LAKTOZUN ENZİMATİK HİDROLİZİNDE DOLGULU KOLON REAKTÖR KULLANIMI: DOLGULU KOLON GEOMETRİSİ VE AKIŞ ÖZELİKLERİNİN İNCELENMESİ

THE USE OF PACKED-BED REACTOR IN ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LACTOSE: INVESTIGATION OF THE GEOMETRY OF THE PACKED- BED COLUMN AND FLOW PROPERTIES

SEVİM GÜRDAŞ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

LAKTOZUN ENZİMATİK HİDROLİZİNDE DOLGULU KOLON REAKTÖR KULLANIMI: DOLGULU KOLON GEOMETRİSİ VE AKIŞ ÖZELİKLERİNİN İNCELENMESİ

Sevim Gürdaş

ÖZ

Gıda endüstrisinde farklı amaçlarla çeşitli enzimler büyük oranda kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerin yurtdışı firmalardan yüksek fiyatlarla alınması ve bunların proseste sadece bir kez kullanılması işletme maliyetlerini arttırmaktadır. Enzimlerin yoğun kullanıldığı alanlardan biri ülkemizde de üretimi yapılan laktozu azaltılmış süt üretimidir. Bu proseste laktaz enzimleri yoğun olarak kullanılmaktadır. *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktozidaz, laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen temel enzimdir. Laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi, gıda teknolojisi ve beslenme açısından önemlidir.

Bu çalışmada, sürekli sistemde laktozu azaltılmış süt üretimde kullanılmak üzere yüksek performanslı enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör tasarımı amaçlanmıştır.

İlk aşamada β-galaktozidaz'ın reçineye (Duolite A568) adsorpsiyonu incelenerek sonuçlar matematiksel olarak değerlendirilmiş; Langmuir ve Freundlich izotermleri ile modellenmiştir. Denge verileri adsorban yüzeyinin homojenliğini ifade eden Langmiur izotermine uyduğunu göstermiştir. Langmiur izoterminde maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_0) $35\,^{o}C$'de $0.051 mg/g$ olarak saptanmıştır. Enzimin reçineye adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması için pseudo-birinci derece ve pseudo-ikinci derece kinetik modelleri test edilmiş ve adsorpsiyon prosesinin ikinci derece kinetik modele uyduğu belirlenmiştir.

İkinci aşamada enziminin zayıf bazik karakterde reçine üzerine tutuklama parametreleri belirlenmiş ve optimum tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi $5.0\,mg/mL$, tutuklama süresi $60\,dk$, tutuklama pH'sı 4.5 ve tutuklama sıcaklığı $35\,°C$ olarak elde edilmiştir.

Kinetik parametreler K_m V_{max} serbest enzim için sırasıyla $73.97\,mmol/L$ 73.96 µmol/dk mg enzim ve tutuklu enzim için sırasıyla $108,96\,mmol/L$ 54,07 μmol/dk

mg tutuklu enzim olarak bulunmuştur. Tutuklama ile enzimin K_m değerinin arttığı görülmektedir. Thiele modülü ve etkinlik katsayıları hesaplanmıştır. Partikül büyüklüğünün artması ile Thiele modülünün 1.23'den 1.50'a arttığı ve diğer yandan etkinlik katsayısının ise 0.91'den 0.87'e azaldığı saptanmıştır.

Partikül büyüklüğünün, L/D oranına ve akış hızına, enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör kinetiği üzerine etkisi uyarı-cevap ve moment teknikleri ile incelenmiştir. Sonuçlar kolon Peclet sayısı, eksenel dağılım katsayısı, dönüşüm hızı, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri hesaplanarak açıklanmıştır. Bu veriler doğrultusunda hazırlanacak enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör sisteminde kullanılması uygun olan partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızı sırasıyla; 390 μm, 10 ve 4 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında hazırlanan enzim tutuklu dolgulu kolonun performansı süt örneği kullanılarak test edilmiştir. Enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör ile sütteki laktozdan %55 dönüşüm elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Laktoz, β-Galaktozidaz, Dolgulu Kolon Reaktör, Uyarı Cevap Tekniği, Moment Analizi, Etkinlik Katsayısı, Thiele Modülü, Damköhler Sayısı

Danışman: Prof.Dr. Mehmet MUTLU, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

THE USE OF PACKED-BED REACTOR IN ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LACTOSE: INVESTIGATION OF THE GEOMETRY OF THE PACKED- BED COLUMN AND FLOW PROPERTIES

Sevim Gürdaş

ABSTRACT

Soluble or immobilized form of enzymes are used in food industry for different purposes. Their supplement from aboard firms with high prices and their limited usage due to their soluble form highly increases the operational cost of the process. One of the area in which enzymes are consistently used is the production of low lactose milk production, which is also widely produced in our country. In this process, mainly lactase enzymes are being used. *Aspergillus oryzae* β-galactosidase, is the main enzyme that catalyses the hydrolysis of lactose to glucose and galactose. The conversion of lactose to glucose and galactose is very important from food technology and nutrition point of view.

In this study, it was aimed to use the production of low lactose milk production and to design a packed bed reactor that will achive high conversion ratio in continious systems.

In this step, adsorption of β-galactosidase onto basic resin (Duolite A568) were modeled with the Langmuir and Freundlich isotherm as the results were evaluated the mathematical description of the adsorption equilibrium. The equilibrium data fitted well with the Langmuir model which demonstrated the homogeneity of the surface of the adsorbent. The maximum adsorption capacity was found to be 0.051 mg/g resin from the Langmuir isotherm model at 35 ºC. Furthermore adsorption was kinetically modeled to explain the mechanism of adsorption and to determine the rate of the adsorption process. Two different kinetic models were tested and the adsorption process of the enzyme was explained best with the pseudo-second-order kinetic model.

Immobilization parameters of enzyme on weak base ion exchange resin was determined and optimum immobilization parameters were obtained as; initial

enzyme concentration 5.0 mg/mL, immobilization time 60 min, immobilization pH 4.5 and immobilization temperature 35 °C.

Kinetic parameters of K_m V_{max} were calculated as 73.97 mmol/L 73.96 µmol/dk mg respecitvely for free enzyme, and 108.96 mmol/L 54.07 µmol/dk mg respecitvely for immobilized enzyme. It can be seen that K_m was increased by immobilization. Also Thiele modulus and effectiveness factor for enzyme-immobilized particles of different sizes were calculated. It was determined that increasing particle size from 390 µm to 475 µm lead to an increase in Thiele modulus from 1.23 to 1.50 and a decrease in effectiveness factor from 0.91 to 0.87.

The effects of particle size, L/D ratio and flow rate on enzyme immobilized packed bed column kinetics were determined by using stimulus-response and moment techniques. The results were explained by calculating of Peclet number, axial dispersion coefficient, conversion rate, Damköhler number and reaction rate. According to these results, the particle size, L/D ratio and flow rate appropriate for this system were determined as 390 µm, 10 and 4 mL/min, respectively.

Prepare results of this study, performance of enzyme immobilized packed bed reactor was tested with milk sample. It was obtained 55% conversion of lactose from milk with enzyme immobilized packed bed reactor

KEY WORDS: Lactose, β-Galactosidase, Packed-Bed Column Reactor, Stimulus Response Technique, Moment Analysis, Effectiveness Factor, Thiele Modulus, Damköhler Number

Advisor: Prof.Dr. Mehmet MUTLU, Hacettepe Üniversity, Department of Food Engineering, Food Engineering Section

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında ilgi, destek ve bilgisini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet MUTLU'ya,

Yönlendirme ve destekleriyle yardımlarını esirgemeyen bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Bu teze maddi destek veren Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Arastırma Projeleri Fonu'na (CÜBAP),
Tüm çalışmam boyunca desteğini ve sevgisini esirgemeyen Lale ÖZTÜRK' e,
Tez çalısmam boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Yrd. Doç. Dr Hacı Ali GÜLEÇ' e,
Çalışmam süresince gösterdikleri sabır ve destekleri için Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma Grubu'na,

Bu tezin hazırlanmasında bana her türlü çalışma olanağını sağlayan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve tüm personeline,

Deneysel çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Uz. Yelda ZENCİR, Uz. Selin HEYBELİ'ye,

Özellikle tez yazım aşamasında değerli yardımlarını esirgemeyen ağabeyim Yük. Müh. Kemal GÜRDAŞ'a,

Tüm yaşantımda olduğu gibi doktora çalışmamda da beni yalnız bırakmayan, her konuda yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen annem ve babam'a en içten minnet ve şükran duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ i
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Laktoz 3
2.2. Adsorpsiyon 8
2.2.1. Adsorpsiyon Mekanizması ve Türleri 10
2.2.2. Adsorpsiyon Dengesi ve Adsorpsiyon İzotermleri 12
2.2.3. Adsorpsiyon Kinetikleri 16
2.2.4. İyon Değiştirici Reçineler 18
2.3. Enzimler 19
2.3.1. Enzimlerin Özellikleri 20
2.3.2. Enzim Aktivitesi 21
2.3.3. Enzim Kinetiği 25
2.3.5. Enzim Tutuklama Yöntemleri 31
2.3.6. Tutuklu Enzim Kinetiği 34
2.4. Dolgulu Kolon Dinamik Davranışının Uyarı Cevap Tekniği ile İncelenmesi 41
2.4.1. Alıkonma Süresi Dağılım Fonksiyonu 41
2.4.2. Deneysel Momentlerin İstatistiksel Yöntemler Kullanılarak Hesaplanması 45
2.4.3. Momentlerin Modellerden Çıkarılma Yöntemi 46

2.4.4. Deneysel Momentlerle Model Momentlerin Birleştirilmesi 47
2.4.5. Dolgulu Kolon Reaktörü Karakterize Eden Modelin Seçimi..... 48
2.4.6. Peclet Sayısının Hesaplanması 49
3.MATERYAL VE METOT..... 52
3.1 Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktör Hazırlanması..... 53
3.1.1 Enzimin Partikül Yüzeyine Adsorpsiyon Mekanizmasının İncelenmesi 55
3.1.2.Serbest ve Tutuklu Enzim Kinetiğinin Belirlenmesi..... 56
3.1.3. Dolgulu Kolon Reaktör Kinetiğinin İncelenmesi..... 60
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... 64
4.1. Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktör Hazırlanması..... 64
4.1.1. Enzimin Partikül Yüzeyine Adsorpsiyon Mekanizmasının İncelenmesi 64
4.1.3. β-Galaktozidaz Enziminin Tutuklama Parametrelerinin Belirlenmesi .. 78
4.1.4. Serbest β-galaktozidaz Enzimi Kinetiğinin İncelenmesi 82
4.1.5. Tutuklu β-galaktozidaz Enzim Kinetiğinin İncelenmesi..... 83
4.1.6. Dolgulu Kolon Reaktör Kinetiğinin İncelenmesi..... 86
5. SONUÇLAR 110
6. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER 112
KAYNAKLAR..... 116
EKLER 124
EK-1: Kalibrasyon grafikleri 124
EK-2: Duolite A568'in özellikleri..... 125
Ek-3: Dönüşümün kolon L/D oranları ile değişim..... 126
ÖZGEÇMİŞ 128

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A_p	Partikül yüzey alanı, cm^2
b	Adsorpsiyon net entalpisi (Langmiur sabiti), L/mg
C	Derişim, mmol/L
C_0	Başlangıç enzim derişimi, mg/L
C_e	Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan enzim derişimi, mg/L
C_{wp}	Weisz-Prater parametresi
D	Kolon boyu, cm
D_a	Damköhler sayısı
D_e	Difüzyon katsayısı, cm^2/s
D_L	Eksenel dağılım katsayısı, cm^2/s
D_p	Partikül çapı, cm
D_R	Radyal dağılım katsayısı, cm^2/s
E	Serbest enzim derişimi
E_0	Başlangıç enzim derişimi
E_a	Aktivasyon enerjisi, kJ/mol
E_S	Enzim-Substrat derişimi
E_t	Toplam enzim derişimi
J	Boyutsuz derişim
k	Reaksiyon hız sabiti, dk^{-1}
k_1	Lagergren adsorpsiyon hız sabiti, dk^{-1}
k_2	Pseudo ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti, g/mg.dk
K_f	Freundlich adsorpsiyon sabiti, L/g
K_m	Michaelis-Menten Sabiti, mmol/L

k_s	Sıvı film kütle aktarım katsayısı, cm/dk
L	Reaktör uzunluğu, cm
M_1	Birinci mutlak moment, s
M_2	İkinci mutlak moment, s^2
M_{2*}	İkinci merkezi moment
M_0	Sıfırıncı mutlak moment
N_A	Yüzeye olan net akı, mol/cm^2 s
n	Adsorpsiyon derecesi
P	Ürün derişimi
P_e	Peclet sayısı
q_e	dengede birim adsorban üzerine adsorplanan enzim miktarı, mg/g
Q_0	adsorbanın birim ağırlığında adsorplanan enzim miktarı (Langmiur sabiti), mg/g
q_t	Herhangi bir zamandaki adsorplanan enzim miktarı, mg/g
r	Partikül yarıçapı, cm
R_L	dağılma sabiti
r_s	Reaksiyon hızı, mmol/(L dk)
s	Laplace değişkeni
S	Partikül üzerinde substrat derişimi, mmol/L
S_o	Çözelti ortamındaki substrat derişimi, mmol/L
T	Sıcaklık, $°C$
t	Zaman, s
U	Gerçek hız, cm/s
V	Reaktör hacmi, cm^3
v	Hacimsel akış hızı, cm^3/dk

V_{max}	Maksimum reaksiyon hızı, mmol/(L dk)
V_p	Partikül hacmi, cm^3
X	Dönüşüm
τ	Alıkonma süresi, dk
ε	Boşluk kesri
ξ	Boyutsuz uzunluk
η	Etkinlik Katsayısı
β	Partikül içi gözeneklilik
φ	Thiele modülü
μ	Viskozite, g/(cm s)
ρ	Partikül yoğunluğu, g/cm^3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Michaelis – Menten parametrelerinin belirlenmesi 29

Şekil 2.2. Hones-Woolf grafiği 30

Şekil 2.3. Enzim tutuklu bir partikülde kütle aktarımı ve kimyasal reaksiyon etkileşimleri..... 35

Şekil 2.4. Etkinlik katsayısı-Thiele modülü etkileşimi 40

Şekil 2.5. Farklı Peclet sayıları için C-eğrileri 43

Şekil 3.1. Deney düzeneğinin şematik gösterimi 62

Şekil 4.1. Farklı miktarlardaki reçine üzerine enzimin adsorplanma kinetiği (35 °C) 65

Şekil 4.2. Birim reçine üzerine enzimin adsorplanma kinetiği (35 °C) 67

Şekil 4.3. Farklı sıcaklıklardaki Freundlich izotermleri 68

Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklardaki Langmuir izotermleri 70

Şekil 4.5. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (25 mg) 73

Şekil 4.6. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (50 mg) 73

Şekil 4.7. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (75 mg) 74

Şekil 4.8. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (100 mg) 74

Şekil 4.9. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (25 mg) 76

Şekil 4.10. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (50 mg) 76

Şekil 4.11. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (75 mg) 77

Şekil 4.12. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (100mg) 77

Şekil 4.13. Tutuklama süresinin tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0 4 mg/mL T : 35 °C, pH : 4.5) 79

Şekil 4.14. Tutuklama pH'sının tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0 :4 mg/mL, t:60 dk, T:35°C) 80

Şekil 4.15. Tutuklama sıcaklığının tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0 :4mg/mL, t:60 dk, pH:4.5) 81

Şekil 4.16. Başlangıç enzim derişiminin tutuklu enzim aktivitesine etkisi (T:35°C, t:60 dk, pH:4.5) 82

Şekil 4.17. Serbest enzime ait Hanes- Woolf grafiği 83

Şekil 4.18. Tutuklu enzime ait Hanes- Woolf grafiği 84

Şekil 4.19. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 1) 88

Şekil 4.20. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 2) 88

Şekil 4.21. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 5) 89

Şekil 4.22. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 10) 89

Şekil 4.23. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 1) 90

Şekil 4.24. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 2) 91

Şekil 4.25. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 5) 91

Şekil 4.26. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 10) 92

Şekil 4.27. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 1) 94

Şekil 4.28. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 2) 94

Şekil 4.29. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 5) 95

Şekil 4.30. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 10) 95

Şekil 4.31. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 1) 97

Şekil 4.32. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 2) 97

Şekil 4.33. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 5) 98

Şekil 4.34. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 10) 98

Şekil 4.35. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 1) 100

Şekil 4.36. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 2) 101

Şekil 4.37. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 5) 101

Şekil 4.38. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 10) 102

Şekil 4.39. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 1) 103

Şekil 4.40. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 2) 104

Şekil 4.41. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 5) 104

Şekil 4.42. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 10) 105

Şekil 4.43. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 1) 106

Şekil 4.44. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 2) 107

Şekil 4.45. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 5) 107

Şekil 4.46. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 10) 108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. Bazı önemli β-galaktozidaz enzim kaynakları 8

Çizelge 2.2. R_L (dağılma) değerleri ve izoterm tipleri 14

Çizelge 3.1. β-galaktozidaz enziminin optimum tutuklama parametrelerinin saptanması amacıyla denenen parametreler 58

Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklardaki Freundlich ve Langmuir sabitleri 69

Çizelge 4.2. 25 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği 75

Çizelge 4.3. 50 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği 75

Çizelge 4.4. 75 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği 75

Çizelge 4.5. 100 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği 75

Çizelge 4.6. Partikül büyüklüğünün enzim tutuklu reçinelerin Thiele modülü ve etkinlik katsayısına etkisi 86

1. GİRİŞ

Son yıllarda gıda endüstrisinin gösterdiği gelişim ve ilerleme sürecinde özel amaçlı gıdaların üretilmesine yönelik çabalar artmaktadır. Özel amaçlı ürünler içinde en büyük payı da diyet ve tıbbi amaçlı ürünler almaktadır. Ülkemizde tıbbi amaçlı gıda üretimi sınırlı yapılmakta ve yetersiz kalmaktadır. Türk gıda sektörünün bu konuda teşvik edilmesi gerekmektedir. Bu tür üretimlerin; ülkemizde hasta bireylerin beslenmesine, ülke ekonomisine ve gıda endüstrisinin gelişmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada sütün beslenmedeki rolü düşünülerek, tıbbi amaçlı gıda niteliği taşıyan laktozu azaltılmış süt üretilmesi hedeflenmiştir.

Süt ve süt ürünlerindeki temel karbonhidrat laktozdur. Laktoz, ince bağırsak kanalında laktaz enzimi tarafından glukoz ve galaktoza hidrolize edilerek emilmektedir. Organizmada laktaz eksikliği ya da yokluğunda laktozun hidroliz olamayacağından emilimi de gerçekleşememektedir. Bu sorun literatürde “laktoz intoleransı” veya “laktaz eksikliği” olarak adlandırılmakta ve bu bireylere de “laktoz intolerant” denmektedir (Paige and Davis 1985; Savaiano and Levitt, 1987; Santos et. al., 1998). Laktoz intolerantlar, laktoz içeriğinden dolayı süt ve ürünlerini tüketememektedir. Laktoz intolerantlar için laktozu azaltılmış süt üretimi büyük önem taşımaktadır. Laktozu düşürülmüş süt üretiminde, enzimatik hidroliz tekniği bilinen ve yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde β - galaktozidaz (laktaz) enzimi kullanılarak laktozun glukoz ve galaktoza enzimatik yolla hidrolizi sağlanmaktadır. Günümüzde gelişmiş ülkelerde serbest ve tutuklu β - galaktozidaz kullanılarak hem laktoz intolerantlara içme sütü olanağı sağlanmakta hem de hidroliz ürününün teknolojik üstünlüklerinden yararlanılmaktadır (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985; Mahoney, 1998). Laktozun enzimatik hidrolizi kesikli ve sürekli proseslerle gerçekleştirilmektedir. Endüstride sürekli sistemde laktozu azaltılmış süt üretiminde enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörlere gereksinim duyulmaktadır.

Kimya, gıda ve proses mühendisliği alanında çok önemli sistem olan dolgulu kolonların sabit yataklı katalitik reaktörü, çözünen adsorpsiyonu, absorpsiyon, filtreli yataklar ve enzimatik dönüşüm gibi uygulamaları bulunmaktadır (Levenspiel, 1972). Dolgu malzemesi olarak, küre, silindir gibi farklı geometriye sahip alümina, silika, alijinat, kil, bentonit, perlit, zeolit polistiren ve reçine gibi materyaller kullanılmaktadır. Dolgu yataklı reaktörler ürün inhibisyonu amaçlı reaksiyon

sistemleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm reaktör içerisinde substrat ve ürün derişimi arasındaki düşük farktan dolayı inhibisyon etkisinin azalması nedeniyle verimleri büyüktür (Carrara et. al., 2002). Biyolojik üretimlerde dolgu yataklı reaktörlerin kullanımı, çevresel problemlerin yeni teknolojilere dönüştürülmesi uygulamasına olanak sağlamaktadır (Mammarella and Amelia, 2006).

Bu çalışmada, sürekli sistemde laktozu azaltılmış süt üretimde kullanılmak üzere yüksek performanslı enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör tasarımı amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında enzimin reçineye adsorplanma kapasitesi incelenerek adsorpsiyon mekanizması modellenmiştir. İkinci aşamada taşıyıcı pariküllere bağlanan enzimin aktivitesi temel alınarak, maksimum tutuklu enzim aktivitesini elde edebilmek amacıyla kullanılacak parametre değerleri belirlenmiştir. Bu parametreler kullanılarak enzim tutuklanan partiküllerle dolgulu kolon reaktörler oluşturulmuştur. Dolgulu kolon kinetiği uyarı cevap tekniği ile incelenmiş ve optimum çalışma parametreleri belirlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan β-galaktozidaz tutuklu dolgulu kolon reaktörde süt örneği kullanılarak kolon performansı test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktoz

Süt, içeriğinde yer alan yüksek kaliteli protein, kalsiyum ve laktoz nedeniyle üstün besleyici değere sahiptir ve enerji kaynağı olarak da ideal bir gıdadır (Schneider at. al, 1990; Baysal,1999). Süt, sadece bebeklik sürecinde değil, bireyin her döneminde tüketmesi gereken temel bir gıdadır. Canlı organizma gelişimi için gerekli olan besin öğelerinin tümünü içeren inek sütünün bileşimine genel olarak bakıldığında, %88.7-85.5 su, %4.4-2.3 protein, %5.5-2.4 yağ, %5.3-3.8 karbonhidratlar (laktoz) ve %0.8-0.53 mineral kompozisyonuna sahip olduğu görülmektedir (Baysal, 1999; Metin, 2005). Sütün kompozisyonuna bakıldığında çeşitli yaş grupları için önemli olan tüm besin öğelerini içerdiği görülmektedir (Anonymous, 1987). Ancak süt ve ürünlerinin tüketimi, çoğu kez bu ürünlere duyarlı bireylerde gastro- intestinal problemlere yol açmaktadır. Bu rahatsızlık belirtileri, gaz, şişkinlik, karın ağrısı, bulantı, ishal, ekşime gibi şikayetlerdir. Bu belirtilerden dolayı da bireyler çoğu zaman süt ve ürünlerini tüketmekten vazgeçmektedir. Pek çok araştırıcı süt ve ürünlerini tükettikten sonra ortaya çıkan semptomların üstün temel karbonhidratı olan laktozun vücutta sindirimini gerçekleştiren enzim miktarının yetersizliğinden kaynaklandığını ileri sürmektedir (Yücemen, 1993).

Süt, üstün kalitede protein içeren gıdalar arasında yer almakta ve kalsiyum (Ca^{+2}) açısından da en iyi kaynak sayılmaktadır. Hayat boyunca ve özellikle gelişme döneminde, organizmaya yetersiz miktarda Ca^{+2} alındığında ya da süt ve ürünleri gerektiğinden az tüketildiğinde bireyin iskelet sisteminde çeşitli problemler ortaya çıkmaktadır. Kemiklerdeki kalsiyum, beslenmedeki Ca^{+2} miktarına bağlı olarak değişmektedir. Kalsiyum yaşam boyunca kemiklerin gelişimi ve onarımı için gereklidir (Anonymous, 1994; Metin, 2005)

Süt ve süt ürünlerindeki temel karbonhidrat laktozdur. Anne sütünde ve inek sütünde sırasıyla yaklaşık olarak %7 ve %4,8 civarında laktoz bulunmaktadır (Yang and Silva, 1995). Laktoz enerji kaynağı olduğu kadar yapısında bulunan galaktozunda beyin dokusundaki glikolipitlerin kaynağını teşkil etmesi açısından da oldukça önemlidir. Laktoz, kan basıncını azaltmak, kabızlığı ve diareyi önlemek

amacıyla kullanılır. Osmotik basınç üzerinde etkili olması, bağırsaklarda çok yavaş parçalanması ve böylece bağırsağın sürekli asidik olması, kokuşmaya neden olan proteolitik bakterilerin yaşamasını da önler. Dolayısıyla laktoz bağırsak florasını düzenleyici bir etki yapar. Bunların yanı sıra Ca^{+2}, Mg^{+2} ve P^{+3} gibi mineral maddelerin bağırsakta daha iyi emilimlerine yardımcı olur (Metin, 2005)

Laktoz, kimyasal olarak glukoz ve galaktoz monosakkaritlerinin birleşmesinden oluşmuş bir disakkarittir. Laktoz, ince bağırsak kanalında laktaz enzimi tarafından glukoz ve galaktoza hidrolize edilerek emilmektedir. Organizmada laktaz eksikliği ya da yokluğunda laktoz hidrolizi olamayacağından emilimi de gerçekleşememektedir. Absorbe edilemeyen laktozun osmotik etkisi ve bağırsak mikroflorası tarafından fermantasyonu kişilerde kramp, diare, gaz oluşumu gibi sindirim bozuklukları meydana getirmektedir. Bu sorun literatürde “laktoz intoleransı”, “laktoz malabsorpsiyonu” ya da “laktaz eksikliği” olarak adlandırılmakta, bu bireylere de “laktoz intolerant” denmektedir. Laktaz eksikliği, genetik faktörlerden ya da beslenme bozukluğu ve sindirim sistemi hastalıklarından kaynaklanabilmektedir. Yaş arttıkça laktaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Paige and Davis, 1985; Savaiano and Levitt, 1987; Bayhan ve Yentür, 1993; Santos et. al., 1998).

Laktoz intolerantların laktoz içeren gıdalardan sakınmaları gerekmektedir. Ancak laktoz içeren gıdalardan sakınmak besleme açısından risk yaratabilmektedir. Süt, beslenmede fazla miktarda kalsiyum, fosfor, magnezyum, riboflavin, vitamin D ve protein sağlamaktadır. Fosfor, magnezyum, riboflavin, vitamin D laktoz içermeyen gıdalarda da bulunmasına karşın kalsiyum %75’i laktoz içeren ürünlerden sağlanmaktadır. Yetersiz kalsiyum alınması, iskeletin yavaş büyümesi, hipertansiyon, hamilelikte toksemiya, kolon kanseri ve osteoporosis gibi tıbbi sorunlara neden olmaktadır (Bayhan ve Yentür, 1993). Süt ile kalsiyum alımının diğer bir yararı da laktozun kalsiyum ile kelat oluşturarak ince bağırsaklarda bu mineralin emilimini artırmasıdır (Kalala et. al., 1990; Baysal, 1999).

Yapılan araştırmalarda, dünya popülasyonunun yaklaşık %70’inin laktoz intolerant olduğu bildirilmektedir (Paige and Davis, 1985; Savaiano and Levitt, 1987). Laktoz intoleransı dağılımı toplumlarda değişim göstermektedir. Bazı toplumlarda laktoz intoleransı görülme sıklığı %100’lere ulaşmıştır. Yapılan

araştırmalarda Afrika, Asya ve Latin Amerika ülkelerinde bu insidans %100-15 arasında yer almaktadır. Kuzey Avrupa ülkelerinde de laktoz intolerant birey sayısının yüksek olduğu bilinmektedir (Paige and Davis, 1985; Bayhan ve Yentür, 1993). Türkiye'de laktoz intoleransı görülme sıklığı farklı araştırmalarda %24,%34,%50 ve hatta %66 olarak bulunmuştur. Ancak ülkemizdeki laktoz intoleransı insidansının daha da yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Bayhan ve Yentür, 1993).

Paige et al.(1975), %90 oranında laktozu hidrolize edilmiş sütün laktoz intolerant bireyler için besleyici değeri yüksek bir ürün niteliği taşıdığını belirtmiştir. Kosikowski (1988)'ye göre laktoz intolerantlar %70 oranında laktozu düşürülmüş süt ya da dondurmayı tüketebilmektedir. Yoğurt laktoz intolerantların tüketebildiği diğer bir süt ürünüdür. Yoğurdun oluşması sürecinde sütteki laktozun%30-20'u fermentasyona uğrayarak glukoz ve galaktoz açığa çıkar. Açığa çıkan glukoz da fermentasyon ile laktik aside dönüşür. Yoğurt oluşum sürecinde laktoz azalmakla birlikte yoğurdun kalitesini arttırmak için süt tozu ile süt içeriği zenginleştirildiği için yoğurt laktozdan zengindir, fakat buna karşın laktoz intolerantlar yoğurdu daha iyi tolere edebilmektedirler. Bu, yoğurtta bulunan bakterilerin sindirim kanalında da aktivitelerine devam ettiğini, enzimatik aktiviteleriyle de laktozu parçaladıklarını düşündürmektedir. Süt ile kişilerin %80'inde diare gibi rahatsızlıklar görülürken yoğurt ile %20'sinde semptom oluştuğu ortaya konmuştur. Bizim gibi laktaz yetmezliğinin yüksek sıklıkta görüldüğü toplumlarda fermente süt ürünlerinin (yoğurt vb.) tüketimi özendirilmelidir.

Laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi; güçlü mineral asitlerle, laktaz enzimiyle ve iyon değiştiricilerle gerçekleştirilmektedir. Asitle hidroliz olayının, pratikte laktoz şurubu yapımında kullanılması nedeniyle önemi vardır. Parçalanma ürünleri olan glukoz ve galaktoz, laktoza oranla daha tatlı olduğu için laktoz şurubu asit hidrolizi ile hazırlanmaktadır. Oksijen köprüsünün seyreltik asitlere karşı dirençli olması, fizyolojik açıdan önemlidir. Böylece laktoz midede parçalanmadan geçer ve bağırsaklarda parçalanarak kokuşma yapan bakterilerin gelişmesine engel olur (Roy and Gupta, 2003; Metin, 2005).

Laktoz intolerantların süt ve ürünleri gereksinimleri nedeniyle bazı gelişmiş ülkelerde, laktaz tabletleri, serbest ya da tutuklu enzim sistemleri kullanılarak

laktozu düşürülmüş süt üretilmektedir. Laktozu hidrolize edilmiş sütten çeşitli ürünler geliştirilerek özel gıda formülasyonları da hazırlanabilmektedir (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985; Mahoney, 1985; Jurado et. al., 2006).

Laktozu düşürülmüş süt üretimi, enzimatik hidroliz ve ultrafiltrasyon teknikleriyle gerçekleştirilmektedir. Enzimatik hidroliz tekniği en bilinen ve yaygın uygulanan bir yöntemdir. Enzimatik hidroliz tekniğinin maliyetinin yüksek olması ve süte göre daha tatlı ürün oluşturması, ultrafiltrasyon tekniğinin de mineral ve laktoz kaybından dolayı tadının yavanlaşması ve beslenme değerinin azalması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Laktozun enzimatik hidrolizi kesikli ve sürekli proseslerle gerçekleştirilmektedir. Kesikli sistemde, pastörize edilen süt tanklara alınmakta ve belirlenen miktarda serbest enzim eklenerek enzimin reaksiyon sıcaklığında enzimatik hidroliz gerçekleştikten sonra paketlenmektedir. Bu yöntemle laktozu azaltılmış süt üretimi birkaç aşamada gerçekleşmekte ve kullanılan serbest enzimde maliyeti arttırmaktadır (Kartal, 1998)

Sürekli sistemde ise çiğ süt ön işlemlerden geçirildikten sonra pastörize edilir, enzimin reaksiyon sıcaklığına soğutulduktan sonra enzim tutuklu dolgulu kolondan geçirilerek enzimatik hidrolize uğrayan süt paketlenir. Sürekli sistemle çalışan enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörlerde tutuklu enzimler kullanılarak enzim maliyeti düşürülmekte ve dolgulu kolon sistemi sürekli prosese entegre edilerek hem zamandan kazanılmakta hem de ek bir maliyet gerektirmemektedir.

Laktozun β- galaktozidaz enzimiyle monosakkaritlere hidrolizi aşağıdaki formülde görüldüğü şekilde meydana gelir:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

$$\text{Laktoz} + \text{H}_2\text{0} \rightarrow \text{Glukoz} + \text{Galaktoz}$$

Bu tepkimede enzim, laktozu üç aşamada monosakkaritlere parçalar:

$$\text{Enzim} + \text{Laktoz} \rightarrow \text{Enzim-Laktoz kompleksi}$$

$$\text{Enzim-Laktoz} \rightarrow \text{Galaktosil-Enzim} + \text{Glukoz}$$

$$\text{Galaktosil-Enzim} + H2O \rightarrow \text{Galaktoz} + \text{Enzim}$$

β-galaktozidaz mekanizmasında galaktoz, hidroksil grubu içeren herhangi akseptöre transfer olmaktadır. Akseptör su ise serbest galaktoz oluşmaktadır; ancak ortamda başka şeker varsa oligosakkaritler meydana gelmektedir. Bu olaya "transferaz aktivitesi" denmektedir (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985; Mahoney, 1985). β-galaktozidaz (β-D galaktozit galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23) ticari ismi ile laktaz, laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen temel enzimdir. Kesikli veya sürekli enzim reaktörlerde, birçok biyolojik kaynaktan izole edilen ve saflaştırılan serbest veya tutuklu β-galaktozidaz enzimleri kullanılmaktadır. β-galaktozidaz; bitkilerden, hayvan organlarından, mayalardan, bakterilerden ve küflerden elde edilebilmektedir. Çizelge 2.1'de önemli β-galaktozidaz enzim kaynakları görülmektedir. Ticari anlamda kullanılan laktaz ürünlerine bakıldığında, endüstriyel kullanım alanları için maya ve küf kaynaklarından daha çok yararlanıldığı görülmektedir. Gıda sistemlerinde kullanılacak olmalarından dolayı tüm β-galaktozidaz kaynakları güvenli kabul edilmemektedir ve GRAS (Tüketimi Sakıncalı Olmayan Maddeler) kapsamına alınamamaktadır. GRAS kapsamında yer alan *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β-galaktozidaz enzimleri ticari olarak sık kullanılmaktadırlar. Üzerine pek çok araştırma yapılmasına karşın *Escherichia coli* laktazı, koliform grubu bakteriden elde edildiği için gıdalarda kullanımı güvenli olmamaktadır (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985; Mahoney, 1998).

Günümüzde çok sayıda β-galaktozidaz enzimi karakterize edilmiş olmasına karşın yeni alternatif kaynaklardan enzim eldesi için çalışmalar devam etmektedir. Endüstriyel uygulamalarda β-galaktozidazlar farklı sıcaklıklarda ve pH' larda, farklı substratlarla ve farklı iyon içeren ortamlarda kullanılmaktadırlar. Bu bağlamda, pek çok farklı kullanım alanında yapılan işlemler için, çok daha uygun, düşük maliyet ve yüksek verim ile üretilen yeni β-galaktozidaz kaynaklarına gereksinim duyulmaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen β-galaktozidaz'ların spesifiklikleri aynı kalsa da her bir enzimin kendine özgü optimum pH ve sıcaklıkları ile K_m değeri gibi farklı özellikleri vardır (Pivarnik, 1995; Mahoney, 1998; Santos et. al., 1998; Carrara et.al., 2002).

Çizelge 2. 1. Bazı önemli β-galaktozidaz enzim kaynakları (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985; Mahoney,1998).

Bitkiler	Şeftali, badem, yabani gül tipleri, kayısı, kahve çekirdeği
Hayvan organları	Bağırsak, beyin ve deri
Mayalar	*Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces marxianus, Candida pseudotropicalis, Wingea robertsii, Brettanomyces anomalus*
Bakteriler	*Escherichia coli, Thermus aquaticus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophilus, Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Bacillus stearothermophilus, Leuconostoc citroverum*
Funguslar	*Neurospora crassa, Alternaria alternata, Mucor pucillus, Mucor miehei, Fusarium moniliforme, Scopuloriopsis sp., Aspergillus niger, Aspergillus flavus,* ***Aspergillus oryzae****, Aspergillus phoenicis, Curvularia inaegualis*

Süt ve ürünleri endüstrisinde özellikle de laktoz intolerantlar için laktozu düşürülmüş süt üretiminde laktozun hızlı ve duyarlı bir şekilde analizi büyük önem taşımaktadır. Literatürde birçok laktoz tayin yöntemi bulunmaktadır. Bunlar polarimetrik, gravimetrik, infrared ve enzimatik yöntemler “Assosiation of Official Analitical Chemists” (AOAC)’nin resmi analizleri arasında yer almaktadır (Kwak and Jeon, 1988, Griffith et al., 1989). Donma noktası alçalmasına dayalı kriyoskopik ölçüm yöntemleri (Mittal et. al., 1990), kolorimetreye dayalı spektrofotometrik yöntemler (Nickerson et. Al., 1976; Teles et al., 1978), kromotografik yöntemler (Koops and Olieman, 1985; Kowalski and Gieseckke, 1986; Kwak and Jeon, 1988) ve elektrokimyasal yöntemler (Pilloton et al., 1987; Pilloton and Mascini, 1990; Watanabe et al., 1991) ile de laktoz analizleri yapılmaktadır.

Laktozu düşürülmüş süt üretiminde laktoz içeriğindeki düşüşün izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle öncelikle laktozu düşürülmüş süt üretim prosesinde kullanılabilecek ve prosese entegre edilecek sürekli sistemde çalışan enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör tasarımı üzerinde çalışılmıştır.

2.2. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon prosesi, genelde çözeltide çözünmüş halde bulunan maddelerin, uygun bir ara yüzey üzerinde toplanmasıdır. Ara yüzey sıvı ile bir gaz, bir katı ya

da diğer bir sıvı arasında olabilir. Adsorpsiyon ilk olarak gaz için 1773'te Scheele tarafından, çözeltiler için ise 1785 yılında Lowitz tarafından gözlenmiştir. Günümüzde birçok doğal fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemde adsorpsiyon prosesinin taşıdığı önem bilinmektedir.

Adsorpsiyon, sıvı ya da gaz fazında çözünmüş halde bulunan maddelerin katı bir yüzey üzerinde yüzey gerilimini düşürmek amacıyla kimyasal ve fiziksel kuvvetlerle tutulmaları işlemidir. Herhangi bir katı örgüsü içindeki atom veya moleküller, aralarındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimlerden dolayı kuvvetli iyonik bağlardan daha zayıf Van der Waals çekim kuvvetleri arasında değişen bağlayıcı kuvvetlerin etkisi altında bir arada dururlar. Katı örgünün iç kısımlarında bulunan bir molekül diğerleri tarafından tamamen çevrelenmiş olduğundan çekim kuvvetleri her yönde dengelenmiştir. Ancak yüzeydeki kuvvetlerin bir kısmı serbest bulunmaktadır. Bu doymamış kuvvetler yüzey gerilimine yol açarlar. Katı yüzeyden dışarı doğru uzanmış kuvvetler çevrelerindeki sıvı ya da gaz içindeki moleküllerin çevreye yaydıkları çekim kuvvetleri ile birleşip, kombine çekim dalgaları ve adsorpsiyon şiddetini doğururlar. Daha güçlü çekim kuvvetlerine sahip bir molekül diğerlerine nazaran tercihli olarak tutulur ve adsorpsiyon oluşarak katı yüzeyinde dengesiz olan kuvvetlerin bir kısmı doyurularak yüzey gerilimi düşer. Adsorpsiyon prosesi bir yüzey olayı olmasından dolayı adsorplama işlemini yapan katının yüzey özellikleri son derece önemlidir. Yüzey alanı ne kadar geniş ise o kadar iyi bir adsorban özeliği taşımaktadır.

Adsorpsiyonun matematiksel ifadesi q_e :olarak verilir ve birimi de mg/g'dır. q_e 'nin anlamı, g miktar adsorban başına adsorplanan mg miktar adsorbattır. Adsorpsiyon ifadesinin denklemi:

$$q_e = V\,(C_o - C_e)\,/\,m \qquad (2.1)$$

şeklinde olup, burada;

q_e : Birim adsorban üzerine adsorplanan madde miktarı (mg/g)

C_o : Çözeltinin başlangıç enzim derişimi (mg/L)

C_e : Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan enzim derişimi (mg/L)

V : Çözeltinin hacmi (L)

W : partikül miktarı (g)

Adsorpsiyon yönteminde q_e değerinin büyük olması istenmektedir. Bu değerin büyük olması, adsorbanın adsorplama kapasitesinin büyük olması anlamına gelmektedir.

2.2.1. Adsorpsiyon Mekanizması ve Türleri

Adsorpsiyon, katı yüzeyi ile çözücüde çözünmüş gaz ya da çözünen maddenin teması ile gerçekleşmektedir. Katı yüzeyinde bulunan bir atom ya da molekül dengelenmemiş kuvvetlerin etkisi altında bulunmaktadır. Molekülü içe çeken kuvvet dışa çeken kuvvetten daha büyük olmaktadır. Birikim gösteren maddeye adsorbat, adsoplayan maddeye adsorban denilmektedir. Adsorpsiyonu üçe ayırabiliriz;

- Fiziksel
- Kimyasal
- Değişim (iyon değişimi gibi)

2.2.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyonda, adsorbe olan molekül katı yüzeyinde belirli bir yere bağlanmamıştır, yüzey üzerinde hareketli bir durumdadır. Van der Walls kuvvetleri olarak bilinen ikincil kuvvetler yüzeye tutunmayı sağlar. Adsorpsiyonun çok yaygın olan bu türünde hemen tüm katılar adsorplayıcı olabildikleri gibi, hemen tüm sıvı ve gazlarda adsorplanan olabilirler. Fiziksel adsorpsiyonun oluşabilmesi için düşük sıcaklık aralığı yeterlidir. Adsorpsiyon sonucu, ekzotermik olarak yoğuşma enerjisinden biraz büyük bir enerji oluşur $(0.5 - 5\,\text{kcal/mol})$. Aktivasyon enerjisi düşüktür, bağlar zayıf ve adsorpsiyon prosesi tersinirdir. Adsorplanan bileşenin çözeltideki derişiminin değişimiyle, adsorplanan moleküller desorbe olmaktadır. Adsorpsiyon çok tabakalıdır ve rejenerasyonu kolaydır (Metcalf and Eddy, 1972)

2.2.1.2. Kimyasal Adsorpsiyon

Kimyasal adsorpsiyonda adsorban ve adsorbat arasında kimyasal bağlanma olur. Genellikle adsorbat yüzey üzerinde bir molekül kalınlığında tek tabaka oluşturur ve moleküller yüzey üzerinde hareket etmezler. Adsorban yüzeyinin tamamı bu monomoleküler tabaka ile kaplandığında, adsorbanın adsorplama kapasitesi bitmiş olur. Adsorpsiyon sırasında ortaya çıkan ısı, reaksiyon ısısından daha büyüktür (10 - 50 kcal/mol) ve aktivasyon enerjisi yüksektir Bu tür adsorpsiyon çok nadir olarak geri dönüşümlüdür (tersinmez). Bu nedenle yüksek sıcaklıkta kimyasal adsorpsiyon daha hızlı gerçekleşir. Bununla beraber oluşan bağlar fiziksel adsorpsiyondaki bağlardan kuvvetlidir. Kimyasal adsorpsiyon yalnızca bir tabakalı olabildiği halde, fiziksel adsorpsiyon bir tabakalı ya da çok tabakalı olabilir (Harward and Trapnel, 1964)

Fiziksel adsorpsiyon genellikle tersinir bir olaydır. İşlem şartlarının (derişim, P, T vb.) değiştirilmesi ile desorpsiyon meydana gelirken kimyasal adsorpsiyon, kuvvetli bağ oluşumu söz konusu olduğu için tersinmez bir işlemdir. Fiziksel adsorpsiyon genellikle sıcaklık yükseltilmesi ile azaldığı halde, kimyasal adsorpsiyon, adsorpsiyonun ekzotermik ya da endotermik olmasına ve aktivasyon enerjisine bağlı olarak sıcaklık yükseltilmesi ile artış ya da azalma gösterebilir. Fiziksel adsorpsiyonun hızı artan sıcaklık ile hızlı bir şekilde düşerken, kimyasal adsorpsiyonda, adsorpsiyon hızı sıcaklık yükseldikçe artmaktadır (Smith, 1981). Katı yüzeyindeki adsorpsiyon işlemi, difüzyon kinetiğine bağlı olarak gerçekleşmektedir.

2.2.1.3. İyonik Adsorpsiyon

Yüzeydeki yüklü bölgelere elektrostatik kuvvetler ile çözeltideki iyonik karakterde adsorplananların çekilmesi sonucu oluşur. Adsorpsiyon adsorbent ve adsorplananların iyonik güçleri ve moleküler büyüklüklerine göre seçimli olarak oluşur. Eş yüklü iyon durumunda küçük iyon tercih sebebidir. Yüzeye tutunan iyonlara eş yüklü başka iyonların aynı anda yüzeyi terk etmesi halinde ise sürece iyon değişimi adı verilir.

Pek çok farklı özeliklerine karşın, çoğu durumda fiziksel, kimyasal ve iyonik adsorpsiyon arasındaki keskin bir ayırım yapılamaz, çoğu kez birlikte veya art arda oluşurlar (Ross and Olivier, 1964; Hassler, 1974).

2.2.2. Adsorpsiyon Dengesi ve Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon izotermleri adsorbanın birim kütlesine adsorbe olan kimyasal miktarıyla dengedeki çözelti derişimi arasındaki ilişkiyi temsil eder. Çözeltide kalan enzim derişimi C_e ile, adsorplayıcının birim ağırlığı başına tuttuğu madde miktarı q_e :arasındaki ilişkiler adsorpsiyon izotermi olarak tanınır. Adsorpsiyon izotermleri, adsorpsiyon sistemlerinin dizaynı için oldukça önemlidir. Genel olarak adsorpsiyon izotermleri adsorbanın, adsorbat ile nasıl etkileştiğini tarif eder ve bu nedenle de adsorbanların optimizasyonları için gereklidir. Adsorpsiyon, adsorban yüzeyinde biriken madde derişim ve çözeltide kalan madde derişim arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder. Adsorpsiyon dengesi kurulduktan sonra adsorpsiyon miktarında ve çözelti derişiminde bir değişiklik olmaz. Adsorpsiyon izotermleri adsorplanan madde derişimi ile değişim gösteren fonksiyonlardır. Denge izotermleri modellerin oluşturulmasında ve adsorpsiyon sistemlerinin tasarlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Ho et. al., 2002).

