşiminin iki boyutlu grafiği şekil 4.73'de, üç boyutlu grafiği ise EK-E1'da görülmektedir.



Şekil 4.72. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC verimine etkisi (DMC/Gly mol oranı: 3/1)

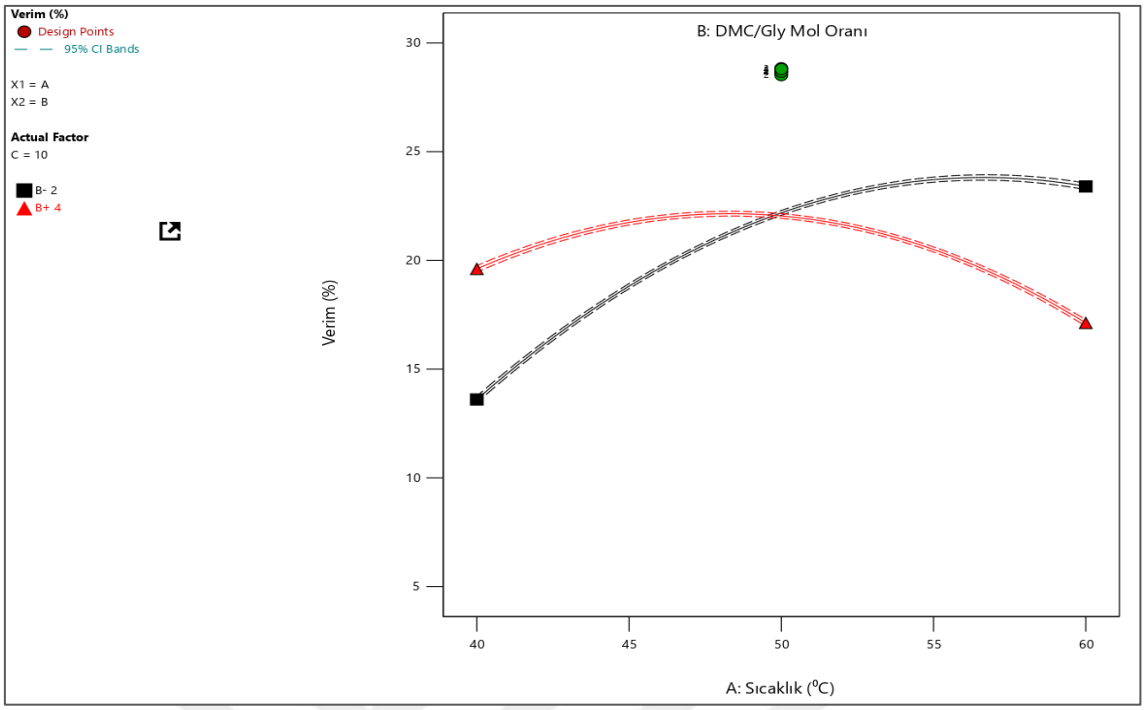
Şekil 4.72.'da görüldüğü gibi, %5 enzim miktarında, sıcaklığın 40 ºC'den 50 ºC'ye arttırılmasıyla GlyC verimi hafif yükselme eğilimine geçerken, sıcaklığın 60 ºC'ye yükseltilmesiyle daha hızlı düşme eğilimine geçtiği analiz edilmiştir. %15 enzim miktarında ise, sıcaklığın 40 ºC'den 60 ºC'ye arttırılmasıyla yaklaşık 53 ºC'ye kadar GlyC verimi artarken, sıcaklığın 60 ºC'ye yükseltilmesiyle GlyC veriminin düşme eğilimine geçtiği gözlemlenmiştir. Parametrelerin orta değerlerinde elde edilen GlyC verimine (%28,6) gerek %5 gerekse %15 enzim miktarı ile ulaşılamadığı görülmektedir (Şekil 4.72.).

Şekil 4.73. incelendiğinde, enzim miktarı sabit tutulduğunda, sıcaklığın 40 ºC'den 52 ºC'ye artmasıyla GlyC verimini arttığı, sonrasında sıcaklığın 60 ºC'ye yükseltilmesiyle ise bu değerin düştüğü görülmektedir. Sıcaklık sabit tutulduğunda ise, enzim miktarının % 5'den yaklaşık % 11'e yükseltilmesiyle GlyC veriminin arttığı ve enzim miktarının % 15'e çıkarılmasıyla azaldığı belirlenmiştir.

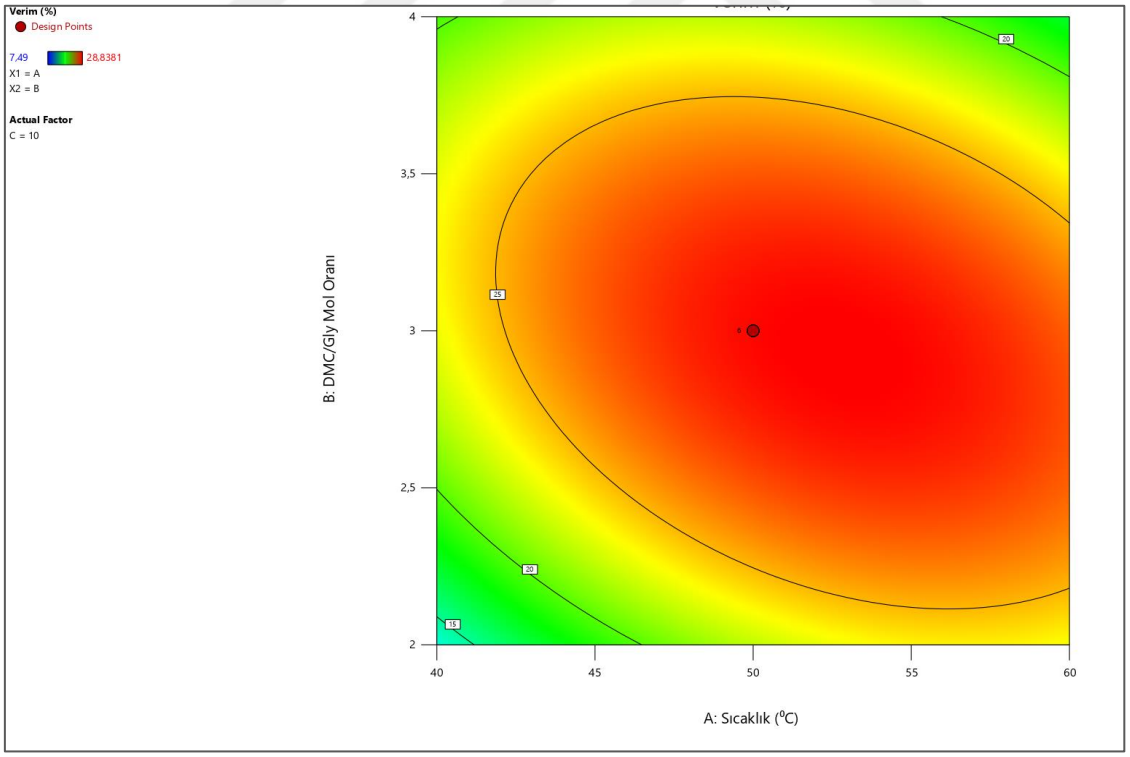


Şekil 4.73. Sıcaklık ve enzim miktarının GlyC verimine etkisine ait iki boyutlu grafik (DMC/Gly mol oranı: 3/1)

Enzim miktarı orta noktada (%10) iken, sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi şekil 4.74.'de, bu ikili etkileşimin iki boyutlu grafiği şekil 4.75.'de, üç boyutlu grafiği ise EK-E2'de görülmektedir.



Şekil 4.74. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi (Enzim miktarı: %10)



Şekil 4.75. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait 2 boyutlu grafik (Enzim miktarı: %10)

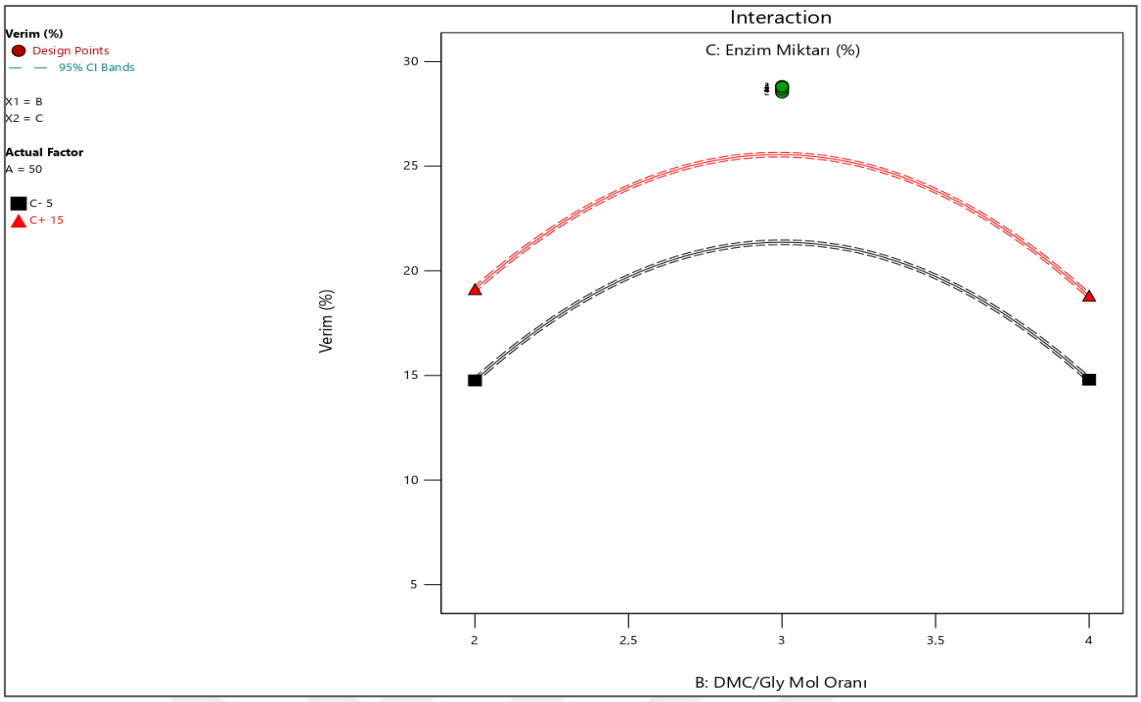
Şekil 4.74.'de görüldüğü gibi, 2/1 DMC/Gly mol oranında sıcaklığın 40 ºC'den 55 ºC'ye arttırılmasıyla, GlyC veriminin yaklaşık %24'e arttığı, sıcaklığın 55 ºC'den 60 ºC'ye yükseltilmesiyle GlyC veriminin düşme eğilimine geçtiği görülmektedir. 4/1 DMC/Gly mol oranında ise; sıcaklığın 40 ºC'den yaklaşık 48 ºC'ye yükseltildiğinde GlyC veriminin öncelikle hafif yükselme eğilimindeyken, sıcaklığın 48 ºC'den 60 ºC'ye yükseltilmesiyle düşüş trendine geçtiği görülmektedir. Parametrelerin orta değerlerinde elde edilen GlyC verimine (%28,6) gerek mol oranı 2/1'de gerekse 4/1'de ulaşılamadığı görülmektedir.

Şekil 4.75. incelendiğinde ise, GlyC verimi, sabit sıcaklıkta DMC/Gly mol oranı 2/1'den 2,7/1'e arttırılmasıyla önce artmış, mol oranının daha yüksek değerlerinde ise düşmüştür. DMC/Gly mol oranı sabit olduğunda ise, sıcaklığın 40 ºC'den yaklaşık 52 ºC'ye arttırılmasıyla GlyC verimi önce artmış, bu değerin üzerindeki sıcaklıklarda ise daha düşük değerlerde olmuştur.

