

TEKSTİL ATIK SUYUNDA HRP-CLEA İLE HİDROJEN PEROKSİDİN GİDERİLMESİ İÇİN ÖLÇEK BÜYÜTME TASARIMININ MODELLENMESİ VE SİMÜLASYONU

Gülçin ÖZEVCI¹, Oğuz AKPOLAT², Hakan AYHAN³, Fatma AYHAN^{4*}

¹İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Görüntüleme Teknikleri Programı, İstanbul, Türkiye.

ORCID No: <http://orcid.org/0000-0003-1375-7443>

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 48000, Muğla, Türkiye.

ORCID No: <http://orcid.org/0000-0002-6623-14323>

³Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya & Biyomalzemeler Araştırma Grubu, 48000, Muğla, Türkiye.

ORCID No: <http://orcid.org/0000-0003-2911-1655>

⁴Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya & Biyomalzemeler Araştırma Grubu, 48000, Muğla, Türkiye.

ORCID No: <http://orcid.org/0000-0003-2220-4496>

Anahtar Kelimeler	Öz
HR Peroksidaz, Çapraz Bağlı Enzim Agregatları, Taşıyıcısız Enzim İmmobilizasyonu, Modelleme, Ölçek Büyütme.	<i>Hidrojen peroksit tekstil edüstrisinde ağartıcı olarak kullanılan kuvvetli bir oksidant kimyasaldır ve çevreye verilmeden önce atık sulardan giderilmesi önemlidir. Peroksidaz (HRP) enziminin oksitleyici substratı hidrojen peroksittir. Yapılan bu çalışmada, hidrojen peroksitin giderilmesinde HRP enzimi çapraz bağlı agregatlar (CLEA) şeklinde immobilize edilmiştir ve çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit (GA) kullanılmıştır. Serbest peroksidaz enziminin kinetik sabitleri hesaplandığında doygunluk sabiti 0,06965 mmol H₂O₂/L ve, maksimum özgül hız sabiti V_m değeri ise 0.0232 mmol H₂O₂/L.sn olarak bulunmuştur. Boyasız hidrojen peroksitli atık suda HRP-CLEA ortalama K_m doygunluk sabiti 0,00625 mmol H₂O₂/L, ortalama maksimum özgül hız sabiti V_m değeri ise 0.0699 x 10⁻³ mmol H₂O₂/L.sn olarak hesaplanmıştır. HRP-CLEA ile 15 dk içinde % 90 dan fazla H₂O₂ uzaklaştırma sağlanmıştır. H₂O₂ (0,02M) içeren atık suda giderim beş dakikada tamamlanmıştır. Ölçek büyütme yaklaşımında Euler çözüm algoritması kullanılarak veriler değerlendirilmiş ve kinetik sabitlerin değiştiği etkinlik faktör aralığında H₂O₂ giderimi hesaplanmıştır. Tepkime hızının doğrusal olarak değiştiği kabul edilerek elde edilen agregat formundaki enzimle ölçek büyütülmesi sırasında oluşacak aktivite farklılaşmaları %125-%50 aralığında belirlenmiş olup, bunlara bağlı etkinlik faktörleri dikkate alınarak endüstriyel boyutta tasarım modellenmiştir. Büyütülen tepkime hacminde oluşacak derişimler simule edilmiştir. Elde edilen sonuçlar HRP-CLEA'ların zaman ve maliyet açısından serbest enzime göre daha avantajlı olduğunu göstermiştir.</i>

MODELLING AND SIMULATION OF SCALE-UP DESIGN FOR THE REMOVAL OF HYDROGEN PEROXIDE WITH HRP-CLEA IN TEXTILE WASTEWATER

Keywords	Abstract
HR Peroxidase, Cross-Linked Enzyme Aggregates, Carrier-Free Enzyme Immobilization, Modelling, Scaling Up.	<i>Hydrogen peroxide is a strong oxidant chemical used as a bleach in the textile industry and it is important to remove it from water before being released to the environment. The oxidizing substrate of peroxidase (HRP) enzyme is hydrogen peroxide. In this study, cross-linked aggregates (CLEA) of HRP enzyme were used to remove hydrogen peroxide and glutaraldehyde (GA) was used as a crosslinking agent. When the kinetic constants of the free peroxidase enzyme were calculated, saturation constant was 0,06965 mmol H₂O₂/L and maximum specific rate constant was found as 0.0232 mmol H₂O₂/L.sec. Average saturation constant, K_m of HRP-CLEA was found as 0,00625 mmol H₂O₂/L, and average</i>

* Sorumlu yazar; e-posta : fayhan@mu.edu.tr



Bu eser, Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) hükümlerine göre açık erişimli bir makaledir.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

maximum specific rate constant value, V_m , was calculated as 0.0699×10^{-3} mmol H_2O_2 /L.sec in wastewater without dye. More than 90 % H_2O_2 removal was achieved in 15 minutes with HRP-CLEA. The removal of the wastewater containing H_2O_2 (0.02M) was completed in five minutes. In the scale-up approach, the data was evaluated using the Euler solution algorithm and the H_2O_2 removal in the efficiency factor range where the kinetic constants change was calculated. Assuming the reaction rate changes linearly, the activity variations that will occur during scaling up with the enzyme in aggregate form were determined in the range of 125% -50%, and the industrial-scale design was modelled by taking into account the activity factors. In scaling up, concentrations that will occur in the increased reaction volume have been simulated. The results obtained showed that HRP-CLEAs are more advantageous than free enzyme in terms of time and cost.

Araştırma Makalesi		Research Article	
Başvuru Tarihi	: 07.10.2020	Submission Date	: 07.10.2020
Kabul Tarihi	: 17.03.2021	Accepted Date	: 17.03.2021

1. Giriş

Kasar (Ağartma) işleminin birinci amacı pamuğa arzu edilmeyen esmerliği veren renkli safsızlıkları (boyarmaddeleri) gidermektir. Günümüzde en yaygın kullanılan oksidatif ağartıcı kimyasallar hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hipoklorit ($NaClO$) ve sodyum klorit ($NaClO_2$) olarak sayılabilir (Tamtürk, 2007). İleri oksidasyon işlemlerinde atık su arıtımında oksidasyon amaçlı olarak H_2O_2 kullanımı gündemdedir ve araştırmalar devam etmektedir (Cuerda-Correa, Alexandre-Franco ve Fernández-González, 2020; Garrido-Cardenas, Esteban-García, Agüera, Sánchez-Pérez ve Manzano-Agugliaro, 2020). Fakat sürdürülebilir yeşil teknolojilerin güncel talepleri, ekolojiyi korumak büyük önem kazanmıştır. Endüstriyel süreçlerde enzim teknolojisinin kullanımını hızla arttırmıştır. Endüstriyel işlemlerin zorlu koşullarına rağmen enzim immobilizasyon teknikleri ile artan katalitik özellikleri sayesinde enzimler biyokatalizörler olarak daha fazla kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit giderilmesinde enzim kullanımı veya kullanılan peroksidin enzim yardımıyla uzaklaştırılması yaygınlaşmaya başlamıştır (Mohamada, Marzukia, Buanga, Huyopb ve Wahab, 2015; Chapman, Ismail ve Dinu, 2018). Bu enzimlerden biri de peroksidaz enzimidir ve parçalanmasında enzimatik olarak iç elektron donörlerinin yardımı ile suya indirgenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. En verimli olarak ise metal içeren peroksidazlar aracılığı ile aşağıdaki tepkimeye göre (Denklemler 1) zararsız O_2 ve suya dönüşmektedir. Günlük hayatta verimli olarak giderimi hem prokaryotik ve ökaryotik hücreler için hem de bazı anaerobik bakteriler için çok önemlidir (Zámocky, Gasselhuber, Furtmüller ve Obinger, 2012).



