

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

128576

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

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Kimya Mühendisi Dilek KILIÇ

F.B.E. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Belma KIN ÖZBEK



Prof. Dr. Esen Bolat



Doç. Dr. Kutlu Ülgen

İSTANBUL, 2002

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. ENZİMLER.....	2
2.1 Enzim Nedir?.....	2
2.2 Enzimlerin Yapısı.....	2
2.3 Enzimlerin Etki Mekanizması.....	3
2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
2.5 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	5
2.6 Enzim İnhibisyonu.....	5
2.7 Enzim Üretimi.....	6
2.8 Enzimlerin Uygulama Alanları.....	9
3. NIŞASTA.....	11
3.1 Nişastanın yapısı.....	11
3.2 Nişastanın Hidrolizlenmesi.....	12
4. AMİLAZ ENZİMLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ	15
4.1 $\alpha$ -Amilaz.....	15
4.1.1 $\alpha$ -Amilazın Kimyasal Yapısı.....	15
4.1.2 $\alpha$ -Amilazın Endüstriyel Uygulamaları.....	16
4.2 $\beta$ -Amilaz.....	17
4.3 Gliko Amilaz.....	17
5. $\alpha$ -AMİLAZ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	18
6. METERYAL VE YÖNTEM.....	22
6.1 Kullanılan Materyaller.....	22
6.2 Kullanılan Cihazlar.....	22
6.2.1 Karıştırmalı biyoreaktör.....	25

6.2.2	Kontrol modülleri.....	26
6.3	Deneyin Yapılışı.....	27
6.4	Analiz Yöntemleri.....	27
6.4.1	Enzim aktivite tayini.....	27
6.4.2	Nişasta konsantrasyonu tayini.....	28
6.5	Hesaplamalar.....	28
6.5.1	Enzim aktivitesinin hesaplanması.....	28
6.5.2	Nişasta konsantrasyonunun hesaplanması.....	29
7.	ARAşTIRMA BULGULARI.....	30
7.1	Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	30
7.2	pH'ın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	33
7.3	Karştırıcı Hızının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi. ....	37
7.4	Zamanın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	40
7.5	Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi...	43
7.6	Viskozitenin Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	46
7.7	Hidrolizat Miktarının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	52
7.8	Maltozun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	55
7.9	Glikozun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	59
7.10	Etanolün Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	62
7.11	CaCl <sub>2</sub> 'ün Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi.....	65
8.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	68
	KAYNAKLAR.....	72
	EKLER.....	75
	Ek 1.Deneysel Verilere Uyan Modeller ve R <sup>2</sup> değerleri.....	75
	ÖZGEÇMİŞ.....	78

## SİMGE LİSTESİ

$[A_0]$	$t=0$ anındaki enzimin aktivitesi
$[A_1]$	İşlem sonu enzim aktivitesi
$[A]$	İşlem sonu % enzim aktivitesi
$C_{ao}$	$t=0$ anında çözünür nişastanın absorbands değeri
$C_{ak}$	Kontrol çözeltisindeki çözünür nişastanın absorbands değeri
$C_{a1}$	İşlem sonunda çözünür nişastanın absorbands değeri
$C_{so}$	$t=0$ anındaki nişastanın absorbands değeri
$C_{s1}$	İşlem sonunda ortamda kalan nişastanın absorbands değeri
H	% Hidroliz derecesi
$[H]$	% Hidrolizat miktarı, (hacim/hacim)
E	Enzim miktarı, g/l
Et	%Etanol miktarı, (hacim/hacim)
$G_1$	%Gliserin miktarı, (hacim/hacim)
$G_2$	Glikoz konsantrasyonu, g/l
$k_D$	Enzim inaktivasyonunun hız sabiti, dakika <sup>-1</sup>
M	Maltoz konsantrasyonu, g/l
$\mu$	Viskozite, cP
N	Karıştırıcı hızı, devir/dakika
$\sigma$	Standart sapma
$R^2$	Regresyon katsayısı
$[S_0]$	$t=0$ anındaki nişasta konsantrasyonu, g/l
$[S_1]$	İşlem sonunda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu, g/l
$[S_{G1o}]$	İşlem sonunda hidroliz olan nişasta konsantrasyonu (gliserin miktarı, $G_1=0$ ), g/l
$[S_{G2o}]$	İşlem sonunda hidroliz olan nişasta konsantrasyonu (glikoz miktarı, $G_2=0$ ), g/l
$[S_{ho}]$	İşlem sonunda hidroliz olan nişasta konsantrasyonu (hidrolizat miktarı, $[H]=0$ ), g/l
$[S_{Mo}]$	İşlem sonunda hidroliz olan nişasta konsantrasyonu (maltoz miktarı, $M=0$ ), g/l
T	Sıcaklık, °C
t	Zaman, dakika
$t_{1/2}$	Enzimin yarılanma ömrü, dakika

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Enzimin yapısı..... 2
Şekil 2.2	Enzim-substrat etkileşim modelleri..... 4
Şekil 2.3	Endüstriyel enzim üretimi..... 7
Şekil 3.1	Amiloz molekülü..... 11
Şekil 3.2	Amilopektin molekülü..... 12
Şekil 3.3	Nişasta hidrolizlenmesi (Fruktoz üretimi)..... 14
Şekil 6.1	Deney düzeneğinin genel görünüşü..... 23
Şekil 6.2	Biyoreaktör ve kontrol modüllerinin şeması..... 24
Şekil 7.1	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun sıcaklıkla değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 31
Şekil 7.2	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun pH ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 35
Şekil 7.3	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun karıştırıcı hızı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 38
Şekil 7.4	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 41
Şekil 7.5	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun enzim konsantrasyonu ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 45
Şekil 7.6a	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidroliz çözeltisinin viskozitesi ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 48
Şekil 7.6b	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun gliserin miktarı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 50
Şekil 7.7	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidrolizat miktarı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 54
Şekil 7.8	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun maltoz miktarı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 57
Şekil 7.9	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun glikoz miktarı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 60
Şekil 7.10	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun etanol miktarı ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 64
Şekil 7.11	%Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun CaCl <sub>2</sub> ilavesi ile değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 66

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Çeşitli enzimler ve endüstride uygulama alanları..... 9
Çizelge 4.1	$\alpha$ -Amilaz enziminin amino asit bileşimi..... 16
Çizelge 6.1	Biyoreaktör ile ilgili bileşenler ve değerleri..... 25
Çizelge 7.1	Sıcaklığa karşılık elde edilen deneysel veriler (pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 30
Çizelge 7.2	pH'a karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, N=300 devir/dak)..... 34
Çizelge 7.3	Karıştırıcı hızına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5)..... 37
Çizelge 7.4	Zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 40
Çizelge 7.5	Enzim konsantrasyonuna karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 44
Çizelge 7.6	Viskozite değerlerine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300devir/dak)..... 47
Çizelge 7.7	Hidrolyzat miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 53
Çizelge 7.8	Maltoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 56
Çizelge 7.9	Glikoz miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 59
Çizelge 7.10	Etanol miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 63
Çizelge 7.11	CaCl <sub>2</sub> konsantrasyonuna karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60 <sup>0</sup> C, pH=6.5, N=300 devir/dak)..... 65
Çizelge E1.1	$\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesi ile ilgili modeller ve R <sup>2</sup> değerleri..... 75
Çizelge E1.2	Ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile ilgili modeller ve R <sup>2</sup> değerleri..... 77

## ÖNSÖZ

Bu tezin bana verilmesini sağlayan Bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Salih DİNÇER'e, çalışmamın her aşamasında beni yönlendirerek yardım ve desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Belma KIN ÖZBEK'e, yalnız öğrenim hayatım boyunca değil tüm yaşantım boyunca her zaman beni destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZET

Birçok biyoteknolojik proses hızlı bir gelişim gösterirken, kullanılan enzimlerin deaktivasyonu bu proseslerin verimini önemli bir ölçüde azaltmaktadır. Enzim deaktivasyonu hakkında edinilecek bilgiler, biyoteknolojik proseslerin fizibilitesini arttıracaktır. Nişasta, birçok endüstri dalında kullanılan önemli bir biyopolimerdir. Nişasta moleküllerini farklı biyokimyasallara dönüştürmek için enzimler kullanılmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz enziminin nişasta partiküllerini sulu ortamda parçaladığı bilinmektedir. Başarılı bir hidroliz sisteminin tasarımı için öncelikle, hidroliz prosesi sırasında  $\alpha$ -amilaz enziminin kinetik aktivitesinin yüksek olması gerekmektedir. Çünkü,  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin azalması verimi önemli ölçüde etkileyecektir.

Bu çalışmada, mısır nişastasını *Bacillus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile hidroliz işlemine tabi tutulmuş ve nişastanın hidroliz derecesi ile işlem sonu enzim aktivitesinin, sıcaklık, pH, karıştırıcı hızı, zaman, enzim konsantrasyonu, viskozite, hidrolizat miktarı, maltoz konsantrasyonu, glikoz konsantrasyonu, etanol miktarı ve  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonu ile değişimi incelenmiştir. Ayrıca enzim aktivitesi ve nişasta konsantrasyonuna ait elde edilen deneysel veriler kullanılarak matematiksel modeller kurulmuştur. Hidroliz işlemi modüler bir bioreaktör sistemi kullanılarak 500 ml'lik (nişasta oranı %1 ağırlık/hacim) çözelti hacminde gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, işlem sonu  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin ve mısır nişastasının hidroliz derecesinin, incelenen her bir parametre için farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mısır nişastasını, enzimatik hidroliz, proses değişkenleri

## ABSTRACT

The rapid enhancement of many biotechnology processes has been severely constrained by enzyme deactivation. An improved knowledge of enzyme deactivation would significantly enhance the feasibility of quite a few biotechnological processes. Starch has become a very important biopolymer and is used in many industries as a feedstock material. Enzymes are used to quickly transform starch molecules to useful, added-value biochemicals.  $\alpha$ -Amylase enzyme is known to effectively attack both insoluble starch and starch granules held in aqueous suspension. Before designing a successful hydrolysis system, maintain a good activity of the  $\alpha$ -amylase enzyme which is not degraded during the process is important. Because, the loss of enzyme activity will significantly affect the process yield.

In the present study, corn starch is hydrolysed with  $\alpha$ -amylase enzyme which is produced from *Bacillus Species*. The degree of corn starch hydrolysis (%) and residual  $\alpha$ -amylase activity (%) were investigated versus temperature, pH, impeller speed, processing time, enzyme concentration, viscosity, amount of hydrolysate added, maltose concentration, glyucose concentration, amount of ethanole added and  $\text{CaCl}_2$  concentration. And also, the mathematical models which represent the residual starch concentration and residual  $\alpha$ -amylase activity were developed according to the data obtained from the experiments. The hydrolysis reactions were carried out in a modular bioreactor system in 500 ml of aqueous solutions containing 1 % (w/v) corn starch. An evaluation of the experimental data showed that residual activity of  $\alpha$ -amylase enzyme and hydrolysis degree of corn starch studied were different for each set of these conditions.

**Keywords:** Corn starch, enzymatic hydrolysis, process variables

## 1. GİRİŞ

Biyoteknolojinin son 50 yıldaki gelişimi ile biyolojik organizmaların, sistemlerin ve proseslerin endüstride kullanılması hız kazanmıştır. Özellikle son çeyrek yüzyılda çevre ve insan sağlığının ön plana çıkması ile, enzimlerden teknolojiye daha iyi yararlanılma yolları aranmış ve önemli başarılar elde edilmiştir. Endüstriyel üretimde kimyasal katalizörler yerine, katalitik olarak daha etkili, ürün spesifikasyonu yüksek, istenmeyen ürün oluşumunu büyük ölçüde azaltan, enerji maliyeti düşük prosesler gerektiren, çevre dostu enzimlerin kullanımı artmıştır.

Enzimlerin gıda ve fermentasyon endüstrisinde kullanımı oldukça eskidir. Örneğin, arpadan elde edilen malt özütünün nişastayı çözünürleştirdiği çok eskiden beri bilinmektedir. Nişasta birçok endüstride kullanılan önemli bir biopolimerdir. Nişastanın endüstride çok amaçlı kullanılabilir bir madde olmasını sağlayan en önemli özelliği, glikoz birimleri arasındaki bağlarının asitler veya enzimlerle hidrolizidir. Günümüzde nişastanın hidrolizlenmesi özellikle tatlandırıcı üretiminde önemli bir proses olarak gelişmiştir. Nişasta hidrolizi ile tatlandırıcıları sadece şeker pancarı ve şeker kamışından değil nişasta içeren bitkilerden de üretmek mümkün olmaktadır. Nişastanın hidrolizlenmesinde amilaz enzimleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişastanın enzimatik hidrolizi ve hidroliz işlemi için kullanılan enzimler birçok araştırmacı tarafından ilgi gören bir konu olmuştur.

Bu çalışmada, Bölüm 2'de Enzimler başlığı altında enzimler hakkında bilgilere, Bölüm 3'de nişasta ve yapısı ile ilgili bilgilere, Bölüm 4'de amilaz enzimleri ve genel özelliklerine yer verilmiştir. Bölüm 5'de literatürde yer alan  $\alpha$ -amilaz enzimi ile ilgili bazı çalışmalar kısaca özetlenmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan maddeler ve cihazlar ile analiz yöntemleri, Materyal ve Yöntem başlığı altında Bölüm 6'da, deneysel çalışmalar ve bunlara ait deneysel veriler kullanılarak elde edilen matematiksel ifadeler Araştırma Bulguları başlığı altında Bölüm 7'de yer almaktadır. Bölüm 8'de deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar özetlenmektedir.

## 1. ENZİMLER

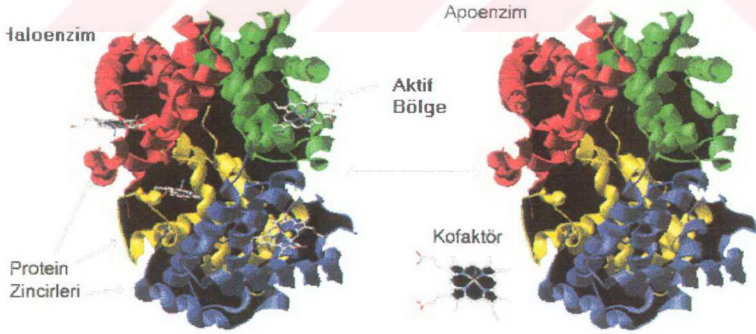
### 1.1 Enzim Nedir?

Enzimler doğal katalizör olarak işlev görerek hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirleyen, çoğunluğu protein yapısında olan ve bütün canlı organizmalarda bulunan makromoleküllerdir ([1]; Demirsoy, 1989).

### 1.2 Enzimlerin Yapısı

Enzimler molekül ağırlıkları genellikle 6000 ile 600000 arasında değişen uzun amino asit zincirleridir. Genler tarafından şifrelenen enzimlerin aminoasit dizilimi kendilerine özgüdür. Bu nedenle her enzim farklı bir üç boyutlu yapıya sahiptir.

Bazı enzimler sadece proteinlerden oluşmuştur (pepsin ve üreaz gibi). Fakat genel olarak enzimler yapılarında bileşim ve işlev olarak birbirinden farklı, apoenzim ve koenzim olarak adlandırılan iki kısım bulundurulurlar (Şekil2.1) (Demirsoy, 1989; [2]; Gates, 1992).



Şekil 2.1 Enzimin yapısı [3]

•**Apoenzim kısmı:** Enzimlerin protein kısmıdır. Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.

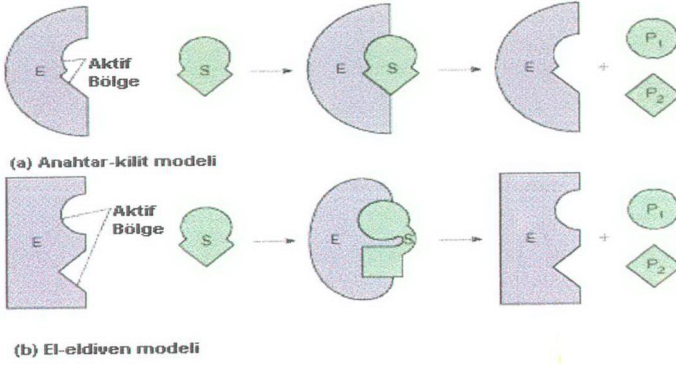
•**Koenzim kısmı:** Organik yada inorganik çoğu zaman fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük molekülü, enzime katalitik aktivite özelliği veren kısım. Koenzim kısmı metal iyonu ise (Ca, K, Mg, Zn gibi) kofaktör olarak isimlendirilir. Apoenzim ve koenzim kısımlarının ikisine birden haloenzim adı verilir ([4]; Demirsoy, 1989; Çetin, 1983).