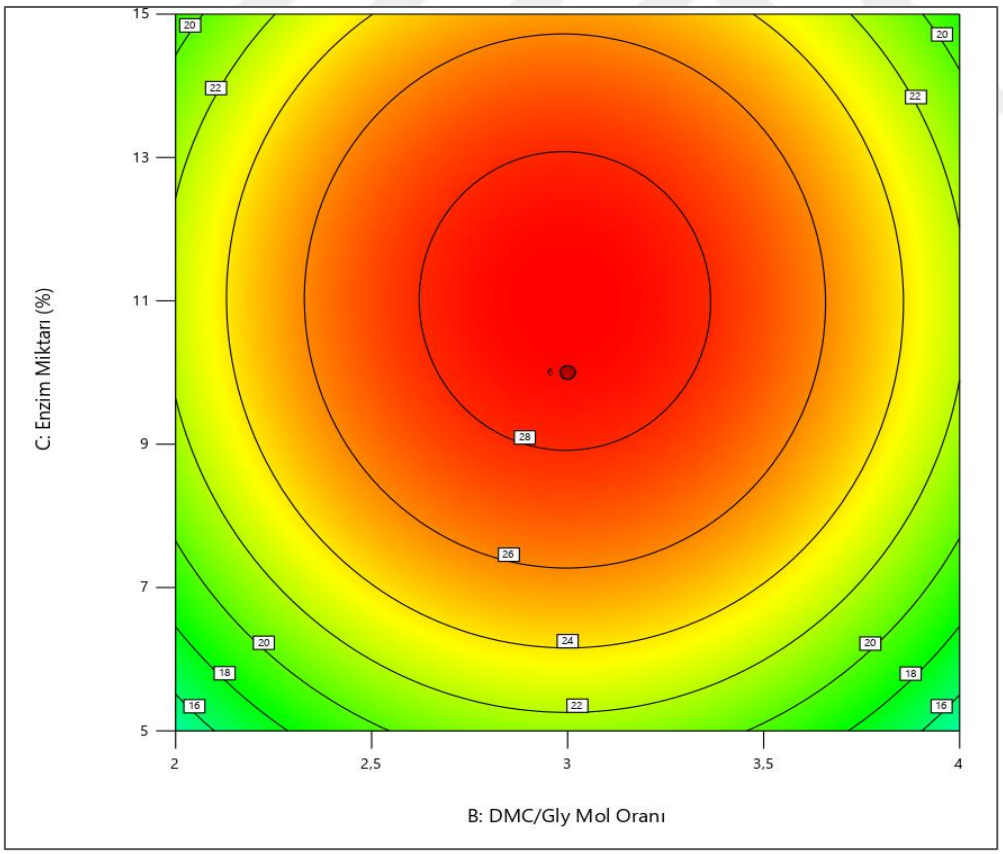
Sıcaklık orta noktada (50 ºC) iken, enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi şekil 4.76.'de, bu ikili etkileşimin iki boyutlu grafiği şekil 4.77.'de, üç boyutlu grafiği ise EK-E3'de görülmektedir.

Şekil 4.76.'de görüldüğü gibi, %5 enzim miktarında DMC/Gly mol oranı 2/1'den 3/1'e yükseldikçe GlyC veriminin veriminin yaklaşık %15'den %20'e yükseldiği, DMC/Gly mol oranın 3/1'den 4/1'e yükseldikçe GlyC veriminin %20' den %15' civarına düşme eğilimine geçtiği görülmektedir. %15 enzim miktarında da DMC/Gly mol oranın 2/1'den 3/1'e yükseldikçe %18'den %25'e artarken, DMC/Gly mol oranının 3/1'den 4/1'e yükseldikçe %17'e düştüğü görülmüştür.

Şekil 4.77. incelendiğinde ise, GlyC verimi, sabit sıcaklıkta DMC/Gly mol oranı 2/1'den yaklaşık 2,8/1'e arttırılmasıyla önce artmış, mol oranının 4/1'e arttırılmasıyla ise düşmüştür. DMC/Gly mol oranı sabit tutulduğunda ise, enzim miktarının %5'den %11'e arttırılmasıyla GlyC verimi önce artmış, bu değerin üzerindeki DMC/Gly mol oranında ise GlyC veriminin düştüğü gözlemlenmiştir.



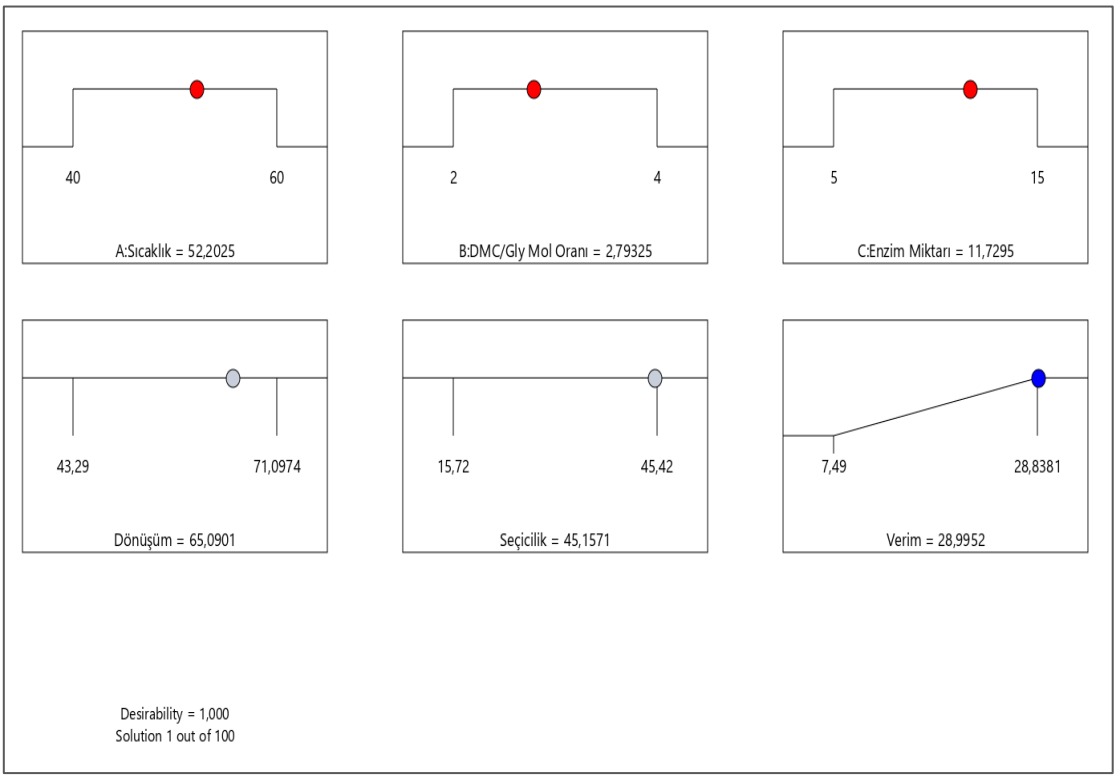
Şekil 4.76. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisi (Sıcaklık: 50 ºC)



Şekil 4.77. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait 2 boyutlu grafik (Sıcaklık: 50 ºC)

GlyC verimi maksimum olacak şekilde YYY ile program tarafından önerilen model optimizasyon çalışması şekil 4.78.'deki gibidir. Maksimum GlyC verimi için model iyileştirme çalışmasında parametreler için önerilen değerler 52,2 ºC sıcaklık, 2,8/1 DMC/Gly mol oranı ve %11,7 enzim miktarıdır. GlyC veriminin %28,99 değerine maksimize edilmesi ile program tarafından önerilen teorik Gly dönüşüm ve seçimlilik değerleri ise sırasıyla, %65 ve %45 olmuştur.

Biyonanokompozit desteğe tutuklanmış CalB enzimi ile GlyC üretiminde literatüre ve tutuklanmış Novozyme 51032 enzimine kıyasla daha düşük GlyC verimine ulaşıldığı analiz edilmiştir.



Şekil 4.78. CalB enzimi ile maksimum GlyC verimine ait model optimizasyonu

YYY kullanılarak program tarafından önerilen parametrelerin optimum değerleri kullanılarak yapılan deneysel çalışma sonuçları Tablo 4.13.'de teorik değerlerle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

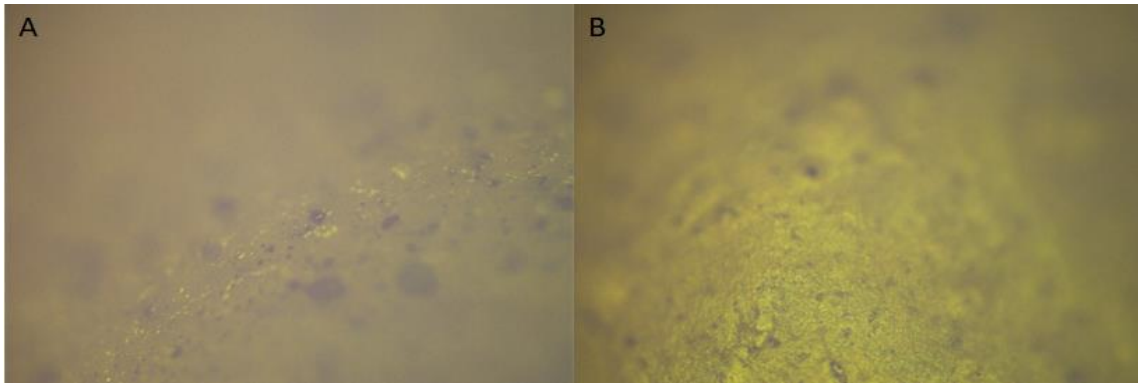
Görüldüğü gibi YYY'de optimum GlyC verimine ait optimum koşullarda edilen deneysel sonuçlar; %64,72 Gly dönüşümü, %44,94 GlyC seçimliliği ve %28,74 GlyC verimidir.

Tablo 4.13. GlyC verimine ait YYY ve deneysel sonuçlarının karşılaştırılması

Optimum Şartlar	**Gly Dönüşüm (%)**	**GlyC Seçicilik (%)**	**GlyC verim (%)**	**Sıcaklık (ºC)**	**DMC/Gly Mol Oranı**	**Enzim Miktarı (%)**
Teorik Sonuçlar	65,09	45,16	28,99	52,20	2,79/1	11,7
Deneysel Sonuçlar	64,72	44,94	29,08			

Şekil 4.79.' da GlyC tepkime sonrasında CalB ve Novozyme 51032 enzimlerinin POM görüntüleri yeralmaktadır. Destek üzerindeki CalB ile tutuklanmış destek üzerinde Gly tabakalarının varlığı daha çarpıcı gözükürken, Novozyme 51032 enzimin destek yüzeyindeki parlaklığın daha net olduğu ve homojen bir Gly dağılımının olduğu görülmektedir.

CalB enziminin ticari tutuklanmış enzimi olan hidrofobik yapıdaki Novozyme 435 ile GlyC üretimde sıklıkla bu enzimin yüzeyinin Gly tarafından kaplanması nedeniyle enzim yüzeyinin substata ulaşımını güçlendirdiği ve enzimin aktif çalışmasını önlediğine dair çalışmalar mevcuttur (Dossat vd., 1999; K. H. Lee vd., 2010). Çalışmamızda biyonanokompozit desteğe tutuklanan CalB enzimi ile GlyC verimindeki düşük verimin enzim yüzeyinde enzimin substrata erişimini güçlendiren Gly kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.79. GlyC tepkime sonundaki biyonanokompozit desteğin POM görüntüleri (A: CalB; B: Novozyme 51032) (500µm)

Bilgilerimize göre literatür de DMC ve gliserin ile enzimatik GlyC üretiminin YYY ile optimizasyonuna ait bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat yağ asidi ve DMC ile

biyodizel ve GlyC üretiminin gerçekleştirildiği aynı araştırma grubuna ait iki farklı çalışmada biyodizel ve GlyC üretimi optimize edilmiş, bu çalışmalarının özeti Tablo 4.14.'de verilmiş olup, ilgili literatür çalışmaları aşağıda açıklanmıştır. Soya yağı ve DMC ile tert-butanol çözücü eklenerek eşzamanlı Novozyme 435 enzimi ile biodizel ve GlyC üretiminde YYY ile optimizasyonun araştırıldığı bir çalışmada, biyodizele ek olarak maksimum Gly dönüşümünü için incelenen parametreler sıcaklık (50-80ºC), enzim miktarı (115-130 g/L) ve DMC/Soya yağı mol oranı (4,5/1- 9/1) olarak belirlenmiştir. Tepkime süresi 48 saat olup, Gly dönüşümü (%99,7) maksime edildiğinde, YYY modeli tarafından önerilen optimum parametre değerleri; 116,76 g/L enzim, 9,27/1 DMC/soya yağı mol oranı ve 52,56 ºC sıcaklıktır (Lee vd., 2017).

Novozyme 435 enzimi ile enzimatik biyodizel ve GlyC üretimde çözücüsüz ortada aynı araştırma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada YYY ile optimizasyon çalışması yapılmış, incelenen parametreler ve orta değerleri; sıcaklık (60 ºC), enzim miktarı (25 g/L), su miktarı (%1 v/v) ve DMC/soya yağı mol oranı (15/1)'dir. YYY'de merkezi kompozit tasarım ile çalışılmış ve program tarafından 7 orta değer, 8 eksenel ve 2^4 faktöriyel noktaları olmak üzere 31 deneysel veri analiz edilmiştir. En yüksek Gly dönüşümüne (%95,5) göre 48 saat tepkime süresince YYY tarafından önerilen optimum parametre değerleri ise; 59,65 ºC sıcaklık, 25 g/L enzim miktarı, 15/1 DMC/ soya yağı mol oranı ve %0,082 (v/v) su miktarıdır (Lee vd., 2019).

