

154428

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ULTRASONİK ORTAMDA BUĞDAY NIŞASTASININ
 α -AMİLAZ ENZİMİ İLE HİDROLİZİ**

Kimya Mühendisi Meltem TURHAN

**FBE Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Kimya Mühendisliği Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK (YTÜ)

Prof. Dr. Kutlu ÜLGEN (Boğaziçi)

Prof. Dr. Ülker BEKER (YTÜ)

İSTANBUL, 2004

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTIMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. ULTRASONİKASYON	3
2.1 Ultrasonikasyonun Tanımı	3
2.1.1 Frekans aralığı	4
2.2 Ultrasonikasyonun Tarihçesi	5
2.3 Ultrasonikasyonun Genel Prensipleri	6
2.3.1 Ultrasonik dalgaların elde edilmesi	6
2.3.2 Kavitasyon ve etkileri	7
2.3.2.1 Kavitasyon	7
2.3.2.2 Kavitasyonun çeşitleri	9
2.3.2.3 Kavitasyonu etkileyen faktörler.....	9
2.3.2.4 Kavitasyon etkileri.....	10
2.3.2.4.1 Homojen sıvı sistemler	11
2.3.2.4.2 Heterojen sistemler	11
2.3.3 Ultrasonikasyon işleminde kullanılan cihazlar	13
2.3.3.1 Ultrasonik banyo.....	14
2.3.3.2 Ultrasonik prob	14
2.3.4 Ultrasonikasyonun yararları.....	15
2.3.5 Ultrasonikasyonun kullanım alanları.....	17
3. ENZİMLER	20
3.1 Enzim Nedir?	20
3.2 Enzimlerin Özellikleri	20
3.3 Enzimlerin Yapısı	21
3.4 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	22
3.5 Enzim Kaynakları	23
3.6 Enzimlerin Etki Mekanizması	23
3.7 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	24
3.8 Enzim İnhibisyonu.....	25

3.9	Enzimlerin Uygulama Alanları.....	27
4.	AMİLAZ ENZİMLERİ VE ÖZELLİKLERİ	30
4.1	α -Amilaz.....	30
4.1.1	α -Amilazın endüstriyel uygulamaları.....	32
4.2	β -Amilaz.....	33
4.2.1	β -Amilazın kullanım alanları.....	33
4.3	Glikoamilaz.....	33
4.3.1	Glikoamilazın kullanım alanları	34
5.	NİŞASTA	35
5.1	Nişasta ve Yapısı	35
5.2	Nişastanın Hidrolizlenmesi.....	37
5.2.1	Nişasta hidrolizinin aşamaları	37
5.2.2	Nişasta hidrolizinin prosesleri	38
6.	ULTRASONİK ORTAMDA NİŞASTA HİDROLİZİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	41
7.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
7.1	Kullanılan Materyaller.....	44
7.2	Kullanılan Cihazlar	44
7.2.1	Reaktör.....	47
7.2.2	Kontrol modülleri	47
7.3	Deneyin Yapılışı	48
7.4	Analiz Yöntemleri	48
7.4.1	Enzim aktivite tayini.....	48
7.4.2	Nişasta konsantrasyonu tayini	49
7.5	Hesaplamalar	49
7.5.1	Enzim aktivitesinin hesaplanması.....	49
7.5.2	Nişasta konsantrasyonunun hesaplanması	50
8.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
8.1	<i>Bacillus species</i> Kaynaklı α -Amilaz Enzimi ile Yapılan Deneyler	51
8.1.1	40°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	51
8.1.2	40°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	53
8.1.3	50°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	54
8.1.4	50°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	56
8.1.5	Sonuçların değerlendirilmesi	58
8.2	<i>Bacillus licheniformis</i> Kaynaklı α -Amilaz Enzimi ile Yapılan Deneyler	59
8.2.1	40°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	59
8.2.2	40°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	60
8.2.3	50°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	62

8.2.4	50°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi.....	64
8.2.5	Sonuçların değerlendirilmesi.....	66
9.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....		70
EKLER.....		75
Ek1	Deneysel Verilere Uyan Matematiksel İfadeler ve İstatiksel Veriler.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....		76



SİMGE LİSTESİ

$[A_0]$	$t=0$ anındaki enzimin aktivitesi
$[A_1]$	İşlem sonu enzim aktivitesi
$[A]$	İşlem sonu % enzim aktivitesi
C_{ao}	$t=0$ anında çözüdür nişastanın absorbands değeri
C_{ak}	Kontrol çözeltisindeki çözüdür nişastanın absorbands değeri
C_{at}	İşlem sonunda çözüdür nişastanın absorbands değeri
C_{so}	$t=0$ anındaki nişastanın absorbands değeri
C_{s1}	İşlem sonunda ortamda kalan nişastanın absorbands değeri
H	% Hidroliz derecesi
k_D	Enzim inaktivasyonunun hız sabiti
σ	Standart sapma
R^2	Regresyon katsayısı
$[S_0]$	$t=0$ anındaki nişasta konsantrasyonu, g/L
$[S_1]$	İşlem sonunda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu, g/L
T	Sıcaklık, °C

KISALTMA LİSTESİ

DE	Dekstroz eşdeğeri
FA	Frekans aralığı
SAHP	Seyreltik asit hidroliz prosesi
DAHP	Derişik asit hidroliz prosesi
kD	Kilodalton



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Ultrasonik dalgaların ilerleyişi.....	8
Şekil 2.2	Kavitasyon kabarcığının oluşması, büyümesi ve sönmesi.....	8
Şekil 2.3	Homojen bir sıvıda kavitasyon	11
Şekil 2.4	Katı yüzey yakınında kavitasyonun etkisi	12
Şekil 2.5	Kavitasyonun toz halindeki katılar üzerindeki etkisi	13
Şekil 2.6	Kavitasyonun karışmayan sıvılar üzerindeki etkisi	13
Şekil 2.7	Ultrasonik temizleme banyosu.....	14
Şekil 2.8	Ultrasonik prob sistemi.....	15
Şekil 3.1	Enzimin yapısı	22
Şekil 3.2	Enzim-substrat etkileşim modelleri	24
Şekil 3.3	Rekabetçi inhibisyon.....	26
Şekil 3.4	Rekabetçi olmayan inhibisyon.....	26
Şekil 3.5	Yarı rekabetçi inhibisyon.....	27
Şekil 3.6	Tersinmez inhibisyon.....	27
Şekil 4.1	<i>Bacillus</i> kaynaklı α -amilazın şekli	32
Şekil 4.2	β -Amilazın şekli.....	33
Şekil 4.3	<i>Aspergillus</i> kaynaklı glikoamilazın X-ray ile elde edilen görüntüsü.....	34
Şekil 5.1	Amiloz molekülü	35
Şekil 5.2	Amilopektin molekülü	36
Şekil 5.3	Nişasta hidrolizlenmesi.....	40
Şekil 7.1	Deney düzeneğinin genel görünüşü.....	45
Şekil 7.2	Reaktör ve kontrol modüllerinin şeması.....	46
Şekil 8.1	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W).....	52
Şekil 8.2	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W).....	54
Şekil 8.3	<i>Bacillus Species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W).....	55
Şekil 8.4	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W).....	57
Şekil 8.5	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W).....	60
Şekil 8.6	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W).....	61
Şekil 8.7	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W).....	63
Şekil 8.8	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W).....	65

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1	Ses dalgaları ve frekansları.....	3
Çizelge 2.2	Güç ve frekansa göre ultrasesin uygulamaları.....	3
Çizelge 2.3	Frekans aralığı ve titreşim oranlarının karşılaştırılması	4
Çizelge 2.4	Ultrasonikasyonun kullanım alanları.....	17
Çizelge 3.1	Çeşitli enzimler ve endüstride uygulama alanları.....	28
Çizelge 4.1	Amilaz enzimlerinin çeşitleri	30
Çizelge 4.2	Farklı kaynaklı α -amilazların bazı özellikleri	31
Çizelge 8.1	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W).....	52
Çizelge 8.2	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W).....	53
Çizelge 8.3	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W).....	55
Çizelge 8.4	<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W).....	57
Çizelge 8.5	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W).....	59
Çizelge 8.6	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W).....	61
Çizelge 8.7	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W).....	62
Çizelge 8.8	<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W).....	64
Çizelge Ek 1.1	50°C sıcaklıkta yapılan deneylerden elde edilen α -amilaz enzim aktivite değerleri ile ilgili matematiksel ifadeler ve istatistiksel veriler.....	75

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasına olanak sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sabriye Pişkin'e, çalışmamı değerli fikir ve önerileri ile yönlendiren ve yardımları ile beni her zaman destekleyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma Kın Özbek'e, çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dilek Kılıç Apar'a, yetişmemi sağlayan tüm saygıdeğer Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyip her zaman yanımda bulunan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Nişasta önemli bir biyopolimer olup; gıda, tekstil gibi bir çok endüstri alanında kullanılmaktadır. Nişasta moleküllerini daha küçük boyutta moleküllere dönüştürmek ve tatlandırıcı elde etmek için yaygın olarak enzimler kullanılmaktadır. α -Amilaz enzimi, nişasta moleküllerinin hidroliz reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bu nedenle, nişasta hidroliz prosesinin veriminin yüksek olması için α -amilaz enziminin stabilitesini koruması gerekir. Ultrasonikasyon işlemi, reaksiyonları hızlandırmak ve dönüşüm oranını arttırmak için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, ultrasonikasyon işlemi uygulanarak buğday nişastası *Bacillus species* ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimleri ile hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Biyokatalitik bir reaksiyon olan bu hidroliz işlemi, ceketli cam bir reaktörde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda, nişasta hidroliz derecesi ile enzim aktivitesinin, sonikasyon parametreleri (akustik güç ve frekans aralığı) ve sıcaklık ile değişimi incelenmiştir. Analizler spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, 40°C'de 20 W ve 100 W'lık akustik güçlerde frekans aralığının %10'dan %80'e arttırılmasıyla enzim aktivitesi ve hidroliz derecesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 40°C sıcaklıkta ultrasonikasyon işleminin uygulanması ile reaksiyon sonu enzim aktivitesi *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi için 20 W ve 100 W'lık akustik güçlerde %7, *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi için 20 W'da %7 ve 100 W'da %10 oranında azalmıştır. 50°C'de yapılan deneylerde ise, 20 W ve 100 W'lık akustik güçlerde frekans aralığının %10'dan %80'e arttırılmasıyla enzim aktivitesinde *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi için %16 ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi için %10'luk bir azalma görülmüştür. Yapılan modelleme sonucunda, deneysel verilerin sıfırcı merteye inaktivasyon modeline uyduğu saptanmıştır. Ayrıca, 50°C sıcaklıktaki hidroliz derecesinin 40°C'dekine göre *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi için yaklaşık 3.4 kat ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi için ise yaklaşık 2.4 kat arttığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Buğday nişastası, enzimatik hidroliz, ultrasonikasyon, akustik güç, frekans aralığı

ABSTRACT

Starch is an important polymer, and it is used in many industrial areas such as food, textile and etc. Enzymes are used widely in order to convert starch molecules into smaller molecules and to produce sweeteners. α -Amylase enzyme catalyzes the hydrolysis reaction of starch molecules. For this reason, the stability of α -amylase enzyme must be prevented during the hydrolysis process to obtain higher yield. Ultrasonication is used in order to accelerate the reactions and increase the conversion ratio.

In the present study, wheat starch was hydrolysed with α -amylase enzymes produced from *Bacillus species* ve *Bacillus licheniformis* by using a sonifier. The hydrolysis process was carried out in a jacketed reactor made from glass. At the end of the reaction, the degree of starch hydrolysis (%) and residual enzyme activity (%) were investigated versus sonication parameters (acoustic power and duty cycle) and temperature. Analyses were performed using spectrophotometric method. According to the the experiments carried out at temperature 40°C, increasing the duty cycle ratio from 10 % to 80 % at 20 W and 100 W acoustic powers, no significant change was observed for the values of hydrolysis degree and enzyme activity. By applying ultrasonication treatment at 40°C, the decreases obtained for the enzyme activity were; 7 % for α -amylase enzyme produced from *Bacillus species* at 20 W and 100 W acoustic powers, and 7 % and 10 % for α -amylase enzyme produced from *Bacillus licheniformis* at 20 W and 100 W, respectively. At 50°C, increasing the duty cycle from 10 % to 80 % at 20 W and 100 W acoustic powers, decreases obtained for the enzyme activity were; 16 % for α -amylase enzyme produced from *Bacillus species* and 10 % for α -amylase enzyme produced from *Bacillus licheniformis*. As a result of the modelling, it was determined that experimental data fitted to the zero order inactivation model. It was also found that hydrolysis degrees at 50°C, approximately 3.4 times higher value was obtained for α -amylase enzyme produced from *Bacillus species* and approximately 2.4 times higher value was obtained for α -amylase enzyme produced from *Bacillus licheniformis* compared to the the values at 40°C.

Keywords: Wheat starch, enzymatic hydrolysis, ultrasonication, acoustic power, duty cycle

1. GİRİŞ

Günümüzde çevre ve insan sağlığının ön plana çıkması ile enzimlerin teknolojide ve endüstride kullanımını artmaktadır. Enzimler; verimlilikleri, seçicilikleri, ılımlı şartlar altında çalışabilmeleri ve biyolojik olarak parçalanabilir olmaları nedeniyle pek çok endüstri alanı için çok uygun bir seçenek oluşturmaktadır. Enzim kullanımı ile enerji tasarrufu sağlandığı, sıcaklık, basınç ve korozyona dayanıklı malzemelere gereksinim duyulmadığı için ekonomik ve pratik yararlar sağlamaktadır. Ayrıca, enzimler doğal oldukları için çevresel zararları da oldukça azdır. Çünkü, sert kimyasalların yerini alırlar ve üretim sırasında çok az istenmeyen yan etkileri ve yan ürünleri vardır.

Enzimlerin hücre ve canlı metabolizmasındaki önemi çok fazladır. Hücrenin yaşaması ve organizmaların başlıca işlevleri enzimlerin varlığına bağlıdır. Bu sebeple yaşam, bir çok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret bir sistem olarak tanımlanabilir.

Bugün doğal olarak hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilen 3000'in üzerinde enzim mevcuttur. Ancak, 120'nin üzerindeki enzimler endüstriyel amaçlı kullanılmaktadır. Enzimler başta gıda sektörü olmak üzere tarım, deterjan, tekstil, kimya gibi endüstrilerde katalizör olarak önemli bir yer tutmaktadır.

Enzimlerin gıda endüstrisinde kullanımını oldukça eskidir. Şekerlerden alkolün oluşumu, peynir yapılması ve şarabın sirkeleşmesi gibi enzimatik olaylar tarih öncesi devirlerden beri bilinmektedir.

Nişasta, başta tatlandırıcı üretimi olmak üzere çok çeşitli endüstrilerde kullanılan bir biyopolimerdir. Nişastanın glikoz birimleri arasındaki bağların hidrolizlenebilmesi, bu kaynağın endüstride çok yönlü kullanılabilmesini mümkün kılmıştır. Amilaz enzimleri ise, nişasta hidroliz proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzün ileri teknolojilerinden olan ultrases teknolojisi, çeşitli alanlara uygulanmakta ve bu teknoloji sayesinde yeni teknikler geliştirilmektedir. Özellikle ultrasonikasyonun biyoteknolojik proseslere uygulanması son zamanlarda büyük ilgi çekmektedir.

Ultrasonikasyon işlemi, genellikle hücrelere zarar vermekte ve yapısını bozmaktadır; ancak, kontrollü sonikasyon işleminin canlı katalizörlüğündeki reaksiyonlara yararlı etkileri olduğu ortaya çıkmıştır.

Biyoreaktörlerde mikrobiyolojik, bitki ve hayvan hücrelerindeki metabolik verimliliğin artması biyoteknoloji proseslere ekonomik yararlar sağlamaktadır. Ayrıca, ultrasonikasyon işleminin kullanımı, biyolojik katalizörlerin ve proseslerin verimliliğini büyük ölçüde arttırmaktadır.

Bu çalışmada; Bölüm 2’de ultrasonikasyon başlığı altında ultrasonikasyon hakkında bilgilere, Bölüm 3’de enzimler ve yapısı ile ilgili bilgilere yer verilmiştir. Bölüm 4’de amilaz enzimleri ve genel özellikleri ve Bölüm 5’de nişasta ve özellikleri anlatılmıştır. Bölüm 6’da literatürde yer alan nişastanın ultrasonik ortamda hidrolizi ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan maddeler, cihazlar ve analiz yöntemleri materyal ve yöntem başlığı altında Bölüm 7’de; deneysel çalışmalar ve bunlara ait deneysel veriler kullanılarak elde edilen matematiksel ifadeler araştırma bulguları başlığı altında Bölüm 8’de yer almaktadır. Bölüm 9’da ise deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.



2. ULTRASONİKASYON

2.1 Ultrasonikasyonun Tanımı

Ultrasonikasyon, insan kulağının işitebileceği ses frekansının (16 Hz–18 kHz) üzerindeki akustik dalgalara denir. Ultrasonik dalgaları insan kulağı duyamaz [1]. Diğer bir deyişle ultrasonikasyon, akustik spektrumda frekansı 20 kHz'den (saniyede 2000 devir) büyük yüksek frekanslı sesler olarak adlandırılmaktadır (Yalçın vd., 2002). Ultrasonikasyon bir mekanik enerji çeşididir, elektrik enerjisi değildir. Çizelge 2.1'de ses dalgalarının frekanslara göre gruplandırılması ve Çizelge 2.2'de ise güç ve frekansa göre ultrasonikasyonun uygulama alanları görülmektedir.

Çizelge 2.1 Ses dalgaları ve frekansları (Povey ve Mason, 1998; Cracknell 1980)

	Frekans Aralığı
İnfrases (kızılötesi ses)	0 Hz – 15 Hz
İnsan kulağının işitebildiği sesler	16 Hz - 20 kHz
Güç ultrasonikasyon dalgaları	20 kHz - 2 MHz
Tanı (diagnostik) ses dalgaları	5 MHz - 10 MHz
Mikroses (eski adıyla “hiperses”)	> 500 MHz

Çizelge 2.2 Güç ve frekansa göre ultrasonikasyonun uygulamaları [2]

Uygulama alanı	Frekans	Güç	Örnek
Düşük güç uygulamaları	Yüksek frekans (>100 kHz)	Düşük güç (< 1 W/cm ²)	Malzeme bilimi, tıbbi tanı
Yüksek güç uygulamaları	Düşük frekans (<100 kHz)	Yüksek güç (> 1 W/cm ²)	Temizleme, homojenizasyon, sonokimyasal uygulamalar

Ultrasonikasyon işlemi için genellikle 20 kHz - 40 kHz aralığındaki frekanslar kullanılır. Bu aralık laboratuarda kullanılan ultrasonik banyolarda geçerlidir. Ancak, akustik kavitezyon bu frekansın üzerindeki frekanslarda da oluşabildiğinden son yıllardaki araştırmalarda 5 MHz'e kadar çıkılmaktadır. 5 MHz'in üzerindeki frekanslar ise kavitezyon yaratmaz, tıpta görüntüleme tekniklerinde kullanılır (Koç (Öncül), 2001; Povey ve Mason,1998).

2.1.1 Frekans aralığı

Ultrasonikasyon cihazlarında kullanılan parametrelerden biri frekans aralığıdır. Frekans aralığı yüzde olarak ifade edilir ve prosesdeki aktif zamanın toplam zamana oranıdır (Schlager, 1998). Diğer bir deyişle, güç çeviricideki titreşim süresinin bir fraksiyonudur.

$$\text{Frekans aralığı} = \frac{\text{Aktif zaman (on)}}{\text{Aktif zaman (on) + Aktif olmayan zaman (off)}} \quad (2.1)$$

Kesikli ve sürekli olmak üzere iki çeşit ultrasonikasyon işlemi bulunmaktadır. %100 frekans aralığı, sürekli işlemi ifade eder. Eğer, frekans aralığı %100' den küçükse kesikli proses olarak adlandırılır.

Frekans aralığı sistemdeki zararlı etkilerin (aşırı sıcaklık yükselmesi gibi) oluşmasını önler. Frekans aralığı arttıkça daha yüksek sıcaklık ortaya çıkar [3, 4].

Titreşim oranı, zamana göre enerji konsantrasyonunu ifade eder. Yani, cihazın açık olduğu sürenin kapalı olduğu süreyle karşılaştırılması sonucu elde edilen bir orandır. Örneğin, titreşim oranı 1:4 ve toplam titreşim süresi 10 milisaniye ise; ultrasonikasyon ünitesi bir birim süre (2 milisaniye) enerji vermekte, 4 birim süre (8 milisaniye) enerji vermemektedir. Yani; sürenin %20'sinde cihaz çalışmaktadır. Ultrasonikasyon cihazı daha yüksek frekans aralığında, daha fazla enerji verir. Çizelge 2.3'de frekans aralığı ile titreşim oranlarının karşılaştırılması yapılmıştır [5].

Çizelge 2.3 Frekans aralığı ve titreşim oranlarının karşılaştırılması [5]

İşlem Modu	Titreşim Oranı	Frekans Aralığı
Sürekli		%100
Kesikli	1:1	%50
	1:2	%33
	1:3	%25
	1:9	%10

2.2 Ultrasonikasyonun Tarihçesi

- 1867: İlk kavitasyon araştırmaları Tomlinson ve Gernez tarafından gerçekleştirilmiştir.
- 1880: Pierre Curie tarafından piezoelektrik etkinin keşfi. Pierre Curie, mekanik basıncı uygulanırsa kuvars ve roşel tuzu (potasyum sodyum tartarat) gibi asimetric kristallerin elektrik yükü ürettiğini tespit etmiştir. Tersi durumda da, aynı kristallere elektriksel salınımlar uygulanırsa mekanik titreşimler oluşmaktadır.
- 1883: Galton tarafından ilk ultrasonik dönüştürücünün yapımı.
- 1895: Suyun içindeki pervanenin hızlı hareketiyle kavitasyon kabarcıklarının oluştuğu Thornycroft-Barnaby tarafından gözlenmiştir.
- 1917: Rayleigh tarafından kavitasyon kabarcığı için ilk matematik model yapıldı. Çok yüksek sıcaklık ve basınçlara yol açacağı belirtildi.
- 1927: Ultrasonikasyonun kimyasal etkileri üzerine ilk basılmış yayını; Richards and Loomis tarafından yapıldı.
- 1929: Metal nesnelere incelemek için ultrasonikasyonun kullanılması tartışılmaya başlandı.
- 1930: Demann ve Asbach'ın ultrasonikasyonu polimerizasyon için kullanmaları.
- 1931: Katılardaki kusurları bulmak için ultrasonikasyonun kullanımı ile ilgili bir patent alındı.
- 1933: Ultrasonikasyon ile polimer çözeltilerinin viskozitesinde azalma olduğu rapor edildi.
- 1943: Ultrasonikasyon ile temizleme üzerine ilk patent alındı.
- 1944: Ultrasonikasyon ile emülsiyon yapımı üzerine alınan ilk patent.
- 1945: Japon araştırmacılar ultrasonun tıbbi teşhislerde kullanımını araştırmaya başladılar.
- 1950: Kavitasyon ve ultrasonikasyon araştırmalarının yoğunlaşması ve ultrasonikasyon kullanılan uygulamaların sayısının artması. Noltingk ve Neppiras tarafından "Hot spot" modelinin ortaya konulması.
- 1963: Ultrasonikasyonun plastik kalıplarında kullanılışı.
- 1970: Sonokimya araştırmaları hız kazandı.
- 1980: Sonokimyanın etkileri üzerine yapılan araştırmaların artması.