CLEA'lar taşıyıcısız immobilize enzim ailesine yakın zamanda katılmışlardır. Çözünmüş enzim molekülleri ile moleküller arası uzaklığı etkileyen faktörler değiştirilerek daha sonra çapraz olarak bağlanan fiziksel agregatlar oluşturabilirler. Ancak enzim agregatlarının

boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirileceği, enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanacağı konularının aydınlatılması gerekmektedir. CLEA'lar ile ilgili yapılan çalışma; geniş bir enzim aralığında uygulanabilirliği,

boyut kontrolü, yeni agregasyon yöntemleri ve yeni çapraz bağlayıcılar konularıdır. Amaç, daha yaygın uygulamalar için güçlü çapraz bağlı enzim agregatlarını seçip tasarlamak üzere esnek bir teknoloji platformu oluşturabilmektir. Bu tür tasarım süreçleri üretim parametrelerinin optimizasyonuna dayanır (Sheldon, 2007; Leitgeb, Knez ve Vasić, 2016; Cao, Langen, ve Sheldon, 2003; Yamaguchi, Kiyota ve Miyazaki, 2018; Kieran ve Berovic, 2001). Yapılan çalışmada, tekstil sanayiinde yaygın olarak kullanılan atık su temizlenmesinde HRP enziminin çapraz bağlı enzim agregatları oluşturularak taşıyıcısız immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest enzimin çözünmez agregatlarını oluşturmak için çapraz bağlayıcı olarak GA kullanılmıştır ve tekstil sektörü ağartma suyunda bulunan H_2O_2 immobilize enzim setleri ile parçalanmış ve optimum sonucu veren agregat formundaki enzimle ölçülen kinetik sabitler kullanılarak ölçek büyütme yapılmıştır. Ölçek büyütme için yapılan modelleme çalışmasında esas olarak kinetik sabitlerin belli bir etkinlik faktörüyle değiştiği kabul edilmiştir. Kabul edilen bu etkinlik faktörü değişmesine bağlı olarak büyütülen tepkime hacminde oluşacak derişimler simule edilmiştir. Sonuçlar zaman ve harcama açısından değerlendirilmiştir.

2. Bilimsel Yazın Taraması

Oksidasyon işleminin sentetik tekstil boyalara YTP kullanarak uygulanmasında enzimin serbest (Da Silva, de Sà, Russo Scio ve Ferreira-Leitao, 2010; Farias, de Oliveira Ulson de Souza, Guelli, de Souza, ve Morgado,

2017), taşıyıcı immobilize (Sekuljica, Prlainovic, Jakovetic, Grbavcic, Ognjanovi, Knezevi-Jugovic ve Mijin, 2016; Opwis, Kiehl ve Gutmann, 2016; Yinca, Yan, Xueyong, Qiao ve Xiaoping, 2017) veya ÇBEA formları (Grateron, Barbosa, Ruedaa, Ortiz-L'opez ve Torres, 2007; Mehde, 2019; Kulkarni, Kadam, Jeon ve Govindwar, 2020) ile araştırmalar yapılmıştır. Etanol varlığında sığır serum albumini (BSA) olmadan ve BSA varken oluşturulan agregatlar çapraz bağlanmış ve üç azo boyanın renk giderimi sıcaklık ve pH için optimize edilmiştir. Agregatların yıkanmadan veya yıkanarak tekrar kullanılabilmesi bildirilmiştir (Grateron, ve diğ., 2007). Fonksiyonlaştırılmış manyetik CLEA'lar farklı agregat ajanlar ile çöktürülüp GA ile çapraz bağlanmıştır. Dört farklı boyanın serbest enzime göre % 93-55 arasında giderimi rapor edilmiştir. Zamanın çapraz bağlanma ve ısıl aktivite kaybı kinetiğine etkisi incelenmiştir (Mehde, 2019). *Dermatocarpon vellereceum* tarafından salınan enzim çözeltisi CLEA olarak oluşturulmuş ve karboksimetil selüloz/aljinat mikrokapsül içine hapsedilmiştir. Tekstil atık suyunda bulunan bazı boyaların renk giderimi koşulları iki farklı deneysel tasarım kullanılarak optimize edilmiştir (Kulkarni ve diğ., 2020). Fakat HRP-CLEA formundaki enzim yapılarının gerçek tekstil atıklarında denenmesi ve ölçek büyütme yapılarak endüstriyel düzeyde tekstil atık su temizlemede kullanımına yönelik araştırmaya tarafımızca ulaşılamamıştır.

3. Yöntem

Bu çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

3.1. Peroksidaz Enziminin Taşıyıcısız Olarak Agregat Formda Eldesi

Sunulan çalışmada HRP enziminin çapraz bağlı enzim agregatları oluşturularak taşıyıcısız immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan serbest enzim SIGMA-Aldrich Chemie'den satın alınarak temin edilmiştir. Serbest enzimin çözünmez agregatlarını oluşturmak için ise çözülmüş durumdaki enzim, uygun bir proteinik besleyici (proteik feeder) varlığında bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilmiştir. Bu işlemin yapılmasının amacı protein yapısındaki molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri değiştirerek fiziksel olarak enzimin çözünmez yapıya kavuşturulmasıdır. Son olarak da tekstil ağartma işlemindeki atık suyun içerdiği peroksidin giderimi için hazırlanan serbest ve agregat formundaki enzimlerin aktiviteleri tayin edilmiştir.

Enzim agregatlarının eldesi için; enzim 0,05 mg/mL 25°C'de pH 7 Sodyum tetraborat tamponunda çözülür. Derişimi 0,05 mg/mL olan enzim çözeltisinden 80µL alınır ve üzerine 5 mg BSA eklenerek ve 100 devir/dak

karıştırma hızında 5 dakika süreyle karıştırılarak proteinin tamamının çözünmesi sağlanmıştır.

Enzim moleküllerinin çapraz bağlanabilmesi için ortama %2 (h/h) olacak şekilde GA eklenmiştir ve son hacim 1mL'ye tamamlanmıştır. Sonra çözeltiler ilk 15 dakika karıştırılarak toplam 2 saat 25°C'de tutulmuştur. 2 saatin sonunda çözeltiler 4°C'de bir gece bekletilmiş ve aynı sıcaklıkta 7000 devir/dak karıştırma hızında 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Ortamdaki fazla GA'ın uzaklaştırılması amacıyla üst faz alındıktan sonra 4 defa destile su ile yıkanmıştır. Burada agregat oluştururken literatürdeki çalışmalardan optimum değerler kullanılmıştır (Topçular, 2006; İspirli ve Ayhan, 2008; Ayhan, İspirli ve Ayhan, (2011); Ayhan, Ayhan ve Gülsu, 2012; Akpolat, Ayhan ve Ayhan, 2013).