Tablo 4.14. GlyC üretimine ait YYY sonuçlarının karşılaştırılması

Katalizör (Destek)	**Açil verici Reaktant**	**Katalizör Derişimi[a,b,c]**	**Reaktant Mol Oranı DMC/ Açil verici**	**Çözücü / Su (v/v) (%)**	**Sıcaklık (ºC)**	**Süre (h)**	**Dönüşüm (C) GlyC Verim (Y)/ Seçimlilik (S) (%)**	**Referans**
CalB (Biyonano kompozit)	Gly	11,7[b]	2,79/ 1	-	52,20	24	C: 65,09 Y: 45,16 Y: 28,99	Bu çalışma
Novozyme 435	Soya yağı	116, 76[c]	9,27/1	Tert-butanol	52,56	48	C: 99,7	(Y. Lee vd., 2017)
Novozyme 435	Soya yağı	25[c]	15/1	%0,082 (su)	59,65	48	C: 95,5	(Lee vd., 2019)

[b] (wt, %, gliserin ve DMC toplam ağırlığı baz alınmış)

[c] (g/L enzim)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde Gly ve DMC'den GlyC üretimi amaçlanmış olup üç aşamadan oluşmaktadır. 1. aşama, enzim tutuklama; 2. aşama, enzim adsorpsiyon prosesi için adsorpsiyon izotermler, kinetik ve termodinamik inceleme; 3. aşama, GlyC üretimi ve üretimin YYY ile optimizasyonu.

1.aşamada biyonanokompozit desteğe CalB ve Novozyme 51032 enzlidrnin tutuklanması hedeflenmiştir. Tutuklama prosesine çapraz bağlayıcı derişimi, çapraz bağlayıcı ile bekleme süresi, sıcaklık, pH, enzim miktarı, karbon nanotüp miktarı ve tutuklama süresi etkisi incelenmiştir.

Biyonanokompozit desteğe CalB enziminin tutuklanması için belirlenen koşullar, 35 ºC sıcaklık, pH 7'lik fosfat tampon, 400 µL CalB enzim, %0,2 ÇDKNT (w/v), 0,5 g destek ve 22 saat tutuklama süresidir. Bu koşullarda tutuklama verimi % 82,47, APM 20,66 mg/g ve 3,38 U/mg enzim hidroliz aktivitesi tayin edilmiştir.

Novozyme 51032 enziminin biyonanokompozit desteğe tutuklamasında CalB enzimindeki Gla derişimi, Gla ile bekleme süresi ve f-ÇDKNT miktarı esas alınarak tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş olup, tutuklama için en uygun çalışma koşulunun pH 8 (0,1 M fosfat tamponu), 300 µL enzim miktarı, 20 saat tutuklama süresi ve 40 ºC sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda % 64,06 tutuklama verimi, 10,63 mg/g APM miktarı ve 9,43 U/mg enzim hidroliz aktivitesi tayin edilmiştir.
2. aşamada her iki enzimin biyonanokompozit desteğe adsorpsiyon sürecine ait izotermler, adsorpsiyon kinetiği ve termodinamiğine ait parametreler incelenmiştir.

CalB enziminin biyonanokompozit desteğe adsorpsiyonunda Langmuir izoterme uygunken, Novozyme enziminin Freundlich izoterme uyduğu tespit edilmiştir. CalB ve Novozyme 51032 enzimlerinin yalancı ikinci derece kinetik modeline uygun olduğu görülmüştür.

Her iki enzimin adsorpsiyonuna ait termodinamik sabitler belirlenmiştir. CalB enziminin (ΔH^0: 151,39 kJ/mol) ve Novozyme 51032 (ΔH^0: 81,64 kJ/mol) enziminin termodinamik verilerinden elde edilen entalpi değişimlerinin (ΔH^0) pozitif olması ve 80 kJ/mol üzerinde olması kimyasal adsorpsiyonun varlığına işaret etmektedir. CalB ve

Novozyme 51032 enzimileri için ΔS^{o} değerinin (sırasıyla, 0,522 ve 0,028 J/mol.K) pozitif olması ise biyonanokompozit desteğe enzim afinitesinin arttığını göstermektedir.

3. aşamada tutuklanmış CalB ve 51032 enzlidr ile enzimatik GlyC üretimi gerçekleştirilmiş ve GlyC üretiminde etki eden parametreler incelenmiştir.

CalB enzimi ile GlyC üretim ön denemeleri sonunda uygun çalışma koşullarının, 50 ºC sıcaklık, %10 enzim miktarı (w/w), 3/1 DMC/Gly mol oranı ve 24 saat tepkime süresi olduğu analiz edilmiştir. Bu koşullarda elde edilen Gly dönüşümü, GlyC seçimliliği ve verimi sırasıyla, % 63,35, % 45,31 ve % 28,70 olarak belirlenmiştir.

CalB enzimi ile GlyC üretimi ön denemelerle belirlenen uygun çalışma koşulları (50 ºC sıcaklık, %10 enzim miktarı (w/w), 3/1 DMC/Gly mol oranı) YYY'de orta değer olarak alınmış; merkezi kompozit tasarım modelinden yararlanılarak en yüksek GlyC verimine ait optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. GlyC verimi maksime edilerek YYY ile önerilen parametrelerin optimum değerleri; 52,20 ºC sıcaklık, 2,79/1 DMC/Gly mol oranı ve %11,7 enzim miktarı olup program tarafından verilen Gly dönüşümü, GlyC seçiciliği ve verim değerleri sırasıyla, %65,09, %45,16 ve %%28,99 olmuş; belirtilen optimum koşullarla gerçekleşen deneysel sonuçlara göre bu değerler sırasıyla, %64,72, %44,94 ve %29,08 olarak belirlenmiştir.

Novozyme 51032 enzimi ile GlyC üretimi için YYY benzeri herhangi bir optimizasyon yapılmamış olup en uygun çalışma koşulları, 24 saat tepkime süresi, 10/1 DMC/Gly Mol oranı, %10 enzim miktarı (w/w) ve 50 ºC sıcaklık olarak belirlenmiş, bu koşullarda ulaşılan Gly dönüşümü, GlyC seçiciliği ve verim değerleri sırasıyla, %80,30, %99,80 ve %80,14 GlyC oalrak tesbit edilmiştir.

Sonraki çalışmalar için öneri olarak kütle aktarımını iyileştirmek için ultrasonikasyon destekli bir yöntem kullanılabilir. Yan ürünlerin detaylı analizi GC harici farklı cihazlarla yapılabilir. Serbest enzimle üretim yapılarak tutuklanmış enzimlerle karşılaştırma yapılabilir. Tutuklanmış enzimlerle bitkisel yağ (ya da atık yağ, mikrolagal yağ) ve DMC ile GlyC üretimi gerçekleştirilebilir. Ekonomik analiz yapılabilir. Enzim tepkimesi için kinetik model önerilerek kinetik sabitler belirlenebilir.

KAYNAKLAR

Ahmaruzzaman, M. (2008). Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *143*(1–2), 48–67.

Aisverya, S., Sudha, P.N. (2014). f- Multiwalled carbon nanotube-grafted – Chitosan / Polyvinylpyrrolidone blends : Preparation and characterization, *6*(3), 9–14.

Akhtar,K., Khan,S.A., Khan, S.B. and Asimi, A.M. (2018). Scanning Electron Microscopy Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization* (1st ed., ss. 113–145). Springer.

Alvarez, M. G., Segarra, A. M., Contreras, S., Sueiras, J. E., Medina, F., Figueras, F. (2010). Enhanced use of renewable resources: Transesterification of glycerol catalyzed by hydrotalcite-like compounds. *Chemical Engineering Journal*, *161*(3), 340–345.

Alves, M. D., Aracri, F. M., Cren, É. C., Mendes, A. A. (2017). Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, *311*, 1–12.

Arumugam, A., Saravanan, M., Ponnusami, V. (2017). Immobilization kinetics of lipase on mesoporous material (Santa Barbara Amorphous-15). *International Journal of ChemTech Research*, *10*(1), 104–109.

Asmat, S., Husain, Q., Azam, A. (2017). Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: Stability and activity insights. *RSC Advances*, *7*(9), 5019–5029.

Aydın, G. (2014). *Alg Yagından Lipaz Katalizli Biyodizel Üretimi*. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Universitesi, Kocaeli, 354566.

Aydogdu, S., Kapucu, N. (2022). A review on the achievement of enzymatic glycerol carbonate production. *Turkish Journal of Chemistry*, *46*(5), 1376–1396.

Bai, X., Wen, S., Liu, J., Lin, Y. (2018). Response surface methodology for optimization of copper leaching from refractory flotation tailings. *Minerals*, *8*(4), 139–145.

Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*(6), 392–416.

Bayramoglu, G., Altintas, B., Arica, M. Y. (2009). Adsorption kinetics and thermodynamic parameters of cationic dyes from aqueous solutions by using a new strong cation-exchange resin. *Chemical Engineering Journal*, *152*(2–3), 339–346.

Beatriz B., Paula G., Francisco B. (2013). *Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. Immobilization of enzymes and cells (3rd ed.)*. Totowa, New Jersey, Humana Press.

Bilir, M. H. (2009). *Yer Fıstığı Kabuğundan Üretilen Poliüretan Tipi Köpük ile Safranin ve Remazol Brillant Blue R' nin Adsorpsiyonunun Incelenmesi*. Yüksek

Lisans Tezi, 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Kilis, 287547.

Box, G.E.P., Draper N.R. (1987). Empirical Model-Building and Response Surfaces. *Biometrics*. New York: John Wiley & Sons, Ing.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.

Bruno A.V. (2014). *Process Intensification in the Synthesis of the Green Chemical Dimethyl Carbonate*. Dissertation, do Porto Üniversitesi, Portugal.

Bukhari, A., Idris, A., Atta, M., Loong, T. C. (2014). Covalent immobilization of Candida antarctica lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, *35*(9), 1555–1564.

Cabuk, B., Tari C., Harsa, S. T. (2014). β-Galactosidase Immobilization on Chitosan-Hydroxyapatite Complex: Effects of Immobilization Conditions. Journal of Nutritional Health & Food Engineering, 1(1), 13–23.

Cai, H., Li, Y., Zhao, M., Fu, G., Lai, J., Feng, F. (2015). Immobilization, regiospecificity characterization and application of aspergillus oryzae lipase in the enzymatic synthesis of the structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol. PLoS ONE, 10(7), 1-19.

Cai, X., Shen, J.W., Qiang, Y., Hua, J., Ma, Z.-Q., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.G. (2022). Efficient Activity Enhancement of a Lipase from Sporisorium reilianum for the Synthesis of a Moxifloxacin Chiral Intermediate via Rational Design. Engineering, 1–10.

Cai, Y., Zhang, C., Cai, X. (2020). Preparation of chitosan modified magnetic carbon nanotubes and application in immobilized enzymes. Composite Interfaces, 27(6), 601–616.

Caro, P., Bandres, M., Urrutigoïty, M., Cecutti, C., Thiebaud-Roux, S. (2019). Recent progress in synthesis of glycerol carbonate and evaluation of its plasticizing properties. *Frontiers in Chemistry*, *7*(308), 1–13.

Castillo, E., Casas-Godoy, L., Sandoval, G. (2016). Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis*, *1*, 178–188.

Castillo, E., Dossat, V., Marty, A., Stéphane Condoret, J., Combes, D. (1997). The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(2), 77–85.

Çelik, A., Dinçer, A., Aydemir, T. (2016). Characterization of β-glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 406–414.

Chandra D.S., Al-Amin, M., Ur Rashid, T., Zakir S.M., Ashaduzzaman, M., Sarker, M., Shamsuddin, S. (2016). Performance Evaluation of Chitosan As an Adsorbent for Remazol Red. *International Journal of Latest* Research in Engineering and

Technology (IJLRET), 2(2), 52–62.

Chapman, J., Ismail, A. E., Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. Catalysts, 8(238), 1–26.

Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., Shu, G. (2013). The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β-galactosidase on chitosan bead. *Advance Journal of Food Science and Technology*, *5*(7), 932–935.