Belli bir şarttaki izotermler bir modele uyarken başka şartlarda ise bu modele uymamaktadır. Bu nedenle genelde uygulanabilir tek bir model bulunmamaktadır. Bulunan modellerde bazı varsayımlar yapılarak yeni modeller geliştirilebilir. Günümüzdeki çalışmalar genellikle belirlenmiş modeller kullanılarak, bu modeller yardımıyla adsorban ya ya adsorplanan maddenin (adsorbat) değiştirilmesi üzerinedir. En genel kullanım gören izotermler Langmuir ve Freundlich denklemlerinden elde edilenlerdir (Ng et.al., 2003; Wong et.al., 2004; Aksu and Yener, 2001; Aksu et.al., 1999).

Bir adsorpsiyonunun hangi izotermle daha iyi açıklandığının bulunması için deneysel olarak elde edilen veriler tüm izoterm denklemlerine uygulanıp grafiği çizilir. Verilerin doğrusal bir grafik oluşturduğu (korelasyon katsayısı) (R^2)'nin 0.95'den büyük olduğu izoterm çeşidi o adsorpsiyon için en uygun olanıdır. Ancak bir ya da daha fazla izoterm de uygun olabilmektedir.

2.2.2.1. Langmuir İzotermi

Langmuir izoterminde adsorpsiyon, adsorbat başlangıç derişimin ile birlikte lineer olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeye adsorbe olmuş adsorbat miktarı sabit kalmaktadır. Langmuir izoterminde adsorpsiyon enerjisi üniformdur. Adsorpsiyon hızı adsorbat derişimin ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır.

Langmuir izotermini ifade eden eşitlik ve bu eşitliğin doğrusallaştırılmış şekli aşağıda gösterilmiştir.

$$q_e = \frac{Q_0\, bC_e}{1 + bC_e} \tag{2.2}$$

Langmuir eşitliğini lineer formda yazacak olursak;

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_0\, b} + \frac{1}{Q_0} C_e \tag{2.3}$$

elde edilir ve burada;

Q_0: yüzeyde tam bir tek tabaka oluşturmak için adsorpbanın birim ağırlığında adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

b: adsorpsiyon net entalpisi ile ilgili bir sabittir (L/mg)

C_e: Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan maddenin derişimin (mg/L)

q_e: Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (mg/g)

Langmuir izotermlerine ait sabitlerin (Q_0 ve b) değerleri, C_e/q_e'ye karşı çizilen C_e grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinden hesaplanmıştır.

Özellikle tek tabakalı adsorpsiyonun meydana geldiği heterojen adsorpsiyon sistemlerinde bu izoterm denge durumunu net olarak açıklayamaz. Langmuir izotermi homojen bir adsorpsiyon olduğu için her molekülün aktivasyon enerjisi aynıdır. Düşük derişimler de Henry Yasası'nın geçerli olduğu durumda C_e çok

küçüktür. O zaman,

$$q_e = K_L C_e \tag{2.4}$$

şeklinde olur.

Adsorpsiyonun elverişliliğini bulmak için boyutsuz dağılma sabiti (R_L) hesaplanır (eşitlik 2.5) ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması (Çizelge 2.2) elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder (Aksu and Yener, 2001; Bayat, 2002; Başibüyük and Forster, 2003; Ho and Wang, 2004).

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \tag{2.5}$$

Bu eşitlikte;

b: Langmuir sabiti (L/mg)

C_0: Maddenin çözeltideki başlangıç derişimi (mg/L)

Çizelge 2.2. R_L (dağılma) değerleri ve izoterm tipleri (Hall,1966).

R_L **Değerleri**	**İzoterm tipi**
$R_L > 1$	Elverişli olmayan
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	Elverişli
$R_L = 0$	Tersinmez

Langmuir izotermi için yapılan kabuller aşağıda sıralanmıştır:

- Materyalin tüm yüzeyi aynı adsorpsiyon aktivitesine sahiptir ve enerji bakımından üniformdur.
- Adsorbe edilen moleküller arasında herhangi bir etkileşim, rekabet yoktur.
- Tüm adsorpsiyon aynı mekanizma ile olur ve adsorbe edilen kompleks aynı yapıya sahip kabul edilir.

- Adsorpsiyonun derecesi, yüzey üzerindeki tam bir monomoleküler tabakadan büyük olamaz (Smith, 1981).

2.2.2.2. Freundlich İzotermi

Freundlich 1926 yılında adsorpsiyon prosesini ifade eden bir ampirik denklem geliştirmiştir. Freundlich izotermi de ana fikir olarak Langmuir izoterminden yola çıkılarak, bazı varsayımlar ve gelişimler yapılarak matematiksel olarak ifade edilmiştir. Freundlich'e göre, bir adsorbanın yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir, yani farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından teşkil edilmiştir (McKay,1980; Moon, 1983; Al-Duri, 1988).

Freundlich eşitliği, Langmuir eşitliğinden farklı olarak düşük derişimler Henry kanununu uygulamaz ve dengeden sonra tam sabit bir adsorbat değeri elde edilemez. Freundlich izoterminin en büyük dezavantajı bunlardır.

Freundlich, çözeltilerin adsorpsiyonunu açıklamak için Eşitlik 2.6'yı türetmiştir;

$$q_e = K_f (C_e)^{1/n} \tag{2.6}$$

Burada;

C_e : Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan madde derişimi (mg/L)

q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (mg/g)

K_f : Deneysel olarak hesaplanır. Adsorpsiyon kapasitesi (L/g)

n : Adsorpsiyon derecesi (birimsiz).

Genellikle n değerlerinin $1-10$ arasında olması iyi bir adsorpsiyon olduğunun bir göstergesidir. $1/n$ değeri, heterojenite faktörüdür ve $0-1$ aralığında değerler alır. Yüzey ne kadar heterojense, $1/n$ değeri o kadar sıfıra yakın olur. Bu izotermin doğruluğu, heterojen adsorpsiyon sistemlerinde Langmuir izotermine göre daha iyidir.

Freundlich izoterminde Eşitlik 2.6'nın her iki tarafının logaritması alınarak lineer hale getirilir (Eşitlik 2.7).

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \qquad (2.7)$$

$\ln q_e$'nin $\ln C_e$'ye göre değişiminin grafiğe geçirilmesiyle K_f ve n sabitleri bulunur. Grafikten elde edilen doğrunun y eksenini kesim noktası $\ln K_f$'yi ve eğimi de 1/n'i verir. $n > 1$ değeri adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir (Chiou and Li, 2002).

Bir adsorpsiyonun hangi izotermle daha iyi açıklandığının bulunması için deneysel olarak elde edilen veriler tüm izoterm denklemlerine uygulanıp grafiği çizilir. Verilerin doğrusal bir grafik oluşturduğu (korelasyon katsayısının bulunmasına yardımcı olur) izoterm çeşidi o adsorpsiyon için en uygun olanıdır; ancak adsorpsiyon bir ya da daha fazla izoterme de uygun olabilmektedir.

2.2.3. Adsorpsiyon Kinetikleri

Bir olayın mekanizmasının aydınlatılması ve buna bağlı olarak dizayn edilecek süreçler için deneysel verilerin yorumlanması oldukça önemlidir. Bunun için de olayın hız belirleme basamağının bulunması elzemdir. Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbat-adsorban temas süresi; alıkonma süresi bulunur (Ho and McKay, 1998; Ho and McKay, 1999). Kinetik, adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır. Bir çözeltide bulunan maddenin adsorban tarafından adsorplanması işleminde dört ana basamak vardır:

1. Gaz ya da sıvı fazda bulunan madde, adsorbanı kaplayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur. Bu basamak, adsorpsiyon düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için çoğunlukla ihmal edilir.

2. Film tabakasına gelen madde buradaki durgun kısımdan geçerek adsorbanın gözeneklerine doğru ilerler.

3. Sonra adsorbanın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler.

4. En son olarak da adsorbatın adsorbanın gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir.

Adsorbanın bulunduğu faz hareketsiz ise, 1. basamak en yavaş ve adsorpsiyon hızını belirleyen basamak olabilmektedir. Akışkan hareket ettirilirse, yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için adsorpsiyon hızı artar. Son basamağın ölçülemeyecek kadar hızlı olduğu ve ilk basamakta da iyi bir karıştırma olduğu düşünülerek adsorpsiyon hızına aksi bir etki yapmayacakları için 2. ve 3. basamaklar süreçte hız belirleyicidir. 2. basamak adsorpsiyon işleminin ilk dakikalarında, 3. basamak ise adsorpsiyon işleminin geri kalan daha uzun bir süresinde meydana geldiği için, adsorpsiyon hızını tam olarak etkileyen basamağın 3. basamak olduğunu söyleyebiliriz (Başıbüyük and Forster, 2003; Chu and Chen, 2002a; Keskinkan et.al., 2003). Sınır tabakası difüzyonu adsorpsiyon işleminin ilk birkaç dakikasında etkili olmaktadır, ama parçacık içi difüzyon ise daha fazla zaman almaktadır. Bu nedenle parçacık içi difüzyonun hız belirleyici ana basamak olduğu bildirilmektedir (Başıbüyük and Forster, 2003). Adsorpsiyon işleminin ilk birkaç dakikasında sınır tabakası difüzyonunun etkisinin olup olmadığının anlaşılması için $\log C_t/C_0$ değerinin zamana karşı grafiği çizilir (Eşitlik 2.8). Çizilen bu eğrinin doğrusallığı ne kadar bire yakınsa sınır tabakası difüzyonunun etkisinin o kadar önemli olduğu söylenebilir. Adsorpsiyon işlemine parçacık içi difüzyonun etkisinin bulunması için ise, q_t değerinin zamanın kareköküne (Eşitlik 2.9) karşı grafiği çizilerek anlaşılır. Çizilen bu eğrinin eğimi ise hız sabitine eşittir (Waranusantigul et.al., 2003).

$$k\,t = 2.303 \log \frac{C_t}{C_0} \tag{2.8}$$

Burada;

C_t: Her bir temas zamanında çözeltide kalan adsorbat değişimi (mg/L)

C_0: Baslangıçtaki adsorbat değişimi (mg/L)

k : sınır tabakası difüzyonu sabiti (dk^{-1})

$$k_p = \frac{q_t}{t^{0,5}} \tag{2.9}$$

k_p: parçacık içi difüzyon hız sabiti ($mg/g\,dk^{0.5}$)

q_t : t zamanında birim adsorban üzerine adsorplanan adsorbat miktarı (mg/g)

t : zaman (dk)

Adsorpsiyon hızını belirlemek için kullanılan eşitlikler şunlardır:

Pseudo birinci derece Lagergren eşitliği:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \tag{2.10}$$

Pseudo ikinci dereceden reaksiyon hız eşitliği:

$$\frac{t}{q_t} = \left[\frac{1}{k_2 q_{e,h}^2}\right] + \frac{1}{q_{e,h}} t \tag{2.11}$$

Burada;

k_1: Lagergren adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1})

k_2 : Pseudo ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/(mg.dk))

q_e : Denge meydana geldiği zaman adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

$q_{e,h}$: Hesaplanan enzim miktarı (mg/g)

q_t : Herhangi bir zamandaki adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

$\ln(q_e - q_t)$ ve t/q_t değerlerinin t değerine karşı ayrı ayrı grafiğe geçirilmesiyle, sırasıyla k_1 ve k_2 değerleri hesaplanır. Deneylerden elde edilen veriler, grafikler yardımıyla değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulunur.

2.2.4. İyon Değiştirici Reçineler

İyon değiştiriciler çözeltiden yüklü iyonları tutan ve eş miktarda iyonları çözeltiye veren katı materyallerdir. İyon değiştirebilmeleri materyalin yapısına ait özellik sayesindedir. İyon değiştirici fazla pozitif ya da negatif yüklenmiş bir matristir. İyon değiştirici değişen boyut ve şekle sahip por denen birçok açık bölgeye sahiptir. Sadece bazı inorganik değiştiriciler aynı biçimde kesit alanına sahip porlar içerirler. İyon değiştiriciler düzensiz boyutta kanallardan oluşan üç boyutlu bir ağ yapısı göstermektedirler. Fazla yük, katı yapının ya da fonsiyonel grubun belli

bölgelerinde toplanmıştır. Matrisin yükü karşı iyon denilen matristeki serbest boşlukta hareket edebilen iyonlarla dengelenmektedir ve eş yük işaretine sahip diğer iyonlarla yer değiştirmektedir (Inglakis and Poulopoulos, 2006a). Bu durumda porlar iyonlarla dolmaktadır.

Porlar bazen sadece karşı iyon değil çözücü de içermektedirler. İyon değiştirici madde sıvı ile fazla temas ettiğinde, çözücü iyon değiştirici içinden hareket etmekte ve karşı iyonun çeşidine bağlı olarak bir miktar şişmeye neden olmaktadır.

İyon değiştirme adsorpsiyona benzemektedir çünkü her iki prosesde de sıvıdan katı faza bir kütle transferi söz konusudur. Ancak iyon değiştirme ve adsorpsiyon arasında karakteristik farklar bulunmaktadır. Örneğin iyon değiştirme sorpsiyonun aksine stokiyometrik bir prosestir. İyon değiştirme prosesinde her ayrılan iyon için aynı işarete sahip başka bir iyon çözeltiye bırakılmaktadır. Tersine, sorpsiyonda çözeltiden ayrılan madde yerine yeni bir madde bırakılmamaktadır. İyon değiştirme de bir sorpsiyon prosesidir ancak adsorpsiyonda adsorplanan türler nötr türler iken iyon değiştirme de iyonlardır. Genel olarak adsorpsiyon ve iyon değiştirme proseslerinin uygulamalarda sorpsiyon olarak gruplandırılması kabul edilmektedir.

2.3. Enzimler

Enzimler, protein yapısında olan yapay ve doğal ortamlarda birçok tepkimeyi kontrol eden ve hızlandıran yüksek molekül ağırlığına sahip biyolojik katalizörlerdir. Enzimler diğer katalizörlerde olduğu gibi hem katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin hızlanmasını sağlarla hem de substrata özgü olmalarından dolayı daha saf ve güvenilir ürün elde edilmesine neden olmaktadırlar. Protein yapısını oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlamaktadır. Bazı enzimler sadece protein yapısında olurken bazıları protein yapısında olmayan bir kısım içermektedir. Enzimlerin protein yapısında olan kısmına apoenzim, protein yapısında olmayan kısmına kofaktör ya da koenzim denmektedir (Bailey and Ollis, 1986). Koenzim, organik ya da inorganik maddelerden meydana gelen ve enzimin protein kısmına göre çok daha küçük moleküller içeren kısımdır. Enzimde reaksiyonu gerçekleştiren yapı koenzim kısmıdır. Koenzim kısmı genellikle protein kısmından ayrılabilir ve birçok vitamini

(thiamin, niasin, riboflavin vs.) bünyesinde bulundurabilir. Bazen enzimin aktif olabilmesi için bir metal iyonuna gereksinimi vardır ve bu kısma kofaktör denir.

Bazı durumlarda koenzim ya da kofaktör kısmı apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmıştır; bu sıkı bağlanan kısma "Prostetik Grup"; prostetik grupla apoenzim kısmının her ikisine birden ise, "Holoenzim" denir. Enzimlerin bir kısmı stoplazmaya serbestçe dağılmış olarak, diğer bir kısmı da hücredeki bazı yapılara sıkıca bağlanmış olarak bulunur. Enzimin apoenzim kısmı substrata karşı seçiciliğini sağlarken koenzim kısmı kimyasal aktiviteden sorumludur. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir. Aynı koenzim farklı apoenzimlerle birleşerek oluşan farklı enzimlerle farklı substratlar için aynı reaksiyon gerçekleştirilebilir (Bailey and Ollis, 1986; Leblebici, 1999).

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli aminoasitlerin oluşturduğu bir kısım bulunmaktadır. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olup aktif bölge olarak tanımlanmaktadır. Substrat bu merkeze hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve/veya kovalent bağlar ile bağlanmaktadır. Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılmaktadır (Bailey and Ollis, 1986, Boyacı, 2001).

2.3.1. Enzimlerin Özellikleri

- Enzimlerin maddeyi tanıyan temel kısımları proteindir. Bu kısma apoenzim denir, genelde inaktif durumdadır. Aktifleşmesi için ya başka bir enzim gerekir ya da protein olmayan küçük bir aktivatör ile çalışır. Aktivatör organik madde ise koenzim, bir metal iyonu ise kofaktör adını alır.

- Biyolojik reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürür.

- Aynı reaksiyon çeşidi için aynı enzimler bozulmadan tekrar tekrar kullanılabilir.

- Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlar.

- Enzimler mutlaka hücre içinde sentezlenir; ancak hücre dışında da yani cansız ortamda da çalışabilir.

- Enzimlerin özel aminoasit dizilimleri nedeniyle, yüzey yapıları belirli bir maddeye anahtar kilit ilişkisi gibi uyar ve böylece her enzim özel bir substrat (etkin madde) ile etkileşir.

- Enzimler belirli bir aktivatör ile aktifleşirler ve aktivatörlerini değiştirmezler; ancak bir aktivatör, birden çok enzimi aktifleştirebilir. Bu nedenle bir hücrede enzim miktarı aktivatör miktarından fazladır.

- Enzimatik reaksiyonlar tersinirdir. Enzimler takımlar halinde çalıştığından birinin ürünü diğerinin substratı olarak kabul edilebilir.

- Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir ve canlı sistemlerde binlerce enzim bulunmaktadır. Enzimler, inorganik katalizörlere göre aktivasyon enerjisini daha fazla düşüren moleküllerdir.

- Kimyasal katalizörler, birden fazla kimyasal tepkimede rol oynarken enzimler genellikle tek bir tepkimeyi kataliz etmektedir.

2.3.2. Enzim Aktivitesi

Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Enzim aktivitesi birimi (1 E.U.), yaygın olarak standart koşullarda 1 dakikada 1µmol substratı dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım uluslar arası Biyokimya Birliği tarafından 1965 yılında kabul edilmiştir (Lehninger, 1979; Fennema, 1985).

Ünite: Bir µmol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri E.U şeklinde gösterilmektedir.

Spesifik Aktivite: Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak kabul edilmektedir.

2.3.2.1. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin aktivitesini, dolayısıyla hızını etkileyen faktörler; enzim derişimi, sıcaklık, pH, substrat derişimi, zaman, inhibitör

ve aktivatörlerin miktarı, ortamdaki su miktarı, tepkime ürünlerinin derişimi ve özellikleri, substrat yüzeyi, ışık ve diğer fiziksel faktörler olarak sıralanabilir. Bu faktörlerin enzim tepkimeleri üzerine olan etkilerini saptamak için etkisi ölçülmek istenen faktör dışındaki koşullar sabit tutularak sadece bu faktörün farklı değerlerinde enzim tepkime hızları ölçülmektedir (Bailey and Ollis, 1986).

- ***Enzim derişimi*:** Tepkimenin hızı, enzim derişimi substrat derişiminden çok az olduğu durumlarda ($[E0] << [S0]$) enzim derişimi ile lineer bir şekilde artmaktadır. Enzim derişimi substrat derişiminden çok az olmadığı durumlarda da tepkime hızı enzim derişimine bağlı olarak artmaktadır; ancak bu artış ilk duruma göre daha yavaştır ve belli bir enzim derişiminden sonra durmaktadır.

- ***Sıcaklık:*** Tepkime hızı sıcaklıkla doğru orantılı olarak artmaktadır. Ortamın sıcaklığı arttıkça reaksiyona giren moleküller arasında çarpışma hızı ve buna bağlı olarak da aktivasyon enerji seviyesini aşabilen moleküllerin sayısı da artmaktadır. Dolayısıyla sıcaklığın artmasıyla enzim reaksiyon hızı maksimuma erişmektedir; ancak belirli bir noktadan itibaren düşmeye başlamakta ve tamamen durmaktadır. Enzim reaksiyon hızının maksimuma eriştiği sıcaklığa "optimum sıcaklık" denir. Yüksek sıcaklıklarda enzimler etkisizdir (genellikle $55 - 60\ °C$). Optimum noktanın biraz üzerinde enzimler etkisiz olmasına karşın, sıcaklık düşünce tekrar aktif hale geçebilmektedirler (Shuler and Kargı, 1992); ancak bu sıcaklığın devamı ya da sıcaklığın biraz daha yükselmesi, enzimlerin etkinliğini tamamen ortadan kaldırmaktadır. Enzimlerin etkisiz hale gelmeleri ile proteinlerin koagüle olması arasında büyük bir ilişkinin olması, büyük bir kısmının proteinlerden yapıldığını kanıtlamaktadır. Düşük sıcaklıklar enzimin etkinliğini azaltmaktadır. $0\ °C$'de enzim ya hiç etkin değildir ya da çok az işlev göstermektedir; ancak sıcaklığın azalması, enzimin yapısını bozmamaktadır. Sıcaklık eski hale döndüğünde etkinlik yine başlamaktadır (dondurmak suretiyle besin maddelerinin saklanması, yine enzimlerin etkisiz hale geçirilmesiyle sağlanır).

- ***pH etkisi:*** Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve bazik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek

etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Optimum pH'ın her iki yanında da enzim aktivitesi yavaşlar. Örneğin; proteini parçalayan pepsin, midenin asidik ortamında maksimum çalışır; buna karşın pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin bazik ortamda optimum olarak çalışır. Enzim aktivitesinin pH' ile ilgili olmasının nedeni, enzimlerin proteinlerden oluşmasındandır. Kuvvetli asitler ve bazlar enzimleri koagüle ederler. pH'yı optimum seviyede tutmak için tampon sistemler kullanılmaktadır (Shuler and Kargı, 1992).

- ***Substrat derişimi:*** Enzimatik reaksiyonlarda eğer ortamda belirli bir miktar enzim varsa, substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızı da artar, yani birim zamanda daha fazla ürün oluşur. Bu artış bir süre doğrusal olarak devam eder, enzim tepkimesi bu durumda birinci dereceden bir kinetik gösterir. Ancak bir süre sonra substrat miktarı ne kadar arttırılırsa arttırılsın ürün miktarı sabit kalır ve platoya ulaşılır. Ürün miktarının artmamasının nedeni; enzim moleküllerinin tamamının enzim-substrat kompleksi halinde bulunmasıdır. Bu durumda ortama daha fazla substrat konulsa bile, kompleks yapabilecek enzim olmadığından dolayı enzimatik reaksiyonun hızı değişmemektedir. Bu durumda enzim tepkimesi sıfırıncı dereceden bir kinetik gösterir. Bu noktada enzim tepkime hızı, maksimum hıza (V_{max}) erişmiştir. Enzim moleküllerinin yarısı enzim-substrat kompleksi halinde iken yani yarısı çalışırken gözlenen tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. Maksimum hızın yarısını veren substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti (K_m) denir. Bir enzimin K_m değeri, enzim substrata olan ilgisini gösterir. Enzim substrata olan ilgisi zayıf ise K_m değeri büyüktür.

- ***Zaman:*** Enzimatik reaksiyonlarda oluşan ürün derişimi bir süre zamanla lineer artış göstermektedir; ancak belirli bir süre sonunda enzim aktivasyon eğrisi belirli bir seviyede devam etmektedir. Enzimatik reaksiyon hızında zamana göre bir azalma görülmesinin başlıca nedenleri şöyledir;

  1. Ortamdaki substrat derişimi gittikçe azalıyor olabilir.

  2. Ürünün ortamda çoğalmasıyla reaksiyonun dengesi sola kayıyor olabilir.

3. Ortamda fazla ürün birikmesi enzimi denatüre (yapısının bozulması) ediyor olabilir.

4. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürün asidik ya da bazik özelliklere sahip ise, ortamın asit baz dengesini bozuyor olabilir. Bu neden enzim aktivitesini kaybediyor olabilir.

- ***Reaksiyon ürün miktarı:*** Bir enzimin ürünü genellikle diğer enzimin substratı olur ve zincirleme reaksiyonlar sonucunda son ürün oluşur. Ortamda ürünün birikmesi sonucu oluşan fazla ürün enzim moleküllerine bağlanmakta ve enzimi ya inhibe etmekte ya da aktivitesini azaltmaktadır. Bu şekilde enzimatik reaksiyonlarda oluşan ürünler enzimlerin aktivitesini kontrol etmektedir.

- ***Ortamdaki su miktarı:*** Enzim reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda belirli oranda (en az %15) su olması gerekir; çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir.

- ***Substrat yüzeyi:*** Enzimler yüzey uygunluğu yaparak substrata bağlandıklarından yüzey ne kadar geniş ise enzim etkinliği o kadar fazladır.

- ***İnhibitör-aktivatör miktarı:*** Koenzim ve kofaktörler enzimleri aktifleştirdikleri için enzim reaksiyon hızını arttırırlar. İnhibitörler ise enzimlere bağlanır; böylece enzimler tepkime içinde çökelir. Buna bağlı olarak enzim reaksiyon hızı düşer. Tepkime ortamında bulunduklarında, enzimatik tepkime hızını azaltan maddelere ‘inhibitör’ denir. İnhibitörler, tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler, ya aktif merkeze doğrudan bağlanarak ya da enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek, aktif merkezi tamamen bozarlar. Bu maddeler enzim etkinliğini tümüyle yok ettiklerinden enzim kinetiği açısından fazla önem taşımazlar. Tersinir inhibitörler ise enzimlerle ara bileşik oluşturarak ya Michaelis-Menten sabiti ya da maksimum tepkime hızı değerlerini ya da her ikisini de azaltıcı yönde etkilerler; diğer bir inhibisyon türü olan ürün inhibisyonunda, enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünler belirli derişim değerlerinden sonra tepkime

hızını düşürücü işlev görür. Bazı enzim tepkimelerinde de, yüksek substrat derişimlerinde enzim aktivitesinin azaldığı görülür (substrat inhibisyonu).

- ***Işık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi:*** Enzimler ancak üç boyutlu yapılarını korudukları sürece aktivite gösterirler. Molekülün üç boyutlu yapısı bozulursa enzimin aktivitesi ya azalır ya da tamamen yok olur. Enzimin üç boyutlu yapısını meydana getiren kuvvetler; Van der Waals bağları, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve kovalent bağlar gibi kimyasal bağlardır. Işınlar, ısı, yüksek basınç gibi faktörler bu bağları kırarak molekülün üç boyutlu yapısını bozup enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar.

2.3.3. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği ile ilgili çalışmalar 1902 yılında Henri tarafından yapılmış ve enzimatik hız ifadesi 1913 yılında L. Michaelis ve M. Menten tarafından tekrar ele alınarak geliştirilmiştir. Bu yaklaşım denge varsayımına dayanmaktadır. Briggs ve Haldane (1925) bu çalışmaları, yatışkın durum varsayım kinetiği yaklaşımıyla genelleştirmişlerdir. Bütün bu yaklaşımlarda enzimatik tepkimelerde öncelikle kararsız bir ara bileşik oluşmaktadır. Kararsız olan bu ara bileşik, enzim ve ürünlere dönüşmektedir. Ürün oluşum hızı, ortamdaki enzim ve substrat derişimine bağlıdır (Bailey and Ollis, 1986; Shuler and Kargı, 1992).

Enzimatik bir reaksiyon için aşağıdaki reaksiyon denklemleri yazılabilir.

$$E + S \xrightarrow{k_1} E \cdot S \tag{2.12}$$

$$E \cdot S \xrightarrow{k_2} E + S \tag{2.13}$$

$$E \cdot S \xrightarrow{k_3} P + E \tag{2.14}$$

Yukarıdaki denklemlerde, $E, S, E \cdot S$ ve P sırasıyla enzim, substrat, enzim-substrat kompleksi ve ürünü ifade etmektedir.

Substratın tüketim hızı, $-r_S$;

$$-r_S = k_1(E)(S) - k_2(E \cdot S) \tag{2.15}$$

Enzim-substrat kompleksinin net oluşum hızı;

$$-r_s = k_1(E)(S) - k_2(E \cdot S) - k_3(E \cdot S) \tag{2.16}$$

Reaksiyonda enzim tüketimi söz konusu olmadığı için toplam enzim miktarı, ortamda serbest ve kompleks halinde bulunan enzimlerin toplamlarına eşittir.

$$(E_T) = (E) + (E \cdot S) \tag{2.17}$$

Eşitlik 2.17'den (E) çekildiğinde Eşitlik 2.18 elde edilir.

$$(E) = (E_T) - (E \cdot S) \tag{2.18}$$

Eşitlik 2.18' elde edilen E Eşitlik 2.16'da yerine yazılır ve denklem düzenlenerek Eşitlik 2.19 elde elde edilir.

$$-r_s = k_1\left[(E_T) - (E \cdot S\right](S) - k_2(E \cdot S) - k_3(E \cdot S) \tag{2.19}$$

Eşitlik 2.19 $E.S$ için tekrar yazılırsa;

$$(E \cdot S) = \frac{k_1(E_T)(S)}{k_1(S) + k_2 + k_3} \tag{2.20}$$

elde edilir. Eşitlik 2.18'in Eşitlik 2.15'de yerine konulması ile Eşitlik 2.21 elde edilir.

$$-r_s = k_1\left[(E_T) - (E \cdot S)\right](S) - k_2(E \cdot S) \tag{2.21}$$

Eşitlik 2.19, Eşitlik 2.21'den çıkartılır ve tekrar düzenlenirse eşitlik 2.22 elde edilir.

$$-r_S = \frac{k_1 k_2(E_T)(S)}{k_1(S) + k_2 + k_3} \tag{2.22}$$

Michaelis-Menten Eşitliği

$$K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1} \tag{2.23}$$

Eşitlik 2.22 ve Eşitlik 2.23 birleştirilirse Eşitlik 2.24 elde edilir.

$$-r_S = \frac{k_3(E_T)(S)}{(S) + K_m} \tag{2.24}$$

K_m değeri Michaelis-Menten sabiti olarak tanımlanır. Enzimin tamamı substrat ile bağlandığında maksimum hıza (V_{max}) ulaşılır. Maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) maksimum miktarda enzimin reaksiyona girmesi ile olacağı için;

Maksimum hız denkliği

$$V_{max} = k_3 * (E_T) \tag{2.25}$$

Hız denkliği maksimum hız denkliğine göre düzenlenirse Michaelis-Menten eşitliği Eşitlik 2.26 elde edilir.

$$-r_S = \frac{V_{max}(S)}{(S) + K_m} \tag{2.26}$$

Michaelis – Menten denkleminde görüldüğü gibi, enzimatik bir reaksiyonun hızı [S] ve K_m' e bağlıdır. Farklı durumlarda;

- Substrat derişimi, K_m' den çok düşük ise; S değeri paydada bulunan, K_m' in yanında ihmal edilebilir ve reaksiyon hız ifadesi;

  $$-r_S = \frac{V_{max}(S)}{K_m}$$

  elde edilir. Böyle reaksiyonlar, birinci dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.

- Substrat derişimi, K_m' den çok büyük ise; K_m değeri paydada bulunan, S 'ın yanında ihmal edilebilir ve reaksiyon hız ifadesi;

  $$-r_S \cong V_{max}$$

şeklinde yazılabilir. Bu durumda başlangıç hızı maksimum hıza eşit olduğunu ve aşırı substrat derişiminde sıfırıncı dereceden reaksiyonun geçerli olduğunu ifade etmektedir.

- Substrat derişimi K_m değerine eşit ise; başlangıç hızı, maksimum hızın yarısına eşit olur. Reaksiyon hız ifadesi;

$$-r_S = \frac{V_{max}}{2}$$

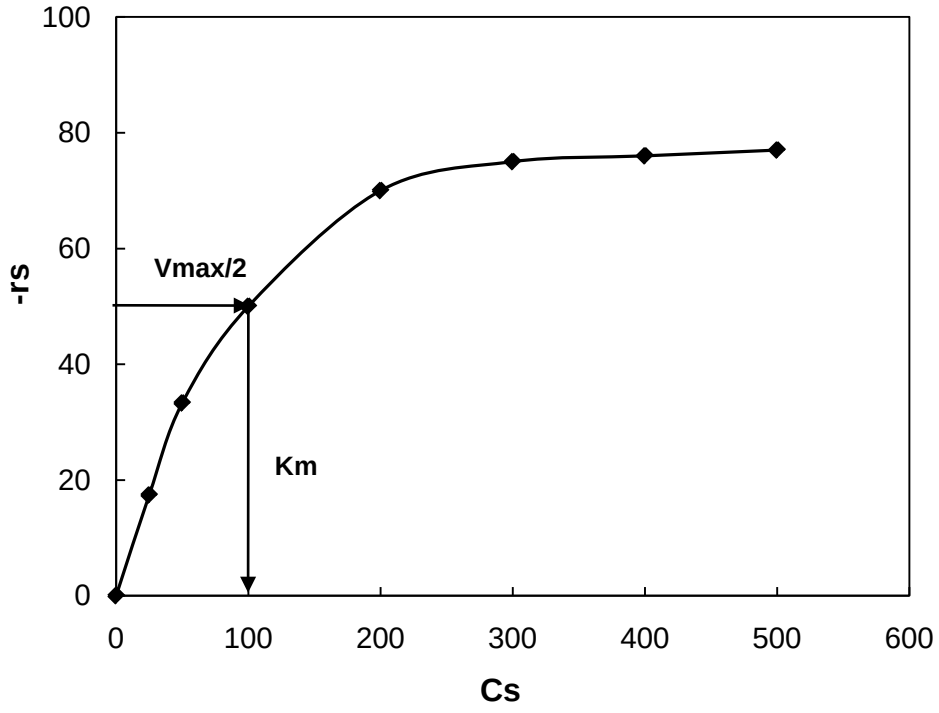
olarak elde edilir (Fogler, 1999).

Michaelis-Menten denklemine göre; K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_m değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat derişiminde doyarak maksimal hız sağlar. K_m değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir. Bir enzim için K_m değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır.

Michaelis-Menten denklemi hiperbolik eğrinin denklemi olduğundan ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan bir enzime ait V_{max} ve K_m'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Michaelis-Menten denklemi doğrusal olmayan bir grafik olduğundan, kinetik katsayıların hesaplanması ancak doğrusal olmayan regresyon hesaplamaları için farklı düzeylerde hazırlanan bilgisayar yazılımları kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bilgisayar yazılımlarının kullanılmasının yanı sıra, kinetik katsayıların hesaplanması amacıyla farklı grafiksel yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Doğrusal olmayan regresyon yönteminin haricinde Lineweaver-Burk, Eadie- Hofstee ve Hanes- Woolf grafiksel yaklaşımları en yaygın kullanılan doğrusallaştırma yöntemleridir.

Michealis-Menten eşitliğinin doğrusallaştırılması, Lineweaver-Burk grafiğinin sağladığı önemli bir avantajdır; ancak, bu grafikte, düşük substrat derişimleri, yüksek 1/S değerlerine karşılık gelmektedir. İlk hız ölçümlerinde en fazla hata düşük substrat derişimlerinde yapılmakta ve Lineweaver Burk grafiğinde en fazla hata bu değerlerinde olmaktadır. Hanes-Woolf grafiği Michealis-Menten eşitliğinin doğrusallaştırılması ile elde edilen grafiklerin içerisinde (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee) doğruluğu en yüksek olanıdır. Lineweaver-Burk grafiğinin sahip olduğu

dezavantajlar Hanes-Woolf grafiği için geçerli değildir. Hız ölçümlerinde en fazla hata düşük substrat derişimlerinde yapılmakta ancak substrat derişimlerinde herhangi bir dönüşüm yapılmaması Hanes-Woolf grafiğinin en önemli avantajıdır (Cornish-Bowden, 1999; Copeland, 2000)

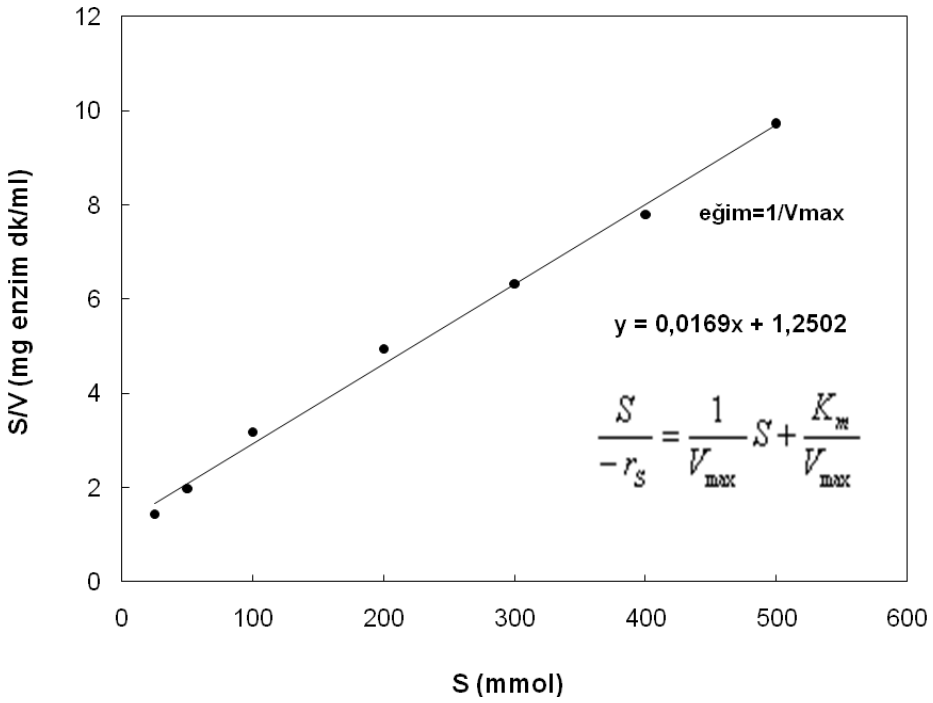


Şekil 2.1. Michaelis – Menten parametrelerinin belirlenmesi

Bu çalışmada Michaelis-Menten eşitliğinin doğrusallaştırılmasında Hones-Woolf grafiği kullanılmıştır. Eşitlik 2.26 ’nın ters çevrilip her iki tarafının S ile çarpılması sonucu elde edilir ve şöyle gösterilir.

$$\frac{S}{-r_S} = \frac{1}{V_{\max}} S + \frac{K_m}{V_{\max}} \tag{2.27}$$

Eşitlik (2.27) ile elde edilecek doğrunun eğimi $1/V_{max}$ olup, y eksenini kestiği nokta K_m/V_{max} değerini vermektedir.



Şekil 2.2. Hones-Woolf grafiği

2.3.4. Tutuklanmış Enzim Prosesleri

İmmobilizasyon genel anlamda enzim hareketinin sabit bir yüzey üzerinde sınırlandırılması olarak bilinir (Shuler and Kargı, 1992). Günümüze kadar birçok enzimin değişik tekniklerle tutuklanması üzerinde çalışılmıştır. Bunların çoğu akademik nitelikte olmuş, ancak temel tutuklama yöntemlerinin bir kısmı ticari olarak kullanılmıştır. Genel olarak endüstride kullanılan tutuklanmış enzim preperatları kofaktör gerektirmeden substratı etkileyebilen basit hidrolazlar, izomerazlar ve oksidazlardır. Endüstriyel ölçekte polimerik maddelerin dönüşümlerinin yapıldığı tutuklanmış enzim proseslerinin sayısı oldukça azdır (Çelebi, 1986).

Günümüzde tutuklanmış enzimler ticari proseslerde kullanılan çözünür (serbest) enzimlerin yerlerini almaktadır. Bu durum tutuklanmış enzim kullanımının sağladığı şu avantajlardan ileri gelmektedir (Mutlu, 1994;Boyacı, 2001):

Tutuklanmış enzimler ortamdan ayrılabildiklerinden kesikli proseste tekrar-tekrar kullanılabilir ya da doğrudan sürekli proseste kullanılabilirler. Böylece sürekli prosesin yüksek kapasitede ve her zaman aynı kalitede ürün eldesi ve işletme kolaylıkları gibi avantajlarından yararlanılır. Tutuklu enzimlerin kullanımda aktif

oldukları süre serbest enzimlere göre önemli derecede fazladır. Bu nedenle tutuklanmış enzimin başlangıç aktivitesi düşük olsa bile prosesin katalizör bileşeninin fiyatı yani, işletme maliyeti düşer. Ayrıca bu durumun sonucu olarak istenilirse daha fazla ve daha saf yüksek aktiviteli enzim preparatları kullanılabilir. Böylece reaksiyon süresinin kısalması ile küçük reaktörlerin kullanımı ve daha saf ürünleri elde edilebilir.

Tutuklanmış enzimler substrat fazında çözünmediğinden sistemin kontrolü çözünür enzimlere göre daha kolaydır. Örneğin dolgulu kolon enzim reaktörü kullanıldığında, çözelti kolondan çıktığı anda enzimin substratı etkilemesi durur. Reaksiyonu durdurmak için enzimi inaktive edici bazı işlemlere (ani ısıtma, inhibitör eklenmesi vb.) gerek kalmaz. Ayrıca çözeltinin akış hızı dolayısı ile alıkonma süresi ayarlanarak istenmeyen bir dengenin ya da yan ürünlerin oluşumu ve ürün inhibisyonu engellenebilir.

Tutuklanmış enzimler ürün çözeltisinden kolaylıkla ayrılabildiklerinden enzimin safsızlık olarak ortamda kalması istenmediği durumlarda kompleks ayırma işlemlerine gerek kalmaz. Bu da maliyet düşürücü bir unsur olarak göz önüne alınmalıdır.

Serbest formda pH optimumları birbirine uymayan iki enzim ya farklı destek maddelerine tutuklanarak ya da bir membranın zıt iki tarafında kendi mikro çevrelerine sahip olmaları sağlanarak kullanılabilir. Alternatif olarak enzimlerin biri çözeltide, diğeri ise bir desteğe bağlanmış şekilde çalışılabilir. Böylece birbirini izleyen iki enzim prosesi için gerekli zaman kısalmış olacaktır.

2.3.5. Enzim Tutuklama Yöntemleri

Enzim ve taşıyıcının farklı kombinasyonları ve farklı bağlama teknikleri birbirinden çok farklı özellikler ortaya çıkarır. Bu nedenle yüzlerce kombinasyon çalışılabilir ve çok karmaşık durumlarla karşılaşılabilir (Demain and Solomon, 1986).

Enzim tutuklama yöntemleri farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmıştır (Bailey and Ollis, 1986; Hartmeier, 1988; Shuler and Kargı, 1992). Enzim tutuklama yöntemleri temelde fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar:

- Fiziksel Yöntemler
    a) Polimerik matrikste tutuklama (kapanlama)
    b) Mikrokapsülleme
    c) Membran reaktörler
- Kimyasal Yöntemler
    a) Adsorpsiyon
    b) İyonik bağlama
    c) Çapraz bağlama
    d) Kovalent bağlama

2.3.5.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler enzim molekülünün herhangi bir şekilde bir bağlanmaksızın taşıyıcı tarafından tutuklanmasına dayanır.

Polimerik matrikste tutuklama (kapanlama): yöntemin esası enzim moleküllerinin etrafında bir polimer ağ oluşturulmasına dayanır. Oluşturulan ağın gözenekleri substrat ve ürün moleküllerinden büyük, enzim molekülünden küçüktür. Böylece, substrat ve ürün polimer ağ içine kolaylıkla girip çıkabilir ancak enzim molekülleri dışarı çıkamazlar.

Mikrokapsülleme: yöntemin temeli enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran tarafından kuşatılmasına dayanır. Membran, enzim moleküllerinin dış etkilerden korunmasını sağlar. Küçük moleküllü substrat ve ürünler enzim ortamına girip çıkabilirler (Telefoncu, 1986).

Membran reaktörler: Mikroenkapsülasyon yönteminin büyük ölçekli, mekanik olarak akış dinamiğine uygun olarak tasarlanan, sürekli sistem amaçlı tutuklama yöntemidir. Membran reaktörler, oyuk fiber, tübüler ve kaskat yapılarında olabilirler. Membranın özelliği substrat ürün giriş ve çıkışına izin verecek şekilde yarı geçirgen olması ve prosesin mekanik etkilerinden enzimi koruyacak şekilde dayanıklı olmasıdır (Hartmeier, 1988).

2.3.5.2. Kimyasal Yöntemler

Adsorpsiyon: Enzim molekülü suda çözünmeyen bir taşıyıcıya adsorpsiyon bağlayıcı kuvvetleriyle bağlanır. Adsorpsiyon, faz ve yüzey sınırlarında fiziksel ve kimyasal kuvvetlerin etkisiyle ortaya çıkan yüzeye tutunma olayıdır. Fizikokimyasal bir tutuklama yöntemi olarak da tanımlanabilecek olan bu yöntemde, enzim molekülleri gözenekli bir katı desteğin yüzeyine adsoplanır. Bu adsorpsiyonda tutucu kuvvetler, yüzey kuvvetleri veya elektrostatik kuvvetlerdir. Destek madde olarak sentetik veya biyolojik kökenli maddeler kullanılabilir. Adsorplayıcı madde ve enzim moleküllerinin özelliklerine göre bağlanma kuvvetleri değişir. Bağlanma çok kuvvetli değildir. Bu nedenle tutuklama kayıpları fazla olmaktadır. Avantajlı yönleri ise hazırlama kolaylığı ve enzime toksik maddelerin olmamasıdır. Çözeltilerde adsorpsiyon üç tür olarak incelenir (Mutlu, 1988):

a) *Yer değiştirme adsorpsiyonu*: çözünen bir adsorplayıcı arasındaki elektriksel etkileşme sonucu meydana gelir.

b) *Van der Walls adsorpsiyonu (fiziksel adsorpsiyon)*: bu tür adsorpsiyonda fiziksel karakterde zayıf Van der Walls kuvvetleri etkindir.

c) *Kimyasal adsorpsiyonu (Kemisorpsiyon)*: adsorplanan ile adsorplayan yüzey üzerindeki aktif merkezlerde, kuvvetli kimyasal bağlar oluşur.

Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Walls kuvvetleri olmakla birlikte iyonik ve hidrojen bağlarının bir kombinasyonu şeklindedir. Enzim adsorpsiyonunda, en çok kullanılan taşıyıcılar gözenekli cam, reçineler, diatome toprağı (kizelgur), bentonit(kil), sepiolit (lüle taşı), titania, alumina, seramik, kolodyum, silikajel, kül, aktif karbon, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Yöntemin avantajıları: enzim tutuklama işleminin basit oluşu, enzime zarar verebilecek maddeler kullanılmadığı için enzim konformasyonu üzerine etkisinin az oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıcıları seçme olanağının olmasıdır. Adsorpsiyon yönteminin en önemli dezavantajı enzimin desorpsiyonudur. Enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmadığından genellikle şiddetli hidrodinamik kuvvetlerin varlığında, desorpsiyon sonucu enzim serbest halde tepkime ortamına geçmektedir (Hartmeier, 1988).

İyonik Bağlama: bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama, ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişiklik görülmez. Yöntemin dezavantajı, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışının meydana gelmesidir. Sephadex, amberlite, dowex gibi iyon değiştirici reçineler taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Shuler and Kargı, 1992)

Çapraz bağlama (Cross-linking): Çapraz bağlamada enzim molekülleri çift fonksiyonlu bir madde ile muamele edilip üç boyutlu bir örgü oluşturulur. Çift fonksiyonlu gruplar genellikle aldehitler veya aminlerdir. Bu maddelerin toksik etkisi bu yöntemin uygulanmasına kısıtlama getirir.

İkili Çapraz Bağlama (Co-Cross-linking): Bu yöntem, gerekli durumlarda, çapraz bağlama yöntemindeki yüksek enzim derişimini düşürmek üzere ortama ikinci bir seyreltme ajanının ilavesi ile çapraz bağlama yöntemi gibi gerçekleştirilir. Seyreltme ajanı genellikle büyük molekül ağırlıklı, protein yapısında bir maddedir.

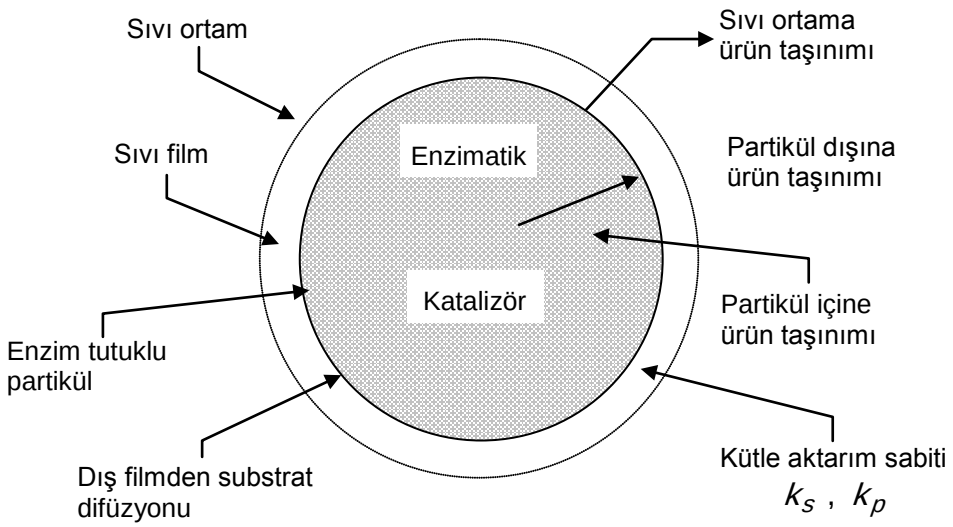
Kovalent Bağlama: Destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile taşıyıcı yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturulur. Destek maddeleri karbodimid, agaroz, glisidimetakrilat, zirkonyum oksit, titanyum oksit, stiren, gibi organik veya inorganik maddelerden oluşabilir. Bu tür tutuklama yönteminin avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Yöntemin dezavantajı ise, tutuklama sırasında enzimin aktif bölgelerinin bağlayıcı ajan tarafından kullanılabilme olasılığı ve ayrıca ortamın kimyasal yapısı dolayısı ile enzimin zehirlenme ihtimalidir.

2.3.6. Tutuklu Enzim Kinetiği

Tutuklu enzimler genellikle serbest enzimlere göre daha az aktif olmakla birlikte daha kararlıdırlar. Tutuklama materyali ile enzim arasındaki etkileşimler tutuklu enzimlerin kinetik davranışlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Tutuklama materyalinin hidrofilik ve hidrofobik yapısı, dielektrik ve yük özellikleri tutuklu enzimin kinetik davranışını etkilemektedir. Optimum pH taşıyıcının yük özelliklerine göre değişebilmesi ve optimum pH aralığı serbest enzimlere göre daha geniş olması bu tür etkileşimlere örnek olarak verilebilir (Chaplin and Bucke, 1990). Enzimin

tutuklandığı materyalde tekrar serbest hale geçmesi, tutuklama materyalinin deformasyonu nedeniyle reaksiyon ortamından uzaklaşması, tutuklama işlemi ile enzimin üç boyutlu yapısının değişmesi, enzimin aktif bölgesinin tutuklama işlemiyle kullanılamaz bir yapı kazanması ve tutuklama materyalinin mikrobiyal bozunmaya uğraması vb. nedenlerden dolayı tutuklu enzimlerde aktivite kaybı gözlenmektedir. Tutuklu enzim sistemlerinde uygun tutuklama materyalinin ve yönteminin seçilmesi ve uygun tutuklama parametrelerinin kullanılması tutuklu enzim aktivitesini olumlu yönde etkilemektedir (Hartmeier, 1988; Leblebici, 1999).

Tutuklu enzim kinetiğinin iyi bilinmesi tutuklu enzimlerle hazırlanacak reaktör tasarımı için çok önemlidir. Enzim tutuklu katalitik partikülün veya membran sisteminin katalitik aktivitesi, enzim tabakasına substrat taşınımına ve tutuklu enzimin katalitik aktivite etkileşimine bağlıdır (Bailey and Ollis, 1986). Kütle aktarımı-katalitik aktivite etkileşimi tutuklu enzimin görünür aktivitesini oluşturmaktadır.



Şekil 2.3. Enzim tutuklu bir partikülde kütle aktarımı ve kimyasal reaksiyon etkileşimleri

Substrat çözeltisi içerisinde bulunan enzim tutuklu partikülün kesiti incelendiğinde, partikül içerisinde susbtrat tüketildiği ve ürün üretildiği için substrat çözeltisinden partikül merkezine doğru substrat ve ürün için bir derişim gradiyenti oluşmaktadır. Partikül yüzeyinde substrat derişimi, merkezinde ise ürün derişimi yüksektir.

Enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için öncelikle substrat çözeltiden film tabakasını aşarak partikül yüzeyine ulaşmalı ve sonra katalitik partikülün içerisine difüzlenmelidir. Karıştırma veya akış yoluyla substrat yığın taşınımı ile partikül yüzeyine taşınmaktadır.

Substrat partikül içerisine difüzlenmiyor ise veya partikülün sadece yüzeyinde enzim bulunması durumunda sadece yüzeysel kütle aktarımı söz konusudur. Genellikle enzim partikül içerisinde tutuklandığı için substrat mutlaka partikül içerisine, enzimin bulunduğu bölgeye taşınmalıdır. Ürün için tam tersi taşınım söz konusu olup partikül merkezinden çözelti ortamına doğru taşınım geçerlidir (Boyacı, 2001).

Partikül içerisine doğru substrat derişiminin azalması ve ürün derişiminin artması nedeniyle partikülün merkezine doğru enzimatik reaksiyon hızı değişmektedir. Toplam substrat hızı partikül içi substrat tüketim hızlarının toplamına eşittir. Yatışkın durumda toplam substrat tüketim hızı toplam kütle aktarım hızına eşit olmaktadır. Dolayısıyla tüm hız etkileşimleri aktarım prosesleri ile katalitik reaksiyon etkileşimlerine bağlıdır (Bailey and Ollis, 1986).

Kütle Aktarım Dirençlerinin Etkisi

Enzimin sadece partikül yüzeyine tutuklanması durumunda sadece sıvı ortamından reaksiyonun gerçekleştiği partikül yüzeyine kütle aktarımı söz konusudur. Nernst difüzyon tabakası veya durgun film tabakasından kütle akısı;

$$N_s = k_s(S_0 - S)$$

birim zamanda birim alandan aktarılan madde miktarı olarak tanımlanmaktadır. Eşitlikte S, S_0 sırasıyla partikül yüzeyindeki ve sıvı ortamdaki substrat derişimini ifade etmektedir. Enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörlerde k_s akış hızının artması ile artmaktadır. Yatışkın durum için durgun filmdeki kütle aktarım hızı partikül yüzeyinde substrat tüketim hızına eşit olduğu için Eşitlik 2.28 yazılabilir.

$$k_s(S_0 - S) = r_s = \frac{V_{max}\,S}{K_m + S} \qquad (2.28)$$

Sistemi tanımlamak için gerekli olan dört parametre yerine Eşitlik 2.29'de görüldüğü gibi iki boyutsuz değişken tanımlanabilir.

$$X = \frac{S}{S_0} \ , \quad Da = \frac{V_{\max}}{k_s S_o} \ , \quad K = \frac{K_m}{S_o} \tag{2.29}$$

Boyutsuz değişkenler kullanılarak substrat kütle denkliği tekrar yazılırsa Eşitlik 2.30 elde edilir.

$$\frac{1\text{-}\,X}{Da} = \frac{X}{K + X} \tag{2.30}$$

Damköhler (Da) sayısı tutuklu enzimin kullanıldığı tepkime hızının, substratın difüzlenme hızı tarafından veya tepkime hızı tarafından kısıtlanmasının sayısal ifadesidir.

Damköhler (Da) sayısının fiziksel tanımı aşağıda verilmiştir.

$$\mathrm{Da} = \frac{\mathrm{V_{max}}}{\mathrm{k_s S_o}} = \frac{\text{maksimum reaksiyon hızı}}{\text{maksimum kütle aktarımhızı}} \tag{2.31}$$

Da sayısının birden küçük olması maksimum kütle aktarım hızının maksimum reaksiyon hızından büyük olduğunu ve substrat tüketiminde reaksiyon hızının sınırlayıcı faktör olduğunu ifade etmektedir. Da sayısının birden büyük olması durumunda ise kütle aktarım hızı sınırlayıcı faktör durumundadır. Da sayısının bire eşit olması durumunda ise difüzyon ve tepkime hızı birlikte kısıtlayıcı etki yapmaktadır.

Kütle aktarım hızının toplam reaksiyon prosesi üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla etkinlik katsayısı (η) Eşitlik 2.32' de olduğu gibi tanımlanmaktadır.

$$\eta = \frac{\text{görünür reaksiyon hızı}}{\text{kütle aktarım direnci olmadığı durumdaki reaksiyon hızı}} \tag{2.32}$$

Etkinlik katsayısının birden küçük olması durumu, kütle aktarım dirençlerinin katalizörün görünür aktivitesini azalttığını ifade etmektedir. Da sayısının sıfıra yaklaşması (düşük reaksiyon hızı, yüksek kütle aktarım hızı) durumunda etkinlik katsayısı bire yaklaşmaktadır.

Pek çok tutuklu enzim reaktörlerde, enzim partikül içerisine tutuklanmaktadır. Bu nedenle partikül içi kütle transferinin ve reaksiyon kinetiğinin incelenmesi gerekmektedir. Öncelikle partikül için derişim profili oluşturulmalıdır. Bu amaçla küresel geçirgen bir partikül için yatışkın durumda kütle denkliği çok ince bir kalınlık için Eşitlik 2.33'deki gibi yazılabilir.

$$\left(\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr} 4\pi r^2 \right)\Big|_{r} \left(\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr} 4\pi r^2 \right)\Big|_{r+dr} = r_s 4\pi r^2 dr \tag{2.33}$$

Eşitlik $4\pi dr$'ye bölünüp ve limiti alınıdığında $(dr \to 0)$ Eşitlik 2.34 elde edilir.

$$\mathcal{D}_{es}\left(\frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2ds}{rdr}\right) = r_s \tag{2.34}$$

Bu ifadenin aşağıda verilen sınır şartlarında çözülmesi durumunda Eşitlik 2.35 türetilebilir.

$$\frac{ds}{dr}\Big|_{r=0} = 0 \text{ ve } s\Big|_{r=R} = S_0$$

$$r_{S_0} = \frac{A_p}{V_P}\left(\mathcal{D}_{es} \frac{ds}{dr}\right)_{r=R} \tag{2.35}$$

Vp, Ap sırasıyla partikül hacmi ve dış yüzey alanını ifade etmektedir.

Etkinlik katsayısı katalitik partikül hakkında çok fazla bilgi verse de ne yazık ki etkinlik katsayısı analitik yöntemlerle saptanamamaktadır. Bu nedenle sayısal çözümleme yapılması gerekmektedir. Sayısal çözümlemeleri kolaylaştırmak amacıyla eşdeğer boyutsuz formüller yazılmaktadır (Boyacı, 2001).

$\bar{S} = S/So$ ve $\bar{r} = r/R$ olarak tanımlanır ve Eşitlik 2.34 tekrar yazılırsa Eşitlik 2.36 elde edilir.

$$\left(\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2d\bar{s}}{\bar{r}d\bar{r}}\right) = \frac{r_s R^2}{\mathcal{D}_{es} s_o} = 9\phi^2 \frac{\bar{s}}{1+\beta\bar{s}} \tag{2.36}$$

Yukarıdaki eşitlikte ϕ ve β boyutsuz parametreler,

$$\phi = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{V_{\max} / K_m}{\mathcal{D}_{es}}} \quad \text{ve} \quad \beta = \frac{S_0}{K_m}$$

olarak tanımlanmıştır.

Eşitlik 2.36 deki ifade $\bar{s}\Big|_{r=1} = 0$ ve $\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\Big|_{r=0} = 0$ sınır şartlarında birleştirilir.

$$\eta = \frac{(d\bar{s} / d\bar{r})_{r=1}}{3\phi^2[1/(1+\beta)]} \tag{2.37}$$

Bu ifadeden etkinlik katsayısının, Thiele modulü (ϕ) ve satürasyon parametresinin fonksiyonu olduğu görülmektedir. Eşitlik 2.37 ve 2.35 kullanılarak aşağıdaki eşitlik elde edilebilir.

$$\phi = \left[\frac{R^2 r_{S_0}}{9\eta\,\mathcal{D}_{es} S_o}(1+\beta)\right]^{1/2} \tag{2.38}$$

Etkinlik katsayısının Thiele modülüne karşı değişimi Şekil 2.4'de görülmektedir.

Şekil incelendiğinde; yüksek Thiele modülü değerlerinde $(\phi > 3)$ substrat difüzyonunun substrat tüketiminden daha yavaş olduğu görülmektedir. Bu tür sistemler difüzyon kontrollü sistemler olup sadece partikülün ince bir tabakasında enzimatik reaksiyon gerçekleşmektedir.

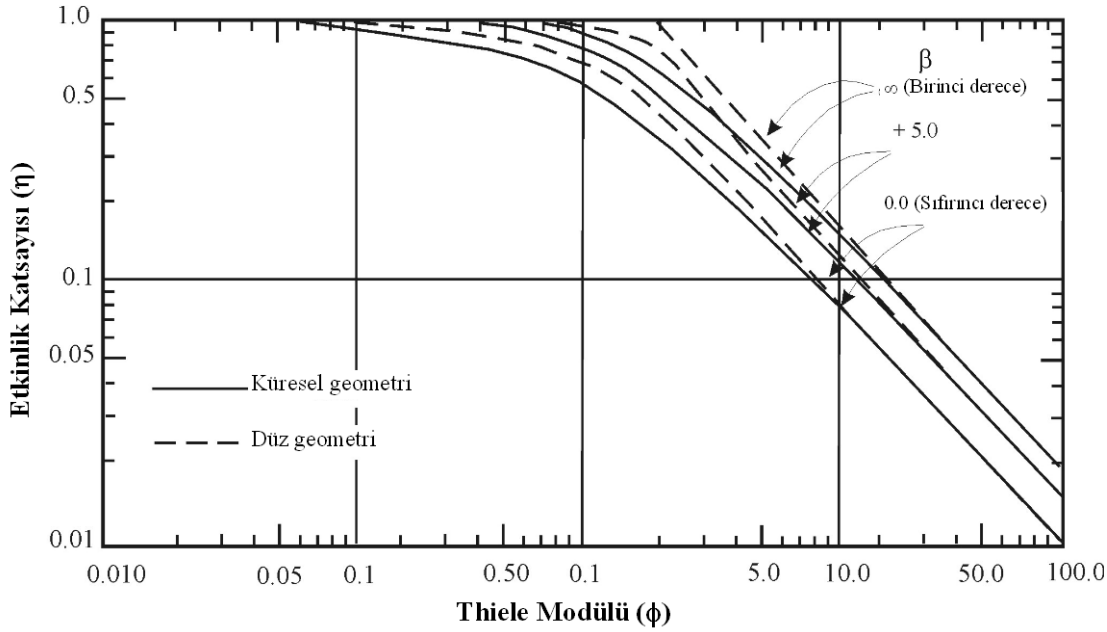
$$\mathcal{D}_{es}\frac{d^2 s}{dr^2} = r_S \tag{2.39}$$

Eşitlik daha açık şekilde yazılırsa;

$$\frac{d^2 s}{dr^2} = \frac{1}{2}\frac{d}{ds}\left[\frac{ds}{dr}\right]^2 \tag{2.40}$$

$$\frac{ds}{dr} = \left[\frac{2}{\mathcal{D}_{es}}\int_0^{S_0} r_S\, ds\right]^{1/2} \tag{2.41}$$

Eşitlik 2.32, 2.35 ve 2.41 kullanılarak yüksek Thiele modülü için etkinlik katsayısı Eşitlik 2.42'de tekrar yazılmıştır.



Şekil 2.4. Etkinlik katsayısı-Thiele modülü etkileşimi (Bailley and Ollis, 1986; Boyacı, 2001)

$$\eta_{\phi>>1} = \frac{3\mathcal{D}_{es}}{R} \frac{\left[\frac{2}{\mathcal{D}_{es}} \int_0^{s_0} r_s \, ds\right]^{1/2}}{r_{s_0}} \tag{2.42}$$

Bu eşitlik Michaelis-Menten kinetiği için tekrar düzenlendiğinde;

$$\eta_{\varphi>>1} = \frac{1}{R} \frac{1+\beta}{\beta} \sqrt{2} \left[\beta - \ln(1+\beta)\right]^{1/2} \tag{2.43}$$

Substrat derişiminin K_m değerinden düşük olması durumunda birinci dereceden reaksiyonun geçerli olduğu daha önceden belirtilmiştir.

$$r_s = k\,s \tag{2.44}$$

Düşük substrat derişimleri için etkinlik katsayısı tekrar yazılırsa Thiele modülünü etkinlik katsayısına bağlayan eşitlik elde edilir (Bailey ana Ollis, 1986; Fogler, 1999).

$$\eta = \frac{3}{\varphi_1^2}(\varphi_1 \coth\varphi_1 - 1) \tag{2.45}$$

Thiele modülü fiziksel olarak tepkime hızı ile difüzyon hızı oranını ifade etmektedir. Yüksek Thiele modülü, eşzamanlı difüzyon ve tepkime olayında tepkime hızının substrat difüzyon hızına göre daha yüksek olduğunu ve olayın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Düşük Thiele modülü, substrat difüzyon hızının tepkime hızına göre daha yüksek olduğunu ve olayın kinetik kontrollü olduğunu göstermektedir.

2.4. Dolgulu Kolon Dinamik Davranışının Uyarı Cevap Tekniği ile İncelenmesi

2.4.1. Alıkonma Süresi Dağılım Fonksiyonu

Akış içeren bir kimyasal prosesin matematiksel modelinin yapısı, elemanlarının akış yollarının durumuna ve sistemdeki alıkonma süresinin dağılımına bağlıdır (Smith, 1970; Levenspiel, 1972; Kafarov, 1976; Mutlu, 1988; Boyacı, 2001). Giren akıma verilen bir test sinyalinin sistemden çıkıştaki durumu izlenerek bu dağılım istatistiksel kurallarla açıklanabilir. Test sinyali, basamak, impals veya sinüs dalgası şeklinde olabilir. Besleme akımına enjekte edilen bir izleyicinin derişiminin sistem çıkışından belli zaman aralıkları ile ölçülmesiyle elde edilen değerler, zamana karşı grafiğe geçirildiğinde C-eğrisi olarak adlandırılan eğri elde edilir (Şekil 2.5). İmpals tipi bir uyarının alıkonma süresini veren bu eğri Eşitlik 2.46'teki gibi ifade edilebilir.

$$C = \int_0^\infty \tau\, C(\tau)\, d\tau \tag{2.46}$$

Eşitlikte $C(\tau)$; alı konma süresi dağılım fonksiyonu olarak adlandırılır ve sisteme verilen izleyicinin çıkış akımında, ortalama alıkonma süresi, $\bar{\tau}$, da daha az süre reaktörde oyalanan izleyicilerin oranını verir.

Ortalama alıkonma süresi;

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^\infty \tau\, C(\tau)\, d\tau}{\int_0^\infty C(\tau)\, d\tau} = \frac{\sum \tau\, C}{\sum C} \tag{2.47}$$

olarak tanımlanmaktadır. Bu eşitlik kullanılarak alıkonma süresi dağılım fonksiyonu aşağıdaki şekilde de yazılabilir.

$$C(\tau) = \frac{1}{\tau}\frac{C}{C_0} = \frac{C}{\sum C \Delta t} \tag{2.48}$$

Burada Δt örnek alma aralığını göstermektedir.

Ortalama alıkonma süresi biliniyorsa, C - eğrisi aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$C = \frac{C}{C_0} = \tau C(\tau) \tag{2.49}$$

Burada;

C_0 : Sistem girişindeki izleyicinin başlangıç derişimidir.

Sürekli bir sistemde, verilen bir değişkenin ortalamaya göre yayılım veya varyansı, sabit ölçüm aralıklarında aşağıdaki gibi verilebilir.

$$S_\tau^2 = \frac{\sum X_i^2 f(X_i)}{\sum f(X_i)} - \left[\frac{\sum X_i f(X_i)}{\sum f(X_i)}\right]^2 \tag{2.50}$$

varyans zaman birimleri ise;

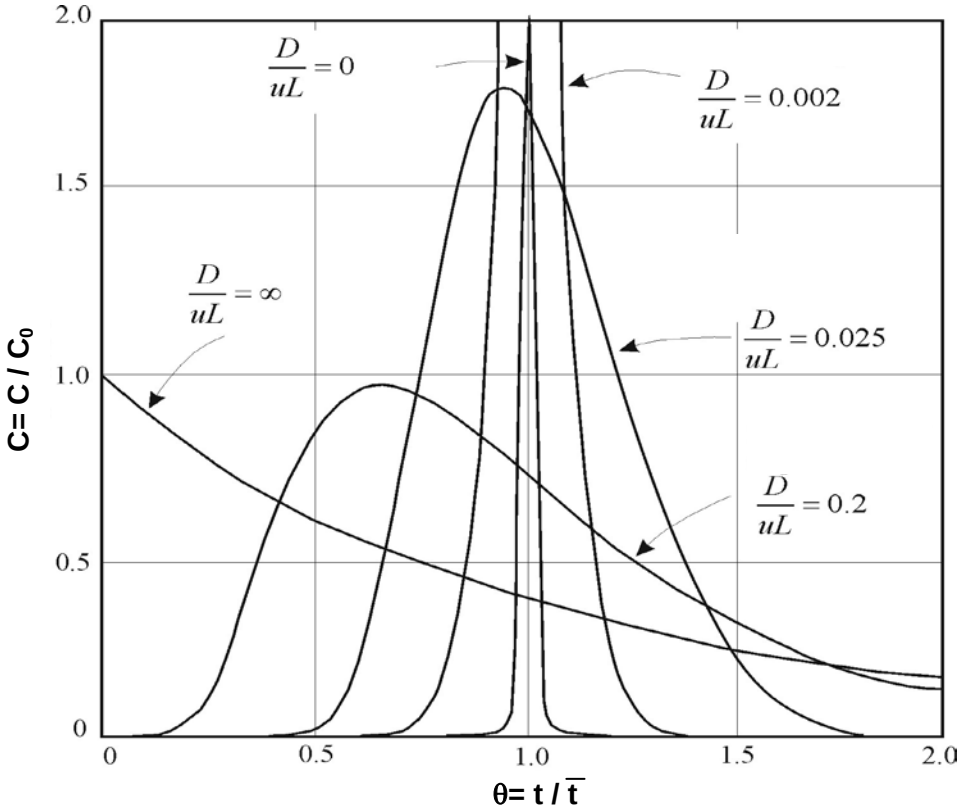
$$\sum f(x_i) = \sum C_i,\ \sum x_i f(x_i) = \sum \tau C_i, \sum x_i^2 f(x_i) = \sum \tau^2 C_i, \tag{2.51}$$

şeklinde yazılır.

Boyutsuz zaman biriminde varyans,

$$S^2 = S_\tau^2 / \tau^2 \tag{2.52}$$

olarak verilir.



Şekil 2.5. Farklı Peclet sayıları için C-eğrileri $(U_L/D = Pe)$ (Boyacı, 2001)

Boyutsuz zaman ise. Eşitlik 2.53'de görülmektedir.

$$\theta = \tau / \bar{\tau} \tag{2.53}$$

C-dağılımının varyansı, boyutsuz zaman ifadesi içinde,

$$S^2 = \frac{\sum \theta^2 C}{\sum C} - 1 = \sum \theta^2 C \Delta\theta - 1 \tag{2.54}$$

şeklindedir.

$C(\tau)d\tau$ fonksiyonu, reaktörde $(\tau + d\tau)$ süre oyalanan bir maddenin reaktör çıkış akımındaki kesrini vermektedir. Eğer, bu fonksiyon maddenin C_A derişimi ile çarpılırsa, reaktörde $(\tau + d\tau)$ süre kalmış olan akışkan elemanlarının ortalama derişimini vermektedir. Bir başka şekilde Eşitlik 2.55'teki gibi yazılabilir.

$$\overline{C}_A = \int C_A C(\tau) d\tau \tag{2.55}$$

Akışkan elemanlarının alıkonma sürelerinin belirlenmesi, istatistiksel moment ve olasılık yoğunluk fonksiyonu kavramlarına bağlıdır. Olasılık yoğunluk fonksiyonlarının sıfırıncı momenti "1" dir. Birinci moment, “bileşkenin ortalaması” olup, dağılımın merkez yerini belirler. İkinci moment, “varyans” dağılımın “yayılma” sının bir ölçüsüdür. Üçüncü moment, dağılımın ortalamaya göre “simetri” veya “çarpılma” sının bir ölçüsüdür. Dördüncü moment, şekildeki “tepe” noktasının keskinliğini karakterize etmektedir.

Momentler sıfır ile sonsuz aralığında, sürekli bir dağılım için aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$Mo = \int_0^\infty C(\tau)\, d\tau$$

$$M_1 = \frac{\int_0^\infty t\, C(\tau)\, d\tau}{\int_0^\infty C(\tau)\, d\tau}$$

$$\vdots$$

$$M_m = \frac{\int_0^\infty t^m\, C(\tau)\, d\tau}{\int_0^\infty C(\tau)\, d\tau} \qquad (2.56)$$

$M_0, M_1, ..., M_m$: Sıfırıncı, birinci ve m’inci dereceden momentlerdir. Deneysel dağılım eğrilerine basamaklı olarak yaklaştığından dağılım eğrisinin kırıklı olduğu varsayımı ile yukarıdaki eşitlik;

$$M_o = \sum_{i=1}^{n} Ci\, \Delta\tau$$

$$M_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i\, \tau_i}{\sum_{i=1}^{n} Ci}$$

$$\vdots$$

$$M_m = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i \, \tau_i^m}{\sum_{i=1}^{n} Ci} \tag{2.57}$$

şeklini alır.

2.4.2. Deneysel Momentlerin İstatistiksel Yöntemler Kullanılarak Hesaplanması

Deneysel C-eğrisinin momentleri "trapezoid" kuralı ile bulunur. Sıfırıncı deneysel moment için;

$$M_0^E = \int_0^a c \, d\tau \approx \sum_{i=1}^{n} C_{av,i} \Delta\tau \tag{2.58}$$

ifadesi geçerlidir. Burada M_0^E deneysel sıfırıncı momenttir. $C_{aV,i} = (C_{i+1} + C_i)/2$ ye eşit olup, C-diyagramının ordinatı sıfır ile "a" arasında uzanır. Böylece herhangi bir moment,

$$M_j^E = \frac{\int_0^a \tau^j C \, d\tau}{\int_0^a C \, d\tau} = \frac{\int_0^a \left(\frac{c}{j+1}\right) d(t^{j+1})}{\int_0^a C \, d\tau} \approx \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{C_{av,i}}{j+1} \Delta(\tau^{j+1})}{\sum_{i=1}^{n} C_{av,i} \Delta\tau} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(\frac{C_{av,i}}{j+1}\right) \left[\tau_{i+1}^{j+1} - \tau_1^{j+1}\right]}{\sum_{i=1}^{n} C_{av,i} \Delta\tau} \tag{2.59}$$

eşitliği ile bulunur (Himmelblau, 1968). Eşitlik 2.59 kullanılarak,

$$M_1^E = \frac{\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} C_{av,i} (\tau_{i+1} + \tau)}{\sum_{i=1}^{n} C_{av,i}} \tag{2.60}$$

$$M_2^E = \frac{\frac{1}{3} \sum_{i=1}^{n} C_{av,i} \left[\tau_{i+1}^2 + \tau_{i+1}\tau_i + \tau_i^2\right]}{\sum_{i=1}^{n} C_{av,i}} \tag{2.61}$$

$$M_3^E = \frac{\frac{1}{4}\sum_{i=1}^{n} C_{av,i}\left[(\tau_{i+1}+\tau_i)+(\tau_{i+1}^2+\tau_i^2\right]}{\sum_{i=1}^{n} C_{av,i}} \tag{2.62}$$

elde edilir. Eşitlik 2.59 ile bulunan sonuçlar $\Delta\tau < 0.02\theta_{av}$ aralığında Eşitlik 2.57 ile bulunan sonuçlarla tam uygunluk sağlamaktadır.

2.4.3. Momentlerin Modellerden Çıkarılma Yöntemi

Moment modellerinin çıkarılması için önce sistemi karakterize eden fiziksel modele ve bu modeli tanımlayan diferansiyel eşitliğe karar verildikten sonra, bu eşitliğin Laplace dönüşümü alınır. Teorik momentlerin bulunmasında, momentlerle Laplace çözümleri arasında belli ilişkiler kurulabilmektedir (Ramachandran, 1978; Mutlu, 1990; Sağ, 1993; Boyacı, 2001). Model momentlerin çıkartılması için önce sistemi karakterize eden fiziksel modele ve bu modeli tanımlayan diferansiyel eşitliğe karar verilmesi sonra bu eşitliğin Laplace dönüşümünün alınması gerekmektedir. Alıkonma süresinin değişimini gösteren bağımlı değişkenin (C_A) Laplace dönüşümü;

$$\overline{C}_A = \int_0^\infty C_A e^{-st} dt \tag{2.63}$$

şeklinde gösterilir. Sıfırıncı Moment (m_0);

$$m_0 = \int_0^\infty C_A dt \tag{2.64}$$

şeklinde ifade edilir. C_A 'nın $\lim(S \to 0)$ iken değerlendirilmesiyle;

$$\lim(S \to 0)\overline{C}_A = \int_0^\infty C_A dt \tag{2.65}$$

dir. Eşitlik 2.65 sıfırıncı moment ifadesi ile aynıdır. Bir başka değişle;

$$m_0 = \lim(S \to 0)\overline{C}_A \tag{2.66}$$

olarak tanımlanabilir. Benzer yaklaşımla birinci moment;

$$\frac{d\overline{C}_A}{d_s} = \frac{d}{ds}\int_0^\infty C_A e^{-st} dt = \int_0^\infty C_A(-t)e^{-st} dt \tag{2.67}$$

$$\lim(S \to 0)\frac{d\overline{C}_A}{ds} = -\int_0^\infty t\, C_A dt \tag{2.68}$$

dir.

$$m_1 = -\int_0^\infty t\, C_A dt \tag{2.69}$$

şeklinde yazılabilir. Momentler ve Laplace çözümleri arasındaki bu ilişki genellenirse;

$$m_n = -1^n \lim(S \to 0)\frac{d^n \overline{C}_A}{ds^n} \tag{2.70}$$

şeklinde ifade edilir. Modeli tanımlayan diferansiyel eşitlik Laplace bölgesinde tanımlandıktan sonra istenen moment derecesine göre ($d^n C_A/ds^n$) ifadeleri oluşturulup $\lim(S \to 0)$ durumunda değerlendirilerek teorik moment ifadeleri elde edilir..

2.4.4. Deneysel Momentlerle Model Momentlerin Birleştirilmesi

Modellerden bulunan momentler, $t = 0$ ve $t = a$ integrasyon aralığında tanımlanarak aşağıdaki eşitlik grubu çıkartılır.

$$M_1^E = M_1^M; \quad M_2^E = M_2^M; \quad M_j^E = M_j^M \quad \Rightarrow \quad M_m^E = M_m^M \tag{2.71}$$

ve çözülürse buradan

$$M_1^E = \frac{\int_0^a \tau^j C\, d\tau}{\int_0^a C\, d\tau} \tag{2.72}$$

olup, modelden bulunur.

Deneysel eğri, modelin doğruluğunun bir ölçüsü olduğundan, eğrideki kesim noktasının seçimi $(t = a)$ ölçüm koşullarında, ölçüm elemanlarının duyarlılığına ve kesinliğine bağlıdır. Eşitlik 2.71'de yer alan eşitlik sayısı, model parametrelerinin sayısına bağlıdır. Modeli tanımlayan eşitliklerin karmaşık yapısından dolayı M_j^M'in analitik olarak çözülemediği durumda, model eşitliğinden türetilerek, model parametrelerinin sayısına göre Eşitlik 2.72 nolu eşitlik seti oluşturulur. Bu setin sol tarafı nümerik sağ tarafı ise alfa nümerik karakterleri içermektedir. Bu eşitlik seti ortak olarak çözülerek sistem parametreleri saptanır (Mutlu, 1988; Sağ, 1993; Boyacı, 2001).

2.4.5. Dolgulu Kolon Reaktörü Karakterize Eden Modelin Seçimi

Küresel katalitik partiküller ile hazırlanan dolgulu kolon reaktöre impals tipi bir uyarı yapıldığında, kolonun dinamik davranışının (C-eğrisinin), başka bir ifadeyle olasılık yoğunluk fonksiyonunun dispersiyon modeline uyduğu saptanmıştır. Dolgulu kolon reaktörde prosesi tanımlayan diferansiyel eşitlik;

$$\varepsilon \frac{\delta C}{\delta t} = -U \frac{\delta C}{\delta X} + D_L \left[\frac{\delta^2 C}{\delta X^2} \right] + \frac{D_R}{r} \left[\frac{\delta}{\delta r} \left[r \frac{\delta C}{\delta r} \right] \right] - \rho_p N_{A'} \qquad (2.73)$$

şeklinde olup, burada;

D_L : Eksenel dağılım katsayısı, cm^2/s

D_R : Radyal dağılım katsayısı, cm^2/s

U : Gerçek hız, cm/s

X : Eksenel yöndeki uzunluk, cm

t : Zaman, s

$N_{A'}$: Yüzeye olan net akı, $mol/(cm^2\ s)$

ε : Boşluk kesri olarak verilmiştir.

Kolonda kullanılan katalitik partikülün tanecik çapının kolon çapına oranının $(1/10)$ 'dan küçük olduğu göz önüne alınarak radyal yöndeki dağılımın ihmal edilmesi ile

tek parametreli dispersiyon modeline karar verilmiştir. Bu durumda diferansiyel eşitlik;

$$D_L \frac{\delta^2 C}{\delta X^2} - U \frac{\delta C}{\delta X} - \rho_p N_{A'} = \varepsilon \frac{\delta C}{\delta t} \tag{2.74}$$

halini alır. Eşitlik tüm verilerin moment tekniği ile değerlendirildiği ifadedir.

2.4.6. Peclet Sayısının Hesaplanması

Dolgulu kolondaki akış dinamiğini karakterize eden en önemli parametre o kolona ait Peclet sayısı (Pe)'dır. Bu bölümde, Peclet sayısının, model momentler ve deneysel momentler ile hesaplama yöntemi verilecektir.

Model Momentlerin Çıkarılışı

Model momentlerin bulunması için aşağıdaki aşamalar izlenmiştir. Dolgulu kolonda bulunan partikülle herhangi bir şekilde etkileşmeyen bir madde için $N_{A'}$;

$$N_{A'} = 0 \tag{2.75}$$

yazılır.

Eşitlik 2.74'ün boyutsuz gruplar halinde yeniden düzenlenmesiyle Eşitlik 2.76 elde edilir.

$$\frac{1}{Pe} \frac{\delta^2 J}{\delta \zeta^2} - \frac{\delta J}{\delta \zeta} - \frac{\varepsilon L}{U} \frac{\delta J}{\delta t} = 0 \tag{2.76}$$

Burada;

J : Boyutsuz derişim

Pe : Peclet sayısıdır.

Eşitlik 2.76'in Laplace dönüşümü alınırsa;

$$J(s) = \left\{ \frac{1}{Pe} D^2 - D - \frac{\varepsilon L}{U} s \right\} = 0 \tag{2.77}$$

elde edilir. Denklemin kökleri alınırsa;

$$m_{1,2} = \frac{1 \pm \sqrt{1 + \frac{4\,\varepsilon\,L\,s}{U\,Pe}}}{2/Pe} \tag{2.78}$$

olarak tanımlanmaktadır. Bu denklemin "s" bölgesindeki genel çözümü;

$$J(s) = A\,e^{m_1 \zeta} + B\,e^{m_2 \zeta} \tag{2.79}$$

şeklindedir. Burada;

A, B : Denkleme ait integral sabiti

m_1, m_2 : Denklemin kökleri

İntegral sabitlerinin bulunması amacıyla Danckwerts sınır şartları kullanılmıştır.

1. sınır şartı : $\zeta = 0 \;\; UM = U\,J(s)_{\zeta=0} - \left[\frac{D}{L}\frac{\delta\,J(s)}{\delta\,\zeta}\right]_{\zeta=0}$ (2.80)

2. sınır şartı : $\zeta = 1 \;\; \frac{\delta\,J(s)}{\delta\,\zeta} = 0$ (2.81)

Burada M sisteme yapılan uyarı miktarıdır. Denklemin kökleri ve sabitleri Eşitlik 2.79'e yerleştirildikten sonra $J(s)$ fonksiyonu son şeklini alır. Sonra fonksiyonun (s) 'e göre birinci türevi ve ikinci türevi alınır.

Tanım dolayısıyla;

Sıfırıncı mutlak moment;

$$\lim(s \to 0) \quad J(s) = M_0^M = M \tag{2.82}$$

Birinci mutlak moment;

$$\lim(s \to 0)\frac{\delta\,J(s)}{\delta\,s} = M_1^M = \frac{\varepsilon\,L}{U} \tag{2.83}$$

Birinci mutlak moment;

$$M_1^E = \frac{m_1^E}{m_0^E} \tag{2.84}$$

şeklinde ifade edilmektedir (Doğu, 1986). Burada m_0^E ve m_1^E sırasıyla sıfırıncı ve birinci deneysel momentlerdir.

İkinci mutlak moment;

$$\lim(s \to 0)\frac{\delta^2 J(s)}{\delta s^2} = M_2^M \tag{2.85}$$

olarak ifade edilir ve deneysel 0.,1. ve 2. momentler ile arasındaki ilişki;

$$M_2^E = \frac{m_2^E}{m_0^E} - \left[\frac{m_1^E}{m_0^E}\right]^2 \tag{2.86}$$

şeklindedir.

İkinci merkezi moment için tanım;

$$M_2^M = \frac{M_2^M}{M_0^M} - \left[\frac{M_1^M}{M_0^M}\right]^2 \tag{2.87}$$

$$M_2^{M*} = \frac{2}{Pe} - \frac{2}{Pe^2}\left[1 - e^{-Pe}\right] \tag{2.88}$$

şeklindedir ve ikinci deneysel merkezi moment;

$$M_2^{E*} = \frac{M_2^E}{\left(M_1^E\right)^2} \tag{2.89}$$

olarak ifade edilmektedir.

Deneysel sonuçlar doğrultusunda hesaplanan ikinci deneysel merkezi moment değeri, ikinci merkezi moment denklemine eşitlenerek Pe sayısı hesaplanabilir.

3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, düşük laktozlu süt üretiminde kullanılmak üzere enzim tutuklu dolgulu kolon hazırlanması hedeflenmiştir. Çalışmada, taşıyıcı matriks yüzeyine β -galaktozidaz tutuklanarak hazırlanan dolgulu kolon reaktörün dinamik davranışı, uyarı cevap tekniği kullanılarak ve moment analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Kinetik davranış ile dinamik tepki arasındaki ilişki Thiele modülü, etkinlik katsayısı, Damköhler sayısı gibi sistemi tanımlayıcı boyutsuz gruplar oluşturularak tanımlanmıştır. Çalışmada, akış dinamiği, kolon geometrisi, enzimin immobilizasyon performansı, enzimin kolondaki kinetik davranışı gibi etkin parametreler kullanılarak oluşturulan bir matematiksel model ile tamamlanarak ve elde edilen optimum parametrelerle çalışan sistemde süt örneği kullanılarak laktoz miktarındaki değişim belirlenmiştir.

1. Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktör Hazırlanması:

Çalışmada, maksimum verimle çalışan enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör hazırlanması amaçlanmıştır. Bu nedenle, laktaz enzimi tutuklu dolgulu kolon reaktörlerin hazırlanması aşamasında etkin parametreler test edilmiş ve maksimum görünür aktivitenin elde edildiği parametreler optimum parametreler olarak saptanmıştır. Optimum parametreler ile hazırlanan dolgulu kolon reaktörde, reaktör kinetiği uyarı-cevap tekniği ile incelenmiştir.

Sunulan çalışma üç temel aşamadan oluşmaktadır.

2. Enzimin Partikül Yüzeyine Adsorpsiyon Mekanizmasının İncelenmesi

Enzim, partikül yüzeyine immobilizasyon yöntemlerinden biri olan adsorpsiyon yöntemiyle tutuklanmıştır. β - galaktozidaz enzimi bazik reçine (Duolite A568) adsorpsiyonunu etkileyen parametreler kesikli düzende çalışan tepkime kaplarında incelenmiştir. Bu bölümde kesikli sistemde adsorpsiyon çalışmaları ile ilgili sonuçların matematiksel olarak değerlendirilmesi ile tek tabakalı adsorpsiyonu açıklayan modellere ait Langmuir ve Freundlich sabitleri verilmiştir. β - galaktozidaz'ın bazik reçineye adsorpsiyon kinetiği incelenmiştir.

3.Serbest ve Tutuklu Enzim Kinetiğinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde, laktaz enzimini zayıf bazik karakterde reçine yüzeyine tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, tutuklama pH'sı ve tutuklama sıcaklığı temelinde incelenmiş ve optimum tutuklama parametreleri belirlenmiştir. Bu parametrelerde, partikül yüzeylerine laktaz enzimi tutuklanmış, serbest ve tutuklu enzimlerin V_{max} ve K_m değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Enzim kinetiğinin birinci dereceden gerçekleştiği subtsrat derişiminde, tutuklu enzimlerin oluşturdukları reaksiyon hızları kullanılarak Thiele modulü ve etkinlik katsayıları belirlenmiştir.

3. Dolgulu Kolon Reaktör Kinetiğinin İncelenmesi

Dolgulu kolon reaktör sisteminde; kolonun L/D oranı ve çözelti akış hızı incelenmiştir. Bu bölümde uyarı-cevap tekniği kullanılarak sisteme impals tipi uyarı verilmiş ve kolon çıkışı cevap eğrileri saptanmıştır. Cevap eğrileri uygulanarak, alıkonma süresi, Peclet sayısı, eksenel dağılım katsayısı, dönüşüm değeri, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir.

3.1 Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktör Hazırlanması

Laktozun enzimatik hidrolizinde kullanılmak üzere maksimum verimle çalışan enzim tutuklu dolgulu kolon hazırlanması amaçlanmıştır. Bu nedenle partiküle, uygun miktarda ve maksimum aktivitede enzim tutuklayarak kolon performansı arttırılmaya çalışılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında enzimin partikül yüzeyine adsorsiyon mekanizması incelenmiştir. Enzim adsorpsiyon mekanizmasının hangi izoterme uyduğu modellenerek adsorpsiyon kinetiği belirlenmiştir.

İkinci aşamasında ise β-galaktozidaz enziminin zayıf bazik karakterde reçine yüzeyine tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, tutuklama pH'sı ve tutuklama sıcaklığı temelinde incelenerek optimum tutuklama parametreleri saptanmıştır. Bu parametrelerde, partiküle β-galaktozidaz enzimi tutuklanmış, serbest ve tutuklu enzimlerin V_{max} ve K_m değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Enzim kinetiğinin birinci dereceden gerçekleştiği substrat

derişiminde, tutuklu enzimlerin oluşturdukları reaksiyon hızları kullanılarak Thiele modulü ve etkinlik katsayıları belirlenmiştir.

Son bölümde ise kolon L/D oranının ve akış hızının kolon peclet sayısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu aşamada uyarı-cevap tekniği uygulanarak kobalt (II) nitrat çözeltisi sisteme impals tipi uyarı olarak beslenmiş ve kolon çıkışı cevap eğrileri saptanmıştır. Cevap eğrileri kullanılarak kolon alıkonma süresi, Peclet sayısı, eksenel dağılım katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise optimum parametrelerle hazırlanan enzim tutuklu dolgulu kolondaki dönüşüm değeri, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri saptanmıştır.

Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada Aspergillus oryzae kaynaklı laktaz (AOG, 100,000 laktaz unit/gram, EC 3.2.1.23) enzimi ENZECO® (Enzyme Development Corporation, ABD) firmasından, taşıyıcı partikül Duolite A568 Rohm and Haas (ABD), laktoz (D-laktoz monohidrat), glukoz ve tampon çözelti olarak kullanılan kimyasallar Merk (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Çözelti hazırlanmasında ve yıkama işlemlerinde saf su kullanılmıştır. Protein tayininde kullanılan Bovine Serum Albümin (BSA) Acros Organics (Belçika) firmasından temin edilmiştir.

