

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

93703

BUĞDAY NIŞASTASININ HİDROLİZİNDE  $\alpha$ -AMİLAZ  
ENZİMİNİN AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Kimya Müh. Semra YÜCEER

F.B.E Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

: Doç. Dr. Belma KIN ÖZBEK



Dr. Belma Özbek



Doç. Dr. Kutlu Ülgen

İSTANBUL, 2000

Prof. Dr. Mualla Öner



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. ENZİMLER.....	3
2.1 Enzim Nedir?.....	3
2.2 Enzimlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	3
2.3 Enzimlerin Etki Mekanizması.....	4
2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	5
2.5 Enzim Üretim Yöntemleri.....	5
2.6 Enzimlerin Uygulama Alanları.....	6
3. $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİ ve ÖZELLİKLERİ.....	9
3.1 Amilaz Enzimleri.....	9
3.1.1 $\alpha$ -Amilaz.....	9
3.1.2 $\beta$ -Amilaz.....	9
3.1.3 Gliko Amilaz.....	9
3.2 $\alpha$ -Amilazın Kimyasal Yapısı.....	10
3.3 $\alpha$ -Amilazın Etki Modeli.....	12
3.4 $\alpha$ -Amilazın Endüstriyel Uygulamaları.....	12
4. NIŞASTA ve YAPISI.....	14
4.1 Nişasta Sıvılaştırılmasında $\alpha$ -Amilaz.....	15
4.2 Tekstil Endüstrisinde $\alpha$ -Amilaz.....	16
4.2.1 Haşılama işlemi.....	16
4.2.2 Haşıl sökme işlemi.....	16
4.2.2.1 $\alpha$ -Amilaz ile haşıl sökme işlemi.....	17
4.3 $\alpha$ -Amilaz ile İlgili Çalışmalar.....	18
5. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
5.1 Kullanılan Materyaller.....	20

5.2	Kullanılan Cihazlar.....	20
5.2.1	Karıştırmalı biyoreaktör.....	22
5.2.2	Kontrol modülleri.....	23
5.3	Deneyin Yapılışı.....	24
5.4	Analiz Yöntemleri.....	24
5.4.1	Enzim aktivite tayini.....	24
5.4.2	Nişasta konsantrasyonu tayini.....	25
5.5	Hesaplamalar.....	25
6.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
6.1	pH'ın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	27
6.2	Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	28
6.3	Enzim Miktarının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	31
6.4	Viskozitenin Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	33
6.5	Hidrolizat Miktarının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	36
6.6	Karıştırıcı Hızının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	39
6.7	Zamanın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	42
6.8	Nişastasız Ortamda Zamanın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	44
7.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	48
	KAYNAKLAR.....	50
	EKLER.....	53
	EK 1.....	53
	ÖZGEÇMİŞ.....	54

## SİMGE LİSTESİ

$[A_0]$	$t=0$ anındaki enzimin aktivitesi
$[A_1]$	İşlem sonundaki enzimin aktivitesi
$[A]$	% Enzim aktivitesi
$C_{ao}$	$t=0$ anındaki enzimin absorbans değeri
$C_{ak}$	Kontrol çözeltisinin absorbans değeri
$C_{a1}$	İşlem sonundaki enzimin absorbans değeri
$[S_1]$	İşlem sonunda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu, g/l
$[S_0]$	$t=0$ anındaki nişasta konsantrasyonu, g/l
$C_{s1}$	İşlem sonunda ortamda kalan nişastanın absorbans değeri
$C_{so}$	$t=0$ anındaki nişastanın absorbans değeri
$[H]$	% Hidroliz derecesi
$E$	Enzim miktarı, ml/l
$H$	% Hidrolizat miktarı (hacim/hacim)
$[S_{ho}]$	İşlem sonunda hidroliz olan nişasta konsantrasyonu (hidrolizat miktarı, $H=0$ ), g/l
$\mu$	Viskozite, cpoise
$N$	Karıştırıcı hızı, rpm (karıştırıcının bir dakikadaki dönüş sayısı)
$\sigma$	Standart sapma
$R^2$	Regresyon katsayısı
$t_{1/2}$	Enzimin yarılanma ömrü, dakika
$k_D$	Enzim inaktivasyonunun hız sabiti, dakika <sup>-1</sup>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Anahtar-Kilit modeline göre enzimin etki mekanizması..... 4
Şekil 2.2	Dünyada 1995 yılı itibariyle enzimlerin en çok kullanıldığı sanayi dalları (Mountain vd., 1999)..... 7
Şekil 2.3	Dünyada 1995 yılı itibariyle en çok kullanılan enzimler (Mountain vd., 1999)..... 7
Şekil 4.1	Amiloz molekülü..... 14
Şekil 4.2	Amilopektin molekülü..... 14
Şekil 5.1	Biyoreaktör ve kontrol modüllerinin şematik diyagramı..... 21
Şekil 5.2	Nişasta konsantrasyonu ile ilgili kalibrasyon grafiği..... 25
Şekil 6.1	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun pH ile değişimi (T=60°C ve N=300 rpm)..... 28
Şekil 6.2	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun sıcaklık ile değişimi (pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 30
Şekil 6.3	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun enzim miktarı ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 32
Şekil 6.4	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun viskozite ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 34
Şekil 6.5	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidrolizat ilavesi ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 37
Şekil 6.6	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun karıştırıcı hızı ile değişimi (T=60°C ve pH=6.5)..... 40
Şekil 6.7	% Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun zamanla değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 43
Şekil 6.8	% Enzim aktivitesinin nişastasız ve nişastalı ortamda zamanla değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 45

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	Amilaz enzimleri..... 9
Çizelge 3.2	$\alpha$ -Amilaz enziminin aminoasit kompozisyonu (Wiseman, 1979)..... 10
Çizelge 3.3	Farklı kaynaklı $\alpha$ -amilazların molekül ağırlıkları (Dordick,1991)..... 11
Çizelge 3.4	Farklı kaynaklı $\alpha$ -amilazların bazı özellikleri (Godfrey ve Reichelt,1983)..... 11
Çizelge 5.1	Biyoreaktör ile ilgili komponentler ve değerleri..... 22
Çizelge 6.1	pH'a karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C ve N=300 rpm)..... 27
Çizelge 6.2	Sıcaklığa karşılık elde edilen deneysel veriler (pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 29
Çizelge 6.3	Enzim ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 32
Çizelge 6.4	Gliserin ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 34
Çizelge 6.5	Hidrolizat ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 37
Çizelge 6.6	Karıştırıcı hızına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C ve pH=6.5)..... 40
Çizelge 6.7	Zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 42
Çizelge 6.8	Niştasız ve niştalı ortamda zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)..... 45
Çizelge 6.9	Niştasız ve niştalı ortam ile hidrolizat ilaveli ortamın karşılaştırılması..... 47
Çizelge 6.10	Niştasız ve niştalı ortam için bulunan $t_{1/2}$ ve $k_D$ değerleri..... 47
Çizelge E1.1	$\alpha$ -Amilaz enzim inaktivasyonu ile ilgili modeller ve $R^2$ değerleri 53
Çizelge E1.2	Ortamda kalan niştasta konsantrasyonu ile ilgili modeller ve $R^2$ değerleri 53

## ÖNSÖZ

Bu tezin bana verilmesini sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Salih DİNÇER'e, çalışmamı yönlendiren ve her aşamasında bana yardımcı olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Belma KIN ÖZBEK'e, yetişmemi ve yönlenmemi sağlayan tüm saygıdeğer Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine, Boğaziçi Üniversitesi Kimya mühendisliği Bölümünden Sayın Doç. Dr. Kutlu ÜLGEN ve Başak SAYGILI'ya, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyip her zaman yanımda bulunan aileme, her konuda yardımını gördüğüm eşim Zeki ÖZİRİ'ye, arkadaşlarım Emel AKYOL, Sevgi GAYIK ve Işık YAVUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZET

Günümüzde, 100'den fazla enzim çeşitli endüstri dallarında kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde de kumaşa dokuma esnasında dayanıklılık vermesi amacı ile dokuma işleminden önce haşıl maddelerinin kullanılmaları gerekli bir prosestir. Haşıl maddesi olarak kullanılan nişastayı, kumaştan uzaklaştırabilecek kimyasal materyallerin kumaş ve çevre için zararlı olmaları, üretici firmaları alternatif haşıl sökücü materyaller bulmaya itmiştir. Alternatif haşıl sökücü bu materyaller ise, farklı kaynaklı ve özellikteki  $\alpha$ -amilaz enzimleridir. Bu çalışmada, buğday nişastası enzimatik hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Biyokatalitik bir reaksiyon olan bu hidroliz reaksiyonu modüler bir biyoreaktör sisteminde gerçekleştirilmiştir. pH, sıcaklık, enzim miktarı, viskozite, karıştırıcı hızı, hidrolizat ilavesi ve zamana karşılık, hidroliz derecesinin ve  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Dolayısı ile maksimum verim sağlanabilmesi amacı ile proses parametreleri optimize edilmiştir. Analizler spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi ve nişasta konsantrasyonuna ait elde edilen deneysel veriler kullanılarak matematiksel modeller kurulmuştur. 60°C sıcaklık, 300 rpm karıştırıcı hızı ve pH 6.5 olarak belirlenen optimum proses şartlarında 2.5 ml/l enzim ilavesi ile yapılan hidroliz işlemi sonunda,  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesini %48.01 kaybettiği ve buğday nişastasının hidroliz derecesinin %39.82 olduğu bulunmuştur.

## ABSTRACT

Nowadays, over one hundred enzymes are used by different industry. In the textile industry, using size materials is a necessary process before weaving for being strengthened threads during weaving. Chemical materials, which are able to remove starch sizes from textiles, are harmful for fabrics and environment so it forced the manufacturer to find alternative desizing materials. These alternative desizing materials are  $\alpha$ -amylase enzymes which have been produced from different sources and have different properties. In this study, wheat starch is used for the enzymatic hydrolysis. This hydrolysis reaction which is a biocatalytic reaction was performed in a modular bioreactor system. The degree of hydrolysis (%) and  $\alpha$ -amylase activity (%) were investigated versus pH, temperature, viscosity, amount of enzyme solution added, stirred rate, amount of hydrolysate added and time. The process parameters were optimized for obtaining maximum efficiency. Analyses were made by spectrophotometric method. The mathematical models are also derived by using the experimental data of both enzyme activity and starch concentration. The optimum conditions have been determined as temperature 60°C, stirred rate 300 rpm and pH 6.5. After hydrolysis of wheat starch by addition of 2.5 ml/l enzyme solution in determined conditions,  $\alpha$ -amylase enzyme has lost its activity 48.01 % and the hydrolysis degree of wheat starch have been found as 39.82 %.

## 1. GİRİŞ

Biyoteknolojinin son 20 yıldır yaşantımız içerisine girmesi endüstriyel alanda bir çok avantajlar sağlamıştır. Biyoteknolojik proseslerde kullanılan tekniklerin, endüstriyel tekniklerden daha ekonomik ve güvenilir olmaları ise en büyük özelliklerindedir.

Günümüzde çevre ve insan sağlığının ön plana çıkması, biyolojik katalizörler olarak adlandırılan enzimlerin kullanımını arttırmaktadır. Kimyasal katalizörlerden daha etkili olmaları, biyolojik olarak parçalanmaları ve düşük maliyetli prosesler gerektirmeleri, kullanıcı için büyük önem arz etmektedir. Türkiye ekonomisinde önemli bir yeri olan tekstil endüstrisi de bir çok uygulamada enzimleri tercih etmektedir. Bu uygulamaların başlıcaları şöyledir:

- Haşıl sökme
- Peroksit kasarı
- Denim (taş) yıkama
- Tüy giderme
- İndigo ağartma
- Ham ipek ağartılması
- Atık su arıtımı

Enzimatik reaksiyonlar ile pamuklu dokumalarda kalitenin yükseltilmesiyle yumuşaklığın artırılması ve pürüzsüz, düzgün bir dokuma yüzeyi elde edilmesinin yanısıra, enerji tasarrufu, kolay uygulanabilirlik, tehlikeli kimyasalların kullanılmasına gerek kalınmaması, çıkan ürünlerin doğada kolay parçalanabilir ve tehlikesiz olması enzimlerin tercih edilmelerinin başlıca sebeplerindedir.

Haşıl sökme prosesinde, nişastayı suda çözünür hale getiren  $\alpha$ -amilaz enzimi, nişasta makromoleküllerini parçalarken selüloz ve diğer liflere hiç bir şekilde zarar vermediğinden en güvenli haşıl sökme maddesidir (Oltulu vd., 1999).

Enzimlerin bu kadar avantajlı olarak kullanılabilirlikleri bazı faktörlere bağlıdır. Özellikle kullanıcıların enzimler hakkında bilinçli ve eğitilmiş olmaları gerekmektedir. Örneğin; enzimlerin depolama şartlarına dikkat edilmesi, aşırı sıcaklık ve donmalara karşı korunmaları gerekmektedir.

Enzim üretim ve saflaştırma yöntemlerinin yanısıra, her enzim için farklı olan optimum çalışma şartları belirlenmelidir.

Bu çalışmada öncelikle Bölüm 2’de Enzimler başlığı altında enzimler hakkında genel bilgi verilmekte, Bölüm 3’de kullanılan  $\alpha$ -amilaz enziminin yapısı ile endüstriyel uygulamaları anlatılmakta, Bölüm 4’de ise nişasta ve yapısından bahsedilmektedir. Deneysel çalışma hakkındaki bilgiler ise Bölüm 5’de Materyal ve Yöntemler başlığı altında kullanılan maddeler, cihazlar ve tayin yöntemleri ile Bölüm 6’da Araştırma Bulguları başlığı altında yer almaktadır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen denklemler temel alınarak hidroliz işlemi sonucunda elde edilen deneysel veriler kullanılarak matematiksel modeller kurulmuştur. Bölüm 7’de ise deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar özetlenmektedir.



## 2. ENZİMLER

### 2.1 Enzim Nedir?

Canlıların metabolizma süreçlerindeki biyokimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için, her biri belirli tip bir tepkimede katalizör işlevi gören karmaşık yapıları proteinlerdir.

Yaşamın devam etmesi için enzimlerin varlığı gereklidir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmaların hücrelerinde gerçekleşen karmaşık ve birbirleriyle bağlantılı kimyasal tepkimelerin hemen hepsi enzimlerce denetlenir. Üreme, sindirim ve solunum süreçlerinden görme olayına kadar pek çok işlevin yerine getirilmesinde rol oynayan enzimler bütün canlı hücrelerde bulunur. Her enzim tek bir kimyasal tepkime türüne özgü olduğu için, canlı karmaşıklaştıkça hücredeki enzim sayısı da artar. Örneğin; ortalama büyüklükteki bir memeli hücresinde 3000 kadar enzim bulunur. Bazı enzimler vücudun bütün hücrelerinde, bazıları yalnızca belirli hücrelerde bulunur, bir bölümünde ancak gerektiği zaman üretilir.

### 2.2 Enzimlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

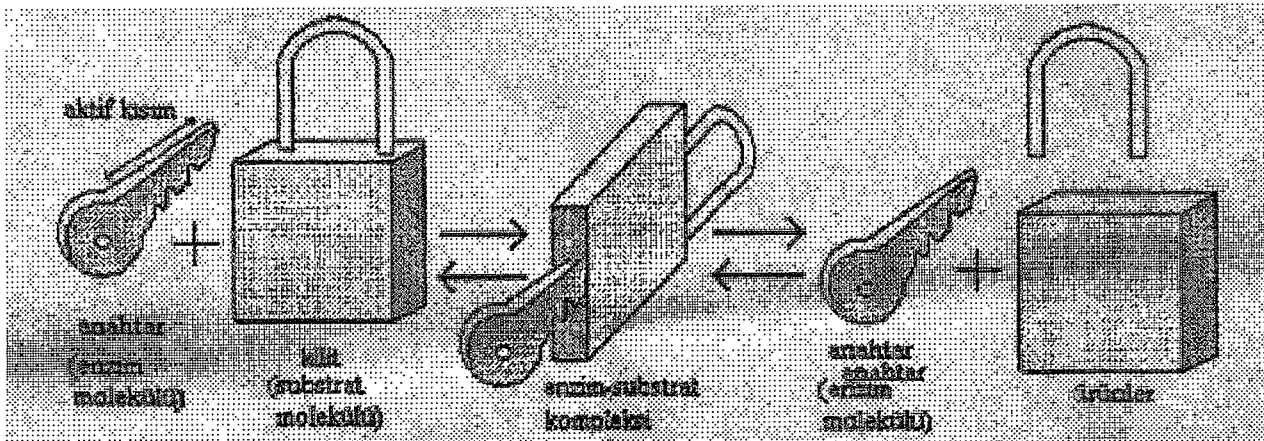
20. yüzyılın başlarına kadar enzimlerin kimyasal yapısı hakkında çok az şey biliniyordu. Kristalleştirilen ve protein yapısında olduğu belirlenen ilk enzim 1926 yılında üreaz olmuştur. Bir kaç yıl içinde, pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi sindirim enzimlerinin protein yapısı da kanıtlanmıştır.