1986: İngiltere’de Warwick Üniversitesi’nde sonokimya ile ilgili ilk uluslar arası toplantı yapıldı.

1990: European Society of Sonochemistry’nin kuruluşu (Ensminger,1988; Kuttruff, 1991; Koç (Öncül), 2001; [1]).

2.3 Ultrasonikasyonun Genel Prensipleri

2.3.1 Ultrasonik dalgaların elde edilmesi

Ultrasonik dalgalar; mekanik, elektromanyetik ve termal enerji kaynakları kullanılarak ultrasonik güç çeviriciler ile üretilir [1]. Ultrasonik güç çeviriciler, mekanik ve elektrik enerjisini ses enerjisine çeviren cihazlardır (Povey ve Mason,1998). Ultrasonik dalgalar; gazlar (hava gibi), sıvılar ve katılar içinde üretilebilir [1]. Ultrasonik dalgalarının elde edildiği başlıca 3 çeşit dönüştürücü mevcuttur:

- **Sıvı sürücü dönüştürücüler:** Bir sıvının ince bir metal yüzeye hızla çarpmasıyla çalışır. Böylelikle, titreşimler meydana gelir. Bu titreşimsel hareketler ile basınç ve dolayısıyla da kavitasyon oluşur (Povey ve Mason,1998).
- **Manyetostriktif (manyetik büzülümlü) dönüştürücüler:** Ters manyetostriktif etkisini kullanarak, manyetik enerjiyi ultrasonik enerjiye çevirirler. Bu, metal alaşımlara (ferrometalik gibi) güçlü bir alternatif manyetik alan uygulanarak sağlanır. Bu tip dönüştürücülerin 2 dezavantajı bulunmaktadır. Birincisi, frekans aralığı 100 kHz den küçük olması; ikincisi ise kayıplar nedeniyle sadece %60’a yakın elektriksel verimlilik sağlanabilmesidir (Povey ve Mason,1998; [1]).
- **Piezoelektrik dönüştürücüler:** Kuvvetli piezoelektrik davranışı gösteren doğal veya yapay tek kristal (kuvars gibi) veya seramik (baryum titanat gibi) kullanıp ters piezoelektrik etki oluşturarak çalışırlar. Seramiklerin şekillendirilmesi daha kolay olduğundan kristallerden daha avantajlıdır. Piezoelektrik etki, ilk olarak 1880 yılında Pierre Curie tarafından ortaya atılmıştır. Kuvars ve roşel tuzu (potasyum sodyum tartarat) gibi asimetric kristallerin mekanik basınç altında elektrik enerjisi ürettiğini bulmuştur. Aslında mekanik titreşimler, elektriksel salınımların uygulanmasıyla elde edilmektedir. En yaygın olarak kullanılan dönüştürücü piezoelektrik dönüştürücülerdir. Piezoelektrik dönüştürücüler, tüm frekans aralıklarında kullanılabilmekte ve %95 elektriksel verim sağlamaktadır (Povey ve Mason,1998; [1]).

Ultrasonik güç kaynakları, voltaj hattındaki normal elektirik enerjisini yüksek frekanstaki elektrik enerjisine dönüştürmektedir. Bu elektrik enerjisi, mekanik enerjiye dönüştüren proba iletilmektedir. Prob, boylamsal yönde titreşir ve bu hareket çözeltiliye daldırılmış titanyum uca iletilir. Probtaki titreşimler, titanyum uç tarafından şiddetlendirilmektedir. Çözeltiliye yayılan güçlü şok dalgaların etkisiyle oluşan mikroskopik kabarcıkların anlık olarak oluşup sönmesiyle kavitasyon oluşur (Cropek ve Dankowski, 2000; [6]).

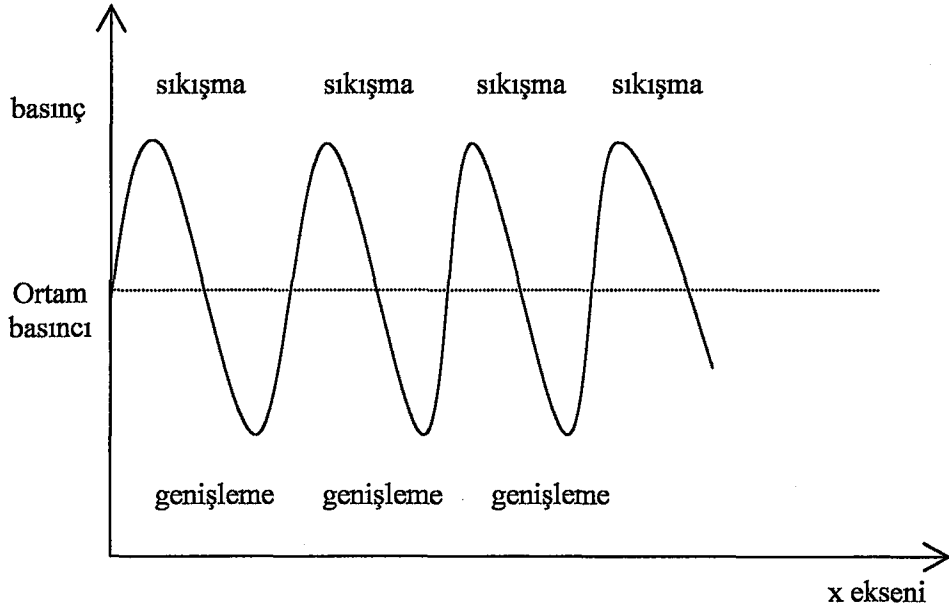
2.3.2 Kavitasyon ve etkileri

2.3.2.1 Kavitasyon

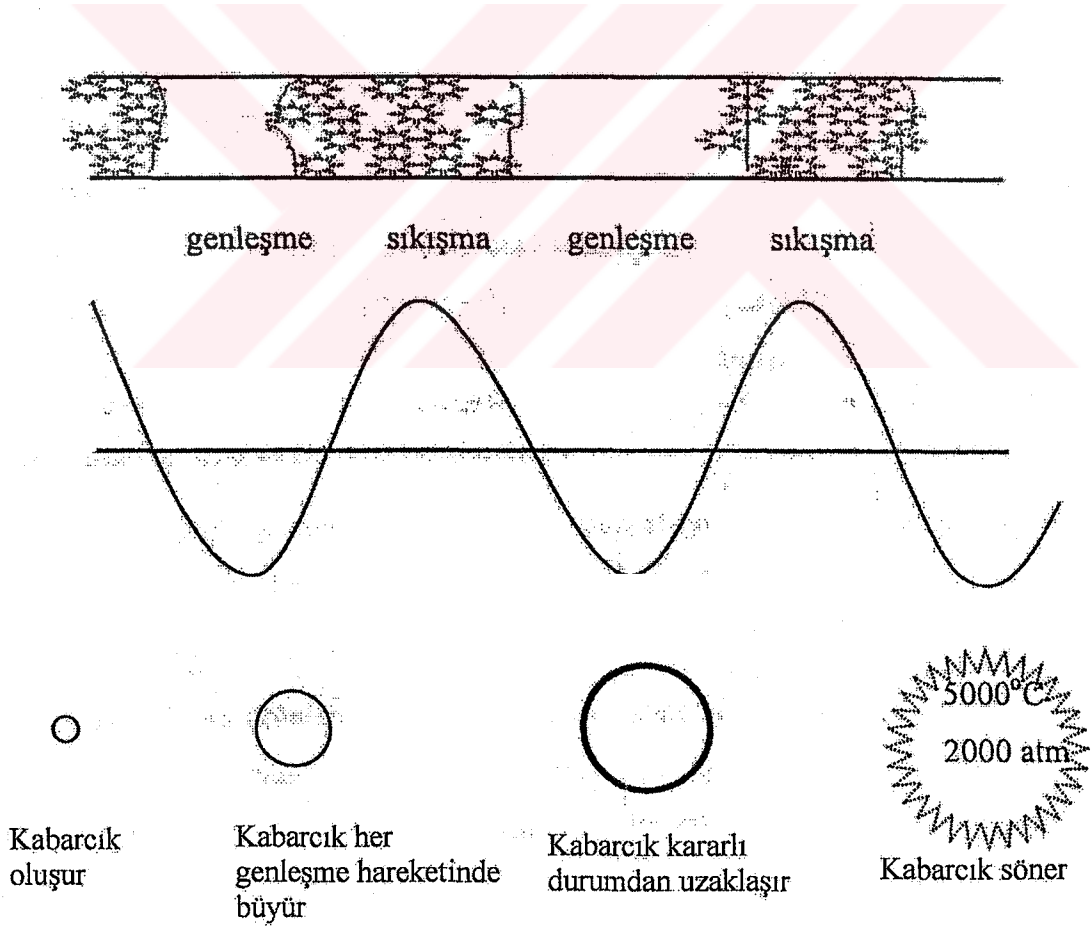
Akustik enerji, mekanik bir titreşimdir ve ses dalgaları içinden geçtikleri ortamdaki moleküllerin titreşimlerini etkiler. Ancak bu mekanik titreşimlerin frekansı, moleküllerin titreşim frekansından çok daha düşük olduğundan, akustik enerji moleküller tarafından direkt absorplanamaz (Cracknell, 1980). Ses enerjisinin prosesler üzerindeki etkisi kavitasyon olayı ile açıklanabilir. Kavitasyon ile dayanıklı küçük moleküller ve biyoaktif makromoleküller parçalara ayrılabilir (Chisti, 2003).

Kavitasyon; ultrasonikasyon uygulanan bir çözeltilide, ultrasonik dalgaların genişleme evresinde sıvının içinde mikrokabarcıkların ve çukurların oluşması ve dalgaların sıkıştırma evresinde bu kabarcıkların sönmesi şeklinde gerçekleşen bir akustik prostestir (Schlager, 1998). Sönen kabarcıklar ile ortamda şiddetli dalgalar oluşmaktadır. Kabarcığın oluşması ve sönmesi çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Kavitasyon, sadece ultrasonik güç uygulandığında oluşmaktadır.

Ses, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi ardarda gelen sıkışma ve genişlemelerden oluşan basınç dalgaları halinde ilerler. Bu basınç dalgaları, içinde ilerledikleri ortamdaki moleküllerin titreşimlerini etkiler (Andaç, 2002). Bir sıvı sıkışma dalgalarına kolaylıkla dayanırken, yeterince güçlü bir genişleme dalgası sıvı molekülleri arasındaki bağların kopmasına sebep olabilir. Bu durumda oluşan boşluk, sıvı içinde bulunan gaz yada buhar tarafından doldurulur ve kavitasyon baloncuğu oluşur. Oluşan bu baloncuk peşpeşe birkaç genişleme dalgası boyunca ortamdaki gaz yada buhar olarak büyümeye devam eder ve kararlı durumunu kaybeder. Böylece bir sıkışma dalgası kavitasyon baloncuğunun patlamasına neden olur (Andaç, 2002; Casadonte, 2000). Şekil 2.2'de bir kavitasyon kabarcığının oluşması, büyümesi ve sönmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Ultrasonik dalgaların ilerleyişi (Andaç, 2002)



Şekil 2.2 Kaviteasyon kabarcığının oluşması, büyümesi ve sönmesi (Casadonte, 2000; Giz, 2000)

Akustik alanda oluşan kabarcık kararlı değildir. Çünkü, çevresindeki diğer kabarcıklar oluşmakta ve büyümektedir. Böylece bazı kabarcıklar dengesiz boyuta kadar şişerler ve şiddetli bir şekilde sönerler. Bu kabarcıkların sönməsi, kimyasal ve mekanik etkiler için gereken enerjiyi üretir. Sonokimyasal proseslerde kavitasyon oluşumu istenen bir durumdur (Koç (Öncül), 2001; Chisti, 2003).

Kavitasyon enerjisinin ortaya çıkmasını açıklayan “hot spot” (sıcak nokta) teorisine göre; her bir kavitasyon kabarcığı, sıvı sistemlerde bir mikroreaktör gibi hareket ederek birkaç bin derece sıcaklık (5000 K gibi) ve bin atmosferin üzerinde basınç (2000 atm basınca kadar) üretir. Kabarcıkların oluşumu ve sönməsi sırasında kabarcık etrafındaki lokal sıcaklık 110°C/s den daha fazla olacak şekilde değişmektedir. Bunun yanında hızlı sönmenin sonucu olarak meydana gelen büyük mekanik etkiler de söz konusudur (Chisti, 2003).

2.3.2.2 Kavitasyonun çeşitleri

Kavitasyon iki şekilde gerçekleşmektedir:

- **Kararlı kavitasyon:** Bu kavitasyon türünde, kabarcıklar büyük ve periyot süreleri oldukça uzundur. Kalıcı kavitasyon için gerek duyulan ultrasonik güç yoğunluğu, geçici kavitasyonun gerektirdiğinden daha düşüktür. Ayrıca; kalıcı kavitasyonun oluşturduğu sıcaklık ve basınç, geçici kavitasyonunkinden oldukça daha düşüktür.
- **Geçici kavitasyon:** Yüksek sıcaklık (5000 K gibi) ve yüksek basınçta (1000 atm) geçici kavitasyon oluşur. Kavitasyon sırasında, hızlı bir şekilde küçük kabarcıklar oluşur ve yüksek miktarda enerji çıkışı gözlenir. Geçici kavitasyon için yüksek ultrasonik güç yoğunluğu gerekir. Geçici kavitasyon, suyun sterilizasyonu ve bitkisel besin çözeltilerinde mikrobiyolojik popülasyon kontrolünde çok fazla kullanılmaktadır (Schlager, 1998).

2.3.2.3 Kavitasyonu etkileyen faktörler

- **Uygulanan frekansın etkisi:** Ultrasonik dalgaların frekansı arttıkça, sıvılardaki kavitasyonun şiddeti ve üretimi azalır. Bunun sebebi, çok yüksek frekanslarda genleşme ve sıkışma evrelerinin çok kısa olmasıdır. Genleşme evresinin sınırlı zamanı, kabarcığın yeterli derecede büyümesine izin vermez. Genleşme sırasında kabarcık üretilse bile, sönməsi için belirli bir süre gereklidir. Bu nedenle, yüksek frekanslarda meydana gelen kavitasyon etkiler daha az olur.

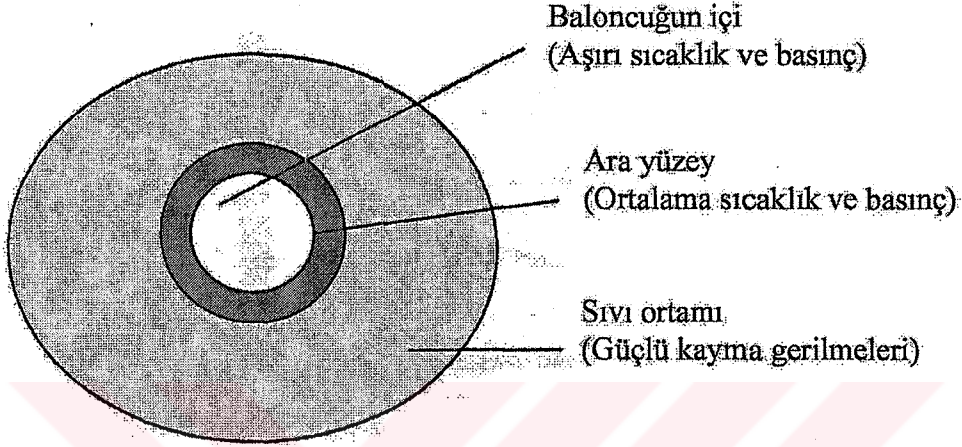
- **Çözücünün etkisi:** Bir sıvıda boşlukların ve mikrokabarcıkların oluşması için, sıvının kohesiv kuvvetlerinin üstesinden gelebilecek genleşme evresiyle etkisini gösteren negatif bir sabit basınç gereklidir. Viskoz veya yüksek yüzey gerilimli sıvılarda bu daha zordur. Bu durumda daha büyük şiddet gereklidir. Bununla birlikte; viskoz sıvı kaviteasyon kabarcığını üretebilirse, kabarcıkların çökmesinden ortaya çıkan sıcaklık ve basınç etkileri oldukça büyük olur. Çünkü çökme başlangıcında basınç çok fazladır. Kaviteasyona etki eden diğer çözücü faktörü de buhar basıncıdır. Bu direkt olarak sıcaklıkla ilgilidir.
- **Sıcaklığın etkisi:** Reaksiyon sıcaklığının artması, daha düşük akustik şiddetlerde kaviteasyona izin verir. Bu, sıvının ısıtılmasıyla buhar basıncının artmasının direkt bir sonucudur. Buhar basıncı artarsa, uygulanan akustik basıncın etkisi azalır, dolayısıyla kaviteasyon kabarcıklarının çökmesinin sonucu olan etkiler azalır. Sonuç olarak, maksimum sonokimyasal yarar sağlamak için deneylerin düşük sıcaklıkta yapılması gerekir. Çözücünün düşük buhar basıncına sahip olması tercih edilmelidir.
- **Gaz tipi ve içeriği:** Küçük atomlu gazların kullanımı, içi gaz dolu kabarcıkların daha büyük sonokimyasal etkiler yaratmasını sağlayacaktır. Bu nedenle tek atomlu gazlar (He, Ar, Ne) iki atomlulara göre tercih edilir. Sıvının gaz içeriği arttıkça, zayıf noktalarda artma olur ve kaviteasyon eşiği düşer.
- **Uygulanan dış basıncın etkisi:** Dış basıncın artırılmasıyla kaviteasyon eşiğinde ve kabarcık çökme şiddetinde bir artma olur. P_h (sıvının basıncı) - P_a (akustik basınç) > 0 ise, kaviteasyon kabarcığının oluşmadığı kabul edilir. Yüksek dış basınç, yüksek P_a değeri vereceğinden, $P_h - P_a < 0$ olur. Bu durum ultrasonik şiddeti yeterli derecede attıracak ve kaviteasyon üretecektir (Koç (Öncül), 2001).

2.3.2.4 Kaviteasyon etkileri

Kabarcığın patlaması esnasında içeriğinin çok yüksek sıcaklık ve basınç değerine ulaştığı bilinmektedir. Ancak patlama, kabarcığın çevresini de etkiler. Patlama esnasında kabarcığın etrafında meydana gelen kayma gerilmeleri, mikrojetler ve şok dalgaları, radikal oluşumunu sağlama, kütle transferini artırma, tanecik boyutunu düşürme ve yüzey temizleme gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilere sebep olurlar. Bunları daha iyi anlayabilmek için kaviteasyonun farklı sıvı sistemleri üzerinde meydana getireceği muhtemel değişimleri incelemek gerekir (Andaç, 2002).

2.3.2.4.1 Homojen sıvı sistemler

Kavitasyonun reaksiyon başlatma etkinliği, homojen şartlarda daha azdır. Araştırmalar, sonokimyasal etkinin çöken kabarcığın içinde aşırı koşullarda (yüksek sıcaklık ve basınçlarda) oluştuğunu, sıvı ile kabarcık içindeki boşluk arasındaki yüzeyde ise fazla aşırı olmayan koşullarda oluştuğunu göstermiştir. Kabarcığın hemen etrafında bulunan sıvıda ise mekanik etkiler baskındır (Şekil 2.3) (Koç (Öncül), 2001).



Şekil 2.3 Homojen bir sıvıda kavitasyon (Giz, 2000)

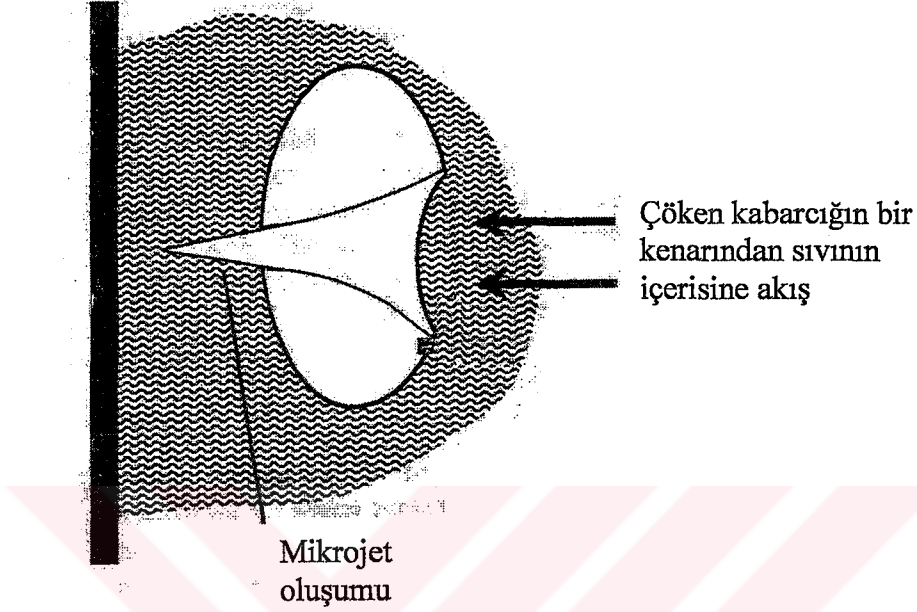
Çökme sırasında kavitasyon kabarcığının içerisinde aşırı koşulların (yüksek sıcaklık ve basınç) oluşması için kimyasal maddenin kabarcığa girmesi gerekir. Yani, kimyasal madde uçucu olmalıdır. Bilinen laboratuvar cihazları kullanılarak ultrasonik olarak üretilen kavitasyon kabarcıklarının konsantrasyonu çok küçüktür. Dolayısıyla bu tip reaksiyonlarda verim oldukça düşüktür (Giz, 2000; Koç (Öncül), 2001).

