İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

OZMOTİK MEMBRAN DİSTİLASYON SİSTEMİNDE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU VE KİNETİK MODELLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Kadir ÇINAR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

MART 2021

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

OZMOTİK MEMBRAN DİSTİLASYON SİSTEMİNDE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU VE KİNETİK MODELLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Kadir ÇINAR
(506142508)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ
Eş Danışman: Prof. Dr. Hacı Ali GÜLEÇ

MART 2021

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 506142508 numaralı Doktora Öğrencisi Kadir ÇINAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "OZMOTİK MEMBRAN DİSTİLASYON SİSTEMİNDE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU VE KİNETİK MODELLENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
Eş Danışman :	**Prof. Dr. Hacı Ali GÜLEÇ** Trakya Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. Meral KILIÇ AKYILMAZ** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
	Doç. Dr. Filiz ALTAY İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
	Prof. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
	Doç. Dr. Pelin ONSEKİZOĞLU BAĞCI Trakya Üniversitesi	.....
	Doç. Dr. Kevser KAHRAMAN Abdullah Gül Üniversitesi	.....

Teslim Tarihi : 8 Şubat 2021
Savunma Tarihi : 31 Mart 2021

Kızıma,

ÖNSÖZ

Doktora tezimi hazırlama aşamasında değerli katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerinden faydalanma şansı bulduğum danışman hocalarım Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ ve Prof. Dr. Hacı Ali GÜLEÇ'e sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme toplantılarında görüş ve önerileriyle yolumu aydınlatan tez izleme jüri üyelerim Prof. Dr. Meral KILIÇ AKYILMAZ, Doç. Dr. Pelin ONSEKİZOĞLU BAĞCI ve Doç. Dr. Filiz ALTAY'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, önerileri ve teknik desteğini benden hiç esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ufuk BAĞCI'ya,

İlgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi İrem DAMAR HÜNER ve Araş. Gör. Dr. Emel YILMAZ'a,

Laboratuvar çalışmalarıma katkı sağlayan Gamze BİLDİŞ'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışması 117O940 nolu TÜBİTAK projesi ve 40556 nolu İTÜ Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında desteklenerek tamamlanmıştır. Verdikleri maddi desteklerden ötürü TÜBİTAK ve İTÜ BAP'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri sabır, anlayış ve manevi destekleri için aileme teşekkürlerimi sunarım.

Şubat 2021

Kadir Çınar
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
SEMBOLLER ..... **xiii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xvii**
ÖZET ..... **xxi**
SUMMARY ..... **xxv**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **5**
2.1 Galaktooligosakkaritler 5
2.1.1 Kullanım alanları 7
2.1.2 Pazar durumu 8
2.1.3 Sentez mekanizması 9
2.1.4 Sentez sürecine etki eden faktörler 13
2.1.4.1 Başlangıç laktoz konsantrasyonu 13
2.1.4.2 Sıcaklık 13
2.1.4.3 Enzim kaynağı ve konsantrasyonu 14
2.1.4.4 Reaksiyon süresi 15
2.1.4.5 İnhibitör ve pH 15
2.2 Endüstriyel Galaktooligosakkarit Üretimi 15
2.3 Galaktooligosakkarit Sentezinin Modellenmesi 17
2.4 Ozmotik Membran Distilasyon 20
3. MATERYAL VE METOT **23**
3.1 Materyal 23
3.2 Enzimin Karakteristik Özelliklerinin ve Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi 23
3.3 Sürekli Karıştırmalı Tip Kesikli Reaktörde GOS Sentezi (Reaktör-1) 24
3.4 Ozmotik Membran Distilasyon Sisteminde GOS Sentezi (Reaktör-2) 24
3.5 Deneysel Tasarımlar ve İstatistiksel Analizler 27
3.6 HPLC ile Şeker Analizi 28
3.7 Enzimatik GOS Sentezinin Kinetik Temelde Modellenmesi 30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **31**
4.1 Serbest Formda *A. oryzae* Enziminin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi 31
4.2 Reaktör-1'de Enzimatik GOS Sentezi 33
4.2.1 Bağımsız değişken aralıklarının seçimi 33
4.2.2 Enzimatik GOS sentezinin incelenmesi 34
4.2.3 Reaktör-1'de elde edilen sonuçların istatistiksel analizi 38
4.2.3.1 Reaktör-1'de GOS-4 eldesi 41
4.2.3.2 Reaktör-1'de GOS-3 eldesi 45
4.2.3.3 Reaktör-1'de toplam GOS (GY) eldesi 47
4.2.3.4 Maksimum toplam GOS'nin elde edildiği süre (TMGY) 51

4.2.3.5 Reaktör-1 için GY değerinin optimize edilmesi 54
4.2.4 Reaktör-1'de elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi 56
4.3 Reaktör-2'de Enzimatik GOS Sentezi 64
4.3.1 Reaktör-2'de elde edilen sonuçların istatistiksel analizi 68
4.3.1.1 Reaktör-2'de GOS-4 eldesi 68
4.3.1.2 Reaktör-2'de GOS-3 eldesi 71
4.3.1.3 Reaktör 2'de toplam GOS (GY) eldesi 73
4.3.1.4 Reaktör-2 için GY değerinin optimize edilmesi 76
4.3.2 Reaktör-2'de elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi 77
4.3.3 Reaktör-2'de yapılan diğer çalışmalar 95
4.3.3.1 Farklı başlangıç besleme miktarları ile yapılan denemeler 96
4.3.3.2 Kapiler membran modül içeren sistem ile yapılan denemeler 98
4.3.3.3 Glukoz oksidaz enzimi ilave edilerek yapılan denemeler 102
4.4 Kinetik Parametrelerin Tahminlenmesi 105
5. SONUÇLAR 121
KAYNAKLAR 125
EKLER 135
ÖZGEÇMİŞ 149

KISALTMALAR

2FI : İki faktörlü etkileşim
Allo : Allolaktoz
CV : Varyasyon katsayısı
dF : Serbestlik derecesi
DP : Polimerizasyon derecesi
E : Enzim
EC : Enzim konsantrasyonu
E:Inhb : Enzim-inhibitör kompleksi
E:Lak : Enzim-laktoz kompleksi
E:Gal : Enzim-galaktoz kompleksi
Gal : Galaktoz
GAP : Galaktoz pik alanı
GLP : Gluktoz pik alanı
Glu : Glukoz
GO : Glukoz oksidaz
GOS : Galaktooligosakkarit
GOSP : Galaktooligosakkarit pik alanı
GOS-2 : 2-zincirli galaktooligosakkarit
GOS-3 : 3-zincirli galaktooligosakkarit
GOS3P : 3-zincirli galaktooligosakkarit pik alanı
GOS-4 : 4-zincirli galaktooligosakkarit
GOS4P : 4-zincirli galaktooligosakkarit pik alanı
GOS-5 : 5-zincirli galaktooligosakkarit
GRAS : Genel olarak güvenilir zararsız kabul edilen
GY : Toplam oligosakkaritler (GOS3+GOS-4)
HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC : Laktoz konsantrasyonu
LP : Laktoz pik alanı
LS : Laktoz çözeltisi
M1 : Düz tabakalı membran
M2 : Kapiler membran
NDO : Sindirilemeyen oligosakkaritler
OD : Ozmotik distilasyon
OMD : Ozmotik membran distilasyon
ONPG : 2-nitrophenil-β-D-galaktopiranozit
RI : Refraktif indeks
SPGOSP : Spesifik galaktooligosakkarit üretkenliği
StdErr : Standart hata
T : Sıcaklık
TMGY : Maksimum toplam galaktooligosakkaritin elde edildiği süre

SEMBOLLER

°Briks	**:** Çözünür katı madde içeriği
$CaCI_2$	**:** Kalsiyum klorür
$C_{b,m}$	**:** Besleme membran yüzeyindeki konsantrasyon
$C_{p,m}$	**:** Permeat membran yüzeyindeki konsantrasyon
$C_{b,y}$	**:** Besleme yığın konsantrasyonu
$C_{p,y}$	**:** Permeat yığın konsantrasyonu
Da	**:** Dalton
HCI	**:** Hidroklorik asit
K_m	**:** Michaelis-Menten sabiti
Lak_0	**:** Başlangıç laktoz miktarı
Lak_t	**:** Reaksiyon ortamı laktoz miktarı
M	**:** Molarite
$MgCI_2$	**:** Magnezyum klorür
$MgSO_4$	**:** Magnezyum sülfat
NaCI	**:** Sodyum klorür
NaOH	**:** Sodyum hidroksit
ΔP_m	**:** Membran yüzeyindeki su buharı basıncı farkı
ΔP_y	**:** Yığın su buharı basıncı farkı
R^2	**:** Determinasyon katsayısı
t	**:** Süre
U	**:** Enzim ünitesi
V_{max}	**:** Maksimum reaksiyon hızı (µmol/ml/dk)
β_0	**:** Kesim noktası regresyon sabiti
$\beta_1, \beta_2, \beta_3$	**:** Lineer faktör etkileşiminin regresyon sabiti
$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$	**:** İkili faktör etkileşiminin regresyon sabiti
$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$	**:** Kuadratik faktör etkileşiminin regresyon sabiti

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Hidroliz, içsel düzenleşim ve transgalaktosilasyon ile laktozdan oluşan olası reaksiyon ürünleri **7**

Çizelge 2.2 : Farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında elde edilen GOS verimleri.....**13**

Çizelge 2.3 : Ticari olarak üretilen GOS ürünlerinin içerikleri ve kullanılan enzim sistemleri ……**17**

Çizelge 3.1 : HPLC ile şeker analizi için sabit ve hareketli faza ait özellikler…….. **29**

Çizelge 4.1 : Reaktör 1-de uygulanan Box Benhken dizaynı ile elde edilen deneysel koşullar, elde edilen deneysel yanıt değerleri ve tahminlenen yanıt değerleri... **39**

Çizelge 4.2 : Reaktör-1'de GOS-4 model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları……... **40**

Çizelge 4.3 : Reaktör-1'de GOS-3 model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları……... **40**

Çizelge 4.4 : Reaktör-1'de GY model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları……..**40**

Çizelge 4.5 : Reaktör-1'de TMGY model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları……... **40**

Çizelge 4.6 : GOS-4 yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri……...**42**

Çizelge 4.7 : GOS-3 yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri……..**45**

Çizelge 4.8 : GY yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri……....**48**

Çizelge 4.9: TMGY yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri……...**51**

Çizelge 4.10 : Numerik optimizasyon ile bazı TMGY değerlerinde elde edilen GY……...**54**

Çizelge 4.11 : Reaktör-1'de GY optimizasyonu için numerik koşullar……**55**

Çizelge 4.12 : Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör ve serbest enzim ile yapılmış bazı çalışmalar……. **59**

Çizelge 4.13 : Reaktör-2'de uygulanan faktöriyel deney planı ve elde edilen deneysel yanıt değerleri…… **65**

Çizelge 4.14 : Reaktör-2'de elde edilen deneysel ve tahminlenen değerleri……... **66**

Çizelge 4.15 : Reaktör-2 için model uygunluklarının belirlenmesi yapılan test sonuçları……..**67**

Çizelge 4.16 : GOS-4 2FI modeli için ANOVA değerleri……....**69**

Çizelge 4.17 : GOS-3 2FI modeli için ANOVA değerleri……**71**

Çizelge 4.18 : GY 2FI modeli için ANOVA değerleri……...**74**

Çizelge 4.19 : Reaktör-2'de GY numerik optimizasyonu için koşullar……....**76**

Çizelge 4.20 : Bazı deney setlerinde reaktör-1 ve reaktör-2'de aynı laktoz dönüşümünde elde edilen GY'nin karşılaştırılması……....**80**

Çizelge 4.21 : 300 ve 450 dakika sentez süresinde elde edilen GOS-4, GOS-3 ve GY……...**86**

Çizelge 4.22 : 90 dakika sentez süresi sonunda elde edilen toplam GOS……....**100**

Çizelge 4.23 : Farklı sistemler için sistemlerin optimum çalışma koşullarında laktoz hidrolizi ve GOS sentezini tanımlayan modelden tahminlenmiş reaksiyon hız sabitleri (Güven aralığı: %95)……...**117**
Çizelge 4.24 : Reaksiyon hız sabit oranları (oluşum/yıkım)……....**117**
Çizelge A.1 : HPLC sonuçları ile reaksiyon bileşen yüzdelerinin zamana bağlı değişiminin hesaplanması……**136**
Çizelge A.2 : Reaksiyon bileşen ağırlıklarının zamana bağlı olarak hesaplanması.**137**
Çizelge A.3 : Reaksiyon bileşenlerinin molar konsantrasyonlarının hesaplanması.**138**
Çizelge B.1 : HPLC sonuçları ile reaksiyon bileşen yüzdelerinin zamana bağlı değişiminin hesaplanması.....**139**
Çizelge B.2 : Reaksiyon bileşen ağırlıklarının zamana bağlı olarak hesaplanması.**139**
Çizelge B.3 : Reaktör-2'de elde edilen zamana bağlı su uzaklaştırma hızı. **140**
Çizelge B.4 : Reaktör-2'de reaksiyon ortam hacminin su uzaklaştırma hızı denklemi ile hesaplanması. **141**
Çizelge B.5 : Reaksiyon bileşenlerinin molar konsantrasyonlarının hesaplanması **142**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Galaktooligosakkaritlerin genel yapısı. **5**
Şekil 2.2 : Bazı GOS'lerin kimyasal yapısı **6**
Şekil 2.3 : Galaktosidazlar üzerindeki β-galaktosidaz aktivitesi için reaksiyon mekanizması **11**
Şekil 2.4 : Laktoz hidroliz ve transgalaktosilasyonunun şematik gösterimi (E=enzim, Lak= laktoz, Glu= glukoz, Gal= galaktoz, Ac= galaktosil akseptörü) **12**
Şekil 2.5 : Endüstriyel GOS üretimi **16**
Şekil 2.6 : Ozmotik distilasyon prosesinin şematik gösterimi **20**
Şekil 2.7 : Ozmotik distilasyon prosesinde ortaya çıkan konsantrasyon profilleri: $C_{b,y}$:besleme yığın konsantrasyonu; $C_{b,m}$: besleme membran yüzeyindeki konsantrasyon; $C_{p,y}$:permeat yığın konsantrasyonu; $C_{p,m}$: permeat membran yüzeyindeki konsantrasyon; ΔP_y= yığın su buharı basıncı farkı; ΔP_m= membran yüzeyindeki su buharı basıncı farkı **21**
Şekil 3.1: Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörde enzimatik GOS sentezi. **24**
Şekil 3.2 : Ozmotik membran distilasyon sistemi görseli; (1) membran modülü, (2) peristaltik pompa, (3) besleme, (4) konsantre tuz çözeltisi, (5) terazi, (6) ısı değiştirici, (7) ısıtıcı sistem, (8) soğutucu sistem. **25**
Şekil 3.3 : Ozmotik membran distilasyon sisteminin şematik gösterimi; (1) membran modülü, (2) peristaltik pompa, (3) besleme, (4) konsantre tuz çözeltisi, (5) terazi, (6) ısı değiştirici, (7) ısıtıcı sistem, (8) soğutucu sistem, (9) manyetik karıştırıcı (10) bilgisayar. **26**
Şekil 3.4 : CF042A çapraz akış akrilik modülü düzeneği ve düz tabaka membran özellikleri. **26**
Şekil 3.5 : MD020CP2N kapiler membran özellikleri. **27**
Şekil 3.6 : Agilent 1260 Infinity HPLC sistemi. **28**
Şekil 4.1 : Hanes-Woolf grafiği. **31**
Şekil 4.2 : *A.oryzae* enzimine ait Michalis-Menten grafiği. **32**
Şekil 4.3 : *A.oryzae* enzimine ait Hanes-Woolf grafiği. **32**
Şekil 4.4 : Enzim konsantrasyon aralığının belirlenmesi için farklı enzim konsantrasyonlarında yapılan GOS sentez çalışmaları (Reaksiyon koşulları: LC:32 °Briks, T:35 °C). **33**
Şekil 4.5 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: T:35 °C, EC:10 U/g LS, a. LC:4,5 °Briks, b. LC:18,25 °Briks, c. LC:32 °Briks). **35**
Şekil 4.6 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı reaksiyon sıcaklıklarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: LC:18,25 °Briks, EC:10 U/g LS, a. T:35 °C, b. T:45 °C, c. T:55 °C). **36**

Şekil 4.7 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı enzim konsantrasyonlarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: T:35 °C, LC:18,25 °Briks, a. EC: 6 U/g LS, b. EC:10 U/g LS, c. EC:14 U/g LS). **37**
Şekil 4.8 : GOS-4 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-4 için artıkların normal olasılık grafiği (b). **43**
Şekil 4.9 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkarit). **44**
Şekil 4.10 : GOS-3 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-3 için artıkların normal olasılık grafiği (b). **46**
Şekil 4.11 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-3'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkarit). **47**
Şekil 4.12 : GY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GY için artıkların normal olasılık grafiği (b). **49**
Şekil 4.13 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GY'ye etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GY: 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı). **50**
Şekil 4.14 : TMGY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve TMGY için artıkların normal olasılık grafiği (b). **52**
Şekil 4.15 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin maksimum toplam GOS'nin elde edildiği süreye (TMGY) etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC). **53**
Şekil 4.16 : Optimum GY'yi sağlayan reaksiyon koşullarındaki kontur diyagramları (EC:10,917 U/g LS). **55**
Şekil 4.17 : Reaksiyon ürünlerinin zamana bağlı değişimini gösteren HPLC kromatogramları (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS). **61**
Şekil 4.18 : GOS-4 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-4 için artıkların normal olasılık grafiği (b). **69**
Şekil 4.19 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkarit). **70**
Şekil 4.20 : GOS-3 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-3 için artıkların normal olasılık grafiği (b). **72**
Şekil 4.21 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-3'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkarit). **73**
Şekil 4.22 : GY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GY için artıkların normal olasılık grafiği (b). **74**

Şekil 4.23 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GY'ye etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GY: 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı). **75**
Şekil 4.24 : Optimum GY değerini sağlayan reaksiyon koşullarındaki kontur diyagramları (EC:6 U/g LS)..... **77**
Şekil 4.25 : Reaktör-2'de enzimatik GOS sentezi sürecinde membran akısının sıcaklığa bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, EC:6 U/g LS)... **81**
Şekil 4.26 : GOS-3 ve GOS-4'ün farklı başlangıç laktoz konsantrasyonunda reaksiyon süresince değişiminin grafiksel gösterimi (Reaksiyon koşulları; a.LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, b.LC:18,25 °Briks, T:55 °C, EC:14 U/g LS, c.LC:4,5 °Briks, T:35 °C, EC:14 U/g LS)..... **83**
Şekil 4.27 : Reaktör-1 ve reaktör-2'de elde edilen zamana bağlı GOS-4, GOS-3 ve GY değerleri (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:55 °C, EC:10 U/g LS)..... **85**
Şekil 4.28 : Sıcaklığın (T) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör-1, b) Reaktör-2 (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, EC:10 U/g LS)..... **88**
Şekil 4.29 : Başlangıç laktoz konsantrasyonunun (LC) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör 1, b) Reaktör 2 (Reaksiyon koşulları; T:45 °C, EC:6 U/g LS)..... **91**
Şekil 4.30 : Enzim konsantrasyonunun (EC) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör 1, b) Reaktör 2 (Reaksiyon koşulları; T:35 °C, LC:32 °Briks)..... **93**
Şekil 4.31 : a) 200 g, 300 g ve 400g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, 6U=EC:6 U/g LS, 14U=EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:35 °C). **97**
Şekil 4.32 : a) 300 g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, M2=Kapiler membran, 6U= EC:6U/g LS, 10U= EC:10 U/g LS, 14U= EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, T:35 °C)..... **99**
Şekil 4.33 : 600 g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, M2=Kapiler membran, 6U= EC:6 U/g LS, 10U=EC:10 U/g LS, 14U=EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, T:35 °C)..... **101**
Şekil 4.34 : Farklı başlangıç besleme miktarlarında M1 ve M2 içeren reaktör-2 sisteminde reaksiyon ortamı briks artışı (LC:32 °Briks, T:35 °C , EC:6 U/g LS). **102**
Şekil 4.35 : Reaktör-1'de toplam GOS ve laktoz dönüşümünün reaksiyon süresine bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları: LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, R1:Reaktör-1, GO: Glukoz oksidaz)..... **103**
Şekil 4.36 : Reaktör 2'de toplam GOS ve laktoz dönüşümünün reaksiyon süresine bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları: LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, R2:Reaktör-2, GO: Glukoz oksidaz)..... **105**
Şekil 4.37 : Model-(a) grafiği. **110**
Şekil 4.38 : Model-(b) grafiği. **110**
Şekil 4.39 : Model-(c) grafiği. **111**
Şekil 4.40 : Model-(d) grafiği. **111**
Şekil 4.41 : Model-(e) grafiği. **112**
Şekil 4.42 : Model-(f) grafiği..... **112**

Şekil 4.43 : Model-(g) grafiği. **113**
Şekil 4.44 : Model-(h) grafiği. **113**
Şekil 4.45 : Deneysel veriler ile uyarlanmış verilerin reaktör-1 sistemi için karşılaştırılması (Reaksiyon koşulları; T:35 ºC, LC:32 °Briks, EC:10,917 U/g LS). **115**
Şekil 4.46 : Deneysel verileri ile uyarlanmış verilerin reaktör-2 sistemi için karşılaştırılması (Reaksiyon koşulları; T:36,67 ºC, EC:6,0 U/g LS, LC:32 °Briks). **116**
Şekil B.1 : Su uzaklaştırma hızının zamana bağlı lineer denkleminin elde edilmesi. **140**
Şekil C.1: Reaktör-1'de GOS-4 için diğer süreç yanıt grafikleri. **142**
Şekil C.2 : Reaktör-1'de GOS-3 için diğer süreç yanıt grafikleri. **143**
Şekil C.3 : Reaktör-1'de GY için diğer süreç yanıt grafikleri. **144**
Şekil C.4 : Reaktör-1'de TMGY için diğer süreç yanıt grafikleri. **145**
Şekil D.1 : Reaktör-2'de GOS-4 için diğer süreç yanıt grafikleri. **146**
Şekil D.2 : Reaktör-2'de GOS-3 için diğer süreç yanıt grafikleri. **147**
Şekil D.3 : Reaktör-2'de GY için diğer süreç yanıt grafikleri. **148**

OZMOTİK MEMBRAN DİSTİLASYON SİSTEMİNDE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU VE KİNETİK MODELLENMESİ

ÖZET

Prebiyotik etkili gıda bileşenleri, insan sağlığı üzerinde sağladıkları faydalı etkiler nedeniyle gıda endüstrisinde genişleyen bir pazar payına sahiptirler. Prebiyotik karbonhidratlar arasında galaktooligosakkaritler (GOS) en spesifik bifidojenik faktörler olarak tanımlanmışlardır. GOS'ler laktozdan β-galaktosidaz enziminin katalizlediği transgalaktosilasyon reaksiyonları ile sentezlenirler. Fakat GOS üretim sürecinde enzimin transgalaktosilasyon ve hidroliz reaksiyonlarını eş zamanlı katalizlemesi nedeniyle GOS sentez verimi düşük olmaktadır. GOS'nin enzimatik sentezi kinetik kontrollü bir reaksiyon olduğundan enzim kaynağı GOS verimi, laktoz dönüşümü, üretkenlik ve ürün komposizyonu gibi parametreleri etkilemektedir. *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidazın GRAS kapsamında olmasının yanında yüksek spesifik aktivite, yüksek sıcaklık dayanımı ve düşük maliyetli olması endüstriyel üretimde bu enzimi ön plana çıkarmaktadır. Fakat bu enzimin GOS sentezinde laktoz dönüşümü düşük olduğundan sürecin optimizasyonunun sağlanarak GOS sentez veriminin arttırılması önemli bir gerekliliktir. Bu kapsamda *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin katalizlediği GOS sentezinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu ilk defa bu çalışmada ele alınmıştır.

GOS sentez verimininin arttırılması amacıyla enzimatik GOS sentezi basınç destekli membran sistemleri ile entegre edilmeye çalışılmıştır. Özellikle ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon GOS üretim süreçlerine dahil edilerek enzim üzerinde inhibe edici etkileri olan glukoz ve galaktozun reaksiyon ortamından uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Ancak bu sistemlerde hem ürün ve substrat kaybının meydana gelmesi hem de permeat akı değerlerinin hızlı bir şekilde azalması neticesinde GOS üretim süreçleri istenilen etkiyi gösterememiştir. Bu nedenle membran destekli ayırım süreçlerinin GOS sentez sürecine engtegrasyonunda yeni yaklaşımların denenmesine ihtiyaç vardır.

Literatür incelendiğinde yüksek verimlilikte GOS sentezinin sağlanabilmesi için başlangıç laktoz konsantrasyonunun en önemli parametre olduğu görülmektedir. Buradan hareketle enzimatik reaksiyon ortam laktoz konsantrasyonunun süreç boyunca yüksek seviyede tutulmasının GOS sentez verimini arttıracağı düşünülmüştür. Bu fikir doğrultusunda enzimatik GOS sentez sürecine ozmotik membran distilasyon sisteminin engtegrasyonu sağlanmıştır. Ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyonun aksine ozmotik membran distilasyon yönteminde kullanılan yüksek hidrofobisiteye sahip mikro-gözenekli bir membran sayesinde enzimatik reaksiyon ortamından sadece suyun yüksek seçicilikle ayrımı sağlanarak reaksiyon ortamı süreç boyunca laktoz konsantrasyonu açısından daha konsantre bir hale getirilmiştir. Ayrıca, entegre sistemden substrat ve ürün kaybı olmamış ve başlangıç akı değerleri uzun süreler boyunca sabit ilerlemiştir. GOS sentez verimini arttırmaya yönelik sürekli

karıştırmalı tip kesikli reaktör sürecinin ozmotik membran distilasyon sistemine entegresi sağlanan bu çalışma, reaktör tasarımı açısından literatürde daha önce çalışılmamıştır.

Doktora tezi kapsamında ilk önce sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörde (reaktör-1) GOS sentez çalışmaları yapılmış ve süreç çıktıları yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. İkinci olarak ozmotik membran distilasyon sisteminde (reaktör-2) GOS sentez çalışmaları yapılmış ve süreç çıktıları yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Son olarak her iki sistemde yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum reaksiyon koşullarında GOS sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen reaksiyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi yapılmıştır. Böylece ozmotik membran distilasyon sisteminin GOS sentezi reaksiyonunun kinetiği üzerine etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

Bu çalışmanın temel hedefi ozmotik membran distilasyon sürecinin entegrasyonu yapılan reaktör-2 sisteminde laktozdan enzimatik yolla elde edilen GOS sentez veriminin incelenmesidir. Tasarımı yapılan reaktör-2 sistemi çalışma mekanizması gereği literatürde GOS sentezi için kullanılan membranlı reaktörlerden farklı olduğundan elde edilen verilerin sağlıklı bir biçimde değerlendirilebilmesi için aynı reaksiyon koşullarında çalıştırılan reaktör-1 sisteminden sağlanan GOS sentez sonuçlarından yararlanılmıştır.

Reaktör-1'de Box Benhken deney tasarımı ile belirlenmiş deney seti ile başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC) ve sıcaklık (T) reaksiyon parametrelerinin toplam GOS'ye (GY=GOS-3+GOS-4) etkisi incelenmiş ve GY değeri en düşük %8,47 ile en yüksek %26,92 arasında bulunmuştur. Reaktör-2'de aynı reaksiyon parametrelerinin GY'ye etkisi faktöriyel deney tasarımı ile incelenmiş ve elde edilen GY değerleri %18,7 ile %28,63 arasında saptanmıştır. Her iki reaktörde de ayrıca GOS-3 ve GOS-4 değerlerinin reaksiyon parametrelerine bağlı olarak değişimini ifade eden matematiksel modeller elde edilmiştir. Yanıt yüzey metodolojisi ile elde edilen matematiksel modeller süreç yanıtlarını başarılı bir şekilde tahminleyebilmiştir. Reaksiyon süresinin GOS birim maliyetini etkileyen önemli bir parametre olduğu düşünüldüğünde bu modeller yardımıyla hedeflenen GOS ürün kompozisyonunu en hızlı sağlayan deney koşulları önceden tahminlenebilecektir.

Reaktör-2'de reaktör-1'e kıyasla reaksiyon verimi üzerine en fazla %20,1 düzeyinde artış elde edilmiştir. Reaktör-2'de yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonlarında yüksek laktoz dönüşümlerinde yüksek GOS üretkenliği (GOSP) değerlerinin elde edilmesi enzimin transgalaktosilasyon aktivitesinin hidrolize oranla baskın olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca yüksek laktoz dönüşümlerinde yüksek GOSP değerleri için düşük seviyede enzim konsantrasyonunun ve düşük reaksiyon sıcaklığının daha iyi sonuçlar sağladığı tespit edilmiştir.

Kinetik değerlendirmeler sonucunda k_5 ve k_5/k_{-5} değerleri reaktör-2'de artmıştır. Bu durum reaktör-2'de transgalaktosilasyonun daha aktif rol oynadığını göstermektedir. Her iki reaktörde elde edilen benzer k_3/k_{-3} oranına karşın reaktör-2'de tespit edilen yüksek k_2 ve k_5/k_{-5}, reaktör-2'de yüksek seviyede E:Lak ve E:Gal kompleksi oluşumunun GOS sentez/GOS bozunması hızını olumlu yönde etkilediğini belirtmektedir. Bu açıdan ozmotik membran distilasyon sisteminin GOS sentezine önemli etkilerininden birinin enzimin laktoz ile daha fazla etkileşime girmesini sağlayarak reaksiyon ortamındaki E:Gal kompleksi konsantrasyonunu yüksek seviyede tutması olduğu söylenebilir. Ayrıca, reaktör-1 de glukoz inhibisyonu (k_6/k_{-6}), reaktör-2'de ise galaktoz inhibisyonu (k_7/k_{-7}) ön plana çıkmıştır.

Reaktör-2'de reaktör-1'e kıyasla aynı laktoz dönüşümü değerlerinde hem daha yüksek GY değerleri elde edilmiş hem de bu süreç daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Bu durum enzimin membranlı sistemde daha çok transgalaktosilasyon reaksiyonuna yönelmiş şekilde çalıştığı ifade etmektedir. Aynı zamanda reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su enzimin GOS-4 oluşturma performasına olumlu yönde etki etmiştir.

Sonuç olarak, reaktör-2 sistemi GOS sentezinin yanında sentezlenen reaksiyon ürünlerinin konsantrasyonunu da sağlaması nedeniyle endüstriyel GOS üretiminde rol alma potansiyeline sahiptir. Fakat bu sistemde görülen olumlu etkinin daha da arttırılabilmesi için enzim aktivitesinin de yüksek seviyede tutulması elzemdir. Çünkü ilerleyen reaksiyon sürelerinde enzimde aktivite kaybı yaşandığı tespit edilmiştir. GOS sentez veriminde görülen artışın daha da yükseltilmesi için yeni yaklaşımlar ile enzim aktivitesi üzerinde görülen monosakkarit inhibisyonunun hafifletilmesi gereklidir. Böylece membran destekli sürecin GOS sentez performansının daha da artacağı düşünülmektedir. Bu açıdan reaktör-2 sistemini geliştirmek üzere enzimin immobilizasyonunun sağlanarak nanofiltrasyon sisteminin de reaktör-2 sistemine entegrasyonunun yapılacağı bir bütünleşik süreç tasarımının verim artışına olumlu yönde etki edeceği düşünülmüştür.

OPTIMIZATION AND KINETIC MODELLING OF GALACTOOLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS IN OSMOTIC MEMBRANE DISTILLATION SYSTEM

SUMMARY

Prebiotic food ingredients have an expanding market share in the food industry due to their beneficial effects on human health. Among the prebiotic carbohydrates, galactooligosaccharides (GOS) have been identified as the most specific bifidogenic factors. GOS are synthesized from lactose by transgalactosylation reactions catalyzed by the enzyme β-galactosidase. However, GOS synthesis efficiency is low because the enzyme catalyzes transgalactosylation and hydrolysis reactions simultaneously in the GOS production process. Since the enzymatic synthesis of GOS is a kinetically controlled reaction, the enzyme source affects parameters such as GOS yield, lactose conversion, productivity and product composition. In addition to the fact that β-galactosidase originating from *Aspergillus oryzae* is within the scope of GRAS, its high specific activity, high temperature resistance and low cost brings this enzyme in the first place in industrial production. However, since the lactose conversion of this enzyme in the GOS synthesis is low, it is an important requirement to increase the GOS synthesis efficiency by optimizing the synthesis process. In this context, the optimization of GOS synthesis catalyzed by β-galactosidase enzyme originating from *A.oryzae* with the response surface method was discussed for the first time in this study.

In order to increase the efficiency of GOS synthesis, enzymatic GOS synthesis has been tried to be integrated with pressure driven membrane systems. Particularly, ultrafiltration and nanofiltration were included in GOS production processes and it was aimed to remove glucose and galactose, which have inhibitory effects on the enzyme, from the reaction medium. However, as a result of the loss of product and substrate and the rapid decrease in permeate flux values in these systems, GOS production processes did not show the desired effect. Therefore, it is necessary to try new approaches in the integration of membrane-assisted separation processes into the GOS synthesis process.

According to literature nitial lactose concentration is the most important parameter to achieve high efficiency GOS synthesis. From this point of view, it can be expected that keeping the lactose concentration in the enzymatic reaction medium at a high level during the process would increase the yield of GOS synthesis. In line with this idea, the integration of osmotic membrane distillation system into the enzymatic GOS synthesis process was provided. Unlike ultrafiltration and nanofiltration, high hydrophobicity micro-porous membrane used in osmotic membrane distillation ensures that only water can be separated from the enzymatic reaction medium with high selectivity and the reaction medium can be more concentrated in terms of lactose concentration during the process. In addition, there would be no substrate and product loss from the integrated system and the initial flux values can remain steady over long

periods. This involved integration of the continuous stirred type batch reactor process with osmotic membrane distillation system to increase the GOS synthesis efficiency, and this approach has not been studien in literature in terms of reactor design.

Within the scope of this doctoral thesis, firstly, GOS synthesis studies were carried out in a continuous stirred type batch reactor (reactor-1) and the process outputs were optimized by the response surface method. Secondly, GOS synthesis studies were carried out in the osmotic membrane distillation system (reactor-2) and the process outputs were optimized by the response surface method. Finally, in both systems, GOS synthesis was performed under optimum reaction conditions obtained by the response surface method and the kinetic evaluation of the obtained reaction data was performed. Thus, the effects of the osmotic membrane distillation system on the kinetics of the GOS synthesis reaction were comparatively investigated.

The main aim of this study was to investigate GOS synthesis efficiency obtained from lactose enzymatically in the reactor-2 system, which is integrated into the osmotic membrane distillation process. Since the designed reactor-2 system is different from the membrane reactors used for GOS synthesis in the literature due to its working mechanism, the GOS synthesis results obtained from the reactor-1 system operated under the same reaction conditions are used to evaluate the obtained data properly.

In reactor-1, the effect of initial lactose concentration (LC), enzyme concentration (EC) and temperature (T) reaction parameters on total GOS (GY = GOS-3 + GOS-4) was investigated with the experiment set, which was determined by the Box Benhken experiment design. The GY value was between 8.47% and 26.92%. The effect of the same reaction parameters on GY in reactor-2 was examined in the factorial experimental design and the GY values obtained were determined between 18.7% and 28.63%. Mathematical models expressing the change of GOS-3 and GOS-4 values depending on the reaction parameters were also obtained in both reactors. Mathematical models obtained with the response surface methodology were able to successfully predict the process responses. Considering that reaction time is an important parameter affecting the GOS unit cost, experimental conditions providing the fastest GOS product composition can be predicted with the help of these models.

In reactor-2, compared to reactor-1, a maximum increase of 20,1% was obtained on the reaction efficiency. Obtaining high GOS productivity (GOSP) values in high lactose conversions at high initial lactose concentrations in reactor-2 indicates that the transgalactosylation activity of the enzyme is dominant compared to hydrolysis. It was also determined that low enzyme concentration and low reaction temperature provide better results for high GOSP values in high lactose conversions.

As a result of the kinetic evaluations, k_5 and k_5/k_{-5} values increased in reactor-2. This shows that transgalactosylation plays a more active role in reactor-2. In contrast to the similar k_3/k_{-3} ratio obtained in both reactors, high k_2 and k_5/k_{-5} values detected in reactor-2 points out that high level of E: Lac and E: Gal complex formation in reactor-2 affects GOS synthesis/GOS degradation rate positively. In this respect, it can be said that one of the important effects of the osmotic membrane distillation system on GOS synthesis is that the enzyme interacts more with lactose and keeps the E: Gal complex concentration at a high level in the reaction medium. In addition, glucose inhibition (k_6/k_{-6}) in reactor-1 and galactose inhibition (k_7/k_{-7}) in reactor-2 were dominant.

In Reactor-2, higher GY values were obtained at the same lactose conversion values compared to reactor-1 and this process took place in a shorter time. This indicates that the enzyme worked towards tansgalactosylation reaction to a greater extent in reactor 2 as compared to reactor 1. At the same time, the water removed from the reaction medium positively affected the GOS-4 formation performance of the enzyme.

As a result, the reactor-2 system has the potential to play a role in industrial GOS production, as it provides concentration of synthesized reaction products as well as the GOS synthesis. However, it is essential to keep the enzyme activity at a high level in order to increase the positive effect seen in this system, because it has been determined that there is a loss of activity in the enzyme in the following reaction times. In order to further increase the GOS synthesis efficiency, it is necessary to alleviate the monosaccharide inhibition on the enzyme activity with new approaches. Thus, it is thought that the GOS sythesis performance of the membrane supported process will increase even more. In this respect, an integrated process design in immobilization of the enzyme would provide improvement in the reactor-2 system and integration of the nanofiltration system to the reactor-2 system would positively affect the efficiency.

1. GİRİŞ

Prebiyotik etkili gıda bileşenleri faydalı sağlık etkili nedeniyle gıda sanayinde gittikçe artan bir pazar payına sahiptirler (Lamsal, 2012). Prebiyotik etkili fonksiyonel gıda bileşeni olarak nitelendirelen galaktooligosakkarit (GOS)'ler hazır bebek mamaları, aromalı yoğurtlar, fermente süt ürünleri, bisküvi ve meyve suları gibi pek çok gıdanın fonksiyonel özelliklerini geliştirmek açısından gıda endüstrisinde ilgi görmektedir (Playne ve Crittenden, 2009). Fonksiyonel ürünlere artan talebin ekonomik bir şekilde karşılanabilmesi için prebiyotik etkili gıda bileşenlerinin üretim süreçlerinin de bu talebi karşılayacak yönde geliştirilmesi gerekmektedir (Foda ve Lopez-Leiva, 2000; Gaur ve diğ., 2006). GOS'ler doğal kaynaklardan özütlenerek ya da kimyasal ve enzimatik sentez yoluyla üretilmektedir (Oku, 1996). Doğal kaynaklarda çok az miktarda bulunmaları ve kimyasal ile enzimatik süreçlerinin verimsizliği GOS'lerin pahalı olmasına neden olmaktadır (Husain, 2010) . Bu nedenle, yüksek verimde GOS sentezi sağlayan yenilikçi yaklaşımların denenmesi endüstriyel bir gerekliliktir.

GOS'ler, in vitro ortamda laktozdan, β-galaktosidaz enziminin katalizlediği glikozil transfer reaksiyonları yolu ile sentezlenmektedir (Illanes ve diğ., 2016b). β-galaktosidaz (β-D galaktozit galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23), ticari ismi ile laktaz, laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen temel bir enzimdir. GRAS kapsamında yer alan *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β-galaktosidaz enzimleri bu amaçla ticari olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Literatür verileri incelendiğinde, kullanılan enzim kaynağı ve çalışma koşullarına bağlı olarak, çok az çalışmada %40 (w GOS/w laktoz) ve üzeri düzeyde GOS sentezi gerçekleştirilmiş; aksine daha çok araştırmada %20-25 ya da daha az miktarda verim rapor edilmiştir (Córdova ve diğ., 2016; Gosling ve diğ., 2010; Manucci, 2009; Osman, 2016; Vera ve diğ., 2012). Laktozdan enzimatik yolla GOS üretiminde elde edilen düşük verimin temel nedeni, β-galaktosidaz enziminin hem transgalaktosilasyon hem de hidroliz reaksiyonlarını aynı anda katalizleme özelliğidir (Martınez-Villaluenga ve diğ., 2008). GOS sentezini etkileyen temel faktörler başlangıç laktoz konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı, enzim kaynağı ve

konsantrasyonu, reaksiyon süresi, pH ve inhibitör/aktivatör varlığıdır (Osman, 2016). Literatür incelendiğinde, yüksek verimlilikte GOS sentezinin sağlanabilmesi için başlangıç laktoz konsantrasyonunun en önemli parametre olduğu görülmektedir (Illanes ve diğ., 2016a; Osman, 2016; Vera ve diğ., 2012). Çünkü β-galaktosidaz enzimi, yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonlarında, GOS'leri oluşturma yönünde seçici olarak transgalaktosilasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir. Düşük başlangıç laktoz konsantrasyonlarında ise hidroliz reaksiyonları baskındır. Bu nedenle, laktozdan enzimatik yolla GOS üretim sürecinin, ozmotik membran distilasyon yöntemiyle gerçekleştirilmesinin, GOS üretim verimini arttıracağı fikri tezin temel hipotezini oluşturmuştur.

Uluslararası literatürde membran destekli enzimatik GOS sentezi üzerine çalışmalar mevcut olmasına rağmen (Chockchaisawasdee ve diğ., 2005; Córdova ve diğ., 2016; Czermak ve diğ., 2004; Das ve diğ., 2011; Foda ve Lopez-Leiva, 2000; Nath ve diğ., 2013; Pocedičová ve diğ., 2010) ozmotik membran distilasyon yönteminin enzimatik GOS sentezine entegrasyonu daha önce çalışılmamıştır. Literatürde yer alan membran destekli çalışmalarda reaksiyon ortamından enzimi inhibe edici etkileri olan glukoz ve galaktozun uzaklaştırılması amaçlanmış (Nath ve diğ., 2013) fakat sakkarit moleküllerinin molekül büyüklüklerinin birbirlerine yakın olması nedeniyle laktoz ve GOS kaybı yaşanmıştır (Córdova ve diğ., 2017). Ozmotik membran distilasyon yöntemi, sistemde kullanılan yüksek hidrofobisiteye sahip mikro-gözenekli bir membran ile enzimatik reaksiyon ortamından sadece suyun yüksek seçicilikle ayrımını sağlamak için kullanılmıştır. Bu sayede, membran destekli diğer GOS üretim süreçlerinde önemli bir problem olan substrat kaybına izin verilmeksizin, reaksiyon ortamının laktoz konsantrasyonu bazında daha konsantre bir hale dönüştürülmüştür. Bu bilgiler ışığında ozmotik membran distilasyon sistemi yüksek verimlilikte GOS sentezi hedefine yönelik olarak ilk kez GOS üretim süreçlerinde kullanılmıştır.

Ozmotik membran distilasyon sistemi ile oligasakkarit üretim süreç veriminin arttırılmasıyla, kolay ve ucuz bir şekilde temin edilebilen bir hammadde olan laktozdan ekonomik katma değeri yüksek bir gıda bileşeni olan prebiyotik etkili GOS'lerin yüksek verimlilikte üretimi sağlanmıştır. Sütte bulunan ve tamamına yakın bir kısmının, teknolojik işlemler sonucunda peynir altı suyuna geçtiği bilinen laktoz; değerli bir endüstriyel yan ürün niteliği taşımaktadır (Palai ve Bhattacharya, 2013). Günümüzde peynir altı suyu proteinlerinden ayrılan laktoz, ileri aşamada kurutularak

farklı gıda üretimlerinde katkı maddesi olarak değerlendirilmektedir (Sako ve diğ., 1999). Oysa laktoz katma değeri arttırılmış fonksiyonel bileşenlerin hammaddesi olarak önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir. Elde edilen sonuçlar, ucuz bir hammadde olan peynir altı suyunun katma değeri yüksek bir gıda bileşeni olan GOS'lerin ekonomik bir biçimde üretimi için kullanılabilmesini mümkün kılmıştır. Bu açıdan tez kapsamı peynir altı suyunun değerlendirilmesine yönelik alternatif bir yaklaşım içermektedir.

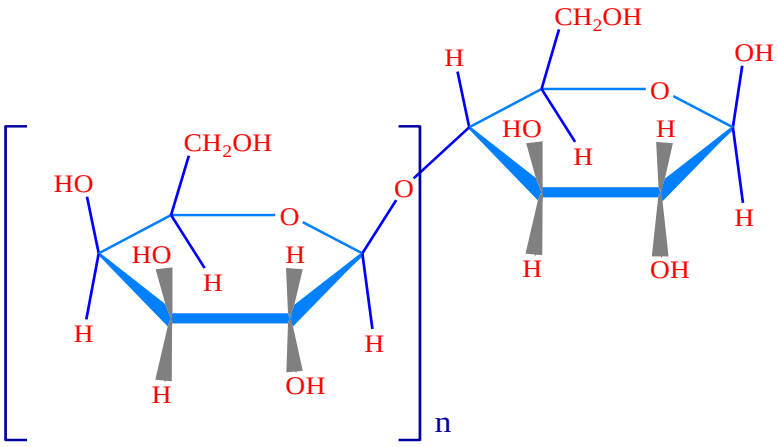
Bu doktora tez çalışmasının amacı ozmotik membran distilasyon yöntemiyle laktozdan enzimatik yolla yüksek verimlilikte GOS sentezlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda GOS sentezinde ozmotik membran distilasyon yönteminin verim üzerine etkisi incelenmiştir. Membran distilasyon entegrasyonu yapılan GOS üretim sürecinin performansını analiz etmek için sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör sisteminden elde edilen GOS sentez sonuçları kullanılmıştır. Her iki sistemde de serbest formda *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enzimi kullanılmıştır. Bu kapsamda tezde hedeflenenler;

- GOS sentez reaksiyonun sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörde (reaktör-1) gerçekleştirilmesi ve süreç parametrelerinin optimizasyonunun yapılması,
- Reaktör-1'deki GOS sentez reaksiyonunun ozmotik membran distilasyon ile entegrasyonu (reaktör-2) ve süreç parametrelerinin optimizasyonu,
- Optimum reaksiyon koşullarında çalıştırılan reaktör-1 ve reaktör-2 sistemlerinde yürütülen enzimatik GOS sentezinin kinetik temelde modellenmesi,
- GOS sentezi reaksiyonunun kinetiği üzerine enzimin kinetik davranışının reaktör-1 ve reaktör-2'de kıyaslamalı olarak incelenmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Galaktooligosakkaritler

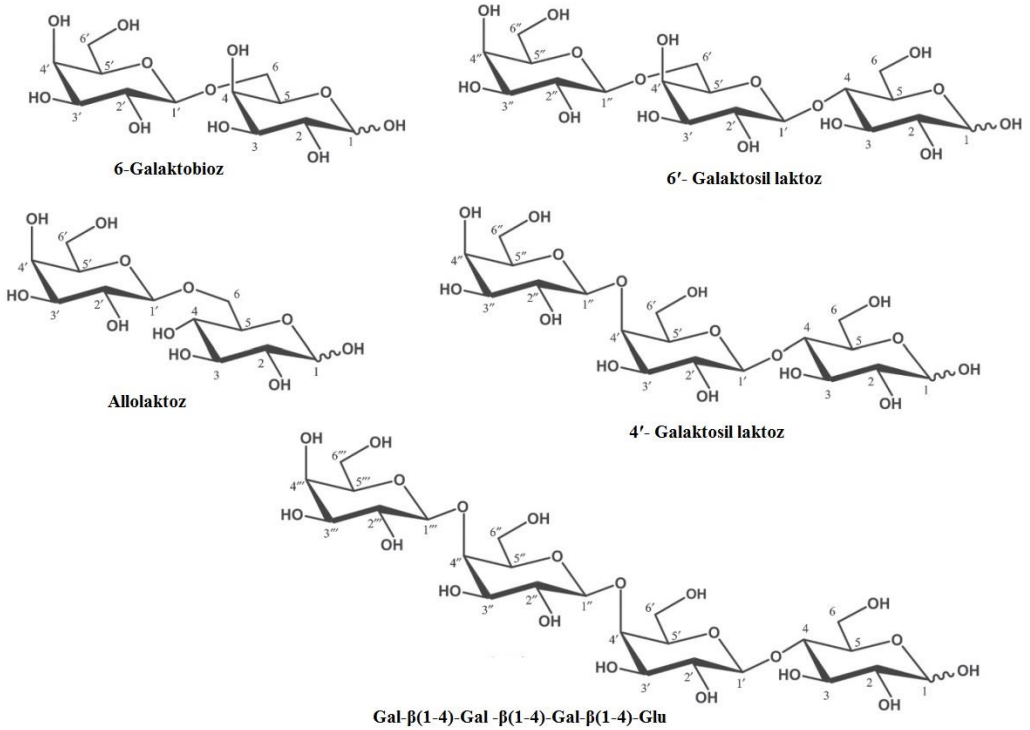
Prebiyotik etkili fonksiyonel gıda bileşeni olarak nitelendirelen galaktooligosakkaritler (GOS), laktozdan β-galaktosidaz enzimi tarafından sentezlenen önemli gıda kaynaklı oligosakkaritler sınıflarındandır (Gosling ve diğ., 2011). Prebiyotik etkili gıda bileşenleri faydalı sağlık etkili nedeniyle gıda sanayinde gittikçe artan bir pazar payına sahiptirler. GOS'ler ticari olarak üretimi yapılan başlıca prebiyotiklerdendir (Sako ve diğ., 1999). Sindirilmeyen oligosakkarit grubuna (NDO) dahil çözünebilir diyet lifi olarak kabul edilirler (Illanes ve diğ., 2016b). İnsan bağırsağında bifidobakteri ve laktobasil tarafından seçici olarak kullanılabilir ve böylece konak sağlığını iyileştirirler. İnsan sütünün doğal olarak bileşenlerinden biri olan GOS, soğan, sarımsak, muz, soya fasulyesi ve hindiba gibi çeşitli gıda çeşitlerinde eser miktarda bulunur (Sanz-Valero, 2009). Prebiyotik özellikleri ve insan sağlığı için yararlı aktivitelerinden dolayı GOS'ler nutrasötik olarak gıda endüstrilerinde büyük bir ilgi uyandırmışlardır (Palai ve diğ., 2012).



Şekil 2.1 : Galaktooligosakkaritlerin genel yapısı.

GOS molekülleri galaktosil-galaktoz zincirine terminal olarak bağlanmış glukoz molekülü içerir. GOS'lerin genel yapısı [galaktoz]n-glukoz olarak ifade edilebilir (Şekil 2.1) (Sako ve diğ., 1999). Laktozun yanı sıra hidroliz ile salınan glikoz ve galaktozun galaktosil alıcıları olarak işlev gördüğü transgalaktosilasyon reaksiyonları

ile elde edilirler (Tzortzis ve Vulevic, 2009). Enzim kaynağının türü ve reaksiyon ortamındaki laktozun başlangıç konsantrasyonuna göre galaktoz monomerleri birbirlerine farklı yapısal konfigürasyonlarda bağlanarak GOS'leri oluştururlar. Genellikle β(1-6) bağıyla birbirine bağlanmış galaktopiranosil gruplarının terminal glukopiranosil residüsine, α(1-4) glikozidik bağıyla bağlanması sonucu oluşurlar (Playne ve Crittenden, 2009).



Şekil 2.2 : Bazı GOS'lerin kimyasal yapısı (Plou ve diğ., 2016).

Ticari olarak üretilen GOS'nin çeşitli oligosakkaritlerin karışımları olduğu ve farklı yüzdelerde kalıntı laktoz ve monosakkarit (glukoz, galaktoz) içerdikleri düşünüldüğünde, fizikokimyasal özellikleri değişiklik göstermektedir. GOS'ler, laktozdan üretilen maddelerin, 2-8 arasında sakkarit ünitesi içeren bir karışımı olarak tanımlanabilirler (Tzortzis ve Vulevic, 2009; Villamiel ve diğ., 2014). GOS sentez reaksiyon koşullarına bağlı olarak polimerleşme derecesinde ve oligosakkaritlerin yapılarında bazı farklılıklar oluşabilir (Şekil 2.2).

Laktozdan oligosakkarit sentez reaksiyonlarında başlangıçta galaktobioz ve allolaktoz oluşur ancak allolaktoz baskın başlangıç ürünüdür. Daha sonra galaktotrioz dahil bir dizi daha yüksek polimerleşme derecesine sahip oligosakkarit oluşur (Playne ve Crittenden, 2009). Çizelge 2.1'de laktozun hidroliz, içsel düzenleşim ve transgalaktosilasyonu sonucu oluşan olası reaksiyon ürünleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 : Hidroliz, içsel düzenleşim ve transgalaktosilasyon ile laktozdan oluşan olası reaksiyon ürünleri (Playne ve Crittenden, 2009).

Genel Adı	Bileşen zinciri	Süreç
Laktoz	Gal (1→4) Glu	
Galaktoz	Gal	Hidroliz
Glukoz	Glu	Hidroliz
DİSAKKARİTLER		
	Gal (1●2) Glu	İçsel düzenleşim
	Gal (1●3) Glu	İçsel düzenleşim
Allolaktoz	Gal (1●6) Glu	İçsel düzenleşim
	Gal (1●3) Gal	Transgalaktosilasyon
Galaktobioz	Gal (1●6) Gal	Transgalaktosilasyon
TRİSAKKARİTLER		
6′- galaktosil laktoz	Gal (1●6) Gal (1●4) Glu	Transgalaktosilasyon
3′- galaktosil laktoz	Gal (1●3) Gal (1●4) Glu	Transgalaktosilasyon
	Gal (1●6) Gal (1●6) Glu	İçsel düzenleşim
Galaktotrioz	Gal (1●6) Gal (1●6) Gal	Transgalaktosilasyon
Tetrasakkaritler Pentasakkaritler Hekzasakkaritler Septasakkaritler Oktasakkaritler	Benzer düzenleşim ve ileri transgalaktosilasyonlar içeren bazı yan zincir oluşumları	

2.1.1 Kullanım alanları

Halkın beslenme bilincinin artmasıyla, sağlık açısından yararları kanıtlanabilir gıdalara olan talep artmıştır. Çeşitli ve önemli sağlık yararları nedeniyle, GOS uygulamaları dünya çapında yayılmıştır (Playne ve Crittenden, 2009). GOS'ler yoğurt, fırın ürünleri, içecekler, snack barlar gibi çeşitli ürünlerde bulunabilir (Vénica ve diğ., 2015). β–galaktosidazın GOS oluşturma aktivitesinden yararlanılarak işlenen süt ürünleri, daha düşük şeker içeriği (örneğin laktoz) ve daha yüksek çözünür lif (örneğin GOS) içerebilir ve bu nedenle diğer süt ürünleri ile güçlü bir rekabet avantajına sahiptirler. Dolayısıyla, bu durum GOS üretimine olan ihtiyacı arttırmaktadır (Gosling ve diğ., 2010).

GOS temel olarak bebek sütü formülü, takip formülü ve bebek mamalarında kullanılır (Playne ve Crittenden, 2009). Bebek gıdalarına ek olarak stabiliteleri nedeniyle bir çok gıdaya ek olarak katılabilirler. Fermantasyon ve fırınlama işlemleri sırasında GOS moleküllerinin parçalanmaması veya tüketilmemesi ekmek gibi fırınlanmış ürünleri

GOS ilavesi için uygun bir aday yapar (Sako ve diğ., 1999). Gıda sektörünün yanı sıra kozmetik ve ilaç endüstrileri gibi diğer alanlarda da GOS'nin fizikokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden yararlanılabilir. Prebiyotik oligosakkaritler seçici olarak insan derisi üzerinde "yararlı" bakterileri uyarabilir (Krutmann, 2009). GOS ürünleri, GOS bileşimine bağlı olarak prebiyotik aktivite ve diğer fizyolojik etkiler açısından değişirler (Torres ve diğ., 2010).

İnsan sağlığı açısından GOS, potansiyel olarak zararlı olduğu düşünülen mikrobiyotanın diğer üyelerine rağmen lümen içindeki bifidobakteri ve laktobasillerin büyümesini uyarabilir. Bu oligosakkaritler, bakteriyel yapışmanın meydana geldiği konakçı hücre reseptörlerini taklit etme özellikleri nedeniyle bakteriyel yapışmayı da önleyebilirler (Cho ve Finocchiaro, 2009). Fermantasyon süreçlerini geciktirme ve kolon kanseri ilişkili genotoksik bakteriyel enzimlerin aktivitesini azaltma kapasitelerine atfedilebilen gelişimi engelleyebilir (Shoaf ve diğ., 2006). Mineral emilimi GOS uygulaması ile uyarılabilir. Yaşlılarda ve hamile kadınlarda nispeten yaygın olan kabızlığı hafifletmek için kullanılabilir. Ayrıca GOS'nin dolaylı olarak mukozal ve sistemik bağışıklık aktivitesine etki ettiği ve alerjik belirtilere karşı koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (Rowland ve Tanaka, 1993).

2.1.2 Pazar durumu

GOS pazarı fonksiyonel gıda pazarının genişlemesi ile birlikte önemli ölçüde genişlemiştir. 1995 yılında GOS üretimi 15000 ton (çoğunluğu Japonya) iken Asya, Avrupa ve Amerika'da üretilmesi ile birlikte 2020 yılı için üretim miktarı 175000 ton olarak tahmin edilmektedir (Illanes ve diğ., 2016a). Market Insights Report şirketinin 2020 raporuna göre küresel GOS pazar büyüklüğünün 2025 yılına kadar 1,58 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmekte ve 2019-2025 döneminde yıllık bileşik büyüme oranında %9,6'lık bir artış beklenmektedir.

GOS'lerin prebiyotik olarak bir çok farklı özellikleri olmasına karşın insan sütü oligosakkaritlerini taklit etmesi nedeniyle yenidoğan ve devam bebek formüllerinin takviyesinde önemli bir rol oynar. Artan bebek nüfusu ve artan tüketici alım paritesi nedeniyle bebek maması ürünlerinde GOS kullanımı, genel pazar büyümesini teşvik edebilir. Artan bebek popülasyonu, bebek formülü tedarikini arttırmak için gereklidir, bu nedenle GOS'lere olan ihtiyaç önemli ölçüde artacaktır (Data Bridge Market Research). Ayrıca, değişen beslenme alışkanlıkları, tat tercihleri ve artan fast-food

tüketimi nedeniyle yiyecek ve içecek endüstrisindeki büyüme, genel pazar büyümesini teşvik edebilir. İşlenmiş ve fonksiyonel gıdalarda GOS'lerin artan kullanımı ürün talebini artırabilir.

Friesland Campina, Baolingbao, Nissin-sugar, Yakult, Taiwan Fructose, Ingredion, New Francisco Biotechnology, Kerry ve Quantum Hi-Tech şirketleri küresel pazarda GOS üretiminde önde gelen firmalardır.

2.1.3 Sentez mekanizması

GOS'lerin enzimatik yolla sentezlenmesi aşamasında glikosiltransferazlar (EC 2.4) ve glikohidrolazlardır (EC 3.2.1) olmak üzere iki tip enzim kullanılır. Galaktosiltransferazlar, aktive edilmiş donör moleküllerinden spesifik alıcı moleküllere şeker parçalarının transferini katalize ederek glikozidik bağlar oluşturur. Bu enzimler yüksek oranda regio ve stereo seçici ve yüksek verimde GOS sentezleyebilmelerine rağmen şeker nükleotitlerine olan ihtiyaçları, hali hazırda bulunmamaları ve yüksek maliyetler gibi nedenlerden dolayı endüstriyel GOS üretimi için tercih edilmezler. Galaktohidrolazlar daha az stereo seçici olmalarına karşın glikosiltransferazlardan çok daha kolay elde edilebilirler (Playne ve Crittenden, 2009).