Bütün proteinler gibi enzimlerde aminoasit zincirlerinden oluşan büyük moleküllerdir. Tek bir aminoasit zincirinden oluşan bazı enzimler dışında, hemen hepsinin molekülünde iki, dört yada altı zincir bulunur. Alt birim denen bu zincirlerin sayısı bazı dev molekülü enzimlerde 60'a kadar çıkabilir. Enzimlerin bir kısmı yalnızca proteinlerden oluştuğu halde, birçoğunda protein yapısındaki bileşenin yanısıra demir, bakır yada magnezyum gibi bir metal iyonu yada koenzim denen ve protein yapısında olmayan organik bir molekül bulunur. Bu tamamlayıcı bileşen ya metal iyonlarında olduğu gibi enzimin katalizleyici etkisini artırır, yada koenzimlerde olduğu gibi enzimle birlikte tepkimeye katılır.

### 2.3 Enzimlerin Etki Mekanizması

Her enzimin katalizleyici etkisi yalnızca bir tip tepkimeye ve yalnızca belirli türden maddelere özgüdür. Enzimin etki ettiği bu maddeye ise substrat denir (Çetin, 1983).

Enzimlerin molekül ağırlığı milyonlar, substratın ise genellikle yüzler basamağında olduğundan, bu iki molekül karşılaştığında enzimin ancak bir bölümü substrata rastlar; iki bileşiğin birbirine temas ettiği bu bölgeye aktif bölge denir. Bir enzimin tanıtıcı özellikleri, o enzimin aktif bölgesinin yapısından, dolayısıyla hangi tip substrata etki edebileceğini belirleyen aminoasit dizilişinden kaynaklanır. Bir enzim, karşılaştığı substratı fiziksel yada kimyasal kuvvetlerle aktif bölgesine doğru çeker; bütün katalizörler gibi kimyasal tepkimeyi başlatır, ama kendisi tepkimeye katılmaz. Oluşan tepkime ürünlerini hemen yüzeyinden uzaklaştırır. Enzim tepkimelerinin çoğunda, enzim ile substrat arasında kimyasal bağ kuran bir ara ürünün oluşması gerekir. Kararsız olan bu madde hızla parçalanarak tepkime ürünlerini oluştururken, enzim diğer substrat moleküllerini etkilemek üzere serbest kalır. Enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerin üç boyutlu yapısının, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin, bu bölgeye doğru çekilen substratın enzime uygun olup olmadığını, enzimin aktif bölgesine tam yerleşip yerleşemeyeceğini belirledikleri sanılmaktadır. Enzimin yalnızca belirli tipden substratlara özgü olmasının “Anahtar-Kilit modeli” gibi olduğu Alman kimyacı Emil Fisher tarafından savunulmuştur. Çekim gücü az olan bir molekül aktif bölgeye tam uymayacak, dolayısıyla enzimle tepkimeye giremeyecektir.



Şekil 2.1 Anahtar-Kilit modeline göre enzimin etki mekanizması

## 2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

Pepsin, tripsin, trombin gibi birkaç enzim dışında, bütün enzimlerin adı “-az” son ekiyle biter. Eskiden bu son ek, enzimin etkidiği substratın türünü gösteren bir köke eklenirdi; günümüzde ise enzimlerin sistematik sınıflandırılmasında ve adlandırılmasında, katalizledikleri tepkime tipi temel alınır. Bu sistemde enzimler, özgün tepkimelerine göre altı ana grub şeklinde sınıflandırılmıştır:

- a) **Oksiredüktazlar:** İndirgenme ve yükseltgenmeyi sağlayan enzimlerdir. (Örneğin, katekolaz, katalaz, dehidrojenaz vb.)
- b) **Transferazlar:** Amin gruplarının transferini yapan enzimlerdir. (Örneğin, glikokinaz, fosforilaz, dekarboksilaz vb.)
- c) **Hidrolazlar:** Hidrolizlemeyi katalizleyen enzimlerdir.
  - Proteazlar (pepsin, tripsin, kimotripsin)
  - Esterazlar ve Lipazlar (pektin esteraz, pankreatik lipaz)
  - Karbohidrazlar (laktaz, sakkaraz,  $\alpha$ -amilaz, selülaz)
  - Fosfatazlar (lesitinaz-c)
  - Amidazlar (ürez)
- d) **Liyazlar:** Küçük moleküllerin parçalanmasını sağlayan enzimlerdir. (Örneğin, aldolaz vb.)
- e) **İzomerazlar:** Grupların yerini değiştirerek izomerizasyon yapan enzimlerdir. (Örneğin, glikoz izomeraz, mutarotaz vb.)
- f) **Ligazlar:** Enerji kullanarak molekülleri birbirine bağlayan enzimlerdir. (Örneğin, amidsintetaz)

## 2.5. Enzim Üretim Yöntemleri

Bitkisel, hayvansal ve mikroorganizmalardan elde edilen enzimler hücrede buldukları yere göre de ikiye ayrılmaktadır.

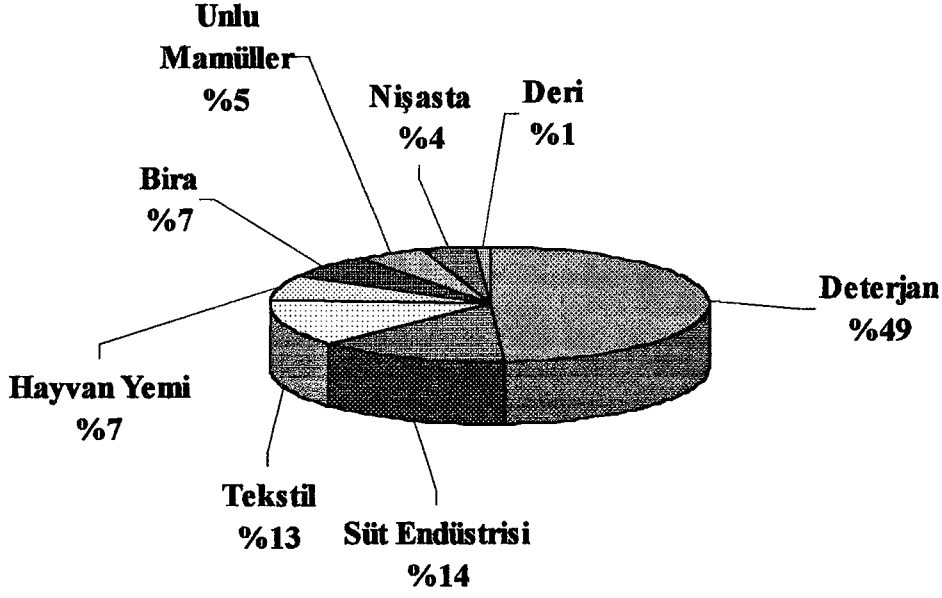
- **Hücre dışı enzimler:** Hücreler tarafından dışarı salgılanan enzimlerdir. Elde edilişleri kolay olduğundan endüstride kullanım alanları daha yaygındır. İleri saflaştırma işlemleri gerektirmediklerinden daha ekonomiktirler.
- **Hücre içi enzimler:** Hücre yapılarına sıkıca bağlı olan ve dışarı salgılanmayan enzimlerdir. Elde edilmeleri ve saflaştırılmaları için ek prosesler, örneğin; hücre zarının parçalanması için kimyasal yada mekaniksel işlemler gerektirirler.

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin elde edilmesinde iki yöntem kullanılmaktadır:

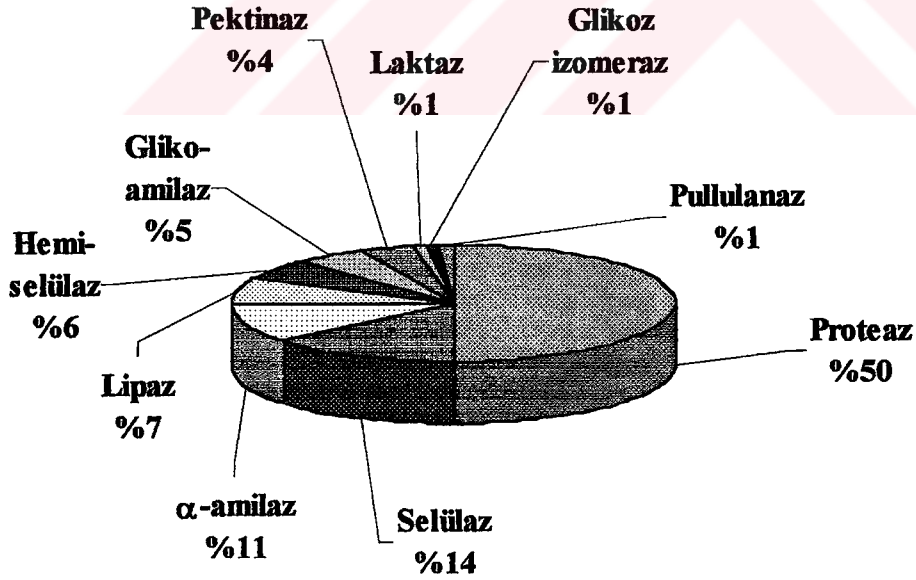
- **Katı besi ortamında kültürleme:** Buğday kepeği, tampon maddeler ve gerekli besin maddeleri su ile bulamaç haline getirildikten sonra derinliği az geniş tavalara yerleştirilir. Aşı tankından alınan kültür mikroorganizmalar bu besiyeri üzerine ekilir. Odalara hava gönderilerek işleme belli bir süre devam edilir. Üreme sonunda istenilen mikroorganizmanın bulunduğu karışım bir tampon çözelti ile ekstrakte edilir. Filtrasyon ile katı partiküllerinden ayrılan enzim çözeltisi konsantrasyonu artırıldıktan sonra sıvı halde yada kuru enzim haline getirilerek içerisine koruyucu maddeler ilave edilerek saklanır.
- **Sıvı ortamda derin kültürleme:** Mikroorganizmalar aşı tankından 20-250 m<sup>3</sup> hacmindeki biyoreaktöre glikozlu besin maddesi ve diğer yardımcı maddeler katılarak havalı ortamda üremeye bırakılır. Üreyen mikroorganizmaların salgıladığı enzimler çözeltiliye geçer. Çözeltideki enzim çeşitli çöktürme ve saflaştırma yöntemlerinden geçirilerek kuru halde saklanır (Çetin, 1983).

## 2.6 Enzimlerin Uygulama Alanları

Teknolojinin gelişmesi ve çevre duyarlılığının artmasıyla enzimlerin endüstride kullanım alanları hızlı bir şekilde artmaktadır (Şekil 2.2). Kimyasal katalizörlere göre katalizleme güçlerinin fazla olması ve enzimatik reaksiyonların kimyasal reaksiyonlar gibi yüksek sıcaklık ve basınç gerektirmediğinden ekonomik ve pratik olmaları ise diğer bir avantajlarıdır. Çeşitli sanayi dallarında kullanılan enzimler Şekil 2.3'de ayrıca verilmiştir.



Şekil 2.2 Dünyada 1995 yılı itibariyle enzimlerin en çok kullanıldığı sanayi dalları (Mountain vd., 1999)



Şekil 2.3 Dünyada 1995 yılı itibariyle en çok kullanılan enzimler (Mountain vd., 1999)

Enzimlerin uygulama alanları ise Şu Şekilde sıralanabilir:

- Kimyasal Üretim
- Biyokimyasal Analizler
- Metabolik Sistemlerin Tedavisi
- Biyokimyasal Ayırmalar
- Yakıt Pilleri
- Afinite Kromotografisi
- Enzim Modelleri
- Çevre Kirliliği
- Tek Hücre Proteini Sentezi



### 3. $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİ ve ÖZELLİKLERİ

#### 3.1 Amilaz Enzimleri

Amilaz enzimleri, hidrolazlar grubunda, glikozidik bağlarını parçalayan karbohidrazlar alt grubunun üyeleridir. Polisakkaridazlar olarak da adlandırılırlar. Amiloz, amilopektin, glikojen ve maltooligasakkaridlerdeki  $\alpha$ -(1,3), (1,4), (1,6) glikozidik bağlarını hidrolizleyen geniş bir ailedir. Önemli bir polisakkarit olan nişastayı parçalarlar (Moseley ve Keay, 1970). En yaygın olarak kullanılan üç tip amilaz enzimi vardır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Amilaz Enzimleri

Adı	Sınıf numarası	Sistemik adı
$\alpha$ -Amilaz	EC 3.2.1.1	$\alpha$ -1,4-glukan 4-glukanohidrolaz
$\beta$ -Amilaz	EC 3.2.1.2	$\alpha$ -1,4-glukan maltohidrolaz
Gliko amilaz	EC 3.2.1.3	$\alpha$ -1,4-glukan glukohidrolaz

##### 3.1.1 $\alpha$ -Amilaz

$\alpha$ -Amilaz birçok hayvan ve bitki ürünü olarak doğaya oldukça geniş bir şekilde yayılmıştır.  $\alpha$ -Konfigurasyonlu oligasakkarid üreten tipik bir hidrolazdır.  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağlarını hidrolizler.  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlarına etki edememesine rağmen küçük dallanmış ürünler üretir. Reaksiyon yavaş olup maltoz, maltotrioz, glikoz ve bazı oligomerik dekstrinler oluşturur (Suzuki vd., 1989; Violet ve Meunier, 1989; Dordick, 1991).

##### 3.1.2 $\beta$ -Amilaz

Mayalardan, küflerden, bakterilerden ve bitkilerin özellikle tohumlarından elde edilir. Nişastanın indirgenmeyen moleküllerine etki eder.  $\alpha$ -Amilaz gibi  $\alpha$ -(1,4) bağlarını hidrolizler. Son ürün olarak maltoz ve  $\beta$ -limit dekstrinler oluşturur.

##### 3.1.3 Gliko Amilaz

Diğer amilazlardan farklı olarak  $\alpha$  - (1,3) ve  $\alpha$  - (1,6) glikozidik bağlarını da hidrolizler.

Nişastadan, glikoz monomerleri oluştursa da, bunun için diğer amilazların varlığına ihtiyaı vardır. Özellikle saf glikoz istenildiği durumlar için gliko amilaz ve  $\alpha$ -amilaz ardışık işlem olarak kullanılır (Roehr, 1996).

### 3.2 $\alpha$ -Amilazın Kimyasal Yapısı

$\alpha$ -Amilazın fizikokimyasal özellikleri ve etki mekanizması enzimin üretildiği kaynağa göre değişiklik gösterir (Whistler vd., 1964).  $\alpha$ -Amilaz enziminin içerdiği aminoasitler ve aminoasit kompozisyonu (Wiseman 1979), izelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2  $\alpha$ -Amilaz enziminin aminoasit kompozisyonu (Wiseman 1979)

Aminoasit adı	Mol miktarı (mol aminoasit/mol protein)
Aspartik asit	51
Treonin	21
Serin	33
Glutamik asit	31
Prolin	9
Glisin	26
Alanin	28
Valin	16
Metiyonin	5
İzolösin	19

Memelilerden ve tahıllardan elde edilen  $\alpha$ -amilazlar üzerinde oldukça geniş araştırmalar yapılmış olmasına rağmen bakteri kaynaklı  $\alpha$ -amilazlar daha çok ticari önem kazanmıştır. Endüstriyel boyutta üretilen  $\alpha$ -amilazlar birbirinden optimum çalışma pH ve sıcaklık aralığı, ısı stabilitesi ve moleküler ağırlıklarıyla ayrılırlar (Tomazic ve Klivanov, 1988; Bealin-Kelly vd., 1991). Çizelge 3.3'de farklı kaynaklı  $\alpha$ -amilazların moleköl ağırlıkları (Dordick, 1991) verilmiştir.

Çizelge 3.3 Farklı kaynaklı  $\alpha$ -amilazların moleköl ağırlıkları (Dordick, 1991)

Enzim kaynağı	Moleküler ağırlık (gram/mol)
Malt	59000
Pankreas	45500
Bacillus Licheniformis	22500
Bacillus Acidocaldarius	68000
Bacillus Subtilis	41000
Bacillus Amyloliquefaciens	49000

Endüstride en çok kullanılan  $\alpha$ -amilazlar malt, pankreatik, fungal, bakteriyel ve ısıya dayanıklı bakteriyel kaynaklı olabilmektedirler. Çizelge 3.4'de ise farklı kaynaklı  $\alpha$ -amilazlara ait bazı özellikler (işlem sıcaklığı, işlem pH'ı, inhibitör ve aktivatör gibi) verilmiştir (Godfrey ve Reichelt, 1983).

Çizelge 3.4 Farklı kaynaklı  $\alpha$ -amilazların bazı özellikleri (Godfrey ve Reichelt, 1983)

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

### 3.3 $\alpha$ -Amilazın Etki Modeli

*Bacillus amyloliquefaciens* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz, en çok araştırılan enzimdir. Bu enzim çözünebilir nişastayı, amilozu, amilopektini ve glikojeni çözer. Amiloz ve amilopektin hidrolizi başlangıçta çokça maltoz, maltotrioz, maltohekzaoz, maltoheptaoz verir. Glikoz ve maltohexaoz oldukça yavaş oluşur. Glikojen hidrolizinde en büyük ilk ürün maltohexaoz ve maltoheptaoz daha sonra glikoz, maltoz ve en çok miktarda bulunan maltohekzaozdur.

*Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz ile nişastanın hidrolizinde başlangıçta yüksek molekül ağırlıklı oligosakkaritler, daha sonra maltopentaoz, maltotetraoz, maltotrioz, maltoz ve glikoz oluşur.

*Bacillus Steorothermophilus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz, eşit miktarda maltoz, maltotrioz, maltotetraoz ve maltopentaoz oluşturur.

*Bacillus Coagulans* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz oligosakkaritler, maltotetraoz, maltotrioz, maltoz ve glikoz oluşturur.


Diğer bir grup hidrolizleyici enzimler ise fungal kaynaklı  $\alpha$ -amilazlardır. *Aspergillus oryzae* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz ticari olarak günümüzde daha çok kullanılmaktadır (Dordick, 1991). Reaksiyon ürünleri maltoz gibi disakkaritlerdir. Gliko amilazla beraber kullanıldığında diğer  $\alpha$ -amilazlardan daha çok glikoz üretir (Wang, 1999).

### 3.4 $\alpha$ -Amilazın Endüstriyel Uygulamaları

Tahıl nişastasının sıvılaştırılmasında kullanılan  $\alpha$ -amilazın teknik uygulaması oldukça yaygındır. Gıda, yakıt, tekstil ve deterjan gibi değişiklik gösteren endüstri dallarında gün geçtikçe artan miktarlarda kullanılmaktadır.

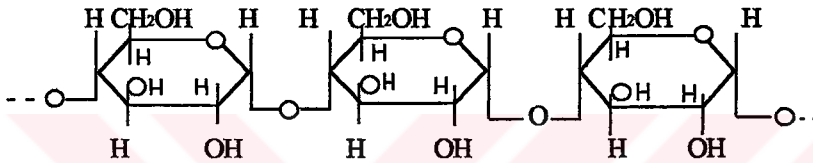
$\alpha$ -Amilazın başlıca kullanım alanları ise şöyledir (Atkinson ve Mavituna, 1991);

- Hamur viskozitesinin düşürülmesi

- Ekmeğin yapısının ve görünüşünün iyileştirilmesi
  - Alkollü içecek üretimi
  - Çikolata üretiminde şurup eldesi
  - Bebek gıdalarının hazırlanması
  - Şeker eldesi
  - Kumaşlardan haşıl sökme
  - Püre ve çorbaların sıvılaştırılması
  - Glikoz şurubu eldesi
  - Bira üretimi
  - Deterjan üretimi
  - Duvar kağıdı üretimi
- 

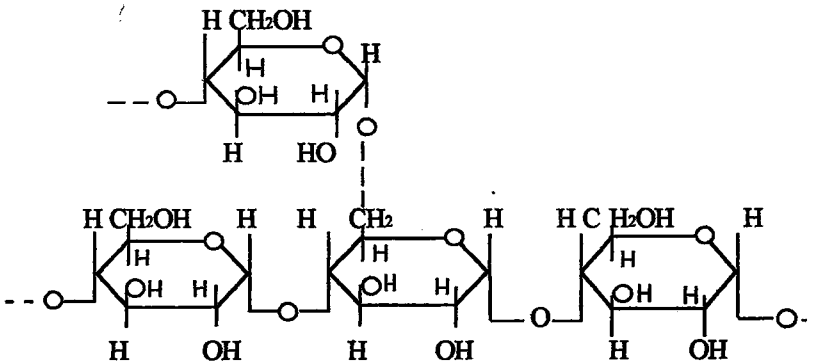
#### 4. NİŞASTA ve YAPISI

Nişasta, biyopolimerlerin önemli bir alt sınıfı olan bir polisakkarittir. Yapı birimi D-glikoz olup kapalı formülü  $(C_6H_{10}O_5)_n$  şeklindedir. Bitkilerin kök, tohum ve yumrularında mikroskopik tanecikler şeklinde yer alır. Taneciklerin boyut ve biçimi elde edildiği kaynağa göre değişiklik gösterir. Buğday, mısır, patates ve pirinç önemli kaynaklarındandır. Nişasta, moleküler ağırlığı ve kimyasal yapısı farklı iki tip polimerden oluşmuştur. Nişasta molekülünün %10-20'sini amiloz adı verilen suda çözünen kısım ve %80-90'ını amilopektin olarak bilinen suda çözünmeyen kısım meydana getirir. Lineer bir polimer olan amiloz, D-glikoz birimine  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağlarıyla katılmış uzun bir zincirden ibarettir. şekil 4.1'de amiloz molekülünün açık formülü verilmiştir.



şekil 4.1 Amiloz molekülü

Dallanmış polimer olan amilopektin, glikoz biriminin normal zincirine ek olarak  $\alpha$ -(1,4) bağlantılarıyla bağlanmıştır ve kenar zincirler ana zincire  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlarıyla katılmışlardır (Fujii vd., 1988). şekil 4.2'de amilopektin molekülünün açık formülü verilmiştir.



şekil 4.2 Amilopektin molekülü

Nişasta, genellikle oda sıcaklığında suda çözümez. Bu sebepten dolayı doğada hücrelerde mikroskop altında görülebilen küçük granüller halinde depolanır. Nişasta granülleri aynı ve komşu moleküller arası oluşan hidrojen bağları sebebiyle su ve hidrolitik enzimlerle penetrasyona oldukça dirençlidir. Nişastanın sulu süspansiyonu ısıtıldığında hidrojen bağları zayıflar, su absorblanır ve nişasta granülleri şişer. Ortamın yüksek viskozitesi sebebiyle bu proses jelatinizasyon olarak adlandırılır.

Nişasta parçalanması prosesinin ürünleri dekstrin, maltotrioz, maltoz ve glikozdur. Dekstrin ara glikozidik bağların rastgele hidrolizi sebebiyle parçalanmış nişastanın kısa segmentleridir. Nişasta molekülü, reaksiyon sonunda üçlü bağ olarak parçalanırsa bir moleköl maltotrioz, ikili bağ olarak parçalanırsa maltoz, her bağ parçalanırsa glikoz oluşur (Wang, 1999).

Nişastanın endüstride çok amaçlı kullanılabilir bir madde olmasını sağlayan en önemli özelliği, glikoz birimleri arasındaki bağların asitler veya enzimlerle hidrolizidir. Nişasta depolimerizasyonu özellikle tatlandırıcı üretiminde önemli bir proses olarak gelişmiştir (Park ve Rollings, 1994).

#### 4.1 Nişasta Sıvılaştırılmasında $\alpha$ -Amilaz

Gıda ve yakıt endüstrisinde doğal nişastadan önemli hammaddelerin hazırlanmasında ilk adım nişastanın sıvılaştırılmasıdır. Nişasta sıvılaştırılması yüksek fruktozlu mısır şurubu üretim prosesinin önemli bir kısmıdır (Mountain vd., 1999).

Nişasta hamuru 60°C üzerine ısıtılır ve nişasta tanelerinin şişmesi ve bozulması sağlanır. Sıcaklık nişasta kaynağına göre değişiklik gösterir. Mesela mısır nişastası için 105-110°C'dir. Jelatinleşmiş nişastanın viskozitesi oldukça yüksektir ve bu yüzden viskozite düşürücü madde kullanımı gerektirir. Bu madde nişastayı kısmen hidrolizler. Çözeltinin viskozitesi düşürüldüğünden proses sıvılaştırma olarak adlandırılır. Genellikle viskozite düşürücü maddeler olarak asitler kullanılır. Ancak istenmeyen ürün ve renk oluşması ile elde edilen şurubun yüksek oranda tuz içermesi asit proseslerinin başlıca sakıncalarındandır. Bu sebepten dolayı  $\alpha$ -amilaz enzimleri daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Pye ve Wingard, 1973).

## 4.2 Tekstil Endüstrisinde $\alpha$ -Amilaz

### 4.2.1 Haşılama işlemi

Modern tekstil üretim proseslerinde dokuma esnasında çözgüde oldukça fazla gerilme meydana gelir. İpliğin bu gerilme esnasında kırılmaya karşı korunması gerekir. Bu amaçla iplik üzerine uzaklaştırılabilir koruyucu katmanlar uygulanır ki, dokuma işleminden önce yapılan bu hazırlık işlemine haşılama adı verilir. Amaç dokuma esnasında oluşacak yıpratıcı kuvvetlerden iplikleri korumak için ipliklerin kayganlaştırılması ve güçlendirilmesidir. Haşıl katmanlar için kullanılan malzemeler iki grupta toplanırlar (Oltulu vd., 1999).

- Doğal kaynaklı haşıl maddeleri:** Nişasta, dekstrin (düşük molekül ağırlıklı polisakkaritler karışımı), metil selüloz, karboksi metil selüloz, jelatin ve tutkal gibi maddelerdir.
- Yapay haşıl maddeleri:** Polivinil alkol, poliakrilat, polistrien, maleik asit kopolimerleri gibi uzun zincirli yapay kimyasal maddelerdir.

### 4.2.2 Haşıl sökme işlemi

Haşılanmış kumaşın emiciliğinin az olmasından dolayı, dokumadan sonra haşıl sökme prosesi olarak adlandırılan aşamada bu haşılın kumaşdan uzaklaştırılması gerekir. Boyanın kumaşa iyi absorblanması için bu işlem oldukça önem taşımaktadır. İyi bir haşıl maddesi olarak kolayca uzaklaştırılan maddeler tercih edilirler. Nişasta en uygun haşıl maddesidir, ucuzdur ve kaynağı oldukça boldur. Suda çözünmemesine karşı kolay uzaklaştırılır. Suda çözünebilir haşıllar sıcak su ve deterjanlı yıkama ile uzaklaştırılabilir. Haşıl sökme için asitler, bazlar ve oksidleyici ajanlar kullanılmaktadır. Basınçlı pişirme işlemleri gerektirdiklerinden işlem esnasında kumaşın yapısı zarar görmektedir.

Tekstil fabrikalarının çoğu nişastayı hidrolizlemek ve çözündürmek için amilaz enzimlerini kullanmakta ve bunu yaparken kumaşa hiç zarar vermemektedirler (Godfrey ve Reichelt, 1983). Diğer avantajları ise farklı proseslerde çalışma olanağı, enerji tasarrufu, kolay

uygulanabilirlik, tehlikeli kimyasalların kullanılmasına gerek kalınmaması, çıkan ürünlerin doğada parçalanabilir ve tehlikesiz olmasıdır.

#### 4.2.2.1 $\alpha$ -Amilaz ile haşıl sökme işlemi

Kimyasal yöntemlerle haşıl sökme sonrası ortaya çıkan atık su kirliliği, kumaş üzerindeki mukavemet kayıpları, daha çevreci ve performansı yüksek olan enzimatik yöntemin kullanımını gerektirmiştir. Bundan dolayı, nişastalı haşılların  $\alpha$ -amilaz ile uzaklaştırılması büyük bir başarıdır.

Enzimlerle yapılan nişasta parçalanmasında son ürün olarak çoğunlukla maltoz ve az miktarda glikoz meydana gelir. Nişasta makromoleküllerinin tamamıyla parçalanması gerekli değildir. Makromoleküllerin su ile dispersiyon oluşturarak kumaşdan yıkama sonunda uzaklaşabilecek kadar parçalanması yeterlidir. Örneğin;  $\alpha$ -amilaz nişastayı dekstrine ve diğer suda çözünür ürünlere dönüştürür. Benzer bir proses, haşıl olarak kullanılan polivinil alkolün enzimatik olarak parçalanmasında da kullanılmaktadır (Mori vd.,1997).

Haşıl sökme prosesi genel olarak dört adımda gerçekleşir:

- Ön yıkama
- Enzimatik yıkama
- Sıcak su ile yıkama
- Durulama

Kumaşlar ilk olarak haşıl sökme için ön yıkamaya tabii tutulurlar. Ön yıkama esnasında, kumaş su ile doyurulur ve suda çözünen katkı maddelerinin uzaklaştırılması sağlanır.

Ön yıkanmış kumaş ikinci adım olarak enzim çözeltisi ile muamele edilir. Kumaş nişasta hidrolizi için enzimle iyice doyurulur. Sıcaklık, kullanılan  $\alpha$ -amilazın optimum çalışma sıcaklığında olmalı ve enzimin direkt olarak buharla temas edilmesinden kaçınılmalıdır. Hidroliz işlemi bu aşamada başlar. Kesikli olan prosesde uygulanan pH ve sıcaklığa göre işlem 0.5-16 saat

aralığında sürer. Sürekli hidroliz işlemi ise daha kısadır.  $\alpha$ -Amilaz için 1-4 saat, ısıya dayanıklı  $\alpha$ -amilaz için 20-60 saniyedir (90-110°C).

$\alpha$ -Amilaz hidroliz ürünlerini mümkün olduğu kadar uzaklaştırmak için kumaş deterjan ve sodyum klorit ilave edilerek sıcak su ile yıkanır. Durulama tüm yabancı maddeleri kumaşdan uzaklaştırmak için yapılan son işlemdir. Bundan sonra kumaş diğer prosesler için hazır hale gelir (Mountain vd., 1999).

### 4.3. $\alpha$ -Amilaz ile İlgili Çalışmalar

Hidroliz işlemi katalizleyecek alternatif teknolojilerin olmaması endüstride amilaz enzimlerinin önemini daha çok arttırmıştır. Bundan dolayı, kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi araştırmacıların ilgisini çeken bir konu olmuştur.

Özellikle ısıya dayanıklı *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz ile birçok çalışmalar yapılmıştır (Saito ve Yamamoto, 1975; Rothstein vd., 1986; De Cordt vd., 1992). *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilazın en yüksek aktiviteye pH 5.9'da sodyum ve potasyum fosfat tamponu kullanıldığında (2 ml enzim ve çözünebilir nişasta) sahip olduğu belirtilmiştir (Salieri vd., 1995).

*Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz için pH 5.7'de optimum çalışma sıcaklığı 70°C (%0.5 mısır nişastası ve 4 mM kalsiyum iyonu ilave edildiğinde), *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz için ise 92°C olarak bulunmuştur. 95°C'de *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilazın aktivitesinin çok düştüğü gözlenmiştir. Tüm  $\alpha$ -amilazlar için belli miktarlarda kalsiyum iyonu ilavesinin kararlılığı artırdığı belirlenmiştir. Bu miktar 70°C'da pH 7.0'de *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz için 3.4 ppm iken aynı şartlarda *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz için 150 ppm olarak bulunmuştur. Hiç kalsiyum ilavesi olmadan *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilazın yarılanma ömrü 26 dakika, *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilazın ise 21 dakika olarak belirlenmiştir. *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz için 60°C ve pH 6 optimum değerler olarak bulunmuştur (Pye ve Wingard, 1973).

Üç farklı tip  $\alpha$ -amilaz aynı şartlar altında incelendiğinde, arpadan elde edilen  $\alpha$ -amilaz pH 4.5 ve 45°C'de en aktif enzim olarak bulunmuştur. 8 mg/ml enzim ve 30 mg/ml buğday nişastası kullanıldığında endüstriyel pişirme süresi olan üç saatlik bir süre sonunda, enzimin nişastayı %98 hidrolizlediği gözlenmiştir. pH 5.5 ve 26°C'de 3 mg/ml nişasta ve 8 mg/ml enzim kullanıldığında 6 saatlik işlem sonunda arpa, bakteriyel ve fungal kaynaklı  $\alpha$ -amilazların hidrolizledikleri nişasta konsantrasyonları sırasıyla %75, %95 ve %30 olarak bulunmuştur. Arpa kaynaklı  $\alpha$ -amilazın bakteri kaynaklı  $\alpha$ -amilazdan çok daha ucuz olması uygun enzim olarak seçilmesini sağlamıştır. Fakat hidrolizleme sonunda fungal kaynaklı  $\alpha$ -amilazın daha fazla glikoz oluşturduğu gözlenmiştir. Granüllerin %16'sının çok hızlı olarak 1.dereceden, %84'ünün ise yavaş olarak Michaelis Menten modeline uyduğu belirtilmiştir (Textor vd.,1998).

Ayrıca arpa kaynaklı  $\alpha$ -amilaz (8 mg/l) ve buğday nişastası (30 g/l) ile yapılan çalışmada pH 5.5 ve 45°C'de %1.1 hızla deaktive olduğu, 55°C'de bu hızın dahada arttığı, oluşan glikoz ve maltozun hem bakteriyel hemde arpa kaynaklı  $\alpha$ -amilazın katalitik etkisini inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı proses şartlarında (pH 5.5 ve 45°C'de, 8 mg/l enzim ve 30 g/l nişasta kullanıldığında) ilave edilen 100 g/l glikozun enzimi %50 inaktive ettiği belirlenmiştir (Hill vd.,1997).