2.3.2.4.2 Heterojen sistemler

1) Sıvı içindeki katı yüzeylerin oluşturduğu heterojen sistemler

Heterojen bir sistemde oluşan kavitasyon, homojen reaksiyonlarda bahsedilen şekilde ortaya çıkar. Aralarındaki fark, sadece heterojen sistemde bulunan fazların ara yüzeyleri civarında kabarcıkların sönmesinden kaynaklanır. Eğer kavitasyon kabarcıkları büyük bir katı yüzey yakınında oluşurlarsa, kabarcıkların sönmesi simetrik olmaz. Büyük katı yüzey sıvının hareketini kısıtlar. Katı yüzey, sönen kabarcığın bir kenarından sıvı hareketine engel olarak, diğer taraftan kabarcığın içine doğru büyük bir sıvı akışına neden olur. Bunun sonucu olarak, hızı 100 m/s'den büyük bir "sıvı jeti" oluşur (Şekil 2.4). Sıvı jetin mekanik etkisi yüksek

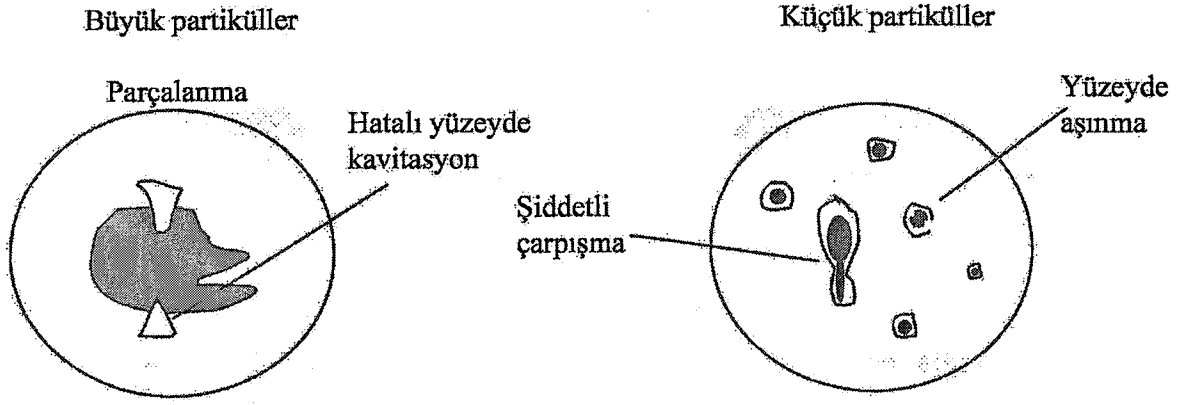
basınç oluşturduğundan dolayı, ultrasonikasyon işlemi temizlemede etkili olur. Kullanılan koşullara bağlı olarak bu güçlü sıvı jeti, katalizör yüzeylerini aktif hale getirir; katalitik maddenin gözenek içine emilmesi için gereken kuvveti artırır ve ara yüzey tabakalarının bozulmasıyla yüzeye kütle ve ısı transferini artırır (Koç (Öncül), 2001; Tuzcuoğlu, 2000).



Şekil 2.4 Katı yüzey yakınında kavitasyonun etkisi (Povey ve Mason, 1998)

2) Sıvı içindeki toz halindeki katıların oluşturduğu heterojen sistemler

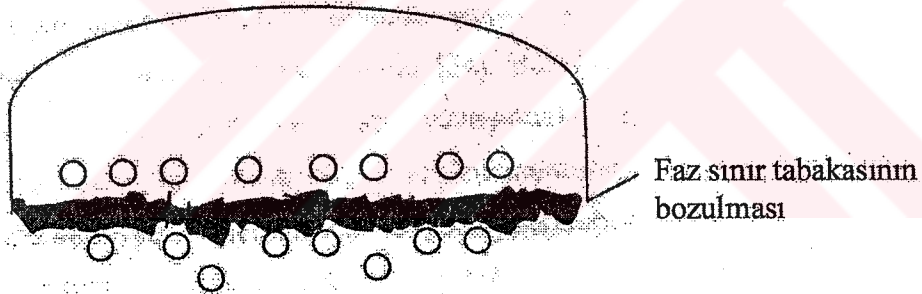
Katı partikül halindeyse, kavitasyon katının cinsine ve boyutuna bağlı olarak çeşitli etkiler oluşturur. Bu etkiler, bir aradaki kümelerin mekanik olarak topaklanmasının önlenmesi, aşınmayla yüzey kaplamaların kalkması ve yüzeye kütle transferinin sağlanmasıdır. Büyük tanecikli katılarda parçalanma ve bölünmeler olurken, küçük tanecikli katılardan oluşan sistemlerde kavitasyon nedeniyle hızlanan çarpışmalar sonucu tanecikler birleşir (Şekil 2.5). Ancak, her iki durumdada kütle transferi artacaktır (Andaç, 2002; Koç (Öncül), 2001).



Şekil 2.5 Kavitasyonun toz halindeki katılar üzerindeki etkisi (Koç (Öncül), 2001)

3) Karışmayan sıvıların oluşturduğu heterojen sistemler

Karışmayan sıvıların ara yüzeyinde veya yakınında kavitasyon kabarcıklarının çökmesi, ara yüzeylerin parçalanmasını ve karışmayı sağlar. Bunun sonucu olarak da iyi emülsiyonlar elde edilir. Bu esas olarak mekanik bir etkidir (Şekil 2.6) (Öncül (Koç), 2001).



Şekil 2.6 Kavitasyonun karışmayan sıvılar üzerindeki etkisi (Andaç, 2002)

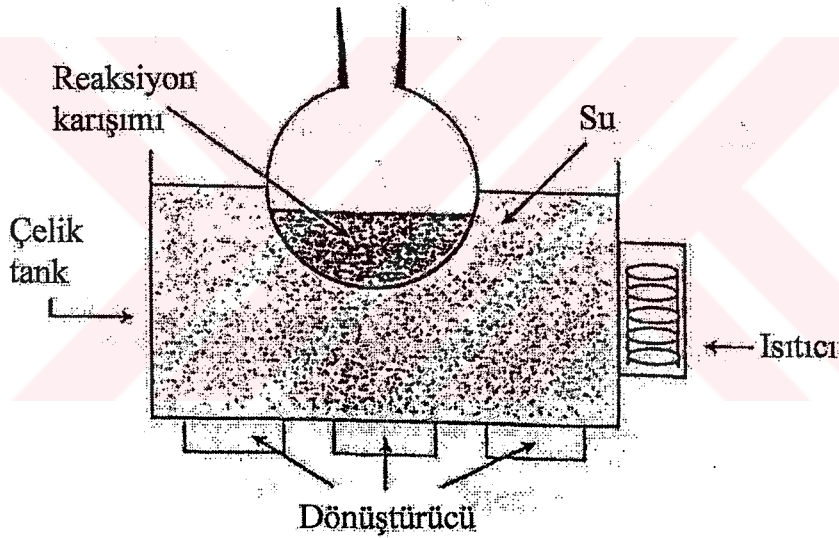
2.3.3 Ultrasonikasyon işleminde kullanılan cihazlar

Ultrasonikasyon kaynağı olarak, elektrik enerjisini ses enerjisine çeviren bir dönüştürücü kullanılır. Laboratuarlarda en çok kullanılan ultrasonikasyon cihazları, ultrasonik banyo ve ultrasonik prob sistemidir (Koç (Öncül), 2001).

2.3.3.1 Ultrasonik banyo

Basit bir ultrasonik temizleme banyosu en fazla kullanılan ve en ucuz ultrases kaynağıdır (Şekil 2.7). Banyonun kendisini reaksiyon kabı olarak kullanmak mümkün ise de bu genellikle banyo duvarlarının korozyonu, buharların veya gazların yayılmasının kontrolü gibi problemlerden dolayı çok nadir yapılır. Standart kullanımda, cam reaksiyon kapları ultrasonik banyo içine daldırılır.

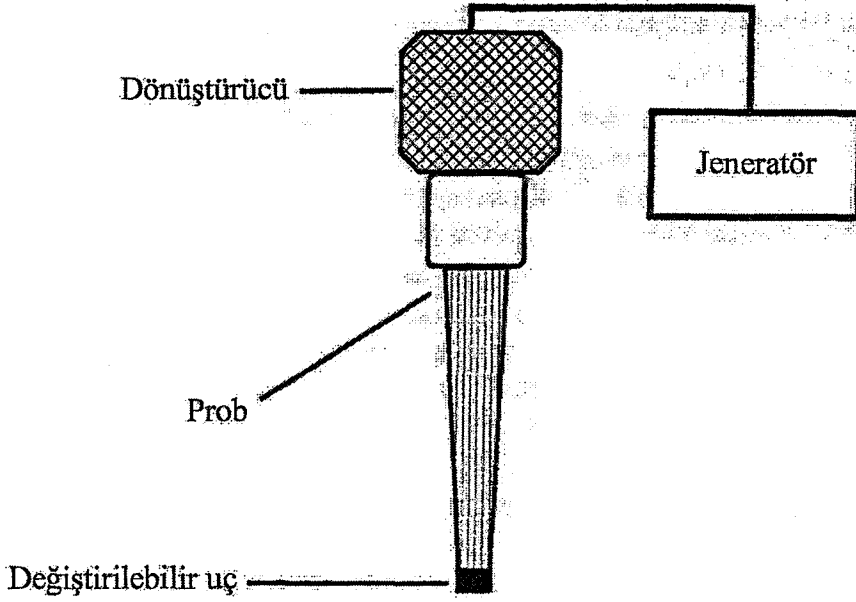
Reaksiyon kabı için özel bir adaptör gerekli değildir. Kap içerisinde inert bir atmosfer veya basınç sağlanabilir. Cihazın duvarlarından reaksiyon ortamına ulaşan enerji miktarı düşüktür, normal olarak $1-5 \text{ W cm}^{-2}$ arasındadır. Ticari ultrasonikasyon banyolarında termostatik kontrol genellikle zayıftır ve bu nedenle sistem ek olarak termostatik kontrol gerektirir (Koç (Öncül), 2001; Povey ve Mason, 1998).



Şekil 2.7 Ultrasonik temizleme banyosu (Povey ve Mason, 1998)

2.3.3.2 Ultrasonik prob

Ultrasonik prob, reaksiyon ortamına direkt olarak ultrasonik enerjinin uygulanmasını sağlar. Prob sisteminde, banyo sisteminde bulunan reaktör duvarları ve dalganın transfer edildiği su ortamı aradan çıkarılmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Ultrasonik prob sistemi (Povey ve Mason, 1998)

Bu tip sistemlerin gücü kontrol edilebilir ve banyo sistemine göre daha yüksek güç yoğunluğu (maksimum birkaç yüz $W\text{ cm}^{-2}$) sağlanabilir. Ancak, prob sistemi banyodan daha pahalıdır (Koç (Öncül), 2001; Povey ve Mason, 1998).

2.3.4 Ultrasonikasyonun yararları

Kimyasal ve biyokimyasal proseslere ultrasonikasyon işleminin uygulanmasındaki en önemli amaç, kimyasal reaktifliği arttırmaktır (Li vd., 1999).

Reaksiyon hızını arttırmak için kullanılan yöntemler şunlardır:

- Reaksiyon sıcaklığını arttırmak,
- Reaktanların konsantrasyonunu arttırmak,
- Dış basıncı arttırmak,
- Katalizör kullanımı,
- Ultrasonikasyon

Ultrasonikasyonun reaksiyona etkisi, katalizörün reaksiyonu hızlandırma etkisine benzemektedir. Ultrasonikasyon, en çok katalitik bazlı (katalizörün kullanıldığı) proseslerde etkili olmaktadır. Ultrasonik ve enzimatik etkiler; proses süresini kısaltmakta ve yüksek

oranda dönüşüm sağlamaktadır. Ayrıca, ultrasonikasyon cihazı yaydığı dalgalarla ortamın sıcaklığını yükseltmektedir. Bu nedenle sistemde soğutucu bulundurulmalıdır (Schlager, 1999). Yapılan çalışmalar sonucu, ses ötesi dalgaların enzimatik reaksiyonlar üzerinde 1000 kat daha etkili olduğu görülmüştür. Aynı tepkime süresine sahip bir kimyasal çalışmada, ses ötesi dalgaların uygulandığı sistemde, karıştırmalı sisteme göre daha yüksek dönüşüm değerlerine ulaşılmıştır. Diğer bir kimyasal çalışmada ise, ses ötesi dalgalar ve karıştırmalı sistem birlikte uygulanarak yüksek dönüşüm değerleri elde edilebilmiştir. (Yalçın vd., 2002).

Sıvı ortamda, ultrasonikasyonun biyokimyasal reaktifliğe etkileri iki temel akustik olaydan elde edilir (Schlager, 1998):

- Akustik dalga
- Kavitasyon

Ses ötesi dalgaların uygulandığı sistemlerde meydana gelen titreşim, etkili bir karışma meydana getirir (Yalçın vd., 2002). Ultrasonikasyonun karıştırıcı etkisi şunları sağlar:

- Kütle transferi
- Aktif kısımlardaki yenilenme ve üretim hızı
- Enzim yüzeylerindeki ürün ve toksinlerin desorpsiyonu (Schlager, 1998).

Organik maddelerin büyüklükleri, onların biyolojik degradasyon hızının saptanmasını sağlar. Büyük moleküllerin ve koloidal maddelerin degradasyonu yavaştır. Çünkü, moleküllerin hücre zarına nüfuz etmeleri zordur. Yavaş hidroliz reaksiyonları ultrasonikasyonun uygulanmasıyla hızlandırılabilir (Neis, 2002).

Kimyada ultrasonikasyon kullanımının diğer avantajları şu şekilde özetlenirse; ultrasonikasyon uygulandığı zaman, reaksiyon hızlandırılır veya daha kolay şartlarda gerçekleştirilebilir. Reaksiyonlarda indüksiyon süresi önemli derecede azaltılır. Reaksiyonlar, genellikle ek kimyasal madde gerektirmeden ultrasonikasyon ile başlatılabilir. Bazı sentezlerde reaksiyon basamağı sayısı azaltılabilir. Bazı durumlarda ise reaksiyon, ultrasonikasyon etkisi ile tamamen farklı bir yolla gerçekleştirilebilir (Koç (Öncül), 2001).

Ultrasonikasyon kullanımının çok az dezavantajı bulunmaktadır. Bu dezavantajlar ise, cihazın gürültülü çalışması ve ultrasonikasyonun endüstriye uygulanmasındaki maliyettir.

2.3.5 Ultrasonikasyonun kullanım alanları

Teknolojide görülen gelişmelere paralel olarak ultrasonikasyonun kullanım alanları hızlı bir şekilde artmaktadır. Çizelge 2.4’de ultrasonikasyonun kullanım alanları verilmiştir.

Çizelge 2.4 Ultrasonikasyonun kullanım alanları (Andaç, 2002; Cropek ve Dankowksi, 2000; Chisti, 2003; Koç (Öncül), 2001; [1])

Alan	Uygulama
Biyoloji, Biyokimya	<ul style="list-style-type: none"> • Homojenleştirme • Hücre parçalanması <p>Akustik güç, çeşitli çalışmalar için hücre duvarlarını parçalayarak, hücrelerdeki istenmeyen yapıları ayırmada kullanılır. Ayrıca, hücreler inaktive edilebilir.</p>
Kimya	<ul style="list-style-type: none"> • Reaksiyon süresini azaltma • Reaksiyon verimini artırma • Reaksiyon mekanizması değiştirme • Katalizör aktivitesini artırma • Radikal oluşturma • İndüksiyon süresini azaltma • Homojenizasyon ve karıştırma • Hidroliz
Coğrafya, Jeoloji	<ul style="list-style-type: none"> • Vuruş/yankı teknikleri • Petrol yataklarının yerinin saptanması • Deniz ve okyanuslarda derinlik ölçümü • Sonar (ultrasonik radar)
Endüstri	<ul style="list-style-type: none"> • Boyalar ve katıların; boya, mürekkep ve reçineler içinde kolayca dağılmasını sağlar. • Ultrasonik banyolara daldırılarak yağlamayı azaltma ve temizleme işlemleri yapılır. • Akustik filtrasyon ve ultrasonikasyon ile kurutma uygulamaları ise pek yaygın değildir.

Çizelge 2.4 (Devam)

Plastikler ve Polimerler	<ul style="list-style-type: none"> • Termoplastiklerle kaynak yapımında, • Polimerizasyon reaksiyonlarını başlatmada, • Polimer zincirlerinin kırılmasında.
Okyanus bilimi	<ul style="list-style-type: none"> • Su altının izlenmesi • Deniz tabakasının hatlarının çizilmesi • Batık gemilerin bulunması • Balık sürülerinin aranması
Metalurji ve Malzeme	<ul style="list-style-type: none"> • Metal oksit katalizör hazırlama • Kolloid ve dispersiyon hazırlama • Elektroliz • Metal ve plastik birleştirme-kesme • Yüzey temizleme: Elektronik aksamalar, otomotiv, uçaklarda kullanılan metal, seramik veya kristal yüzeylerden gres (katı yağ), pas ve boyaların çıkarılması gibi • Lehimleme ve kaynak • Malzemelerin işlenmesi: Karmaşık şekillerin, çok sert ve aşındırıcı malzemelerin işlenmesinde kullanılabilir. Yumuşak çelik, seramik, cam, tungsten gibi malzemeler bu teknikle işlenebilir. • Malzemelerdeki hataların bulunması: Vuruş yankı tekniği kullanılır. Bu teknikte ses dalgaları, muayene edilecek nesneye gönderilir ve yankı analiz edilen içteki hata veya geometrik yüzeyin bir bölümünden alıcıya geri döner. Hatalar ve maddenin içindeki diğer düzensizlikler dalgaların yansımada değişiklikler meydana getirir. Vuruş yankı metodu öncelikle kaynak ve dökümlerin incelenmesinde kullanılır. • Akustik mikroskop: 1 μ seviyesine kadar detaylar görülebilir. • Malzeme özelliklerinin belirlenmesi (parçacık büyüklüğü, gözeneklilik, kırılma mukavemeti gibi özellikler)
Gıda	<ul style="list-style-type: none"> • Köpük giderme • Karıştırma ve oksidasyon

Çizelge 2.4 (Devam)

Diş hekimliği	<ul style="list-style-type: none"> • Dişlerin temizlenmesi ve delinmesinde kullanılır.
İlaç	<ul style="list-style-type: none"> • Enzim aktifleştirme • Emülsiyon haline getirme • Kemoterapi uygulamaları
Tıp	<ul style="list-style-type: none"> • Cerrahi aletlerin sterilizasyonu • Görüntüleme tenikleri: İnsan kalbindeki kanın akışı, kalp kapakçıklarının durumu (doppler); böbrek, safратаşı ve tümörlerin tetkikinde kullanılmaktadır. 2-10 MHz frekans aralığı ultrasonikasyon ile görüntüleme, özellikle doğumlarda, fetusu (cenini) gözlemlemek için ve ameliyatlarda kesim aletlerine rehberlik etmek için kullanılır. • Fizyoterapi: Düşük frekanslarda (20-50 kHz) kas incinmelerin tedavisinde kullanılır.
Elektronik	<ul style="list-style-type: none"> • Elektronik komponentlerin muayenesi, temizliği ve montajı • Yüzey akustik dalga filtreleri ultrasonik frekanslarla çalışır. Bunlar cep telefonu ve TV alıcıları için önemlidir.
Tarım	<ul style="list-style-type: none"> • Hayvanlardaki yağ tabakasının kalınlığını ölçmek • Homojenleştirilmiş sütün kalitesini arttırma • Haşereleer ile mücadele

3. ENZİMLER

3.1 Enzim Nedir?

Kimyasal reaksiyonların dengesini bozmaksızın hızını değiştiren maddelere katalizör denir. Enzimler ise, bütün canlı organizmalarda bulunan, hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirleyen, organizmadaki metabolik olayları hızlandıran ve çoğunluğu protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, diğer proteinler gibi birbirlerine peptit bağları ile bağlanmış uzun amino asit zincirlerinden oluşmaktadır (Demirsoy, 1989; Telefoncu, 1995; [7]).

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonları hızlandırır ve reaksiyon sonunda hiç bozulmadan ayrılırlar. Bu nedenle, hücrede tekrar tekrar kullanılırlar. Bütün enzimler proteindir, fakat tüm proteinler enzim değildir. Enzimler yardımıyla hücre içinde çok sayıda madde parçalanır ve yeniden sentezlenir. Bütün bu reaksiyonlar hücre içinde normal vücut ısısında, düşük basınç altında ve belli bir pH aralığında enzimler tarafından gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlar çok hızlı reaksiyonlardır. Enzimler yardımı ile enzimler olmaksızın gerçekleştirilecek kimyasal reaksiyonlar 10^8 - 10^{11} kez daha hızlandırılabilir (Bailey ve Ollis, 1986; [8]).

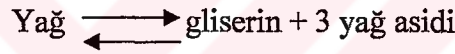
Canlı hücrelerde faaliyet göstermek üzere oluşturulan enzimler, atmosferik basınçta, düşük sıcaklık ve asitliği yüksek olmayan ortamlarda çalışırlar. Birçok enzimin fonksiyonlarını sürdürebilmesi için en uygun koşullar; 30-70°C arasında sıcaklık ve nötr değere yakın pH değerleridir. Bazı teknik uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda çalışabilecek enzimler geliştirilmiştir. Ancak, hiçbir enzim 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda uzun süre aktiflik özelliği gösteremez [9].

Organizmadaki organik maddelerin yapımı, parçalanması, kas hareketleri, sindirim ve solunum gibi fizyolojik olaylar, enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Bu nedenle hayat bir çok enzimatik reaksiyonların tümüdür denilebilir (Çetin, 1983).

3.2 Enzimlerin Özellikleri

- Enzimlerin tümü protein yapısındadır ya da protein kısmı bulundurlar.
- Etki ettiği maddenin sonuna "-az" eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar. Örneğin, kitine etki eden kitinaz enzimi.

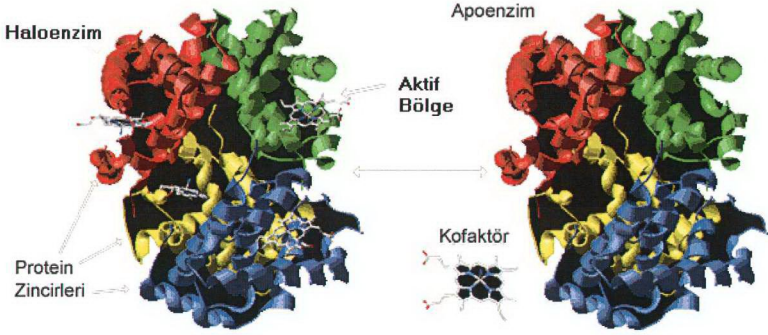
- Suda yada sulandırılmış tuz çözeltilerinde çözülebilirler. Fakat mitokondrilerde bulunan enzimler suda çözünmezler.
- Enzimin etki ettiği bileşiğe “substrat” denir. Enzimin saniyede etki ettiği substrat molekül sayısına enzimin etkinlik değeri denir. Bazı enzimler çok spesifiktir ve yalnızca bir substrata etki ederler. Bazı enzimler ise çeşitli substratlara etki ederler.
- Enzimler hücrede bir takım halinde beraber çalışır. Bir enzimin son ürünü kendisinden sonraki enzimin substratını oluşturur. Örneğin amilaz enzimi nişastayı iki zincirli maltoza, maltaz enzimi ise maltozu tek zincirli glikoza çevirir.
- Kuramsal olarak enzimli tepkimeler dönüştürdür. Enzim, tepkimenin yönünü değil dengenin oranını saptar. Tipik örnek, lipazın yağı parçalaması, fakat aynı zamanda gliserin ile yağ asitlerini birleştirmesidir. Ortamda sadece yağ asidi ya da sadece gliserin ile yağ asitlerinin birleşimi varsa denge ona göre, aşağıdaki şekilde olur. Denge noktası, yani tepkimenin hangi yöne gideceği termodinamik yasalarına göre belirlenir (Demirsoy, 1989).