3.2. Peroksidaz Enziminin Aktivite Tayini

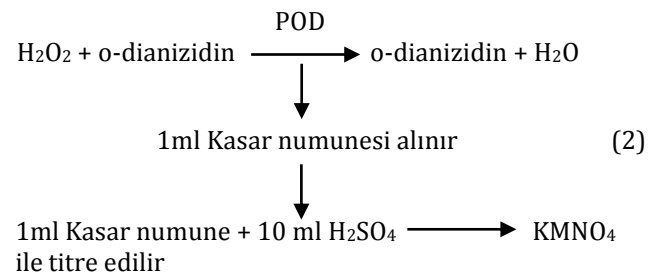
Peroksidaz enziminin 1 aktivite birimi, pH=7 ve 25°C'de 1dakika süre içinde 1µmol hidrojen peroksiti (H₂O₂) suya dönüştüren enzim miktarıdır. Tepkime, 25°C ortam sıcaklığında H₂O₂'in o-dianizidin ile reaksiyona sokularak POD enzimi yardımıyla suya dönüşmesi esasına dayanır. Araştırmada H₂O₂'in derişimi tayin edilerek aktivite hesaplanmıştır.

3.2.1. Hidrojen Peroksit Tayini

Hidrojen peroksit tayini için 0.02 M potasyum permanganat ve % 9.8'lik sülfürik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Örnek/kasar numunesinden 1 mL alınıp 10 mL H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılmıştır. 0.020 M KMnO₄ ile titre edilmiş, H₂O₂'nin tamamı giderildiğinde eflatun-kırmızı renk dönüşüm noktası gözlenmiştir (Denklem 2). Harcanan KMnO₄ miktarları 1.7 ile çarpılarak banyodaki H₂O₂ miktarları g/L olarak bulunmuştur.

Bu işlemler hem serbest peroksidaz enzimi ile hem de çapraz bağlı enzim agregatı ile gerçekleştirilmiştir. (Benli, 2015; <http://kimtekskimya.com/test.html#hidrojen>).

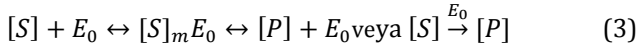
Serbest peroksidaz enzimi için; 0,5 Molar 1mL H₂O₂ üzerine 6,0 mM 1mL o-dianizidin ilave edilmiş ve 0,5 mg/mL POD enziminden 25µL enjekte edilerek tepkime gerçekleştirilmiştir. Bir dakika ara ile 1mL örnek alınıp yukarıda anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir.



Agregat için: 0,5 Molar 5 mL H₂O₂ üzerine 6,0 mM 5 mL o-dianizidin ilave edilmiş ve içerisine oluşturulan çapraz bağlı agregat daldırılarak bir dakika ara ile örnek alınmıştır. Hem serbest peroksidaz enzimi için hem de agregat için 1 dk ara ile 5 örnek alınmış ve harcanan KMnO₄ miktarları 1.7 ile çarpılarak banyodaki H₂O₂ miktarları g/L olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda zamana bağlı harcanan H₂O₂ miktarlarının grafikleri çizilmiştir. Grafiklerin doğru denklemlerinden eğimler bulunmuş ve hız değerleri hesaplanmıştır. Ticari bir firmadan (İzmir-Torbali Ekoten Firması) temin edilen tekstil atık suyunda H₂O₂ benzer şekilde tayin edilmiştir.

3.3. Kinetik Parametre Değerlerinin Bulunması

Enzimatik tepkimeler (Denklem 3) genel olarak aşağıdaki gibi gösterilir,



olarak yazılır. Bu tepkimenin hızı da (v veya v) tepkimeye giren bileşenlerin ya da ürünlerin zamana bağlı olarak derişiminin bir ifadesi olup (Denklem 4), S, substrat, P, ürün ve E₀ da başlangıçtaki enzim derişimini göstermek üzere aşağıdaki gibi yazılır.

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_m[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Yukarda verilen ve enzimatik tepkimeler için önerilen Michealis-Menten kinetik model parametreleri yine bu ifadenin doğrusallaştırılması ile aşağıda ifade edilen Lineweaver-Burk denklemi ile hesaplanmıştır. İlk tepkime hızları farklı substrat (H₂O₂) derişimlerinde alınan ölçümler ile çizilen grafiklerden elde edilmiştir (Denklem 5).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} + \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{[S]} \quad (5)$$

Burada K_m enzimatik tepkimeleri için önerilmiş olan Michealis-Menten kinetik sabitini belirtmektedir, v_m ise ulaşılabilir en yüksek tepkime hızıdır. Kinetik parametrelerin hesaplanmasında MATLAB 7.0 programı kullanılmıştır (Özevci, 2012). Tepkimeye ilişkin kinetik sabitlerin bulunmasının ardından ölçek büyütmenin modellenmesine geçilmiştir.

3.4. Ölçek Büyütmenin Modellenmesi

Ölçek büyütmeyle ilişkin modelleme hacim (V), enzim miktarı (E), tepkime hızı için (v), kinetik sabitler (v_m) veya (K_m) olarak ölçek büyütme hızlarının fonksiyonları ile verilir (Denklem 6) (Kieran ve Berovic, 2001; Smith, 1970; Lübbert, Simutis, Volk ve Galvanuskas, 2000).

$$\frac{V_{pilot} \text{ ölçek}}{V_{laboratuvar} \text{ ölçek}} \alpha \eta_{pilot}^n \text{ ve } \frac{V_{endüstriyel} \text{ ölçek}}{V_{pilot} \text{ ölçek}} \alpha \eta_{endüstriyel}^n \quad (6)$$

etkinlik faktörü η (Denklem 7) de sunulmaktadır.

$$\eta = \frac{\text{gözlenen tepkime hızı}}{\text{Yığın substrat derişiminde (So) ölçülen hız}} \quad (7)$$

Burada n, **üstel değişim sabiti** ve η **etkinlik faktörü** olarak da adlandırılır. **Pilot/Laboratuvar reaktör hacim oranının üstel değişim sabitini içeren etkinlik faktörü ile orantılı olduğu gösterilmiştir.** Üstel değişim sabiti n ve etkinlik faktörü η 'nin ideal laboratuvar çalışma koşullarını gösteren değerlerinin 1 olduğu anlaşılmaktadır. Bu durumda ölçek büyütme ile tepkime performansı değişmediği kabul edilmektedir. Tüm büyütme oranları arasındaki ilişki ancak tepkimenin laboratuvar ve pilot ölçekte gerçekleştirilerek etkinlik faktörünün bulunmasıyla belirlenebilir ve enzim üzerinde gerçekleşen tepkime hızına etki eden ısı, kütle ve hareket bileşenlerinin toplam göstergesi olarak ölçülen etkinlik faktörü ile ancak tepkimenin oluşma hızı, dolayısıyla tepkimenin gidışı kontrol edilebilir. Bunun için tepkimenin hızı (V) Michealis-Menten kinetik modelinin etkinlik faktörünü de içerecek şekilde düzenlenmesiyle aşağıdaki gibi tanımlanır (Denklem 8);