Buğdaydan elde edilen nişasta granüllerinin *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilazla enzimatik depolimerizasyonu elektron mikroskobu ile incelendiğinde tüm granüllerin verilen zamanda eşit olarak parçalanmadığı görülmüştür. Ayrıca enzim konsantrasyonunun hidrolize olan etkisi de incelenmiştir. 5 saat sonunda, 2  $\mu$ g/ml ve 189  $\mu$ g/ml enzim kullanıldığında hidrolizlemenin sırasıyla yaklaşık %21 ve %62 olduğu bulunmuştur. 189  $\mu$ g/ml enzim kullanımı ile 26 saat sonunda hidroliz derecesi %98 olarak tespit edilmiştir (Colonna vd., 1988).

Nişasta konsantrasyonunun hidrolize olan etkisi incelendiğinde, mısır nişastası ve *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz 95°C ve pH 6.0'da işleme tabi tutulmuş, yüksek nişasta konsantrasyonunda moleküllerinin viskoz etkiler sebebiyle serbestçe hareket edemediği ve bundan dolayı da reaksiyon hızının düştüğü gözlenmiştir. Viskoz etkilerin kütle transferini yavaşlattığı belirtilmiştir (Komalprasert ve Ofoli, 1991).

## 5. MATERYAL ve YÖNTEM

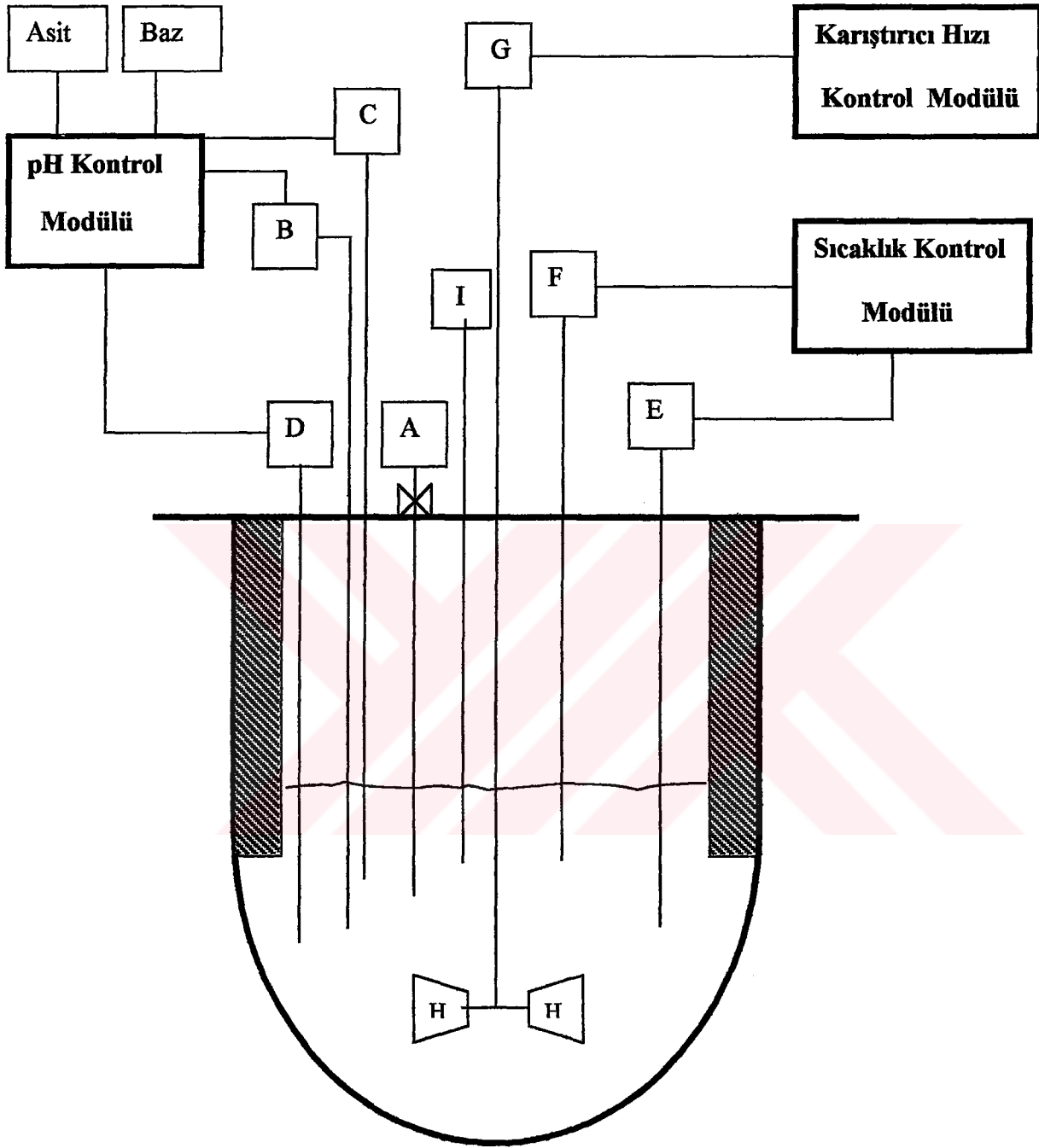
### 5.1 Kullanılan Materyaller

- Ticari  $\alpha$ -amilaz enzimi
- Buğday nişastası
- Çözünebilir nişasta
- Gliserin
- Kimyasal maddeler (%0.5 ve %15'lik  $I_2$  , %0.5 ve %5'lik KI, 5 M HCl, ve 50 mM  $CH_3COONa$ )
- Saf su

Buğday nişastasının hidroliz işleminde kullanılan  $\alpha$ -amilaz enzimi ticari bir enzim olup çözelti şeklinde GEMSAN Tekstil Yardımcı Kimyasalları A.Ş.'den sağlanmıştır. Bacillus Subtilis kaynaklı  $\alpha$ -amilaz (Gemsize 4A ,Yüksek aktiviteli haşıl sökme enzimi), (EC 3.2.1.1) çalışmalar süresince +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Aktivite tayininde kullanılan çözünebilir nişasta (Extra pure soluble starch, ürün no:101253) ve hidroliz için kullanılan nişasta (buğday nişastası, ürün no: 111685) ise Merck'den sağlanmış olup laboratuvar şartlarında saklanmıştır. Viskozitenin etkisini incelemek için yapılan deneylerde ise, çözeltinin viskozitesi gliserin ilavesi ile arttırılmıştır. Bu işlem için kullanılan gliserin (ürün no: 104093) ise yine Merck'den temin edilmiştir. Deneyler sırasında çözeltinin pH'ı 0.2 M KOH ve 0.2 M HCl çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır.

### 5.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, Sanyo Gallenkamp firması tarafından üretilen modüler biyoreaktör sistemi (FER-195-010) kullanılmıştır. Bu sistem, bir biyoreaktör ile karıştırıcı hızı, sıcaklık ve pH kontrol modüllerinden oluşmaktadır. Ayrıca, enzim aktivite tayini için 40°C'ye ayarlanmış bir su banyosu ve örneklerin absorbans değerlerini okumak için de Shimadzu marka UV-150-02 çift ışıklı Spektrofotometre kullanılmıştır. Biyoreaktör ve kontrol modüllerinin şematik diyagramı Şekil 5.1'de verilmiştir.



A: Örnek alma kabı

B: Asit girişi

C: Baz girişi

D: pH elektrodu

E: Termistör

F: Isıtıcı

G: Motor

H: Karıştırıcı kanatlar

I: Termometre

▨: Engeller

⊗: Örnek alma vanası

Şekil 5.1 Biyoreaktör ve kontrol modüllerinin şematik diyagramı

### 5.2.1 Karıştırılmalı biyoreaktör

Kullanılan biyoreaktör, çelik kapaklı ve yuvarlak tabanlı pyrex cam bir reaktördür. Biyoreaktörün tüm parçaları ise paslanmaz çelikten yapılmıştır. Kapak üzerinde problemlerin yerleştirilmesi ve çeşitli ilavelerin yapılmasına elverişli toplam 15 tane değişik çaplarda girişler olup, kullanılmayan girişler silikon mantarlarla kapatılmıştır. Ayrıca, reaksiyon çözeltisinden örnek alınabilmesi için bir örnek alma vanası ve kabı mevcuttur. Karıştırma, çelik kapağa monte edilen bir karıştırıcı motor (65 W gücünde) ile gerçekleştirilmiştir. Karıştırıcı şaftında, tek, altı kanatlı, reaktör tabanından yüksekliği ayarlanabilir Rushton tipi bir karıştırıcı mevcuttur. Toplam reaktör hacmi 1 litre olup, çalışma hacmi olarak 0,5 litre hacim seçilmiştir. Biyoreaktör ile ilgili komponentler ve değerleri Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Biyoreaktör ile ilgili komponentler ve değerleri

Komponentler	Değerler
Reaktör hacmi	1 litre (yuvarlak tabanlı)
Reaktörün çalışma hacmi	0.5 litre
Reaktör iç çapı	11 cm
Reaktör dış çapı	12.1 cm
Reaktör yüksekliği	17 cm
Karıştırıcı palet tipi	6 kanatlı Rushton
Karıştırıcı palet sayısı	1
Karıştırıcı palet çapı	4.8 cm
Karıştırıcı kanat genişliği	1.4 cm
Karıştırıcı kanat yüksekliği	1.9 cm
Engel sayısı	4
Engel yüksekliği	13.5 cm
Engel genişliği	1.5 cm
Reaktör tabanından karıştırıcının yüksekliği	3 cm

## 5.2.2 Kontrol modülleri

Karıştırıcı hızı, sıcaklık ve pH'ın kontrolünü sağlamak üzere kullanılan kontrol modülleri ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

### •Karıştırıcı hızı kontrol modülü:

Karıştırıcı hızı 50-1000 rpm  
Karıştırıcı motor 65W , 24V dc

Karıştırıcı hızının kalibrasyonu bir takometre ile yapılmıştır.

### •Sıcaklık kontrol modülü:

Sıcaklık :15-80°C  
Doğruluk :±%1  
Isıtıcı tipi :dc rezistans  
Isıtıcı gücü :24V dc 100W  
Termistör tipi :Yarı iletken LM5DZ

Sıcaklık kontrol modülünün kalibrasyonu bir termometre yardımı ile yapılmış olup, deney sırasında reaktör içerisindeki sıcaklık bu termometre ile kontrol edilmiştir.

### •pH kontrol modülü:

pH :0-14 pH  
Doğruluk :±0,1 pH  
Elektrolit :AgCl ile doyurulmuş 4M KCl

pH modülünün kalibrasyonu, pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri ile sağlanmıştır.

### 5.3 Deneyin Yapılışı

%1 (g/100ml) nişasta içeren 500 ml saf su, reaksiyonun gerçekleştirildiği biyoreaktörde istenilen sıcaklık ve pH'a getirildikten sonra 2.5 ml/l enzim (Gemsan tarafından piyasaya çözelti olarak sunulan) ilave edilmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Üretici firma tarafından nişastanın hidrolizi için tavsiye edilen süre olan 30 dakika sonunda, çözeltiden alınan örnekler enzim aktivitesi ve nişasta miktarının tayini yapılmak üzere hazırlanmıştır. Örneklerin analizleri 5 kez tekrar edilmiş olup, elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır.

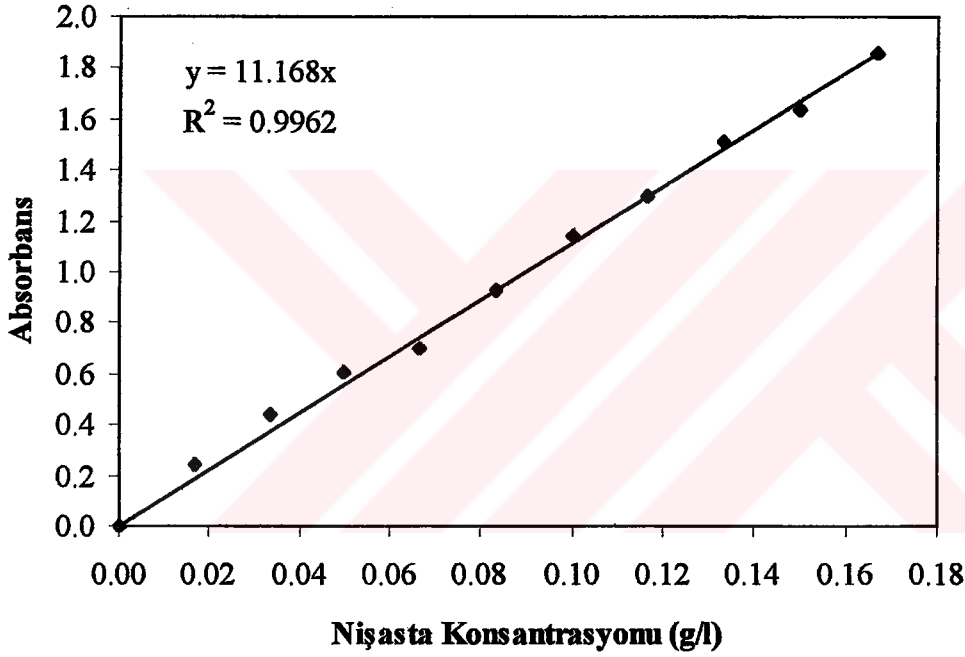
### 5.4 Analiz Yöntemleri

#### 5.4.1 Enzim aktivite tayini

$\alpha$ -Amilaz aktivite tayini için 200'ün üzerinde metod geliştirilmiştir (Oltulu vd., 1999). Ayrıca her metod için farklı aktivite birimi tanımlanmıştır (Yoo vd., 1987). Bu çalışmada,  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini De Moraes vd. (1995) tarafından belirtilen yönteme göre yapılmıştır. Substrat olan 0.2 g çözünebilir nişasta 100 ml kaynayan 50 mM sodyum asetat tampon çözeltisinde (pH=5.9) çözüldürülmüş ve en az 40°C'ye soğutulmuştur. Biyoreaktörden alınan reaksiyon çözeltisi, kağıt süzgeçten (589<sup>3</sup> Blue Ribbon 300211 Schleicher-Schuell) süzöldükten sonra ele geçen çözeltiden 200 µl'lik örnekler deney tüplerine alınmış ve bu örnekler daha önce hazırlanan substrat çözeltisinden 1 ml ilave edilmiştir. Ayrıca kontrol çözeltisi olarak kullanılan 200 µl saf su üzerinede aynı miktarda substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra bu örnekler 40°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu sırada 1 ml iyot çözeltisi (% 0.5 I<sub>2</sub> ve %5 KI) içeren İyot stok çözeltisi, 5 ml 5M HCl ilave edilerek 500 ml'e saf su ile tamamlanmıştır. 10 dakika sonunda su banyosundan çıkarılan 200 µl'lik örneklerin üzerine 5 ml İyot stok çözeltisi ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini için elde edilen bu son karışımın absorbans değerleri, 620 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunmuştur. Şahid olarak 200 µl saf su ve 5 ml İyot stok çözeltisi kullanılmıştır. 1 ünite  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, 10 dakikada 40°C'de 2 mg nişastanın 0.1 mg'ını parçalamak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (De Moraes vd., 1995; Savaş, 1998; Saygılı, 1999).

### 5.4.2 Nişasta konsantrasyonu tayini

Biyoreaktörden alınan reaksiyon çözeltisindeki nişasta tayininde ise, öncelikle enzimin inaktive edilmesi için deney tüplerine alınan 0.5 ml örnekler 100°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 5 ml iyot çözeltisi (%15 I<sub>2</sub> ve %0.5 KI) ilave edilerek son hacim 15 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Çözeltideki nişasta konsantrasyonu tayini için kullanılan bu son karışımın absorbans değeri, 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunmuş ve şahid olarak 10 ml saf su ve 5 ml iyot çözeltisi kullanılmıştır (Astolfi-Filho vd., 1986; Birol, 1997). Şekil 5.2'de nişasta konsantrasyonu ile ilgili kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 5.2 Nişasta konsantrasyonu ile ilgili kalibrasyon grafiği

### 5.5 Hesaplamalar

#### •Enzim aktivitesinin hesaplanması:

Enzim aktivitesinin hesaplanması için şu bağıntılar kullanılmıştır:

$$[A_0] = (1 - C_{ao} / C_{ak}) \quad (5.1)$$

$$[A_1] = (1 - C_{a1} / C_{ak}) \quad (5.2)$$

$$[A] = 100 * [A_1] / [A_0] \quad (5.3)$$

Burada;

$C_{a0}$  : t=0 anındaki enzimin absorbans değeri

$C_{a1}$  : İşlem sonundaki enzimin absorbans değeri

$C_{ak}$  : Kontrol çözeltisinin absorbans değeri

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

$[A_1]$  : İşlem sonundaki enzimin aktivitesi

$[A]$  : % Enzim aktivitesi

olarak tanımlanmıştır.

**•Nişasta konsantrasyonunun hesaplanması:**

Nişasta konsantrasyonu tayinlerinde ise aşağıdaki bağıntılar kullanılmıştır:

$$[S_1] = (C_{s1} / C_{s0}) * [S_0] \quad (5.4)$$

$$[H] = 100 * (1 - C_{s1} / C_{s0}) \quad (5.5)$$

Burada;

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

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

$[S_0]$  : t=0 dakika'daki nişasta konsantrasyonu, g/l

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

$[H]$  : % Hidroliz derecesi

olarak tanımlanmıştır.