GOS molekülleri (örneğin, Gal β(1→4) Gal β(1→4)Glu) tipik olarak, transgalaktosilasyon olarak bilinen bir reaksiyonda β -galaktosidazın laktoz üzerindeki enzimatik aktivitesi ile sentezlenirler. Bu kimyasal tepkimeyi β–glukosidaz ve β–glikosidaz gibi karbonhidrat modifiye edici enzimler de katalizleyebilmektedirler. β-glukosidazlar (E.C. 3.2.1.21), tek bir polipeptit zinciri üzerinde fonksiyonel katalitik özelliklere sahip küçük, monomerik enzimlerdir (Kaur ve Panesar, 2020). Bu enzimler, glikozil kalıntılarını ve oligosakkariti serbest bırakmak için karbonhidrat molekülünün O-glikosidik bağlarının hidrolizini katalize ederler (Li ve diğ., 2013). Glikozit hidrolaz ailesinin enzimlerinden biri olan β-glikosidazlar arkeler, öbakteriler ve ökaryotlar gibi farklı mikroorganizmalardan izole edilebilir ve karakterize edilebilir. β-glikosidazlar 49 kDa moleküler ağırlığa sahip küçük monomerlerdir ve oligosakkaritlerin üretimi için (1,4)-glikosidik bağın hidrolizini katalize etmekten sorumludurlar (Han ve diğ., 2001; Henrissat ve diğ., 1995). β–galaktosidaz uzun zamandır süt endüstisinde laktozu hidrolize edip glikoz ve galaktoz üretimini gerçekleştirmek için kullanılan hidrolitik enzim sınıfına ait bir enzimdir (Gosling ve diğ., 2010). β-glikosidazlar ve β-glukozidazlar gibi enzimler, karbonhidratları hidroliz

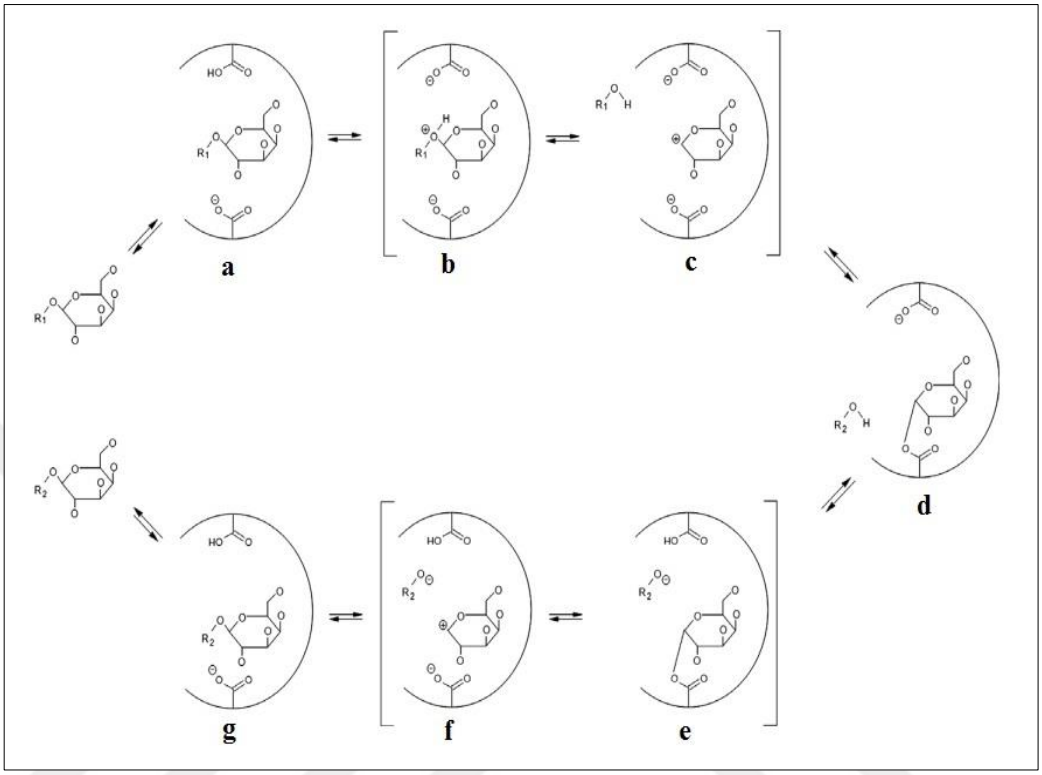
edebilmelerinin yanı sıra transglikosilasyon reaksiyonlarını katalize edebilmesine rağmen, β-galaktosidaz GOS üretmek için süt endüstrisinde en çok kullanılan enzimdir. *Kluyveromyces* ve *Aspergillus* türlerinden elde edilen β-galaktosidaz GRAS kapsamında değerlendirildiği için endüstride tercih edilir (Meyer ve diğ., 2015).

β-galaktosidazlar laktoz hidrolizi sırasında galaktoz ve glikoz arasındaki β(1→4) glikozidik bağını parçalayarak glikozun ortama salınmasına yol açarlar. Daha sonra, enzim galaktosil kısmını hidroksil grupları içeren alıcı moleküllere aktarır. Bu alıcı su olduğunda galaktoz oluşur (hidroliz). Ortamda başka bir alıcı mevcut olduğunda ise yeni bir glikozit veya oligosakkarit oluşturulabilir (Mahoney, 1998). Yüksek laktoz konsantrasyonu koşullarına sahip reaksiyon ortamlarında, laktozun kendisi hem substrat hem de galaktosil alıcısı olarak hareket ederek daha yüksek zincir uzunluğuna sahip sakkarit oluşumuna olanak sağlar. Laktoz konsantrasyonu yüksek ortamlarda trisakkaritler oluşur ve oluşan bu trisakkaritler tetrasakkaritler oluşturmak için galaktosil alıcıları olarak işlev görebilirler. Bu şekilde, di-, tri-, tetra- ve daha yüksek zincirli oligosakkaritleri içeren bir oligosakkarit karışımı laktozdan üretilir (Osman, 2016). Oluşan oligosakkaritlerin tipi ve nispi bileşimi enzimin transferaz aktivitesinin hidrolitik aktivitesine oranına bağlıdır. Bu oran ise enzim kaynağı ve özelliklerine, reaksiyon ortamındaki farklı galaktosil alıcılarının nispi konsantrasyonuna ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Martınez-Villaluenga ve diğ., 2008).

Laktozun laktaz enzimi ile GOS'ye dönüştürülmesi, farklı polimerizasyon derecelerine (DP) sahip GOS, reaksiyona girmemiş laktoz ve monomerik şekerler (glukoz ve galaktoz) içeren şeker karışımları ile sonuçlanır. Son zamanlardaki ve gelecekteki gelişmeler GOS üretiminde daha saf ve daha verimli karışımlar sağlamayı amaçlamaktadır. Yüksek GOS içerikli karışımlar üretmek için enzim hidrolize göre transgalaktosilasyon reaksiyonunu katalize etmek için iyi bir kabiliyete sahip olmalı ve aynı zamanda oluşan GOS için laktozun afinitesine göre düşük bir değere sahip olmalıdır (Torres ve diğ., 2010).

Literatür incelendiğinde transgalaktosilasyon mekanizması hakkındaki yayınlanmış veriler, doğrudan transgalaktosilasyonu gözlemlemek yerine hidrolitik reaksiyondan çıkarımlar yapılarak elde edilmiştir. Aşağıdaki şekilde R_1, galaktosidaz substratının aglikan kısmını; R_2, nükleofil galaktosil akseptörünü temsil eder. “a”, aktif bölgeye giren substratı; “b”, glikozidik oksijenin protonasyonunu; “c” ‘deki R_1OH, ayrılan

grubu; “d”, galaktosil-enzim ara maddesinin oluşumunu; “e”, gelen nükleofilin (su veya başka bir akseptör) aktivasyonunu; “f” ve “g”, galaktosil-enzim ara maddesinin hidrolizini temsil eder (Osman, 2016).

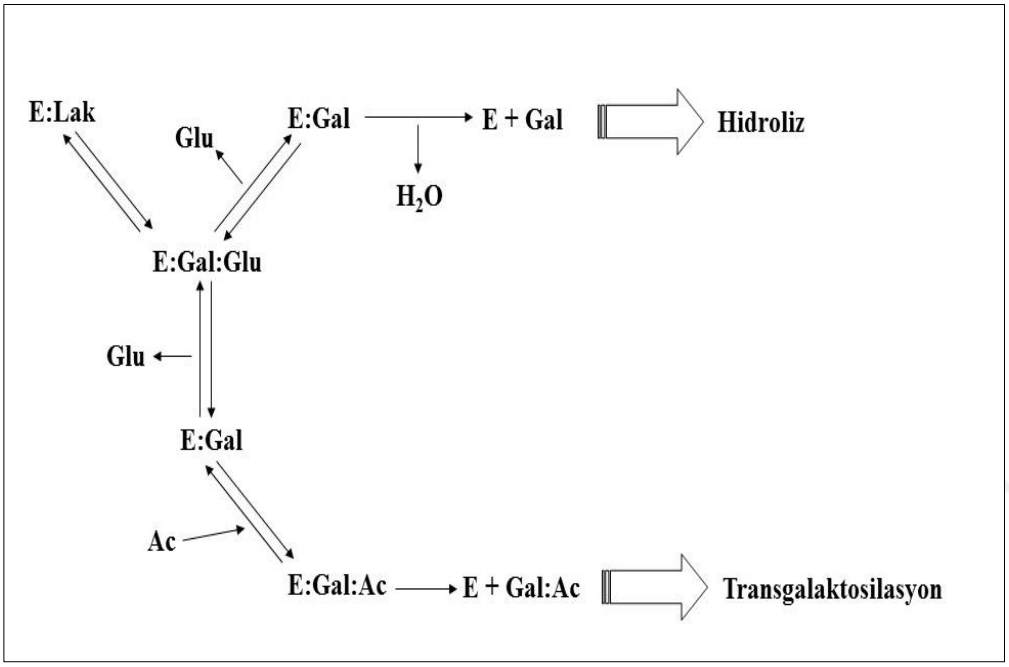


Şekil 2.3 : Galaktosidazlar üzerindeki β-galaktosidaz aktivitesi için reaksiyon mekanizması (Gosling ve diğ., 2010).

β-galaktosidaz aktivitesi sırasında ilk olay, bir substrat molekülünün kenetlenmesidir. Substrat laktoz olduğunda glikan kısmı galaktosil ve aglikan kısmı ise glikozildir (Şekil 2.3'te R_1 grubu olarak temsil edilir). β-galaktosidaz, beta stereokimyanın glikozidik bir bağıyla bağlanmış galaktosil glikanlara sahip substratlar için yüksek substrat spesifiklik gösterirken, aglikan kısmı için geniş bir spesifiklik karakterine sahiptir. Galaktosidaz substratı GOS olduğunda R_1 grubu oligosakkarit eşiti olarak kabul edilebilir (Gosling ve diğ., 2010). Substrat molekülü β-galaktosidazın aktif bölgesine yerleştikten sonra kataliz meydana gelebilir. Galaktosil kısmı ile enzim arasında kovalent bir bağ oluşur ve ardından galaktosil bir nükleofil akseptöre aktarılır (Şekil 2.4). Reaksiyonun ilerleyişi bu noktada galaktosil akseptörünün spesifikliğine göre değişiklik gösterir. Galaktosil akseptörü su olduğunda (Şekil 2.3’te R_2=H), serbest galaktoz salınır. Bu reaksiyonun sonucu galaktosil hidrolizi olup hem laktozun hem de GOS'nin bozulmasına yol açar. Reaksiyon galaktosil transferi ve GOS

sentezine doğru yöneldiğinde galaktosil akseptörü başka bir sakkarittir (R_2=glukoz, galaktoz, laktoz veya bir GOS molekülü).

Farklı enzimlerin aynı laktoz konsantrasyonunda değişen miktarlarda GOS verimi sağladığı için farklı enzimlerin su ve sakkaritler için farklı seçicilikler sergilediği bilinmektedir. GOS verimlerindeki bu farkın, farklı kaynaklardan gelen β-galaktosidazlar arasındaki yapısal ve/veya mekanik farklılıkların bir sonucu olduğu görülmektedir. GOS ürünlerinin yapıları, farklı β-galaktosidazların yapı ve/veya mekanizmasındaki farklılıklar nedeniyle de değişebilir (Nguyen ve Haltrich, 2013).



Şekil 2.4 : Laktoz hidroliz ve transgalaktosilasyonunun şematik gösterimi (E=enzim, Lak= laktoz, Glu= glukoz, Gal= galaktoz, Ac= galaktosil akseptörü) (Osman, 2016).

β-galaktosidaz ile laktozun GOS'ye dönüştürülmesi hidroliz ve transgalaktosilasyon arasında rekabet içeren kinetik kontrollü bir reaksiyondur (Torres ve diğ., 2010). Bu dönüşüm sırasında, D-galaktoz ve D-glikoz üreten laktozun termodinamik olarak tercih edilen hidrolizi, çeşitli yapılarda galaktoz bazlı di- ve oligosakkaritlerin kompleks karışımını üreten transferaz aktivitesi ile rekabet eder (Tzortzis ve Vulevic, 2009). Bu nedenle, istenen ürünün maksimum verim noktasını belirlemek için reaksiyon süresi önemli bir parametredir.

2.1.4 Sentez sürecine etki eden faktörler

GOS verimi başlangıç laktoz konsantrasyonu, sıcaklık, enzim kaynağı ve konsantrasyonu, GOS sentez süresi (reaksiyon süresi), inhibitör varlığı ve pH gibi işlem koşullarına bağlıdır.

2.1.4.1 Başlangıç laktoz konsantrasyonu

GOS sentez reaksiyonunu etkileyen en önemli parametredir. Transgalaktosilasyon reaksiyonunu kolaylaştırmak ve verimi arttırmak için başlangıç laktoz konsantrasyonu yüksek olmalıdır (Kaur ve Panesar, 2020). Yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip bir reaksiyon ortamında laktozun galaktosil alıcısı olma şansı artmaktadır (Zhou ve Chen, 2001). Genel olarak hidroliz ve transgalaktosilasyon reaksiyonlarının aynı anda meydana geldiği ve hidroliz reaksiyonunun düşük laktoz konsantrasyonunda hakim olduğu, yüksek laktoz konsantrasyonlarında ise GOS oluşumunun hakim olduğu gözlemlenmiştir (Neri ve diğ., 2009b). Literatürde laktoz konsantrasyonu arttıkça GOS sentez veriminin ve polimerizasyon derecelerinin arttığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (Neri ve diğ., 2009a; Vera ve diğ., 2012). Literatürde farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında farklı enzim kaynakları ile yapılan bazı çalışmalarda elde edilen GOS verimleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 : Farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında elde edilen GOS verimleri.

Enzim Kaynağı	Reaksiyon Koşulları	Verim (w/w)	Referans
A.oryzae	50 g/L, 40 °C, pH 4,5	%11	(Albayrak ve Yang, 2002)
A.oryzae	500 g/L, 40 °C, pH 4,5	%26	(Albayrak ve Yang, 2002)
B.circulans	55 g/L, 40 °C, pH 6	%22	(Palai ve diğ., 2012)
B.circulans	525 g/L, 40 °C, pH 6	%39	(Palai ve diğ., 2012)
K.lactis	50 g/L, 40 °C, pH 6	%3	(Delgado ve diğ., 2016)
K.lactis	250 g/L, 40 °C, pH 6	%12	(Delgado ve diğ., 2016)

2.1.4.2 Sıcaklık

Laktoz çözünürlüğü sıcaklık ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Bu nedenle GOS üretimi reaksiyon sıcaklığını artırarak iyileştirilebilir (Chen ve diğ., 2003). Yüksek sıcaklıklar substrat konsantrasyonunu arttırırken konsantre reaksiyon ortamı hidroliz reaksiyonunu baskılar ve GOS sentezinde artış sağlar. Reaksiyon hızı ve enzim stabilitesi de reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (Kaur ve Panesar,

2020). Kaynağının türüne göre her enzim için farklı bir optimum sıcaklık değeri vardır. Bu değerin üstündeki reaksiyon sıcaklığında enzim denatüre olabilmektedir (Zhou ve Chen, 2001). Aynı zamanda, yüksek reaksiyon sıcaklıklarının maillard reaksiyonunu tetiklediği rapor edilmiştir (Bruins ve diğ., 2003).

2.1.4.3 Enzim kaynağı ve konsantrasyonu

β-galaktosidaz (β-D galaktozit galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23), ticari ismi ile laktaz, laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen temel bir enzimdir (Kaur ve Panesar, 2020). GRAS kapsamında yer alan *Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β-galaktosidaz enzimleri bu amaçla ticari olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Husain, 2010). Enzim kaynağına bağlı olarak laktaz enzimlerinin maksimum GOS miktarı sağladıkları laktoz dönüşüm değerleri farklılık göstermektedir (Sanz-Valero, 2009). Kesikli bir sistemde *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz kullanılarak %40 (w/v) başlangıç laktoz konsantrasyonunda 47 °C'de %58 laktoz dönüşümünde %28 GOS verimi elde edilmiştir (Vera ve diğ., 2011). *B.circulans* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise %10 (w/v) başlangıç laktoz konsantrasyonunda 60°C'de %54 GOS verimine ulaşılmıştır. Termofilik *archeon thermus caldophilus* kaynaklı β-galaktosidaz kullanılan bir çalışmada %50 (w/v) başlangıç laktoz konsantrasyonunda %90 laktoz dönüşümüde ise %75 GOS verimine ulaşılmıştır (Torres ve diğ., 2010).

Uygun enzim seçilirken GOS verimi dışında birçok faktör düşünülerek seçilir. Enzim kaynağına göre sentezlenen GOS'lerin türü önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Palai ve diğ., 2012). *A. oryzae* kaynaklı β-galaktosidazlar daha çok GOS-3, çok az miktarda GOS-4 ve ihmal edilebilir düzeyde GOS-2 ve GOS-5 üretirler (Osman, 2016). *K.marxianus* önemli miktarda GOS-2 üretirken, *B.circulans* GOS-2'den GOS-5'e varan dengeli bir üretim sağlamaktadır (Panesar ve diğ., 2006). GOS'lerin prebiyotik potansiyeli temel olarak GOS-3 ve GOS-4 ile ilişkili olduğundan, endüstriyel üretim için GOS-2 zincirlerinden daha büyük üretim kabiliyetine sahip enzimler tercih edilmelidir (Gosling ve diğ., 2010).

Enzim kaynağı seçiminde bir diğer parametre ise enzimin inhibisyon direncidir. Reaksiyon süresince reaksiyon ortamında konsantrasyonları artan glukoz ve galaktoz gibi monosakkaritlerin inhibisyon etkisi enzim kaynağına bağlı olarak değişir. Enzim

konsantrasyonundaki artış ayrıca reaksiyon karışımındaki inhibitör düzeyini yükseltmektedir. Bu nedenle enzim miktarının optimize edilmesi ve özellikle düşük enzim konsantrasyonlarında (<%0,1 (w/w)) çalışılmasının daha ekonomik olduğu bildirilmiştir (Boon ve diğ., 2000).

2.1.4.4 Reaksiyon süresi

Laktoz ve GOS aynı anda β-galaktosidaz tarafından sentezlenip hidrolize edildiği için tepkime süresi istenilen seviyede GOS üretimi için oldukça önemlidir (Mahoney, 1998). GOS sentez reaksiyonu ilerledikçe hidrolitik reaksiyon baskın olmaya başlar ve GOS sentez verimliliğini azaltır. Daha yüksek GOS verimi elde etmek için reaksiyon, verimin maksimum olduğu noktaya yakın bir noktada durdurulmalıdır (Kaur ve Panesar, 2020). GOS verimi kesikli bir reaktörde ara laktoz dönüşümlerinde elde edilmektedir.

2.1.4.5 İnhibitör ve pH

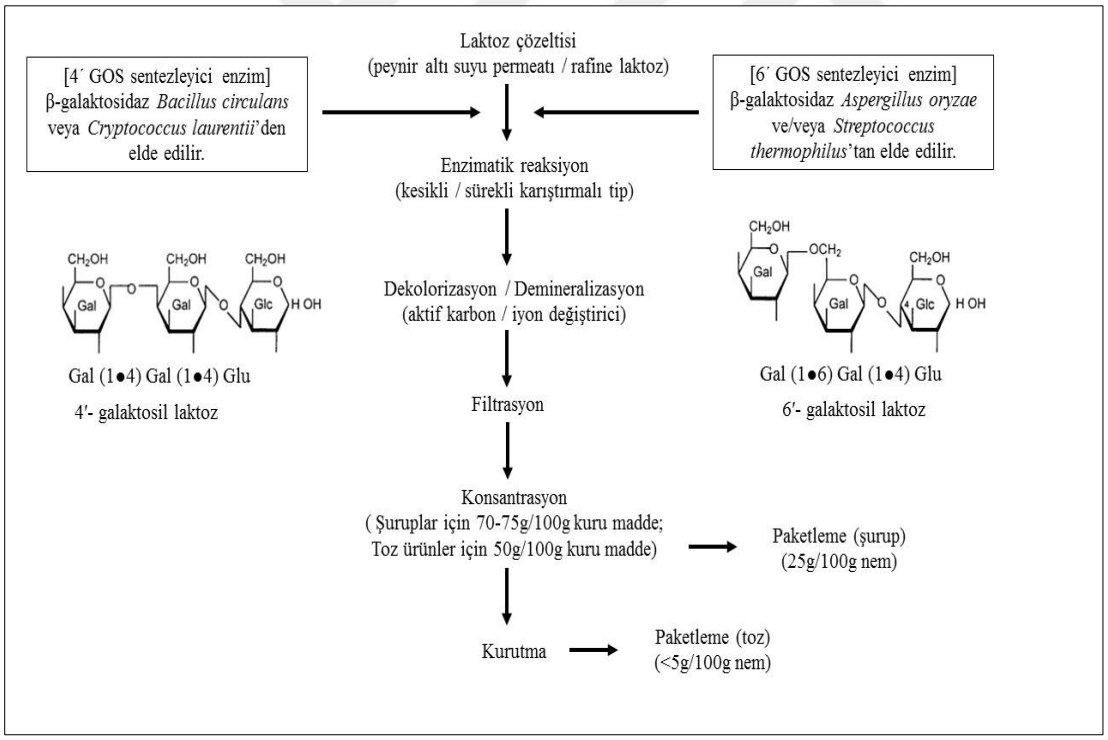
GOS üretimi birçok β-galaktosidaz için hidroliz inhibitörü olarak tanınan glikoz ve/veya galaktoz konsantrasyonundan da etkilenebilir (Hatzinikolaou ve diğ., 2005; Torres ve diğ., 2010). GOS sentez reaksiyonu sırasında disakkaritlerin hidrolizi nedeniyle reaksiyon ortamına salınan monosakkaritler, konsantrasyonları belirli bir düzeye eriştiğinde, GOS oluşumunu sınırlandırmaktadır (Rustom ve diğ., 1998). Birçok β-galaktosidaz enziminin reaksiyon süresince ortama salınan monosakkaritler tarafından inhibe oldukları belirtilmiştir. Literatür incelendiğinde *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enzimi için glukoz inhibisyonundan bahsedilmese de, çoğu bakteriyel ve maya kaynaklı enzimler için kompetitif ve non-kompetitif inhibisyonlar rapor edilmiştir (Palai ve diğ., 2012).

GOS sentez reaksiyonu için optimum pH değeri kullanılan enzim karakteristiğine göre değişmektedir (Kaur ve Panesar, 2020). Örneğin, *Aspergillus oryzae* kaynaklı laktazın optimum pH değeri 4,5 iken; *Bacillus circulans* için bu değer 6,5; *Kluyveromyces lactis* için ise 6,0'dır (Sanz-Valero, 2009).

2.2 Endüstriyel Galaktooligosakkarit Üretimi

Endüstriyel GOS üretimi şematik olarak Şekil 2.5'te gösterilmiştir. GOS'nin endüstriyel üretimi için rafine laktoz veya konsantre edilmiş peynir altı suyu

permeatından elde edilen yüksek konsantrasyona sahip laktoz çözeltisi kullanılır (Lamsal, 2012). GOS sentezi için kesikli reaktör, sürekli karıştırmalı tanklı reaktör, ince boşluklu fiber membran (hollow fiber) reaktör, sabit yataklı ve sıvılaştırılmış yataklı reaktör gibi çeşitli reaktör tasarımları ve konfigürasyonları tasarlanmıştır (Boon ve diğ., 2000b; Botelho-Cunha ve diğ., 2010) Kesikli çalışma modu, kullanım kolaylığı ve olası mikrobiyal kontaminasyonun kontrolünü sağlaması nedeniyle trangalaktosilasyon işlemleri için tercih edilmektedir. Sürekli sistemler ise reaksiyon süresi boyunca çoğunlukla sabit galaktosil alıcı bileşimi ve konsantrasyonu sağladığı için içeriği tanımlanmış standart GOS ürün karışımları üretilmesine olanak sağlar (Sako ve diğ., 1999). Reaksiyon içeriğindeki monosakkaritlerin ayrımı genellikle aktif karbon veya iyon değişim reçineleri içeren kromatografik yöntemler ile yapılır (Hernández ve diğ., 2009). Daha sonra filtrasyon işlemi yapılır. Şurup ürünleri için buharlaştırıcılarda konsantre işlemi, toz ürünler için ise püskürtmeli kurutucularda kurutma işlemi yapılır ve elde edilen ürünler paketlenir (Lamsal, 2012).



Şekil 2.5 : Endüstriyel GOS üretimi (Lamsal, 2012; Sako ve diğ., 1999).

Ticari GOS ürünleri genellikle şeffaf şuruplar veya beyaz tozlardır ve her iki durumda da, farklı polimerizasyon derecelerine sahip oligosakkaritleri, reaksiyona girmemiş laktoz ve monosakkaritler içeren karışımlardır (Torres ve diğ., 2010). Çizelge 2.3'te bazı ticari GOS imalatçılarını, GOS kompozisyonunu ve bunları üretmek için

kullanılan enzim kaynakları gösterilmektedir. Laktozdan GOS'nin ticari üretiminin çoğu şu anda Japonya ve Avrupa'da yapılmaktadır, ancak ABD'deki bir şirketin de piyasada GOS ürünleri bulunmaktadır (Lamsal, 2012).

Çizelge 2.3 : Ticari olarak üretilen GOS ürünlerinin içerikleri ve kullanılan enzim sistemleri (Lamsal, 2012; Torres ve diğ., 2010).

Ürün	Firma	Enzim kaynağı	Toplam GOS (g/100g)	Galaktoz (g/100g)	Laktoz (g/100g)
CUP-oligo (syrup: Cup-Oligo H70; powder: Cup-Oligo P)	Nissin Sugar Manufacturing Co., Tokyo, Japan	*Cryptococcus laurentii*	70	25-30	-
Oligomat 55 (Syrup ve powder); ve TOS-100	Yakult Honsha, Tokyo, Japan	*A. oryzae ve S. thermophilus*	50–60 (oligomate); 99–100 (TOS-100)	18–39 (oligomate); 0 (TOS-100)	10–22 (oligomate)
Bimuno powder ve syrup	Clasado Ltd, Milton Keynes, UK	*Bifidobacterium bifidum*	48-55	12	22
Vivinal GOS	Friesland Foods Domo, Zwolle, Netherlands	*Bacillus circulans*	57-59	0,8-1,3	10-23
Purimune powder	Corn Products Intl, Inc., IL, USA	*Bacillus circulans*	90-92	0,5	7-10

2.3 Galaktooligosakkarit Sentezinin Modellenmesi

Literatürde farklı yaklaşımlar uygulanarak GOS sentez mekanizmasının modellenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Chen ve diğ., 2003; Mueller ve diğ., 2018; Palai ve diğ., 2012). GOS sentez mekanizması özdeş nükleofil ve substrata sahip olması (hidroliz ve transferaz reaksiyonlarının eş zamanlı gerçekleşmesi) nedeniyle karmaşık bir süreçtir. Bu duruma bağlı olarak görünür hız sabitleri açısından değerlendirilmesi

zordur. GOS sentez mekanizması üzerine çalışma yapan yazarlar ilk önce bir reaksiyon yolu önerirler. Hız sabitleri kataliz sırasında her aşamaya tahsis edilir ve daha sonra deneysel olarak tahmin edilirler. β-galaktosidaz enziminin reaksiyon mekanizmasının literatürde ayrıntılı olarak bilinmesi bu yaklaşımı çekici kılmaktadır. Deneysel tahmin gerektiren hız sabitlerinin sayısını sınırlamak için reaksiyon mekanizmasında sadeleştirmeler yapılır. Fazla sayıda sadeleştirme yapılması modelin doğruluğunu olumsuz etkilerken modelin kurgulanmasını daha uygun hale getirebilir. Bu nedenle, modelin doğruluğu ve fizibilitesi arasında bir denge bulunması şarttır (Gosling ve diğ., 2010). Çok sayıda bilinmeyen kinetik parametre nedeniyle bazı yazarlar reaksiyon aşamalarının sayısını, özellikle glikoz ve galaktoz inhibisyonunu veya her ikisini de eleyerek reaksiyon mekanizmasını basitleştirmeye çalışmışlardır. Fakat, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidazın transgalaktosilasyon aktivitesinde glukozun (Vera ve diğ., 2011) ve galaktozun (Mueller ve diğ., 2018) önemli ölçüde inhibe edici etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Iwasaki ve diğ. (1996) enzimatik GOS sentez reaksiyonunda, hidroliz ve transferaz tepkimelerinin aynı anda gerçekleşmesinin matematiksel analizi zorlaştırdığını ifade etmişlerdir. Bu nedenle, GOS sentez reaksiyonunun stokiyometrik olarak basit bir modelle temsil edilebileceğini varsaymışlardır. 13 denklemden oluşan bir biyokimyasal reaksiyon zinciri ile GOS sentez reaksiyon modelini oluşturmuşlar ve oluşturdukları modelde 3 ve 4 zincirli GOS oluşumlarına yer vermişlerdir. Boon ve diğ. (1999) ise önerdikleri modelde literatürdeki bazı modellerin aksine, galaktoz mutarotasyonu (Bakken ve diğ., 1992), allolaktoz üretimi (Huber ve diğ., 1976) ve 3 ile 4 zincirli sakkaritlerin ayrı ayrı üretimi (Iwasaki ve diğ., 1996) gibi durumları hesaba katmamışlardır. Önerdikleri sadeleştirilmiş reaksiyon modelinde King-Altman yöntemi ile hız parametrelerini elde etmişlerdir.

Kim ve diğ. (2004) önerdikleri GOS sentez reaksiyon modeli ile sadece laktoz hidrolizinde değil aynı zamanda çeşitli substrat konsantrasyonlarında da deneysel verilerle iyi bir uyum yakalamışlardır. Önerdikleri model, allolaktoz oluşumunu, glukozun alıcı olarak reaksiyonunu ve enzim konsantrasyonunu parametre olarak içermektedir. Bu modelde, laktoz hem substrat hem de daha zayıf bir glikosil alıcısı olarak işlev görür; ancak yüksek konsantrasyonlarda, 3 zincirli GOS sentezi için alıcı olma şansı daha fazladır. Galaktoz, alıcı olarak glukoz veya laktoz ile daha ileri transgalaktosilasyon reaksiyonları için galaktosil-enzim kompleksini oluşturmak

üzere serbest enzime bağlanır, ancak galaktozil-enzim kompleksine bağlanmaz. Bununla birlikte, glukoz, galaktosil-glukoz disakkaritleri oluşturmak için yalnızca galaktosil-enzim kompleksi ile reaksiyona girerek, transgalaktosilasyon reaksiyonları için daha iyi bir alıcı görevi görür. Reaksiyon mekanizmasında sadece bir adet hız sınırlayıcı adımın yer aldığı ve diğer adımların hepsinin tersine çevrilebilir olduğu varsayılır.

Neri ve diğ. (2009a) kullandıkları modelde trisakkarit sentezi ve laktoz hidroliz reaksiyonlarına glukoz ve galaktoz kompetetif inhibisyonunu da eklemişlerdir. Model dört bağımlı durum değişkenini (laktoz, glukoz, galaktoz ve trisakkarit konsantrasyonu) ve sekiz adet kinetik parametreyi içermektedir. Bu modelde su veya laktoz, galaktosil-enzim kompleksi ile reaksiyona girebilir ve oligosakkarit sentezinin tersinir olduğu varsayılmıştır. Substrat olarak sadece laktoz kullanımını öngören modelde galaktoz mutarotasyonu, tetresakkarit oluşumu, difüzyon sınırlamaları ve zamana bağlı enzim inaktivasyonu dikkate alınmamıştır.

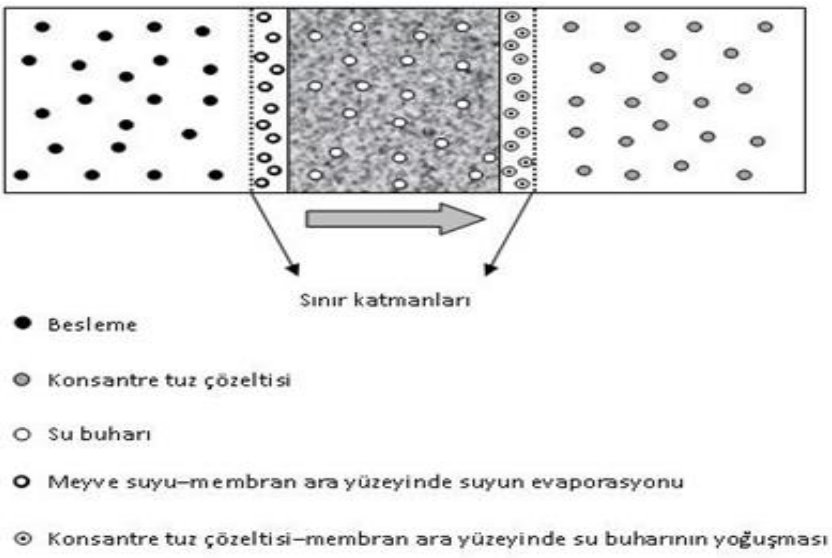
Palai ve diğ. (2012), Palai ve Bhattacharya (2013), Palai ve diğ. (2014) ve Palai ve diğ. (2016) GOS sentezinde kinetik analiz yapabilmek amacıyla temeli Michaelis-Menten modeline dayanan reaksiyon modelleri kullanmışlardır. Palai ve diğ. (2012) reaksiyon mekanizmasını sadeleştirmek adına dört basamaklı bir model kullanmıştır. Bu modelde sentezlenen 3 ve 4 zincirli GOS'ler tek ürün olarak "GOS" ile ifade edilmiştir. Glukoz ve galaktoz arasında bir ayrım yapılmamış ve monosakkarit olarak ifade edilmişlerdir. Ayrıca enzim inhibisyonu ihmal edilmiştir. Palai ve diğ. (2014) ve Palai ve diğ. (2016) ise yaptıkları çalışmada beş basamaklı reaksiyon modelini kullanmışlardır. Bu modelde glukoz ve galaktoz oluşumu ayrı ayrı ele alınırken GOS hidrolizi ve glukozun kompetitif inhibisyonu da hesaba katılmıştır. 3, 4 ve olası daha yüksek zincirli GOS'ler "GOS" olarak ifade edilmiştir. Palai ve Bhattacharya (2013) ise altı basamaklı reaksiyon modeli kullanmışlardır. Bu modelde diğer çalışmalardaki modellerin aksine kompetetif tüm reaksiyonlar yer almaktadır. Fakat enzimin galaktoz inhibisyonuna yer verilmemiştir.

Mevcut GOS sentezi modelleri, modelin aşırı basitleştirilmesi ve hız sabitlerinin uygun olmayan bir biçimde tahminlenmesi gibi nedenler sebebiyle deneysel veriler ile modelin uyumu arasında bir denge yakalamaya çalışır (Gosling ve diğ., 2010). Literatürde yapılan çalışmalarda kinetik parametreleri raporlamak için uygulanan prosedür, her bir deney setinde her ayrı uyumun parametre, standart hata veya standart

sapmasının verilmesidir (Manucci, 2009). Çoklu doğrusal olmayan regresyon tekniğini kullanılarak her bir deney setinde istatistiksel hatalar bildirilebilir (Bates ve Watts, 1988).

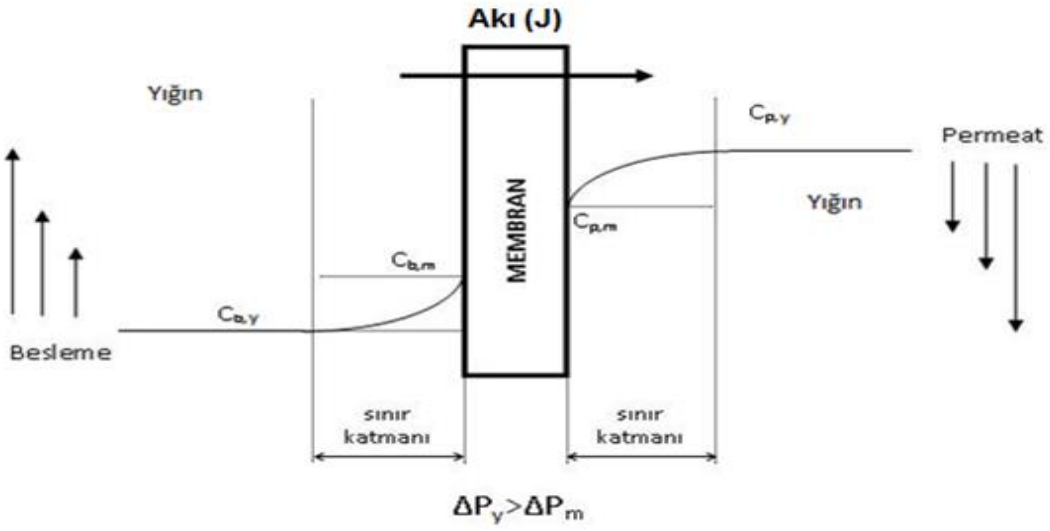
2.4 Ozmotik Membran Distilasyon

Membran distilasyon ve ozmotik distilasyon (OD) yöntemleri meyve sularının düşük sıcaklık ve atmosferik basınç altında 60-65 ˚Briks gibi yüksek seviyelere konsantre edilmesini mümkün kılan alternatif membran süreçleri olarak ortaya çıkmıştır (Cissé ve diğ., 2011; Onsekizoglu Bagci, 2015; Pagani ve diğ., 2011). OD sisteminde konsantrasyon işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirilir (Cassano ve Drioli, 2007; Onsekizoglu ve diğ., 2010). Eğer işlem oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilirse "ozmotik membran distilasyon" ismini almaktadır. OD sisteminde mikro gözenekli hidrofobik bir membranın bir tarafında besleme çözeltisi diğer tarafında hipertonik tuz çözeltisi akmaktadır. Bu iki çözelti arasında konsantrasyon farkından doğan buhar basıncı farkı ve akabinde oluşan su aktivitesi farklılığı, konsantrasyonu düşük çözeltiden tuz çözeltisine doğru su buharı transferine neden olur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 : Ozmotik distilasyon prosesinin şematik gösterimi (Onsekizoğlu, 2011).

OD sisteminde üç aşamalı bir kütle transferi mekanizması vardır: (1) konsantre edilecek çözeltide buhar-sıvı ara yüzeyinde suyun buharlaşması; (2) membran boyunca su buharının aktarımı; ve (3) tuz çözeltisi-membran ara yüzeyinde su buharının yoğuşması (Şekil 2.7) (Jiao ve diğ., 2004; Khayet ve diğ., 2005).



Şekil 2.7 : Ozmotik distilasyon prosesinde ortaya çıkan konsantrasyon profilleri: $C_{b,y}$:besleme yığın konsantrasyonu; $C_{b,m}$: besleme membran yüzeyindeki konsantrasyon; $C_{p,y}$:permeat yığın konsantrasyonu; $C_{p,m}$: permeat membran yüzeyindeki konsantrasyon; ΔP_y= yığın su buharı basıncı farkı; ΔP_m= membran yüzeyindeki su buharı basıncı farkı (Khayet ve diğ., 2005).

Ozmotik membran distilasyon (OMD), çok viskoz çözeltilerin (örneğin şeker çözeltileri) işlenmesine ve ayrıca gıda işleme için önemli olan ılımlı çalışma koşullarına (düşük sıcaklık) olanak sağlar (Warczok ve diğ., 2007). OD tamamen bir kütle transferi işlemi iken OMD sisteminde ayrıca ısı transferi de söz konusudur (Celere ve Gostoli, 2002). OMD sisteminde sürücü kuvvet hem membranlar arası sıcaklık gradyanı hem de besleme çözeltisi ile hipertonik tuz çözeltisi arasındaki konsantrasyon farkıdır. Hipertonik çözelti hazırlanmasında çözünen olarak NaCI, $CaCI_2$, $MgCI_2$ veya $MgSO_4$ gibi ozmotik basıncı sağlayan inorganik tuzlar kullanılır (El-Abbassi ve diğ., 2013). Hipertonik tuz çözeltisinin seçimi, proses verimliliği için çok önemlidir. Bu çözeltinin OMD'de kullanılmak üzere sahip olması gereken özellikler şunlardır: suda yüksek çözünürlük (düşük su aktivitesi), düşük uçuculuk ve viskozite, yüksek yüzeysel gerilim ve toksik olmama (Warczok ve diğ., 2007).

OMD ısıya duyarlı farmasötik ürünlerin ve biyolojik maddelerin sulu çözeltilerinin işlenmesinde büyük ilgi çekmiştir. Buharlaştırma yöntemi ile halihazırda elde edilen kadar yüksek bir konsantrasyon seviyesi herhangi bir termal hasar veya çözünen madde kaybı olmadan OMD ile elde edilebilmektedir (Hogan ve diğ., 1998). Düşük sıcaklıklarda konsantrasyon işlemi yapabilmenin yanında, OMD sürecinin önemli bir diğer avantajı, yüksek hidrofobik karakterdeki membran ile yalnızca su buharı ve sınırlı bir düzeyde de uçucu bileşenlerin geçişine izin verilmesi; suda çözünen sakkarit

gibi küçük molekül ağırlıklı partiküllerin membran porlarından taşınmasının mümkün olmamasıdır. Ayrıca, nanofiltrasyon ve ters ozmoz gibi basınç kaynaklı diğer membran süreçlerinde genellikle organik yapıda partiküllerin birikimiyle ortaya çıkan ve sistem performansını olumsuz yönde etkilediği bilinen jel tabakası oluşumunun, bu sistemde küçük molekül ağırlıklı partiküllerin su ile birlikte membran ara yüzeyinde taşınmaması nedeniyle ancak çok uzun süreli kullanım sonrasında gözlendiği belirtilmiştir (Curcio and Drioli, 2005). Permeat akısında azalmanın olması için çok uzun süre gerekmesi, enzimatik üretim süreci ile OMD sisteminin bütünleşik kullanımında önemli bir avantaj olarak öngörülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Aspergillus oryzae kaynaklı laktaz (100000 laktaz ünite/gram) enzimi ENZECO® (Enzyme Development Corporation, ABD) firmasından temin edilmiştir. Substrat materyal (hammadde) olarak, yüksek saflıkta laktoz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) kullanılmıştır. HPLC'de alıkonma sürelerinin tespiti amacıyla glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya) ve galaktoz (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. *Aspergillus niger* kaynaklı glukoz oksidaz enzimi (GOD, Type X-S, 100000-250000 ünite/g katı) ise Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Enzimin Karakteristik Özelliklerinin ve Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

A.oryzae enziminin karakteristik özelliklerinin ve kinetik sabitlerinin (V_{max} ve K_m değerleri) belirlenmesinde Estevinho ve diğ. (2015)'in uyguladıkları spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntemde, 2-nitrophenil-β-D-galaktopiranozit (ONPG) substrat çözeltisi (100 mM fosfat tamponu içerisinde, pH: 7.0) hazırlanmış ve standart ölçümlerde 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Her bir analizde, mikrosantrifüj tüpünde, 980 µl substrat çözeltisine 20 µl enzim çözeltisi ilave edilmiş; karışım hızlıca vortekslenmiş, reaksiyonun (oda sıcaklığında) ilk 10 saniyesi içerisinde reaksiyon karışımı (portakal renkli) doğrudan yarı mikro spektrofotometre küvetlerine boşaltılmış ve 420 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir. Her bir analiz için, 980 µl substrat çözeltisine 20 µl ultra saf su ilave edilerek hazırlanan karışım tanık olarak kullanılmıştır. Enzimlere ait kinetik katsayıların saptanmasında Hanes-Woolf yaklaşımı kullanılmıştır (Güleç ve diğ., 2010). Bir ünite enzim pH 7.0 ve 25 °C'de, 1 dakikada, bir µmol 2-nitrophenil-β-D-galaktopiranoziti hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3 Sürekli Karıştırmalı Tip Kesikli Reaktörde GOS Sentezi (Reaktör-1)

Reaktör-1'de enzimatik GOS üretimi, 50 g laktoz çözeltisi (LS) erlanmeyere tartıldıktan sonra sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcıda (MTops MS300HS, Güney Kore) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Laktoz çözeltisi laktaz enziminin optimum çalışma pH'sında (4,5) hazırlanmıştır. Çözelti pH değeri gerektiğinde 0,1 N HCI ve 0,1 N NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Enzimatik GOS sentez mekanizmasının (GOS oluşumu ve yıkımı) tam olarak gözlenebilmesi için reaksiyon süreleri 90-540 arasında değişen dakikalarda sürdürülmüştür. Sentez reaksiyonları sonucunda maksimum GOS üretiminin gerçekleştiği süreyi belirlemek için reaksiyon ortamından belirli zaman aralıklarında (5-30 dakika) 100 µl örnek alınmış ve enzim inaktivasyonu örneklerin 900 µl 95°C' de saf su ile karıştırılması neticesinde sağlanmıştır. Örnekler, gerekli görüldüğünde şeker profillerinin HPLC ile analizine kadar, -18°C'de muhafaza edilmiştir. Şekerlere ait HPLC piklerinden elde edilen sonuçlar toplam şekerlerin yüzde oranı şeklinde verilmiştir. Reaktör-1'de, reaksiyon ortam sıcaklığı (T), başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC) ve enzim konsantrasyonu (EC) değişkenlerinin maksimum GOS sentezi üzerine etkileri çalışılmış ve çalışma koşulları optimize edilmiştir.



Şekil 3.1: Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörde enzimatik GOS sentezi.

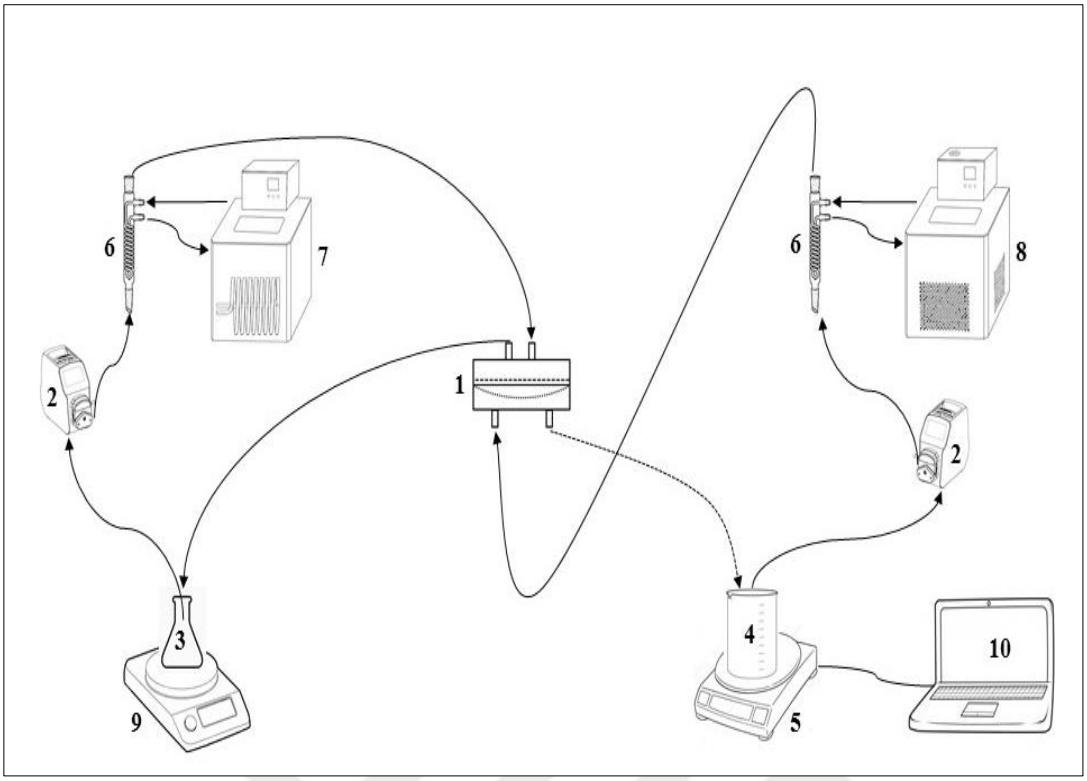
3.4 Ozmotik Membran Distilasyon Sisteminde GOS Sentezi (Reaktör-2)

Reaktör 2'de kullanılan membranın bir tarafında substrat çözeltisi diğer tarafında ise hipertonik $CaCl_2$ çözeltisi (64 °Briks) birbirine zıt yönde akmaktadır. Böylece sistemindeki sıcaklık gradyenine ayrıca çözünen madde konsantrasyonları arasındaki

fark da eklenmektedir. Her iki çözeltinin de membrana giriş ve çıkış sıcaklıkları sisteme yerleştirilen termometreler yardımıyla takip edilmiştir. Substrat çözeltisinin sıcaklığı cam eşanjör, peristaltik pompa (Masterflex, IL, ABD) ve su banyosundan (WiseBath WB-06, Daihan Scientific, Seul, Güney Kore) oluşan bir sistem kullanılarak sabit tutulmuştur. Hipertonik tuz çözeltisinin sıcaklığı ise 2 adet cam eşanjör ve soğutucudan (SMC HRS012-AF-20, Tokyo, Japonya) oluşan bir sistem ile sabit tutulmuştur. Enzimatik reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su, bilgisayar kontrollü bir terazi (OHAUS Explorer, Nänikon, İsviçre) ile zamana bağlı olarak ölçülerek, buna bağlı akı değerleri belirlenmiştir. Hem reaksiyon ortamının hem de hipertonik tuz çözeltisinin °Briks değerleri refraktometre yardımıyla okunmuştur. Enzimatik GOS sentez sürecinde kullanılmış olan ozmotik membran distilasyon sistemi görseli Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca, bu sistemin şematik gösterimi de Şekil 3.3'te verilmiştir. Sistemde CF042A çapraz akış akrilik membran modülü (Sterlitech Corporation, WA, ABD) (Şekil 3.4) ve içinde Durapore 0,22 GVHP (Millipore, İrlanda) poliviniliden florid yapısında hidrofobik bir membran bulunmaktadır. Aktif membran alanı 0,0045 m^2'dir. Membran kalınlığı 125 µm, gözenikliliği ise %75 olarak belirtilmiştir.

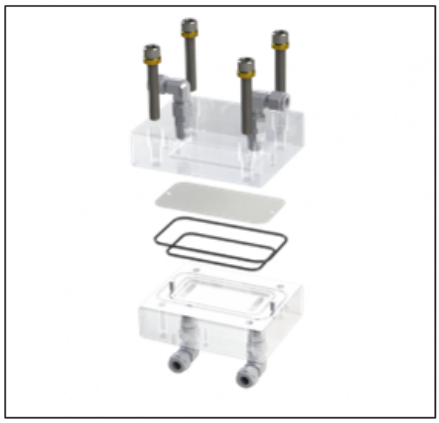


Şekil 3.2 : Ozmotik membran distilasyon sistemi görseli; (1) membran modülü, (2) peristaltik pompa, (3) besleme, (4) konsantre tuz çözeltisi, (5) terazi, (6) ısı değiştirici, (7) ısıtıcı sistem, (8) soğutucu sistem.



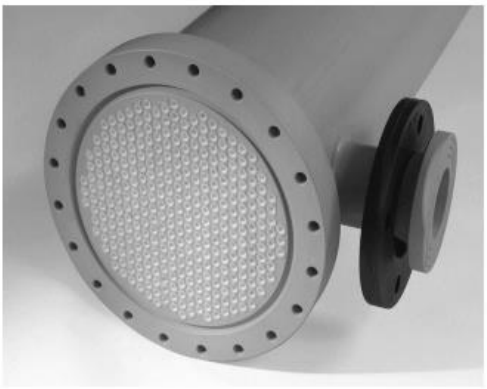
Şekil 3.3 : Ozmotik membran distilasyon sisteminin şematik gösterimi; (1) membran modülü, (2) peristaltik pompa, (3) besleme, (4) konsantre tuz çözeltisi, (5) terazi, (6) ısı değiştirici, (7) ısıtıcı sistem, (8) soğutucu sistem, (9) manyetik karıştırıcı (10) bilgisayar.

Ayrıca ozmotik membran distilasyon sistemine kapiler membran modülü takılarak bazı GOS sentez reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kapiler membran özellikleri Şekil 3.5'te yer almaktadır.



Membran malzemesi	Polivinilidenflorid
Gözenek çapı	0,22 µm
İç çap	1,8 mm
Membran alanı	0,0042 m^2
Süreç sıcaklık aralığı	< 85 °C

Şekil 3.4 : CF042A çapraz akış akrilik modülü düzeneği ve düz tabaka membran özellikleri.



Membran malzemesi	Polipropilen
Kapiler sayısı	40
Gözenek çapı	0,2 µm
İç çap	1,8 mm
Membran alanı	0,1 m^2
Süreç sıcaklık aralığı	5-40 °C

Şekil 3.5 : MD020CP2N kapiler membran özellikleri.

MD020CP2N kapiler membran modülünde (Microdyn, Almanya) dış çapı 2,8 mm, iç çapı 1,8 mm olan 40 adet polipropilen kapiler tüp bulunmaktadır.

Laktoz çözeltileri, laktaz enziminin optimum çalışma pH'sına 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCI çözeltileri ile ayarlanmıştır. Sentez reaksiyonları sonucunda maksimum GOS üretiminin gerçekleştiği süreyi belirlemek için reaksiyon ortamından belirli zaman aralıklarında (5-30 dakika) 100 µl örnek alınmış ve enzim inaktivasyonu örneklerin 900 µl 95 °C' de saf su ile karıştırılması neticesinde sağlanmıştır. Örnekler, şeker profillerinin HPLC ile analizine kadar, -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Şekerlere ait HPLC piklerinden elde edilen sonuçlar toplam şekerlerin yüzde oranı şeklinde verilmiştir.

3.5 Deneysel Tasarımlar ve İstatistiksel Analizler

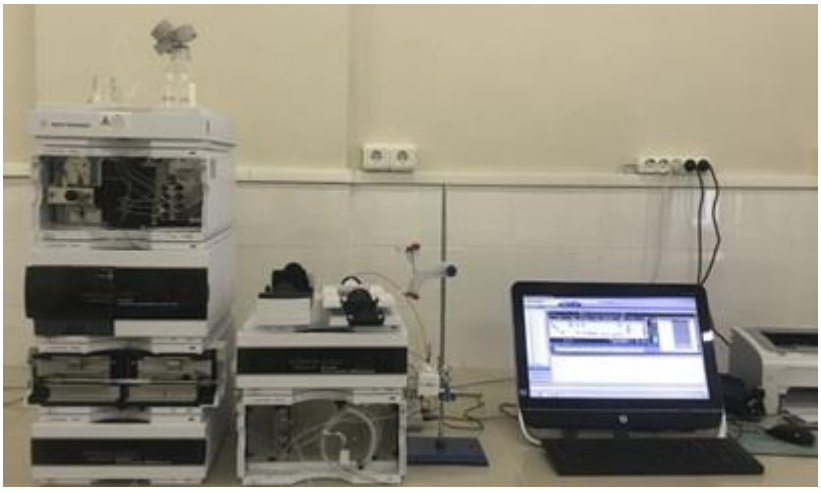
Reaktör-1'de deneysel tasarımlar için yanıt yüzey metodu (Response Surface Method-RSM) tasarımlarından 3-faktör 3-seviyeye sahip Box Behnken yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 4.1). Reaktör-1'de, substrat çözeltisinin sıcaklığı (T: 35-45-55 °C), başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC: 4,5-18,25-32 °Briks) ve enzim konsantrasyonu (EC: 6-10-14 U/g LS) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Reaktör-2'de gerçekleştirilen deneyler için faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır (Çizelge 4.13). Besleme ve hipertonik tuz çözeltisi akış hızı (24 L/saat) sabit tutularak, substrat çözeltisinin sıcaklığı (T: 35-45-55 °C), başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC: 18,25-32 °Briks), enzim konsantrasyonu (EC: 6-10-14 U/g LS) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Her iki reaktörde enzimatik sentez reaksiyon sonucu oluşan %GOS-4 (eşitlik 3.5), %GOS-3 (eşitlik 3.4) ve %toplam GOS (GY) (eşitlik 3.6) değerleri ise süreç yanıtı olarak ölçülmüştür. Ayrıca, reaktör-1'de maksimum toplam GOS'nin elde edildiği

süre de (TMGY) süreç yanıtı olarak ölçülmüştür. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar varyans analizi yöntemi Design Expert 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) istatistiksel yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sentezlenen GOS-4, GOS-3 ve GY z-eksenine ve bir parametre sabit tutulup diğer iki parametre x- ve y-eksenine yerleştirilerek 3-boyutlu yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir. Grafiklerin yorumlanması için sabit faktör seviyesinde grafik çizimine karar verirken, faktör seviyesinin etkisinin en net gözlemlenebildiği seviyeler seçilmiştir. Yanıt yüzey grafikleri üzerindeki maksimum ile minimum değerlerin en net gözlenebildiği, yüksek, orta ve düşük seviyeleri en net ifade eden renk skalasının gözlemlenebildiği noktalar dikkate alınmıştır. Diğer sabit parametre seviyelerinde çizilen yanıt yüzey grafikleri EK C ve EK D'de verilmiştir.

3.6 HPLC ile Şeker Analizi

Enzimatik reaksiyon sonucunda elde edilen ürün profilinin analiz edilmesinde Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.6). Sistem kolon fırını (Agilent, G1316A), autosampler (Agilent G1329B), pompa (Agilent, G1311C), bir refraktif indeks dedektörü (SpectraSystem RI-150), ve sistemin kontrolü ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde kullanılan bir paket programdan (Agilent Chem-Station) oluşmaktadır. Reaktörlerde GOS sentezi sonrasında elde edilen ürünlerin şeker içeriklerinin belirlenmesinde, örnekler 1:9 oranında (100 µl örnek: 900 µl 95 °C sıcak su) seyreltilerek sisteme enjekte edilmiştir. Separasyon koşulları Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.6 : Agilent 1260 Infinity HPLC sistemi.

Çizelge 3.1 : HPLC ile şeker analizi için sabit ve hareketli faza ait özellikler.

Kolon	Oligosakkarit kolonu
Kolon sıcaklığı	80 °C
Mobil faz	Deiyonize su (%100)
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Akış hızı	0,5 ml/dk
Dedektör	Refraktif index (RI), 16X

HPLC analizlerinde standart kullanılmamış, şekerlerin konsantrasyonları (laktoz, glukoz, galaktoz, GOS-3, GOS-4 ve toplam GOS) toplam şekerlerin ağırlık yüzdeleri cinsinden (w/w) bu şekerlere ait olan pik alanlarından hesaplanmıştır (Boon ve diğ., 2000a). Reaksiyonun başlangıcında reaksiyon ortamında sadece laktoz bulunmaktadır. Enzimatik reaksiyon ile laktoz diğer şekerlere dönüşmektedir. Laktoz pik alanını LP, glukoz pik alanını GLP, galaktoz pik alanını GAP, GOS-3 pik alanını GOS-3P ve GOS-4 pik alanını GOS-4P ile tanımladığımızda bu bileşenlerin %(ağırlık/ağırlık) formülleri aşağıda verilmiştir. Laktoz dönüşümü (%) ise laktozun GOS ve monosakkaritlere yüzde olarak dönüşümü olarak tanımlanmıştır. Başlangıç laktoz miktarı (Lak_0) ile reaksiyon ortamındaki laktoz miktarı (Lak_t) farkının başlangıç laktoz miktarına oranının yüz ile çarpımı ile hesaplanmıştır.

$$\%\text{Laktoz} = \frac{\text{LP}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%\text{Glukoz} = \frac{\text{GLP}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%\text{Galaktoz} = \frac{\text{GAP}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\%\text{GOS-3} = \frac{\text{GOS-3P}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\%\text{GOS-4} = \frac{\text{GOS-4P}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\%\text{Toplam GOS (GY)} = \frac{\text{GOS-3P+GOS-4P}}{\text{LP+GLP+GAP+GOS-3P+GOS-4P}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\%\text{Laktoz dönüşümü} = \frac{Lak_0 - Lak_t}{Lak_0} \times 100 \quad (3.7)$$

3.7 Enzimatik GOS Sentezinin Kinetik Temelde Modellenmesi

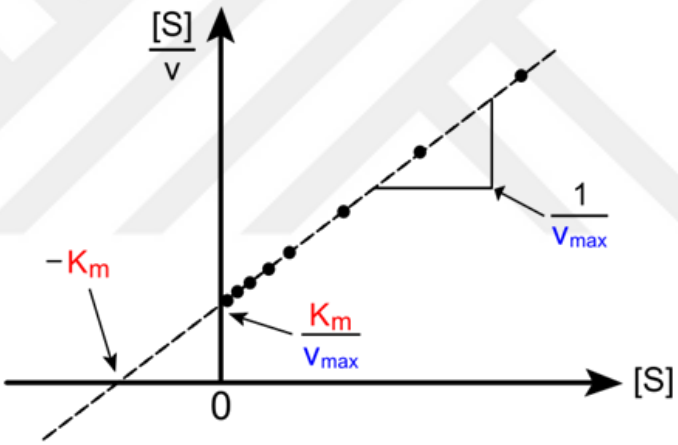
Transgalaktosilasyon ile hidroliz reaksiyonlarının aktivite oranı GOS sentezi çalışmalarında kullanılan enzim kaynağına ve üretim yöntemine göre değişiklik göstermektedir. Laktoz hidrolizi ve GOS sentezi için literatürde tanımlanmış transgalaktosilasyon mekanizmaları kullanılarak deneysel veriler kinetik modellere uyarlanmıştır. Bu kapsamda, Manucci (2009) ve Kim ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmalarda GOS sentezi için ele alınan reaksiyon mekanizması modelleri kullanılmıştır (Bölüm 4.4). Deneysel verilerin kinetik bir modele uyarlanması ve reaksiyon hız sabitlerinin tahmin edilebilmesi için, biyokimyasal sistemlerin modellenmesine olanak sağlayan COPASI 4.22 yazılım paketi kullanılmış ve çözümleme sırasıyla "random research" ve "particle swarm" algoritmaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. COPASI, biyokimyasal tepkimelerin kinetik modellemesi için en çok kullanılan, kullanıcı dostu yazılımlardan biridir. Yazılım farklı parametre tahmin algoritmalarının uygulanması, metabolik kontrol analizi için geliştirilmiş destek ve kullanıcıların SBML aktarma formatını kullanmasını sağlama gibi önemli özellikler içerir (Costa ve Vinga, 2016). Önerilen modellere ait kinetik parametreler, deneysel veri setleri kullanılarak lineer olmayan regresyon tekniği yardımıyla belirlenmiştir.