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{v_m * \eta * [S]}{K_m * \eta + [S]} \quad (8)$$

ve önerilen model için yine önerilen farklı etkinlik faktörleri için tepkime hızları hesaplanarak zamana karşı bulunan substrat derişimleri çizilir ve etkinlik faktörünün değişmesiyle tepkimenin ilerlemesi gözlenir. Etkinlik faktörüne ilişkin olası değişimler laboratuvar-pilot ölçek ölçümleri ile belirlendikten sonra endüstriyel boyuttaki üretimler için gerçekçi tahminlerde bulunulur. Tepkime ilerlemesini gösteren zamana-substrat derişim eğrilerinin etkinlik faktörünü içerecek şekilde çizilmesi yani bir başka deyişle simulasyonu aşağıdaki şekilde tepkime hızını da gösteren önerilmiş kinetik modelin sayısal çözümlenmesine dayanır. Bu da çözümlenmedeki adım aralığının gerçekçi olabilmesi için yeterince küçük

olması, yani minimizasyonu diğer bir deyişle optimizasyonu olarak anlaşılır. Bu optimizasyonun ölçümü ise adım aralığının küçültülerek hesaplanan iki sonucun karşılaştırılması ve farkın önceden belirlenen ve kabul edilebilir bir hata düzeyinin altında olmasıyla yapılır. Çözümleme süreci için en bilinen Euler Yöntemi, matematiksel anlamda türevin limit çerçevesinde genişletilmesine sayısal olarak yaklaşım olanağı verirken, ardı ardına hesaplama adımlarıyla da simülasyonun gerçekleştirilmesini yine sayısal olarak sağlar.

Hızı içeren çözüm denklemi (Denklem 9);

$$v = (\lim \Delta t \rightarrow 0) - \frac{\Delta S}{\Delta t} = - \frac{dS}{dt} \quad (9)$$

olarak yazılır ve sayısal çözümlemede Δt yeterince küçük seçilerek i. adım için (Denklem 10);

$$t_{i+1} = t_i + \Delta t, \quad \Delta S_i = \left\{ (v_m * \eta) * [S_i] \right\} / \left\{ K_m * \eta + [S_i] \right\} \quad (10)$$

ve $S_{i+1} = S_i + \Delta S_i$

Örneğin ilk adımda (i=1) birinci adımın bitiş dolayısıyla ikinci adımın (i=2) başlangıç değeri hesaplanmış olur ve bu süreç istenen zamana (ya da seçilen dönüşme derecesine) kadar sürdürülür. Burada sonucun gerçekçi olması için yazılan optimizasyon fonksiyonu belirlenen bir hata değeri için ($\varepsilon < \text{Hata}$) aşağıdaki gibidir; (Denklem 11)

$$J = \left\{ (S_{i+1})_{\Delta t 2} - (S_{i+1})_{\Delta t 1} \right\} / \left\{ (S_{i+1})_{\Delta t 1} \right\} \rightarrow \min, \quad J \leq \varepsilon \quad (11)$$

Δt yeterince küçük seçilmişse yani $J \leq \varepsilon$ ise hata en azdır ve çözüm gerçekçi kabul edilir ve bunun da ancak hesaplamayla veya deneyimle doğrulanması gereklidir (Smith, 1970; Lübbert ve diğ., 2000). Ölçek büyütmenin modellenmesinde MATLAB 7.0 programından yararlanılmıştır (Özveci, 2012). Verilerin değerlendirilmesi ve ölçek büyütmenin modellenmesi algoritması üç ana başlık altında toplanmıştır.

Bunlar;

1. Deneysel ölçüm değerlerine bağlı olarak zamana karşı derişim ve dönüşme değerlerinin grafikler halinde sunulması, tepkime hızlarının doğrusal değiştiği başlangıç bölgesi için bulunması, tepkime kinetiği için önerilen Michealis-Menten kinetik modelindeki sabitlerin hesaplanması ,
2. Muhtelif etkinlik faktörleri için ölçek büyütülmesinin modellenmesi ve bu etkinlik faktörlerine bağlı simülasyon eğrilerinin çizilmesi,

3. Etkinliğin doğrusal değiştiği kabul edilerek endüstriyel boyutta üretimin tasarlanması, olarak verilmiştir.

4. Bulgular

Yapılan çalışmada; Horseradish Peroksidaz Enziminin çapraz bağlı enzim agregatları oluşturularak taşıyıcısız immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Peroksit giderimi için hazırlanan serbest ve agregat formundaki enzimlerin farklı çalışma koşullarındaki aktiviteleri tayin edilmiştir. Serbest ve agregat haldeki enzimin kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Tekstil sektörü ağartma suyunda bulunan H_2O_2 immobilize enzim setleriyle parçalanmıştır. Son olarak da agregat formundaki enzimin ölçek büyütülmesi sırasında oluşacak aktivite değişimi belirlenen etkinlik faktörlerine bağlı olarak modellenmiştir ve endüstriyel boyutta tasarımı gerçekleştirilmiştir.

4.1. Enzim Aktivite Ölçümleri

Bu bölümde serbest enzim ve oluşturulan agregatları ile giderilen H_2O_2 miktarları belirlenmiştir. Serbest enzim ile agregat formlarında yapılan ilk denemelerde ölçülen $KMnO_4$ değerlerinden hesaplanan H_2O_2 derişimleri Tablo 1'de görülmektedir. Deneysel sonuçlar üç değer in ortalaması olarak sunulmuştur. Araştırmada serbest enzimle yapılan denemelerde başlangıç derişimi 0.5M olan H_2O_2 'nin dördüncü dakika sonunda tamamı giderilmiş ve % 100 verim elde edilmiştir.

Çalışmada agregatla yapılan ve ikinci denemelerde başlangıç derişimi 0.5M olan H_2O_2 'nin on beş dakika sonunda birinci denemede % 88'i giderilerek derişimi 0.06M'a inerken, ikinci denemede bu değer 0.043M'a inerek H_2O_2 'nin % 91'i giderilmiştir.