## 6. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 6.1 pH'm Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

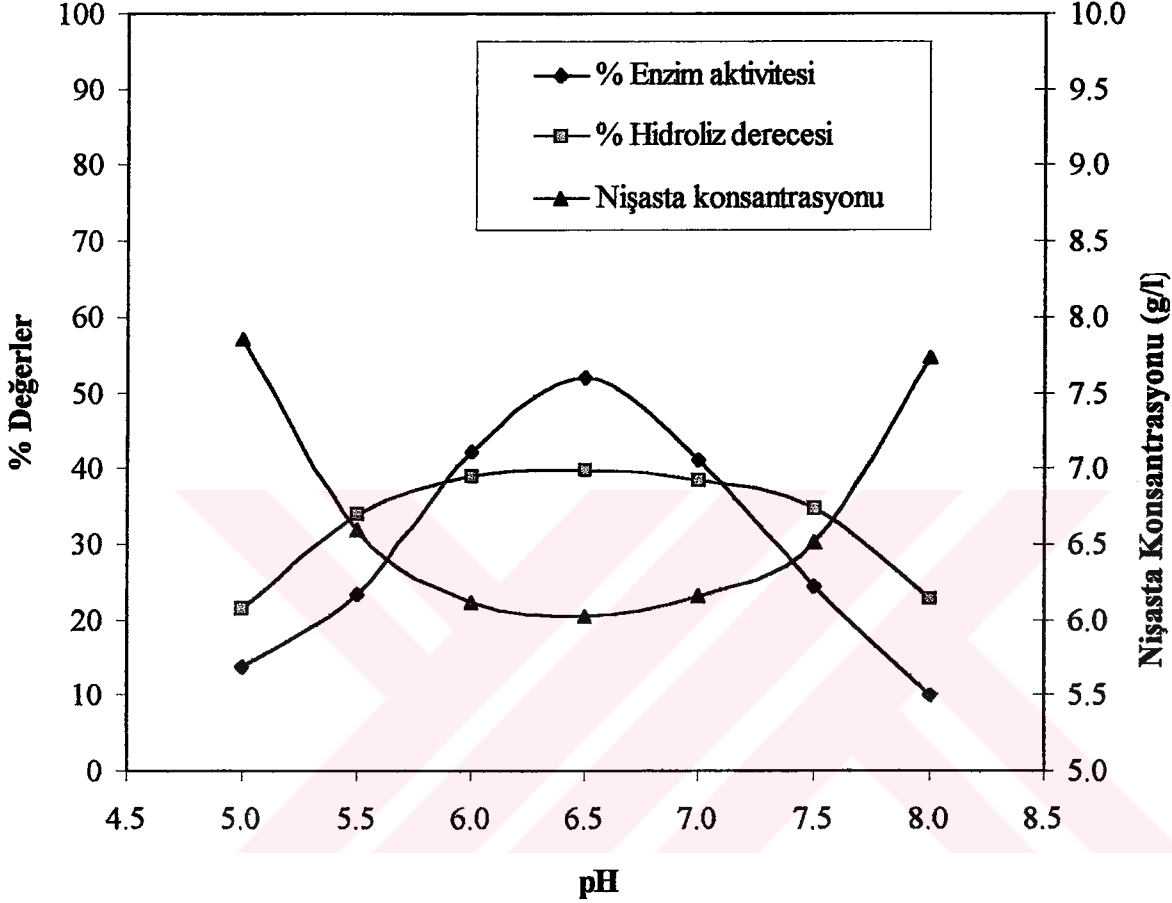
Asidik veya bazik ortamın, katalitik reaksiyona etkisini incelemek için, %1 nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisi pH 5-8 arasında (0.5'lik pH artışları için), 60°C sıcaklık, 300 rpm karıştırıcı hızı ve 30 dakikalık reaksiyon süresince hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonunda çözeltideki  $\alpha$ -amilaz aktivitesi Bölüm 5.4.1'de ve ortamda kalan nişasta konsantrasyonu Bölüm 5.4.2'de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 6.1'de verilmiştir.

Çizelge 6.1 pH'a karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C ve N=300 rpm)

pH	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
5.0	13.72	21.49	7.851
5.5	23.23	34.03	6.597
6.0	42.22	38.87	6.113
6.5	51.99	39.82	6.018
7.0	40.99	38.43	6.157
7.5	24.42	34.82	6.518
8.0	10.02	22.71	7.729

Şekil 6.1'den de görüldüğü gibi pH 6.5'de enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Literatürde bakteriyel kaynaklı  $\alpha$ -amilazlar için işlem pH'ı 5.0-7.5 olarak verilmiştir (Godfrey ve Reichelt, 1983). Enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu aralıkta (6.0<pH<7.0), hidroliz derecesinin maksimum olduğu (ortalama %39.04 hidroliz derecesi) görülmüştür. Enzimin daha az aktif olduğu pH değerlerinde (örneğin pH 5.0 ve 8.0), reaksiyonun yeteri kadar katalizlenmediği ve bundan dolayı da hidroliz derecesinin az olduğu (%21.49 ve %22.71 hidroliz dereceleri) görülmektedir. pH 5.0 ve 8.0 değerlerindeki % hidroliz dereceleri, maksimum hidroliz derecesi ile karşılaştırıldığında, maksimum değer yaklaşık olarak %56'sına

eşittir. Yine pH 5.0 ve 8.0 değerlerindeki % enzim aktiviteyi, maksimum % enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında, maksimum değer yaklaşık olarak %23'üne eşittir. Dolayısıyla, bu pH değerlerinde ortamdaki nişasta konsantrasyonu daha yüksek olmaktadır.



Şekil 6.1 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun pH ile değişimi (T=60°C ve N=300 rpm)

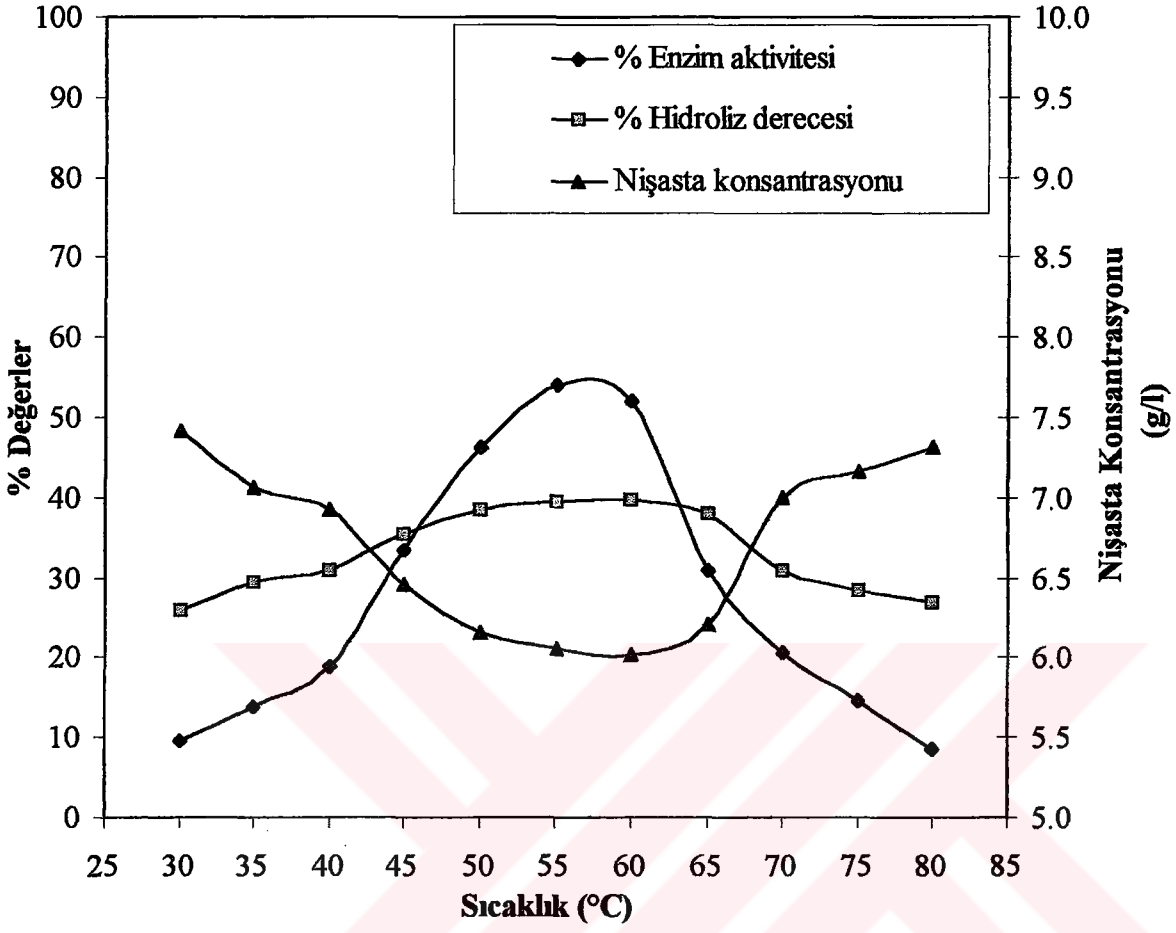
## 6.2 Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Sıcaklık artışının hem enzim aktivitesine hem de hidroliz derecesine olan etkisini incelemek için reaksiyon çözeltisi (500 ml), enzim ilavesi (2.5 ml/l) ile 30-80°C arasında (5°C'lik artışlar için), pH 6.5 ve 300 rpm'de 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen değerler Çizelge 6.2'de verilmiştir ve Şekil 6.2'de grafiksel olarak sunulmuştur. Çizelge 6.2'den de görüldüğü gibi, enzim aktivitesinin 60°C'de maksimum olduğu (yaklaşık %52), bu sıcaklık değerinden çok daha düşük veya çok daha yüksek sıcaklık değerlerinde ise aktivitede belirgin bir azalış meydana geldiği görülmüştür. Literatürde bakteriyel kaynaklı  $\alpha$ -amilazlar için işlem

sıcaklığı 60-75°C olarak verilmiştir (Godfrey ve Reichelt, 1983). Sıcaklık değerleri 30°C ve 80°C için ise en düşük % enzim aktivitesi ve % hidroliz dereceleri elde edilmiştir. Örneğin, 80°C'deki değerler maksimum değerle karşılaştırıldığında, enzim aktivitesi yaklaşık %83, hidroliz derecesinin yaklaşık %33 oranında azaldığı görülmüştür. Sıcaklığın etkisi ile enzimin hızla inaktive olmasından dolayı, sıcaklığın artması reaksiyon hızını artıramamıştır. Enzimler yalnız belli sıcaklık aralıklarında çalıştığından dolayı sıcaklık artışının enzime yapısal olarak zarar verdiği bilinmektedir. Düşük sıcaklıkta ise enzim, reaksiyonu yeteri kadar katalizleyememektedir. Sonuç olarak bu çalışma için optimum sıcaklık 60°C olarak belirlenmiş ve bu sıcaklık değerindeki enzim aktivitesi yaklaşık %52 ve hidroliz derecesi yaklaşık %40 olarak bulunmuştur. Ortamda kalan nişasta miktarı ile hidroliz derecesi birbirine bağlı olduğundan (ters orantılı), hidroliz derecesi azaldıkça nişasta konsantrasyonu artmıştır (Şekil 6.2).

Çizelge 6.2 Sıcaklığa karşılık elde edilen deneysel veriler (pH=6.5 ve N=300 rpm)

Sıcaklık (°C)	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
30	9.60	25.88	7.412
35	13.84	29.36	7.064
40	18.77	30.82	6.918
45	33.43	35.44	6.456
50	46.17	38.44	6.156
55	50.08	39.41	6.059
60	51.99	39.82	6.018
65	30.98	37.93	6.207
70	20.53	31.03	6.897
75	14.56	28.45	7.155
80	8.61	26.87	7.313



Şekil 6.2 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun sıcaklıkla değişimi (pH=6.5 ve N=300 rpm)

### 6.3 Enzim Miktarının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

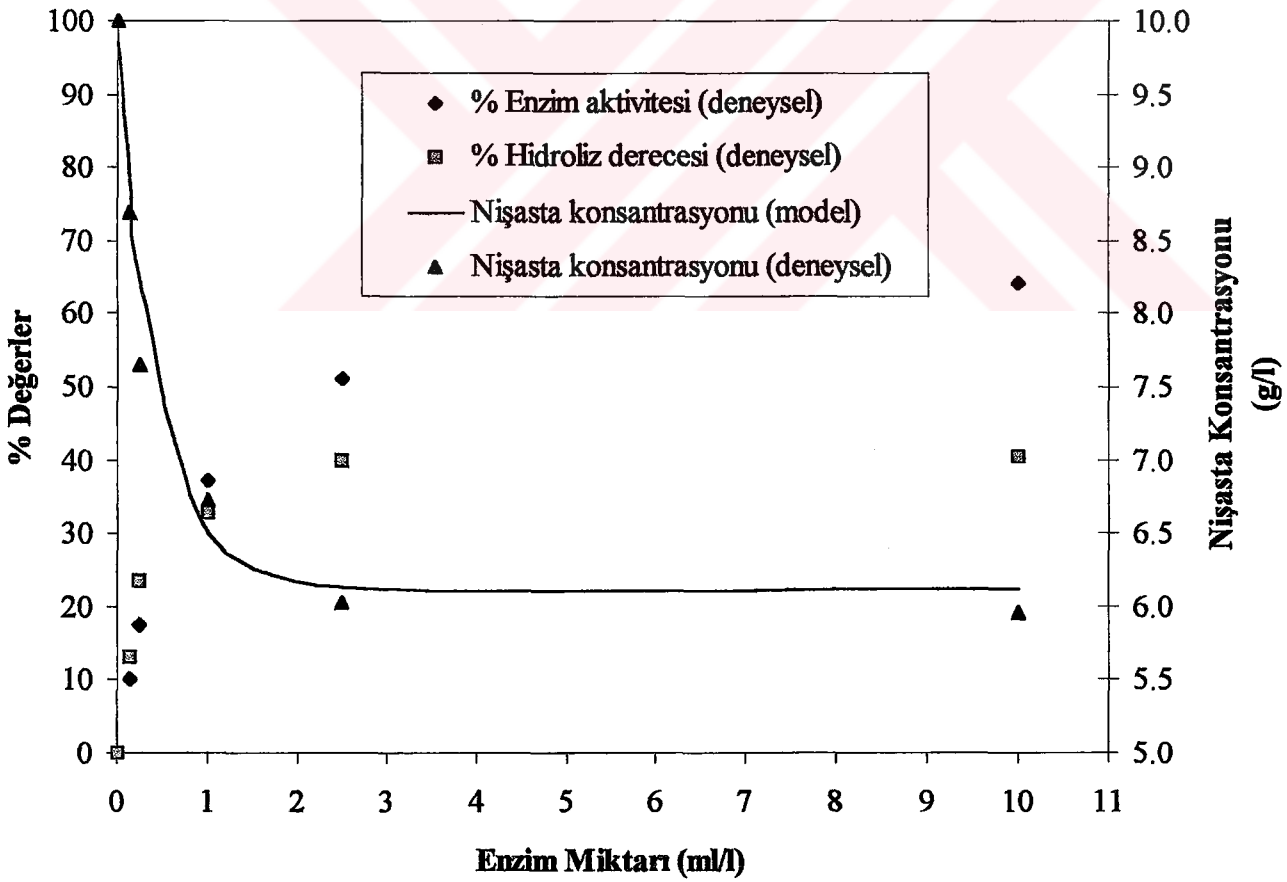
Enzim miktarının hidroliz işlemine olan etkisini incelemek için reaksiyon çözeltisine (500 ml) 0.125-40 ml/l arasında enzim ilavesi yapılarak 60°C sıcaklık, pH 6.5 ve 300 rpm karıştırıcı hızında 30 dakika boyunca reaksiyona devam edilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 6.3'de verilmiştir ve Şekil 6.3'de grafiksel olarak sunulmuştur. Şekil 6.3'den de görüldüğü gibi, enzim ilavesi ile hem enzim aktivitesinin hemde hidroliz derecesinin hızla arttığı, 2.5 ml/l'den sonra bu artışın yavaşladığı gözlenmiştir. Enzim miktarının 0.125 ml/l'den 10.0 ml/l'ye artırılması sonucunda, enzim aktivitesi %10.03 değerinden %64.28 değerine artmıştır. Çizelge 6.3'den de görüldüğü gibi yüksek enzim konsantrasyonu için (40 ml/l) elde edilen enzim aktivitesi %13.06 ve nişastanın hidroliz derecesi yaklaşık %17 olarak bulunmuştur. 0.125-10 ml/l arasındaki enzim ilaveleri için, nişasta tanecikleri aktif enzim molekülleri ile doymun hale gelmiştir. Ancak, 10 ml/l enzim konsantrasyonu üzerinde ise hidroliz derecesinde bir artış gerçekleşmemesi ve enzimin aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmesi Textor vd. (1998) tarafından da belirtildiği gibi, bir çeşit enzim-enzim inhibisyonu ile açıklanabilir. Enzim-enzim inhibisyonunda, enzim moleküllerinin çift oluşturarak aktif bölgelerini bozmaları nedeniyle nişasta taneciklerinin aktif bölgelere efektif olarak bağlanması engellenmekte ve dolayısı ile hidroliz derecesi azalmaktadır.

Şekil 6.3'den de görüldüğü gibi, enzim miktarının reaksiyonu aynı oranda katalizleyemediği 80 kat fazla enzim kullanıldığında (0.125 ml/l'den 10 ml/l'ye) aynı proses şartlarında enzim aktivitesinin yaklaşık 6.4 kat ve hidroliz derecesinin yaklaşık 3.1 kat arttığı bulunmuştur. Colonna vd., (1988), ise buğday nişastasının *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile hidroliz işleminde (proses şartları T=35°C, pH=7.0 ve 1 saat işlem süresi) 94.5 kat fazla enzim kullanıldığında (2 mg/l'den 189 mg/l'ye) hidrolizin yaklaşık 4 kat arttığını belirtmişlerdir.

Hidroliz derecesinde, enzim ilavesi ile hızlı bir artış gözlenmiş fakat daha sonra bu artışın azaldığı tespit edilmiştir. Enzim miktarının 0.125 ml/l'den 10.0 ml/l'ye artırılması durumunda, hidroliz derecesi %13.07 değerinden %40.44 değerine artmıştır. Bu durum, aşırı miktarda enzim ilavesinin reaksiyon hızında önemli bir artış gerçekleştirmediğini göstermektedir. Hidroliz derecesi ile ortamda kalan nişasta konsantrasyonu birbirine bağlı olduğundan (ters orantılı), hidroliz derecesi arttıkça nişasta konsantrasyonu azalmıştır (Şekil 6.3).

Çizelge 6.3 Enzim ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Enzim miktarı (ml/l)	%Enzim aktivitesi	%Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
0.000	0.00	0.00	10.000
0.125	10.03	13.07	8.693
0.250	17.39	23.43	7.657
1.000	37.25	32.79	6.721
2.500	51.99	39.82	6.018
10.000	64.28	40.44	5.956
40.000	13.06	17.40	8.260



Şekil 6.3 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun enzim miktarı ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Enzim miktarının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile enzim miktarı arasında yapılan matematiksel modelleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin, Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından verilen aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur.

$$[S_1]=a*\exp(-b*E)+c \quad (6.1)$$

Burada  $[S_1]$ , işlem sonunda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu (g/l), E ise enzim miktarıdır (ml/l). Eşitlik (6.1)'deki a, b ve c değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a= 3.7204 \text{ g nişasta/l}$$

$$b= 2.2698 \text{ (ml enzim/l)}^{-1}$$

$$c= 6.1242 \text{ g nişasta/l}$$

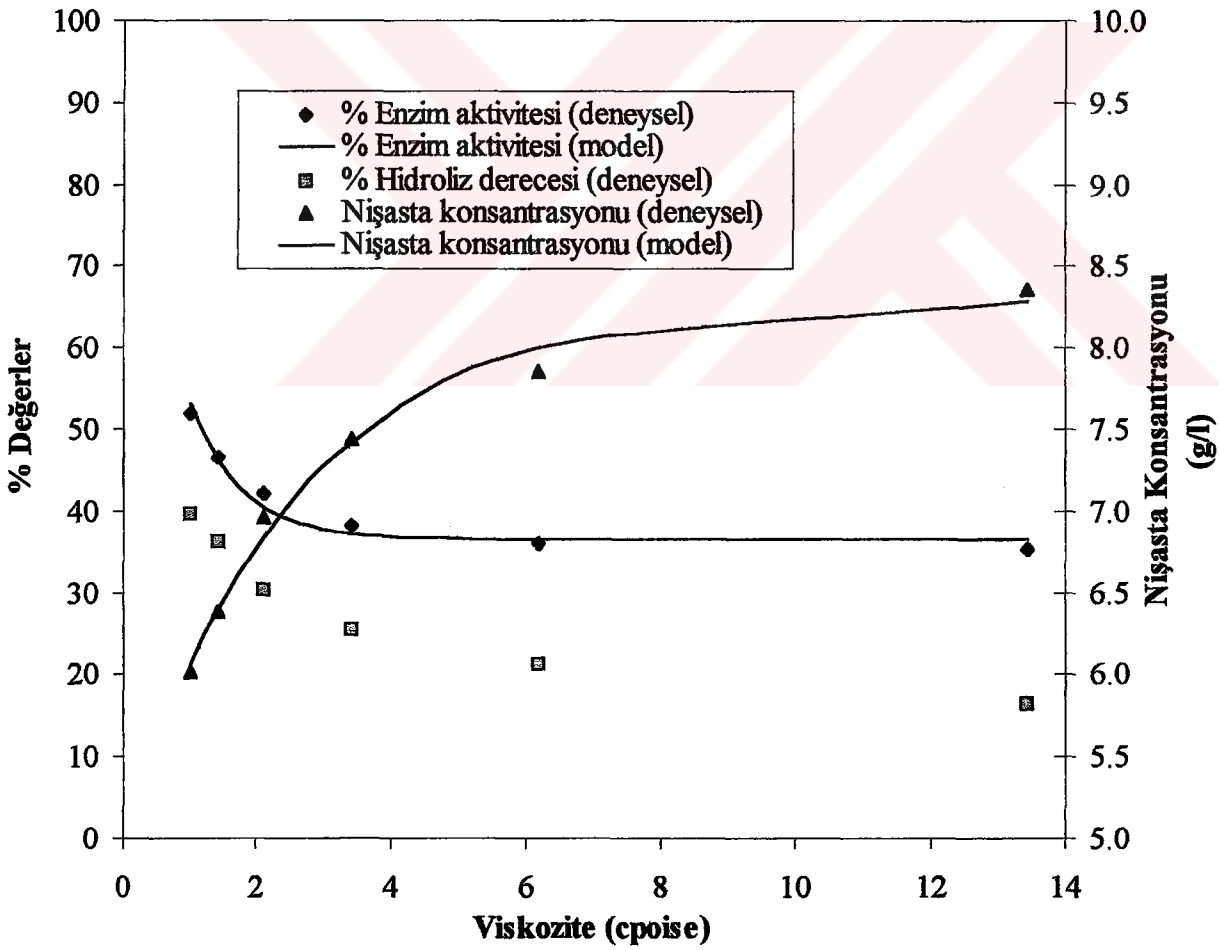
olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ), değerleri sırası ile 0.2797 ve 0.9936 olarak bulunmuştur.

#### 6.4 Viskozitenin Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Çözelti viskozitesinin, enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine olan etkisini incelemek için, ortama viskozite artırıcı olarak %10, %20, %30, %40 ve %50 oranlarında (hacim/hacim) gliserin ilave edilmiştir. 500 ml reaksiyon çözeltisi, 60°C ve pH 6.5'de 30 dakika boyunca işleme tabii tutulmuştur. Kullanılan enzim miktarı 2.5 ml/l'dir. Çizelge 6.4'de gliserin ilavesi ile viskozitenin artırılması sonucu elde edilen deneysel veriler verilmiştir. Viskozitenin artmasıyla enzim aktivitesinin ve hidroliz derecesinin azaldığı gözlenmiştir. Çözeltiye %0 ile %50 oranları arasında gliserin ilavesi ile viskozite, 1.005 cpoise'dan 13.43 cpoise'a artırılmıştır (Sheely, 1932). %0 ve %50 gliserin ilavesi için elde edilen deneysel veriler karşılaştırıldığında, enzim aktivitesi %51.99'dan %35.18 değerine, hidroliz derecesi %39.82 değerinden %16.33'e azalmıştır. Sonuç olarak, çözeltinin viskozitesinin yaklaşık 13 kat artırılması ile enzim aktivitesini yaklaşık %32 oranında kaybetmiştir. Hidroliz derecesinde ise yaklaşık %59 oranında bir azalma olmuştur. Ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile hidroliz derecesi birbirine bağlı olduğundan (ters orantılı), hidroliz derecesi azaldıkça nişasta konsantrasyonu artmıştır (Şekil 6.4).

Çizelge 6.4 Gliserin ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

% Gliserin (hacim/hacim)	Viskozite (cpoise)	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
0	1.005	51.99	39.82	6.018
10	1.415	46.53	36.21	6.379
20	2.109	42.12	30.42	6.958
30	3.412	38.21	25.60	7.440
40	6.188	36.02	21.43	7.857
50	13.430	35.18	16.33	8.357



Şekil 6.4 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun viskozite ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Viskozitenin artması ile hidroliz derecesinin azalması, kütle transfer katsayısının dolayısı ile kütle transfer hızının azalması sonucuna bağlıdır. Viskozitesi düşük olan ortamda, enzim ile nişasta molekülleri rahatça hareket edebilmekte ve bunun sonucu olarak daha kolay reaksiyona girebilmektedirler. Fakat viskozitesi yüksek olan ortamda ise, enzim ile nişasta molekülleri rahatça hareket edemediklerinden dolayı birbirleri ile etkileşimleri daha az gerçekleşmektedir. Komalprasert ve Ofoli (1991) tarafından belirtildiği gibi bu durum reaksiyonun yavaşlamasına sebep olmaktadır.

Viskozite artışının hidroliz reaksiyonu sonucunda enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin Sadana ve Henley (1987) tarafından verilen aşağıdaki bağıntıya (tek adım birinci dereceden olmayan inaktivasyon modeline) uyduğu bulunmuştur.

$$[A]/[A_{max}]=(1-\alpha_1)*\exp(-k_D*\mu )+\alpha_1 \quad (6.2)$$

Burada  $[A_{max}]$ ,  $t=0$  anındaki enzim aktivitesidir ve bu değer hesaplamalarda %100 olarak dikkate alınmıştır.  $[A]$  ise, işlem sonunda  $A_{max}$ 'a göre % değerler olarak verilmiştir.

Eşitlik (6.2)'deki  $\alpha_1$  ve  $k_D$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$\alpha_1=0.3656$$

$$k_D=1.3311 \text{ cpoise}^{-1}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.0139 ve 0.9819 olarak bulunmuştur.

Çözeltinin viskozitesinin gliserin ilavesi ile artırılması ile ortamda kalan nişasta konsantrasyonu arasında yapılan matematiksel modelleme sonucunda ise elde edilen deneysel verilerin Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından verilen bağıntıya uyduğu görülmüştür.

$$[S_1]=a*\exp(-b*\mu)+c \quad (6.3)$$

Eşitlik (6.3)'deki a, b ve c değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a = -3.2886 \text{ g nişasta/l}$$

$$b = 0.385 \text{ cpoise}^{-1}$$

$$c = 8.3027 \text{ g nişasta/l}$$

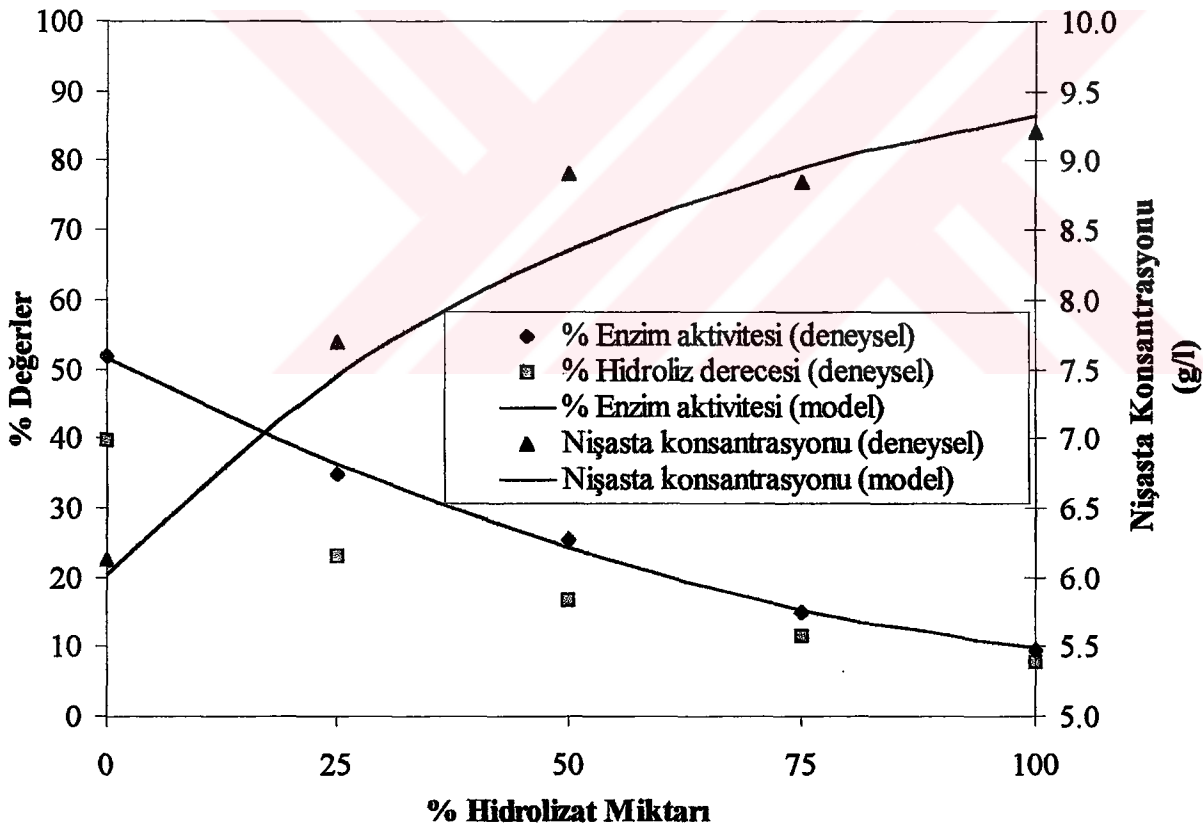
olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.1026 ve 0.9946 olarak bulunmuştur.

### 6.5 Hidrolizat Miktarının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Hidroliz işlemi sonunda meydana gelen ürünlerin, enzim aktivitesine ve reaksiyona olan etkisini incelemek için proses şartları sıcaklık  $60^\circ\text{C}$ , karıştırıcı hızı 300 rpm ve pH 6.5'da sabit tutulmuştur. Çözeltiye 2.5 ml/l enzim ilavesi ile hidroliz reaksiyonuna 30 dakika boyunca devam edilmiştir. Reaksiyon sonunda çözelti 15 dakika boyunca  $100^\circ\text{C}$ 'deki su banyosunda, enzimin tamamen inaktive olmasını sağlamak amacı ile kaynatılmıştır. Daha sonra bu çözelti süzgeç kağıdından süzüldükten sonra, deneylerde kullanılacak miktarlarda kaplara konularak buzlukta saklanmıştır. Hidrolizat adı verilen bu çözelti toplam hacme %25, %50, %75 ve %100 (hacim/hacim) oranlarında ilave edilmiştir. Hidrolizat çözeltisinin reaksiyon çözeltisine ilavesi ile  $60^\circ\text{C}$  sıcaklık, 300 rpm karıştırıcı hızı, pH 6.5 ve 2.5 ml/l enzim ilavesi ile reaksiyon çözeltisi 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçlar Çizelge 6.5'de verilmiştir. Şekil 6.5'den de görüldüğü gibi hidrolizat çözeltisinin %0'dan %100'e arttırılması durumunda, enzim aktivitesi %51.99 değerinden %9.59 değerine yaklaşık %82 oranında azalmıştır. Aynı şekilde, hidroliz derecesi %39.82 değerinden %7.87 değerine yaklaşık %80 oranında azalmıştır. Bu azalma, hidrolizat çözeltisinin içerdiği hidrolizat ürünlerinin enzimi inhibe ettiği ve bunun sonucu olarak hidroliz reaksiyonunun yeteri kadar katalizlenememesi olarak açıklanabilir (Özbek ve Lovitt, 1999). Hill vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada (buğday nişastasının,  $45^\circ\text{C}$  ve pH 5.5'de bakteriyel ve arpa kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimleri ile hidrolizi) ortama ilave edilen hidrolizat ürünlerinin (100 g/l glikoz ve maltoz) inhibitör etkisi sonucu, enzim aktivitesi yaklaşık %50 oranında azalmıştır.

Çizelge 6.5 Hidrolizat ilavesine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

% Hidrolizat (hacim/hacim)	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
0	51.99	39.82	6.018
25	34.95	23.09	7.691
50	25.35	16.64	8.336
75	14.95	11.46	8.854
100	9.59	7.87	9.213



Şekil 6.5 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidrolizat ilavesi ile değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Hidrolizat miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Kvadratik model, Özbek ve Ülgen, 1999).

$$[A]=a+b*H+c*H^2 \quad (6.4)$$

Eşitlik (6.4)'deki a, b ve c değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a=51.548$$

$$b=-0.676 \text{ (hacim/hacim)}^{-1}$$

$$c=0.0026 \text{ (hacim/hacim)}^{-2}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) sırası ile 1.2997 ve 0.9985 olarak bulunmuştur.