Molar konsantrasyonları hesaplamak için laktoz, galaktoz ve glukoz molekül ağırlıkları sırasıyla 342,3 g/mol, 180,16 g/mol ve 180,16 g/mol alınmıştır. Sentezlenen GOS'lerin ağırlıklık olarak GOS-3 olduğu varsayılarak molekül ağırlıkları 504,32 g/mol kabul edildi (Maugard ve diğ., 2003; Warmerdam ve diğ., 2013). *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin molekül ağırlığı ise 105000 Da olarak kabul edildi (Tanaka ve diğ., 1975). Reaktör-1 ve reaktör-2'deki reaksiyon ortamı bileşenlerinin molar konsantrasyonunu hesaplama aşamaları ayrıntılı olarak sırasıyla EK A ve EK B'de verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

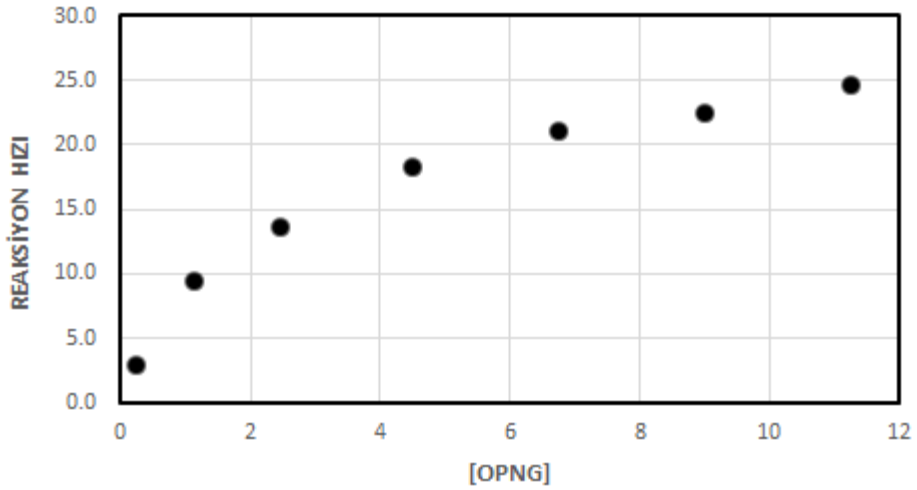
4.1 Serbest Formda *A. oryzae* Enziminin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

A.oryzae enziminin V_{max} ve K_m değerlerinin belirlenmesi için 1 mg/ml konsantrasyonunda enzim çözeltisi, o-nitrophenil-β-D-galaktopiranozit (ONPG)'den hazırlanan 0,225-11,25 mM aralığında değişen 7 farklı substrat çözeltisi ile etkileştirilmiştir. Elde edilen ilk hız değerlerinden yararlanılarak enzime ait Michaelis-Menten grafiği çizilmiş ve bu grafiğin Hanes-Woolf yaklaşımına (Şekil 4.1) göre doğrusallaştırılmasıyla kinetik katsayılar saptanmıştır.



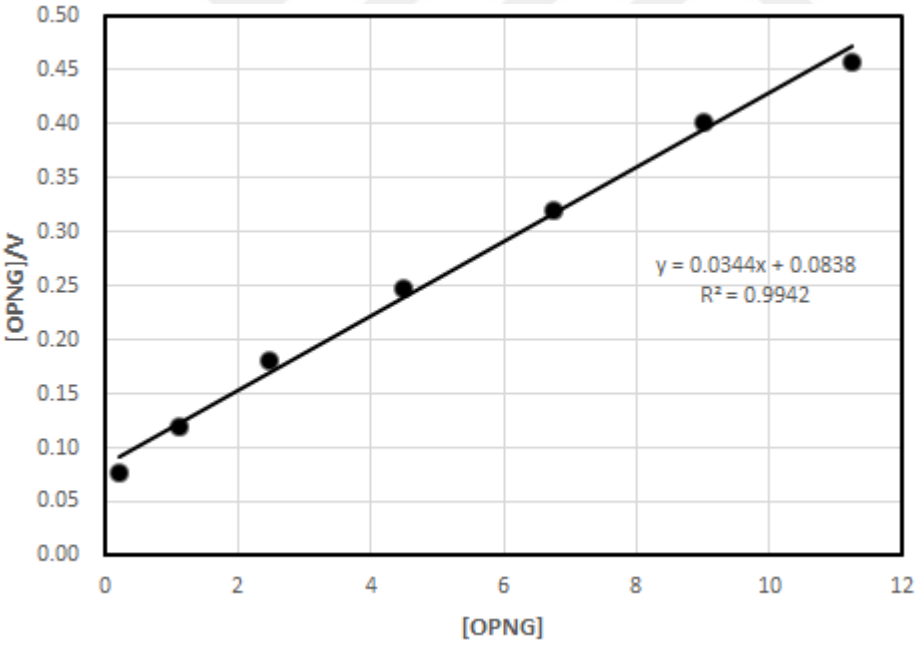
Şekil 4.1 : Hanes-Woolf grafiği.

A.oryzae enzimi için elde edilen Michalis-Menten grafiği (Şekil 4.2) ve bu grafiğin doğrusallaştırılması ile elde edilen Hanes-Woolf grafiği (Şekil 4.3) kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.2 : *A.oryzae* enzimine ait Michalis-Menten grafiği.

V_{max} değeri belirtilen enzim konsantrasyonundaki maksimum reaksiyon hızını ifade etmektedir. K_m değeri ise enzimin substrata olan ilgisini belirtmektedir. K_m değeri azaldıkça enzimin substrata karşı ilgisi artar. Bir diğer deyişle, reaksiyon hızı V_{max} değerine daha hızlı ulaşır (Estevinho ve diğ., 2015).



Şekil 4.3 : *A.oryzae* enzimine ait Hanes-Woolf grafiği.

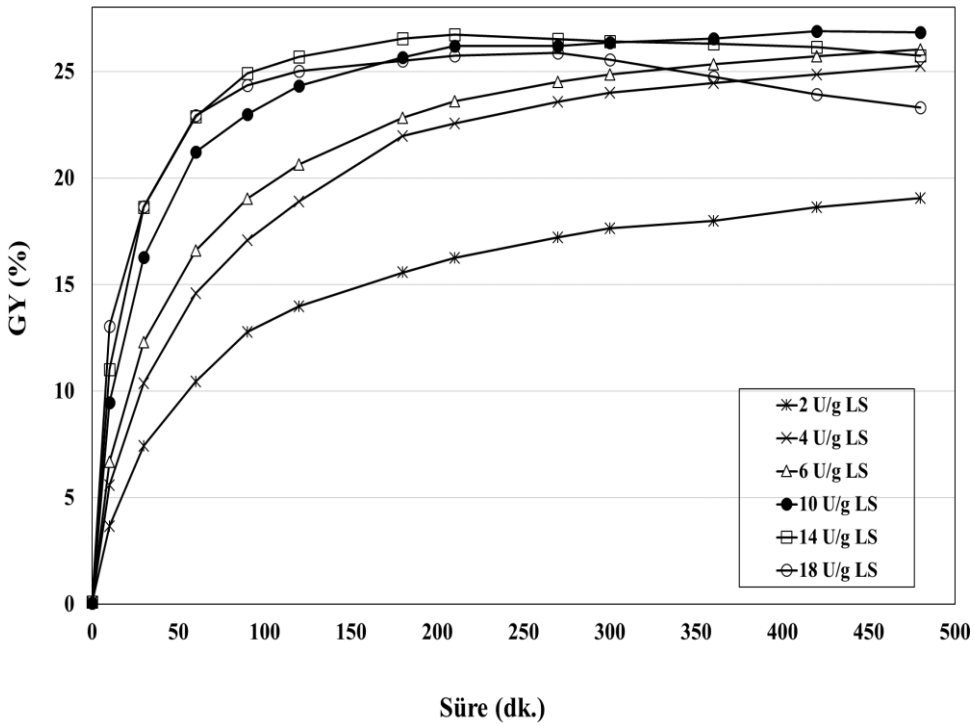
Hanes-Woolf grafiği kullanılarak yeni temin edilen *A.oryzae* enziminin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 29,07 µmol/ml/dk ve 2,44 mM olarak tespit edilmiştir. Önceden temin edilmiş *A.oryzae* enziminin ise V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 28,87 µmol/ml/dk ve 2,30 mM olarak tespit edilmiştir. Böylece, yeni temin edilen enzim ile ön çalışmalarda kullanılan enzim arasında aktivite açısından önemli derecede bir fark

olmadığı belirlenmiştir. Ön denemeler ile belirlenmiş enzimatik GOS üretim süreç parametrelerinde herhangi bir değişikliğe ihtiyaç olmadığı görülmüş ve planlanan şekilde çalışmalara devam edilmiştir.

4.2 Reaktör-1'de Enzimatik GOS Sentezi

4.2.1 Bağımsız değişken aralıklarının seçimi

Enzimatik GOS sentezini etkileyen başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), sıcaklık (T) ve enzim konsantrasyonu (EC) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. *A. oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin optimum pH değerinin 4,5-5,0 arasında, optimum sıcaklık değerinin ise 55 °C civarında olduğu tespit edilmiştir (Güleç ve diğ., 2010). Ayrıca, bu enzimin spesifik aktivitesinin 50 °C'nin altında daha kararlı olmasına rağmen, hidrolitik aktivitesinin %50'sinden fazlasını 35 ºC'nin altında kaybettiği belirtilmiştir (Güleç ve diğ., 2010). Bu nedenle, GOS sentezinin optimizasyonu sürecinde enzimin bağıl aktivitesinin yüksek olduğu ve ozmotik membran distilasyon sürecinde çalışılması uygun sıcaklık aralığı (35-55 °C) seçilmiştir.



Şekil 4.4 : Enzim konsantrasyon aralığının belirlenmesi için farklı enzim konsantrasyonlarında yapılan GOS sentez çalışmaları (Reaksiyon koşulları: LC:32°Briks, T:35°C).

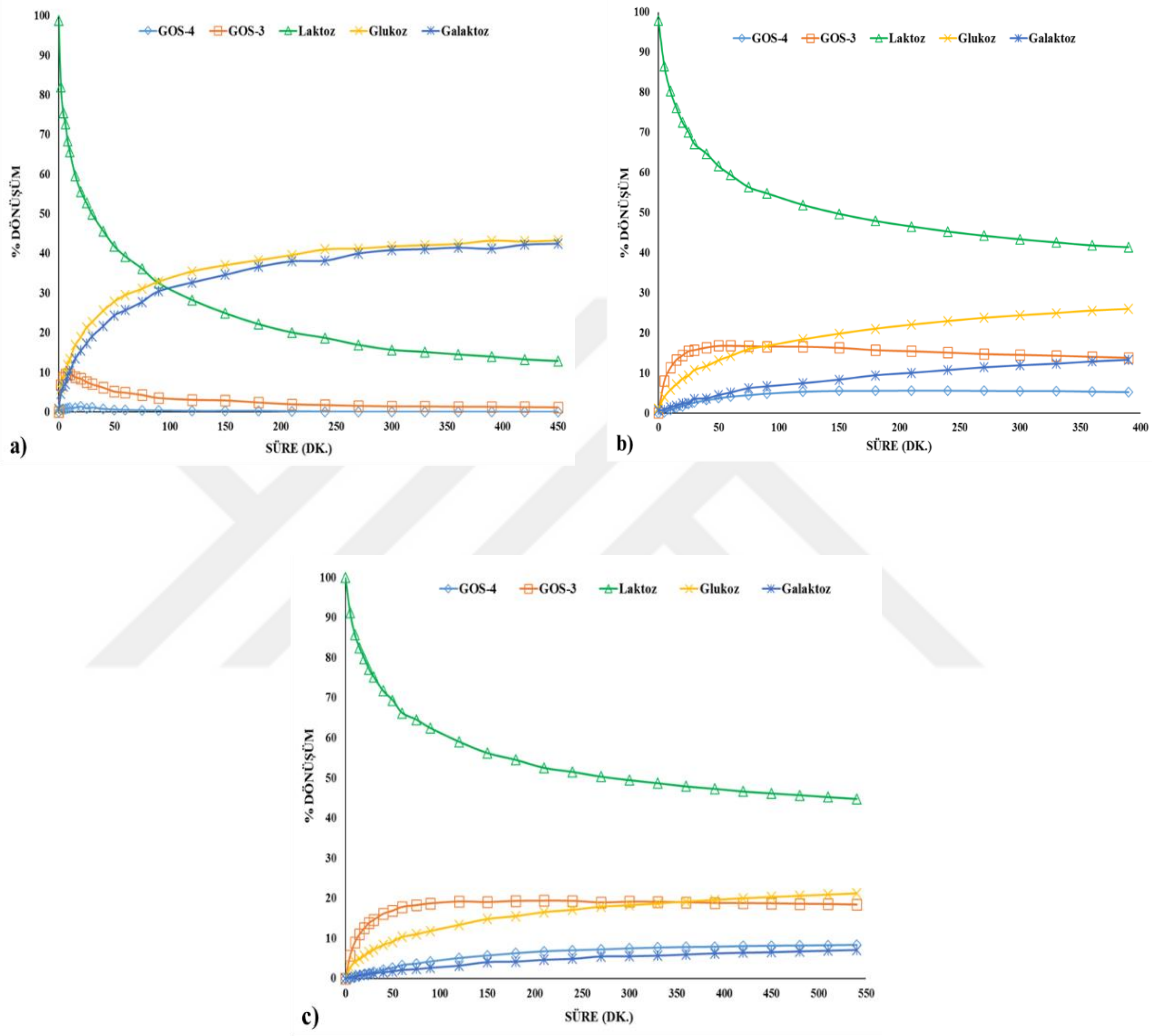
LC aralığı belirlenirken en düşük değer olarak süt veya peynir altı suyunun laktoz içeriği gözetilerek 4,5 °Briks seçilmiştir (Walstra, 1999). Çalışmada kullanılan LC'nin (32 °Brix) üst sınırı, 35 °C'lik alt sıcaklık sınırında elde edilebilecek maksimum konsantrasyondur (Paterson, 2009).

Literatürde EC'yi bağımsız parametre olarak tanımlayıp GOS sentezini ele alan bazı çalışmalarda (Das ve diğ., 2011; Guerrero ve diğ., 2011; Jenab ve diğ., 2018; Mueller ve diğ., 2018; Palai ve diğ., 2012; Rustom ve diğ., 1998) EC'nin GY üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını bildirilirken bazı araştırmacılar enzim/substrat oranının GY ve GOS üretkenliği (GOSP) üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir (Chen ve diğ., 2002; González-Delgado ve diğ., 2016; Manera ve diğ., 2010; Martınez-Villaluenga ve diğ., 2008). Bu tür farklı bulgular ve ifadeler karşısında, bu çalışmada kullanılacak EC aralığı ön denemeler ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör sürecinde enzim aktivitesinin en düşük ve galaktosil alıcılarının maksimum olduğu çalışma koşulunda (LC:32 °Briks ve T:35 °C) 6 farklı EC kullanılarak EC'nin GOS sentezine etkisi incelenmiştir. EC=2 U/g LS'de GOS sentezi yavaş bir şekilde gerçekleşirken sentezlenen GOS miktarı düşüktür (Şekil 4.4). 14 U/g LS değerine kadar EC arttıkça GY değerinde de artış elde edilmiş fakat 18 U/g LS değerinde GY'de azalış gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin EC arttıkça artan GOS degradasyon hızı olduğu düşünülmüştür. 14 ve 18 U/g LS değerlerinde GY pik değeri elde ettikten sonra yavaş bir şekilde azalmaya başlamıştır. Çünkü maksimum GY elde edildikten sonra hidroliz aktivitesi baskın hale gelmiştir. 10 U/g LS değerinde ise maksimum GY elde edildikten sonra reaksiyon süresi ilerledikçe stabil bir GY seviyesi görülmüştür. Bu durum transgalaktosilasyon ve hidroliz aktivitelerinin eşit hızlarda olduğunu göstermektedir. Elde edilen verilere göre EC arttıkça maksimum GY değeri için gerekli sürenin azaldığı gözlemlenmiştir. Artan EC, transgalaktosilasyon hızının artmasına neden olarak kısa sürede yüksek GOS verimi elde edilmesine olanak sağlamış fakat aynı zamanda kısa sürede enzimin hidroliz yönünde çalışmasına da neden olmuştur. Bu nedenle 6-14 U/g LS aralığı baskın transgalaktosilasyon aktivitesi ile yüksek GY eldesi için en uygun EC aralığı olarak seçilmiştir.

4.2.2 Enzimatik GOS sentezinin incelenmesi

İki bağımsız değişken sabit tutularak farklı sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu değerlerinde reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı

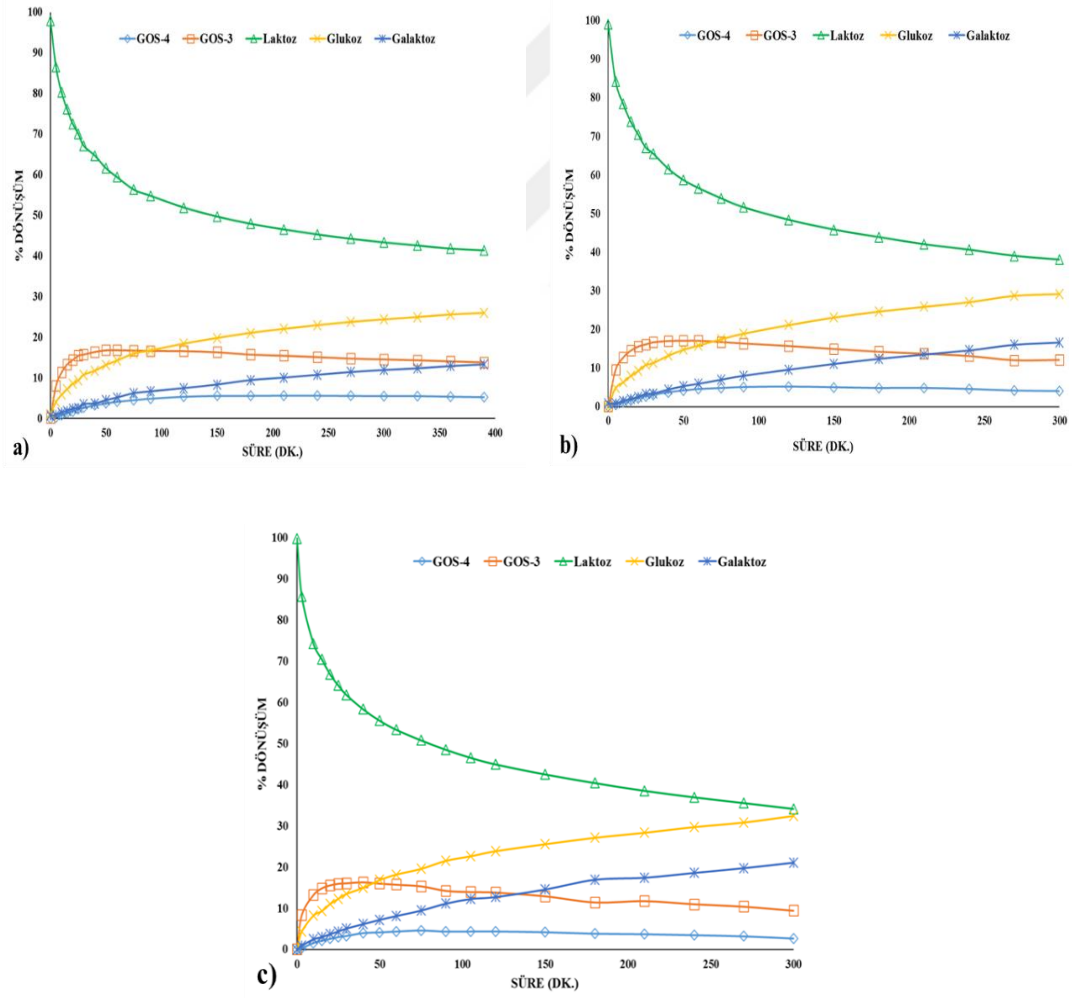
dönüşümünü (değişimini) ifade eden grafikler çizilerek GOS sentezi incelenmiştir (Şekil 4.5-4.7). Reaksiyonun başlangıç (t=0) anında ortamda sadece laktoz bulunmaktadır. Dolayısıyla t=0 anında ortamda bulunan bileşenin tamamını (%100) laktoz oluşturmaktadır. Laktoz miktarı transgalaktosilasyon ve hidroliz reaksiyonları nedeniyle reaksiyon süresince azalmaktadır (negatif yönde dönüşüme uğramaktadır).



Şekil 4.5 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: T:35 °C, EC:10 U/g LS, a. LC:4,5 °Briks, b. LC:18,25 °Briks, c. LC:32 °Briks).

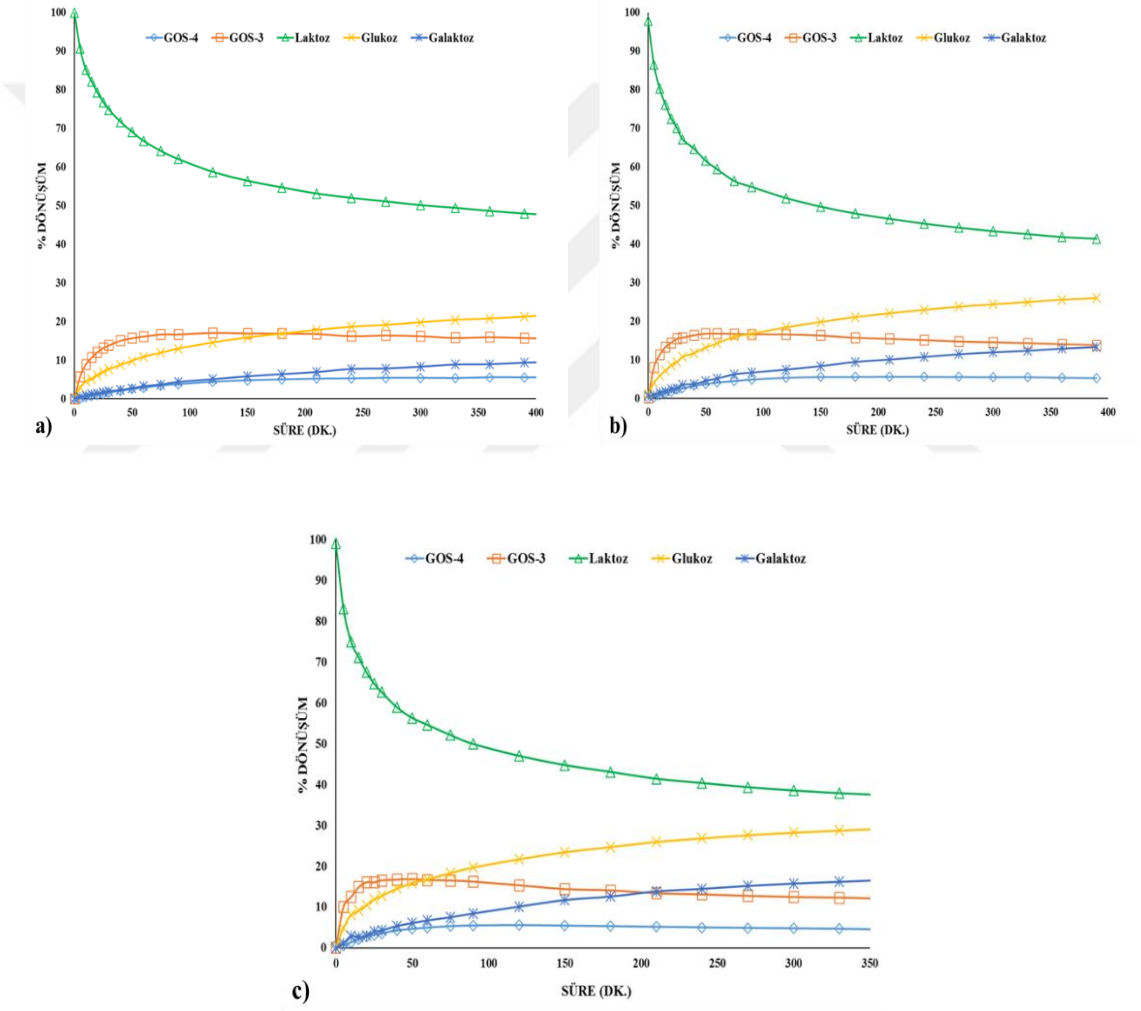
Farklı LC değerlerinde, T:35 °C ve EC:10 U/g LS değerinde sabit tutularak çizilmiş GOS sentez sürecine ait grafikler incelendiğinde (Şekil 4.5) 4,5 °Briks ve 18,25 °Briks LC içeren reaksiyonlarda ortamdaki glikoz ve galaktoz miktarının hızlı bir şekilde artması nedeniyle bu süreçlerde hidroliz reaksiyonun baskın olduğu görülmektedir. 4,5 °Briks LC'de 400 dakikada başlangıçtaki laktozun yaklaşık olarak %90'ı diğer

ürünlere dönüşürken, sentezlenen %10 ve %1 civarındaki GOS-3 ve GOS-4 yıkıma uğrayarak monosakkaritlere parçalanmıştır. 18,25 °Briks LC'da 400 dakikada başlangıçtaki laktozun yaklaşık %60'ı diğer ürünlere dönüşürken, sentezlenen %18 ve %4 civarındaki GOS-3 ve GOS-4 pik değerlerine ulaştıktan sonra yıkıma uğramaya başlamıştır. 32 °Briks LC'de 400 dakikada başlangıçtaki laktozun yaklaşık %55'i diğer reaksiyon ürünlerine dönüşürken, sentezlenen %19 civarındaki GOS-3 çok yavaş bir şekilde yıkıma uğramakta ve %8 civarındaki GOS-4 yapım süreci ise yine yavaş bir şekilde devam etmektedir. Enzim yüksek LC'da reaksiyonun ilerleyen sürelerinde ne transgalaktosilasyon ne de hidroliz yönünde baskın bir şekilde çalışabilmektedir. Bu durumun temel nedeninin enzimin aktivite kaybı yaşaması olduğu düşünülmüştür. Artan monosakkarit konsantrasyonunun (özellikle galaktoz) enzimi inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Neri ve diğ., 2009b).



Şekil 4.6 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı reaksiyon sıcaklıklarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: LC:18,25 °Briks, EC:10 U/g LS, a. T:35 °C, b. T:45 °C, c. T:55 °C).

Farklı sıcaklık değerlerinde LC'nin 18,25 °Briks EC'nin ise 10 U/g LS değerinde sabit tutularak çizilmiş GOS sentez sürecine ait grafikler incelendiğinde sıcaklık arttıkça enzimin hidroliz aktivitesinin de arttığı görülmektedir (Şekil 4.6). 18,25 °Briks LC'de sıcaklık artışı GOS sentezine pozitif yönde bir etki sağlamamıştır. Enzim reaksiyonun erken sürelerinde hidroliz yönünde baskın bir şekilde çalışmaya başlamış ve oluşan GOS'ler hidroliz sürecine başlamıştır. T:35 °C olan deney setinin GOS sentezi açısından performansı daha iyi bulunmuştur. 300 dakika reaksiyon süresinde ortamdaki laktozun 35, 45 ve 55 °C reaksiyon sıcaklığına sahip deney setlerinde sırasıyla yaklaşık %55'i, %60'ı ve %70'i diğer reaksiyon bileşenlerine dönüşmüştür.



Şekil 4.7 : Enzimatik GOS sentezi sürecinde farklı enzim konsantrasyonlarında reaksiyon bileşenlerinin zamana bağlı dönüşüm grafikleri (Reaksiyon koşulları: T:35°C, LC:18,25 °Briks, a. EC: 6 U/g LS, b. EC:10 U/g LS, c. EC:14 U/g LS).

Farklı EC değerlerinde T= 35 °C ve LC= 18,25 °Briks değerinde sabit tutularak çizilmiş GOS sentez sürecine ait grafikler incelendiğinde EC arttıkça enzimin hidroliz aktivitesinin de arttığı görülmektedir (Şekil 4.7). Düşük EC kullanıldığında daha iyi

bir GOS sentez aktivitesi elde edilmiştir. Düşük EC'de GOS-3 maksimum değerine ulaştıktan sonra diğer EC değerlerine göre daha yavaş hızda bir yıkıma uğramıştır. GOS-4 ise çok yavaş bir hızda olsa bile pozitif yönde değişim göstermeye devam etmiştir. 350 dakika reaksiyon süresinde ortamdaki laktozun 6, 10, 14 U/g LS enzim konsantrasyonu içeren deney setlerinde sırasıyla yaklaşık %50'si, %55'i ve %60'ı diğer reaksiyon bileşenlerine dönüşmüştür.

4.2.3 Reaktör-1'de elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

Başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC) ve sıcaklık (T) reaksiyon parametrelerinin GOS sentezine etkisini incelemek ve reaksiyon koşullarını optimize etmek üzere Box Benhken tasarımı kullanılarak deneysel koşullar belirlenmiştir. Box Benhken tasarımı ile elde edilen deneysel koşullar ve belirlenen yanıtlar için, elde edilen deneysel sonuçlar tahminlenen değerler ile birlikte Çizelge 4.1'de verilmiştir. Deneysel koşullar 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Merkez noktaları içeren deney seti ise, elde edilen sonuçların değişkenliğini ve deneysel hatanın sağlıklı bir biçimde belirlenebilmesi için 6 kez tekrar edilmiştir. Tüm deneyler gözlemlenecek yanıttaki açıklanamayan değişkenliğinin önüne geçmek için rastgele sırayla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 : Reaktör 1-de uygulanan Box Benhken dizaynı ile elde edilen deneysel koşullar, elde edilen deneysel yanıt değerleri ve tahminlenen yanıt değerleri**.**

		Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Yanıt 1	Tahminlenen Değer	Yanıt 2	Tahminlenen Değer	Yanıt 3	Tahminlenen Değer	Yanıt 4	Tahminlenen Değer
Deneme	**Standart Sıra**	**T (°C)**	**LC (°Briks)**	**EC (U/g LS)**	**GOS-4 (%)**	**GOS-4 (%)**	**GOS-3 (%)**	**GOS-3 (%)**	**GY (%)**	**GY (%)**	**TMGY (dk.)**	**TMGY (dk.)**
1	23	45	32	6	7,26	7,74	18,74	18,52	26	26,26	375	366,3
2	11	45	4,5	14	0,8	0,84	9,12	9,07	9,92	9,92	5	7,2
3	25	45	32	14	7,29	7,43	18,72	18,62	26,01	26,04	150	160,9
4	13	45	18,25	10	4,73	4,76	16,88	16,75	21,62	21,51	75	73,8
5	28	55	32	10	7,26	7,17	17,5	17,87	24,76	25,04	210	192,7
6	6	55	18,25	6	4,48	4,65	16,63	15,90	21,11	20,55	90	101,1
7	19	35	4,5	10	1,08	1,22	10,09	9,63	11,17	10,85	8	10,8
8	3	35	32	10	8,18	8,15	18,7	18,63	26,92	26,80	330	337,6
9	2	55	4,5	10	0,63	0,67	7,85	8,25	8,47	8,91	5	4,4
10	15	45	18,25	10	4,52	4,76	17,08	16,75	21,6	21,51	60	73,8
11	20	35	32	10	8,03	8,15	18,8	18,63	26,83	26,80	345	337,6
12	5	35	18,25	6	5,18	5,04	16,9	17,08	22,08	22,12	195	203,6
13	16	45	18,25	10	5,03	4,76	16,46	16,75	21,49	21,51	82,5	73,8
14	1	35	4,5	10	1,07	1,22	9,56	9,63	10,62	10,85	9	10,8
15	24	45	4,5	14	1,11	0,84	8,85	9,07	9,97	9,92	7	7,2
16	12	45	32	14	7,58	7,43	18,5	18,62	26,08	26,04	165	160,9
17	30	55	18,25	14	4,17	4,10	15,67	15,87	19,83	19,97	30	26,4
18	27	55	4,5	10	0,79	0,67	8,41	8,25	9,21	8,91	4	4,4
19	4	55	32	10	7,38	7,17	17,85	17,87	25,23	25,04	180	192,7
20	14	45	18,25	10	4,54	4,76	17,09	16,75	21,63	21,51	67,5	73,8
21	29	55	18,25	6	4,74	4,65	15,4	15,90	20,14	20,55	105	101,1
22	8	55	18,25	14	3,72	4,10	16,48	15,87	20,2	19,97	25	26,4
23	26	45	18,25	10	4,91	4,76	16,42	16,75	21,33	21,51	75	73,8
24	22	45	4,5	6	0,92	0,88	9,45	9,43	10,36	10,31	9	5,0
25	10	45	32	6	8,00	7,74	18,47	18,52	26,47	26,26	360	366,3
26	21	35	18,25	14	5,21	5,23	16,93	16,85	22,14	22,08	90	75,2
27	7	35	18,25	14	5,33	5,04	16,54	16,85	21,87	22,08	67,5	75,2
28	18	35	18,25	6	5,22	0,88	16,85	17,08	22,08	22,12	210	203,6
29	9	45	4,5	6	0,83	4,76	9,42	9,43	10,25	10,31	8	5,0
30	17	45	18,25	10	4,82	5,04	16,54	16,75	21,36	21,51	82,5	73,8

Çizelge 4.2 : Reaktör-1'de GOS-4 model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları.

	Model p-değeri	**Uyum eksikliği p-değeri**	**Ayarlamalı R^2**	**Tahmini R^2**
Lineer	< 0.0001	0,0006	0,9806	0,9766
2FI	0,3815	0,0003	0,9808	0,9733
Kuadratik	< 0.0001	0,1756	0,9923	0,9876
Kübik	0,1756		0,9931	0,9868

Çizelge 4.3 : Reaktör-1'de GOS-3 model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları.

	Model p-değeri	**Uyum eksikliği p-değeri**	**Ayarlamalı R^2**	**Tahmini R^2**
Lineer	< 0.0001	< 0.0001	0,8316	0,8012
2FI	0,9895	< 0.0001	0,8106	0,7444
Kuadratik	< 0.0001	0,3347	0,9911	0,9855
Kübik	0,3347		0,9914	0,9827

Çizelge 4.4 : Reaktör-1'de GY model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları.

	Model p-değeri	**Uyum eksikliği p-değeri**	**Ayarlamalı R^2**	**Tahmini R^2**
Lineer	< 0.0001	< 0.0001	0,9172	0,9022
2FI	0,9972	< 0.0001	0,9066	0,8736
Kuadratik	< 0.0001	0,8334	0,9982	0,9969
Kübik	0,8334		0,9980	0,9955

Çizelge 4.5 : Reaktör-1'de TMGY model uygunluklarının belirlenmesi için yapılan test sonuçları.

	Model p-değeri	**Uyum eksikliği p-değeri**	**Ayarlamalı R^2**	**Tahmini R^2**
Lineer	< 0.0001	< 0.0001	0,8459	0,8141
2FI	< 0.0001	< 0.0001	0,9332	0,9202
Kuadratik	< 0.0001	0,7215	0,9932	0,9891
Kübik	0,7215		0,9926	0,9851

Model uygunluğunu belirlemek amacıyla F-değeri testi ve uyum eksikliği testleri uygulanmıştır (Çizelge 4.2-4.5). Her bir yanıt için (GOS-4, GOS-3, GY ve TMGY) uygun model seçilirken ayarlamalı ve tahmini R^2 değerlerinin en yüksek olduğu model gözetilir. Ayrıca, modelin "aliased" olmaması gerekir. Kuadratik modelin uygunluk değerleri tüm modeller için yüksek bulunurken, kübik model ise istatistiksel yazılım paketi uyarısı ile "aliased" olarak tespit edilmiştir. Bir diğer deyişle uygulanan deney planı kübik modeli ifade etmek için uygun değildir. F-değeri testinden elde edilen sonuçlara göre parametreler arasında ilişkinin iyi olduğu ve anlamlı terimleriyle en yüksek dereceye sahip olan kuadratik modeller her bir yanıtın matematiksel modellenmesi için kullanılmıştır. Değişkenler ile yanıtlar arasındaki matematiksel ilişki ikinci dereceden polinomiyal bir denklem ile ifade edilebilmektedir. Çoklu regresyon analizi ile her bir yanıta karşı bir denklem (4.1) elde edilir.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1(T) + \beta_2(LC) + \beta_3(EC) + \beta_{12}(T)(LC) + \beta_{13}(T)(EC) + \beta_{23}(LC)(EC) + \beta_{11}(T^2) + \beta_{22}(LC^2) + \beta_{33}(EC^2) \quad (4.1)$$

Bu denklemde Y_i tahminlenen yanıtı (GOS-4, GOS-3, GY ve TMGY), β_0 kesim noktasının, β_1, β_2 ve β_3 lineer etkileşimlerin, β_{12}, β_{13} ve β_{23} ikili etkileşimlerin, β_{11}, β_{22} ve β_{33} ise kuadratik etkileşimlerin regresyon sabitini ifade etmektedir. Sonuçların istatiksel açıdan anlamlığı varyans analizi (ANOVA) ile %95 güvenirlilik oranı kullanılarak test edilmiştir

4.2.3.1 Reaktör-1'de GOS-4 eldesi

Matematiksel modelin Prob>F değeri < 0,0001 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bir diğer deyişle model %99,99 güvenilirlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için ''Prob>F'' değerinin 0,05'ten küçük olması gerekmektedir. Bu durumda sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC), sıcaklık-enzim konsantrasyonu etkileşimi (T*EC) ve laktoz konsantrasyonunun kuadratik etkileşimi (LC^2) değerleri anlamlı model terimleridir. Regresyon analiz sonucu matematiksel modelin determinasyon katsayısı (R^2) 0,9947 olarak bulunmuştur. Bu sonuç modelin toplam varyasyonun %99,47'lik kısmını açıklayabilirken, %0,53'lük kısmını ise açıklamakta başarısız kaldığını göstermektedir. Elde edilen yüksek R^2 değeri elde edilen matematiksel modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Ayarlamalı

(adjusted) R^2 değeri 0,9923 olarak bulunurken tahmini (predicted) R^2 değeri ise 0,9876 olarak bulunmuştur. Bu nedenle deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyum vardır.

Çizelge 4.6 : GOS-4 yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri.

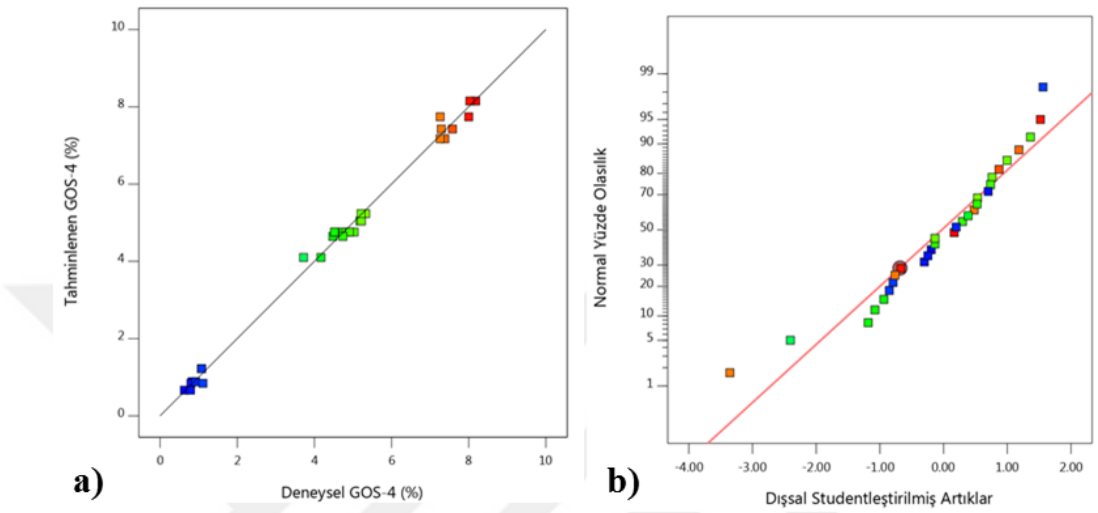
Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	185,28	9	20,59	414,61	< 0,0001
T	2,35	1	2,35	47,30	< 0,0001
LC	180,57	1	180,57	3636,43	< 0,0001
EC	0,1260	1	0,1260	2,54	0,1268
T*LC	0,0882	1	0,0882	1,78	0,1976
T*EC	0,2701	1	0,2701	5,44	0,0302
LC*EC	0,0378	1	0,0378	0,7615	0,3932
T^2	0,0109	1	0,0109	0,2185	0,6452
LC^2	1,80	1	1,80	36,32	< 0,0001
EC^2	0,0121	1	0,0121	0,2429	0,6275
Kalıntı	0,9931	20	0,0497		
Uyum Eksikliği	0,2449	3	0,0816	1,85	0,1756
Hata	0,7482	17	0,0440		
Düzeltilmiş Toplam	188,56	29			

R^2=0,9947; Adjusted R^2=0,9923; Predicted R^2=0,9876; Adequate Precision=58,1797; C.V.%=4,96.

Yeterli hassaslık (adequate precision), sinyal gürültü oranını ifade eder. Sinyal gürültü oranının 4'ün üstünde olması istenir. Bu çalışmada elde edilen 58,1797 değerindeki sinyal gürültü oranı yeterli sinyali belirtmektedir. Uyum eksikliği (lack of fit), regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için modelin başarısını ölçer. Model ile veri uyumunun iyi bir düzeyde olması için uyum eksikliği için hesaplanan p değerinin 1'e yakın olması gerekir. Matematiksel modelin uyum eksikliği (1,85) deneysel hataya göre anlamlı değildir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği model bağımsız değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonda GOS-4 (%) değerini önerebilmesi açısından iyidir. Yüksek varyasyon katsayısı (CV) değerleri gerçekleştirilen deneylerin güvenilirliğinin az olduğunu gösterir. Varyasyon katsayısı, deneysel olarak elde edilen değerlerin tahminlenen değerlerden nispi dağılımını göstermekte olup %10'dan büyük olmaması istenir. Bu çalışmada elde edilen %4,96 değeri gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Polinomiyal çok değişkenli regresyon tekniği kullanılarak T, LC ve EC faktörlerinin GOS-4 sentezine etkisini ifade eden bir matematiksel model (4.2) elde edilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

$$\text{GOS-4}= 4{,}76 -0{,}38(T)+3{,}36(LC)-0{,}09(EC)-0{,}11(T)(LC)0{,}18(T)(EC)0{,}07(LC)(EC)+0{,}04(T^2)-0{,}49(LC^2)-0{,}04(EC^2) \quad (4.2)$$



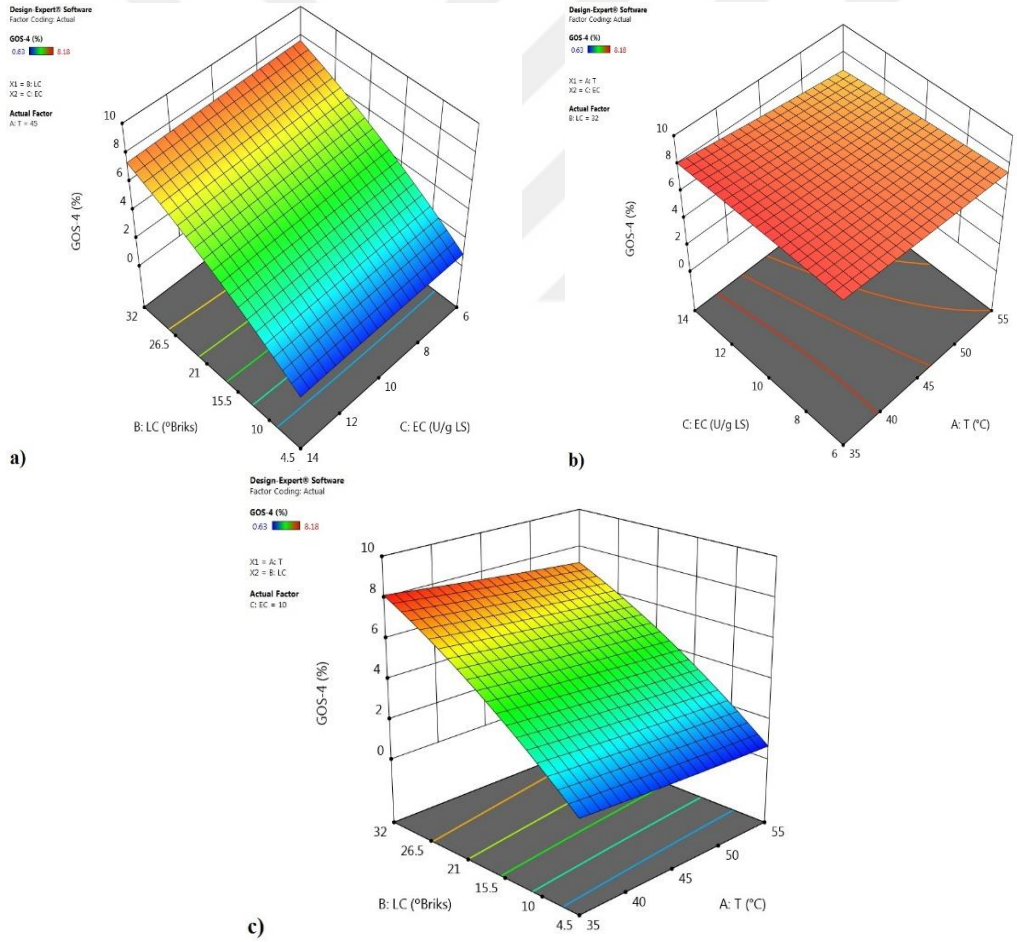
Şekil 4.8 : GOS-4 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-4 için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Tahminlenen GOS-4 değerleri ile deneysel GOS-4 değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.8a). Artıkların normal olasılık grafiğinde düz çizgi çevresi etrafındaki dağılımı normal bir dağılım olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8b). Bu veriler elde edilen matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini göstermektedir.

Sentezlenen %GOS-4'ü z-eksenine ve bir parametre sabit tutulup diğer iki parametre x- ve y-eksenine yerleştirilerek 3-boyutlu yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir. Sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu parametrelerinin birbirleri ile etkileşimleri elde edilen grafikler ile GOS-4 sentezi için görselleştirilmiştir.

LC ve EC etkileşiminin GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği, reaksiyon sıcaklığı 45°C'de sabit tutularak çizilmiştir (Şekil 4.9a). LC arttıkça sentezlenen GOS-4'te önemli düzeyde artarken, artan EC'nin GOS-4 sentez veriminde önemsiz bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6) . Fakat aynı LC'de EC arttıkça GOS-4 sentez veriminde azalma vardır. Yüksek LC ve düşük EC kombinasyonlarının GOS-4 sentez veriminde daha yüksek sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bunun nedeni artan

EC'nin hidroliz aktivitesinin ön plana çıkması olarak düşünülmüştür. EC ve T etkileşiminin sentezlenen GOS-4 değerine etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği, reaksiyon LC=32 °Briks değerinde sabit tutularak çizilmiştir (Şekil 4.9b). Grafik incelendiğinde düşük EC ve düşük T etkileşiminin daha yüksek GOS-4 verimi sağladığı görülmektedir. LC ve T etkileşiminin sentezlenen GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği, reaksiyon EC=10 U/g LS değerinde sabit tutularak çizilmiştir (Şekil 4.9c). Grafikte LC arttıkça artan GOS-4 verimi görülmektedir (Şekil 4.9c). Enzimatik reaksiyon sürecinde elde edilen GOS'lerin zincir uzunlukları LC değerine önemli derecede bağlıdır. LC arttıkça sentezlenen GOS'lerin zincir uzunlukları ve miktarları artmaktadır. Deney setlerinden elde edilen verilere göre GY değerinin maksimum olduğu noktalardaki GOS-4 en düşük %0,63 ile en yüksek %8,18 bulunmuştur (Şekil 4.9a, b ve c).



Şekil 4.9 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkarit).

4.2.3.2 Reaktör-1'de GOS-3 eldesi

Matematiksel model model %99,99 güvenilirlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7). Sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC) ve sıcaklığın kuadratik etkileşimi (T^2) ve laktoz konsantrasyonunun kuadratik etkileşimi (LC^2) değerleri anlamlı model terimleridir. Modelin determinasyon katsayısı (R^2) 0,9938 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7 : GOS-3 yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri.

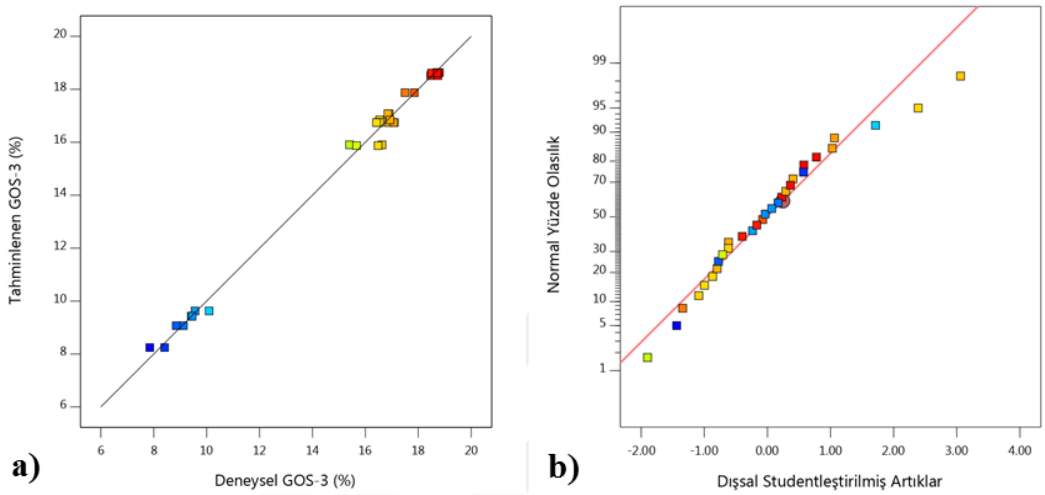
Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	411,87	9	45,76	358,71	< 0,0001
T	4,60	1	4,60	36,06	< 0,0001
LC	347,17	1	347,17	2721,26	< 0,0001
EC	0,0689	1	0,0689	0,5401	0,4709
T*LC	0,1922	1	0,1922	1,51	0,2339
T*EC	0,0200	1	0,0200	0,1568	0,6963
LC*EC	0,1035	1	0,1035	0,8114	0,3784
T^2	0,7415	1	0,7415	5,81	0,0257
LC^2	59,27	1	59,27	464,61	< 0,0001
EC^2	0,0001	1	0,0001	0,0006	0,9813
Kalıntı	2,55	20	0,1276		
Uyum Eksikliği	0,4503	3	0,1501	1,21	0,3347
Hata	2,10	17	0,1236		
Düzeltilmiş Toplam	414,42	29			

R^2=0,9938; Adjusted R^2=0,9911; Predicted R^2=0,9855; Adequate Precision=50,3777; C.V.%=2,37.

Bu sonuç modelin toplam varyasyonun %99,38'lik kısmını açıklayabilerken, %0,62'lik kısmını ise açıklamakta başarısız kaldığını göstermektedir. Elde edilen yüksek R^2 değeri elde edilen matematiksel modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Elde edilen yüksek ayarlamalı R^2 (0,9911) ve tahmini R^2 (0,9855) değerleri deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyumu göstermektedir. Belirlenen sinyal gürültü oranı (50,3777) ise yeterli sinyali ifade etmektedir. Matematiksel modelin uyum eksikliği (1,21) deneysel hataya göre anlamlı bulunmamış ve bu nedenle model bağımsız değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonda GOS-3 (%) değerini önerebilmesi açısından iyidir. Elde edilen varyasyon katsayısı değeri (%3,93) gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Polinomiyal çok değişkenli regresyon tekniği kullanılarak T, LC ve EC faktörlerinin GOS-3 sentezine etkisini ifade eden bir matematiksel model (4.3) elde edilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

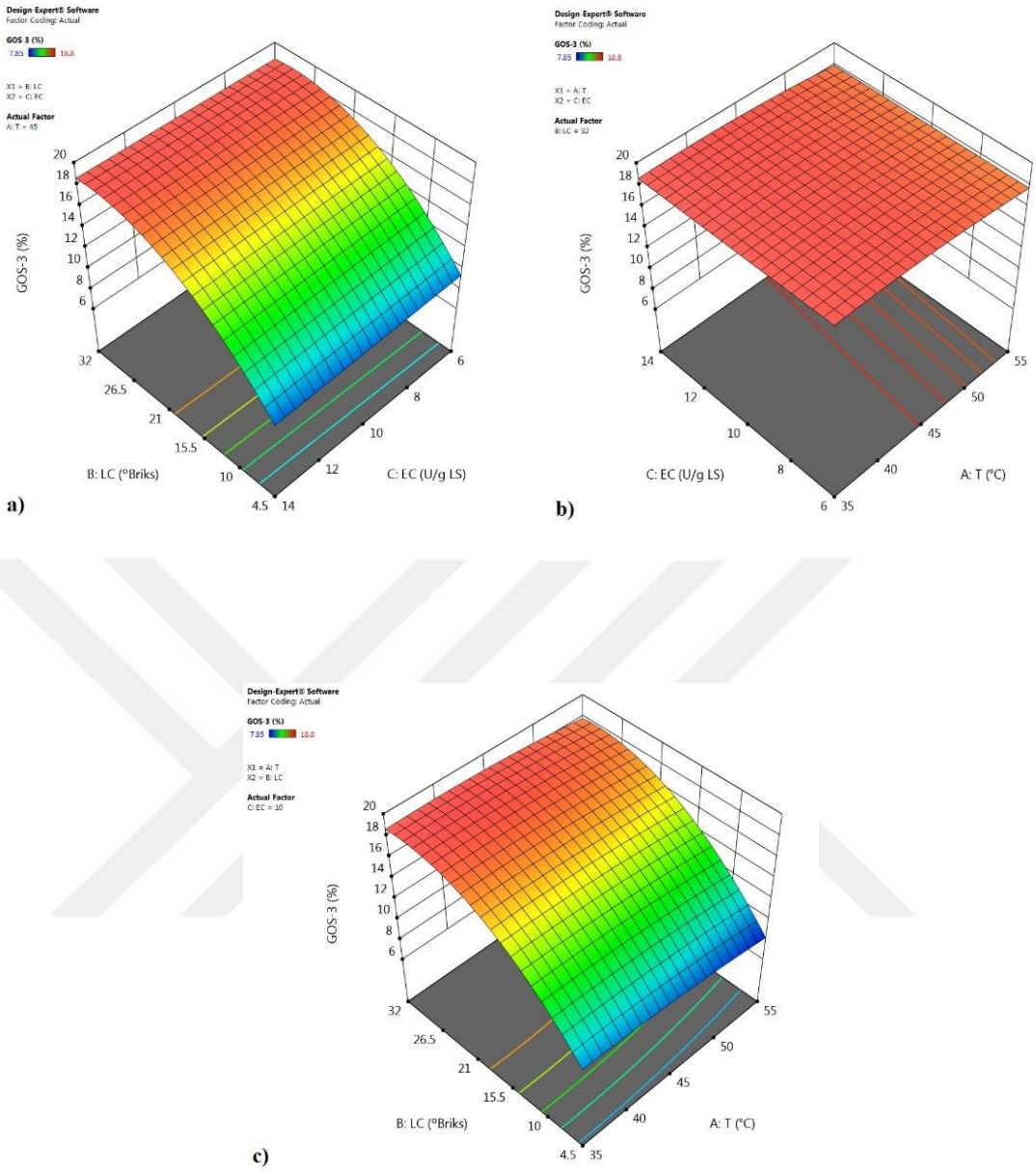
$$GOS\text{-}3= 16{,}75-0{,}54(T)+4{,}66(LC)-0{,}06(EC)+0{,}16(T)(LC)+0{,}05(T)(EC)+ 0{,}11(LC)(EC)-0{,}32(T^2)-2{,}83(LC^2)-0{,}003(EC^2) \quad (4.3)$$



Şekil 4.10 : GOS-3 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-3 için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Tahminlenen GOS-3 değerleri ile deneysel GOS-3 değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.10a). GOS-3 için artıkların normal olasılık grafiği matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini göstermektedir (Şekil 4.10b).

LC arttıkça sentezlenen GOS-3'te önemli düzeyde artarken, EC arttıkça GOS-3 sentez veriminde önemli bir değişim olmadığı görülmüştür (Şekil 4.11a). Nitekim elde edilen ANOVA sonuçlarında EC etkisi önemsiz bulnmuştur (Çizelge 4.7). Yüksek LC'de GOS-4'te olduğu gibi GOS-3'te de sentez verimi yüksektir. Grafik incelendiğinde düşük T etkileşimlerinin daha yüksek GOS-3 verimi sağladığı görülmektedir (Şekil 4.11b). EC ve T etkileşiminin sentezlenen GOS-3'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafiğinde (Şekil 4.11c) ise yüksek LC ve düşük T etkileşiminin GOS-3 verimini pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Deney setlerinden elde edilen verilere göre GY değerinin maksimum olduğu noktalardaki GOS-3 en düşük %7,85 ile en yüksek %18,8 arasında değişmektedir.



Şekil 4.11 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-3'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkarit).

4.2.3.3 Reaktör-1'de toplam GOS (GY) eldesi

GY için elde edilen model %99,99 güvenilirlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.8). Sıcaklık (T), başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC), sıcaklığın kuadratik etkileşimi (T^2) ve laktoz konsantrasyonunun kuadratik etkileşimi (LC^2) değerleri anlamlı model terimleridir. Matematiksel modelin determinasyon katsayısı (R^2=0,9988) modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Elde edilen R^2 değeri

modelin toplam varyasyonun %99,88'lik kısmını açıklayabilerken, %0,12'lik kısmını ise açıklamakta başarısız kaldığını ifade etmektedir. Ayarlamalı (adjusted) R^2 değeri (0,9982) ve tahmini (predicted) R^2 değeri (0,9969) deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyumu belirtmektedir.

Çizelge 4.8 : GY yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri.

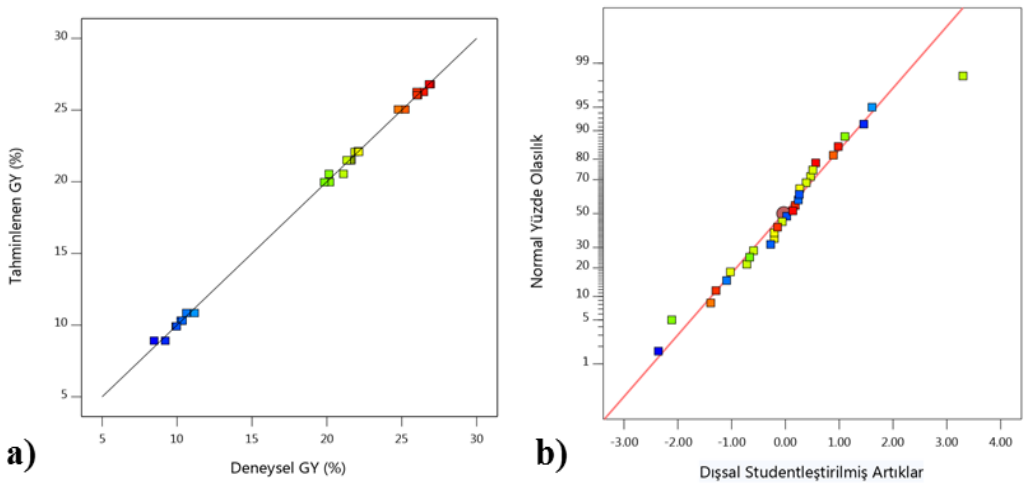
Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	1125,50	9	125,06	1796,53	< 0,0001
T	13,62	1	13,62	195,61	< 0,0001
LC	1029,29	1	1029,29	14786,61	< 0,0001
EC	0,3813	1	0,3813	5,48	0,0297
T*LC	0,0153	1	0,0153	0,2200	0,6441
T*EC	0,1431	1	0,1431	2,06	0,1671
LC*EC	0,0144	1	0,0144	0,2076	0,6536
T^2	0,5687	1	0,5687	8,17	0,0097
LC^2	81,70	1	81,70	1173,73	< 0,0001
EC^2	0,0158	1	0,0158	0,2269	0,6390
Kalıntı	1,39	20	0,0696		
Uyum Eksikliği	0,0673	3	0,0224	0,2880	0,8334
Hata	1,32	17	0,0779		
Düzeltilmiş Toplam	1126,89	29			

R^2=0,9988; Adjusted R^2=0,9982; Predicted R^2=0,9969; Adequate Precision=117,4211; C.V.%=1,35.