Cho, H. J., Kwon, H. M., Tharun, J., Park, D. W. (2010). Synthesis of glycerol carbonate from ethylene carbonate and glycerol using immobilized ionic liquid catalysts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *16*(5), 679–683.

Çiçekçi, A., Dönmez, B., Kavci, E., Laçin, Ö. (2020). Malahit Yeşilinin Şeftali Çekirdeği Kabuğu Üzerine Adsorpsiyon İzotermi ve Termodinamiği Adsorption Isotherms and Thermodynamics on Peach Kernel Peel of Malahit Green, *5*(2), 103–111.

Coşkun, G., Çıplak, Z., Yıldız, N., Mehmetoğlu, Ü. (2021). Immobilization of Candida antarctica Lipase on Nanomaterials and Investigation of the Enzyme Activity and Enantioselectivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(2), 430–445.

Cristovao, R. O., Almeida, M. R., Barros, M. A., Nunes, J. C. F., Boaventura, R. A. R., Loureiro, J. M., Faria, J. L., Neves, M. C., Freire, M. G., Ebinuma-Santos, V. C., Tavares, A. P. M., Silva, C.G. (2020). Development and characterization of a novel l-asparaginase/MWCNT nanobioconjugate. *RSC Advances*, *10*(52), 31205–31213.

Cushing, K. A., Peretti, S. W. (2013). Enzymatic processing of renewable glycerol into value-added glycerol carbonate. *RSC Advances*, *3*(40), 18596–18604.

Da Silva, V.C.F., Contesini, F. J., Carvalho, P.D.O. (2008). Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from Aspergillus niger: A comparative study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *19*(8), 1468–1474.

Daoud, F. B. O., Kaddour, S., Sadoun, T. (2010). Adsorption of cellulase Aspergillus niger on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*(1), 93–99.

De Souza, S.P., de Almeida, R.A.D., Garcia, G.G., Leão, R.A.C., Bassut, J., de Souza, R.O., Itabaiana, I. (2018). Immobilization of lipase B from Candida antarctica on epoxy-functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *93*(1), 105–111.

Demirbas, O., Calimli, M.H., Kuyuldar, E., Alma, M.H., Nas, M.S., Sen, F. (2019). Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamic of Adsorption of Enzymes on Diatomite Clay Materials. *BioNanoScience*, *9*(2), 474–482.

Demirbaş, Ö., Çalımlı, M.H., Demirkan, B., Alma, M.H., Nas, M.S., Khan, A., Asiri, A.M., Şen, F. (2019). Thermodynamics, Kinetics, and Adsorption Properties of Biomolecules onto Carbon-Based Materials Obtained from Food Wastes. *BioNanoScience*, *9*(3), 672–682.

Dorado, M.P., Ballesteros, E., Arnal, J.M., Gómez, J., López, F.J. (2003). Exhaust

emissions from a Diesel engine fueled with transesterified waste olive oil. *Fuel*, *82*(11), 1311–1315.

Dossat, V., Combes, D., Marty, A. (1999). Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(3), 194–200.

Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X., Liu, D. (2008). Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*(3), 331–337.

Du, Y., Gao, J., Kong, W., Zhou, L., Ma, L., He, Y., Huang, Z., Jiang, Y. (2018). Enzymatic Synthesis of Glycerol Carbonate Using a Lipase Immobilized on Magnetic Organosilica Nanoflowers as a Catalyst. *ACS Omega*, *3*(6), 6642–6650.

Duane T, Taconi J, T. K. (2007). The Glycerin Glut:Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *26*(4), 338–348.

Duman, O. (2012). *Doğal nano killer ile atıksulardan Zn+2 ve Pb+2 ağır metallerinin giderilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Konya Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 327069.

Elmorsi, T.M., Mohamed, Z.H., Shopak, W., Ismaiel, A.M. (2014). Kinetic and Equilibrium Isotherms Studies of Adsorption of Pb(II) from Water onto Natural Adsorbent. *Journal of Environmental Protection*, *05*(17), 1667–1681.

Ferreira, A.G.M., Egas, A.P.V., Fonseca, I.M.A., Costa, A.C., Abreu, D.C., Lobo, L.Q. (2017). The viscosity of glycerol. *Journal of Chemical Thermodynamics*, *113*(2017), 162–182.

Gandhi, N.N., Nitin P., Sudhirprakash Sawant, J. J. (2000). Lipase-Catalyzed Esterification. *Catalysis Reviews*, *42*(4), 439–480.

Ganjalikhany, M.R., Ranjbar, B., Taghavi, A.H., Tohidi M.T. (2012). Functional motions of candida antarctica lipase b: A survey through open-close conformations. *PLoS ONE*, *7*(7).

Gao, J., Wang, Y., Du, Y., Zhou, L., He, Y., Ma, L., Yin, L., Kong, W., Jiang, Y. (2017). Construction of biocatalytic colloidosome using lipase-containing dendritic mesoporous silica nanospheres for enhanced enzyme catalysis. *Chemical Engineering Journal*, *317*, 175–186.

Gharat, N., Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(3), 900–905.

Go, A.R., Lee, Y., Kim, Y.H., Park, S., Choi, J., Lee, J., Han, S.O., Kim, S.W., Park, C. (2013). Enzymatic coproduction of biodiesel and glycerol carbonate from soybean oil in solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, *53*(3), 154–158.

Gonawan, F. N., Romli, M.M., Zuhan, M. K., Jaya, M. A. (2022). Immobilization of Candida Rugosa Lipase on the Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads.

Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology, 8(1), 33-41.

Gong, A., Zhu, C. T., Xu, Y., Wang, F. Q., Tsabing, D. K., Wu, F. A., Wang, J. (2017). Moving and unsinkable graphene sheets immobilized enzyme for microfluidic biocatalysis. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–15.

Başyigit Kılıç, G., Karahan, A.G.. (2010). Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması. Gıda, 35(6), 445–452.

Günal, D. (2014). *Pankreatik Lipaz Enziminin Kompozit Taşıyıcılarda Immobilizasyonu ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi,Manisa, 360500.

Gündüz, F., Bayrak, B. (2017). Biosorption of malachite green from an aqueous solution using pomegranate peel: Equilibrium modelling, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, *243*, 790–798.

Guo, Y., Zhu, X., Fang, F., Hong, X., Wu, H., Chen, D., Huang, X. (2018). Immobilization of enzymes on a phospholipid bionically modified polysulfone gradient-pore membrane for the enhanced performance of enzymatic membrane bioreactors. *Molecules*, *23*(1), 1–13.

Gutierrez-Lazaro, A., Velasco, D., Boldrini, D.E., Yustos, P., (2018). Effect of operating variables and kinetics of the lipase catalyzed transesterification of ethylene carbonate and glycerol. *Fermentation*, *4*(75), 1–14.

Halim, S.F.A., Kamaruddin, A.H., Fernando, W.J.N. (2009). Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, *100*(2), 710–716.

Halkos, G. E., Gkampoura, E. C. (2020). Reviewing usage, potentials, and limitations of renewable energy sources. *Energies*, *13*(2906), 1–19.

Hao, W., Jing, S. I., Bao, C. U. I. (2021). Immobilization of Laccase from Trametes orientalis and Its Application for Decolorization of Multifarious Dyes. *China Biotechnology*, *37*(11), 142–157.

Hellmut G. Karge, J. W. (2008). *Adsorption and Diffusion*, *Molecular Sieves*, (7th ed.) *Berlin, Heidelberg: Springer*.

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, *6*(4), 185–205.

Hombalimath, V.S., Desai, S.V., Sharanappa, A. (2020). Characterization of lipase immobilized on Chitosan magnetic micro-particles for economic biodiesel production. *International Journal of Scientific and Technology Research*, *9*(3), 5111–5116.

Huang, D., Zhou, H., Lin, L. (2012). Biodiesel: An alternative to conventional fuel. *Energy Procedia*, *16*, 1874–1885.

Iryna S., Jakub Z., Filip C., Dariusz S., Anna D., Teofil J. (2021). Pristine and

Poly(Dimethylsiloxane) Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Supports for Lipase Immobilization - PubMed. *Materials*, *14*(2874).

Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(4), 390–397.

Jamal, Y., Luo, G., Kuo, C.H., Rabie, A., Boulanger, B.O. (2014). Sorption kinetics, thermodynamics and regeneration for lipid feedstock deacidification using a mixed-bed ion-exchange resin. *Journal of Food Process Engineering*, *37*(1), 27–36.

Jung H, Lee Y, Kim D, H. S. (2012). Enzymatic production of glycerol carbonate from by-product after biodiesel manufacturing process. *Enzyme and Microbial Technology*, *51*, 143–147.

Kaja, B.S., Lumor, S., Besong, S., Taylor, B., Ozbay, G. (2018). Investigating Enzyme Activity of Immobilized Candida rugosa Lipase. *Journal of Food Quality*, *2018*, 1–9.

Khan, A. K., Mubarak, N. M., Abdullah, E. C., Khalid, M., Nizamuddin, S., Baloch, H. A., Siddiqui, M. T. H. (2019). Immobilization of Lipase Enzyme Carbon Nanotubes via Adsorption. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *495*(1).

Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *5*(3), 1–13.

Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, *45*(1).

Khor, C. Y., Abdullah, M. Z. (2012). Optimization of IC encapsulation considering fluid/structure interaction using response surface methodology. *Simulation Modelling Practice and Theory*, *29*, 109–122.

Kim, S. C., Kim, Y. H., Lee, H., Yoon, D. Y., Song, B. K. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of glycerol carbonate from renewable glycerol and dimethyl carbonate through transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *49*, 75–78.

Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(2–3), 126–139.

Kristl, M., Muršec, M., Šuštar, V., Kristl, J. (2016). Application of thermogravimetric analysis for the evaluation of organic and inorganic carbon contents in agricultural soils. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *123*(3), 2139–2147.

Kuzmany, H., Kukovecz, A., Simon, F., Holzweber, M., Kramberger, C., Pichler, T. (2004). Functionalization of carbon nanotubes. *Synthetic Metals*, *141*(1–2), 113–122.

Lan, D., Zhao, G., Holzmann, N., Yuan, S., Wang, J., Wang, Y. (2021). Structure-

Guided Rational Design of a Mono- And Diacylglycerol Lipase from Aspergillus oryzae: A Single Residue Mutant Increases the Hydrolysis Ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(18), 5344–5352.

Langmuir, I. (1919). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, *40*(1914), 1361–1403.

Lanjekar, K., Rathod, V. K. (2013). Utilization of glycerol for the production of glycerol carbonate through greener route. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *1*, 1231–1236.

Leão, R. A. C., De Souza, S. P., Nogueira, D. O., Silva, G. M. A., Silva, M. V. M., Gutarra, M. L. E., Miranda, L. S. M., Castro, A. M., Junior, I. I., De Souza, R. O. M. A. (2016). Consecutive lipase immobilization and glycerol carbonate production under continuous-flow conditions. *Catalysis Science and Technology*, *6*(13), 4743–4748.

Lee, K. H., Park, C. H., Lee, E. Y. (2010). Biosynthesis of glycerol carbonate from glycerol by lipase in dimethyl carbonate as the solvent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *33*(9), 1059–1065.

Lee, S. H., Doan, T. T. N., Won, K., Ha, S. H., Koo, Y. M. (2010). Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *62*(2), 169–172.

Lee, Y., Kim, S. B., Lee, T., Jang, M., Shin, A., Park, S. J., Kim, J. R., Choi, Y. E., Na, J. G., Park, C. (2019). Efficient and simultaneous cleaner production of biodiesel and glycerol carbonate in solvent-free system via statistical optimization. *Journal of Cleaner Production*, *218*, 985–992.

Lee, Y., Lee, J. H., Yang, H. J., Jang, M., Kim, J. R., Byun, E. H., Lee, J., Na, J. G., Kim, S. W., Park, C. (2017). Efficient simultaneous production of biodiesel and glycerol carbonate via statistical optimization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *51*, 49–53.

Levine, I. N. (2015). *Fizikokimya (6.Baskı)*. Palme Yayıncılık.

Li, B., Shan, C. L., Zhou, Q., Fang, Y., Wang, Y. L., Xu, F., Han, L. R., Ibrahim, M., Guo, L. B., Xie, G. L., Sun, G. C. (2013). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. *Marine Drugs*, *11*(5), 1534–1552.

Li, J., Wang, T. (2011). Chemical equilibrium of glycerol carbonate synthesis from glycerol. *Journal of Chemical Thermodynamics*, *43*(5), 731–736.

Liu, A. H., Sun, K. N., Li, A. M. (2007). Preparation of chitosan/carbon nanotubes composites. *Advanced Composites Letters*, *16*(4), 143–148.