Ortamda kalan nişasta konsantrasyonunun hidrolizat miktarına bağlı olarak değişimi incelendiğinde, elde edilen deneysel verilerin Hill vd. (1997) tarafından verilen bağıntıya uyduğu görülmüştür.

$$[S_1]=[S_0]-[S_{ho}]*\exp(-a*H) \quad (6.5)$$

Burada,  $[S_0]$ ,  $t=0$  anındaki ortamdaki nişasta konsantrasyonu olup 10 g/l ve  $[S_{ho}]$  ise hidrolizlenen nişasta konsantrasyonudur (hidrolizat miktarı,  $H=0$ ).

Eşitlik (6.5)'deki a ve  $[S_{ho}]$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a= 0.0177$$

$$[S_{ho}]=3.919 \text{ g nişasta/l}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.1378 ve 0.9939 olarak bulunmuştur.

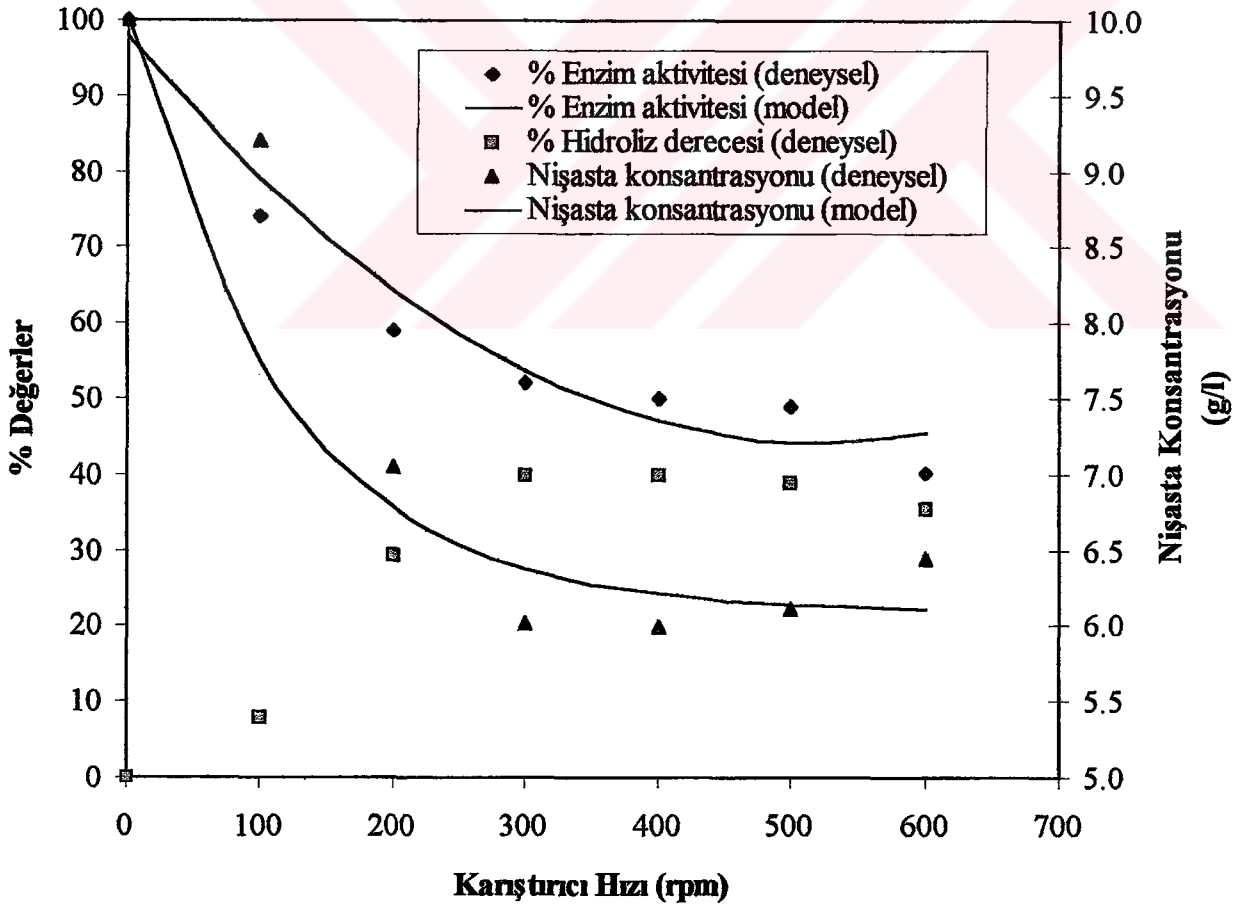
## 6.6 Karıştırıcı Hızının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

%1 nişasta içeren 500 ml reaksiyon çözeltisi 60°C ve pH 6.5'de 100-600 rpm karıştırıcı hızlarında (100 rpm'lik artışlarla) 30 dakika boyunca 2.5 ml/l enzim ilavesi ile hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 6.6'da verilmiştir ve Şekil 6.6'da grafiksel olarak sunulmuştur.

Karıştırıcı hızının 100 rpm'den 600 rpm'e artırılması sonucunda enzim aktivitesi %74.16 değerinden %40.15 değerine düşmüştür. 100 rpm karıştırıcı hızı temel alındığında, enzim aktivitesi değerinde yaklaşık %46 oranında bir azalma olmuştur. Hidroliz derecesi ise %7.97 değerinden başlayarak, karıştırıcı hızı 400 rpm'de maksimum %40.02 değerine ulaşmıştır. Karıştırıcı hızının 4 kat artırılması ile (100 rpm'den 400 rpm'e) hidroliz derecesinde yaklaşık 5 katlık bir artış olduğu görülmüştür. Ancak 400 rpm'den sonra hidroliz derecesinde tekrar bir azalma görülmüş olup, 600 rpm için %35.55 hidroliz derecesi elde edilmiştir. Hidroliz derecesi ile ortamda kalan nişasta konsantrasyonu birbirine bağlı olduğundan (ters orantılı), hidroliz derecesi arttıkça, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu azalmıştır (Şekil 6.6). Sonuç olarak, düşük karıştırıcı hızlarında yeteri kadar kütle transfer hızı sağlanamadığından, hidroliz işlemi yetersiz olmakta, karıştırıcı hızının artması ile reaksiyon ilerlemekte, fakat yüksek karıştırıcı hızlarında enzimin yapısal olarak zarar görmesi, denatüre olması sonucunda reaksiyonunda yavaşladığı görülmektedir. Maksimum verim elde edilebilmesi açısından kritik karıştırıcı hızının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışma için elde edilen deneysel verilere göre kritik karıştırıcı hızı 400 rpm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 6.6 Karıştırıcı hıza karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C ve pH=6.5 )

Karıştırıcı hızı N (rpm)	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
0	100.00	0.00	10.000
100	74.16	7.97	9.203
200	58.94	29.45	7.055
300	51.99	39.82	6.018
400	50.08	40.02	5.998
500	48.97	38.91	6.109
600	40.15	35.55	6.445



Şekil 6.6 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun karıştırıcı hızı ile değişimi (T=60°C ve pH=6.5)

Karıştırıcı hızının enzim aktivitesine olan etkisi incelendiğinde elde edilen deneysel verilerin Quadratic modele uyduğu saptanmıştır (Eşitlik 6.6).

$$[A]=a+b*N+c*N^2 \quad (6.6)$$

N: karıştırıcı hızı, rpm

Eşitlik (6.6)'da a, b ve c değerleri ise Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a= 97.8170$$

$$b= -0.2071 \text{ (rpm)}^{-1}$$

$$c= 0.0002 \text{ (rpm)}^{-2}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.0567 ve 0.9784 olarak bulunmuştur.

Karıştırıcı hızının ortamda kalan nişasta konsantrasyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde elde edilen deneysel verilerin Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından sunulan bağıntıya uyduğu saptanmıştır (Eşitlik 6.7).

$$[S_1]=a*\exp(-b*N)+c \quad (6.7)$$

Eşitlik (6.7)'deki a, b ve c değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$a= 3.9323 \text{ g nişasta/l}$$

$$b= 0.0086 \text{ (rpm)}^{-1}$$

$$c= 6.0844 \text{ g nişasta/l}$$

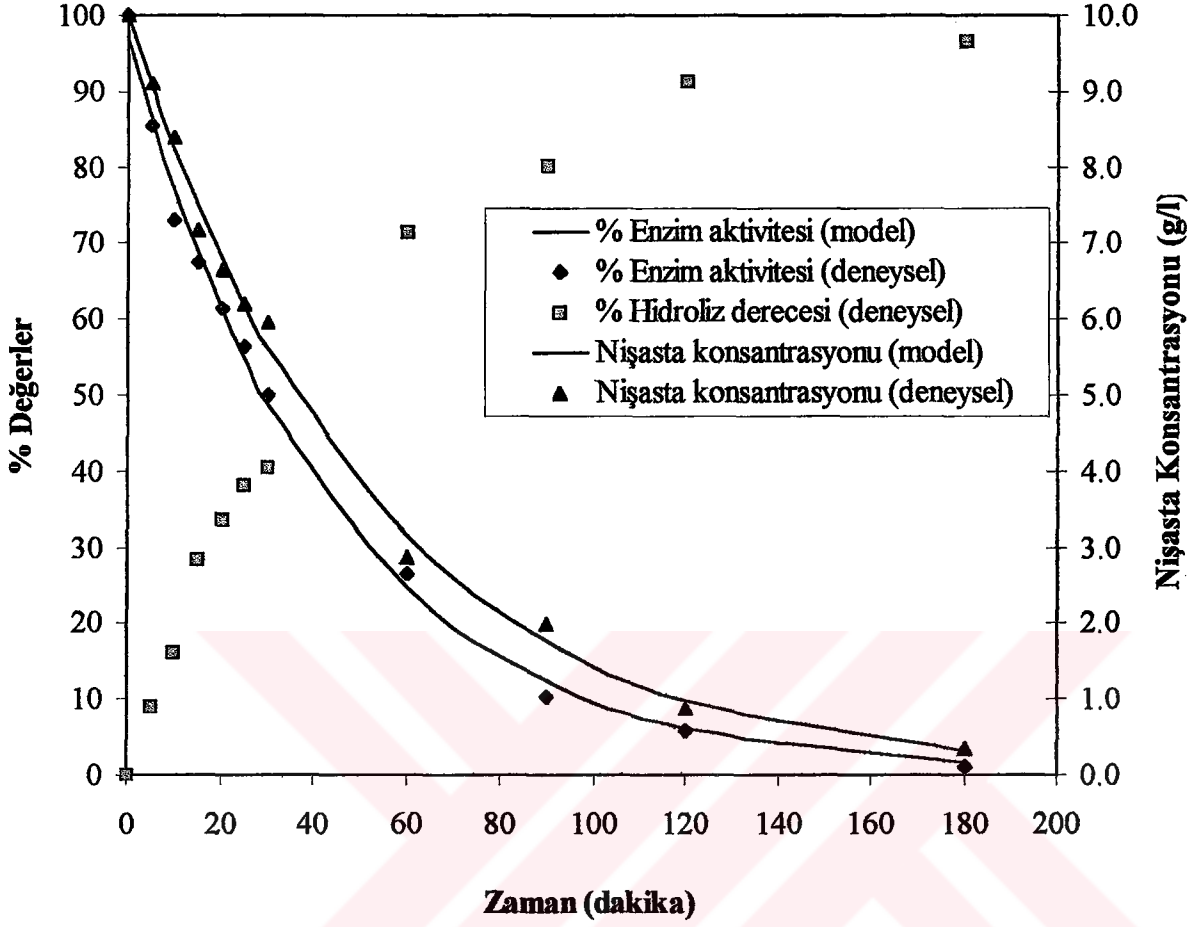
olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.3484 ve 0.9847 olarak bulunmuştur.

### 6.7 Zamanın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Bu çalışmada sıcaklık 60°C, pH 6.5 ve karıştırıcı hızı 300 rpm'de sabit tutulmuş ve 2.5 ml/l enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Enzim aktivitesinin ve nişasta hidrolizinin zamana bağlı olarak değişimini incelemek için, reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 ve 180. dakikalarda) örnekler alınmıştır. Zamana karşı elde edilen deneysel veriler Çizelge 6.7'de verilmiştir. Ayrıca bu değerler Şekil 6.7'de grafiksel olarak sunulmuştur. 180 dakika sonunda enzim aktivitesinde, yaklaşık %99 oranında bir azalma gözlenmiştir. Hidroliz derecesi ise zamana bağlı olarak artmış ve 180 dakika sonunda bu değer %96.55 olarak bulunmuştur. Hill vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada (buğday nişastasının, 45°C ve pH 5.5'de bakteriyel kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile hidrolizi) 180 dakika sonunda hidroliz derecesi yaklaşık %94 olarak bulunmuştur. Hidroliz derecesi ile ortamda kalan nişasta konsantrasyonu birbirine bağlı olduğundan (ters orantılı), hidroliz derecesi arttıkça, nişasta konsantrasyonu azalmıştır (Şekil 6.7). 180 dakika sonunda, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunun yaklaşık %3.5'i kadardır.

Çizelge 6.7 Zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Zaman (dakika)	% Enzim aktivitesi	% Hidroliz derecesi	Nişasta konsantrasyonu (g/l)
0	100.00	0.00	10.000
5	85.47	8.93	9.107
10	72.89	16.06	8.394
15	67.42	28.35	7.165
20	61.45	33.63	6.637
25	56.33	38.03	6.197
30	50.08	40.44	5.956
60	26.53	71.44	2.856
90	10.34	80.12	1.988
120	5.71	91.25	0.875
180	1.04	96.55	0.345



şekil 6.7 % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun zamanla değişimi (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Zamana bağlı olarak enzim aktivitesinin değişimi incelendiğinde, yapılan matematiksel modelleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin birinci derece enzim inaktivasyon kinetiğine uyduğu bulunmuştur (Jones, 1984).

$$[A]=[A]_0 \cdot \exp(-k_D \cdot t) \quad (6.8)$$

Burada  $[A]_0$ ,  $t=0$  anındaki % enzim aktivitesidir.  $[A]$  ise, işlem sonunda % değerler olarak verilmiştir.

Eşitlik (6.8)'deki  $[A]_0$  ve  $k_D$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$[A]_0=96.9138$$

$$k_D=0.0229 \text{ dakika}^{-1}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.0261 ve 0.9905 olarak bulunmuştur.

Zamana karşı ortamda kalan nişasta konsantrasyonu incelendiğinde elde edilen deneysel verilerin Hill vd. (1997) tarafından sunulan bağıntıya uyduğu saptanmıştır (Eşitlik 6.9).

$$[S_t]=[S_0]*\exp(-a*t) \quad (6.9)$$

Eşitlik (6.9)'daki  $[S_0]$  ve  $a$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$[S_0]= 9.9941 \text{ g nişasta/l}$$

$$a= 0.0193 \text{ dakika}^{-1}$$

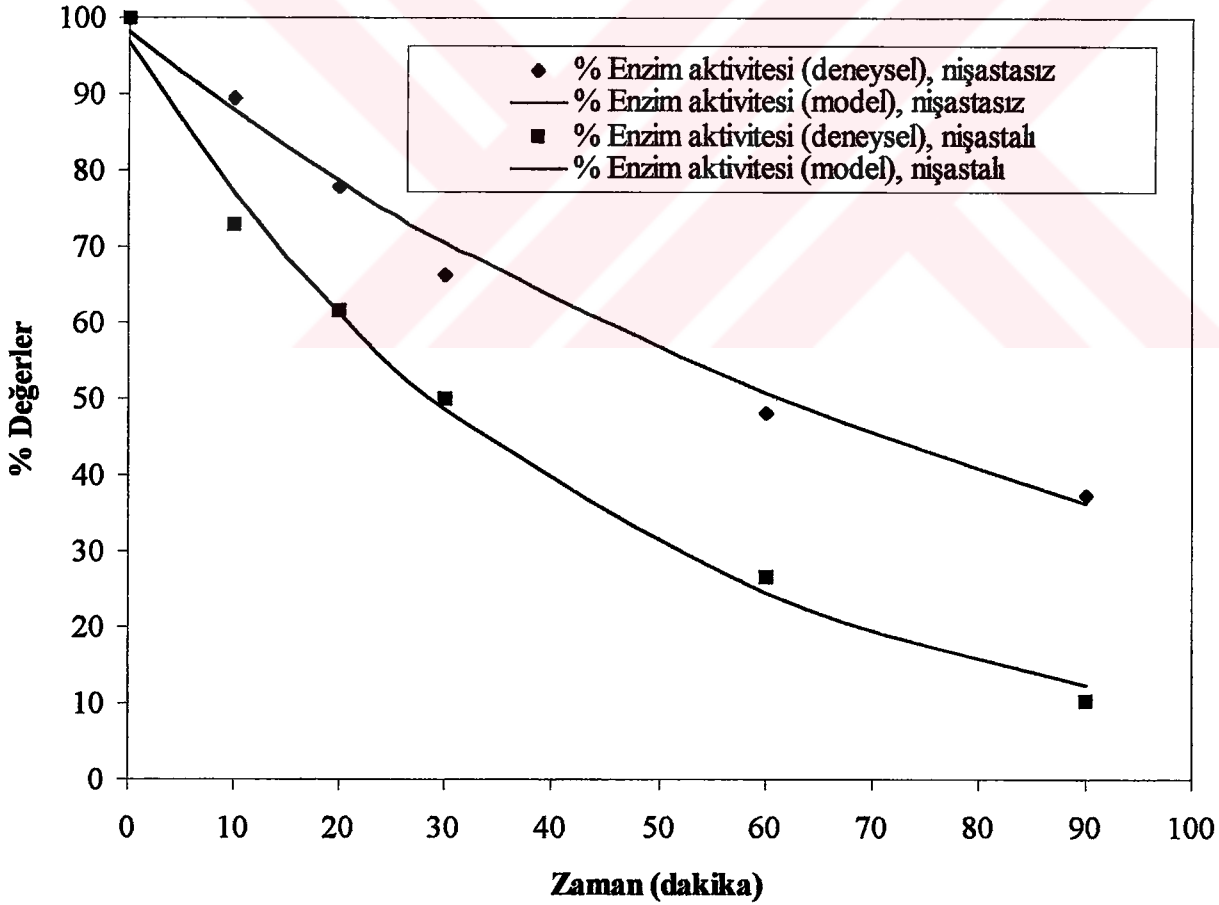
olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.2166 ve 0.9981 olarak bulunmuştur.