Ekipmanlar

Kesikli sistemde yürütülen tutuklama çalışmaları sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatör (SI-300R, Korea) cihazında gerçekleştirilmiştir. Laktozun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan glukoz, OneTouch select (Lifescan,Inc., ABD) glukoz ölçüm kitleriyle belirlenmiştir.

Uygun derişimlere seyreltilen enzim (protein) çözeltisi ile Coomassie Brilliant Blue G boyasının bileşimi ile oluşan komplekslerin 595 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1601 spektrofotometre ile absorbansları belirlenmiştir. Ayrıca kolon çıkışındaki veriler fraksiyon toplayıcı (Foxy 200, ABD) ile alınmıştır.

3.1.1 Enzimin Partikül Yüzeyine Adsorpsiyon Mekanizmasının İncelenmesi

Kesikli sistemde adsorpsiyon çalışmaları: β-galaktozidaz enzimi bazik reçine adsorpsiyonunu etkileyen parametreler kesikli düzende çalışan tepkime kaplarında incelenmiştir. Adsorpsiyon hızı ve kapasitesini etkileyen parametreler arasında sıcaklık ve adsorban miktarı seçilmiştir.

- Kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon çalışmaları sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatör cihazında gerçekleştirilmiştir.
- Enzim çözeltisinin pH'sı enzimin çalışma pH'sı olan 4,5'a ayarlanmıştır. Karıştırma hızı ise 150 rpm' de sabit tutulmuştur.
- Adsorpsiyon çalışmaları 50 mL' lik beherlerle 4 mg/mL derişiminde 5 mL β-galaktozidaz çözeltisi konularak sabit karıştırma hızında ve sıcaklıkta çalışan inkübatörde yürütülmüştür.
- Deneylerde 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg olmak üzere dört farklı bazik reçine (Duolite A568) miktarı kullanılmıştır.
- Sıcaklığın adsorpsiyon hızına olan etkisini gözlemlemek amacıyla dört farklı sıcaklıkta (15, 25, 35, 45 °C) çalışılmıştır.
- Adsorpsiyon prosesi 24 saat süreyle izlenmiş ve 9 ile 12 saat arasındaki verilerde değişim olmaması nedeniyle adsorpsiyon prosesine 9 saat süreyle devam edilmiştir.
- Çözelti ortamında kalan enzim miktarı protein üzerinden takip edilmiştir. Bradford yöntemi (1976), uygulanmış ve derişim değişimi spektrofotometre ile takip edilmiştir.

Protein tayini

β-galaktozidaz enziminin protein oranının çok yüksek olmasından dolayı yüzeye adsorbe olan ve çözeltide kalan enzim miktarı, protein yardımıyla takip edilmiştir. Protein miktarları, standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılan boya bağlama yöntemine (Bradford, 1976) göre belirlenmiştir. Yöntemde kullanılan

Coomassie Brillant Blue G boyasının stok çözeltisinin hazırlanması amacıyla; 35 mg boya 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözülerek üzerine 20 ml fosforik asit (%85'lik) ilave edilmiş ve son olarak bu stok çözelti Whatman No.1 kağıdı ile filtrelenmiştir. Uygun derişimlere seyreltilen enzim (protein) çözeltisi ile Coomassie Brilliant Blue G boyasının bileşimi ile oluşan komplekslerin 595 nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbansları belirlenmiştir. Enzim çözeltilerindeki protein oranları Bovine Serum Albumin (BSA) saf protein ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin (Ek-1) eğim değerlerinden yararlanılarak adsorpsiyon çözeltisinde kalan enzim miktarı belirlenmiştir.

3.1.2.Serbest ve Tutuklu Enzim Kinetiğinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde β-galaktozidaz enziminin çalışma koşulları ve tutuklama parametreleri belirlenmiştir. β-galaktozidaz enziminin zayıf bazik karakterde reçine (Duolite A568) yüzeyine tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, tutuklama pH'sı ve tutuklama sıcaklığı temelinde incelenmiş, maksimum aktivitenin elde edildiği parametreler, optimum tutuklama parametreleri olarak belirlenmiştir. Bu parametrelerde, partikül yüzeylerine β-galaktozidaz enzimi tutuklanarak, serbest ve tutuklu enzimlerin V_{max} ve K_m değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Enzim kinetiğinin birinci dereceden gerçekleştiği subtsrat derişiminde, tutuklu enzimlerin oluşturdukları reaksiyon hızları kullanılarak Thiele modulü ve etkinlik katsayıları belirlenmiştir.

3.1.2.1 β-galaktosidaz Enziminin Tutuklama Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzim tutuklu dolgulu kolon hazırlanması çalışmalarında ilk olarak reçineye enzim tutuklama parametreleri test edilmiştir. β-galaktozidaz enziminin zayıf bazik karakterde reçine yüzeyine tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, tutuklama pH'sı ve tutuklama sıcaklığı temelinde incelenmiş ve maksimum aktivitenin elde edildiği optimum tutuklama parametreleri belirlenmiştir.

Enzim tutuklama işlemlerinde ve tutuklama koşullarının optimize edilmesi aşamalarında daha hızlı sonuç alınması için enzim aktiviteleri glukoz ölçüm kitleriyle belirlenmiştir. Kullanılan cihaz 0 - 600 mg/dL glukoz derişim aralığında hızlı bir şekilde ölçme imkanı sağlamaktadır. Aktivite ölçümlerinde enzimatik

reaksiyonlar 1 dakika süreyle gerçekleştirilmiş ve daha sonra bu karışımdan $3\,\mu L$ örnek analiz edilmiştir. Deneysel çalışmalar iki paralel şeklinde yürütülmüştür.

- Çalışmada süresince $0.1g$ zayıf bazik karakterde iyon değiştirici reçine kullanılmıştır. Tartılan partikül üç defa saf su ve bir defa fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi $15\,mL$ yıkama çözeltisi ile reçine 1 dk karıştırılmış ve sonra partiküller ayrılmıştır. Son yıkamada kullanılan fosfat tamponunun pH'sı tutuklama pH'sında seçilmiştir. İncelenen tutuklama parametreleri çizelge 3.1' de görülmektedir.

- Tutuklama süresinin tutuklanan enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla tutuklama süresi incelenmiştir. Tutuklama işlemi $4.0\,mg/mL$ başlangıç enzim derişimine sahip pH $4,5$ fosfat tamponu içerisinde $35^{o}C$ 'de karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir. Tutuklama süresi sonunda yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve aktivitelerine bakılmıştır. Aynı işlemler artan tutuklama sürelerinde tekrarlanmıştır.

- Tutuklama pH'sının tutuklanan enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı pH' larda tutuklama işlemi $4.0\,mg/mL$ başlangıç enzim derişiminde, $35^{o}C$ de $60\,dk$ sürekli karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir. Tutuklama süresi sonunda partiküller yıkanarak serbest enzimler uzaklaştırılmış ve aktivitelerine bakılmıştır. Aynı işlemler çizelgedeki pH'lar için tekrarlanmıştır.

- Tutuklama sırasındaki ortam sıcaklığının tutuklanan enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla tutuklama işlemi $4.0\,mg/mL$ başlangıç enzim derişimine sahip pH $4,5$ fosfat tamponu içerisinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. 60 dakikalık tutuklama süresince ortam sürekli olarak karıştırılmıştır. Tutuklama süresi sonunda yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve aktivitelerine bakılmıştır Aynı işlemler Çizelge 3.1' de belirtilen sıcaklıklar için tekrarlanmıştır.

- Tutuklama ortamındaki başlangıç enzim derişiminin tutuklu enzim aktivitesine etkisini incelemek amacıyla β-galaktozidaz enziminin farklı

derişimlerindeki çözeltileri 10 mL pH 4,5 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış ve 0.1 g reçine ile karıştırılmıştır. Tutuklama ortamı 35 °C'de tutuklama süresince (60 dk) sabit tutulmuştur. Tutuklama süresince partikül yüzeyinde oluşabilecek film direncini kırmak amacıyla ortam sürekli olarak karıştırılmıştır. Bu süre sonunda reçine çözeltiden uzaklaştırılmış ve partikül yüzeyinde tutuklanmadan kalan veya yüzeye zayıf tutunmuş enzimi uzaklaştırmak amacıyla üç defa saf su kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler tüm enzim çözeltileri için tekrarlanmıştır.

- Enzim tutuklu reçinelerin ürün oluşturma hızları karşılaştırılarak maksimum ürün oluşturma hızına sahip enzimin tutuklanmasında kullanılan parametreler optimum tutuklama parametreleri olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.1. β-galaktosidaz enziminin optimum tutuklama parametrelerinin saptanması amacıyla denenen parametreler

Parametreler	**İncelenen Değerler**
Başlangıç enzim derişimi (mg/mL)	0.5, 1, 2, 4, 5, 10
Tutuklama süresi (dk)	10, 20, 30, 60, 120, 180, 210
Tutuklama pH'sı	3, 4.5, 5.5, 6.5, 8.0
Tutuklama Sıcaklığı (°C)	15, 25, 35, 45, 55

3.1.2.2 Serbest β-Galaktozidaz Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Enzim kinetiğinin tanımlanmasında kullanılan Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan K_m ve V_{max} değerleri enzim aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. Özellikle enzimlerin tutuklanması işlemlerine enzim aktivitesi çeşitli nedenlerden dolayı azalmaktadır. Tutuklama işleminden sonra enzim aktivitesinde meydana gelen aktivite kayıplarını belirlemek amacıyla serbest enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu bölümde serbest β-galaktozidaz enziminin çalışma koşulları belirlenmiş ve bu koşullarda çalışılarak serbest enzimin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Aktivite ölçümlerinde enzimatik reaksiyonlar 1 dakika

süreyle gerçekleştirilmiş ve daha sonra bu karışımdan $3\,\mu L$ örnek analiz edilmiştir. Enzim aktivitesi glukoz ölçüm kitleriyle belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen aşamalar aşağıda verilmiştir.

- Serbest formdaki β-galaktozidaz enziminin çalışma pH'sının belirlenebilmesi amacıyla $3, 4.5, 5.5, 6.5$ ve 8 pH değerlerine sahip fosfat tamponları hazırlanmış ve bu tampon çözeltiler yardımıyla $125\,mM$ (%4,5 laktoz) laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. $25\,°C$ oda sıcaklığında $1\,ml$ laktoz çözeltisi ile $200\,\mu L$ $4\,mg/ml$ enzimin reaksiyonu ile enzimin aktivesi ölçülmüştür.

- β-galaktozidaz enziminin çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla, $15, 25, 35, 45$ ve $55\,°C$'de gerçekleştirilmiştir. $15\,°C$' de pH 4.5 $200\,\mu L$ $4\,mg/ml$ enzim ile $1\,ml$ $125\,mM$ pH $5,5$ laktoz çözeltisinin reaksiyonu sonucu veriler alınmıştır. Bu işlem her sıcaklık için tekrarlanmıştır.

- Optimum çalışma koşullarında, β-galaktozidaz enziminin kinetik katsayılarının (V_{max} ve K_m) belirlenebilmesi için pH, 5.5'de 25, 50, 100, 200, 300, 400, $500\,mM$ derişimlerinde laktoz çözeltileri hazırlanmış ve $55\,°C$'de $200\,\mu L$ 4 mg/ml enzim ile $1\,ml$ laktoz çözeltisinin reaksiyonu sonucu enzim aktivitesi belirlenmiştir.

- Farklı substrat derişimlerinde, elde edilen ilk hızların grafiğe geçirilmesi ile Michealis-Menten grafiği elde edilmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda Hanes-Woolf grafiği kullanılarak serbest β-galaktozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri saptanmıştır

3.1.2.3 Tutuklu β-Galaktozidaz Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Bu aşamada optimum tutuklama parametreleri ile zayıf bazik karakterde iyon değiştirici reçineye enzim tutuklanmış ve tutuklu enzimin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca farklı büyüklüklerdeki reçineye optimum tutuklama parametreleri ile tutuklanan enzimin aktiviteleri ölçülerek Thiele modülü ve etkinlik katsayıları hesaplanmıştır. Çalışmanın aşamaları aşağıda verilmiştir.

- Çalışmanın ilk aşamasında 200-700 μm çapına sahip bir karışım halinde temin edilen reçine beş farklı elek (250, 355, 425 ve 500 μm) kullanılarak dört ayrı fraksiyona ayrılmıştır. Her bir fraksiyon ortalaması o fraksiyonun partikül büyüklüğü olarak alınmıştır. Bunlar; 390, 437.5 ve 475 μm olarak belirlenmiştir.

- $0.1\,\mathrm{g}$ reçine tartılmış ve daha önce verildiği gibi yıkanarak tutuklamaya hazır hale getirilmiştir.

- Tutuklama işlemi daha önce belirlenen optimum tutuklama parametrelerinde; $5\,\mathrm{mg/mL}$ başlangıç enzim derişimi, $\mathrm{pH}\,4.5$ tutuklama pH'sı, $35\,^{\circ}C$ tutuklama sıcaklığı ve 60 dk tutuklama süresince sürekli karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir. Tutuklama sonrasında partikül ortamdan uzaklaştırılmış ve partikül yüzeyine zayıf bağlanan enzimi uzaklaştırmak amacıyla iki defa $10\,\mathrm{mL}$ saf su ve $\mathrm{pH}\,6.5$ fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

- Tutuklu enzimin K_m ve V_{max} değerlerini saptamak amacıyla $\mathrm{pH}\,6.5$'da $25, 50, 100, 200, 300, 400, 500\,\mathrm{mM}$ derişimlerinde laktoz çözeltileri ve optimum parametrelerle tutuklanan partiküller ile reaksiyonu sonucu aktivite ölçülmüştür. Tutuklu enzim aktiviteleri glukoz ölçüm kitleriyle belirlenmiştir.

- Substrat derişimine karşılık enzimatik reaksiyon hızı eğrileri elde edilmiş, Hanes-Woolf grafikleri çizilerek reçinelere tutuklu β - galaktozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

- Düşük substrat derişimlerinde (birinci dereceden reaksiyonun geçerli olduğu substrat derişimlerinde) ölçülen reaksiyon hızları kullanılarak farklı büyüklüklerdeki enzim tutuklu partiküller için Thiele modülü ve etkinlik katsayıları hesaplanmıştır.

3.1.3. Dolgulu Kolon Reaktör Kinetiğinin İncelenmesi

Bu bölümünde kolon L/D oranının ve akış hızının kolon Peclet sayısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Boş kolon hacimleri sabit $(5\,\mathrm{mL})$ tutularak eşit miktarda

partikülün kolon içerisine yerleştirilmesi sağlanmıştır. İyon değiştirici reçine ile doldurulan dört farklı L/D oranına sahip kolonlar farklı akış hızlarında test edilmiştir. Her bir parametre için kobalt (II) nitrat çözeltisi sisteme impals tipi uyarı olarak beslenmiş ve kolon çıkışı cevap eğrileri belirlenmiştir. Cevap eğrileri kullanılarak alıkonma süreleri, Peclet sayısı ve eksenel dağılım katsayısı değerleri hesaplanmıştır. β-galaktozidaz tutuklu reçineler dolgulu kolon reaktörlere yerleştirilerek hazırlanan sistemlerde laktoz çözeltisi sisteme impals tipi uyarı şeklinde beslenmiş ve elde edilen cevap eğrisinden dönüşüm değeri, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir. İzlenen aşamalar aşağıda görülmektedir.

3.1.3.1. Dolgulu Kolon Reaktörlerde Peclet Sayısı ve Eksenel Dağılım Katsayısının Belirlenmesi

- Çalışmada taşıyıcı partikül olarak iyon değiştirici reçine kullanılmıştır. Bu amaçla L/D oranı $1, 2, 5$ ve 10 ve iç hacmi $5\,\text{mL}$ olan teflon kolonla çalışılmıştır. Kolon içerisine $1.6\,\text{g}$ partikül yerleştirilmiş ve bağlantı elemanları ve peristaltik pompa yardımıyla deney düzeneği hazırlanmıştır. Kolon girişine İmpals tipi uyarı için enjeksiyon noktası belirlendi. Deney düzeneğinin şematik gösterimi Şekil 3.1'te görülmektedir.

- Sisteme uyarı verilmeden önce kolon içerisindeki havanın boşaltılması ve yıkanması amacıyla bir süre saf su geçirilmiştir.

- Kolon içerisinde yer alan partikül ile kobalt (II) nitrat çözeltisinin etkileşip etkileşmediği test edilmiş ve çalışma sonucunda etkileşme olmadığı, kobalt (II) nitrat çözeltisinin inert olduğu görülmüştür.

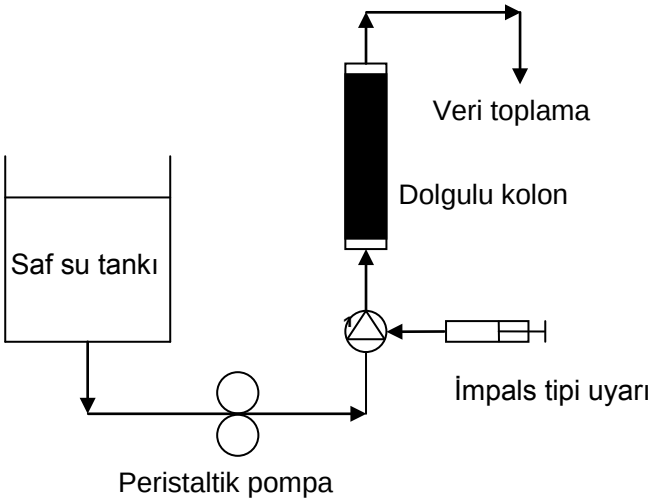
- Akış hızı istenilen değere set edilmiş ve uyarı için kobalt (II) nitratın stok çözeltisinden $(4\,\text{mol/L})$ $0{,}1\,\text{mL}$ enjekte edilmiş, kolon çıkışından yaklaşık $0.8\,\text{mL}$'lik hacimler şeklinde toplam hacim $25\,\text{ml}$ olana kadar veri toplanmıştır.

- Örnekler toplandıktan sonra sistemde saf su geçirilerek temizlenmiş ve bir sonraki örneklemeye hazır hale getirilmiştir.

- Kolon çıkışında toplanan örneğin $510\,nm$'de absorbans değeri okunarak kobalt (II) nitrat derişimi saptanmıştır.

- Bu veriler doğrultusunda kolon çıkışı derişimi zamana karşı grafiğe geçirilerek kolon cevap eğrisi elde edilmiştir. Bu aşamalar $1-10\,mL/dk$ akış hızı aralığında farklı akış hızlarında tekrar cevap eğrileri elde edilmiştir.

- Elde edilen cevap eğrileri kullanılarak sıfırıncı, birinci, ve ikinci mutlak ve ikinci merkezi moment değerleri bulunmuştur. Moment değerleri kullanılarak peclet sayısı ve eksenel dağılım katsayısı hesaplanmıştır



Şekil 3.1. Deney düzeneğinin şematik gösterimi

3.1.3.2. Dönüşüm, Damköhler Sayısı ve Reaksiyon Hız Sabiti Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında dolgulu kolon reaktörlerde dönüşüm üzerine kolon L/D oranının ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri her bir parametre için hesaplanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen aşamalar aşağıda verilmiştir.

- Bu aşamada β-galaktozidaz enziminin katalizlediği laktoz, hidroliz ürünü glukoz üzerinden takip edilmiştir. Bu amaçla β-galaktozidaz enzimi $390, 437.5, 475\ \mu m$ partikül büyüklüklerine sahip reçine üzerine bölüm 3.1.2.1.'de belirlenen parametrelerde yine aynı bölümde anlatıldığı gibi

tutuklanarak kullanıma hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında L/D oranları 1, 2, 5 ve 10 olan teflondan yapılmış ve iç hacmi 5 mL olan kolonlar kullanılmıştır.

- Sistem Şekil 3.1'e benzer şekilde kurulmuş ancak saf su yerine laktoz çözeltisi (40 mmol/L) bir rezervuardan peristaltik pompa yardımıyla sisteme sürekli olarak beslenmiştir.

- İlk aşamada sisteme beslenen laktoz çözeltisinin akış hızı ayarlanmış ve sistemin dengeye gelmesi için boş kolon hacminin dört katı laktoz çözeltisi sistemden geçirilmiştir.

- Kolon çıkışından 0.5 mL örnek alınarak enzimatik hidroliz sonucu oluşan glukoz, glukoz ölçüm kitleriyle belirlenmiştir. Ölçüm işlemi iki defa tekrarlanarak deneysel hatalar azaltılmıştır

- Yukarıda anlatılan aşamalar aynı kolon ve aynı partikül büyüklüğünde, farklı akış hızları için ve sonrasında farklı kolon ve partikül büyüklükleri için tekrarlanmıştır.

- Hesaplanan dönüşüm değerleri ve daha önceki aşamada belirlenen Peclet sayıları kullanılarak her bir parametre için Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri hesaplanmıştır. Bu aşamada düşük substrat derişiminde çalışıldığı için Michaelis-Menten eşitliğinin birinci dereceden reaksiyon eşitliğine yaklaştığı kabul edilmiş ve birinci dereceden reaksiyonlar için geliştirilen Danckwerts eşitliği kullanılmıştır.

- Optimum parametrelerle oluşturulan enzim tutuklu dolgulu kolonda laktozun dönüşümüne bakılmıştır. Tek geçişle gerçekleştirilen çalışmada yağsız UHT süt sisteme beslenmiş ve 1 saniye aralıklarla 10 örnek alınarak analiz edi

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktör Hazırlanması

Dolgulu kolon reaktör hazırlanması aşamasında reaktör performansını etkileyecek parametreler incelenmiş ve reaktörün verimini artırmak için optimum parametreler belirlenmiştir. Bu çerçevede gerçekleştirilen çalışmalar; β-galaktozidaz'ın reçineye adsorpsiyon mekanizmasının incelenmesi, β-galaktozidaz enziminin optimum tutuklama parametrelerinin saptanması, serbest ve tutuklu enzimin kinetik parametreleri (K_m, V_{max}), Thiele modülü ve etkinlik katsayısı değerlerinin belirlenmesi ve dolgulu kolon kinetiğinin incelenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

4.1.1. Enzimin Partikül Yüzeyine Adsorpsiyon Mekanizmasının İncelenmesi

Bu bölümde kesikli sistemde adsorpsiyon çalışmaları ile ilgili sonuçlar verilmiş ve bu sonuçlar matematiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, enzimin reçineye adsorpsiyonu Langmuir ve Freundlich izotermleri kullanılarak modellenmiştir. Tek tabakalı adsorpsiyonu açıklayan modellere ait Langmuir ve Freundlich sabitleri belirlenmiştir.

B-galaktozidaz'ın bazik reçineye (Duolite A568) adsorpsiyon kinetiği incelenmiş ve enzimin reçineye adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması için pseudo-birinci derece ve pseudo-ikinci derece kinetik modelleri göz önünde bulundurulmuştur.

Adsorpsiyon çalışmalarında Freundlich ve Langmuir izotermlerine, kinetik modellere ve diğer matematiksel modellere olan uygunluk analizleri en düşük kareler regresyonu metodu (lineer) uygulanmıştır. Sonuçlar ise korelasyon katsayısı (R^2) olarak gösterilmiştir (Berthouex ve Brown, 2002).

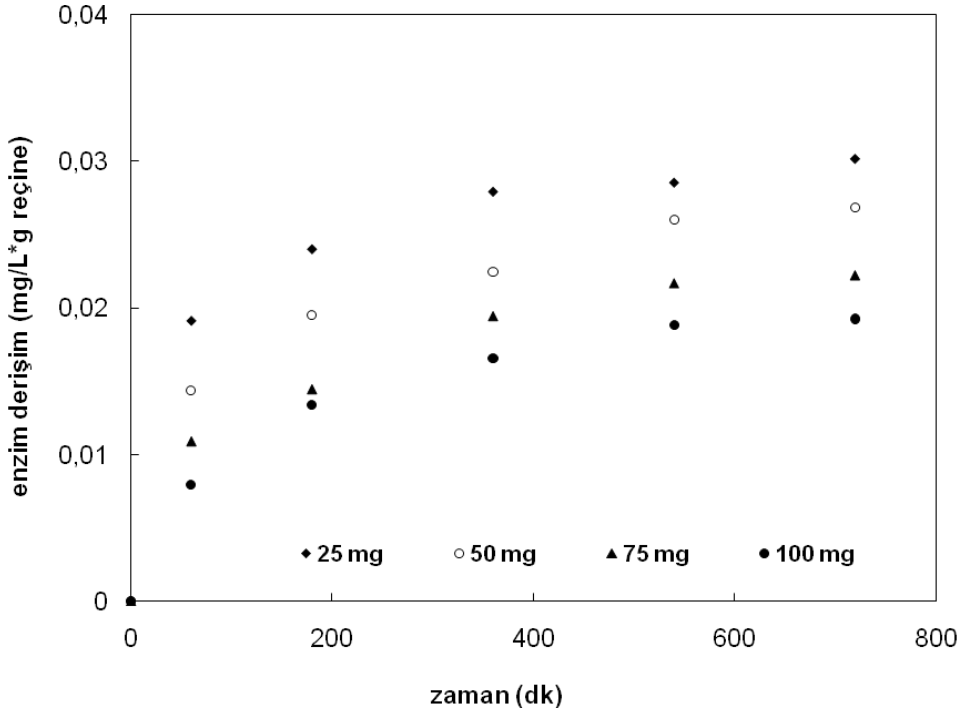
4.1.2.2. Kesikli Sistemde Enzimin Reçineye Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon, genellikle hızla dengeye ulaşma özelliği gösteren bir işlemdir. Bu nedenle sistem dengeye ulaştıktan sonra sıvı fazda kalan adsorplanan madde miktarı sabittir. Bu temel prensipten hareketle gerçekleştirilen kesikli sistem adsorpsiyon çalışmaları ile tek tabakalı adsorpsiyon modeline uygun veriler elde edilmiştir.

Kesikli sistem çalışmalarında ilk olarak denge adsorpsiyon eğrileri oluşturulmuştur. Daha sonra farklı sıcaklıklar için tek tabakalı adsorpsiyonu ifade eden Langmuir ve Freundlich izotermleri oluşturulup Langmuir ve Freundlich sabitleri bulunarak reçinenin adsorplama kapasitesi belirlenmiştir

4.1.2.3. Denge Adsorpsiyon Eğrileri

β-galaktozidaz farklı miktardaki reçine üzerine adsorpsiyonuna ait denge eğrileri, enzim derişimlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Sıcaklığın adsorpsiyona olan etkisini gözlemlemek amacıyla denge adsorpsiyon eğrileri 15, 25, 35 ve 45 °C' de olmak üzere dört farklı sıcaklık için oluşturulmuş ve 35 °C için Şekil 4.1 gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı miktarlardaki reçine üzerine enzimin adsorplanma kinetiği (35 °C)

Şekil 4.1.'den de görüldüğü gibi reçine miktarı fazla olan örneklerde enzimin çözeltiden uzaklaştırılması daha hızlı olmaktadır. Tüm reçine miktarlarında adsorpsiyon işlemi ilk 60 dakika, hızlı gerçekleşmekte ve 9 saat sonra dengeye gelmekte ve sıvı fazdaki enzim derişimi plato değerine ulaşmaktadır. Bu davranış tüm sıcaklık değerlerinde de benzer davranış göstermektedir.

Bu grafikten denge enzim derişimlerini (C_e) plato değerlerinden okunabilir. Dengede reçine üzerine adsorplanan enzim miktarlarını (q_e) bulmak için başlangıç enzim derişiminden, denge durumunda çözeltide kalan enzim derişimleri çıkartılarak çözelti hacmiyle çarpılmış ve kullanılan reçine miktarına bölünerek gram reçine üzerinde adsorplanan mg-enzimin miktarları zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

$$q_e = V(C_0 - C_e)/W \tag{4.1}$$

Burada;

q_e : dengede birim adsorban üzerine adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

C_0 : Çözeltinin başlangıç enzim derişimi (mg/L)

C_e : Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan enzim derişimi (mg/L)

V : Çözeltinin hacmi (L)

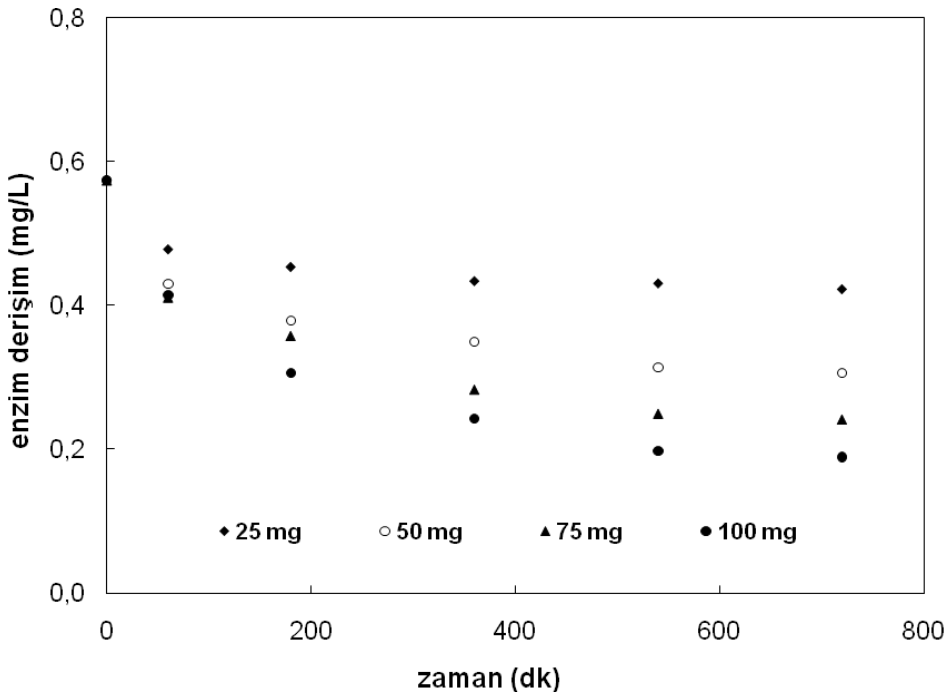
W : adsorban miktarı (g)

Bu grafikten (q_e) değerleri mg enzim/g reçine olarak okunabilmektedir. Şekil 4.2'den de görüldüğü üzere reçine miktarının arttırılmasıyla sistemin daha hızlı ve etkin bir şekilde dengeye geldiği, çözeltide kalan enzim miktarının da dengede daha az miktarda kaldığı söylenebilir.

Reçine miktarının arttırılmasıyla dengede çözeltide kalan enzim miktarının azalması ve dengede reçine üzerine adsorplanan enzim miktarının arttığı düşünülebilir. Şekil 4.2' den reçine miktarının arttırılmasıyla sistemin dengeye gelme eğilimi yüksek; ancak düşük reçine miktarlarında ise adsorplanan enzim miktarının arttığı görülmektedir.

Grafikte, adsorplanan enzim miktarının birim reçine üzerine adsorplanan miktar olarak verilmiştir. Burada reçine miktarı artarken adsorplanan toplam enzim miktarı artmakta, ancak birim reçine üzerinde adsorplanan enzim miktarı azalmaktadır. Bunun nedeni olarak ise reçine miktarının arttırılmasıyla ortamdaki enzimin, artmış olan reçine yüzeyine daha kolaylıkla ulaşabildiği ve adsorplandığı açıktır. Reçine miktarı arttırıldıkça, reçinenin adsorplama kapasitesinin bir kısmı

kullanılamamaktadır.



Şekil 4.2. Birim reçine üzerine enzimin adsorplanma kinetiği (35°C)

4.1.2.4. Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon izotermleri, adsorbant üzerinde adsorplanan madde miktarı ile sıvı içerisinde çözünmüş halde bulunan madde miktarı arasındaki ilişkinin açıklanmasında kullanılırlar. Adsorpsiyon izotermlerinin deneysel sonuçlarının açıklanması için iki veya üç parametreli modeller geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları Langmuir ve Freundlich modelleridir. Langmuir modeli tamamen homojen bir adsorpsiyon yüzeyi üzerinde elde edilmişken, Freundlich modeli heterojen ortamlar için geçerlidir.

Adsorpsiyonun denge hali için geçerli olan ve dengede çözeltide kalan adsorplanan madde ile adsorban üzerine adsorplanan madde arasındaki ilişkiyi ifade eden Freundlich ve Langmuir izotermlerinin oluşturulması ve bu izotermlere ait adsorpsiyon katsayılarının bulunmasıyla adsorpsiyon olayının daha da açıklık kazanması amaçlanmaktadır.

Freundlich izotermi heterojen yüzeylerde adsorpsiyonu ifade eden aşağıdaki ifade ile verilmektedir. Freundlich izotermini ifade eden eşitlik ve bu eşitliğin

doğrusallaştırılmış şekli aşağıda gösterilmiştir.

$$q_e = K_f (C_e)^{1/n} \tag{4.2}$$

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \tag{4.3}$$

Burada;

q_e : dengede birim adsorban ağırlığı başına adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

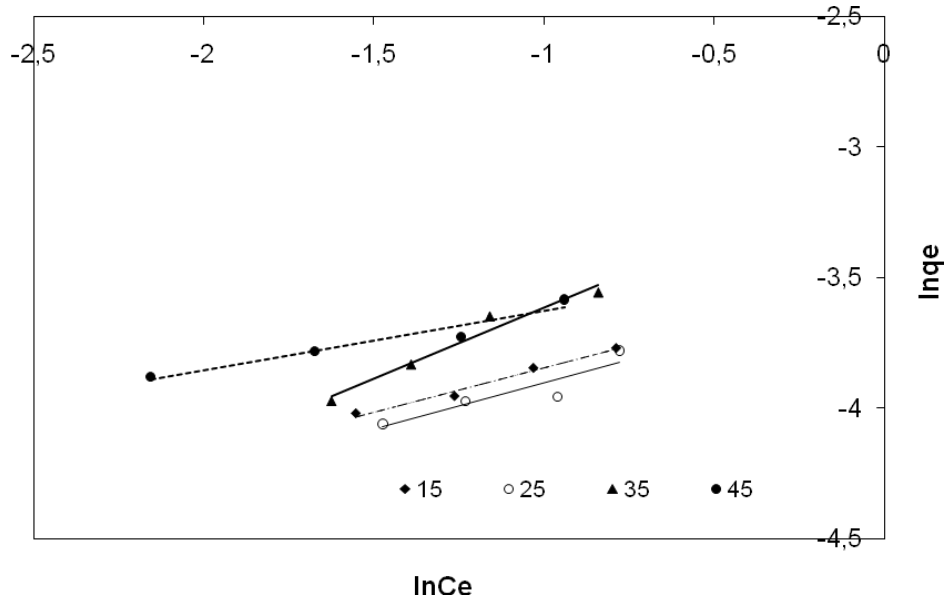
C_e : dengede adsorplanmadan kalan enzim derişimi (mg/L)

K_f : Deneysel olarak hesaplanır. Adsorpsiyon kapasitesi (L/g)

n : Adsorpsiyon derecesi (birimsiz)

Burada K_f ve n sırasıyla adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon derecesini ifade eden Freundlich sabitleridir. $\ln q_e$ 'ye karşı çizilen $\ln C_e$ grafiğinden elde edilen doğru denkleminde K_f ve n değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.1' de verilmiştir.

Dengede çözeltide kalan enzim derişiminin logaritmik değerine karşı birim reçine üzerine adsorplanan enzimin logaritmik değerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen Freundlich izotermleri farklı sıcaklıklar için şekil 4.3' te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı sıcaklıklardaki Freundlich izotermleri

Deneysel verilerin Freundlich izotermine uygunluğu adsorbant yüzeyinin heterojenitesini ifade etmektedir. 1/n değeri adsorbant/adsorbat sisteminin uygunluğu ve kapasitesi hakkında bilgi verir, heterojenlik faktörünü ifade eder. Bu değer sıfıra yaklaştıkça yüzeyin heterojenlik seviyesi artmaktadır ve bu doğal adsorbanların düşük enerjili heterojenliği ile açıklanır. Bu değer aynı zamanda adsorpsiyon yoğunluğudur ve değerin 1 ile 10 arasında oluşu iyi bir adsorpsiyona işarettir. n değeri 1'den az ise, adsorpsiyon kimyasaldır. Tam tersi durumda fizikseldir denebilir (Wu 2007).

Çalışmamızda Freundlich izoterminden elde ettiğimiz n değerleri Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere 1.84 ile 4.44 arasında olup, tüm sıcaklıklarda n değerlerinin 1 ve 10 değerleri arasında olması, enzimin reçineye adsorpsiyonunun istemli ve fiziksel bir süreç olduğunu ve adsorpsiyonunun verimliliğini ifade etmektedir.

Yine önceki bölümlerde bahsedildiği gibi K_f sabitinin büyük değerleri, iyi bir adsorpsiyon için tercih sebebidir. Çizelgeden görüldüğü üzere enzime ait K_f (L/mg) değerleri 2.9 ile 4.6 arasında bulunmuştur. Çalışma sonucu en büyük K_f değeri 308 K (35 °C) sıcaklıkta belirlenmiştir. Bu durum enzimin reçineye adsorplanma kapasitesinin bu sıcaklıkta en iyi olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklardaki Freundlich ve Langmuir sabitleri

T (°C)	**Freundlich sabitleri**			**Langmuir sabitleri**			
	K_f (x10^{-2}) (L/g)	n	R^2	Q_0 x10^2) (mg/g)	b (L/mg)	R_L	R^2
15	3.00	2.96	0.98	3.13	5.99	0.23	0.99
25	2.87	2.84	0.84	3.12	5.07	0.26	0.91
35	4.64	1.84	0.96	5.12	3.02	0.37	0.96
45	3.33	4.44	0.94	3.20	13.69	0.12	0.98

Langmuir izotermini ifade eden eşitlik ve bu eşitliğin doğrusallaştırılmış şekli aşağıda gösterilmiştir.

$$q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e} \tag{4.4}$$

Langmuir eşitliğini lineer formda yazacak olursak;

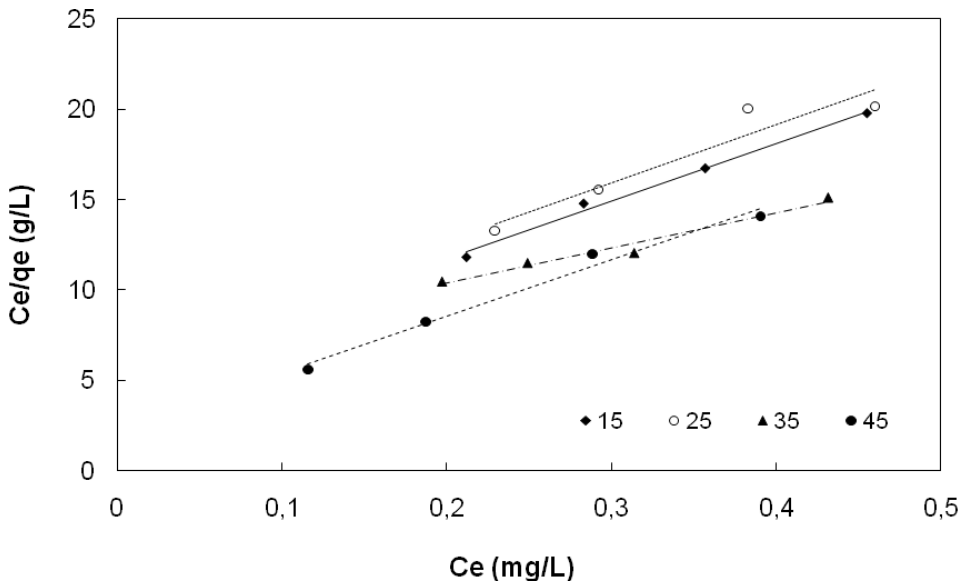
$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_0 b} + \left(\frac{1}{Q_0}\right) C_e \tag{4.5}$$

elde eldilir. Burada;

Q_0: yüzeyde tam bir tek tabaka oluşturmak için adsorbanın birim ağırlığında adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

b: adsorpsiyon net entalpisi ile ilgili bir sabittir (L/mg)

Langmuir izotermlerine ait sabitler $C_e/q_{e'}$'ye karşı çizilen C_e grafiğinden (Şekil 4.4.) elde edilen doğru denklemlerinden Q_0 ve b değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklardaki Langmuir izotermleri

Adsorpsiyonun elverişliliğini belirleyen boyutsuz R_L (dağılma) sabiti eşitlik 4.6 yardımıyla hesaplanmış ve değerleri çizelge 4.1 verilmiştir. Bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder (Hall, 1966).

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \tag{4.6}$$

Bu eşitlikte;

b : Langmuir sabiti (L/mg)

C_0 : Enzimin çözeltideki başlangıç derişimi (mg/L)

Langmuir eşitliği adsorpsiyonu çok güçlü homojen yüzeylerde tarif etse de, doğal adsorbanlar için bu pek geçerli değildir. Çünkü; doğal adsorbanlar, farklı fonksiyonel gruplarla gösterilen, kimyasal heterojenlik gösterirler. Langmuir izotermi açısından bakıldığında, adsorban seçiminde Q_0 ve b değerleri yüksek olması makbuldür.

Langmuir izoterminden elde ettiğimiz Q_0 ve b değerleri, Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere, sırasıyla $0.031-0.051$ mg/g ile $3.02-13.69$ L/mg arasında değişmektedir. Bu değerler adsorpsiyon prosesinin Langmiur izotermine uyduğunu göstermektedir.

Langmuir izotermine uygunluğu gösteren diğer bir parametre olan boyutsuz R_L sayısı denklem 4.6' ya göre hesaplanmıştır. R_L değeri, Çizelge 4.1' den görüldüğü üzere, $0.12-0.37$ arasında bulunmuştur. Bu değerler adsorpsiyon işleminin Langmiur izotermine uyduğunu kanıtlamaktadır (Bölüm 2, Çizelge 2.2).

Yapılan çalışmada elde edilen sonuçların Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerine uygun olduğu görülmüştür. Her iki modelden elde edilen korelasyon katsayıları (>0.90) tüm sıcaklıklar için yüksek değerlerde olmasına karşın, enzimin reçineye adsorpsiyonu Langmuir izotermine daha uygundur. Çünkü korelasyon katsayısının (R^2) Langmuir izotermi için daha büyük olduğu Çizelge 4.1'de görülmektedir.

4.1.2.5. Adsorpsiyon Kinetikleri

Kinetik modeller adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması için geliştirilmiştir ve adsorpsiyon prosesinin hızının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Adsorpsiyon mekanizması adsorbantın fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerine bağlıdır. Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbentin yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Enzimin reçineye adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması

için pseudo-birinci derece ve pseudo ikinci derece kinetik modelleri göz önünde bulundurulmuştur. Lagergren pseudo birinci derece hız eşitliği ve Ho pseudo ikinci derece hız eşitliği sıvı çözeltide çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliklerdir (Lin and Wang, 2009).

Adsorpsiyon hızını belirlemek için kullanılan eşitlikler şunlardır:

Pseudo birinci derece Lagergren eşitliği:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \tag{4.7}$$

Pseudo ikinci dereceden reaksiyon hız eşitliği:

$$\frac{t}{q_t} = \left[\frac{1}{k_2 q_{e,h}^2}\right] + \frac{1}{q_{e,h}} t \tag{4.8}$$

Burada;

k_1: Lagergren adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1})

k_2: Pseudo ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/(mg.dk))

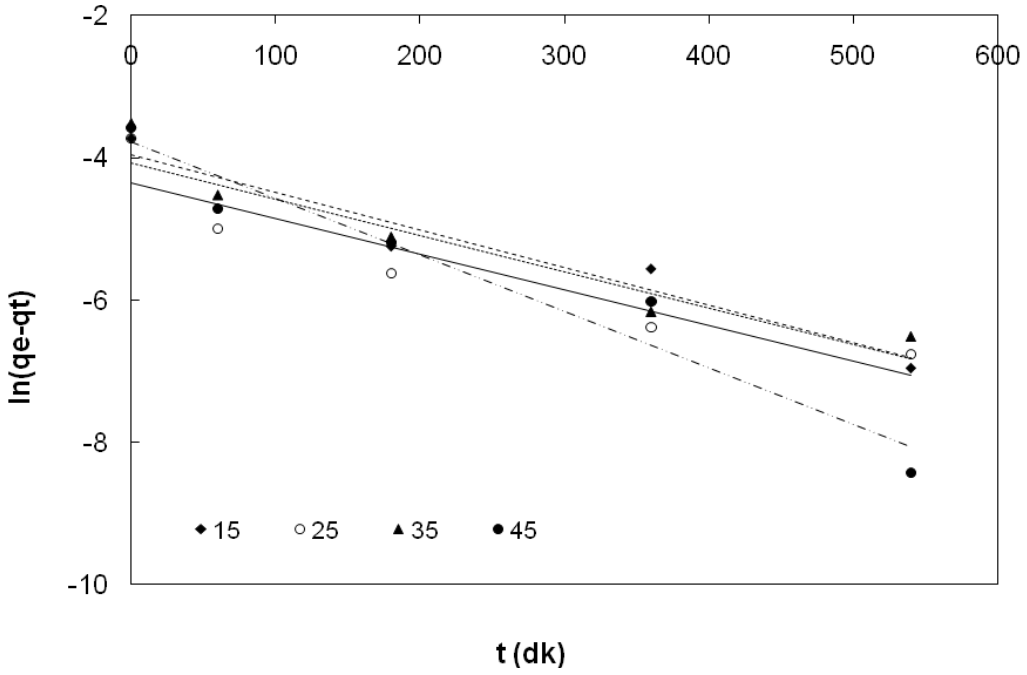
q_e: Denge meydana geldiği zaman adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

$q_{e,h}$: Hesaplanan enzim miktarı (mg/g)

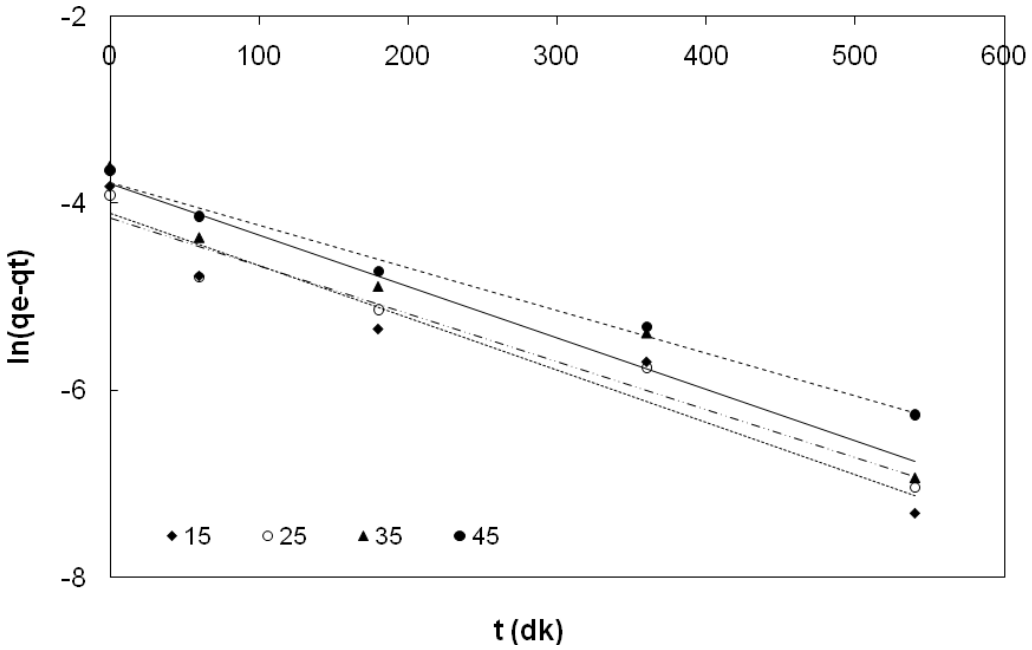
q_t: Herhangi bir zamandaki adsorplanan enzim miktarı (mg/g)

olarak tanımlanmaktadır. $\ln(q_e - q_t)$ ve t/q_t değerlerinin t değerine karşı ayrı grafikleri çizilmiştir. Elde edilen doğrular yardımıyla k_1 ve k_2 değerleri hesaplanmıştır. Deneylerden elde edilen veriler, grafikler yardımıyla değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulunmuştur.