Liu, J., Ma, R. T., Shi, Y. P. (2020). "Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods"-A review. *Analytica Chimica Acta*, *1101*, 9–22.

Liu, L., Lan, D., Wang, Q., Gao, C., Li, Z., Yang, B., Wang, Y. (2013). A "bridge-like" structure responsible for the substrate selectivity of mono- and diacylglycerol

lipase from Aspergillus oryzae. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *97*, 144–149.

Shuler, M.L., Kargi, F. (1992). *Bioprocess engineering: Basic concepts*. *Journal of Controlled Release (2nd ed.)*. River: USA: Prentice Hall PTR.

Mallakpour, S., Madani, M. (2015). Effects of glucose-functionalized multiwalled carbon nanotubes on the structural, mechanical, and thermal properties of chitosan nanocomposite films. *Journal of Applied Polymer Science*, *132*(23), 1–9.

Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K. (1995). On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, *1258*(3), 272–276.

Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., Seki, M. (2000). Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*(11), 1121–1126.

Marx, S. (2016). Glycerol-free biodiesel production through transesterification: A review. *Fuel Processing Technology*, *151*, 139–147.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(6), 1451–1463.

Melis, Ö. (2016). *Halofilik Arkeal Kaynaklı Lipaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Aktif Lipazın Saflaştırılması*. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 425714.

Min, J. Y., Lee, E. Y. (2011). Lipase-catalyzed simultaneous biosynthesis of biodiesel and glycerol carbonate from corn oil in dimethyl carbonate. *Biotechnology Letters*, *33*(9), 1789–1796.

Min, K., Kim, J., Park, K., Yoo, Y. J. (2012). Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *83*, 87–93.

Mohammadi, J., Mohammadi, M., Mehrasbi, M. R., Peyda, M. (2016). Investigation of Enzyme Immobilization Effects on its Characteristics. *Journal of Human, Environment, and Health Promotion*, *1*(4), 183–188.

Nieto, J. M., Peniche-Covas, C., Padro´G. (1991). Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*.

Norjannah, B., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Juan, J.C., Chong, W.T. (2016). Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Advances*, *6*(65), 60034–60055.

Ochoa-Gómez, J. R., Gómez-Jiménez-Aberasturi, O., Maestro-Madurga, B., Pesquera-Rodríguez, A., Ramírez-López, C., Lorenzo-Ibarreta, L., Torrecilla-Soria, J.,

Villarán-Velasco, M. C. (2009). Synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate by transesterification: Catalyst screening and reaction optimization. *Applied Catalysis A: General*, *366*(2), 315–324.

Ochoa-Gómez, J. R., Gómez-Jiménez-Aberasturi, O., Ramírez-López, C. A., Nieto-Mestre, J., Maestro-Madurga, B., Belsué, M. (2011). Synthesis of glycerol carbonate from 3-chloro-1,2-propanediol and carbon dioxide using triethylamine as both solvent and CO2 fixation-activation agent. *Chemical Engineering Journal*, *175*(1), 505–511.

Ochoa-Gómez, J. R., Gómez-Jiménez-Aberasturi, O., Ramírez-López, C., Maestro-Madurga, B. (2012). Synthesis of glycerol 1,2-carbonate by transesterification of glycerol with dimethyl carbonate using triethylamine as a facile separable homogeneous catalyst. *Green Chemistry*, *14*(12), 3368–3376.

Ögretmen, A. (2021). *Biyonanokompozit Desteğe Lipaz Enziminin Tutuklanması*. Kocaeli Üniverstitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli,702542.

Okumuş, Z. Ç., Doğan, T. (2019). Biyodizeldeki Suyun Reçine ile Uzaklaştırılması: Adsorpsiyon İzotermi, Kinetiği ve Termodinamik İncelemesi. *European Journal of Science and Technology*, (15), 561–570.

Okur, M. (2013). Tekstik Atıksularindaki Metal KompleksBoyarmaddelerin Yumurta Kabuklari ile Giderimi, *28*(4), 777–785.

Orbak, İ. (2009). *Aktif Karbon İle Çevre Kirletici Bazı Unsurların Giderilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Istanbul, 252372.

Paitaid, P., H-Kittikun, A. (2021). Enhancing immobilization of Aspergillus oryzae ST11 lipase on polyacrylonitrile nanofibrous membrane by bovine serum albumin and its application for biodiesel production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *51*(6), 536–549.

Pan, S., Zheng, L., Nie, R., Xia, S., Chen, P., Hou, Z. (2012). Transesterification of glycerol with dimethyl carbonate to glycerol carbonate over Na-based zeolites. *Chinese Journal of Catalysis*, *33*(11), 1772–1777.

Panadare, D. C., Rathod, V. K. (2016). Microwave assisted enzymatic synthesis of biodiesel with waste cooking oil and dimethyl carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *133*, S518–S524.

Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R. R., Rousset, A. (2001). Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*, *39*, 507.

Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, *93*(1–2), 67–80.

Quispe, C. A. G., Coronado, C. J. R., Carvalho, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 475–493.

Rafiee, F., Rezaee, M. (2021). Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. *International Journal of*

Biological Macromolecules, *179*, 170–195.

Raghunadh Acharyulu, S., Gomathi, T., Sudha, P. N. (2013). Physico-chemical characterization of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends. *Der Pharmacia Lettre*, *5*(2), 354–363.

Rastian, Z., Khodadadi, A.A., Vahabzadeh, F., Bortolini, C., Dong, M., Mortazavi, Y., Mogharei, A., Naseh, M. V., Guo, Z. (2014). Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, *90*(2014),16–26.

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, *59*, 1–41.

Rodrigues, L.A., da Silva, M. L. (2010). Thermodynamic and kinetic investigations of

phosphate adsorption onto hydrous niobium oxide prepared by homogeneous solution method. *Desalination*, *263*(1–3), 29–35.

Rong, J., Zhou, Z., Wang, Y., Han, J., Li, C., Zhang, W., Ni, L. (2019). Immobilization of horseradish peroxidase on multi-armed magnetic graphene oxide composite: Improvement of loading amount and catalytic activity. *Food Technology and Biotechnology*, *57*(2), 260–271.

Rounce, P., Tsolakis, A., Leung, P., York, A. P. E. (2010). A comparison of diesel and biodiesel emissions using dimethyl carbonate as an oxygenated additive. *Energy and Fuels*, *24*(9), 4812–4819.

Rusu, A. G., Chiriac, A. P., Nita, L. E., Balan, V., Serban, A. M., Croitoriu, A. (2022). Synthesis and Comparative Studies of Glucose Oxidase Immobilized on Fe3O4 Magnetic Nanoparticles Using Different Coupling Agents. *Nanomaterials*, *12*(14).

Sahani, S., Upadhyay, S. N., Sharma, Y. C. (2021). Critical Review on Production of Glycerol Carbonate from Byproduct Glycerol through Transesterification. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *60*(1), 67–88.

Saikia, K., Kumar, P. S., Rathankumar, A. K., Lavanyaa, S. S., Srinivasan, L., Subramanian, S., Cabana, H., Gosselin, M., Kumar, V. V. (2020). Amino-functionalised mesoporous silica microspheres for immobilisation of Candida antarctica lipase B – application towards greener production of 2,5-furandicarboxylic acid. *IET Nanobiotechnology*, *14*(8), 732–738.

Samui, A., Chowdhuri, A. R., Mahto, T. K., Sahu, S. K. (2016). Fabrication of a magnetic nanoparticle embedded NH2-MIL-88B MOF hybrid for highly efficient covalent immobilization of lipase. *RSC Advances*, *6*(71), 66385–66393.

Sarıkaya, Y. (2004). *Fizikokimya* (6. Baskı). Ankara: Gazi Kitapevi.

Savi, P., Giorcelli, M., Quaranta, S. (2019). Multi-walled carbon nanotubes composites for microwave absorbing applications. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(5), 1–10.

Secundo, F., Miehé-Brendlé, J., Chelaru, C., Ferrandi, E. E., Dumitriu, E. (2008). Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Materials*, *109*(1–3), 350–361.

Shomal, R., Du, W., Al-Zuhair, S. (2022). Immobilization of Lipase on Metal-Organic frameworks for biodiesel production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*(2), 107265.

Shuai, W., Das, R. K., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M. (2017). A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *64*(4), 496–508.

Singh, R. S., Chauhan, K. (2020). *Functionalization of multiwalled carbon nanotubes for enzyme immobilization*. *Methods in Enzymology, 630,25-38.*

Skoronski, E., Souza, D. H., Ely, C., Broilo, F., Fernandes, M., Fúrigo, A., Ghislandi, M. G. (2017). Immobilization of laccase from Aspergillus oryzae on graphene nanosheets. *International Journal of Biological Macromolecules*, *99*, 121–127.

Sonnati, M. O., Amigoni, S., Taffin G.E., Darmanin, T., Choulet, O., Guittard, F. (2013). Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: Synthesis, reactivity, properties and applications. *Green Chemistry*, *15*(2), 283–306.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T. (2003). Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(1), 97–103.

Soundararajan, A. (2015). Preparation and Characterization of F-Multiwalled Carbon Nanotube-Grafted – Nanochitosan / Polyvinylpyrrolidone Scaffold,

Sreeharsha, N., Ghorpade, R. V., Alzahrani, A. M., Al-Dhubiab, B. E., Venugopala, K. N. (2019). Immobilization studies of Candida antarctica lipase b on gallic acid resin-grafted magnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 3235–3244.

Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., A. Leon, J., Gochev, V. (2012). Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Current Analytical Chemistry*, *8*(3), 400–407.

Szori, M., Giri, B. R., Wang, Z., Dawood, A. E., Viskolcz, B., Farooq, A. (2018). Glycerol carbonate as a fuel additive for a sustainable future. *Sustainable Energy and Fuels*, *2*(10), 2171–2178.

Tang, Y., Xue, Y. Y., Li, Z., Yan, T., Zhou, R., Zhang, Z. (2019). Heterogeneous synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate catalyzed by LiCl/CaO. *Journal of Saudi Chemical Society*, *23*(4), 494–502.

Temkin, M.J. Pyzhev, V. (1940). Recent modifications to Langmuir isotherms, Acta Physiochim. *Acta Physiochim URSS*, *12*, 217.

Teng, W.K., Ngoh, G.C., Yusoff, R., Aroua, M.K. (2014). A review on the performance of glycerol carbonate production via catalytic transesterification: Effects of influencing parameters. *Energy Conversion and Management*, *88*, 484–497.

Thangaraj, B., Solomon, P. R. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *ChemBioEng Reviews*, *6*(5), 157–166.

Tison, Y., Giusca, C. E., Stolojan, V., Hayashi, Y., Silva, S.R. (2008). The inner shell influence on the electronic structure of double-walled carbon nanotubes. *Advanced Materials*, *20*(1), 189–194.

Trodler, P., Nieveler, J., Rusnak, M., Schmid, R. D., Pleiss, J. (2008). Rational design of a new one-step purification strategy for Candida antarctica lipase B by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1179*(2), 161–167.

Tudorache, M., Ghemes, G., Nae, A., Matei, E., Mercioniu, I., Kemnitz, E., Ritter, B., Coman, S., Parvulescu, V. I. (2014). Biocatalytic designs for the conversion of renewable glycerol into glycerol carbonate as a value-added product. Içinde *Central European Journal of Chemistry*,1262–1270.

Tudorache, M., Nae, A., Coman, S., Parvulescu, V. I. (2013). Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *RSC Advances*, *3*(12), 4052–4058.

Tudorache, M., Negoi, A., Parvulescu, V. I. (2017). Enhancement of the valorization of renewable glycerol: The effects of the surfactant-enzyme interaction on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *Catalysis Today*, *279*, 71–76.

Tudorache, M., Negoi, A., Protesescu, L., Coman, S. M. (2013). Bio-Glycerol as Sustainable Raw Material for Biorefinery-Biocatalytic Synthesis of Glycerol Carbonate. Conference Paper, Bucharest, Romanian, Januar 2013.

Tudorache, M., Negoi, A., Protesescu, L., Parvulescu, V. I. (2014). Biocatalytic alternative for bio-glycerol conversion with alkyl carbonates via a lipase-linked magnetic nano-particles assisted process. *Applied Catalysis B: Environmental*, *145*, 120–125.

Tudorache, M., Negoi, A., Tudora, B., Parvulescu, V. I. (2014). Environmental-friendly strategy for biocatalytic conversion of waste glycerol to glycerol carbonate. *Applied Catalysis B: Environmental*, *146*, 274–278.