## 6.8 Nişastasız Ortamda Zamanın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Bölüm 6.7'de nişastalı ortamda, bu çalışmada ise nişastasız ortamda aynı proses şartlarında çalışılarak enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi incelenmiştir. 2.5 ml/l enzim içeren 500 ml saf su 60°C sıcaklık, pH 6.5 ve 300 rpm karıştırıcı hızında biyoreaktörde 90 dakika boyunca işleme tabi tutulmuştur. Belirli zaman aralıklarında (10, 20, 30, 60 ve 90 dakikalarda) alınan örneklerde enzim aktivitesi tayinleri yapılmıştır. Zamana karşı elde edilen deneysel veriler Çizelge 6.8'de verilmiştir. Ayrıca bu değerler Şekil 6.8'de grafiksel olarak sunulmuştur. Nişastasız ortam için enzim aktivitesinde 30 dakika sonunda yaklaşık %34 ve 90 dakika sonunda ise yaklaşık %63 oranında bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma enzim stabilitesinin kararlı olmaması ile açıklanabilir. Pye ve Wingard (1973), yaptıkları çalışmalarında  $\alpha$ -amilaz enzim stabilitesinin ortama kalsiyum iyonlarının ilavesi ile arttırılabileceğini belirtmişlerdir.

Çizelge 6.8 Nişastasız ve nişastalı ortamda zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Zaman (dakika)	Nişastasız ortamdaki % enzim aktivitesi	Nişastalı ortamdaki % enzim aktivitesi
0	100	100
10	89.58	72.89
20	78.02	61.45
30	66.24	50.08
60	48.15	26.53
90	37.27	10.34



Şekil 6.8 Nişastasız ve nişastalı ortamda % enzim aktivitesinin zamanla değişimi (T=60 °C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Nişastalı ortam için ise, 90 dakika sonunda enzim aktivitesinde yaklaşık %90 ve nişastasız ortam için yaklaşık %63 oranında bir azalma gözlenmiştir. Bu iki değer arasındaki %27'lik farkın reaksiyon sonucu meydana gelen hidrolizat ürünlerinin inhibitör etkisinden kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Nişastasız ortamda zamana bağlı olarak enzim aktivitesinin değişimi incelendiğinde, yapılan matematiksel modelleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin birinci derece enzim inaktivasyon kinetiğine uyduğu bulunmuştur (Jones, 1984).

$$[A]=[A]_0 \cdot \exp(-k_D \cdot t) \quad (6.10)$$

Burada  $[A]_0$ ,  $t=0$  anındaki % enzim aktivitesidir.  $[A]$  ise, işlem sonunda % değerler olarak verilmiştir.

Eşitlik (6.10)'daki  $[A]_0$  ve  $k_D$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

$$[A]_0=98.0511$$

$$k_D=0.0118 \text{ dakika}^{-1}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatiksels analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.03401 ve 0.9918 olarak bulunmuştur.

Daha önce, Bölüm 6.5'de nişastalı ortamda hidrolizat ilavesinin enzim aktivitesine olan inhibitör etkisi incelenmişti. 30 dakika sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 6.9'da karşılaştırılmal olarak verilmiştir. Çizelge 6.9'dan da göröldüğü gibi hidrolizat ilavesi arttıkça inhibitör etki gösterdiği için enzim aktivitesi azalmaktadır. Enzim aktiviteleri için yarılanma ömürleri hesaplanmış ve Çizelge 6.10'da nişastasız ve nişastalı ortam için  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerleri verilmiştir.

Çizelge 6.9 Nişastasız ve nişastalı ortam ile hidrolizat ilaveli ortamın karşılaştırılması (T=60°C, pH=6.5 ve N=300 rpm)

Ortam	Nişastasız	Nişastalı				
		H=%0	H=% 25	H=% 50	H=% 75	H=% 100
Hidrolizat miktarı	H=%0	H=%0	H=% 25	H=% 50	H=% 75	H=% 100
% Enzim aktivitesi	66.24	50.08	34.95	25.35	14.95	9.59

Çizelge 6.10 Nişastasız ve nişastalı ortam için bulunan  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerleri

Ortam	Yarılanma ömrü $t_{1/2}$ (dakika)	$k_D$ (dakika) <sup>-1</sup>	Standart sapma ( $\sigma$ )	$R^2$
Nişastasız	59	0.0118	0.0341	0.9918
Nişastalı	30	0.0229	0.0261	0.9905

## 7. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nişastanın enzimler yardımı ile hidrolizi bir çok sanayi dalı için önem taşımaktadır. Kullanılan  $\alpha$ -amilaz enziminin çevreye ve ürünlere zarar vermeden, hidroliz reaksiyonunu katalizlemesi en büyük avantajlarından. Özellikle tekstil endüstrisinde, haşıl maddesi olarak tercih edilen nişastayı parçalamada enzimlerin kullanılması atık su proseslerinde meydana gelebilecek kirlenmeyi azalttığından dolayı büyük önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, buğday nişastasının ticari bir enzim olan Gemsize 4A  $\alpha$ -amilaz ile hidroliz işlemine ait proses parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. İncelenen parametreler ile,  $\alpha$ -amilaz enziminin inaktivasyonu ve buğday nişastasının hidroliz derecesi ile ilgili elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

- 1) pH'ın etkisi incelendiğinde, fazla asidik ve bazik ortamlarda enzimin aktivitesi düşük olup optimum pH 6.5 olarak bulunmuştur.
- 2) Sıcaklığın etkisi incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda enzimin aktivitesinin düşük olduğu, yüksek sıcaklıklarda ise yapısal olarak zarar gördüğünden aktivitesinin yine düşük olduğu tespit edilmiş ve enzimin en yüksek aktiviteye 60°C'de sahip olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak hidrolizin ise, düşük sıcaklıklarda az olduğu, sıcaklığın artması ile hidrolizin arttığı, fakat optimum çalışma sıcaklığı aşıldığında enzimin inaktive olması ile reaksiyonun katalizlenmediği gözlenmiştir. Optimum çalışma sıcaklığı olarak bulunan 60°C'de % hidroliz derecesi 39.82 olarak bulunmuştur.
- 3) Enzim miktarının etkisi incelendiğinde, 2.5 ml/l  $\alpha$ -amilaz enzimi hidrolizleme için en uygun miktar olarak bulunmuştur.
- 4) Viskozitenin etkisi incelendiğinde, çözeltinin viskozitesi gliserin ilavesi ile artırılmış, bunun sonucu olarak  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinde ve hidroliz derecesinde de mevcut bir azalma gözlenmiştir. Enzim aktivitesi yaklaşık %52'den %35'e, hidroliz derecesi ise yaklaşık %40'dan %16'ya düşmüştür. Bu azalma viskoz ortamdan dolayı kütle transfer hızının azalmasından kaynaklanmaktadır. Enzim aktivitesi tayininde elde edilen deneysel veriler tek adım birinci dereceden olmayan enzim inaktivasyon modeline uymuştur.
- 5) Hidrolizat miktarının etkisi incelendiğinde, hidrolizat ürünlerinin inhibitör etkisinden dolayı, enzimin inaktive olduğu ve böylelikle hidrolizin azaldığı gözlenmiştir. %100 hidrolizat

ilavesi ile enzim aktivitesinin yaklaşık %10'a, hidroliz derecesinin ise yaklaşık %8'e azaldığı görülmüştür. Enzim aktivitesi tayininde elde edilen deneysel veriler Quadratik modele uymuştur.

- 6) Karıştırıcı hızının etkisi incelendiğinde, karıştırıcı hızının artması ile enzim aktivitesi azalmış ve hidroliz derecesi 300 rpm'de yaklaşık %40 (maksimum değer) olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi tayininde elde edilen deneysel veriler Quadratik modele uymuştur.
- 7) Zamanın etkisi incelendiğinde, 180 dakika sonunda  $\alpha$ -amilaz enziminin yaklaşık %1 aktiviteye sahip olduğu, nişastanın ise yaklaşık %96 hidrolizlendiği belirlenmiştir. Enzim aktivitesi tayininde elde edilen deneysel veriler birinci derece enzim inaktivasyon modeline uymuştur.
- 8) Nişastasız ortamda zamanın etkisi incelendiğinde, 30 dakika sonunda  $\alpha$ -amilaz enziminin yaklaşık %66 ve 90 dakika sonunda ise yaklaşık %37 aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Enzim aktivitesi tayininde elde edilen deneysel veriler birinci derece enzim inaktivasyon modeline uymuştur.

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

- farklı kaynaklı ticari  $\alpha$ -amilaz enzimleri
- enzimin stabilitesini sağlayan aktivatörlerin ilavesi
- tutuklanmış  $\alpha$ -amilaz enzimleri
- değişik reaktör tipleri

**KAYNAKLAR**

Astolfi-Filfo, S., Galembeck, E. V., Faria, J. B. ve Frascino, A. C. S., (1986), "Stable Yeast Transformants that Secrete Functional  $\alpha$ -Amylase Encoded by Cloned Mouse Pancreatic cDNA", *Biotechnology*, 4:311-315.

Atkinson, B. ve Mavituna, F., (1991), *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan Publishers, Hamsphire.

Bealin-Kelly, F., Kelly, C. ve Fogarty, W. M., (1991), "Studies on The Thermostability of The  $\alpha$ -Amylase of *Bacillus Caldovelox*", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 36:332-336.

Biröl, G., (1997), *Fermentation Characteristics of Four Genetically Engineered Saccharomyces Cerevisiae Strains*, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.

Çetin, E. T., (1983), *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Colonna, P., Buleon, A. ve Lemarie, F., (1988), "Action of *Bacillus Subtilis*  $\alpha$ -Amylase on Native Wheat Starch", *Biotechnol. Bioeng.*, 31:895-904.

De Cordt, S., Vanhoof, K., Hu, J., Maesmans, G., Hendrickx, M. ve Tobback, P., (1992), "Thermostability of Soluble and Immobilized  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus Licheniformis*", *Biotechnol. Bioeng.*, 40:396-402.

De Moraes, L. M. P., Astolfi-Filho, S. ve Oliver, S. G., (1995), "Development of Yeast Strains for the Efficient Utilisation of Starch: Evaluation of Constructs that Express  $\alpha$ -Amylase and Glucoamylase Separately or as Bifunctional Fusion Proteins", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 43:1067-1076.

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

Fujii, M., Homma, T. ve Taniguchi, M., (1988), "Synergism of  $\alpha$ -Amylase and Glucoamylase on Hydrolysis of Native Starch Granules", *Biotechnol. Bioeng.*, 32:910-915.

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

Hill, G. A., Macdonald, D. G. ve Lang, X., (1997), " $\alpha$ -Amylase Inhibition and Inactivation in Barley Malt during Cold Starch Hydrolysis", *Biotechnol. Lett.*, 19(11):1139-1141.

Jones, M. G., (1984), *Transients in Inhibited Fermentations*, Doktora tezi, Wales Üniversitesi, Swansea, UK.

Komolprasert, V. ve Ofoli, R. Y., (1991), "Starch Hydrolysis Kinetics of *Bacillus Licheniformis*  $\alpha$ -Amylase", *J. Chem. Biotechnol.*, 51:209-223.

Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T. ve Saki, T., (1997), "Enzymatic Desizing of Polyvinyl Alcohol from Cotton Fabrics", *J. Chem. Biotechnol.*, 68:151-156.

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

Mountain, A., Ney, U. ve Schomburg, D., (1999), *Biotechnology: Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic Genes*, Wiley-VCH, Weinheim.

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

Özbek, B. ve Lovitt, R. W., (1999), "Solubilisation Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Wheat Starch Gluten", 9<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology (ECB9), 12-15 Temmuz 1999, Belgium, Brussels, CD-ROM, 1-6.

Özbek, B. ve Ülgen, K., (1999), "Studies on the Stabilities of Enzymes After Disruption by a Sonifier", *Process Biochemistry*, (baskıda).

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

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

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

Rothstein, D. M., Devlin, P. E. ve Cate, R. L., (1986), "Expression of  $\alpha$ -Amylase in *Bacillus Licheniformis*", *J. Bacteriol.*, 168(2):839-842.

Sadana, A. ve Henley, J. M., (1987), "Single Step Unimolecular Non-first-order Enzyme Deactivation Kinetics", *Biotechnol. Bioeng.*, 30:717-723.

Saito, N. ve Yamamoto, K., (1975), "Regulatory Factors Affecting  $\alpha$ -Amylase Production in *Bacillus Licheniformis*", *J. Bacteriol.*, 121(3):848-856.

Salieri, G., Vinci, G. ve Antonelli, M. L., (1995), "Microcalorimetric Study of the Enzymatic Hydrolysis of Starch: An  $\alpha$ -Amylase Catalyzed Reaction", *Analytica Chimica Acta*, 300:287-292.

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

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

Sheely, M. L., (1932), "Glycerol Viscosity Tables", *Industrial and Engineering Chemistry*, 24(9):1060-1064.

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

Textor, S. D., Hill, G. A., Macdonald, D. G. ve Denis, E. S., (1998), "Cold Enzyme Hydrolysis of Wheat Starch Granules", The Canadian Journal of Chemical Engineering, 76:87-93.

Tomazic, S. J. ve Klibanov, A. M., (1988), "Mechanism of Irreversible Thermal Inactivation of Bacillus  $\alpha$ -Amylases", J. Biol. Chem., 263(7):3086-3091.

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

Wang, N. S., (1999), <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm>, "Experiment No:5 Starch Hydrolysis by Amylase".

Whistler, R. L., Smith, R. J., BeMiller, J. N. ve Wolfram, M. L., (1964), Methods in Carbohydrate Chemistry: Volume: IV: Starch, Academic Press, New York.

Wiseman, A., (1979), Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Ellis Horwood, Chichester.

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

Ek 1 Çalışmada kullanılan modeller ve R<sup>2</sup> değerleriÇizelge E1.1  $\alpha$ -Amilaz enzim inaktivasyonu ile ilgili modeller ve R<sup>2</sup> değerleri

Parametre	Matematiksel model	Türetilmiş denklem	R <sup>2</sup>
Viskozite	Ampirik formül (Sadana ve Henley, 1987)	$[A]/[A_{max}] = (1 - \alpha_1) \exp(-k_D \cdot \mu) + \alpha_1$	0.9819
Hidrolizat miktarı	Quadratic formül	$[A] = a + b \cdot H + c \cdot H^2$	0.9985
Karıştırıcı hızı	Quadratic formül	$[A] = a + b \cdot N + c \cdot N^2$	0.9784
Zaman (Nişastalı)	$d[A]/dt = -k_D \cdot [A]$ (Jones, 1984)	$[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k_D \cdot t)$	0.9905
Zaman (Nişastasız)	$d[A]/dt = -k_D \cdot [A]$ (Jones, 1984)	$[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k_D \cdot t)$	0.9918

Çizelge E1.2 Ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile ilgili modeller ve R<sup>2</sup> değerleri

Parametre	Matematiksel model	Türetilmiş denklem	R <sup>2</sup>
Enzim miktarı	Ampirik formül (Komolprasert ve Ofoli, 1991)	$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot E) + c$	0.9936
Viskozite	Ampirik formül (Komolprasert ve Ofoli, 1991)	$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot \mu) + c$	0.9946
Hidrolizat miktarı	$d[S]/dt = (d[S]/dt)_{H=0} \exp(-a \cdot H)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - [S_{ho}] \cdot \exp(-a \cdot H)$	0.9939
Karıştırıcı hızı	Ampirik formül (Komolprasert ve Ofoli, 1991)	$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot N) + c$	0.9847
Zaman (Nişastalı)	$d[S]/dt = a \cdot [S]$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] \cdot \exp(-a \cdot t)$	0.9981

**ÖZGEÇMİŞ**

<b>Doğum tarihi</b>	14.03.1975	
<b>Doğum yeri</b>	İstanbul	
<b>Lise</b>	1989-1992	Pendik Lisesi
<b>Lisans</b>	1992-1996	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği
<b>Yüksek Lisans</b>	1996-2000	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Müh. Anabilim Dalı