3.3 Enzimlerin Yapısı

Enzimler, proteinler gibi uzun aminoasit zincirlerinden oluşan makromoleküllerdir ve molekül ağırlıkları genellikle 6000 ile 600000 arasında değişmektedir. Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelendiğinden her enzimin aminoasit dizilimi kendine özgüdür. Bazı enzimler (pepsin ve üreaz gibi) sadece proteinlerden oluşmuştur. Fakat, diğer çoğunluğu apoenzim ve koenzim olmak üzere iki farklı kısımdan meydana gelmiştir (Şekil 3.1) (Demirsoy, 1989; Gates 1992).

- Apoenzim kısmı:** Enzimlerin protein kısmıdır. Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.
- Koenzim kısmı:** Organik ya da inorganik, çoğu kez, fosfattan meydana gelmiş; protein kısmına göre çok daha küçük molekülü bir kısımdır. Enzimde işlev gören ve esas işi yapan yani apoenzime katalitik aktive özelliği veren bu kısımdır. Bazen enzimin iş görebilmesi için bir metal iyonuna gereksinimi vardır. Yani, koenzim kısmı metal iyonu ise (Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} , Zn^{++}) buna “kofaktör” adı verilir. Apoenzim ve koenzim kısmının ikisine birden “haloenzim” denir (Demirsoy,1989; Çetin, 1983).



Şekil 3.1 Enzimin yapısı [10]

3.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

Her enzimin 4 rakamlı bir numarası vardır. Örneğin, 3.6.1.3. “ATP fosfohidrolaz” da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu ve dördüncü numarada kendine özgü sıra numarasını verir (Demirsoy, 1989; [11]). Enzimler, katalizledikleri tepkimelere göre altı ana sınıfa ayrılmıştır:

1. **Oksiredüktazlar:** Redoks reaksiyonlarında indirgenme ve yükseltgenmeyi sağlayan enzimlerdir (Örneğin; katalaz, dehidrojenaz vb.).
2. **Tranferazlar:** Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil gibi) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar (Örneğin; glikokinaz, dekarboksilaz vb.).
3. **Hidrolazlar:** Hidrolizlenmeyi katalizleyen enzimlerdir:
 - Proteazlar (pepsin, tripsin)
 - Esterazlar ve Lipazlar (pektin esteraz, pankreatik lipaz)
 - Karbohidrazlar (laktaz, sakkaraz, α -amilaz, selüloz)
 - Fosfatazlar (lektinaz-c)
 - Amidazlar (üreaz)
4. **Liyazlar:** Su molekülü çıkarmadan molekülleri parçalayan enzimlerdir (Örneğin; aldolaz vb.).

5. İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak bir molekülün izomere dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir (Örneğin; glikoz izomeraz, mutarotaz vb.).

6. Ligazlar: Enerji kullanarak küçük molekülleri birbirine bağlayıp büyük moleküllerin oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Örneğin; amidsintetaz).

3.5 Enzim Kaynakları

Enzimlerin elde edilmesinde kullanılan üç ana kaynak vardır. Bunlar; hayvansal (karaciğer, kalp, böbrek gibi organlar ve kaslar), bitkisel ve mikrobiyal (mikroorganizmalar, bakteri, küf, mantar) kaynaklardır. Bu üç kaynak arasında en önemlisi, üretimi ve uygulanmasındaki kolaylık bakımından mikroorganizmalardır. Bu nedenle endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizmalardan yararlanılır. Enzimler hücrelerde buldukları yere göre ikiye ayrılır;

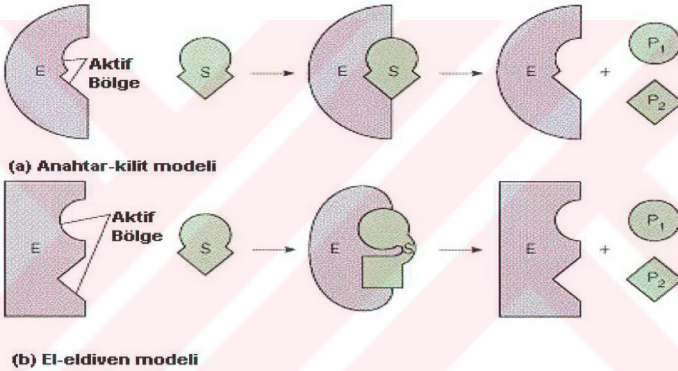
- **Hücre dışı enzimler:** Hücreler tarafından dışarı salgılanan enzimlerdir. Elde edilişleri kolay olduğundan endüstride kullanım alanları daha yaygındır.
- **Hücre içi enzimler:** Hücre yapılarına sıkıca bağlı olan ve dışarıya salgılanmayan enzimlerdir. Elde edilebilmeleri ve saflaştırılmaları için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir (Çetin, 1983; Tauber,1949).

3.6 Enzimlerin Etki Mekanizması

Her enzimin katalizleyici etkisi yalnızca bir tip tepkimeye ve yalnızca belirli türden maddelere özgüdür. Enzimin etki ettiği bu maddeye ise “*substrat*” denir. Enzimlerin molekül ağırlığı, substratın molekül ağırlığından çok daha büyük olduğu için, bu iki molekül karşılaştığında enzimin ancak bir bölümü substrata rastlar; iki bileşiğin birbirine temas ettiği bu bölgeye “aktif bölge” denir. Bir enzim, karşılaştığı substratı fiziksel yada kimyasal kuvvetlerle aktif bölgesine doğru çeker; bütün katalizörler gibi kimyasal tepkimeyi başlatır, ama kendisi kimyasal tepkimeye katılmaz (Çetin, 1983). Enzimatik reaksiyonlar genellikle üç aşamada gerçekleşir;

- Substrat enzimi fark eder ve enzime tutunur. Enzim substrat kompleksi oluşur.
- Enzimin katalitik kısmı (aktif bölgesi) substratla temas eder ve substratı ürüne dönüştürür.
- Ürünler enzim yüzeyinden uzaklaştırılır, böylece enzim diğer substrat molekülleri ile etkileşmek üzere serbest kalır.

Enzim-substrat etkileşimini açıklayan ilk model, alman kimyacı Emil Fisher (1890) tarafından savunulan anahtar kilit modelidir (Şekil 3.2a). Enzimin hangi substratla çalışacağını saptayan kısım apoenzim kısmıdır. Demek ki apoenzim kısmı ile substrat arasında bir ilişki vardır. Fischer bunun anahtar-kilit uyumu gibi olacağını savunmuştur. Enzim çok seçicidir ve şekli farklı olan başka bir substratı katalizlemez. Enzim-substrat etkileşimini açıklayan ikinci model ise, Daniel Koshland (1958) tarafından savunulan ve anahtar kilit-modeline göre enzim seçiciliğinin biraz daha az spesifik olduğu el ve eldiven modelidir (Şekil 3.2b). Bu modele göre, enzimde substratın bağlanacağı kısmın esnek bir yapıya sahip olduğu ve bağlanan substrata göre şekillendiği varsayılmaktadır (Demirsoy, 1989; [11, 12]).



Şekil 3.2 Enzim-substrat etkileşim modelleri [13]

3.7 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesine etki eden başlıca faktörler (Demirsoy, 1989):

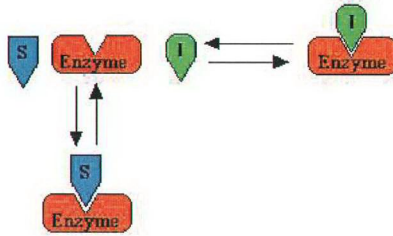
- Enzim/substrat derişimi: Substrat ya da enzimin fazla olması reaksiyon hızını değişik şekillerde etkileyebilir. Fazla substrat bulunan bir ortama eklenecek enzim, son ürün miktarını arttıracaktır.
- Sıcaklık: Reaksiyon hızını artırır, enzimin bozulmasına sebep olur.

- pH: Enzimler genellikle çok fazla asidik ve bazik ortamda etki gösteremezler ve yapıları bozulabilir.
- Suyun etkisi: Enzimleri büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden su miktarı az olduğunda işlev gösteremezler.
- İnhibitörler/Protein bozucular
- Zaman

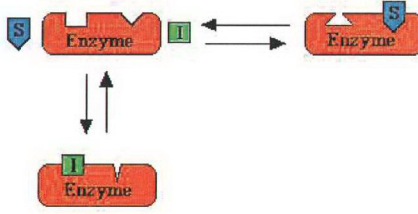
3.8 Enzim İnhibisyonu

İnhibitörler; enzime bağlanarak enzim aktivitesini azaltan ya da reaksiyonu durduran maddelerdir. Enzim inhibisyonu çok önemlidir. Çünkü, bir çok ilaç ve zehirli maddeler bu şekilde etkili olurlar. Enzim inhibitörleri iki ana gruba ayrılır;

- 1) **Tersinir inhibitörler:** Enzime zayıf bağlarla bağlanan ve etkileri tersinir olan inhibitörlerdir. Konsantrasyonları düşürüldüğünde enzimlerden ayrılma eğilimi gösterdiklerinden enzim aktivitesi normal seviyeye döner. Tersinir inhibitörler enzime bağlandıkları yere göre üçe ayrılır;
- **Rekabetçi (competitive) inhibitörler:** Yapıları bakımından substrata benzeyen inhibitörlerdir. Substratın bağlanacağı aktif kısma bağlanıp substrat molekülünün enzime bağlanmasını engelleyerek reaksiyon hızını düşürürler. Yani, substrat ve inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanabilmek için rekabete girerler (Şekil 3.3). Örnek olarak, sülfamitler ve malonik asit verilebilir.



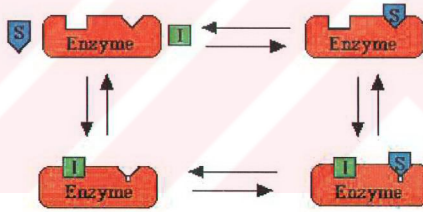
a) Klasik rekabetçi inhibisyon



b) Klasik olmayan rekabetçi inhibisyon

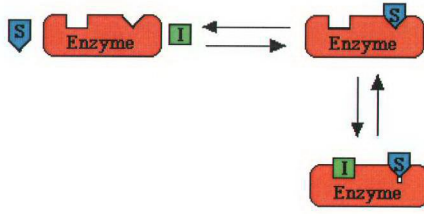
Şekil 3.3 Rekabetçi inhibisyon

- **Rekabetçi olmayan (non-competitive) inhibitörler:** Enzim molekülünde aktif bölgenin dışında bir yere bağlanırlar, aktif kısımda şekil değişikliği yapar ve ardından substrat bağlandığında ürün oluşumunu engellerler. Yani, enzim konformasyonunu değiştirerek reaksiyonun oluşumunu engellerler (Şekil 3.4). Bu inhibitörlerin substrata benzerliği yoktur. Örnek olarak, siyanür ve karbomonoksidin sitokrom oksidaz enzimini inhibe etmesi sonucu hücre solunumuna engel olurlar.



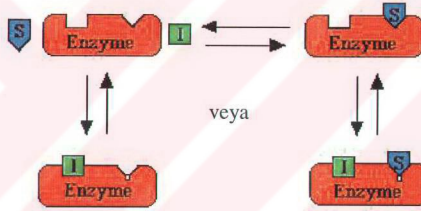
Şekil 3.4 Rekabetçi olmayan inhibisyon

- **Yarı rekabetçi (uncompetitive) inhibitörler:** Daha önce substrat bağlanmış enzime (enzim substrat kompleksine) bağlanırlar (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Yarı rekabetçi inhibisyon

2) **Tersinmez inhibitörler:** Enzime sıkıca, genellikle kovalent bağlarla bağlanan ya da enzim yapısındaki kovalent bağları parçalayan inhibitörlerdir. Etkileri tersinmezdir [11, 14-16].



Şekil 3.6 Tersinmez inhibisyon

3.9 Enzimlerin Uygulama Alanları

Teknolojinin gelişimi ile enzimlerin endüstride kullanımı hızlı bir şekilde artmaktadır. Ayrıca, enzimlerin kimyasal katalizörlere göre bir çok avantajı bulunmaktadır. Çizelge 3.1'de endüstride en çok kullanılan enzimler ve kullanım alanları verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çeşitli enzimler ve endüstride uygulama alanları (Çetin, 1983; Telefoncu, 1995)

Enzim	Uygulama alanları
α -Amilaz	Niştayı belirli oranda hidroliz ederek çözünürleştirir. Tekstil endüstrisi, deterjan sanayi, gıda endüstrisi (tatlandırıcı eldesi için), atık su arıtımı
β -Amilaz	Niştanın amiloz bileşimi üzerine etki ederek maltoza kadar hidroliz eder.
Pektinaz	Pektin molekülünü hidroliz eden enzimdir. İçecek endüstrisi (meyve suyu üretiminde verimi arttırmada, meyve suyunun berraklaştırılmasında)
Proteaz	Protein hidroliz eden hücre dışı enzim özütleridir. Gıda endüstrisinde (buğday proteinlerinin modifikasyonunda, etin gevrekleştirilmesinde, peynir endüstrisinde başlatıcı), içecek sanayi (biralarm berraklaştırılmasında), hayvan yem sanayi (balık atıklarının değerlendirilmesinde), deterjan endüstrisi, selüloz ve kağıt endüstrisi, deri endüstrisi
Selülaz	Selülozu glikoza hidroliz eden enzimlerdir. Tekstil endüstrisi, deterjan endüstrisi, hayvan yem sanayi, tarımsal atıklardan glikoz üretiminde, eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
Katalaz	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ reaksiyonunu katalizler. Gıda endüstrisi (konservelerde glikoz oksidaz enzimi ile birlikte oksijen çıkarıcı olarak ve sütlerin soğuk pastörizasyonunda)
İnvertaz	Sakkoroza glikoz ve fruktoza hidroliz eder. Gıda sanayi (reçel, marmelat, çikolata ve dondurma üretiminde kristallenmeyi (şekerlenmeyi) önleyici olarak)
Lipaz	Yağları yağ asitlerine hidrolizler. Gıda endüstrisi (yağların hidrolizi, süt ürünlerinin koku ve tadını geliştirmede), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında), hayvan yem sanayi, deterjan sanayi, kağıt endüstrisi, deri sanayi

Çizelge 3.1 (Devam)

Penisilnaz	Penisilini penisiloik aside hidroliz eder. Tıp (penisilin zehirlenmelerinde)
Glikoamilaz	Nişasta zincirlerini glikoza kadar hidroliz eder. Gıda sanayi (nişastadan glikoz üretimi)
Pepsin	Proteinlerin peptid bağlarını hidroliz eder. İçecek sanayi (şarapçılıkta, biralarn bulanıklılığının gideriminde), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
Laktaz	Laktozu glikoz ve galaktoza hidroliz eder. Gıda sanayi (laktosuz süt üretiminde, peynir altı sularının değerlendirilmesinde)
Tripsin ve Papain	Peptid ve proteinleri hidroliz eder. Gıda sanayi (etlerin gevrekleştirilmesinde), içecek sanayi (biralarn berraklaştırılmasında), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
Glikoz-izomeraz	Glikozu fruktoza dönüştürür. Gıda sanayi (şekerleme, çikolata, reçel ve marmelat üretiminde)

4. AMİLAZ ENZİMLERİ VE ÖZELLİKLERİ

Amilaz enzimleri; hidrolazlar grubunda, glikozidik bağları parçalayan karbohidrolazlar alt grubunun üyeleridir. Polisakkaridazlar olarak da adlandırılırlar (Moseley ve Keay, 1970). Amilaz enzimi, nişasta (amiloz, amilopektin), glikojen ve oligosakkaritlerdeki α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen glikosidazlardır. Bir polisakkarit türü olan nişastayı parçalarlar (Wong, 1995). Diğer bir tanımla amilaz; karbohidratları parçalayarak disakkaritlere ve daha sonrada glikoz gibi monosakkaritlere dönüştüren bir enzimdir [17].

Endüstride yaygın olarak kullanılan üç tip amilaz enzimi vardır: α -Amilaz, β -amilaz ve glikoamilaz (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Amilaz enzimlerinin çeşitleri (Maarel vd., 2002)

Enzimin Adı	Sistemik Adı	Sınıf Numarası
α -Amilaz	α -1,4-glukan 4-glukanhidrolaz	EC 3.2.1.1
β -Amilaz	α -1,4-glukan maltohidrolaz	EC 3.2.1.2
Glikoamilaz	α 1,4-glukan glukohidrolaz	EC 3.2.1.3

Amilaz enzimleri; bakteri (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* vb.), mantar (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* vb.), hayvanlar (tükrük salgısı, pankreatik salgı, kan, ter, gözyaşı, karaciğer ve diğer organlar) ve bitkilerde (tohum, tahıl) bulunmaktadır (Wong, 1995; Tauber, 1949)

4.1 α -Amilaz

α -Amilaz; nişasta, glikojen ve diğer polisakkaritlerdeki α -1,4 glikosidik bağların hidrolizini katalizleyerek oligosakkaritlere ve daha sonrada maltoz ve glikoza dönüştüren endoglikosidazdır ve α -konfigurasyonunda ürün verirler (Wong, 1995; Shaw vd., 1995).

α -Amilaz, glikojendeki α - 1,4 bağları hidrolizler fakat α -1,6 bağlarına etki edemez. Hidrolizlenme reaksiyonu yavaş olup maltoz, maltotrioz, glikoz ve bazı oligomerik dekstrinler oluşturur. Bakteriye kaynaklı α -amilazlar, hidroliz ürünü olarak dekstrin oluştururlar ve sıvılaştırıcı enzim olarak isimlendirilirler. Fungal α -amilazlar ise, tatlandırıcı

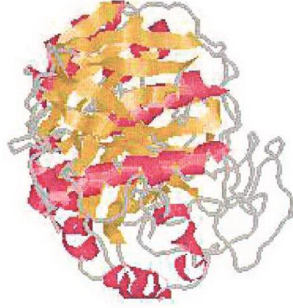
olarak isimlendirilir ve hidroliz ürünü olarak bir disakkarit olan maltozu oluştururlar. Endoamilaz; amiloz ve amilopektinin iç kısmındaki α -1,4 glikosidik bağları parçalayabilir. α -Amilaz, iyi bilinen bir endoamilazdır (Dordick, 1991; Maarel, 2002; Suzuki vd., 1989; Violet ve Meunier, 1989; [18, 19]).

Memelilerden ve tahıllardan elde edilen α -amilazlar üzerinde oldukça geniş araştırmalar yapılmış olmasına rağmen bakteri kaynaklı α -amilazlar daha çok ticari önem kazanmıştır. Endüstriyel boyutta üretilen α -amilazlar, birbirinden optimum çalışma pH ve sıcaklık aralığı, ısı stabilitesi ve molekül ağırlıkları ile ayrılmakta ve endüstriyel uygulamalarda bu özelliklere göre değişmektedir. Örneğin, ısıya dayanıklı (termostabil) α -amilaz yüksek sıcaklıkta nişastanın sıvılaştırılmasında, ısıyla bozunur α -amilaz ise nişastanın şekere dönüştürülmesinde kullanılmaktadır (Tomazic ve Klibanov, 1988; Bealin-Kelly vd., 1991; Shaw vd., 1995).

Endüstride en çok kullanılan α -amilazlar malt, pankreatik, fungal, bakteriyel ve ısıya dayanıklı bakteriyel kaynaklı olabilmektedirler. Genellikle nişasta hidroliz endüstrisinde ticari enzim olarak sıcaklığa dayanıklı olan *Bacillus amyloliquefaciens* ve özellikle de *Bacillus licheniformis* kaynaklı enzimler kullanılmaktadır. Molekül ağırlığı 50 kD'den küçük olan α -amilaz enzimleri, aktivitesi ve stabilitesi için Ca^{2+} iyonuna ihtiyaç duymaktadır. Çizelge 4.2'de ise farklı kaynaklı α -amilazlara ait bazı özellikler (işlem sıcaklığı, işlem pH'ı, inhibitör ve aktivatör gibi) ve Şekil 4.1'de ise α -amilazın şekli verilmiştir (Godfrey ve Reichelt, 1983; Wiseman, 1987; Wong, 1995; [20]).

Çizelge 4.2 Farklı kaynaklı α -amilazların bazı özellikleri (Godfrey ve Reichelt, 1983)

Enzim kaynağı	İşlem sıcaklığı (°C)	İşlem pH'ı	İnhibitör	Aktivatör
Malt	55-65	4.5-5.5	Metal iyonu	Ca^{2+}
Pankreatik	40-55	6.5-7.0	Asitler	--
Fungal	50-55	4.5-5.5	Metal iyonu	Ca^{2+}
Bakteriyel	60-75	5.5-7.0	Anyonik yüzey aktif maddeler	Ca^{2+}
Isıya dayanıklı bakteriyel	85-110	5.0-7.5	Anyonik yüzey aktif maddeler	Ca^{2+}



Şekil 4.1 *Bacillus* kaynaklı α -amilazın şekli [21]

4.1.1 α -Amilazın endüstriyel uygulamaları

α -Amilazın teknik uygulamaları oldukça yaygındır. Gıda, kimya, tekstil ve deterjan gibi çeşitli endüstri dallarında gün geçtikçe artan miktarlarda kullanılmaktadır (Atkinson ve Mavituna, 1991; Casida, 1968; Shaw vd., 1995).

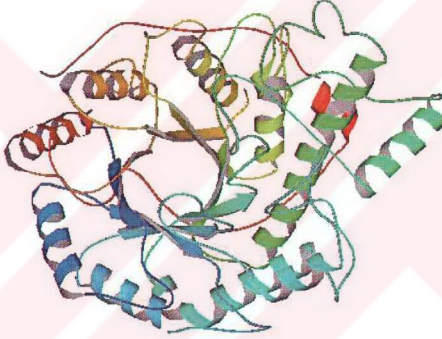
α -Amilazın başlıca kullanım alanları ise şöyledir;

- Ekmek üretimi
- Alkollü içecek üretimi
- Çikolata üretiminde şurup eldesi
- Bebek gıdalarının hazırlanması
- Şeker ve tatlandırıcı şurup eldesi
- Kumaşlardan haşıl sökme işlemi
- Püre ve çorbaların sıvılaştırılması
- Bira üretimi
- Deterjan üretimi
- Kağıt üretimi
- Nişasta bazlı yapıştırıcıların hazırlanması
- Tatlandırıcıların üretimi
- Farmakoloji
- Hayvan yemi
- Pis suların (lağım gibi) arıtılması

4.2 β -Amilaz

β - konfigürasyonunda ürün veren α -amilaz enzimleri gibi α -1,4 bağlarını hidrolizleyen ekzoenzimlerdir. Nişastanın indirgenmeyen moleküllerine etki eder. Nişastadaki amiloz bileşiğini tamamen parçalar, amilopektini kısmen hidrolizler. Son ürün olarak, maltoz ve β -limit dekstrinleri oluştururlar. Genellikle bitkiler (özellikle tohumları) ve bakterilerden (*Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa* gibi) elde edilirler. Enzim aktivitesi için Ca^{2+} iyonuna gereksinim duymaz (Wong, 1995; Maarel, 2002).