Elde edilen 117,4211 değerindeki sinyal gürültü oranı yeterli sinyali belirtmektedir. Matematiksel modelin uyum eksikliği (0,288) deneysel hataya göre anlamlı değildir. Dolayısıyla uyum eksikliği model bağımsız değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonda GY değerini önerebilmesi açısından başarılıdır. Varyasyon katsayısı (%3,06) değeri gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Polinomiyal çok değişkenli regresyon tekniği kullanılarak T, LC ve EC faktörlerinin GY sentezine etkisini ifade eden bir matematiksel model (4.4) elde edilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

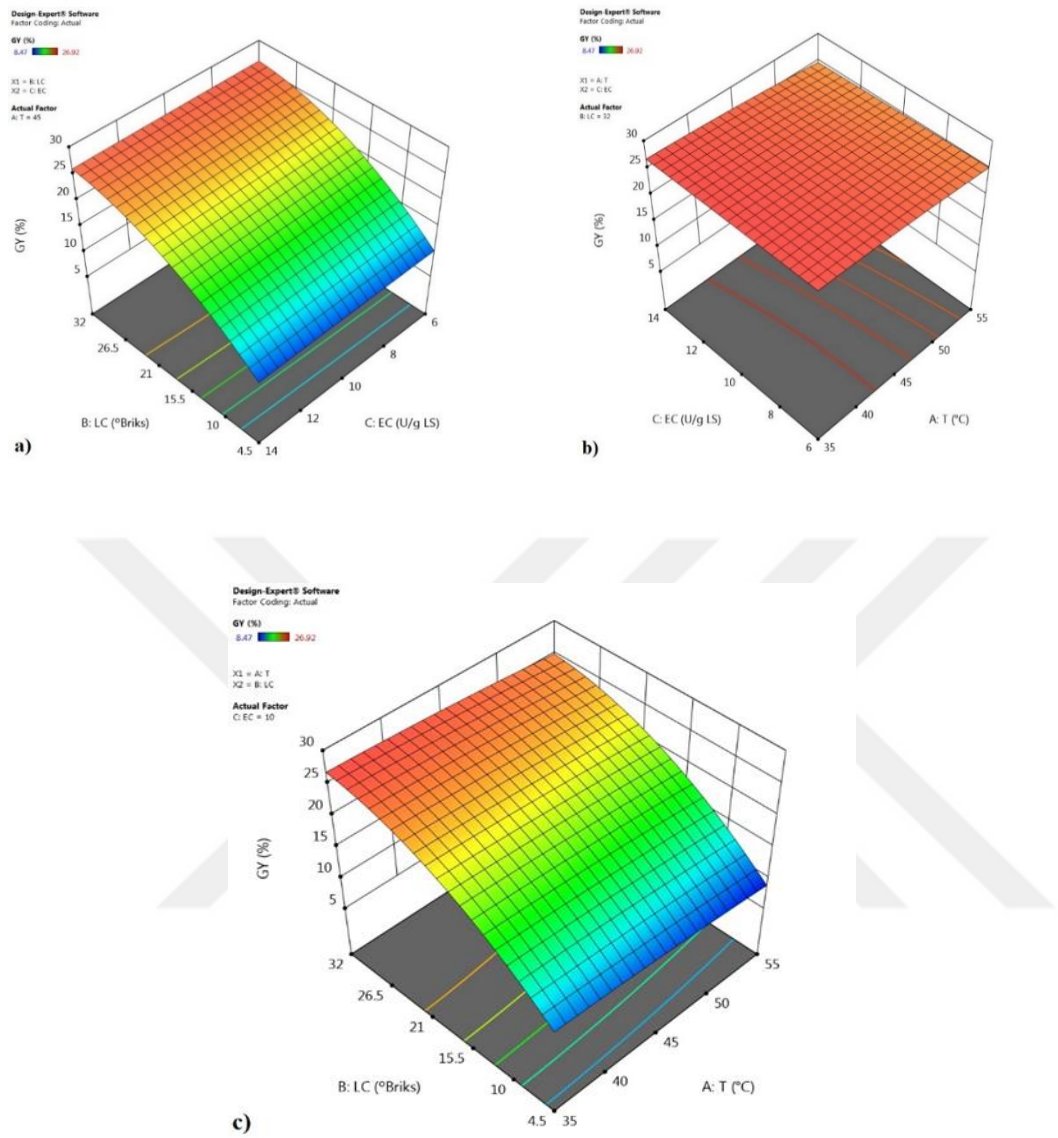
$$GY = 21,51-0,92(T)+8,02(LC)-0,15(EC)+0,044(T)(LC)-0,13(T)(EC)+ 0,04(LC)(EC)-0,28(T^2)-3,33(LC^2)-0,05(EC^2) \quad (4.4)$$



Şekil 4.12 : GY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GY için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Reaktör-1 sisteminden elde edilen veriler değerlendirildiğinde tahminlenen GY değerleri ile deneysel GY değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.12a). Artıkların düz çizgi çevresi etrafındaki dağılımı normal bir dağılım olduğunu göstermekte ve elde edilen matematiksel modelin parametrelerinin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini göstermektedir (Şekil 4.12b).

LC ve EC etkileşiminin GY üzerine etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği (Şekil 4.13a) incelendiğinde, LC arttıkça GY'nin önemli düzeyde arttığı, EC arttıkça ise GY'de önemli bir değişim olmadığı anlaşılmıştır. Yüksek LC'de GY yüksektir. Düşük EC ve düşük T etkileşiminin daha yüksek GY sağladığı görülmektedir Yüksek LC'de EC'nin artması maksimum GOS sentezi için gerekli süreyi kısaltmış ve eser miktarda GY'de azalma sağlamıştır (Şekil 4.13b). Çünkü, artan EC ile birlikte substrat molekülleriyle enzim-substrat kompleksini sağlayacak enzim sayısında artış olmuş ve böylece enzim aktivitesi artarak daha hızlı bir biçimde transgalaktosilasyon gerçekleşmiştir. Fakat toplam GOS değeri tepe noktasına ulaşınca yüksek enzim içeriğine sahip reaktörde hidroliz reaksiyonu da daha hızlı gerçekleşmiştir. LC ve T etkileşiminin GY değerine etkisini gösteren yüzey yanıt grafiğinde ise yüksek LC ve düşük T etkileşiminin GY değerini pozitif yönde etkilediği görülmektedir (Şekil 4.13c).



Şekil 4.13 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GY'ye etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GY: 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı).

Hidroliz ve transgalaktosilasyon reaksiyonları eş zamanlı olarak gerçekleşmesine rağmen reaksiyon parametreleri değiştirilerek reasiyonun transgalaktosilasyon yönünde baskın halde devam etmesi sağlanabilir. Bu nedenle, yüksek LC, düşük T ve enzim aktivitesi gözetilerek uygun EC'de, hidroliz reaksiyonuna kıyasla daha yüksek bir transgalaktosilasyon hızı elde edilebilemektedir. Deney setlerinden elde edilen verilere göre maksimum GY değeri en düşük %8,47 ile en yüksek %26,92 arasında değişmektedir.

4.2.3.4 Maksimum toplam GOS'nin elde edildiği süre (TMGY)

Maksimum toplam GOS değerinin gözlemlendiği reaksiyon süresi TMGY olarak tanımlanmıştır. Kuadratik model %99,99 güvenilirlik aralığında istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.9). Sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC), sıcaklık-laktoz konsantrasyonu etkileşimi (T*LC), sıcaklık-enzim konsantrasyonu etkileşimi (T*EC), laktoz konsantrasyonu-enzim konsantrasyonu etkileşimi (LC*EC), sıcaklığın kuadratik etkileşimi (T^2) ve laktoz konsantrasyonunun kuadratik etkileşimi (LC^2) ve enzim konsantrasyonunun kuadratik etkileşimi (EC^2) değerleri anlamlı model terimleri olarak bulunmuştur. Matematiksel modelin determinasyon katsayısı (R^2=0,9953), modelin toplam varyasyonun %99,53'lük kısmını açıklayabilirken, %0,47'lik kısmını ise açıklamakta başarısız kaldığını göstermekle beraber modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir.

Çizelge 4.9: TMGY yanıt yüzey kuadratik modeli için ANOVA değerleri.

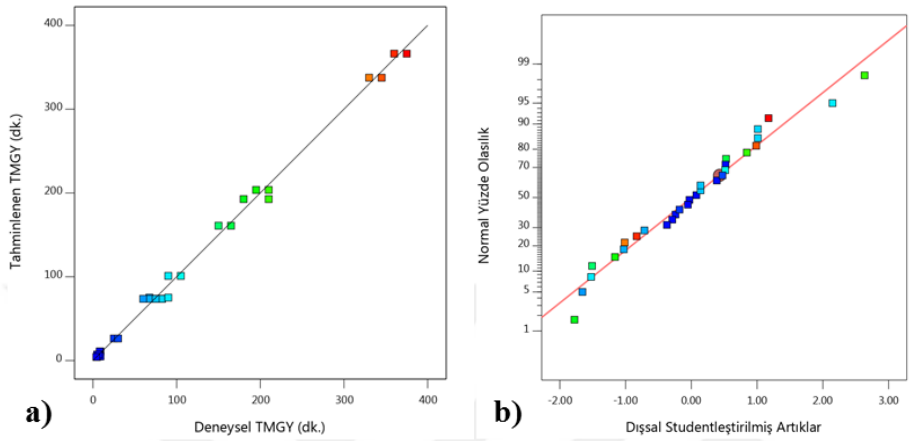
Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	380400	9	42267,92	470,19	< 0,0001
T	22914,39	1	22914,39	254,90	< 0,0001
LC	265200	1	265200	2950,38	< 0,0001
EC	41259,77	1	41259,77	458,98	< 0,0001
T*LC	9591,13	1	9591,13	106,69	< 0,0001
T*EC	1444,53	1	1444,53	16,07	0,0007
LC*EC	21528,13	1	21528,13	239,48	< 0,0001
T^2	1586,26	1	1586,26	17,65	0,0004
LC^2	16992,01	1	16992,01	189,02	< 0,0001
EC^2	1278,18	1	1278,18	14,22	0,0012
Kalıntı	1797,91	20	89,90		
Uyum Eksikliği	131,91	3	43,97	0,4487	0,7215
Hata	1666,00	17	98,00		
Düzeltilmiş Toplam	382200	29			

R^2=0,9953; Adjusted R^2=0,9932; Predicted R^2=0,9891; Adequate Precision=66,1075; C.V.%=8,30.

Ayarlamalı R^2 (0,9932) ve tahmini R^2 (0,9891) değerleri deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyum olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen 66,1075 değerindeki sinyal/gürültü oranı yeterli sinyali belirtmektedir. Matematiksel modelin uyum eksikliği (0,4487) deneysel hataya göre anlamlı değildir. Varyasyon katsayısı (CV) %8,30 olarak bulunmuştur ve gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Polinomiyal çok değişkenli regresyon tekniği kullanılarak T, LC ve EC faktörlerinin maksimum GY'nin elde edildiği süreye (TMGY) etkisini ifade eden bir matematiksel model (4.5) elde edilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

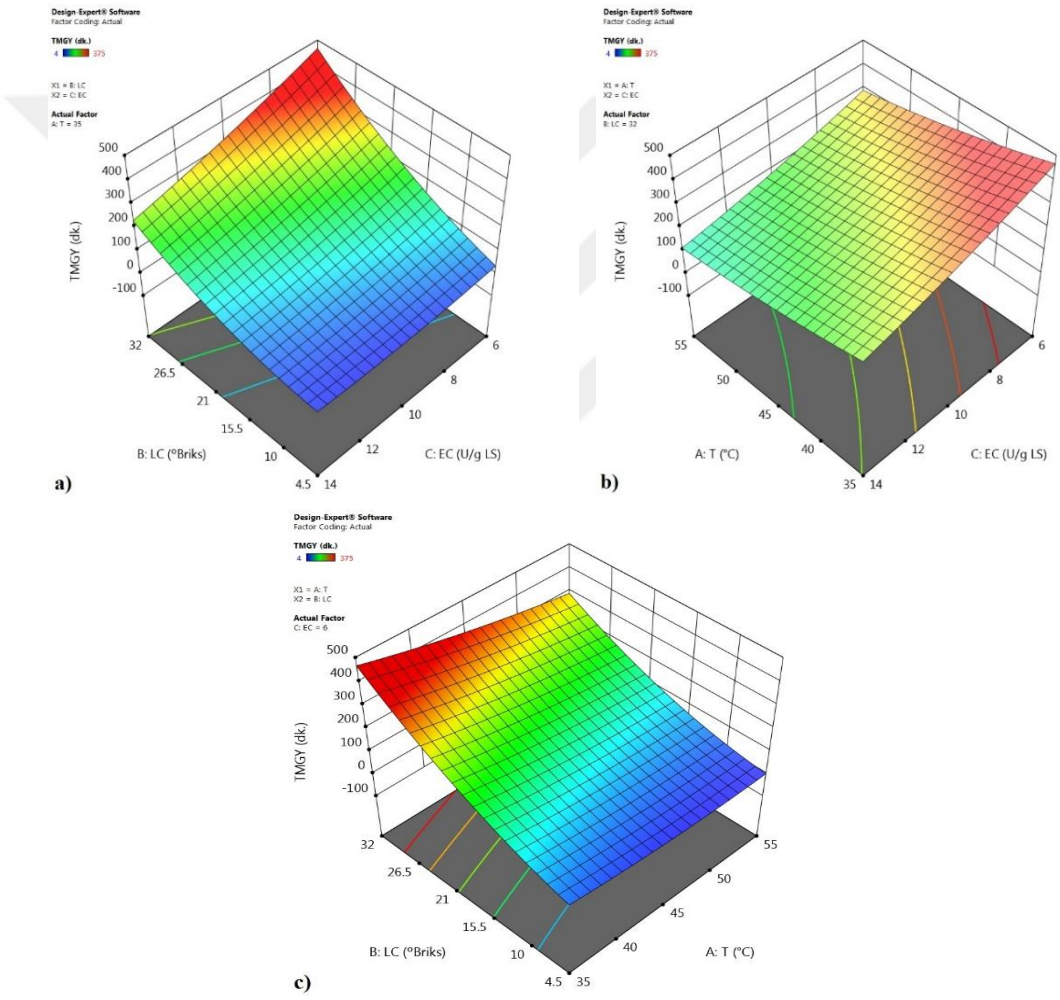
$$TMGY = 73{,}75 - 37{,}84(T) + 128{,}75(LC) - 50{,}78(EC) - 34{,}62(T)(LC) + 13{,}44(T)(EC) - 51{,}88(LC)(EC) + 14{,}66(T^2) + 47{,}97(LC^2) + 13{,}16(EC^2) \quad (4.5)$$



Şekil 4.14 : TMGY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve TMGY için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Reaktör-1 sisteminden elde edilen veriler değerlendirildiğinde tahminlenen TMGY ile deneysel TMGY değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.14a). Artıkların normal olasılık grafiğinde düz çizgi çevresi etrafındaki dağılımı matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini göstermektedir (Şekil 4.14b). Elde edilen verilere göre maksimum GY değerinin elde edildiği süreler (TMGY) 4 dk. ile 375 dk. arasında değişmektedir. En düşük TMGY değeri T=55 °C, LC=4,5 °Briks ve EC=10 U/g LS kombinasyonu deney seti için bulunurken, en yüksek TMGY değeri T=45 °C, LC=32 °Briks ve EC=6 U/g LS kombinasyonunu içeren deney setinde elde edilmiştir (Çizelge 4.1). LC ve EC etkileşiminin TMGY'ye etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği (Şekil 4.15a) incelendiğinde, yüksek LC ve düşük EC kombinasyonun TMGY değerini arttırdığı görülmektedir. Bir diğer deyişle maksimum miktarda toplam GOS elde etmek için gerekli reaksiyon süresi artmaktadır. Yüksek TMGY değerleri enzimatik reaksiyon süresince transgalaktosilasyon aktivitesinin laktoz ve GOS hidroliz aktivitelerine kıyasla baskın olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, maksimum GOS miktarını elde etmek için gerekli olan süre artmaktadır. Enzimatik GOS sentezi süresince LC azalırken GOS, glukoz ve galaktoz konsantrasyonları artmaktadır. GOS miktarının

artışı, transgalaktosilasyon ile hidroliz reaksiyonlarının dengeye ulaştığı noktaya kadar sürmektedir. Bu noktadan sonra GOS yıkımı GOS sentezini baskılamakta ve dolayısıyla glukoz ve galaktoz termodinamik açıdan tercih edilen reaksiyon ürünleri olmaktadır. Bu nedenle, reaksiyon sonlandırma süresi (bu çalışmada TMGY olarak ifade edilebilir) maksimum GOS elde etmek için önemli bir yanıttır. Yüksek LC'de TMGY değerleri de artmıştır. Grafik incelendiğinde düşük EC ve düşük T etkileşimlerinin yüksek TMGY değerleri sağladıkları görülmektedir (Şekil 4.15b). LC ve T etkileşiminin (Şekil 4.15c) ise yüksek LC ve düşük T değerlerinde maksimum GOS elde etmek için daha uzun reaksiyon sürelerine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin maksimum toplam GOS'nin elde edildiği süreye (TMGY) etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC).

Elde edilen matematiksel modeller yardımıyla herhangi bir TMGY değerinde maksimum GY'yi sağlayan deneysel koşullar (sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu) öngörülebilmektedir. Numerik optimizasyon yöntemi ile bazı

TMGY değerleri için maksimum GY sağlayan deneysel koşullar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Kullanılan EC'nin benzer olduğu çalışma koşullarında, düşük LC ve yüksek T uygulamasının elde edilecek GY'yi azalttığı; maksimum GY elde edilecek süreyi ise önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Yüksek LC ve düşük T kullanımı ise maksimum GY'ye erişim süresini arttırmaktadır. Ancak bu koşullarda elde edilen GY en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ek olarak EC'nin azaltılması maksimum GY'ye erişim süresini daha da arttırmakta; bununla birlikte elde edilen maksimum GY üzerine önemli bir etki oluşturmamaktadır.

Çizelge 4.10 : Numerik optimizasyon ile bazı TMGY değerlerinde elde edilen GY.

TMGY (dk.)	GOS-3 (%)	GOS-4 (%)	T (°C)	LC (°Briks)	EC (U/g LS)
15	14,78	3,42	50,37	14,48	13,84
30	16,28	4,34	47,14	17,47	13,56
60	17,63	5,38	45,24	21,45	13,34
120	18,58	6,58	44,36	26,83	13,07
180	18,78	7,31	41,10	29,59	12,69
240	18,75	7,75	39,00	31,13	11,72
360	18,67	8,04	36,39	31,95	8,64

(LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu, T: sıcaklık, EC: enzim konsantrasyonu, GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkaritler, GOS-4: 4 zincirli galaktoligosakkaritler ; TMGY: maksimum GY'nin elde edildiği süre).

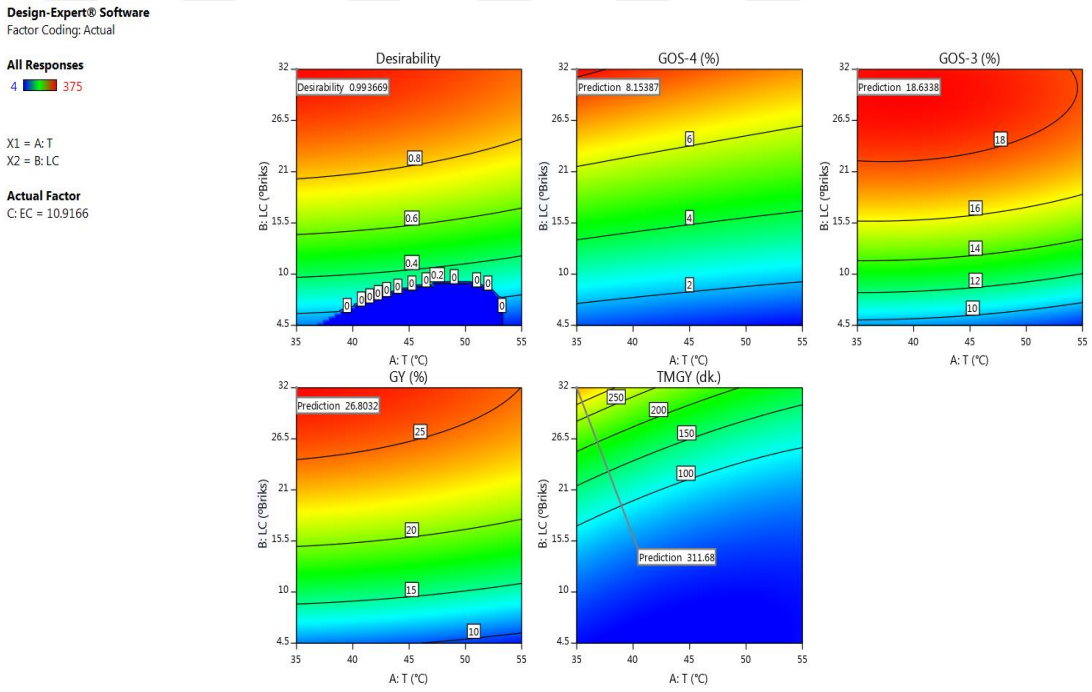
4.2.3.5 Reaktör-1 için GY değerinin optimize edilmesi

Yanıt yüzey analizi sonucunda GY'yi maksimize eden reaksiyon koşulları belirlenmiştir. GY'yi maksimize eden reaksiyon koşullarını belirlemek için istatistiksel yazılım paketine uygulanan numerik optimizasyon ayarları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Seçilen reaksiyon parametreleri aralığı içinde ulaşılabicek en yüksek GY değeri hedeflenerek optimizasyon ayarları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 32 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu, 35 °C sıcaklık ve 10,917 U/g LS enzim konsantrasyonu optimum proses koşulları olarak hesaplanmıştır. Optimum enzim konsantrasyonunda elde edilen kontur diyagramları Şekil 4.16'da verilmiştir. Optimum proses koşullarında tahminlenen GOS-4 %8,154, GOS-3 %18,634, GY %26,803 ve TMGY 311,68 dk. olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.11 : Reaktör-1'de GY optimizasyonu için numerik koşullar.

İsim	Amaç	Üst Sınır	Alt Sınır	Alt Ağırlık	Üst Ağırlık	Önem Derecesi
T	Aralık içinde	35	55	1	1	3
LC	Aralık içinde	4.5	32	1	1	3
EC	Aralık içinde	6	14	1	1	3
GOS-4	Yok	0,63	8,18	1	1	3
GOS-3	Yok	7,85	18,8	1	1	3
GY	En yüksek	8,47	26,92	1	1	3
StdErr(GY)	Yok	0,11	0,16	1	1	3
TMGY	Aralık içinde	4	375	1	1	3
StdErr(TMGY)	Yok	3,87	5,81	1	1	3

(T: sıcaklık (ºC), LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkaritler (%), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkaritler (%), GY: Toplam GOS, 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı (%), StdErr(GY): GY değeri standart hata, TMGY: Toplam GOS'nin maksimum olduğu noktadaki reaksiyon süresi, StdErr(TMGY): TMGY için standart hata).



Şekil 4.16 : Optimum GY'yi sağlayan reaksiyon koşullarındaki kontur diyagramları (EC:10,917 U/g LS).

Yapılan çalışmalarda *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin katalizlediği GOS sentez reaksiyonunda etkisi bulunan laktoz konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve sıcaklık parametreleri yanıt yüzey yöntemi ile matematiksel bir modele uyarlanarak GOS-4, GOS-3, ve TMGY değerleri başarılı bir şekilde öngörülmüştür. Oluşturulan matematiksel modeller yardımı ile yüksek GOS miktarı için reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Ayrıca, elde edilen modeller yardımıyla ayrı ayrı maksimum

GOS-3 ve GOS-4 değerlerini sağlayacak reaksiyon koşulları da optimize edilebilecektir. Farklı sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonunda maksimum GY'nin elde edildiği süreyi ifade eden matematiksel model de türetilmiştir. Herhangi bir deney seti kombinasyonunda maksimum toplam GOS'nin elde edileceği sürenin tahminlenmesi, elde edilecek maksimum verimin arttırılması hedeflenen ozmotik membran distilasyon tasarımı sisteminin GOS sentez sürecine entegrasyonunda kullanılabilecektir.

4.2.4 Reaktör-1'de elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi

Transgalaktosilasyon ve hidroliz reaksiyonlarının aynı anda gerçekleştiği GOS üretimi için sentez mekanizmasının karmaşıklığı, farklı reaksiyonların farklı substratlara ve oranlara sahip olması nedeniyle artmaktadır (González-Delgado ve diğ., 2016). Bu nedenle, GOS sentez sürecini analiz etmek ve optimizasyonunu sağlamak için farklı yaklaşımların denenmesi gerekmektedir. *A.oryzae* kaynaklı GOS sentezinin yanıt yüzey ile optimizasyonu ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. GOS'nin enzimatik sentezi kinetik kontrollü bir reaksiyon olduğundan enzim özelliklerine oldukça bağlıdır. Enzim kaynağı laktoz dönüşümü, üretkenlik ve ürün komposizyonu gibi parametreleri etkilemektedir. *A. oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz yüksek spesifik aktivite, yüksek sıcaklık dayanımı ve düşük maliyetli olduğundan ön plana çıkmaktadır. Fakat, bu enzimin GOS sentezi için laktoz dönüşümü düşük olduğundan optimizasyon yöntemleri kullanılarak reaksiyon koşullarının optimize edilmesi ile GOS miktarının arttırılması önemli bir gerekliliktir (Vera ve diğ., 2012).

GY'yi olumlu etkileyen en önemli reaksiyon parametresi LC'dir (Çizelge 4.1). Bu aynı zamanda, LC'nin lineer ve ikinci dereceden terimlerinin oldukça anlamlı olduğu regresyon denkleminden de görülmektedir (Çizelge 4.8). LC'nin transgalaktosilasyon aktivitesini iyileştirmesi üzerindeki olumlu etkileri önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Iwasaki ve diğ., 1996; Mueller ve diğ., 2018; Neri ve diğ., 2009a). Neri ve diğ. (2009a) hidroliz ve transgalaktosilasyon reaksiyonlarının aynı anda meydana geldiğini ve reaksiyonun ürün profilinin büyük ölçüde LC'ye bağlı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, hidroliz reaksiyonunun düşük LC'de baskın, GOS oluşumunun ise yüksek LC'de baskın olduğunu belirtmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde LC:4,5 °Briks reaksiyonlarında yüksek laktoz dönüşümüne karşın elde edilen GOS düşüktür (Şekil 4.5a). Ayrıca hidroliz aktivitesinin fazla olmasından dolayı reaksiyon

sürdükçe laktoz ve oluşan GOS'ler monosakkaritlere parçalanmıştır (Şekil 4.5a). Düşük LC'de reaksiyon ortamındaki su moleküllerinin fazlalığı, suyun galaktosil gruplarının alıcısı olarak hareket etmesine olanak sağlar ve enzimin aktif bölgesinden galaktoz salınabilir (Iwasaki ve diğ., 1996). Bir başka deyişle suyun galaktosil alıcısı olma ihtimali daha yüksektir ve bu nedenle reaksiyondaki hidroliz aktivitesi artmaktadır (Mueller ve diğ., 2018). LC'nin 18,25 °Briks seviyesinden 32 °Briks seviyesine artması 400 dakikalık bir GOS sentez süreci sonunda GY'yi yaklaşık %22'den %27'ye çıkarmıştır (Şekil 4.5a,b). Reaksiyon ortamındaki LC artışı laktoz ve oligosakkaritler gibi galaktosil gruplarının GOS oluşturmak için enzim galaktoz kompleksi ile bağlanma olasılığını arttırarak suyun alıcı olarak varlığını azaltmıştır (Jenab ve diğ., 2018). Laktoz, GOS sentezinde galaktozun hem donörü hem de alıcısı olarak görev yaptığından, laktoz konsantrasyonu sentez ve hidroliz reaksiyon hızları üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir ve bu tür reaksiyonların nispi etkisini belirler (Vera ve diğ., 2012). Düşük laktoz dönüşümlerinde reaksiyonun erken aşamalarında transgalaktosilasyon baskındır ve GY maksimum seviyeye ulaştığında hidroliz baskın olmaya başlar (Albayrak ve Yang, 2002; Palai ve diğ., 2012). Bu durum en net şekilde 18,25 °Briks LC'da 400 dakikada %60 dönüşümde, sentezlenen GOS-3 ve GOS-4'ün maksimum seviyelerine ulaştıktan sonra yıkıma uğramaya başlamalarından görülmektedir (Şekil 4.5a). Yüksek LC kullanımı, laktozun büyük ölçüde sıcaklığa bağlı olan çözünürlüğü ile sınırlıdır. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıkların kullanımı enzim stabilitesiyle sınırlıdır ve ayrıca enzimin kinetik parametreleri üzerinde olumsuz bir etki yaratabilir (Vera ve diğ., 2012). LC arttıkça gözlenen GOS verim artışı literatürde yapılan diğer çalışmalar ile uyumludur (González-Delgado ve diğ., 2016; Jenab ve diğ., 2018; Martınez-Villaluenga ve diğ., 2008; Mueller ve diğ., 2018; Neri ve diğ., 2009a).

GOS sentezi için EC ve sıcaklığın (T) artan seviyeleri LC kadar etkili değildir fakat ağırlıklı olarak TMGY'yi etkiledikleri saptanmıştır (Çizelge 4.10). Vera ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada da enzim/substrat oranının GOS verim ve spesifik üretkenlik değerlerinde önemli bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Kasche (1986) kinetik kontrollü bir reaksiyonda maksimum verimin enzimin kinetik parametreleri tarafından belirlendiğini ve enzim konsantrasyonunun sadece maksimum verime ulaşılma süresini etkilediğini ifade etmiştir. Nitekim elde edilen sonuçlarda yüksek LC'de artan EC seviyesi, sadece TMGY'yi düşürmekle kalmamış aynı zamanda GY'de de hafif bir

düşüşe neden olmuştur. Bunun nedeni ise EC'deki artış ile beraber hem GOS oluşum hızı hem de hidroliz hızının artmasıdır (Vera ve diğ., 2012). Benzer şekilde Jenab ve diğ. (2018) enzimin GOS üretimi üzerinde minimum etkiye sahip olduğunu, ancak artan EC seviyesinin daha yüksek laktoz dönüşümlerine neden olduğunu gözlemlemiştir. Mueller ve diğ. (2018) de yaptıkları çalışmada enzimin verim/laktoz dönüşümü üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Fakat aynı EC'de artan LC'nin daha fazla laktoz dönüşümü sağladığını rapor etmişlerdir.

TMGY'deki azalmanın ana nedeni, artan EC seviyelerinin, daha kısa sürede çok daha fazla transgalaktosilasyon aktivitesi sağlayan enzim-substrat kompleksinde bir artışa neden olmasıdır (Şekil 4.7). Sabit LC'de EC'nin arttırılması, hem laktoz hidrolizini hem de enzim aktivitesini ilk aşamada arttırmıştır (Şekil 4.4). Çünkü enzim-substrat kompleksi oluşturmak için daha fazla enzim mevcuttur ve böylece belirli bir zamanda daha fazla ürün (GOS) elde edilir. EC artarken hız sabit hale geldiğinde sabit bir nokta görünecektir. Bunun nedeni, artık substrat moleküllerinin sınırlayıcı faktör haline gelmesidir. Tüm substrat molekülleri enzimle birleşerek enzimdeki tüm aktif bölgeler doldurulmuştur (Das ve diğ., 2015). 14 U/g LS'den daha yüksek EC'lerde GY ve TMGY'de önemli değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.4). Yüksek EC düzeyine sahip reaktörde maksimum GY'ye ulaşıldıktan sonra GOS'nin glukoza ve galaktoza bozunmasının daha hızlı hale geldiği görülmüştür. GOS'nin enzimatik sentezi sırasında laktoz konsantrasyonu azalırken, GOS, glikoz ve galaktoz konsantrasyonları zamanla artar (Şekil 4.5). Monosakkaritlerin inhibe edici etkilerinden dolayı transgalaktosilasyon ve hidroliz reaksiyon hızlarının dengeye ulaştığı ve seviyeye kadar GY artışı devam etmiştir (Osman, 2016). Bu noktadan sonra GOS hidrolizi trasgalaktosilasyondan baskın hale gelerek glikoz ve galaktoz termodinamik açıdan tercih edilen ürünler haline gelmiştir (Matella ve diğ., 2006).

Sıcaklık arttıkça enzimin hidroliz aktivitesinin artarak GY'yi olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur (Şekil 4.6). Düşük sıcaklıkların aksine sıcaklığın yükselmesi ile enzim reaksiyonun erken sürelerinde hidroliz yönünde baskın bir şekilde çalışmaya başlamış ve oluşan GOS'ler hidroliz edilmiştir. Vera ve diğ. (2012) reaksiyon ortamındaki sıcaklık artışı ile birlikte GY veriminde hafif azalmanın hidroliz hızının GOS sentez hızından daha yüksek bir şekilde artması ile açıklamışlardır. Ayrıca daha önceki çalışmalarında da *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz kullanılan enzimatik reaksiyonlarda hidroliz reaksiyonunun aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğunu

rapor etmişlerdir (Vera ve diğ., 2011). Mueller ve diğ. (2018) yüksek sıcaklıklarda enzimin, kinetiğini değiştirerek transgalaktosilasyona göre daha yüksek hidroliz reaksiyon hızı sağladığını bildirmiştir. Chen ve diğ. (2003) de sıcaklığın GOS sentezine etkisini inceledikleri çalışmalarında da aynı sonuca ulaşmışlardır.

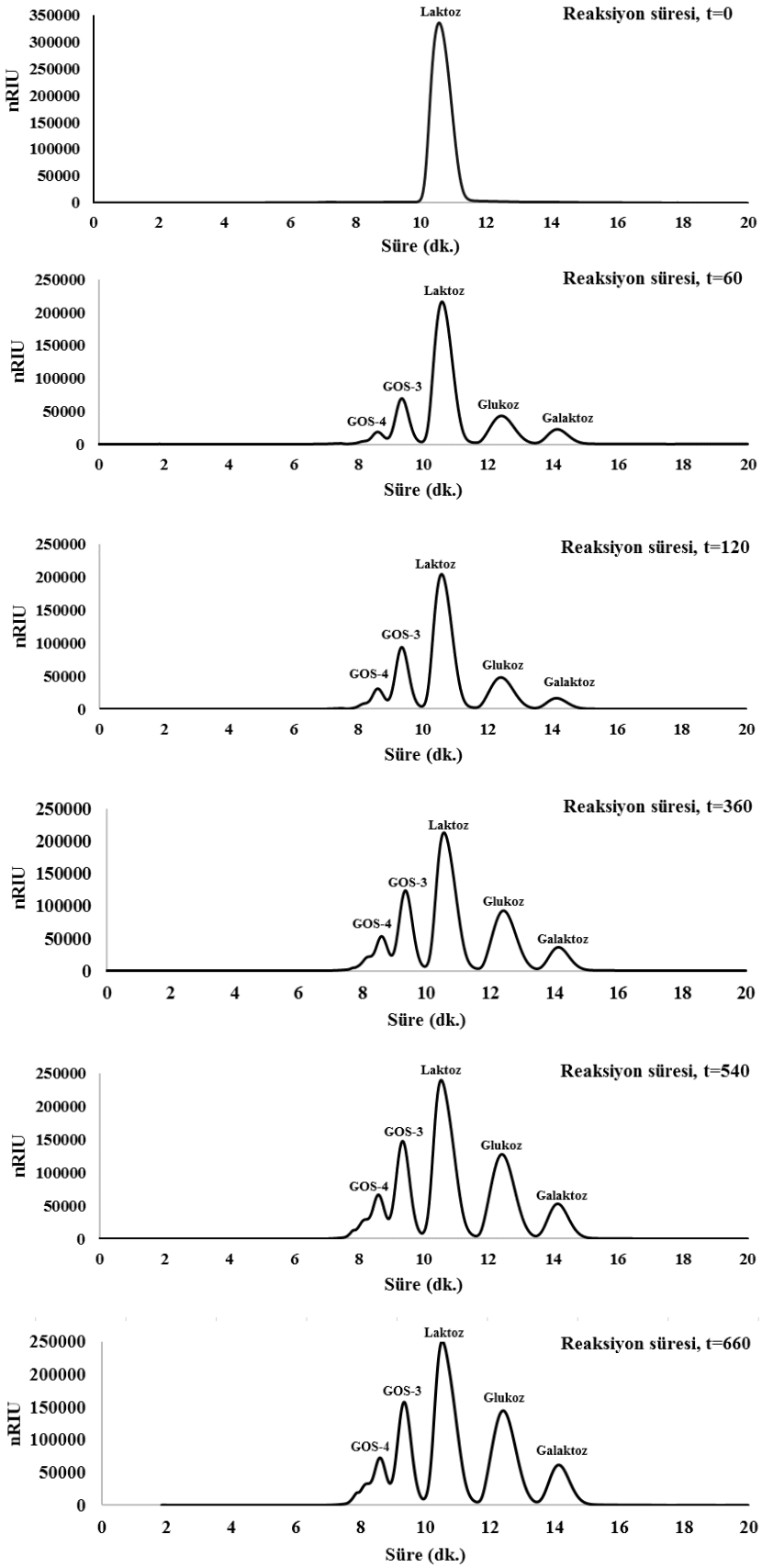
A.oryzae kaynaklı β-galaktosidaz enzimi kullanılarak elde edilen verim, endüstriyel üretim için uygun diğer enzim kaynaklarına göre biraz daha düşüktür (Sanz-Valero, 2009). Fakat, verimi yüksek olan bu enzimlerin üretkenlik değerleri düşüktür (Çizelge 4.12). Ekonomik bir GOS üretimi için yüksek üretkenlik değeri süreç veriminden daha önemlidir çünkü laktoz ucuz bir hammaddedir . Bu nedenle, %25-30 arasında bir GOS verimi sağlayan *A.oryzae* %40-55 arasında verim sağlayan enzim kaynaklarına nazaran reaktör verimi daha fazladır (Albayrak ve Yang, 2002). Reaktör verimliliği direkt olarak enzim konsantrasyonu ile ilgili olduğundan yüksek üretkenlik değerine sahip *A.oryzae* GOS sentezi süreçlerinde daha düşük miktarlarda enzim harcanmasını sağlar (Vera ve diğ., 2012). Ayrıca, *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidazın kg fiyatı 350 USD iken *K.lactis* ve *B.circulans* kaynaklı β-galaktosidazın sırasıyla 550 ve 850 USD'dir (Sanz-Valero, 2009). Bu nedenle, üretilen birim GOS'nin maliyeti diğer enzim kaynaklarına göre oldukça hesaplıdır. Sürekli karıştırmalı tip kesikli sistemde (reaktör-1) maksimum GY eldesi için T, LC ve EC parametrelerinin optimizasyonu yapılan bu çalışmada her ne kadar EC'nin GY'ye etkisi ihmal edilebilir bulunsa da elde edilen veriler yardımıyla ekonomik açıdan GOS sentezinde kullanılacak en uygun EC miktarına TMGY gözetilerek karar verilebilir.

Çizelge 4.12 : Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör ve serbest enzim ile yapılmış bazı çalışmalar.

Enzim kaynağı	**LC (g/L)**	**T (°C)**	**pH**	**GY (%)**	**Üretkenlik (g/L/h)**	**Referans**
B.circulans	46	40	6,0	24,0	2,2	(Mozaffar ve diğ., 1985)
B. singularis	300	45	3,7	54,0	4,8	(Shin ve Ji-Won, 1998)
T.aquaticus	160	70	4,6	34,8	2,3	(Berger ve diğ., 1995)
K.lactis	230	45	7,0	22,2	11,3	(Foda ve Lopez-Leiva, 2000)
A.oryzae	380	40	4,5	31,0	24,3	(Iwasaki ve diğ., 1996)
A.oryzae	400	40	4,5	28,0	11,2	(Vera ve diğ., 2012)
A.oryzae	200	40	4,5	24,1	4,0	(Gaur ve diğ., 2006)
A.oryzae	356	45	4,5	26,0	37,0	Bu çalışmada

Bu çalışmada T:45 °C LC: 32°Briks ve LC: 14 U/g LS için üretkenlik değeri 37 g/L/h hesaplanmıştır (Çizelge 4.12). °Briks değeri g/L birimine çevrimi için laboratuvarda 50 g 32 °Briks çözeltinin hacmi 45 ml olarak ölçülmüştür. Böylece suda çözünür kuru madde oranı 32g/100g olan laktoz çözeltisinin g/L cinsinden laktoz konsantrasyonu 32g/90mL ifadesinden 355,56 g/L olarak hesaplanmıştır. Üretkenlik değerleri reaksiyon sıcaklığına, enzim konsantrasyonuna ve maksimum GY elde edilen süreye bağlı olarak değişmektedir. Vera ve diğ. (2012) artan sıcaklık ile birlikte üretkenlik değerlerinin de arttığını ve bunun artan reaksiyon hızlarının bir sonucu olduğunu bildirmişlerdir.

Reaksiyon bitiş süresi olarak da değerlendirilebilecek olan TMGY, prebiyotik konsepte dayalı daha değerli GOS karışımı elde edilmesini sağlayan önemli bir yanıttır (Rastall ve diğ., 2016). González-Delgado ve diğ. (2016) üretilen GOS'nin kompozisyon profilinin sağlanan sağlık yararlarının belirlenmesi açısından oldukça önemli olduğunu söylemişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalarda GOS'nin prebiyotik etkisinin esas olarak GOS-3 ve GOS-4 ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Lamsal, 2012; Torres ve diğ., 2010). GOS-3 ve GOS-4'ün kalın bağırsak florası tarafından tamamen metabolize edilebildiği (Sako ve diğ., 1999) ve bu oligosakkaritlerin, özellikle GOS-4'ün, istenen prebiyotik etkiyi elde etmek için önemli olduğu bildirilmiştir (Gosling ve diğ., 2010). Bu nedenle, enzimatik reaksiyon parametreleri ayarlanarak GOS sentez sürecinden maksimum prebiyotik fayda sağlanabilir. Bu amaçla GY ve TMGY optimizasyon verilerini birlikte değerlendiren sayısal optimizasyon yöntemi uygulanmıştır (Çizelge 4.10) EC ve sıcaklıktaki azalma ile birlikte LC'deki artışın, maksimum ulaşılabilir GY elde etmek için gerekli süreyi uzatmıştır. 120 dakikaya kadar TMGY ile GY arasında görülen yüksek korelasyon ilerleyen sürelerde görülmemiştir. 180 dakikaya kadar GOS-3 ve GOS-4 değerleri birlikte artmış fakat reaksiyon devam ettikçe GOS-4 artmaya devam ederken GOS-3 azalmıştır. 15-360 dakikalık TMGY arasında GOS-4'ün GOS-3'e oranı iki kat artmış ve bu sonuç reaksiyon bitme süresinin GOS karışımının prebiyotik etkisi üzerindeki önemini göstermiştir. Genel bir değerlendirme yapıldığında hidroliz ve transgalaktosilasyon reaksiyonları aynı anda gerçekleşmesine rağmen, istenen GOS ürün kompozisyonu ve GY'ye reaksiyon koşullarının ayarlanmasıyla ulaşılabilir. Bu nedenle, yüksek LC, düşük veya orta derece yüksek sıcaklıklar ve düşük EC hidroliz aktivesine göre transgalaktosilasyon aktivitesini destekleme eğilimindedir.



Şekil 4.17 : Reaksiyon ürünlerinin zamana bağlı değişimini gösteren HPLC kromatogramları (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS).

GOS sentez sırasında allolaktoz ve galaktobioz gibi bazı çift zincirli sakkaritlerin sırasıyla galaktozun glukoza ve galaktoza enzimatik transferi ile oluşması mümkündür (Neri ve diğ., 2009a). Bu reaksiyonlar GOS sentezi için ara adım olarak kabul edilirler ve oluşumları geçicidir. Reaksiyon süresince galaktosil alıcısı olarak davranırlar ya da enzim tarafından parçalanarak galaktoz ve glikoza hidroliz edilirler (Huber ve diğ., 1976; Jobe ve Bourgeois, 1972). Elde edilen örnek HPLC kromatagramlarından da görüldüğü üzere (Şekil 4.17) reaksiyon süresince bu yan reaksiyonların meydana gelip gelmediği anlaşılamamaktadır. Bunun yanında *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidazın ihmal edilebilir miktarda transgalaktozile disakkarit ürettiği tespit edilmiştir (Albayrak ve Yang, 2002; Cheng ve diğ., 2006; Huerta ve diğ., 2011; Sanz-Valero, 2009; Vera ve diğ., 2011). Reaksiyon süresince farklı yapıda yüksek zincirli GOS'lerin oluşma ihtimali de mevcut olduğu gibi bunların HPLC ile tespit edilememiş olması da mümkündür. Literatürde yapılan çalışmalarda allolaktoz ve galaktobioz gibi çift zincirli GOS'lerin laktoz pikine dahil oldukları varsayılmıştır (Jenab ve diğ., 2018; Manucci, 2009). Ayrıca, reaksiyon boyunca glikoz ve galaktoz molar dengeleri Boon ve diğ. (1999) yaptıkları çalışmada olduğu gibi aşağıdaki denklem (4.6) kullanılarak kontrol edilmiştir.

$$\frac{[\text{glukoz}]}{[\text{galaktoz}]} = \frac{[\text{laktoz}]+[\text{glukoz}]+[\text{GOS}]}{[\text{laktoz}]+[\text{galaktoz}]+2[\text{GOS}]} \quad (4.6)$$

HPLC'de standart kullanılmadığı ve reaksiyon ürünlerinin miktarları yüzde olarak hesaplandığı için, glikoz ve galaktoz molar oranı reaksiyon süresince az da olsa değişmektedir. Teorik olarak "1" olması gereken oran için %10 hata payı kabul edilebilir bir hata payı aralığı olarak değerlendirilmiştir (Boon ve diğ., 1999).

Özellikle artan LC'de enzimin reaksiyonun ilerleyen sürelerinde ne transgalaktosilasyon ne de hidroliz yönünde baskın bir şekilde çalışabildiği ve laktoz dönüşüm hızının da oldukça yavaşladığı saptanmıştı (Bölüm 4.2.2, Şekil 4.5). Bu durumun temel nedeninin enzimin aktivite kaybı yaşaması ve artan monosakkarit konsantrasyonunun (özellikle galaktoz) enzimi inhibe edici etkisi olduğu düşünülmüştür. Nitekim galaktoz laktoz hidroliz reaksiyonun yarışmalı bir inhibitörü olduğu literatürde birçok çalışmada belirtilmiştir (Freitas ve diğ., 2011; Rodriguez-Fernandez ve diğ., 2011; Yin ve diğ., 2017). Ayrıca üretici firma olan ENZECO® (Enzyme Development Corporation, ABD) tarafından da galaktozun enzim aktivesi üzerinde güçlü inhibe edici etkisi bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar *A.oryzae* kaynaklı

β-galaktosidazlar için glukozun enzimin reaksiyon kinetiği üzerinde inhibitör olarak işlev görmediğini (Mueller ve diğ., 2018; Shin ve Ji-Won, 1998) bildirirken bazıları glukozun inhibe edici etkilerini (Palai ve diğ., 2012; Vera ve diğ., 2011) açıklamışlardır. Neri ve diğ. (2009a) reaksiyon ortamında serbest galaktoz varlığının *A.oryzae*'dan elde edilen β-galaktosidazın laktoz tüketme oranını glikoz varlığından daha fazla düşürdüğünü ve hem glikoz hem de galaktozun ayrı ayrı ve kombinasyon halinde oluşan maksimum GOS miktarını düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Bu çalışmada glukoz ve galaktozun GOS sentez reaksiyonu üzerine inhibe edici etkileri reaktör-1 ve reaktör-2 verileri ile birlikte Bölüm 4.4'te tartışılmıştır.

Yanıt yüzey yönteminle elde edilen optimum reaksiyon koşullarında laktoz konsantrasyonu ve sıcaklık parametrelerinin, bu iki parametrenin üst limitleri ile örtüştüğü görülmektedir (Bölüm 4.3.3.5). Laktoz konsantrasyonun seçiminde daha önce belirtilenlerin (Bölüm 4.2.1) yanında ayrıca hem reaktör-1 hem de reaktör-2 sistemlerinde yüksek konsantrasyonda laktoz çözeltisi kullanımında karşılaşılabilecek çözünürlük problemleri (Paterson, 2009) göz önüne alınarak yapılan ön denemeler dikkate alınmıştır. Özellikle 32 °Briks ve üzeri konsantrasyonlarda laktoz çözeltisi hazırlamak için oda sıcaklığında çok uzun sürelere ihtiyaç vardır. Yüksek konsantrasyonlarda laktozun ısıtılarak veya kaynatılarak, sürekli karıştırma ile, suda tam olarak çözünmesi sağlansa da düşük sıcaklık değerlerinde (35 ºC'nin altında) yürütülen sentez reaksiyonlarında çözünürlük kayıpları ve laktozun geri dönüşümsüz bir şekilde kristalize olması söz konusu olmuştur (Fox, 2009). Bu nedenlerle en yüksek laktoz konsantrasyon değeri 32 °Briks olacak şekilde deney planı oluşturulmuştur. Ayrıca 35 ºC'nin altında besleme sıcaklığı ile çalışılması durumunda, reaktör-1 sistemi ozmotik membran distilasyon ayırım süreci ile entegre edildiğinde, besleme ortamından ayırılan su nedeniyle laktoz çözeltisinin ºBriks değerinde meydana gelen artışa ve membran sisteminin hortum ve bağlantı elemanlarındaki ısı kayıplarına bağlı olarak ani laktoz kristalizasyonu sorunları meydana geldiği ön denemelerde gözlenmiştir. Yaşanılan bu ve benzeri teknik sorunların enzimatik reaksiyon sürecinde oluşmaması ve enzim aktivitesinin 35 ºC'nin altında oldukça azalması (Bölüm 4.2.1) nedeniyle çalışma sıcaklığı 35 ºC'nin altına indirilmemiştir.

4.3 Reaktör-2'de Enzimatik GOS Sentezi

Ozmotik membran distilasyon sisteminde gerçekleştirilen deneyler için faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Reaktör-2 sistemindeki amaç reaksiyon ortam laktoz konsantrasyonunun sürekli olarak maksimum GOS sentezine olanak sağlayacak yüksek bir seviyede tutulması ve GOS sentez veriminin arttırılmasıdır. Böylece reaksiyon süresince enzimin, hidroliz reaksiyonundan ziyade seçici olarak transgalaktosilasyon reaksiyonuna yönelmesi sağlanarak verim artışı hedeflenmiştir. Fakat, reaktör-1'den elde edilen sonuçlara göre 4,5 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu kullanılan deney setlerinde maksimum GY'nin elde edildiği süreler çok kısadır (Çizelge 4.1). Enzim düşük laktoz konsantrasyonlarında kısa bir sürede hidrolize doğru eğilim göstermektedir. Reaktör-2'de istenen transgalaktosilasyon aktivitesinin elde edilmesi için GOS sentez reaksiyonunun, Reaktör-1'de 4,5 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonları için saptanan TMGY değerlerinden daha uzun süreler sürdürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle reaktör-1 sisteminden elde edilen veriler ve yapılan ön denemeler neticesinde 4,5 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu reaktör-2'de GOS sentezi için uygun bulunmamış ve deney setinden çıkarılmıştır.

Başlangıç besleme ağırlığını belirlemek üzere 200 g, 300 g, 400 g ve 600 g 32 °Briks laktoz çözeltisi (LS) ile ön denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde ozmotik membran distilasyon işleminin sürdürülebilir zamanı (reaksiyon süresi) ve ortam briks değerinin artışı parametreleri göz önüne alınarak reaktör-2'de süreç optimizasyonu için kullanılacak başlangıç besleme miktarı 300 g olarak belirlenmiştir. Farklı besleme miktarları için reaktör-2 sistem performansı ayrıntılı olarak Bölüm 4.3.3.1'de incelenmiştir.

Başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC) ve sıcaklık (T) reaksiyon parametrelerinin GOS sentezine etkisini incelemek ve reaksiyon koşullarını optimize etmek üzere faktöriyel deney tasarımı kullanılarak deneysel koşullar belirlenmiştir. Elde edilen deneysel koşullar ve belirlenen yanıtlar Çizelge 4.13'de, elde edilen deneysel sonuçlar tahminlenen değerler ile birlikte Çizelge 4.14'te verilmiştir. Deneysel koşullar 2 tekrarlı çalışılmıştır.

Çizelge 4.13 : Reaktör-2'de uygulanan faktöriyel deney planı ve elde edilen deneysel yanıt değerleri.

Deneme	Standart Sıra	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Yanıt 1	Yanıt 1	Yanıt 1
		T (°C)	LC (°Briks)	EC (U/g LS)	GOS-4 (%)	GOS-3 (%)	GY (%)
1	32	35	32	6	8,42	19,75	28,17
2	17	45	32	14	8,67	17,93	26,6
3	26	45	18,25	14	4,83	15,55	20,38
4	9	55	18,25	14	3,46	15,24	18,7
5	13	35	32	10	9,67	18,61	28,28
6	31	35	18,25	6	5,96	17,45	23,41
7	5	45	18,25	10	4,58	16,14	20,72
8	4	35	18,25	10	6,31	15,99	22,3
9	35	45	32	6	8,42	20,11	28,53
10	12	55	32	6	8,71	19,38	28,09
11	33	35	32	10	8,85	18,92	27,77
12	16	35	32	14	8,96	18,55	27,51
13	24	55	18,25	14	5,02	14,12	19,14
14	6	55	18,25	10	4,35	15,41	19,76
15	25	55	18,25	6	5,69	15,7	21,39
16	23	55	18,25	10	4,99	15,74	20,73
17	3	55	18,25	6	6,02	15,39	21,41
18	27	45	18,25	10	4,85	16,92	21,77
19	2	45	18,25	6	5,71	16,36	22,07
20	30	35	18,25	10	5,4	16,15	21,55
21	7	35	18,25	14	5,05	16,77	21,82
22	20	55	32	14	7,22	18,47	25,68
23	19	55	32	6	8,41	19,95	28,36
24	15	55	32	10	9,07	17,64	26,71
25	34	35	32	14	8,85	18,36	27,21
26	10	35	32	6	8,46	20,17	28,63
27	28	45	18,25	6	5,16	16,93	22,09
28	8	45	18,25	14	4,6	15,96	20,56
29	36	45	32	14	8,75	17,89	26,64
30	14	45	32	10	9,14	18,45	27,59
31	29	35	18,25	14	5,7	15,92	21,62
32	1	35	18,25	6	6,18	17,17	23,34
33	21	55	32	10	8,95	18,49	27,44
34	18	55	32	14	7,7	18,32	26,02
35	22	45	32	10	8,82	19,05	27,87
36	11	45	32	6	8,76	19,8	28,57

Çizelge 4.14 : Reaktör-2'de elde edilen deneysel ve tahminlenen değerler.

Deneysel GOS-4 (%)	Tahminlenen GOS-4 (%)	Deneysel GOS-3 (%)	Tahminlenen GOS-3 (%)	Deneysel GY (%)	Tahminlenen GY (%)
8,42	8,69	19,75	19,90	28,17	28,60
8,67	8,57	17,93	18,08	26,60	26,65
4,83	4,71	15,55	15,60	20,38	20,31
3,46	3,98	15,24	14,98	18,70	18,96
9,67	8,92	18,61	19,06	28,28	27,98
5,96	5,83	17,45	17,20	23,41	23,03
4,58	5,21	16,14	16,05	20,72	21,26
6,31	5,64	15,99	16,70	22,30	22,34
8,42	8,74	20,11	19,68	28,53	28,43
8,71	8,79	19,38	19,47	28,10	28,26
8,85	8,92	18,92	19,06	27,77	27,98
8,96	9,14	18,55	18,21	27,51	27,36
5,02	3,98	14,12	14,98	19,14	18,96
4,35	4,79	15,41	15,40	19,76	20,19
5,69	5,61	15,70	15,81	21,39	21,42
4,99	4,79	15,74	15,40	20,73	20,19
6,02	5,61	15,39	15,81	21,41	21,42
4,85	5,21	16,92	16,05	21,77	21,26
5,71	5,72	16,36	16,50	22,07	22,22
5,40	5,64	16,15	16,70	21,55	22,34
5,05	5,44	16,77	16,21	21,82	21,65
7,22	8,00	18,47	17,94	25,68	25,94
8,41	8,79	19,95	19,47	28,36	28,26
9,07	8,39	17,64	18,70	26,71	27,10
8,85	9,14	18,36	18,21	27,21	27,36
8,46	8,69	20,17	19,90	28,63	28,60
5,16	5,72	16,93	16,50	22,09	22,22
4,60	4,71	15,96	15,60	20,56	20,31
8,75	8,57	17,89	18,08	26,64	26,65
9,14	8,66	18,45	18,88	27,59	27,54
5,70	5,44	15,92	16,21	21,62	21,65
6,18	5,83	17,17	17,20	23,34	23,03
8,95	8,39	18,49	18,70	27,44	27,10
7,70	8,00	18,32	17,94	26,02	25,94
8,82	8,66	19,05	18,88	27,87	27,54
8,76	8,74	19,80	19,68	28,57	28,43

Çizelge 4.15 : Reaktör-2 için model uygunluklarının belirlenmesi yapılan test sonuçları.

	GOS-4			GOS-3			GY		
	Lineer	**2FI**	**Kuadratik**	**Lineer**	**2FI**	**Kuadratik**	**Lineer**	**2FI**	**Kuadratik**
Model p-değeri	<0.0001	0,0140	0,3354	<0.0001	0,0341	0,1496	<0.0001	<0.0001	0,7818
Uyum eksikliği p-değeri	0,0264	0,1152	0,1087	0,0196	0,0581	0,0785	0,0226	0,7239	0,6189
Ayarlamalı R^2	0,9175	0,9365	0,9371	0,9024	0,9197	0,9251	0,9816	0,9908	0,9903
Tahmini R^2	0,9030	0,9156	0,9111	0,8857	0,8975	0,8968	0,9782	0,9890	0,9873

Model uygunluğunu belirlemek amacıyla F-değeri testi ve uyum eksikliği testleri uygulanmıştır (Çizelge 4.15). Her bir yanıt için (GOS-4, GOS-3 ve GY) uygun model seçilirken ayarlamalı ve tahmini R^2 değerlerinin en yüksek olduğu model gözetilir. Ayrıca, modelin "aliased" olmaması gerekir. Kuadratik modelin uygunluk değerleri yüksek olmasına rağmen istatistiksel yazılım paketi tarafından "aliased" bulunmuştur. Bunun temel nedeni deney planının (Çizelge 4.13) laktoz konsantrasyonu için 2 seviye içermesidir. Bu nedenle deney planından elde edilen veriler kuadratik model terimlerini ifade edememiştir. Bir diğer deyişle, deney planı tüm model katsayılarını tahmin etmek için yeterli benzersiz tasarım noktası içermemektedir. F-değeri testinden elde edilen sonuçlara göre parametreler arasında ilişkinin iyi olduğu ve anlamlı terimleriyle en yüksek dereceye sahip model (2FI) istatistiksel yazılım paketi önerisi doğrultusunda seçilmiştir.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1(T) + \beta_2(LC) + \beta_3(EC) + \beta_{12}(T)(LC) + \beta_{13}(T)(EC) + \beta_{23}(LC)(EC) \qquad (4.7)$$

İki faktörlü etkileşim modeli (2FI) denkleminde (4.7) Y_i tahminlenen yanıtı (GOS-4, GOS-3 ve GY,) β_0 kesim noktasının, β_1, β_2 ve β_3 lineer etkileşimlerin ve β_{12}, β_{13} ve β_{23} ikili etkileşimlerin regresyon sabitini ifade etmektedir. Sonuçların istatiksel açıdan anlamlığı varyans analizi (ANOVA) ile %95 güvenirlilik oranı kullanılarak test edilmiştir.

4.3.1 Reaktör-2'de elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

4.3.1.1 Reaktör-2'de GOS-4 eldesi

Matematiksel modelin Prob>F değeri < 0,0001 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.16). Sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC), sıcaklık-enzim konsantrasyonu etkileşimi (T*EC) ve laktoz-enzim konsantrasyonları etkileşimi (LC*EC) anlamlı model terimleridir. Regresyon analiz sonucu matematiksel model toplam varyasyonun %94,74'lik kısmını açıklayabilerken, %5,26'lık kısmını ise açıklamakta başarısız kalmıştır. Elde edilen yüksek R^2 değeri elde edilen matematiksel modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Ayarlamalı (adjusted) R^2 değeri (0,9365) ve tahmini (predicted) R^2 değeri (0,9156) deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyum olduğunu göstermektedir. Elde edilen 25,0549 değerindeki sinyal gürültü oranı yeterli sinyali belirtmektedir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği değeri (1,87) model bağımsız

değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonda GOS-4 (%) değerini önerebilmesi açısından iyidir. Elde edilen varyasyon katsayısı (CV=%4,96) değeri gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

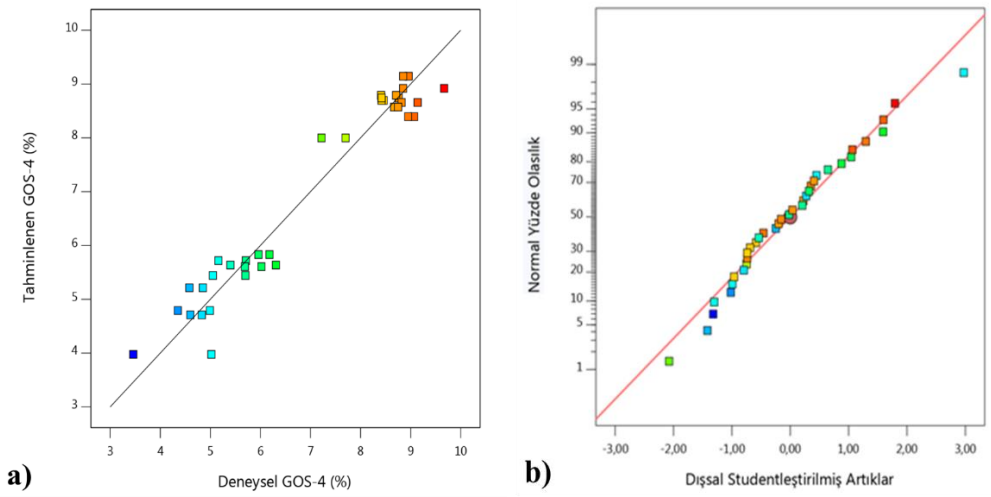
Çizelge 4.16 : GOS-4 2FI modeli için ANOVA değerleri.

Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	114,34	6	19,06	87,08	< 0.0001
T	2,82	1	2,82	12,87	0,0012
LC	106,67	1	106,67	487,49	< 0.0001
EC	2,09	1	2,09	9,57	0,0043
T*LC	0,1536	1	0,1536	0,7019	0,4090
T*EC	1,54	1	1,54	7,05	0,0127
LC*EC	1,05	1	1,05	4,82	0,0363
Kalıntı	6,35	29	0,2188		
Uyum Eksikliği	3,38	11	0,3076	1,87	0,1152
Hata	2,96	18	0,1646		
Düzeltilmiş Toplam	120,68	35			

R^2=0,9474; Adjusted R^2=0,9365; Predicted R^2=0,9156; Adequate Precision=25,0549; C.V.%=6,74.

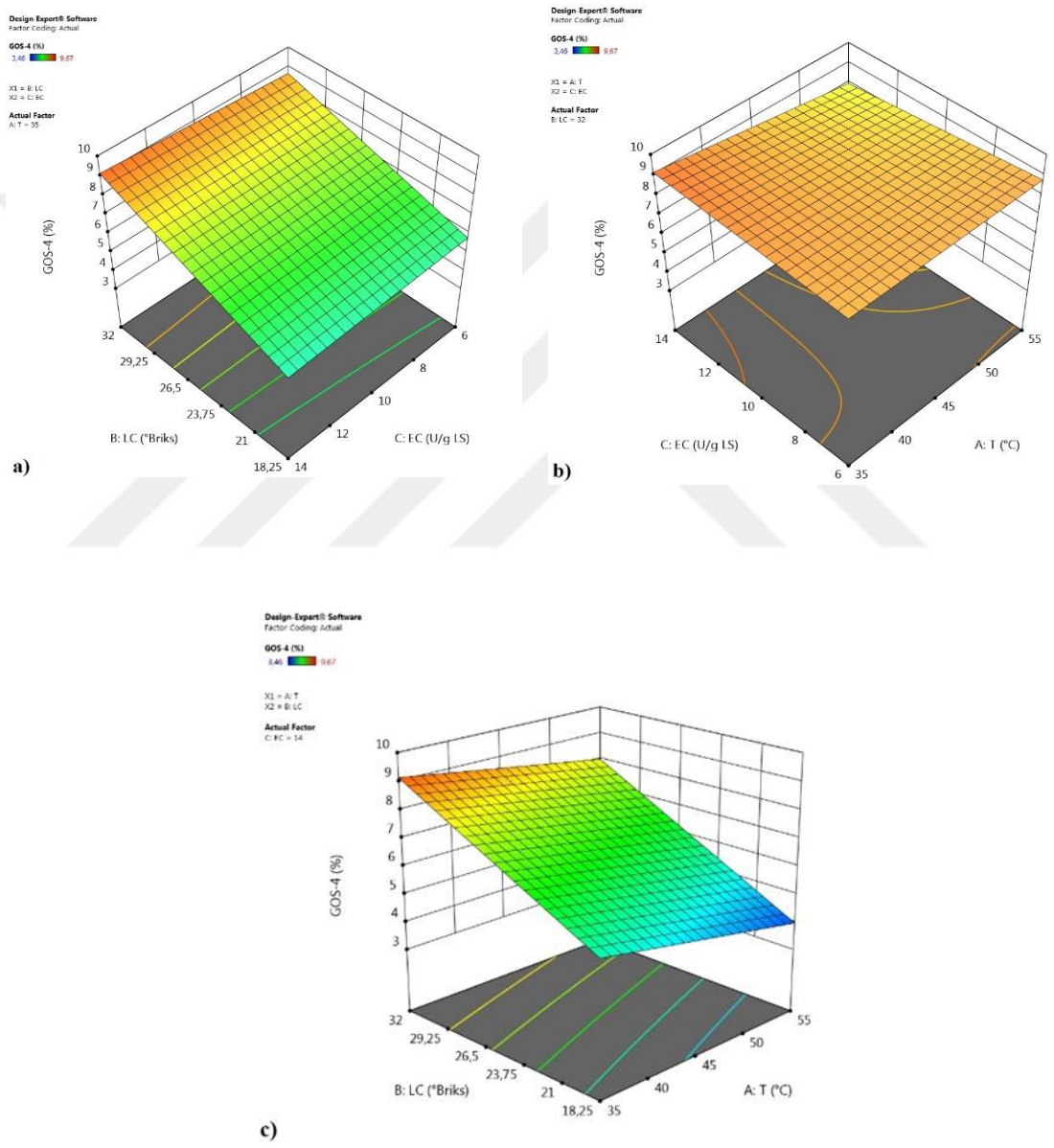
Polinomiyal çok değişkenli regresyon tekniği kullanılarak T, LC ve EC faktörlerinin GOS-4 sentezine etkisini ifade eden matematiksel model (4.8) elde edilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiş olup her bir faktörün belirli seviyeleri için GOS-4 değeri tahminlenmesinde kullanılabilir.

$$\text{GOS-4}=6{,}94-0{,}34(T)+1{,}72(LC)-0{,}30(EC)+0{,}08(T)(LC)$$
$$-0{,}31(T)(EC)+0{,}21(LC)(EC) \qquad (4.8)$$



Şekil 4.18 : GOS-4 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-4 için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Tahminlenen GOS-4 değerleri ile deneysel GOS-4 değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.18a). Artıkların normal olasılık grafiğinde düz çizgi çevresi etrafındaki dağılımı normal bir dağılım olduğunu göstermektedir (Şekil 4.18b). Bu veriler elde edilen matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.19 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-4'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkarit).

Reaktör-2'de LC ve EC arttıkça sentezlenen GOS-4'te önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.19a). Reaktör-1'de gözlenen eğilimin aksine (Şekil 4.19b) Reaktör-2'de yüksek LC'de artan EC ve azalan T, GOS-4 sentezine olumlu etki etmiştir (Şekil 4.19b). Reaktör-1'de olduğu gibi Reaktör-2'de de yüksek LC ve düşük T kombinasyonları GOS-4 sentezi için daha iyi sonuçlar vermiştir (Şekil 4.19c). Deney setlerinden elde edilen verilere göre GY'nin maksimum olduğu noktalardaki GOS-4 en düşük %3,46, en yüksek %9,67 bulunmuştur (Şekil 4.19a, b ve c).

4.3.1.2 Reaktör-2'de GOS-3 eldesi

Matematiksel modelin Prob>F değeri < 0,0001 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.17). Sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC), sıcaklık-enzim konsantrasyonu etkileşimi (T*EC) anlamlı model terimleridir. ANOVA analizi sonucu elde edilen yüksek R^2 değeri (0,9335) matematiksel modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Ayarlamalı (adjusted) R^2 değeri (0,9197) ve tahmini (predicted) R^2 değeri (0,8975) deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyum olduğunu göstermektedir. Sinyal gürültü oranı (24,0074) yeterli sinyali belirtmektedir. Uyum eksikliği değeri (2,28) modelin GOS-3 (%) değerinin tahminlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Varyasyon katsayısı (CV=%2,66) gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

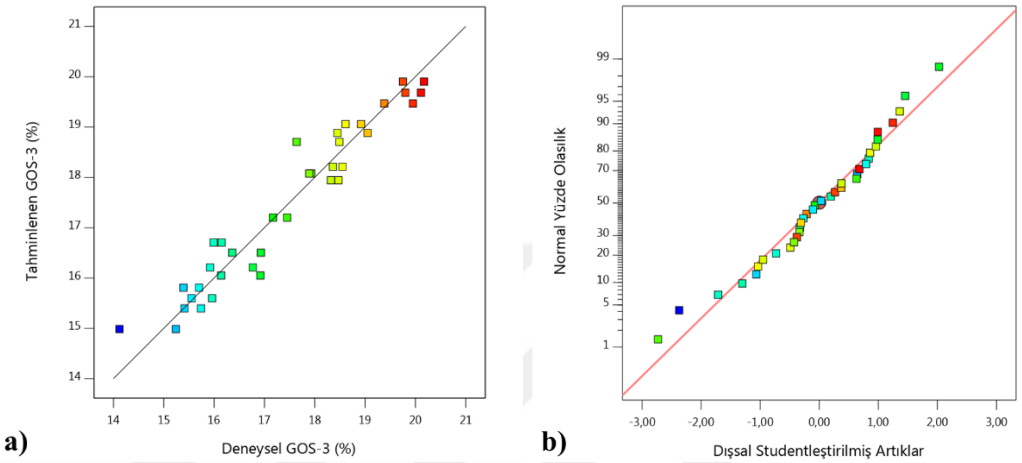
Çizelge 4.17 : GOS-3 2FI modeli için ANOVA değerleri.

Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	87,80	6	14,63	67,85	< 0.0001
T	4,13	1	4,13	19,17	0,0001
LC	72,05	1	72,05	334,11	< 0.0001
EC	9,48	1	9,48	43,94	< 0.0001
T*LC	1,37	1	1,37	6,37	0,0174
T*EC	0,0281	1	0,0281	0,1301	0,7209
LC*EC	0,7350	1	0,7350	3,41	0,0751
Kalıntı	6,25	29	0,2157		
Uyum Eksikliği	3,64	11	0,3311	2,28	0,0581
Hata	2,61	18	0,1451		
Düzeltilmiş Toplam	94,05	35			

R^2=0,9335; Adjusted R^2=0,9197; Predicted R^2=0,8975; Adequate Precision=24,0074; C.V.%=2,66.

T, LC, ve EC faktörlerinin GOS-3 sentezine etkisini ifade eden kodlanmış faktörler cinsinden matematiksel model (4.9) aşağıda verilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

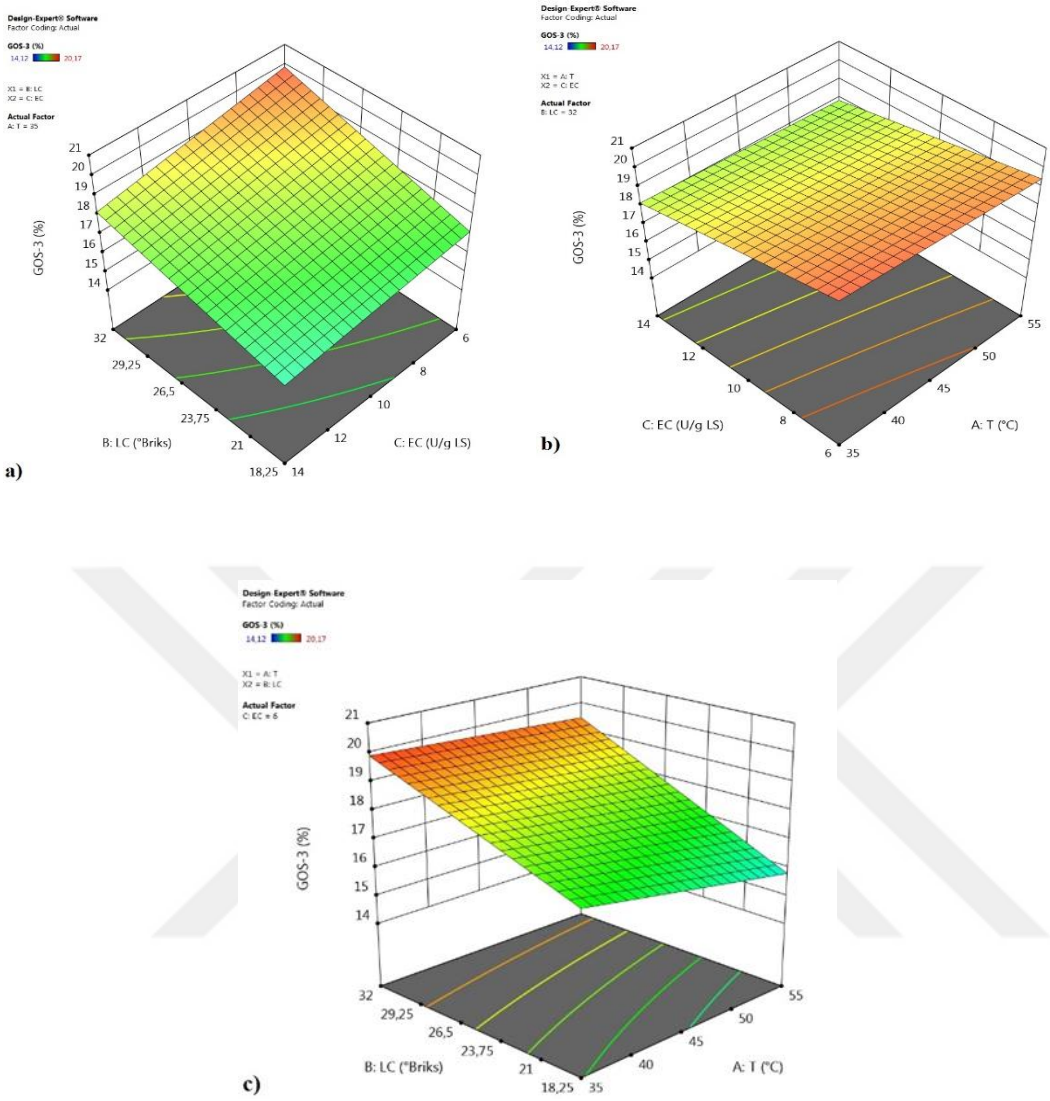
$$\text{GOS-3} = 17{,}47 - 0{,}42(T) + 1{,}41(LC) - 0{,}63(EC) + 0{,}24(T)(LC) + 0{,}04(T)(EC) - 0{,}18(LC)(EC) \quad (4.9)$$



Şekil 4.20 : GOS-3 için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GOS-3 için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Tahminlenen GOS-3 değerleri ile deneysel GOS-3 değerleri arasındaki yüksek korelasyon (Şekil 4.20a) ve artıkların normal dağılım göstermesi (Şekil 4.20b) elde edilen matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini doğrulamıştır.

Reaktör-2'de yüksek LC ve düşük EC kombinasyonları GOS-3 sentez performasını arttırmıştır (Şekil 4.21a). Yüksek LC'ye sahip deney setlerinde düşük EC GOS-3 sentezini iyileştirirken, T ise önemli düzeyde etkiye sahip değildir (Şekil 4.21b). GOS-4 sentezinde olduğu gibi GOS-3 sentezinde de yüksek LC ve düşük T kombinasyonları GOS-3 değerini maksimize etmiştir (Şekil 4.21c). Deney setlerinden elde edilen verilere göre GY'nin maksimum olduğu noktalardaki GOS-3 en düşük %14,12, en yüksek ise %20,17 bulunmuştur (Şekil 4.21a, b ve c).



Şekil 4.21 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GOS-3'e etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkarit).

4.3.1.3 Reaktör 2'de toplam GOS (GY) eldesi

Matematiksel modelin Prob>F değeri < 0,0001 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.18). Sıcaklık (T), laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC), sıcaklık-laktoz konsantrasyonu etkileşimi (T*LC) ve sıcaklık-enzim konsantrasyonu etkileşimi (T*EC) anlamlı model terimleridir. ANOVA analizi sonucu elde edilen yüksek R^2 değeri (0,9923) matematiksel modelin belirlenen deneysel koşullar altında uyum içinde çalıştığını belirtmektedir. Ayarlamalı (adjusted) R^2 değeri (0,9908) ve tahmini (predicted) R^2 değeri (0,9890) deneysel ve tahminlenen değerler arasında kabul edilebilir bir uyum olduğunu göstermektedir. Sinyal gürültü oranı (67,6764) yeterli

sinyali belirtmektedir. Uyum eksikliği değeri (0,6994) modelin GY (%) değerinin tahminlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Varyasyon katsayısı (CV=%1,32) gerçekleştirilen deneylerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

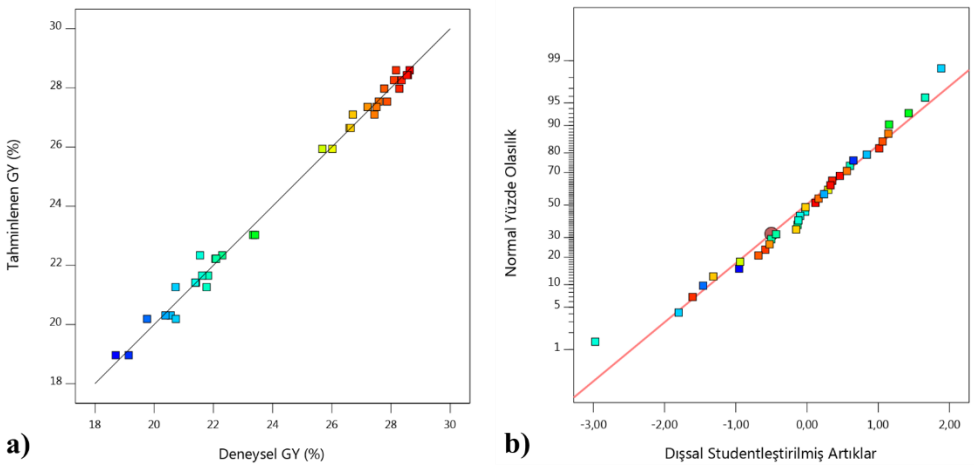
Çizelge 4.18 : GY 2FI modeli için ANOVA değerleri.

Kaynak	Kareler Toplamı	dF	Ortalama Kareler	F Değeri	p-değeri Prob>F
Model	392,10	6	65,35	626,71	< 0.0001
T	13,76	1	13,76	131,92	< 0.0001
LC	354,19	1	354,19	3396,69	< 0.0001
EC	20,52	1	20,52	196,75	< 0.0001
T*LC	2,44	1	2,44	23,38	< 0.0001
T*EC	1,17	1	1,17	11,24	0,0022
LC*EC	0,0260	1	0,0260	0,2494	0,6213
Kalıntı	3,02	29	0,1043		
Uyum Eksikliği	0,9055	11	0,0823	0,6994	0,7239
Hata	2,12	18	0,1177		
Düzeltilmiş Toplam	395,13	35			

R^2=0,9923; Adjusted R^2=0,9908; Predicted R^2=0,9890; Adequate Precision=67,6764; C.V.%=1,32.

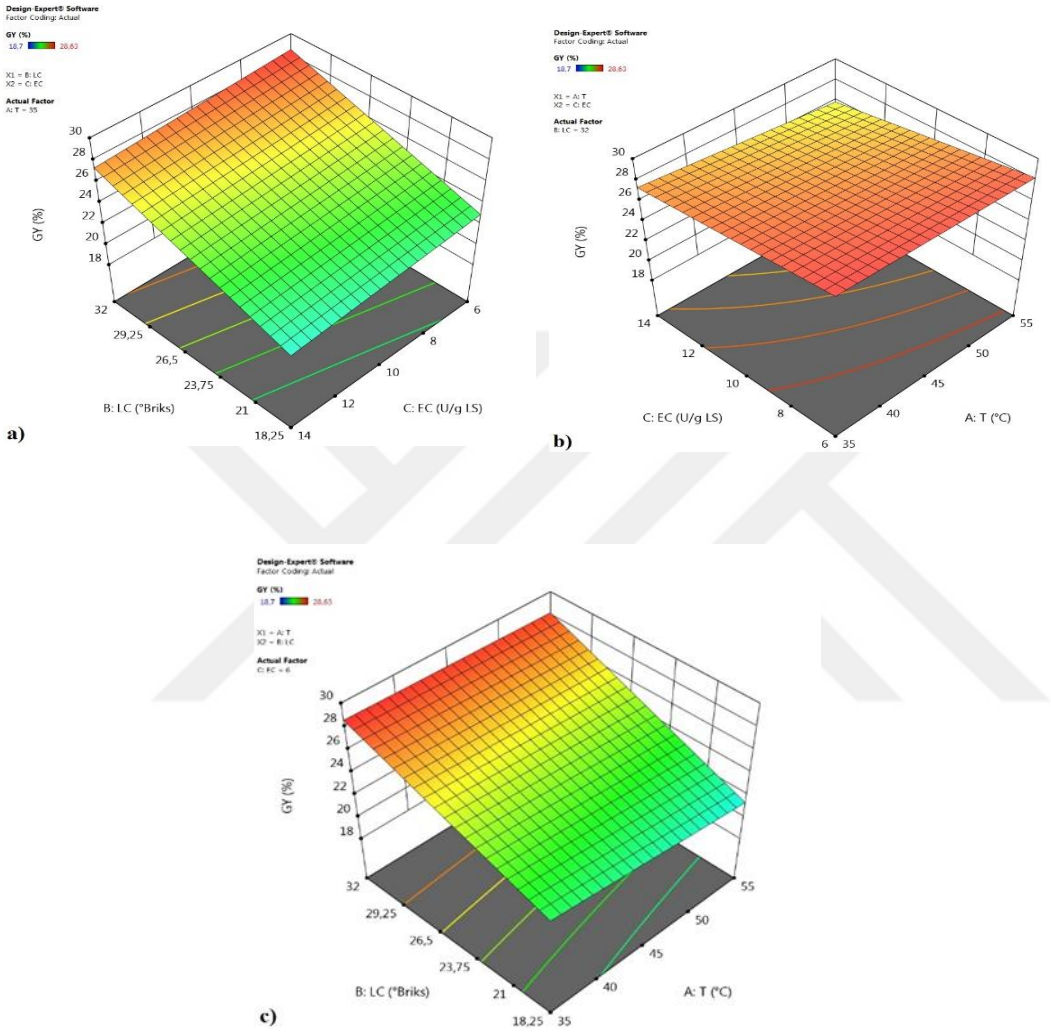
T, LC, ve EC faktörlerinin GY sentezine etkisini ifade eden kodlanmış faktörler cinsinden matematiksel model (4.10) aşağıda verilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir.

$$GY= 24,40-0,76(T)+3,14(LC)-0,93(EC)+0,32(T)(LC) -0,27(T)(EC)+0,03(LC)(EC) \quad (4.10)$$



Şekil 4.22 : GY için tahminlenen değerler ile deneysel değerlerin korelasyonu (a) ve GY için artıkların normal olasılık grafiği (b).

Tahminlenen GY değerleri ile deneysel GY değerleri arasındaki yüksek korelasyon (Şekil 4.22a) ve artıkların normal dağılım göstermesi (Şekil 4.22b) elde edilen matematiksel modelin parametrelerin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğini doğrulamıştır.



Şekil 4.23 : Sıcaklık, başlangıç laktoz konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonu etkileşimlerinin sentezlenen GY'ye etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri (LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), T: sıcaklık (ºC), GY: 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı).

Yüksek LC ve düşük EC etkileşimi GY'yi olumlu yönde etkilemiştir (Şekil 4.23a). Düşük EC seviyelerinde T etkileşiminin GY değerine pozitif yönde etkisinin önemli derecede olduğu görülmüştür (Şekil 4.23b). Yüksek LC ve düşük EC kombinasyonlarında T değerlerinin etkisi sınırlıdır. LC arttıkça daha az miktarda su molekülüne karşın daha fazla miktarda laktoz ve diğer sakkarit molekülleri galaktosil alıcısı olarak ortamda artan oranlarda bulunmaktadır. Bu nedenle transgalaktosilasyon

hidroliz reaksiyonundan daha baskın bir şekilde gerçekleşerek yüksek verimde GOS sentezi sağlamaktadır. LC azaldıkça reaksiyon ortamında su molekülleri galaktosil alıcısı olarak daha yüksek oranlarda bulunarak hidroliz reaksiyonunu baskın hala getirmektedir. Sıcaklık, reaksiyon hız sabitlerini etkilediği için süreç parametrelerine bağlı olarak GOS veriminde ve transgalaktosilasyon-hidroliz hızında bazı değişikliklere yol açmaktadır. Hidroliz reaksiyonunun hızı ve baskın hale geçme zamanı süreç parametrelerine bağlı olarak değiştiği sonucuna varılmıştır. LC ve T etkişileminin GY'ye etkisinin önemli olduğu görülmektedir (Şekil 4.23c). Reaktör-1 de olduğu gibi Reaktör-2'de de yüksek LC ve düşük T kombinasyonunda daha yüksek verimde GOS elde edilmiştir. Reaktör-2'de elde edilen GY değerleri %18,7 ile %28,63 arasında değişmektedir.

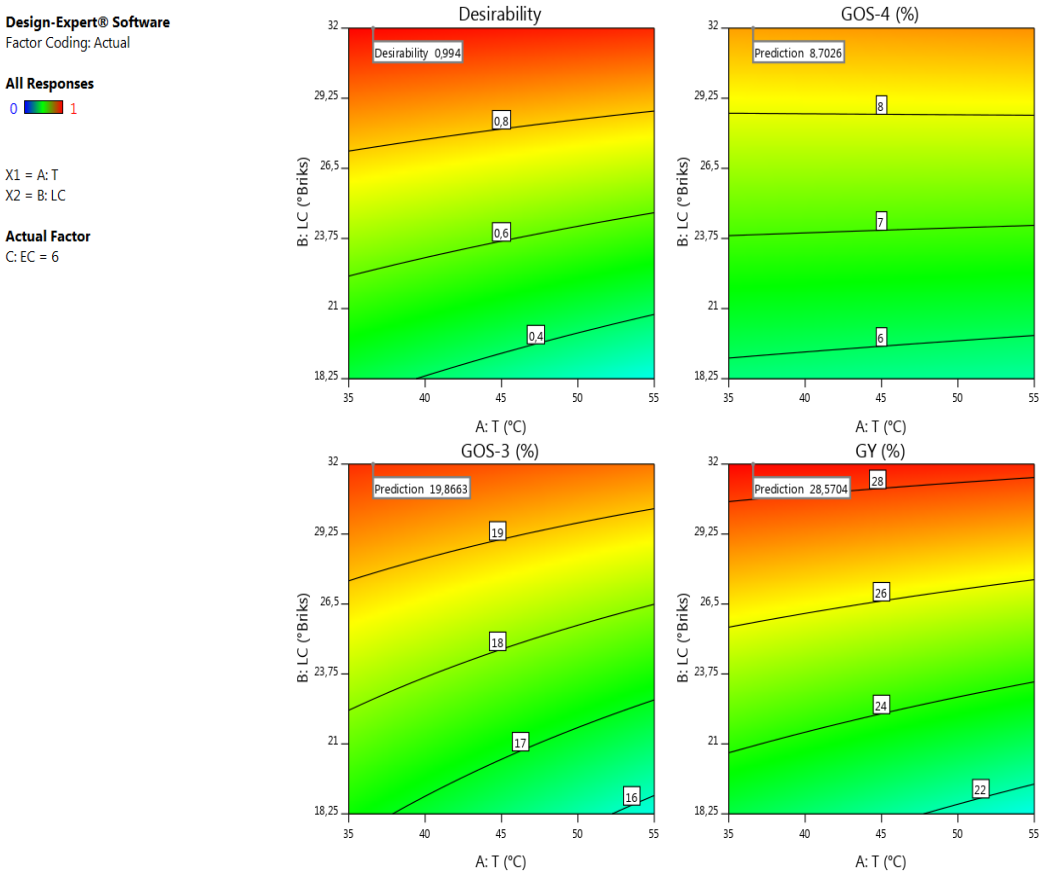
4.3.1.4 Reaktör-2 için GY değerinin optimize edilmesi

GY'yi maksimize eden reaksiyon koşullarını belirlemek için istatistiksel yazılım paketine uygulanan numerik optimizasyon ayarları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Reaktör-2 sistemi için optimum reaksiyon koşulları, Sıcaklık (T) 36,672 ºC, enzim konsantrasyonu (EC) 6,0 U/g LS ve laktoz konsantrasyonu (LC) 32°Briks olarak tespit edilmiştir. Optimum enzim konsantrasyonunda elde edilen kontur diyagramları Şekil 4.24'te verilmiştir. Optimum proses koşullarında tahminlenen GOS-4 %8,703, GOS-3 %19,866 ve GY %28,57 bulunmuştur.

Çizelge 4.19 : Reaktör-2'de GY numerik optimizasyonu için koşullar.

İsim	Amaç	Üst Sınır	Alt Sınır	Alt Ağırlık	Üst Ağırlık	Önem Derecesi
T	Aralık içinde	35	55	1	1	3
LC	Aralık içinde	45	32	1	1	3
EC	Aralık içinde	6	14	1	1	3
GOS-4	Yok	3,46	9,67	1	1	3
GOS-3	Yok	14,12	20,17	1	1	3
GY	En yüksek	18,70	28,63	1	1	3
StdErr(GOS-4)	Yok	0,11	0,25	1	1	3
StdErr(GOS-3)	Yok	0,11	0,25	1	1	3
StdErr(GY)	Yok	0,08	0,17	1	1	3

(T: sıcaklık (ºC), LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu (°Briks), EC: enzim konsantrasyonu (U/g LS), GOS-4: 4 zincirli galaktooligosakkaritler (%), GOS-3: 3 zincirli galaktooligosakkaritler (%), GY: Toplam GOS, 3 zincirli ve 4 zincirli galaktooligosakkaritlerin toplamı (%), StdErr(GOS-4): GOS-4 değeri için standart hata), StdErr(GOS-3): GOS-3 değeri için standart hata), StdErr(GY): GY değeri için standart hata.



Şekil 4.24 : Optimum GY değerini sağlayan reaksiyon koşullarındaki kontur diyagramları (EC:6 U/g LS).

4.3.2 Reaktör-2'de elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi

GOS sentez verimini arttırmaya yönelik sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör sürecinin ozmotik membran distilasyon sistemine entegresi sağlanan bu çalışma, reaktör tasarımı açısından literatürde daha önce çalışılmamıştır. Literatürde GOS sentez süreçlerine basınç destekli membran sistemleri dahil edilmeye çalışılmıştır. GOS üretim süreçlerine ultrafiltrasyon (Chockchaisawasdee ve diğ., 2005; Córdova ve diğ., 2016; Czermak ve diğ., 2004; Das ve diğ., 2011; Foda ve Lopez-Leiva, 2000; Nath ve diğ., 2013; Pocedičová ve diğ., 2010) ve nanofiltrasyon (Botelho-Cunha ve diğ., 2010) entegre edilirken nanofiltrasyon aynı zamanda şekerlerin birbirinden ayrımı ve pürifikasyon (Goulas ve diğ., 2002, Das ve diğ., 2011) için kullanılmıştır. Üretim süreçlerine dahil edilen basınç destekli membran çalışmalarında hedeflenen enzim üzerinde inhibe edici etkileri olan glukoz ve galaktozun reaksiyon ortamından uzaklaştırılmasıdır (Nath ve diğ., 2013). Ancak sakkarit moleküllerinin molekül büyüklüklerinin birbirlerine yakın olması (monosakkaritler=180 Da, laktoz=347 Da, GOS'ler=520-900 Da), ayırım süreçlerinin etkin olmamasına ve bu süreçlerde

özellikle hammadde (laktoz) ve ürün (GOS) kaybının oluşmasına neden olmuştur (Córdova ve diğ., 2017). Basınç destekli membran sistemlerinin aksine ozmotik membran distilasyon yönteminin kullanıldığı bu çalışmada hammadde ve ürün kaybı olmamış ve başlangıç akı değerleri uzun süreler boyunca sabit kalabilmiştir. Bu yöntemde kullanılan yüksek hidrofobisiteye sahip mikro-gözenekli bir membran sayesinde enzimatik reaksiyon ortamından sadece suyun yüksek seçicilikle ayrımı sağlanmış ve reaksiyon ortamı süreç boyunca laktoz konsantrasyonu bazında daha konsantre bir hale dönüştürülmüştür. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada tasarlanan reaktör-2 sistemi çalışma mekanizması gereği GOS sentez süreçlerine basınç destekli membran entegrasyonu yapılan diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Bu nedenle literatürde gerçekleştirilen farklı sistemlerde çalışılan farklı reaksiyon koşulları ile reaktör-2 sisteminden elde edilen veriler arasında tam bir karşılaştırma yapılması mümkün değildir. Membran distilasyon entegrasyonu yapılan reaktör-2 sistem performansını incelemek için aynı reaksiyon koşullarında çalıştırılan reaktör-1 GOS sentez sonuçları kullanılmıştır.

Reaktör-1 ve reaktör-2 de aynı seviyelerde bağımsız değişkenlere sahip deney setleri sonucu elde edilen GY üzerinden Çizelge 4.20'de karşılaştırma yapılmıştır. Toplam GOS sentezi performansı açısından reaktör-1 ve reaktör-2 sistemini karşılaştırmak için aynı laktoz dönüşüm değerinde elde edilen veriler esas alınmıştır. Çizelge 4.20 incelendiğinde 55 °C sıcaklık, 32°Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu ve 10 U/g LS enzim konsantrasyonu içeren deney setinde GY bakımından en yüksek sistemsel artış elde edilmiştir. Aynı laktoz dönüşümü için gerekli reaksiyon süresinin membran distilasyon içeren reaktörde daha kısa olmasının yanında GOS sentez veriminde de artış elde edilmiştir. Córdova ve diğ. (2016) de ultrafiltrasyon ile entegre ettiği bir membran reaktörde sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörden elde ettiği GOS sentez sonuçlarını karşılaştırdığında laktoz dönüşümünün membran destekli sistemde hızlandığını, bu nedenle maksimum GOS veriminin daha yüksek ve daha kısa sürelerde elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu sonucu reaksiyon ortamından uzaklaştırılan galaktoz nedeniyle azalan inhibisyona bağlamışlardır. Fakat sadece suyun seçici olarak ayrımının sağlandığı bu çalışmada, galaktozun reaksiyon ortamında konsantre hale gelmesine karşın GOS verim artışı elde edilmiştir. Ayrıca, *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz tarafından katalizlenen sürekli karıştırmalı tip kesikli ve membran destekli sürekli GOS sentez reaksiyonlarında elde edilen GOS veriminin

%28'i (w/w) asla geçemediği (Córdova ve diğ., 2016; Vera ve diğ., 2012), çoğu çalışmada %25'lerde sonuç alındığı bildirilmiştir (Illanes ve diğ., 2016b; Manucci, 2009). Buna karşın reaktör-2'den elde edilen sonuçlar transgalaktosilasyon aktivitesinin bu sistemde arttığını ve bahsedilen literatür verilerine kıyasla az da olsa GOS sentez veriminin geliştirildiğini göstermektedir.

Reaktör-1 sistemine ozmotik membran distilasyon entegrasyonu T:35 °C, LC: 32 °C °Briks, EC:10 U/g LS reaksiyon koşullarına sahip deney setinden elde edilen GY değerinde %3,9 artış sağlarken T:55 °C, LC: 32 °Briks, EC:10 U/g LS reaksiyon koşullarına sahip deney setinden %20,1 artış sağlamıştır. Aynı şekilde yüksek laktoz ve enzim konsantrasyonuna sahip deney setinin sıcaklığının 35 °C'den 45 °C'ye çıkması değişim oranını %2,6'dan %13,6 seviyesine yükseltmiştir. Düşük sıcaklık ve yüksek laktoz konsantrasyonuna sahip deney setlerinde ise enzim konsantrasyonu yükseldikçe değişim oranı azalmıştır. Düşük enzim konsantrasyonu ve yüksek laktoz konsantrasyonu içeren deney setlerinde ise sıcaklığın yükselmesi değişim oranını azaltmıştır. Reaksiyon sıcaklığı yüksek enzim konsantrasyonlarında sistemsel artışa olumlu etki ederken düşük enzim konsantrasyonlarında ise olumsuz etki etmiştir. Elde edilen bu sonuçlar sıcaklığın hem suyun uzaklaştırma hızını hem de enzimin kinetik parametrelerini etkilemesi ile ilgili olabilir. Nitekim 35 °C'de enzimin aktivitesinin diğer sıcaklıklara göre düşük olması, 35 °C sıcaklıkta suyun uzaklaştırma hızının diğer sıcaklıklara kıyasla az olması ve reaksiyon ortamında artan monosakkarit konsantrasyonları olası etkenlerdir.

18,25 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip deney setlerinde ise değişim oranı sınırlı kalmıştır (Çizelge 4.20). Chockchaisawasdee ve diğ. (2005) sentezlenen GOS miktarının laktoz konsantrasyonuna bağlı olduğunu, transgalaktosilasyonun kinetik kontrollü bir reaksiyon olması nedeniyle yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonlarında tercih edildiğini açıklamışlardır. Botelho-Cunha ve diğ. (2010) nanofiltrasyon destekli biyoreaktörlerinde, 150 g/L ile 300 g/L başlangıç laktoz konsantrasyonlarından elde edilen sonuçları karşılaştırdığında düşük başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip reaktörde GOS sentez veriminin değişmediğini belirtmişlerdir. Literatürde ve bu çalışmada düşük başlangıç laktoz konsantrasyonunda elde edilen bu sonuçlar artan laktoz konsantrasyonun reaksiyon ortamındaki su aktivitesini azaltarak transgalaktosilasyonun hidrolize karşı tercih edilmesini sağlaması ile ilişkilendirilmiştir. Düşük enzim konsantrasyonuna sahip deney

setlerinde sıcaklık artışının değişim oranına etkisi ihmal edilebilir düzeydedir. Ayrıca 10 U/g LS enzim konsantrasyonuna sahip deney setlerinde ise sıcaklık artışı az da olsa değişim oranına negatif yönde etki etmiştir.

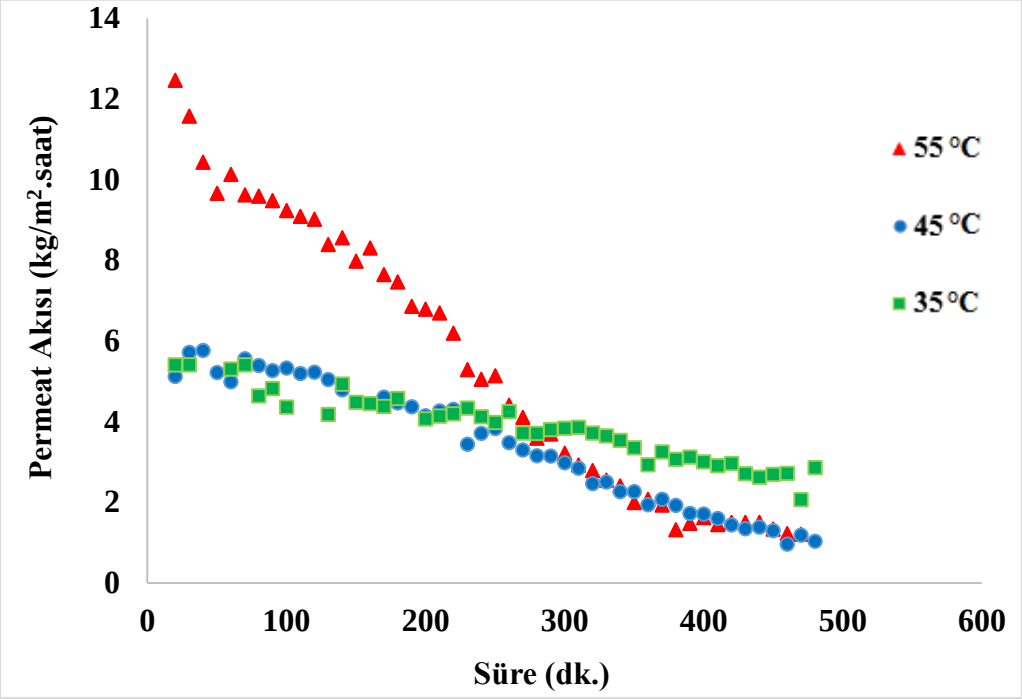
Çizelge 4.20 : Bazı deney setlerinde reaktör-1 ve reaktör-2'de aynı laktoz dönüşümünde elde edilen GY'nin karşılaştırılması.

T	LC	EC	R1 GY	R2 GY	R1/R2 Laktoz Dönüşümü	R1/R2 Süre	Değişim	R1/R2 Prob>F p değeri
(°C)	(°Briks)	(U/g LS)	(%)	(%)	(%)	(dk.)	(%)	
35	18,25	6	22,0±0,0	23,3±0,0	49/49	300/240	5,9	0,0003
55	18,25	6	19,2±0,2	20,6±0,2	55/55	270/180	7,5	0,015
35	18,25	10	20,8±0,1	22,2±0,1	55/55	240/210	7,0	0,009
45	18,25	10	19,9±0,1	20,7±0,3	55/55	180/120	3,8	0,082
55	18,25	14	17,9±0,2	18,8±0,3	56/56	90/105	4,6	0,083
35	32	6	25,9±0,1	28,4±0,3	53/53	480/420	9,4	0,009
35	32	10	26,9±0,1	27,9±0,1	55/55	450/420	3,9	0,008
35	32	14	26,6±0,1	27,3±0,9	53/53	240/210	2,6	0,03
45	32	14	22,9±0,6	26,1±0,1	61/61	450/360	13,6	0,018
55	32	10	22,3±0,8	26,8±0,1	62/62	450/420	20,1	0,016
45	32	6	26,2±0,4	27,6±0,1	53/53	450/390	5,7	0,041

LC: başlangıç laktoz konsantrasyonu, T: sıcaklık (ºC), EC: enzim konsantrasyonu, R1: Reaktör-1, R2: Reaktör-2, % değişim: R1 ile R2 sistemlerinde elde edilen GY arasındaki yüzdesel fark.

Reaktör-1 ve reaktör-2 sistemlerinden elde edilen optimizasyon verilerine göre yüksek GOS dönüşümü sağlanabilmesi için yüksek laktoz konsantrasyonu, düşük enzim konsantrasyonu ve düşük sıcaklık kombinasyonları ile çalışılmasının uygun olduğu daha önce belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.13). Nitekim her iki reaktörde de en yüksek GY, 35 °C sıcaklık ve 32 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu kombinasyonunda bulunmuştur. Ancak her iki sistem aynı laktoz dönüşüm değerlerinde karşılaştırıldığında reaktör-1 sistemine kıyasla daha yüksek GOS dönüşümünün elde edilmesi için ozmotik membran distilasyon ayırım süreci ile entegre reaktör-2 sisteminde yüksek laktoz konsantrasyonu, yüksek sıcaklık ve enzim konsantrasyonu içeren deney kombinasyonlarının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. GOS sentez sürecinin ozmotik membran distilasyon sistemi ile entegrasyonunda sıcaklık artışının verim üzerine olumlu etki göstermesi kinetik parametrelerin dışında ayrıca sıcaklığın membran akısını pozitif yönde etkilemesi ile de ilişkilendirilebilir.

Reaktör-2'de sıcaklığın membran akısına etkisi Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde 32 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu ve 6 U/g LS enzim konsantrasyonu içeren deney setlerinde sıcaklığın 35 °C'den 55 °C'ye artması permeat akısını arttırmıştır. Reaktör-2'de GOS sentezi çalışmalarında yapılan ön çalışmalar neticesinde hipertonik tuz çözeltisinin sıcaklığının 18°C'de sabit tutulmasına karar verilmiştir. Bu dikkate alındığında reaksiyon ortamı ve hipertonik tuz çözeltisi arasındaki sıcaklık farkından (ΔT) oluşan sürücü gücün 17 °C'den 27 °C'ye yükseltilmesi permeat akısında kayda değer bir artış sağlamazken, 37 °C'ye yükseltilmesi başlangıç akı değerini yaklaşık 2 kat arttırmıştır. Fakat şekilden de görüldüğü üzere 55 °C'de hızlı bir akı düşüşü yaşanmıştır. Bunun nedeni hipertonik tuz çözeltisi konsantrasyonunun yüksek permeat akısından dolayı hızlı bir şekilde azalmasıdır. Bu azalma 35 ºC ve 45 ºC reaksiyon ortam sıcaklıkları için düşük seviyededir. Nitekim 35 °C'de 300 dakika reaksiyon süresi aşıldıktan sonra elde edilen akı değerleri diğer sıcaklık değerlerinden yüksek seyretmiştir. Bunun nedeni ise ozmotik membran distilasyon sisteminde sürücü gücü, hem sıcaklık farkının hem de konsantrasyon farkının oluşturmasıdır.

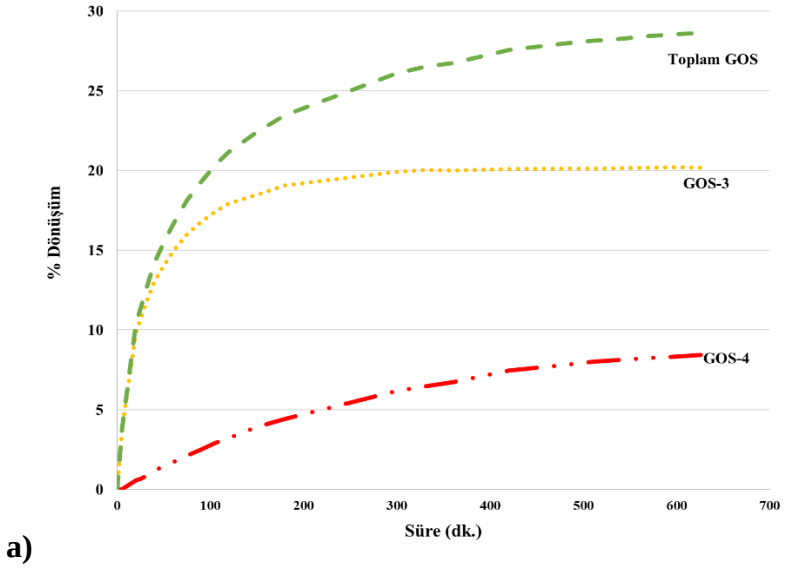


Şekil 4.25 : Reaktör-2'de enzimatik GOS sentezi sürecinde membran akısının sıcaklığa bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, EC:6 U/g LS).

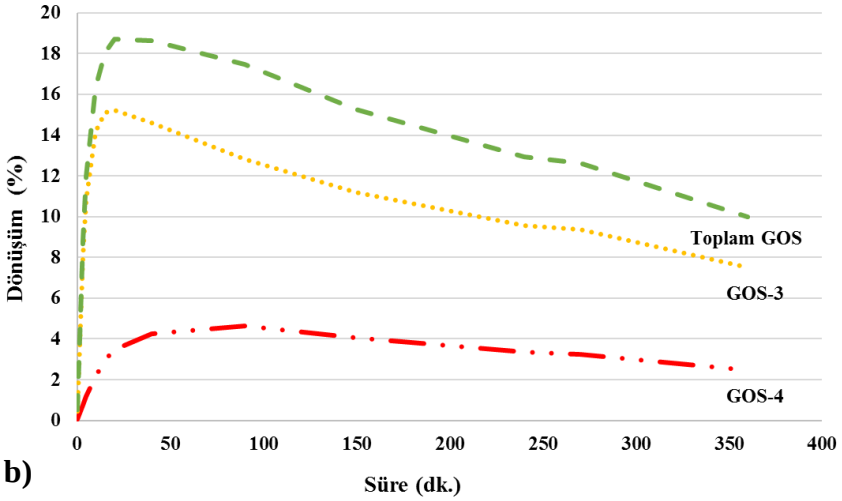
Reaktör-1'de olduğu gibi reaktör-2'de de toplam GOS maksimum düzeye ulaştıktan sonra reaksiyon ortam koşullarına bağlı olarak GOS miktarı azalmaya başlamış ya da

sabit kalmıştır (Şekil 4.26a,b,c). Bu durum reaktör-2'de transgalaktosilasyon aktivitesinin yüksek verimde GOS sentezi sağlayarak reaksiyonun erken zamanlarında baskın olduğunu ifade eder. Chen ve diğ. (2002) toplam oligosakkarit veriminin maksimuma ulaşmasından sonra reaksiyon süresi arttıkça azaldığını ifade etmişlerdir. Bunun nedenini oligosakkaritlerin sentez hızının, enzimatik reaksiyonun ilk aşamalarında oligosakkaritler için hidroliz hızından daha hızlı olmasına bağlamışlardır. Ayrıca reaksiyon süresi arttıkça GOS sentez hızının yavaşladığını bildirmişlerdir. Nitekim yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonu ile çalışılan deney seti (Şekil 4.26a) incelendiğinde reaksiyonun ilk 90 dakikasında çok hızlı bir GOS-3 sentezi gerçekleşmiştir. GOS miktarı maksimum düzeye ulaştıktan sonra hidroliz reaksiyonu baskın hale gelmektedir (Şekil 4.26b). İlk önce GOS-3'ler hidrolize uğramakta, GOS-4'te ise bir süre artış devam etmektedir (Şekil 4.26b). Çünkü GOS-3'ler hem hidrolize uğramakta bir yandan da GOS-4 oluşumunda galaktosil alıcısı olarak kullanılmaktadır. Fakat GOS-3 hidroliz hızı, GOS-4 yapım hızından düşük seviyede olduğundan toplam GOS yavaş fakat sürekli bir şekilde azalma göstermekte ve hidroliz reaksiyonu ürünleri olan glukoz ve galaktoz seviyeleri artmaktadır. Hidroliz aktivitesi başlangıç laktoz konsantrasyonu azaldıkça artmaktadır (Şekil 4.26a,b,c). Başlangıç laktoz konsantrasyonu 4,5 °Briks olan deney setinde erken zamanda baskın hale geçen hızlı bir hidroliz aktivitesi söz konusudur (Şekil 4.26c). Eğer reaksiyon uzun süreler devam ettirilir ise oluşan GOS'ler yıkılarak ortamda sadece hidroliz ürünleri kalacaktır (Şekil 4.26c).

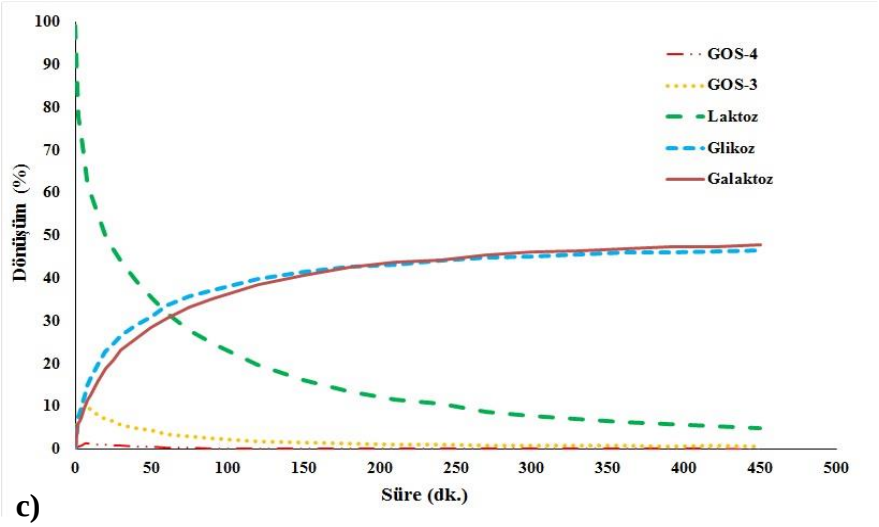
Manera ve diğ. (2010) *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β-galaktosidaz kullandığı çalışmasında 500 g/L laktoz konsantrasyonu 10 U/ml enzim konsantrasyonu, 45 °C sıcaklık ve pH 7.0'da 27,6 g/L/h'lık bir üretkenlik ve %16,5'lik bir GOS verimi elde etmişlerdir. Üç saatlik reaksiyondan sonra, sürekli GOS hidrolizinin bir sonucu olarak galaktooligosakkaritlerde kademeli bir azalma gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar, transgalaktosilasyonun ağırlıklı olarak reaksiyonun başlangıcında gerçekleştiğini ve yüksek GOS konsantrasyonu sağladığını, β-galaktosidaz hidrolitik aktivitesinin reaksiyon süresi boyunca arttığını göstermektedir.



a)



b)



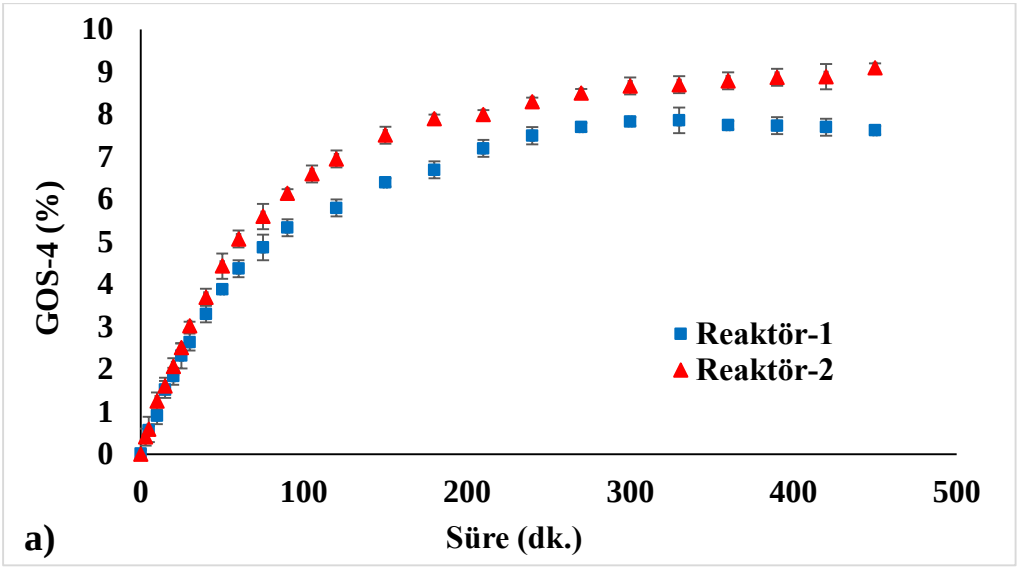
c)

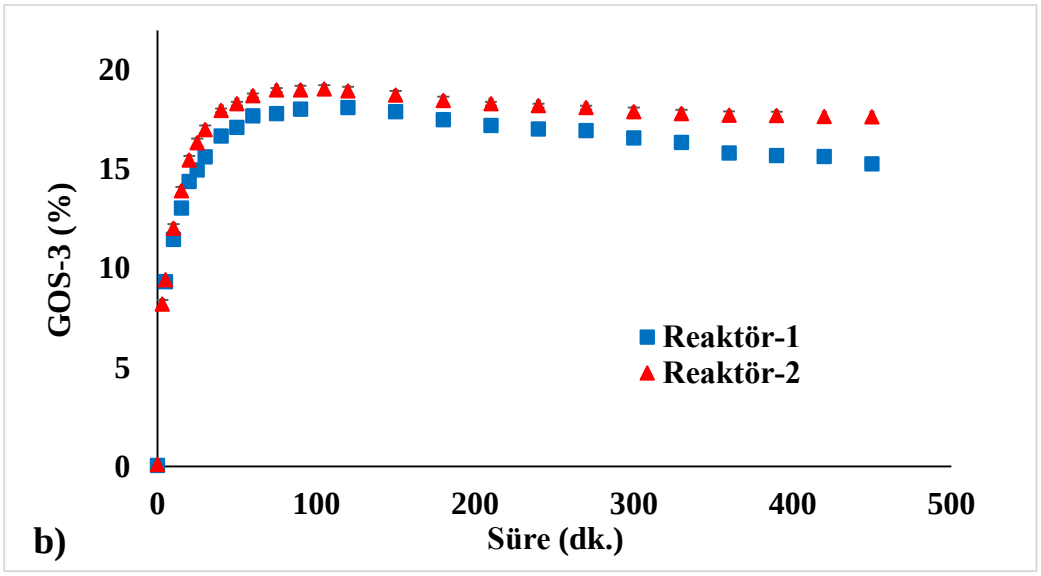
Şekil 4.26 : GOS-3 ve GOS-4'ün farklı başlangıç laktoz konsantrasyonunda reaksiyon süresince değişiminin grafiksel gösterimi (Reaksiyon koşulları; a.LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, b.LC:18,25 °Briks, T:55 °C, EC:14 U/g LS, c.LC:4,5 °Briks, T:35 °C, EC:14 U/g LS).

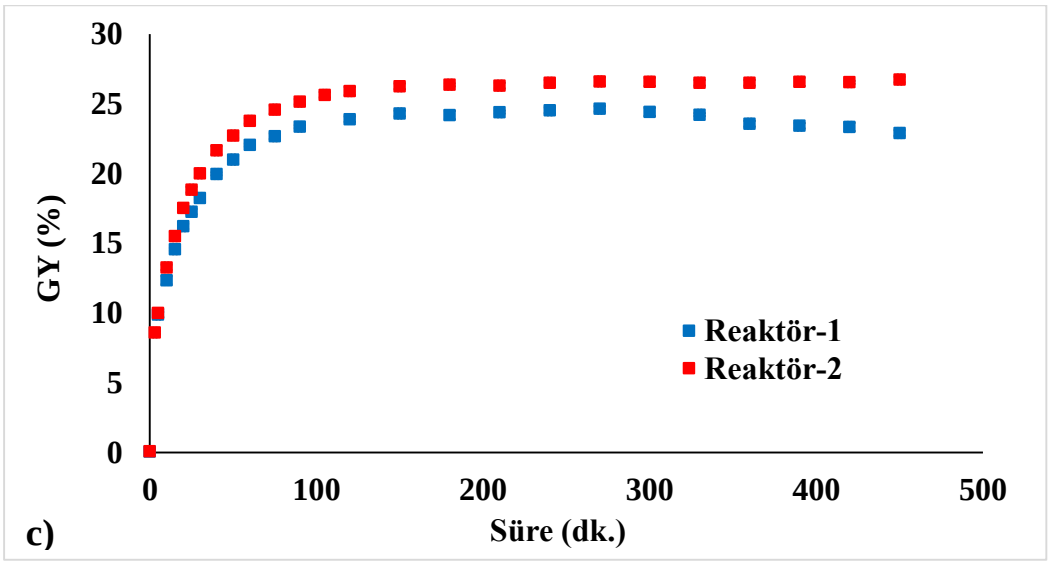
Sen ve diğ. (2014) ise Şekil 4.26'da grafiksel olarak gösterilen süreci şu şekilde ifade etmişlerdir. Reaksiyonun ilk aşamasında, laktoz, reaksiyon karışımında bulunan baskın karbonhidrattır. Transgalaktosilasyon reaksiyonunun net hızı, GOS-3 oluşum hızı olarak tahmin edilebilir, çünkü bu süreç sırasında kayda değer miktarda daha yüksek oligosakkaritler tespit edilmemiştir. Reaksiyonun ilk aşamasında oluşan monosakkaritler, GOS-3'leri üretmek için substrat (laktoz) molekülleri ile bağlanır. Dolayısıyla bu süreç sırasında, reaksiyon karışımındaki monosakkarit konsantrasyonu düşüktür ve GOS-3 konsantrasyonu yüksektir. Zaman arttıkça, GOS-3 bozunma hızı artar, bu da transgalaktosilasyon reaksiyonunu inhibe eden monosakkarit üretimine yol açar ve dolayısıyla GOS-3 konsantrasyonu azalır.

Elde edilen bu bilgiler ışığında reaktör-2 sisteminde çalışılması daha uygun bulunan yüksek sıcaklık ve enzim konsantrasyonu içeren deney kombinasyonları için şu şekilde bir yorum yapılabilir. Transgalaktosilasyon aktivitesinin reaksiyonun ilk 90 dakikası boyunca yüksek seviyede olması nedeniyle bu zaman aralığında reaksiyon ortamında artan galaktosil alıcıları konsantrasyonu toplam GOS'yi da arttırmıştır. Yüksek sıcaklıkta reaktör-2'de reaksiyon ortamındaki suyun hızlı bir şekilde reaksiyon ortamından uzaklaştırılması GOS-3, GOS-4 ve laktoz gibi galaktosil alıcı konsantrasyonlarını arttırmış ve böylece transgalaktosilasyon aktivitesine pozitif yönde katkı sağlamıştır. Nitekim Tzortzis ve diğ. (2005) yüksek laktoz konsantrasyonunun ve yüksek galaktosil alıcılarının varlığının reaksiyon çözeltisinin su aktivitesini azaltarak oluşan GOS ürünlerinin polimerizasyon derecesini etkilediğini söylemişlerdir. Çünkü düşük su aktivitesi koşulları trisakkaritlerin üretimini desteklerken, daha yüksek polimerizasyon derecesine sahip GOS sentezlemek için daha yüksek su aktivitesi gerekir (Boon ve diğ., 2000b) .

Reaktör-1 sistemine kıyasla reaktör-2 sisteminde gözlemlenen önemli diğer bir sonuç ise aynı laktoz dönüşümünün reaktör-2'de reaktör-1'e kıyasla reaksiyonun daha erken safhalarında gerçekleşmesidir. Bu sonuç ozmotik membran distilasyon ile entegre GOS sentez sürecinde reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su nedeniyle enzimin transgalaktosilasyon reaksiyonuna daha fazla yöneldiği ve daha hızlı şekilde çalıştığı şeklinde yorumlanmıştır. Reaktör-1'de gerçekleştiren bir çalışmanın (T=55 °C, LC=32°Briks, EC= 10 U/g LS) reaktör-2'de yürütülmesinin sentezlenen GOS-4, GOS-3 ve GY değerlerine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.27'de verilmiştir.







Şekil 4.27 : Reaktör-1 ve reaktör-2'de elde edilen zamana bağlı GOS-4, GOS-3 ve GY değerleri (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:55 °C, EC:10 U/g LS).

Enzimatik GOS sentezinin ozmotik membran distilasyon süreci ile entegrasyonunun en çarpıcı etkisi GOS-4 üzerine olmuştur (Şekil 4.27a). Fakat GOS-3 ve toplam GOS açısından önemli bir etki gözlenmemiştir (Şekil 4.27b,c). Bu durumun temel nedeni sentezlenen GOS-3'lerin GOS-4 oluşum sürecinde hammadde olarak kullanılmasıdır. Reaksiyon ortamından suyun kademeli olarak uzaklaştırılması nedeniyle enzim reaktör-2 sisteminde reaktör-1 sistemine kıyasla daha seçici olarak transgalaktosilasyon aktivitesi göstermektedir. Bu nedenle reaktör-2 sisteminde oluşan GOS-3'ler de galaktosil alıcısı olarak davranarak daha fazla GOS-4 oluşumuna neden olmuştur. Boon ve diğ. (2000a) GOS sentez reaksiyon parametrelerinin üretilen GOS'lerin polimerizasyon derecesini etkilediğini, *B.circulans* ve *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz kullanılan çalışmalarda artan laktoz konsantrasyonun üç zincirli GOS'lerden daha uzun GOS oluşumları sağladığını tespit etmişlerdir. Ayırım sürecinin bu pozitif etkisi elde edilen GOS'lerin, prebiyotik etkinliğindeki artışın zincir uzunluğu ile paralel artış göstereceği bilgisi (Gosling ve diğ., 2010; Rastall ve diğ., 2016) göz önüne alındığında kayda değer bulunmuştur.