### 2.3 Enzimlerin Etki Mekanizması

Kimyasal katalizörler gibi enzimlerde reaktan ve ürün arasındaki enerji bariyerini (aktivasyon enerjisini) azaltarak, reaksiyon hızını artırırlar. Her enzimin katalizleyici etkisi yalnızca bir ip tepkimeye ve belirli türden maddelere özgüdür. Enzimin etki ettiği bu maddeye ise substrat denir. Enzimatik reaksiyonlar genelde üç aşamada gerçekleşir;

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

Enzim-substrat etkileşimini açıklayan ilk model, alman kimyacı Emil Fisher (1890) tarafından savunulan anahtar kilit modelidir (Şekil 2.2.a). Bu modele göre, enzimde substratın bağlanacağı kısım ile substratın şekli birbirini bütünler. Enzim çok seçicidir ve şekli farklı olan başka bir substratı katalizlemez. Enzim-substrat etkileşimini açıklayan ikinci model ise Daniel Koshland (1958) tarafından savunulan ve anahtar kilit-modeline göre enzim seçiciliğinin biraz daha az spesifik olduğu el ve eldiven modelidir (Şekil 2.2.b). Bu modele göre enzimde substratın bağlanacağı kısmın, esnek bir yapıya sahip olduğu ve bağlanan substrata göre şekillendiği varsayılmaktadır [5],[6].



Şekil 2.2 Enzim-substrat etkileşim modelleri [7]

## 2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

1961'de Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından öngörülen enzimlerin sistematik sınıflandırılmasında, enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı ana sınıfa ayrılmıştır.

1. **Oksidoredüktazlar:** Redoks tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
2. **Transferazlar:** Bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerdir.
3. **Hidrolazlar:** Hidrolizlenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
4. **Liyazlar:** Su veya amonyak gibi küçük molekülleri çift bağa ekleyerek bağı parçalayan veya uzaklaştırarak çift bağ oluşturan enzimlerdir (Su molekülü çıkarmadan molekülleri parçalayan enzimlerdir).
5. **İzomerazlar:** Molekül içinde değişiklik yaparak bir molekülün izomere dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir.
6. **Ligazlar:** Büyük moleküller oluşturmak üzere (enerji kullanarak) küçük molekülleri birbirine bağlayan enzimlerdir [4], [5].

## 2.5 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesine etki eden faktörler başlıca;

- Etki edeceği malzeme (substrat)
- Sıcaklık (reaksiyon hızını artırır, enzimin bozulmasına sebep olur)
- pH
- İnhibitörler \ Protein bozucular
- Zamandır.

## 2.6 Enzim İnhibisyonu

İnhibitörler enzime bağlanarak, enzimin reaksiyon hızı üzerindeki etkisinin azalmasına yol açan maddelerdir. Enzimin inhibitörleri iki gruba ayrılır;

- Tersinir inhibitörler:** Enzime zayıf bağlarla bağlanan, etkileri tersinir olan inhibitörlerdir. Konsantrasyonları düşürüldüğünde enzimlerden ayrılma eğilimi gösterdiklerinden enzim aktivitesi normal seviyesine döner. Tersinir inhibitörler enzimde bağlandıkları yere göre ikiye ayrılır;

**Rekabetçi (competitive) inhibitörler;** Substratın bağlanacağı aktif kısma bağlanıp substratın bağlanmasını engelleyerek reaksiyon hızını düşürürler. (İnhibitör konsantrasyonunun düşürülmesi yanında, substrat konsantrasyonunun artırılması da bu durumda reaksiyon hızını tekrar artırır.)

**Rekabetçi olmayan (non-competitive) inhibitörler;** Enzimde aktif kısmın dışında bir yere bağlanırlar, enzimin konformasyonunu değiştirerek reaksiyonu engellerler.

- Tersinmez inhibitörler:** Enzime sıkıca, genellikle kovalent bağlarla bağlanan yada enzim yapısındaki kovalent bağları parçalayan inhibitörlerdir. Etkileri tersinmezdir [5],[8].

## 2.7 Enzim Üretimi

Enzimler hayvansal kaynaklar, bitkisel kaynaklar veya mikroorganizmalardan elde edilir. Enzimler türlerine göre canlıların belirli hücrelerinde daha fazla bulunabildiği gibi yine türüne bağlı olarak hücrelerin belirgin kısımları da belirli enzimlerce zengindir. Enzimler hücrelerde buldukları yere göre ikiye ayrılır;

•**Hücre dışı enzimler:** Hücreler tarafından dışarı salgılanan enzimlerdir. Elde edilişleri kolay olduğundan endüstride kullanım alanları daha yaygındır.

•**Hücre içi enzimler:** Hücre yapılarına sıkıca bağlı olan ve dışarıya salgılanmayan enzimlerdir. Elde edilebilmeleri ve saflaştırılmaları için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir.

Endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizmalardan yararlanılır. Endüstriyel boyutta enzim üretimi (Şekil 2.3) en genel hali ile aşağıda açıklanmıştır.

### 1) Başlangıç Kültürü

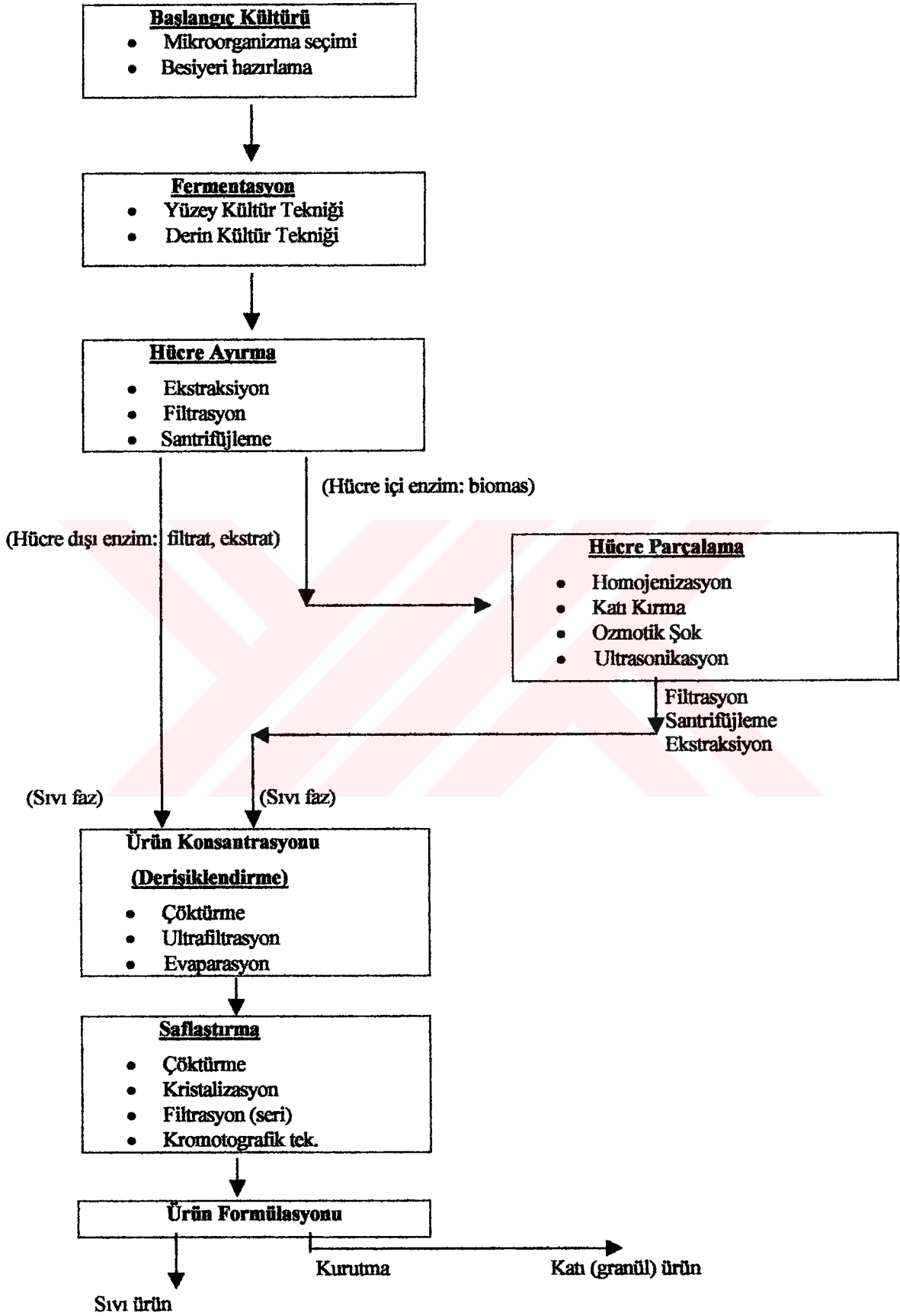
#### •Mikroorganizma Seçimi:

Üretimde uygun mikroorganizma türünün seçimi büyük önem taşır. Seçilecek mikroorganizmanın söz konusu enzimi bol miktarda üretiyor olması ilk şarttır. Seçimde önemli olan diğer parametreler ise: fermantasyon süresi; mikroorganizmanın hücre içi veya hücre dışı enzim üretecek olması; toksit madde veya antibiyotik üretiyor olmaması; ucuz besi ortamında çoğalabilmesi, olarak sıralanabilir.

#### •Besiyeri (Substrat):

Teknik besi ortamında bulunması gereken önemli bileşenler;

- Karbonhidratlar (C- ve Enerji kaynağı): Tahıl kütümesi, soya kütümesi, buğday ve pirinç kepeği, melas, patates nişastası en fazla kullanılan karbonhidrat kaynağıdır.
- Organik Azot (Amino asit): Balık unu, jelatin, kazein, kepek, peptonlar, soya kütümesi.
- Büyüme maddeleri ve iz elementler: Maya ekstratı, bitkisel yağlar, yağlı tohum kütümesi, kepek



**Şekil 2.3** Endüstriyel enzim üretimi

## **2) Fermentasyon**

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin fermentasyonunda iki teknik kullanılmaktadır.

### **• Yüzey Kültür Tekniği:**

Besiyeri (substrat) hazırlandıktan sonra steril koşullarda tepsilere serilir. Besi ortamı genelde katı veya yarı katı karakterdedir. Üretim için seçilen mikroorganizma besiyeri üzerine ekilir. Bu teknikte mikroorganizma besisi ortamının yüzeyinde çoğalır ve yüzeyde mikroorganizma hücreleri ve bunların metabolitlerinden ibaret bir tabaka oluşur.

### **• Derin Kültür Tekniği:**

Mikroorganizmalar bioreaktöre (kesikli, mekanik karıştırılmalı) besiyeri ile birlikte beslenerek (aerobik ortamda) üremeye bırakılır. Derin kültür tekniğinde hücreler çözelti içinde çoğalır.

## **3) Hücre ayırma**

Fermentasyon sona erdiğinde istenilen enzimi içeren kısım besiyerinin özelliğine göre ekstraksiyon, filtrasyon veya santrifüjleme tekniklerinden uygun olanı kullanılarak ayrılır. Hücre dışı enzim üretilmişse sulu faz (ekstrat veya filtrat), hücre içi enzim üretilmişse katı faz (biomas) alınır.

## **4) Hücre parçalama**

Hücre içi enzimin oluşumu durumunda enzimin serbest hale geçebilmesi için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan yöntemler; presleme, homojenizasyon, katı kırma, soğuk şok, alkali ile muamele ve ultrasonikasyondur. Hücre parçalama işlemi tamamlandıktan sonra enzim uygun bir tampon çözelti ile ekstrakte edilir. Katı kütlelerin ayrılmasında ise yine santrifüjleme veya filtrasyon tekniklerinden uygun olanı kullanılır.

## **5) Ürün konsantrasyonu**

Daha derişik bir ürün elde etmek amacıyla enzimi içeren sıvı faz, evaporasyon veya ultrafiltrasyon işlemi ile derişiklendirilir.

## 6) Safılaştırma

Enzim çözeltilisi içerisindeki safsızlıkların giderilmesi için kullanılan en yaygın yöntemler; fraksiyonel çöktürme, kristalizasyon ve seri filtrasyon işlemleridir.

## 7) Ürün formülasyonu

Safsızlıkları giderilen ürün içerisine koruyucu maddeler ilave edilerek sıvı veya kurutulmuş (püskürtücü kurutucu, akışkan yatak metodu veya vakum kurutma) katı granüller halinde kullanıma hazır hale getirilir (Çetin, 1983; Telefoncu, 1995; [9]).

## 2.8 Enzimlerin Uygulama Alanları

Kimyasal katalizörlere göre pek çok avantajı olan enzimlerin endüstride kullanımı teknolojinin gelişimi ile hızlı bir şekilde artmaktadır. Aşağıdaki tabloda endüstride en çok kullanılan enzimler ve kullanım alanları kısaca özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1** Çeşitli enzimler ve endüstride uygulama alanları (Çetin, 1983; Telefoncu, 1995)

Enzim	Uygulama alanları
Proteaz	Protein hidroliz eden hücre dışı enzim özütleridir. Gıda endüstrisinde (buğday proteinlerinin modifikasyonunda, etin gevrekleştirilmesinde, peynir endüstrisinde başlatıcı), içecek sanayi (biralarm berraklaştırılmasında), hayvan yem sanayi (balık atıklarının değerlendirilmesinde), deterjan endüstrisi, selüloz ve kağıt endüstrisi, deri endüstrisi
Selülaz	Selülozu glikoza hidroliz eden enzimlerdir. Tekstil endüstrisi, deterjan endüstrisi, hayvan yem sanayi. Tarımsal atıklardan glikoz üretiminde, eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
$\alpha$ -Amilaz	Niştayı belirli oranda hidroliz ederek çözünürleştirir. Tekstil endüstrisi, deterjan sanayi, gıda endüstrisi (tatlandırıcı eldesi için), atık su arıtımı

Çizelge 2.1 (Devam)

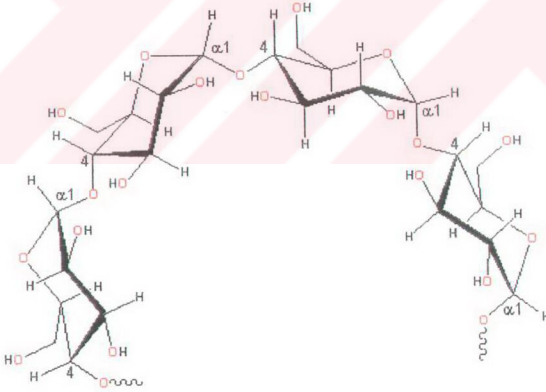
Enzim	Uygulama alanları
Lipaz	Yağları yağ asitlerine hidrolizler. Gıda endüstrisi (yağların hidrolizi, süt ürünlerinin koku ve tadını geliştirmede), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında), hayvan yem sanayi, deterjan sanayi, kağıt endüstrisi, deri sanayi
Hemi-selüloz	Gıda endüstrisi (tatlandırıcı olarak)
Gliko-amilaz	Nişasta zincirlerini glikoza kadar hidroliz eder. Gıda sanayi (nişastadan glikoz üretiminde)
Pektinaz	Pektin molekülünü hidroliz eden enzimdir. İçecek endüstrisi(meyve suyu üretiminde verimi arttırmada, meyve suyunun berraklaştırılmasında)
Laktaz	Laktozu glikoz ve galaktoza hidroliz eder. Gıda sanayi (laktozsuz süt üretiminde, peynir altı sularının değerlendirilmesinde)
Glikoz-izomeraz	Glikozu fruktoza dönüştürür. Gıda sanayi (şekerleme, çikolata, reçel ve marmelat üretiminde)
Pullulanaz	Gıda endüstrisi (mısır ve tahıldan yapılmış kahvaltılık gıdalarda, tatlandırıcı olarak), içecek sanayi (içecek ve meşrubatlarda)
Katalaz	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ reaksiyonunu katalizler. Gıda endüstrisi (konservelerde glikoz oksidaz enzimi ile birlikte oksijen çıkarıcı olarak ve sütlerin soğuk pastörizasyonunda)
İnvertaz	Sakkoroza glikoz ve fruktoza hidroliz eder. Gıda sanayi (reçel, marmelad, çikolata ve dondurma üretiminde kristallenmeyi önleyici olarak)
Keratinaz	Keratin katmanlarını hidroliz eder. Tekstil sanayi, deri sanayi (kılların deriden ayrılmasında)
Tripsin ve Papain	Peptid ve proteinleri hidroliz eder. Gıda sanayi (etlerin gevrekleştirilmesinde), içecek sanayi (biralarmın berraklaştırılmasında), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
Pepsin	Proteinlerin peptid bağlarını hidroliz eder. İçecek sanayi (şarapçılıkta, biralarmın bulanıklılığının gideriminde), eczacılık (sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında)
Penisilinaz	Penisilini penisiloid aside hidroliz eder. Tıp (penisilin zehirlenmelerinde)