Endüstride yaygın olarak kullanılan serbest enzimle gerçekleştirilen atık su temizleme işleminin dezavantajı enzimin tekrar kullanılamaması ve atık su ile birlikte kaybedilmesidir. Bu duruma alternatif bir yöntem de atık suyun taşıyıcısız immobilize enzimler ile arıtılmasıdır. İzmir-Torbalı'dan (Ekoten Firması) temin edilen ağartma işlemi sonrası atık su örneğine oluşturulan agregatlar daldırılarak yapılan denemelerde ölçülen $KMnO_4$ değerlerinden hesaplanan H_2O_2 derişimleri ise Tablo 2'te görülmektedir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi oluşturulan ilk agregatla ağartma işlemi sonunda, yıkama suyunda kalan 0.02 Molar derişimli atık suda yapılan denemede 1 dakika içinde tüm hidrojen peroksit giderilirken ikinci agregatla yapılan denemede 6 dakika tüm hidrojen peroksit giderilmiştir. Agregat formundaki peroksidaz enzimi ile yapılan denemelerden hidrojen peroksidin tamamının çok kısa sürede giderilmesi agregat formun aktivitesinin çok yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışma kapsamında oluşturulan agregatla yapılan denemelerde ortalama % 90 verim elde edilirken aynı agregat atık su gideriminde verim %100'e çok kısa sürede erişmiştir. Tüm denemeler sonucu hesaplanan Michealis-Menten Kinetik Sabitleri ise Tablo 3'de verilmiştir. Serbest peroksidaz enziminin kinetik sabitleri hesaplandığında doyunluk sabiti 0,06965 mmol H₂O₂/L ve, maksimum özgül hız sabiti V_m değeri ise 0.0232 mmol H₂O₂/L.sn olarak bulunmuştur. Boyasız hidrojen peroksitli atık suda HRP-CLEA I ve II nin ortalama K_m doyunluk sabiti 0,00625 mmol H₂O₂/L, ortalama maksimum özgül hız sabiti V_m değeri ise 0.0699 x 10⁻³ mmol H₂O₂/L.sn olarak hesaplanmıştır. Agregat (I) ve Agregat (II) için hesaplanan K_m ve V_m değerleri serbest enzimin kinetik parametre değerlerine göre düşük bulunmuştur. Bunun nedeni agregat yapıdaki enzimin substrat ilgisinin azalması ile K_m değerinin düşmesi ve buna bağlı olarak v_m değerinin de düşük çıkması olarak yorumlanabilir. Atık su kullanılarak Agregat (I) ve Agregat (II) ile yapılan denemelerde bulunan K_m ve v_m değerleri çok daha düşük bulunmuştur. Buradaki önemli düşme atık sudaki olası başka kirlilikler nedeni ile gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. Fakat başka kirlilikler enzim aktivitesine etkilese bile Tablo 2'de de görüldüğü gibi H₂O₂ hızlı bir şekilde giderilmiştir.

Burada taşıyıcısız immobilize enzimlerin kullanılmasının sebebi hazırlanmasının kolaylığı, geniş kapsamlı olması, yüksek konsantrasyonlu enzim

aktivitesi, yüksek kararlılık, düşük üretim maliyeti gibi endüstriyel uygulamalarda bize sunduğu pek çok avantajın olmasındandır. Birçok endüstriyel biyokatalizörde olduğu gibi ideal endüstriyel bir immobilize enzim aynı zamanda geri kazanım, geniş alanlarda kullanılabilme, maliyeti etkin ve kullanımı güvenilir olma kriterlerini de taşımaktadır (Cao ve diğ., 2003). Taşıyıcısız immobilize enzimler, yapılarında polimerik kütle barındırmadıklarından ve immobilizasyon işlemleri sırasında mekanik etkiye maruz bırakılmadıklarından üç boyutlu yapılarını ve aktivitelerini oldukça korumaktadırlar (Topçular ve Ayhan, 2007).

4.2. Ölçek Büyütme

Burada atık suda yapılan giderme işleminde optimum sonucu veren agregat formundaki enzimle ölçülen kinetik sabitler (ortalama K_m doyunluk sabiti 0,00625 mmol H₂O₂/L, ortalama maksimum özgül hız sabiti V_m değeri ise 0.0699 x 10⁻³ mmol H₂O₂/L.sn) kullanılarak ölçek büyütme gidilmiştir. Ölçek büyütme için yapılan modelleme çalışmasında esas olarak kinetik sabitlerin belli bir etkinlik faktörüyle değiştiği kabul edilmiştir.

Kabul edilen bu etkinlik faktörü değişmesine bağlı olarak büyütülen tepkime hacminde oluşacak derişimler simule edilmiştir. Etkinlik faktörüne bağlı olarak çizilen dönüşüm eğrileri Şekil 1'de sunulmuştur.

Tablo 1.

HRP Enzim H₂O₂ Dönüşüm Ölçümleri.

Zaman (dak)	Serbest enzim		Zaman (dak)	Agregat enzim (I)		Agregat enzim (II)	
	Ortalama H ₂ O ₂ derişimi (mol/Lt)	Dönüşüm (%)		Ortalama H ₂ O ₂ derişimi (mol/Lt)	Dönüşüm (%)	Ortalama H ₂ O ₂ derişimi (mol/Lt)	Dönüşüm (%)
0	0,5	0	0	0,5	0	0,5	0
1	0,338	32,4	1	0,397	20,6	0,395	21
2	0,2	60	3	0,304	39,2	0,305	40
3	0,058	88,5	6	0,217	56,6	0,209	58
4	0	100	10	0,14	72	0,150	70
			15	0,06	88	0,043	91

Tablo 2.

HRP Enzim Agregatlarının Atık Su Örneği H₂O₂ Dönüşüm Ölçümleri.

Zaman (dak)	Agregat (I) Ölçüm I	Dönüşüm (%)	Agregat (II) Ölçüm II	Dönüşüm (%)
0	0,02	0	0,02	0
1	0	100	0,015	92,5
3	0	100	0,01	95
6	0	100	0	100

Tablo 3.

HRP Enzim serbest ve Agregatların Michealis-Menten Kinetik Sabitleri.

Enzim	K_m (mM)	V_m (mmol/L.sn)
Serbest Enzim	0,06965	0.0232
Agregat (I)	0,05115	0.2046 x10 ⁻³
Agregat (II)	0,05240	0.2096 x10 ⁻³
Agregat (I) atık su	0,01000	0,0399 x10 ⁻³
Agregat (II) atık su	0,00250	0,0998 x10 ⁻³
Agregat (I ve II) atık su ortalama değeri	0,00625	0.0699 x 10 ⁻³