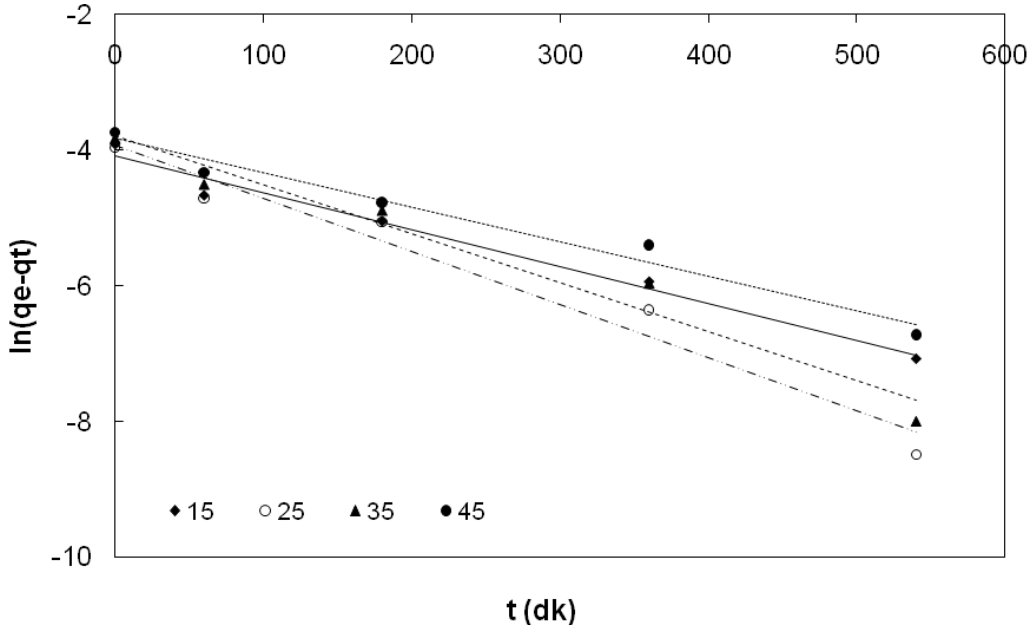
Enzimin reçineye adsorpsiyonu için pseudo birinci derece ve pseudo ikinci derece kinetik modeller incelenmiş ve birinci derece kinetikleri Şekil 4.5-4.8'de görülmektedir. Ayrıca birinci ve ikinci derece kinetik model denklemleri yardımıyla 25, 50, 75 ve 100 mg reçinelere adsorplanma kinetik sabitleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2-4.5'te verilmiştir.



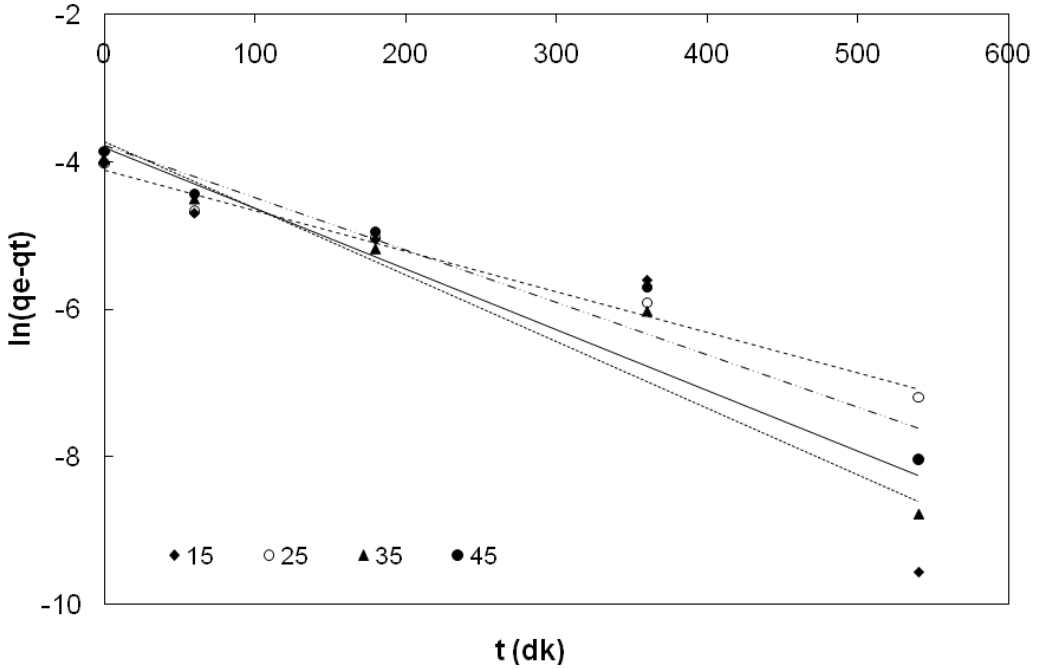
Şekil 4.5. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (25 mg)



Şekil 4.6. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (50 mg)



Şekil 4.7. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (75 mg)



Şekil 4.8. Enzimin reçineye pseudo I. derece adsorpsiyon kinetiği (100 mg)

Çizelge 4.2. 25 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği

T (K)	**Pseudo I. Derece Kinetik (Lagergren Modeli)**				**Pseudo II. Derece Kinetik (Ho Modeli)**		
	q_{ed}	R^2	k_1 (1/dk)	q_{eh}	R^2	k_2 [g/(mg dk)]	q_{eh}
288	0.023	0.92	0.005	0.017	0.99	0.633	0.025
298	0.023	0.86	0.005	0.013	1.00	1.004	0.025
308	0.029	0.92	0.005	0.019	1.00	0.625	0.032
318	0.023	0.94	0.005	0.023	1.00	0.652	0.030

Çizelge 4.3. 50 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği

T (K)	**Pseudo I. Derece Kinetik (Lagergren Modeli)**				**Pseudo II. Derece Kinetik (Ho Modeli)**		
	q_{ed}	R^2	k_1 (1/dk)	q_{eh}	R^2	k_2 [g/(mg dk)]	q_{eh}
288	0.021	0.93	0.005	0.016	0.99	0.646	0.024
298	0.019	0.96	0.005	0.016	0.99	0.574	0.022
308	0.026	0.95	0.005	0.023	0.99	0.394	0.030
318	0.024	0.99	0.004	0.023	1.00	0.245	0.030

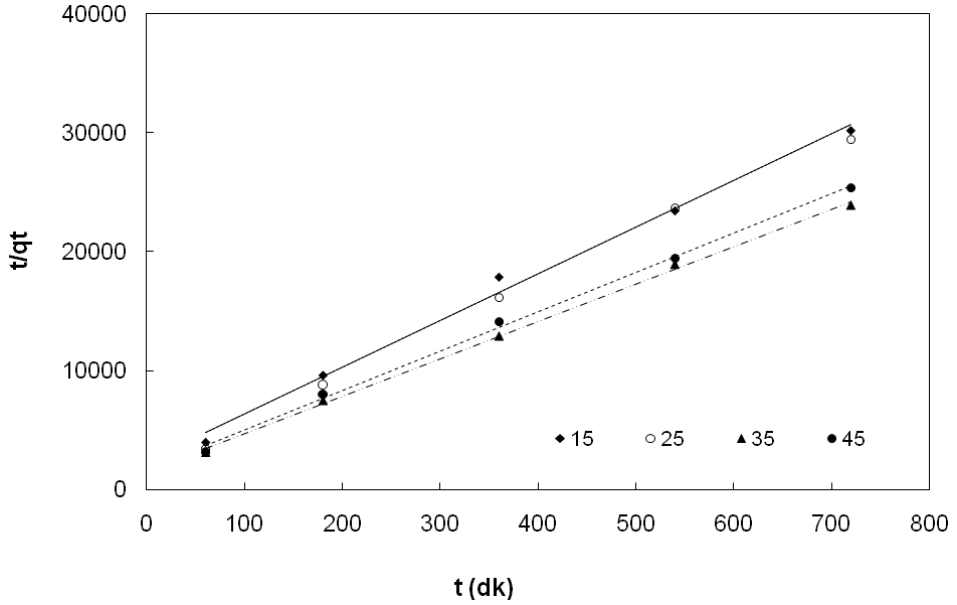
Çizelge 4.4. 75 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği

T (K)	**Pseudo I. Derece Kinetik (Lagergren Modeli)**				**Pseudo II. Derece Kinetik (Ho Modeli)**		
	q_{ed}	R^2	k_1 (1/dk)	q_{eh}	R^2	k_2 [g/(mg dk)]	q_{eh}
288	0.019	0.98	0.005	0.017	1.00	0.520	0.022
298	0.019	0.97	0.007	0.020	0.99	0.469	0.022
308	0.022	0.96	0.007	0.023	0.99	0.370	0.025
318	0.023	0.97	0.005	0.022	0.99	0.291	0.028

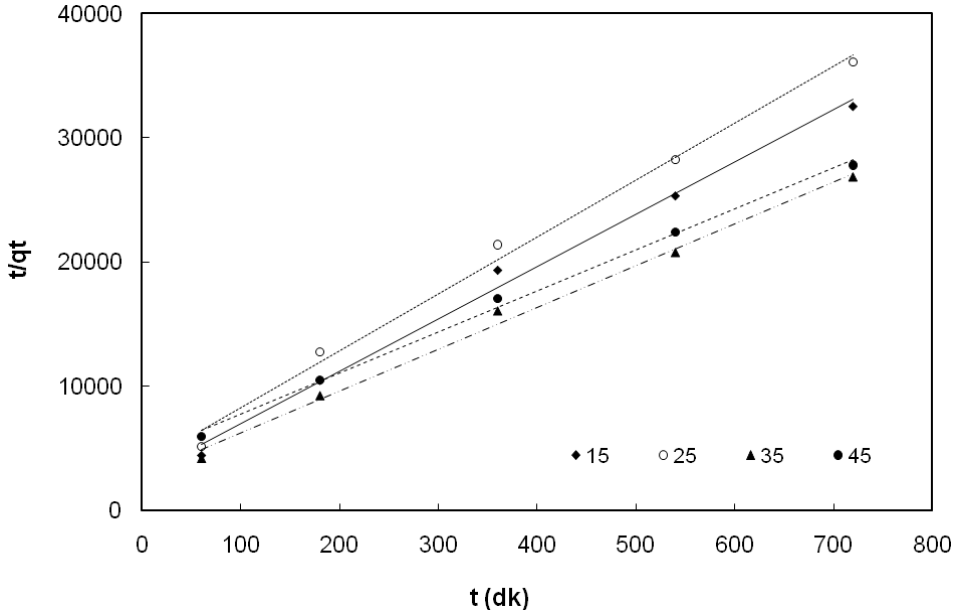
Çizelge 4.5. 100 mg reçineye enzimin adsorplanma kinetiği

T (K)	**Pseudo I. Derece Kinetik (Lagergren Modeli)**				**Pseudo II. Derece Kinetik (Ho Modeli)**		
	q_{ed}	R^2	k_1 (1/dk)	q_{eh}	R^2	k_2 [g/(mg dk)]	q_{eh}
288	0.018	0.83	0.009	0.024	0.98	0.375	0.021
298	0.017	0.98	0.005	0.016	0.99	0.453	0.020
308	0.019	0.94	0.008	0.022	1.00	0.384	0.022
318	0.21	0.94	0.007	0.023	1.00	0.328	0.025

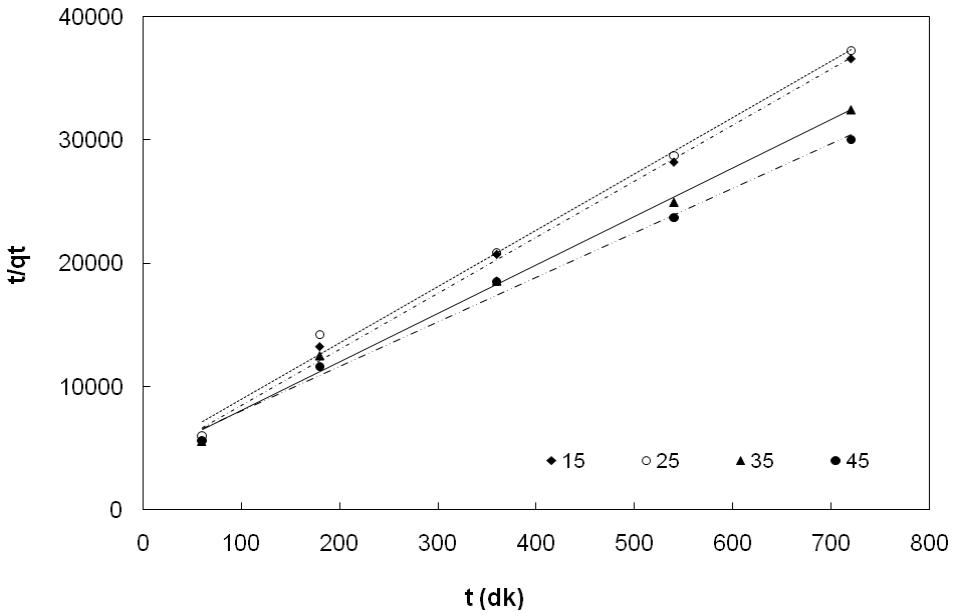
Enzimin reçineye adsorpsiyonu için pseudo II derece kinetikleri Şekil 4.9-4.12' de görülmektedir.



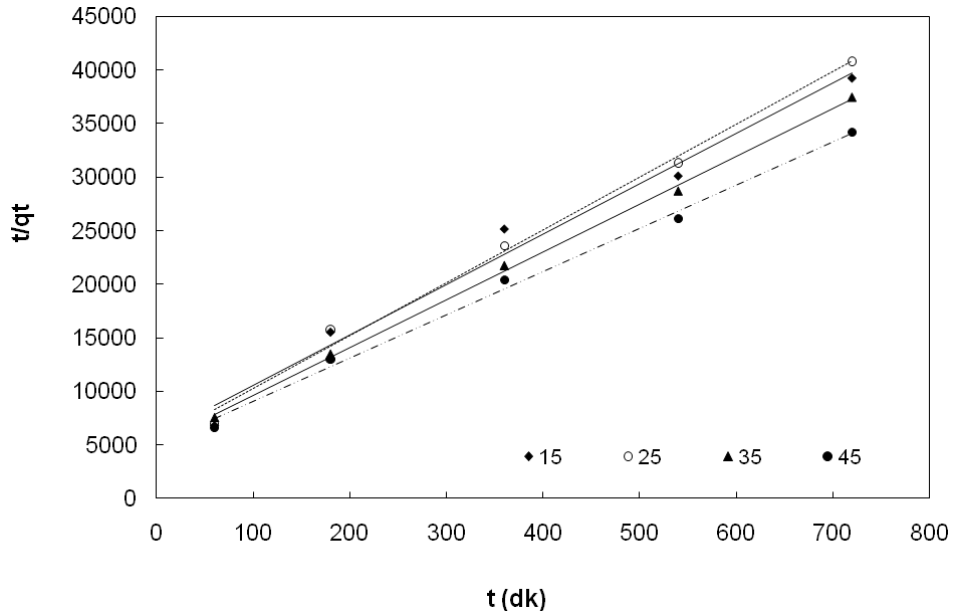
Şekil 4.9. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (25 mg)



Şekil 4.10. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (50 mg)



Şekil 4.11. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (75 mg)



Şekil 4.12. Enzimin reçineye pseudo II. derece adsorpsiyon kinetiği (100mg)

Yukarıdaki çizelgelerden de görüldüğü gibi R^2 değerleri pseudo ikinci derece için oldukça yüksek çıkmıştır. Bu sonuca göre enzimin reçineye adsorpsiyonunun pseudo ikinci derece kinetik modele uyduğu belirlenmiştir. Çizelgelerde ikinci dereceden hız katsayılarının deneysel ve teorik katsayıları gösterilmiştir. Bu grafiklerden de görüldüğü gibi $q_{e,d}$ ve $q_{e,h}$ değerleri birbirine çok yakındır. Böylece

bu adsorpsiyon işleminin pseudo ikinci dereceden hız modeline uygunluğu bir kez daha ispatlanmaktadır.

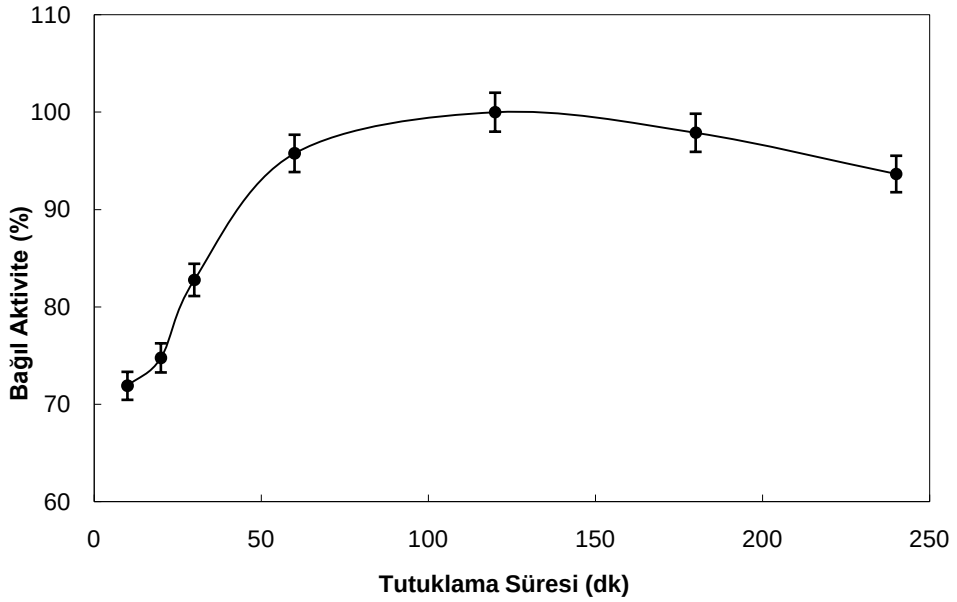
Enzimin reçine üzerine adsorpsiyon kinetiği aşamalı olarak meydana gelmektedir. Bu aşamalar kısaca şöyledir: Çözeltide bulunan enzim molekülleri adsorbanı kaplayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur. Bu basamak, Lagergren pseudo I. dereceden denklem basamağı ile açıklanıyor olup, adsorpsiyon düzeneğinde yaratılan belirli bir hareketlilik (karıştırma) sebebiyle çok hızlı gerçekleştiği için çoğunlukla ihmal edilir. Daha sonra, film tabakasına gelen enzim molekülleri buradaki durgun kısımdan geçerek adsorbanın gözenek boşluklarında hareket eder ve adsorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler. Bu da Ho pseudo II. dereceden denklem ile ifade edilen ikinci basamaktır. Ve çalışmamızda hız belirleyici olan basamaktır. Son basamak ise, parçacık içi difüzyon olayının meydana geldiği basamaktır ve burada adsorbat, adsorbanın gözenek yüzeyine tutunur. Bu basamak da 1. basamak gibi hızlı olduğundan ihmal edilebilir. Adsorbanın bulunduğu faz hareketsiz ise, 1. basamak en yavaş ve adsorpsiyon hızını belirleyen basamak olabilmektedir. Ancak akışkan hareket ettirilirse, yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için adsorpsiyon hızı artacaktır. Çalışmamızda karıştırma hızı iyi olduğundan dolayı yüzey tabakası kalınlığı azalmış ve adsorpsiyon kolay olmuştur. Dolayısıyla 1. basamak hız belirleyici olmaktan çıkmış ve 2. basamak hız belirleyici olmuştur (Ho and Mckay, 1999; Kumar, 2006)

4.1.3. β-Galaktozidaz Enziminin Tutuklama Parametrelerinin Belirlenmesi

Literatürde farklı tutuklama yöntemleri bulunmakla birlikte bu farklılık; materyalin yüzey özelliklerine ve tutuklanan enzimin özelliklerine göre farklı tutuklama parametreleri bulunmaktadır. Çalışmada zayıf bazik karakterde reçine üzerine β -galaktozidaz enzimi tutuklanarak yüksek performanslı dolgulu kolon reaktör hazırlanması hedeflenmiştir. Partikül üzerine tutuklanan enzimin aktivitesi kolon performansını belirleyen en önemli parametrelerdendir. Bundan dolayı birim partikül üzerine maksimum aktivitede enzim tutuklamak amacıyla tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, tutuklama pH'sı ve tutuklama sıcaklığı temelinde incelenmiştir. Maksimum görünür aktivitenin belirlendiği tutuklama parametreleri optimum tutuklama parametresi olarak belirlenmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarında bu parametreler kullanılmıştır.

Tutuklama Süresinin Tutuklanan Enzim Aktivitesine Etkisi:

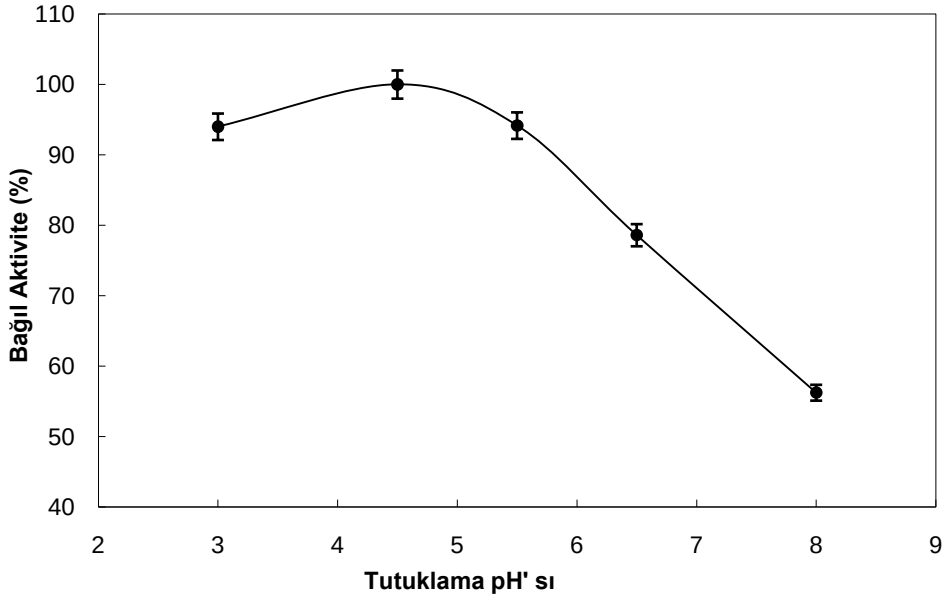
Reçineye maksimum aktivitede enzim tutuklamak amacıyla tutuklama süresi $10-240$ dakika aralığında incelenmiştir. Tutuklama işlemi; başlangıç enzim derişimi $4\,\text{mg/ml}$, tutuklama pH'sı 4.5 ve tutuklama sıcaklığı $35\,^{o}\text{C}$ de test edilen tutuklama süresinde gerçekleştirilmiş ve tutuklanan enzim aktivitesi; sabit substrat derişiminde birim zamanda glukoz oluşum hızının glukoz ölçüm kitleri kullanılarak ölçülmesi ile belirlenmiş ve bağıl aktivite hesaplanmıştır. Çalışılan tutuklama süreleri ile elde edilen enzim aktivitesi değerleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.13 incelendiğinde $60\,\text{dk}$ tutuklama süresi civarında, tutuklu enzim aktivitesinin daha stabil bir değer aldığı düşünülerek tutuklamanın 1 saat süre ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu sonuçlara göre β-galaktozidaz enziminin duolite üzerine hızlı bir tutuklama gerçekleştirdiği söylenebilmektedir. Elde edilen bu sonuçlara paralel olarak Demirel (2003), Pectinaex Ultra SP-L enziminin, duolite-polistiren partiküle tutuklama işlemlerinde aynı tutuklama süresinde çalışmalarını yürütmüştür. Literatürde farklı enzimlerin Duolite A568 üzerine tutuklama için 1 saatten 24 saate kadar değişen tutuklama süreleri belirlenmiştir (Özdural et.al., 2001; Sarıoğlu, 1998)



Şekil 4.13. Tutuklama süresinin tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0 $4\,\text{mg/mL}$ $T: 35\,°C$, $pH: 4.5$)

***Tutuklama pH'sının Tutuklanan Enzim Aktivitesine Etkisi*:**

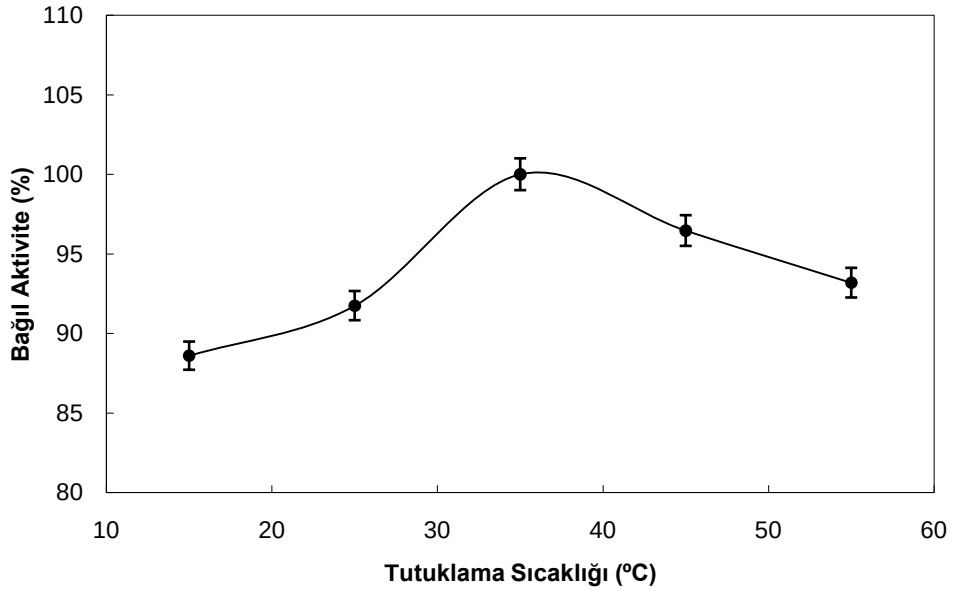
Optimum tutuklama pH'sını belirlemek amacıyla tutuklama işlemi $3-8$ pH aralığında gerçekleştirilmiştir. Tutuklama işlemindeki diğer parametreleri; başlangıç enzim miktarı 4 mg/ml, tutuklama süresi 60 dk ve tutuklama sıcaklığı $35°C$'de sabit tutulmuştur. Tutuklama işlemi sonrasında tutuklu enzim aktivitesi belirlenmiş ve pH' daki değişim Şekil 4.14'de verilmektedir. Ortam pH değerindeki değişmenin, tutuklu enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Maksimum enzim aktivitesi, ortam pH değerinin pH'sı 4.5 olduğu durumda elde edilmiştir. β-galaktozidaz enziminin pH değeri 4-7.5 ve Duolite A568 reçinesinin 7-9 olarak verilmektedir (Anonim a., 1998, Anonim b., 1998). Buna göre düşük pH değerlerin de reçinenin bağlama özelliğini, yüksek pH değerlerin de ise enzimin aktivitesini kaybedeceği düşünülmektedir. Her ikisinin de maksimum düzeyde özelliklerini koruyarak tutuklamaya katıldıkları nokta, pH 4.5 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi pH 4.5 değerinin üstündeki tutuklamalarda enzim aktivitesi kaybı, pH 4.5 değerinin altındakilere göre daha çok miktarda gerçekleşmiştir.



Şekil 4.14. Tutuklama pH'sının tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0:4 mg/mL, t:60 dk, T:35°C)

Tutuklama Sıcaklığının Tutuklanan Enzim Aktivitesine Etkisi:

Tutuklama sıcaklığı da tutuklu enzimin aktivitesini etkileyen önemli bir parametredir. Tutuklama sıcaklığının tutuklanan enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla $15-55\,°C$ sıcaklık aralığında tutuklama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Diğer tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi 4 mg/ml, tutuklama süresi 60 dk ve tutuklama pH'sı 4.5 olarak sabit tutulmuştur. Farklı tutuklama sıcaklıklarına karşı elde edilen tutuklu enzim aktivitesindeki değişim Şekil 4.15'te verilmiştir. Tutuklu enzim aktivitesinin sıcaklıkla çok fazla değişmediği ve bu sıcaklıklar arasında enzim aktivitesinin $35\,°C$ de daha iyi olduğu görülmüştür ve sonraki aşamalarda bu sıcaklık kullanılmıştır. Bu sonuç Boyacı, (2001)'nın glukoz oksidaz enziminin aynı reçineye tutuklama parametreleri ile ilgili çalışmasındaki tutuklama sıcaklığı ile uyum içindedir.

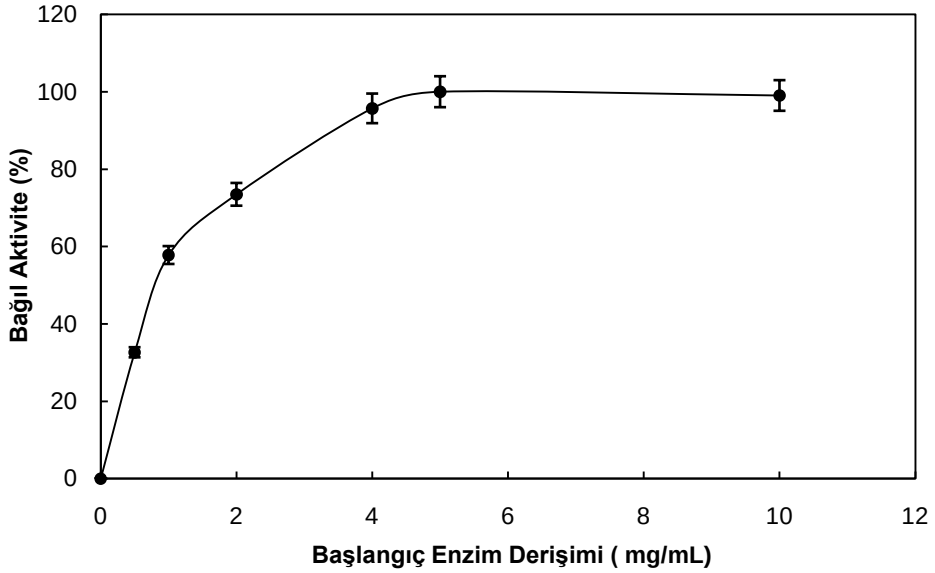


Şekil 4.15. Tutuklama sıcaklığının tutuklu enzim aktivitesine etkisi (C_0:4mg/mL, t:60 dk, pH:4.5)

Başlangıç Enzim Derişiminin Tutuklanan Enzim Aktivitesine Etkisi:

Enzim derişiminin tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla farklı derişimler de (0.5 - 10.0 mg/mL) enzim çözeltileri hazırlanmış ve reçine üzerine incelenen diğer tutuklama koşulları kullanılarak tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Test koşullarındaki enzim aktivitesi, maksimum enzim aktivitesine oranlanarak bağıl aktivite hesaplanmış ve artan başlangıç enzim

derişimine karşı grafiği çizilmiş ve sonuçlar Şekil 4.16' de verilmiştir. Tutuklu enzim aktivitesi 5 mg/ml enzim derişimine kadar artış göstermiş ve sonra plato değerine ulaşılmıştır. Enzim derişimi artmasına karşın enzim aktivitesinde artış gözlenmemiştir. Tutuklama çözeltisinin 5 mg/ml' nin üzerinde başlangıç enzim derişimi kullanıldığında, sterik engellemenin meydana geldiği söylenebilmektedir. Bu veriler doğrultusunda 5 mg/ml' nin başlangıç enzim derişimi olarak kullanılması uygun görülmüştür.

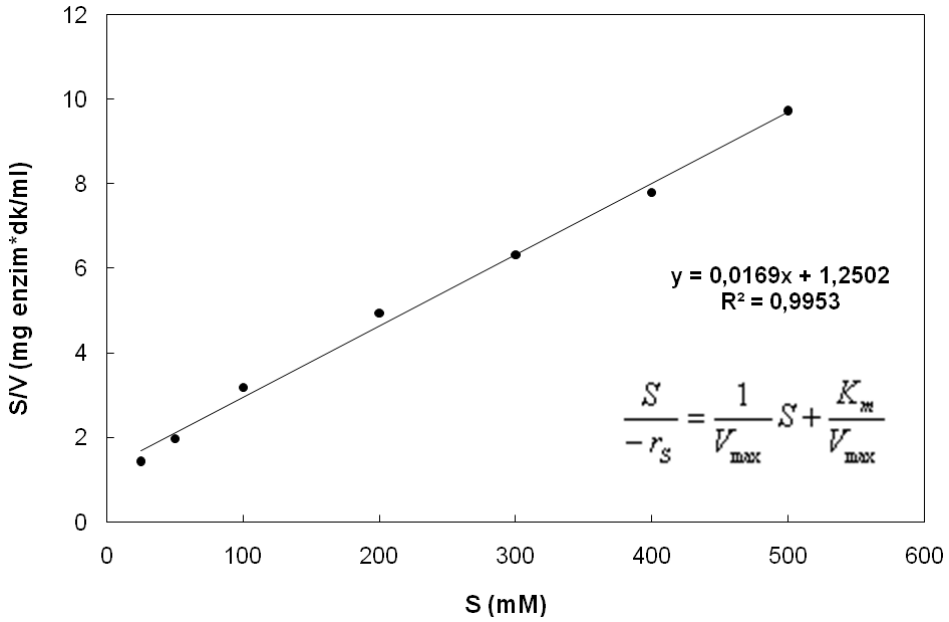


Şekil 4.16. Başlangıç enzim derişiminin tutuklu enzim aktivitesine etkisi (T:35°C, t:60 dk, pH:4.5)

4.1.4. Serbest β-galaktozidaz Enzimi Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest enzim kinetiğinin belirlenmesi amacıyla farklı substrat derişimlerinde β-galaktozidaz enziminin birim zamandaki reaksiyonu sonucu ilk hız değerleri elde edilmiştir. Substrat derişiminin artması enzim aktivitesini arttırmış ve bu artış 400 mmol/L laktoz derişimine kadar devam etmiştir. Bu derişimin üstünde önemli bir değişim saptanmamıştır. Bu durum belirtilen derişim değerine kadar substrat miktarının, üzerindeki derişimlerde ise enzim miktarının sınırlayıcı faktör olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak Hanes-Woolf grafiği çizilmiş (Şekil 4.17) ve Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 73.97 mmol/L ve 73.96 μmol/dk mg enzim olarak saptanmıştır. Farklı kaynaklarda serbest β-galaktozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri için farklı

değerler yer almaktadır. Bu değerler K_m için 35 - 150 mmol/L aralığında değişmektedir (Portaccoio et al., 1998). Bu bölümde hesaplanan K_m değeri literatür ile uyum içindedir.



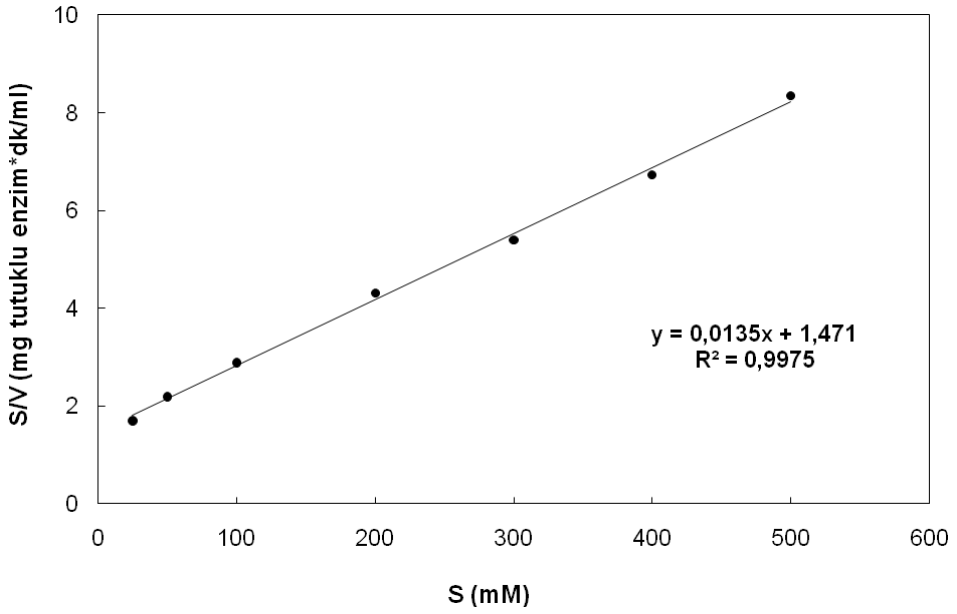
Şekil 4.17. Serbest enzime ait Hanes- Woolf grafiği

4.1.5. Tutuklu β-galaktozidaz Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Belirlenen optimum tutuklama parametrelerine göre gerçekleştirilen tutuklama işleminden sonra farklı substrat derişimlerinde birim zamandaki reaksiyon hız değerleri elde edilmiştir.

Tutuklama yöntemine ve enzimin türüne bağlı olarak enzim aktivitesi azalmaktadır. Bu nedenle minimum aktivite kaybına neden olacak tutuklama yönteminin belirlenmesi enzim çalışmalarında önemli yer almaktadır. Bu çalışma kapsamında taşıyıcı materyal olarak kullanılan zayıf bazik karakterdeki reçinenin üzerine β-galaktozidaz enziminin tutuklanması sonucu enzimin aktivite kayıpları incelenmiş ve tutuklu enzimin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Elde edilen verilerle Hanes-Woolf grafiği çizilmiş (Şekil 4.18) ve Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 108,96 mmol/L ve 54,07 μmol/dk mg tutuklu enzim olarak saptanmıştır. Serbest ve tutuklu enzime ait bu değerler karşılaştırıldığında, β-galaktozidaz'ın tutuklama ile K_m değerinin arttığı

görülmektedir. K_m'in tutuklama ile artması, literatürde yine β-galaktozidaz, Pectinaex Ultra SP-L, ve glukoz oksidaz gibi farklı enzimler için de mevcuttur (Güleç, 2009; Sarıoğlu, 1998; Boyacı, 2001). Reçine yüzeyinde bulunan enzimin K_m değeri difüzyon sınırlamaları nedeniyle artmış yani enzimin substratına olan ilgisi azalmıştır. Sonuçlardan da görüldüğü gibi, enzimin partikül üzerine tutuklanması ile birlikte çözünür formdan çözünmez forma geçmesi enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Wentworth, et. al., 2004).



Şekil 4.18. Tutuklu enzime ait Hanes- Woolf grafiği

Katalizör partiküllerde difüzyon ve reaksiyon olaylarını incelemek için Thiele modülü ve etkinlik katsayısı değerleri belirlenmiştir. Thiele modülü ve etkinlik katsayısını belirlemek için birinci dereceden reaksiyonun gerçekleştiği reaksiyon hız değerleri kullanılmıştır. Bu amaçla Weisz-Prater parametresi (C_{wp}) hesaplanmış, sadeleştirmeler yapılarak Thiele modülünü partikül çapına bağlayan eşitlik çıkartılmış ve Thiele modülleri hesaplanmıştır. Thiele modülleri yardımıyla etkinlik katsayıları belirlenmiştir. Kullanılan eşitliğin çıkarımı aşağıda gösterilmiştir (Fogler, 1999).

$$C_{WP} = \eta \times \phi_1^2 \qquad (4.9)$$

$$C_{WP} = \frac{\text{Gerçek reaksiyon hızı}}{C_{As}\ \text{derişiminde reaksiyon hızı}} \times \frac{C_{As}\ \text{derişiminde reaksiyon hızı}}{\text{Difüzyon hızı}} \tag{4.10}$$

$$\eta = \frac{3}{\phi_1^2}(\phi_1 \coth\phi_1 - 1) \tag{4.11}$$

Eşitlik düzenlenirse,

$$\eta\phi_1^2 = 3(\phi_1 \coth\phi_1 - 1) \tag{4.12}$$

$$\eta = \frac{r_A^I(\text{görünür})}{-r_{As}^I} \quad \text{ve} \quad \phi_1^2 = \frac{-r_A^{II} S_a \rho_c R^2}{D_e C_{As}} = \frac{-r_A^I \rho_c R^2}{D_e C_{As}} \tag{4.13}$$

$$C_{WP} = \frac{r_A^I(\text{görünür})}{-r_{As}^I}\left[\frac{-r_A^I \rho_c R^2}{D_e C_{As}}\right] \tag{4.14}$$

$$C_{WP} = \eta\phi_1^2 = \frac{r_A^I(\text{görünür})\rho_c R^2}{-r_{As}^I D_e C_{As}} \tag{4.15}$$

Eşitlik 4.12 ve 4.15 birleştirilip düzenlenmesi ile Eşitlik 4.16 elde edilir.

$$\frac{r_A^I(\text{görünür})\rho_c R^2}{-r_{As}^I D_e C_{As}} = \eta\phi_1^2 = 3(\phi_1 \coth\phi_1 - 1) \tag{4.16}$$

Bu eşitlik aynı partikülün iki farklı büyüklüğü için hesaplanan hız değerleri ile oranlanır ve sadeleştirilirse Eşitlik 4.17 elde edilir.

$$\frac{r_{A2}^I R_2^2}{r_{A1}^I R_1^2} = \frac{(\phi_{12} \coth\phi_{12} - 1)}{(\phi_{11} \coth\phi_{11} - 1)} \tag{4.17}$$

Thiele modülü;

$$\phi_1 = R_1\sqrt{\frac{-r_A^I \rho_c}{D_e C_{As}}} \tag{4.18}$$

Her iki partikül için Thiele modülü oranlanırsa Eşitlik 4.19 elde edilir.

$$\frac{\phi_{11}}{\phi_{12}} = \frac{R_1}{R_2} \tag{4.19}$$

Eşitlik 4.17 ve 4.19 birlikte çözülerek farklı büyüklüklerdeki enzim tutuklu reçineler için Thiele modülü ve Eşitlik 4.12 kullanılarak da etkinlik katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Partikül büyüklüğünün enzim tutuklu reçinelerin Thiele modülü ve etkinlik katsayısına etkisi

Ortalama Partikül Büyüklüğü (μm)	**Thiele Modülü**	**Etkinlik Katsayısı**
390	1.23	0.91
437.5	1.39	0.89
475	1.50	0.87

Çizelgede görüldüğü üzere partikül büyüklüğünün artması ile Thiele modülü beklenildiği şekilde artmış, etkinlik katsayısı ise azalmıştır. Bu durum, büyük partiküllerde difüzyon uzaklığının küçük partiküllere göre daha fazla olması nedeniyle partikülün merkezine yaklaşıldıkça substrat derişiminin azalmasını ve merkeze yakın bölgelerde tutuklu enzimlerin etkin bir şekilde çalışmadığı anlamına gelmektedir. Thiele modülünün küçük değerleri yüzey tepkimesi kontrolünü ve girdilerin önemli bir miktarının tepkimeye girmeden katalizör partikülün içine doğru iyi difüzlendiğini ifade etmektedir. Thiele modülünün büyük değerleri yüzey tepkimesinin hızlı olduğunu ve girdilerin katalizör partikülün yüzeyine yakın bölgede harcandığını göstermektedir (Fogler,1999; Ladero; 2001; AL-Muftah, 2005). Elde edilen veriler doğrultusunda çalışmalarda 390 μm büyüklüğüne sahip Duolite A568'in kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Boyacı, (2001), tarafından yapılan benzer bir çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi partikül çapının artmasıyla Thiele modülünün arttığı, etkinlik katsayısının ise azaldığı belirlenmiştir.

4.1.6. Dolgulu Kolon Reaktör Kinetiğinin İncelenmesi

Dolgulu kolon reaktörlerinin çalışma performanslarını etkileyen partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve çözelti akış hızı parametreleri incelenmiştir. Belirlenen parametreler uyarı cevap tekniği ile incelenmiş olup kolon girişinde impuls tipi

uyarı verilmiş ve kolon çıkışı cevap eğrileri belirlenmiştir. Cevap eğrileri değerlendirilerek Peclet sayısı, dönüşüm, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri hesaplanmıştır.

Çalışmanın ilk bölümünde kobalt çözeltisinin partiküle adsorplanıp adsorplanmadığı incelenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada kobaltın partiküle adsorplanmadığı görülmüştür. İkinci aşamada ise Peclet sayısı üzerine partikül büyüklüğünün, kolon L/D oranının ve akış hızının etkisi incelenmiştir. Son aşamada da enzim tutuklu reçineler kullanılarak dönüşüm, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir

Dolgulu Kolon Reaktörlerde Peclet Sayısının Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde partikül büyüklüğü, kolon L/D oranının ve akış hızının kolon Peclet sayısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kobalt çözeltisi sisteme impuls tipi uyarı şeklinde beslenmiş ve kolon çıkışında cevap eğrileri belirlenmiştir. Cevap eğrilerinin mutlak momentleri ve merkezi momentleri hesaplanarak Peclet sayıları Eşitlik 4.20 yardımı ile hesaplanmıştır.