## 3. NİŞASTA

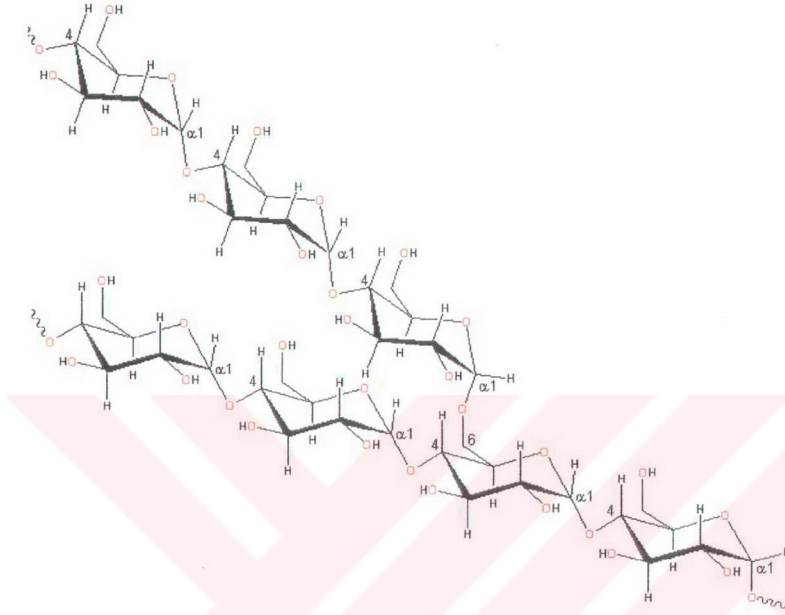
### 3.1 Nişastanın Yapısı

Nişasta  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ , bitki yumru ve tohumlarında yarı kristal tanecikler şeklinde depolanan, yapı olarak yüksek mertebeli glikoz polimerlerinden oluşmuş bir polisakarittir. Mısır, buğday, patates ve pirinç nişasta için önemli kaynaklardır.

Nişasta amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan iki tür polimerden oluşmuştur. Amiloz nişastanın yaklaşık %20-30'unu oluşturan,  $\alpha(1-4)$  glikozik bağlarla bağlı glikoz üniteleri içeren (molekül başına 4-5 dallanma noktası veren), nişastanın düz zincirli bileşenidir (Şekil 3.1). Nişastanın %70-80'ini oluşturan amilopektin ise  $\alpha(1-4)$  glikozik bağlarla bağlı ve  $\alpha(1-6)$  bağları ile dallanan (molekül başına 250 dallanma noktası verir) glikoz üniteleri içeren bir polimerdir (Şekil 3.2) (Wang, 1999; [10]).



Şekil 3.1 Amiloz molekülü [10]



Şekil 3.2 Amilopektin molekülü [10]

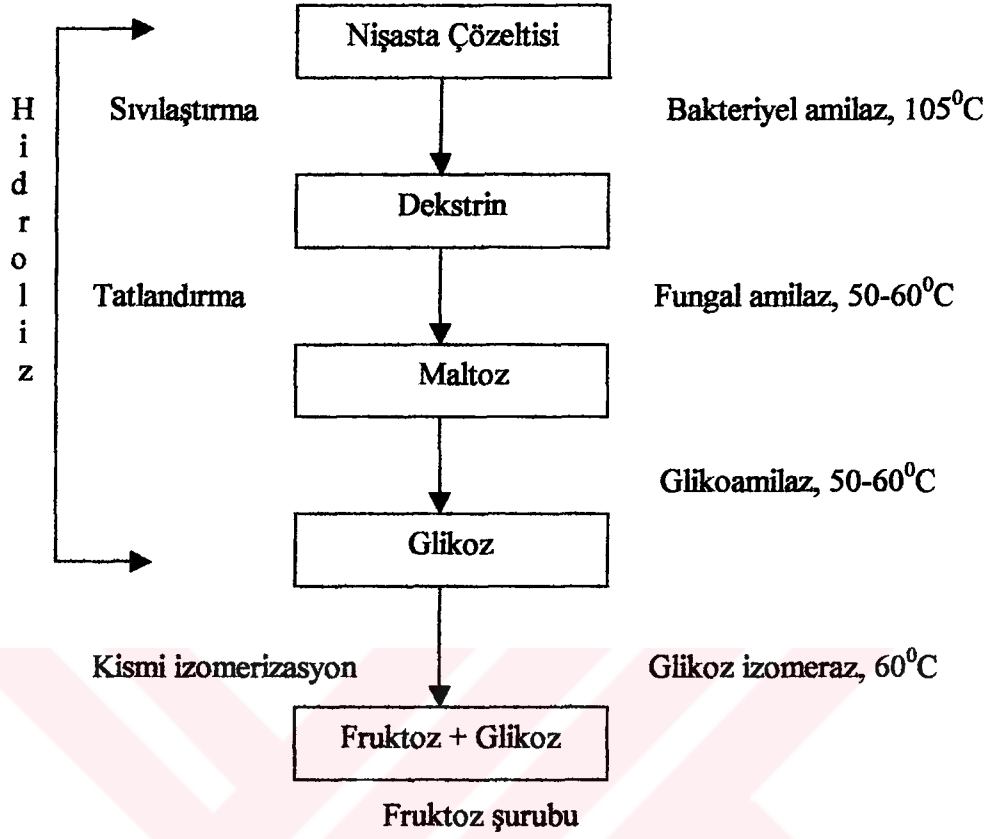
## 2 Nişastanın Hidrolizlenmesi

işasta önemli bir biopolimer olup, birçok endüstride kullanılmaktadır (gıda endüstrisi; tlandırıcı şurupların eldesi, tekstil endüstrisi; haşillama prosesinde, kimya endüstrisi; etanol etimi, yapııştırıcı üretimi, kağıt sanayi vs.). Nişastanın endüstride çok amaçlı kullanılabilir r madde olmasını sağlayan en önemli özelliği, glikoz birimleri arasındaki bağlarının asitler ya enzimlerle hidroliz edilebilmesidir. Nişasta depolimerizasyonu özellikle tatlandırıcı etiminde önemli bir proses olarak gelişmiştir (Park ve Rollings, 1994; Reed ve Underkofler, 1966).

Nişastanın hidrolizlenerek dekstrin, maltotrioz, maltoz veya glikoza dönüştürülmesiyle, tatlandırıcıları sadece şeker pancarı veya şeker karışından değil, nişasta içeren bitkilerden üretmekte mümkündür. Gıdaların tatlandırılmasında glikoz, potansiyel olarak şeker pancarı veya şeker karışından elde edilen şekere göre çok daha ucuz olmasının yanında daha tatlı olan fruktoza (enzimlerle) kısmen veya tamamen dönüştürülebilir ki bunu kimyasal olarak gerçekleştirmek mümkün değildir (Wang, 1999; Wood ve Pickering, 1982).

Nişastanın şekere asidik ve enzimatik hidrolizlenmesi 19. yüzyıldan beri bilinmektedir. **Nişastanın asit ile hidrolizlenmesinde;** nişasta çözeltisinin pH'ı, HCl kullanılarak 1.8'e ayarlanır ve çözelti 20-30 dakika için 120<sup>0</sup>C'ye ısıtılır. Asit hidrolizlenmesi ile ürün spesifikasyonunu kontrol etmek çok zordur. Hidrolizat zeltisi ise acı ve tuzludur. Bu nedenle enzimler nişastanın tatlandırılmasında asidin yerini almışlardır. Enzimlerin kullanımı ile değişik karakteristiklerde şeker ve nişasta şurupları elde etmek mümkündür (Reed ve Underkofler, 1966; www.europabio.org). Gerçekte, farklı gıda endüstrileri farklı glikoz-fruktoz oranında şurup talep eder (Wood ve Pickering, 1982).

Genellikle **enzimatik hidrolizlenme** iki aşama ile gerçekleşen bir prosestir. **Sıvılaştırma** olarak adlandırılan birinci aşamada; nişasta çözeltisi 100<sup>0</sup>C'nin üzerine ısıtılır ve ısıya dayanıklı bakteriyel amilaz (*Bacillus Licheniformis*) ile işleme tabi tutulur. Bu enzim nişastadaki birkaç glikozidik bağı hidrolizleyerek dekstrin üretir ve çözelti viskozitesini düşürür. **Tatlandırma** olarak adlandırılan ikinci aşamada dekstrin parçalanır. Bu aşamada fungal  $\alpha$ -amilaz kullanılarak dekstrin maltoza, amiloglikoz enzimi kullanılarakta maltoz serbest glikoza dönüştürülür. Prosesin bu kısmı 50-60<sup>0</sup>C arasında gerçekleştirilir. Nişasta parçalanmasında son ürün olan glikozu daha tatlı olan fruktoza dönüştürülmesi işlemi **izomerizasyon** olarak adlandırılır. Bu proses tatlandırma işleminden sonra 60<sup>0</sup>C'de glikoz izomeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Nişastanın enzimatik hidrolizlenmesi şematik olarak Şekil 3.3'de verilmiştir (Delphine vd., 1999; Wood ve Pickering, 1982).



şekil 3.3 Nişasta hidrolizlenmesi (Fruktoz eldesi)

#### 4. AMİLAZ ENZİMLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Amilaz enzimleri, hidrolazlar grubunda, glikozidik bağlara parçalayan karbohidrolazlar alt grubunun üyeleridir. Polisakkaridazlar olarak da adlandırılırlar. Amiloz, amilopektin, glikojen ve maltooligasakkaridlerdeki  $\alpha(1-3)$ ,  $\alpha(1-4)$ ,  $\alpha(1-6)$  glikozidik bağlarını hidrolizleyen geniş bir ailedirler. Önemli bir polisakkarit olan nişastayı parçalarlar (Yüceer, 2000).

Endüstride yaygın olarak kullanılan üç tip amilaz enzimi vardır.  $\alpha$ -Amilaz,  $\beta$ -amilaz ve glikoamilaz.

##### 4.1 $\alpha$ -Amilaz

Doğada birçok organizma tarafından yaygın olarak sentezlenir. Ticari olarak bakterilerden (*Bacillus Subtilis*, *Bacillus Diastaticus*) ve mantarlardan (*Aspergillus Oryzae*, *Aspergillus Niger*) üretilir. Nişastadaki  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağlarını hidrolizleyerek nişastayı daha düşük moleküllü ürünlere dönüştürür. Bakteriyel kaynaklı  $\alpha$ -amilazlar hidroliz ürünü olarak dekstrin oluştururlar ve sıvılaştırıcı enzim olarak isimlendirilirler. Fungal  $\alpha$ -amilazlar ise tatlandırıcı enzimler olarak isimlendirilir ve hidroliz ürünü olarak disakkarid olan maltozu oluştururlar (Casida, 1968; Tauber, 1949; Wang, 1999).

##### 4.1.1 $\alpha$ -Amilaz'ın Kimyasal Yapısı

$\alpha$ -Amilazın fizikokimyasal özellikleri ve etki mekanizması enzimin üretildiği kaynağa göre değişiklik gösterir.  $\alpha$ -Amilaz enziminin içerdiği aminoasitler ve aminoasit kompozisyonu, Çizelge 4.1'de verilmiştir (Yüceer, 2000).

**Çizelge 4.1  $\alpha$ -Amilaz enziminin aminoasit kompozisyonu (Yüceer, 2000)**

<b>Aminoasit adı</b>	<b>Mol miktarı (mol aminoasit/mol protein)</b>
Aspartik asit	51
Treonin	21
Serin	33
Glutamik asit	31
Prolin	9
Glisin	26
Alanin	28
Valin	16
Metiyonin	5
İzolösin	19
Lösin	19
Tirozin	13
Fenilalanin	11
Lizin	14
Histidin	10
Arginin	12
Triptofan	11
Sistein	1
<b>Toplam</b>	<b>330</b>

#### 4.1.2 $\alpha$ -Amilazın Endüstriyel Uygulamaları

Nişastasının sıvılaştırılmasında kullanılan  $\alpha$ -amilazın teknik uygulaması oldukça yaygındır. Gıda, kimya, tekstil ve deterjan gibi çeşitli endüstri dallarında gün geçtikçe artan miktarlarda kullanılmaktadır.

$\alpha$ -Amilazın başlıca kullanım alanları ise şöyledir;

- Ekmek üretimi
- Alkollü içecek üretimi
- Çikolata üretiminde şurup eldesi
- Bebek gıdalarının hazırlanması
- Şeker ve tatlandırıcı şurup eldesi
- Kumaşlardan haşıl sökme işlemi
- Püre ve çorbaların sıvılaştırılması
- Bira üretimi
- Deterjan üretimi
- Kağıt üretimi
- Nişasta bazlı yapıştırıcıların hazırlanması (Yüceer, 2000; Casida, 1968).

#### 4.2 $\beta$ -Amilaz

Arpa taneciklerinde, birçok tohumda, patatesten ve benzeri bitkilerde bulunur. Çözünür nişastayı çok kısa zamanda maltoza dönüştürür.  $\alpha$ -Amilaz enzimleri gibi nişastadaki  $\alpha$ -(1-4) glikozidik bağları hidrolizler. Nişastadaki amiloz bileşimini tamamen parçalar, amilopektini kısmen hidrolizler. Son ürün olarak maltoz oluşturdukları için tatlandırıcı enzim sınıfındadırlar (Tauber, 1949).

#### 4.3 Gliko Amilaz

Gliko amilaz ( $\alpha$ (1-4) glukanhidrolaz), nişastadaki  $\alpha$ (1-4) ve  $\alpha$ (1-6) glikozidik bağları hidrolizler. Glikoz monomeri oluşturur. Fungal amilaz ve gliko amilaz nişastayı basit şekerlere indirgemekte birlikte kullanılabilir. Özellikle saf glikoz istendiği durumlar için gliko amilaz ve  $\alpha$ -amilaz ardışık işlem olarak kullanılır (Wang, 1999; Yüceer, 2000).

## 5. $\alpha$ -AMİLAZ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Endüstride kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi birçok araştırmacının ilgisini çeken bir konu olmuştur. Aşağıda  $\alpha$ -amilaz enzimi ile yapılan bazı çalışmalar kısaca özetlenmiştir.

Özbek ve Yüceer (2001) tarafından yapılan çalışmada; *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile buğday nişastasının hidrolizine pH, sıcaklık, karıştırıcı hızı, viskozite, enzim miktarı, zaman ve hidroliz ürünlerinin etkisi incelenmiştir. Hidroliz işlemi için optimum sıcaklık 60°C, pH 6.5 ve karıştırıcı hızı 300 rpm olarak belirlenmiş; bu koşullarda 2.5 ml/l oranında enzim içeren %1 nişasta çözeltisi ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda, hidroliz derecesinin %40 olduğu enzimin ise aktivitesini % 48 kaybettiği saptanmıştır.

Marchal vd.(1999) tarafından yapılan çalışmada; *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile amilopektin patates nişastasının farklı endüstriyel şartlar için hidrolizlenmesi araştırılmış, parametreler; pH 5.6-7.6 aralığında, kalsiyum ilavesi 0-120  $\mu$ g/g aralığında, sıcaklık 63-97°C aralığında, substrat konsantrasyonu %3-37 (ağırlık/ağırlık) aralığında, enzim miktarı 27.6-372.4  $\mu$ l/kg aralığında ve karıştırıcı hızı 0-200 rpm aralığında incelenmiştir. Yüksek hidroliz derecesinin yüksek sıcaklık (90°C) ve düşük pH (6) değerinde gerçekleştiği saptanmıştır. Yüksek pH değerlerinde hidrolizlenme için maksimum sıcaklığın daha düşük derecelere kaydığı belirlenmiş, en düşük hidroliz hızı 90°C sıcaklıkta pH 7'de elde edilmiştir. Hidroliz derecesinin enzim miktarı ile arttığı, hidrolizlenme için enzim miktarı ile sıcaklık ve pH arasında interaktif bir etkileşimin olduğu, yüksek enzim konsantrasyonlarında (300  $\mu$ l/kg) sıcaklığın hidroliz hızını düşük enzim konsantrasyonlarına (100  $\mu$ l/kg) göre daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ilavesinin maksimum hidroliz için sıcaklığı düşürdüğü, kalsiyum konsantrasyonu ile sıcaklık arasında da interaktif bir etkileşim olduğu, karıştırıcı hızı değişiminin reaksiyon hızını fazla etkilemediği, substrat veya ürün inhibisyonu olmadığı saptanmıştır.