Tudorache, M., Protesescu, L., Coman, S., Parvulescu, V. I. (2012). Efficient bio-conversion of glycerol to glycerol carbonate catalyzed by lipase extracted from Aspergillus niger. *Green Chemistry*, *14*(2), 478–482.

Tudorache, M., Protesescu, L., Negoi, A., Parvulescu, V.I. (2012). Recyclable biocatalytic composites of lipase-linked magnetic macro-/nano-particles for glycerol carbonate synthesis. *Applied Catalysis A: General*, *437–438*, 90–95.

Verma, M. L., Naebe, M., Barrow, C. J., Puri, M. (2013). Enzyme Immobilisation on Amino-Functionalised Multi-Walled Carbon Nanotubes: Structural and Biocatalytic Characterisation. *PLoS ONE*, *8*(9).

Waghmare, G.V., Vetal, M.D., Rathod, V.K. (2015). Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. *Ultrasonics Sonochemistry*, *22*, 311–316.

Wang, F., Nie, T.T., Shao, L. L., Cui, Z. (2014). Comparison of physical and covalent

immobilization of lipase from Candida antarctica on polyamine microspheres of alkylamine matrix. *Biocatalysis and Biotransformation*, *32*(5–6), 314–326.

Wang, L., Liu, X., Jiang, Y., Zhou, L., Ma, L., He, Y., Gao, J. (2018). Biocatalytic pickering emulsions stabilized by lipase-immobilized carbon nanotubes for biodiesel production. *Catalysts*, *8*(12).

Wang, S. F., Shen, L., Tong, Y. J., Chen, L., Phang, I. Y., Lim, P. Q., Liu, T. X. (2005). Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. *Polymer Degradation and Stability*, *90*(1), 123–131.

Weber, W. J. (1972). Physicochemical Processes for Water Quality Control. New York: Wiley-Interscience.

Yu, D., Zhang, X., Wang, T., Geng, H., Wang, L., Jiang, L., Elfalleh, W. (2021). Immobilized Candida antarctica lipase B (CALB) on functionalized MCM-41: Stability and catalysis of transesterification of soybean oil and phytosterol. *Food Bioscience*, *40*(2021), 100906.

Yury S. (2012). Bionanocomposites: Green sustainable materials for the near future. *Pure Appl. Chem.*, *84*(12), 2579–2607.

Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., Liu, D. (2015). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *44*, 182–197.

Zhou, C. H., Beltramini, J. N., Lu, G. Q. (2008). Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, *37*(3), 527–549.

URL-1:https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-glycerol-carbonate-market/119135/ (Ziyaret tarihi 11 Ocak 2022)

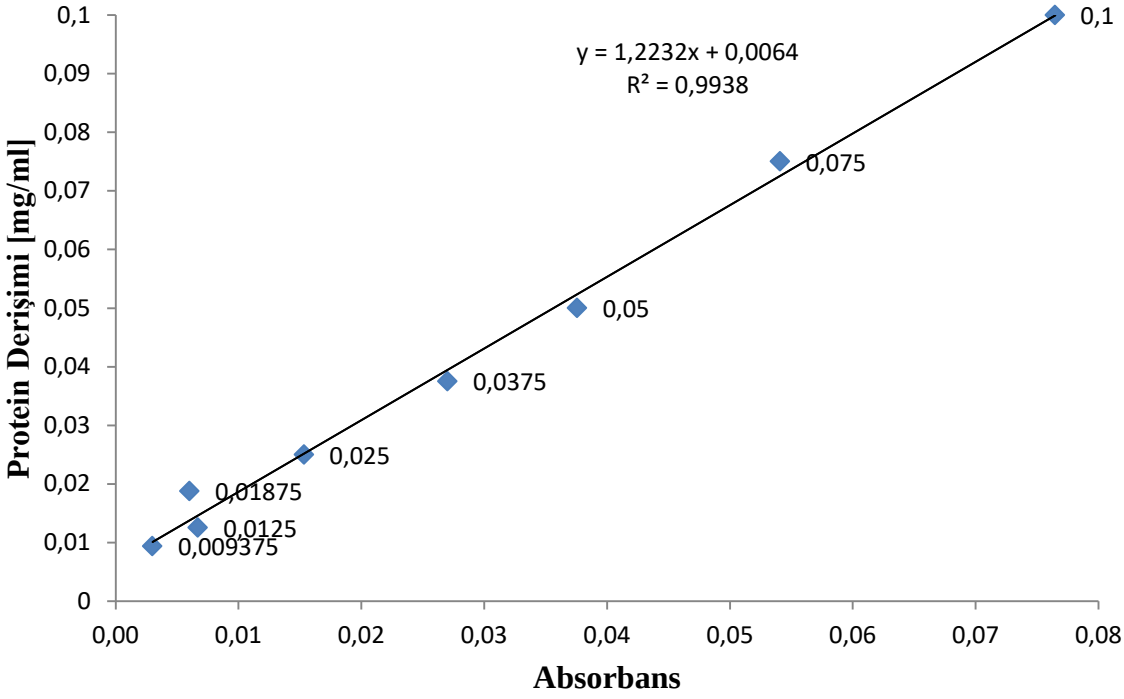
URL-2:. https://www.thesciencehive.co.uk/enzymes-alevel (Ziyaret tarihi 22 Şubat 2022)

URL-3: https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search (Ziyaret tarihi 16 Eylül 2022)

EKLER

Ek- A

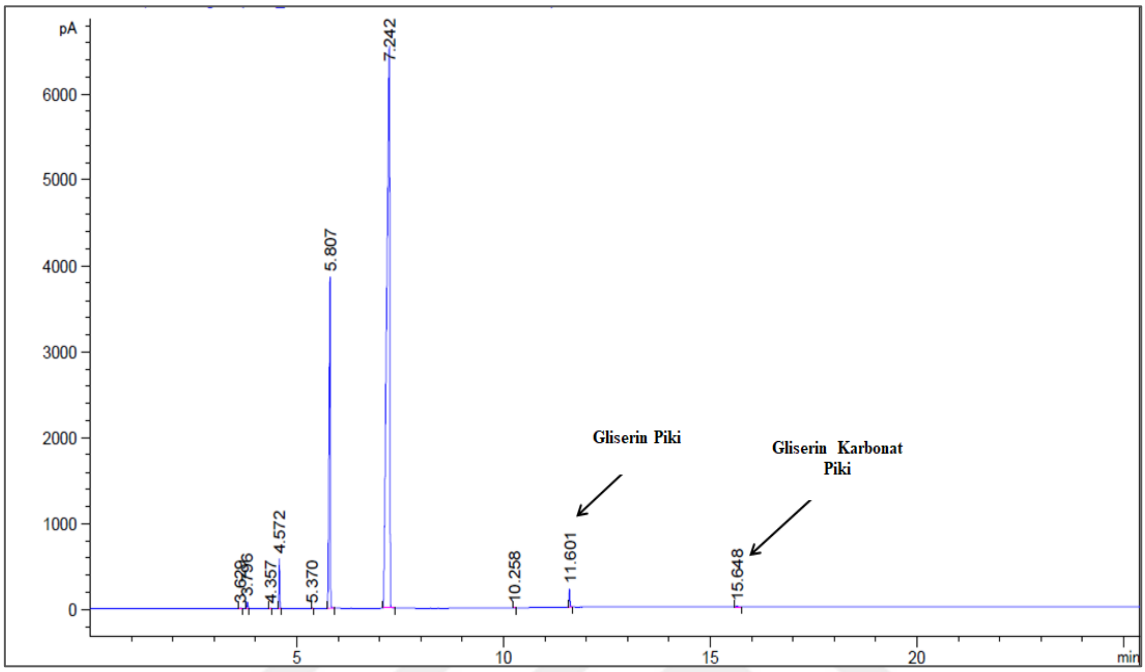
Protein Derişimi Kalibrasyon Grafiği



Şekil A.1. UV-VIS Spektroskopi ile protein derişimi kalibrasyon grafiği (Ögretmen, 2021)

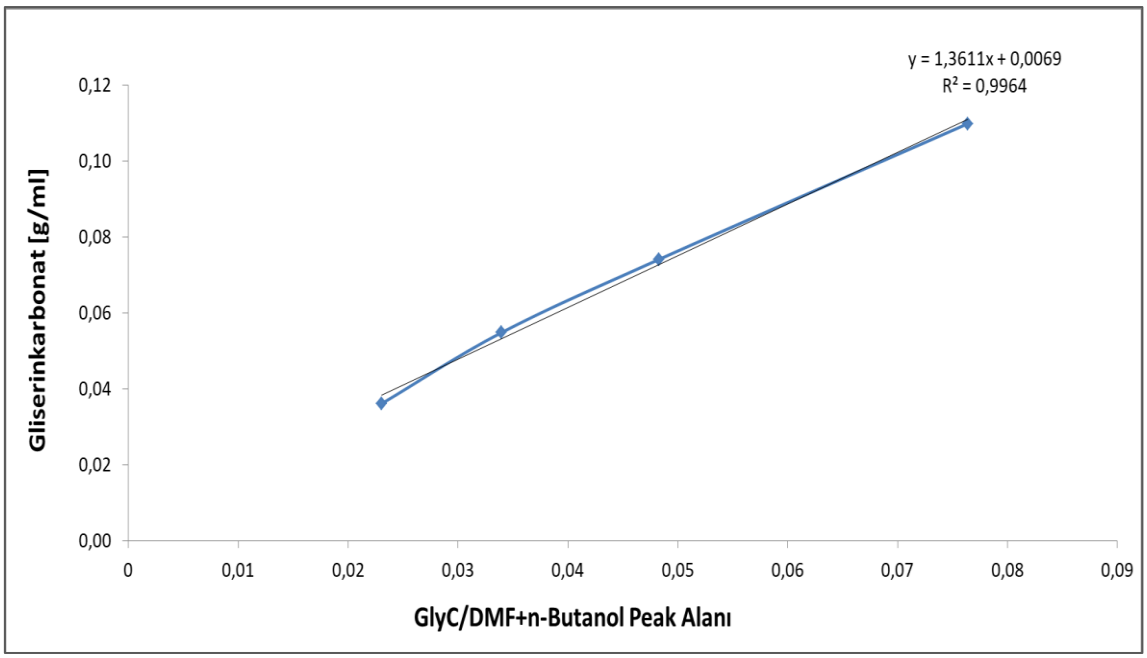
Ek- B

Gaz Kromatografi Kromatogramı



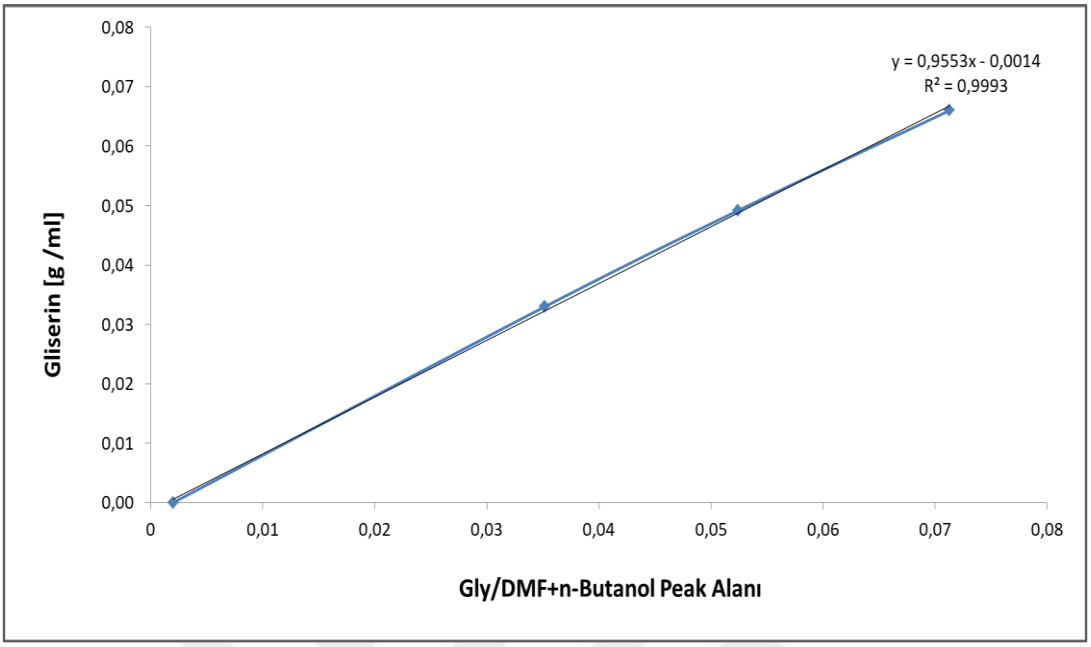
Şekil B.1. Gliserin karbonat analizi GC kromatogramı