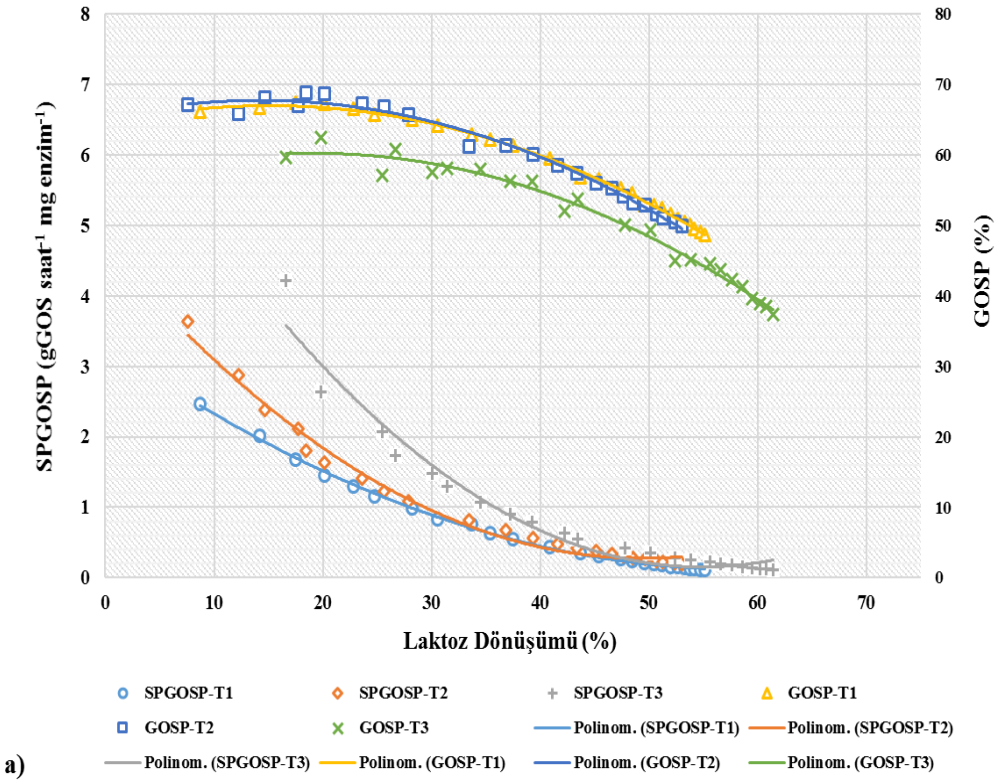
Çizelge 4.21 : 300 ve 450 dakika sentez süresinde elde edilen GOS-4, GOS-3 ve GY.

	300 dk.		**450 dk.**	
	Reaktör-1	**Reaktör-2**	**Reaktör-1**	**Reaktör-2**
Laktoz Dönüşümü	57,8±0,1	59,7±0,2	61,6±0,3	62,0±0,2
GOS-3	16,6±0,2	17,9±0,3	15,3±0,2	17,6±0,3
GOS-4	7,8,±0,1	8,7±0,1	7,6±0,1	9,1±0,1
GY	24,4±0,2	26,6±0,3	22,9±0,2	26,7±0,2

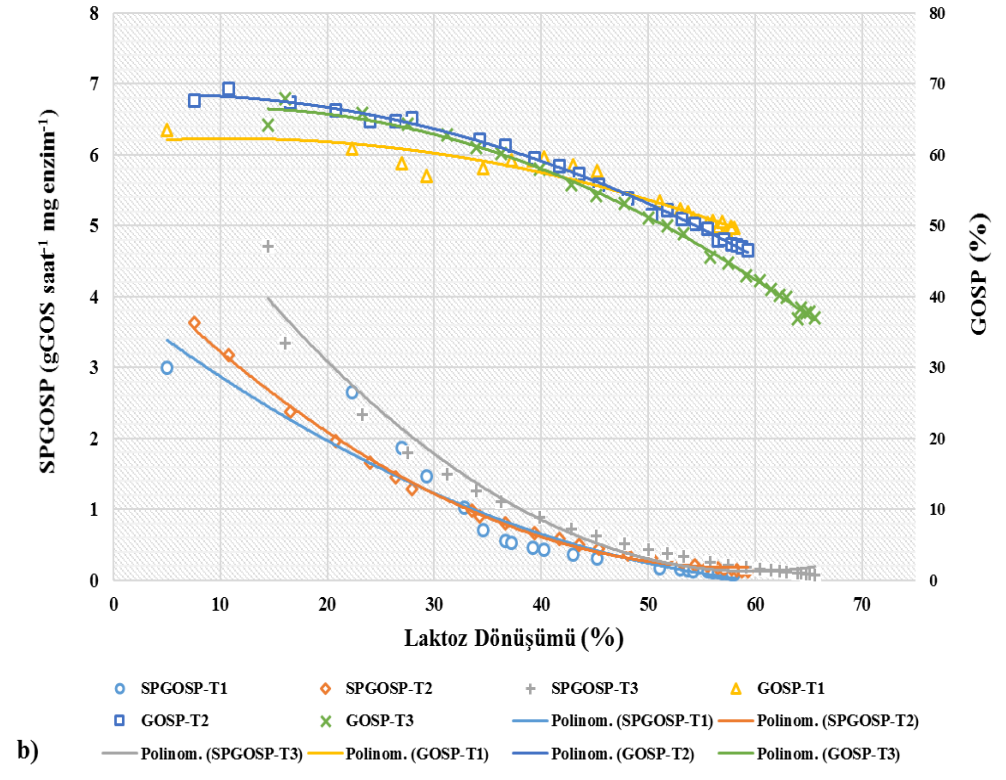
Şekil 4.27'da grafiksel olarak sunulan reaktör-2'deki etki Çizelge 4.21'de 300. ve 450. dakika verileri kullanılarak ayrıntılı bir şekilde ayrıca ifade edilmiştir. Reaktör-1'de aynı deneysel koşullarda çalışan enzimin reaktör-2'de özellikle reaksiyonun 90. dakikasından sonra GOS-4 sentezine ağırlık verecek şekilde çalıştığı ve bu eğilimin reaksiyonun ilerleyen sürelerinde daha belirginleştiği saptanmıştır (Şekil 4.27a). Reaksiyon süresi arttıkça enzim reaktör-1'de GOS-3 hidrolizine yönelirken ayrıca GOS-4 sentezi de gerçekleştirmektedir (Çizelge 4.21). Fakat oluşan GOS-4, hidroliz edilen GOS-3 değerinden az olduğundan toplam GOS azalmaktadır. Reaktör-1'de 300. dakikadaki toplam GOS 450. dakikada %24,4'ten %22,90 değerine azalırken GOS-4'te %7,8'ten %7,6'ya azalmıştır. Reaktör-2'de ise 300. dakikadaki toplam GOS 450. dakikada %26,6'den %26,70 değerine yükselirken GOS-4 %8,7'den %9,1'e

yükselmiştir (Çizelge 4.21). Reaksiyon süresinin GOS karışımlarında polimerizasyon derecesi üzerinde etkisi vardır (Osman, 2016). Genellikle trisakkaritler ilk oluşan GOS'dir, ardından tetrasakkaritler ve daha sonra daha yüksek oligosakkaritler gelir. Bunun nedeni, trisakkaritlerin, galaktosil alıcısı olarak da hareket ederek tetrasakkaritleri oluşturmaları, ardından tetrasakkaritlerinde galaktosil alıcısı olarak hareket ederek pentasakkaritleri oluşturması gerçeğidir (Albayrak ve Yang, 2002). Bu nedenle, farklı uzunlukta GOS'lerin maksimum verimleri genellikle sentez reaksiyonu sırasında farklı zaman noktalarında elde edilir (Neri ve diğ., 2009a). Genel bir değerlendirme yapmak gerekirse sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktör sisteminin ozmotik membran ayırım sistemi ile entegre edilmesi iki sistem arasındaki GOS-4 arasındaki farkı yükseltmiş ve GY'de az da olsa bir artış elde edilmiştir.

Reaktör-1 ve reaktör-2'de sıcaklık (T) artışının GOS sentezi sürecine etkisi spesifik GOS üretkenliği (SPGOSP) ve GOS üretkenliği (GOSP) terimlerinin laktoz dönüşümüne karşı eğilim grafikleri çizilerek incelenmiştir (Şekil 4.28). SPGOSP, 1 mg enzimin bir saatte ürettiği GOS'nin g cinsinden miktarı olarak tanımlanırken (Vera ve diğ., 2012), GOSP ise sentezlenen GOS miktarının dönüşüme uğrayan laktoz miktarına oranının yüzdesi olarak tanımlanmıştır. T1, T2 ve T3 terimleri sırasıyla 35 °C, 45 °C ve 55 °C sıcaklıklarını ifade etmektedir. Şekil 4.28a incelendiğinde reaktör-1 için sıcaklık artışının SPGOSP'yi arttırdığı söylenebilir. Artan laktoz dönüşümü ile birlikte yüksek sıcaklığın SPGOSP değerleri diğer sıcaklıkların üstünde seyretmiştir. 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarının sağladığı SPGOSP değerleri yaklaşık %35 laktoz dönüşümünde eşitlenirken her üç sıcaklığın SPGOSP değerleri yaklaşık %47 laktoz dönüşümünde benzer olmuştur. GOSP için ise durum tam tersidir. Sıcaklık artışı GOSP'de azalışa neden olmuştur. 55 °C'de gözlenen GOSP değerleri diğer sıcaklıkların oldukça altında seyretmiştir. 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarının sağladığı GOSP değerleri benzer bir eğilim göstermiştir. SPGOSP'deki sıcaklığa bağlı artış 45 °C için belirgin değilken 55 °C'de önemli derecede belirgin hale gelmiştir. Bölüm 4.2.4'te ifade edildiği üzere SPGOSP değerleri de reaksiyon sıcaklığına, enzim konsantrasyonuna ve dolayısıyla reaksiyon süresine bağlı olarak değişmektedir. Bu durum artan sıcaklık ile birlikte artan reaksiyon hızına bağlanmıştır (Vera ve diğ., 2012). 55 °C enzimin optimum çalışma sıcaklığı olduğundan enzim aktivitesinde artış meydana gelmiş ve transgalaktosilasyon/hidroliz dengesinde negatif bir etki oluşturmuştur.



a)



b)

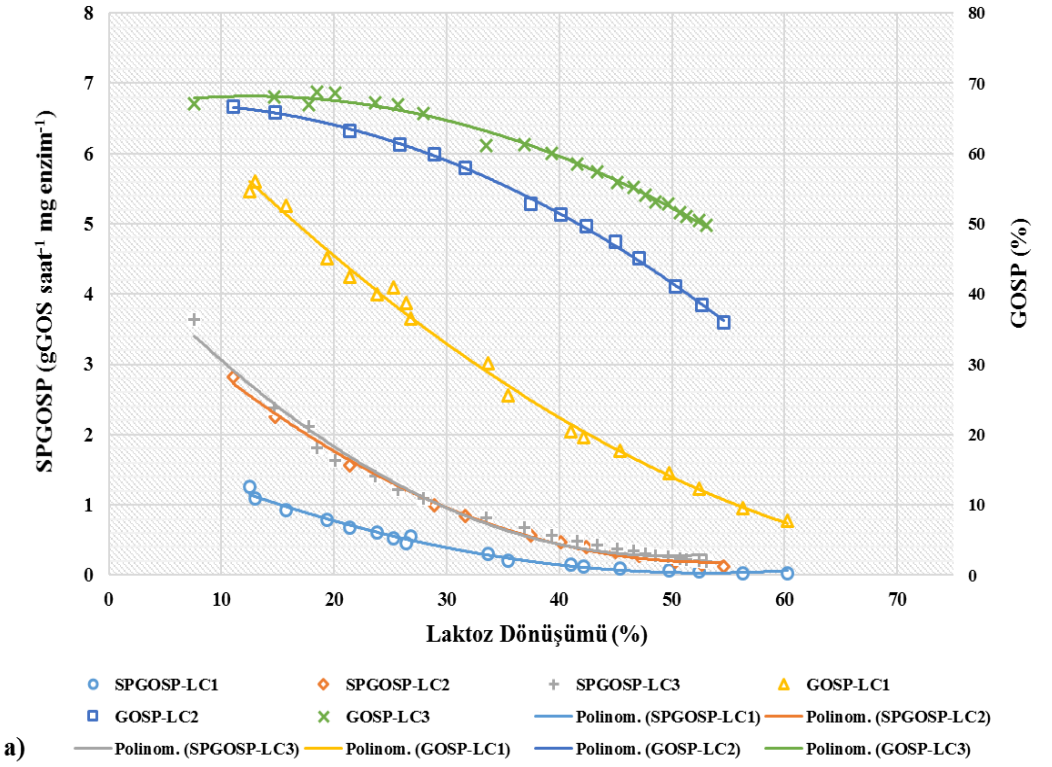
Şekil 4.28 : Sıcaklığın (T) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör-1, b) Reaktör-2 (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, EC:10 U/g LS).

Özellikle %25 laktoz dönüşümünden sonra GOSP'de keskin bir azalış vardır. Bunun nedeni ise artan sıcaklıklarda enzim daha aktif olduğundan maksimum GY elde edildikten sonra hidroliz yönünde daha fazla eğilim göstermesidir. Benzer sonuçlar Sen ve diğ. (2014) tarafından da elde edilmiştir. Sen ve diğ. (2014) sıcaklıktaki artışla birlikte laktoz dönüşüm yüzdesinin artarken GOS konsantrasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Çalıştıkları sıcaklık aralığı içinde (ilgili enzimin optimum sıcaklığının altında), sıcaklıktaki artış enzim aktivitesini artırarak daha kısa sürede daha fazla laktoz dönüşümü ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, artan ısı ile birlikte termal enerjinin artmasının aktivasyon enerji bariyerinin aşılmasına yardımcı olduğunu ve bu birleşik etkinin belirli bir reaksiyon anında dönüşümü arttırmaya destek sağladığı yorumunu yapmışlardır.

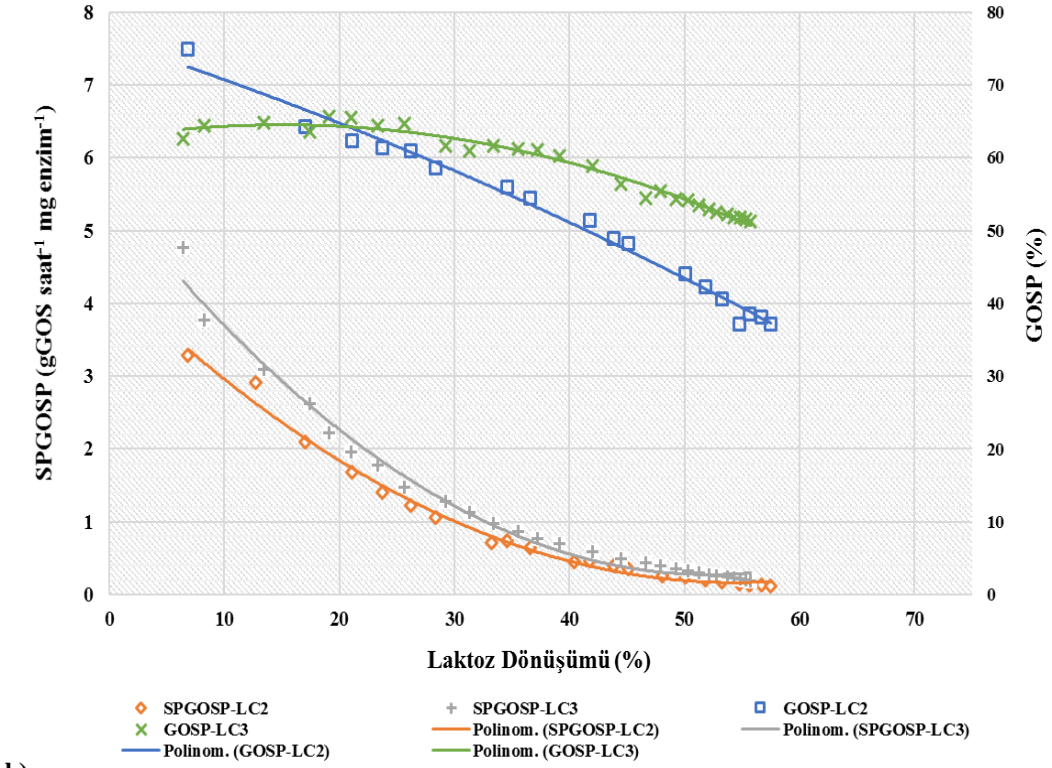
Her iki reaktörde de artan sıcaklık ile birlikte artan başlangıç SPGOSP değerleri elde edilmiştir. (Şekil 4.28a,b). Benzer sonuç Vera ve diğ. (2012) tarafından da elde edilmiş ve bunun nedeninin artan reaksiyon hızları olarak belirtilmiştir. Vera ve diğ. (2012) 400 g/L laktoz konsantrasyonunda 40 °C, 47,5 °C ve 55 °C sıcaklıklarda yaptıkları GOS sentez çalışmalarında artan bir SPGOSP değerleri gözlemlerken, SPGOSP değerinin özellikle 55 °C sıcaklıkta önemli bir şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Reaktör-1'de 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarında gözlenen SPGOSP değerlerinin birbirine yakın olması durumu (Şekil 4.28a) reaktör-2'de de geçerlidir. Reaktör-2'de 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarının sağladığı SPGOSP değerleri yaklaşık %25 laktoz dönüşümünde eşitlenirken her üç sıcaklığın SPGOSP değerleri yaklaşık %53 laktoz dönüşümünde benzer olmuştur. 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarının SPGOSP değerlerinin benzer olma durumu reaktör-2'de daha erken laktoz dönüşümlerinde gözlenmiştir. Bunun nedeni 45 °C'de suyun uzaklaştırma hızının 35 °C'ye göre yüksek olmasından dolayı reaksiyon ortamındaki enzimi inhibe edici özellik gösteren monosakkarit konsantrasyonunun hızlı bir biçimde artması şeklinde yorumlanabilir. Reaktör-2 sisteminde artan sıcaklık ile birlikte hem enzim aktivesi hem de permeat akısı artmaktadır. Laktoz parçalandıkça reaksiyon ortamına salınan glukoz ve galaktoz yüksek sıcaklıklarda kritik inhibisyon konsantrasyonu (Neri ve diğ., 2009a; Vera ve diğ., 2011) değerine daha çabuk bir şekilde erişmektedir. Bu nedenle 45 °C sıcaklıktaki enzimin transgalaktosilasyon aktivitesi daha hızlı azalmaktadır. 55 °C sıcaklığında bu etkinin 45 °C sıcaklığına göre daha az görülmesi enzimin bu sıcaklıkta aktivitesinin de ciddi oranda artması ile açıklanabilir (Şekil 4.28a). Ayrıca, yüksek laktoz

dönüşümlerinde az da olsa 35 °C sıcaklığın sağladığı SPGOSP değerleri diğer sıcaklıklara göre daha fazla azalmaktadır. Fakat reaktör-1'de gözlenilenin aksine reaktör-2'de düşük sıcaklıkta daha düşük fakat daha stabil bir GOSP değeri elde edilmiştir (Şekil 4.28b). 45 °C ve 55 °C değerlerinde benzer GOSP eğilimi görülmekte olup özellikle %40 laktoz dönüşümünden sonra 55 °C çizgisinde meydana gelen GOSP değerinin daha hızlı azalışı, enzimin hala aktif olduğunu ve hidroliz yönünde çalıştığını işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar çerçevesinde sıcaklığın reaktör-2 sentez sürecine etkisi özetlenecek olursa yüksek laktoz dönüşümlerinde yüksek GOSP elde etmek için düşük sıcaklığın daha iyi sonuçlar sağladığı tespit edilmiştir.

Reaktör-1 ve reaktör-2'de laktoz konsantrasyonu (LC) artışının GOS sentezi sürecine etkisi spesifik GOS üretkenliği (SPGOSP) ve GOS üretkenliği (GOSP) terimlerinin laktoz dönüşümüne karşı eğilim grafikleri çizilerek incelenmiştir (Şekil 4.29). LC1, LC2 ve LC3 terimleri sırasıyla 4,5 °Briks, 18,25 °Briks ve 32 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonlarını ifade etmektedir. Reaktör-1'de 4,5 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonu oldukça düşük SPGOSP değerleri sağlamasının yanı sıra bir de ciddi bir GOSP azalış trendi göstermiştir (Şekil 4.29a). Yüksek laktoz dönüşümlerinde oluşan GOS'ler hızlı bir şekilde hidrolize uğramış ve GOSP değeri oldukça azalmıştır. Laktoz konsantrasyonunun artması GOSP'yi de önemli miktarda arttırmıştır. Fakat aynı etki SPGOSP'de gözlenmemiştir. Laktoz konsantrasyonunun GOS üretkenliğine etkisi 45 °C sıcaklıkta sabit tutulan bir reaksiyonda incelendiği için bu sonuç 45 °C sıcaklıkta gözlenen düşük SPGOSP performansından da ileri gelebilir (Şekil 4.29b). GOSP değerleri incelendiğinde 32 °Briks laktoz konsantrasyonunda enzimin transgalaktosilasyon aktivitesini artmış ve %17 laktoz dönüşümüne kadar enzimin transgalaktosilasyon/hidroliz aktivitesi neredeyse sabit hızda ilerlemiştir. Enzim reaksiyonun başında yüksek bir SPGOSP değerleri sağlarken reaksiyon ilerledikçe bu değer çok hızlı bir şekilde azalmaktadır. Azalan başlangıç laktoz konsantrasyonu reaksiyonun ilk dakikalarında enzimin hidroliz aktivitesinin transgalaktosilasyon aktivitesini baskıladığını ve GOSP değerlerinde hızlı bir azalışa yol açtığını göstermektedir (Neri ve diğ., 2009).



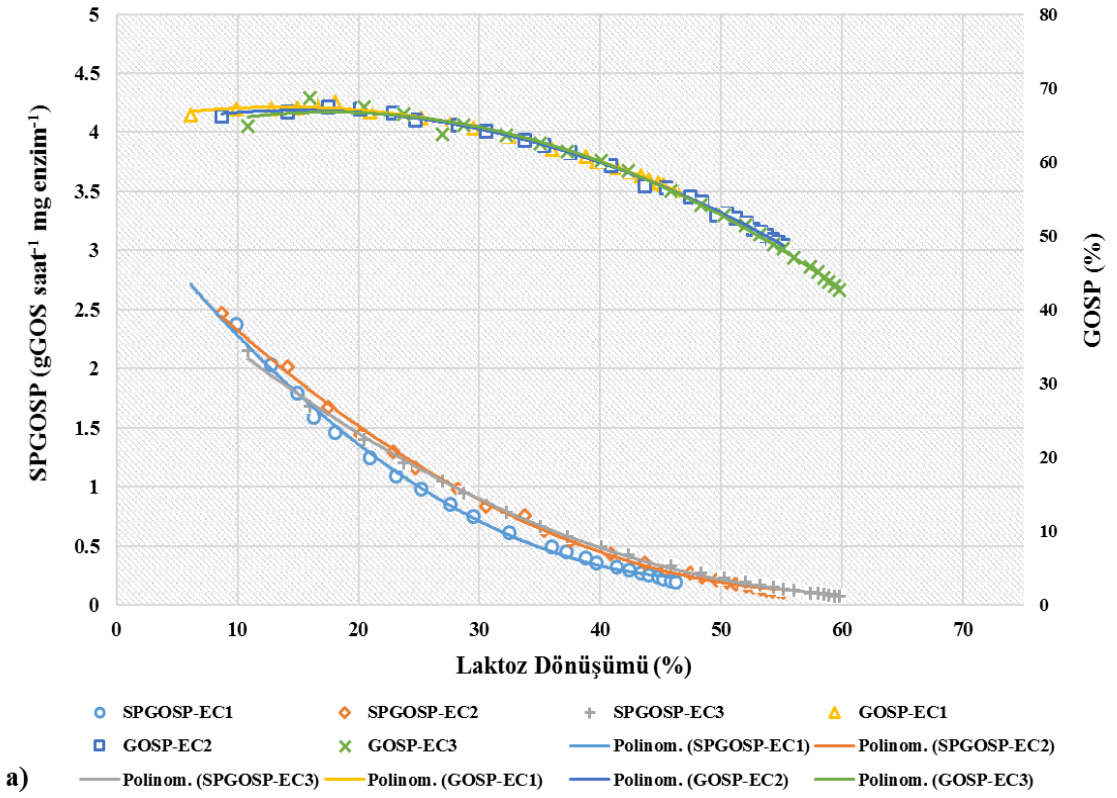
a)



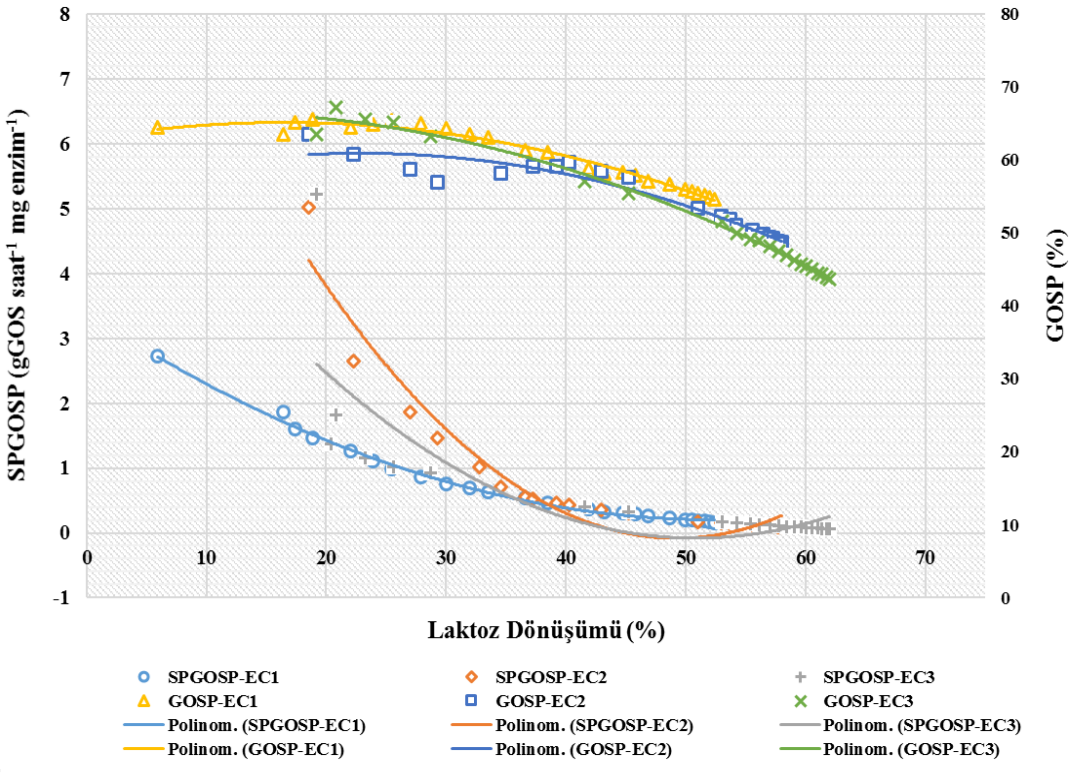
b)

Şekil 4.29 : Başlangıç laktoz konsantrasyonunun (LC) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör 1, b) Reaktör 2 (Reaksiyon koşulları; T:45 °C, EC:6 U/g LS).

Reaktör 2'de 18,25 °Briks ve 32 °Briks başlangıç laktoz konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonu GOS sentez süreci boyunca daha yüksek SPGOSP değerleri sağlamıştır. Şekil 4.29b incelendiğinde başlangıç laktoz konsantrasyonu değerinin artması GOSP değerini arttırmıştır. Sen ve diğ. (2014) bu durumu reaksiyon ortamında laktoz konsantrasyonunun artmasıyla transgalaktosilasyon reaksiyonunun laktoz hidrolizine göre daha tercih edilebilir olmasına bağlamışlardır. Düşük laktoz konsantrasyonlarında, monosakkaritlerin ayrıca transgalaktosilasyon reaksiyonunu da inhibe ederek daha düşük GOS oluşumuna neden olduklarını ayrıca eklemişlerdir. Öte yandan Jovanovic-Malinovska ve diğ. (2012), düşük laktoz konsantrasyonunda, karbonhidratların hidroksil gruplarının miktarı az olduğundan transgalaktosilasyon oranı hidrolizinkinden daha düşük olduğunu, bunun da reaksiyon çözeltisinde daha yüksek miktarda glikoz ve galaktoz ve daha düşük GOS miktarı ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Bunun yanında 400 g/L'yi aşan laktoz konsantrasyonlarında ani laktoz çökelmelerinin laktoz çözünürlüğünü azaltmaları nedeniyle GOS veriminde düşüşe neden oldukları rapor edilmiştir (Vera ve diğ., 2016; Vera ve diğ., 2012). Düşük başlangıç laktoz konsantrasyonunda neredeyse lineer azalan bir GOSP trendi görülürken yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonun %26 laktoz dönüşümüne kadar stabil bir GOSP trendi gözlenmiştir. Yüksek başlangıç laktoz konsantrasyonu yüksek laktoz dönüşümlerinde yüksek GOSP değerleri sağlayarak enzimin transgalaktosilasyon aktivitesinin baskın olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuç ve GY'de elde edilen artış enzimatik reaksiyon sürecine ozmotik membran distilasyon sisteminin dahil edildiği reaktör için kayda değer bir kazanımdır. Fakat reaktör-2'de reaksiyon ortamında inhibisyon etkileri bulunan monosakkaritlerin de konsantre edilmesi enzimin aktivitesini olumsuz etkilediği düşünülmüştür. Bu nedenle reaktör-2 sisteminin GOSP üzerine pozitif katkısını belirginleştirmek için enzim inaktivasyonunun giderilmesi oldukça önemlidir.



a)



b)

Şekil 4.30 : Enzim konsantrasyonunun (EC) GOS üretkenliğine etkisi, a) Reaktör 1, b) Reaktör 2 (Reaksiyon koşulları; T:35 °C, LC:32 °Briks).

Reaktör-1 ve reaktör-2'de enzim konsantrasyonu (EC) artışının GOS sentezi sürecine etkisi spesifik GOS üretkenliği (SPGOSP) ve GOS üretkenliği (GOSP) terimlerinin laktoz dönüşümüne karşı eğilim grafikleri çizilerek incelenmiştir (Şekil 4.30). EC1, EC2 ve EC3 terimleri sırasıyla 6 U/g LS, 10 U/g LS ve 14 U/g LS enzim konsantrasyonlarını ifade etmektedir. Reaktör-1'de GOSP değerleri enzim konsantrasyonundan bağımsız olarak benzer trend göstermiştir (Şekil 4.30a). Chockchaisawasdee ve diğ. (2005) enzim konsantrasyonu arttıkça daha kısa sürelerde maksimum verim elde edilmesine karşın oluşan ürünlerin de daha hızlı hidrolize edildiği saptamışlardır. Sabit laktoz konsantrasyonunda artan enzim konsantrasyonları için daha yüksek verimlere rastlamamışlardır. Aynı başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip deney kombinasyonlarından elde edilen maksimum verimin, az veya çok, enzim konsantrasyonundan bağımsız olarak aynı miktarda GOS oluşturduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir sonuç Botelho-Cunha ve diğ. (2010) tarafından bulunmuş ve artan enzim konsantrasyonlarının GOS veriminde bir artış sağlamadığını bildirmişlerdir. Düşük ve orta enzim konsantrasyonunda gözlenen yüksek SPGOSP değerleri laktoz dönüşümü arttıkça yüksek enzim konsantrasyonu SPGOSP değerlerinin altında kalmıştır. Özellikle düşük enzim konsantrasyonu yüksek laktoz dönüşümlerinde daha düşük SPGOSP değerleri sağlamıştır.

Reaktör-2'de enzim konsantrasyonu arttıkça başlangıç SPGOSP değerleri de önemli ölçüde artmıştır (Şekil 4.30b). SPGOSP değeri 10 U/g LS için %39 laktoz dönüşümüne kadar, 14 U/g LS için ise %35 laktoz dönüşümüne kadar 6 U/g LS enzim konsantrasyonundan yüksektir. Ancak bu laktoz dönüşümü noktalarından sonra SPGOSP trendinde düşüş gözlenmiştir. Reaktör-1 sisteminde gözlenilen durumun aksine (Şekil 4.30a) enzim konsantrasyonu reaktör-2'de GOSP değerlerini etkilemiştir. En düşük enzim konsantrasyonunda yüksek laktoz dönüşümlerinde yüksek SPGOSP değerleri görülürken aynı zamanda süreç boyunca yüksek GOSP değerleri gözlenmiştir. Pocedičová ve diğ. (2010) maksimum GOS için optimal hidroliz derecesinin kullanılan laktoz ve enzim konsantrasyonuna bağlı olduğunu ifade etmiştir. Botelho-Cunha ve diğ. (2010) da enzim konsantrasyonundaki artışın GOS sentezini geliştirmek yerine muhtemelen üretilen GOS'nin hidrolizinin hızlanması nedeniyle daha az GOS miktarlarına yol açtığını belirtmişlerdir. Bu bulgulardan hareketle reaktör-2'de düşük enzim konsantrasyonunda GOS verimi üzerine olumlu

etkinin daha net biçimde gözlenebileceği söylenebilir. Enzim konsantrasyonun 10 U/g LS değerine yükselmesi enzimin aktivitesini arttırırken hidroliz kabiliyetini ön plana çıkararak GOSP değerlerinde önemli düzeyde azalışa neden olmuştur. Enzim konsantrasyonunun 14 U/g LS değerine yükselmesi ise yine enzimin hidroliz aktivitesinin baskın hale gelmesine yol açararak düşük enzim konsantrasyonunda elde edilen kadar GOSP değeri sağlamamıştır. Rustom ve diğ. (1998) *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz ile yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlara göre enzimle katalize edilen reaksiyonlarda reaksiyon hızının, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu söylemişlerdir. Bununla birlikte, enzim preparasyonunda küçük miktarlarda bazı yüksek derecede toksik kalıntı veya tersine çevrilebilir inhibitörlerin varlığının bir sonucu olarak sapma meydana gelebileceğini ve böylece enzim konsantrasyonunun arttırılmasının reaksiyon karışımındaki inhibitör seviyesini de yükselteceğini ifade etmişlerdir. Daha düşük miktarda (%0,1'in altında) *A.oryzae* enzimi kullanmanın daha ekonomik olduğu kanısına varmışlardır. Elde edilen bu bu bulgular neticesinde reaktör-2 sisteminin GOS sentez süreçlerinde gerekli enzim miktarını azaltacağı ve böylece birim GOS başına düşen maliyetinde azalacağı söylenebilir.

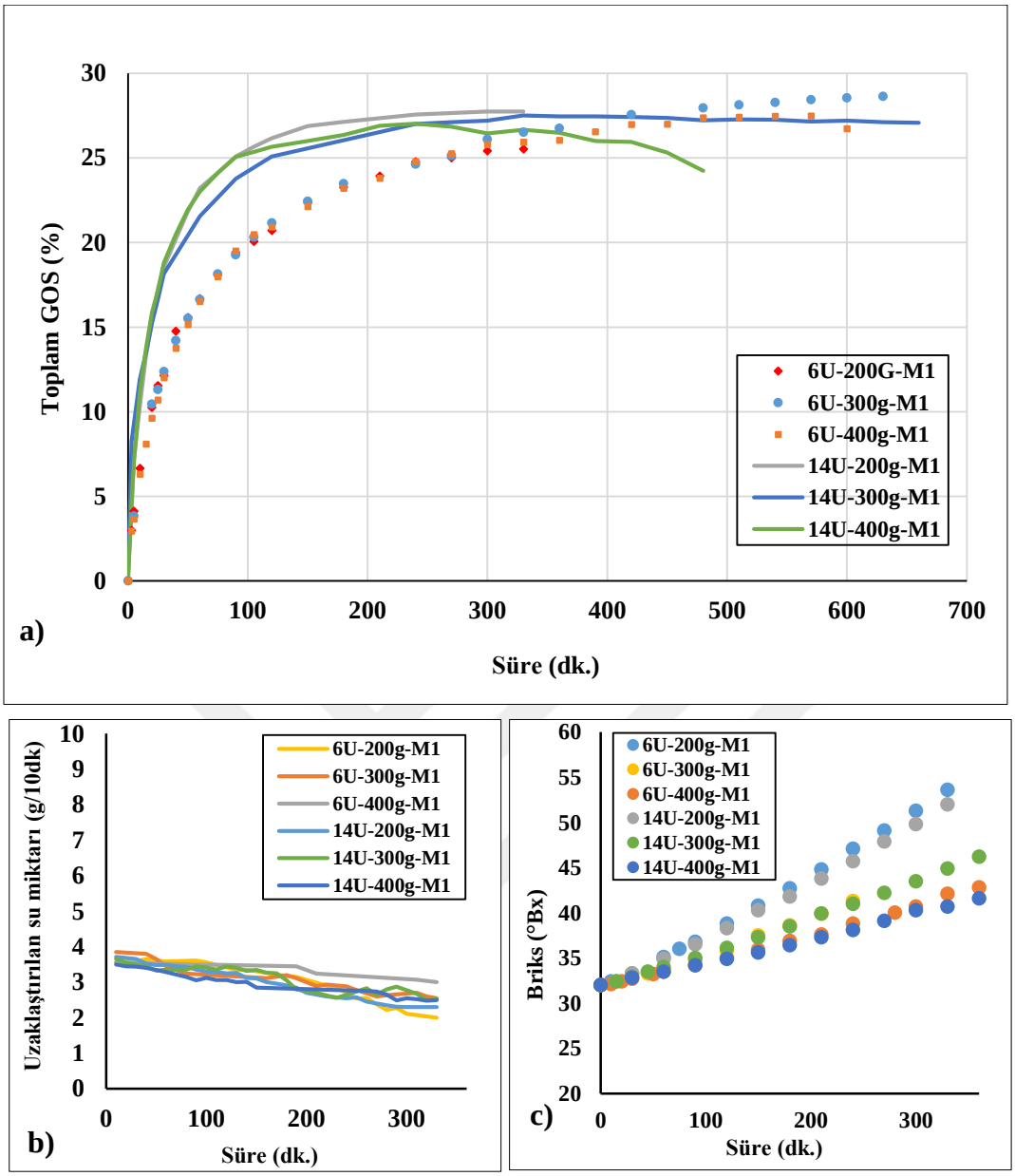
4.3.3 Reaktör-2'de yapılan diğer çalışmalar

Reaktör-2 sisteminde yüksek hidrofobisiteye sahip mikro-gözenekli bir membran ile enzimatik reaksiyon ortamından sadece suyun yüksek seçicilikle ayrımı sağlanarak toplam GOS değerinde artış elde edilmiştir. Sistemde kullanılan düz tabakalı membran düşük reaksiyon sıcaklığında yetersiz permeat akı değerleri sağlamıştır (Şekil 4.25). Bunun nedeni membran alanının dar olmasıdır. Nitekim düşük sıcaklıklara sahip deney kombinasyonları için membran alanından kaynaklanan yetersiz su geçiş hızı nedeniyle istenilen reaktör-2 performansının sağlanamamış olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yukarıdaki bölümde anlatıldığı üzere transgalaktosilasyon aktivitesi reaksiyonun ilk 1-2 saatlik diliminde yüksek seviyededir. Bu zaman aralığında ortamdaki galaktosil alıcılarının konsantrasyonu arttığı takdirde, bir diğer deyişle suyun uzaklaştırma hızının artması durumunda transgalaktosilasyon aktivitesinin bundan nasıl etkileneceği araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla farklı başlangıç besleme miktarlarında düz tabakalı membran ile ve membran alanı daha geniş olan kapiler tip membranlı reaktör-2 sistemi ile ayrıca GOS sentezi çalışılmıştır. Yüksek laktoz konsantrasyonu ve düşük sıcaklık kombinasyonuna sahip GOS sentez süreçlerinde toplam GOS performansı daha iyi düzeyde bulunduğundan, LC=32

°Briks ve T=35 °C deney seti kombinasyonlarında farklı enzim konsantrasyonlarında GOS sentezi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, glukoz inhibisyonunun etkisini incelemek üzere reaktör-1 ve reaktör-2 de reaksiyon ortamına glukoz oksidaz enzimi katılarak GOS sentez çalışmaları da yapılmıştır.

4.3.3.1 Farklı başlangıç besleme miktarları ile yapılan denemeler

Reaktör 2'de yapılan enzimatik GOS sentezinin optimizasyonu çalışmalarında 300 g başlangıç besleme çözeltisi kullanılmıştı. Düz tabakalı membranda (M1) 200 g ve 400 g başlangıç besleme çözeltileri ile enzimatik GOS sentez çalışmaları yürütüldü. Yapılan bu çalışmalarda enzim konsantrasyonunun etkisini de incelemek üzere en düşük nokta (6 U/g LS) ve en yüksek nokta (14 U/g LS) seçildi. Suyun reaksiyon ortamından uzaklaştırma hızını, başlangıç besleme miktarının ve enzim konsantrasyonunun ihmal edilebilir seviyede etkilediği görüldü (Şekil 4.31b). Suyun uzaklaştırma hızı ortalama 3,5g/10dk seviyelerinden başlayıp reaksiyon ortamı deriştikçe azalan hızda devam etmiştir. Reaksiyon ortamının briks artış hızı başlangıç besleme miktarına göre değişmektedir (Şekil 4.31c). 200 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalar 330 dakika sürdürülebildiği için briks-süre grafikleri 330 dakika üzerinden gösterilmiştir. 300 g ve 400 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda ise GOS sentezi 600 dakikayı aşan sürelerde gerçekleştirilebilmiştir. Suyun uzaklaştırma hızı tüm çalışmalar için benzerdir (Şekil 4.31b). 330 dakika boyunca 200 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda reaksiyon ortamı briks değeri 32'den 52'ye, 300 g ile yapılan çalışmalarda 32'den 45'e, 400 g ile yapılan çalışmalarda ise 32'den 42'ye yükselmiştir (Şekil 4.31c). Böylece farklı reaksiyon ortamı briks artış hızlarında GOS sentezi çalışmaları elde edilerek suyun reaksiyon ortamından uzaklaştırma hızı-transgalaktosilasyon aktivitesi ilişkisi incelenmiştir. Elde edilen GOS sentez sonuçlarına bakıldığında 14 U/g LS ile yapılan çalışmalarda 6 U/g LS ile yapılan çalışmalara göre transgalaktosilasyon aktivitesinin daha hızlı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.31a).



Şekil 4.31 : a) 200 g, 300 g ve 400 g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, 6U=EC:6 U/g LS, 14U=EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları LC:32 °Briks, T:35 °C).

Başlangıç besleme miktarı azaldıkça reaktör-2'de sürdürülebilir reaksiyon süresi de azalmaktadır. 200 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda bulunan maksimum toplam GOS 330 dakika sonunda düşük enzim konsantrasyonu ile %25,52, yüksek enzim konsantrasyonu ile ise %27,74'tür. 300 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda ise en yüksek GOS verimi 630 dakika sonunda düşük enzim konsantrasyonu ile %28,63, yüksek enzim konsantrasyonu ile ise 330 dakika sonunda %27,51'dir. 400 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda bulunan en

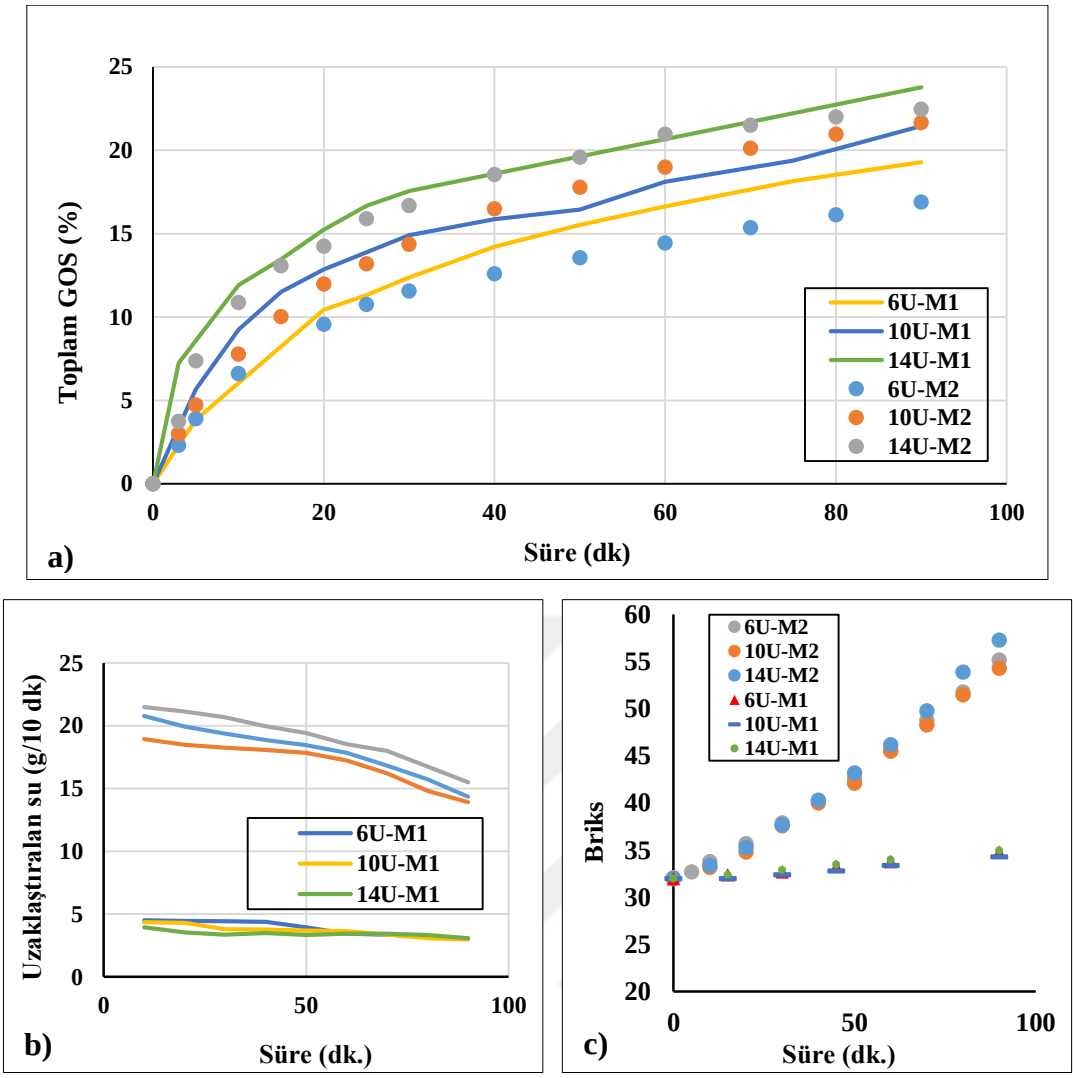
yüksek GOS verimi 540 dakika sonunda düşük enzim konsantrasyonu ile %27,47, yüksek enzim konsantrasyonu ile ise 240 dakika sonunda %27,03'tür.

Farklı başlangıç besleme miktarları ile yapılan çalışmalarda yüksek enzim ve düşük enzim konsantrasyonu içeren deney setlerinde elde edilen maksimum toplam GOS değerleri birbirine oldukça yakındır. Enzim farklı reaksiyon ortamı briks artış hızlarında beklenen etkiyi gösterememiştir. Transgalaktosilasyon aktivitesi ile suyun uzaklaştırma hızı arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Reaktör-2 ile yapılan çalışmalarda enzim reaksiyon ortamı briks değeri artışına hareketle reaktör-1'e kıyasla daha çok GOS sentezi sağlayacak yönde çalışarak transgalaktosilasyon aktivitesini artırmış, yani toplam GOS veriminde artış sağlanmıştır. Fakat, artan veya azalan su uzaklaştırma hızlarında 300g başlangıç besleme çözeltisi ile elde edilen sonuçlara kıyasla toplam GOS değerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

4.3.3.2 Kapiler membran modül içeren sistem ile yapılan denemeler

Reaktör-2'de kullanılan düz tabakalı membranın (M1) alanı 0,0042 m^2 olması suyun besleme çözeltisinden tuz çözeltisine geçiş hızını kısıtlamıştır. Bu nedenle, membran alanı daha geniş (A=0,1 m^2) olan kapiler membran (M2) ile çalışmalar yapılmıştır. Böylece, reaktör-2'de elde edilen GOS sentez verimi artışının daha üst seviyelere çıkıp çıkmayacağı test edilmiştir. Reaksiyon ortamından uzaklaştırılan suyun hızı ve sentezlenen GOS miktarı ilişkisini araştırmak için öncelikle 300 g başlangıç laktoz çözeltisi ile GOS sentez çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.32).

Kapiler membran içeren reaktör-2 sisteminde membran alanı yaklaşık olarak 24 kat artmıştır. Reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su miktarı M1'de yaklaşık 5g/10dk iken M2'de yaklaşık 20g/10dk değerine yükselmiştir (Şekil 4.32b). Reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su miktarı 4 katına çıktığı için GOS sentez süreci M2 içeren reaktör-2 sisteminde 90 dakika sürdürülebilmiştir. 3 farklı enzim konsantrasyonunda çalışılan GOS sentez süreçlerinde 90 dakika sonunda elde edilen besleme çözeltisi briks değerleri 54,3-57,2 arasında bulunmuştur (Şekil 4.32c). Bu değerler M1 içeren reaktör-2 sisteminde ise 34,3-35,0 arasındadır. Bu nedenle reaksiyon ortamı çok hızlı bir şekilde konsantre edilmiştir.



Şekil 4.32 : a) 300 g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, M2=Kapiler membran, 6U= EC:6U/g LS, 10U= EC:10 U/g LS, 14U= EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, T:35 °C).

Elde edilen GOS sentez sonuçlarına bakıldığında (Şekil 4.32c) reaksiyon ortamı hızlı bir şekilde konsantre hale gelmesine karşın toplam GOS bu durumdan olumlu bir şekilde etkilenmemiştir. M2 içeren reaktör-2 sisteminde 90 dakika süren sentez sürecinde GOS verimi sonuçları M1 içeren reaktör-2 sistemine göre düşük kalmıştır (Çizelge 4.22). Ayrıca, M1 içeren reaktör-2 sisteminin 600 dakika boyunca elde edilen GOS sentez sonuçlarına bakıldığında enzimin transgalaktosilasyon aktivitesine devam ettiği görülmektedir. Bu nedenle, 90 dakikalık bir GOS sentez sürecinin istenilen seviyede GOS sentez verimini elde etmek için yetersiz kaldığı söylenenebilir.

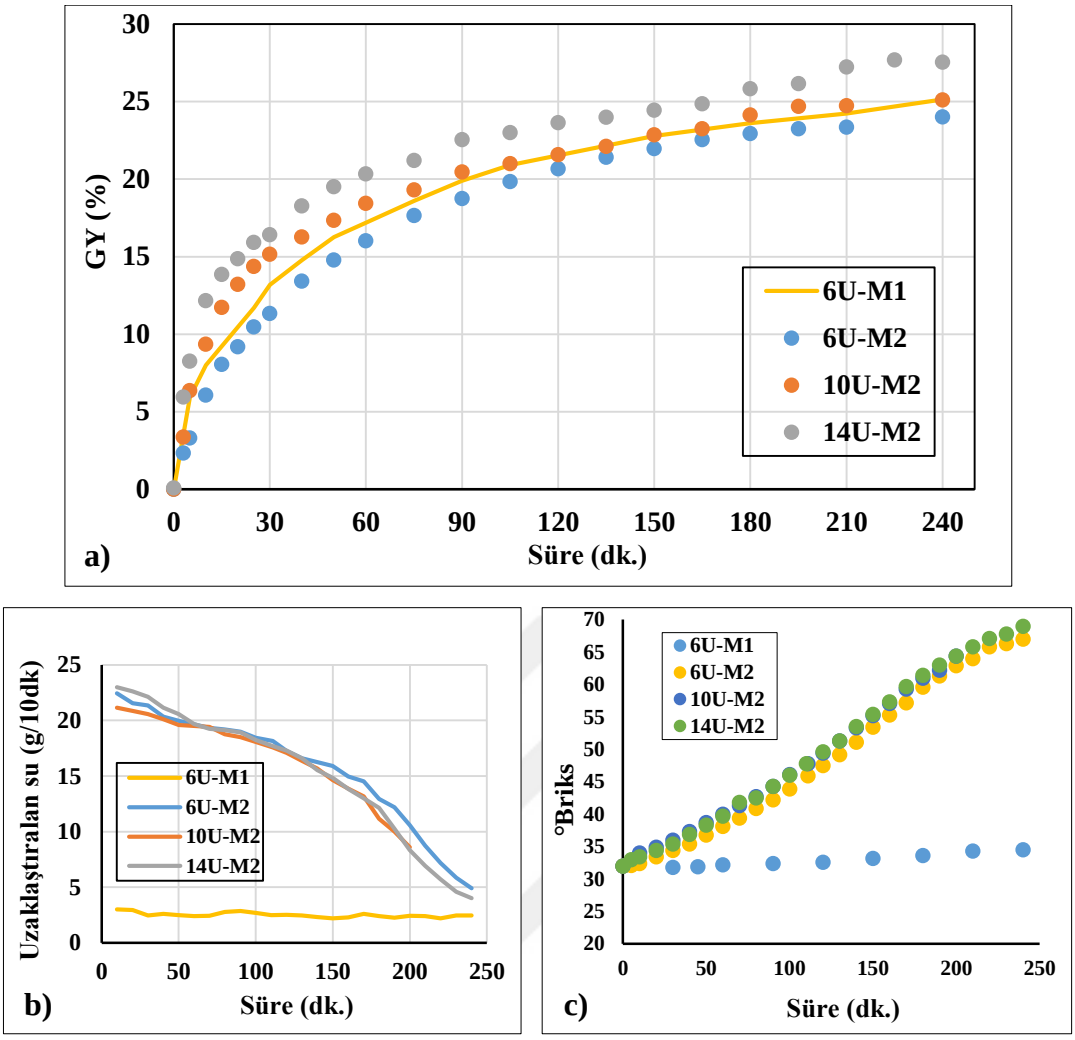
Çizelge 4.22 : 90 dakika sentez süresi sonunda elde edilen toplam GOS.

	6U	**10U**	**14U**
M1	19,28±0,2	21,45±0,1	23,77±0,2
M2	17,51±0,1	21,65±0,1	22,46±0,1

M1=Düz tabakalı membran, M2=Kapiler membran.

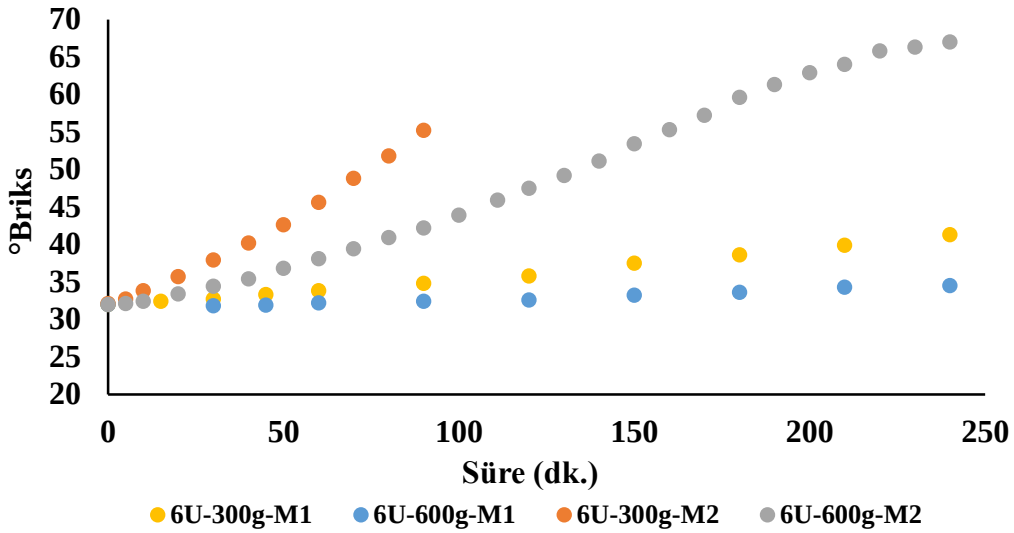
Reaksiyon ortamı briksinin çok hızlı yükselmesinin enzimin çalışma hızıyla uyumsuz olduğu düşünülmüştür. Reaksiyon ortamında galaktosil alıcılarının konsantrasyonunun artmasına karşın çok hızlı bir şekilde enzimi inhibisyon eden monosakkaritlerin de konsantrasyonu artmıştır. Bu nedenle 300 g başlangıç besleme miktarının kullanıldığı M2 içeren reaktör-2 sisteminde yapılan GOS sentez çalışmarında reaksiyon ortamı briks artışı ile enzimin transgalaktosilasyon performansı arasında olumsuz bir uyum gözlenmiştir. Sonraki çalışmalarda başlangıç besleme miktarı 600 g olarak ayarlanmış ve böylece reaksiyon ortamının briks değerinin daha yavaş bir şekilde artması sağlanmıştır.

Reaksiyon ortamından uzaklaştırılan su miktarı M1'de yaklaşık 2,5g/10dk iken M2'de 240 dakika boyunca yaklaşık 23g/10dk başlangıç değerinden 5g/10dk değerine azalarak ilerlemiştir (Şekil 4.33b). M2 içeren sistemde suyun uzaklaştırma hızı yüksek olduğundan GOS sentez süreci 240 dakika sürdürülebilmiştir. M2 içeren reaktör-2 sisteminde 3 farklı enzim konsantrasyonunda çalışılmış, M1 içeren reaktör-2 sisteminde ise sadece 6 U/g LS içeren deney seti yürütülmüştür. GOS sentez süreçlerinde 240 dakika sonunda elde edilen besleme çözeltisi briks değerleri 42,3-44,2 arasında bulunmuştur (Şekil 4.33c). M1 içeren reaktör-2 sisteminde ise besleme çözeltisi °Briks değeri 32,4 bulunmuştur. Beklenildiği üzere reaksiyon ortamı 300g başlangıç besleme miktarı içeren deney süreçlerine göre daha düşük hızda konsantre edilmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.33 : 600 g başlangıç laktoz miktarı ile yapılan GOS sentezi çalışmaları, b) Besleme çözeltisinden uzaklaştırılan su miktarı, c) Besleme çözeltisinin briks artışı (M1=Düz tabakalı membran, M2=Kapiler membran, 6U= EC:6 U/g LS, 10U=EC:10 U/g LS, 14U=EC:14 U/g LS) (Reaksiyon koşulları; LC:32 °Briks, T:35 °C).

M1 ve M2 içeren reaktör-2 sistemleri arasında reaksiyon ortamı briks artış hızları arasında ise önemli derecede fark mevcuttur (Şekil 4.33). Fakat, elde edilen GOS sentez verimi sonuçlarına bakıldığında istenilen düzeyde bir artış sağlanamamıştır. Farklı enzim konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlara göre en yüksek GOS sentez verimi 240. dakikada %27,56 bulunmuştur (Şekil 4.33a). Aynı enzim düzeyi M1 içeren reaktör-2 sisteminde çalışılmadığı için direkt olarak kıyas yapılamamıştır. Fakat 300 g besleme ve M1 içeren reaktör-2 sisteminde 630. dakikada %28,63 değeri elde edildiği için 600 g besleme ve M2 içeren reaktör-2 sisteminin istenilen düzeyde GOS sentez verimi sağlayamayacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.34 : Farklı başlangıç besleme miktarlarında M1 ve M2 içeren reaktör-2 sisteminde reaksiyon ortamı briks artışı (LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS).

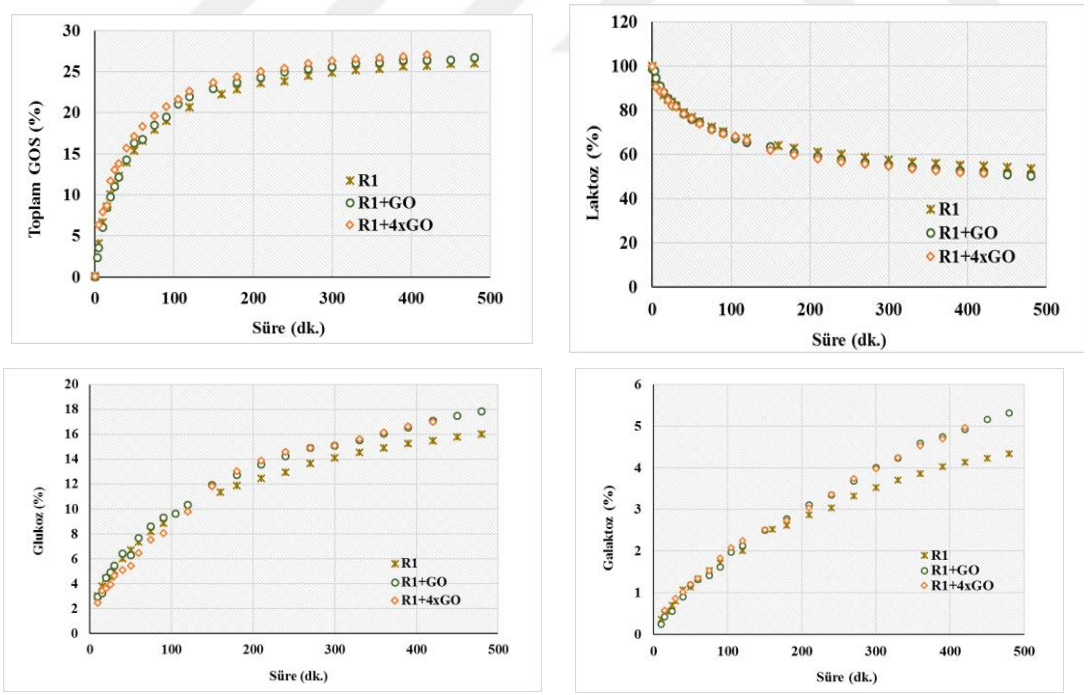
Bu başlangıç besleme miktarında (600 g) da reaksiyon ortamı briks artış hızı ile enzimin çalışma hızının uyumsuz olduğu sonucuna varılmıştır. 600 g başlangıç besleme miktarı ile yapılan çalışmalarda, 300 g başlangıç besleme miktarıyla elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Enzimin reaktör-2'de transgalaktosilasyon aktivitesi için zamana ihtiyaç duyduğu bu nedenle reaksiyon ortam briks hızının yavaş bir şekilde artmasının daha iyi sonuçlar sağladığı görülmüştür. Çünkü reaksiyon ortamında enzimi inhibisyon eden etkenlerin konsantrasyonunun hızlı bir şekilde yükselmesi transgalaktosilasyon aktivitesini sınırlamıştır.