Textor vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada; kaynakları farklı üç  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılarak (*Bacillus* kaynaklı bakteriyel amilaz, *Aspergillus Orayze* kaynaklı fungal amilaz ve arpa kaynaklı bitkisel amilaz) değişik sıcaklık, pH, enzim ve substrat konsantrasyonlarında buğday nişastasının hidrolizi incelenmiştir. pH 5.5'da, 26°C'de, 3mg/ml nişasta ve 8mg/ml

enzim konsantrasyonu ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda bakteriyel amilazın 6 saatte nişastada %95, arpadan elde edilen amilazın %75, fungal amilazın ise %30 bozunma sağladığı tesbit edilmiştir. Aynı şartlarda (pH 5.5'da, 26°C'de 3 mg/ml nişasta konsantrasyonunda, 6 saat süresince) farklı enzim konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda arpa kaynaklı amilaz için kinetik olarak maksimum aktivite; 2.7 mg enzim/mg nişasta oranında %75 hidroliz derecesi ile, bakteriyel amilaz için 1.3 mg enzim/mg nişasta oranında %100 hidroliz derecesi ile elde edilmiştir. Fungal amilaz ile gerçekleştirilen deneylerde ise hidroliz derecesi enzim konsantrasyonu ile değişim göstermemiş, her konsantrasyon için yaklaşık %25 hidrolizlenme elde edilmiştir. Bakteri kaynaklı amilaz enzimi aynı şartlarda arpa kaynaklı amilaz enzimine göre daha yüksek hidroliz derecesi sağlarken, arpa kaynaklı enzimin diğerine göre daha ucuz olması bu proses için uygun enzim olarak seçilmesine neden olmuştur. Arpa kaynaklı enzim kullanımında hidroliz işlemi için optimum şartların belirlenmesi amacı ile yapılan deneyler sonucunda pH 4.5'da, 45°C sıcaklıkta 8 mg/ml konsantrasyonunda enzim kullanıldığında 3 saat sonunda hidroliz derecesi %98 olarak bulunmuştur.

Hill vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada; bakteriyel ve arpa kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimleri ile buğday nişastasının hidrolizlenmesinde glikoz ve maltozun etkisi incelenmiştir. 45°C'de 30 g/l substrat konsantrasyonu için, 8 g/l konsantrasyonunda enzim kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde glikoz ve maltoz konsantrasyonu 0 ile 400 g/l arasında değiştirilmiş, maltoz ve glikozun her iki enziminde katalitik aktivitesini aynı şekilde inhibe ettiği saptanmıştır.

Salieri vd. (1995) tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmada; *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enziminin katalitik aktivitesine ortamda bulunan çeşitli metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. 30°C'de, pH 5.9 fosfat tamponunda, 40g/l nişasta konsantrasyonu için 20 I.U./ml amilaz ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda, Hg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Ag<sup>+1</sup>, Cd<sup>+2</sup> iyonlarının düşük konsantrasyonlarda enzimi %100 inhibe ettiği, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda düşük inhibitör etkisi gösterdiği saptanmıştır.

Bajpai vd. (1992) tarafından yapılan çalışmada; *Bacillus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz üretimi için, karbon kaynağı olarak peynir altı suyu kullanılmış, yapılan optimizasyon sonucunda üretim için optimum ortam içeriği %2 mısır nişastası, %3 mısır gluteni, %1 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, %0.1

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , %0.2 NaCl ve %0.02  $\text{CaCl}_2$  olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada üretim ortamının pH'ının hücre konsantrasyonuna etkisi de incelenmiş, pH 6'ya kadar hücre üremesi artarken pH 6'dan sonra üremenin durduğu ancak enzim stabilitesinin pH 9'a kadar bir değişim göstermediği (azalmadağı) saptanmıştır.

Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından yapılan çalışmada; *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi ile mısır nişastasının hidrolizinde nişasta konsantrasyonunun etkisi 5 incelenmiştir. Düşük nişasta konsantrasyonları için (%1-8 ağırlık/ağırlık) deneyler pH 6'da  $100^\circ\text{C}$ 'de kesikli reaktörde, 300 saniye süresince, yüksek nişasta konsantrasyonları için deneyler pH 6'da  $95^\circ\text{C}$  sıcaklıkta sürekli reaktörde 600 saniye süresince gerçekleştirilmiştir. Çalışmada düşük nişasta konsantrasyonlarında hidrolizlenmenin klasik Michaelis-Menten modeli ile ifade edilebileceği, yüksek nişasta konsantrasyonlarında ise hidroliz derecesinin ampirik birinci mertebe model ile ifade edilmesinin gerektiği saptanmıştır.

Colonna vd. (1988) tarafından gerçekleştirilen çalışmada; buğday nişastasının hidrolizinde *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzim konsantrasyonunun hidroliz derecesine etkisi incelenmiştir.  $35^\circ\text{C}$ 'de, pH 7'de, 40 ml fosfat tamponunda 1g substrat kullanılarak 30 saat süresince gerçekleştirilen deneylerde enzim konsantrasyonu 2 ile 189  $\mu\text{g/ml}$  arasında değiştirilmiş, kısa zaman aralığı için (5 saate kadar) hidrolizlenmenin enzim konsantrasyonu ile lineer olarak değiştiği saptanmıştır. 142  $\mu\text{g/ml}$  enzim konsantrasyonundan sonra 189  $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar konsantrasyon değişimi kinetik olarak fazla değişiklik göstermemiştir. 189  $\mu\text{g/ml}$  enzim konsantrasyonu için 26 saat sonunda hidroliz derecesinin %98 olduğu görülmüştür.

Handa (1983) tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmada; poliakrilonitril ile immobilize edilmiş *Bacillus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi için çözünür nişasta ile gerçekleştirilen deneylerde optimum pH ve sıcaklık aralığı incelenmiş, aynı koşullarda normal enzim için optimum pH aralığı 5-7.5, immobilize enzim için 5.5-7.5 olarak, optimum sıcaklık aralığı normal enzim için  $55-75^\circ\text{C}$ , immobilize enzim için  $50-75^\circ\text{C}$  olarak bulunmuştur.

Pye ve Wingard (1973) tarafından yapılan çalışmada; *Bacillus Licheniformis* ve *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimleri için optimum çalışma sıcaklıkları ve pH aralığı belirlenmiş, ayrıca  $\text{Ca}^{+2}$  ilavesinin aktiviteye etkileri incelenmiştir. %0.5 mısır nişastası

çözeltisi ve 4 mM kalsiyum iyonu ilavesi ile pH 5.7'de gerçekleştirilen deneyler sonucunda optimum çalışma sıcaklığının, *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi için 92<sup>0</sup>C, *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi için 70<sup>0</sup>C olduğu saptanmıştır. Her iki enzim içinde optimum pH çalışma aralığının sıcaklık artışıyla daraldığı belirlenmiş; 37, 60 ve 95<sup>0</sup>C'de gerçekleştirilen deneyler için *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH aralığının sırasıyla 5.5-7.5, 4.5-7.5 ve 6-7.5; *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi için ise 5-7, 5.5-6.5 ve 6.5-7 olduğu saptanmıştır. Kalsiyum ilavesi ile enzim kararlılığının arttığı belirlenmiş, 70<sup>0</sup>C'de pH 7'de kalsiyum iyonları ile stabilitede doygunluk konsantrasyonunun %0.1'lik *Bacillus Licheniformis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzim çözeltisi için 5 ppm'den az, aynı şartlarda *Bacillus Subtilis* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzim içinse 150 ppm olduğu saptanmıştır.



## 6. MATERYAL VE YÖNTEM

### 6.1 Kullanılan Materyaller

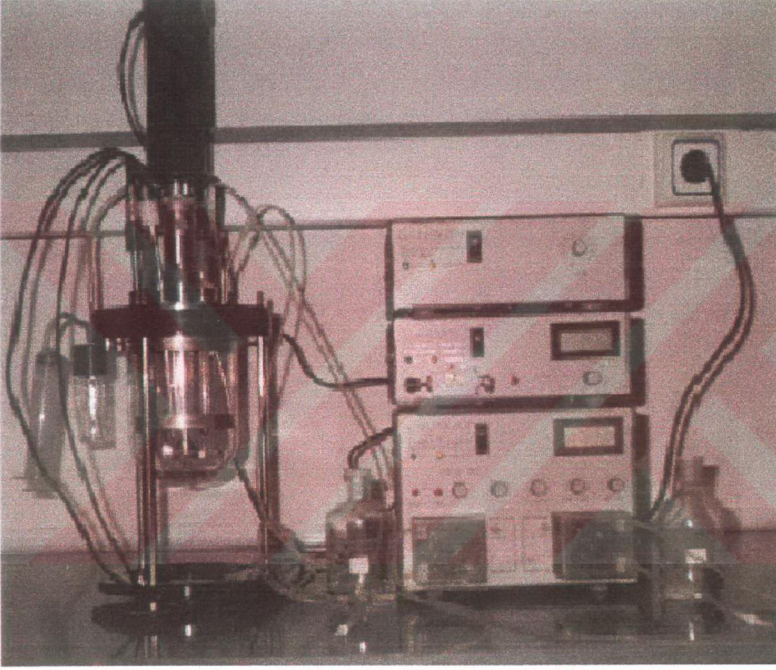
- $\alpha$ -Amilaz enzimi
- Mısır nişastası
- Çözünür nişasta
- Gliserin
- Maltoz
- Glikoz
- $\text{CaCl}_2$
- Etanol
- Kimyasal maddeler (%0.5 ve %15'lik  $\text{I}_2$ , %0.5 ve %5'lik  $\text{KI}$ , 5 M  $\text{HCl}$ , ve 50 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ )
- Saf su

Mısır nişastasının hidroliz işleminde kullanılan *Bacillus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi (ürün kodu: A6211) ticari bir enzim olup toz preparat halinde Sigma firmasından sağlanmış ve çalışmalar süresince derin dondurucuda saklanmıştır. Hidroliz işlemi için kullanılan mısır nişastası (ürün no: 569377) Calbiochem firmasından, aktivite tayininde kullanılan çözünür nişasta (Extra pure soluble starch, ürün no: 101253), hidroliz reaksiyonuna ve enzim aktivitesine etkilerini incelemek için kullanılan; maltoz (ürün no: 1.05912), glikoz (ürün no: 1.08337), gliserin (ürün no: 1.04093) ve etanol (ürün no: 108543) Merck firmasından,  $\text{CaCl}_2$  (ürün no: 0064) ise J.T.Baker firmasından sağlanmış olup laboratuvar şartlarında saklanmıştır. Deneyler sırasında çözeltinin pH'ı 0.1 M  $\text{KOH}$  ve 0.1 M  $\text{HCl}$  çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır.

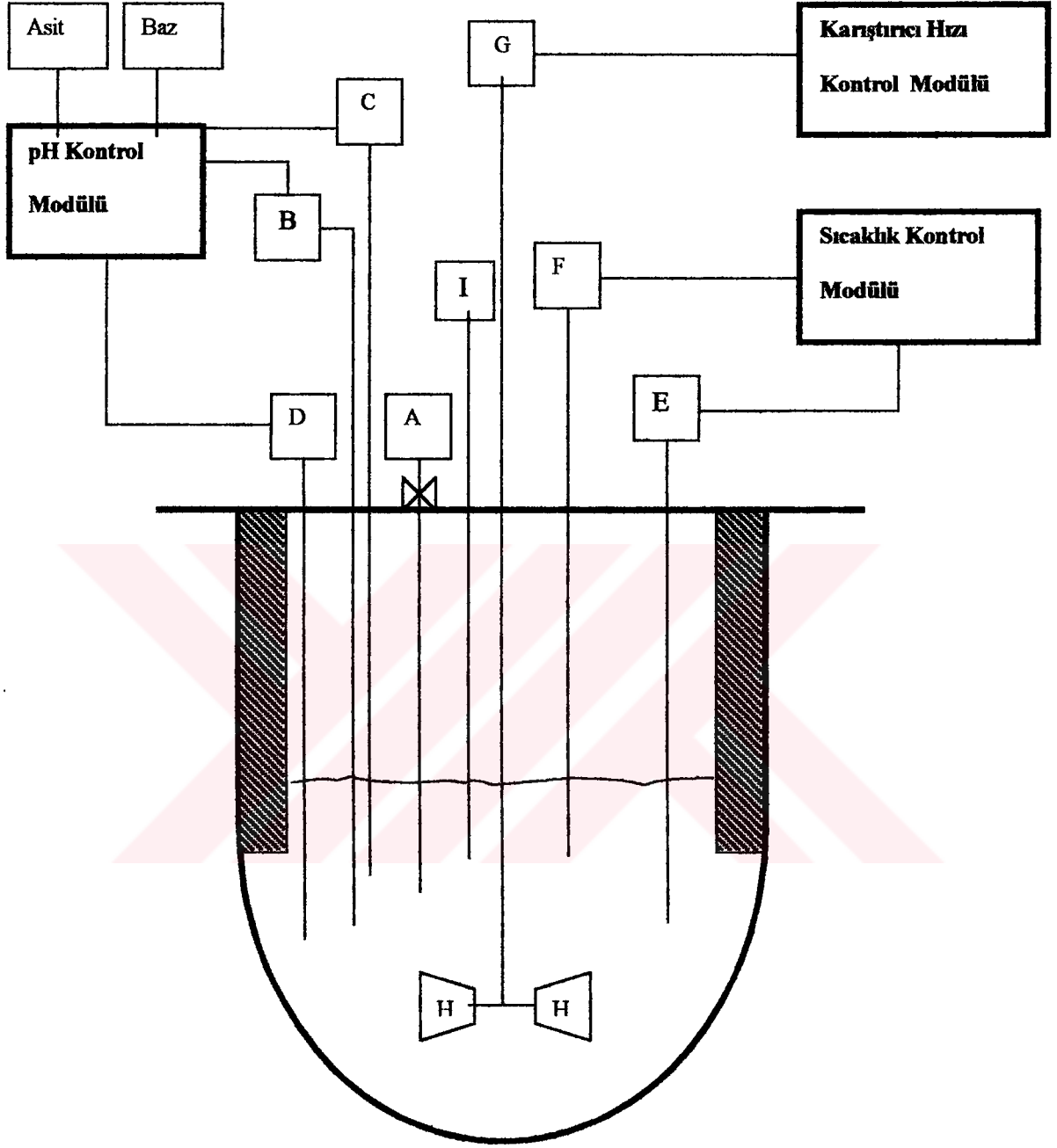
### 6.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, Sanyo Gallenkamp firması tarafından üretilen modüler biyoreaktör sistemi (FER-195-010) kullanılmıştır. Bu sistem, bir biyoreaktör ile karıştırıcı hızı, sıcaklık ve pH'ı kontrol eden modüllerden 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

şınılı Spektrofotometre kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan deney düzeneğinin genel görünüşü Şekil 6.1'de, şeması ise Şekil 6.2'de verilmiştir.



Şekil 6.1 Deney düzeneğinin genel görünüşü



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 6.2** Biyoreaktör ve kontrol modüllerinin şeması

### 6.2.1 Karıştırma biyoreaktör

Kullanılan biyoreaktör 1 litre hacminde, çelik kapaklı ve yuvarlak tabanlı, tüm parçaları paslanmaz çelikten yapılmış, pyrex cam bir reaktördür. Biyoreaktörün kapağı üzerinde problemlerin yerleştirilmesi ve gerekli ilavelerin yapılmasına olanak tanıyan girişler (15 adet) bulunmaktadır. Reaktörde reaksiyon çözeltilerinden örnek alınabilmesi için bir örnek vanası ve kabı mevcuttur. Karıştırma, çelik kapağa monte edilen bir karıştırıcı motor ile gerçekleştirilmektedir. Karıştırıcı şaftında, altı kanatlı, reaktör tabanından yüksekliği ayarlanabilir Rushton tipi bir karıştırıcı palet mevcuttur. Reaktörde her biri 1.5 cm genişliğinde dört adet simetrik takılıp çıkarılabilir engel vardır. Biyoreaktör ile ilgili komponentler ve boyutları Çizelge 6.1’de verilmiştir.