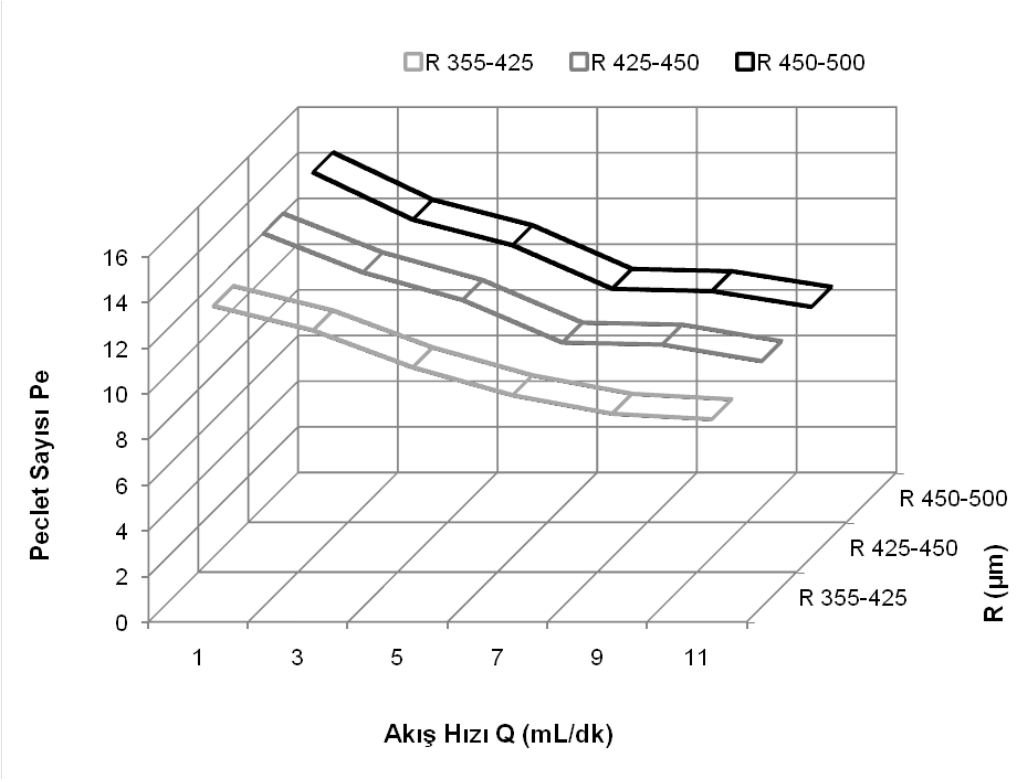
$$M_2^{M^*} = M_{12}^{E^*} = \frac{2}{Pe_L} - \frac{2}{Pe_L{}^2}\left[1 - e^{-Pe_L}\right] \tag{4.20}$$

Peclet sayısı;

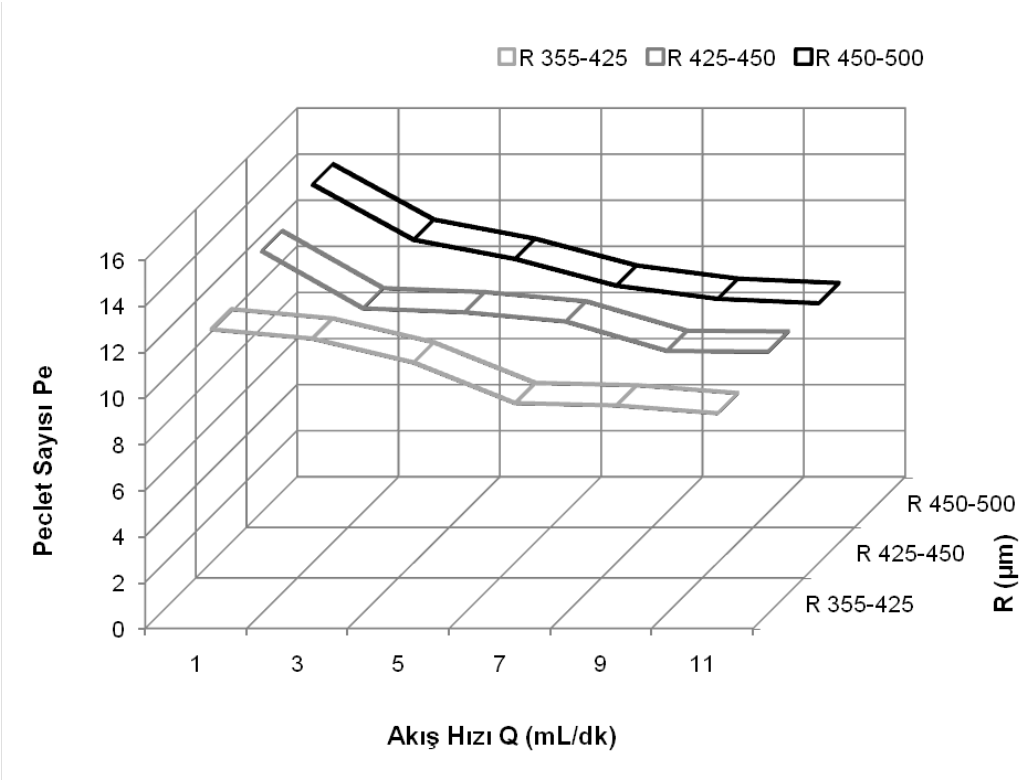
$$Pe_L = \frac{UL}{D_L} \quad \text{veya} \quad Pe_P = \frac{UD_P}{D_L} \tag{4.21}$$

olup, yığın kütle transferlerinin eksenel dağılım katsayısına oranını ifade etmektedir. Kolon boyuna (Pe_L) veya partikül çapına (Pe_P) göre tanımlanabilmektedir. Pe sayısının yüksek olması bir başka deyişle eksenel dağılım katsayısının düşük olması tıpa tipi akışa (Plug flow) yaklaşıldığını, Pe katsayısının düşük olması ise eksenel dağılım katsayısının yüksek olması nedeni ile tam karıştırmalı akışa yaklaşıldığını ifade etmektedir (Levenspiel, 1972).

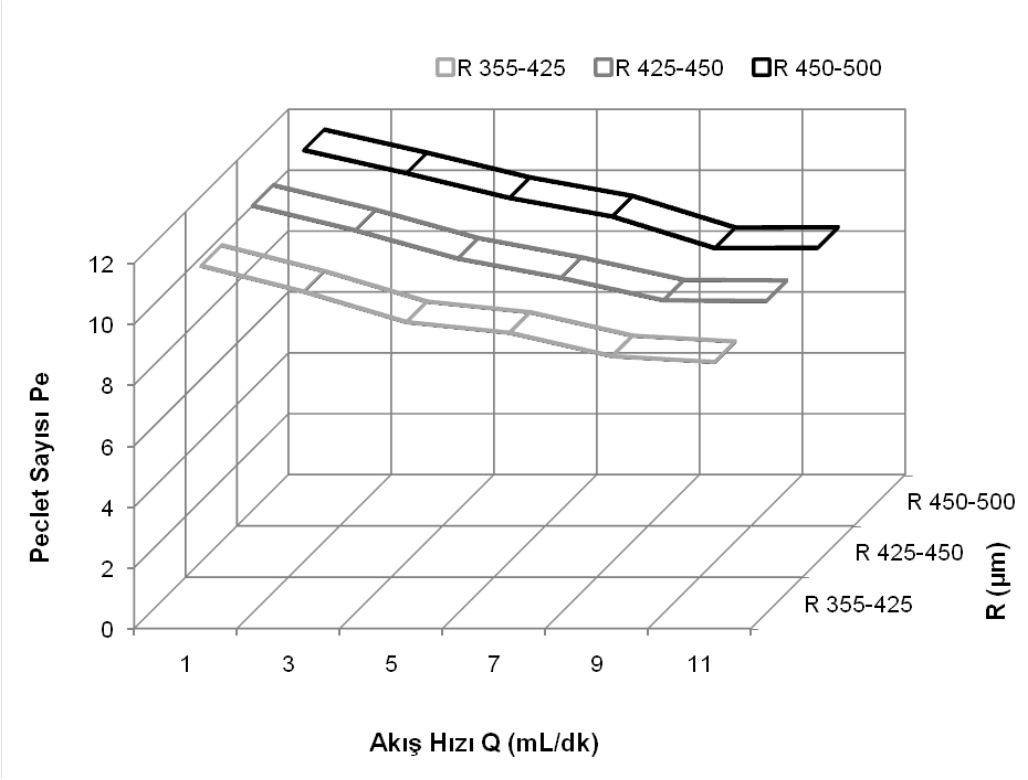
Hesaplanan Peclet sayıları ile ilgili sonuçlar Şekil 4.19 - 4.22'de verilmiştir.



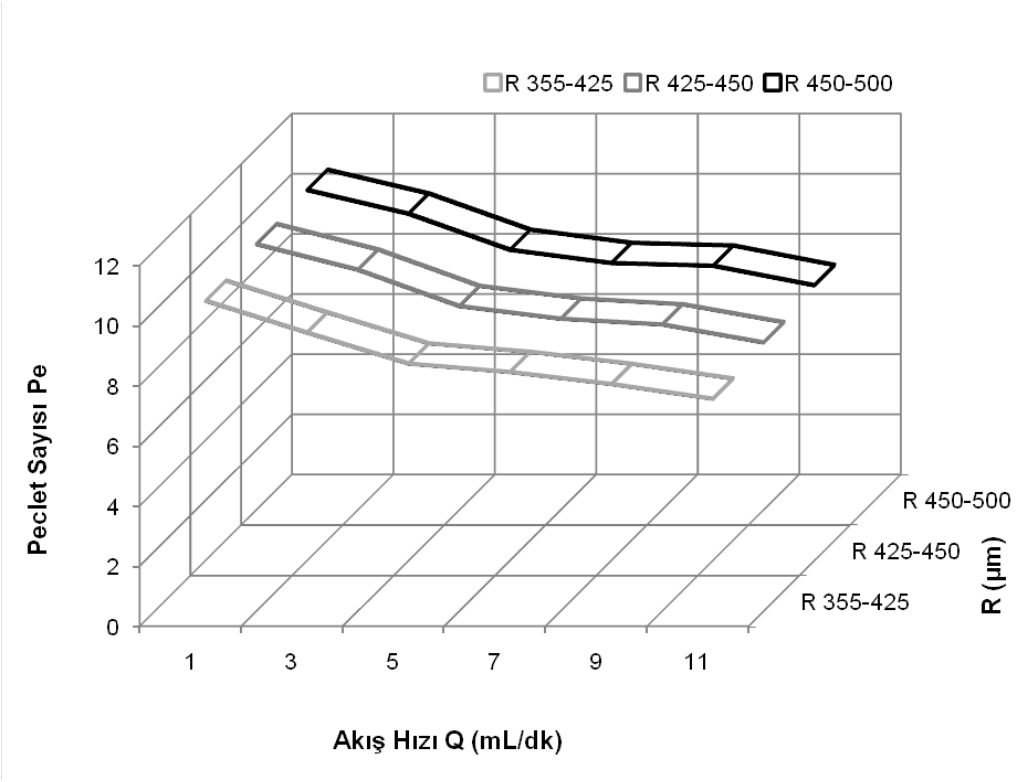
Şekil 4.19. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.20. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.21. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 5)

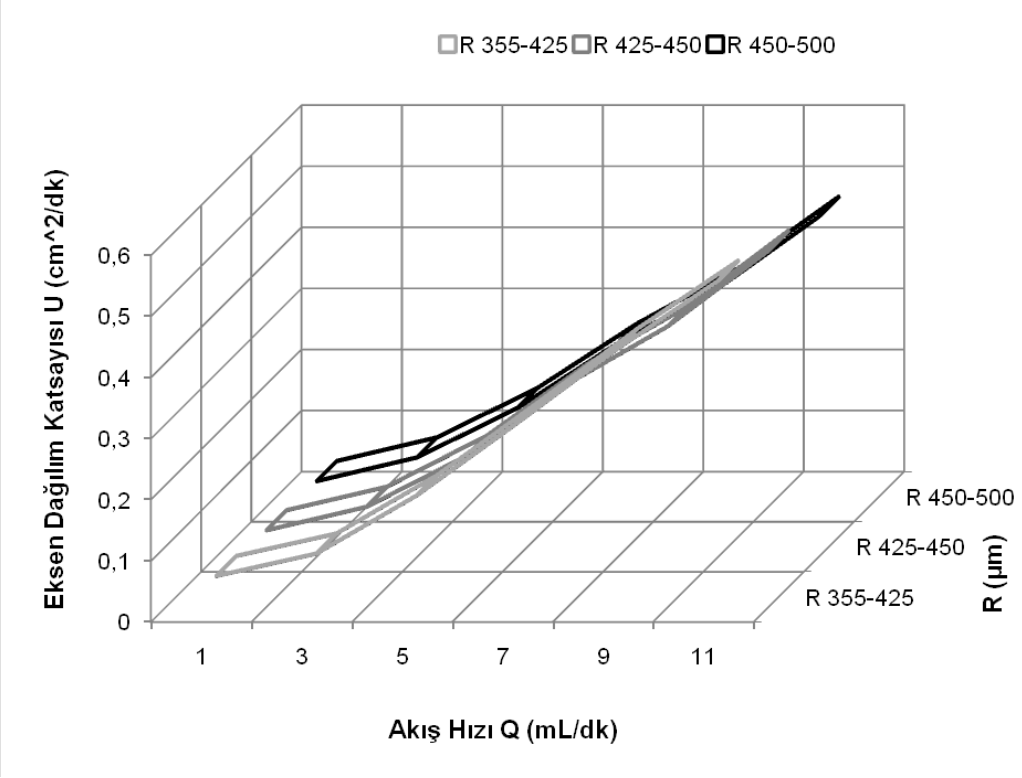


Şekil 4.22. Akış hızının Peclet sayısı üzerine etkisi (L/D : 10)

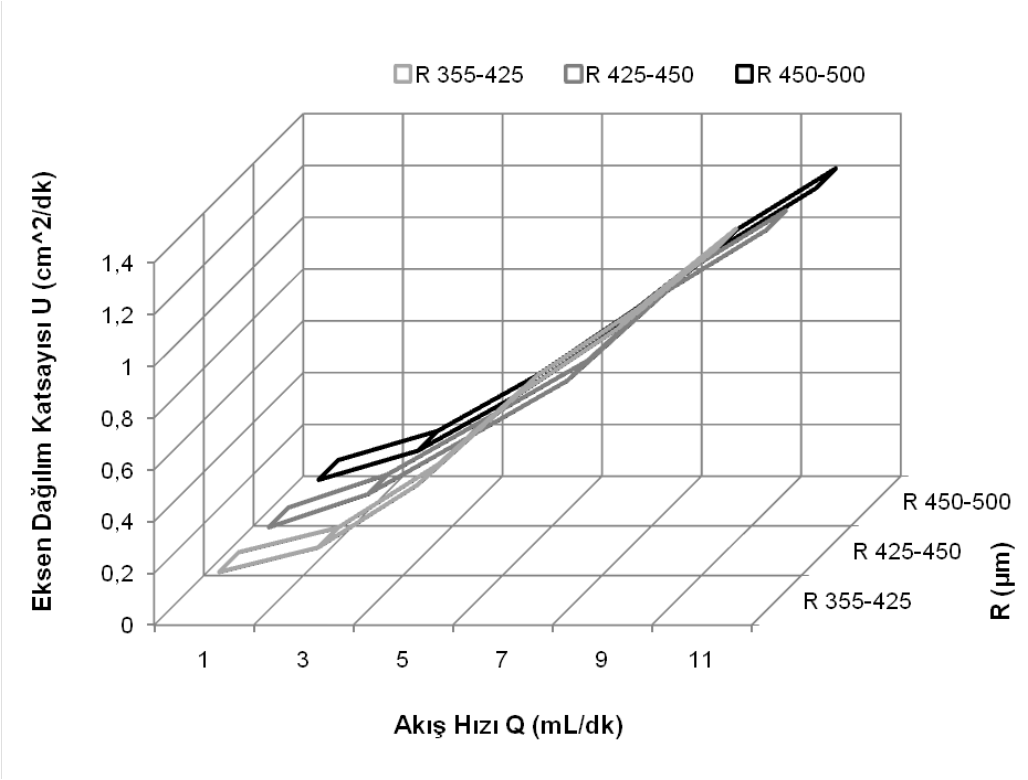
Yukarıdaki şekillerden de görüldüğü üzere; Akış hızının Peclet sayısına etkisi, akış hızının artması ile Peclet sayısı başlangıçta azalmakta, sonra ise plato değerine yaklaşarak dengeye ulaşmaktadır. Farklı L/D oranlarında aynı akış davranışı devam etmiştir. Bu durum, akış hızının artmasıyla akış davranışının beklendiği gibi tıpa tipi akıştan tam karıştırmalı akışa yaklaştığını göstermektedir (Levenspiel, 1972; Fogler,1999).

Kolon L/D oranının artması ile daha düşük Peclet sayısı değerleri elde edilmiş ve bunun sonucu olarak partikül büyüklüğünün Peclet sayısı üzerindeki etkisi çok azalmış ve L/D oranının azalmasıyla da akış şeklinin tam olarak oluşmadığı görülmüştür. Partikül büyüklüğünün artmasıyla akış hızının Peclet sayısı üzerindeki etkisinin çok azaldığı şekillerde de görülmektedir.

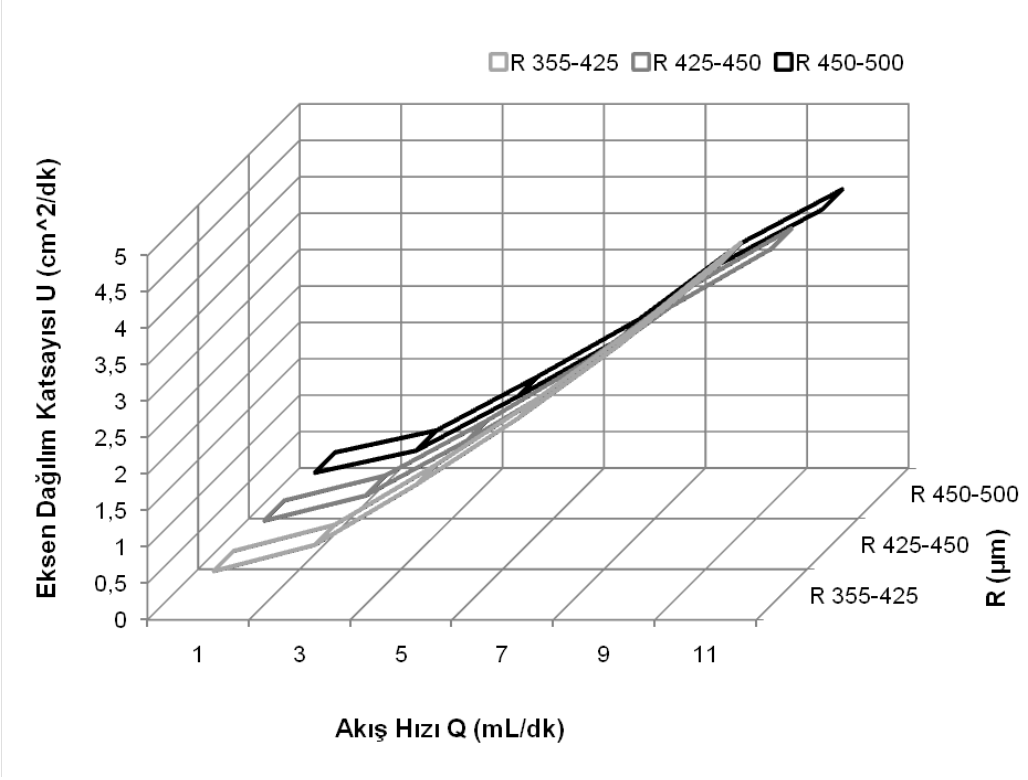
Eşitlik 4.21 kullanılarak eksenel dağılım katsayıları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 4.23 - 4.26).



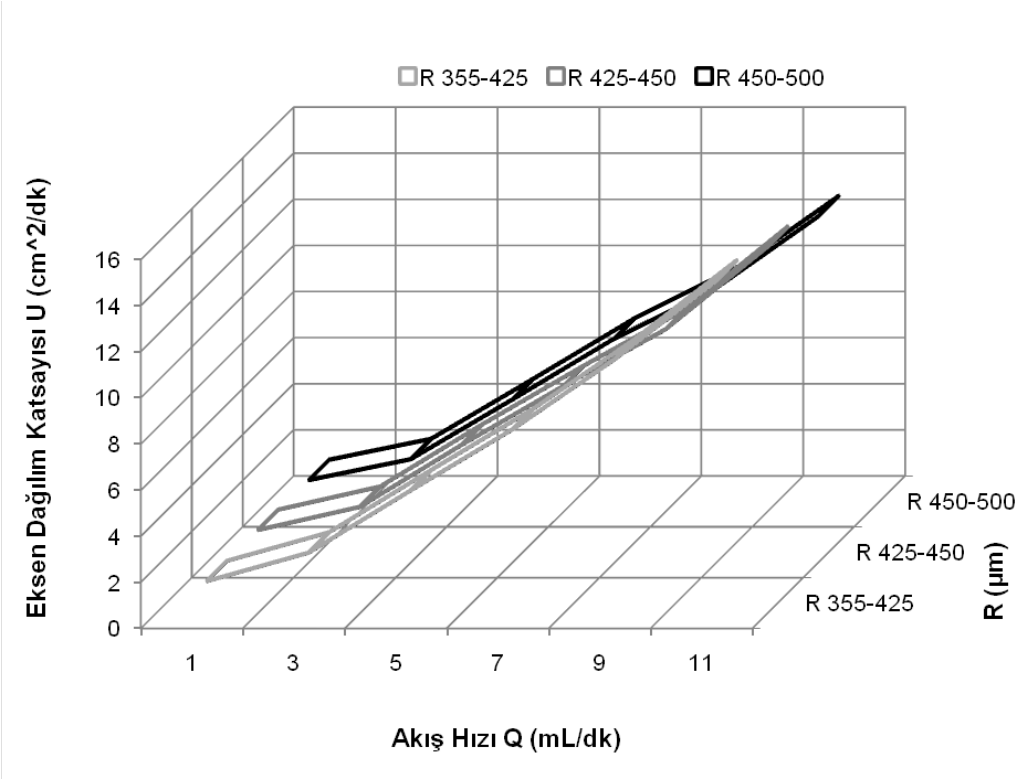
Şekil 4.23. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D :1)



Şekil 4.24. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.25. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D : 5)



Şekil 4.26. Akış hızının eksenel dağılım katsayısı üzerine etkisi (L/D :10)

Akış hızının artması ile eksenel dağılım katsayısı da doğru orantılı olarak artmıştır. Peclet sayıları ile eksenel dağılım katsayıları birlikte değerlendirildiğinde kolon dinamiği daha iyi açıklanabilmektedir. Peclet sayısı akış hızının artması ile önce azalmakta, sonra ise etkilenmemektedir. Peclet sayısının sabit kaldığı kısımda akış hızının artması, yani yığın kütle transferindeki artış eksenel dağılım katsayısının artmasına neden olmuştur.

Ayrıca eksenel dağılım katsayısının artması, kolondaki akışın tam karıştırmalı akışa yaklaşıldığını göstermektedir. Etkin bir karışmanın olması özellikle kütle aktarım dirençlerinin olduğu sistemlerde reaksiyon verimini arttırmak için kullanılan yöntemlerdendir (Fogler, 1999; Boyacı, 2001). Eksenel dağılım katsayısı, dolgulu kolon reaktör sisteminin hazırlanmasında oldukça önemli bir parametredir. Dolgulu kolon sisteminde kullanılan parametreler seçilirken eksenel dağılım katsayılarının yüksek olmasına dikkat edilmelidir. Ancak bu değerlendirmeler yapılırken enzimatik reaksiyon hız ifadeleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

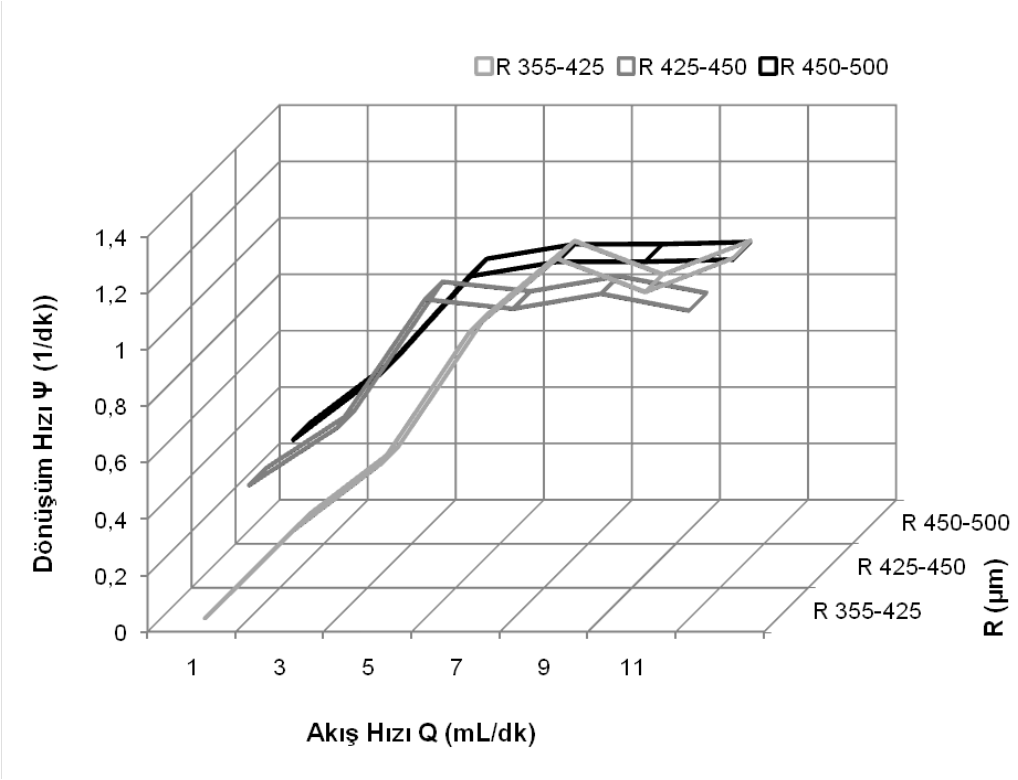
Kolon L/D oranının artması ile eksenel dağılım katsayısı da artmıştır. Aynı hacimsel akış hızında büyük L/D oranına sahip kolon reaktörlerde çizgisel akış hızının yüksek olması eksenel dağılım katsayısının da artmasına neden olmuştur.

Partikül büyüklüğünün artması ile eksenel dağılım katsayısı azalmıştır. Kolon L/D oranının artması ile eksenel dağılım katsayısındaki azalma az da olsa artmıştır. L/D oranı 1 olan kolondaki azalma %86 oranında olurken L/D oranı 10 olan kolondaki azalma %87.5 oranında gerçekleşmiştir.

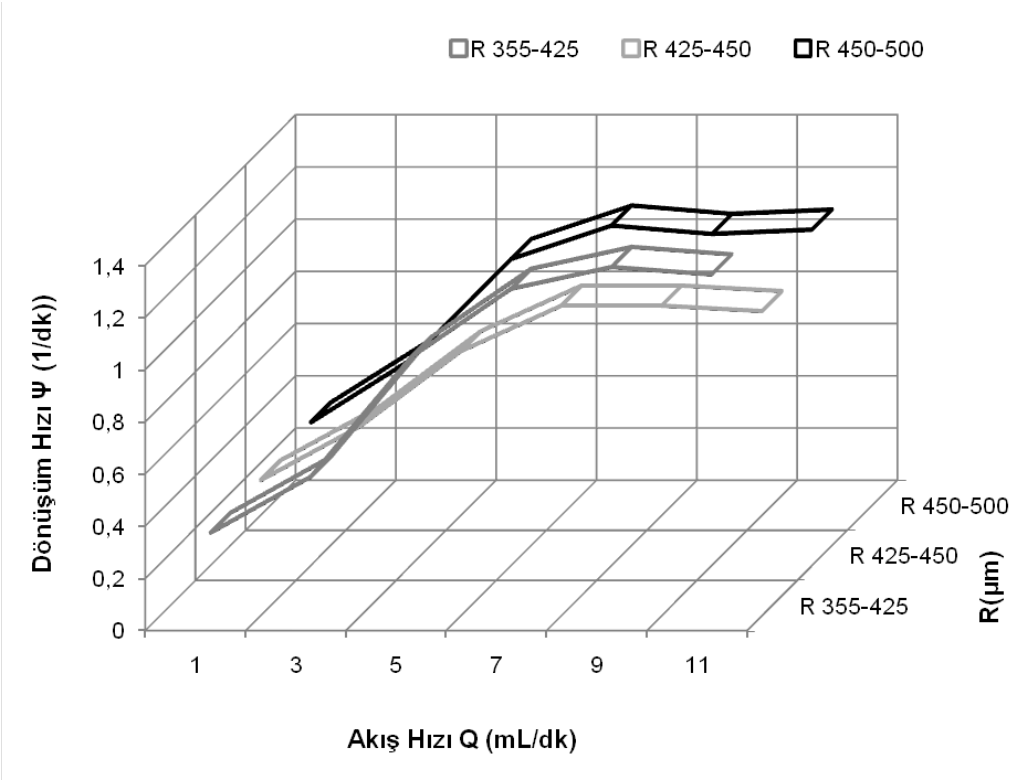
Dönüşüm, Damköhler Sayısı ve Reaksiyon Hız Sabiti Değerlerinin Belirlenmesi

Dolgulu kolon reaktörlerde akış hızının, partikül büyüklüğünün ve kolon L/D oranının enzimatik dönüşüm, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; üç farklı büyüklüğe sahip partikül yüzeyine daha önce belirlenen optimum tutuklama parametreleri kullanılarak enzim tutuklanmış ve dört farklı L/D oranına sahip kolonlara yerleştirilmiştir. Çalışma tek geçişli sistemle yürütülmüş ve elde edilen veriler ile farklı akış hızları için enzimatik dönüşüm, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri belirlenmiş ve sonuçlar şekiller ile verilmiştir.

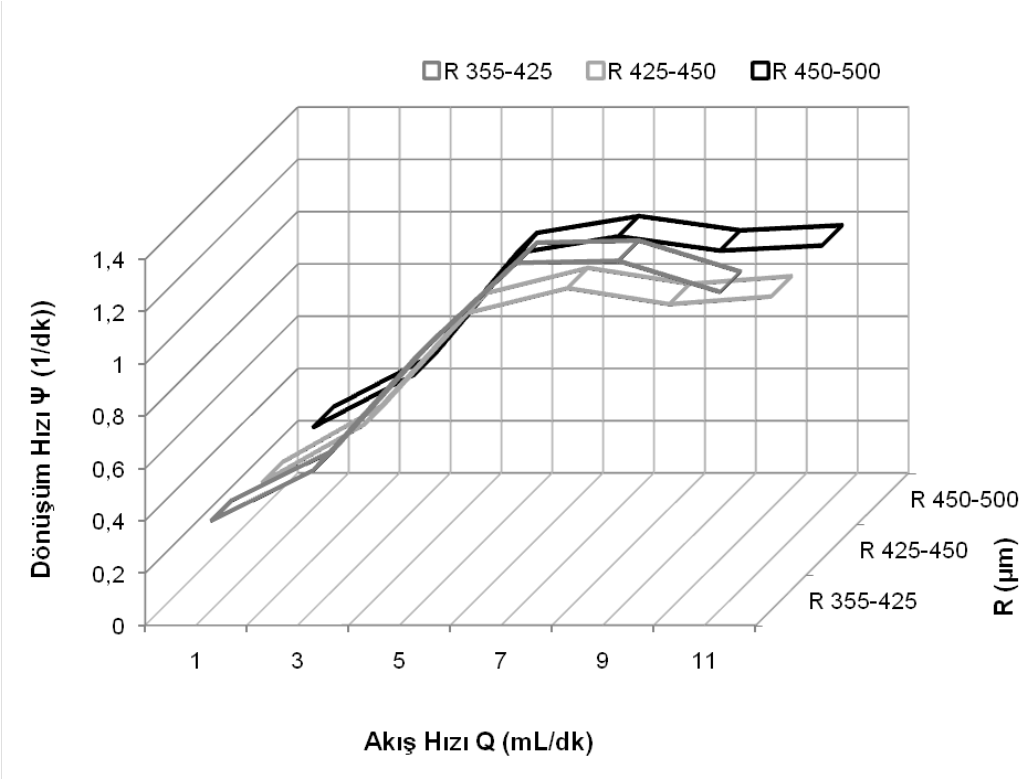
Akış hızının artması tek geçişli sistemde dönüşümü olumsuz yönde etkilemektedir. Bu ise akış hızının artması ile alıkonma süresinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Akış hızının enzimatik dönüşüm üzerindeki etkisini görebilmek için dönüşüm, alıkonma süresine bölünerek dönüşüm hızı değerleri hesaplanmıştır. Akış hızının dönüşüm hızına olan etkisi aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 4.27 - 4.30).



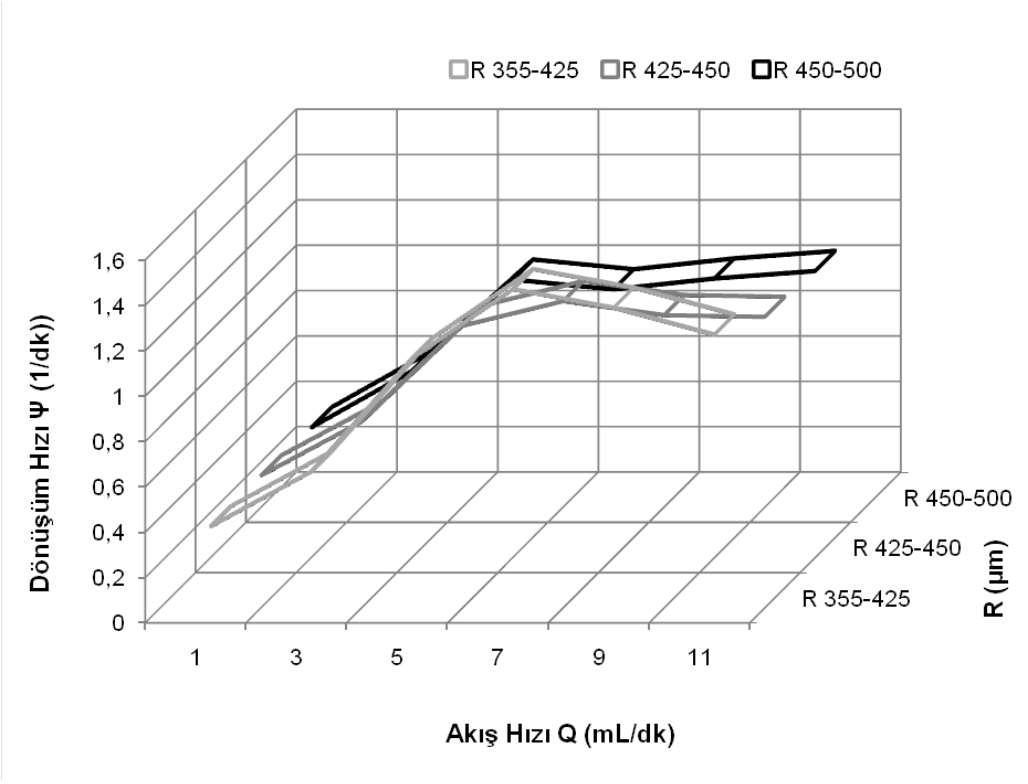
Şekil 4.27. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.28. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.29. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 5)



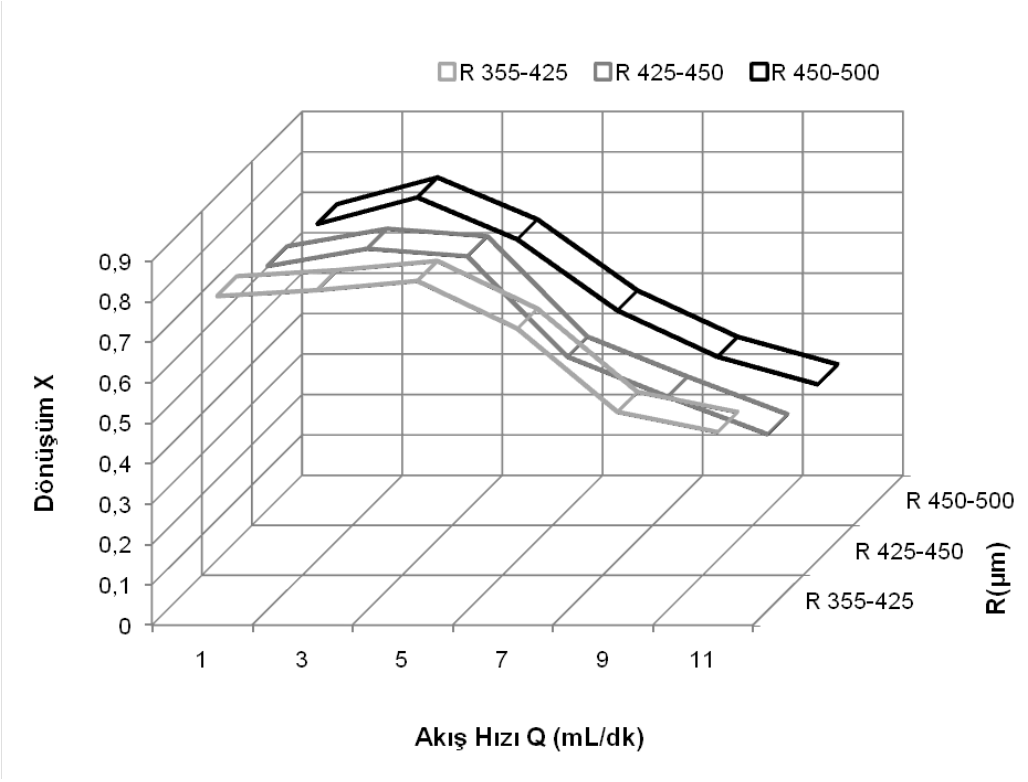
Şekil 4.30. Akış hızının dönüşüm hızı üzerine etkisi (L/D : 10)

Akış hızının artması dönüşüm hızının artmasına neden olmuştur. Bu artış miktarı yüksek akış hızlarında azalarak dönüşüm hızı plato değerine yaklaşmıştır. Akış hızının artması ile partikül yüzeyindeki kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve enzim substrat etkileşim veriminin de arttığı bilinmektedir (Cho and Bailey, 1978; Boyacı, 2001). Dönüşüm oranındaki artış kütle aktarım dirençlerinin ulaşabileceği minimum düzeye kadar yükselmiş ve bu değer sabit bir değere yaklaşmıştır.

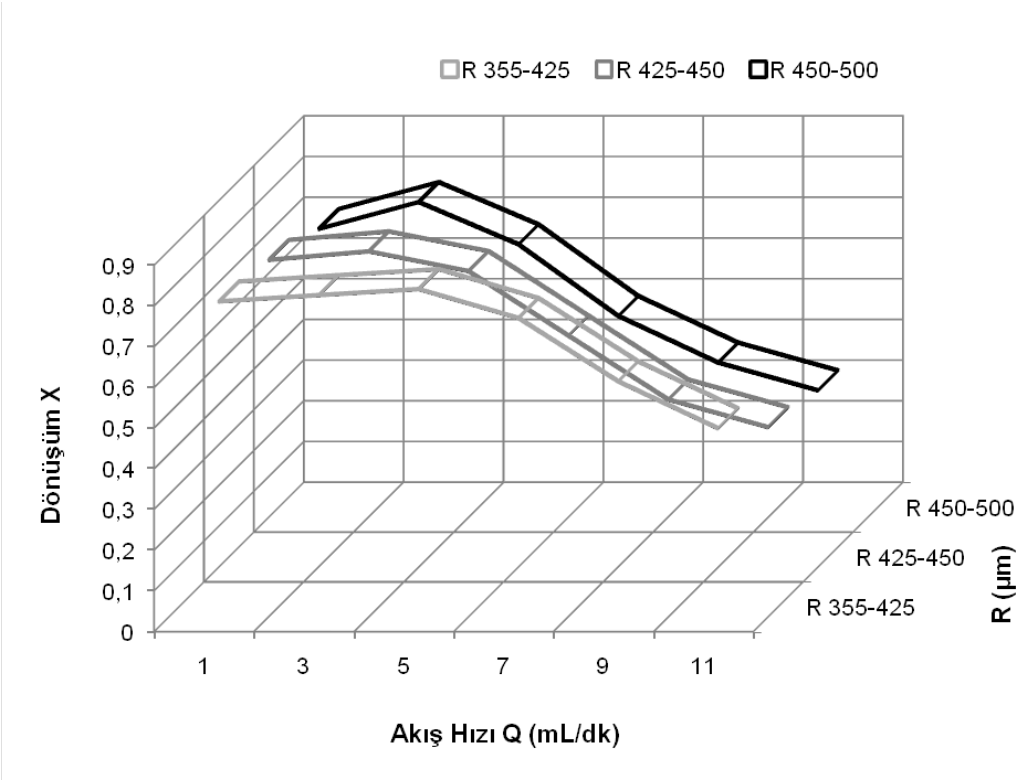
Akış hızlarının artması ile birim alıkonma süresinde dönüşüm oranının azaldığı görülmüştür. Düşük hızlarda tanecikler etrafındaki film tabakası direnci kırılmadığından tepkime hızları da düşüktür. Yüksek besleme akış hızlarına çıkıldığında da alıkonma süresi çok azaldığı için tepkime hızında bir azalma gözlenmiştir. Bu durum L/D oranı 10 olan kolonda daha net bir şekilde izlenmektedir.

Tüm kolonlarda partikül büyüklüğünün azalması ile dönüşüm oranında artış olduğu şekillerden net bir şekilde görülmektedir. Küçük partiküller daha yüksek etkinlik katsayısına ve daha düşük Thiele modülüne sahiptir. Bu özellikleri taşıyan partikülün kolon içerisinde daha yüksek verimle çalışması yani dönüşüm oranının yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Kolon verimi kolon L/D oranının artması ile arttığı, aynı hacimsel akış hızında daha yüksek dönüşüm değerlerinin elde edildiği yine aynı şekillerde görülmektedir.

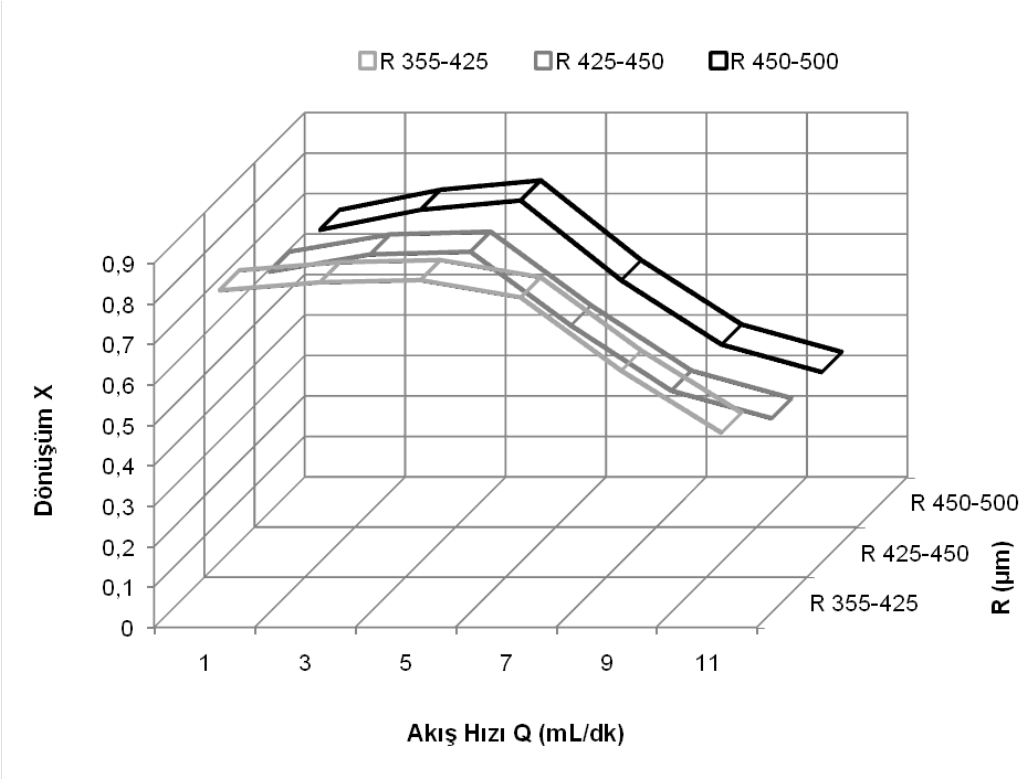
Akış hızının, partikül büyüklüğünün ve kolon L/D oranının dönüşüme etkisini belirlemek amacıyla dönüşüme karşı akış hızı grafiğe geçirilmiştir. Grafiksel gösterimi aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 4.31 - 4.34).