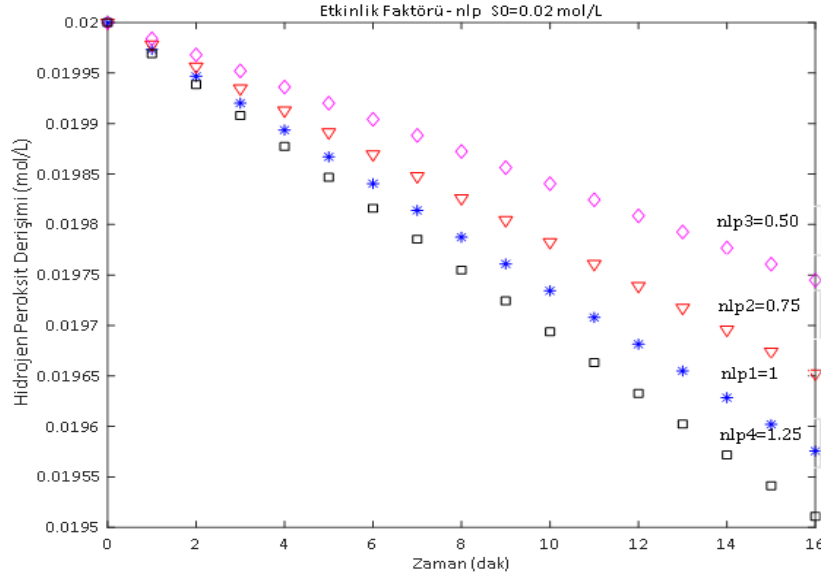
Etkinlik faktörü ($\eta_{ip}=1$) olması durumu laboratuvar koşullarının endüstri koşulları ile aynı olduğu yani etkinliğin değişmediği, verimin aynı kaldığı durumu gösterir. Etkinlik faktörünün 1'den büyük seçilmesi enzimin agregat formunda defalarca kullanımından kaynaklanan verim artışı olarak yorumlanabilir. Beklenildiği gibi, açıklanan bu durum, endüstriyel kullanımda da verim artışına sebep olacaktır. Etkinlik faktörünün %75 ve %50'lik değere düşmesinin sebebinin elde edilen enzim agregatlarının raf ömrüne bağlı olduğu, yani, immobilize enzim moleküllerinin yapısal bozulmasının neden olduğu düşünülmektedir. Topçular, 2006 yılındaki çalışmasında immobilize peroksidaz enziminin raf ömrünü 6 ay olarak belirlemiştir. Aynı derişimde agregat formunda peroksidaz enzimi kullanılarak yapılan bu çalışmada H₂O₂'in giderilmesinde ölçülen aktiflik Topçular'ın çalışmasındakine yakın kabul edilirse, agregat formundaki enzimin raf ömrü de yaklaşık 6 ay kabul edilebilir.

4.3. Büyük Ölçekte Tasarım

Ölçek büyütmenin modellenmesinden sonra büyük ölçekte üretimlerin yapılacağı tasarım modeline geçilmiştir. Büyük ölçekte tasarım modellemesinde tepkime hızının doğrusal olarak değiştiği kabul edilmiştir. Büyütme sırasında karşılaşılan tüm büyütme katlı oranlar şeklinde arttığı göz önüne alınmıştır. Tasarım sonuçları Tablo 4'de özetlenmiştir.

Atık sudaki H₂O₂'in peroksidaz enzim agregatı ile uzaklaştırılmasında optimum sonuçların elde edildiği

denemenin, Tablo 4'de verilen etkinlik faktörü (η_{ip}) değerleri kullanılarak endüstriyel boyutta tasarımı yapılmıştır. Tablo 4 incelendiğinde hacim 1000 kat artırılırken kullanılan enzim miktarı 5000/80 katına çıkarılmış, 1000 katlık hacim artışında etkinlik faktörüne bağlı olarak $n_{ip}=1.25$ için 3.56 saat giderim beklenirken, bu süre $n_{ip}=0.50$ için 8.89 saate çıkmıştır. Burada hacmin 1000 L olarak alınmasının sebebi, endüstriyel ortamdaki bir reaktörde ağartma sonrası atık su gideriminin gerçekleştirildiği hacim ile benzer olmasındandır. Bu çalışma kapsamında kullanılan HRP enzimi (HRP tip II enzim 275 mg'lık ambalajda 500IU/mg), tekstil sektöründe kullanılan teknik enzime kıyasla daha maliyetli olan analitik sınıf (analytic grade) bir enzimdir. Çalışmada 275 mg'dan 0,05 mg/ml'lik derişimde 5,5 litre analitik saflıkta enzim çözeltisi hazırlanabilmektedir. Bu enzim çözeltisi ile endüstriyel ortamdaki bir reaktörde ağartma sonrası 1000 L atık su giderimi gerçekleştirilebilmektedir. Aynı miktar atık suyun giderimi için kilolarca teknik katalaz enzimi kullanılmaktadır. Sonuç olarak kilolarca teknik katalaz enzimi yerine pahalı analitik saflıktaki HRP enzimini kullanmak maliyet açısından daha kârlı olacaktır. Endüstride, endüstriyel teknik katalaz enzimiyle yaklaşık 24 saatte yapılan arıtma işlemi modellenen sistemde 4.5 saat gibi kısa bir sürede gerçekleşerek büyük oranda zaman tasarrufu sağlanmıştır. Ayrıca immobilize enzim kullanımı ile hem enzim atık olarak atılmamakta, hem de tekrar tekrar kullanımı mümkün olmakta ve bu sayede de daha fazla atığı daha uzun süre temizleyebilmektedir.



Şekil 1. Farklı Etkinlik Faktörleri İçin Agregat Formunda Peroksidaz Enzimi İle Atık Su Ölçek Büyütmesi.

Tablo 4.

Endüstriyel Boyutta Üretim Tasarımı ($S_i=0.02$ mol/L, $V_i=1$ L).

S_p/S_i	V_p/V_i	η_{lp} (%)	El (μ L)	Ep (μ L)	vl (mol/L.dk)	vp (mol/L.dk)	t_i (dk)	t_p (dk)	t_p (sa)
1	1000	1.25	80	5000	0.02	0.025	16.67	213.33	3.56
1	1000	1	80	5000	0.02	0.020	16.67	266.67	4.44
1	1000	0.75	80	5000	0.02	0.015	16.67	355.56	5.93
1	1000	0.5	80	5000	0.02	0.010	16.67	533.33	8.89

*l: laboratuvar ölçekli; p: ölçek büyütülmüş proses.

5. Tartışma

Çalışmanın bu bölümünde benzer araştırmaların sonuçları göz önüne alınarak ölçek büyütmenin modellenmesinde kullanılacak olan Michealis-Menten kinetik sabitleri doğrudan hesaplanmıştır. Bunun için literatürde verilen ve Tablo 3'de sunulan K_m ve V_m değerleri, ölçülen substrat derişimi ve tepkime hızlarıyla birlikte Michealis-Menten denkleminde taşınarak kinetik sabitler MATLAB 7.0 programı ile bulunmuştur (Topçular, 2006; Topçular ve Ayhan, 2007). HRP-CLEA şeklinde oluşturulan enzim sisteminin kinetik parametreleri hesaplandığında kullanılan substrata göre farklı değerler bulunmuştur. Bulunan değerler incelendiğinde agregatlar için hesaplanan K_m değerlerinin küçülmesi, serbest enzime göre substrat ilgisinde azalma ve maksimum hızda düşme de kütle aktarım kısıtlaması nedeniyle olduğu söylenebilir. Atık su ile yapılan hidrojen peroksit gideriminde atık su için hesaplanan kinetik parametre değerlerinin atık sudan gelmesi olası farklı kirleticilerin varlığı nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır. HRP enziminin immobilize halde aktivitesinin belirlenmesine yönelik araştırmalar devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada Nano Spray Dryer B-90 kullanarak üretilen poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