**Çizelge 6.1** Biyoreaktör ile ilgili bileşenler ve değerleri

Bileşenler	Değerler
Reaktör hacmi	1 litre (yuvarlak tabanlı)
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

### 6.2.2 Kontrol modülleri

Deneysel çalışmalar sırasında karıştırıcı hızı, sıcaklık ve pH'ın kontrolünü sağlayan kontrol modülleri ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

#### •Karıştırıcı hızı kontrol modülü:

Karıştırıcı hızı : 50-1000 devir/dak

Karıştırıcı motor : 65W , 24V dc

Karıştırıcı hızının kalibrasyonu bir takometre ile yapılmıştır.

#### •Sıcaklık kontrol modülü:

Sıcaklık :15-90°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, pH 7 ve pH10 tampon çözeltileri kullanılarak sağlanmıştır.

### 6.3 Deneyin Yapılışı

%1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 500 ml saf su, reaksiyonun gerçekleştirildiği biyoreaktörde istenilen sıcaklık ve pH'a getirildikten sonra, 0.7 g enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. İşleme başlamadan önce ve 30 dakikalık işlem süresi sonunda, çözülden örnekler alınarak, enzim aktivitesi ve ortamda kalan nişasta miktarının tayini için hazırlanmıştır. Örneklerin analizleri 5'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır.

### 6.4 Analiz Yöntemleri

#### 6.4.1 Enzim aktivite tayini

$\alpha$ -Amilaz aktivite tayini için 200'ün üzerinde metod geliştirilmiş (Oltulu vd., 1999) ve her metod için farklı bir aktivite birimi tanımlanmıştır (Yoo vd., 1987). Bu çalışmada,  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini De Moraes vd. (1995) tarafından belirtilen yöntemle yapılmıştır. Substrat olan 0.2 g çözünebilir nişasta 100 ml'lik 50 mM sodyum asetat tampon çözeltisinde (pH=5.9) kaynatılarak çözüldürüldükten sonra 40°C'ye soğutulmuş ve sıcaklığı bu derecede sabit tutulmuştur. Biyoreaktörden alınan reaksiyon çözeltisi, kağıt süzgeçten (589<sup>3</sup>Blue Ribbon 300211 Schleicher-Schuell) süzöldükten sonra ele geçen çözeltiden 200  $\mu$ l'lik örnekler deney tüplerine alınmış ve bu örnekler daha önce hazırlanan substrat çözeltisinden 1 ml ilave edilmiştir. Ayrıca kontrol çözeltisi olarak kullanılan 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l'lik örneklerin üzerine 5 ml İyot stok çözeltisi ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini için elde edilen bu son karışımın absorbans değerleri, 620 nm dalga boyundaki spektrofotometrede referans çözeltisi olarak 200  $\mu$ l saf su ve 5 ml İyot stok çözeltisi kullanılarak okunmuştur. 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).

#### 6.4.2 Nişasta konsantrasyonu tayini

Ortamda kalan nişasta miktarının tayini için, biyoreaktörden alınan 0.5 ml'lik reaksiyon çözeltisi örneklerine NaOH ilavesi ile reaksiyon durdurulmuş ve enzimin inaktive edilmesi için örnekler 100°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 5 ml iyot çözeltisi (%15 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 referans çözeltisi olarak 10 ml saf su ve 5 ml iyot çözeltisi kullanılarak okunmuştur (Astolfi-Filho vd., 1986; Birol, 1997).

#### 6.5 Hesaplamalar

##### 6.5.1 Enzim aktivitesinin hesaplanması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki bağıntılar kullanılmıştır:

$$[A_0] = (1 - C_{ao} / C_{ak}) \quad (6.1)$$

$$[A_1] = (1 - C_{a1} / C_{ak}) \quad (6.2)$$

$$[A] = 100 * [A_1] / [A_0] \quad (6.3)$$

Burada;

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

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

$C_{ak}$  : Kontrol çözeltisindeki çözünür nişastanın absorbans değeri

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

$[A_1]$  : İşlem sonu enzim aktivitesi

$[A]$  : İşlem sonu % enzim aktivitesi

olarak tanımlanmıştır.

### 6.5.2 Nişasta konsantrasyonunun hesaplanması

Nişasta konsantrasyonu tayinlerinde ise aşağıdaki bağıntılar kullanılmıştır:

$$[S_1] = (C_{sa} / C_{so}) * [S_0] \quad (6.4)$$

$$[H] = 100 * (1 - C_{sa} / C_{so}) \quad (6.5)$$

Burada;

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

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

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

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

H : % Hidroliz derecesi

olarak tanımlanmıştır.

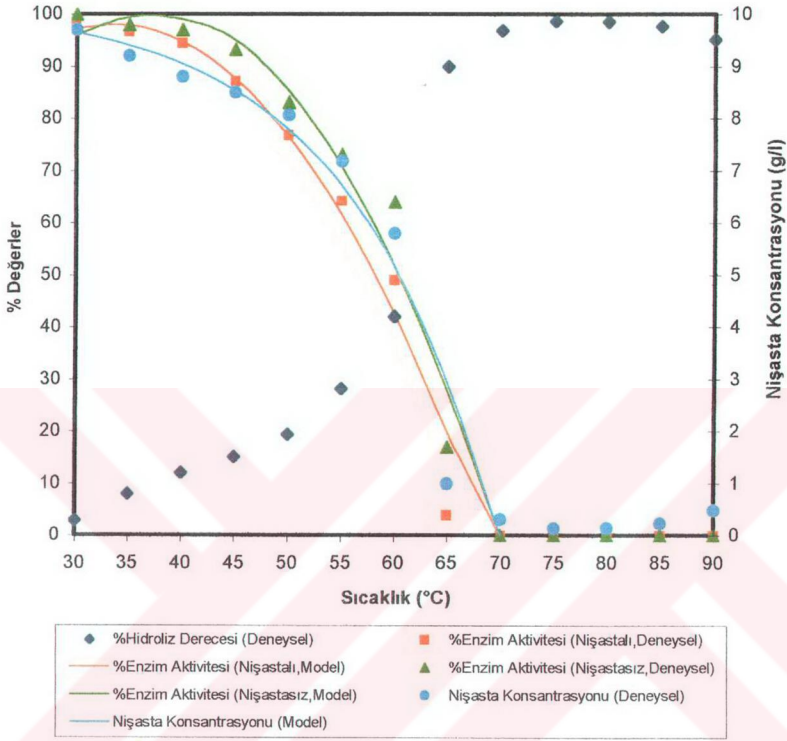
## 7. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 7.1 Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Sıcaklık artışının reaksiyon hızını artırdığı ancak enzimlerinde yapısal olarak bozunmalarına neden olduğu bilinmektedir. Sıcaklık artışının enzim aktivitesine ve hidroliz derecesine etkisini incelemek için %1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisi, pH 6.5 ve 300 devir/dak karıştırıcı hızında, 0.7g enzim ilavesi ile 30-90°C arasında (5°C'lik artışlar için) 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuş, reaksiyon sonunda çözeltideki  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve ortamda kalan nişasta konsantrasyonu Bölüm 6.4.1 ve Bölüm 6.4.2'de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 7.1'de verilmiş ve Şekil 7.1'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Çizelge 7.1 Sıcaklığa karşılık elde edilen deneysel veriler (pH=6.5, N=300 devir/dak)

Sıcaklık (°C)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
30	2.94	97.81	100	9.71
35	8.00	96.70	98.00	9.20
40	12.10	94.40	97.03	8.79
45	15.11	87.11	93.13	8.49
50	19.4	76.70	83.00	8.06
55	28.20	64.22	73.04	7.18
60	42.03	49.01	64.10	5.80
65	90.00	3.93	17.00	1.01
70	96.91	0.00	0.00	0.31
75	98.63	0.00	0.00	0.13
80	98.59	0.00	0.00	0.14
85	97.67	0.00	0.00	0.23
90	95.17	0.00	0.00	0.48



**Şekil 7.1** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun sıcaklıkla değişimi (pH=6.5, N=300 devir/dak)

Çizelge 7.1'den de görüldüğü gibi, sıcaklık artışıyla hidroliz derecesi artarken reaksiyon sonu enzim aktivitesi düşüş göstermiş, maksimum hidrolizlenme 75°C'de (%98.63) gerçekleşirken 65°C'den sonra enzim aktivitesi tamamen sıfırlanmıştır. 65°C'den sonra enzim aktivitesinin reaksiyon sonunda sıfırlanmasına rağmen hidrolizlenmenin 90°C'ye kadar fazla bir düşüş göstermemesi, sıcaklık artışıyla reaksiyon hızının çok fazla artmasına ve reaksiyon çözeltisine enzim ilavesi ile enzimin sıcaklığın etkisi ile tamamen inaktive olması arasında geçen çok kısa sürede reaksiyonu gerçekleştirmesine bağlıdır. Literatürde, bakteriyel kaynaklı  $\alpha$ -amilazlar için işlem sıcaklığı 60-75°C olarak verilirken (Godfrey ve Reichelt, 1983), çok kısa

reaksiyonlar için  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin 85-95<sup>0</sup>C'ye kadar kullanılabileceği belirtilmiştir (Pye ve Wingard, 1973).

$\alpha$ -Amilaz enziminin reaksiyon şartlarına dayanıklılığını inceleyebilmek amacıyla, sıcaklık deneyleri aynı şartlarda ortamda nişasta yok iken tekrarlanmış ve sonuçlar Çizelge 7.1'de verilmiştir. Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler sonucunda enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişiminin nişastalı deneyler ile paralel olduğu Şekil 7.1'de görülmektedir. Nişastasız ortamda enzim aktivitesinin biraz daha yüksek bulunması, hidrolizlenmenin olmaması dolayısı ile nişasta partiküllerinin ve/veya hidroliz ürünlerinin enzimi inaktive etmemesine bağlanmaktadır.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerin (30-70<sup>0</sup>C sıcaklık aralığında) aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot T + c \cdot T^2 \quad (7.1)$$

T: sıcaklık (<sup>0</sup>C)

Eşitlik 7.1'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

•Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 10.9716

b: 5.2269 (<sup>0</sup>C)<sup>-1</sup>

c:-0.0783 (<sup>0</sup>C)<sup>-2</sup>

•Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: -28.0325

b: 6.9555 (<sup>0</sup>C)<sup>-1</sup>

c: -0.0938 (<sup>0</sup>C)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla nişastalı enzim aktivitesi modeli için 7.6363 ve 0.9850, nişastasız enzim aktivitesi modeli için 7.2572 ve 0.9854 olarak bulunmuştur.

Reaksiyon sonucu ortamda kalan nişasta miktarının (hidrolizlenmeyen) sıcaklık artışına karşı değişimi incelendiğinde, elde edilen deneysel verilerin (30-70°C sıcaklık aralığında) Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen aşağıdaki bağıntıya uyduğu görülmüştür.

$$[S_1] = [S_0] - a \cdot \exp(-b \cdot T) \quad (7.2)$$

Bu denklemde  $[S_0]$ , t=0 anındaki ortamdaki nişasta konsantrasyonu olup 10 g/l dir.

Eşitlik 7.2'deki a ve b değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak ;

a: 0.0638 (g nişasta/l)

b: -0.0729 (°C)<sup>-1</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda modele ait standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile 0.7651 ve 0.9812 olarak bulunmuştur.

## 7.2 pH'in Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Literatürde, pH değişiminin protein yapısını modifiye ettiği, enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat bağlanmasını dolayısıyla reaksiyonun katalizlenmesini aynı zamanda enzim stabilitesini etkilediği belirtilmiştir (Chitnis ve Sadana, 1989). Bakteriyel amilazların asidik ortamlarda aktivitelerini yitirdiği bilinmektedir (Textor vd., 1998).

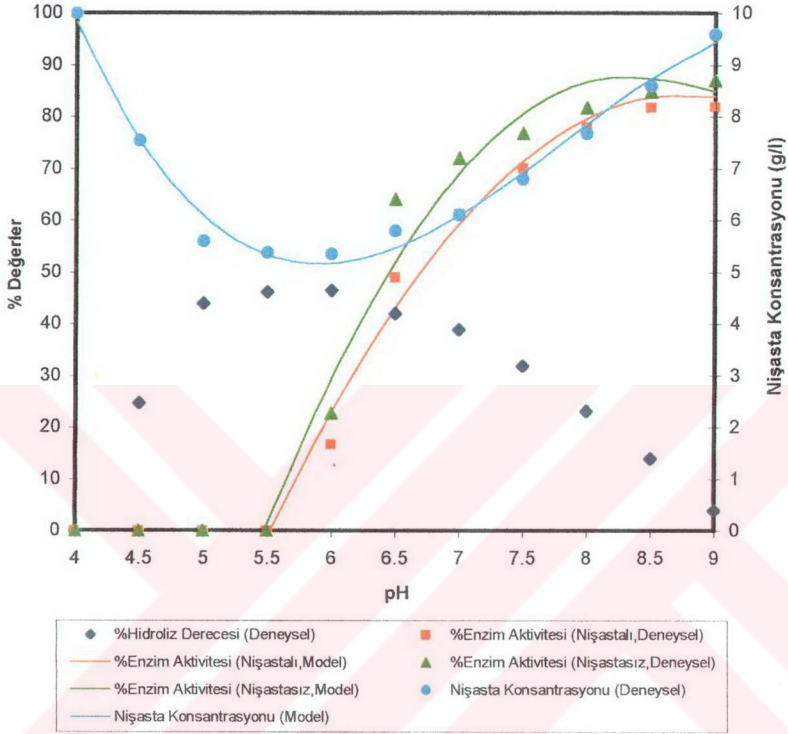
Asidik ve bazik ortamın enzim aktivitesine ve hidroliz reaksiyonuna etkisini incelemek için %1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisi, pH 4.5-9 aralığında (0.5'lik pH artışları için), 60°C sıcaklık ve 300 devir/dak karıştırıcı hızında, 0.7 g enzim ilavesi ile 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.2 verilmiş ve Şekil 7.2'de grafiksel olarak sunulmuştur.

**Çizelge 7.2** pH'a karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, N=300 devir/dak)

PH	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
4.0	0.00	0.00	0.00	10.00
4.5	26.67	0.00	0.00	7.33
5.0	44.00	0.00	0.00	5.60
5.5	46.20	0.00	0.00	5.38
6.0	46.51	16.70	22.80	5.35
6.5	42.03	49.01	64.10	5.80
7.0	38.91	61.22	72.00	6.11
7.5	32.00	70.04	76.81	6.80
8.0	23.23	78.00	81.12	7.68
8.5	14.08	81.72	84.80	8.60
9.0	4.00	86.00	87.10	9.60

Şekil 7.2'den de görüldüğü gibi, hidroliz işlemi için optimum pH aralığı 5-7 olarak bulunmuştur. Reaksiyon sonu enzim aktivitesi asidik ortamda sıfırlanırken (pH<6), bazik ortamda enzimin stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Fakat enzim stabilitesini koruduğu halde reaksiyonu katalizleyememiş ve pH 7'den sonra hidroliz derecesinde düşüş görülmüştür. Literatürde,  $\alpha$ -amilazlar ile hidroliz işlemi için optimum pH aralığı 5-7.5 olarak verilmiş (Godfrey ve Reichelt, 1983) ve stabilitelelerini pH 6-10 aralığında koruyabilecekleri belirtilmiştir (Bajpai vd., 1992).

$\alpha$ -Amilaz enziminin reaksiyon şartlarına dayanıklılığını inceleyebilmek amacıyla, pH deneyleri nişastasız ortamda aynı şartlarda tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesi için elde edilen değerler Çizelge 7.2 verilmiş ve Şekil 7.2'de grafiksel olarak sunulmuştur. Şekil 7.2'den nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için sonuçların birbirine paralel seyrettiği görülmektedir.