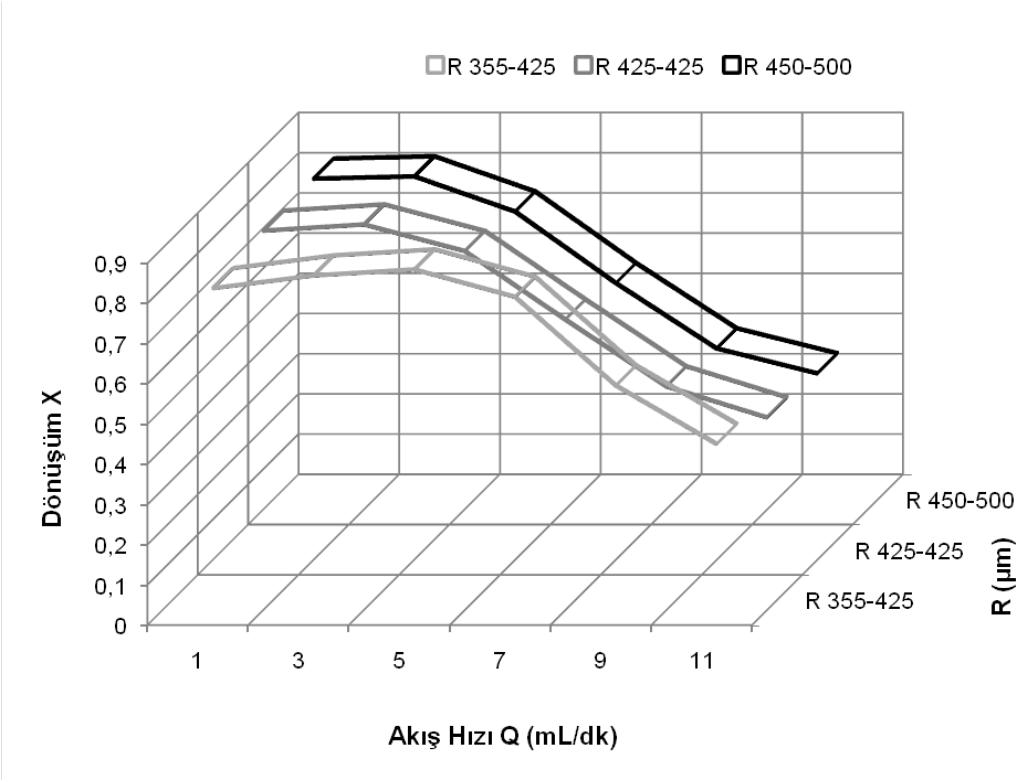
Şekil 4.31. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.32. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.33. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 5)



Şekil 4.34. Akış hızının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 10)

Şekillerden görüldüğü gibi akış hızının artması ile dönüşüm artmış ve sonra dönüşümün azaldığı görülmüştür. Düşük akış hızlarında film direncinin, yüksek hızlarda ise azalan alıkonma süresinin etkisiyle dönüşüm değerleri azalmıştır. Düşük hızlarda film dirençleri nedeniyle substrat ile katalizör partikül yeterince etkileşememiştir. Yüksek dönüşüm değerlerine ulaşmak için film dirençlerinin en düşük düzeyde tutulabilmesi için yüksek hızlarda çalışılmalı ancak bu sistem için $4\,\mathrm{ml/dk}$ değerinin üzerine çıkılmamalıdır.

Kolon L/D 10 oranının artması ile dönüşümün arttığı görülmektedir. Ayrıca önceki sonuçlarda da olduğu gibi dolgulu kolon sisteminde küçük partiküllerin kullanılmasının dönüşümü arttırdığı bir kez daha kanıtlanmıştır.

Önceki sonuçlarda yüksek L/D oranına sahip kolonların daha yüksek eksenel dağılım katsayısına sahip olduğu belirtilmişti. Bu sonuçlar; eksenel dağılım katsayısının partiküle tutuklu enzimin görünür reaksiyon hızını olumlu yönde etkilemiştir. Bu etki enzimatik reaksiyon hızı sınırlayıcı olana kadar sürmektedir. Damköhler sayısı;

$$\mathrm{Da} = \frac{-r_{S_0} V}{F_{S_0}} = \frac{k\, C_{S_0} V}{u_0 C_{S_0}} \tag{4.22}$$

Maksimum reaksiyon hızının maksimum kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanmaktadır. Damköhler sayısının 1'den küçük olması maksimum kütle aktarım hızının maksimum reaksiyon hızından büyük olduğunu (düşük kütle aktarım direnci), sistemde sınırlayıcı faktörün enzimatik reaksiyon olduğunu göstermektedir. Damköhler sayısının 1'den büyük olması durumunda ise yüksek kütle aktarım dirençleri nedeniyle reaksiyon için gerekli olan substratın yeterli miktarda (zamanda) enzime ulaşamadığını, sınırlayıcı faktörün kütle aktarım hızı olduğunu göstermektedir. Görüldüğü üzere Damköhler sayısı reaksiyon sistemi hakkında oldukça fazla bilgi vermektedir (Al-Muftah, 2004).

Çalışmanın bu bölümünde Damköhler sayısı üzerine partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Bu amaçla birinci dereceden reaksiyonlar için geliştirilmiş olan Danckwerts eşitliği kullanılmıştır. Düşük substrat derişimlerinde Michailes-Menten eşitliğinin birinci dereceden reaksiyon kinetiğine

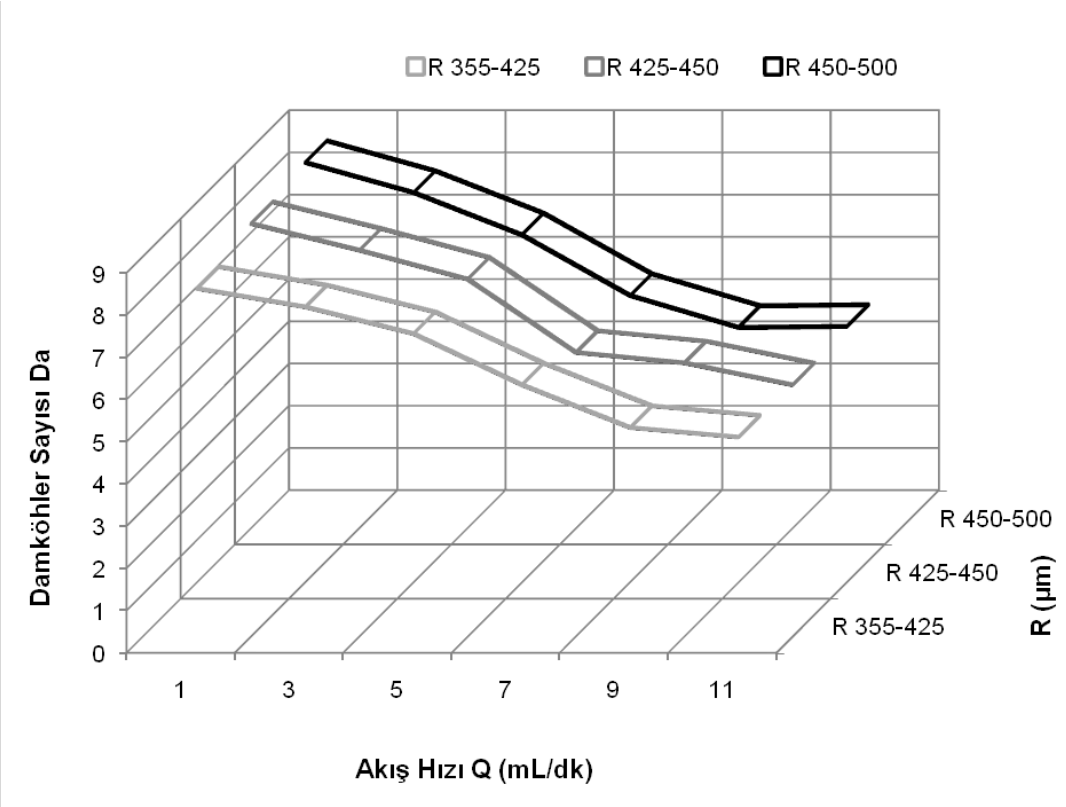
yaklaştığı bilinmektedir (Bailey and Ollis, 1986). Çalışma da K_m derişiminin altında çalışılmış ve enzim kinetiği birinci dereceden kabul edilmiştir.

Danckwerts eşitliği;

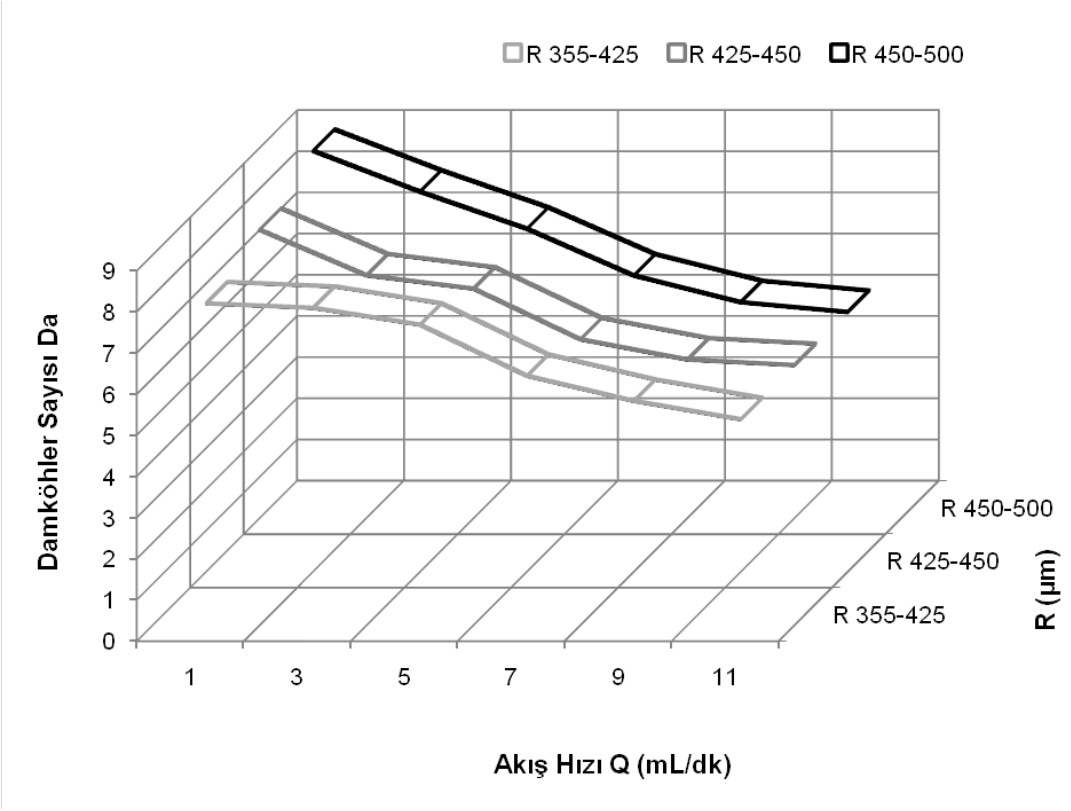
$$X = 1 - \frac{4q\exp(Pe_L/2)}{(1+q)^2\exp\left[\frac{Pe_L q}{2}\right] - (1-q)^2\exp\left[-\frac{Pe_L q}{2}\right]} \tag{4.23}$$

$$q = \sqrt{1 + \frac{4Da}{Pe_L}} \tag{4.24}$$

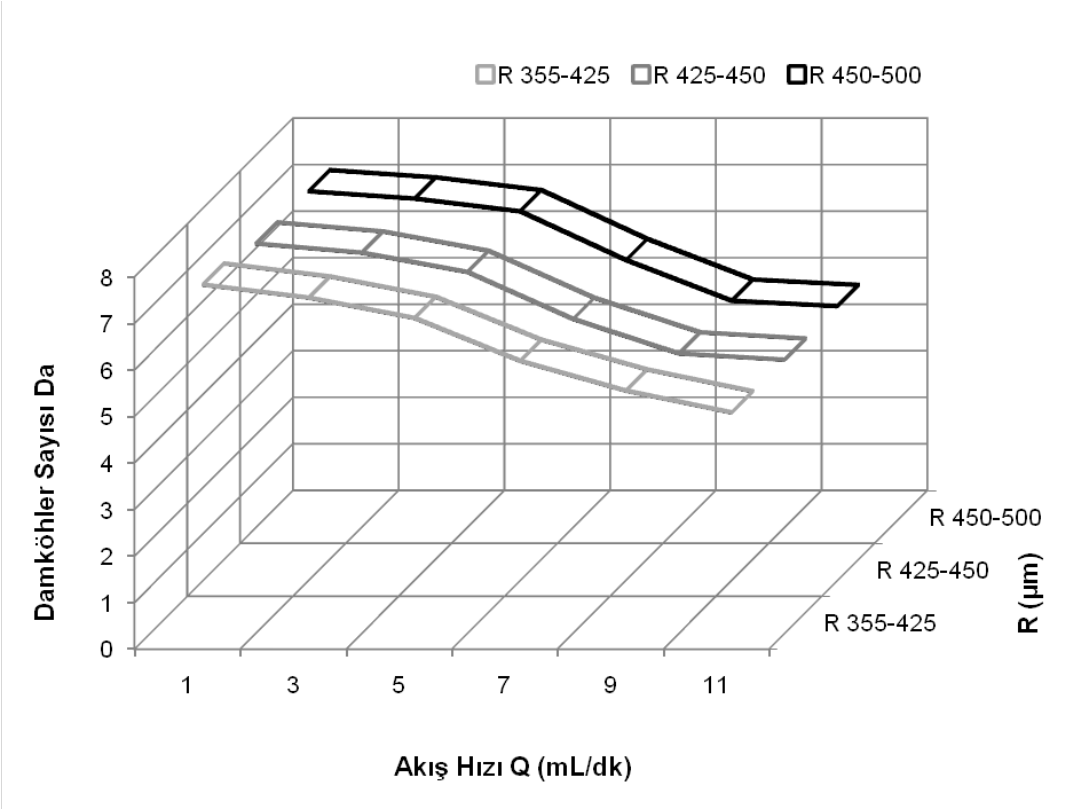
Damköhler sayısı, önceki bölümde belirlenen Peclet sayısı ve dönüşüm değerleri kullanılarak Eşitlik 4.23 ve Eşitlik 4.24 yardımıyla hesaplanmıştır. Akış hızının Damköhler sayısı üzerindeki etkisi aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 4.35 - 4.38).



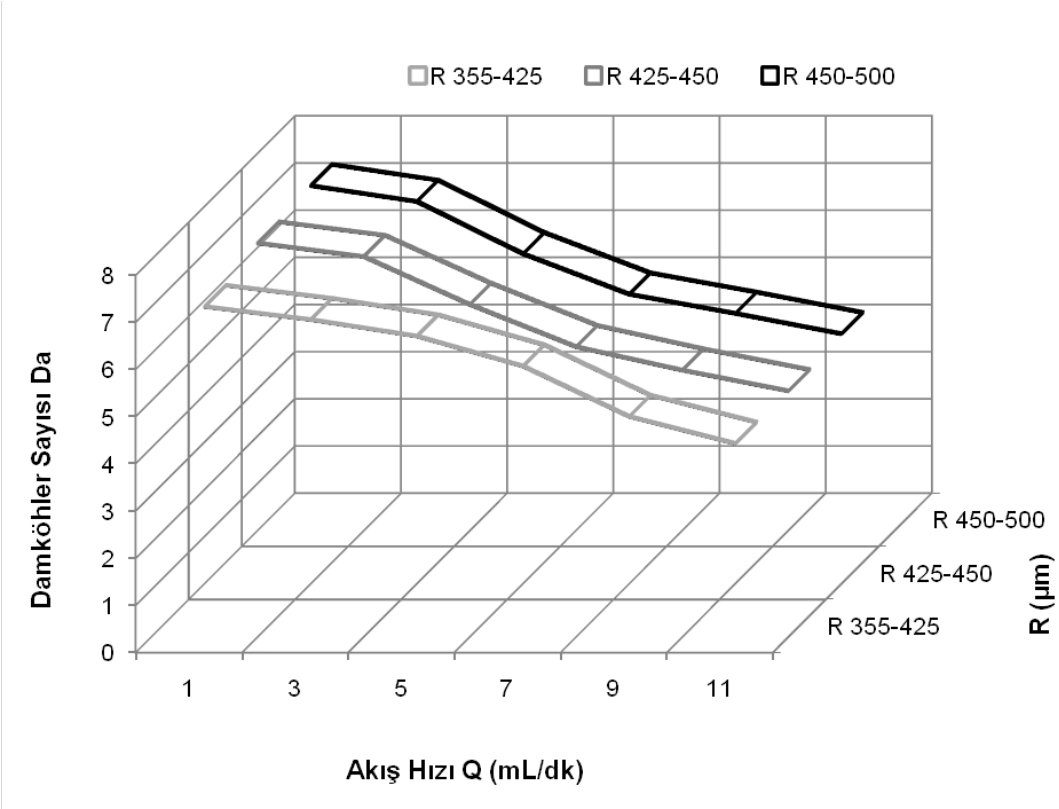
Şekil 4.35. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.36. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.37. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D : 5)



Şekil 4.38. Akış hızının Damköhler sayısı üzerine etkisi (L/D :10)

Akış hızının artması ile Damköhler (Da) sayısı, azalmakta ve daha yüksek akış hızlarında azalma yavaşlamaktadır. Da sayısının büyük olduğu bölgede akış hızının artması maksimum reaksiyon hızındaki artışın maksimum kütle aktarım hızındaki artıştan daha fazla olduğunu göstermektedir. Akış hızının artması ile kütle aktarım dirençlerinin azalması beklenen bir durumdur. Bu sayede daha fazla substrat enzime ulaşmakta ve reaksiyona girebilmektedir. Bu durum enzimatik reaksiyon için hız kısıtlayıcı basamağın kütle aktarım hızı olduğunu ifade etmektedir.

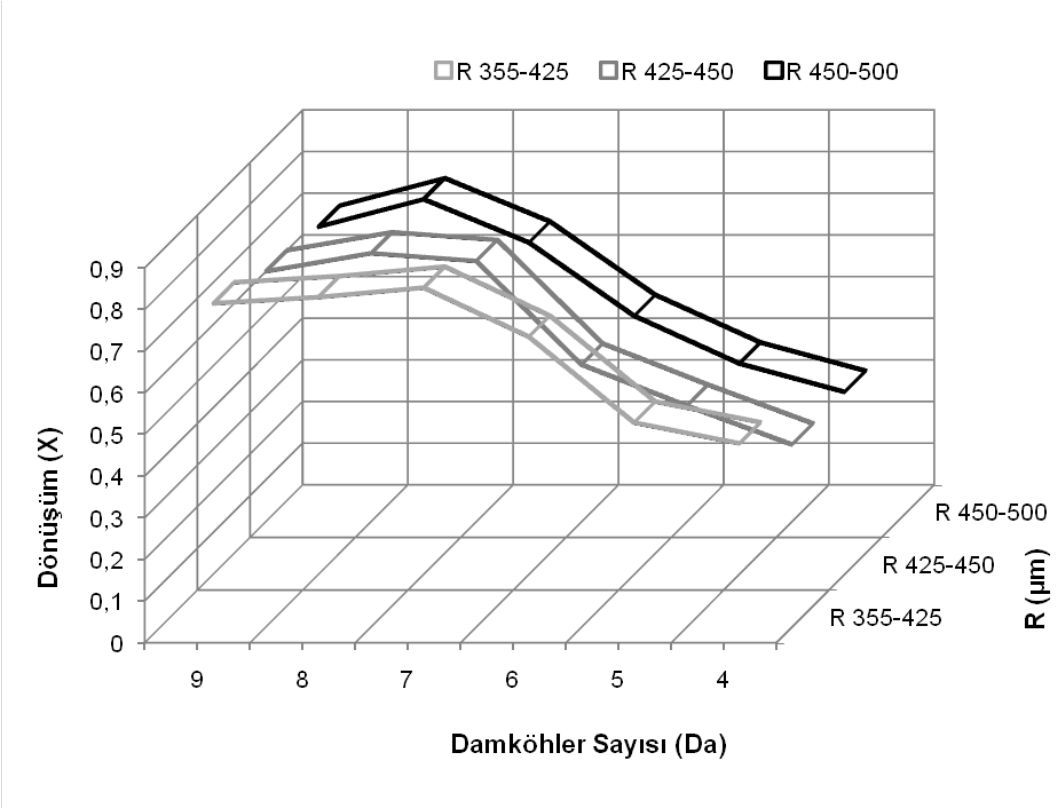
Yüksek akış hızlarında ise daha fazla substrat enzimle buluşmakta ancak sınırlı miktarda enzim, katalizleyebileceğinden fazla substrat ile etkileşemeyeceği için sınırlayıcı faktör enzim miktarı (aktivitesi) olmaktadır. Bu nedenle; maksimum kütle aktarım hızının artmasına karşılık maksimum reaksiyon hızının sabit kalması yüzünden yüksek akış hızlarında Da sayısının azaldığı görülmektedir.

Kolon L/D oranının artması ile Da sayısı şekillerde görüldüğü gibi artmıştır. Büyük L/D oranına sahip kolonların düşük Peclet sayısına ve yüksek eksenel dağılım

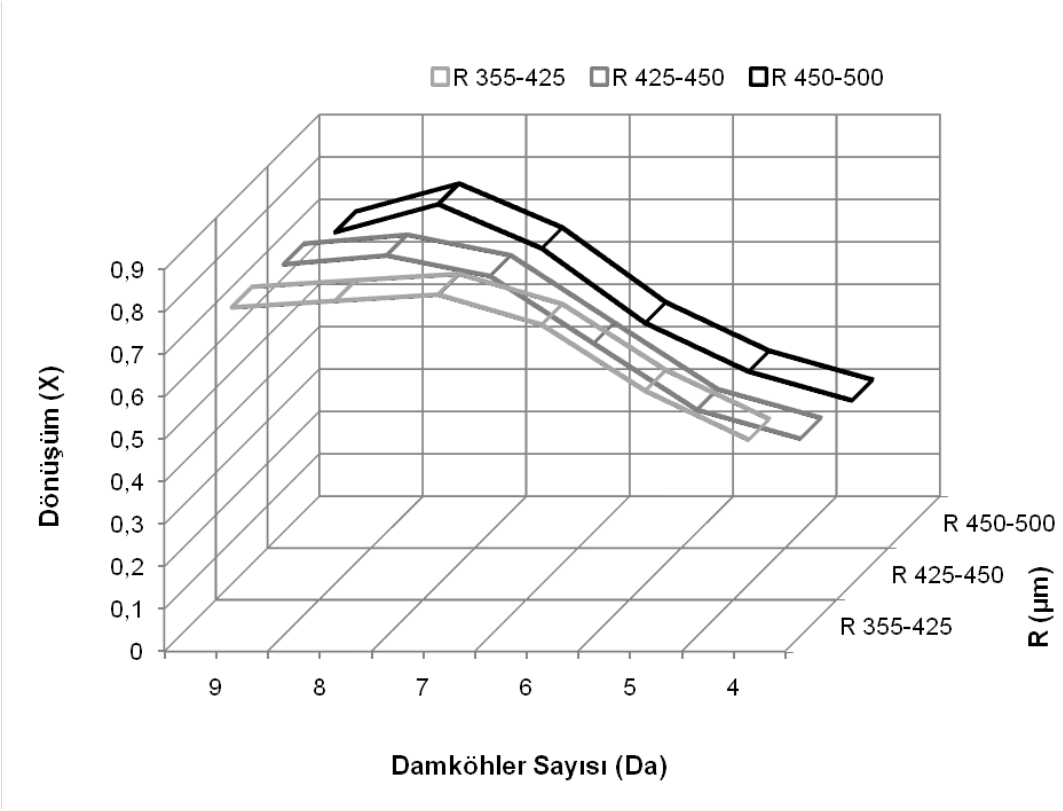
katsayısına, böylece daha yüksek kütle aktarım hızına sahip olduğunu önceki sonuçlar göstermiştir. Büyük L/D oranına sahip dolgulu kolon reaktörlerde görünür enzimatik reaksiyon hızının daha yüksek olmasına ve bu durumun da Da sayısının artmasına neden olduğu söylenebilmektedir.

Yine şekillerde görüldüğü üzere partikül büyüklüğünün azalması ile az da olsa Da sayısı artmıştır. Bu durum partiküllerin Thiele modülü ve etkinlik katsayıları ile ilgili sonuçlar ile uyum sağlamaktadır.

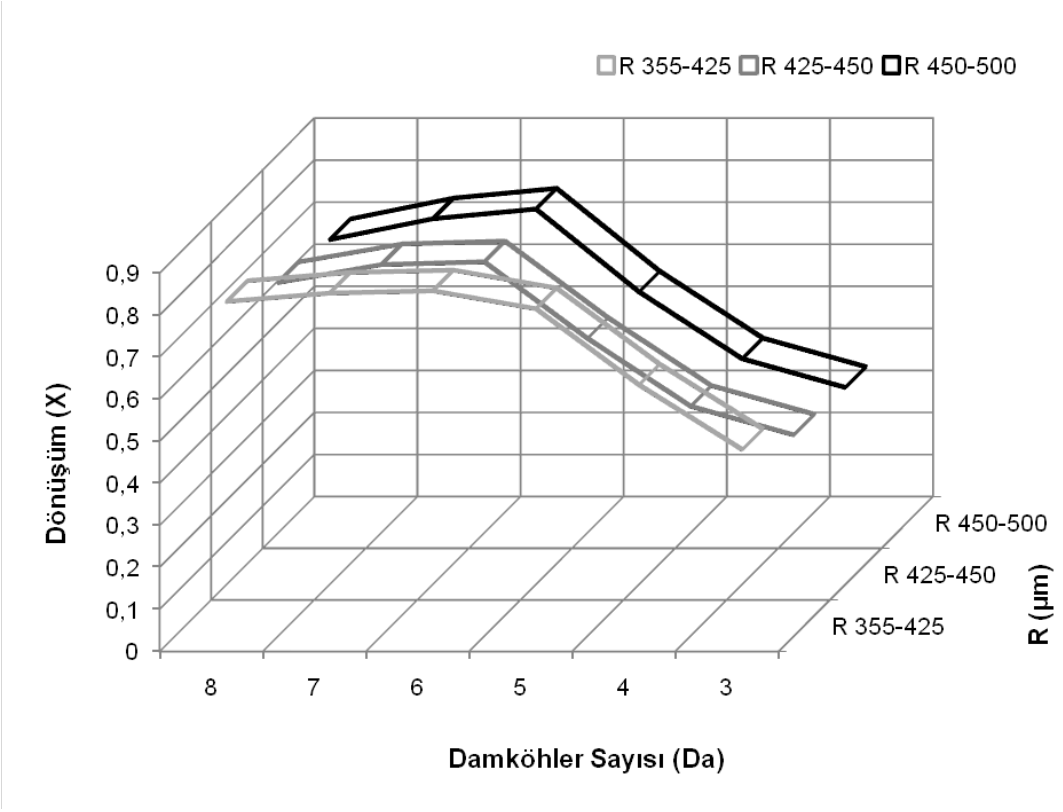
Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisini belirlemek amacıyla dönüşüme karşı Da sayısı grafiğe geçirilmiştir. Sonuçların grafiksel gösterimi Şekiller 4.39-4.42'de verilmektedir.



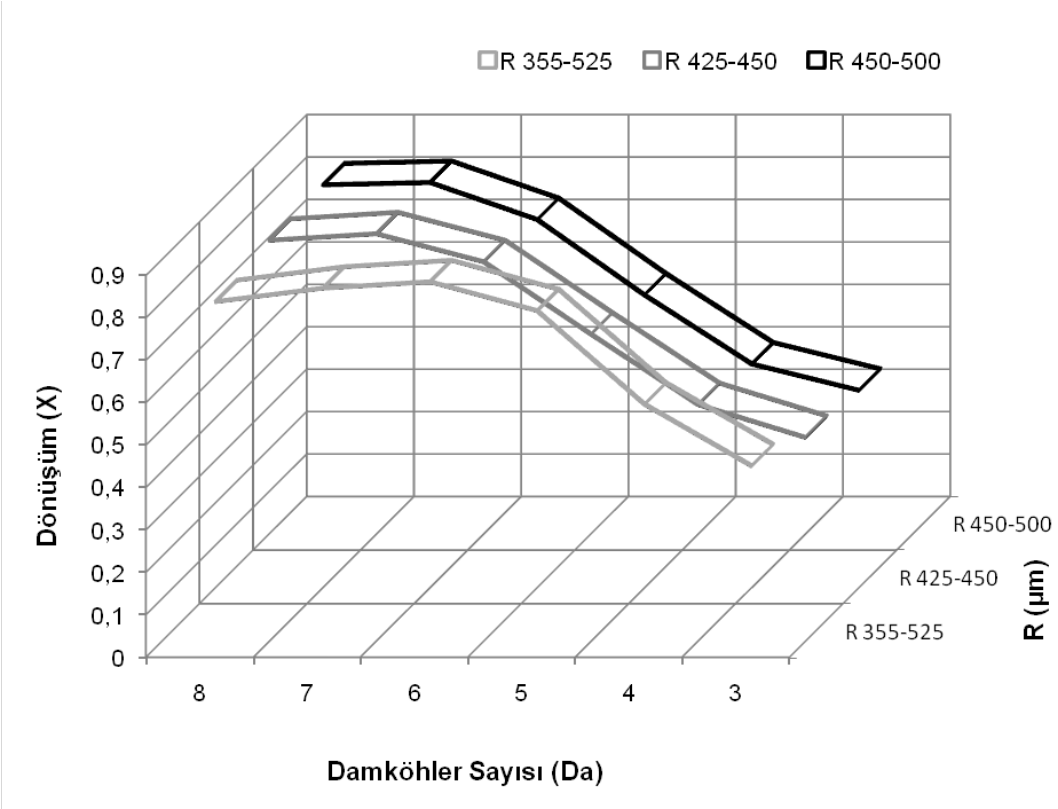
Şekil 4.39. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.40. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.41. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 5)



Şekil 4.42. Damköhler sayısının dönüşüm üzerine etkisi (L/D : 10)

Birinci dereceden reaksiyonlar için Damköhler sayısı;

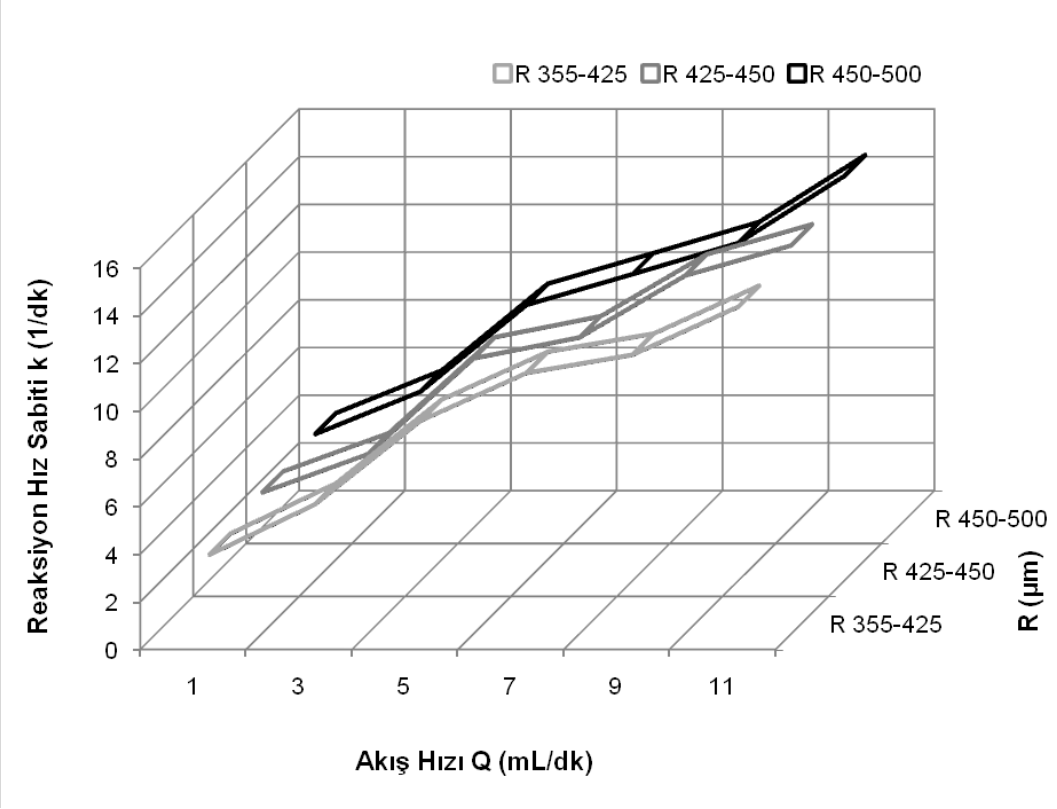
$$Da = \tau . k \tag{4.25}$$

olarak tanımlanmaktadır. Burada τ alıkonma süresini (dk) ve k; reaksiyon hız sabitini (dk^{-1}) göstermektedir. Denklemde de görüldüğü gibi Da sayısı iki şekilde arttırılabilmektedir. Bunlar; alıkonma süresi ve reaksiyon hız sabitidir. Akış hızının arttırılması alıkonma süresinin azalmasına neden olduğu için Da sayısı olumsuz etkilenmektedir. Diğer yandan akış hızının artması kütle aktarım hızını artırdığı için reaksiyon hız sabiti ve dolayısıyla Da sayısı artmaktadır. Bundan dolayı çalışmada akış hızı optimizasyonunun yapılması önem kazanmaktadır.

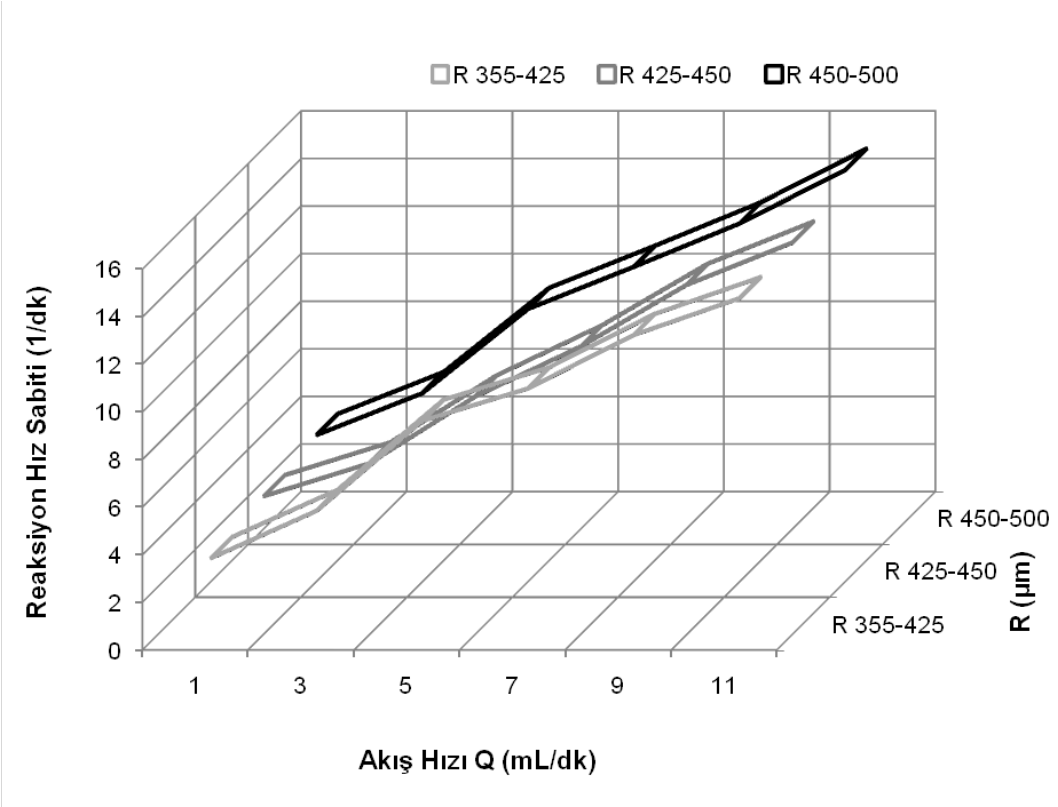
Damköhler sayısının yüksek olduğu akış hızlarında, dönüşüm değerinin de yüksek olduğu, akış hızı-Da sayısı ve Da sayısı-dönüşüm grafikleri birlikte incelendiğinde daha net bir şekilde görülmektedir. Bu akış hızı, kolon L/D oranına ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak $1-10$ mL/dk aralığında değişmektedir. Önceki sonuçlara

uygun olarak, kolon L/D oranının artması ve partikül çapının küçülmesiyle dönüşüm değerinin ve Da sayısının olumlu yönde etkilendiği belirlenmiştir.

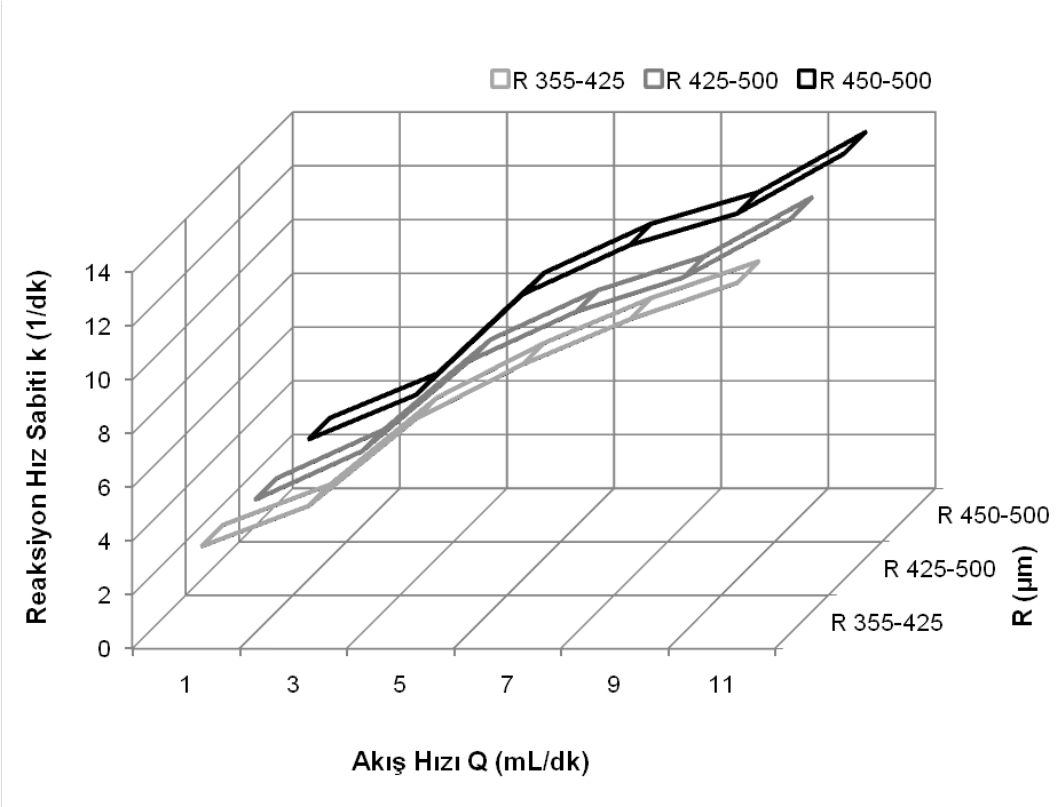
Akış hızının, partikül büyüklüğünün ve kolon L/D oranının reaksiyon hız sabitine etkisini belirlemek amacıyla Eşitlik 4.23 kullanılarak reaksiyon hız sabiti hesaplanmıştır. Reaksiyon kinetiği daha önceden belirtildiği gibi düşük substrat derişiminde çalışıldığı için birinci dereceden kabul edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.43 - 4.46'da görülmektedir.



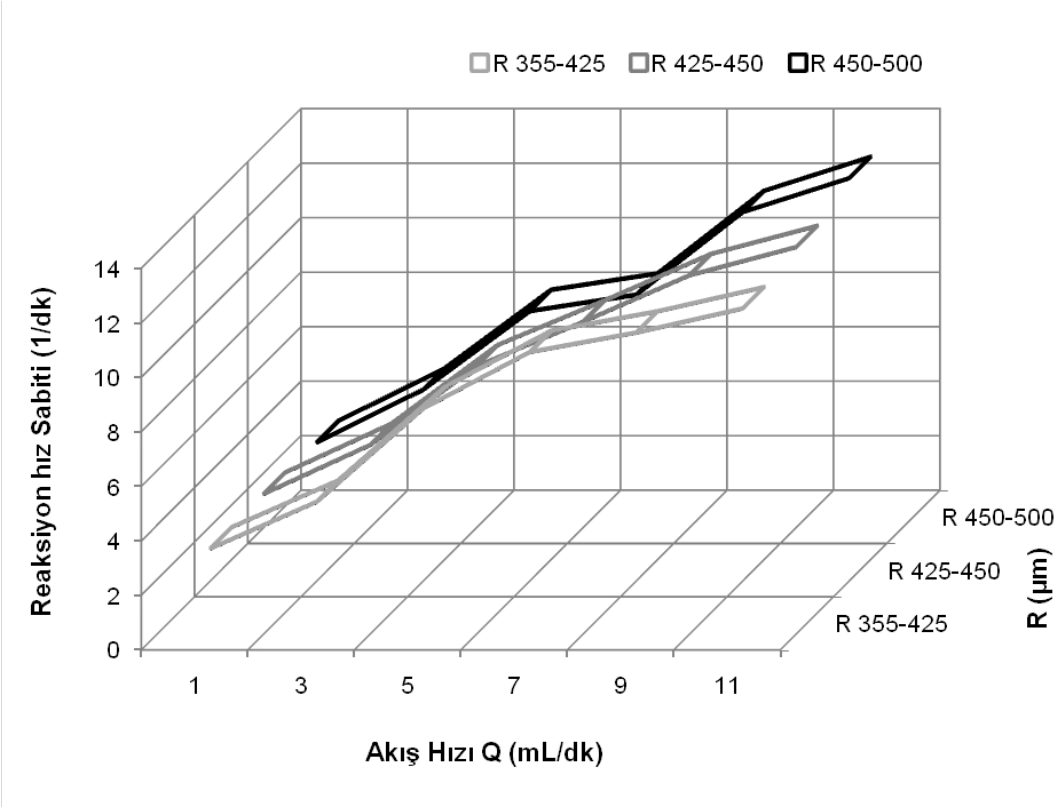
Şekil 4.43. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 1)



Şekil 4.44. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 2)



Şekil 4.45. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 5)



Şekil 4.46. Akış hızının reaksiyon hız sabiti üzerine etkisi (L/D : 10)

Akış hızının artması ile reaksiyon hız sabiti 6 mL/dk akış hızına kadar hızlı artmış daha sonra artış miktarı yavaşlayarak plato değerine yaklaşmıştır. Bu akış hızının üzerine çıkılması ile reaksiyon hız sabitindeki çok az artışa karşın alıkonma süresinin azalmasıyla Da sayısı düşmektedir. Böylece daha düşük dönüşüm değeri elde edilmektedir.

Kolon L/D oranın artması ile reaksiyon hız sabiti de artmıştır. Bu sonuçlar dönüşüm hızı ve Da sayısı sonuçları ile uyum göstermektedir. Partikül büyüklüğü ile reaksiyon hız sabitinde kayda değer bir değişim görülmemiştir.

Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; β-galaktozidaz enzimi tutuklanmış Duolite A568 reçine ile hazırlanmış dolgulu kolon reaktörlerde birim alıkonma süresinde yüksek dönüşüm elde etmek için partikül çapı küçük (390 μm) ve yüksek L/D (L/D : 10) oranına sahip kolonların tercih edilmesinin gerektiği görülmektedir. Akış hızının ise 4 mL/dk olmasının yeterli olduğu belirlenmiştir.

Enzim Tutuklu Dolgulu Kolon Reaktörün Test Edilmesi

Çalışmanın sonuçlarına uygun olarak hazırlanan enzim tutuklu dolgulu kolonun performansı süt örneği kullanılarak test edilmiştir.

Birim alıkonma süresinde yüksek dönüşüm elde etmek için partikül çapı küçük (390 μm) reçineye optimum tutuklama parametreleri ile enzim tutuklanmış ve L/D oranı 10 olan kolona enzim tutuklu partiküllerin doldurulmasıyla enzim tutuklu dolgulu kolon hazırlanmıştır. Akış hızı 4 mL/dk olarak ayarlanmış ve bu sistemden model laktoz çözeltisi (% 4.5) yerine yağsız UHT süt geçirilmiştir. Oda sıcaklığında (20 °C) yürütülen çalışmada, sistemden kolon hacminin 4 katı kadar süt geçirildikten sonra 1 saniye ara ile 10 örnek alınmış ve reaksiyon ürünlerinden biri olan glukoz miktarı ölçülmüştür. Ölçümlerin ortalaması alınmış ve laktozunun glukoza dönüşüm oranı hesaplanmıştır. Enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörün sütteki laktozu % 55 oranında hidrolize ettiği belirlenmiştir. Tek geçişli sürekli sistemde çalışan enzim tutuklu dolgulu kolonun beklenen dönüşümü sağladığı görülmüş ve bu sonuçla çalışmanın amacına ulaşılmıştır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, sürekli sistemde düşük laktozlu süt üretimde kullanılmak üzere yüksek performanslı enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör tasarımı amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalar ve sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

İlk aşamada β-galaktozidaz'ın reçineye (Duolite A568) adsorpsiyonu incelenerek sonuçlar matematiksel olarak değerlendirilmiş ve Langmuir ve Freundlich izotermleri ile modellenmiştir. Adsorpsiyon çalışmalarında Freundlich ve Langmuir izotermlerine ve kinetik modellere olan uygunluk analizleri en düşük kareler regresyonu metodu (R^2) uygulanmıştır. Elde edilen verilerle adsorpsiyon prosesinin Langmiur izotermine uyduğu ve yapılan hesaplamalar sonucunda maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_0) $35\,^{o}C$'de $0.051\,mg/g$ saptanmıştır. Enzimin reçineye adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması için pseudo-birinci derece ve pseudo-ikinci derece kinetik modelleri test edilmiş ve adsorpsiyon prosesinin ikinci derece kinetik modele uyduğu belirlenmiştir.

Enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörün performansını etkileyebilecek parametreler olan enzim tutuklama parametreleri (başlangıç enzim derişimi, tutuklama süresi, pH'sı ve sıcaklığı), partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızı test edilmiştir. Maksimum görünür enzim aktivitesinin elde edildiği parametreler optimum parametreler olarak seçilmiştir.

Enziminin zayıf bazik karakterde reçineye optimum tutuklama parametreleri; başlangıç enzim derişimi $5.0\,mg/mL$, tutuklama süresi $60\,dk$, tutuklama pH'sı 4.5 ve tutuklama sıcaklığı $35\,°C$ olarak elde edilmiştir. Bu aşamada, partikül üzerinde maksimum enzim aktivitesi hedeflenmiş ve bu aktiviteye sahip partiküllerin tutuklanmasında kullanılan parametreler optimum tutuklama parametreleri olarak belirlenmiş ve çalışmada bu parametreler kullanılmıştır.