Ekzoenzimler; α -1,4 glikozidik bağı parçalayan β -amilaz ve α -1,4 ve α -1,6 bağlarını parçalayan glikoamilaz ve α -glikosidaz enzimleridir. Şekil 4.2'de β -amilazın şekli görülmektedir.



Şekil 4.2 β -Amilazın şekli [22]

4.2.1 β -Amilazın kullanım alanları

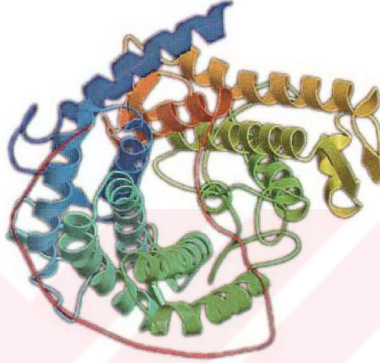
Nişastayı ve dekstrini maltoza kadar parçalar. Nişastayı şekerlendirici (sakkarifiye edici) enzim olarak da adlandırılan β -amilaz, maltoz üretiminde kullanılır (Çetin, 1983).

4.3 Glikoamilaz

Glikoamilaz, bazı literatürlerde γ -amilaz veya amiloglikosidaz olarak adlandırılmaktadır (Wong, 1995). Glikoamilaz enzimi nişasta ve türevlerini indirgen olmayan uçlarından α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları hidroliz ederek glikoz meydana getirir. Fakat, α -1,6 bağlarda aktivitesi daha düşüktür (Wong, 1995; Uludağ (Bozkurt), 2000; Wiseman, 1987). Glikoamilaz

enzimleri, mannoz, glikoz, galaktoz ve uronik asit içeren glikoproteinlerdir (Wiseman, 1987).

Glikoamilaz sadece küf ve mayada bulunan bir mikrobiyal enzimdir (Şekil 4.3). Bu enzim genellikle *Aspergillus niger* ve *Rhizopus delemar*'dan üretilir. Bu enzim, α - ve β -amilaza göre daha yavaş hızda hidroliz işlemi gerçekleştirir ve α -amilaza göre sıcaklığa dayanıklılığı daha düşüktür (Wong, 1995; Uludağ (Bozkurt), 2000).



Şekil 4.3 *Aspergillus* kaynaklı glikoamilazın görüntüsü (Uludağ (Bozkurt), 2000)

Glikoamilaz; nişastayı glikoz monomerlerine indirgese de, bunun için diğer amilazların varlığına ihtiyacı vardır. Özellikle saf glikoz istenildiği durumlar için glikoamilaz ve α -amilaz ardışık işlem olarak kullanılır (Roehr, 1996; [18])

4.3.1 Glikoamilazın kullanım alanları

Fungal glikoamilazın gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı vardır. Nişasta dekstrinlere kadar parçalandıktan sonra, glikoamilazın ortama ilavesi ile nişasta glikoza kadar ayrılmaktadır. Açığa çıkan glikoz ya şurup halinde ya da kristal toz halinde elde edilmektedir. Glikoz şurubuna glikoz izomeraz enzimi katılarak yüksek fruktozlu şurup üretimi sağlanabilmektedir. Bu ürün yüksek tatlılığa sahip olup, meşrubat üretiminde, alkol üretiminde, süt ürünlerinde, ekmekçilik ürünlerinde, konservecilikte, pasta ve şekerleme yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (glikoz şurubu ve fruktoz şurubu eldesi) (Uludağ (Bozkurt), 2000).

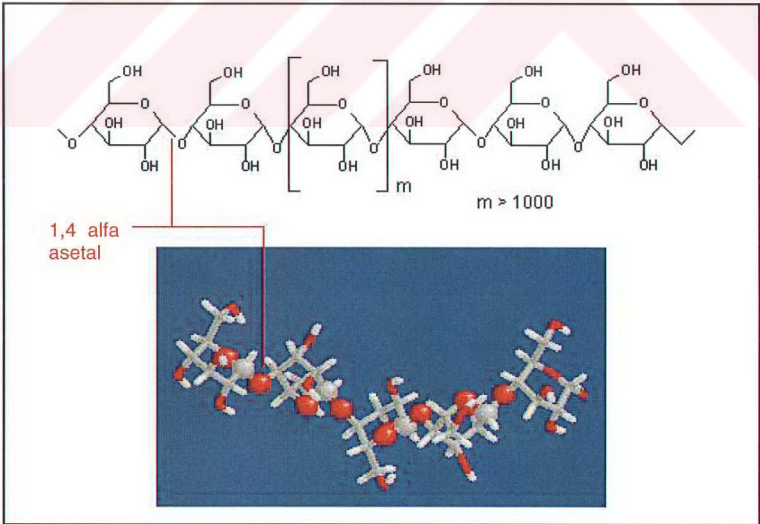
5. NİŞASTA

5.1 Nişasta ve Yapısı

Nişasta doğada bulunan en önemli yenilenen kaynaklardan biridir ve gıda endüstrisinde önemli bir yeri vardır. Glikoz canlıların önemli bir enerji sağlama maddesi, nişasta ise depolanmış bir enerji maddesidir [23].

Nişasta; kapalı formülü $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ olan, bitkilerin kök, yumru ve tohumlarında yarı kristal tanecikler şeklinde depolanan, glikoz polimerlerinden oluşmuş bir polisakkarittir [18, 20]. Nişasta granüllerinin çapları 0.5 ile 17 μm arasında değişir ve bitkilerin tohumları (mısır, buğday, pirinç), kök (tapyoka) ve yumru köklerde (patates) mikroskobik tanecikler şeklinde bulunur [23].

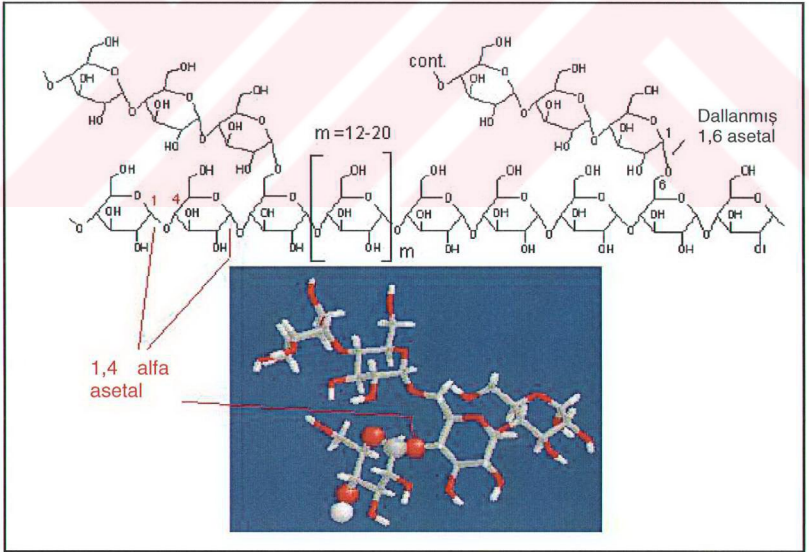
Nişastaların çoğu, yapısı ve molekül ağırlığı birbirinden farklı iki tip polimerden oluşur. Bunlar, amiloz ve amilopektindir. Amiloz; nişastanın yaklaşık %20-30'unu oluşturan, α -1,4 glikozik bağlarla bağlı glikoz birimleri içeren ve molekül başına 4-5 dallanma noktası veren, nişastanın düz zincirli bileşenidir (Şekil 5.1) [18, 20]. Amiloz molekülünde 100-2000 glikopiranoz birimleri α -1,4 bağlarla bağlanmıştır (Uludağ (Bozkurt), 2000)



Şekil 5.1 Amiloz molekülü [24]

Amilopektin ise; nişastanın %70 - 80'ini oluşturan, α -1,4 glikozik bağlarla bağlı ve α -1,6 bağları ile dallanan (molekül başına 250 dallanma noktası verir) glikoz üniteleri içeren bir polimerdir (Şekil 5.2) [18, 20]. Amilopektin, dallanmış 1500 veya daha fazla glikopiranoz birimlerinden meydana gelmiştir. Her molekülde 50-70 dal bulunur ve bunların her biri 20-25 glikoz uzunluğundadır. Her 20-30 glikoz biriminde bir dal vardır (Uludağ (Bozkurt), 2000). Amiloz molekülü, amilopektin molekülünden daha küçüktür. Nişastanın çeşitlerine göre, nişastanın kompozisyonlarında farklılıklar olabilir. Nişastadaki amiloz oranı %0-75 arasında değişebilmektedir. Patates ve mısır nişastaları gibi nişastalar %100 saf amilopektinden meydana gelmektedir (Maarel vd., 2002; [23]).

Nişasta granüllerinde amorf ve kristal bölgeler bulunmaktadır. Kristal bölgeler genellikle amilopektinden oluşmaktadır. Amiloz ise, amorf bölgelerde bulunmaktadır. Amilopektin nişastanın suda çözünen bileşeni, amiloz ise suda çözünmeyen bileşendir (Maarel vd., 2002). Granüllerin kısmen kristal ve suda çözünmez olmaları doğal nişastanın izolasyon ve eldelerinin kolay olmasını sağlar. Böylelikle amiloz ve amilopektin birbirinden kolaylıkla ayrılabilir (Uludağ (Bozkurt), 2000).

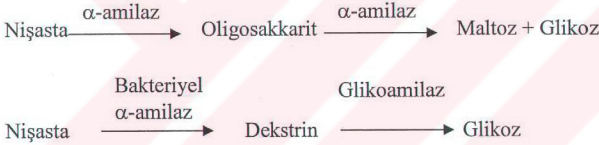


Şekil 5.2 Amilopektin molekülü [24]

5.2 Nişastanın Hidrolizlenmesi

Nişasta önemli bir biyopolimer olup, birçok endüstride kullanılmaktadır (gıda endüstrisi, tatlandırıcı şurup eldesi; tekstil endüstrisi, haşılama prosesi; kimya endüstrisi, etanol üretimi, yapıştırıcı üretimi, kağıt sanayi vs.). Nişastanın endüstride çok amaçlı kullanılabilir bir madde olmasını sağlayan en önemli özelliği nişastanın hidroliz edilebilmesidir. Nişasta depolimerizasyonu özellikle tatlandırıcı üretiminde önemli bir proses olarak geliştirilmiştir (Park ve Rollings, 1994; Reed ve Underkofler, 1966).

Nişasta hidrolizi, glikoz üniteleri arasındaki bağların katalitik olarak asit veya enzim yardımı ile kopması ile gerçekleşir (Uludağ (Bozkurt), 2000). Nişasta hidrolizlenme prosesinin ürünleri; dekstrin, maltotrioz, maltoz ve glikozdur. Dekstrin ara glikozidik bağların rastgele hidrolizi sebebiyle parçalanmış nişastanın kısa segmentleridir. Nişasta molekülü, reaksiyon sonunda üçlü bağ olarak parçalanırsa bir molekül maltotrioz, ikili bağ olarak parçalanırsa maltoz, her bağ parçalanırsa glikoz oluşur [18]. Nişasta hidroliz reaksiyonları şu şekildedir (Wiseman, 1987; [19]):



Tatlandırıcıları sadece şeker pancarı veya şeker kamışından değil, nişasta içeren bitkilerden üretmekte mümkündür. Ayrıca; glikoz, şeker pancarı veya şeker kamışından elde edilen şekere göre çok daha ucuzdur (Wood ve Pickering, 1982).

5.2.1 Nişasta hidrolizinin aşamaları

Nişasta hidrolizinde 3 aşama bulunmaktadır (Uludağ (Bozkurt), 2000; Pye ve Wingard, 1973; [18, 25]):

- **Jelatinleşme:** Nişasta granülleri su ile karıştırılıp ısıtıldığı zaman, hidrojen bağları zayıflar, su absorplanır ve nişasta granülleri şişer. Ortamın yüksek viskozitesi sebebiyle bu proses jelatinleşme olarak adlandırılır. Jelatinleşmede kristal bölgeler erir, moleküller geri dönüşümlü olarak şişer. Jelatinleşme sıcaklığı nişasta kaynağına göre değişmekle beraber genellikle nişastalarda jelatinleşmenin başladığı sıcaklık 50-68°C, tamamlanmaya başladığı sıcaklık 64-78°C arasındadır. Bazı nişastalarda bu sıcaklık 100°C'nin üstüne çıkmaktadır .

- **Sıvılaştırma:** Jelatinleşmiş nişastanın viskozitesi yüksek olduğundan, viskozite düşürücü madde kullanılması gerekir. Bu madde nişastayı kısmen hidrolizler. Çözeltilinin viskozitesi düşürüldüğünden proses sıvılaştırma olarak adlandırılır. Genellikle viskozite düşürücü madde olarak asit kullanılır. Ancak, istenmeyen ürün vb. oluşturması nedeniyle enzimler daha fazla kullanılmaya başlanmıştır.
- **Tatlandırma:** Glikoz ve maltozun oluşmasını sağlayan ileri hidroliz aşamasıdır.

5.2.2 Nişasta hidrolizinin prosesleri

Nişasta hidrolizlenmesinde 3 tür proses kullanılmaktadır:

1) Nişastanın asit prosesi ile hidrolizlenmesi

Glikoz şurupları ilk kez 1811 yılında Alman kimyacı Kirchoff'un nişastayı seyreltik asitle kaynatarak tatlı bir şeker şurubu elde etmesiyle ortaya çıkmıştır [26]. Ticari olarak geliştirilmiş iki çeşit asit hidroliz prosesi bulunmaktadır. Bunlar; derişik asit hidroliz prosesi (DAHP) ve seyreltik asit hidroliz prosesi (SAHP)'dir. DAHP yönteminde işlem, yüksek asit konsantrasyonu (1M HCl'den daha derişik) ve düşük sıcaklıkta (70°C'den düşük) gerçekleştirilir ve reaksiyon uzun sürede tamamlanır. DAHP yönteminde başlıca problemler, asidin ayrılması ve nötralizasyonudur. SAHP yönteminde ise işlem, birkaç dakika içerisinde yüksek sıcaklıkta (150-200°C) ve seyreltik asit (%3'den düşük) konsantrasyonunda gerçekleştirilir (Choi ve Kim, 1994).

Asit ile hidroliz yönteminin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar; istenmeyen yan ürünlerin oluşumu, yüksek sıcaklık, korozyona dayanıklı araç gereçlerin bulunması, ısıtma için daha fazla enerji gerektirmesi ve kontrol edilme zorluklarıdır. Yeni enzimler bulunmaya başlandıktan sonra, hidroliz proseslerinde enzimler kullanılmaya başlanmıştır [9, 25].

2) Nişastanın asit-enzim prosesi ile hidrolizlenmesi

Nişasta önce asit ile hidroliz edilir daha sonra pH yükseltilir (pH=4-6) ve sıcaklık 60-70°C civarına getirilir. Enzimatik hidroliz ile glikoz şurubu elde edilir. Bu prosesde genellikle glikoamilaz enzimi kullanılır. Çünkü, glikoamilaz polimerin indirgen olmayan uçlarından α -1,4 bağlarını hidroliz ederek glikoz molekülünü koparır ve aynı zamanda α -1,6 bağlarını da hidroliz edebilir (Uludağ (Bozkurt),2000; [26]).

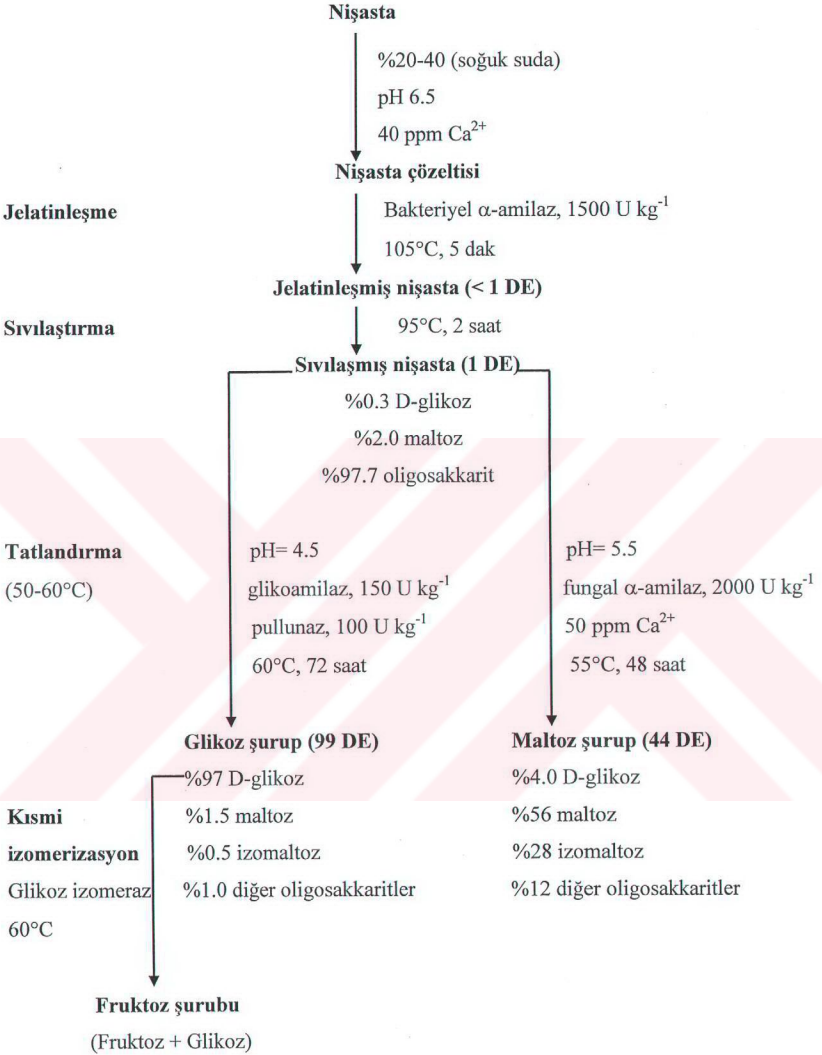
3) Nişastanın enzimatik olarak hidrolizlenmesi

1938 yılında glikoz şurubunun üretiminde ilk kez ticari enzim (fungal amilaz) kullanılarak, tatlı şuruplar elde edilmiştir [9]. Enzimatik hidrolizlenme 3 aşama ile gerçekleştirilmektedir.

Birinci aşamada, nişasta taneleri suda bulamaç haline getirilerek nişasta çözeltisi elde edilir. Bu çözelti, ısıtıldığında jelatinleşir.

Sıvılaştırma olarak adlandırılan ikinci aşamada; %20-40 nişasta içeren sulu süspansiyon pH=6-6.5 civarına getirilir. Nişasta çözeltisi 100°C'nin üzerine ısıtılır ve ısıya dayanıklı bakteriyel amilaz (Örn. *Bacillus licheniformis*) ile işleme tabi tutulur. Bu enzim nişastadaki birkaç glikozidik bağı hidrolizleyerek dekstrin üretir ve çözelti viskozitesini düşürür. Tatlandırma olarak adlandırılan üçüncü aşamada dekstrin parçalanır. Bu aşamada fungal α -amilaz kullanılarak dekstrin maltoza, amiloglikoz enzimi kullanılarak maltoz serbest glikoza dönüştürülür. Prosesin bu kısmı 50-60°C arasında gerçekleştirilir. Nişasta parçalanmasında son ürün olan glikozu daha tatlı olan fruktoza dönüştürülmesi işlemi izomerizasyon olarak adlandırılır. Bu proses tatlandırma işleminden sonra 60°C'de glikoz izomeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir.

Fruktoz şurupları, genellikle %42-55 fruktoz içerir ve mısır nişastasının glikozu kullanılarak elde edilir. Enzim yöntemiyle gerçekleştirilen hidroliz işlemi, asit yöntemiyle yapılan hidrolize göre daha iyi sonuç alınmaktadır. Dönüşüm yüzdesi enzim yönteminde daha yüksektir. Nişastanın enzimatik hidrolizlenmesi şematik olarak Şekil 5.3'de verilmiştir (Delphine vd., 1999; Wood ve Pickering, 1982; Uludağ (Bozkurt), 2000; [25, 26]).



şekil 5.3 Nişasta hidrolizlenmesi (Delphine vd., 1999; Wood ve Pickering, 1982; Kılıç, 2002;

[25])

6. ULTRASONİK ORTAMDA NIŞASTA HİDROLİZİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Endüstride kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi birçok araştırmacının ilgisini çeken bir konu olmuştur. Yapılan literatür araştırması sonucunda nişastanın ultrasonik ortamda asidik ve enzimatik yöntemle hidrolizi ile ilgili bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Losev vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada; ultrasonikasyon ve mekanik gerilim uygulanarak, jelatinleşmiş mısır nişastasının asit ile hidrolizi incelenmiştir. Kayma gerilimi bir döner aktivatör kullanılarak sağlanmıştır. Çalışmada incelenen parametreler; sıcaklık (20-70°C), mısır nişastası konsantrasyonu (%2-8 (ağırlık/ağırlık)), sülfirik asit konsantrasyonu (0.03-0.15 M), mekanik gücün uygulanma süresi (10-90 s), döner aktivatörün devir hızı (1000-5000 rpm) ve kesme deformasyon hızı gradyanı ($0.5-17.4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$) dir. Çalışmada, ultrasonik frekans 22 kHz ve akustik enerji yoğunluğu 1.34 W/cm^2 değerlerinde sabit tutulmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmada, jelatinleşmiş nişastanın asit yöntemiyle hidrolizlenmesi üç metotla gerçekleştirilmiştir: - Normal karıştırılmalı sıcaklık kontrollü reaktör, - Ultrasonikasyon uygulamalı sıcaklık kontrollü reaktör, - Sıcaklık kontrollü döner aktivatör (kayma gerilimi ve ultrasonikasyon kombine olarak uygulanmıştır). Nişasta hidroliz hızı; indirgeyici grupların birikim verilerinden belirlenir. Aynı miktarda asit konsantrasyonu ve sıcaklık değerinde, mekanik kayma gerilimi uygulaması indirgeyici grupların birikimini hızlandırdığı görülmüştür. Aynı miktarda indirgeyici grup konsantrasyonuna; normal karıştırılmalı yöntemde daha uzun, ultrasonik uygulamada daha kısa ve döner aktivatör yönteminde en kısa sürede ulaşıldığı saptanmıştır. Asit eklenilmeksizin mekanik çalışma (ultrasonikasyon veya mekanik gerilim) uygulandığında indirgeyici grup konsantrasyonunda artış görülmediği ve dolayısıyla da kaviteasyonun deneysel şartlarda önemli ölçüde indirgeyici grup üretmediği belirtilmiştir.