4.3.3.3 Glukoz oksidaz enzimi ilave edilerek yapılan denemeler

A.oryzae enziminin transgalaktosilasyon reaksiyonu yanında hidroliz reaksiyonunu da katalizlemesi, reaksiyon ortamında glukoz ve galaktoz konsantrasyonlarının zamanla artmasına neden olmuştur. Bu nedenle, galaktozun transgalaktosilasyon reaksiyonunda kullanıldığı dikkate alındığında, özellikle glukoz konsantrasyonunun kontrol altında tutulması, glukoz oksidaz enzimi ile mümkün olacağı düşünülmüştür. Bu yolla oluşan glukoz molekülleri glukonik asite okside edilebilecektir. Glukoz inhibisyonunun etkisini incelemek üzere reaktör-1 ve reaktör-2'de reaksiyon ortamına glukoz oksidaz enzimi katılarak GOS sentez çalışmaları yapılmıştır. Önceki GOS sentez çalışmalarında reaktör-1 ve reaktör-2'de elde edilen sonuçların istatistiksel olarak incelenmesi sonucunda yüksek laktoz konsantrasyonu ve düşük sıcaklık kombinasyonuna sahip GOS sentez süreçlerinde toplam GOS performansı daha iyi

düzeyde bulunmuştur. Bu nedenle, glukoz oksidaz enziminin GOS sentezine etkisini gözlemlemek amacıyla LC:32 °Briks, T:35 °C ve EC:6 U/g LS deney seti kombinasyonları için GOS sentez çalışmaları yapılmıştır.

Reaktör-1'de glukoz oksidaz katılmadan ve glukoz oksidaz katılarak yapılan çalışmalarda 420 dakika reaksiyon süresi sonucunda elde edilen toplam GOS sentezi sırasıyla %25,72, %26,39 ve %27,10 bulunmuştur. Glukoz oksidaz katılmadan yapılan çalışmaya göre diğer çalışmalarda toplam GOS değerinde artış olmuştur. Nitekim GOS sentez artışına paralel olarak laktozun diğer şekerlere dönüşümünde de bir miktar artış gözlenmiştir (Şekil 4.35). Vera ve diğ. (2011) reaksiyon ortamına başlangıçta eklenen glukoz ve galaktozun enzimin hidroliz ve transgalaktosilasyon aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre enzimin laktozdan daha fazla galaktoza affinite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Glukozun 200 mmol/kg konsantrasyonuna kadar transgalaktosilasyon aktivitesine olumlu yönde etki ettiğini fakat bu değerden yüksek konsantrasyonlarda ise inhibitör olarak rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, glukozun enzime olan etkisinin kompleks ve tartışmalı olduğunu ve olumsuz yönlerini belirten çalışmalaların var olduğunu bildirmişlerdir.

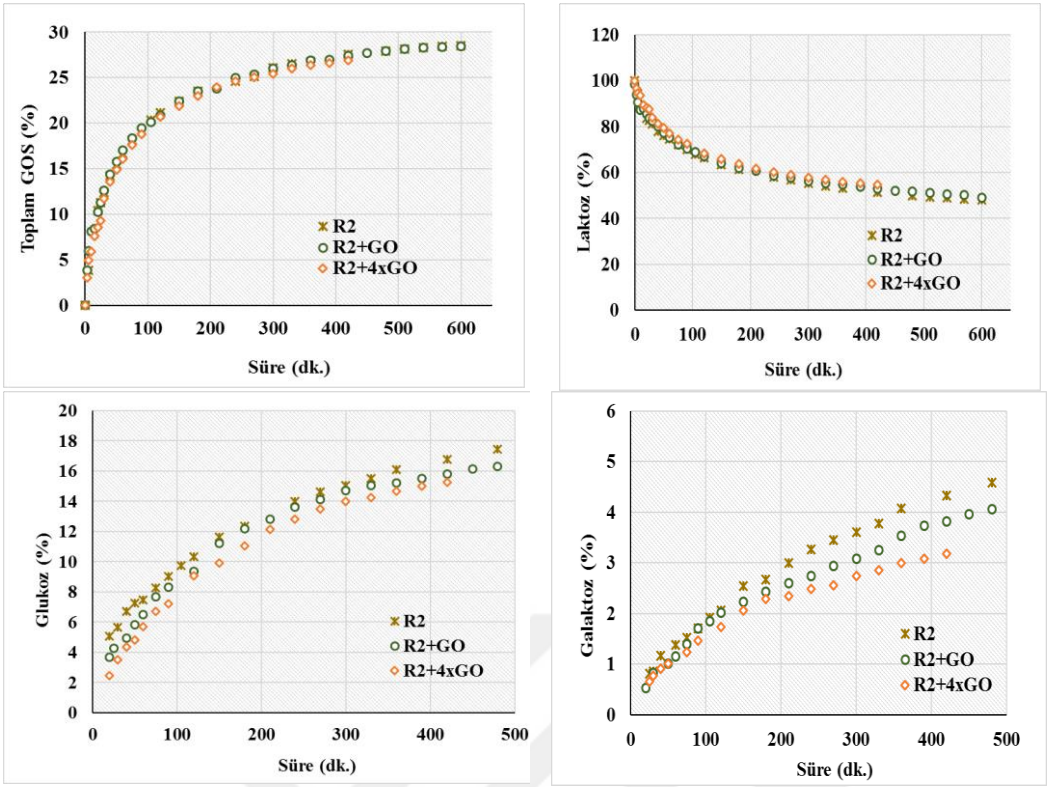


Şekil 4.35 : Reaktör-1'de toplam GOS ve laktoz dönüşümünün reaksiyon süresine bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları: LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, R1:Reaktör-1, GO: Glukoz oksidaz).

Reaktör-2'de glukoz oksidaz katılmadan ve glukoz oksidaz katılarak yapılan çalışmalarda 420 dakika reaksiyon süresi sonucunda elde edilen toplam GOS sentezi sırasıyla %27,55, %27,44 ve %26,89 bulunmuştur. Glukoz oksidaz katılmadan yapılan çalışmaya göre diğer çalışmalarda toplam GOS'de eser miktarda bir azalış olmuştur (Şekil 4.35).

Reaktör-2'de monasakkarit konsantrasyonu hızlı bir şekilde arttığı için eklenen glukoz oksidaz miktarı yetersiz kalmış olabileceği düşünülmüş ve ortama bir önceki çalışmalara kıyasla 4 kat daha fazla konsantrasyonda glukoz oksidaz eklenmiştir. Nitekim benzer bir yaklaşım Fisher ve Kleinschimidt (2019) tarafından uygulanmış reaksiyon ortamına salınan glukozun yüksek oranda tüketimi için reaksiyon ortamına β-galaktosidaz enzim konsantrasyonundan 8 kat daha fazla glukoz oksidaz katarak GOS sentezi gerçekleştirmişlerdir. Sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktörde reaksiyon ortamına GOS sentez performasında olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Bu çalışmada reaksiyon ortamına katılan glukoz oksidaz ile glukoz inhibisyonun sınırlandırılmasının *A.oryzae* kaynaklı galaktosidaz enzimi üzerinde etkisinin düşük olduğunu göstermektedir. Vera ve diğ. (2011) glukoz etkisinin büyük ölçüde enzim kökenine bağlı olduğunu, *A. oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz için glukoz inhibisyonunun önemsiz derecede bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Reaktör-2'de reaksiyon ortamı konsantrasyonunun zamana bağlı olarak artması sonucu monosakkaritlerin inhibisyon etkisi de artmaktadır. Bu nedenle reaktör-2'de glukoz oksidaz katılarak yapılan çalışmalarda toplam GOS ve laktoz dönüşüm değerleri glukoz oksidaz katılmadan yapılan çalışmalara kıyasla düşük miktarda azalmıştır. Reaktör-1'de reaksiyon ortamı derişmediği için monosakkaritlerin konsantrasyonu daha yavaş artmaktadır. Bu nedenle glukoz oksidazın bu reaktörde GOS sentez performansı açısından az da olsa olumlu bir etki gösterdiği düşünülmüştür. Bu nedenle reaktör-1'e yüksek miktarda glukoz oksidaz ilavesi GOS birim maliyetini de önemli miktarda arttıracağı için uygulanabilir bulunmamıştır.



Şekil 4.36 : Reaktör 2'de toplam GOS ve laktoz dönüşümünün reaksiyon süresine bağlı değişimi (Reaksiyon koşulları: LC:32 °Briks, T:35 °C, EC:6 U/g LS, R2:Reaktör-2, GO: Glukoz oksidaz).

4.4 Kinetik Parametrelerin Tahminlenmesi

Laktoz hidrolizi ve GOS sentezi için literatürde tanımlanmış transgalaktosilasyon mekanizmaları kullanılarak deneysel veriler matematiksel bir modele uyarlanmıştır. Transgalaktosilasyon ile hidroliz reaksiyonlarının aktivite oranı GOS sentezi çalışmalarında kullanılan enzim kaynağına göre değişiklik göstermektedir. *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidazlar güçlü bir transgalaktosilasyon aktivitesi göstermektedir. Reaksiyon hız sabitlerinin tahmini ile reaksiyon sürecinde herhangi bir andaki GOS miktarının öngörülebilmesini sağlar ve reaksiyon koşullarının değiştirilmesinin GOS sentezine nasıl etki göstereceği daha detaylı bir biçimde inceleme olanağı sağlar.

Bu çalışmada ilk olarak reaktör-1'de elde edilmiş verilerin GOS sentezine uyarlanabilmesi amacıyla, literatürde GOS sentezinin modellenmesi üzerine tanımlanmış modeller ve bu modellerin modifiye edilmesi sonucu elde edilmiş modeller deneysel veri setlerine uygulanmıştır. Toplam 8 adet modelin, GOS sentezi için belirlenen parametrelerin orta seviyeleri alınarak 6 tekrarlı deneysel veri setinde

(T:45 °C, LC:18,25 °Briks ve EC:10 U/g LS) uygunluğu test edilmiştir. Analizler ve zaman akış simülasyonları deterministik bir LSODA çözücüsü uygulayan COPASI 4.22 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Hoops ve diğ., 2006; Petzold, 1983). Çalışmada kullanılan 8 adet modelin (a-h) reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmiştir.

a) İndirgenmiş model (Manucci, 2000):

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \overset{k_1}{\rightarrow} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{GOS}$

b) İndirgenmiş model + galaktoz inhibisyonu (Manucci, 2000):

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \overset{k_1}{\rightarrow} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{GOS}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E} + \mathrm{Gal} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

c) İndirgenmiş model + glukoz inhibisyonu (Manucci, 2000):

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \overset{k_1}{\rightarrow} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{GOS}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E} + \mathrm{Glu} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

d) İndirgenmiş model + (galaktoz + glukoz) inhibisyonu (Manucci, 2000):

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \xrightarrow{k_1} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{GOS}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E} + \mathrm{Gal} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

Reaksiyon 5: $\mathrm{E} + \mathrm{Glu} \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

e) Kim ve diğ. (2004) modeli:

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Lak}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Lak} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Allo}$

Reaksiyon 5: $\mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{GOS}$

f) Kim ve diğ. (2004) modeli + glukoz inhibisyonu:

Reaksiyon 1: $\mathrm{E} + \mathrm{Lak} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Lak}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E{:}\,Lak} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E{:}\,Gal} + \mathrm{Glu}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E{:}\,Gal} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E} + \mathrm{Gal}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E:Gal + Glu} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + Allo}$

Reaksiyon 5: $\mathrm{E:Gal + Lak} \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + GOS}$

Reaksiyon 6: $\mathrm{E + Glu} \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\leftrightarrow}} \mathrm{E:Inhb}$

g) Kim ve diğ. (2004) modeli + galaktoz inhibisyonu:

Reaksiyon 1: $\mathrm{E + Lak} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \mathrm{E:Lak}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E:Lak} \overset{k_2}{\rightarrow} \mathrm{E:Gal + Glu}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E:Gal} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + Gal}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E:Gal + Glu} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + Allo}$

Reaksiyon 5: $\mathrm{E:Gal + Lak} \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + GOS}$

Reaksiyon 6: $\mathrm{E + Gal} \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\leftrightarrow}} \mathrm{E:Inhb}$

h) Kim ve diğ. (2004) modeli + (galaktoz + glukoz) inhibisyonu:

Reaksiyon 1: $\mathrm{E + Lak} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \mathrm{E:Lak}$

Reaksiyon 2: $\mathrm{E:Lak} \overset{k_2}{\rightarrow} \mathrm{E:Gal + Glu}$

Reaksiyon 3: $\mathrm{E:Gal} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + Gal}$

Reaksiyon 4: $\mathrm{E:Gal + Glu} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + Allo}$

Reaksiyon 5: $\mathrm{E{:}\,Gal + Lak} \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} \mathrm{E + GOS}$

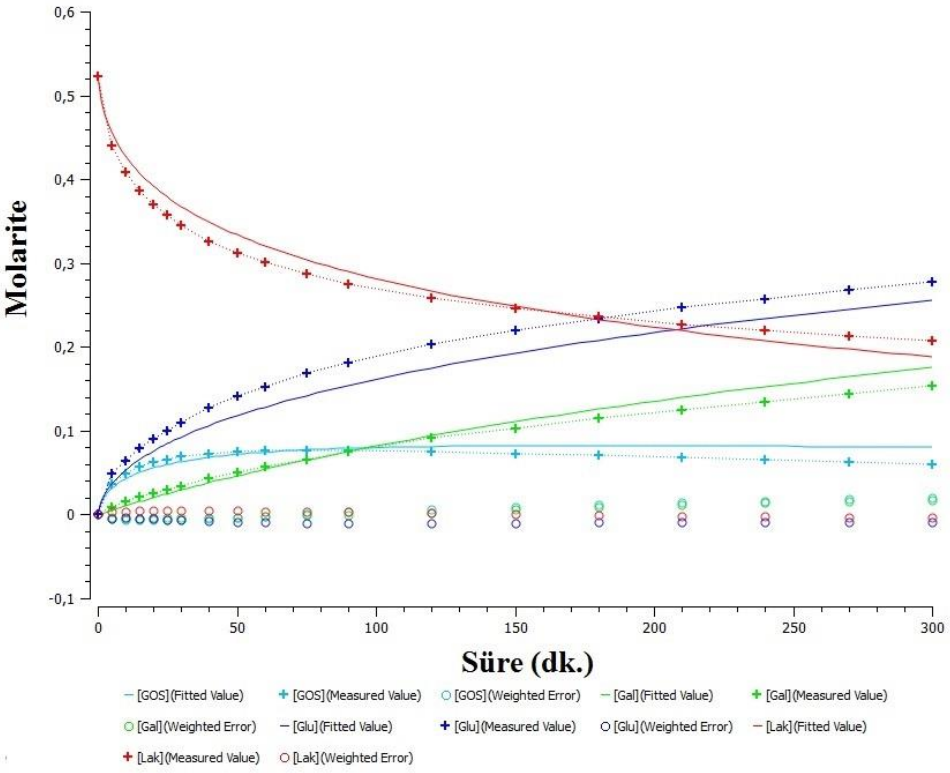
Reaksiyon 6: $\mathrm{E + Glu} \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

Reaksiyon 7: $\mathrm{E + Gal} \underset{k_{-7}}{\overset{k_7}{\leftrightarrow}} \mathrm{E{:}\,Inhb}$

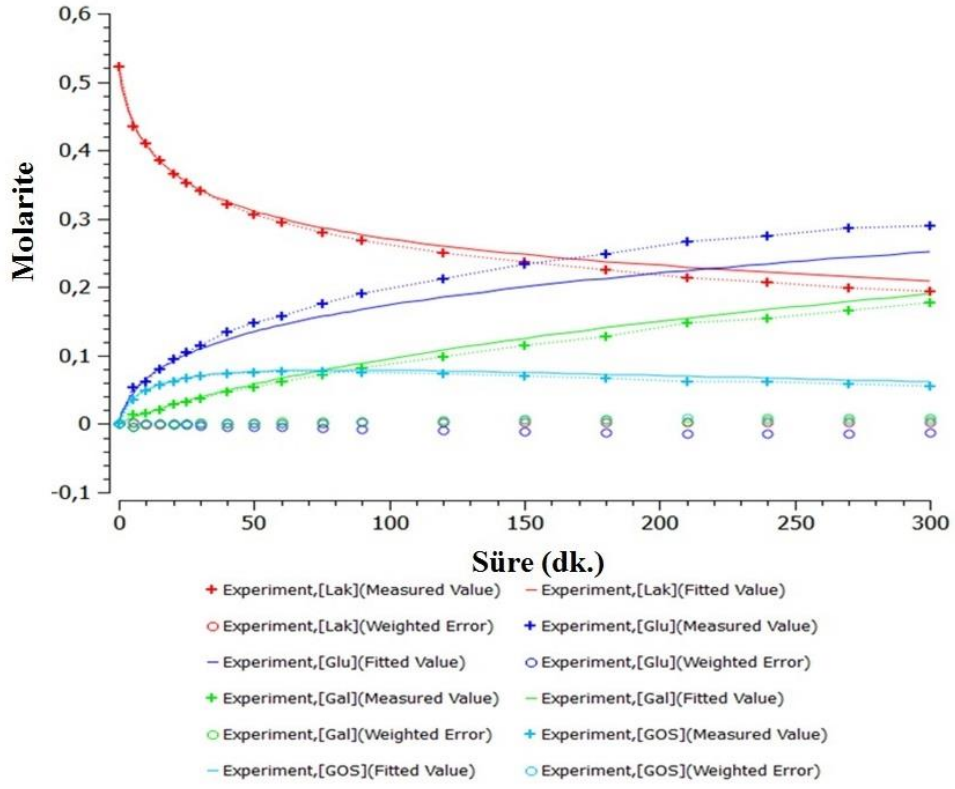
Bu model denklemlerde E=enzim, Glu=glukoz, Gal=galaktoz, Lak=laktoz, GOS=galaktooligosakkarit, E:Lak=enzim-laktoz kompleksi, E:Gal=enzim-galaktoz kompleksi, Allo= allolaktoz, E:Inhb= enzim-inhibitör kompleksini ifade etmektedir. Deneysel verilerin bir modele uyarlanması ve reaksiyon hız sabitlerinin tahmin edilebilmesi için, biyokimyasal sistemlerin modellenmesine olanak sağlayan COPASI yazılım paketi (Hoops ve diğ., 2006) kullanılmıştır ve çözümleme sırasıyla "random research" ve "particle swarm" algoritmaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önerilen modellere ait kinetik parametreler deneysel veri setleri kullanılarak lineer olmayan regresyon tekniği yardımıyla belirlenmiştir. Kinetik hız sabitlerini tahminlemek için kullanılan amaç fonksiyonuna ait ağırlıklı kareler toplamı eşitliği (4.11) aşağıda verilmiştir.

$$f(k) = \sum_{i,j} \frac{[\tilde{y}_{i,j} - y_{i,j}(k)]^2}{<\tilde{y}_i{}^2>} \qquad (4.11)$$

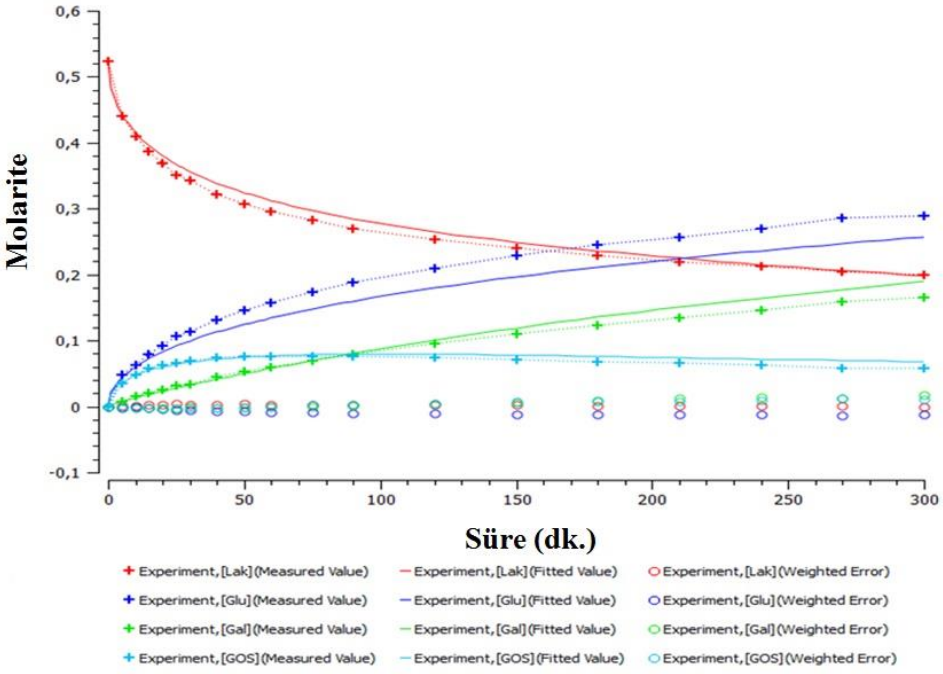
Bu eşitlikte "f(k)" hız sabitlerinin amaç fonksiyonunu, "$\tilde{y}$" deneysel veriyi, "y" ise temsili veriyi ifade etmektedir. Reaksiyon unsurlarını "i" alt simgesi, deneysel verileri ise "j" alt simgesi temsil etmektedir. Reaksiyon unsurlarının (glukoz, galaktoz, GOS) ve ara unsurların (E:Lak, E:Gal, Allo, E:Inhb) başlangıç konsantrasyonları sıfır olarak alınmıştır. 8 adet modelin uygunluğunun 6 tekrarlı deneysel veri setinde test edilmesi sonucu elde edilmiş reaksiyon unsurlarının zamana bağlı değişimini ifade eden grafikler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.37-Şekil 4.44). Grafikler yazılımdan direkt olarak alınmış olup; x-ekseni dakika cinsinden süreyi, y-ekseni ise molariteyi ifade etmektedir.



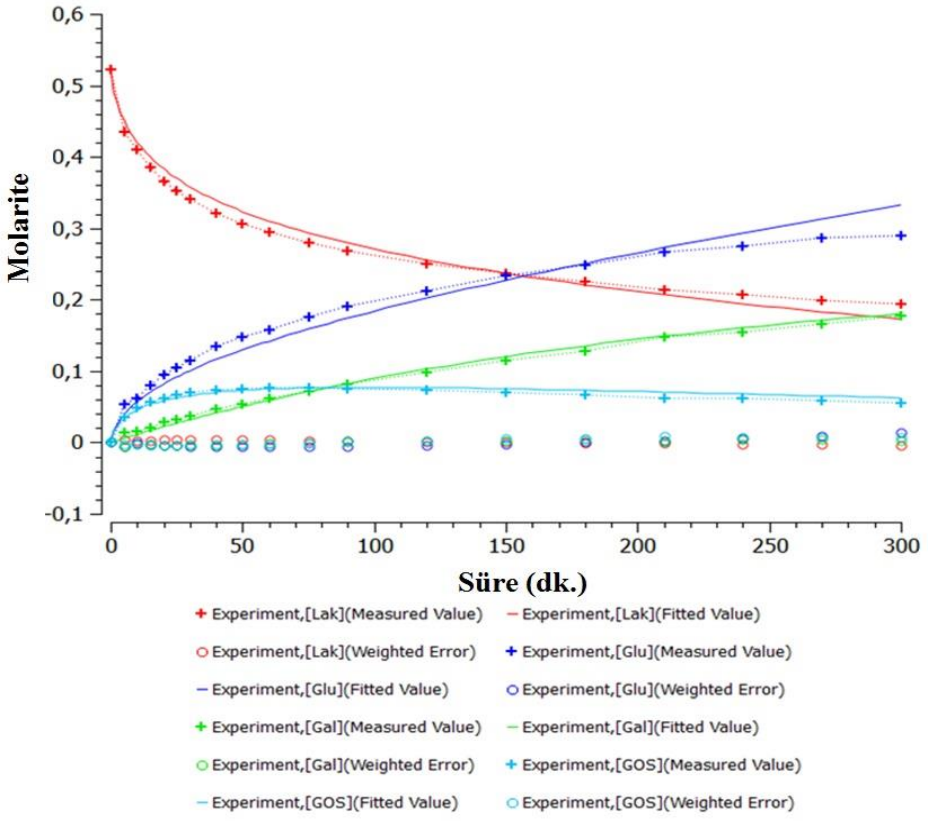
Şekil 4.37 : Model-(a) grafiği.



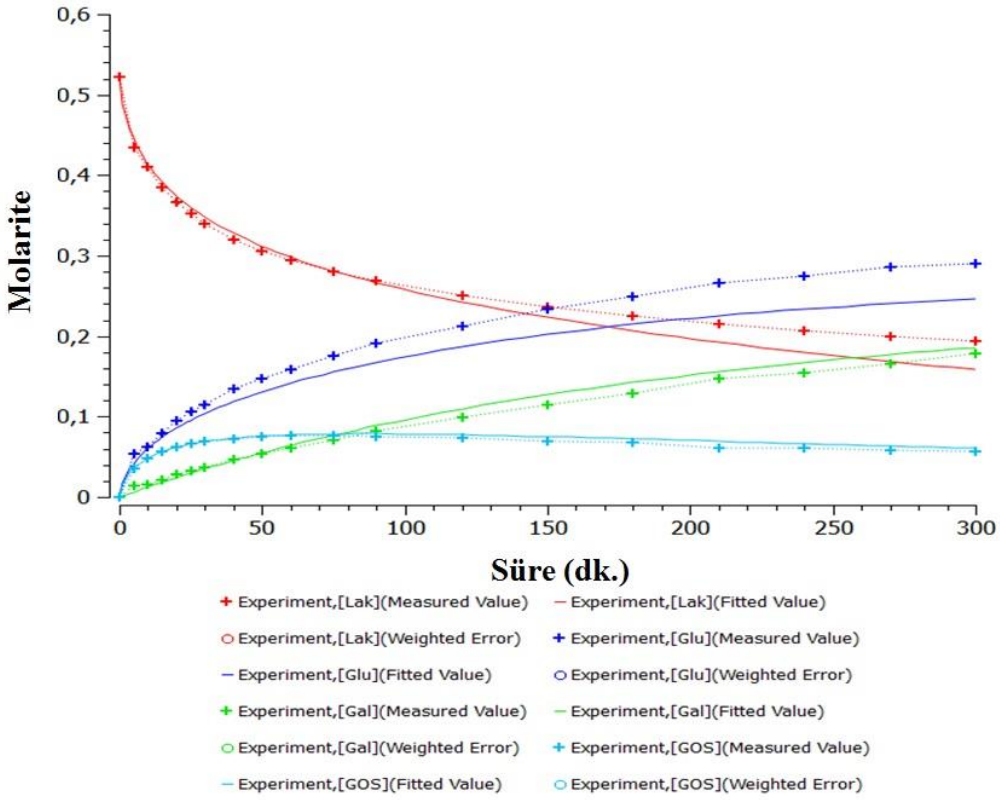
Şekil 4.38 : Model-(b) grafiği.



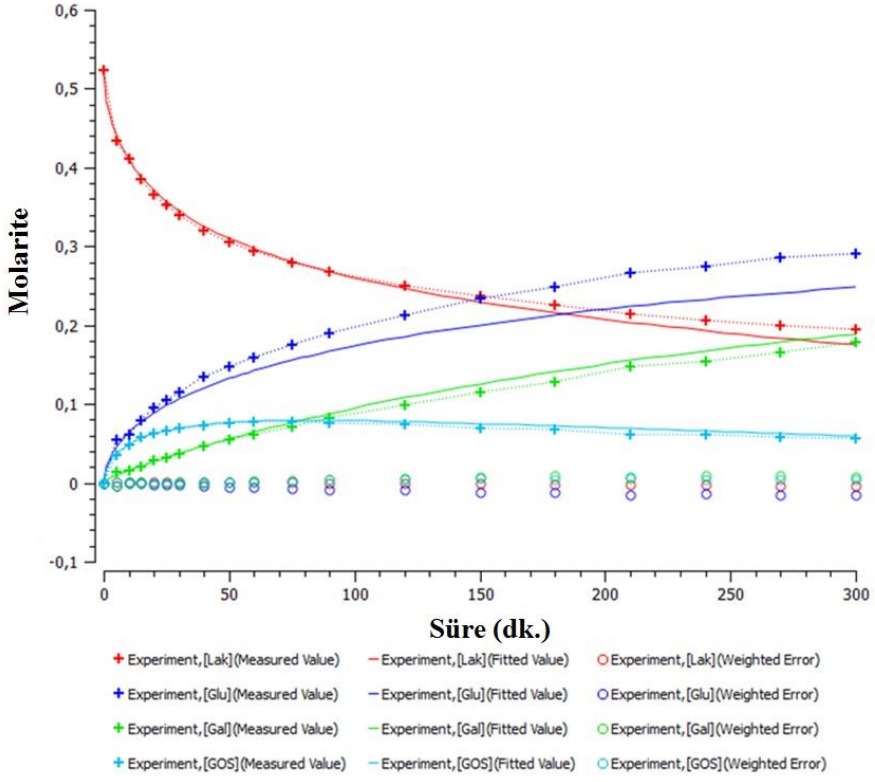
Şekil 4.39 : Model-(c) grafiği.



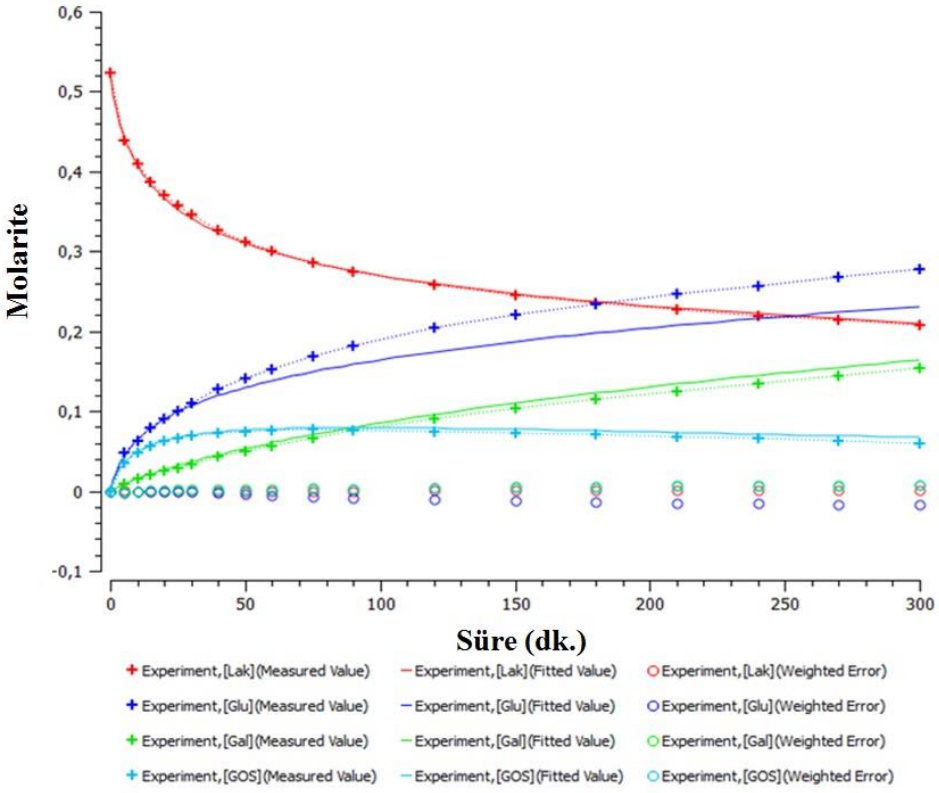
Şekil 4.40 : Model-(d) grafiği.



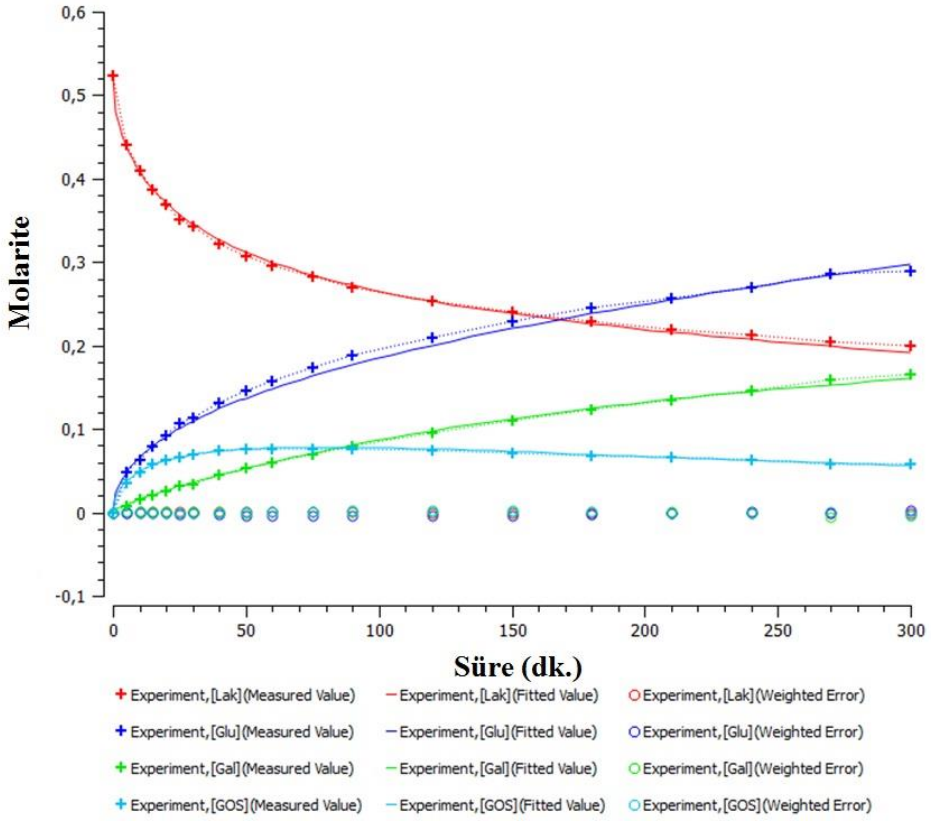
Şekil 4.41 : Model-(e) grafiği.



Şekil 4.42 : Model-(f) grafiği.



Şekil 4.43 : Model-(g) grafiği.



Şekil 4.44 : Model-(h) grafiği.

Reaksiyon unsurlarının zamana bağlı değişimini ifade eden model grafikleri incelendiğinde deneysel verilerin simüle edilmiş verilerle en uyumlu olduğu grafik Şekil 4.44'te yer alan "model h" grafiğidir. Bu nedenle bir sonraki kinetik çalışmalarda bu model kullanılmıştır. Bu model;

- Galaktoz ve glukozun kompetetif inhibisyonunu hesaba katmaktadır.
- GOS'lerin hidrolizini hesaba katmaktadır.
- Glukoz ve galaktoz oluşumunu birbirinden ayrı olarak ele almaktadır.
- Dört zincirli, beş zincirli ya da daha fazla bağ içeren oligosakkaritlerinin hepsini GOS olarak temsil etmektedir.
- Enzim-laktoz kompleksinin enzim-galaktoz kompleksine ayrışımını tersinmez olarak ele almaktadır.
- Difüzyonal sınırlamayı ihmal etmektedir.
- Laktoz konsantrasyonuna bağlı olarak olarak substrat ya da glikozil alıcısı olabilmektedir.
- Glukoz, E:Gal kompleksiyle reaksiyon vererek glukoz-galaktoz disakkaritlerini (allolaktoz) oluşturmaktadır.
- Enzimin termal deaktivasyonu ihmal edilmektedir.

Bu yedi basamaklı modelde her bir unsurun zamana bağlı değişimini veren diferansiyel denklemler (4.12-4.20) aşağıda gösterilmiştir. Köşeli parantez içindeki terimler her bir unsurun molar konsantrasyonunu ifade etmektedir.

$$\frac{d[Lak]}{dt} = -k_1[E][Lak] + k_{-1}[E:Lak] - k_5[E:Gal][Lak] + k_{-5}[E][GOS] \quad (4.12)$$

$$\begin{aligned}\frac{d[E]}{dt} = {} & -k_1[E][Lak] + k_{-1}[E:Lak] + k_3[E:Gal] - k_{-3}[E][Gal] \\ & + k_4[E:Gal][Glu] - k_{-4}[E][Allo] + k_5[E:Gal][Lak] \\ & - k_{-5}[E][GOS] - k_6[E][Glu] + k_{-6}[E:Inhb] - k_7[E][Gal] \\ & + k_{-7}[E:Inhb] \end{aligned} \quad (4.13)$$

$$\begin{aligned}\frac{d[E:Gal]}{dt} = {} & k_2[E:Lak] - k_3[E:Gal] + k_{-3}[E][Gal] - k_4[E:Gal][Glu] \\ & + k_{-4}[E][Allo] - k_5[E:Gal][Lak] + k_{-5}[E][GOS] \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$\begin{aligned}\frac{d[Glu]}{dt} = {} & k_2[E:Lak] - k_4[E:Gal][Glu] + k_{-4}[E][Allo] - k_6[E][Glu] \\ & + k_{-6}[E:Inhb] \end{aligned} \quad (4.15)$$

$$\frac{d[Gal]}{dt} = k_3[E:Gal] - k_{-3}[E][Gal] - k_7[E][Gal] + k_{-7}[E:Inhb] \quad (4.16)$$

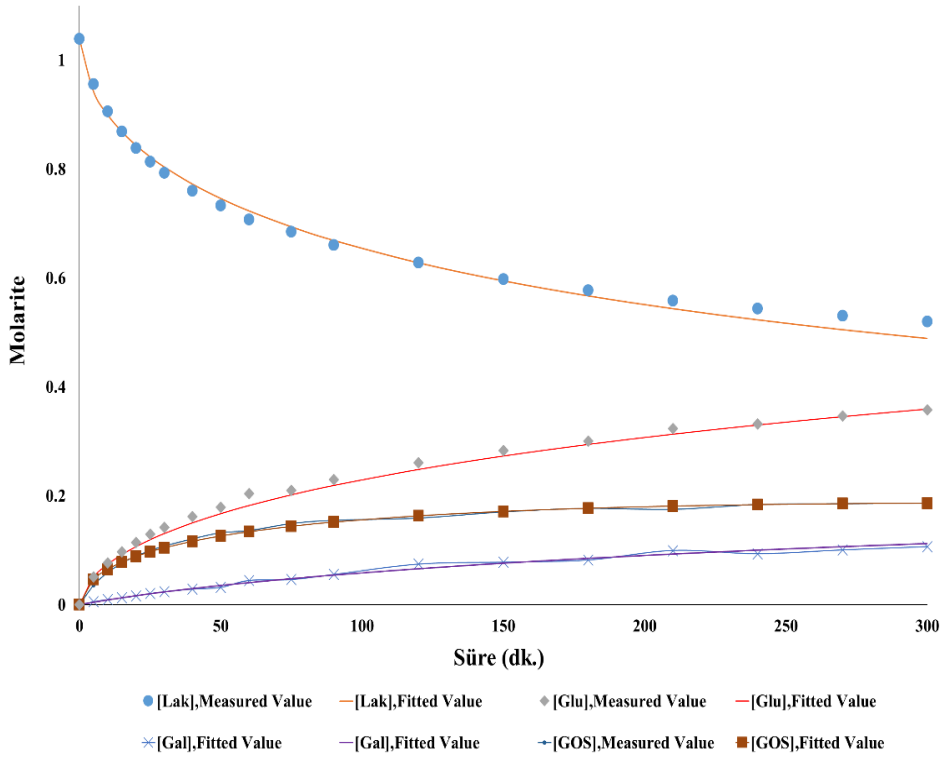
$$\frac{d[GOS]}{dt} = k_5[E:Gal][Lak] - k_{-5}[E][GOS] \quad (4.17)$$

$$\frac{d[Allo]}{dt} = k_4[E:Gal][Glu] - k_{-4}[E][Allo] \quad (4.18)$$

$$\frac{d[E:Lak]}{dt} = k_1[E][Lak] - k_{-1}[E:Lak] - k_2[E:Lak] \quad (4.19)$$

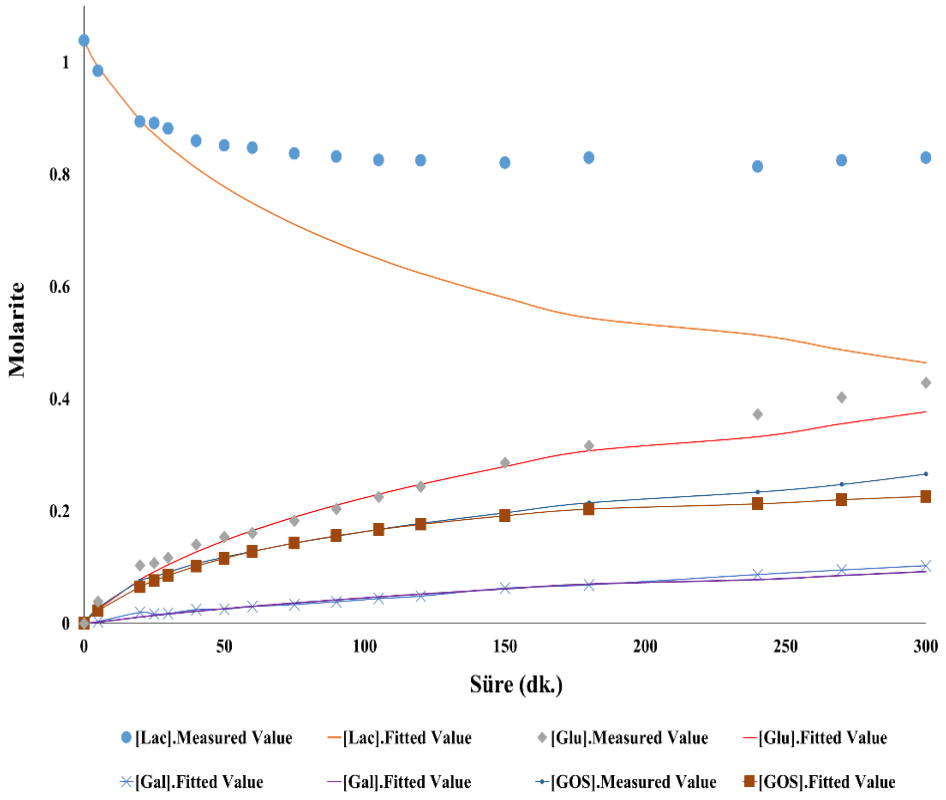
$$\frac{d[E:Inhb]}{dt} = k_6[E][Glu] - k_{-6}[E:Inhb] + k_7[E][Gal] - k_{-7}[E:Inhb] \quad (4.20)$$

GOS sentezi ve laktoz hidrolizini tanımlayan reaksiyon modelinde k_1, k_{-3}, k_4, k_{-4}, k_5, k_{-5}, k_6 ve k_7 kinetik parametrelerinin birimi L/mol.s, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-6} ve k_{-7} kinetik parametrelerinin birimi ise 1/s olarak ifade edilmektedir. Reaktör-1 ve reaktör-2 sistemlerinde elde edilen optimum noktalarda yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel veriler reaksiyon modeline göre uyarlanmış (Şekil 4.45-4.46) ve kinetik katsayılar belirlenerek farklı sistem etkileri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.45 : Deneysel veriler ile uyarlanmış verilerin reaktör-1 sistemi için karşılaştırılması (Reaksiyon koşulları; T:35 ºC, LC:32 °Briks, EC:10,917 U/g LS).

Deneysel verilerle en iyi uyum gösteren reaksiyon model grafiği tüm sistemler için yüksek substrat konsantrasyonlarda uyumdan sapmalar göstermiş ve sapma derecesi reaktör-2 için daha fazla olmuştur (Şekil 4.46). Uyarlanmış 13 kinetik sabit içeren yedi basamaklı kinetik model için deneysel veriler reaktör-1 için daha iyi bir uyum göstermiştir (Şekil 4.45). Reaksiyon süresince laktoz konsantrasyonu belirli bir azalmadan sonra süreç boyunca hedeflendiği gibi yüksek bir seviyede sabit kalmıştır. Reaktör-2'de reaksiyon ortamının sürekli olarak konsantrasyonun sağlanması sonucunda deneysel laktoz verileri ile simüle edilmiş veriler kötü bir uyum göstermiştir. Fakat diğer reaksiyon bileşenlerinin model verileri ile iyi bir uyum yakaladığı görülmektedir. Reaktör-1 ve reaktör-2 sistemleri arasında enzim kinetiğinde önemli bir değişim oluştuğu ve membran ayırım sürecinin enzim kinetiğini önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir.



Şekil 4.46 : Deneysel verileri ile uyarlanmış verilerin reaktör-2 sistemi için karşılaştırılması (Reaksiyon koşulları; T:36,67 ºC, LC:32 °Briks, EC:6,0 U/g LS).

Enzimatik sürecin membran ayrımı ile entegrasyonunda kütle aktarımı mekanizmalarının da devreye girmesi sürecin kinetik anlamda yorumunu zorlaştırsa da oluşan kinetik değişimin temel nedeninin reaksiyon ortamının sürekli deriştirilmesi

nedeniyle enzim üzerinde olan monosakkarit inhibisyonunun daha hızlı bir şekilde ortaya çıktığı düşünülmektedir. 300 dakikalık reaksiyon süreçleri için tahmin edilen kinetik katsayılar Çizelge 4.23'de verilmiştir.

Çizelge 4.23 : Farklı sistemler için sistemlerin optimum çalışma koşullarında laktoz hidrolizi ve GOS sentezini tanımlayan modelden tahminlenmiş reaksiyon hız sabitleri (Güven aralığı: %95).

Kinetik parametreler	**Reaktör-1**	**Reaktör-2**
k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	161,4±22,9	14,30±4,00E-02
k_{-1} (s^{-1})	610,8±123,8	1,6±0,6
k_2 (s^{-1})	201,5±35,4	1,13E+07±1,32E+04
k_3 (s^{-1})	447,7±61,5	73,6±6,3
k_{-3} ($M^{-1}s^{-1}$)	6283,8±220,1	849,0±21,2
k_4 ($M^{-1}s^{-1}$)	1645,7±256,8	1,34E-02±6,5E-03
k_{-4} ($M^{-1}s^{-1}$)	1,67E+04±2195,5	1,09E+04±6,15E+03
k_5 ($M^{-1}s^{-1}$)	1685,0±233,4	2852,3±591,0
k_{-5} ($M^{-1}s^{-1}$)	5712,8±187,0	6577,9±115,9
k_6 ($M^{-1}s^{-1}$)	4148,8±118,1	1,12E+05±3,72E+03
k_{-6} (s^{-1})	20,5±0,3	1,67E+04±5,47E+02
k_7 ($M^{-1}s^{-1}$)	1,67E+04±2456,9	19,2±0,5
k_{-7} (s^{-1})	278,6±36,1	2,75E-03±1,50E-02

Çizelge 4.24 : Reaksiyon hız sabit oranları (oluşum/yıkım).

Kinetik hız sabit oranı	**Reaktör-1**	**Reaktör-2**
k_1/k_{-1}	0,26	9,00
k_3/k_{-3}	0,07	0,09
k_4/k_{-4}	0,10	1,23E-06
k_5/k_{-5}	0,29	0,43
k_6/k_{-6}	202,77	6,70
k_7/k_{-7}	59,83	6974,12

Çizelge 4.24 incelendiğinde, k_1/k_{-1} oranındaki artış, GOS oluşumunun öncüsü olan E:Gal kompleksini oluşturmak için enzim ve laktozun daha fazla etkileşimde bulunarak E:Lak kompleksi oluşturduğunu gösterir (Kim ve diğ., 2004). Reaktör-2'de özellikle k_{-1} değeri önemli miktarda azalmıştır (Çizelge 4.23). Bu nedenle reaktör-2'de E:Lak kompleksinin bozunmasının daha yavaş gerçekleştiği söylenebilir. Reaktör-2'de reaksiyon ortam laktoz konsantrasyonunun sürekli yüksek seviyede tutulması k_2 hız sabitinin önemli miktarda artmasını sağlamıştır (Çizelge 4.23). Hız sabiti k_2 değeri E:Gal kompleksi sentezine olanak sağladığı için hem transgalaktosilasyon hem de hidroliz için önem teşkil etmektedir (Jenab ve diğ., 2018). E:Gal kompleksi GOS

oluşturmak için galaktoz ile etkileşime girerek transgalaktosilasyon aktivitesi gerçekleştirir (Palai ve diğ., 2014). Reaksiyon mekanizması gereği E:Gal kompleksi miktarının artması GOS oluşumu için sürükleyeci kuvvettir bu nedenle GOS oluşum potansiyeli artmaktadır. Laktoz hidroliz hızının (k_3) sürekli karıştırmalı tip kesikli reaktöre kıyasla membran destekli reaktörde önemli miktarda azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.23). Fakat reaksiyon tersinir olduğu için k_3/k_{-3} hız sabitleri oranı şeklinde değerlendirildiğinde E:Gal kompleksinin bozunma hızının iki reaktörde de birbirine yakın olduğu sonucuna varılabilir (Çizelge 4.23). Toplam GOS dönüşüm hızını tanımlayan hız sabiti k_5 ise membran destekli süreç kullanımında artmıştır. Ayrıca, k_5/k_{-5} oranının da izah ettiği üzere GOS oluşumu ve GOS ayrışması eş zamanlı reaksiyonunun hızı reaktör-2'de reaktör-1'e göre artmıştır. Reaktör-2'de artan toplam GOS oluşumu, di- ve oligo-sakkaritler gibi olası GOS oluşturan galaktosil alıcılarının reaksiyon ortamındaki artışına bağlanmıştır (Albayrak ve Yang, 2002). Reaksiyon ortamının yüksek konsantrasyonda laktoz ve oligosakkaritlere sahip olması nedeniyle birkaç araştırmacının da belirttiği gibi, GOS sentezi yüksek galaktosil konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Boon ve diğ., 2000; Mahoney, 1998). Nitekim Jenab ve diğ. (2018) *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz kullandığı çalışmasında başlangıç laktoz konsantrasyonu arttıkça k_5/k_{-5} oranının da arttığını ifade etmiştir. Her iki reaktörde gerçekleşen GOS sentez ve hidroliz reaksiyonları kendi ortam koşullarında incelendiğinde k_3/k_{-3} her iki reaktörde de benzer olmasına karşın reaktör-2'de yüksek seviyede E:Lak kompleksi oluşumu (k_1/k_{-1}) ve E:Gal kompleksi oluşumu (k_2) olmasının GOS sentez/GOS bozunması hızını (k_5/k_{-5}) olumlu yönde etkilediği söylenebilir. Bu nedenle, özellikle reaktör-2'nin GOS sentezine en önemli etkisinin enzimin laktoz ile daha fazla etkileşime girmesine neden olarak reaksiyon ortamındaki E:Gal kompleksi konsantrasyonunu yüksek seviyede tutmasıdır. Allolaktoz oluşumu (k_4) ve allolaktoz yıkımı (k_{-4}) değerleri incelendiğinde allolaktoz sentezinin reaktör-1'de daha baskın olduğu görülmektedir. Oransal olarak bakıldığında da (k_4/k_{-4}) reaktör-1'deki değer reaktör-2'ye göre oldukça yüksektir. Bölüm 4.2.4'te ifade edildiği üzere allolaktoz miktarının laktoz piki içine dahil olduğu düşünülmektedir. Allolaktoz da laktoz gibi galaktosil alıcısı olarak görev aldığı için sentez mekanizması açısından bu durum bir sorun teşkil etmemektedir. Urrutia ve diğ. (2013) de disakkaritlerin toplam GOS miktarına katkısının oldukça önemli olduğunu fakat disakkaritlerin genel analitik yöntemler kullanılırken genellikle laktoz tarafından maskelendiği için bu durumun *A. oryzae* β -galaktosidaz için göz ardı edilen bir sonuç

olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda allolaktoz oluşum mekanizmasının bu β-galaktosidaz için esasen moleküller arası bir reaksiyon olduğunu eklemişlerdir. Reaktör-2'de k_4/k_{-4} oranının oldukça düşük olması membran destekli enzimatik sürecin enzimi daha yüksek polimerizasyon derecesine sahip oligosakkarit üretmesine yönlendirdiği söylenebilir. Reaktör-2'de olası sentezlenmiş yüksek polimerizasyona sahip oligosakkaritler çalışmada kullanılan kolon veya HPLC'de kullanılan yöntemden dolayı gözlemlenememiş olabileceği düşünülmektedir. Sırasıyla glukoz ve galaktoz inhibisyonlarını tanımlayan reaksiyon hız sabit oranları k_6/k_{-6} ve k_7/k_{-7} değerleri incelendiğinde, glukoz inhibisyonunun galaktoz inhibisyonuna göre reaktör-1'de daha önemli olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Reaktör-2'de ise galaktoz inhibisyonun glukoz inhibisyonuna göre çok daha önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca kinetik katsayıların tahminlenmesinden elde edilen bu sonuçlar glukoz oksidaz ile yapılan çalışmaları (Bölüm 4.3.3.3) da doğrulamaktadır. Literatürde *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz için galaktoz inhibisyonunun daha etkili olduğu bildirilmiştir (Albayrak ve Yang, 2002; Rodriguez-Fernandez ve diğ., 2011; Vera ve diğ., 2011; Yin ve diğ., 2017). Vera ve diğ. (2011) *A.oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enzimi ile yaptığı çalışmalarda da galaktozun inhibe edici etkisinin laktoz hidrolizi reaksiyonuna kıyasla transgalaktosilasyon reaksiyonlarında önemli ölçüde daha güçlü olduğunu rapor etmiştir. Galaktoz, laktoz ile enzim aktif bölgesi için rekabet eden β-galaktosidazın rekabetçi bir inhibitörü olarak bilinir (Hsu ve diğ., 2007) ve enzimin hareketlerinin yüksek laktoz dönüşümlerinde büyük ölçüde yavaşlamasına ve reaksiyon hızının düşmesine neden olur (Sanz-Valero, 2009). Glukozun ise orta konsantrasyonlarda trangalaktosilasyon aktivitesinin bir aktivatörü olmasına rağmen, 200 mmol kg/L konsantrasyonunu aşan oranlarda inhibitör olarak etki ettiği bildirilmiştir (Vera ve diğ., 2011). Reaksiyon ortamında glukoz salınımı transgalaktosilasyon sırasında kaçınılmazdır. Bu nedenle daha yüksek GOS verimi elde etmek için reaksiyon ortamındaki serbest haldeki galaktoz ve glukozun uzaklaştırılması elzemdir. Membran destekli enzimatik süreçte toplam GOS değerindeki sınırlı düzeyde artışın en temel nedeni enzim aktivitesi üzerinde galaktoz inhibisyon etkisinin reaksiyon ortamının konsantre hale gelmesi ile birlikte daha hızlı bir şekilde etki göstermesi ve belirgin hale gelmesidir. Yeni yaklaşımlar ile yeni stratejiler geliştirilerek monosakkaritlerin inhibe edici etkisinin hafifletilmesi membran destekli sürecin GOS performansı daha da arttıracaktır.

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında ilk olarak *Aspergillus oryzae* kaynaklı β-galaktosidaz enziminin kinetik parametreleri belirlenmiştir. Hanes-Woolf grafiği kullanılarak yeni temin edilen enzimin V_{max} ve K_m kinetik parametreleri sırasıyla 29,07 μmol/ml/dk ve 2,44 mM olarak tespit edilmiştir. Box Benhken deney tasarımı kullanılarak belirlenmiş 2 tekrarlı 30 deney setinde başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC) ve sıcaklık (T) reaksiyon parametrelerinin GOS sentez verimine (GY) etkisi incelemek üzere sürekli karıştırmalı kesikli reaktör sisteminde (reaktör-1) GOS sentez çalışmaları sonucunda edilen verilere göre maksimum toplam GOS (GY) en düşük %8,47 ile en yüksek %26,92 arasında bulunmuştur. Elde edilen kuadratik matematiksel modelin yüksek uyumlulukta %GY değerleri önerdiği belirlenmiş ve tahminlenen GY değerleri ile deneysel GY değerleri arasında yüksek düzeyde bir korelasyon saptanmıştır. Reaktör-1'de enzimatik GOS üretimi sonucu elde edilen veriler yanıt yüzey grafikleri ile incelenmiştir. Elde edilen tüm yanıt yüzey grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, yüksek seviyede toplam GOS verimi elde edebilmek için yüksek substrat konsantrasyonu, düşük sıcaklık ve düşük-orta düzey enzim konsantrasyonu ile çalışmak daha uygundur. Düşük sıcaklık ve düşük enzim konsantrasyonu ile çalışılması maksimum toplam GOS eldesi için gerekli reaksiyon sürecini uzatmaktadır.

Membran destekli enzimatik GOS sentez sürecinde (reaktör-2) başlangıç laktoz konsantrasyonu (LC), enzim konsantrasyonu (EC) ve sıcaklık (T) reaksiyon parametrelerinin GOS sentezine etkisini incelemek ve reaksiyon koşullarını optimize etmek üzere 2 tekrarlı 36 deney kombinasyonundan oluşan faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre reaktör-2'de de yüksek LC ve düşük T kombinasyonunda daha yüksek verimde GOS elde edilmiştir. Reaktör-2'de elde edilen GY değerleri %18,7 ile %28,63 arasında değişmektedir. Ayrıca, her iki reaktörde de istatistiksel modeller yardımıyla gerekli görüldüğünde ayrı ayrı maksimum GOS-3 ve GOS-4 değerlerini sağlayacak reaksiyon koşullarının da ayrıca optimize edilebileceği gösterilmiştir. GOS sentez reaksiyonunun ozmotik membran

distilasyon sistemi ile entegre edilmesi membran ayırım süreci kullanılmayan reaktör-1'de ulaşılan aynı laktoz dönüşümü için gerekli reaksiyon süresini azaltmış ve GOS dönüşüm verimini arttırmıştır. Aynı zamanda membran kullanılarak reaksiyon ortamından ayrıştırılan su enzimin GOS-4 oluşturma kabiliyetinde artışa neden olmuştur. Bu nedenle membran destekli üretim süreci sonunda elde edilen sakkarit karışımının prebiyotik etkinliğinin daha yüksek olması beklenebilir. Reaktör-2'de aynı laktoz dönüşümü değerlerinde hem daha yüksek toplam GOS dönüşüm değerleri elde edilmesi hem de bu dönüşümün reaktör-1'e kıyasla daha kısa sürede sağlanması, enzimin daha yüksek aktivitede ve daha çok transgalaktosilasyon reaksiyonuna yönelmiş şekilde çalıştığının bir göstergesidir. Ancak membran destekli bir şekilde çalışılsa bile enzimin başlangıç aktivitesine kıyasla ilerleyen süreçte önemli bir aktivite kaybına uğradığı açık bir şekilde belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar reaktör-2 sisteminin hem GOS sentezinde de hem de sentezlenen ürünlerin konsantrasyonunun da başarılı bir şekilde rol alabileceğini göstermiştir. Reaktör-2'de toplam GOS'deki sınırlı seviyede artışın ana nedeni hem reaksiyon parametre etkilerinin incelenmesi aşamasında hem de kinetik değerlendirmelerde belirtildiği üzere enzim aktivitesi üzerinde monosakkarit inhibisyonunun daha etkili hale gelmesidir. Bu nedenle yeni yaklaşımlar ile yeni stratejiler geliştirilerek monosakkaritlerin inhibe edici etkisinin hafifletilerek enzim aktivitesinin korunmasının membran destekli sürecin GOS performansı daha da arttıracağı düşünülmektedir. Reaksiyon parametrelerinin GOS sentez sürecine etkisi genel olarak değerlendirildiğinde başlangıç laktoz konsantrasyonu transgalaktosilasyon aktivitesinde kilit rol oynamaktadır. Sıcaklık ve enzim miktarı ise maksimum GOS sentez verimine katkı sağlamaktan ziyade reaksiyon süresi açısından oldukça önemlidirler. Zaman (reaksiyon süresi) endüstriyel GOS sentez süreçleri açısından GOS birim maliyetini etkileyen önemli bir parametredir. Bu nedenle, GOS sentez süreçleri istenilen reaksiyon ortam içeriğine göre önceden tahminlenenerek bu içeriği en kısa sürede sağlayan reaksiyon parametreleri seçilebilir. Bu açıdan yanıt yüzey metodolojisinin kullanıldığı bu çalışmada elde edilen veriler bu tahminlemeler için uygun sonuçlar vermiş, her iki reaktörde de toplam GOS optimizasyonunu sağlayan matemaktisel modeller başarılı bir şekilde sunulmuştur.