Şekil 7.2 %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun pH ile değişimi (T=60°C, N=300 devir/dak)

Deneyel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, pH ile enzim aktivitesi arasındaki değişimin nişastalı ve nişastasız ortamda aşağıdaki denkleme uyduğu bulunmuştur (pH 5.5'dan itibaren, Quadratik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot (\text{pH}) + c \cdot (\text{pH})^2 \quad (7.3)$$

pH: hidroliz çözeltisinin pH değeri

Eşitlik 7.3 teki a, b, c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

•Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: -531.9619

b: 140.5595

c:-8.0142

•Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: -671.4184

b: 182.8297

c: -11.0071

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla nişastalı enzim aktivitesi modeli için 4.2911 ve 0.9933, nişastasız enzim aktivitesi modeli için 7.4242 ve 0.9807 olarak bulunmuştur.

pH değişiminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için yapılan modelde, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile pH arasındaki değişimin aşağıdaki bağıntıya (polinom denklemi) uyduğu bulunmuştur (pH aralığı 4-9).

$$[S_1] = a + b*(pH) + c*(pH)^2 + d*(pH)^3 \quad (7.4)$$

Eşitlik 7.4'deki a, b, c ve d katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a: 73.2892 (g nişasta/l)

b: -28.8903 (g nişasta/l)

c: 3.9249 (g nişasta/l)

d: -0.1670 (g nişasta/l)

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.2662 ve 0.9912 olarak bulunmuştur.

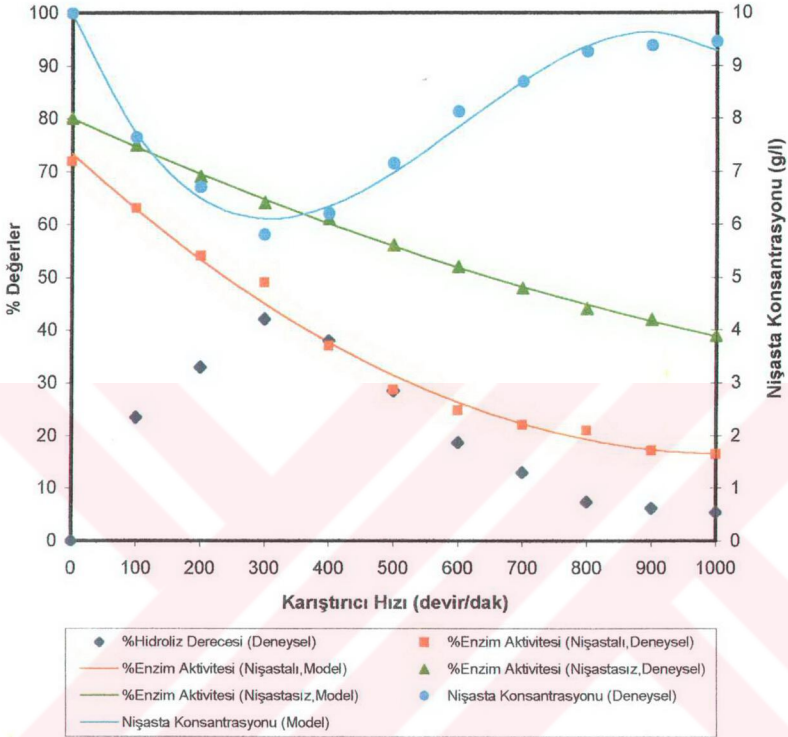
### 7.3 Karıştırıcı Hızının Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Karıştırıcı hızının enzim aktivitesi ve hidroliz işlemi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla %1 nişasta içeren reaksiyon çözeltisi 60°C sıcaklık ve pH 6.5'da, 0.7 g enzim ilavesi ile 0-1000 devir/dak karıştırıcı hızı aralığında (100 devir/dak'lık artışlarla) 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Ayrıca karıştırıcı hızı değişimi ile  $\alpha$ -amilaz enziminin reaksiyon şartlarına dayanıklılığını inceleyebilmek amacıyla deneyler aynı şartlarda nişastasız ortamda da tekrar edilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 7.3'de verilmiş ve Şekil 7.3'de grafiksel olarak sunulmuştur.

**Çizelge 7.3** Karıştırıcı hızına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5)

Karıştırıcı Hızı (devir/dak)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons.(g/l)
0	0	72.00	80.09	10
100	23.48	63.08	75.00	7.65
200	33.00	54.00	69.05	6.70
300	42.03	49.01	64.10	5.80
400	38.01	36.98	60.97	6.20
500	28.50	28.70	56.04	7.15
600	18.70	24.81	52.00	8.13
700	12.99	22.00	47.96	8.70
800	7.39	21.00	44.02	9.27
900	6.20	17.21	42.00	9.38
1000	5.40	16.50	38.95	9.46

Karıştırıcı hızının 0 devir/dak'dan 1000 devir/dak'ya artırılması sonucunda, nişastalı ortamda enzim aktivitesi %72.00 değerinden %16.50 değerine (yaklaşık %77 azalma), nişastasız ortamda ise %80.09 değerinden %38.95 değerine (yaklaşık %51 azalma) düşmüştür. Şekil 7.3'den nişastalı ve nişastasız ortam için enzim aktivitelerindeki azalmanın birbirine paralel seyrettiği görülmektedir. İki eğri arasındaki fark, nişastalı deneylerde ortamda bulunan nişasta partiküllerinin ve hidroliz reaksiyonun, enzimi daha fazla inaktive etmesine bağlanmaktadır.



**Şekil 7.3** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun karıştırıcı hızı ile değişimi (T=60°C, pH=6.5)

Hidroliz derecesine bakıldığında hidrolizlenmenin 300 devir/dak'ya kadar artarak %42.03 değerine ulaştığı, daha yüksek karıştırıcı hızları için ise azalmaya başladığı ve 1000 devir/dak'da %5.40 değerine düştüğü görülmektedir. Düşük karıştırıcı hızlarında (100 ve 200 devir/dak için) yeteri kadar kütle transfer hızı sağlanmadığından hidroliz işlemi yeteri kadar gerçekleşmemekte, karıştırıcı hızının artmasıyla reaksiyon ilerlemekte, fakat daha yüksek karıştırıcı hızlarında (500 devir/dak ve sonrası için) enzimin yapısal olarak zarar görmesi nedeni ile reaksiyonun yavaşladığı görülmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma için elde edilen deneysel verilere göre optimum karıştırıcı hızı 300 devir/dak olarak belirlenmiştir.

Karıştırıcı hızının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot N + c \cdot N^2 \quad (7.5)$$

N: karıştırıcı hızı (devir/dak)

Eşitlik 7.5'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

•Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 73.4069

b: -0.1110 (devir/dak)<sup>-1</sup>

c: 5.4113\*10<sup>-5</sup> (devir/dak)<sup>-2</sup>

•Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 80.0566

b: -0.0557 (devir/dak)<sup>-1</sup>

c: 1.4499\*10<sup>-5</sup> (devir/dak)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla nişastalı enzim aktivitesi modeli için 1.9964 ve 0.9959, nişastasız enzim aktivitesi modeli için 0.5380 ve 0.9994 olarak bulunmuştur.

Karıştırıcı hızı değişiminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için yapılan modelde ise, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile karıştırıcı hızı arasındaki değişimin aşağıdaki bağıntıya (polinom denklemi) uyduğu bulunmuştur.

$$[S_1] = a + b \cdot N + c \cdot N^2 + d \cdot N^3 \quad (7.6)$$

Eşitlik 7.6'deki a, b, c ve d katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

- a: 9.9667 (g nişasta/l)  
b: -0.0284 (g nişasta/l.(devir/dak))  
c:  $6.2028 \cdot 10^{-5}$  (g nişasta/l.(devir/dak)<sup>2</sup>)  
d:  $-3.4308 \cdot 10^{-8}$  (g nişasta/l.(devir/dak)<sup>3</sup>)

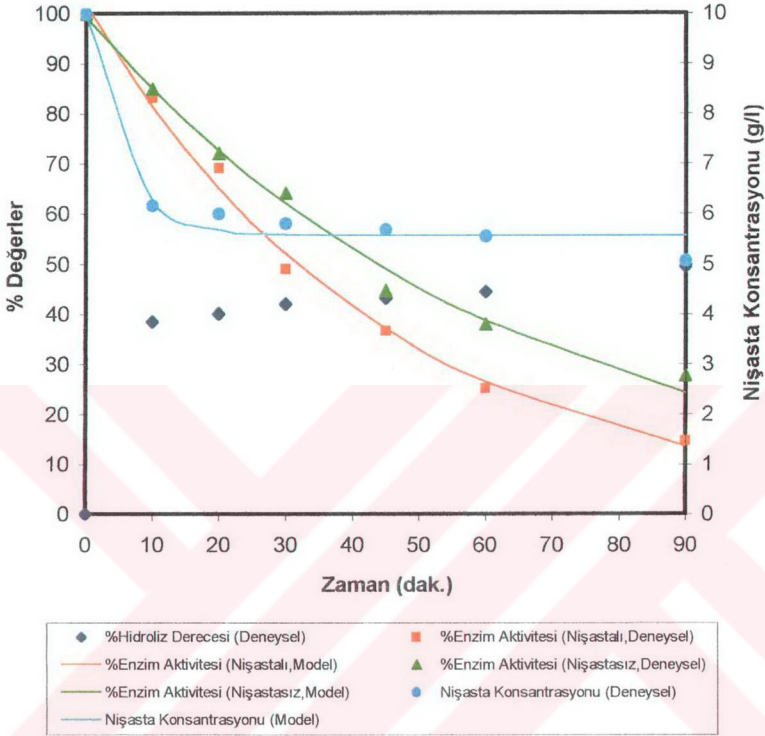
olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.2319 ve 0.9909 olarak bulunmuştur.

#### 7.4 Zamanın Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Bu çalışmada, sıcaklık 60°C, pH 6.5 ve karıştırıcı hızı 300 devir/dak'de sabit tutulmuş ve 0.7 g enzim ilavesi ile (500 ml'lik reaksiyon çözeltisi için) reaksiyon başlatılmıştır. Enzim aktivitesinin ve nişasta hidrolizinin zamana bağlı olarak değişimini inceleyebilmek için, reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıklarında (10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda) örnekler alınmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -amilaz enziminin reaksiyon şartlarında zamana karşı dayanıklılığını inceleyebilmek amacıyla deneyler, aynı şartlarda nişastasız ortamda da tekrar edilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 7.4'de verilmiş ve Şekil 7.4'de grafiksel olarak sunulmuştur.

**Çizelge 7.4** Zamana karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

Zaman (dakika)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
0	0.00	100.00	100.00	10.00
10	38.46	83.19	84.90	6.16
20	40.10	69.10	72.05	5.99
30	42.03	49.01	64.10	5.80
45	43.20	36.63	44.70	5.68
60	44.48	25.20	37.91	5.55
90	49.49	14.70	27.71	5.05



**Şekil 7.4** % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun zamanla değişimi ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Bu çalışmada, 90 dakika sonunda, nişastalı ortamda enzim aktivitesinde yaklaşık %85 oranında, nişastasız ortamda ise yaklaşık %72 oranında bir azalma gözlenmiştir. Şekil 7.4'den nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için aktivite eğrilerinin birbirine paralel olduğu görülmektedir. Nişastalı deneylerde enzim aktivite değerlerinin biraz daha düşük bulunması, ortamda bulunan nişasta partiküllerinin ve hidroliz reaksiyonunun enzimi inaktive etmesine bağlanmaktadır. Hidroliz verilerine bakıldığında hidroliz derecesindeki zamana bağlı artışın, 10. dakikadan sonra yavaşlayarak devam ettiği ve 90 dakika sonunda %49.49 değerine ulaştığı görülmektedir.

Zamana bağılı olarak enzim aktivitesinin değişimi incelendiğinde, yapılan matematiksel modelleme sonucunda, nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerin birinci derece enzim inaktivasyon kinetiğine uyduğu bulunmuştur (Jones, 1984).

$$[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k_D \cdot t) \quad (7.7)$$

t: hidroliz işleminin süresi (dakika)

Burada  $[A]_0$ , t=0 anındaki % enzim aktivitesidir.  $[A]$  ise, işlem sonundaki % enzim aktivitesidir.

Eşitlik 7.7'deki  $[A]_0$  ve  $k_D$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak,

- Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

$$[A_0] = 101.9280$$

$$k_D = 0.0224 \text{ (dakika)}^{-1}$$

- Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

$$[A_0] = 99.4299$$

$$k_D = 0.0157 \text{ (dakika)}^{-1}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ), ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırası ile nişastalı enzim aktivitesi modeli için 2.6574 ve 0.9970, nişastasız enzim aktivitesi modeli için 2.7035 ve 0.9956 olarak bulunmuştur.

Nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için yukarıdaki model denklemler kullanılarak enzimin yarılanma ömrü nişastasız ortam için  $t_{1/2} = 44.14$  dakika, nişastalı ortam için  $t_{1/2} = 30.94$  dakika olarak hesaplanmıştır. Nişastalı ortamda enzimin yarılanma ömrünün nişastasız ortam ile karşılaştırıldığında yaklaşık %30 daha az olduğu görülmektedir.

Zamana karşı ortamda kalan nişasta konsantrasyonu incelendiğinde elde edilen deneysel verilerin Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından sunulan aşağıdaki bağıntıya uyduğu saptanmıştır.

$$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot t) + c \quad (7.8)$$

Eşitlik 7.8'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a: 4.4243 (g nişasta/l)

b: 0.1828 (dakika)<sup>-1</sup>

c: 5.5657 (g nişasta/l)

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.3299 ve 0.9867 olarak bulunmuştur.

### 7.5 Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Enzim konsantrasyonunun hidroliz işlemine ve reaksiyon sonu aktiviteye etkisini incelemek amacıyla %1 nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisine 0-1 g arasında 0.1 g'lık artışlarla enzim ilavesi yapılarak 60°C sıcaklık ve pH 6.5'da, reaksiyonlar 30 dakika boyunca sürdürülmüştür. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 7.5'de verilmiş ve Şekil 7.5'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 7.5'den de görüldüğü gibi, aktivite değerleri enzim konsantrasyonu ile artarken, hidrolizlenme için artış 0.8 g/l enzim konsantrasyonundan sonra yavaşlamakta ve 1.6-2.0 g/l enzim konsantrasyon aralığı için ise hemen hemen sabit kalmaktadır. Bu durumda, 1.6 g/l enzim miktarının, reaksiyon için doygunluk konsantrasyonu olduğu ve daha fazla enzim ilavesinin reaksiyon hızına önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

**Çizelge 7.5** Enzim konsantrasyonuna karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

Enzim Kons. (g/l)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
0.0	0.00	0.00	10.00
0.2	15.10	12.9	8.49
0.4	28.00	23.21	7.20
0.6	34.91	30.00	6.51
0.8	40.40	39.02	5.96
1.0	41.01	42.06	5.90
1.2	41.60	46.10	5.84
1.4	42.03	49.01	5.80
1.6	44.91	55.90	5.51
1.8	45.10	58.00	5.49
2.0	45.70	63.00	5.43

Enzim aktivitesinin enzim konsantrasyonu ile değişimini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, deneysel verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Quadratik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot E + c \cdot E^2 \quad (7.9)$$

E: enzim konsantrasyonu (g enzim/l)

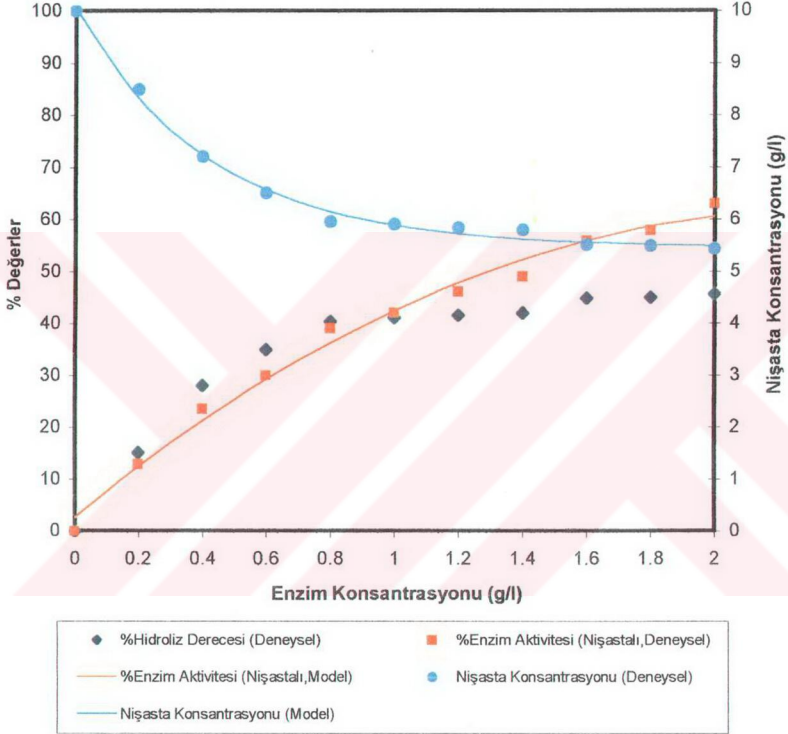
Eşitlik 7.9'daki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a: 2.6916

b: 50.484 (g enzim/l)<sup>-1</sup>

c: -10.7488 (g enzim/l)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 2.2795 ve 0.9947 olarak bulunmuştur.