Serbest ve tutuklu enzimler için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Partiküllerde reaksiyon ve difüzyon etkinliklerini incelemek için, farklı büyüklüklerdeki enzim tutuklu partiküllerin Thiele modülü ve etkinlik katsayıları hesaplanmıştır. Partikül büyüklüğünün artması ile Thiele modülünün arttığı, etkinlik katsayısının azaldığı belirlenmiştir. Bu durum partikül büyüklüğünün

artması ile difüzyon dirençlerinin artması sonucu substrat-enzim etkileşmesinin olumsuz yönde etkilenmesi şeklinde açıklanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucu; maksimum görünür aktivitenin belirlendiği 390 μm partikül büyüklüğüne sahip reçinenin daha sonraki aşamada kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu büyüklükteki partikül için Thiele modülü ve etkinlik katsayısı değerleri sırasıyla 1.23 ve 0.91 olarak belirlenmiştir.

Kinetik parametreler K_m ve V_{max} serbest enzim için sırasıyla 73.97 mmol/L ve 59.17 µmol/dk mg enzim ve tutuklu enzim için sırasıyla 108,96 mmol/L ve 74,07 μmol/dk mg tutuklu enzim olarak bulunmuştur. Tutuklama ile enzimin K_m değerinin arttığı görülmektedir. Reçine yüzeyinde bulunan enzimin K_m değeri difüzyon sınırlamaları nedeniyle artmış yani enzimin substratına olan ilgisi azalmıştır

Partikül büyüklüğünün, L/D oranının ve akış hızının, enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör kinetiği üzerine etkisi uyarı-cevap tekniği ile incelenmiş, kolon girişinden impuls tipi bir uyarı verilmiş, kolon çıkışında cevap eğrileri çizilmiş ve elde edilen veriler moment tekniği ile incelenmiştir. Kolon L/D oranının artması ve partikül büyüklüğünün azalması ile kolon performansı (verimi) artmıştır. Akış hızının artması ile kolon performansı belirli akış hızına kadar artış göstermiş, yavaşlayarak platoya yaklaşmış ve akış hızlarının artması ile azalmıştır. Bu sonuçlar kolon Peclet sayısı, eksenel dağılım katsayısı, dönüşüm hızı, Damköhler sayısı ve reaksiyon hız sabiti değerleri hesaplanarak açıklanmıştır. Bu veriler doğrultusunda hazırlanan enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör sisteminde kullanılması uygun olan partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızı sırasıyla; 390 μm, 10 ve 4 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına uygun olarak hazırlanan enzim tutuklu dolgulu kolonun performansı süt örneği kullanılarak test edilmiştir. Enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörün sütteki laktozu % 55 oranında hidrolize ettiği belirlenmiştir. Tek geçişli sürekli sistemde çalışan enzim tutuklu dolgulu kolonun beklenen dönüşümü sağladığı görülmüş ve bu sonuçla çalışmanın amacına ulaşılmıştır.

6. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Süt ve süt ürünlerindeki temel karbonhidrat laktozdur. Laktoz, laktaz enzimi tarafından glukoz ve galaktoza hidrolize edilerek emilmektedir. Organizmada laktaz eksikliği ya da yokluğunda laktozun hidrolizi olamayacağından emilimi de gerçekleşememektedir. Laktoz intolerantlar, laktoz içeriğinden dolayı süt ve ürünlerini tüketememektedir. Laktoz intolerantlar için düşük laktozlu süt üretimi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, laktoz intolerantların tüketebilecekleri, sürekli sistemde çalışan enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör hazırlamak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yürüttüğümüz çalışmada, optimum tutuklama parametreleri ile reçine yüzeyine laktaz enzimi tutuklanarak kolon bu partiküllerle doldurulmuştur. Dolgulu kolon reaktörde, partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızı optimizasyonu yapılarak kolon performansı süt ile test edilmiştir. Birim alıkonma süresinde yüksek dönüşüm elde etmek için L/D oranı 10 olan kolon, enzim tutuklu küçük (390 μm) reçine ile doldurulmuş ve 4 mL/dk akış hızında, 0.91 dakika alıkonma süresinde % 55 laktoz dönüşümü elde edilmiştir.

Literatürde laktoz intolerantların % 70 ve üzerindeki laktozu düşürülmüş süt ve ürünlerini tüketebildikleri rapor edilmiştir (Kosikowski, 1988). Bu nedenle literatürde düşük laktozlu süt üretimi üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Kesikli sistemle yapılan çalışmalarda serbest ve tutuklu enzimler kullanılmıştır. Kesikli sistemle serbest formda *Kluyveromyces fragilis* kaynaklı β-galaktozidaz yağsız süt tozu ile 2-3 saatlik inkübasyon süresinde % 80-70 dönüşüme ulaşılmıştır (Matioli, 2003). Serbest enzim kullanılması maliyeti arttırdığından genelde tutuklu enzimler tercih edilmektedir. Tutuklu enzimler serbest enzimlere göre daha az aktif olmakla birlikte daha kararlı olması ve kullanımda aktif oldukları süre serbest enzimlere göre önemli derecede fazla olmasından dolayı çalışmamızda tutuklu enzim kullanılmıştır.

Kesikli sistemde yapılan bir çalışmada, *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β-galaktozidaz'ın grafite çapraz bağla tutuklanarak laktozun hidrolizi incelenmiş ve 37 derecede 3 saatte laktozun hidrolizasyon derecesi % 70 ulaşılmıştır. (Zhou and Chen, 2001a). Pamuklu kumaşa enzim tutuklanarak yapılan bir başka çalışmada kesikli sistemde 2 saat inkübasyon süresinden sonra % 95 dönüşüme ulaşılmıştır (Li et. al., 2007). Çalışmamızda kullandığımız *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-

galaktozidaz Ca- aljinat kapanlama yöntemiyle çapraz bağla tutuklanmış ve 37 derecede süt ile 3 saat inkübasyon süresinde % 77 dönüşüme ulaşılmıştır (Haider, 2009). Literatürde kesikli sistemle, tutuklu enzimlerin kullanıldığı çalışmalarda yüksek dönüşümler elde edilmiştir. Laktozun kesikli sistemde hidrolizasyonu; çiğ sütün ön işlemlerden geçirilmesi, pastörize edilmesi, enzimin çalışma sıcaklığına soğutulması, hidroliz için 3-7 saat inkübe edilmesi, gerekli hidroliz derecesine ulaşılınca tutuklu enzimin ayrılması ve sütte kalabilecek olan enzimi inaktive edilmesi için tekrar ısıl işlem uygulanması ve soğutulup paketlenmesi aşamalarından oluşmaktadır. Bütün bu işlemler dizisi hem zaman almakta, hem de enerji maliyetini arttırmaktadır. Kesikli sistemin bu dezavantajları yüzünden son yıllarda laktozun enzimatik hidrolizinde sürekli sistem kullanılması yönünde çalışmalar artmıştır. Süt ve ürünleri endüstrisine katkı sağlayacağını düşünerek düşük laktozlu süt üretiminde kullanılmak üzere sürekli sistemle yüksek dönüşüm sağlayacak enzim tutuklu dolgulu kolon reaktör hazırlanması çalışmamızın kapsamını oluşturmuştur.

Dolgulu kolonun performansını etkileyen parametreler partikül büyüklüğü, kolon L/D oranı ve akış hızıdır. Her bir parametrenin optimizasyonu yapılarak kolonun verimi arttırılabilmektedir.

Partikül büyüklüğünün dönüşüm üzerine etkisini belirlemek için üç farklı çaplarda partiküller ile yaptığımız çalışmada partikül çapının küçülmesiyle dönüşümün arttığı görülmüştür. Partikül çapının küçülmesiyle kolon içine yerleştirilen partikül sayısının artması ile enzimin tutuklandığı yüzey alanın artmasıda önemli bir etkendir. Kolon verimini arttırmak için küçük partiküllerle çalışılmalıdır. Bununla beraber partikül büyüklüğü azaldıkça dolgulu kolonda basınç düşmesi artacağından tepkime hız verileri elde edilirken kütle transferinin tepkimeyi sınırlamadığı akış hızına yükseltilmelidir (Fogler, 1999).

Kolon içerisinde büyük partiküllerde difüzyon mesafesinin küçük partiküllere göre daha fazla olması nedeniyle partikülün merkezine yaklaşıldıkça substrat derişiminin azalması ve merkeze yakın bölgelerde tutuklu enzimlerin etkin bir şekilde çalışmadığı anlamına gelmektedir. Thiele modülünün küçük değerleri yüzey tepkimesi kontrolünü ve substratın önemli bir miktarının tepkimeye girmeden katalizör partikülün içine doğru iyi difüzlendiğini ifade etmektedir. Thiele modülünün büyük değerleri yüzey tepkimesinin hızlı olduğunu ve girdilerin

katalizör partikülün yüzeyine yakın bölgede harcandığını göstermektedir. Çalışmamızda partikül çapları büyüdükçe Thiele modülü artmış etkinlik katsayısı ise azalmıştır. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda da aynı durum gözlenmiştir (Fogler,1999; Ladero; 2001; Boyacı, 2001; Al-Muftah, 2005). Etkinlik faktörü 0 ile 1 arasında değişmekte olup difüzyon ve tepkime sınırlamalarının bağıl önemini ifade eder. Etkinlik faktörünün birden küçük olması durumu, kütle aktarım dirençlerinin katalizörün görünür aktivitesini azalttığını göstermektedir. Partikül çapı 475 den 390 μm azalırken Thiele modülü 1.50 den 1.23 düşmüş ve etkinlik faktörü de 0.87 den 0.91 yükselerek 1'e yaklaşmıştır. Çalışma da etkinlik faktörünün 1'e yaklaşmasıyla dolgulu kolonun performansı artmıştır. Daha somut bir ifadeyle küçük partiküller ile hazırlanan kolonda daha yüksek dönüşüm değeri elde edilmiştir. Daha yüksek dönüşüm değerlerine ulaşmak için partikül çapının 390 μm'den küçük olmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Kolon L/D oranın artmasıda enzimatik dönüşümü olumlu etkilemiştir. Çalıştığımız dört farklı L/D oranından en yüksek dönüşüm L/D 10'da elde edilmiştir. Kolon çapının azalması ve kolon boyunun artmasıyla kolon içinde daha iyi bir eksenel dağılım sağlanmıştır.

Dolgulu kolon performansını etkileyen bir diğer parametrede akış hızıdır. Akış hızının artması ile dönüşüm belli bir noktaya kadar artmış sonrasında akış hızının artması ile dönüşüm azalmıştır. Yüksek akış hızlarına çıkıldığında alıkonma süresi çok azaldığı için tepkime hızında bir azalma görülmektedir. Akış hızının artması ile partikül yüzeyindeki kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve enzim substrat etkileşim veriminin de arttığı bilinmektedir (Cho and Bailey, 1978).

Düşük akış hızlarında daha yüksek dönüşüm değerleri elde edilir. Yapılan benzer bir çalışmada üç faklı akış hızında dönüşüm değerine bakılmış ve düşük akış hızında daha yüksek dönüşüm olduğu görülmüştür (Mammarella, 2006). Aynı yönde yapılan bir başka çalışmada da düşük akış hızında yüksek dönüşüme ulaşılmıştır (Carrara and Rubiolo, 1997).

Çok düşük akış hızlarında tanecikler etrafındaki film tabakası direnci kırılmadığından tepkime hızları da düşüktür. Düşük hızlarda film dirençleri nedeniyle substrat ile katalizör partikül yeterince etkileşememiştir. Yüksek dönüşüm değerlerine ulaşmak için film dirençlerinin en düşük düzeyde

tutulabilmesi için akış hızı optimize edilmelidir, bu çalışma için 4 ml/dk değerinin üzerine çıkılmamalıdır. Düşük akış hızlarında film direncinin, yüksek hızlarda ise azalan alıkonma süresinin etkisiyle dönüşüm değerleri azalmaktadır.

Sürekli sistemle yürüttüğümüz çalışmada hazırladığımız enzim tutuklu dolgulu kolon reaktörün performansı yağsız UHT süt ile test edilmiştir. Dolgulu kolonda tek geçişle yürüttüğümüz çalışma da 0.91 dakikalık alıkonma süresinde % 55 dönüşüm elde edilmiştir. Literatürde Duolite A568 yüzeyine *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktozidaz tutuklanarak hazırlanmış enzim tutuklu dolgulu kolon ve bu kolonla laktozu düşürülmüş sütün dönüşümü üzerine yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde sürekli sistemde yürütülen benzer çalışmalar bulunmaktadır. *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β-galaktozidaz'ın grafit yüzeyine çapraz bağlayıcı gluteraldehit ile gerçekleştirilen tutuklama işleminden sonra yağsız sütteki laktozun hidrolizi incelenmiş ve yapılan çalışmada 7 ml/dk akış hızında 15 dakika alıkonma süresinde yaklaşık % 90 laktoz dönüşümü elde edilmiştir (Zhou and Chen, 2001a). Geri döngüsüz yapılan bir başka çalışmada ise 12 dakika alıkonma süresinde % 30, 44 dakika alıkonma süresinde de dönüşümün yaklaşık 2 katına çıktığı rapor edilmiştir (Li, 2007).

Çalışmamız literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslandığında çok düşük alıkonma süresinde yüksek dönüşüm sağlanmıştır. Tek geçişli sistemle elde ettiğimiz bu dönüşüm oranı, sistem parametrelerinde değişiklikler yapılarak artırılabilir. Kolon kolon boyu (L) uzatılarak ve 390 μm'nin altındaki partiküller kullanılarak kolon performansı arttırılabilir. Buna ilave olarak sisteme geri döngü yapılara, düşük akış hızında ve yüksek alıkonma süresinde çalışılarak, daha yüksek dönüşüm oranına ulaşılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Aksu, Z., Calık, A., Dursun, A. Y., Demırcan, Z., 1999, Biosorption of Iron (III)-Cyanide Complex Anions to Rhizopus Arrhizus: Aplication of Adsorption Isotherms. Process Biochem., 34: 483-491.

Aksu, Z., Yener, J., 2001, A Comperative Adsorption/Biosorption Study of Mono-Chlorinated Phenols onto Various Sorbents. Waste Management, 21: 695-702.

Al-Durı, B., Mckay, G., 1988. Basic dye adsorption on carbon using a solidphase diffusion model. The Chemical Engineering Journal, 38: 23-31.

Al-Muftah, A.E., Abu-Reesh, I.M.,2004, Effects of external mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis, Eng. Life Sci., 4, No.4.

Al-Muftah, A.E., Abu-Reesh, I.M.,2005, Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis, Biochemical Engineering Journal 23, 139–153.

Anonymous a, 1998, Product Sheet, B 302d-GB, Nova Nordisk Ferment Ltd., Switzerland.

Anonymous b, 1998, Material Safety Data Sheet Product code:62252 Rohm and Haas Company, USA.

Anonymous, 1987, Dairy Handbook, Alf- laval Food Engineering AB, Lund, Sweden, 333p.

Anonymous, 1994, Lactose Interance,Deparment of Health and Human Services, NIH Publication No. 95-2751, April, USA.

Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill International Edition, Singapore, 2nd Edition, 983 p.

Başıbüyük, M. And Forster, C.F., 2003. An Examination of Adsorption Characteristics of a Basic Dye (Maxilon Red BL-N) on to Live Activated Sludge System. Process Biochem., 38: 1311-1316.

Bayat, B., 2002, Comparative Study of Adsorption Properties of Turkish Fly Ashes: I. The Case of Nickel(II), Copper(II) and Zinc(II). Journal of Hazardous Materials, 95(3): 251-273.

Bayhan ve Yentür, G.,1993, Laktoz İntoleransı, Gıda, 18, 385-388.

Baysal, A., 1999, Beslenme, 8. Baskı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 481s.

Berthouex, P. M., Brown, L. C., 2002, Statistics For Environmental Engineers. Lewis Pub., CRC Press, USA, e-book.

Boyacı, I.H., 2001, Dolgulu Kolon Entegre Edilmiş Enzim Elektrot Sistemleri Ile Gıda Örneklerinde Glukoz, Sukroz ve Laktoz Miktarının Saptanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120s.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Briggs, G.E., and Haldane, J.B.S.,1925, Note on the kinetics of enzyme action, Biochem J., 19, 383-384.

Carrara, C. R., Rubiolo, A. C, 1997, A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with β- galactosidase immobilized on chitosan, Chem Eng J, 65, 93-98.

Carrara, C.R., E.J. Mammarela, A.C. Rubiolo, 2002, Prediction of the fixedbed reactor behavior using dispersion and plug flow models with different kinetics for immobilized enzyme, Chem. Eng. J. 92 (1–3), 123–129.

Chaplin, M. F. and Bucke, C. Enzyme Technology. Cambridge University, Cambridge, 1990.

Chıou, M.S., LI, H.Y., 2002. Equilibrium and Kinetic Modeling of Adsorption of Reactive Dye on Cros Linked Chitosan Beads. Chemosphere, 50: 1095-1105.

Cho, Y.K. and Bailey, J.E., 1978, Immobilization of Enzyme on Activated Carbao: Properties of Immobilized Glucoamylase, Glucose Oxidase, and Gluconolactonase, Biotechnology and Bioengineering, 20, 1651-1665.

Chu, H. C. And Chen, K. M., 2002 a. Reuse of Activated Sludge Biomass: I. Removal of Basic Dyes from Wastewater by Biomass. Process Bio., 37: 595- 600.

Copeland, R.A., 2000, Kinetics of single substrate enyzme reactions, John Wiley & Sons Inc., 390p.

Cornish-Bowden, A., 1999, Fundamentals of enyzme kinetics, Portland Pres Ltd., London, 343 p.

Çelebi, S.S., Çağlar, A., 1986, Immobilize Enzimlerin Uygulandığı Kimyasal Prosesler, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yazokulu, Çeşme-Izmir, 180-191.

Demain, A.L. and Solomon, A., 1986, Manuel of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington. 61.

Demirel, D., 2003, Pektinazın Manyetik Partiküllere Tutuklanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87s.

Doğu, G., 1986, Diffusion Limitation for Reaction in Porous Catalysts, in Handbook for Heat and Mass Transfer Operation, Ch. 8, (Cheremisioff, N.P., Gulf Pub Co., 401-448.

Fennema, O.R., 1985, Food Chemistry, Second Ed., Macel Dekker Inc. New York, 994p.

Fogler, H.S., 1999, Elements of Chemical Reaction Engineering, Prentice-Hall International, Inc, New Jersey, 3rd Edition 967 p.

Gekas, V., Lopez-Leiva, M., 1985, Hydrolysis of lactose: A literature review. Process Biochemistry, 85 : 2-10.

Griffith, L., Sigualdson, E., Sporn, P., 1989, Determination of lactose and lactose hydrolysis in milk using cerium (4), J. of Food Sci., 54, 2, 419-422.

Güleç, H.A., 2009, Enzimatik Oligosakkarit Üretimine Plazma Modifiye Membran Seperasyonun Etkisi, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 233s.

Haider, T., Husain, Q., 2009, Hydrolysis of milk/whey lactose by β- galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme, Chemical Engineering and Processing 48, 576–580.

Hall, K.R., Egleton, L.C., Acrivos, A., Vemeulen, T., 1966. Pore and solid diffusion kinetics in fixed bed adsorption under constant pattern conditions. Endustrial and Engineering Chemistry Fundamentals, 5, 212-223.

Hartmeier, W., 1988, Immobilized Biocatalysts, Springer-Verlağ, Berlin, Heidelberg.

Harward, D.O and Trapnel, B.M.W., 1964, Chemisorpsiyon: Buttter worths, and 2nd. Ed., USA, 67-159, 226-257.

Hassler, J.W., 1974, Purification with Activated Carbon: Chemical Publishing Co., USA, 390p.

Himmelblau, D.M., 1968, Process Analysis by Stufisrical Mefhods: John Wiley and Sons Inc., New York, 22-24, 343-350.

Ho, Y. S. and McKay, G. 1998. Sorption of Dye from Aqueous Solution by Peat. ,Chemical Engineering Journal; 70(2):115-24.

Ho, Y. S., Mckay, G., 1999, Pseudo-Second Order Model for Sorption Processes. Process Biochem., 34: 451-465.

Ho, Y. S., Porter, J. F. and McKay, G. 2002. Equilibrium Isotherm Studies for The Sorption of Divalent Metal Ions onto Peat: Copper, Nickel and Lead Single Component Systems. Water, Air, and Soil Pollution, 141:1-33.

Ho, Y. S., Wang, C. C., 2004, Pseudo-Isotherms for the Sorption of Cadmium Ion onto Tree Fern. Process Biochem., 39: 759-763.

Inglezakis, V.J. and Poulopoulos, S.G., 2006a, Adsorption, Ion Exchange, and Catalysis, in Adsorption, Ion Exchange and Catalysis: Design of Operations and Environmental Applications, Elsevier Science, 614 p.

Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G., Vicaria, J.M., 2006. Influence of the hollow-fiber membrane on the stability of β-galactosidase and on lactose hydrolysis: kinetic models including adsorption of the enzyme onto the membrane. Enzyme and Microbial Technology, 39: 1008-1015.

Kafarov, V., 1976, Cybernetic Methods in Chemistry and Chemical Engmeering. Mir. Moscow.

Kalala, A.M., Perraudin, J.P., Prieels, J.P., 1990, Anomerization and hydrolysis of lactose by β- galactosidase from S.lactis, Archives of Biochemistry and Biophsics, 277, 2, 434-438.

Kartal, B.İ., 1998, Laktozu düşürülmüş süt üretiminde enzimatik hidroliz ve ultrafiltrasyon tekniklerinin kullanımı ve laktoz tayin yöntemlerinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87s.

Keskinkan, O., Göksu, M. Z. L., Yüceer, A., Başıbüyük, M., Forster, C. F., 2003, Heavy Metal Adsorption Characteristics of A Submerged Aquatic Plant (Myriophyllum spicatum). Process Biochem., 39(2): 179-183.

Koops, J., Olieman, C.,1985, Routine testing of farm tank milk with the Milco- Scan 203, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39, 89-106.

Kosikowski, F.V., 1988, Enzyme behaviour and utilization in dairy technology, J.Dairy Sci., 71, 567- 568.

Kowalski, Z.E., Gieseckke, W.H., 1986, HPLC method for determination of reducing sugar, Onderstepoort J. Vet. Res., 53, 506-508.

Kumar, V K., 2006, Linear and non-linear regression analysis for the sorption kinetics of methylene blue onto activated carbon. Journal of Hazardous Materials B137 1538–1544

Kwak, H.S., Jeon, I.J.,1988, Comparison of HPLC and enzymatic method fort he measurement of lactose in milk, J. of Food Sci., 53, 975-976.

Ladero M., A. Santos, F. Garcı´a-Ochoa, 2001, Diffusion and Chemical Reaction Rates with Nonuniform Enzyme Distribution: an Experimental Approach, Bıotechnology and Bıoengıneerıng, Vol. 72, No. 4, February 20.

Leblebici, F., 1999, Türkiye Şeker Pancarı Fabrikasyonunda Dekstranaz Kullanımı için Optimum Koşulların Saptanması ve Dekstranazın İmmobilizasyon Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens. Ankara, 140 s.

Lehninger, A.L., 1979, Biochemistry, Worth Publishers, second edition, 1103p.

Levenspiel, O., 1972, Chemical Reaction Engineering, John Wqiley and Sons, Inc, New York, 5th Edition, 501 p.

Li X., Zhou ZKQ, Chen XD, 2007, Pilot-scale lactose hydrolysis using β-galactosidase immobilized on cotton fabric, Chemical Engineering and Processing, 46, 497–500.

Lin J and Wang L., 2009, Comparison between linear and non-linear forms of pseudofirst-order and pseudo-second-order adsorption kinetic models for the removal of methylene blue by activated carbon. Environ. Sci. Engin, 3(3), 320–324.

Mahoney, R.R., 1985, Modification of Lactose Containing and Dairy Products with β- galactosidase: Developments in Dairy Chemistry-3 (Edited by Fox, P.F.) Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 69-106.

Mahoney, R.R., 1998, Galactosyl-olygosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. Food Chemistry, 63(2): 147-154.

Mammarella, E.J., Amelia C.R, 2006, Predicting the packed-bed reactor performance with immobilized microbial lactase, Process Biochemistry, 41, 1627–1636

Matioli, G., Moraes, F. F. and Zanin, G. M., 2003, Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β-galactosidase from Kluyveromyces fragilis, Maringa, v. 25, 1, p. 7-12.

Mckay, G., Otterburn, Ms., Sweeney, Ag., 1980, The Removal of Clour From Effluent Using Various Adsorbents – Silica Rate Processes. Water Research, 14: 15-20.

Metcalf L. and Eddy, H.P., 1972, Wastewater Engineering: McGraw-Hill , USA, 346-353

Metin, M., 2005, Süt teknolojisi, sütün bileşimi ve işlenmesi, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir.

Mittal, S.B.,Hourigan, J.A, Newell, G., 1990, The enymic crycoscopic estimation of lactose, Australion J. Dairy Tech., November, 77-79.

Moon, H., J.Lee, W.K., 1983, Intraparticle diffusion in liquid-phase adsorption of phenols with activated carbon in finite batch adsorber. Journal of Colloid and Interface Science, Volume,96: 162-171

Mutlu, M., 1988, Poliüretan Biyomateryallerin Yüzey Özelliklerinin Plazma Polimerizasyonu ile Modifiye Edilmesi ve Kan-Biyomateryal Etkileşmesinin Uyarı-Cevap Tekniği ile İzlenmesi ve Moment Tekniği ile Analizi, Doktora Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens. Ankara, 134 s.

Mutlu, M., Pişkin, E., 1990, Surface Modification of Polyurethane Biomaterials by Plasma Glow Discharge and Investigation of Their Blood Compatibilities by Stimulus-Response Technique and Moment Analysis, Medical and Biological Engineering and Computing, 28, 232-236.

Mutlu, S., 1994, Kan Glukoz Seviyesinin Belirlenmesi için Geliştirilen Sandiviç Tipi Glukoz Oksidaz Elektrodu, Doktora Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens. Ankara, 159 s.

Ng, J. C. Y., Cheung, W. H., Mckay, G., 2003. Equilibrium Studies for the Sorption of Lead From Effluents Using Chitosan. Chemosphere, 52: 1021- 1030.

Nickerson T.A., Vujicic, L.F., Lin, A.Y., 1976, Colorimetric estimation of lactose and its hdrolytic products, J. Dairy Sci, 59, 386-390.

Özdural A.R., Tanyolaç, D., Demircan Z., Boyacı I.H, Mutlu M. and Webb C. 2001, A new method for determination of apparent kinetics parameters in recirculated packed-bed immobilized enzyme reactors, submitted to J. Chemical Engineering Science

Paige, D.M., Bayless, T.M., Huang, S.S., Wexler, R., 1975, Lactose hydrolysed milk, The American Journal of Clinical Nutrition, 28, 818-822.

Paige, D.M., Davis, L.R., 1985, Nutritional Significance of Lactose: Nutritional Aspect of Developments in Dairy Chemistry-3 8Edited by Fox, P.F.), Elsevier Applied Science Publishers, London and Newyork, 111-139.

Pilloton R., Mascini M., Casella, I.G., Festa, M.R., Bottari, M.R.,1987, Lactose determination in raw milk with two-enyzme based electrochemical sensor, Analytical Letters, 20, 11, 1803-1814.

Pilloton R.,and Mascini M., 1990, Flow analysis lactose and glucose in milk and improved electrochemical biosensor, Food Chemistry, 213-222.

Pivarnik, L.F., Senecal, A.G, 1995, Hydrolytic and transgalactolosylic activities of commercial β-galactosidase in food processing. Advances in Food and Nutrition Research, 38: 1-102.

Portaccio, M., Stellato, S., Rossi,S., Bencivenga, U., Mohy Eldin, M.S., Gaeta, F.S., Mita D. G., 1998, Galactose Competitive Inhibition of β-Galactosidase (Aspergillus oryzae) Immobilized on Chitosan And Nylon Supports, Enzyme and Microbial Technology, 23, 101-107.

Ramachandran, P.A. and Smith, J.M., 1978, Transport Rates by Moment of Dynamic Data, Ind. Eng. Chem. Fundam., 17 (3) 148-160.

Ross, S., and Olivier, J.P., 1964, On Physical Adsorption: John Wiley and Sons. USA, 9-11, 17-18, 126-127, 137-139, 145P.

Roy, I., Gupta, M.N., 2003. Lactose hydrolysis by LactozymTM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. Process Biochemistry, 39: 325-332.

Sağ, Y., 1993, Atıksulardaki Ağır Metal İyonlarının Giderilmesi ve Geri Kazanılması için En Uygun Biyosorbent Türünün Seçilmesi ve Değişik Reaktör Sistemlerinin Matematiksel İncelenmesi, Doktora Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens. Ankara, 218 s.

Santos A, Ladero M, Garcia-Ochoa F., 1998, Kinetic modelling of lactose hydrolysis by a b-galactosidase from Kluyveromyces fragilis. Enzyme Microb Technol, 22:558–67.

Sarıoğlu, K., 1998, İmmobilize Haldeki Ticari Preparatının(Pektinex Ultra SP-L) Görünür Aktivitesinin Viskozimetrik Yöntemlerle Belirlenmesi.Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 68s.

Savaiano, D.A., Levitt, M.D., 1987, Milk intolerance and microbe containing dairy food, J. Dairy Sci., 70, 397-406.

Schneider, R.E., Corona, E., Rosales, F., Schneider, F.E, 1990, Effect of temperature on the lactose hydrolytic capacity of a lactose derived from K. Lactis, Am. J.Clin. Nutr., 51, 746-748

Shiraishi, F., Hasegawa, T., Kasai, S., & Makishita, N. (1996). Characteristics of apparent kinetic parameters in a packed-bed immobilized enzyme reactor. Chemical Engineering Science. 51, 2847-2852.

Shuler, M.L. and Kargı, F., 1992, Bioprocess Engineering, Prentice-Hall, Inc., USA.

Smıth, J.M., 1981, “Chemical Engineering Kinetics”, McGraw-Hill International Book London.

Smith, J.M., 1970, Chemical Engineering Kinetics, 2nd Edition, McGraw-Hill, New York.

Telefoncu, A., 1986, Enzimolojiye Genel Bakış: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ed. A. Telefoncu E.Ü. Yayınları, İzmir, 214p.

Teles, F.F., Young, K.C., Stull, J.M., 1978, A method for rapid determination of lactose, J. Dairy Sci, 78, 2541-2562.

Waranusantıgul, P., Pokethıtıyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., 2003, Kinetics of Basic Dye (methylene blue) Biosorption by Giant Duckweed (Spirodela polyrrhiza). Environmental Pollution, 125: 385-392.

Watanabe, E., Takagi, M., Takei, S., 1991, Development of Biosensors for the Simultaneous Determination of Sucrose and Glucose, Lactose and Glucose, and Starch and Glucose, Biotechnology and Bioengineering, 38, 99-103.

Wentworth D. S., Skonberg D., Donahue D.W., Ghanem, A., 2004, Application of Chitosan-Entrapped β-Galactosidase in a Packed-Bed Reactor System, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 91, 1294–1299.

Wong, Y. C., Szeto, Y. S., Cheung, W.H., Mckay, G., 2004, Adsorption of Acid Dyes On Chitosan –Equeilibrium Isotherm Analyses. Process Biochem., 39:693-702.

Wu, C.H., 2007. Studies of the equilibrium and thermodynamics of the adsorption of Cu2+ onto as-produced and modified carbon nanotubes. Journal of Colloid and Interface Science, 311, 338–346.

Yang, S.T., Silva, E.M., 1995, Novel products and new Technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose, J. Dairy Sci, 78, 2541-2562.

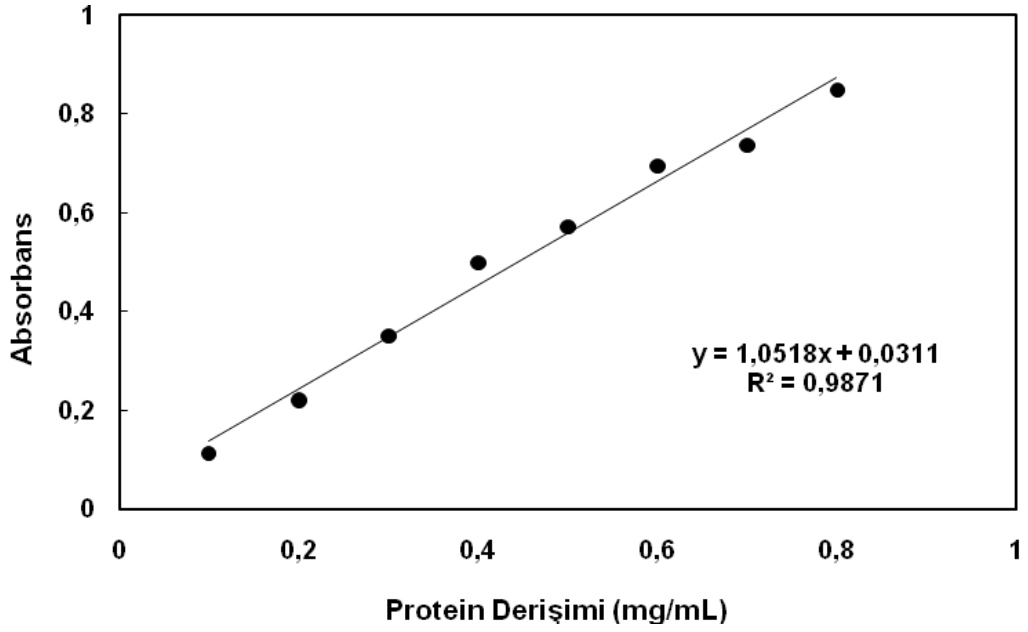
Yücemen, J.,1993, Yetişkin bireylerde süt tüketim alışkanlığı, laktoz sindirim güçlüğü ve intoleransı üzerine bir araştırma, doktora tezi, Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Zhou ZKQ, Chen XD. 2001a. Immobilization of beta-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. J Food Eng, 48:69–74

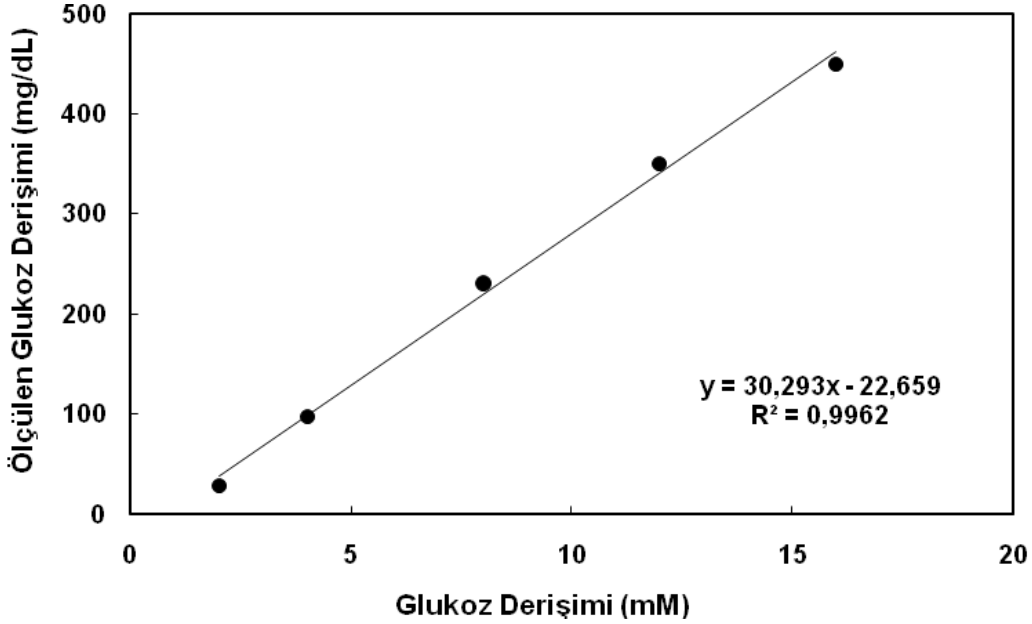
EKLER

EK-1: Kalibrasyon grafikleri

Laktaz enzimin adsorpsiyonunda kullanılan proteinin ve glukoz ölçüm cihazının kalibrasyon grafikleri



Protein kalibrasyon grafiği (BSA)



Glukoz ölçüm cihazının kalibrasyon grafiği

EK-2: Duolite A568'in özellikleri

DUOLİTE A568

Duolite 568 Endütsriyel derecede zayıf bazik iyon değiştirici reçine

DUOLİTE A568 yüksek gözenekli granül, zayıf bazik karakterde anyonik iyon değiştirici reçine olup, fenol-formaldehit çapraz bağlanması ile oluşturulmuştur. Hidrofilik karakterli olması düzenli bir gözenek dağılımına sahip olması nedeniyle biyoproses uygulamalarına en uygun reçinedir. Duolite A568' in iyonik gücü, gözenek hacmi, gözenek büyüklüğü ve partikül büyüklüğü nişasta, yağ ve diğer endüstrilerde kullanılan enzimlerin optimum tutuklanması için ayarlanabilmektedir.

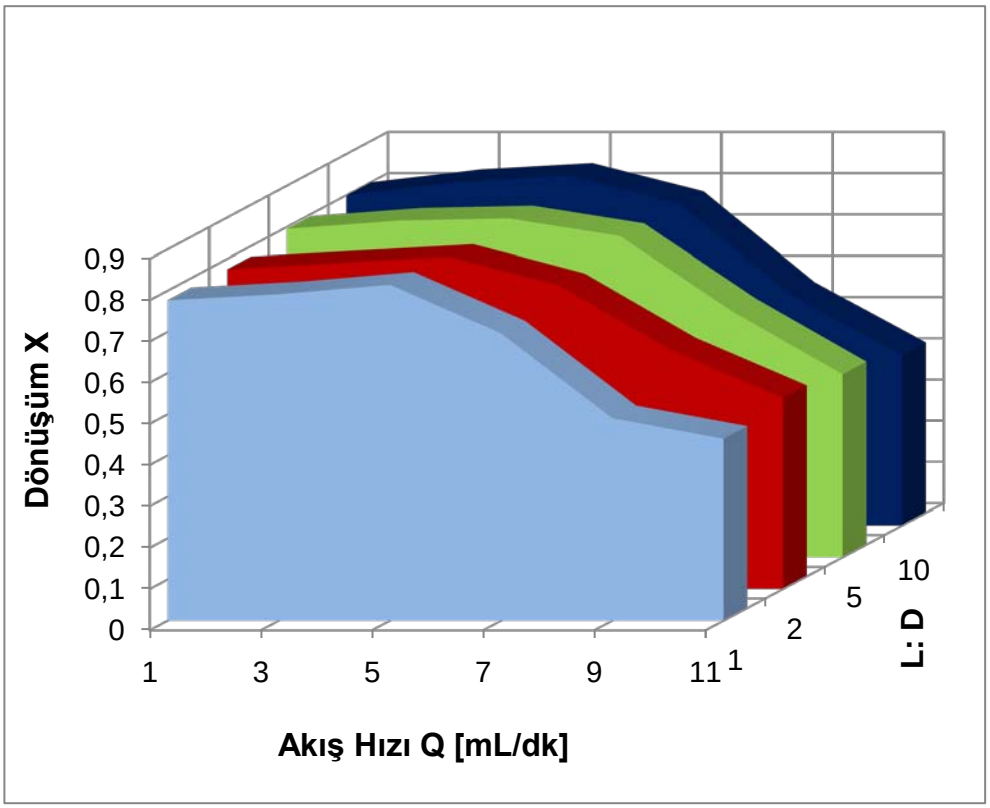
ÖZELLİKLER	
Matrix	Çapraz bağlı fenol-formaldehit
Fonksiyonel form	Tersiyer amin
Fiziksel form	Gri granül
İyonik form	Serbest baz
Toplam değişim kapasitesi	≥1.20 eq/L
Nem tutma kapasitesi(tam kurutulmuş)	%62 to 67
Nem içeriği	%5.5 – 10.5
Özgül ağırlığı	1.10 to 1.14
Taşıma ağırlığı	310 g/L
Küçük partikül içeriği	< 0.150 mm: 0.2 %max
Büyük partikül içeriği	> 0.850 mm: 2.0 %max
Maksimum tersinir şişme	$OH^- \longrightarrow Cl^-$: 7%
Gözenek büyüklüğü	15 to 25 nm
Gözenek hacmi	0.78 to 1 ml/g
Basınç düşmesi (1 m kolon boyu için)	Yaklaşık 6 kPa/ m/h (su, 20°C)

Uygulamaları

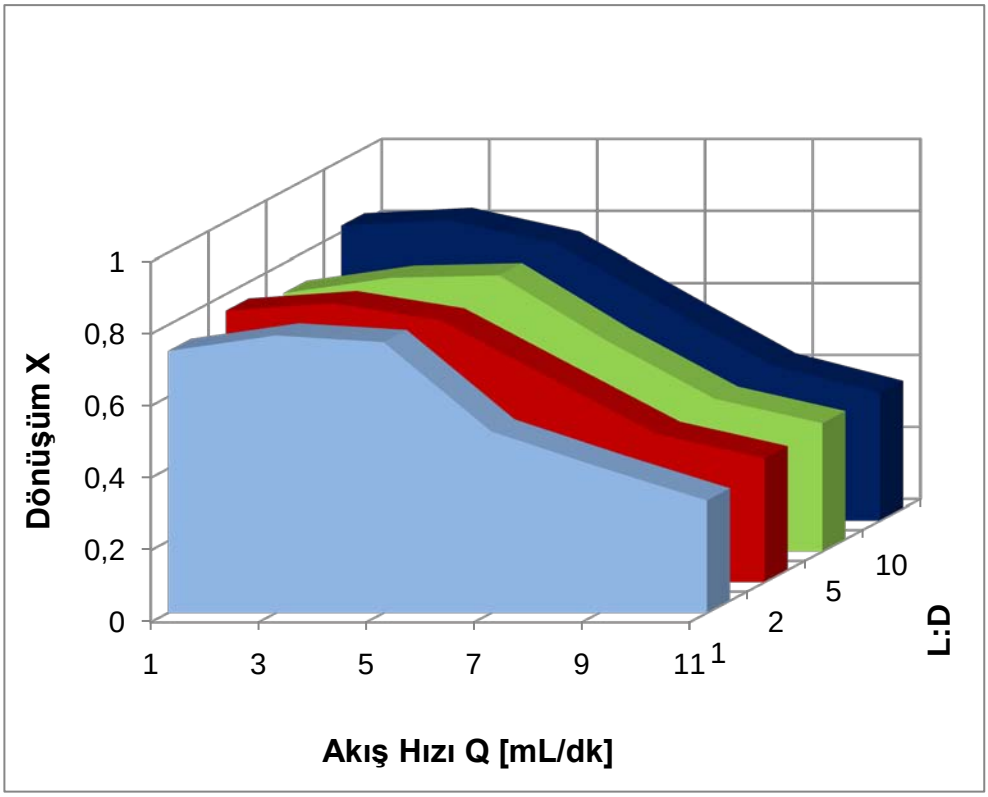
Nişastanın parçalanması

- Glukoz izomeraz enzimi tutuklanarak glukoz şurubundan yüksek fruktaz içerikli şurupların üretimi
- B-amilaz tutuklanarak maltodekstin (15-20 DE) şurubundan maltoz şurubunun üretimi.

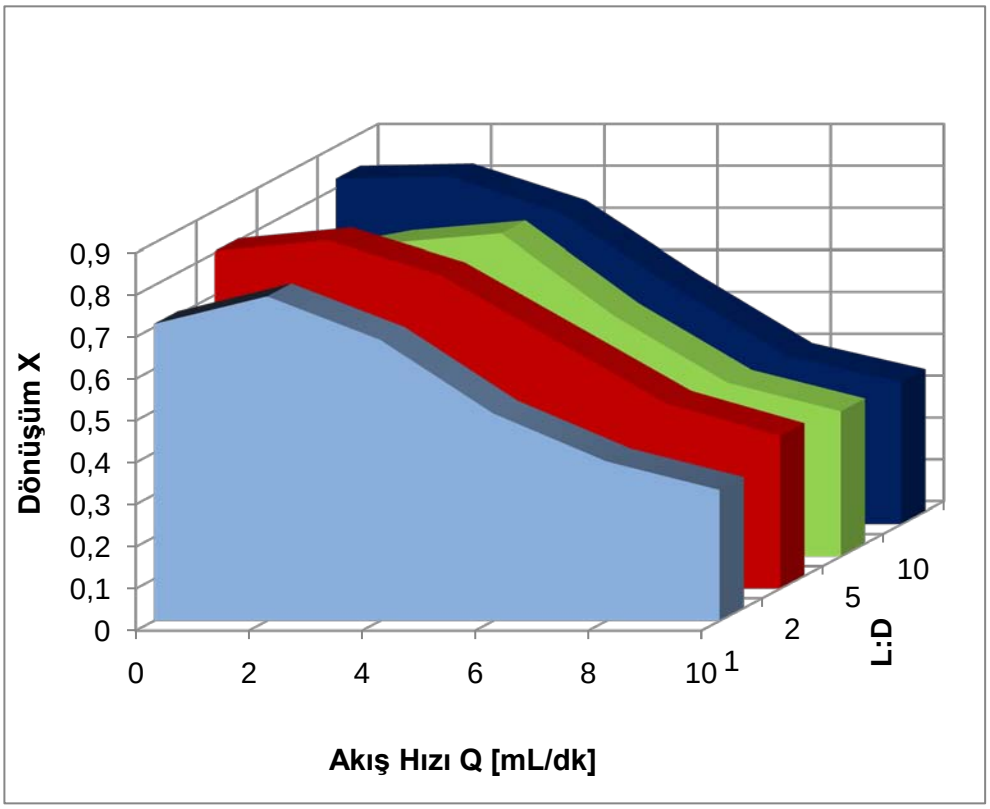
Ek-3: Dönüşümün kolon L/D oranları ile değişim



Dönüşümün akış hızı ve kolon L/D oranına göre değişimi (Partikül çapı:390 µm)



Dönüşümün akış hızı ve kolon L/D oranına göre değişimi (Partikül çapı:437.5 µm)



Dönüşümün akış hızı ve kolon L/D oranına göre değişimi (Partikül çapı:475 µm)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevim GÜRDAŞ

Doğum Yeri : Sivas

Doğum Yılı : 1971

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise :1988-1991 Sivas Lisesi

Lisans :1992-1994 Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Bölümü

Lisans :1994-1999 Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans :1999-2002 Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi:

2002 - : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

2000 - 2002 : Cumhuriyet Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü