

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEMBRAN BİYOREAKTÖR KULLANILARAK

MALTOZ ÜRETİMİ

Mehmet ÜNSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE

2003

TEŞEKKÜR

Dünya bilim arenasında ses getirecek bu tez konusunu öneren ve çalışmalarımda bana her türlü destekten çekinmeyen, bilimsel ufkumu açan, fikirlerimi uygulamamda oldukça demokratik yaklaşan danışmanım, değerli hocam Yrd.Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN'e şükranlarımı, saygılarımı sunarım.

Bilimsel düşünme yeteneğinden ve fikirlerinden çokça istifade ettiğim, değerli bilim adamı Prof.Dr. Bülent KESKİNLER' e teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Adem KILIÇ'a , Kimya Bölümündeki öğretim üyesi ve araştırma görevlisi çalışma arkadaşlarıma, Çevre Mühendisliği Bölümündeki İpek AKIN ve Hilal Yıldız AKBULUT'a, Tasarım ve İmalat Mühendisliği Bölümündeki İsmail BİCAN, Selahattin UYSAL, Mehmet ERMURAT' a

Tüm çalışmalarımda ve yüksek tahsil yapmamda beni her zaman destekleyen çok sevdiğim babam Salim ÜNSAL ve annem Tunay ÜNSAL'a , rahmetli büyükbabam Abdurrahman GÖRSEL ve rahmetli büyükannem Mediha GÖRSEL'e teşekkürlerimi, minnet duygularımı sunarım.

ÖZET

Endüstriyel bir enzim olan Maltogenaz *Bacillus subtilis*'in genetik modifiye bir soyuyla üretilmiş ve eksprese *Bacillus stearothermophilus*'den elde edilen sıcaklığa dayanıklı bir maltogenik α -amilazdır. Nişastayı ve maltodekstrini 1,4- α -glikozidik bağlarından maltoza hidroliz eder. Radikalik emülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak stiren, divinil benzen ve polimerize gluteraldehit monomerlerinden yeni bir membran polimer sentezlendi. Polimerin yapısı, spektroskopik (FTIR, UV, X-ışını Difraksiyonu) ve termal (DSC) analiz metodları ile aydınlatılmaya çalışıldı. Bu membran polimere maltogenaz enzimi immobilize edilerek membran biyoreaktör elde edildi. Serbest enzimin kinetik parametreleri olan K_m değeri 34,39 g MD/L, V_m değeri 18,83g maltoz/L.dak. olarak belirlendi. Substrat olarak %20 (W/V) maltodekstrin kullanıldığında serbest ve immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6, 65°C olduğu bulundu. Biyoreaktörün en az 48 saat çalışma ömrüne, 90 gün depolama süresine sahip olduğu tespit edildi.

SUMMARY

Maltogenase, an industrial enzyme, is a heat-stable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* expressed in and produced by a genetically modified strain of *Bacillus subtilis*. It hydrolyzes α -(1,4)-glycosidic bonds of starch and maltodextrin to form maltose. The enzyme was covalently immobilized onto a new polymer synthesized by radical emulsion polymerization method using styrene, divinyl benzene, and polyglutaraldehyde. The structure of the polymer was determined by using spectroscopic (FTIR, UV, X-Ray Diffraction) and thermal analysis methods. The polymer containing the enzyme was used as a membrane bioreactor.

Optimum pH and temperature using 20% (w/v) maltodextrin (MD) as substrate for soluble enzyme were 6, and 65°C, respectively. Kinetic parameters of soluble enzyme were also determined: K_m and V_m were 34,39 g MD/L, 18,83g maltose/L.min, respectively. It was shown that membrane bioreactor could be used for the continuous production of maltose from maltodextrin. There was no decrease in activity during 48 h continuous operation. In addition, the immobilized enzyme has been active on storage for 45 days.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
1.GİRİŞ	1
2.KATALİTİK MEMBRAN PROSESLERİ	7
2.1.Enzim-Membran Reaktörler	8
2.2. Membran Fermentörler	11
2.2.1. Sürekli Membran Fermentörler	11
2.2.2. Hücre Geri Döngülü Membran Fermentörler	13
2.3. Enzimin Hapsedildiği Katalitik Membran Reaktör	14
2.4. Jelleşmiş Enzim	16
2.5. Enzim Bağlı Membran Reaktörler	20
2.5.1. Biyokatalizörlere Kimyasal Olarak Bağlanmış Membranlar	20
3. RADİKALİK POLİMERİZASYON	23
3.1. Serbest Radikaller	23
3.2. Polimerizasyon Reaksiyonu Yöntemleri	24
3.2.1. Blok Polimerizasyonu	25
3.2.2. Çözelti Polimerizasyonu	25
3.2.3. Süspansiyon Polimerizasyon	26
3.2.4. Emülsiyon Polimerizasyonu	26
3.3. Radikalik Polimerizasyon Reaksiyonunun Basamakları	27

3.4. Poli(Stiren-Divinilbenzen) Polimerizasyon Reaksiyonu	30
4. POLİGLUTERALDEHİT SENTEZİ	31
5. NIŞASTA,ENZİMATİK HİDROLİZİ VE HİDROLİZ ÜRÜNLERİ	37
5.1. Nişasta	37
5.2. Nişastanın Asidik Hidrolizi	40
5.3. Nişastanın Enzimatik Hidrolizi	40
6.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	42
6.1. Gereçler	42
6.1.1. Kullanılan Maddeler	42
6.1.2. Enzim	43
6.2. Yöntem	43
6.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi İle Maltoz Analizi	43
6.2.2. Membranın Sentezi	44
6.2.3. Membranın Modifikasyonu	44
6.2.4. Maltogenazın Membrana İmmobilizasyonu	45
7. SONUÇ VE TARTIŞMALAR	46
7.1. Poligluteraldehitin Yapı Analizi	46
7.2. Divinil Benzen-Stiren Kopolimerinin Yapısının Analizi	49
7.3. Membran Polimerin Yapısının Aydınlatılması	51
7.4. Maltogenazın Katalitik Membran Biyoreaktördeki Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi	57
7.4.1. Serbest Enzimin Kinetik Parametreleri	57
7.4.2. Enzimin Membrana İmmobilizasyon Şartlarının Optimize Edilmesi	59
7.4.3. Biyokatalitik Membran Biyoreaktörün Aktivitesinin İncelenmesi	60
KAYNAKLAR	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

UF	Ultrafiltrasyon
MF	Mikrofiltrasyon
DVB-S	Divinil benzen-stiren polimeri
PGL	Poligluteralehit
DVB-S-PGL	Divinil benzen-stiren-poligluteralehit polimeri
DVB-S-PGL-PGL	Poligluteralehit ile modifiye olmuş DVB-S-PGL
FTIR	Fourier Transform Infrared
DSC	Differential Scanning Calorimeter
AFM	Atomic Force Microscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy
pH	$-\log [H^+]$
MD	Maltodekstrin
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
MANU	pH 5.0'de 60°C'de maltotriozun 1 dakikada 1 mikromolünü hidroliz eden enzim miktarı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enzim membran reaktörü	9
2.2. Hollow-fiber membran fermentör modüllerin şeması	12
2.3. Canlı hücrelerin mikroporoz membran modülüne yerleştirildiği membran fermentörü	13
2.4. Diyalizde sürekli fermentasyonlu hücre sistemi	13
3.1. Polistiren ve divinil benzenin radikalik polimerizasyon reaksiyonu	30
4.1. Gluteraldehitin polimerizasyon reaksiyonu	32
4.2. Gluteraldehitin polimerizasyon reaksiyonunun mekanizması ve enzim immobilizasyon reaksiyonu.	33
4.3. Poligluteraldehitte yükseltgenme tepkimesi	35
5.1. Nişastanın yapısı	37
5.2. Amilozun yapısı	38
5.3. Amilopektinin yapısı	38
5.4. Nişastadaki kristal yapıları A. Ortagonal kristal yapı B. Hekzagonal kristal yapı	39
5.5. Nişastanın hidroliz ürünleri	41
7.1. Poligluteraldehitin UV spektrofotometre pikleri	46
7.2. Poligluteraldehitin FTIR spektroskopisi	47
7.3. PGL'nin X-ışını ile analizi	48
7.4. PGL'nin DSC ile analizi	48
7.5. Divinil benzen-stiren kopolimerinin FTIR spektrumu	50
7.6. Divinil benzen-stiren kopolimerinin X-ışını difraksiyonu spektrumu	50
7.7. Divinil benzen-stiren kopolimerinin DSC analizi	51
7.8. Membran polimerin (PGL-DVB-PS) FTIR spektrumu	52

7.9. PGL, divinil benzen karışımının FTIR spektrumu	53
7.10. Membran polimerin X-ışını difraksiyonu spektrumu	53
7.11. PGL ile PGL, divinil benzen – stiren kopolimerinin X-ışını spektrumları difraksiyonu	54
7.12. Tüm polimerik yapıların X-ışını difraksiyonu spektrumu	54
7.13. Membran polimerin DSC termal analizi	56
7.14. PGL ve divinil benzen-stiren kopolimerinin karışımının DSC ile analizi	56
7.15. Serbest maltogenazın Michaelis-Menten grafiği	57
7.16. Serbest enzimin Hanes-Woolf grafiği	58
7.17. Serbest maltogenazın değişen pH'lardaki aktivitesi	58
7.18. Serbest maltogenazın değişen sıcaklıklardaki aktivitesi	59
7.19. Değişik pH'larda immobilize edilen maltogenazın aktivitesi	59
7.20. Değişik pH'larda immobilize edilen maltogenazın aktivitesi	60
7.21. Reaktörün aktivitesinin süreye göre değerlendirilmesi	61
7.22. Değişen debilere karşı aktivite grafiği	62
7.23. Reaktörde kapalı sistemde 30 dakika sirkülasyonla değişen debilere karşı ürün miktarı	63

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Sentetik Membranların Kullanım Alanları	3
1.2. Membran Reaktörlerin İlaç Kimyası Alanındaki Uygulamaları	4
1.3. Membran Reaktörlerin Ziraat Alanındaki ve Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları	5
1.4. Membran Reaktörlerin Tıbbi Amaçlı Uygulamaları	6
4. 1. Değişen pH ve monomer konsantrasyonuna karşı suda çözünen ve çözünmeyen polimerize gluteralehit konsantrasyonu	34
6.1. Deneyde kullanılan sarf maddeler	42
7.1. Membran reaktörlerin aktivitelerinin karşılaştırılması	61
7.2. Reaktörün sirkülasyon sonucu debilere karşı gelen ürün miktarları	62

1.GİRİŞ

Günümüzde bilimler multidisipliner bir çatıda buluşmaktadır. Tıptan, ziraata, moleküler biyolojiden bilgisayar destekli kimyaya, ileri malzeme teknolojilerinden biyokimyaya, çevre bilimlerinden bilgisayar bilimine kadar pekçok bilim bilgi birikimini biyoteknoloji çatısında paylaşımına sunmuştur. Biyoteknoloji canlının veya canlı bünyesindeki biyolojik materyallerin modifiye edilerek veya edilmeyerek üretime, teknolojiye adapte edilmesidir.

Enzimler, kararlı kaldıkları özgül pH ve sıcaklık aralıkları olan , maksimum aktivitelerini gösterdikleri optimum pH ve sıcaklık değerlerine sahip, birinci ve sıfırıncı dereceden katalitik reaksiyon veren, amino asit monomerli polimerlerdir. Ayrıca stereoseçicilik, reaksiyon verdiği ortama bağlı olarak ürün konfigürasyonunda değişiklik, hızlı katalitik aktivite gibi diğer katalizörlerde olmayan özelliklere sahiptirler.

Enzimler serbest halde biyoreaktörlerde kullanıldıktan sonra hem geri kazanılamazlar hemde bir çok parametredeki kararlılıkları çok sınırlıdır. Bu tür durumlar ürün maliyetine yansır. Enzimler üzerindeki yüklü veya yüksüz gruplar kullanılarak adsorpsiyon gibi fiziksel etkileşimlerle, kovalent bağlanma, çapraz bağlanma ile veya molekül hacminden yararlanılarak hapsedme gibi tekniklerle polimerik, seramik, biyopolimerik, metal, kompozit malzemelere immobilize edilmektedir. İmmobilizasyon sonucunda enzim pekçok nitelik kazanabilmektedir. Ayrıca bu sayede üretime yönelik olarak enzim tekrar tekrar üretime yönelik kullanılabilir.

Poligluteralehit (PGL), enzim immobilizasyon tekniklerinde üzerinde bulunan karbonil grupları nedeniyle çapraz bağlama için sıkça kullanılan kimyasal bir maddedir. Çapraz bağlamanın yanında enzim kararlılığını arttırıcı, adsorpsiyonu kovalent bağa dönüştürücü niteliklere sahiptir. Yapısındaki rezonans hali nedeniyle, enzimlerle yapmış olduğu Schiff bazı reaksiyonlarının ortama bağlı olarak geri dönüşümüne engel olmaktadır.

Membran prosesler temel bir proses olarak ayırma işlemlerinde uzun zamandan beri kullanılmaktadır. İleri malzeme teknolojisi olan membran teknolojileri biyoproses mühendisliğine uyarlanmıştır. Tablo 1.1’de membran çeşitleri, üretim prosedürleri verilmiştir. Bu membranlar enzim ve mikroorganizma immobilizasyonu için katı matriks olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda biyokatalitik membran reaktörlerin keşfiyle, bu reaktörlerin matematiksel modellenmesi, tasarımı, kinetik çalışmaları oldukça cazip hale gelmiştir. Gelişmiş ülkelerde, biyokatalitik membran prosesleri kısa bir süre içinde çok sayıda uygulama alanı bulmasına rağmen, endüstriyel anlamda oldukça yeni bir teknolojidir. Literatürde katalitik membran proses olarak sınıflandırılabilen ilk çalışmalar 1970’li yılların sonlarında yer almaya başlamış, dünyada biyoteknoloji alanında kaydedilen ilerlemelerin ışığı altında, özellikle son 10 yılda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Tek fazlı veya bifazik akışkanlar için çok uygun olan membranlar, yağ sanayinden gıda sanayine, ilaç sanayinden arıtma teknolojilerine, fermentasyon teknolojilerinden zirai sanayiye kadar bir çok alanda kullanılmaktadır. Tablo 1.2, 1.3, 1.4’de membranların endüstride kullanım alanları verilmiştir.

Biyolojik materyalleri süzme işlemine dayalı proseslerde karşılaşılan aşınma, difüzyon, kütle transferi ve molekül büyüklüğüne bağlı porların tıkanması gibi problemler bu tür reaktörlerde minimize edilmiştir. Diğer biyoreaktörlerde görülen substrat veya ürünün reaktörde bekleme süresine bağlı olarak ürün veya substrat inhibisyonu engellenebilmektedir. Substrat konsantrasyonuna bağlı enzim inaktivasyonunda biyokatalitik membran reaktörlerle giderilmektedir. Ayrıca ürün kompozisyonunun değişimi bu tür reaktörlerde gerçekleştirilmektedir. Diğer reaktörlerle karşılaştırıldığında, küçük hacimde geniş bir reaksiyon alanına sahip olan membran biyoreaktörlerin işletim maliyetide oldukça düşüktür.

Yeni malzemelerin bulunması, polimer ve seramik materyal teknolojisinin, nanoteknolojinin gelişmesi ile endüstriyel biyoteknoloji dünyada çok büyük bir sektör haline gelecektir. Bu reaktörler özellikle rekombinat DNA teknolojisi ile modifiye edilmiş enzimlerin veya mikroorganizmaların sanayiye kazandırılmasında çok önemli roller üstlenecektir.

Tablo 1.1. Sentetik Membranların Kullanım Alanları (1)

Membranlar	Yapıldığı Madde	Üretim Prosedürü	Yapısı	Uygulama Alanları
Seramik Membranlar	Kil,silika,alüminyum, oksit, grafit, metal tozu	Presleme ve sinterleme	Por çapı 0,1-10µm	Süspansiyonların filtrelenmesi, gaz ayırma,izotopların ayrılması
Sıkıştırılmış Membranlar	Politetrafloroetilen, polietilen, polipropilen	Billurların gerdirilmesi	Por çapı 0,1-1µm	Agresif ortamların filtrasyonu, havanın temizlenmesi, steril filtrasyon, tıbbi teknoloji
Polların Asitle Aşındırılmasıyla Elde Edilen Membranlar	Polikarbonat	Asitle aşındırma	Por çapı 0,5-10µm	Analitik ve tıbbi kimya
Homojen membranlar	Silikon lastik, hidrofobik sıvılar	Homojen püskürtme,, likit filmlerin formasyonu		Gaz ayrımı
Simetrik mikroporoz membranlar	Poliamit, polipropilen, selüloz türevleri	Faz-inversiyon reaksiyonu	Por çapı 50-5000nm	Steril filtrasyon, diyaliz, membran distilasyonu
Birleşik asimetrik membranlar	Poliamit, polisülfon, selüloz türevleri	Faz-inversiyon reaksiyonu	Homojen polimer veya po çapı 0,1-10µm	Ultra-hiper filtrasyon, gaz ayrımı,pervaporasyon
Kozmotik Asimetrik membranlar	Poliamit, polisülfon, polidimesil okzan	Mikroporoz membrana film uygulaması	Homojen polimer veya po çapı 1-10µm	Ultra filtrasyon, gaz ayrımı,ters osmoz,pervaporasyon
İyon değiştirici membranlar	Polietilen, polisülfon, PVC	Homojen polimerlerin sülfolanması	Pozitif veya negatif yüklü matriks	Elektrodiyaliz,elektroliz

Tablo 1.2. Membran Reaktörlerin İlaç Kimyası Alanındaki Uygulamaları (1)

Reaksiyon	Membran reaktör	Amaç
Fumarik asidin L-aspartik aside dönüşümü (E.coli'deki aspartaz)	Poliakrilamit jelde tutuklama	Gıda ve ilaç ham maddesi
Aspartik asidin L-alanine dönüşümü (Pseudomonas dacunhae)	Poliakrilamit jelde tutuklama	İlaç ham maddesi
Korteksolonun hidrokortizona ve prednizolona dönüşümü (Curvularia lunata / Candida aimpleks)	Poliakrilamit jelde tutuklama	Steroidlerin üretimi
Asetil-D,L-amino asitin L- amino aside dönüşümü (Amino açılaz)	DEAE-sephadex iyonik bağlanma	İlaç sanayi için L-amino asit üretimi
Fenol piruvat ve amonyaktan tirozin sentezi (Trosinaz)	Seluloz triasetat membrana tutuklama	İlaç sanayi için L-amino asit üretimi
Siyano-esterin ibuprofene hidrolizi (Lipaz)	Bifazik hollow fiber membran reaktörde tutuklama	Ateş düşürücü ilaçların üretimi
Ampisilin ve amoksisilin üretimi (Penisilin amidaz)	Seluloz triasetat fiberlerde tutuklama	Antibiyotiklerin üretimi
Diltizem işlemcilerinin hidrolizi (Lipaz)	Bifazik hollow fiber membranlara adsorpsiyon	Kalsiyum kanal bloklayıcıların üretimi
5-p-HP-hydantoinin D-p-HP-glisine hidrolizi (Hydantoinaz ve karbamilaz)	UF polysülfon membranlarına adsorpsiyon	Kefalosporin üretimi için ara ürün sentezi
Dehidrojenasyon reaksiyonları (NAD(P)H)' a bağlı enzim sistemleri)	UF-yüklü membrana hapsetme	Enantiyomerik amino asitlerin üretimi
DNA' nın oligonükleotidlere hidrolizi (DNAaz)	UF-kapiler membranda jelifikasyon	İlaç üretimi
Hidrojen peroksitin hidrolizi (inek karaciğer katalazi)	Seluloz triasetat membrana adsorpsiyon	Karaciğer yetersizliğinde kullanım için
Proteinlerin hidrolizi (Tripsin ve kemotripsin)	Polisülfon UF membran	Medikal kullanım için peptidlerin üretimi
Arjinin ve asparajinin hidrolizi	Poliüretan membranlara adsorpsiyon	Kansere karşı engelleyici veya tedavi edici ilaçların üretimi

Tablo 1.3. Membran Reaktörlerin Ziraat Alanındaki ve Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları (1)

Reaksiyon	Membran biyoreaktör	Amaç
Laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi	Eş eksen akışlı reaktör	Delaktozasyonlu süt ve süt ürünleri
Sütte yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin (trpsin ve kimotripsin) hidrolizi	Jelleşmiş enzimli asimetrik hollow fiber reaktör	Bebek maması üretimi
Raffinozun α -galaktozidaz ve invertaza hidrolizi	Hollow fiber reaktörlerle ayrılmış serbest enzim	Monomerik şakar üretimi
Niştastanın maltoza hidrolizi (α -amilaz, β -amilaz, pullulanaz)	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Maltoz şurup üretimi
Şekerlerin fermentasyonu (maya)	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Bira endüstrisi
Oksijensiz fermentasyon	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Alkol üretimi
Pektinlerin hidrolizi(pektinaz)	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Şarapta ve meyve sularında acılığın ve bulanıklığın giderilmesi
Lactobacillus bulgaricus'un fermentasyonu	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Karboksilik asit üretimi
Limonen ve naringinin çıkartılması	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Meyve sularındaki acılığın ve bulanıklığın giderimi
K-kazeinin hidrolizi (endopeptidaz)	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Sütün koyulaşması
Kollojen ve kas proteinlerinin hidrolizi(proteaz, papain)	Ultrafiltrasyonlu sürekli karıştırmalı tank reaktör	Etin yumuşatılmasında
Glukozun glukonik aside dönüşümü(glukoz oksidaz ve katalaz)	Yatak reaktör	Depolama esnasında yumurta ürünlerinin tadının ve renginin bozulmasını engellemek
Trigliseritlerin yağ asidi ve gliserole hidrolizi(lipaz)	Ultrafiltrasyon kapiler membran	Gıdaların,kozmetiklerin ve sörfektanların üretimi
Selulozun selebioza ve glukozu hidrolizi(selulaz ve β -glukozidaz)	Asimetrik hollow fiber reaktör	Etanol ve glukoz üretimi
Malik asidin laktik aside hidrolizi(Lactobacillus oenos)	Mikrofiltre kapiler membrana yerleştirilmiş hücreler	Beyaz şarapta tadın iyileştirilmesi
Fumarik asidin L-malik aside hidrolizi(fumaraz)	Ultrafiltrasyon kapiler membran	Gıdasal maddelerin üretimi
Zeytin yağının hidrolizi(lipaz)	Hidrofobik levha-çerçeve membran reaktör	Yağların değerlendirilmesi
Soyafasulyesi yağının hidrolizi	Hidrofilik hollow fiber membran reaktör	Yağların değerlendirilmesi
Tereyağının hidrolizi	Hidrofobik düz-tabaka membran reaktör	Kozmetik endüstrisi için ürünlerin ve yağların üretimi
Süt yağının hidrolizi(lipaz)	Spiral-yarıklı polypropilen membran reaktör	Yağların değerlendirilmesi

Tablo 1.4. Membran Reaktörlerin Tıbbi Amaçlı Uygulamaları (1)

Reaksiyon	Membran reaktörler	Amaç
Hidrojen peroksit hidrolizi (bovine liver catalaz)	Selüloz triasetat membranında tutuklama	Karaciğer yetmezliği
İnsulinin glikoz ve levuloza hidrolizi (insulaz)	Sodyum aljinat jelde tutuklama	Karaciğer rahatsızlıklarının tedavisinde
Bilirubin oksidasyonu (bilirubin oksidaz)	Sefarozda immobilizasyon	Yeni doğanlarda sarılığın önlemesi
Heparin degradasyonu (heparinaz)	Sefarozda immobilizasyon	Heparin nötralizasyonu
Arginin ve asparagin hidrolizi (arginaz ve asparaginaz)	Poliüretan membranda tutuklama	Lösemi ve kanserin önlenmesi ve tedavisi
Kan proteik toksinlerinin üretimi (tyripsin, pronaz)	Poliüretan membranda tutuklama	Diyalitik hastalarda kan toksinlerinin uzaklaştırılması
İnsulin sekresyonu	Poliamid UF membranı	Suni pankreas
Peyniraltı proteinlerinin hidrolizi (tripsin, kimotripsin)	Polisülfon UF membranı	Tıbbi amaçlı peptit üretimi
Karaciğer metabolitleri (hepatoksitler)	Polisülfon ve poliamid MF membranı	Suni karaciğer

Tezde üzerinde çalıştığımız enzim olan maltogenaz (E.C. 3.2.1.133) nişasta ve maltodekstrini α -(1,4)- glikozidik bağlarından maltoza hidroliz eden bir maltojenik α -amilazdır. Maltogenaz enzimi bir ekzo-amilazdır. Yani substrat hidrolizini indirgen olmayan uçtan başlayarak yapmaktadır. Substrat olarak MD kullanıldığında, en iyi ürün verimi % 20’lik (W/V) maltodekstrin çözeltisidir. %20 (W/V) substrat konsantrasyonunda enzimin optimum pH değeri 6 ve optimum sıcaklık değeri 65 C° ‘dir.

2.KATALİTİK MEMBRAN PROSESLERİ

Katalitik membran sistemleri, geniş bir konfigürasyona sahip olduğu için tek bir çatıda toplamak, sınıflandırmasını ve net bir tanımını yapmak oldukça güçtür. Genel tanımı, direkt olarak membrana katalitik aktivite kazandırılarak veya membran prosesleri biyokimyasal süreçlere adapte edilerek oluşturulan sistemler şeklinde yapılabilir.

Membranlara katalitik aktivite enzimlerle, canlı hücrelerle veya palladyum gibi kimyasal katalizörlerle kazandırılabilir (1-5). Kimyasal katalizörler, membran üretilirken membranı oluşturan maddelerin içine ilave edilir. Biyokimyasal katalizörler ise membran üretilirken membranı oluşturan maddelerin içine ilave edildiği gibi üretim sonrasında membranın yüzeyine veya içine bağlanır yada hapsedilir. Bu hapsedme, enzim veya hücrenin membranın liflerini yada porlarını arasına alınması ile gerçekleşir. Bağlanma ise fiziksel etkileşimler veya kimyasal reaksiyonlar sonucu gerçekleşir. Katalitik aktiviteye sahip membranların yer aldığı reaktörlerde, reaksiyon membranın içinde veya yüzeyinde gerçekleşmekte, reaksiyon sonucu oluşan ürünler membrandan filtrat akımı ile uzaklaştırılmaktadır.

Bu tür proseslerin yanı sıra reaktör içine ya da alt kısmına bir membran modülü yerleştirilmesi ile elde edilen reaktör konfigürasyonları da biyokatalitik membran reaktör sistemi çatısı altına girmektedir. Bu tip konfigürasyonlarda enzim veya canlı hücre reaktör ortamında immobilize olmaksızın substrat çözeltisinin içinde bulunmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan ürünler filtrat akımıyla uzaklaştırılırken, membranın filtre etme özelliğinden faydalanarak proses gerçekleştirilir. Ürünlerin ayrılması sırasında membran üzerinde toplanan biyokatalizör reaktöre sürekli olarak geri gönderilmektedir. Membran reaktörün iç kısmında ise biyokimyasal reaksiyon ve ayırma işlemi reaktörün içinde gerçekleşmektedir.

Katalitik membran reaktörler yukarıda bahsedilen bilgilerde dikkate alınarak beş ana grupta sınıflandırılabilir(6).

1. Enzim-membran reaktörler

2. Membran fermentörler
3. Enzimin hapsedildiği katalitik membran prosesler
4. Jelleşmiş enzimle hazırlanan katalitik membran prosesler
5. Enzim bağlı katalitik membran prosesler

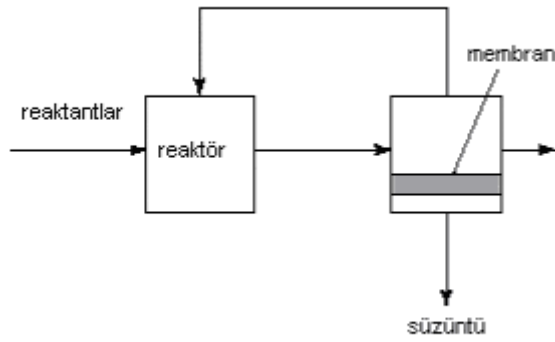
2.1.Enzim-Membran Reaktörler

Enzim-membran reaktörlerde, membranın özgül ayırma özelliğinden faydalanılarak, enzim ve substrat olarak kullanılan makromoleküller reaktörde tutulmakta ve membranın porlarından geçebilecek kadar düşük molekül ağırlıklığına sahip ürün veya ürünler filtrat akışı vasıtası ile reaksiyon ortamını terk etmektedir. Böyle bir reaktör Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Bu sistemler, aktivite kaybına uğramış enzimlerin, aktif enzimlerle değiştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Enzimin serbest halde bulunması nedeni ile substrat ve biyokatalizörün arasındaki difüzyonal dirençler minimuma inmektedir. Ayrıca immobilizasyon süreci içinde meydana gelen aktivite kayıpları gözlenmemektedir. Serbest enzim kullanılması nedeni ile enzim stabilitesi açısından proseste birçok problem bulunmaktadır.

Enzim-membran reaktörlerde tabaka şeklinde ultra filtrasyon membranları kullanılmaktadır. Bu reaktör konfigürasyonları sürekli ve tam karıştırmalı proseslerdir. Klasik filtrasyon ünitelerinin, sistemin akış dinamiklerinden büyük ölçüde etkilendikleri bilinmektedir. Bu sistemlerde, substrat ve katalizör etkin bir şekilde karıştırılmaması nedeniyle konsantrasyon polarizasyonu reaktör verimliliğini önemli ölçüde etkilemektedir.

Enzim aktivitesi enzim yapısındaki fizikokimyasal değişiklikler, termal



Şekil 2.1. Enzim membran reaktörü (6)

denaturasyon, mikrobiyal kontaminasyon ve entropi nedeniyle enzim aktivitesi zamanla azalmaktadır. Katalizörün aktivite kaybı, enzim aktivitesinin başlangıçtaki değerine göre yarıya indiği yarılanma süresinin ölçülmesi ile belirlenebilmektedir. Kullanılan membranin por boyutu uygun seçilmezse biyokatalizör reaktörün dışına sızmakta ve reaktördeki miktarı azalmaktadır. Enzimin ana çözeltideki konsantrasyonunun azalması reaksiyon hızını önemli ölçüde düşmektedir.

Enzim, sistemde arzu edilen seviyede karıştırılmadığından, membran üzerinde ince bir tabaka halinde birikme eğilimi göstermektedir. Bunun sonucu olarak konsantrasyon polarizasyonu meydana gelmekte ve reaktör verimi olumsuz yönde etkilenmektedir.

Yüksek akış hızları enzimin büyük bir kısmının reaktör tabanına itmekte, reaktörün üst kısmındaki enzim konsantrasyonu azalmaktadır. Bu nedenle reaktörde belirli karıştırma şartları, kritik bir akış hızı ve buna bağlı olarak bir basınç şartı ortaya çıkmaktadır. Reaktörde kararlı işletim şartları, kritik değerden daha düşük akış hızlarında sağlanmakta ve bu durumda ürün çıkış konsantrasyonu sabit kalmaktadır. Kritik akış hızı üzerindeki değerlerde, enzimin önemli bir miktarı membranın üzerine itildiğinden nadirde olsa enzim jeli oluşmasına sebep olmaktadır. Enzimin yüksek akış hızı ile sıkıştırılması sonucu enzim deaktivasyonu hızlanmakta ve kararlı şartların oluşması engellenmektedir.

Makromoleküller substratları difüzyon sınırlamalarının yüksek oluşu, bu substratların hidrolizinde immobilize enzim sistemlerinin kullanımını zorlaştırmaktadır. Enzim-membran reaktörlerinde uygun por büyüklüğüne membranların seçilmesi ile enzim ve substrat birbirleriyle etkileşim halinde bulunabilir ve reaktörde hidroliz sonucu oluşan ürün ve/veya inhibitörler (ürün inhibisyonu) sistemden sürekli olarak uzaklaştırılabilir. Burada enzimin herhangi bir matriksle tutuklanması mevzu dışı olduğu için immobilizasyon esnasında enzimin üç boyutlu yapısını bozan etkenler bulunmamaktadır. Aynı zamanda, reaktörde iyi bir karışım sağlandığı takdirde substratın, ürünün ve inhibitörlerin ortamda en düşük konsantrasyonlarda kalmaları sağlanmaktadır. Enzim-membran reaktörlerin kullanılmasının, özellikle substratın kendisinin inhibitör olduğu durumlarda veya besleme akımında çeşitli inhibitörlerin bulunması halinde avantaj sağlamaktadır. Ancak, substrat olarak makromoleküler bileşiklerin kullanıldığı durumlarda yeterli karışma hızı sağlanamadığı takdirde konsantrasyon polarizasyonu, reaktör performansını etkilemektedir.

Enzim-membran reaktörleri sürekli akış modunda işletildiklerinde, substratın ortama derişik olarak verilmesi konsantrasyon polarizasyonunun etkisini arttırmaktadır. Ortamda arzu edilmeyen çeşitli bileşiklerin ve tam hidrolizlenmemiş ara ürünlerin bulunuşu membranın kirlenmesine ve membranın üzerinde jel tabaka oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumda filtrasyon hızı zamanla giderek yavaşlamakta ve substratın ürüne dönüşüm hızı kararlı hale ulaşamamaktadır. Reaktör performansı ortama bu kirletici bileşikleri hidroliz edebilen enzimlerin ilavesi ile artırılabilir. Besleme çözeltisinin reaktöre gönderilmeden arıtılması ile membranın kirlenmesinin engellenmesi veya konsantrasyon polarizasyonuna karşı alınacak tedbirlerin uygulanması ile reaktörün kararlı şekilde işletilmesine katkıda bulunmaktadır.

Membran yüzeyinin hemen üzerindeki akış tabakasındaki enzim derişimi, reaktör içerisindeki akış dinamiklerine bağlı bulunmaktadır. Sistemde sağlanabilecek belirli basınç koşulları, ana çözeltiden enzim yüzeyine kütle transferini arttırmakta ve böylece konsantrasyon polarizasyonu etkisi engellenmektedir. Yüksek karıştırma hızları kısmen enzimin deaktivasyonuna neden olsada tam karışmalı rafli membran reaktörlerin performansını olumlu yönde etkilemektedir.

2.2. Membran Fermentörler

Membran fermentörlerde genellikle biyokatalizör olarak kullanılan materyal canlı hücrelerdir. Membran fermentörler iki ana gruba ayrılmaktadır.

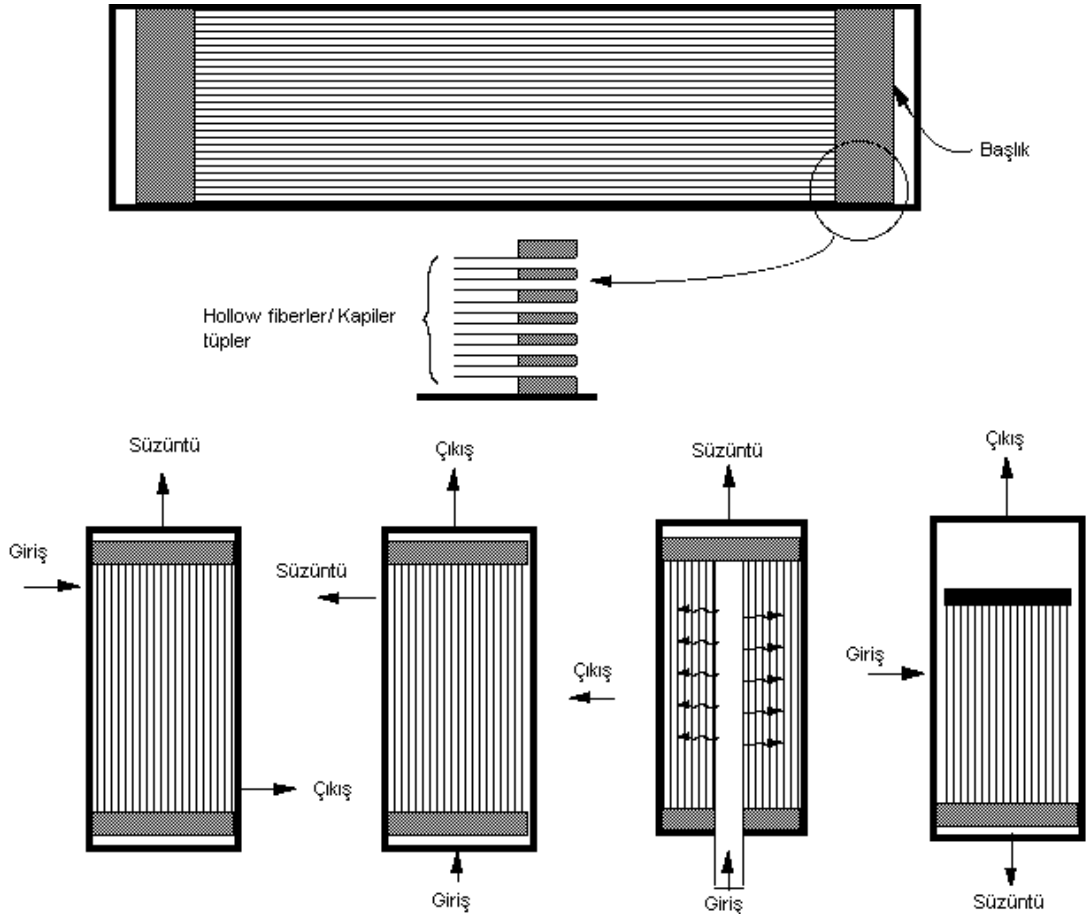
1. Sürekli membran fermentörler
2. Hücre geri döngülü membran fermentörler

2.2.1. Sürekli Membran Fermentörler

Sürekli membran fermentörlerde hücreler membranın iç kısmına yerleştirilmekte ve reaksiyon membranın porları içinde meydana gelmektedir. Membran olarak genellikle hollow-fiber membranlar veya mikrofiltrasyon membranları kullanılır. Böyle bir membran konfigürasyonu Şekil 2.2’de verilmiştir. Reaksiyon substrat çözeltisi membran lifleri arasından geçerken meydana gelir. Bu sistemler özellikle düşük molekül ağırlıklı substratların fermente edilmesinde kullanılmaktadır.

Membran por boyutu uygun olarak seçilmiş bir membranın kullanılmasıyla hücre çevresi tamamen sterilize edilmektedir. Bu reaktörler, fermentör davranışı açısından hücre geri çevrimli reaktörlere benzemektedir. Kesikli fermentasyona göre ürün ve verimlilik değerlerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Uzun süreli işletimlerde de kesikli fermentörlerden daha iyi bir hücre stabilitesine sahiptirler.

Sürekli membran fermentörlerinde verimlilik, fermentördeki canlı hücre konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Hücre geri çevrimi, geleneksel kesikli fermentörlere göre daha yüksek hücre konsantrasyonlarında çalışmaya imkan sağlar. Böylece aynı verim hacimce daha küçük sistemlerde gerçekleşmekte böylece reaktör yatırım maliyeti düşmektedir. Ancak, hücre miktarındaki artış reaktördeki sıvının derişik hale gelmesine neden olmakta bu da konsantrasyon polarizasyonunun oluşmasına neden olabilmektedir.

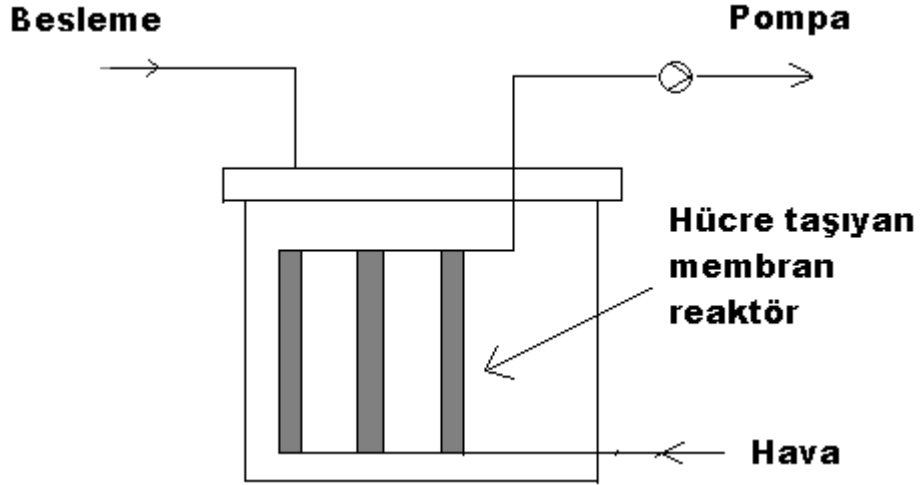


Şekil 2.2. Hollow-fiber membran fermentör modüllerin şeması .

Kirlenme ve muhtemel konsantrasyon polarizasyonunun etkilerini engellemek için döndürme özelliğine sahip membran modülleri ve çeşitli geri yıkama yöntemleri geliştirilmiştir(7,8). Bu sistemler, canlı hücrelerin kesme kuvvetlerine karşı iyi direnç göstermeleri nedeniyle yüksek geri çevirim hızlarında işletilebilmekte böylece konsantrasyon polarizasyonu kontrol edilebilmesinde önemli avantaj sağlamaktadır. Konsantrasyon polarizasyonu meydana geldiğinde, filtrat akıları basınçla değişmez hale gelmektedir. Filtrat hızının yeniden artırılabilmesi, ancak uygun akış dinamiği koşullarında sağlanabilir.

Fermentör içerisine mikro poroz bir membran yerleştirilerek fermentasyon ürünlerinin ekstraksiyonunu sağlayan yeni bir fermentör tasarımı da literatürde yer almaktadır(7,8). Sözü edilen bu sistem aerobik fermentasyon için önerilmektedir.

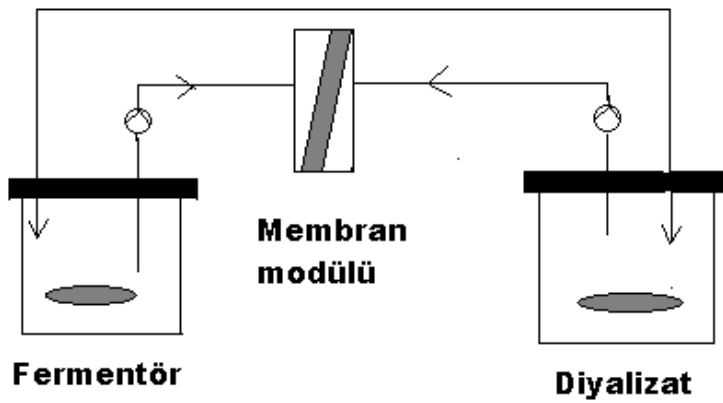
Qian, (1997), Strachan ve Livingston, (1997), fermentasyon için gerekli havanın membran aracılığı ile temin edilmekte olduğunu ve kirlilik probleminin de en aza indirildiğini belirtmektedir (6),(Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Canlı hücrelerin mikroporoz membran modülüne yerleştirildiği membran fermentörü (6).

2.2.2. Hücre Geri Döngülü Membran Fermentörler

Hücre geri döngülü membran fermentörlerde hücreler substrat çözeltisinin beslendiği fermentör içerisine yerleştirilmekte, ürün fermentörü izleyen bir membranla sistemden ayrılmaktadır. Hücreler fermentöre membran üzerinden geri dönmektedir. Sistemde pH ve sıcaklık kontrol edilebildiği gerektiğinde nutrient ilavesi de yapılabilir (9,10).



Şekil 2.4. Diyalizde sürekli fermentasyonlu hücre sistemi (6).

Fermentör arzu edilen biyolojik kütle seviyesine ulaşıldıktan sonra biyokütle ultrafiltrasyon membranına pompalanarak sıvı kısmından ayrılmaktadır. Reaktördeki sıvı seviyesinin sabit tutulabilmesi için besleme sıvı akış hızı ile filtrat akış hızı eşit olarak ayarlanmaktadır.

Hücre döngü fermentörlerde, sistem kararlı haldeyken reaktör verimliliği; substrat konsantrasyonu, ürün konsantrasyonu ve dilüsyon hızının bir fonksiyonu olarak olarak tanımlanmıştır. Dilüsyon hızı arttıkça, reaktör verimliliği belirli bir maksimum değere kadar artmakta ve sonra azalmaktadır. Dilüsyon hızı arttığında, filtrattaki ürün konsantrasyonu kararlı olarak azalmakta ve substrat konsantrasyonu artmaktadır. Sistemde ürün oluşum hızı ve çıkıştaki ürün konsantrasyonu arasındaki denge sağlanması gerekmektedir. Filtrattaki substrat konsantrasyonunun düşük ve ürün konsantrasyonunun yüksek olması, ürün ayırma maliyetinin düşük olmasını sağlamaktadır. Optimum işletme şartlarının, prosesin tamamı dikkate alınarak yapılacak olan maliyet analizi ile belirlenmesi gerekmektedir.

Geri çevirim ve seyreltme (dilüsyon) hızlarının oluşu ürün-inhibitör seviyelerinin düşük tutulabilmesinde yardımcı olmaktadır.

Şekil 2.4'deki sistemde iki farklı işletim sistemi mevcuttur. İlkinde substrat önce fermentöre daha sonrada diyaliz membranına beslenmekte, ikincisinde ise önce önce diyaliz membranından geçirilen çözelti buradan fermentöre difüzlennmektedir.

2.3. Enzimin Hapsedildiği Katalitik Membran Reaktörler

Enzimin ya da hücrelerin membran modülündeki raflara veya hollow-fiber membranın lif tüpleri içerisine yerleştirildiği sistemlerdir. Reaktör içerisine yerleştirilmiş olan enzimler bir yere bağlı olmayıp, membran içerisindeki boşluklarda yer almaktadır. Biyokatalizörün sıvı ortamdan bu şekilde ayrılabilmesi, uygun membran por boyutunun seçilmesi ile mümkündür. Böylece enzimler ve hücreler filtrat çıkışına sızmadan membranın içinde kalabilmektedir. Bu sistemlerde, özellikle, düşük moleköl ağırlıklı ürünlerin ve inhibitörlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Enzim aktivitesinin optimum pH'ya bağımlılığı deneysel çalışmanın şekline göre az veya çok farklılıklar gösterebilmektedir. Bu fark

hangi seviyede olursa olsun, çoğu zaman serbest enzimin optimum pH aktivitesinden farklı olmakta ve uygulamada önem kazanmaktadır. Hollow-fiber membranlar yerine raflı membranlar kullanılarak benzer biyoreaktör konfigürasyonları yapılmaktadır. Bu reaktörlerde üreaz, ürikaz, glikoz oksidaz ve keratin kinaz enzimleri denemiştir.

Sözü edilen çalışmalarda enzim çözeltisi ayrı ayrı raflar halinde tasarlanmış olan membran diyalizöründen geçirilmektedir. Reaktörün yüksek akış hızlarında işletilmesi, kütle transfer dirençlerinin azalmasını sağlamaktadır. Bu tür çalışma canlı organizmalarda kullanılarak yapılmaktadır. Günümüzde mikroorganizmalar oldukça kompleks çok basamaklı enzimatik reaksiyonların gerçekleştirilmesinde başarıyla kullanılabilir. Bu reaktörlerde enzim saflaştırılmasına gerek olmaması nedeni ile toplam reaktör maliyeti azalmaktadır. Biyokatalizörün boyutu asimetric membran süngerindeki por çapını aşıyorsa, membranın raf yüzeyine veya hollow-fiber membrandaki membrandaki lif borusu içerisine yerleşebilmektedir. Substrat akışı ise lif borusu veya membran rafları arasından olmaktadır.

Substratın ürüne dönüşümü sırasında sistemde ana taşınım mekanizması, substratın ana çözeltiden membrana difüze olması şeklindedir. Bunu substratın membran porlarına veya membran raflarına difüzyonu izlemektedir.

Tek bir membran lifi dikkate alındığında, reaksiyon sisteminin şimdiye kadar anlatılmış olanların bir hologramı olduğu gözlenir.

Çapları 100 μm 'ye kadar düşebilen hollow-fiber membranların geliştirilmesi ile hacimlerine göre yüzey alanı oldukça fazla olan borumsu ve raflı reaktörlerin üretilmesi sağlanmıştır. Enzimler yada hücreler, sıvı ortamından hollow-fiber membran içerisinde tutularak ayrılmaktadır. Böylece klasik immobilizasyon tekniklerinin enzim üzerinde oluşturduğu yapısal değişiklikler nedeniyle ve kesme kuvvetlerinin etkisi altında meydana gelebilecek aktivite kaybından da sakınılmış olunur.

Goosen ve ark. (1995) ve Takabakate ve ark. (1991) çeşitli tedavi tekniklerinin geliştirilmesinde sözü edilen reaktör konfigürasyonlarına ilginin giderek arttığı belirtmiştir. Bunun en yaygın uygulamaları suni pancreas olarak

fonksiyon gösteren mikroorganizmaların kullanılması ve bünye dışı detoksifikasyon cihazlarının geliştirilmesidir (11-13).

Literatürde bu tür enzim membran reaktörlerini karakterize eden çeşitli teorik çalışmalar bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar, sözü edilen reaktörlerin reaksiyonun meydana geldiği bölgeye göre dört ana grupta toplanmıştır (6). Bunlar;

1. Lif tüpünde meydana gelen reaktörler
2. Enzim çözeltisinin oluşturduğu yoğun kalın tabakada meydana gelen reaktörler
3. Membranın poroz süngerimsi kısmında meydana gelen reaktörler
4. Substratın aktığı raflarda meydana gelen reaktörlerdir.

İmmobilize stabilitesi ve aktivitesi değerlendirilirken, reaksiyonun gerçekleştiği lif içerisinde ve besleme çözeltisindeki pH farkının dikkate alınması gerekmektedir.

2.4. Jelleşmiş Enzim

Hücre kültürlerinden saflaştırılmış enzim eldesinde, protein çözeltilerinin ultrafiltrasyonu geçerliliği kanıtlanmış bir temel işlemdir. Bu prosesler aynı zamanda enzim immobilizasyonu için konsantrasyon polarizasyonu olayını avantajlı bir şekilde kullanıldığı ilginç bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Enzim çözeltisi, enzimi sıvı ortamdan tamamen ayırabilen bir ultrafiltrasyon membranından basınç altında geçirildiğinde, enzim molekülleri membranın aktif yüzeyi üzerinde tutulmakta ve enzimin katalitik aktivitesine sahip ince bir jel tabakası oluşmaktadır. Enzimlerin gerçek jelasyonu doğrudan membran-sıvı yüzeyindeki enzim konsantrasyonuna bağlıdır. Maksimum enzim konsantrasyonu, jel konsantrasyonundan daha düşük olduğu zaman enzimler gerçek anlamda immobilize olmamaktadır. Yine de membran yüzeyine yakın bölgelerde yüksek sayılabilecek

konsantrasyonlarda enzim toplanmakta, ancak bunlar jel gibi immobilize formda değil yüzeyde çözünmüş halde bulunmaktadır(6).

Jel oluşumu süresince, enzimler mikro çevrelerinde önemli değişiklikler olmadan etkin bir şekilde immobilize olabilmektedirler. İmmobilizasyonun bu şekilde gerçekleşmiş olması, daha sonra enzim stabilizasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir.

Enzim jel tabakası bir dizi akışkan dinamiği şartlarına bağlıdır. Enzim immobilizasyonu enzimatik çözeltinin karıştırmalı yada karıştırmaz kesikli reaktörlerde yarı geçirgen membran üzerinden, jel oluşumu tamamlanıncaya kadar geçirilmesi gerekmektedir.

Protein çözeltilerinin ultrafiltrasyonu genellikle filtrat akısının azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu durum belirli bir transmembran basıncında akı kararlı hale ulaşınca kadar sürmektedir. Bu azalma bazen yüzeyde oluşan jel tabakası yüzünden olmaktadır. Bunun yanı sıra filtre edilen çözelti membran sıvı ara yüzeyinde birikerek ozmotik basıncın düşmesine neden olmaktadır. Bu durumda da filtrat akısı düşmektedir. Jel oluşumu tamamlandıktan sonra membran basıncının artırılması filtrat akısını etkilememektedir.

Enzim membran üzerinde bir tabaka oluşturduğunda hem reaksiyon katalizlenmekte hem de farklı molekül ağırlığındaki bileşiklerin birbirinden ayırmaya yarayan ikinci bir membran yüzeyi oluşmaktadır. Enzim jel tabakasının dinamik formasyonu yöntemiyle enzim immobilizasyonu, tabaka veya boru şeklindeki membran reaktörlere uygulanabilmektedir.

Bu tür sistemlerin kinetik davranışı incelenirken şu noktaların dikkate alınması gerekmektedir;

- Serbest ve jel formdaki enzimlerin reaktör ortamındaki mikro çevreleri ve maruz kaldıkları kesme kuvvetleri birbirinden farklıdır. Jel tabaka içerisindeki substrat kütle transferi ve reaksiyon aynı anda gerçekleşmektedir. Bu nedenle enzim ara yüzeyi ile ana çözelti

arasındaki konsantrasyon gradyanına bağılı olarak bir difüzyon tabakası oluşmaktadır.

- İşletme şartları ve reaktör konfigürasyonuna göre ortaya çıkabilecek dış kütle transfer dirençlerinin dikkate alınması gerekmektedir.

Spesifik reaksiyon hızlarının mutlak sıcaklığa karşı logaritmik grafiklerinin çizilmesiyle hızın hangi basamakta kontrol edildiği belirlenmektedir (Arrhenius eğrisi). Aktivasyon enerjisinin serbest entalpiye göre düşük çıkması, burada geçerli olan reaksiyon kinetiğinin difüzyon sınırlı olduğunu göstermektedir.

Sistemde basıncın artırılması akışın artmasını sağlamak ve reaktör performansını yükseltmektedir. Diğer taraftan oluşan yüksek kesme kuvvetleri immobilize enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilemekte ve substratın ürüne dönüşüm hızını azaltmaktadır. Donato ve ark. 1995 yılında jelleşmiş DNAaz enzimi için yapmış oldukları çalışmada, spesifik aktivitenin transmembran basıncının bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir.

Enzim-jel reaktörlerinin performansı ultrafiltrasyon membran ünitelerinde, silindirik tabakalara yerleştirilmiş olan boru membranların kullanılması ile arttırılabilmektedir. Bu konfigürasyonda filtreleme alanının hacime oranı düz tabaka şeklindeki membran konfigürasyonlarına göre bir derece daha yüksek olup, akışkan dinamiği şartlarının kontrolü daha kolay sağlanabilmektedir. Boru şeklindeki membran duvarlarının iç yüzeyinde bir jel tabakası oluşturabilmek için protein içeren çözelti kesikli modda filtrelenmekte ve bu işlem jel tabaka oluşuncaya kadar devam etmektedir.

Endüstriyel uygulamalarda işletim sürekli modda yapılmaktadır. Substratın reaktöre yatay akış yönünde beslemesi yeni akış dinamiği şartlarının oluşmasına sebep olmaktadır. Jel üzerinde meydana gelecek olan yüksek kesme kuvvetleri enzimin membrandan kısmen veya tamamen uzaklaştırılmasına neden olabilmektedir. Akışkanın kesme kuvvetine maruz kalan bölgelerde enzim aktivitesi kaybolmaktadır. Bu immobilizasyon tekniğinin büyük ölçekli çalışmalarda ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için enzimin mekanik stabilitesinin

garanti edilmesi gerekmektedir. Enzimin mekanik stabilitesinin sağlanabilmesi için öncelikle yatay akış hızı kontrol edilmelidir. İstenmeyen etkilerden kaçınmak için enzim jel tabakası suda çözünmeyen makromoleküller tabakalarla kaplanmakta veya jelin por yapısı içerisine tutuklanması yoluna gidilmektedir. Substratın enzim jeli üzerine yeterince transferi sağlandığında, substrat daha jel üzerinde iken ürüne dönüşmektedir. Bu durumda ürün birikmekte ve enzimin inhibe olmasına neden olmaktadır. Yatay akış hızının, bu durum dikkate alınarak optimize edilmesi gerekmektedir.

Düz tabaka şeklinde ve kapiler yapıda selülozik ve poliamid polimeri membranlara invertaz, asit fosfataz, üreaz, β -glikozidaz, dCMP-aminohidrolaz, malik enzim, DNAaz, ve lipaz enzimleri jel şeklinde immobilize edilmişlerdir. Çalışmaların tamamında enzimler tutuklandıkları membranın yapısal özelliklerinden bağımsız olarak homojen çözeltiler içindeki kendi karakteristik kinetik davranışlarını göstermişlerdir. Ortamda bazı özel bileşiklerin varlığından etkilenen allosterik veya yalancı allosterik enzimler, immobilizasyon prosedüründeki işlemlerden pek etkilenmemişlerdir (14,15).

Jel oluşturulmasında kojelasyon ve kopolimerizasyon gibi başka teknikler de uygulanabilmektedir. İlkinde hem enzimi hem de yüksek molekül ağırlıklı inert bileşikler içeren çözelti yarı geçirgen membranda ultrafiltrasyona tabi tutulmaktadır. Örneğin inert proteinler olan polialbuminler, suda çözünmeyen ve çözünemez bileşikler kojelasyon ajanı olarak kullanılabilmektedir. İkinci durumda enzimler ultrafiltrasyon basamağından önce köprü molekülleri aracılığı yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere bağlanmaktadır. Alfani (1982) yapmış olduğu çalışmalarda, kopolimerize edilmiş ya da kojelasyona uğratılmış enzimatik tabakaların sıcaklığa ve laminar şartlardaki akış hızları karşısında basit jelleştirme prosedürüne göre daha kararlı bir profil oluşturduğunu göstermiştir (6).

Kovalent bağlanma prosedürü nedeniyle kopolimerize edilmiş enzimler, aktivitelerinin büyük bir bölümünü yitirmektedirler. Kojelleştirilmiş enzimlere göre sıcaklık değişimlerine karşı daha az duyarlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle daha çok kojelasyon immobilizasyonu tercih edilmektedir.

Enzim jel tabakalı reaktörün önemi özellikle çoklu enzim reaksiyonlarının peşpeşe uygulanmasının gerektiği durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bu reaktör konfigürasyonu kullanılarak membran yüzeyinde zincirleme enzim tabakaları oluşabilmektedir. Bir tabakadan ürün olarak çıkan ara bileşik diğer tabakadan başka bir ürüne katalizlenmekte, böylece seri enzim reaksiyonları gerçekleşebilmektedir. Enzim jel reaktörlerinde aktivitesini yitirmiş olan enzimin ortamdan uzaklaştırılması mümkün olmaktadır (16,17). Bu reaktörlerin kontrolleri kolay olup diğer enzim reaktörlerine göre maliyetleri düşüktür.

Eski bir teknik olan enzimin membrana emdirme yönteminin yukarıda anlatılan konfigürasyonlara göre uygulanabileceği alanlar sınırlı bulunmaktadır.

2.5. Enzim Bağlı Membran Reaktörler

Biyokatalitikler, membran yüzeyine ya da içine fiziksel veya kimyasal metodlarla bağlanabilmektedir. Kararlı bir bağlanma, substrat çözeltisinde çözünmeyen bir matrikse iyonik bağlanma, çapraz bağlanma veya kovalent bağlanma şeklinde olmaktadır (18,19).

2.5.1. Biyokatalizörlere Kimyasal Olarak Bağlanmış Membranlar

Tez konusu ile bağlantılı olarak bu bölümde daha çok sentetik polimerik membranlara kovalent olarak immobilize edilmiş enzimlerden bahsedilecektir. İlk kez proteaz enzimi diazotize edilmiş polistiren membran üzerinde denenmiş ve böylece enzimlerin kovalent olarak bağlandığı ilk immobilize enzim çalışması literatüre geçmiştir. Bu işlem genellikle son derece aktif köprü molekülleri olan gluteraldehit veya CNBr gibi bileşikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak enzim immobilizasyonunda yer alan mekanizmalar çoğu yönden henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bağlama işlemi için gluteraldehit kullanıldığında, gluteraldehitin karbonil grupları ile aminoasitlerin amin grupları arasında bir shiff bazı reaksiyonu gerçekleşmektedir (19-21). Bu reaksiyon sonucu meydana gelen bağlar, kovalent bağlanma enerjilerinin çok yüksek oluşu nedeni ile oldukça karardır. Diğer taraftan molekül büyüklüğü olarak gayet küçük olan bu çapraz bağlayıcı ajanlar enzim yapısındaki aktif bölgeye nüfuz edebilmektedir. Bu durumda enzim inaktif

olmaktadır. Ayrıca aktif bölgeyi matriksle kapatacak şekilde bağlanmada da enzim vazife göremez hale gelmektedir. Serbest enzimin başlangıçtaki aktivitesine kıyasla geri dönüşümsüz bir aktivite kaybı olmaktadır. Enzim immobilizasyon prosedürü, enzim aktivitesini membran konfigürasyonundan daha fazla etkilemektedir (22).

Enzimler çeşitli membranların yüzeyine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Bağlanma ajanları kullanılarak gerçekleştirilen bu işlem sırasında, enzim membrana doğrudan bağlanmış veya polimer matriks içerisinde oluşan bir ağ üzerine tutulmuş olabilir. Enzimin yüzeye kimyasal olarak bağlandığı membran sistemlerinde, enzimle substrat arasında yakın temas sağlanabilmekte böylece kütle transfer dirençleri kısmende olsa azalabilmektedir. Enzimler, süngerimsi membranlara kimyasal olarak immobilize edildiklerinde, membran duvarları arasındaki kütle transfer dirençlerinin dikkate alınması gerekmektedir.

Duvarları geçirimsiz ve enzimle kaplı tüpsü bir reaktörde kinetik parametrelerin tahmin edilmesi için Kobayashi ve Laidler (1974) tarafından teorik bir model türetilmiş bu çalışmaların sonuçları Bunting ve Laidler tarafından da doğrulanmıştır (6).

Enzimlerin kimyasal olarak bağlandığı bazı hollow fiber membran konfigürasyonları kullanılarak çeşitli tedavi teknikleri geliştirilmiştir. Bu çalışmalar arasında hepatik rahatsızlıklar ve lösemi hastalarına destek verme amaçlı kullanılan bünye dışı cihazların geliştirilmesi sayılabilir (26). Bu tür tedavi amaçlı uygulamalar için enzimlerin membrana dönüşümsüz olarak bağlanması büyük önem taşımaktadır.

Enzimin polimerik asimetric ve simetric membran süngerlere kimyasal olarak bağlanması ile enzim stabilitesi açısından kararlı bir sistem oluşmaktadır. Bu nedenle immün sisteme ait proteinlerin, yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin ve proteolitik enzimlerin immobilizasyonuna imkan vermektedir.

Substrat dönüşümünde rol oynayan kütle transfer mekanizmaları, temel olarak kısımlandırılmış enzim membran reaktör için Waterland ve ark. (1974) tarafından geliştirilen modele uymaktadır (27). Burada kinetik parametreler serbest enzim

kinetik çalışmalarına eşit kabul edilemeyeceğinden, immobilizasyon prosedürü sonrası enzim davranışının kinetik olarak karakterize edilmesi uygundur.

İmmobilizasyon prosedürünce uygulanan ağır kimyasal işlemlerden membranın taşınım ve mekanik özellikleri etkilenebilmektedir.

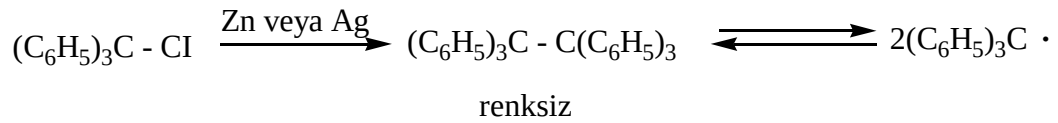
Bünye dışı cihazları tasarlanmasında genelde Cupropan hollow fiber membranlar kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin damar içine doğrudan enjeksiyonu sırasında çeşitli yan etkiler ortaya çıktığından immobilize enzim uygulamaları üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmalarda asparaginaz, katalaz, ürikaz, allantokinaz ve allantoinaz enzimleri gluteraldehit veya CNBr aracılığı ile sözü edilen membrana immobilize edilmektedir. Bünye içindeki akışkan dinamiği şartları bu tür reaktörlerin işletilebilme koşullarını doğrudan etkilemekte ve işletilebilme aralıklarını ancak belli limitler için sağlamak mümkün kılmaktadır. Bu tür reaktörler genellikle difüzyon kontrollü bölgede işletilmeye zorlanmaktadır. Bu işletim şartları altında toplam reaksiyon hızı substrat sağlanabilme hızına bağlıdır. Mazzola ve Vecchio (1981) maksimum reaksiyon hızına ulaşıldığında yatay akış hızının –artık o değerlerden daha yüksek hızlarda çalışıldığında görünür aktivitenin düştüğü- özel bir sınır değere sahip olduğunu göstermişlerdir.

3. RADİKALİK POLİMERİZASYON

Radikalik polimerizasyon teorisinin oluşturulmasında eski Sovyetler Birliğinde akademisyen olan N.N.Semenof tarafından geliştirilen zincir reaksiyon teorisi temel alınmıştır. Staudinger stirenin polimerizasyonunu incelerken, polimerizasyon prosesinde stiren dimer ve trimerlerine rastlamadığını açıklamıştır. 1940'lı yıllarda G.V.Schulz, H.Mark, P.J. Flory kendi elde ettikleri kinetik sonuçlara dayanarak basamaklı radikalik polimerizasyonun mekanizmasını aydınlatmaya çalışmışlardır. Bugünkü polimerizasyon bilminin temel iskeletini kurmuşlardır(28).

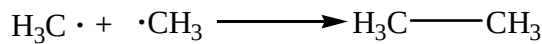
3.1. Serbest Radikaller

1900 yılında M.Gomberg hekzafeniletanın benzendeki çözeltisinin ısıtıldığında sarı renge dönüştüğünü ve yüksek bir reaksiyona girme yeteneği kazandığını gözlemlemiştir.

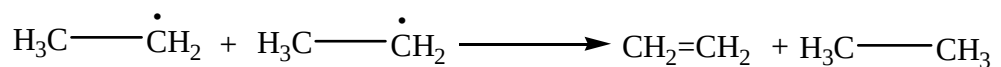


Hekzafeniletanın karbon-karbon bağı yarılarak, trifenilmetil radikalleri oluşur. Trifenilmetil molekülü çiftleşmemiş bir tek elektron içerir.böyle yapılara serbest radikal adı verilir. Radiakllerin stabilizasyonu aşağıda verilen yollarla gerçekleşmektedir.

- Rekombinasyon (birleşme ile sonlanma)

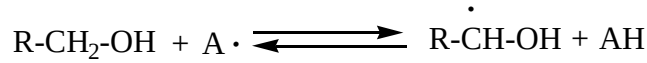


- Disproporsiyon (orantısız sonlanma)

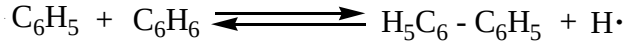


- Çiftleşmemiş Elektron Transferi (radikalotropi)

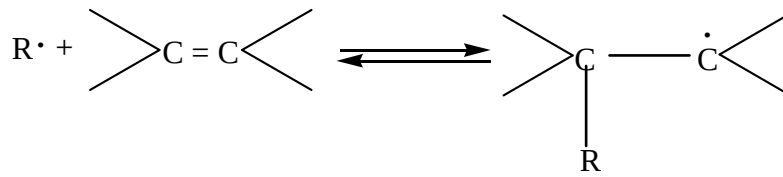
(a) Hidrojen atomunun ayrılması



(b) Radikalin değişmesi



(c) Çift bağa birleşmesi



Radikalik zincir reaksiyonunda radikalin çift bağa birleşmesi, reaksiyonu başlatan ilk basamaktır. Bu oluşan radikallere monomerlerin ardı ardına katılması ile büyür ve çoğalma reaksiyonu gerçekleşir. Büyüyen makroradikallerin rekombinasyonu veya disproporsiyon olayında, radikalin büyüme reaksiyonu bir noktada durdurulur, böylece zincirin kırılması gerçekleşir. Elektron transferi reaksiyonlarında, moleküler zincirin kırılması aynı zamanda yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olabilir. Bu olaya “zincirin transferi” adı verilir. Böylece polimerizasyon başlama, çoğalma, sonlama ve zincir transferinden oluşan ardarda reaksiyonlardan meydana gelir.

3.2. Polimerizasyon Reaksiyonu Yöntemleri

Radikal zincir reaksiyonları genelde dört yöntemle yapılmaktadır; blok polimerizasyonu, çözeltide polimerizasyon, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonu.

3.2.1. Blok Polimerizasyonu

Genellikle blok (kütle) polimerizasyonu;

1. Monomerin saf halde ısıtılması ile
2. Monomere ışık veya radyoaktif ışınların etkisi ile
3. Monomere uygun başlatıcı eklenmesi ile gerçekleşir. Polimer blok halde (katı kütle) halinde oluşmaktadır.

Polimer kütlelerinde az bir miktar katalizör veya polimerizasyona girmemiş monomer kalabilir. Bu yöntemle kolayca ve saf halde polimer sentezlenmesi mümkündür. Ancak reaksiyon sırasında ortamdan geçirilmesi çok zor olan ısının sistemde yerel ısıtma yapması, oluşmuş polimerin reaktörün duvarlarına yapışması ve diğer istenmeyen ürünler blok polimerizasyonunu ekonomik olarak amaca uygun olmaktan uzaklaştırır ve sanayide pratik olarak uygulanmasını kısıtlar.

3.2.2. Çözelti Polimerizasyonu

Monomerlerin uygun çözeltilerde seyreltilmesi, reaksiyon süresince gerçekleşen yerel ısınmalar çözelti polimerizasyonu ile engellenir. Çözeltide polimerizasyonun blok polimerizasyondan diğer bir üstünlüğünde reaksiyon sona erdiğinde oluşan polimerin çözünmüş halde eldesidir. Uygun çözücüler kullanılarak ve monomer konsantrasyonunu belirli ölçülerde değiştirerek, polimerizasyon hızının monomerin konsantrasyonuna bağımlılığı, zincirin çözücü yardımı ile transfer yeteneği vb., faktörler incelenebilir.

Çözücülerde polimerizasyon, sulu ortamda polimerizasyona kıyasla daha avantajlı olduğundan, günümüzde yeniden önem kazanmıştır. Burada çözücülerin tekrar kullanıldığı teknolojilerin gelişmesi ile kirletici atıkların etkisi azaltılmıştır.

3.2.3. Süspansiyon Polimerizasyon

Süspansiyon polimerizasyonunda monomer suda süspanse edilmektedir. Çözücü içinde asılı partiküllerin çapı 0,1 milimetreden birkaç milimetreye kadar olabilmektedir. Başlatıcı, monomer damlalarında çözünmektedir ve reaksiyon bu damlaların içinde meydana gelmektedir. Açıklanan yöntem doğası gereği blok polimerizasyona benzer bir yöntem olarak görülmektedir. Aynı zamanda reaksiyon sistemi su fazında dağılmış partiküllerde gerçekleştiği için reaksiyondan ayrılan ısı, su fazından dışarı transfer edilir ve ısıнын kolayca kontrol edilmesi sağlanır. Blok polimerizasyondan farklı olarak süspansiyon polimerizasyon, emülsiyon polimerizasyonundan sonra ikinci olarak sanayide geniş bir uygulama alanına sahiptir.

İşlemin gelişim süresince süspansiyon vizkozitesi artmakta ve taneciklerin kolayca yapışması ve bunun sonucu olarak da büyük partiküllere dönüşmesi gözlemlenmektedir. Meydana gelecek olan yapışkanlığın engellenmesi için ortama uygun olarak stabilizör eklenmesi gerekmektedir. Jelatin, nişasta, polivinil alkol, karboksimetil selüloz ve diğer suda çözünmeyen polimer bileşiklerinin yanı sıra toz halinde Ca ve Ba karbonatlar, bentonit, kil ve buna benzer anorganik bileşikler stabilizör olarak kullanılmaktadır.

Monomer ve suyun karşılıklı çözünürlüğünü azaltmak, su fazının yoğunluğunu ve yüzey gerilimini düzenlemek için sisteme sık sık elektrolit, örneğin yemek tuzu eklenmelidir.

3.2.4. Emülsiyon Polimerizasyonu

Sabunun sudaki çözeltisinde konsantrasyon belirli bir değerin üzerine çıktığında sabun molekülleri agregasyona uğrar ve misel oluşturur. Böylece suda az çözünen veya çözünmeyen monomerlerin eklenmesi durumunda, monomer molekülleri misellerin içerisine girer ve hidrofobik monomer suda kısmen çözünür. Bu durum solubilizasyon olarak tanımlanmaktadır.

Emülsiyon polimerizasyonunda genellikle suda çözünen başlatıcılar, örneğin potasyumpersülfat kullanılmaktadır. Su fazında oluşan radikaller misel içerisindeki monomer molekülleri ile çarpışmakta ve polimerizasyonu başlatılmaktadır. Görüldüğü gibi emülsiyon polimerizasyonunun mekanizması prensip olarak süspansiyon polimerizasyonunun mekanizmasından farklıdır. Emülsiyon polimerizasyonunun esas avantajı yüksek reaksiyon hızı ve yüksek polimerizasyon derecesinin olasılığıdır. Bunun yanı sıra sıcaklık, reaksiyon sisteminin viskozitesi ve diğer faktörler kolayca düzenlenebilmekte ve emülgatörün varlığı reaksiyon karışımının yüksek hızda karıştırma gereğini ortadan kaldırmaktadır.

3.3. Radikalik Polimerizasyon Reaksiyonunun Basamakları

En yaygın polimerizasyon başlatma yöntemlerinden biri başlatıcı varlığında polimerizasyondur. Aşağıda benzoilperoksitin eklenmesi ile başlatılan polimerizasyon reaksiyonu verilmiştir.

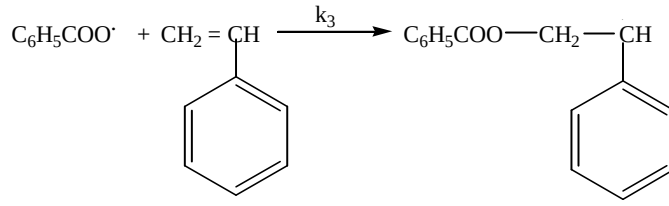
Benzoilperoksit: Benzoilperoksit (BPO) deney koşullarında monomoleküler homolitik ayrılma ile serbest radikallere dönüşür.



Bu reaksiyonun hızını veren denklem ise,

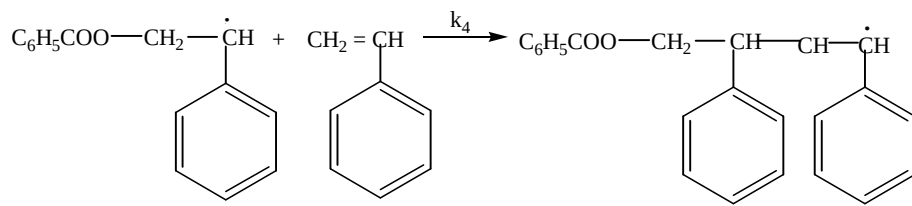
$$-d[\text{BPO}] / dt = k_1[\text{BPO}] + k_2[\text{BPO}]^x$$

Benzoil peroksitin fenil çekirdeğinin farklı türevleri, parçalanma hızına etki eder. Benzoil peroksitin ayrışmasını birinci basamak ve ikinci basamak temsil eder. Gerçekte her iki radikalden hangisinin başlatıcı olduğu bilinmemektedir. Bu radikalın stirenle muamelesinin ardından radikalik polimerizasyon reaksiyonu başlamış olur.



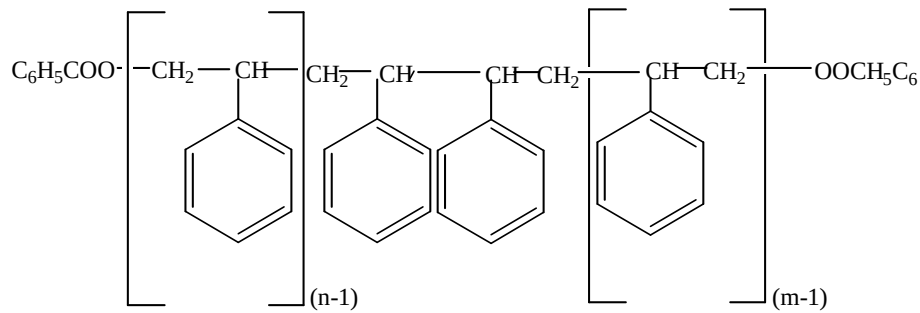
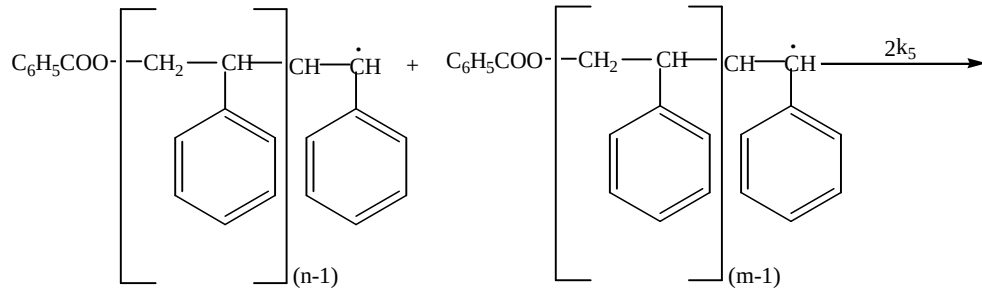
k_3 : Başlama reaksiyonu hız sabiti

Oluşan bu radikal başka bir monomer molekülün çift bağı ile birleşir ve bu reaksiyon defalarca tekrarlanır. Bu basamak reaksiyonun büyüme evresidir.



k_4 : Büyüme reaksiyonu hız sabiti

Tüm bu radikaller, ara ürün olarak çok kısa yaşam süresine sahiptirler. Radikaller rekombine olarak stabil polimerler oluşturabilirler.



k_5 : Zincir reaksiyonunun sonlanma hız sabiti (2 çarpanı, makromoleküllerin oluşumunda herbir reaksiyona iki radikalin katıldığını göstermektedir.)

Benzoilperoksitin konsantrasyonuna I dersek, başlatıcının ayrışma hızı,

$$V_1 = k_1[I] \text{ olur.}$$

Monomer radikalinin oluşma hızı,

$$V_1 = d[BPO] / dt = 2fk_1[I]$$

f: Başlatıcının etkinlik faktörü

Sonlanma hızı ise iki radikalin kaybolması sonucu oluşur.

$$V_5 = -d[BPO\cdot] / dt = 2k_5[BPO\cdot]^2$$

Reaksiyonun başlama hızı ile sonlanma hızlarının eşit olduğu düşünüldüğünde,

$$V_1 = V_5 \text{ ise } 2fk_1[I] = 2k_5[BPO\cdot]^2$$

Buradan,

$$[BPO\cdot] = \{fk_1[I] / k_5\}^{1/2} \text{ elde edilir.}$$

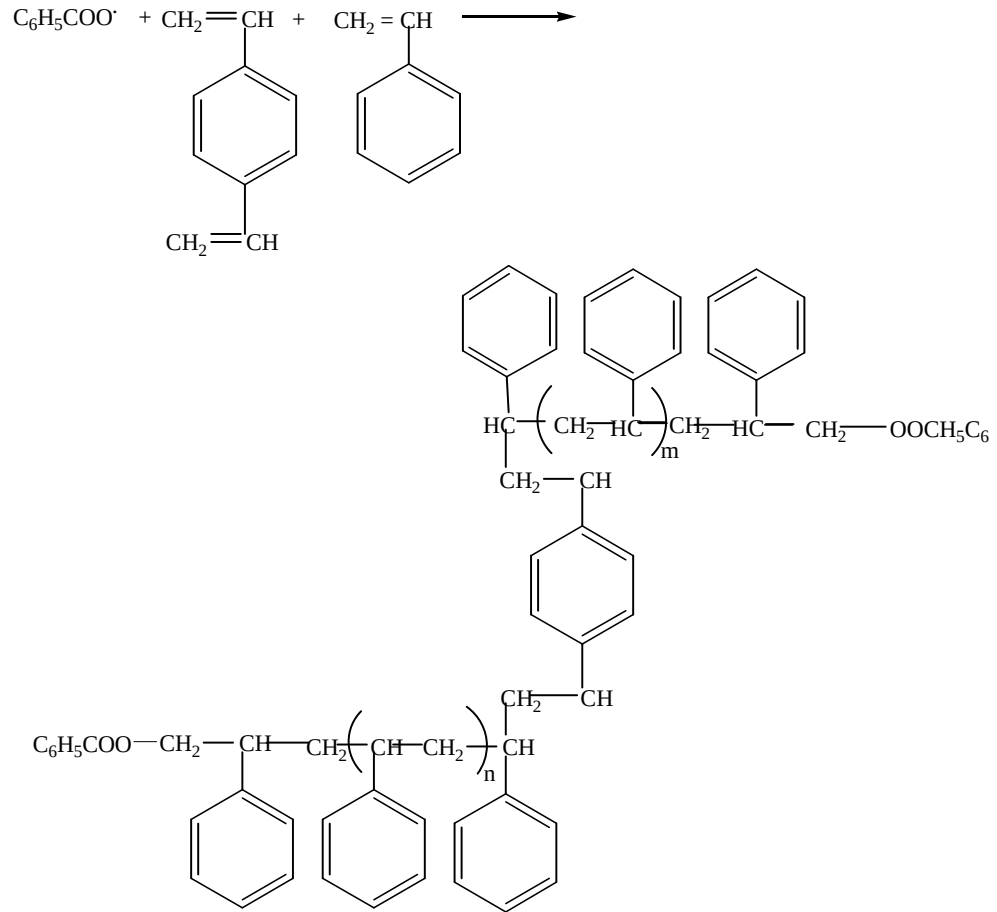
Reaksiyon hızı R, reaksiyonun büyüme hızına eşit olduğu kabul edilirse,

$$R = k_3 [BPO\cdot] [BPO], \text{ yukarıdaki denklemler eşitlenirse,}$$

$$R = k_3 \{fk_1[I] / k_5\}^{1/2} [BPO] \text{ formülü elde edilir.}$$

3.4. Poli(Stiren-Divinilbenzen) Polimerizasyon Reaksiyonu

Endüstride ve günlük hayatta oldukça yaygın olarak kullanılan polistiren divinil benzenin çapraz bağlayıcı olarak kullanılması ile özellikle membran teknolojilerinde, membrana dayalı reaktörlerde çok geniş kullanım alanı bulmuştur (29,30,31). Polistiren doğası itibarıyla lineer bir polimerdir. Divinilbenzenle stirenin yapmış olduğu radikalik reaksiyon sonucunda çapraz bağlanmış bir ağ yapılı polimere dönüşür (Şekil 3.1).

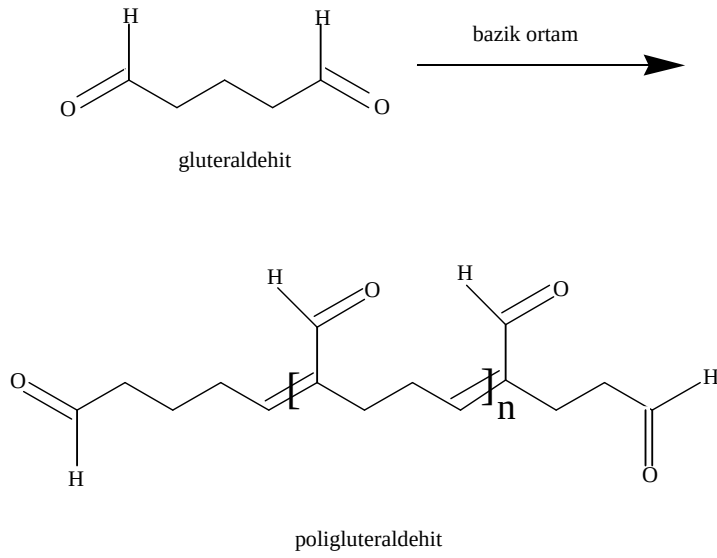


Şekil 3. 1. Polistiren ve divinil benzenin radikalik polimerizasyon reaksiyonu.

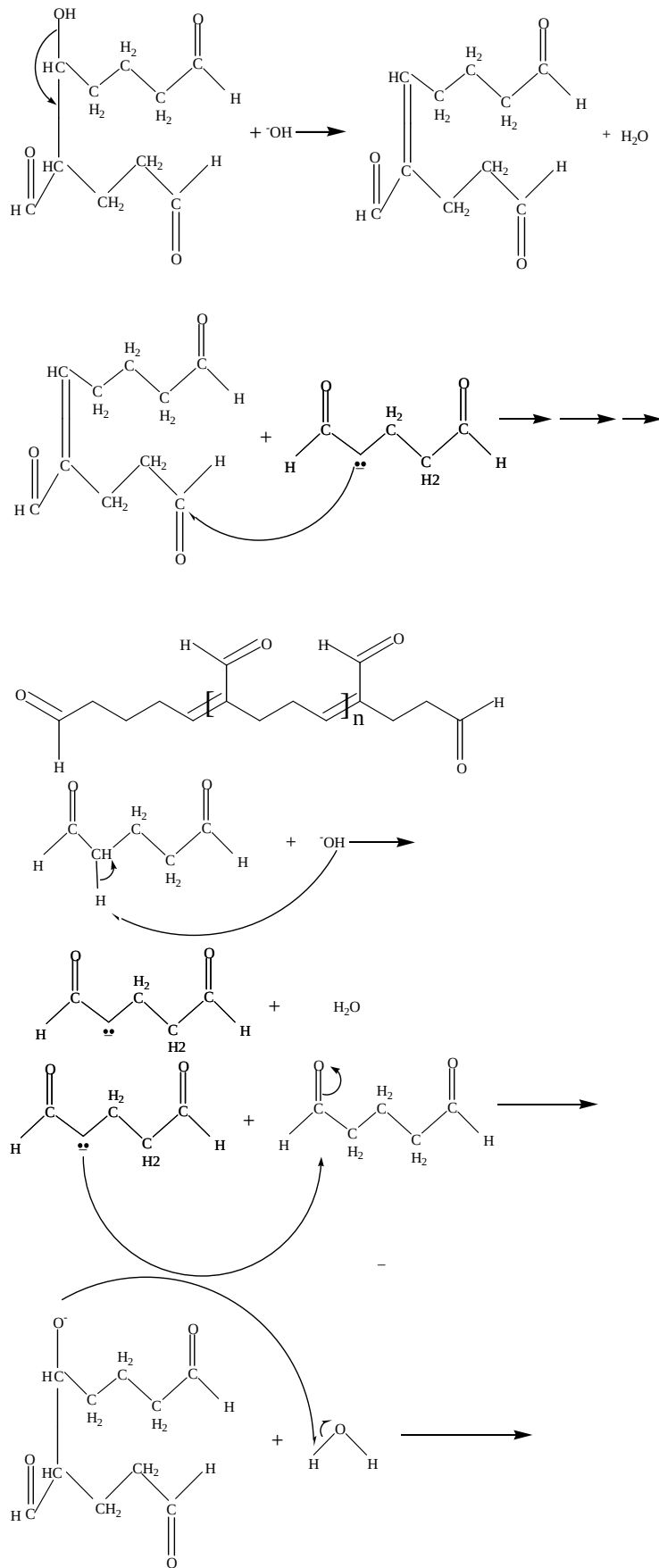
4. POLİGLUTERALDEHİT

Poligluteralehit biyosensor teknolojisinde, enzim immobilizasyon sistemlerinde, enzim modifikasyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı bir bileşiktir. Üzerindeki karbonil grupları sayesinde poligluteralehit, amin grubu bulunduran bileşiklerle shift bazı reaksiyonu yaparak kovalent olarak bağlanır.

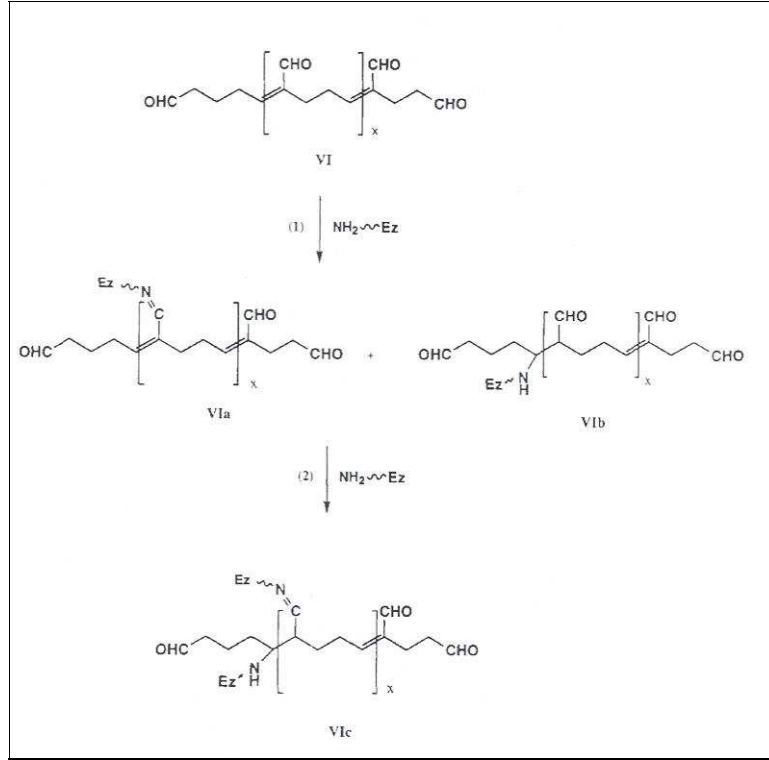
Polimerizasyon reaksiyonu bir aldol kondenzasyon reaksiyonudur (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. Gluteraldehitin polimerizasyon reaksiyonu.



Şekil 4. 2. Glutaraldehitin polimerizasyon reaksiyonunun mekanizması



Şekil 4.3. Poligluteraldehitte enzim enzim immobilizasyon reaksiyonu.

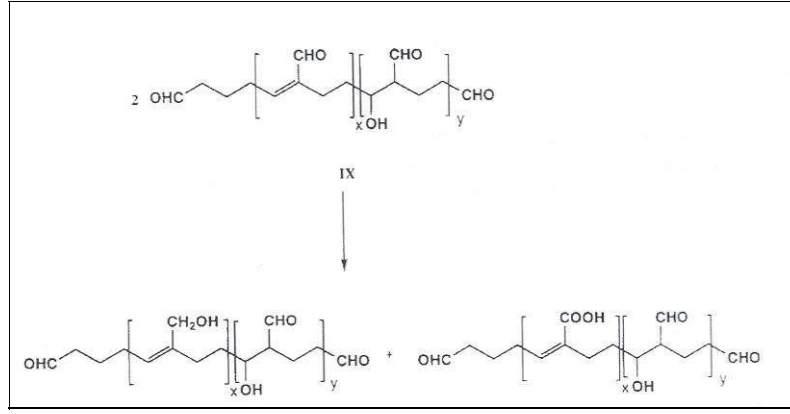
Poligluteraldehit pekçok metodla elde edilebilir. Bazik veya nötr şartlarda pH 7-13,5 aralığında suda çözünen veya çözünmeyen, molekül ağırlığı 12.000-20.000'e değişen polimerler oluşur. Tablo 7'de pH ve monomer konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak suda çözünen veya çözünmeyen polimerlerin yüzdeleri verilmiştir. Ayrıca yapılarda karboksil, hidroksil, aldehit grupları pH' a bağlı olarak değişen yoğunlukta olmaktadır . Karbon-karbon çifte bağları ise karbonil grupları ile orantılı miktarda bulunmaktadır. Suda çözünen poligluteraldehitler, suda çözünmeyenlere kıyasla daha fazla karboksil grubu içermektedir. Bunun nedeni ortamın pH' sına bağlı olarak oluşan Cannizzaro tepkimesidir (Şekil 4.2.). Poligluteraldehit 75-160 C° sıcaklığa maruz kaldığında ağırlığının %3,6' sını kaybetmektedir. Sıcaklık 160-300 C° arasında ise ağırlığının %37' sini kaybetmektedir(32).

Poligluteraldehit sulu çözeltilerinde 233 ve 285 nm'lerde pik vermektedir. Polimerizasyon gerçekleştiğinde karbon-karbon çift bağı miktarı artacağından 233 nm'de optiksel yoğunluk artacaktır (Karbon- karbon çift bağı 233 nm' de karakteristik pik verir). Hidroksil grupları bu çifte bağlarla reaksiyon

verebilmektedir. Aldehit grupları 285 nm’de absorbands verir. Aldol kondenzasyon reaksiyonu gerçekleştikçe, karbonil grubu miktarı azalmaktadır(33).

Tablo 4. 1. Değişen pH ve monomer konsantrasyonuna karşı suda çözünen yada çözünmeyen polimerize glutraldehit konsantrasyonu

Monomer konsantrasyonu %(v/v)	pH	Suda çözünmeyen polimer %	Suda çözünen polimer %
50	10.5	45.0	
20	10.5	35.0	1.4
12	10.5	26.0	
5.0	10.5	10.0	
1.0	10.5	1.0	
12.0	11.5	23.0	
12.0	12.2	14.0	
12.0	12.5	4.0	
12.0	13.3	0.0	
20.0	13.5	0.0	



Şekil 4. 3. Poligluteralehitte yükseltgenme tepkimesi.

FTIR spektroskopisinde ise konjuge olmayan aldehit grupları, konjuge aldehit grupları ve karbon-karbon çifte bağları 1720, 1680 ve 1635 cm^{-1} 'de adsorbsiyon bandına sahiptir.

Suda çözünmeyen poligluteralehit sentezi bir çapraz bağlayıcı ve bir surfaktan vasıtası ile yapılan süspansiyon polimerizasyonudur. Çapraz bağlayıcı ajan olarak poliamidler - örneğin izobütoksipoliakrilamid – kullanılır. çapraz bağlayıcı konsantrasyonu % 0,1-10 arasında olabilir yalnız genellikle %1-5 tercih edilir. Çapraz bağlayıcının etkisi ile poligluteralehit polar çözücülerde çözünmez. Ama benzen, toluen, hekzan, heptan gibi alifatik veya aromatik organik çözücülerde çözünür. Surfaktan olarak aminler, amin tuzları, kuaterner amonyum bileşikler gibi katyonik surfaktanlar, karboksilik asitler, sülfürik esterler, sülfonik asitler gibi anyonik surfaktanlar veya polietilen oksit, polipropilen oksit gibi non-iyonik surfaktanlar kullanılabilir. Oluşan gluteralehit polimerinin büyüklüğü surfaktan konsantrasyonuna, pH' a, gluteralehit monomer konsantrasyonuna bağlıdır. Süspansiyon formu içinde %0,1-20 gluteralehit, %0,1-10 çapraz bağlayıcı ajan, %0,1-3 surfaktan bulunur. pH aralığı 7-13 olup, genellikle 9-11,5 arası tercih edilir. Suda çözünmeyen poligluteralehitin çapı 200 Å - 10µ aralığındadır.

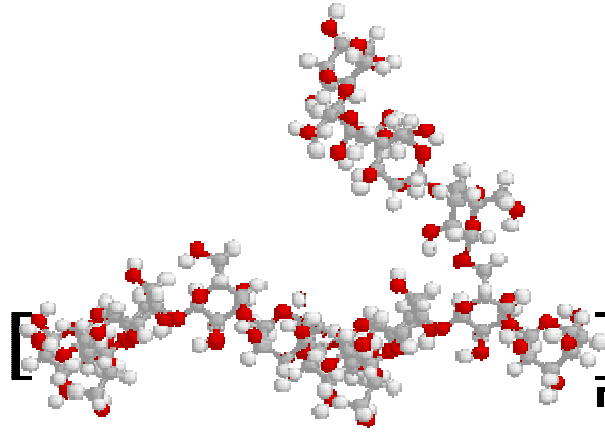
Suda çözünmeyen poligluteralehit sentezi; % 5 poligluteralehit, solüsyonu (100 cc) ve % 0,05 etilen daimin, % 3 Triton X-100, pH 11' de, 25 C°' de karıştırılır. Polimerin çapı 1µ civarındadır(32).

Gluteraldehite immobilizasyonda nazaran poligluteraldehitin tercih edilmesinin birçok sebebi vardır. Gluteraldehitte enzim veya aminli bileşiklerin immobilizasyonunda oluşan reaksiyon shiff bazı reaksiyonu veya asetal reaksiyonlardır. Oluşan bağlar kararsız yapıdadır. Ortam pH' dan etkilenirler. Shiff bazı indirgenme reaksiyonu ile ancak sekonder amin durumunda kararlıdır. Bu işlem hem maliyetli, hemde enzim veya diğer biyolojik materyaller için bozucu etkiye sahiptir. Poligluteraldehitte ise immobilizasyon için iki tarz reaksiyon oluşabilir. Biri yukarıda anlatıldığı shiff bazı oluşumu, diğeri ise Michael katılması denilen konjuge çift bağa enzimin amin gruplarının katılmasıdır (Şekil 4.3.). İki bağda rezonans stabilizasyonu nedeni ile kararlıdır. İndirgenme reaksiyonuna gerek duyulmaz (34).

5. NİŞASTA, ENZİMATİK HİDROLİZİ VE HİDROLİZ ÜRÜNLERİ

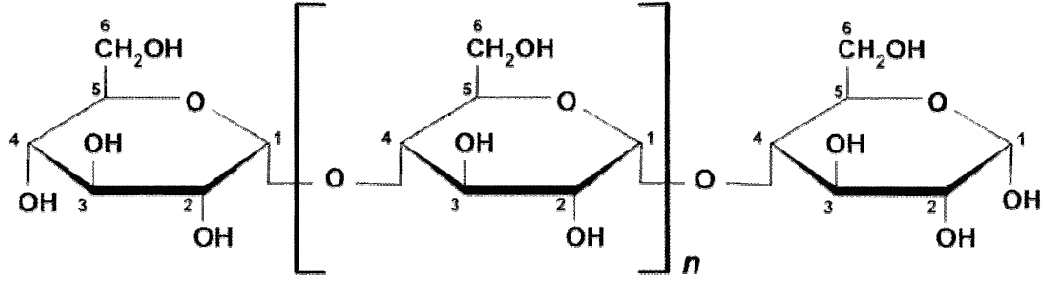
5.1. Nişasta

Yüksek yapılı bitkilerde, fotosentez ürünü olan nişasta depolanmış bir polisakkarittir. İki polisakkaritten oluşur. Bunlar lineer polimer olan amiloz ve dallanmış polimer olan amilopektindir. Doğal olarak granüler yapıda oluşan tek polisakkarittir. Bu granüler yapı oldukça yoğun olup, soğuk suda çözünmez (Şekil 5.1.).



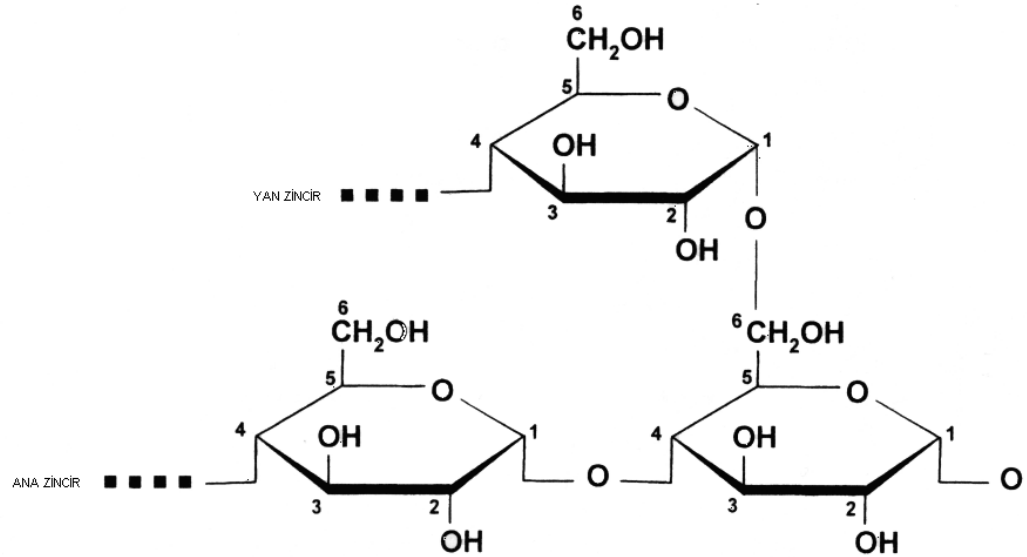
Şekil 5. 1. Nişastanın yapısı

- **Amiloz** : Anhidroglukoz ünitelerinden oluşan amiloz, α -D-1,4 glukozidik bağlarını içeren lineer bir polimerdir. Amilozların molekül ağırlığı ve seviyesi nişasta tipine göre değişim gösterir. Amiloz molekülleri 200-2000 anhidroglukoz ünitesinden oluşur. Suda çözünmüş amiloz oldukça kararsız yapıya sahip olup, molekül içi ve moleküller arası etkileşme yapar. Bu durum amiloz çözeltisinin viskozitesinin artmasına, amiloz moleküllerinin çökmesine neden olur. Amiloz molekülleri iyot ile mavi renkli sarmal kompleksler verirler (Şekil 5.2.).



Şekil 5. 2. Amilozun yapısı

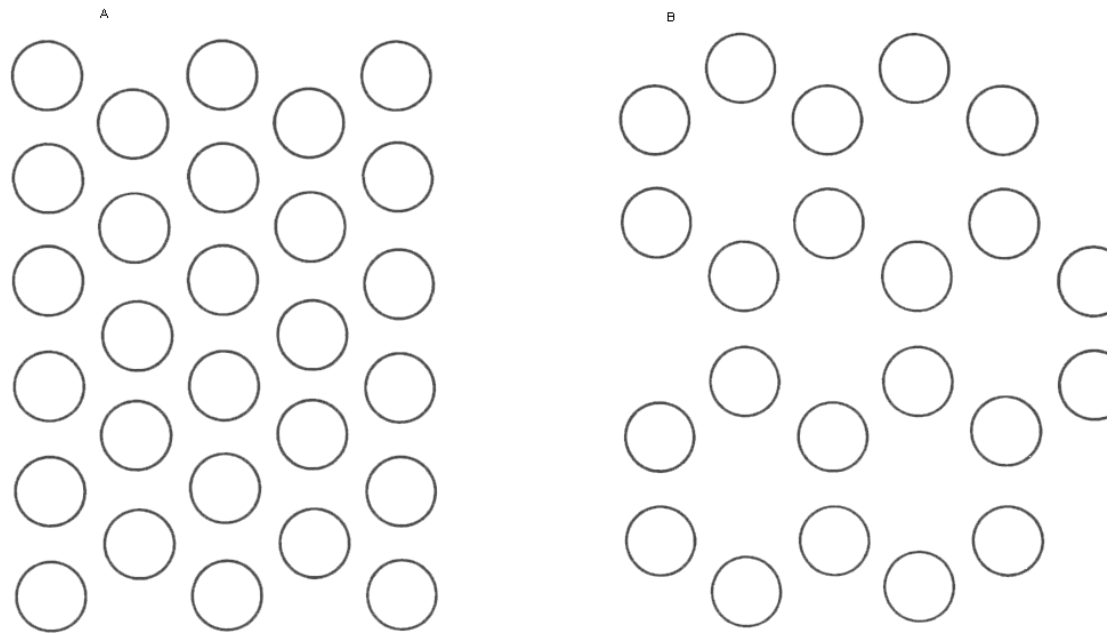
- **Amilopektin:** Amilopektin yapısında α -D-1,4 glukozidik bağla oluşan lineer yapıya 20-30 anhidroglukoz ünitesinde bir α -D-1,6 glukozidik bağ ile polimerik dallanma mevcuttur. Her molekülde 50-70 dal bulunur ve bu dalların her biri 20-25 anhidroglukoz zincirinden oluşur. Amilopektin çözeltisi yüksek viskoziteye, berraklığa, jelleşmeye karşı dirence, karalılığa sahiptir. Amilopektin iyot ile zayıf olarak bağlanarak kırmızı / kahverenkli kompleks oluşturur. Farklı nişasta tiplerinde değişik seviyede amilopektin bulunur (Şekil 5.3.).



Şekil 5. 3. Amilopektinin yapısı.

Nişastada, bu iki polimerik yapı yarı kristal ve amorf tabakalar halinde bulunur. En kaliteli nişastalarda bu tabakalar merkezi simetriktr. Yarı kristal tabakalar kısa amilopektin dallarının çifte sarmal yapı oluşturması ile oluşur. Yarı

kristal tabakanın amorf bölgesi ve amorf tabakalar yarı kristalize olmamış amilopektin dallarından ve amilozlardan oluşur. Tahıl nişastasında olduğu gibi çifte sarmal yapılar yoğun bir şekilde paketlenmiş ise ortogonal niteliktedir (A tip kristal), patates nişastasında olduğu gibi çifte sarmal amilopektin dallar daha az yoğun paketlenmiş ise hekzagonal yapıdadır (B tip kristal). Her iki tipte bünyelerinde yapısal su bulundurur, yalnız yapısal su miktar olarak B tip kristalde daha fazladır (Şekil 5.4.). Nişastalar granül yapılarında bulunan kristal "crystallite" tiplerine göre sınıflandırılır. Diğer tür nişastalar örneğin bezelyede iki kristal tipinde bulunmaktadır. Bu tipler granülün spesifik bölgelerinde bulunur.



Şekil 5. 4. Nişastadaki kristal yapıları A. Ortogonal kristal yapı B. Hekzagonal kristal yapı

Amilopektin ile amiloz miktarları nişastanın cinsine bağlı olarak değişmektedir. Waxy nişastası gibi hiç amiloz içermeyen nişastalarda bulunmaktadır. Bazı baklagiller nişastasında ise %75' e varan amiloz bulunmaktadır.

Nişasta üzerinde hidroksil grupları sayesinde çok iyi nem çekici özelliğe sahiptir. Bünyesinde %7,5 su bulunduran nişasta nem çekici olarak, maddelerin nemden korunmasında kullanılır.

5.2. Nişastanın Asidik Hidrolizi

Hammaddede bulunan çeşitliliği reaktör şartlarına adapte etmek için asitle muameleden yararlanılır. Konsantre hidroklorik asit bu durumun dışındadır. 100-240 C°'de konsantre hidroklorik asitle hidroliz mümkündür. Daha büyük asit konsantrasyonlarında sıcaklık 30 C°'ye kadar düşer.

Sülfürik asit konsantre formda kullanılabilse de, yaygın olarak % 0.5-5 seyreltik çözeltileri hidroliz işlemi için kullanılır. Konsantre veya seyreltik asit çözeltilerinde ayırma ve geri dönüşüm işleminden sonra yaklaşık %3 kadar kayıp vardır. Konsantre asit kullanımının bir avantajı düşük basınç ve sıcaklıkta hidroliz reaksiyonunun gerçekleşmesidir.

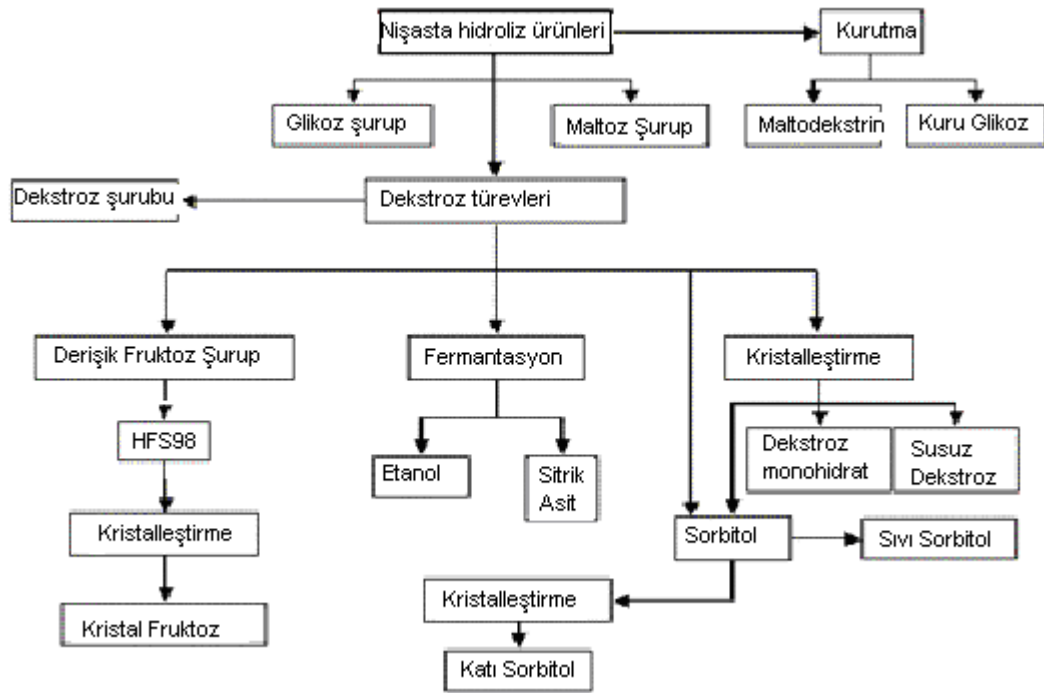
Konsantre hidroklorik asit (%47) güçlü asidik hidroliz için kullanılır. Konsantre HCl herhangi bir asidik prosesin şeker veriminden daha yüksek bir verimle oda şartlarında nişastayı hidroliz eder. Ancak yüksek korozyon, uçuculuk, pahalılık gibi çok fazla dezavantaja sahiptir.

5.3. Nişastanın Enzimatik Hidrolizi

Nişastayı hidroliz eden enzimlere amilazlar adı verilir (Şekil 5.5.). Bu enzimlerin en önemlisi α -amilazdır. Nişasta + su $\longrightarrow$ glikoz reaksiyonu nişastanın hidroliz reaksiyonudur. Glikozidik bağın kopması ile suyun -OH' i bir glikozla H- i diğer glikoz ile birleşir. α -amilaz, α -1,4- glikozidik bağlarını, glikoz ünitelerine kadar hidroliz edebilir. Bir başka amilaz çeşidi olan glukoamilaz, α -1,4- ve α -1,6- bağlarını glikoza kadar hidroliz eder (35).

Jelleştirilmiş nişastanın amilaz ile muamelesi sonucu dekstrozu zinciri 1-20 arasında olan maltodekstrin oluşur. Maltodekstrin tatsız olup molekül ağırlığı dağılımlıdır ve α -1,4- glikozidik bağlı anhidroglikozlardan oluşur. Maltodekstrin hazır çorbaların, pudinglerin, dondurmaların, çikolatalı içeceklerde bebek mamalarının yapımında, gıdalarda dolgu maddesi, çikolatalı içeceklerde kurutma ajanı, ekmeklerde, pasta ve etlerde nem tutucu olarak, düşük NaCl içeren tuz üretiminde kullanılır.

Genel formülü $C_{12}H_{22}O_{11}$ olan ve iki D-glikoz molekülünün 1,4 glikozidik bağla bağlanmasından oluşun bir disakkarittir. Sistematik adı 4-O- α -D-glikopiranozil-D-glikopiranozudur. Maltoz glikozdan daha az tatlı bir şekerdir. Çözelti halinde, %35-60 maltoz içerenlere konsantre maltoz şurubu, %70-85 maltoz içerenlere yüksek konsantre maltoz şurubu denir. Şurupları düşük vizkoziteye sahiptir. Kullanım alanı özellikle şekerleme endüstrisi, gıda ve ilaç endüstrisidir(36).



Şekil 5.5. Nişastanın hidroliz ürünleri

6.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

6.1. Gereçler

6.1.1. Kullanılan Maddeler

Tablo 6.1. Deneyde kullanılan sarf maddeler

ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATOLOG NO
Maltogenaz L	Nova Nordisk	ABNOOO20
Stiren	Tüpraş-Yarımca	
Divinil benzen	Merck	803598
Gluteraldehit	Merck	8206031000
KH ₂ PO ₄	Fluka	60218
NaOH	Fluka	71692
HCl	Merck	100.317.2500
NaCl	Carlo Erba	368257
Maltodekstrin	Avebe(Holland)	
Maltoz	Sigma	M-2250
Sodyum Asetat	Sigma	C-1000
Sodyum Azide	Merck	1.06688.0250
Asetik asit	Merck	1.00056
Thymol	Sigma	T-0501
α-naftol	Sigma	N-1000
H ₂ SO ₄	Sigma	732.2500
C ₂ H ₅ OH	Merck	1.00030
Acetonitril	Merck	13.2500
K5 TLC plak	Whatman	4850-820

6.1.2. Enzim

Maltogenaz L enzimi Novo Nordisk tarafından hediye edildi. Maltogenaz *Bacillus subtilis*'in genetik modifiye bir soyuyla üretilmiş ve eksprese *Bacillus stearothermophilus*'den elde edilen sıcaklığa dayanıklı bir maltogenik α -amilazdır. Koyu kahverenkli sıvı olan enzimin yoğunluğu 1,25 g/ml ve aktivitesi 4000 MANU/ml olarak belirtilmiştir. MANU aşağıda belirtilen standart şartlarda dakikada maltotriozun 1 mikromolünü hidroliz eden enzim miktarıdır.

pH	5,0 (0,5 M Sitrat tampon çözelti)
Sıcaklık	60 °C
Substrat	Maltotrioz
Reaksiyon Süresi	30 dakika

Maltogenaz, maltotriozu içeren düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritlerde, kısmen hidroliz edilmiş nişastada ve nişastadaki $\alpha(1,4)$ glikozidik bağları hidroliz eder. Non-reducing zincir uçlarından maltoz birimleri ayrılır. Açığa çıkan maltoz birimleri alfa konfigürasyonundadır. Enzim yüksek maltoz ihtiva eden maltoz şurubu üretmek için, amilopektin kıran enzimle kullanılabildiği gibi tek olarak da kullanılabilir. Endüstriyel kullanımlar için tavsiye edilen operasyon şartları 60 °C ve pH 5,0-6,0'dir.

Enzimler depolama sıcaklığına bağlı olarak zaman aşımıyla azar azar aktivitelerini kaybederler. Maltogenaz L, 5 C°'de saklandığında 6 ay, 25 C°'de ise 3 ay aktivitesini koruduğu gözlenmiştir(37).

6.2. Yöntem

6.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi İle Maltoz Analizi

Maltoz standartları 0.5-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında alındı. Herbir standarttan 1 μL alınarak, TLC plate damaltıldı ve kurutuldu. Maltogenaz ile reaksiyona giren MD çözeltisinden elde edilen maltozun miktarı bu standart aralığında tespit edildi. Maltoz , Whatman K5 TLC plakaları ile tek çözelti sistemi kullanılarak ayrıldı. Çözelti 1.5 : 8.5 (V/ V) su- asetronitril(Roby, 1987). TLC plakaları çözelti sistemi kullanılarak bir kez yürütüldü.Yürütölme işleminden sonra plakalar saç kurutma makinasında kurutuldu.

TLC, üzerindeki karbohidratları görünür hale getirmek için TLC plakaları %0,5 tymol ve % 5 H_2SO_4 ihtiva eden etanol çözeltisine daldırılıp hot-plate üzerinde 110°C’de 5 dakika ısıtıldı.

6.2.2. Membranın Sentezi

Yüksek poroziteye sahip polimer iki basamakta sentezlenmiştir. Birinci basamak polimerize gluteraldehit sentezidir. Dış hacmi 50 mL olan polimer bloğunun üretimi için %5’lik gluteraldehitten 5 mL alınarak 50 mL’ye seyreltildi. Aldol kondenzasyon polimerizasyonunun olması için ortama 5 mL , 0,1 M NaOH ilave edildi ve 30 dak. 600 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra bu reaksiyon sonucu elde edilen poligluteraldehit çözeltisinden 45 mL alındı. Çözelti içine radikalik polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için kullanılan başlatıcı potasyum peroksidosülfattan 0,7 g konularak, çözüldü. Bu çözeltinin üzerine % 59 stiren,% 26 divinil benzen ve %15 span-80’den oluşan 5 mL emülsiyon faz ilave edildi. Polimerizasyon reaksiyonu 80°C’de gerçekleştirildi.

6.2.3. Membranın Modifikasyonu

%5’lik gluteraldehitten 5 mL alınarak 50 mL’ye seyreltildi. Aldol kondenzasyon polimerizasyonunun olması için ortama 5 mL , 0,1 M NaOH ilave edildi. Gözenekli polimerik yapı 3mm et kalınlığına sahip olacak şekilde torna

tezgahında kesildikten sonra, yıkandı, kurutuldu ve holder'a yerleştirildi. Gluteraldehit çözeltisi holder'a bağlanmış polimerden sürekli olarak 24 saat boyunca sirküle edildi. Ardından membran polimer önce 300 mL saf su ile daha sonra da 200 mL 1M, pH 5,5 NaAc tampon çözeltisi ile yıkandı.

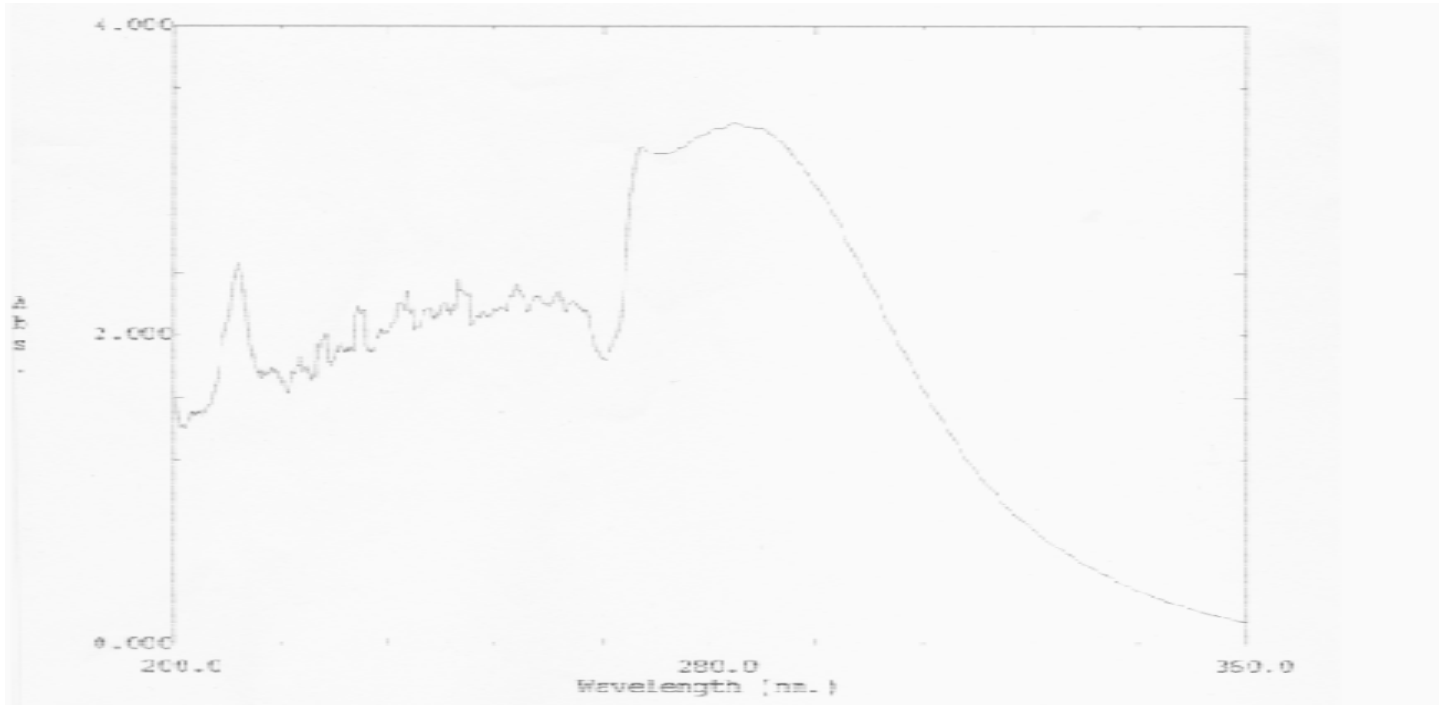
6.2.4. Biyokatalitik Membran Reaktörün Üretimi

50 µL maltogenaz, 50 mL, 1M, pH 5,5 NaAc tampon çözeltisinde çözüldü. Bu protein çözeltisi 24 saat boyunca 5mL/dak debide membrandan geçirilerek kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bağlanmaya enzimleri uzaklaştırmak için önce 300 mL saf su ile daha sonra da 200 mL 1M, pH 5,5 NaAc tampon çözeltisi ile yıkandı. Depolama işlemi gerektiğinde 4°C'de biyoreaktör muhafaza edildi.

7. SONUÇ ve TARTIŞMALAR

7.1. Poligluteralehitin Yapı Analizi

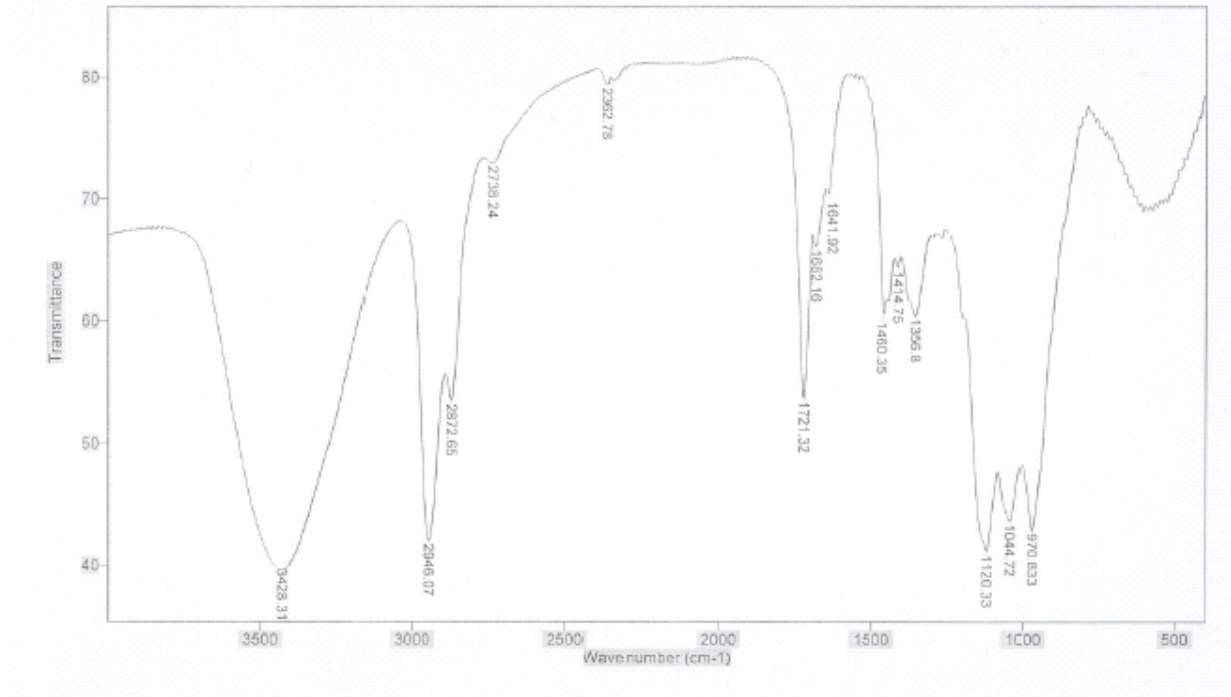
Polimerize gluteralehit bazik ortam şartlarında (pH 9) elde edildi. Gluteralehitin bu şartlar altında yapılan Cannizarro tepkimesi sonucunda elde edilen poligluteralehitin sıvı halde iken UV spektrofotometredeki piklerine bakıldığında 285 nm’de aldehit gruplarına ait pik ve karbon karbon çifte bağına ait pikler ise 233 nm’de gözlemlendi (Şekil 7.1.).



Şekil 7.1. Poligluteralehitin UV spektrofotometre pikleri

Poligluteralehit sentezlendikten sonra vakumlu etüvde 50°C’de 48 saat boyunca suyu buharlaştırılarak katı halde poligluteralehit elde edilmiştir. Şekil 7.2 FTIR spektroskopisinde ise konjuge olmayan aldehit grupları, konjuge aldehit grupları ve karbon-karbon çifte bağları sırası ile 1721,1682 ve 1641 cm^{-1} ’de adsorbsiyon bandına sahip olduğu , 3428 cm^{-1} ’de suya ait OH adsorbsiyon bandı, 2946 ve 2872 cm^{-1} ’de alifatik C-H gerilmesi, 1460, 1414, 1356 cm^{-1} ’de alifatik C-H

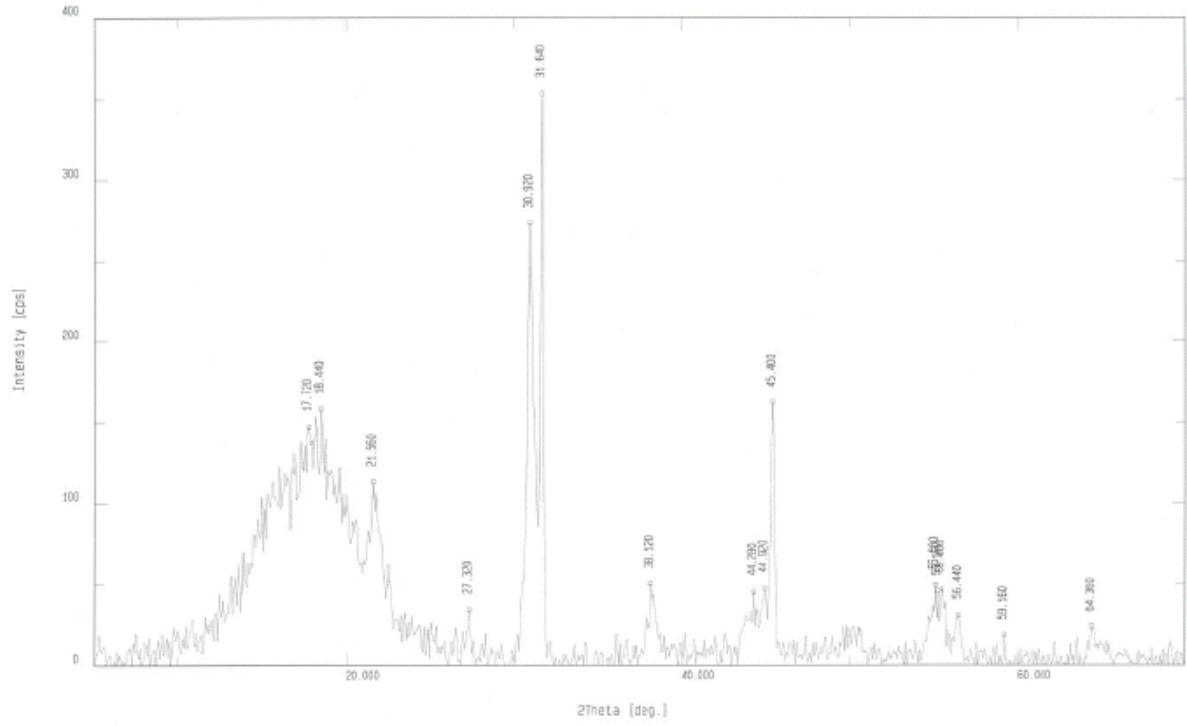
düzlem içi eğilmesi, 1120, 1044, 970 cm^{-1} 'de alifatik C-H düzlem dışı eğilmesi görülmektedir.



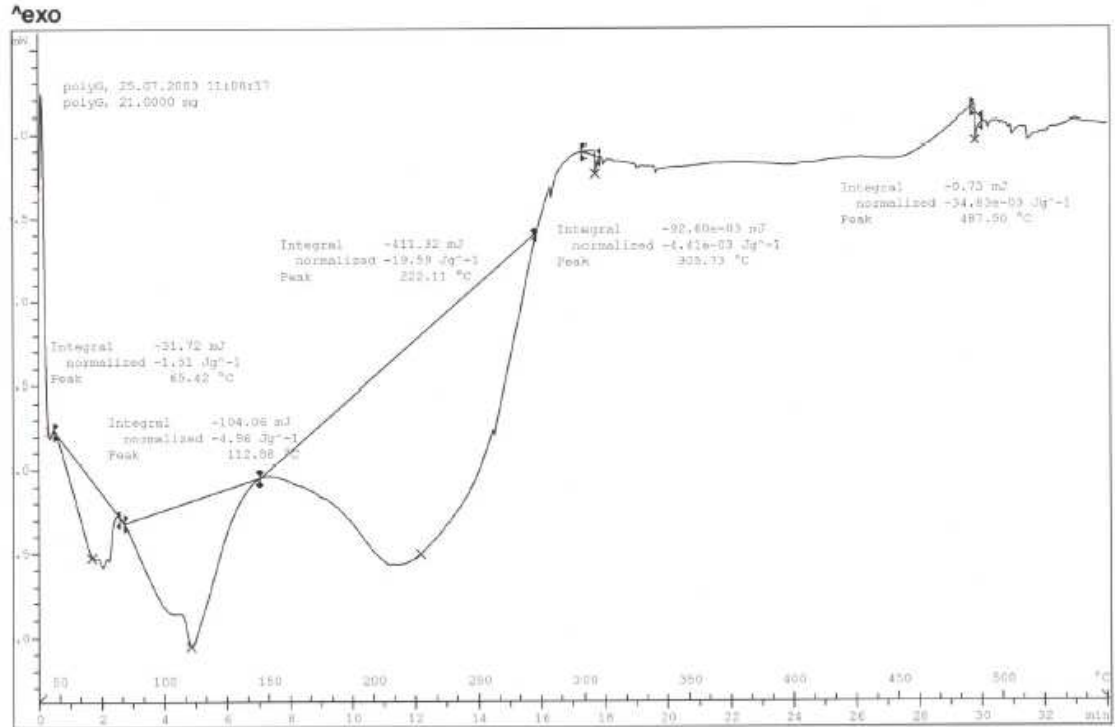
Şekil 7.2. Poligluteraldehitin FTIR spektroskopisi

Ayrıca polimerize gluteraldehitin X-ışını difraksiyonuna bakıldı. 17,720 ; 21,560 ; 27,320 ; 30,920 ; 31,640 ; 38,120 ; 44,280 ; 44,920 ; 45,400 ; 55 ; 59,160 ve 64,360 dereceleri PGL'nin yapısındaki kristalik veya yarı-kristalik yapıları gösterdiği bulundu

0-27 derece arasındaki geniş pik ise malzemenin amorfliğini temsil etmektedir. Tüm spektrum boyunca bulunan oldukça küçük pikler –gürültü olarak adlandırılır- polimerik yapılarda görüldü (Şekil 7.3.).



Şekil 7.3. PGL'nin X-ışını ile analizi



Şekil 7.4. PGL'nin DSC ile analizi

Şekil 7.4.'te görüldüğü gibi PGL'de üç ayrı camsı geçiş sıcaklığı görülmektedir. Bunlar 62 ,112 ve 222 °C'dir. Bunun nedenini oluşturan PGL'nin yapısal olarak 300-20000 Da kadar değişen polimerik yapısından ileri geldiğini düşünmekteyiz. 62°C'de molekül ağırlığı düşük olan PGL'lerin camsı geçiş sıcaklığı, 112°C'de ise 62°C'de camsı geçiş sıcaklığına sahip olan polimerlere nazaran daha büyük molekül ağırlığına sahip olanların camsı geçiş sıcaklığı 222°C'de ise molekül ağırlığı en büyük PGL'lerin camsı geçiş sıcaklıklarını görmekteyiz. Çalışmamızın devamında ise PGL'nin TGA ile termal analizlerini yaparak daha net yaklaşımlar sunmaya çalışacağız.

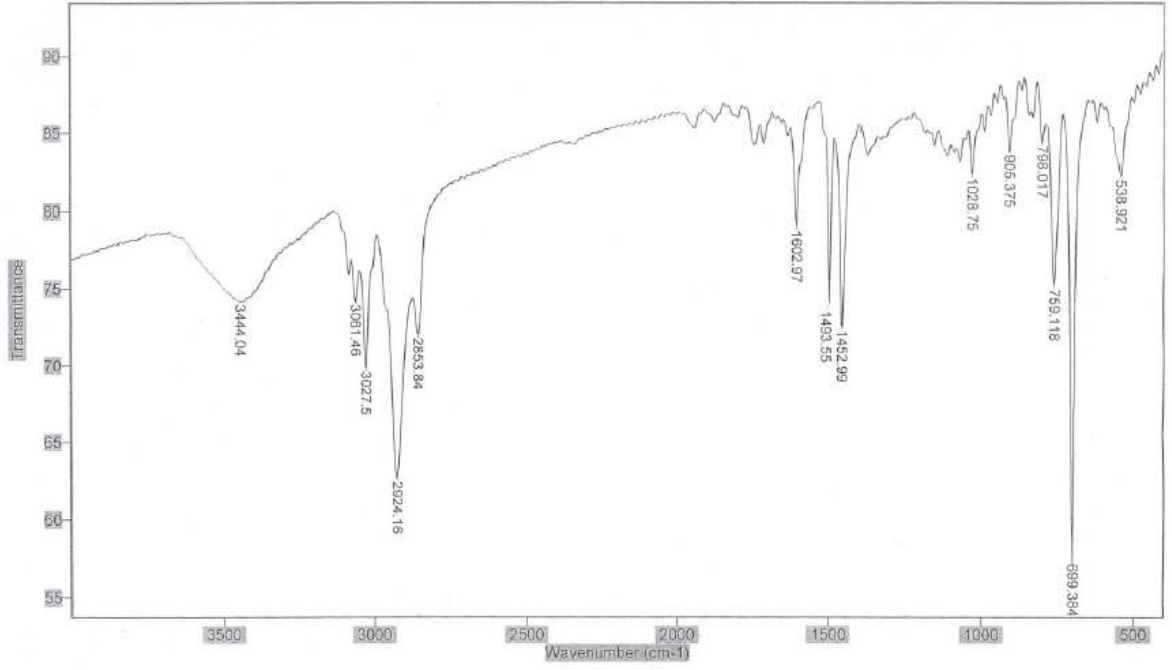
7.2. Divinil Benzen-Stiren Kopolimerinin Yapısının Analizi

Divinil benzen-stiren kopolimerinin yapısı FTIR,X-ışını ve DSC ile aydınlatılmaya çalışıldı.

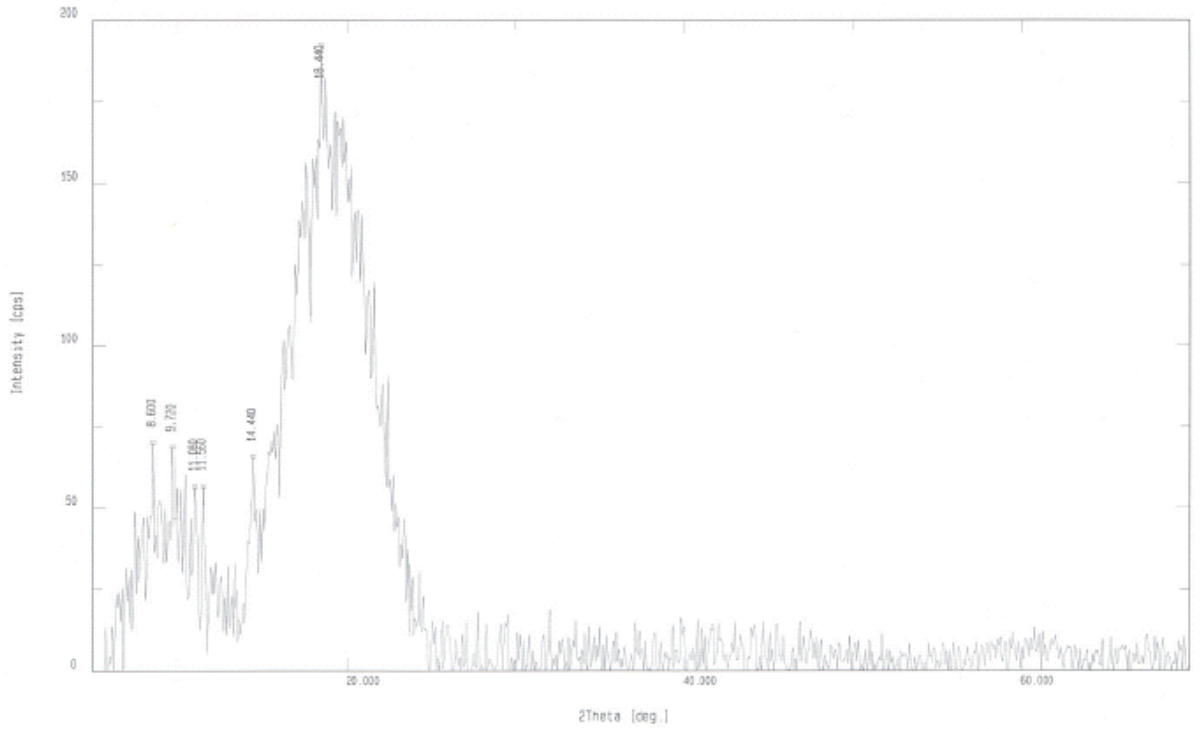
Şekil 7.5. FTIR analizinde 3444 cm^{-1} 'de suya ait OH absorpsiyon bandı, 3061 ve 3027 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilmesi 2924 ve 2853 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmesi 1602 , 1493 ve 1452 cm^{-1} 'de aromatik C=C gerilmesi, 1026 ve 905 cm^{-1} 'de aromatik C-H düzlem içi eğilmesi (p-süstitüe benzen için), 798 , 759 ve 699 cm^{-1} 'de aromatik düzlem dışı eğilmesi (p-süstitüe benzen için) görülmektedir.

X-ışını difraksiyonu analizinde ise divinilbenzen-stiren kopolimerinin yapısında kristalik yapı veya yarı-kristalik yapıya rastlanmamıştır. Amorf yapının etkin şiddetini gösteren 0-27 derece arasında oldukça geniş bir pik ve tüm spektrum boyunca gürültü elde edilmiştir (Şekil 7.6.)

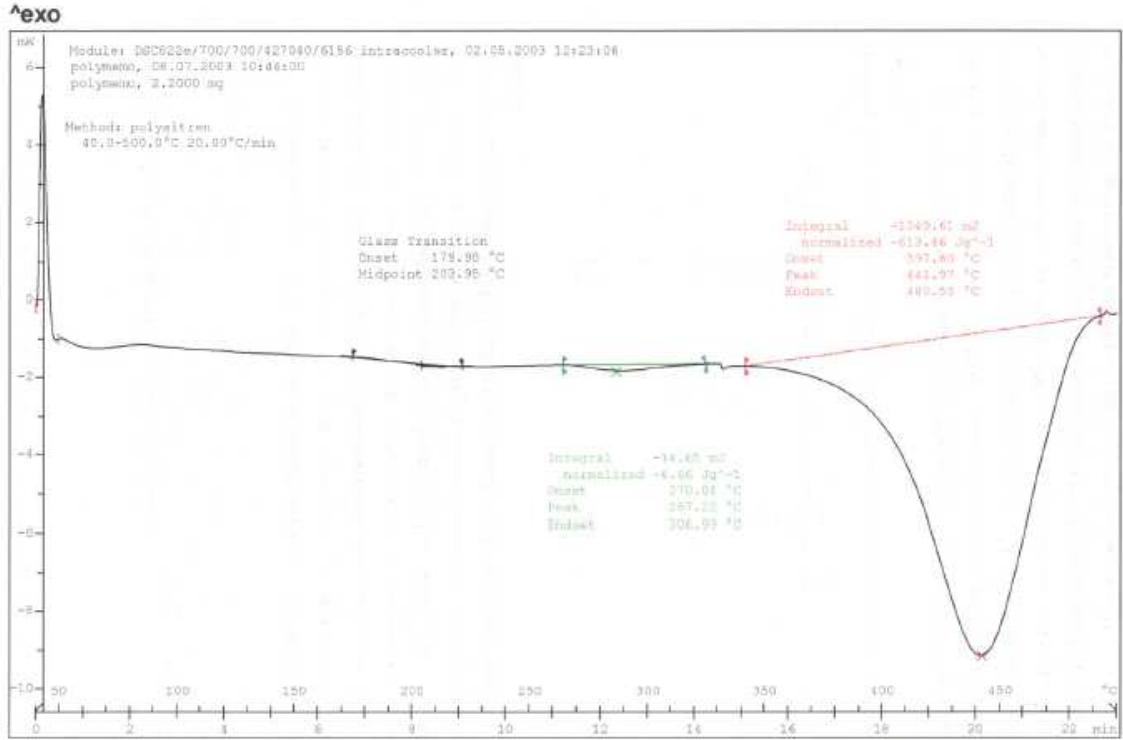
Divinilbenzen-stiren polimerinin DSC analizinde ise 203°C 'de camsı geçiş sıcaklığı ve 287°C 'de ise yumuşama sıcaklığı görülmüştür. 450°C 'de ise kopolimer tamamen deforme olmuştur(Şekil 7.7.)



Şekil 7.5. Divinil benzen-stiren kopolimerinin FTIR spektrumu



Şekil 7.6. Divinil benzen-stiren kopolimerinin X-ışını difraksiyonu spektrumu



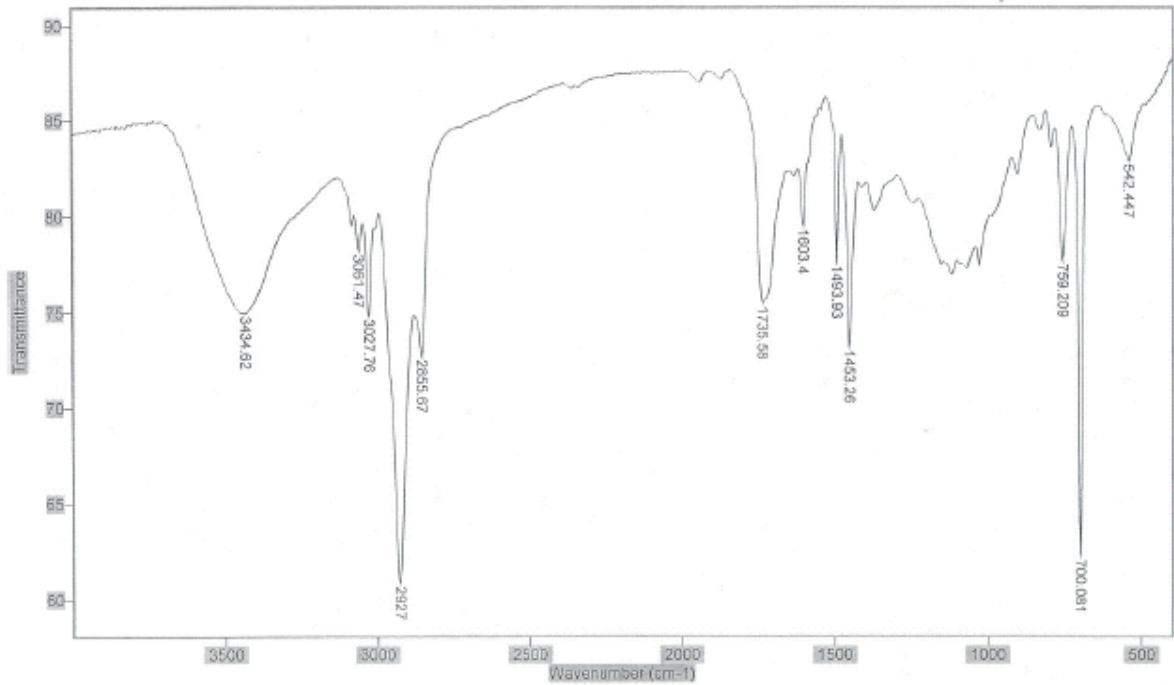
Şekil 7.7. Divinil benzen-stiren kopolimerinin DSC analizi

7.3. Membran Polimerin Yapısının Aydınlatılması

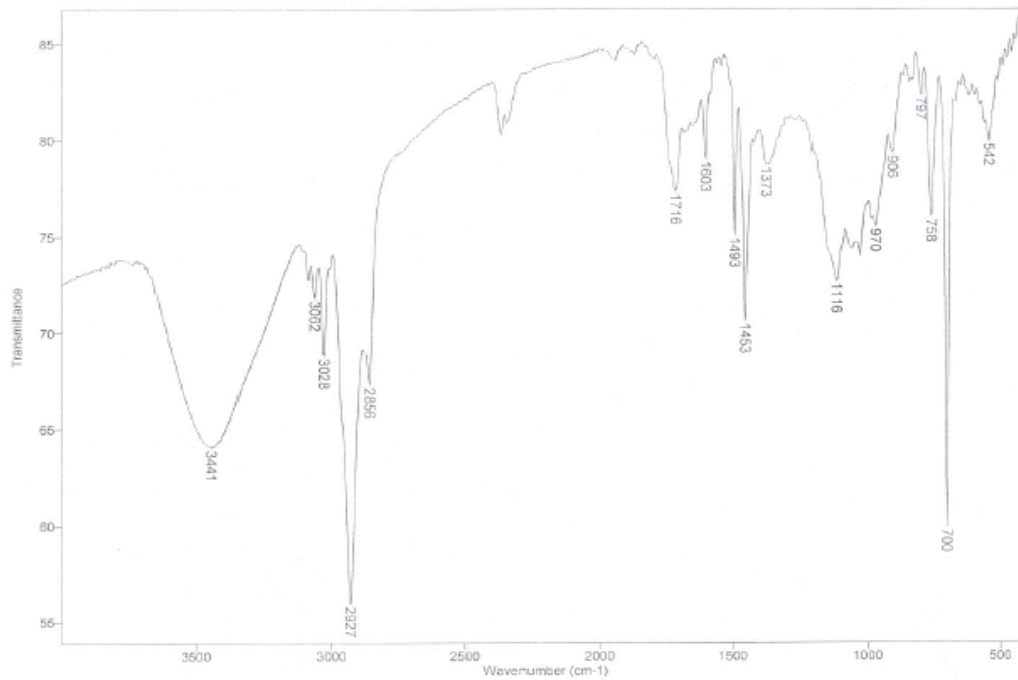
Bu noktaya kadar yapılan tüm analizler membran polimerin yapısını aydınlatmak amacıyla referans datayı oluşturmak içindir. Yukarıda takip edilen analiz sistemi membran polimerine uygulanmış

Membran polimerin FTIR analizinde 3444 cm^{-1} 'de suya ait OH absorpsiyon bandı, 3061 ve 3027 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilmesi 2924 ve 2853 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmesi 1602 , 1493 ve 1452 cm^{-1} 'de aromatik C=C gerilmesi, 1026 ve 905 cm^{-1} 'de aromatik C-H düzlem içi eğilmesi (p-süstitüe benzen için), 798 , 759 ve 699 cm^{-1} 'de aromatik düzlem dışı eğilmesi (p-süstitüe benzen için) görülmektedir (Şekil 7.8). Bu piklerin tamamı divinil benzen-stiren kopolimerinde de mevcuttur. Ama 1735 cm^{-1} 'de görülen pik C = O gerilmesine ait piktir. Bu pike PGL'nin FTIR spktrumunda denk gelmekteyiz. Bir farkla bu pik 1721 cm^{-1} 'de görülmekteyken, divinil benzen ve stirenle yapmış olduğu radikalik reaksiyon sonucu oluşan bağlardan ötürü pik kayma yapmış ve 1735 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bu kayma kimyasal

bağlardan oluşabildiği gibi eğer polimerleşme olmamışsa, polimer karışımı oluşmuşsa moleküller arası etkileşme neticesinde olabilirdi. Bunu anlamak için stokiyometrik olarak membran polimerdeki PGL, divinil benzen, stiren miktarları ile aynı olacak şekilde PGL ve divinil benzen-stiren kopolimeri çok iyi bir şekilde karıştırıldı. Bu karışımın FTIR spektrumuna bakıldığında 3441 cm^{-1} 'de suya ait OH absorpsiyon bandı, 3062 ve 3026 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilmesi 2927 ve 2856 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmesi 1603 cm^{-1} 'de aromatik C=C gerilmesi, $1126, 970$ ve 906 cm^{-1} 'de aromatik C-H düzlem içi eğilmesi (p-süstitüe benzen için), $797, 758$ ve 700 cm^{-1} 'de aromatik düzlem dışı eğilmesi (p-süstitüe benzen için) görülmektedir. Karbonil gerilme piki ise 1716 cm^{-1} 'de görülmektedir(Şekil7.9). Bu durum polimerizasyon reaksiyonunun oluştuğu kanısını arttırmaktadır.



Şekil 7.8. Membran polimerin (PGL-DVB-PS) FTIR spektrumu

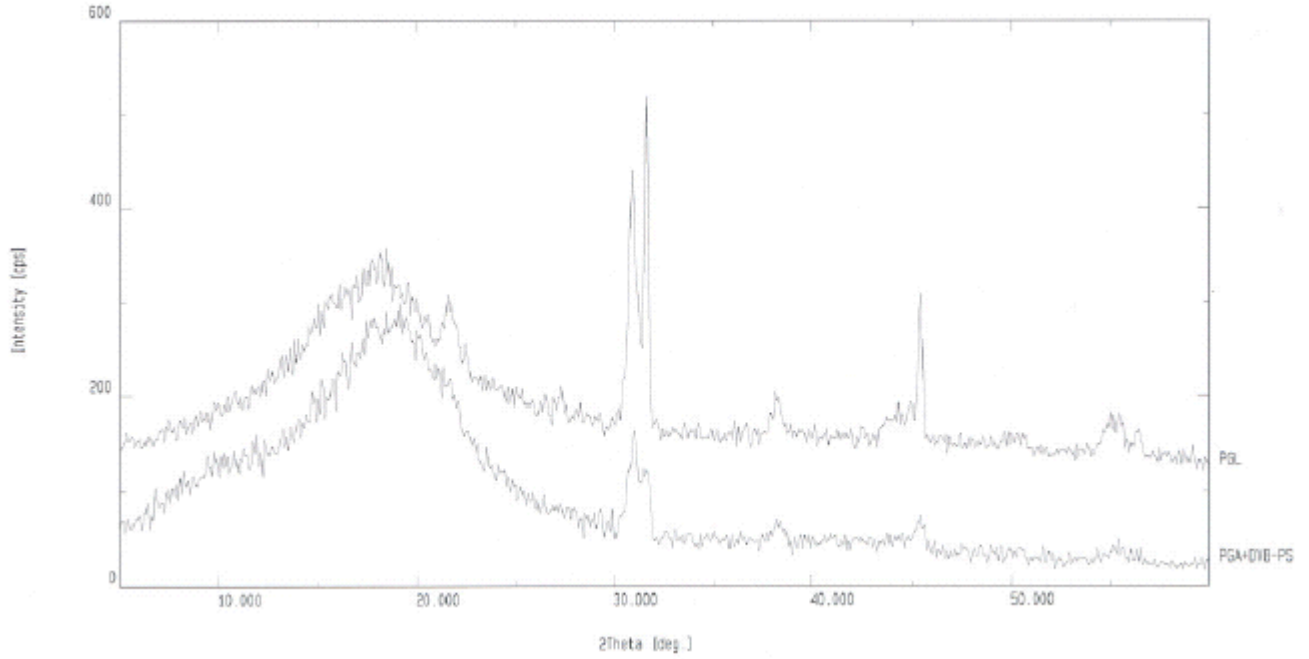


Şekil 7.9. PGL, divinil benzen karışımının FTIR spektrumu

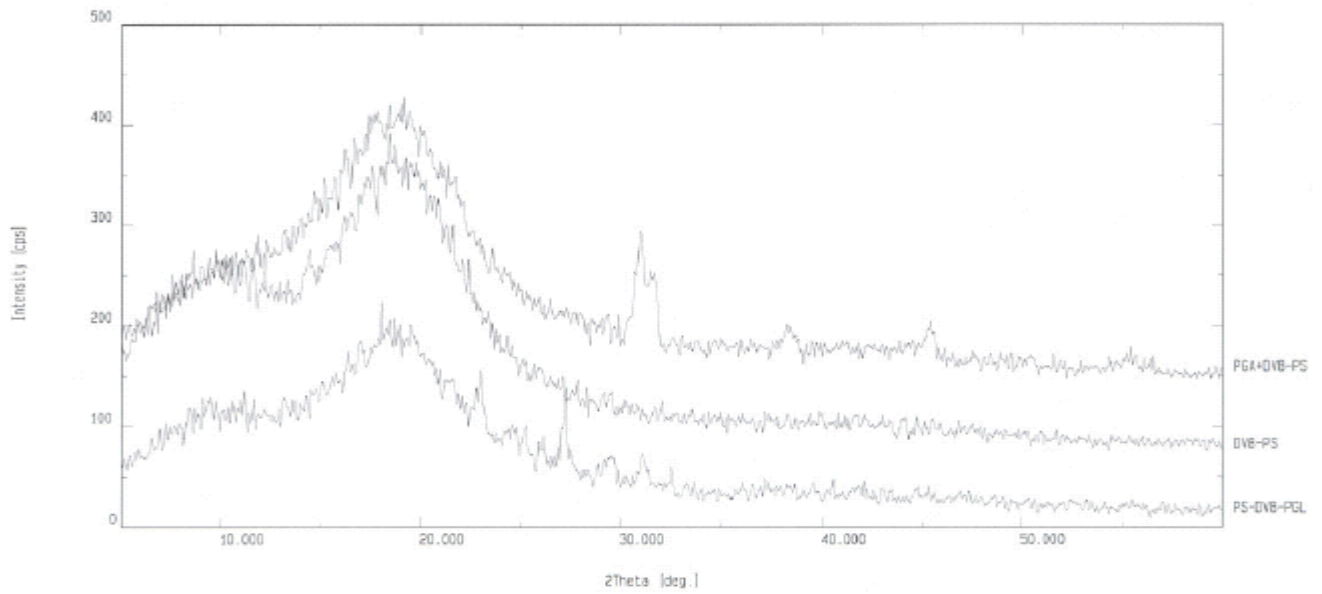
Membran polimerin X-ışını difraksiyon spektrumu incelendiğinde 0-23 derece arasında amorf yapı oranının düştüğünü ve bu bölgede de yarı kristalik yapıları temsil eden pikleri görmekteyiz. 23,00 ; 24,00 ; 25,240 ; 26,120 ; 27,240 ; 29,400 ; 31,00 ; 32,500 ; 37,00 derecelerde kristalik yapılar görülmektedir (Şekil 7.10).

Şekil 7.10. Membran polimerin X-ışını difraksiyonu spektrumu

PGL ve divinil benzen-stiren kopolimeri karışımını X- ışını difraksiyonu ile karşılaştığında kristalik yapılar arasında farklılıklar görülmektedir. Bu karışımın sahip olduğu kristalik yapı PGL'nin sahip olduğu kristalik yapı ile örtüşmektedir. PGL ile PGL, divinil benzen – stiren kopolimerinin X-ışını difraksiyonu spektrumlarındaki benzerlikler görülmektedir (Şekil 7.11).



Şekil 7.11. PGL ile PGL, divinil benzen–stiren kopolimerinin X-ışını difraksiyonu spektrumları

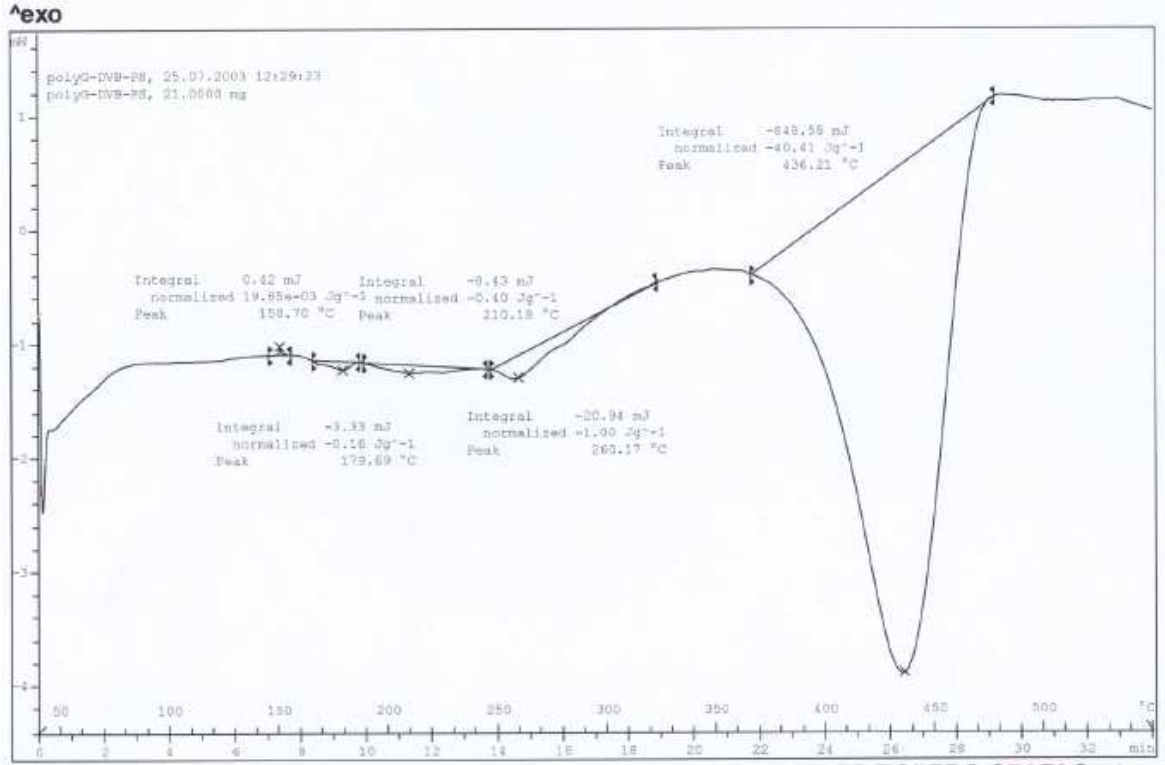


Şekil 7.12. Tüm polimerik yapıların X-ışını difraksiyonu spektrumu

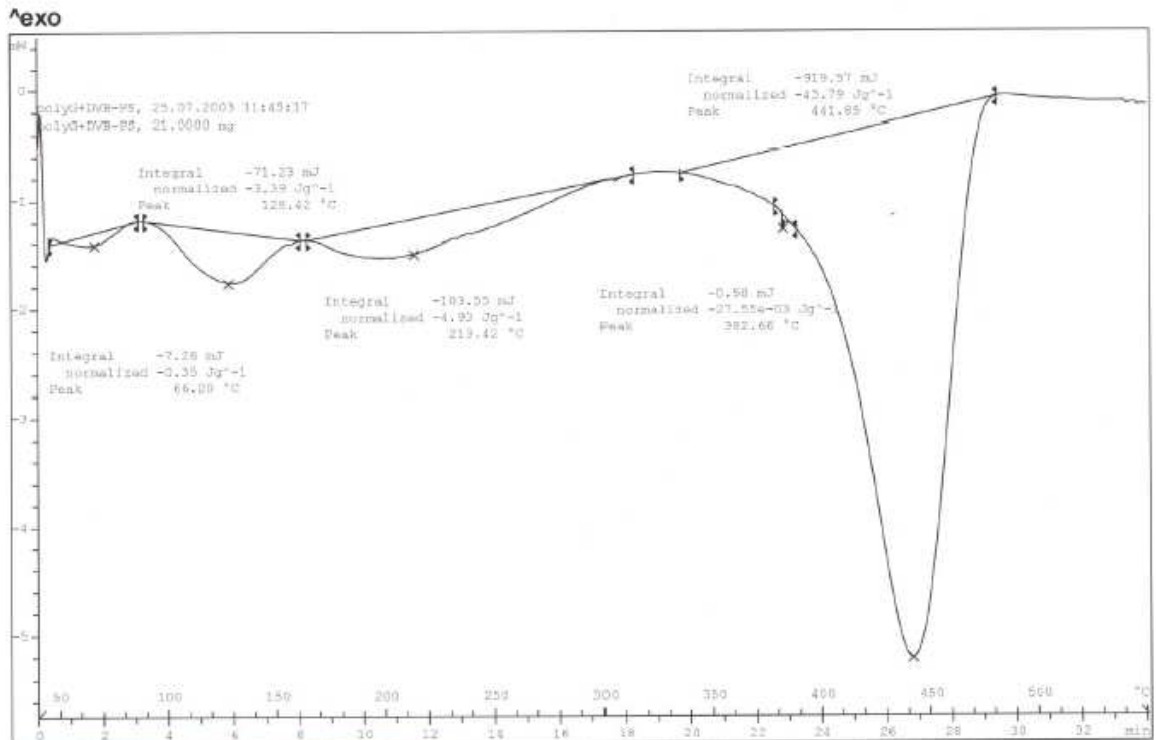
Membran polimerin DSC analizinde ise 150,7 ve 170,69 °C’de iki camsı geçiş sıcaklığı, 260 °C’de yumuşama sıcaklığı, 436,21°C’de ise polimerin deformasyon sıcaklığı görülmektedir (Şekil 7.13).

PGL, divinil benzen-stiren kopolimerinin karışımında ise PGL ile üç ayrı camsı sıcaklık geçişleri ile örtüşen camsı geçiş sıcaklıkları görülmektedir. Bu sıcaklıklar 66,20 ; 128,42 ve 213,42 °C ‘dir. Yukarıda açıklandığı gibi PGL’nin yumuşama sıcaklıkları 62 ,112 ve 222 °C’dir.(Şekil 7.14)

Tüm bu analizleri desteklemek amacı ile ilerleyen çalışmalarda AFM, SEM, katı-NMR analiz teknikleriyle yapı aydınlatılmasına gidilecektir. Ayrıca fiziksel testler için çekme-germe deneyleri yapılacaktır.



Şekil 7.13. Membran polimerin DSC termal analizi



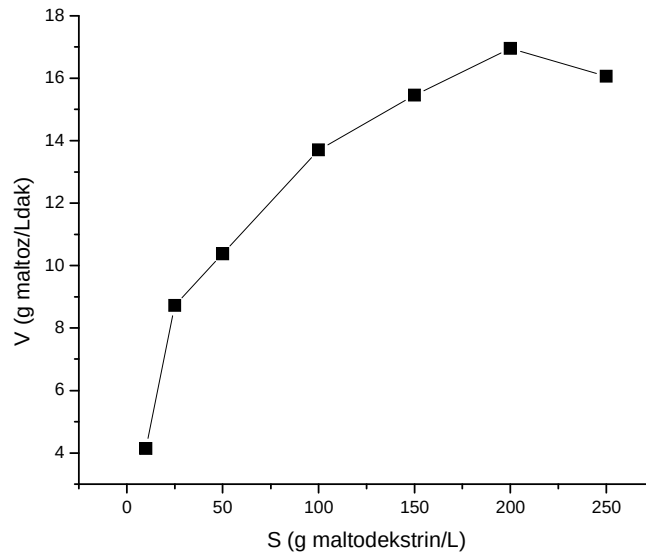
Şekil 7.14. PGL ve divinil benzen-stiren kopolimerinin karışımının DSC ile analizi

7.4. Maltogenazın Katalitik Membran Biyoreaktördeki Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi

7.4.1. Serbest Enzimin Kinetik Parametreleri

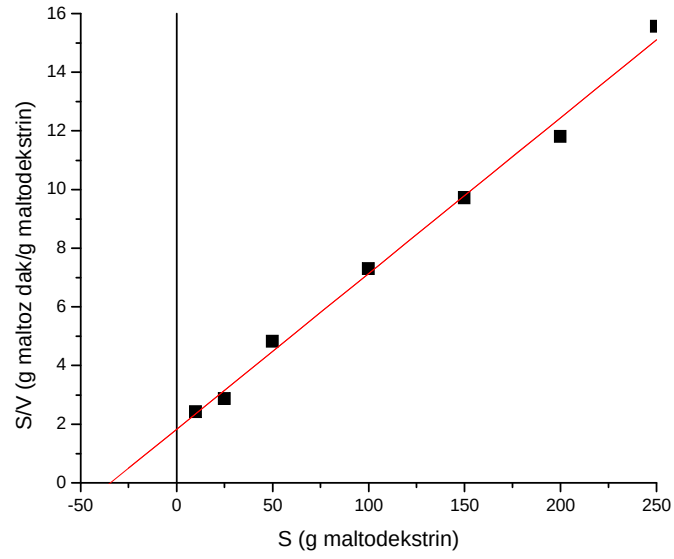
Maltogenaz, maltotriozu içeren düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritlerde, kısmen hidroliz edilmiş nişastada ve nişastadaki $\alpha(1,4)$ glikozidik bağları hidroliz etmektedir. Maltogenaz enziminin kinetik parametreleri olarak sıcaklıkla ve pH'la değişen aktivasyonunun incelenmesi, optimum sıcaklık ve pH'nın elde edilmesi, K_m V_{max} , unit enzim miktarı tespit edilmiştir.