**Şekil 7.5** % Enzim aktivitesi, % hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun enzim konsantrasyonu ile değişimi ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Enzim konsantrasyonuna karşılık ortamda kalan nişasta konsantrasyonu incelendiğinde elde edilen deneysel verilerin Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından sunulan aşağıdaki bağıntıya uyduğu saptanmıştır.

$$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot E) + c \quad (7.10)$$

Eşitlik 7.10'daki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a: 4.6074 (g nişasta/l)

b: 2.3713 (g enzim/l)<sup>-1</sup>

c: 5.4542 (g nişasta/l)

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.1274 ve 0.9971 olarak bulunmuştur.

## 7.6 Viskozitenin Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Reaksiyon çözeltisinin viskozitesinin enzim aktivitesi ve hidrolizlenmeye etkisini incelemek için viskozite artırıcı olarak gliserin kullanılmıştır. %1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisi içerisine %2.5, %5, %10, %20, %30, %40, %50 (hacim/hacim) oranlarında gliserin ilave edilmiştir. Çözeltiye %0 ile %50 oranları arasında gliserin ilavesi ile viskozite değerleri, 1.005 cP'dan 13.43 cP'a arttırılmıştır (Sheely, 1932). Reaksiyonlar 60<sup>0</sup>C sıcaklık, pH 6.5 ve 300 devir/dak karıştırıcı hızında 0.7 g enzim ilavesi ile 30 dakika boyunca sürdürülmüştür. Ayrıca, enzim stabilitesinin reaksiyon şartlarında viskozite ile değişimini inceleyebilmek amacıyla deneyler nişastasız ortamda da tekrarlanmıştır. Gliserin ilavesi ile viskozitenin arttırılması sonucu elde edilen deneysel veriler Çizelge 7.6'da verilmiş ve Şekil 7.6a'da grafiksel olarak sunulmuştur.

Gliserinin enzim stabilitesini artırdığı ve sıvı enzim preparatlarının hazırlanmasında koruyucu olarak kullanıldığı bilinmektedir. Somers vd. (1991),  $\alpha$ -amilaz ile ilgili deneysel çalışmalarında, enzim inaktivasyonunu ve substratın enzim tarafından bozunmasını (enzim-substrat etkileşimini) engellemek amacıyla gliserin kullanmışlar, gliserinin enzim stabilitesini artırdığını ve nişasta için rekabetçi inhibitör olduğunu savunmuşlardır. Komolprasert ve Ofoli (1990) ise çalışmalarında, viskoz etkiler yüzünden kütle transfer hızının azalması sonucu reaksiyon hızının düştüğünü belirtmişlerdir. Bununla birlikte, gliserinin yüzey gerilimini düşürdüğü ve ısıl iletkenliğinin suya göre daha düşük olduğu da bilinmektedir.

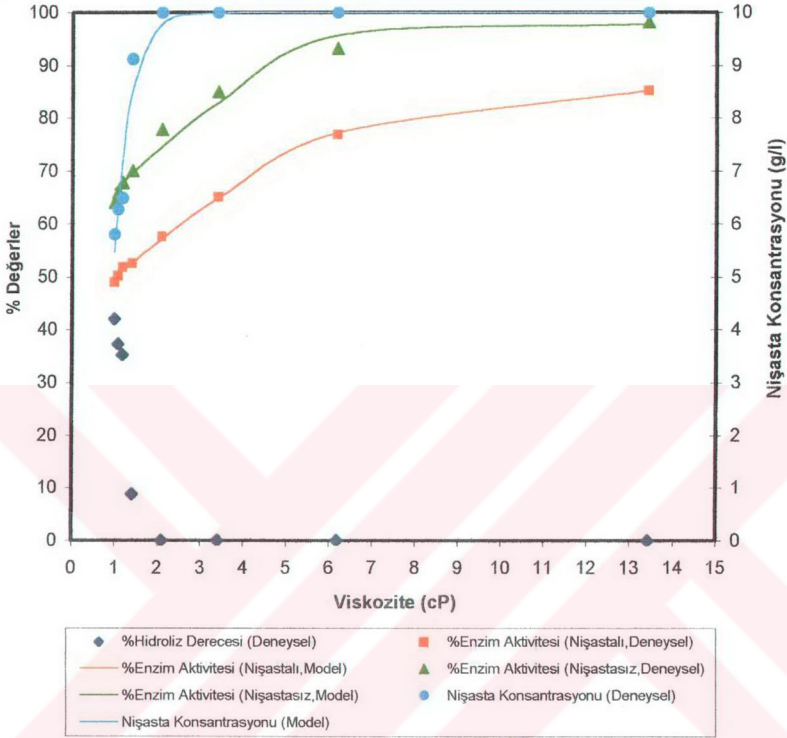
**Çizelge 7.6** Hidroliz çözeltisinin viskozite değerlerine karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300devir/dak)

% Gliserin (hacim/ hacim)	Viskozite (cP)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
0	1.005	42.03	49.01	64.10	5.80
2.5	1.083	37.30	50.24	66.02	6.27
5	1.184	35.22	51.79	67.81	6.48
10	1.415	8.80	52.58	69.99	9.12
20	2.109	0.00	57.6	77.80	10.00
30	3.412	0.00	65.11	84.99	10.00
40	6.188	0.00	76.90	93.21	10.00
50	13.43	0.00	85.22	98.19	10.00

Çizelge 7.6'dan da görüldüğü gibi, çözeltinin viskozitesinin artmasıyla enzim aktiviteleri artarken, ortama %20 (hacim/hacim) gliserin ilavesi ile çözelti viskozitesinin yaklaşık 2 kat artırılması sonucunda hidrolizlenme tamamen durmuştur. Sonuç olarak, ortama gliserin ilavesi ile hidrolizlenmenin azalması ve %20 gliserin ilavesi ile tamamen sıfırlanması,

- Viskoz etkiler sebebiyle kütle transferinin yeteri kadar olmamasından dolayı enzim-substrat etkileşiminin kısıtlanması,
- Gliserinin nişasta için rekabetçi inhibitör olması olasılığında, enzim-substrat etkileşimini engellemesi,
- Gliserin ilavesi ile yüzey geriliminin düşmesi ve böylece enzim-substrat bağlanmasının engellenmesi ile açıklanabilir.

Nişastalı ve nişastasız ortamda enzim stabilitesinin artması ise, gliserinin enzimi çevreleyerek enzim etrafında bir tabaka oluşturmasına (Rariy vd.,1998), bu nedenle çok küçük de olsa proses şartlarındaki değişimlerden (sıcaklık, pH değişimi) enzimin daha az etkilenmesine, nişasta partikülleri ve/veya ortamda bulunabilecek inhibitörlerle etkileşiminden dolayı oluşabilecek enzim inaktivasyonun engellenmiş olmasına bağlanabilir.



**Şekil 7.6a** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidroliz çözeltisinin viskozitesi ile değişimi ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Hidroliz çözeltisinin viskozitesinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot \mu + c \cdot \mu^2 \quad (7.11)$$

$\mu$ : hidroliz çözeltisinin viskozitesi (cP)

Eşitlik 7.11'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

•Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 42.4379

b: 7.7112 (cP)<sup>-1</sup>

c: -0.3372 (cP)<sup>-2</sup>

•Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 58.1759

b: 8.7009 (cP)<sup>-1</sup>

c: -0.4278 (cP)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla nişastalı ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 0.5615 ve 0.9994, nişastasız ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 2.3459 ve 0.9883 olarak bulunmuştur.

Ortamda kalan nişasta konsantrasyonunun hidroliz çözeltisinin viskozitesi ile değişimi incelendiğinde, elde edilen deneysel verilerin Hill vd.(1997) tarafından verilen aşağıdaki bağıntıya uyduğu görülmüştür.

$$[S_1] = [S_0] - a \cdot \exp(-b \cdot \mu) \quad (7.12)$$

Bu denkleme  $[S_0]$ ,  $t = 0$  anında ortamda bulunan nişasta konsantrasyonu olup 10 g/l dir.

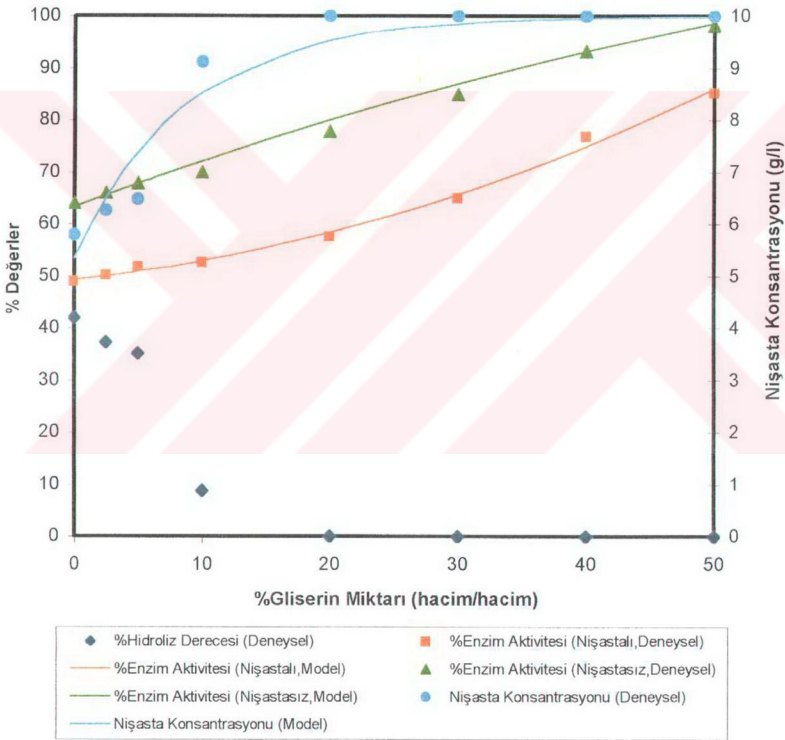
Eşitlik 7.12'deki a ve dğerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a = 72.7864 (g nişasta/l)

b = 2.7631 (cP)<sup>-1</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.3910 ve 0.9806 olarak bulunmuştur.

$\alpha$ -Amilaz ile nişastanın hidroliz işlemi için gliserinin rekabetçi inhibitör olduğu Somers vd. (1991) tarafından savunulmuştur. Deneysel veriler incelendiğinde, hidroliz derecesinin viskoziteyi artırmak için eklenen gliserin miktarı ile çok hızlı bir azalma göstermiş olması, gliserinin ortam viskozitesini artırmasının yanı sıra reaksiyon için inhibitör olma olasılığını da kuvvetlendirmektedir. Bu nedenle, hidroliz derecesinin ve nişastalı-nişastasız ortamda enzim aktivitelerinin gliserin ile değişimi ayrıca incelenmiş ve Şekil 7.6b'de grafiksel olarak sunulmuştur (Çizelge 7.6).



**Şekil 7.6b** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun gliserin miktarı ile değişimi (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

Gliserin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Quadratik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot G_1 + c \cdot G_1^2 \quad (7.13)$$

$G_1$ : % gliserin miktarı (hacim/hacim)

Eşitlik 7.13'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

•Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 49.3518

b: 0.2632 (hacim/hacim)<sup>-1</sup>

c: 0.0094 (hacim/hacim)<sup>-2</sup>

•Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 63.3256

b: 0.9193 (hacim/hacim)<sup>-1</sup>

c: -0.0043 (hacim/hacim)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla nişastalı ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 1.1443 ve 0.9974, nişastasız ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 1.2173 ve 0.9970 olarak bulunmuştur.

Ortamda kalan nişasta konsantrasyonunun gliserin ilavesi ile değişimi incelendiğinde, elde edilen deneysel verilerin Hill vd.(1997) tarafından verilen aşağıdaki bağıntıya uyduğu görülmüştür.

$$[S_1] = [S_0] - [S_{G10}] \cdot \exp(-a \cdot G_1) \quad (7.14)$$

Bu denklemde  $[S_0]$ ,  $t = 0$  anında ortamda bulunan nişasta konsantrasyonu olup  $10 \text{ g/l}$  dir.  $[S_{G10}]$  ise gliserin miktarı  $G_1 = 0$  iken hidrolizlenen nişasta konsantrasyonudur.

Eşitlik 7.14'deki  $a$  ve  $[S_{G10}]$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

$$[S_{G10}] = 4.6480 \text{ (g nişasta/l)}$$

$$a = 0.1147 \text{ (hacim/hacim)}^{-1}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.5275 ve 0.9670 olarak bulunmuştur.

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

Hidroliz işlemi sonunda meydana gelen ürünlerin (hidrolizatların), enzim aktivitesine ve reaksiyona etkisini incelemek amacıyla, öncelikle deneylerde kullanılacak hidrolizatın eldesi için, reaksiyon maksimum hidrolizmenin (%98.63) gerçekleştiği proses şartlarında ( $75^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta, pH 6.5'da, 300 devir/dak karıştırıcı hızında),  $1.4 \text{ g/l}$  enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda elde edilen hidrolizat çözeltisi, ortamda kalan hidrolizlenmeyen nişastayı çözeltiden ayırmak için süzildükten sonra, deneylerde kullanılacağı miktarlarda kaplara konularak buzlukta saklanmıştır. Hidrolizat çözeltisinin toplam hacime %25, %50, %75, %100 (hacim/hacim) oranlarında ilave edilmesiyle hazırlanan %1 (ağırlık/hacim) oranında nişasta içeren reaksiyon çözeltisi,  $60^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, pH 6.5'da, 300 devir/dak karıştırıcı hızında  $1.4 \text{ g/l}$  enzim ilavesi ile 30 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Ayrıca hidroliz reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin enzim stabilitesine etkisini inceleyebilmek amacıyla deneyler aynı koşullarda nişastasız ortamda da tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.7'de verilmiş ve Şekil 7.7'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Çizelge 7.7'den de görüldüğü gibi, hidrolizat çözeltisinin %0'dan %100'e artırılması durumunda, hidroliz derecesi %42.03 değerinden %31.3 değerine yaklaşık %25 oranında azalmıştır. Bu durum, enzimin ürün tarafından inhibe edildiğini yani enzim substrat etkileşiminin oluşan ürünler tarafından kısıtlandığını göstermektedir. Nişastalı ve nişastasız

ortamdaki işlem sonunda enzim aktivitesine bakıldığında enzim stabilitesinde bir azalma olmaması ürün inhibisyonunun tersinir olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 7.7** Hidrolizat miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

% Hidrolizat (hacim/hacim)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
0	42.03	49.01	64.10	5.80
25	39.12	57.12	65.80	6.10
50	36.28	56.23	67.81	6.38
75	33.13	57.16	73.02	6.69
100	31.30	56.14	79.00	6.87

Hidrolizat çözeltisi ilavesi ile nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için işlem sonu enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, her iki durum içinde enzim stabilitesinde bir artışın söz konusu olduğu görülmektedir. Nişastasız ortamda enzim aktivitesinin hidrolizat miktarıyla artması, ürünlerin enzim stabilitesini arttırdığını göstermektedir. Nişastalı ortamda enzim aktivitesinin artışı ise, ürünün enzim stabilitesini arttırmasının yanı sıra hidrolizlenmenin azalması ile, aktivitenin belli bir değerden sonra daha fazla artmaması yani sabitlenmesi ise ortamda bulunan nişasta partiküllerinin enzimi inaktive etmesi ile açıklanabilir.