taşıyıcı desteğe YTP-HRP immobilize edilmiş ve model atık sudan 2,4-diklorofenol giderimi incelenmiştir. Hesaplanan kinetik parametreler $V_{max}=33.3$ mM/min and $K_m=14$ mM olarak rapor edilmiştir (Dahili, Nagy ve Feczko, 2017). Atık sulardaki antrakuinonik türü iki boyanın (Asit mavisi 225 ve Mor 109) renk gideriminde HRP enzimi kullanılmıştır. Enzim ve hidrojen peroksit derişimi, sıcaklık, boya derişimi ve pH parametre değerlerinin etkisi incelenmiştir. Optimum koşullarda C.I. mor 109 için renk giderimim 94.7%, asit mavisi için ise 89.36% olarak bulunmuştur. Substrat inhibisyonu olmadığı mor 109 için $V_{max}=0,51783$ mM/dk and $K_m=0,0245$ mM; asit mavisi 225 için ise $V_{max} = 0,3266$ mM/min and $K_m=0,03464$ mM olarak hesaplanmıştır. Hidrojen peroksit inhibisyonu olduğunda mor 109 için $V_{max}=1,097$ mM/dk and $K_m=0,3302$ mM; olmadığı ise $V_{max}=1,185$ mM/dk and $K_m= 0,5373$ mM olduğu bildirilmiştir (Sekuljica ve diğ., 2016).

Tablo 5'te tekstil atık suda enzim kullanılarak boya giderimine yönelik çalışmalar verilmiştir. Aynı enzim için farklı substratlar yani boyalar için farklı kinetik parametre değerleri hesaplanmıştır. HRP-CLEA olarak ethylene glycol-bis [succinic acid N-hydroxysuccinimide, (EG-NHS)], çapraz bağlayıcısı ile sentezlenmiş ve dolgu yatak reaktör sisteminde farklı

tekstil boyalarının giderimi incelenmiştir. En yüksek parçalanma % 94.26 ile metil turuncusu boyada elde edilmiştir (Bilal, Iqbal, Hu, Wang, Zhang 2017). Lakkaz enziminin ÇBEA şeklinde hazırlanması ile tekstil boyalarının renk giderimi % 90'nın üzerinde bulunmuştur ve kinetik sabitlerde de serbest formlarına göre önemli değişimler olduğu rapor edilmiştir (Vršanská, Vob'erková, Jiménez, Strmiska, ve Adam, 2018). Bunun yanında boya inhibisyonu da önemli bir etken olarak bulunmuş ve kinetik parametre değerleri üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Tasarımda

kullanılan enzim, maliyeti yüksek olan klinik bir enzimdir. Modelleme işlemindeki arıtma ile zaman açısından kazanım yüksektir. Fiyat açısından daha avantajlı enzimlerle yapılacak araştırmalar ile de maliyet konusunda karşılaştırma yapmak endüstriyel olarak agregat formunda enzim sistemlerinin kullanımı konusunda yön verici olabilecektir. Kinetik sabitlere bağlı olarak hesaplanan etkinlik faktörü ile yapılan ölçek büyütmede tepkimenin verimliliği de belirlenmiş olacaktır.

Tablo 5.

Serbest, Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız İmmobilize Peroksidaz Enzimi için Kinetik Parametre Değerleri

Enzim sistemi	K _m (mmol H ₂ O ₂ /L) Serbest/İmmobilize	v _m (mmol H ₂ O ₂ /L.min) Serbest/İmmobilize	Substrat / % parçalanma	Ref.
Serbest enzim (HRP)	0,03464	0,3266	Asit mavisi 225	Sekuljica,
boya inhibisyonu olmadan	0,0245	0,51783	Mor 109	Prlainovic,
boya inhibisyonu olduğunda	0,2213	0,9813	Asit mavisi 225	Jakovetic, Grbavcic,
	0,2374	1,638	Mor 109	Ognjanovi,
H ₂ O ₂ inhibisyonu olduğunda	0,1522	0,5625	Asit mavisi 225	Knezevi-Jugovic, ve
	0,3302	1,097	Mor 109	Mijin, 2016
Poli(laktik-ko-glikolik asit parçacıklarına immobilize HRP)	14	33.3	2,4-diklorofenol	Dahili, Nagy ve Feczko, 2017
ÇBEA (HRP)	Verilmemiştir	Verilmemiştir	% 94.26 Metil turuncusu boya	Bilal, Iqbal, Hu,
Çapraz bağlayıcı: ethylene glycol-bis [succinic acid N hydroxysuccinimide, (EG-NHS)]			% 91.73 bazik kırmızı boya 9	Wang, ve Zhang 2017
			84.35% indigo	
			% 81.47 Rodamin B	
			73.6% Rodamin 6G	
ÇBEA (Lakkaz)	1.9 / 0.8	0.027 / 0.3	95%	Vršanská,
Trametes versicolor			Malasit yeşili,	Vob'erková, Jiménez,
(çapraz bağlayıcı: glutaraldehit)			Bromtimol mavisi,	Strmiska, ve Adam,
ÇBEA (Lakkaz)			Metil kırmızısı 90%	2018
Fomes fomentarius			Malasit yeşili,	
(çapraz bağlayıcı: glutaraldehit)	0.087 / 0.39	0.029 / 0.4	Bromtimol mavisi,	
			Metil kırmızısı	
HRP-monodispers poli(glisidil metakrilat) mikroküreler	2.33/69,13	0.670/0,175	H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit)	Topçular ve Ayhan, 2007
ÇBEA	0,06965/0,05178	0,0232/0,207 x 10 ⁻³	H ₂ O ₂	Bu çalışma
ÇBEA	0,06965/0,00625	0,0232/0,0699 x 10 ⁻³	Boyasız Hidrojen peroksitli atık su	

6. Sonuçlar

Yapılan çalışmada tekstilde ağartma işlemi sonucu oluşan atık suyun enzimle giderimi için ekolojii korumanın önemi artığından dolayı yaygınlaşan enzim kullanımı gerçekleştirilmiştir. Ölçek büyütme ile modellenen sistemde halen kullanılan yöntemle göre kıyaslandığında hem zaman hem de harcama açısından önemli avantaj sağlanmaktadır. Tekstil atık sularındaki başka boyar madde içerikleri olan çalışmalar ile yapılacak giderime yönelik araştırmalar enzim agregat formlarının kullanımının yaygınlaşmasına katkıda bulunabilecektir.