Serbest enzimin öncelikle K_m ve V_{max} değerleri elde edilmiştir. Bunun için hem Michaelis-Menten grafiği hemde Hanes-Woolf grafiği çıkarılmıştır (Şekil 7.15, 16)



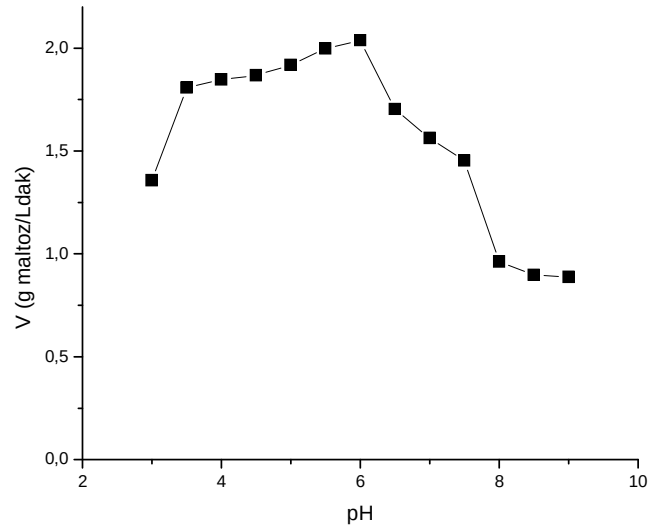
Şekil 7.15. Serbest maltogenazın Michaelis-Menten grafiği

Michaelis-Menten grafiğinde görüldüğü gibi sıfırıncı dereceden biyokimyasal reaksiyon 200g maltodekstrin/L saptanmıştır. Yani enzimin biyoreaktör uygulamalarında kullanılacak olan substrat konsantrasyonu belirlenmiştir. Hanes-Woolf eşitliğinden serbest maltogenaz enzimini K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 34,39 g MD/L, 18,83g maltoz/L.dak bulunmuştur.

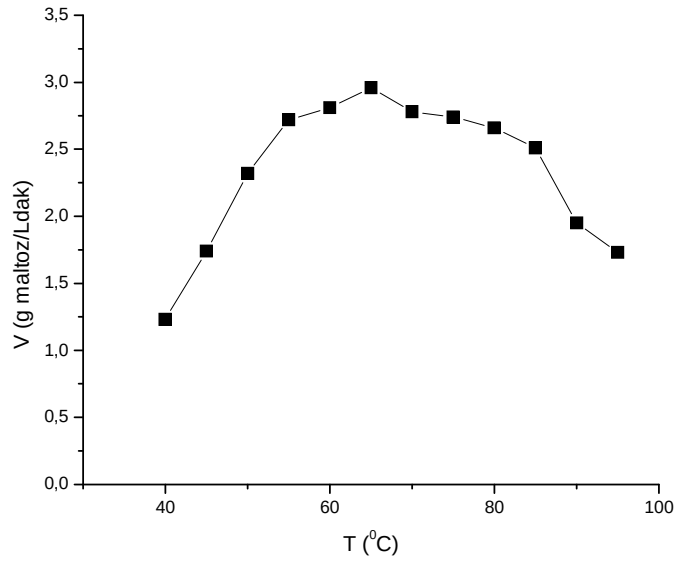


Şekil 7.16. Serbest enzimin Hanes-Woolf grafiği

Bu çalışmanın ardından serbest enzimin 200 g MD/L substrat konsantrasyonunda optimum pH 'ı 6 (25 mM NaAc tampon çözeltisi ortamında) ve optimum sıcaklık değerlerini de 65°C olarak tespit edilmiştir (Şekil 7.17, 18).



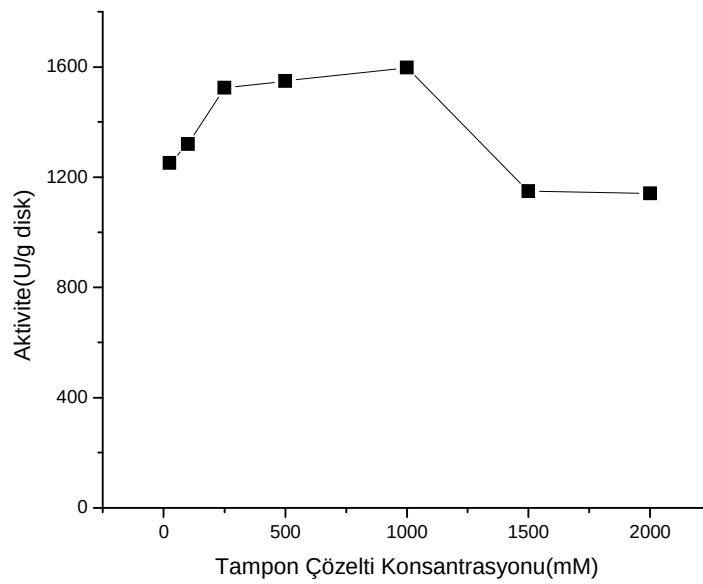
Şekil 7.17. Serbest maltogenazın değişen pH'lardaki aktivitesi



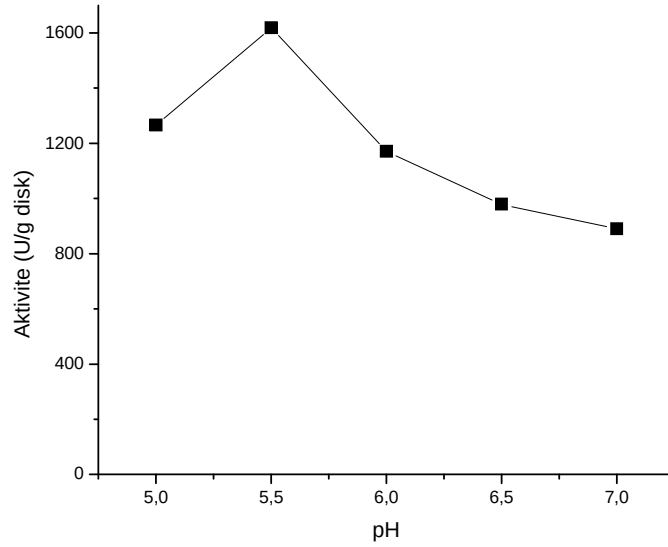
Şekil 7.18. Serbest maltogenazın değişen sıcaklıklardaki aktivitesi

7.4.2. Enzimin Membrana İmmobilizasyon Şartlarının Optimize Edilmesi

Maltogenaz enziminin membrana maksimum seviyede immobilize edilmesi için değişen pH ve tampon çözelti konsantrasyonlarında aktivitesine bakılmıştır. En yüksek aktivite değerleri pH 5.5, 1000mM NaAc tampon çözeltisinde elde edilmiştir.



Şekil 7.19. Değişik pH'larda immobilize edilen maltogenazın aktivitesi



Şekil 7.20. Değişik pH'larda immobilize edilen maltogenazın aktivitesi

Poliglutaraldehytin reaktördeki sikülasyon süresi 24 saat sürmektedir. Maltogenazın membrana immobilize olma süreside 24 saat olmaktadır(Şekil 7.19,20).

7.4.3. Biyokatalitik Membran Biyoreaktörün Aktivitesinin İncelenmesi

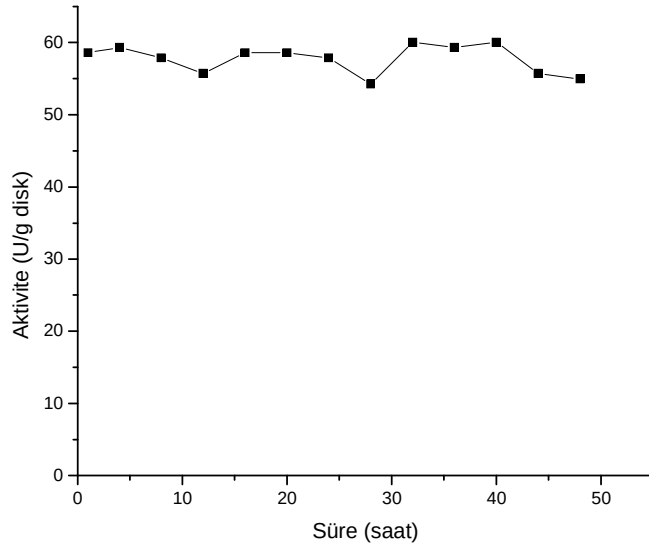
Optimal şartlarda immobilize edilen enzimin süreye bağlı olarak, debiye bağlı olarak, depolamaya bağlı olarak aktivitesi incelenmiştir.

Aktiviteleri karşılaştırmak amacıyla, divinil benzen-stiren kopolimeri (DVB-S), glutaraldehitte muamele edilmiş divinil benzen-stiren kopolimeri (DVB-S+GA), ikinci bir aldol kondenzasyon tepkimesine uğratılmayan PGL-DVB-S kopolimeri sentezlenmiş ve enzim immobilizasyonu yapılmıştır. 15mL/dak debide aktivitelere bakılmıştır.Elde ettiğimiz membran polimerin(DVB-S-PGL-PGL) aktivitesinin diğerlerinden bariz bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7.1) Ayrıca polimer çekme ve germe deneyleri yapılmamasına rağmen elde edilen polimerin mukavemeti ve sertliği diğerlerinden daha iyi olduğu görülmektedir.

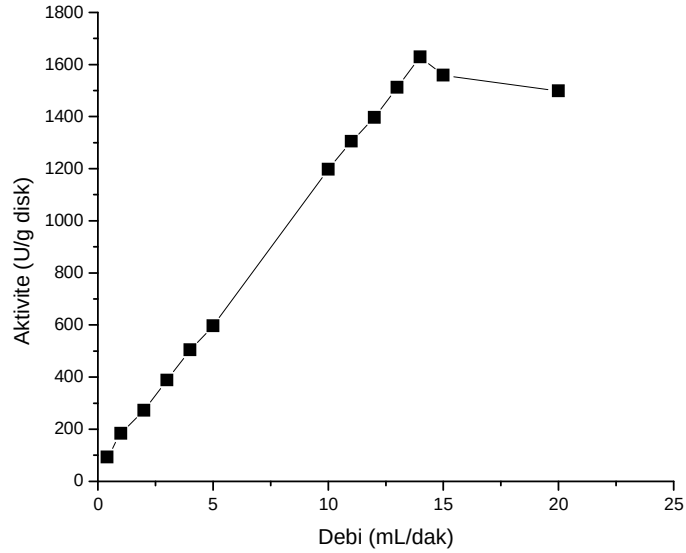
Tablo 7.1. Membran reaktörlerin aktivitelerinin karşılaştırılması

Membran reaktörler	Aktivite (U/g disk)
DVB-S-PGL-PGL	1584,76
PGL-DVB-S	1298,6
DVB-S+GA	933,083
DVB-S	692,481

Süreye bağlı olarak aktivitesi incelendiğinde membran reaktör 0,4 mL./dak debide substrat en az 48 saat süreyle aktivite kaybetmeden sürekli olarak çalışabilmektedir (Şekil 7.21.).

**Şekil 7.21.** Reaktörün aktivitesinin süreye göre değerlendirilmesi

Reaksiyonun kütle transferinden bağımsız kimyasal kontrollü bölgenin tespiti için değişen debilerde aktivite çalışması yapılmıştır. Yapılan deneylerin sonucunda kimyasal kontrollü bölgenin 15mL/dak'lık debide başladığı tespit edilmiştir (Şekil 7.22.) .



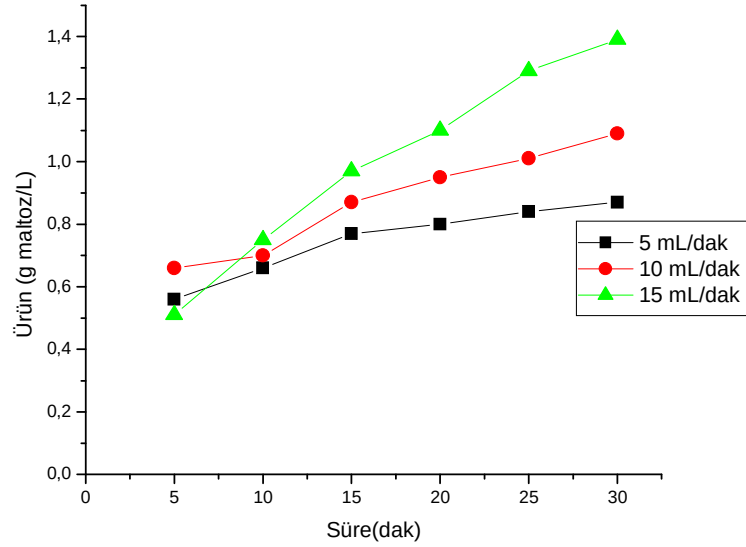
Şekil 7.22. Değişen debilere karşı aktivite grafiği

Depolama ömrü için aktivitesi tespit edilen reaktör daha sonra 1,5 aylık +4 derecelik ortamda bekletilmiştir. Tekrar aktivitesine bakıldığında aktivitede bir kayba rastlanmamıştır. Membran polimerlerin aktivitesinin karşılaştırıldığı deneyde kullanılan DVB-S-PGL-PGL membran polimer 1,5 depolama süresi geçirdikten sonra diğer membranlarla aktivitesi kıyaslanmıştır.

Son olarak reaktörün değişen debilerde kapalı sistemde sirkülasyonla reaksiyon yapılmıştır. 5, 10, 15 mL /dak debide 30 dak. sirkülasyonda 5., 10., 15., 20., 25., 30. dakikalarda ürün miktarı ölçülmüştür (Şekil 7.23., tablo 7.2.)

Tablo 7.2. Reaktörün sirkülasyon sonucu debilere karşı gelen ürün miktarlar

Debiler	Ürün(5dak)	Ürün(10dak.)	Ürün(15dak.)	Ürün(20dak)	Ürün(25dak.)	Ürün(30dak.)
5 ml/dak	0,56g/L	0,66g/L	0,77g/L	0,80g/L	0,84g/L	0,87g/L
10ml/dak	0,66g/L	0,70g/L	0,87g/L	0,95g/L	1,01g/L	1,09g/L
15ml/dak	0,51g/L	0,75g/L	0,97g/L	1,1g/L	1,29g/L	1,39g/L



Şekil 7.23. Reaktörde kapalı sistemde 30 dakika sirkülasyonla değişen debilere karşı ürün miktarı

Tüm bu çalışmalar dikkate alınarak AFM, SEM, katı-NMR, TGA gibi diğer analiz metodları kullanılarak polimerin yapısının tam olarak aydınlatılmasına çalışılacaktır. Reaktörün kinetik parametreleri tam olarak analiz edilip, kütle transfer katsayısı, reaksiyonun aktivasyon enerjisi tespit edilecek, reaktörün tasarımı ve matematiksel modellemesi yapılacaktır. Ayrıca değişik monomerlerin yapıya katılması sağlanarak membranın kullanım alanı genişletilecektir. Özellikle yapay organ sentezi, endüstriyel ölçekte biyodizel üretimi, biyosensör teknolojisi gibi alanlarda kullanılabilecek katalitik membran reaktörlerin üretimi üzerine çalışılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Erhan E., ‘‘Katalitik Membran Prosesler Kullanılarak Atıksulardan Fenol Giderimi’’, Doktora Tezi, Atatürk Üniv. Çevre Müh. Anabilim Dalı, Erzurum, 2000
2. Santamaria J., ‘‘ Zeolit-based membrane reactors: a powerful approach towards the integration of reaction and separation , *Ravello Conference On New Frontiers For Catalytic Membrane Reactors And Other Membrane System* , 54,Rovello,Italy, 1999
3. Shu, J. , Grandjean, B.P.A., Van Neste, A., Kaliaguine, S., ‘‘Catalytic palladium-based membrane reactors: a review’’, *J. Chem. Eng.*, 69: 1036, 1991
4. Szaniawaski, A. R., Spencer, H.G.,’’ Effects of immobilized pectinase on the microfiltration of dilute pectin solution by macroporous titania pknm membranes:resistance model interpretation’’, *J. Membr. Sci.*,127: 69, 1997
5. Uemiya, S., Matsuda, T., Kikuchi, E., ‘‘Aromatization of propane assisted by palladium membrane reactor’’, *Chem. Letters*, 1335, 1990
6. Drioli, E., Giorno, L., *Biocatalytic Membrane Reactors*, 51-206, 1999, UK
7. Belfort , G., ‘‘Membranes and bioreactors:a technical challenge in biotechnology’’, *Biotechnology and Bioengineering*, 33:1047, 1989
8. Cheryan M., *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*, 237-276, 369-470, 1998, USA
9. Katayama N., Urabe, I., Okada, H., ‘‘Steady-state kinetics of coupled two enzyme reactor with recycling of poly(ethylene glycol)-bound NAD’’, *Eur. J. Biochem.*, 132: 403, 1983

10. Horwath C., Shendalman, L. H., Ligth,R. T., “Open tubular heterogeneous enzyme reactors: analysis of a theoretical model”, *Chem. Eng. Sci.* ,28: 375, 1983
11. Catapano G., Iorio G., Drioli E., Lombardi C. P., Crucitti F., Doglietto, G. B., Bellantone, M., “ Theoretical and experimental analysis hybrid bioartificial membrane pancreas distributed parameter model taking into account starling fluxes”, *J. Membr. Sci.* 52:351, 1990
12. Matsumura K. N., Guevara G. R., Huston H., Hamilton W. L., Rikimaru M., Yamasaki G., Matsumura M. S., “Hybrid bioartificial liver in hepatic failure:preliminary clinical report”, *Surgey*, 99, 1987
13. Zydney,A. L.,Colton, C. K., “Fundamental studies and design analysis for crossflow membrane plasmapheresis “ , In. *Artificial Organs: Proceedings of International Symposium on Artificial Organs, Biomedical Engineering and Transplantation.*, s: 343-358, Newyork, VCH Publishers
14. Giorno, L., Drioli, E., 1997, Catalytic behavior of lipase free and immobilized in biphasic membrane reactor with different low water-soluble substrates, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 69,11.
15. Giorno, L., Molinari, R., Natoli, M., Drioli, E., 1997 Hydrolysis and regioselective transesterification catalyzed by immobilized lipases in membrane bioreactors, *J. Membr. Sci.*, 125,177.
16. Kim T. J., Lee, Y. D., Kim, H. S., 1993, Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 88.
17. Lee , C.K., Hong J., “Membrane reactor coupled with electrophoresis for enzymatic production of aspartic acid”, *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 215, 1988

18. Vasic-Racki Dj., Jonas M., Hummel W., Kula M. R., "Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor", *Appl. Microbial. Biotechnol.*,31:215, 1989
19. Krajewska B., Leszko M., Zaborska W., "Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties", *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48: 337,1990
20. Butterfield A. D., Bhattacharyya D., Daunert S., Bachas L., "Interface of biophysical chemistry, chemical engineering ,and molecular biology in catalytic biofunctional membranes:structure and function of site-specific membrane-immobilized enzyme assays, *Ravello Conference On New Frontiers For Catalytic Membrane Reactors And Other Membrane System* , 78,Rovello,Italy, 1999
21. Clement G. E., Potter R., "Enzymatic resolution ", *J. Chem. Edu.*, 48, 695, 1971
22. Kurukawa Y., Ohta T. S., Nakagawa Y., "Communications to the editor immobilization of enzyme onto cellulose-titanium oxide composite fiber", *Biotechnology and Bioengineering*, 42:394, 1993
23. Malcata F. X. Hill C. G., Amundson C. H., "Use of lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butter oil ",*Biotechnology and Bioengineering*, 38:853, 1991
24. Lopez, J. L., Matson S. L. "Multiphase /extractive enzyme membrane reactor for production of diltiazem chiral intermediate", *J . Membr. Sci.* , 125:189, 1997
25. Nakajima M., Jimbo N., Nishizawa K., Nakao S., "Forced-flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by silanization", *Biotechnology and Bioengineering*, 33:856, 1989

26. Nyberg N. S., Shattford R. A., Peshwa M. V., White J. G., Cerra F. B., Hu W. S., "Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver, *Biotechnology and Bioengineering*, 41:194, 1989
27. Winston Ho W. S., Sirkar K. K., *Membrane Handbook*, 455-461, 480-486, 810-832, 1992, New York
28. Duchet J., Demoustier-Champagne S., "Study of polystyrene microstructures and nanostructures synthesised in particle track-etched membranes used as templates", *Polymer*, 41:1-8, 2000
29. Serizawa T., Kamimura S., Akashi M., "Electrostatic adsorption of polystyrene particles with different surface charges onto the surface of an ultrathin polymer film", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 164:237-245, 2000
30. Jones R.A.L., Lehnert R.J., Schönherr H., Vansco J., "Factors affecting the preparation of permanently end-grafted polystyrene layers", *Polymer* 40:525-530, 1999
31. Margel S. and Rembaum A., "Synthesis and Characterization of Poly(glutaraaldehyde). A Potential Reagent for *Protein* Immobilization and Cell Separation", *Macromolecules*, 13:19-24, 1980
32. Moyer Jr., Wender W., Parkersburg W., "Linear Polyglutaraldehyde", *United State Patent Office*, Patent Number: 3,395,125, Patented July 30, 1968
33. Freeman A., "Stabilized Enzyme", *United State Patent Office*, Patent Number: 4,904,592, Date of Patent: Feb. 27, 1990
34. Walt D.R., Agayn V.I., "The Chemistry of Enzyme and Protein Immobilization with Glutaraldehyde",

35. Nebesny E., "Changes of Carbonhydrates and Molecular Structure of Dextrins During Enzymatic Hydrolysis of Starch with Maltogenase Participation", *Starch*, 42:432-436, 1990
36. Gaouar O., Aymard C., Zakhia N.& Rios G.M., "Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch Maltose Syrup in a Continuous Membrane Reactor", *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 69:367-375, 1997
37. B 315f-GB, Maltogenase L, , Novo Nordisk, Product Sheet,1999

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI	: MEHMET ÜNSAL
YÜKSEK LİSANS	: Eylül 2000, Haziran 2001 Ders Dönemi Eylül 2001, Haziran 2003 Tez Dönemi
YÜKSEK ÖĞRENİM	: Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (1999)
ORTAÖĞRENİM	: Erzin Yeşilkent Lisesi
STAJ	: Sümerbank Merinos Yünlü Sanayii İşletmesi TUBİTAK SAGEM
İLGİ ALANLARI	: Enzimoloji Enzim İmmobilizasyonu Biyoproses Mühendisliği Biyonanoteknoloji Karbonhidratlar Membran Biyoreaktörler Biyodizel