GlyC kalibrasyon eğrisi



Şekil B.2. Gliserin karbonat GC kalibrasyon eğrisi

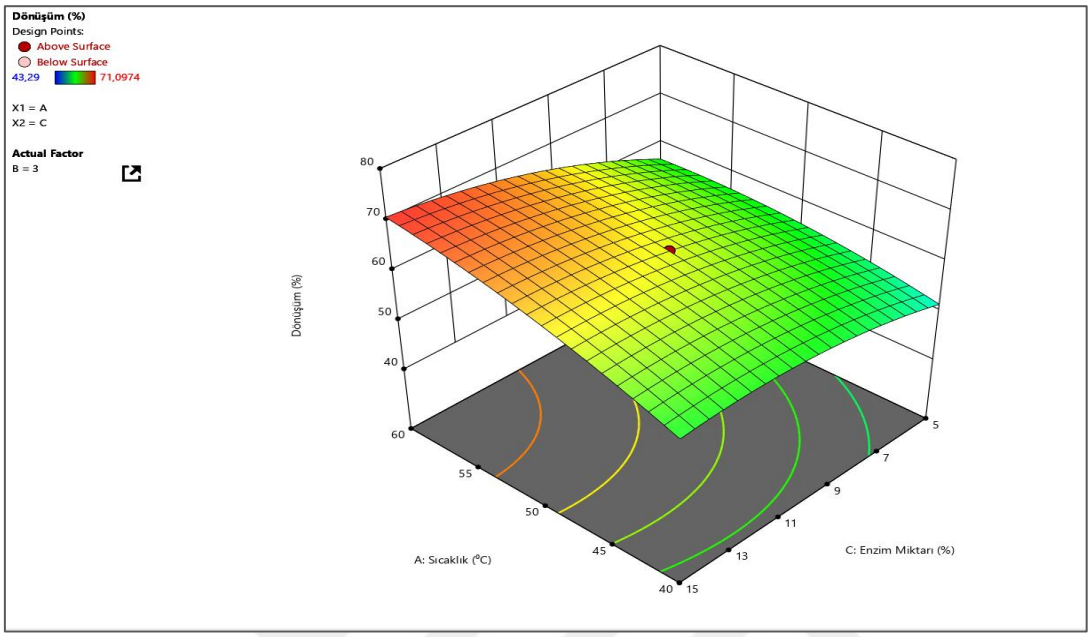
Gliserin Kalibrasyon Eğrisi



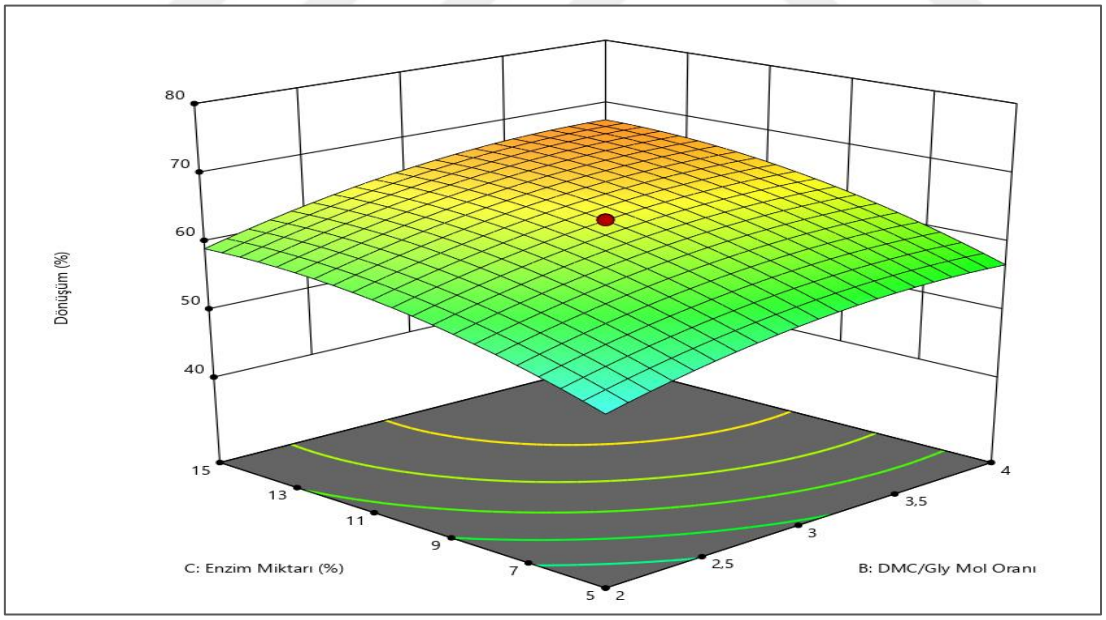
Şekil B.3. Gliserin GC kalibrasyon eğrisi

Ek-C

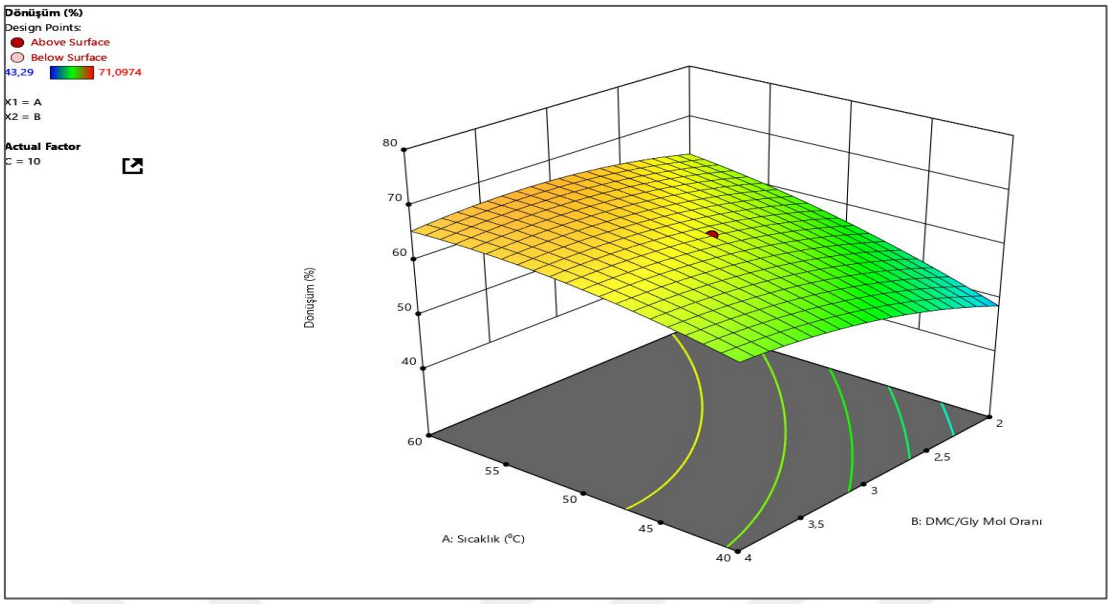
Gly Dönüşümünün YYY ile Optimizasyonu



Şekil C.1. Sıcaklık-Enzim ikili etkileşiminin Gly dönüşümüne etkisine ait üç boyutlu grafiği



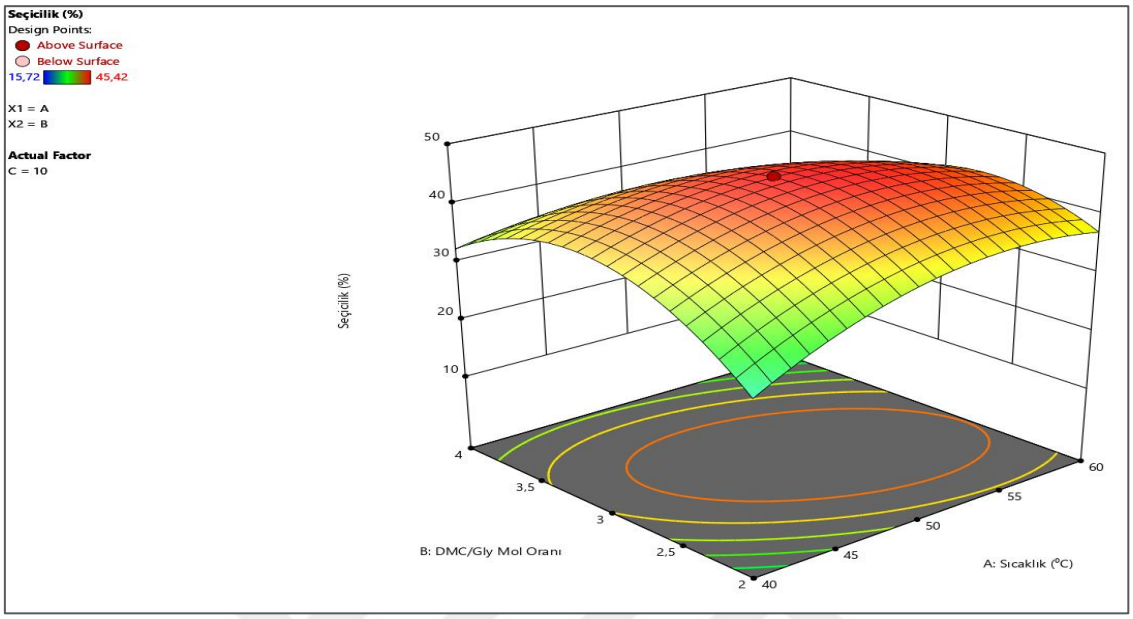
Şekil C.2. Enzim Miktarı ve DMC/Gly Mol oranı Gly dönüşümüne etkisine ait üç boyutlu grafik (Sıcaklık: 50 ºC)



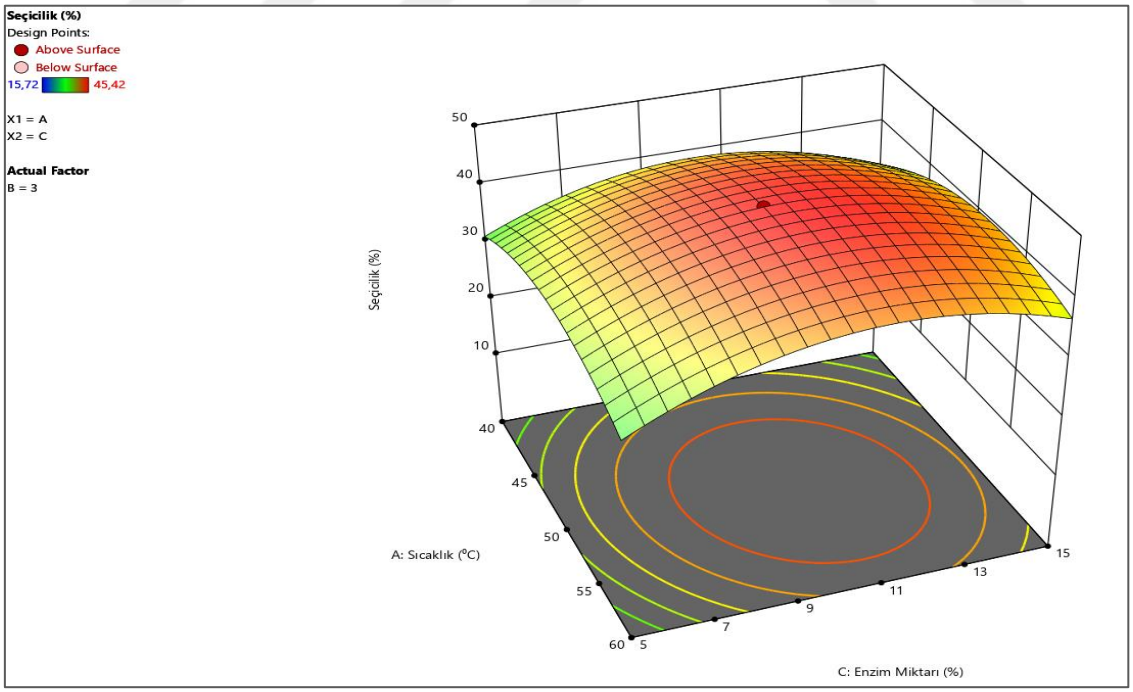
Şekil C.3. Sıcaklık ve DMC/Gly Mol oranı Gly dönüşümüne etkisine ait üç boyutlu grafik (Enzim miktarı: %10)

Ek D

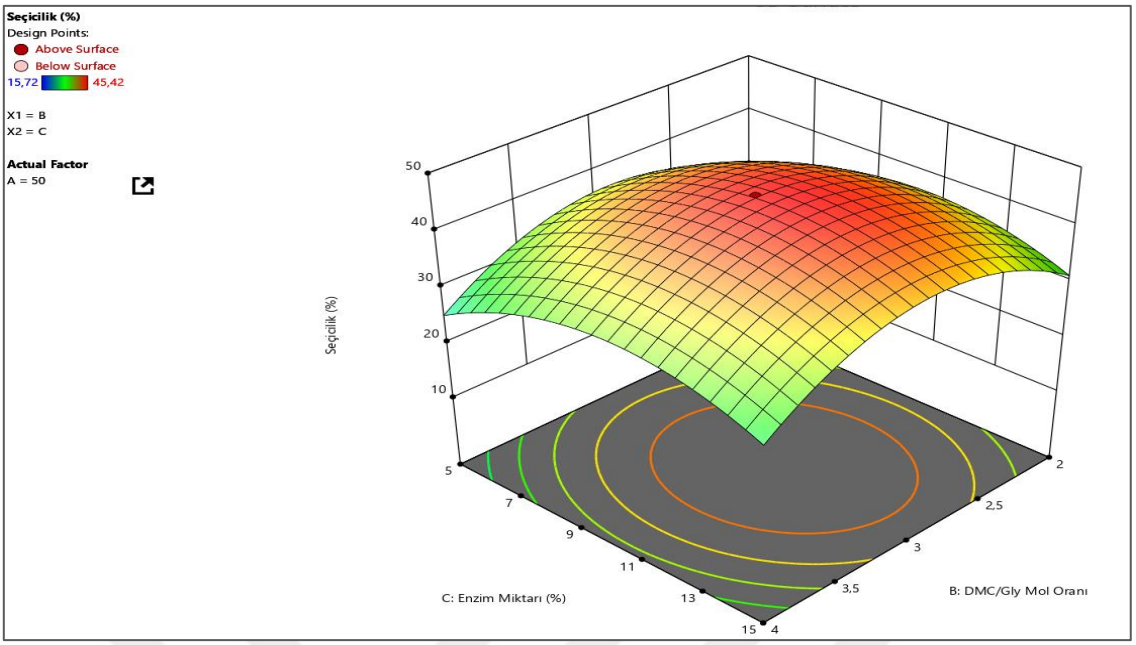
GlyC Seçimliliğinin YYY ile Optimizasyonu - Üç Boyutlu Grafikler



Şekil D.1. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC seçiciliğine etkisine ait üç boyutlu grafiği (Enzim miktarı: %10)



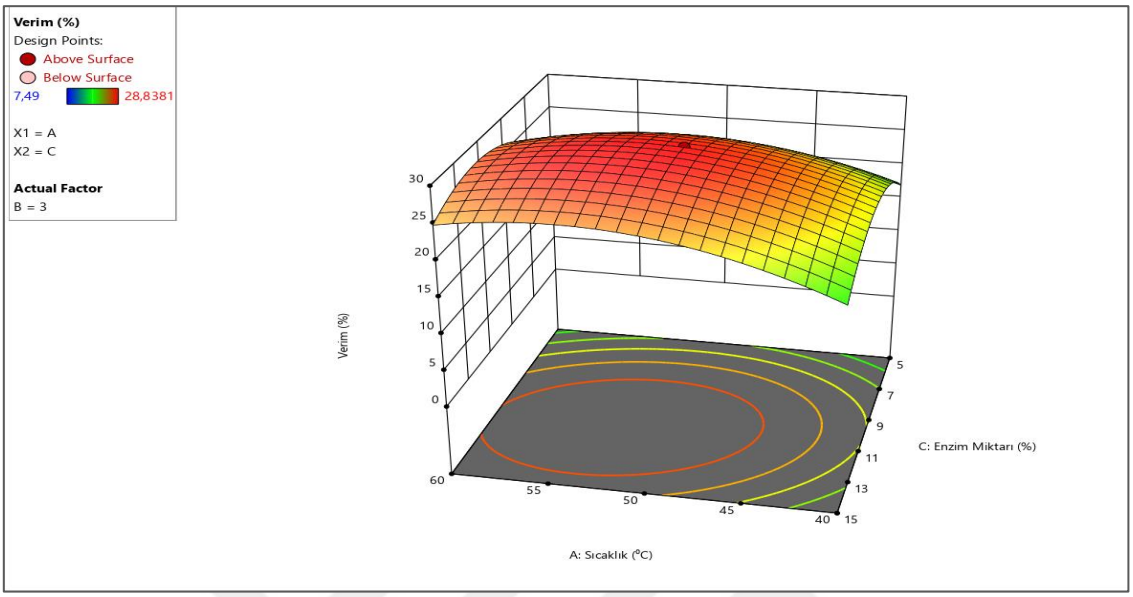
Şekil D.2. Enzim miktarı ve sıcaklığın GlyC seçiciliğine etkisine ait üç boyutlu grafiği (DMC/Gly Mol oranı: 3/1)



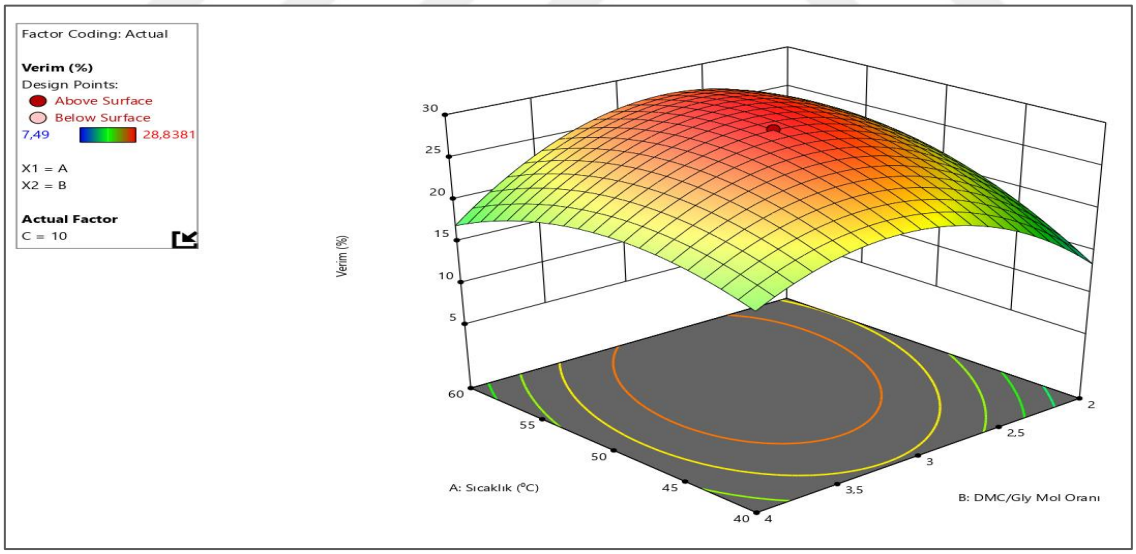
Şekil D.3. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC seçiciliğine etkisine ait üç boyutlu grafiği (Sıcaklık: 50)

EK E

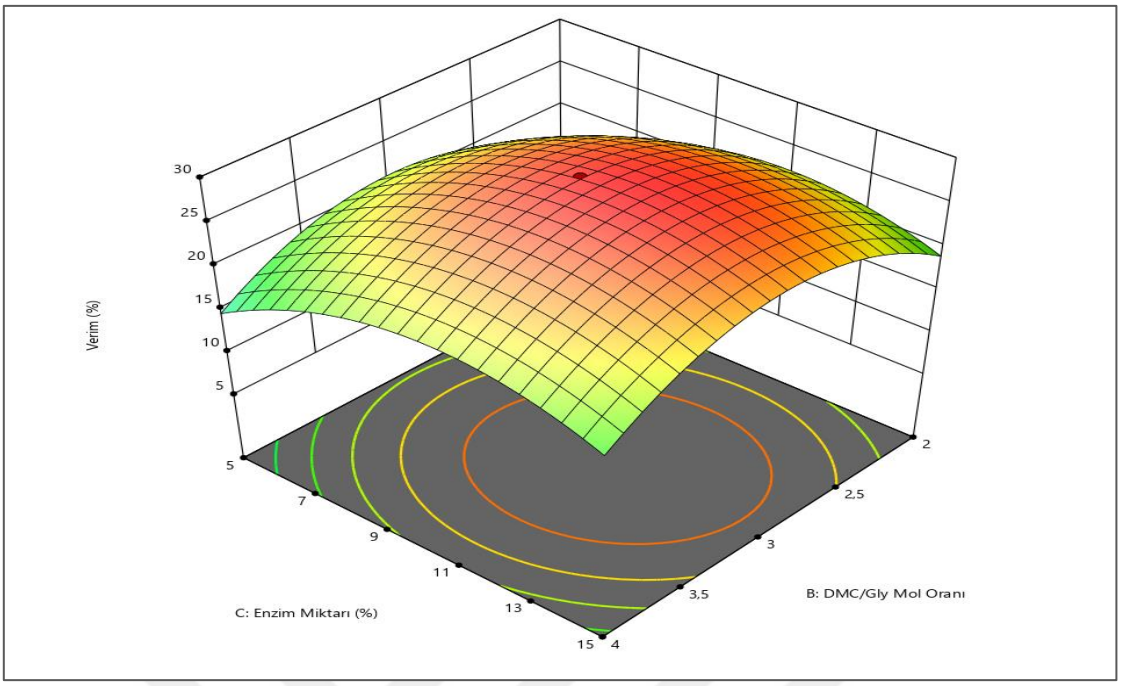
GlyC Veriminin YYY ile Optimizasyonu - Üç Boyutlu Grafikler



Şekil E.1. Sıcaklık ve Enzim miktarının GlyC verimine etkisine ait üç boyutlu grafik (DMC/Gly mol oranı: 3/1)



Şekil E.2. Sıcaklık ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait üç boyutlu grafik (Enzim miktarı: %10)



Şekil E.3. Enzim miktarı ve DMC/Gly mol oranının GlyC verimine etkisine ait üç boyutlu grafiği (Sıcaklık: 50 ºC)

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Aydoğdu, S., Kapucu, N. (2022). A review on the achievement of enzymatic glycerol carbonate production. *Turkish Journal of Chemistry, 46(5),* 1376-1396. https://doi.org/10.55730/1300-0527.3445.

Aydoğdu, S., Kapucu, N. (2019). Gliserin ve dimetil karbonattan (DMC) biyoteknolojik olarak gliserin karbonat üretim, *International Marmara Sciences Congress Autumn (IMASCON),* Kocaeli, Turkey, 01-03 Kasım 2018.

Aydoğdu, S., Kapucu, N. (2021). Immobilization of *Candida antarctica* lipase on bionanocomposite support, *Changing World Congress (International),* Istanbul, Turkey, 13-14 Kasım 2021.

Aydoğdu, S., Kapucu, N. (2022). Gliserinin çevre dostu bir yöntem kullanılarak karbonat türevi elde edilmek üzere değerlendirilmesi, *8. Uluslararası Mühendislik ve Teknoloji Yönetimi Kongresi*, İstanbul, 8-10 Aralık.

Duman T., **Aydoğdu, S.,** Kapucu, N. (2021). Gliserinin yakıt katkısı gliserin karbonat esterine enzimatik dönüşümü, *International Marmara Sciences Congress Autumn (IMASCON),* Kocaeli, Turkey, 21-22 Mayıs.

Öğretmen A., **Aydoğdu, S.,** Kapucu, N. (2020). Immobilization of lipase on bionanocomposite support as green sustainable material, *International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem* 2020), Ankara, Turkey, 16-18 Aralık 2020.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Amasya Merzifon'da tamamladı. Dortmund Teknik Üniversitesi Biyo ve Kimya Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik bölümü 2004 yılında başlamış olduğu Lisans eğitimini 2009 yılında tamamlayarak, 2009 yılı itibari ile Dortmund Teknik Üniversitesi Biyomühendislik alanında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitiminde Erasmus programı ile ISKEN Sugözü firmasında 3 aylık sanayi stajını tamamladı ve 2011 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2012 yılında Türkiye'ye döndü.

09/2017 tarihinde Kocaeli Üniversitesi Fen Billimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalında doktora eğitimine başladı ve 2018 yılı itibari ile doktora eğitimi boyunca 100/2000 öncelikli alanlara (Biyoyakıt) ait YÖK doktora bursuna layık görüldü. Doktora sürecine ait gerekli finansal destek, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi (BAP) tarafından KOU FDK-2022-2809 nolu proje ile sağlanmıştır.