Araştırmacıların Katkısı

Bu araştırmada; Gülçin ÖZEVCI, Literatür araştırması, deneylerinin ve analizlerin yapılması; Hakan AYHAN makalenin oluşturulması, verilerin değerlendirilmesi, makalenin kontrolünün yapılması; Oğuz AKPOLAT Ölçek Büyütmenin yapılması, Modellenmesi ve Simülasyonu; Fatma AYHAN verilerin değerlendirilmesi, sonuçların yorumlanması, makalenin genel kontrolünün yapılması konularında katkı sağlamışlardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

- Akpolat, O., Ayhan, F. ve Ayhan, H. (2013), Modeling of The β -D-Glucose Destruction Kinetics by Using Glucose Oxidase Enzyme Aggregates, *Türk Biyokimya Dergisi*, 38 (4), 483-493. doi: <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.85866>
- Ayhan, F., İspirli, Y. ve Ayhan, H. (2011), Cross-Linked Glucose Oxidase Aggregates: Synthesis and Characterization, *Hacettepe J. of Biology & Chemistry*, 39(3), 241-251.
- Ayhan, H., Ayhan, F. ve Gülsu, A., (2012), Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine, *Türk Biyokimya Dergisi*, 37(1), 283-289. doi: <https://doi.org/0.5505/tjb.2012.00719>
- Bilal, M., Iqbal, H., Hu, H., Wang, W. ve Zhang X. (2017). Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *Journal of Environmental Management*, Mar1;188, 137-143. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.015>
- Cao, L., Langen, L. ve Sheldon, R.A. (2003), Immobilised Enzymes: Carrier-Bound Or Carrier-Free? *Curr. Opin. Biotechnol*, 14(4), 387-394. Doi : [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00096-X)
- Chapman, J., Ismail, A. E. ve Dinu, C. Z. (2018), Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, *Catalysts*, 8, 238. doi: <https://doi.org/10.3390/catal806023887-394>.
- Cuerda-Correa, E. M., Alexandre-Franco M. F. ve Fernández-González, C. (2020). Advanced Oxidation Processes for the Removal of Antibiotics from Water. An Overview. *Water*, 12(1), 102. doi: <https://doi.org/10.3390/w12010102>
- Da Silva, M. R., de Sà, L. R. V., Russo C., Scio E. ve Ferreira-Leitao V. S. (2010). The Use of HRP in Decolorization of Reactive Dyes and Toxicological Evaluation of Their Products. SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research, Article ID 703824, 7 pages doi: <http://doi.org/10.4061/2010/703824>.
- Dahili, L. A., Nagy, E., ve Tivadar F. (2017). 2,4-Dichlorophenol Enzymatic Removal and Its Kinetic Study Using Horseradish Peroxidase Crosslinked to Nano Spray-Dried Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Fine Particles. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(4), 768-774. doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.1606.06002>
- Farias S., de Oliveira D., Ulson de Souza, A. A., Guelli S. M. A., de Souza U., ve Morgado A. F. (2017). Removal of reactive blue 21 and Reactive red 195 dyes using horseradish Peroxidase as catalyst *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(03), 701-707. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20160091>.
- Garrido-Cardenas, J. A., Esteban-García, B., Agüera, A., Sánchez-Pérez J. A., ve Manzano-Agugliaro, F. (2020). Wastewater Treatment by Advanced Oxidation Process and Their Worldwide Research Trends. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17(1), 170. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph17010170>
- Grateron C., Barbosa O., Ruedaa N., Ortiz-López C. ve Torres R., 2007, Azo dye decolorization by optimized cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of a royal palm (*Roystonea regia*) peroxidase. *Journal of Biotechnology* 131S, S74-S97. <https://doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.150>.
- Test yöntemleri: Hidrojen Peroksit Aktif Madde Tayini (2010). <http://kimtekskimya.com/test.html#hidrojen>
- İspirli, Y. ve Ayhan, H., (2008), Proteic Feeder Effect on Glucose Oxidase Aggregates Formation, *Hacettepe J. of Biology&Chemistry*, 36(4), 313-318. http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/site/assets/files/3212/36_4_313-318.pdf.
- Kieran, P. ve Berovic, M. (Edit) (2001), *Bioprocess Engineering Course Note*. The European Federation of Biotechnology, 286-288.
- Kulkarni, A. N. Kadam, S. K., Jeon, B.-H. ve Govindwar, S. P. (2020). Enhanced application of cross-linked enzyme aggregates of lichen *Dermatocarpon vellereceum* released extracellular enzymes for degradation of textile dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 153, 105044. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105044> .
- Leitgeb, M., Knez, Ž. ve Vasić, K., (2016), *Micro and Nanotechnologies for Biotechnology*, Chapter 2: Micro- and Nanocarriers for Immobilization of Enzymes, doi: <http://doi.org/10.5772/63129>
- Lübbert, A., Simutis, R., Volk, N.S. ve Galvanuskas, V. (2000). *Biochemical Process Optimization and Control, Hands-on Course*. Martin Luther Universität, Germany.
- Mehde, A. A. (2019). Development of magnetic cross-linked peroxidase aggregates on starch as enhancement template and their application for decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules* 131, 721-733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.062>

- Mohamada, N. R., Marzukia, N. H. C., Buanga, N. A. ve Huyopb Wahab, R. A., (2015), Agriculture and Environmental Biotechnology: An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2). 205-220, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- Opwis, K., Kiehl, K. ve Gutmann, J. S. (2016), Immobilization of Peroxidases on Textile Carrier Materials and their Use in Bleaching Processes, *Chemical Engineering Transactions*, 49, 67-72. doi: <http://dx.doi.org/10.3303/CET1649012>
- Özevci, G. (2012), Tekstil atık suyunda hidrojen peroksit in enzimatik giderimi, modellenmesi ve tasarımı (Yüksek Lisans Tezi). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Çevre Bilimleri Ana Bilim dalı, Muğla.
- Sekuljica N. Z., Prlainovic N. Z., Jakovetic S. M., Grbavcic S. Z., Ognjanovi N. D., Knezevi-Jugovic Z. D. ve Mijin D. Z. (2016). Removal of Anthraquinone Dye by Cross-Linked Enzyme Aggregates From Fresh Horseradish Extract. *Clean – Soil, Air, Water*, 44 (7), 891–900. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/clen.201500766>.
- Sheldon, R.A. (2007). *Enzyme Immobilization. The Quest for Optimum Performance*, Adv. Synth. Catal Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 12981300s.
- Smith, J.M. (1970), *Chemical Engineering Kinetics*. Newyork, USA: McGraw-Hill,
- Tamtürk, H. F. (2007). *Pamuklu dokuma kumaşlara uygulanan seçilmiş ön terbiye işlemlerinin kumaş performansına etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, <http://libratez.cu.edu.tr/tezler/6236.pdf>
- Topçular, C. ve Ayhan, H. (2007), Immobilisation of Horseradish Peroxidase Onto Monodisperse Poly(glycidly methacrylate) Microspheres. *J.Biomater. Sci.Polymer Edn.* 18 (5), 595-596. <http://dx.doi.org/10.1163/156856207780852550>.
- Topçular, C. (2006), *Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmolize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu*. (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Vršanská, M., Voběrková, S., Jiménez, A. M. J., Strmiska, V. ve Adam, V. (2018). Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi trametes versicolor and fomes fomentarius for the decolourisation of synthetic dyes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 23. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph15010023>.
- Yamaguchi, H., Kiyota, Y. ve Miyazaki, M., (2018), Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions, *Catalysts*, 8, 174, doi: <http://dx.doi.org/10.3390/catal8050174>.
- Yinca Z., Yan L., Xueyong, G., Qiao W. ve Xiaoping X. (2017). Decolorization of color index acid orange 20 buffer solution using horseradish peroxidase immobilized on modified PAN-beads. *RSC Adv.*, 7, 18976–18986. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c7ra01698k>
- Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. G. Ve Obinger C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 131-144. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aab.2012.01.017>