Ozmotik membran distilasyon yönteminin enzimatik GOS sürecine entegrasyonu ile süreç boyunca laktoz konsantrasyonunun yüksek seviyede tutulması GOS sentez

sürecine olumlu etki etmiştir. Reaktör-2'de reaktör-1'e kıyasla reaksiyon verimi üzerine en fazla %20,1 düzeyinde artış elde edilmiştir. Laktoz hidroliz hızının (k_3) reaktör-1'e kıyasla reaktör-2'de önemli miktarda azaldığı saptanmıştır. Transgalaktosilasyon hızını tanımlayan k_5 ve transgalaktosilasyon/hidroliz hızını ifade eden k_5/k_{-5} değerleri reaktör-2'de artmıştır. Her iki reaktörde de k_3/k_{-3} birbirine yakın olmasına karşın reaktör-2'de yüksek seviyede E:Lak kompleksi oluşumu (k_1/k_{-1}) ve E:Gal kompleksi oluşumu (k_2) olmasının GOS sentez/GOS bozunması hızını (k_5/k_{-5}) olumlu yönde etkilediği söylenebilir. Membran destekli sürecin GOS sentezine en önemli etkilerinden birinin enzimin laktoz ile daha fazla etkileşime girmesine neden olarak reaksiyon ortamındaki E:Gal kompleksi konsantrasyonunu yüksek seviyede tutmasıdır. Reaktör-1 de glukoz inhibisyonu (k_6/k_{-6}) ön plana çıkarkan reaktör-2'de ise galaktoz inhibisyonu (k_7/k_{-7}) daha aktif rol oynamıştır.

Reaktör-2'de GOS sentezinde görülen olumlu etkinin daha da arttırılabilmesi için enzim aktivitesinin de arttırılması önem teşkil etmektedir. Sentez sürecinde yüksek laktoz dönüşümlerinden sonra (yaklaşık %50) enzim ortama salınan monosakkaritler nedeniyle aktivitesini kaybetmektedir. Her ne kadar glukoz oksidaz kullanılarak glukozun inhibisyon etkisi aşılmaya çalışılsa da reaktör-2 için gözlenen etki yetersizdir. GOS sentez sürecinde ortamdaki serbest glukoz ve galaktoz konsantrasyonunu düşük seviyede tutmak önemlidir. Bu açıdan reaktör-2 sistemini geliştirmek üzere enzimin bir destek materyali üzerine tutuklanması ile dolgulu kolon reaktörde sentez çalışmasının yürütülmesi, daha sonra bu reaktör çıkışına ozmotik membran distilasyon sürecinin entegre edilmesi ile reaksiyon ortamından suyun uzaklaştırılması ve buradaki çıkışın da bir nanofiltrasyon sistemine beslenerek reaksiyon ortamından glukoz ve galaktozun uzaklaştırılması ve en son olarak buradan elde edilen retentat akımının tekrar dolgulu kolon reaktöre beslenmesi şeklinde bir süreç tasarımının verim artışına olumlu yönde katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

Albayrak, N., & Yang, S. T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering, 77(1),* 8-19.

Bakken, A. P., Hill Jr, C. G., & Amundson, C. H. (1992). Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β-galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnology and Bioengineering, 39(4),* 408-417.

Bates, D. M., & Watts, D. G. (1988). *Nonlinear regression analysis and its applications*. Wiley New York.

Berger, J., Lee, B., & Lacroix, C. (1995). Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β-galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnology letters, 17(10),* 1077-1080.

Boon, M., Janssen, A., & Van der Padt, A. (1999). Modelling and parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biotechnology and Bioengineering, 64(5),* 558-567.

Boon, M., Janssen, A., & Van't Riet, K. (2000a). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology, 26(2-4),* 271-281.

Boon, M., Van't Riet, K., & Janssen, A. (2000b). Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. *Biotechnology and Bioengineering, 70(4),* 411-420.

Botelho-Cunha, V. A., Mateus, M., Petrus, J. C., & de Pinho, M. N. (2010). Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal, 50(1-2),* 29-36.

Bruins, M., Strubel, M., Van Lieshout, J., Janssen, A., & Boom, R. (2003). Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: kinetics and modelling. *Enzyme and Microbial Technology, 33(1),* 3-11.

Cassano, A., & Drioli, E. (2007). Concentration of clarified kiwifruit juice by osmotic distillation. *Journal of Food Engineering, 79(4),* 1397-1404.

Celere, M., & Gostoli, C. (2002). The heat and mass transfer phenomena in osmotic membrane distillation. *Desalination, 147(1-3),* 133-138.

Chen, C. S., Hsu, C. K., & Chiang, B. H. (2002). Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process biochemistry, 38(5),* 801-808.

Chen, C. W., Ou-Yang, C. C., Yeh, C. W. (2003). Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology, 33(4),* 497-507.

Cheng, C. C., Yu, M. C., Cheng, T. C., Sheu, D. C., Duan, K. J., & Tai, W. L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology letters, 28(11),* 793-797.

Cho, S. S., & Finocchiaro, T. (2009). *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications*. CRC Press.

Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V. I., Niranjan, K., & Rastall, R. A. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering, 89(4),* 434-443.

Cissé, M., Vaillant, F., Bouquet, S., Pallet, D., Lutin, F., Reynes, M., & Dornier, M. (2011). Athermal concentration by osmotic evaporation of roselle extract, apple and grape juices and impact on quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12(3),* 352-360.

Córdova, A., Astudillo, C., Santibañez, L., Cassano, A., Ruby-Figueroa, R., & Illanes, A. (2017). Purification of galacto-oligosaccharides (GOS) by three-stage serial nanofiltration units under critical transmembrane pressure conditions. *Chemical Engineering Research and Design, 117,* 488-499.

Córdova, A., Astudillo, C., Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2016). Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UF-MBR) as a processing strategy for the synthesis of galacto-oligosaccharides at high substrate concentrations. *Journal of biotechnology, 223,* 26-35.

Costa, R. S., & Vinga, S. (2016). Control analysis of the impact of allosteric regulation mechanism in a *Escherichia coli* kinetic model: Application to serine production. *Biochemical Engineering Journal, 110,* 59-70.

Curcio, E., & Drioli, E. (2005). Membrane distillation and related operations-a review. *Separation and Purification Reviews, 34(1),* 35-86.

Czermak, P., Ebrahimi, M., Grau, K., Netz, S., Sawatzki, G., & Pfromm, P. H. (2004). Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. *Journal of Membrane Science, 232(1-2),* 85-91.

Das, B., Roy, A. P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Lactose hydrolysis by β-galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and environmental safety, 121,* 244-252.

Das, R., Sen, D., Sarkar, A., Bhattacharyya, S., & Bhattacharjee, C. (2011). A comparative study on the production of galacto-oligosaccharide from whey permeate in recycle membrane reactor and in enzymatic batch reactor. *Industrial & engineering chemistry research, 50(2),* 806-816.

El-Abbassi, A., Khayet, M., Kiai, H., Hafidi, A., & García-Payo, M. D. C. (2013). Treatment of crude olive mill wastewaters by osmotic distillation and osmotic membrane distillation. *Separation and purification technology, 104,* 327-332.

Estevinho, B. N., Ramos, I., & Rocha, F. (2015). Effect of the pH in the formation of β-galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. *International journal of biological macromolecules, 78,* 238-242.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2019). Effect of glucose depletion during the synthesis of galactooligosaccharides using a trienzymatic system. *Enzyme and microbial technology, 121,* 45-50.

Foda, M. I., & Lopez-Leiva, M. (2000). Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process biochemistry, 35(6),* 581-587.

Fox, P. (2009). Lactose: Chemistry and properties, *Advanced dairy chemistry*. Springer, pp. 1-15.

Freitas, F. F., Marquez, L. D., Ribeiro, G. P., Brandão, G. C., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2011). A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Biochemical Engineering Journal, 58,* 33-38.

Gaur, R., Pant, H., Jain, R., & Khare, S. (2006). Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food chemistry, 97(3),* 426-430.

González-Delgado, I., López-Muñoz, M. J., Morales, G., & Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal, 61,* 211-219.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food chemistry, 121(2),* 307-318.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2011). Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(7),* 3366-3372.

Guerrero, C., Vera, C., Plou, F., & Illanes, A. (2011). Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β-galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72(3-4),* 206-212.

Güleç, H. A., Gürdaş, S., Albayrak, N., & Mutlu, M. (2010). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase on low-pressure plasma-modified cellulose acetate membrane using polyethyleneimine for production of galactooligosaccharide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15(6),* 1006-1015.

Han, K. W., Yoo, J., Oh, E. J., Choi, J. J., Kim, H. K., & Kwon, S. T. (2001). Cloning, analysis and expression of the gene for β-glycosidase of *Thermus caldophilus* GK24 and properties of the enzyme. *Biotechnology letters, 23(5),* 379-384.

Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, E., Mamma, D., Karagouni, A. D., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β-galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal, 24(2),* 161-172.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., & Davies, G., (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(15),* 7090-7094.

Hernández, O., Ruiz-Matute, A. I., Olano, A., Moreno, F. J., & Sanz, M. L., (2009). Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *International Dairy Journal, 19(9),* 531-536.

Hogan, P. A., Canning, R. P., Peterson, P. A., Johnson, R. A., & Michaels, A. S., (1998). A new option: osmotic distillation. *Chemical engineering progress, 94(7),* 49-61.

Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., & Kummer, U. (2006). COPASI-a complex pathway simulator. *Bioinformatics, 22(24),* 3067-3074.

Hsu, C., Lee, S., & Chou, C. (2007). Enzymatic production of galactooligosaccharides by β-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(6),* 2225-2230.

Huber, R., Kurz, G., & Wallenfels, K. (1976). A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β-galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry, 15(9),* 1994-2001.

Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process biochemistry, 46(1),* 245-252.

Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical reviews in biotechnology, 30(1),* 41-62.

Illanes, A., Guerrero, C., Vera, C., Wilson, L., Conejeros, R., & Scott, F. (2016a). *Lactose-derived prebiotics: A process perspective*. Academic Press.

Illanes, A., Vera, C., & Wilson, L. (2016b). Enzymatic Production of Galacto-Oligosaccharides. In A. Illanes, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, R. Conejeros, & F. Scott, (Eds.), *Lactose Derived Prebiotics. A Process Perspective* (pp.111-189), Estados Unidos: Elsevier,.

Iwasaki, K., Nakajima, M., & Nakao, S. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β-galactosidase. *Process biochemistry, 31(1),* 69-76.

Jenab, E., Omidghane, M., Mussone, P., Armada, D. H., Cartmell, J., & Montemagno, C. (2018). Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization. *Journal of Food Engineering, 222,* 63-72.

Jiao, B., Cassano, A., & Drioli, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of Food Engineering, 63(3),* 303-324.

Jobe, A., & Bourgeois, S. (1972). lac repressor-operator interaction: VI. The natural inducer of the lac operon. *Journal of molecular biology, 69(3),* 397-408.

Jovanovic-Malinovska, R., Fernandes, P., Winkelhausen, E., & Fonseca, L. (2012). Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by β-galactosidase immobilized in PVA. *Applied biochemistry and biotechnology, 168(5),* 1197-1211.

Kasche, V. (1986). Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β-lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme and Microbial Technology, 8(1),* 4-16.

Kaur, R., & Panesar, P. S. (2020). Enzyme systems for high-value biomolecule production, *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, pp. 273-308.

Khayet, M., Godino, M., & Mengual, J. (2005). Study of asymmetric polarization in direct contact membrane distillation. *Separation science and technology, 39(1),* 125-147.

Kim, C. S., Ji, E. S., & Oh, D. K. (2004). A new kinetic model of recombinant β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and biophysical research communications, 316(3),* 738-743.

Krutmann, J. (2009). Pre-and probiotics for human skin. *Journal of dermatological science, 54(1),* 1-5.

Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(10),* 2020-2028.

Li, D., Li, X., Dang, W., Tran, P. L., Park, S. H., Oh, B. C., Hong, W. S., Lee, J. S., & Park, K. H. (2013). Characterization and application of an acidophilic and thermostable β-glucosidase from *Thermofilum pendens. Journal of bioscience and bioengineering, 115(5),* 490-496.

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

Manera, A. P., de Almeida Costa, F. A., Rodrigues, M. I., Kalil, S. J., & Maugeri Filho, F. (2010). Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Food Engineering, 6(4),* 1-13.

Manucci, F. (2009). *Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate* (Yüksek lisans tezi). Dublin Institute of Technology.

Martınez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., & Villamiel, M. (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food chemistry, 107,* 258-264.

Matella, N., Dolan, K., & Lee, Y. (2006). Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. *Journal of food science, 71(7),* 363-368.

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology letters, 25(8),* 623-629.

Meyer, T. S. M., Miguel, A., Fernández, D. E. R., & Ortiz, G. M. D. (2015). Biotechnological production of oligosaccharides-applications in the food industry. *Food Production and Industry, 2,* 25-78.

Mozaffar, Z., Nakanishi, K., & Matsuno, R. (1985). Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of food science, 50(6),* 1602-1606.

Mueller, I., Kiedorf, G., Runne, E., Seidel-Morgenstern, A., & Hamel, C. (2018). Synthesis, kinetic analysis and modelling of galacto-oligosaccharides formation. *Chemical Engineering Research and Design, 130,* 154-166.

Nath, A., Bhattacharjee, C., & Chowdhury, R. (2013). Synthesis and separation of galacto-oligosaccharides using membrane bioreactor. *Desalination, 316,* 31-41.

Neri, D. F., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C., Ferreira, E. M., Torres, D. P., Rodrigues, L. R., Carvalho Jr, L. B., & Teixeira, J. A. (2009a). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food chemistry, 115(1),* 92-99.

Neri, D. F., Balcão, V. M., Dourado, F. O., Oliveira, J. M., Carvalho Jr, L. B., & Teixeira, J. A. (2009b). Galactooligosaccharides production by β-galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. *Reactive and Functional Polymers, 69(4),* 246-251.

Nguyen, T. H., & Haltrich, D. (2013). Microbial production of prebiotic oligosaccharides, *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Elsevier, 494-530.

Oku, T. (1996). Oligosaccharides with beneficial health effects: a Japanese perspective. *Nutrition reviews, 54(11),* 59-66.

Onsekizoglu Bagci, P. (2015). Potential of membrane distillation for production of high quality fruit juice concentrate. *Critical reviews in food science and nutrition, 55(8),* 1098-1113.

Onsekizoglu, P., Bahceci, K. S., & Acar, M. J. (2010). Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. *Journal of Membrane Science, 352(1-2),* 160-165.

Osman, A. (2016). Chapter 9 - Synthesis of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides: Science and Technology, in: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Academic Press, 135-154.

Pagani, M. M., Rocha-Leão, M. H., Barbosa Couto, A. B., Pinto, J. P., Ribeiro, A. O., dos Santos Gomes, F., & Cabral, L. M. (2011). Concentration of acerola (Malpighia emarginata DC.) juice by integrated membrane separation process. *Desalination and Water Treatment, 27(1-3),* 130-134.

Palai, T., & Bhattacharya, P. K. (2013). Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by β-galactosidase immobilized on PVDF membrane. *Journal of bioscience and bioengineering, 115(6),* 668-673.

Palai, T., Kumar, A., & Bhattacharya, P. K. (2016). Enzyme immobilization/bioconjugation in producing galactio-oligosaccharidies from lactose: developments of kinetic models and bio-reactors. *Materials Today: Proceedings, 3(10),* 3568-3586.

Palai, T., Mitra, S., & Bhattacharya, P. K. (2012). Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade β-galactosidase. *Journal of bioscience and bioengineering, 114(4),* 418-423.

Palai, T., Singh, A. K., & Bhattacharya, P. K. (2014). Enzyme, β-galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: kinetic study with feed flow under recirculation loop. *Biochemical Engineering Journal, 88,* 68-76.

Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 81(4),* 530-543.

Paterson, A. (2009). Production and uses of lactose, *Advanced dairy chemistry*. Springer, 105-120.

Petzold, L. (1983). Automatic selection of methods for solving stiff and nonstiff systems of ordinary differential equations. *SIAM journal on scientific and statistical computing, 4(1),* 136-148.

Playne, M., & Crittenden, R. (2009). Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose, *Advanced dairy chemistry*. Springer, 121-201.

Pocedičová, K., Čurda, L., Mišún, D., Dryáková, A., & Diblíková, L. (2010). Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. *Journal of Food Engineering, 99(4),* 479-484.

Rastall, R. A., Rycroft, C. E., Rabiu, B., & Gibson, G. R. (2016). Trans-Galactooligosaccharides as Prebiotics, *Handbook of Functional Dairy Products*. CRC Press, 109-126.

Rodriguez-Fernandez, M., Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Banga, J. R., (2011). Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β-galactosidases. *Journal of biotechnology, 153(3-4),* 116-124.

Rowland, I., & Tanaka, R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology, 74(6),* 667-674.

Rustom, I. Y., Foda, M. I., & Lopez-Leiva, M. (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors. *Food chemistry, 62(2),* 141-147.

Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal, 9(1),* 69-80.

Sanz-Valero, J. I. (2009). *Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized b-galactosidase and posterior chromatographic separation* (Doktora Tezi). The Ohio State University.

Sen, P., Nath, A., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. K., (2014). Process engineering studies of free and micro-encapsulated β-galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal, 90,* 59-72.

Shin, H. J., & Ji-Won, Y. (1998). Enzymatic production of galactooligosaccharide by *Bullera singularis* beta-galactosidase. *Journal of microbiology and biotechnology, 8(5),* 484-489.

Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., & Hutkins, R. W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells. *Infection and immunity, 74(12),* 6920-6928.

Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., & Horiuchi, T. (1975). Purification and properties of β-galactosidase from Aspergillus oryzae. *The Journal of Biochemistry, 77(1),* 241-247.

Torres, D. P., Gonçalves, M. D. P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(5),* 438-454.

Tzortzis, G., Goulas, A. K., & Gibson, G. R. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology, 68(3),* 412-416.

Tzortzis, G., & Vulevic, J. (2009). Galacto-oligosaccharide prebiotics. Prebiotics and Probiotics Science and Technology, by Charalampopoulos, Dimitris; Rastall, Robert A., ISBN 978-0-387-79057-2. Springer-Verlag New York, 2009,

Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B. R., Fernandez-Arrojo, L. A., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., & Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(5),* 1081-1087.

Vénica, C. I., Bergamini, C. V., Rebechi, S. R., & Perotti, M. C. (2015). Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. *LWT-Food Science and Technology, 63(1),* 198-205.

Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., & Illanes, A., (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(12),* 197.

Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by β-galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology, 50(3),* 188-194.

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research, 346(6),* 745-752.

Villamiel, M., Montilla, A., Olano, A., & Corzo, N. (2014). Production and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose. *Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity,* 137-167.

Walstra, P. (1999). *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. CRC Press.

Warczok, J., Gierszewska, M., Kujawski, W., & Güell, C., (2007). Application of osmotic membrane distillation for reconcentration of sugar solutions from osmotic dehydration. *Separation and purification technology, 57(3),* 425-429.

Warmerdam, A., Boom, R. M., & Janssen, A. E. (2013). β-galactosidase stability at high substrate concentrations. *Springerplus, 2(1),* 402.

Yin, H., Bultema, J. B., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β-galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food chemistry, 225,* 230-238.

Zhou, Q. Z., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal, 9(1),* 33-40.

EKLER

EK A : Reaktör-1’de reaksiyon bileşenleri molarite hesaplama aşamaları.

EK B : Reaktör-2’de reaksiyon bileşenleri molarite hesaplama aşamaları.

EK C : Reaktör-1’de süreç yanıtlarının yanıt-yüzey grafikleri.

EK D : Reaktör-2’de süreç yanıtlarının yanıt-yüzey grafikleri.

EK A: Reaktör-1'de reaksiyon bileşenleri molarite hesaplama aşamaları.

Çizelge A.1 : HPLC sonuçları ile reaksiyon bileşen yüzdelerinin zamana bağlı değişiminin hesaplanması.

Süre (dk.)	Laktoz (%)	Glikoz (%)	Galaktoz (%)	Toplam GOS (%)
0	100,00	0,00	0,00	0,00
5	92,02	2,59	0,28	5,10
10	87,21	3,90	0,48	8,41
15	83,63	4,91	0,63	10,83
20	80,73	5,79	0,82	12,66
25	78,32	6,56	1,04	14,07
30	76,31	7,19	1,20	15,29
40	73,18	8,22	1,45	17,15
50	70,59	9,07	1,62	18,73
60	68,08	10,35	2,26	19,31
75	65,91	10,63	2,34	21,11
90	63,59	11,65	2,81	21,95
120	60,46	13,20	3,77	22,56
150	57,54	14,36	3,95	24,15
180	55,55	15,23	4,16	25,06
210	53,76	16,39	5,04	24,81
240	52,36	16,83	4,74	26,07
270	51,09	17,54	5,09	26,28
300	50,05	18,13	5,39	26,42

Çizelge A.2 : Reaksiyon bileşen ağırlıklarının zamana bağlı olarak hesaplanması.

Süre (dk.)	Laktoz (g)	Glikoz (g)	Galaktoz (g)	Toplam GOS (g)
0	16,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5	14,7233	0,4151	0,0455	0,8161
10	13,9528	0,6244	0,0775	1,3452
15	13,3806	0,7858	0,1013	1,7323
20	12,9161	0,9259	0,1318	2,0262
25	12,5319	1,0496	0,1672	2,2513
30	12,2100	1,1503	0,1925	2,4471
40	11,7090	1,3145	0,2319	2,7446
50	11,2938	1,4510	0,2591	2,9961
60	10,8929	1,6563	0,3616	3,0892
75	10,5462	1,7014	0,3751	3,3773
90	10,1745	1,8641	0,4496	3,5118
120	9,6735	2,1127	0,6036	3,6102
150	9,2064	2,2979	0,6323	3,8634
180	8,8885	2,4364	0,6649	4,0103
210	8,6021	2,6227	0,8063	3,9689
240	8,3773	2,6929	0,7583	4,1716
270	8,1742	2,8072	0,8140	4,2047
300	8,0087	2,9003	0,8632	4,2278

Çizelge A.3 : Reaksiyon bileşenlerinin molar konsantrasyonlarının hesaplanması.

Süre (dk)	Laktoz (mol/L)	Glukoz (mol/L)	Galaktoz (mol/L)	GOS (mol/L)
0	1,0387	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,9558	0,0512	0,0056	0,0360
10	0,9058	0,0770	0,0096	0,0593
15	0,8687	0,0969	0,0125	0,0763
20	0,8385	0,1142	0,0163	0,0893
25	0,8136	0,1295	0,0206	0,0992
30	0,7927	0,1419	0,0237	0,1078
40	0,7602	0,1621	0,0286	0,1209
50	0,7332	0,1790	0,0320	0,1320
60	0,7072	0,2043	0,0446	0,1361
75	0,6847	0,2099	0,0463	0,1488
90	0,6605	0,2299	0,0555	0,1547
120	0,6280	0,2606	0,0745	0,1591
150	0,5977	0,2834	0,0780	0,1702
180	0,5770	0,3005	0,0820	0,1767
210	0,5585	0,3235	0,0994	0,1749
240	0,5439	0,3322	0,0935	0,1838
270	0,5307	0,3463	0,1004	0,1853
300	0,5199	0,3577	0,1065	0,1863

EK B : Reaktör-2'de reaksiyon bileşenleri molarite hesaplama aşamaları.

Çizelge B.1 : HPLC sonuçları ile reaksiyon bileşen yüzdelerinin zamana bağlı değişiminin hesaplanması.

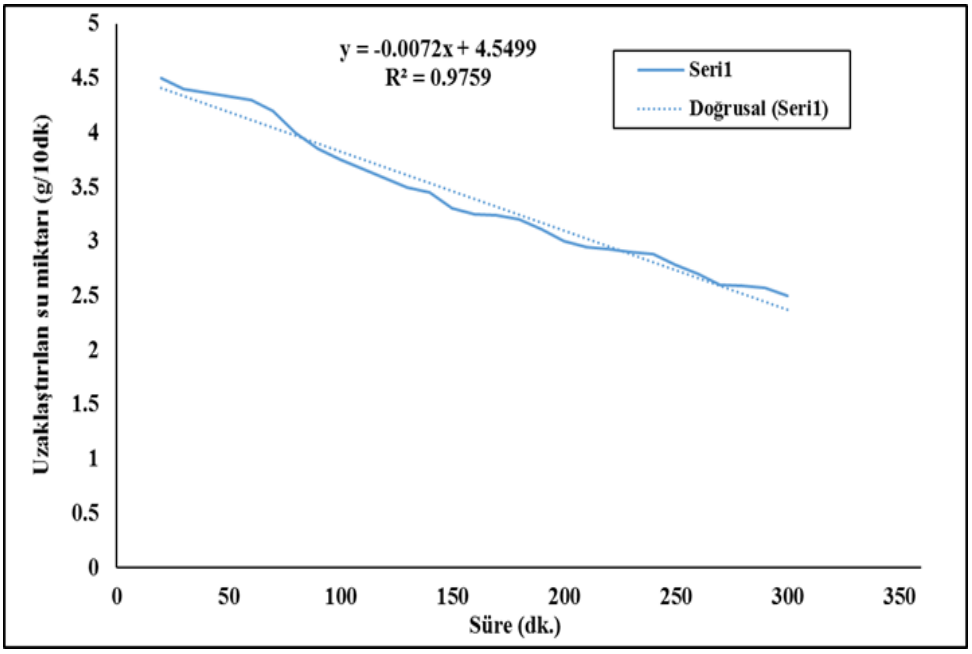
Süre (dk.)	Laktoz (%)	Glukoz (%)	Galaktoz (%)	Toplam GOS (%)
0	100,00	0,00	0,00	0,00
5	94,04	1,96	0,17	3,83
20	83,53	5,08	0,96	10,44
25	82,62	5,26	0,81	11,31
30	81,10	5,68	0,85	12,36
40	77,93	6,69	1,17	14,21
50	76,05	7,25	1,19	15,52
60	74,53	7,45	1,38	16,63
75	72,04	8,29	1,52	18,14
90	69,99	9,03	1,70	19,28
105	68,01	9,76	1,91	20,32
120	66,45	10,33	2,06	21,16
150	63,40	11,62	2,55	22,42
180	61,50	12,34	2,67	23,48
240	58,10	14,00	3,27	24,62
270	56,81	14,61	3,45	25,13
300	55,25	15,03	3,61	26,11

Çizelge B.2 : Reaksiyon bileşen ağırlıklarının zamana bağlı olarak hesaplanması.

Süre (dk.)	Laktoz (g)	Glukoz (g)	Galaktoz (g)	Toplam GOS (g)
0	96,00	0,00	0,00	0,00
5	90,28	1,88	0,17	3,67
20	80,19	4,87	0,92	10,02
25	79,31	5,05	0,78	10,86
30	77,86	5,45	0,82	11,87
40	74,81	6,43	1,12	13,64
50	73,00	6,96	1,14	14,90
60	71,55	7,15	1,33	15,97
75	69,16	7,96	1,46	17,42
90	67,19	8,67	1,64	18,51
105	65,29	9,37	1,84	19,50
120	63,79	9,92	1,97	20,31
150	60,87	11,16	2,45	21,53
180	59,04	11,85	2,57	22,54
240	55,78	13,44	3,14	23,63
270	54,54	14,02	3,31	24,12
300	53,04	14,43	3,46	25,06

Çizelge B.3 : Reaktör-2'de elde edilen zamana bağlı su uzaklaştırma hızı.

Süre (dk.)	Ağırlık (g)
20	4,5
30	4,4
60	4,3
70	4,2
80	4
90	3,85
100	3,75
130	3,5
140	3,45
150	3,3
160	3,25
170	3,24
180	3,2
190	3,11
200	3
210	2,95
220	2,93
230	2,9
240	2,88
250	2,78
260	2,7
270	2,6
280	2,59
290	2,57
300	2,5



Şekil B.1 : Su uzaklaştırma hızının zamana bağlı lineer denkleminin elde edilmesi.

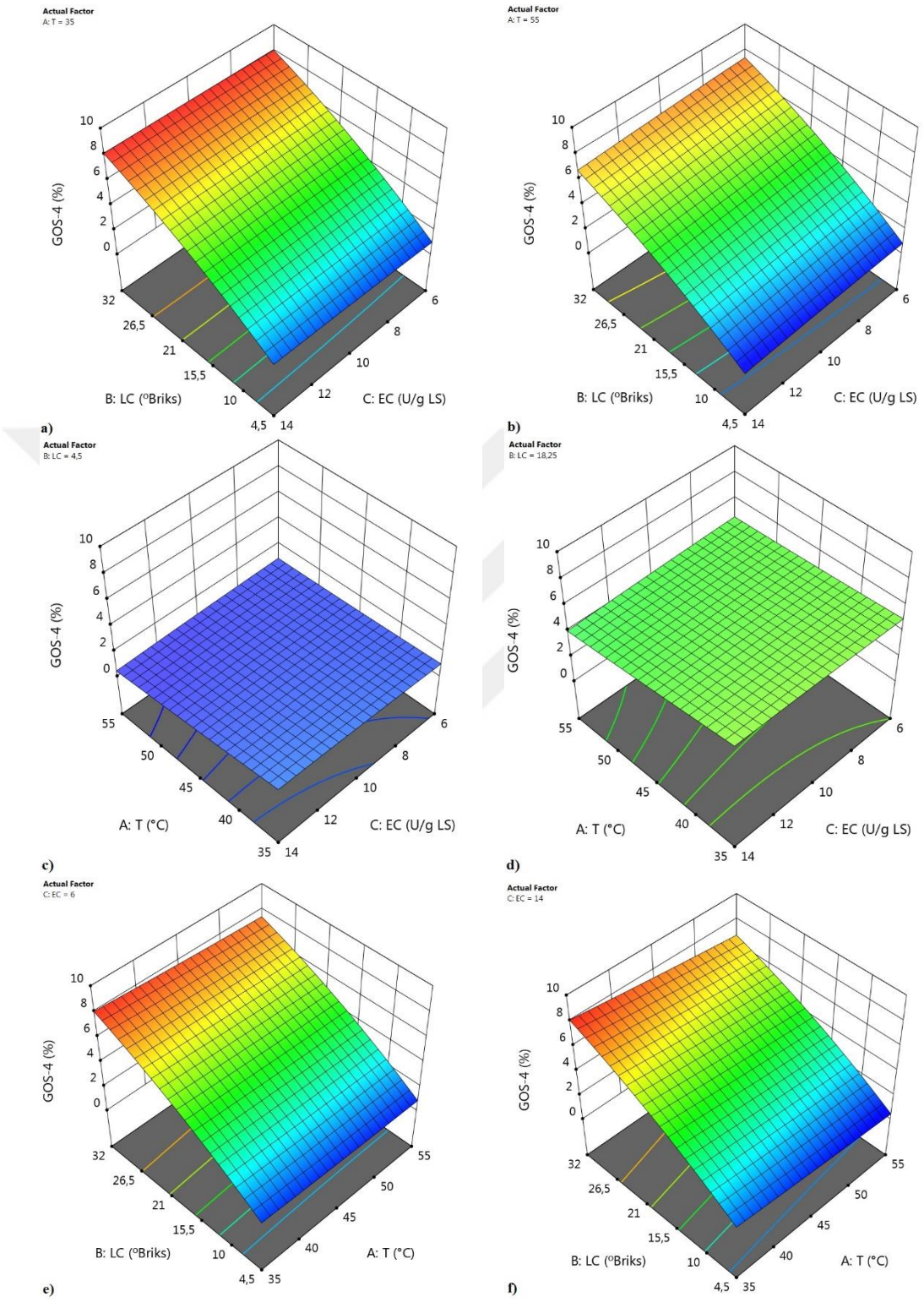
Çizelge B.4 : Reaktör-2'de reaksiyon ortam hacminin su uzaklaştırma hızı denklemi ile hesaplanması.

Süre (dk.)	Uzaklaşan su (g)	Kalan Besleme Çözeltisi Ağırlığı (g)	Reaksiyon hacmi (Litre)
0	0,00	300,00	0,270
5	2,26	297,74	0,268
20	6,61	291,13	0,262
25	2,18	288,95	0,260
30	2,17	286,78	0,258
40	4,26	282,52	0,254
50	4,19	278,33	0,250
60	4,12	274,21	0,247
75	6,01	268,20	0,241
90	5,85	262,34	0,236
105	5,69	256,65	0,231
120	5,53	251,13	0,226
150	10,41	240,72	0,217
180	9,76	230,95	0,208
240	8,47	222,49	0,200
270	7,82	214,67	0,193
300	7,17	207,50	0,187

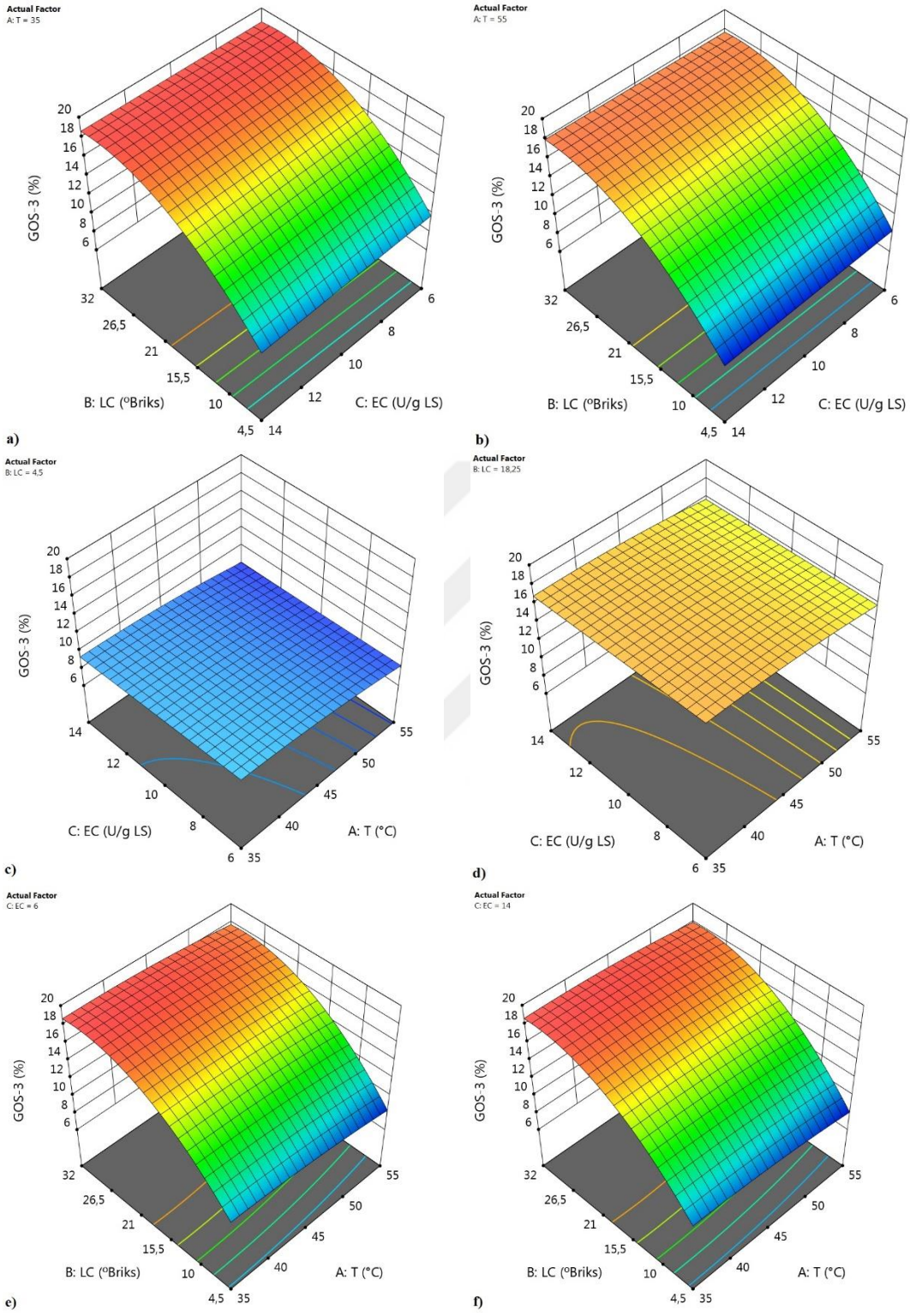
Çizelge B.5 : Reaksiyon bileşenlerinin molar konsantrasyonlarının hesaplanması.

Süre (dk.)	Laktoz (mol/L)	Glukoz (mol/L)	Galaktoz (mol/L	GOS (mol/L)
0	1,0387	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,9842	0,0389	0,0034	0,0272
20	0,8940	0,1033	0,0195	0,0758
25	0,8910	0,1077	0,0167	0,0828
30	0,8813	0,1173	0,0176	0,0912
40	0,8595	0,1403	0,0245	0,1064
50	0,8514	0,1542	0,0252	0,1179
60	0,8470	0,1609	0,0298	0,1283
75	0,8371	0,1829	0,0337	0,1431
90	0,8313	0,2038	0,0384	0,1554
105	0,8257	0,2252	0,0441	0,1674
120	0,8246	0,2436	0,0485	0,1782
150	0,8208	0,2859	0,0627	0,1970
180	0,8298	0,3164	0,0686	0,2150
240	0,8138	0,3727	0,0870	0,2340
270	0,8247	0,4029	0,0951	0,2476
300	0,8298	0,4290	0,1029	0,2661

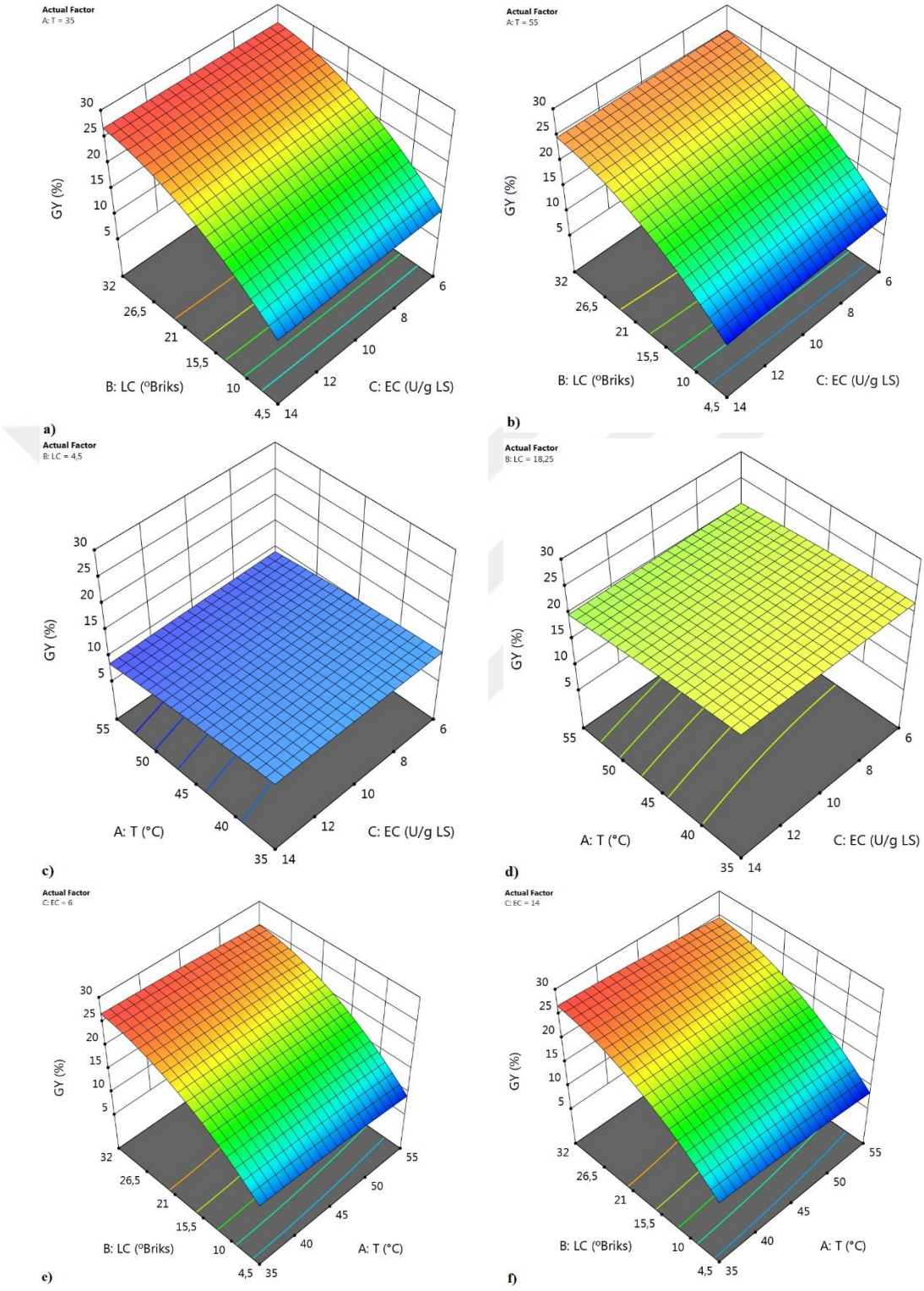
EK C : Reaktör-1'de süreç yanıtlarının yanıt-yüzey grafikleri.



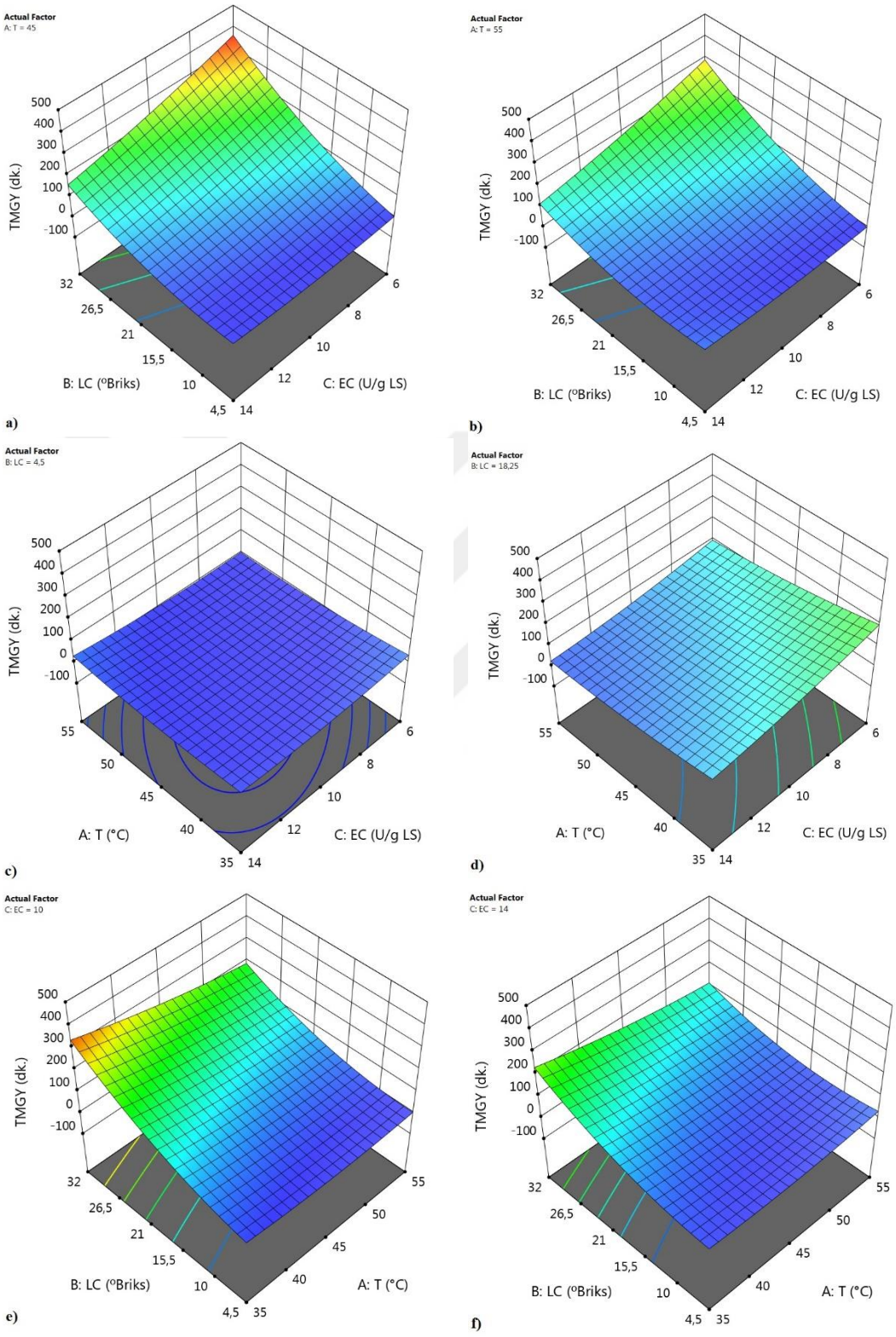
Şekil C.1: Reaktör-1'de GOS-4 için diğer süreç yanıt grafikleri.



Şekil C.2 : Reaktör-1'de GOS-3 için diğer süreç yanıt grafikleri.

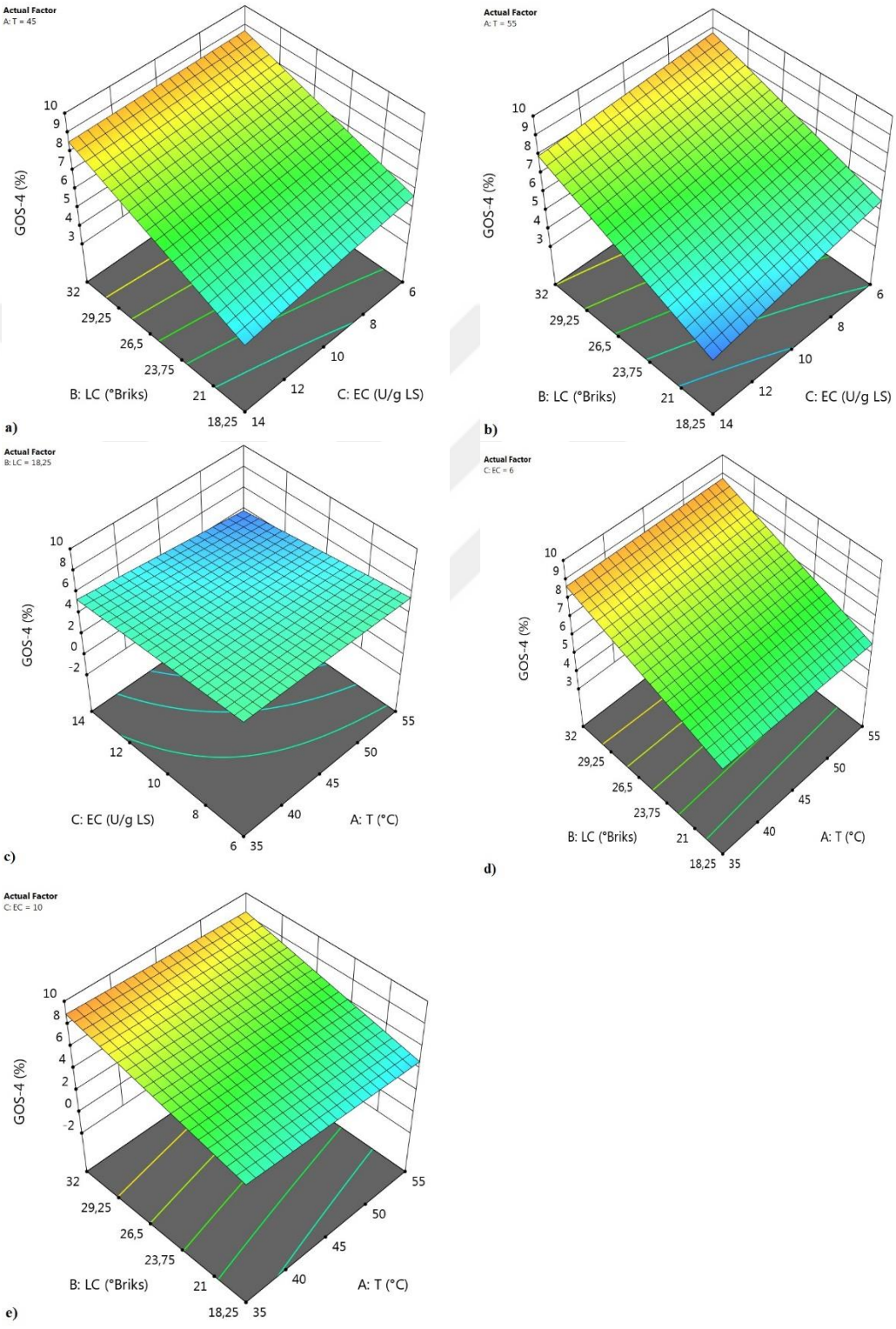


Şekil C.3 : Reaktör-1'de GY için diğer süreç yanıt grafikleri.

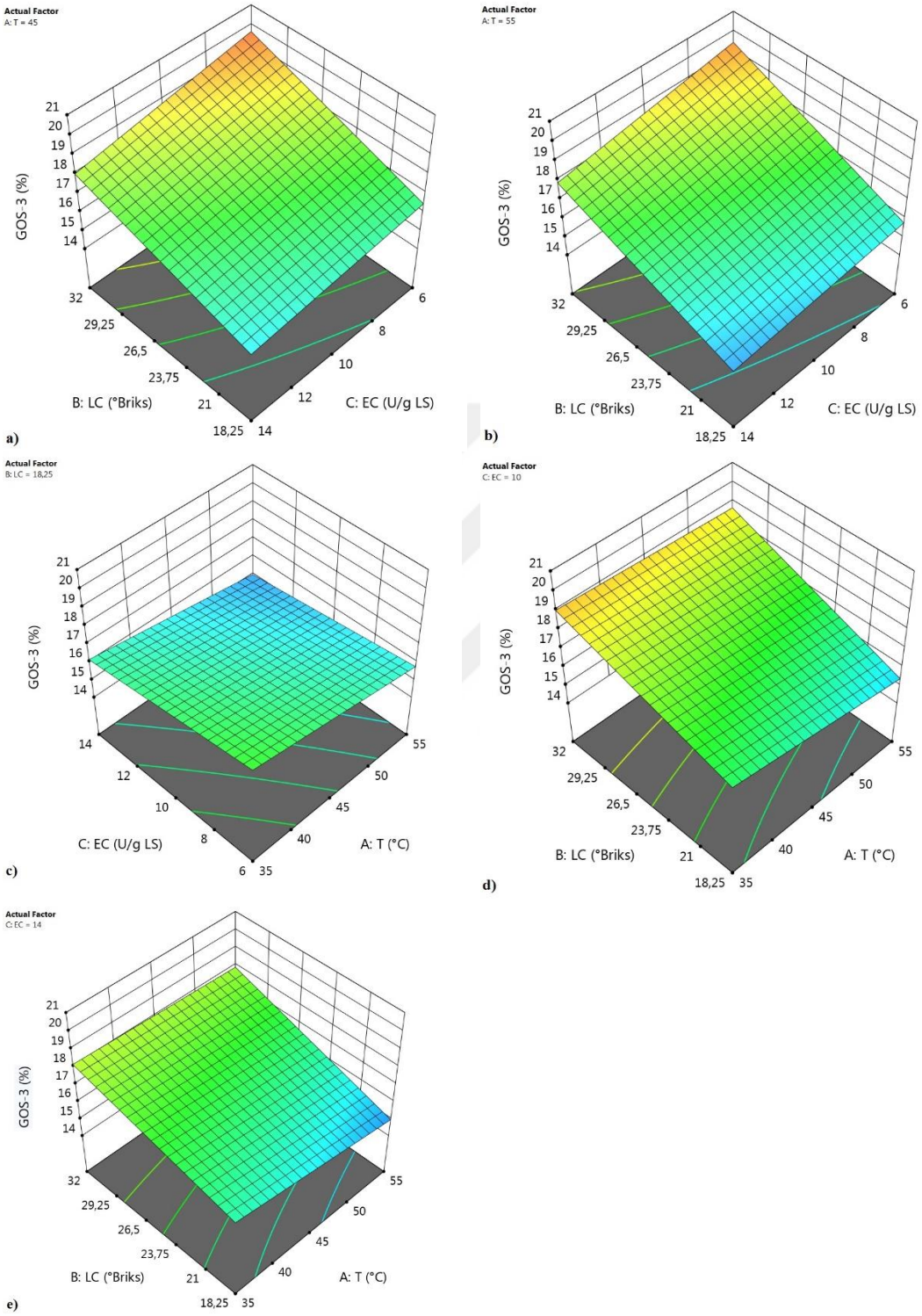


Şekil C.4 : Reaktör-1'de TMGY için diğer süreç yanıt grafikleri.

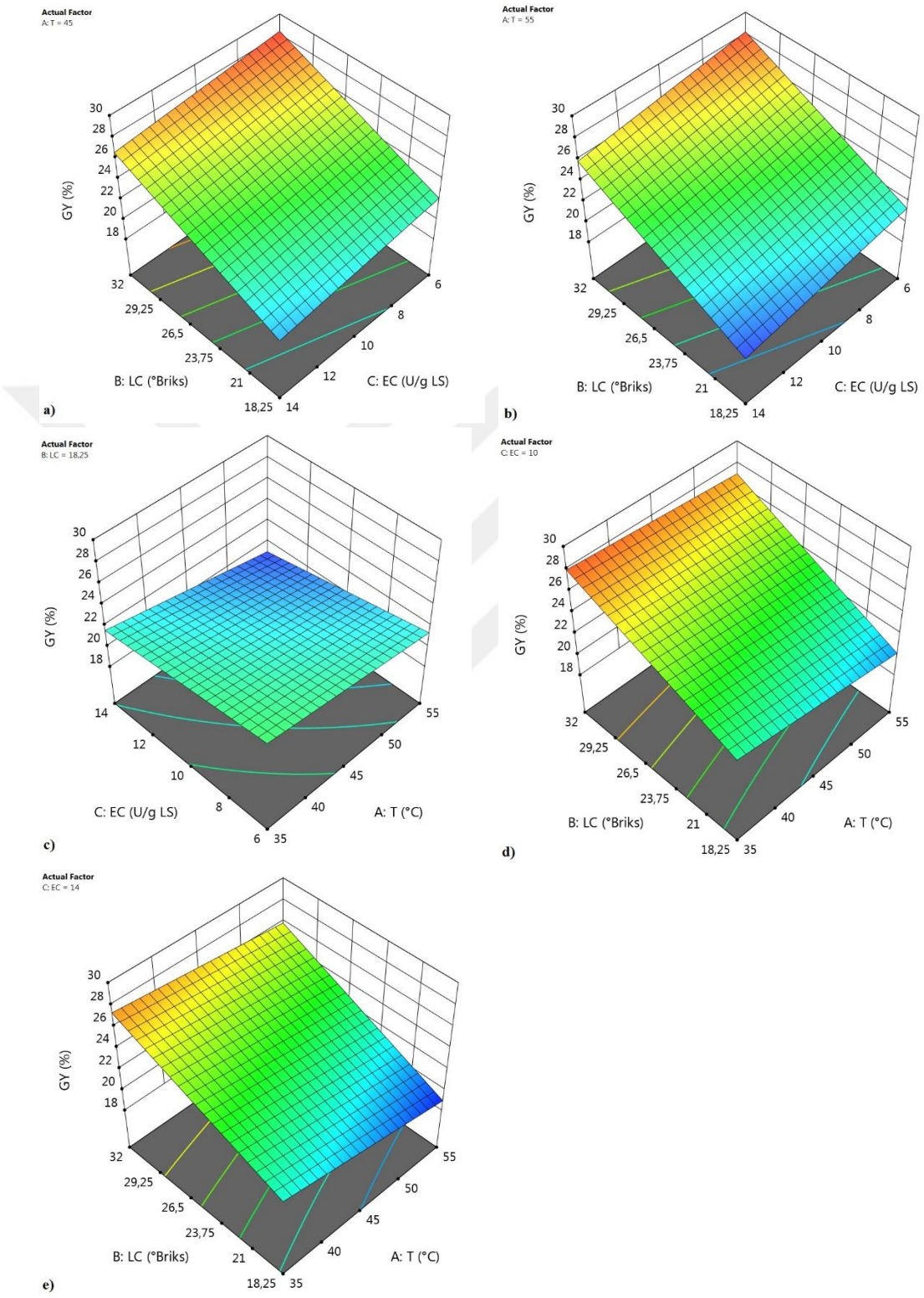
EK D : Reaktör-2'de süreç yanıtlarının yanıt-yüzey grafikleri.



Şekil D.1 : Reaktör-2'de GOS-4 için diğer süreç yanıt grafikleri.



Şekil D.2 : Reaktör-2'de GOS-3 için diğer süreç yanıt grafikleri.



Şekil D.3 : Reaktör-2'de GY için diğer süreç yanıt grafikleri.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad **:** Kadir ÇINAR

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2010, ODTÜ, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** **:** 2015, İTÜ, Gıda Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM:

- 2010 yılından beri Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR:

- **Cinar, K.**, Gunes, G., Gulec H.A. (2020). Enzymatic synthesis of prebiotic carbohydrates from lactose: Kinetics and optimization of transgalactosylation activity of β-galactosidase from Aspergillus oryzae. *Journal of Food Process Engineering*, 43(8), 1-12.
- **Cinar, K**., Gulec, H.A., Gunes, G., "Transgalactosylation activity of β-Galactosidase from Aspergillus Oryzae: Kinetic Parameter Estimation", "International Agricultural, Biological and Life Science Conference-AGBIOL 2018", 2-6 September 2018, Edirne, Turkey (poster).
- **Cinar, K**., Gulec, H.A., Gunes, G., "Galactooligosaccharides Production by Using β-galactosidase from Aspergilus oryzae: Effect of Lactose Concentration", "International Conference on Agriculture, Forest, Food Science and Technologies- ICAFOF 2017", 15-17 May 2017,Cappadocia, Turkey (poster).
- **Cinar, K**., Gulec, H.A., Gunes, G., "Optimization of Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides from Lactose in a Batch Reactor", "8th International Conference on Biotechnology and Food Science – ICBFS 2017", 11-13 April, Seoul, South Korea (poster).

DİĞER YAYINLAR:

- Damar, I., **Cinar, K**., & Gulec, H. A. (2020). Concentration of whey proteins by ultrafiltration: comparative evaluation of process effectiveness based on physicochemical properties of membranes. *International Dairy Journal*, 2020, 111:104823.

- **Cinar, K.**, "A Review on Nanoemulsions: Preparation Methods And Stability", Trakya University Journal of Engineering Sciences, 18(1): 73-83, 2017.
- Akgün A., Damar Hüner, I., Yılmaz, E., **Çınar K**., (2017) "Gıda Analiz Uygulamaları", Sidas Medya, İzmir, Türkiye, ISBN:978-605- 5267-36- 0, 131 Sayfa.
- Gulec, H.A., **Cinar, K**., Bagci, U., & Bagci, O.P., "Production of concentrated whey beverage by osmotic membrane distillation: analysis of flux profile", "International Agricultural, Biological and Life Science Conference-AGBIOL 2018", 2-6 September 2018, Edirne, Turkey (poster).
- Gulec, H.A., Onsekizoglu Bagci, P., **Cinar, K**., & Bagci, U., "Production and Characterization of Polylactic Acid and Polyvinylalcohol/Polyethyleneimine Fibers with Catalytic Activity by Electrospinning", "8th International Conference on Biotechnology and Food Science – ICBFS 2017", 11-13 April, Seoul, South Korea (poster).
- **Cinar, K**., & Gulec, H.A., "Investigation of the Effects of Milk Composition on the Performance and Selectivity of Microfiltration Membranes", "2016 International Conference on Nutrition and Food Engineering (ICNFE 2016)", 19-21 August, Budapest, Hungary (poster).
- Hicsasmaz, Z., **Cinar, K**., & Gunes, G., "Application of Microfiltration to Turkish White Cheese Manufacture, "International Food Technology-16", 16-19 July 2016, Chicago, USA (sözlü sunum).
- **Cinar, K**., & Gülec, H.A., "Application of supercritical carbon dioxide for sunflower oil extraction,"19th International Sunflower Conference", 29 May-3 June 2016, Edirne, Turkey (poster).
- Gülec, H.A., & **Cinar, K.**, "Effect of enzymatic interesterification on oxidative stability of sunflower oil,"19th International Sunflower Conference", 29 May-3 June 2016, Edirne, Turkey (poster).
- Cinar, K. & Bagci, U., "Hardal Tohumu Konsantrasyonun Hardaliye Fermantasyonu Üzerine Etkileri", Türkiye 12. Gıda Kongresi, 2016, 5-7 Ekim, Edirne, Türkiye (poster).
- Gülec, H.A., & **Cinar, K.**, "Separation of Whey Proteins from Milk by Poly(Ethersulfone) Microporous Membrane: Effect of Feed Composition,"Euro Food Chem XVIII", 13-16 October 2015, Madrid, Spain (poster).
- **Cinar, K**., Gülec, H.A. Gunes, G., & Hicsasmaz, Z., "Sensory Properties of White Cheese Made From Microfiltered Milk,"Euro Food Chem XVIII", 13-16 October 2015, Madrid, Spain (poster).
- **Cinar, K**., Gülec, H.A., & Hicsasmaz, Z., "Effect of Membrane Filtration on Physical Properties of Cheeses ,"Balkan Agriculture Congress 2014", 08-11 September, Edirne, Turkey (poster).
- **Cinar, K**., Gülec, H.A., & Hicsasmaz, Z., "Sedimentation and Stabilization of Cloudy Juices ," Food Science, Engineering and Technologies-2011", 14-15 October, Plovdiv, Bulgaria (sözlü sunum).