Normal şartlarda (mekanik kesme işlemi olmaksızın) nişastanın asit ile hidrolizlenme hızı, orantılı olarak asit konsantrasyonuna bağlı olduğu; fakat, nişasta konsantrasyonuna bağlı olmadığı bulunmuştur. Ultrasonik ve döner aktivatör uygulamalarında indirgeyici grup birikme hızı, asit konsantrasyonunun lineer bir fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir. Normal şartlarda, hidroliz hızı nişasta konsantrasyonuna bağlı değildir. Fakat, ultrasonikasyon ve döner aktivatör uygulamalarında nişasta konsantrasyonunun artmasıyla reaksiyon hızında azalma gözlemlenmiştir. Nişasta hidrojellerinin mekanik aktivasyon işleminden sonra hidroliz hızı, nişasta konsantrasyonunun artmasıyla azalmaktadır. Reaksiyonun hızlanma derecesinin

mekanik ön çalışma güç yoğunluğu ve süresine bağlı olup olmadığı kesin olarak belirlenememiştir. Mekanik şartlar uygulanmadan (normal şartlarda) jelatinleşmiş nişastada, 20°C ve asitli ortamda hidrolizlenme gözlenmemiştir. Fakat, 60°C'de aynı asit konsantrasyonunda hidroliz hızında değişiklikler gözlenmiştir. Nişastanın asit hidroliz hızına sıcaklığın etkisi, yüksek yoğunlukta mekanik çalışma (mekanik gerilim ve ultrasonikasyon) uygulandığında belirsizdir. Örneğin; 20-45°C'de sıcaklıktan bağımsızken 60°C'de proses hızlanmaktadır. Devir hızı yüksek olduğunda, sıcaklık etkisinin daha az olduğu gözlenmiştir.

Ultrasonikasyon işleminin uygulanması ile sonokimyasal ürün ve mekanik gerilimin uygulanması ile mekanokimyasal ürün elde edilmektedir. Döner aktivatör ve ultrasonikasyon uygulamalarında nişastanın asit hidrolizi sırasında elde edilen indirgeyici grupların sonokimyasal ürünleri 0.07-0.10 ve mekanokimyasal ürün (döner aktivatör) 0.034-0.152 indirgeyici grup/100 eV'dur. Yoğun mekanik etkiler (mekanik gerilim ve ultrasonikasyon) uygulandığında, nişastanın asit hidroliz hızının yaklaşık 3 kat arttığı saptanmıştır. Hidroliz reaksiyon hızının artırılması için uygulanan ultrasonikasyon işleminin, diğer bir yöntem olan kayma gerilimi işleminden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Devir hızının artmasıyla döner aktivatörde ultrasonik titreşimlerin frekansının arttığı ve bu artıştan dolayı sonokimyasal reaksiyonların hızının azaldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, güçlü mekanik etkiler altında (ultrasonik + döner aktivatör) jelatinleşmiş nişastanın asit hidroliz hızının genellikle akustik kaviteasyon, asit konsantrasyonu ve sıcaklıkla arttığı saptanmıştır.

Barton vd. (1996) tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmada; ultrasonik banyo kullanılarak patates nişastası ve glikojenin α -amilaz ve amiloglikosidaz enzimleri, sukrozun invertaz enzimi ile hidrolizinde, ultrasonikasyonun enzim aktivitelerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada, ultrasonikasyonun uygulandığı ve uygulanmadığı sürelerdeki reaksiyon hızları karşılaştırılmıştır. Parametreler; ultrasonik güç yoğunluğu (1-2 W/cm²), *Bacillus spp.* kaynaklı α -amilaz konsantrasyonu (1.0 g/L), *Rhizopus spp.* kaynaklı glikoamilaz konsantrasyonu (%0.1 (v/v)), invertaz konsantrasyonu (%0.1 (v/v)), substrat konsantrasyonları (patates nişastası (%1-5(w/v), glikojen (%5-10 (w/v), sukroz (0.18 M)), akustik güç (60 W), karıştırıcı hızı (100 rpm), sıcaklık (40°C)'dir.

Yapılan bu çalışmada, sukroz ve patates nişastasının hidroliz hızlarının, ultrasonikasyon kullanımı ile arttığı saptanmıştır. Fakat; glikojenin hidroliz hızının ultrasonikasyon kullanımı ile değişmediği görülmüştür. Ayrıca; yüksek nişasta ve sukroz konsantrasyonunda, reaksiyon hızı arttığı gözlemlenmiştir. Ancak; 1 M sukroz konsantrasyonunda reaksiyon

maksimum hıza ulaşıırken, 1.5 M sukrozda reaksiyon hızında azalma göstermekte ve 1.5 M'dan sonra tekrar reaksiyon hızı artmaktadır. Bunun yanısıra, glikojenin hidroliz hızı, substrat konsantrasyonunun artmasıyla artarken, 130 g/L glikojen konsantrasyonunda hız maksimum olup, bu değerden sonra reaksiyon hızının azaldığı gözlenmiştir. Yüksek substrat konsantrasyonunda, sukroz hidroliz reaksiyonunun (substrat/ürün) inhibisyonunda azalma saptanmıştır.

Choi ve Kim (1994) tarafından yapılan çalışmada; sülfürik asit katalizörlüğünde gerçekleştirilen nişasta hidrolizine (mısır nişastası) ultrasonik dalgalarının etkisi incelenmiş ve maltozun hidroliz reaksiyonu model olarak seçilmiştir. Maltoz reaksiyon modeli; maltozun asit hidrolizinin, sırasıyla maltoz konsantrasyonu ve hidrojen iyon (H^+) konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmada asit hidroliziyle nişastadan mayalanabilir şeker üretimi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada; deneyler 90-100° C sıcaklık aralığında ve seyreltik (%1-5 (ağırlıkça)) sülfürik asit ortamında gerçekleştirilmiş ve hidroliz için ultrasonik jeneratör (25 kHz, 600 W) kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen çalışmada, ultrasonikasyon ile reaksiyon hızının arttığı, düşük sıcaklık ve seyreltik asit durumunda daha iyi hidrolizlenme gerçekleştiği saptanmıştır. Sıcaklığın etkisi baz alınarak yapılan hidroliz işleminde max. glikoz üretimi %63 civarındadır ve bu durum %0.3 - 0.5 asit konsantrasyonu ve 160°C'de olmaktadır. Yarı ticari asit hidroliz reaksiyonları genellikle 200°C'de en az %0.3 asit konsantrasyonu ve 30-60 bar basınçta gerçekleştirilirken, ultrasonikasyon ile daha düşük sıcaklıkta (90-100°C) ve daha yüksek verimde (%81) hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. Ultrasonikasyonun kullanıldığı ve kullanılmadığı her iki durumda da hidroliz işlemi sonucunda; glikoz ile birlikte, maltoz ve maltotrioz üretilmektedir. Fakat ultrasonikasyon işlemi; max. maltoz ve maltotrioz üretim süresini 42 dakikadan 38 dakikaya düşürmekte ve reaksiyon hızını artırmaktadır. Yapılan çalışmada, glikoz oluşumundaki relatif artış oranının sıcaklığa bağlı olduğu saptanmış ve 90°C için bu oran yaklaşık %75 bulunmuştur. Relatif artış oranı, sıcaklık arttıkça düşmektedir. 100°C'de relatif artış oranının %22.1 olduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, aktivasyon enerjisi maltoz kontrol reaksiyonlarında 30.2, ultrasonikasyon destekli asit hidroliz reaksiyonlarında 23.4 kcal/mol olarak bulunmuştur. Reaksiyon hızındaki artış, ultrasonik dalgalarla oluşan reaksiyonun aktivasyon enerjisindeki azalma ile açıklanmış; ayrıca ultrasonikasyon destekli reaksiyonlarda aktivasyon enerjisindeki azalmanın, lokal sıcaklığın aşırı derecede artışı ve kavitasyon kabarcıklarının sönmesiyle oluşan basınç ile açıklanabileceği belirtilmiştir.

7. MATERYAL VE YÖNTEM

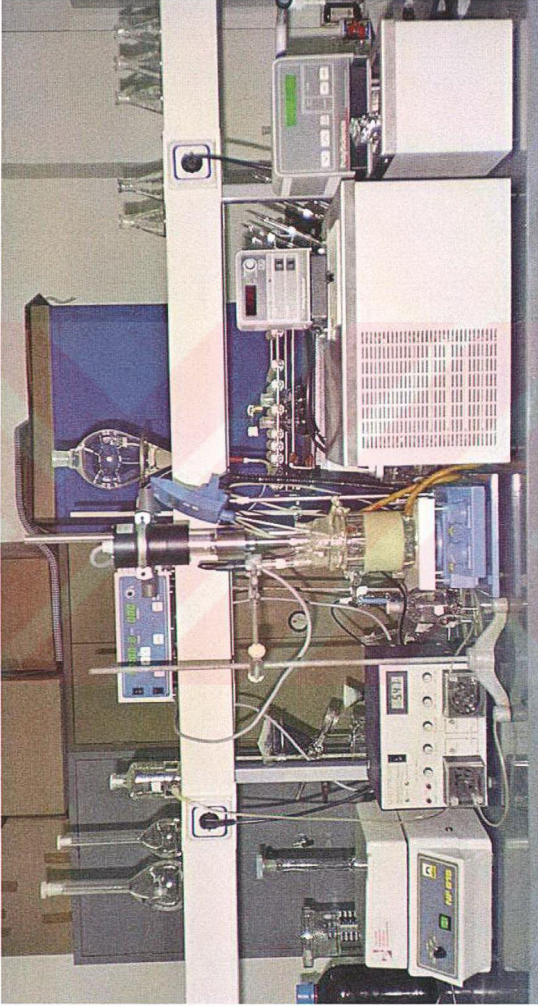
7.1 Kullanılan Materyaller

- α -Amilaz enzimleri (*Bacillus species* ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı)
- Buğday nişastası
- Kimyasal maddeler (%0.5 ve %15'lik I₂ , %0.5 ve %5'lik KI, 5 M HCl, ve 50 mM CH₃COONa)
- Saf su

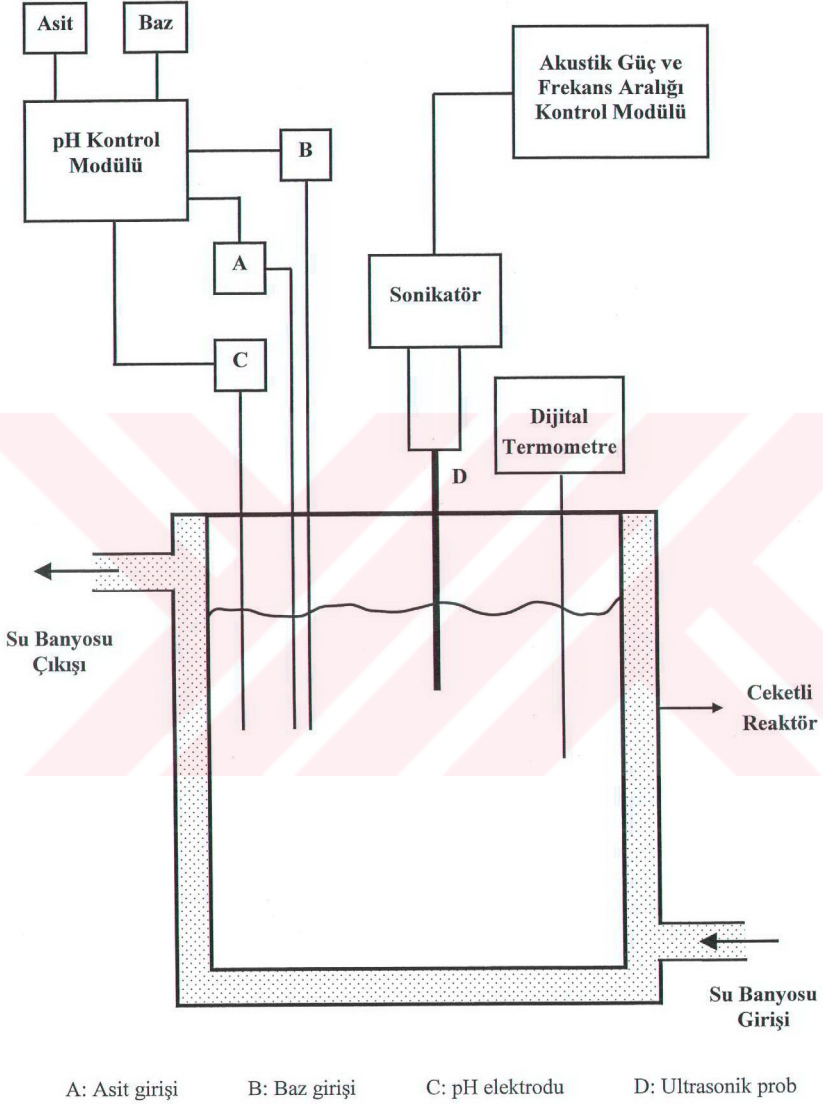
Buğday nişastasının hidroliz işleminde kullanılan *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi (ürün kodu: A6814) toz preparat halinde ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi (Ürün kodu: A3403) sıvı halde Sigma firmasından sağlanmış; çalışmalar süresince *Bacillus species* kaynaklı enzim derin dondurucuda ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı enzim ise buzdolabında saklanmıştır. Aktivite tayininde kullanılan çözünür nişasta (Extra pure soluble starch, ürün no: 101253), hidroliz işlemi için kullanılan buğday nişastası (ürün no: 111685) Merck firmasından sağlanmış olup laboratuvar şartlarında saklanmıştır. Deneyler sırasında çözeltinin pH'ı 0.1 M KOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır.

7.2 Kullanılan Cihazlar

Ultrasonik deneyler, 20 kHz'de Bandelin Sonopuls HD 2200 sonikatör sisteminde 6 mm çapında KE 76 (Kod no: 530) titanyum uç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon çözeltisinin pH ve sıcaklık değerleri, Sanyo Gallenkamp marka (FER-195-010 model) pH kontrol modülü ve PolyScience marka (9005 model) sıcaklık kontrollü su banyosu ile kontrol edilmiştir. Reaktörün iç sıcaklığı (IKA Labortechnik, ETS-D4 fuzzy) marka dijital termometre ile reaksiyon süresi boyunca ölçülmüştür. Reaktörden alınan reaksiyon çözeltisindeki enzim ve nişastayı ayırmak için (Nüve NF 615) marka santrifüj cihazı kullanılmıştır. Ayrıca, enzim aktivite tayini için 40°C'ye ayarlanmış bir su banyosu ve örneklerin absorbans değerlerini okumak için Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınlı Spektrofotometre kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan deney düzeneğinin genel görünüşü Şekil 7.1'de, şeması ise Şekil 7.2'de verilmiştir.



Şekil 7.1 Deneý düzeneginin genel görünüŖü



Şekil 7.2 Reaktör ve kontrol modüllerinin şeması

7.2.1 Reaktör

Deneylerde kullanılan çift cidarlı cam reaktör; 400 ml hacminde, cam kapaklı, düz tabanlı, silindirik, 8 cm çapında ve 10 cm yüksekliğinde bir reaktördür. Reaktörün kapağı üzerinde problemlerin yerleştirilmesi ve gerekli ilavelerin yapılmasına olanak tanıyan girişler (6 adet) bulunmaktadır.

7.2.2 Kontrol modülleri

DeneySEL çalışmalar sırasında pH'ın kontrolünü sağlayan kontrol modülü, sonikasyon kontrol modülü ve sıcaklığın kontrolünü sağlayan su banyosunun özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

• pH kontrol modülü:

pH : 0-14 pH

Doğruluk : ± 0.1 pH

Elektrolit : AgCl ile doyurulmuş 4 M KCl

pH modülünün kalibrasyonu, pH 4, pH 7 ve pH 10 tampon çözeltileri kullanılarak sağlanmıştır.

• Akustik güç ve frekans aralığı kontrol modülü:

Çalışma frekansı : 20 kHz

Akustik güç : max. 200 W

Frekans aralığı : %10 - %90

• Su banyosu

Sıcaklık aralığı : (-20) - 150°C

Doğruluk : ± 0.05 °C

Pompalama hızı : 7 veya 15 (L/dak)

Kapasite : 6 L

Çift cidarlı cam reaktörün su banyosuna bağlanmasıyla sıcaklık kontrolü sağlanmıştır.

7.3 Deneyin Yapılışı

%1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 250 ml saf su, reaksiyonun gerçekleştirildiği biyoreaktörde istenilen sıcaklık ve pH'a getirildikten sonra, 0.35 g *Bacillus species* (90000 U/L veya 0.885 ml *Bacillus licheniformis* (90000 U/L) kaynaklı enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır (Kılıç, 2002). İşleme başlamadan önce ve 30 dakikalık işlem süresi sonunda, çözeltilen örnekler alınarak, enzim aktivitesi ve ortamda kalan nişasta miktarının tayini için hazırlanmıştır. Örneklerin analizleri 5'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır.

7.4 Analiz Yöntemleri

7.4.1 Enzim aktivite tayini

α -Amilaz aktivite tayini için 200'ün üzerinde metod geliştirilmiş olup (Oltulu vd., 1999), her metod için farklı bir aktivite birimi tanımlanmıştır (Yoo vd., 1987). Bu çalışmada, α -amilaz aktivite tayini De Moraes vd. (1995) tarafından belirtilen yöntemle yapılmıştır. Substrat olan 0.2 g çözünebilir nişasta 100 ml'lik 50 mM sodyum asetat tampon çözeltisinde (pH= 5.9) kaynatılarak çözdürüldükten sonra 40°C'ye soğutulmuş ve sıcaklığı bu derecede sabit tutulmuştur. Reaktörden alınan reaksiyon çözeltisine santrifüj işlemi uygulandıktan sonra elde edilen çözeltilen 200 μ l'lik örnekler deney tüplerine alınmış ve bu örnekler daha önce hazırlanan substrat çözeltisinden 1 ml ilave edilmiştir. Ayrıca kontrol çözeltisi olarak kullanılan 200 μ l saf su üzerinde aynı miktarda substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra bu örnekler 40°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu sırada 1 ml iyot çözeltisi (%0.5 I₂ ve %5 KI) içeren İyot stok çözeltisi, 5 ml 5M HCl ilave edilerek 500 ml'e saf su ile tamamlanmıştır. 10 dakika sonunda su banyosundan çıkarılan 200 μ l'lik örneklerin üzerine 5 ml İyot stok çözeltisi ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini için elde edilen bu son karışımın absorbans değerleri, 620 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunmuştur. Referans çözeltisi olarak 200 μ l saf su ve 5 ml İyot stok çözeltisi kullanılmıştır. 1 ünite α -amilaz aktivitesi, 10 dakikada 40°C'de 2 mg nişastanın 0.1 mg'ını parçalamak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (De Moraes vd., 1995; Savaş, 1998; Saygılı, 1999).

7.4.2 Nişasta konsantrasyonu tayini

Reaksiyon sonunda ortamda kalan nişasta miktarının tayini için, reaktörden alınan 0.5 ml'lik reaksiyon çözeltisi örneklerine NaOH ilavesi ile reaksiyon durdurulmuş ve enzimin inaktive edilmesi için örnekler 100°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 5 ml iyot çözeltisi (%15 I₂ ve %0.5 KI) ilave edilerek son hacim 15 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Çözeltideki nişasta konsantrasyonu tayini için kullanılan bu son karışımın absorpsiyon değeri, 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunmuş ve referans çözeltisi olarak 10 ml saf su ve 5 ml iyot çözeltisi kullanılmıştır (Astolfi-Filho vd., 1986; Birol, 1997).

7.5 Hesaplamalar

7.5.1 Enzim aktivitesinin hesaplanması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki bağıntılar kullanılmıştır:

$$[A_0] = (1 - C_{a0} / C_{ak}) \quad (7.1)$$

$$[A_1] = (1 - C_{a1} / C_{ak}) \quad (7.2)$$

$$[A] = 100 * [A_1] / [A_0] \quad (7.3)$$

Burada;

C_{a0} : t=0 anındaki çözünür nişastanın absorpsiyon değeri

C_{a1} : İşlem sonunda (örneklerin 40°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilme işlemi) çözünür nişastanın absorpsiyon değeri

C_{ak} : Kontrol çözeltisindeki çözünür nişastanın absorpsiyon değeri

$[A_0]$: t=0 anındaki enzimin aktivitesi

$[A_1]$: İşlem sonu enzim aktivitesi

$[A]$: İşlem sonu % enzim aktivitesi

olarak tanımlanmıştır.

7.5.2 Nişasta konsantrasyonunun hesaplanması

Nişasta konsantrasyonu tayinlerinde ise aşağıdaki bağıntılar kullanılmıştır:

$$[S_1] = (C_{s1} / C_{s0}) * [S_0] \quad (7.4)$$

$$[H] = 100 * (1 - C_{s1} / C_{s0}) \quad (7.5)$$

Burada;

C_{s0} : t=0 anındaki nişastanın absorbans değeri

C_{s1} : İşlem sonunda ortamda kalan nişastanın absorbans değeri

$[S_0]$: t=0 anındaki nişasta konsantrasyonu, g/L

$[S_1]$: İşlem sonunda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu, g/L

H : % Hidroliz derecesi

olarak tanımlanmıştır.

8. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada; *Bacillus species* ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak buğday nişastası hidrolizinde ultrasonikasyon parametreleri (akustik güç ve frekans aralığı) ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Deneysel çalışmada, reaksiyon sonunda çözeltideki α -amilaz aktivitesi Bölüm 7.4.1'de ve ortamda kalan nişasta konsantrasyonu Bölüm 7.4.2'de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir.

8.1 *Bacillus species* Kaynaklı α -Amilaz Enzimi ile Yapılan Deneyler

8.1.1 40°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

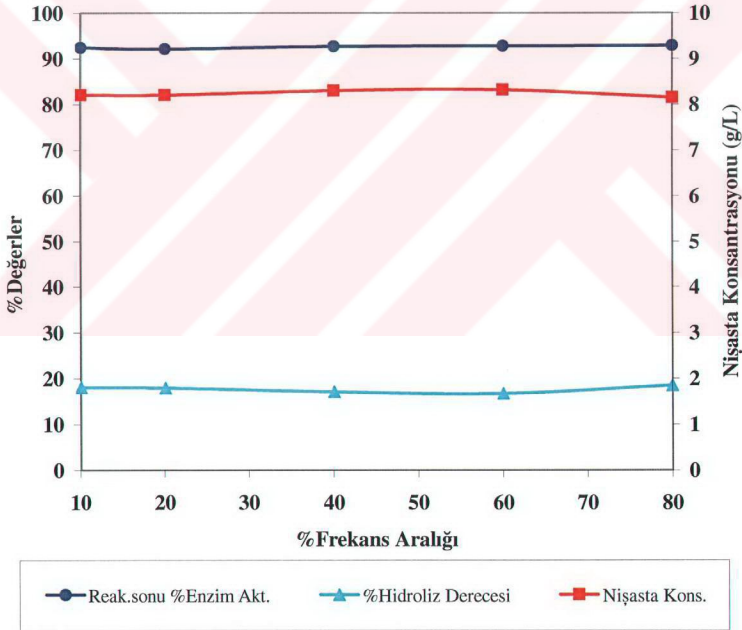
Sıcaklık artışının reaksiyon hızını arttırdığı ancak enzimlerde yapısal olarak bozunmalara neden olduğu bilinmektedir. Sonikasyon yüksek sıcaklık gerektirmeyen bir prosestir. Ayrıca, pH 6.5'da enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gözlenmiştir (Yüceer, 2000). Bu nedenle hidroliz reaksiyonu 40°C sıcaklıkta ve pH 6.5'da gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik enerjinin enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için, %10-80 frekans aralığında ve 20 W'lık akustik güçte sonikasyon işlemi uygulanarak, %1 (ağırlık/hacim) buğday nişastası içeren 250 ml'lik reaksiyon çözeltisi, 0.35 g enzim (*Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi) ilavesi ile 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonunda çözeltideki α -amilaz aktivitesi ve ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerleri Çizelge 8.1'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.1'de sunulmuştur.

Şekil 8.1'den görüldüğü gibi, 20 W akustik güç ve 40°C sıcaklıkta gerçekleştirilen deneylerde, frekans aralığının %10'dan %80'e artırılması ile nişasta hidrolizi ve enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Belirtilen frekans aralığı boyunca, nişasta hidrolizi yaklaşık %18 değerinde, reaksiyon sonu enzim aktivitesi yaklaşık %93 değerinde sabit kalmıştır. Kullanılan enzim tüm frekans aralığı değerlerinde yaklaşık %7 oranında inaktive olmuştur.

Çizelge 8.1 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	92.44	18.02	8.20
20	92.18	17.98	8.20
40	92.73	17.12	8.30
60	92.81	16.76	8.32
80	92.89	18.49	8.15



Şekil 8.1 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W)

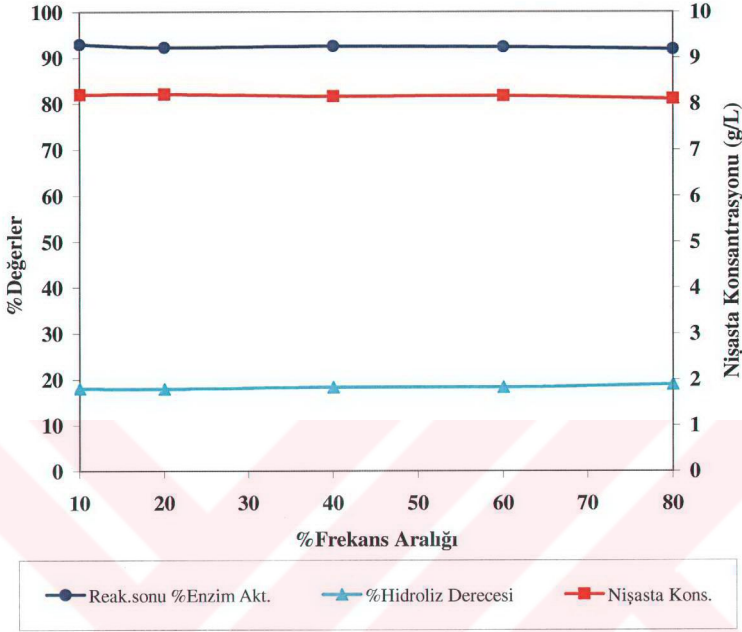
8.1.2 40°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Akustik gücün enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için; Bölüm 8.1.1'de 20 W'lık akustik güçte gerçekleştirilen deneylere karşılık; 100 W'lık akustik güçte aynı proses şartlarında deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Çizelge 8.2'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.2'de sunulmuştur.

Bölüm 8.1.1'de olduğu gibi bu çalışmada da, frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla enzim aktivitesinde (yaklaşık %92'de sabit) ve nişasta hidroliz derecesi değerlerinde (yaklaşık %18'de sabit) önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Akustik gücün 100 W'a artırılması ile daha etkili bir hidroliz sağlanamamış ancak enzimin stabilitesini aynı değerlerde koruduğu saptanmıştır (yaklaşık %92). Bunun yanısıra, belirtilen frekans aralığı değerlerinde enzimin yaklaşık %8 oranında inaktive olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 8.2 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	92.90	18.05	8.19
20	92.22	17.96	8.20
40	92.53	18.33	8.16
60	92.30	18.34	8.17
80	91.85	19.01	8.10



Şekil 8.2 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W)

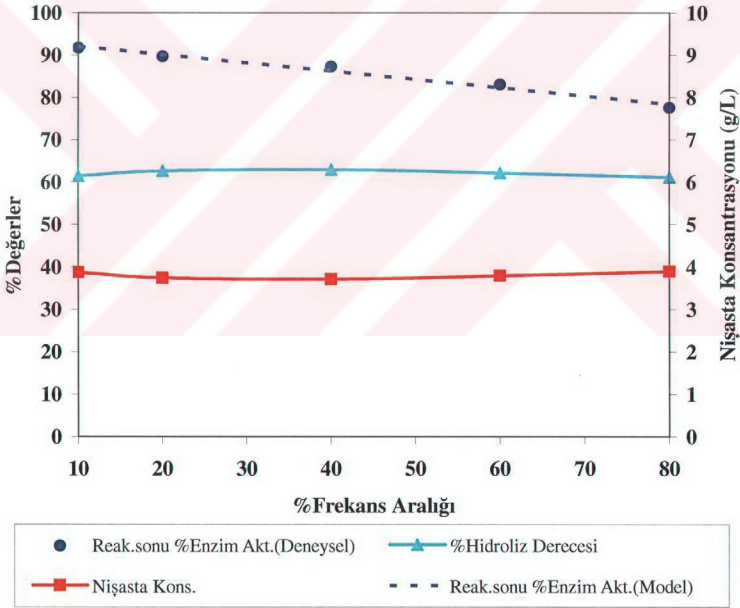
8.1.3 50°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Sonikasyon parametreleri ile birlikte sıcaklığın da enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek amacıyla, ultrasonikasyon deneyleri 50°C'de, %10-80 frekans aralığında ve 20 W'lık akustik güçte diğer proses şartları sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda çözeltideki α -amilaz aktivitesi ve ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerleri Çizelge 8.3'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.3'de sunulmuştur.

Çizelge 8.3 ve Şekil 8.3'den görüldüğü gibi, 50°C'de 20 W'lık akustik güçte, frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla hidroliz derecesi değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (yaklaşık %62 değerinde sabit). Ancak, belirtilen frekans aralığı boyunca, enzim aktivitesi %92'den %77'ye (yaklaşık %16) azalmıştır. Kullanılan enzim %10 frekans aralığı için yaklaşık %8 ve %80 frekans aralığı için yaklaşık %23 oranında inaktive olmuştur.

Çizelge 8.3 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	91.77	61.42	3.86
20	89.74	62.69	3.73
40	87.25	63.00	3.70
60	83.02	62.18	3.78
80	77.59	61.12	3.89



Şekil 8.3 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W)

Deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, frekans aralığı ile *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enziminin aktivitesi arasındaki değişimin sıfıncı mertebe inaktivasyon modeline uyduğu bulunmuştur (denklem 8.1).

$$[A] = [A_{\max}] - k_D (FA) \quad (8.1)$$

FA: Frekans aralığı

k_D : Frekans aralığına bağlı sıfıncı mertebe inaktivasyon katsayısı

$[A_{\max}]$: Reaksiyon öncesi % enzim aktivitesi değeri

Eşitlik 8.1'deki, $[A_{\max}]$ ve k_D katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

k_D : 0.1959

$[A_{\max}]$: 94.1029

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda modele ait standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 0.9058 ve 0.9903 olarak bulunmuştur.

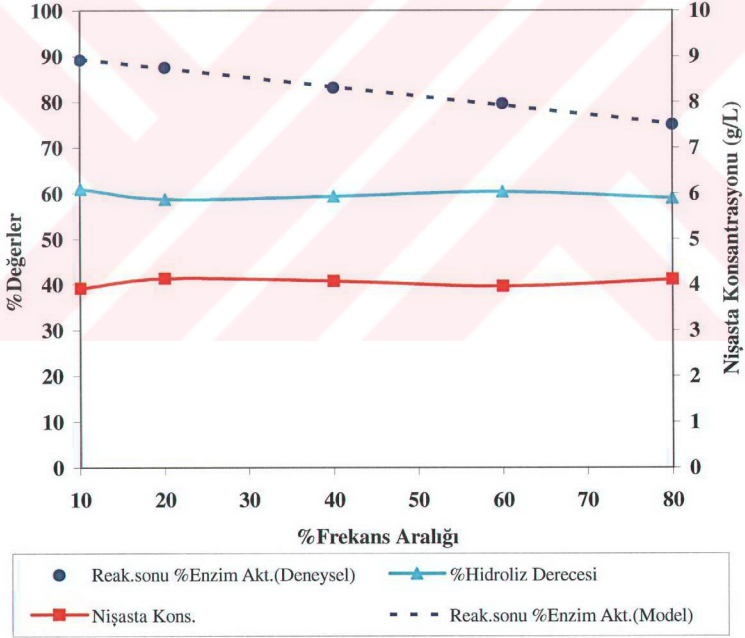
8.1.4 50°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Akustik gücün ve sıcaklığın enzim aktivitesi ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için, Bölüm 8.1.3'de gerçekleştirilen deneyler aynı proses şartlarında ($T= 50^\circ\text{C}$, pH 6.5, enzim konsantrasyonu= 0.35 g/250 ml, nişasta konsantrasyonu= %1) 100 W'lık akustik güç için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen reaksiyon sonu enzim aktivite değerleri ve hidroliz dereceleri Çizelge 8.4'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.4'de sunulmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, 50°C'de 100 W'lık akustik güçte frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla hidrolizlenme derecesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (yaklaşık %60 değerinde sabit). Ancak, belirtilen frekans aralığı için enzim aktivitesi yaklaşık %89'den %75'e (yaklaşık %16) azalmıştır. Kullanılan enzim %10 frekans aralığı için yaklaşık %11, %80 frekans aralığı için yaklaşık %25 oranında inaktive olmuştur.

Çizelge 8.4 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	89.17	60.90	3.91
20	87.47	58.65	4.13
40	83.08	59.27	4.07
60	79.64	60.38	3.96
80	75.04	58.91	4.11



Şekil 8.4 *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W)

Deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, frekans aralığı ile *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enziminin aktivitesi arasındaki değişimin sıfırıncı mertebe inaktivasyon modeline uyduğu bulunmuştur (denklem 8.1).

Eşitlik 8.1'deki, $[A_{max}]$ ve k_D katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$k_D: 0.2009$$

$$[A_{max}] : 91.3171$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda modele ait standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 0.3016 ve 0.9989 olarak bulunmuştur.

8.1.5 Sonuçların değerlendirilmesi

Bacillus species kaynaklı α -amilaz enzimi ile ultrasonikasyon işlemi uygulanarak yapılan deneyler sonucunda, 20 W ve 100 W'lık akustik güç değerlerinde frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla elde edilen % hidroliz derecesi değerlerinin; 40°C sıcaklıkta gerçekleştirilen bütün deneyler için yaklaşık %18 değerinde, 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen tüm deneyler için yaklaşık %62 değerinde sabit kaldığı görülmüştür. Sıcaklığın 40°C'den 50°C'ye artırılması ile hidrolizlenme derecesi %18'den %62'ye (yaklaşık 3.4 kat) artmıştır.

Ultrasonikasyon işleminin uygulanması ile 40°C sıcaklıkta frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla reaksiyon sonu enzim aktivitesi değerleri, 20 W'lık akustik güç için %93 ve 100 W'lık akustik güç için %92 değerinde sabit kalmıştır. Kullanılan enzim 20 W'lık akustik güç için %7 ve 100 W'lık akustik güç için yaklaşık %8 oranında inaktive olmuştur.

50°C sıcaklıkta yapılan deneylerde ise belirtilen frekans aralığında elde edilen reaksiyon sonu enzim aktivitesi değerlerinin, 20 W'lık akustik güç için %92'den %77'ye (yaklaşık %16 oranında azalma) ve 100 W'lık akustik güç için %89'dan %75'e azaldığı (yaklaşık %16 oranında azalma) tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinde 20 W'lık akustik güç için %10 ve %80 frekans aralığı değerlerinde sırasıyla yaklaşık %8 ve %23 oranında; 100 W'lık akustik güç için ise %10 ve %80 frekans aralığı değerlerinde sırasıyla yaklaşık %11 ve %25 oranında azalma görülmüştür.

8.2 *Bacillus licheniformis* Kaynaklı α -Amilaz Enzimi ile Yapılan Deneyler

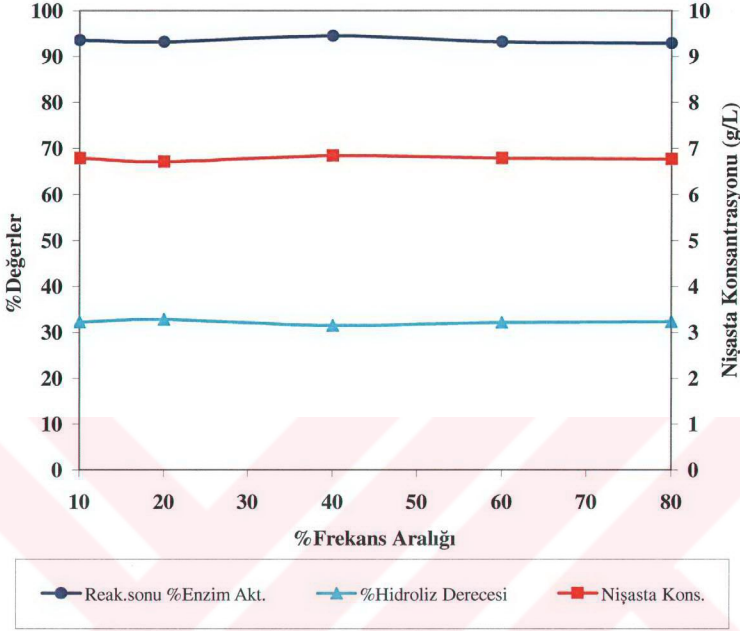
8.2.1 40°C'de 20 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Bacillus licheniformis kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak sonikasyon parametrelerinin (akustik güç ve frekans aralığı) enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek amacıyla; %10-80 frekans aralığı boyunca, %1 nişasta içeren 250 ml'lik reaksiyon çözeltisi, 0.885 ml (90000 U/l) enzim ilavesi ile 40°C'de ve pH 6.5'da 20 W'lık akustik güç uygulanarak 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Deneyler sonucunda elde edilen veriler Çizelge 8.5'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.5'de sunulmuştur.

Şekil 8.5'den de görüleceği üzere, 20 W'lık akustik güç ve 40°C'de frekans aralığı %10'dan %80'e artırılmasıyla nişasta hidrolizi ve enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (sırası ile yaklaşık %32 ve %93 değerlerinde sabit). Enzim yaklaşık %7 oranında inaktive olmuştur.

Çizelge 8.5 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	93.55	32.25	6.78
20	93.15	32.84	6.71
40	94.44	31.52	6.84
60	93.20	32.19	6.78
80	92.86	32.35	6.76



Şekil 8.5 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 20 W)

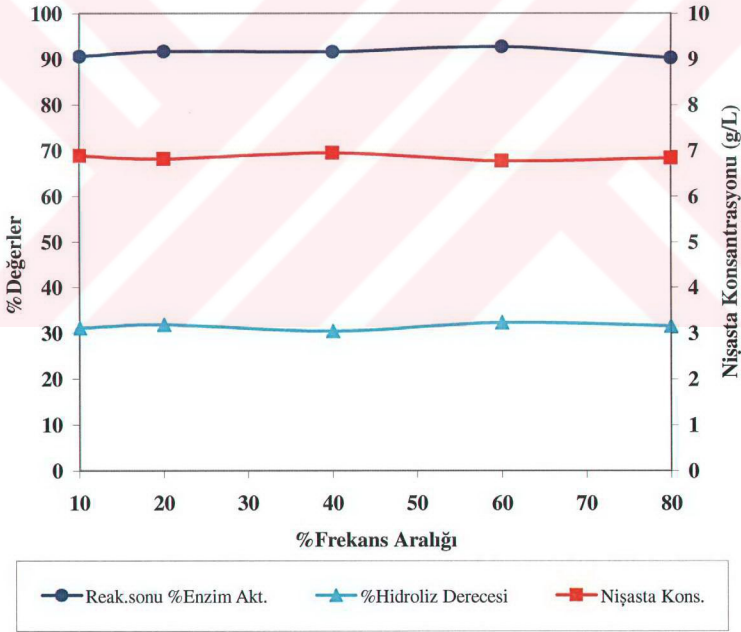
8.2.2 40°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Akustik gücün enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için; Bölüm 8.2.1'de 20 W'lık akustik güçte gerçekleştirilen deneyler 100 W'lık akustik güçte de aynı proses şartlarında gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Çizelge 8.6'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.6'de sunulmuştur.

Bu çalışmada; frekans aralığının %10'dan %80'e arttırılmasıyla enzim aktivitesinde (yaklaşık %91 değerinde sabit) ve nişasta hidroliz derecesinde (yaklaşık %32 değerinde sabit) önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Enzim aktivitesinde tüm frekans aralığı değerleri için yaklaşık %9 oranında bir azalma tespit edilmiştir.

Çizelge 8.6 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	90.58	31.18	6.88
20	91.69	31.88	6.81
40	91.57	30.52	6.94
60	92.74	32.32	6.76
80	90.29	31.66	6.83



Şekil 8.6 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 40°C, Akustik Güç= 100 W)

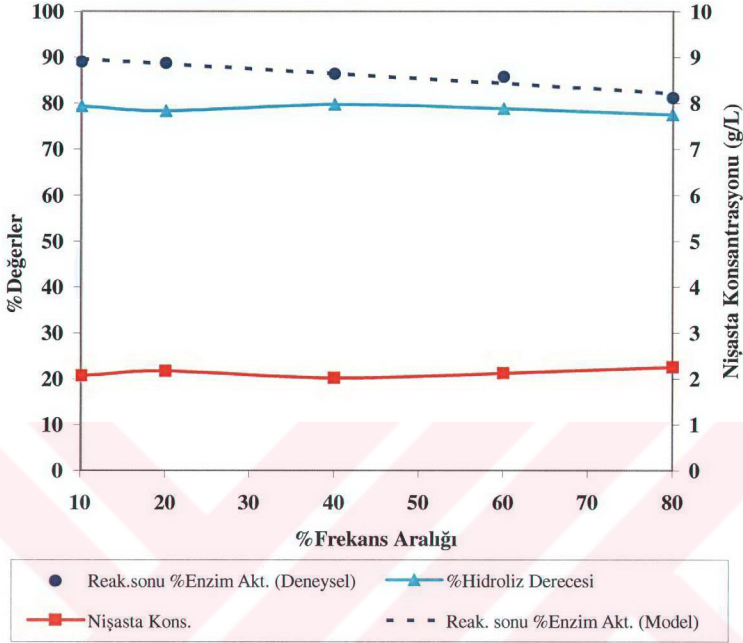
8.2.3 50°C'de 20 W'luk akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Bacillus licheniformis kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak ultrasonik enerji ile birlikte sıcaklığında enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için; %1 (ağırlık/hacim) buğday nişastası içeren 250 ml'lik reaksiyon çözeltisi, 0.885 ml enzim ilavesi ile pH 6.5 ve 50°C'de 20 W'luk akustik güç uygulanarak %10-80 frekans aralığında, 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Deneyler sonucunda elde edilen hidroliz derecesi ve reaksiyon sonu enzim aktivite değerleri Çizelge 8.7'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.7'de sunulmuştur.

Çizelge 8.7'den görüldüğü gibi, 20 W'luk akustik güç ve 50°C'de frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla hidrolizlenme derecesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Hidrolizlenme derecesi belirtilen frekans aralığı boyunca yaklaşık %79 değerinde sabit kalmıştır. Ancak, enzim aktivitesi %89'dan %81'e (yaklaşık %9) azalmıştır. Ayrıca, enzim %10 frekans aralığı için yaklaşık %11 ve %80 frekans aralığı için yaklaşık %19 oranında inaktive olmuştur.

Çizelge 8.7 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	89.01	79.28	2.07
20	88.70	78.27	2.17
40	88.26	79.73	2.02
60	85.70	78.76	2.12
80	81.08	77.42	2.25



Şekil 8.7 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi (T= 50°C, Akustik Güç= 20 W)

Deneyel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, frekans aralığı ile *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enziminin aktivitesi arasındaki değişimin sıfırıncı mertebe inaktivasyon modeline uyduğu bulunmuştur (denklem 8.1).

Eşitlik 8.1'deki, $[A_{max}]$ ve k_D katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$k_D: 0.1062$$

$$[A_{max}] : 90.6076$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda modele ait standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 1.0898 ve 0.9550 olarak bulunmuştur.

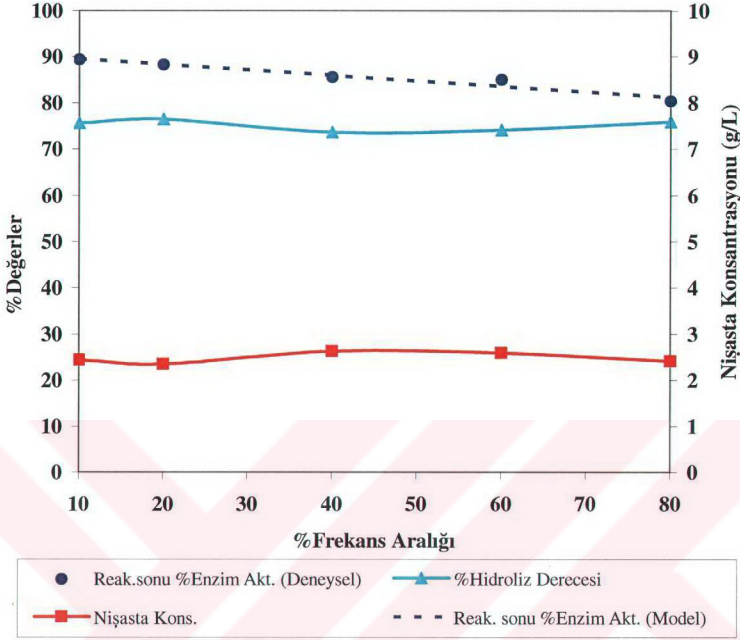
8.2.4 50°C'de 100 W'lık akustik gücün enzim aktivitesi ve hidroliz üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, 50°C'de akustik gücün hidroliz derecesine ve enzim aktivitesine etkisini incelemek amacıyla Bölüm 8.2.3'de 20 W'lık akustik güç için gerçekleştirilen deneyler aynı proses şartlarında 100 W'lık akustik güç için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 8.8'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 8.8'de sunulmuştur.

Çizelge 8.8'den de görüldüğü gibi, 100 W'lık akustik güç ve 50°C sıcaklıkta frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla enzim aktivitesi %89'dan %80'e (yaklaşık %10) azalmış, ancak hidroliz derecelerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (yaklaşık %75'de sabit). Bunun yanısıra, enzim aktivitesinde %10 frekans aralığı için yaklaşık %11 ve %80 frekans aralığı için yaklaşık %20'lik bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 8.8 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için elde edilen deneysel veriler (T= 50°C, Akustik Güç= 100 W)

Frekans Aralığı (%)	Enzim Aktivitesi (%)	Hidroliz Derecesi (%)	Nişasta Kons. (g/L)
10	89.42	75.58	2.44
20	88.24	76.47	2.35
40	87.92	73.62	2.63
60	84.97	74.10	2.59
80	80.36	75.89	2.41



Şekil 8.8 *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile hidrolizlenen nişasta için % enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun frekans aralığı ile değişimi ($T=50^{\circ}\text{C}$, Akustik Güç= 100 W)

Deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, frekans aralığı ile enzim aktivitesi arasındaki değişimin sıfırıncı mertebe inaktivasyon modeline uyduğu bulunmuştur (denklem 8.1).

Eşitlik 8.1'deki, $[A_{\max}]$ ve k_D katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$k_D: 0.1260$$

$$[A_{\max}] : 91.2758$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda modele ait standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 1.1861 ve 0.9618 olarak bulunmuştur*.

*Bölüm 8'de sunulan 50°C sıcaklıkta yapılan deneysel çalışmalara ait verilere uyan matematiksel ifadeler ve istatistiksel veriler Ek1 ve Çizelge Ek 1.1'de verilmiştir.

8.2.5 Sonuçların değerlendirilmesi

Bacillus licheniformis kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak ultrasonik ortamda yapılan hidroliz deneyleri sonucunda, 20 W ve 100 W'lık akustik güç değerlerinde frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla elde edilen hidroliz derecesi değerlerinin; 40°C sıcaklıkta gerçekleştirilen bütün deneyler için yaklaşık %32 değerinde, 50°C sıcaklık için gerçekleştirilen tüm deneylerde 20 W'lık akustik güç için yaklaşık %79 ve 100 W'lık akustik güç için yaklaşık %75 değerinde sabit kaldığı tespit edilmiştir. Sıcaklığın 40°C'den 50°C'ye artırılması ile hidrolizlenme derecesi %32'den %79'a yaklaşık 2.4 kat artmıştır.

Ultrasonikasyon işleminin uygulanması ile 40°C sıcaklıkta yapılan deneyler için frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla reaksiyon sonu enzim aktivitesi değerlerinin 20 W'lık akustik güç için %93 ve 100 W'lık akustik güç için %91 değerinde sabit kaldığı görülmüştür. Kullanılan enzim 20 W'lık akustik güç için %7 ve 100 W'lık akustik güç için yaklaşık %9 oranında inaktive olmuştur.

50°C sıcaklıkta yapılan deneylere ait reaksiyon sonu enzim aktivitesi değerlerinin, 20 W ve 100 W'lık akustik güçler ve belirtilen frekans aralığı değerleri için yaklaşık %89'dan %80'e azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, 20W ve 100 W'lık akustik güçlerde frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla enzim aktivitesinde yaklaşık %10'luk bir azalma gözlenmiştir. Enzim aktivitesinde 20 W'lık akustik güç için %10 frekans aralığında yaklaşık %11 ve %80 frekans aralığında yaklaşık %19 oranında; 100 W'lık akustik güç için ise %10 frekans aralığında yaklaşık %11, %80 frekans aralığında yaklaşık %20 oranında bir azalma görülmüştür.

9. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nişastanın enzimatik hidrolizi diğer hidroliz yöntemlerine göre, daha verimli ve maliyeti düşük olduğundan birçok endüstri dalı için büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemde kullanılan α -amilaz enzimi, çevreye ve ürünlere zarar vermediğinden sanayide önemli bir yeri vardır. Bu nedenle, kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Ayrıca, ultrasonikasyonun biyokimyasal proseslerde kullanılması, çok çeşitli reaksiyonlar için gereken kimyasal aktifleşmeyi kolay ve ucuz bir şekilde sağlamaktadır. Ultrasonikasyon, reaksiyonları hızlandırmakta, reaksiyon süresini kısaltmakta ve dönüşüm yüzdesini arttırmaktadır. Bu nedenle, enzimin katalizleyici etkisine ultrasonikasyonun katkısı ilgi çeken bir konu olmuştur.

Bu çalışmada; ultrasonikasyon uygulanan bir ortamda buğday nişastasının farklı kaynaklı α -amilaz enzimleri ile hidroliz işlemine ait proses değişkenlerinin (sıcaklık, akustik güç ve frekans aralığı) hidroliz derecesi ve enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İşlem sonu α -amilaz enziminin aktivitesi ve buğday nişastasının hidroliz derecesi ile ilgili elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile yapılan sonikasyon deneyleri sonucunda; 40°C sıcaklıkta frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla elde edilen % hidroliz derecesi değerlerinin 20 W ve 100 W'lık akustik güç için %18 değerinde sabit kalırken, % enzim aktivitesi değerlerinin 20 W'lık akustik güç için yaklaşık %93 ve 100 W'lık akustik güç için %92 değerinde sabit kaldığı saptanmıştır. Belirtilen akustik güç ve frekans aralığı değerlerinde 50°C sıcaklık için gerçekleştirilen tüm deneylerde, hidroliz derecesi değerlerinin yaklaşık %62'de sabit kaldığı ve enzim aktivitesi değerlerinin 20 W'lık akustik güç için yaklaşık %92'den %77'ye ve 100 W'lık akustik güç için %89'dan %75'e azaldığı tespit edilmiştir.
- *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak ultrasonik ortamda yapılan hidroliz deneyleri sonucunda; 40°C sıcaklıkta frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla elde edilen hidroliz derecesi değerlerinin 20 W ve 100 W'lık akustik güç için %32 değerinde sabit kalırken, enzim aktivitesi değerlerinin de 20 W'lık akustik güç için yaklaşık %93 ve 100 W'lık güç için yaklaşık %91 değerinde sabit kaldığı görülmüştür. Ayrıca, 50°C sıcaklık için gerçekleştirilen tüm deneylerde, frekans aralığının %10'dan %80'e artırılmasıyla hidroliz derecesi değerlerinin 20 W'lık akustik güç için yaklaşık

olarak %79'da ve 100 W'lık akustik güç için %75'de sabit kaldığı ve enzim aktivitesi değerlerinin belirtilen akustik güç ve frekans aralığı değerlerinde yaklaşık olarak %89'dan %80'e azaldığı tespit edilmiştir

- *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile gerçekleştirilen ultrasonikasyon deneylerinde enzim, 40°C sıcaklıkta belirtilen frekans aralığı değerlerinde, 20 W'lık akustik güç için %7 ve 100 W'lık akustik güç için ise yaklaşık %8 oranında inaktive olmuştur. Bunun yanısıra, 50°C sıcaklıkta enzim aktivitesinde 20 W'lık akustik güç için %10 ve %80 frekans aralığı değerlerinde sırasıyla yaklaşık olarak %8 ve %23 oranında; 100 W'lık akustik güç için ise %10 ve %80 frekans aralığı değerlerinde sırasıyla yaklaşık olarak %11 ve %25 oranında bir azalma görülmüştür.
- *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi kullanılarak yapılan sonikasyon deneylerinde enzim, 20 W'lık akustik güç için %7 ve 100 W'lık akustik güç için yaklaşık %9 oranında inaktive olmuştur. Ayrıca, 50°C sıcaklıkta enzim aktivitesinde 20 W'lık akustik güç için %10 frekans aralığında yaklaşık %11 ve %80 frekans aralığında yaklaşık %19 oranında; 100 W'lık akustik güç için ise %10 frekans aralığında yaklaşık %11 ve %80 frekans aralığında yaklaşık %20 oranında bir azalma tespit edilmiştir.
- *Bacillus species* kaynaklı α -amilaz enzimi ile gerçekleştirilen deneylerde 40°C ve 50°C'deki deneysel veriler karşılaştırıldığında; 20 W ve 100 W'lık akustik güçlerde frekans aralığının %10'dan %80'e arttırılmasıyla 40°C sıcaklıkta enzim aktivitesinde sabit bir inaktivasyon söz konusu iken, 50°C sıcaklıkta %16'lık bir azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca; sıcaklık 40°C'den 50°C'ye arttırıldığında hidrolizlenme derecesi %18'den %62'ye (yaklaşık 3.4 kat) artmıştır.
- *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile yapılan ultrasonikasyon deneylerinde 40°C ve 50°C'deki deneysel veriler karşılaştırıldığında ise, frekans aralığının %10'dan %80'e arttırılmasıyla 40°C'de enzim aktivitesinde sabit bir inaktivasyon söz konusu iken, 50°C'de yaklaşık %10'luk bir azalma saptanmıştır. Bunun yanısıra, sıcaklık 40°C'den 50°C'ye arttırıldığında hidrolizlenme derecesi %32'den %79'a yaklaşık 2.4 kat artmıştır.

Sonuç olarak; bu çalışma için ultrasonikasyon işleminin buğday nişastasını hidrolizine ait reaksiyon kinetiğine önemli bir etkisi olmamıştır. Bunun yanı sıra ultrasonikasyon işlemi, enzimlerin az da olsa aktivitelerini kaybetmelerine neden olmuştur.

Gerek *Bacillus species* gerek *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimleri ile yapılan deneylerde, sıcaklığın 40°C'den 50°C'ye artırılması ile daha yüksek hidrolizlenme derecesi ve daha düşük enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Hidrolizlenme derecesindeki bu artışlar, sonikasyona bağlı olmaksızın sıcaklığın 40°C'den 50°C'ye artırılmasıyla; enzim aktivitelerindeki bu azalmalar ise, sıcaklık ve sonikasyon parametrelerinin enzim stabilitesi üzerindeki etkilerinin birleşmesi ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra, *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enzimi ile yapılan deneylerde, hidrolizlenme derecesinin ve enzimin stabilitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla ile, verilen deneysel şartlarda *Bacillus licheniformis*'den elde edilen α -amilaz enziminin, *Bacillus species*'den elde edilen α -amilaz enzimine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda, nişastanın enzimatik hidrolizi ile ilgili proses veriminin artırılabilmesi ve enzim stabilitesinin mümkün olduğu kadar korunabilmesi için aşağıdaki faktörler incelenebilir:

- farklı hacimlerin etkisi,
- farklı ultrasonik uçların hidroliz reaksiyonuna etkisi,
- farklı kaynaklı nişastalar ve α -amilaz enzimleri,
- tutuklanmış α -amilaz enzimleri.

KAYNAKLAR

- Andaç, Ö., (2002), *Ultrasen Dalgalarının Zeolit A Sentezi Üzerindeki Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Astolfi-Filho, S., Galembeck, E. V., Faria, J. B. and Frascino, A. C. S., (1986), "Stable Yeast Transformants that Secrete Functional α -Amylase Encoded by Cloned Mouse Pancreatic cDNA", *Biotechnology*, 4:311-315.
- Atkinson, B. ve Mavituna, F., (1991), *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan Publishers, Hamisphire.
- Bailey, J.E. ve Ollis, D.F., (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw Hill Book Co., Second Edition, New York.
- Barton, S., Bullock, C. ve Weir, D., (1996), "The Effects of Ultrasound on the Activities of Some Glycosidase Enzymes of Industrial Importance", *Enzyme and Microbial Technology*, 18:190-194.
- Bealin-Kelly, F., Kelly, C. ve Fogarty, W. M., (1991), "Studies on the Thermostability of the α -Amylase of *Bacillus Caldovelox*", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 36:332-336.
- Biröl, G., (1997), *Fermentation Characteristics of Four Genetically Engineered Saccharomyces Cerevisiae Strains*, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.
- Casadonte, D. J., (2000), "The Sound of Science: The Chemical Effect of High-Intensity Ultrasound", *Texas Technical University, Lubbock Magazine*, January:40-43.
- Casida, L.E., (1968), *Industrial Microbiology*, John Willey & Sons inc., New York.
- Chisti, Y., (2003), "Sonobioreactors: Using Ultrasound for Enhanced Microbial Productivity", *Trends in Biotechnology*, 21(2):89-93.
- Choi H. K. ve Kim S. B., (1994), "Effect of Ultrasound on Sulfuric Acid-Catalysed Hydrolysis of Starch", *Korean Journal of Chemical Engineering*, 11(3):178-184.
- Cracknell, A.P., (1980), *Ultrasonics*, Wykeham Publications, London and Basingstoke.
- Cropek D. ve Dankowski B., (2000), "Sonolysis of Nitrocellulose Fines", US Army Corps of Engineers Research and Development Center, Technical Report, (May) ERDC/CERL TR-00-14.
- Çetin, E. T., (1983), *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- De Moraes, L. M. P., Astolfi-Filho, S. ve Oliver, S. G., (1995), "Development of Yeast Strains for the Efficient Utilisation of Starch: Evaluation of Constructs that Express α -Amylase and Glucoamylase Separately or as Bifunctional Fusion Proteins", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 43:1067-1076.

Delphine, P.J., Belleville, M.P., Gilbert, M.R. ve Zakhia, N., (1999), "Why on Earth Can People Need Continuous Recycle Membrane Bioreactors for Starch Hydrolysis", *Starch/Starke*, 51:25-32.

Demirsoy, A., (1989), Genel Biyoloji/Genel Zooloji Cilt1, Meteksan A.Ş., Ankara.

Dordick, J., (1991), *Biocatalysts for Industry*, Plenum Pres, New York and London.

Ensminger, D., (1988), *Ultrasonics Fundamentals, Technology, Applications*, Marcel Dekker Inc., New York and Basel.

Gates, B., (1992), "Catalytic Chemistry", John Wiley&Sons Inc., New York.

Giz, H., (2000), Serbest Radikal Polimerizasyonunda Ultrases Kullanılarak Sonlanma Mekanizmasının Belirlenmesi, Araştırma Fonu Raporu, İTÜ.

Godfrey, T. ve Reichelt, J., (1983), *Industrial Enzymology*, Macmillian Publishers, Stockton.

Kılıç, D., (2002), "Mısır Nişastası Hidrolizinde α -Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Koç (Öncül), A., (2001), Ultrases Kullanılarak Elde Edilen Etiketli Polimerler ve Uygulamaları, Doktora Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kuttruff, H., (1991), *Ultrasonics Fundamentals and Applications*, Elsevier Applied Science, Elsevier Applied Science, London and New York.

Lii, C., Chen, C. H., Yeh, A. ve Lai V. M. F., (1999), "Preliminary Study on the Degredation Kinetics of Agarose and Carregeenans by Ultrasound", *Food Hydrocolloids*, 13:477-481.

Losev, N. V., Makarova, L. I. ve Lipatova, I. M., (2003), "Rate of Acid Hydrolysis of Starch as Influenced by Intensive Mechanical Effects", *Russian Journal of Applied Chemistry*, 76(6):997-1001.

Maarel, M. J. E. C., Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leehuis, H. ve Dijkhuizm, L., (2002), "Propeties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the α -Amylase Family", *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.

Moseley, M. H. ve Keay, L., (1970), "Purification and Characterization of the Amylase of *B. Subtilis* NRRL B3411", *Biotechnol. Bioeng.*, 12:251-271.

Neis, U., (2002), "Intensification of Biological and Chemical Process by Ultrasound", *Ultrasound in Enviromental Engineering II*, TU Hamburg-Harburg Reports on Sanitary Engineering 35.

Oltulu, T., Menciloğlu, Y. Z. ve Auterinen, A. L., (1999), "Tekstil Endüstrisinde Ekolojik Çözüm: Enzimler", *Tekstil Terbiye ve Teknik*, Ocak:74-78.

Park, J. T. ve Rollings, J. E., (1994), "Effect of Substrate Branching Characteristics on Kinetics of Enzymatic Depolymerization of Mixed Linear and Branched Polysaccharides: I. Amylose/ Amylopectin α -Amylolysis", *Biotechnol. Bioeng.*, 44:792-800.

Povey, M. J. W. ve Mason, T. J., (1998), *Ultrasound in Food Processing*, Blakie Academic & Professional, London.

Pye, E. K. ve Wingard, L. B., (1973), *Enzyme Engineering*, V:2, Plenum Pres, New York and London.

Reed, G. ve Underkofler, A.L., (1966), *Enzymes in Food Processing*, Academic Pres Inc., New York.

Roehr, M., (1996), *Biotechnology: Products of Primary Metabolism*, Wiley-VCH, Weinheim.

Savaş, S., (1998), *Starch Fermentation by a Genetically Engineered Yeast Strain*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.

Saygılı, B. E., (1999), *Single Step Conversion of Starch to Ethanol by Recombinant Saccharomyces Cerevisiae YPG/AB*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.

Schlager, K. J., (1998), "Progress in Ultrasonic Bioreactors for Cells Applications", *Adv. Space Res.*, 22(10):1453-1464.

Shaw, J., Lin, F., Chen, S. ve Chen, H., (1995), "Purification and Properties of an Extracellular α -Amylase From *Thermu sp.*", *Botanical Bulletin of academia Sinica*, 36:195-200.

Suzuki, Y., Ito, N., Yuuki, T., Yamata, H. ve Udaka, S., (1989), "Amino Acid Residues Stabilizing a Bacillus α -Amylase against Irreversible Thermoinactivation", *J. Biol. Chem.*, 264(32):18933-18938.

Tauber, H., (1949), *The Chemistry and Technology of Enzymes*, John Wiley&Sons Inc.

Telefoncu, A., (1995), *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir.

Tomazic, S. J. ve Klivanov, A. M., (1988), "Mechanism of Irreversible Thermal Inactivation of *Bacillus* α -Amylases", *J. Biol. Chem.*, 263(7):3086-3091.

Tuzcuoğlu, A., (2000), *Ultras ses ile Polimer Kırılmasında Makro-Radikallerin Oluşum ve Kırılma Reaksiyonlarının Bilgisayar Benzetimi*, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

Uludağ (Bozkurt), Y., (2000), *İmmobilize Glikoamilaz ile Maltodekstrinden Glikoz Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze.

Violet, M., ve Meunier, J. C., (1989), "Kinetic Study of the Irreversible Thermal Denaturation of *Bacillus Licheniformis* α -Amylase", *Biochem. J.*, 263:665-670.

Yalçın, E., Güvenç, A., Kapucu, N. ve Mehmetoğlu, Ü., (2002), “İzoamil Asetatın Enzimatik Üretimine Ses Ötesi Dalgaların Etkisi”, V. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 2-5 Eylül 2002, Ankara.

Yoo, Y. J., Hong, J. ve Hatch, R. T., (1987), “Comparison of α -Amylase Activities from Different Assay Methods”, Biotechnol. Bioeng., 30:147-151.

Yüceer, S., (2000), “Buğday Nişastasının Hidrolizinde α -Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Wiseman, A., (1987), Handbook of Enzyme Biotechnology, John Wiley & Sons, Chichester.

Wong, D.W.S., (1995), Food Enzymes Structure and Mechanism, International Thomson Publishing, New York.

Wood, E.J. ve Pickering, W.R., (1982), Introducing Biochemistry, J.W. Arrowsmith Ltd., Britain.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.angelfire.com/nj3/soundweapon/ultrales.htm>
- [2] <http://www.bandelin.com/english/index.htm>
- [3] http://www.elektrotherapy.org/electro/ultrasound/therapeutic_ultrasound.htm
- [4] <http://science.cancerresearchuk.org/sci/fs/downstream1/sonication/?version=1>
- [5] <http://www.rehabpub.com/features/102002/2.asp>
- [6] http://www.biologics-inc.com/ultrasonic_homogenizers.htm
- [7] http://www.europabio.org/pages/module_14.asp
- [8] [http://www.metrex.com/TechInfo/TechBulletins/Canada%20-%20EmPower-MetriZymeDetergeZyme%20Technical%20Bulletin%20\(metrex\).pdf](http://www.metrex.com/TechInfo/TechBulletins/Canada%20-%20EmPower-MetriZymeDetergeZyme%20Technical%20Bulletin%20(metrex).pdf)
- [9] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/dergi/99/ekim/enzim.pdf>
- [10] <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/Metabolism/Enzymes.html>
- [11] <http://www.ann.com.au/MedSci/enzymeshtm>
- [12] <http://www.mills.edu/RESEARCH/FUTURES/JOHNB/Structurefunction/727.html>
- [13] <http://www.awlonline.com/mathews/ch11ifm.htm>
- [14] <http://ceiba.cc.ntu.edu.tw/603371B1/lecture6.ppt>
- [15] <http://nti.tamuk.edu/cell/Kinetics.html>

- [16] <http://users.rcn.com/~jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/EnzymeKinetics.html>
- [17] <http://www.enzymeessentials.com/HTML/amylase.html>
- [18] <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm>, Wang, N. S., (1999), "Experiment No:5 Starch Hydrolysis by Amylase"
- [19] http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/amylase.html#back
- [20] <http://www.sbu.ac.uk/water/hysta.htm>
- [21] <http://www.food.rdg.ac.uk/online/fs560/topic1/tld/tld.htm>
- [22] <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bya.html>
- [23] <http://www.ftns.wau.nl/prock/Research/Rik/Maltodextrins/marchall1.htm>
- [24] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/547starch.html>
- [25] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/index.html>
- [26] http://www.nigud.com/index_9.html

EKLER

Ek 1. Deneysel Verilere Uyan Matematiksel İfadeler ve İstatiksel Veriler

Çizelge Ek 1.1 50°C sıcaklıkta yapılan deneylerden elde edilen α -amilaz enzim aktivite değerleri ile ilgili matematiksel ifadeler ve istatiksel veriler

Kullanılan enzim	Kullanılan Model	Kullanılan Denklem	σ	R^2
<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi (20 W'lık akustik güç)	Lineer denklem	$[A] = 94.1029 - 0.1959 (FA)$	0.9058	0.9903
<i>Bacillus species</i> kaynaklı α -amilaz enzimi (100 W'lık akustik güç)	Lineer denklem	$[A] = 91.3171 - 0.2009 (FA)$	0.3016	0.9989
<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi (20 W'lık akustik güç)	Lineer denklem	$[A] = 90.6076 - 0.1062 (FA)$	1.0898	0.9550
<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı α -amilaz enzimi (100 W'lık akustik güç)	Lineer denklem	$[A] = 91.2758 - 0.1260 (FA)$	1.1861	0.9618

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	09.10.1978	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1992-1995	Üsküdar İmam Hatip Lisesi
Lisans hazırlık	1996-1997	Yıldız Teknik Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu
Lisans	1997-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	2001-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