Nişastasız ortamda hidrolizat miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda, elde edilen deneysel verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b*[H] + c*[H]^2 \quad (7.15)$$

[H]: % hidrolizat miktarı (hacim/hacim)

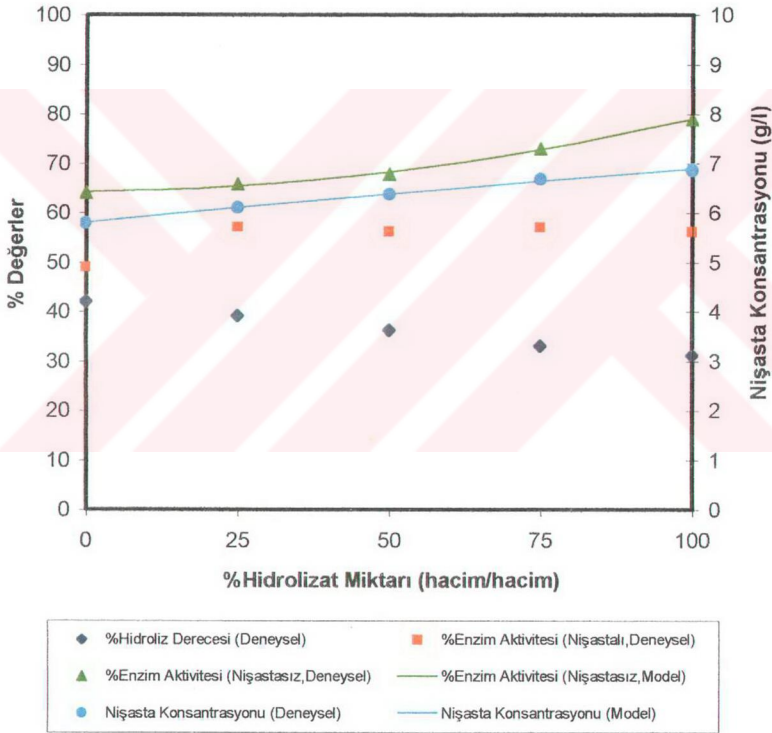
Eşitlik 7.15'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a: 64.222

b: 0.0136 (hacim/hacim)<sup>-1</sup>

c: 0.0013 (hacim/hacim)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.4612 ve 0.9985 olarak bulunmuştur.



**Şekil 7.7** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun hidrolizat miktarı ile değişimi (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

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

$$[S_t] = [S_0] - [S_{ho}] \cdot \exp(-a \cdot [H]) \quad (7.16)$$

Bu denklemde  $[S_0]$ ,  $t = 0$  anında ortamda bulunan nişasta konsantrasyonu olup 10g/l dir.  $[S_{ho}]$  ise hidrolizat miktarı  $[H] = 0$  iken hidrolizlenen nişasta konsantrasyonudur.

Eşitlik 7.16'deki  $a$  ve  $[S_{ho}]$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

$$a = 0.0030 \text{ (hacim/hacim)}^{-1}$$

$$[S_{ho}] = 4.1998 \text{ (g nişasta/l)}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.0271 ve 0.9985 olarak bulunmuştur.

### 7.8 Maltozun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Hidroliz ürünlerinin enzim aktivitesi ve reaksiyon üzerine etkisi Bölüm 7.7'de incelenmiştir. Bu çalışmada ise, ürün olarak sadece maltozun aktivite ve hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deneylerde maltoz, konsantrasyonu 5, 10, 20, 40 ve 60 g/l olacak şekilde, %1 ağırlık/hacim oranında nişasta içeren reaksiyon çözeltisine ilave edilmiştir. Maltozun ilavesi ile reaksiyon çözeltisi 60°C sıcaklık, pH 6.5, 300 devir/dak karıştırıcı hızında 1.4 g/l enzim ilavesi ile, 30 dakika süresince hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Maltoz deneyleri, reaksiyon şartlarında enzimin stabilitesinin maltoz ile değişimini inceleyebilmek amacıyla nişastasız ortamda da tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.8'de verilmiş ve Şekil 7.8'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Çizelge 7.8'den de görüldüğü gibi, maltoz ilave edildiğinde hidroliz derecesi azalmaktadır. Weselake ve Hill (1983) maltozun rekabetçi inhibitör, Houg vd. (1992) ise rekabetçi olmayan inhibitör olduğunu savunmuşlardır (Hill vd., 1997). Hidroliz derecesindeki düşüş göz önünde bulundurulduğunda maltozun reaksiyonu inhibe ettiği açıktır. Fakat,

inhibisyonun yüksek maltoz konsantrasyonlarında belirgin olması hidroliz derecesindeki düşüş için ikinci bir neden olan kütle transfer hızının konsantrasyonla azalması olarak açıklanabilir. Ortama nişasta miktarı kadar maltoz ilave edildiğinde hidroliz derecesindeki azalmanın %5, nişastanın iki katı kadar maltoz ilave edildiğinde %35, maltoz miktarı nişasta miktarının üç katı olduğunda %50, maltoz miktarı nişasta miktarının altı katı olduğunda % 67 civarında olduğu Çizelge 7.8'de görülmektedir. Hill vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada, buğday nişastasının hidrolizinde (reaksiyon şartları; sıcaklık 45 °C, pH 5.5, 8 g/l bakteriyel  $\alpha$ -amilaz enzimi, 30 g/l nişasta) ortamda nişasta miktarının iki katı kadar maltoz ilave edildiğinde hidrolizlenmenin yaklaşık olarak % 40, üç katı kadar maltoz ilave edildiğinde yaklaşık % 50, ortamda nişasta miktarının altı kadar maltoz ilave edildiğinde ise yaklaşık % 75 azaldığı belirtilmiştir.

**Çizelge 7.8** Maltoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

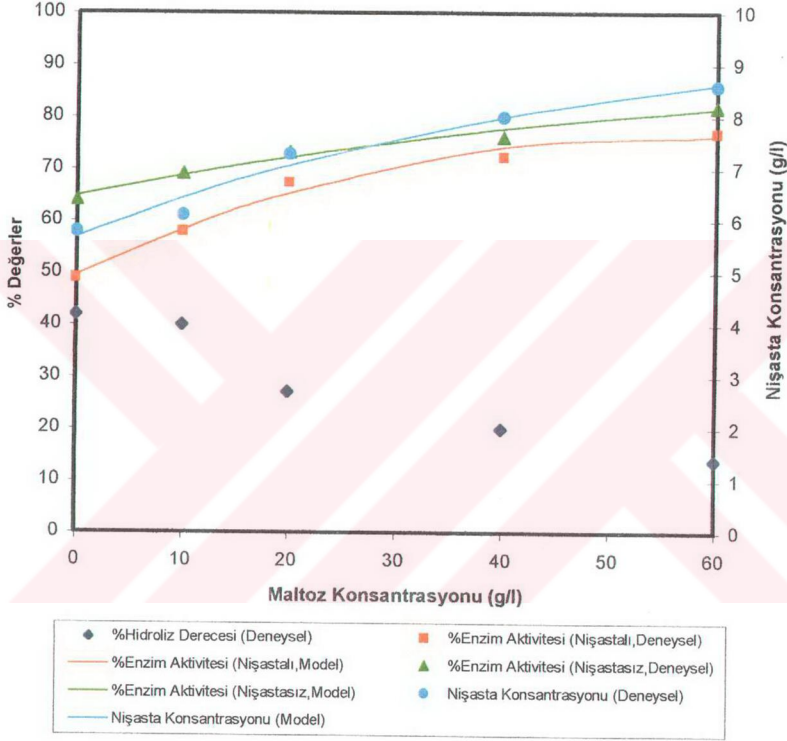
<b>Maltoz Kons.(g/l)</b>	<b>% Hidroliz Derecesi</b>	<b>% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)</b>	<b>% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)</b>	<b>Nişasta Kons.(g/l)</b>
0	42.03	49.01	64.10	5.80
10	40.00	57.96	69.30	6.01
20	27.10	67.38	73.20	7.29
40	19.99	72.32	76.21	8.00
60	14.00	77.00	82.00	8.60

Nişastalı ve nişastasız ortamdaki işlem sonunda enzim aktivitelerine bakıldığında enzim stabilitesinde bir azalma olmaması maltoz inhibisyonunun tersinir olduğunu göstermektedir. Ortamda maltoz olması durumunda her iki durum içinde enzim stabiliteleindeki artış maltozun enzimi stabilize ettiğini göstermektedir.

Maltoz miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b \cdot M + c \cdot M^2 \quad (7.17)$$

M: maltoz konsantrasyonu (g maltoz/l)



**Şekil 7.8** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun maltos miktarı ile değişimi ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Eşitlik 7.17'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

• Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 49.5247

b:  $0.9581 \text{ (g maltoz/l)}^{-1}$

c:  $-0.0085 \text{ (g maltoz/l)}^{-2}$

• Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 64.8384

b:  $0.4073 \text{ (g maltoz/l)}^{-1}$

c:  $-0.0021 \text{ (g maltoz/l)}^{-2}$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla, nişastalı ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 2.0976 ve 0.9913, nişastasız ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 1.4950 ve 0.9877 olarak bulunmuştur.

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

$$[S_1] = [S_0] - [S_{M_0}] \cdot \exp(-a \cdot M) \quad (7.18)$$

Bu denklemde  $[S_0]$ ,  $t = 0$  anında ortamda bulunan nişasta konsantrasyonu olup 10 g/l dir.  $[S_{M_0}]$  ise maltoz miktarı  $M = 0$  iken hidrolizlenen nişasta konsantrasyonudur.

Eşitlik 7.18'deki a ve  $[S_{M_0}]$  dğerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

$a = 0.0192 \text{ (g maltoz/l)}^{-1}$

$[S_{M_0}] = 4.3179 \text{ (g nişasta/l)}$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.2417 ve 0.9847 olarak bulunmuştur.

### 7.9 Glikozun Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

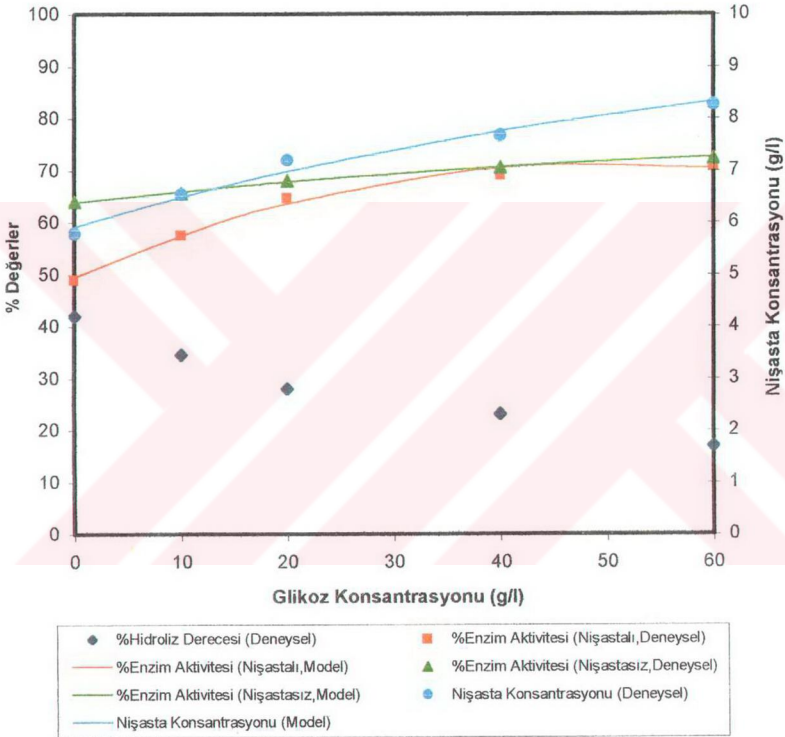
Bu çalışmada ise, ürün olarak sadece glikozun enzim aktivitesine ve hidrolizlenme reaksiyonuna etkisi incelenmiştir. Deneylede glikoz, konsantrasyonu 5, 10, 20, 40 ve 60 g/l olacak şekilde, %1 ağırlık/hacim oranında nişasta içeren reaksiyon çözeltisine ilave edilmiştir. Glikozun ilavesi ile reaksiyon çözeltisi 60°C sıcaklık, pH 6.5, 300 devir/dak karıştırıcı hızında 1.4 g/l enzim ilavesi ile, 30 dakika süresince hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Glikoz deneyleri, reaksiyon şartlarında enzimin stabilitesinin glikoz ile değişimini inceleyebilmek amacıyla nişastasız ortamda da tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.9'da verilmiş ve Şekil 7.9'da grafiksel olarak sunulmuştur.

**Çizelge 7.9** Glikoz miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60°C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

Glikoz Kons.(g/l)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons.(g/l)
0	42.03	49.01	64.10	5.80
10	34.55	57.64	65.58	6.54
20	28.04	64.70	68.02	7.19
40	23.20	69.19	70.64	7.68
60	17.11	71.01	72.45	8.28

Çizelge 7.9'dan da görüldüğü gibi, glikoz ilave edildiğinde hidroliz derecesi düşmektedir. Hidroliz derecesindeki düşüş glikozun reaksiyonu inhibe ettiğini göstermektedir. Fakat inhibisyonun yüksek glikoz konsantrasyonlarında artması, hidroliz derecesindeki düşüş için kütle transfer hızının artan konsantrasyonla azalmasında bir etken olduğunu göstermektedir. Hill vd. (1997) yaptıkları deneysel çalışmada, buğday nişastasının hidrolizinde glikozun reaksiyona etkisini incelemişler ve reaksiyon hızındaki düşüşün, glikozun inhibitör etkisinden çok yüksek şeker konsantrasyonundan (kütle transferinin azalmasından) kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Nişastalı ve nişastasız ortamdaki işlem sonunda enzim aktivitelerine bakıldığında, enzim stabilitesinde bir azalma olmaması glikoz inhibisyonunun tersinir olduğunu gstermektedir. Ortamda glikoz olması durumunda her iki durum içinde enzim stabilitelerindeki artış glikozun enzimi stabilize ettiğini gstermektedir.



**Şekil 7.9** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun glikoz miktarı ile değişimini ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Glikoz miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbek ve Ülgün, 2000).

$$[A] = a + b \cdot G_2 + c \cdot G_2^2 \quad (7.19)$$

$G_2$ : glikoz konsantrasyonu (g glikoz/l)

Eşitlik 7.19'daki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

• Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 49.5432

b: 0.8729 (g glikoz/l)<sup>-1</sup>

c: -0.0087 (g glikoz/l)<sup>-2</sup>

• Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 63.9291

b: 0.2177 (g glikoz/l)<sup>-1</sup>

c: -0.0012 (g glikoz/l)<sup>-2</sup>

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla, nişastalı ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 1.3656 ve 0.9943, nişastasız ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 0.3517 ve 0.9974 olarak bulunmuştur.

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

$$[S_1] = [S_0] - [S_{G2_0}] \cdot \exp(-a \cdot G_2) \quad (7.20)$$

Bu denklemde  $[S_0]$ ,  $t = 0$  anında ortamda bulunan nişasta konsantrasyonu olup 10 g/l dir.  $[S_{G2_0}]$  ise glikoz miktarı  $G_2 = 0$  iken hidrolizlenen nişasta konsantrasyonudur.

Eşitlik 7.20'deki a ve  $[S_{G2_0}]$  değerleri Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

a = 0.0150 (g glikoz/l)<sup>-1</sup>

$$[S_{G20}] = 4.0781 \text{ (g nişasta/l)}$$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda, standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla 0.1554 ve 0.9903 olarak bulunmuştur.

### 7.10 Etanolün Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

Enzimatik reaksiyonlarda ikinci bir çözücü olarak organik çözücülerin kullanılması ile kinetik aktivitenin artış gösterdiği bir çok araştırmacı tarafından savunulmuştur. Kinetik aktivitedeki artışın sebepleri literatürde;

- İkinci bir çözücünün, enzimin spesifik veya spesifik olmayan aktif bölgelerine bağlanarak enzime esneklik kazandırması ve enzimin bu şekilde modifiye edilerek substrata bağlanmasının kolaylaştırılması,
- Organik çözücülerin inhibitörleri enzimin aktif kısmından uzaklaştırıyor olması,
- Yüksek molleküllü substratların organik çözücü ilavesi ile yapılarının değişmesi (örneğin; selülozun ve nişastanın organik çözücüler içerisinde şişmesi gibi) sonucunda reaksiyonun hızlanması

ile açıklanmıştır (Kudryashova vd.,1997). Bu nedenle, bu çalışmada ikinci bir çözücünün hidroliz reaksiyonuna ve enzim aktivitesine etkisini incelemek amacıyla etanol kullanılmıştır. Etanol, %1 (ağırlık/hacim) nişasta içeren 500 ml'lik reaksiyon çözeltisi içerisine, %5, %10, %15, %20 (hacim/hacim) oranlarında ilave edilmiştir. Reaksiyonlar 60°C sıcaklık, pH 6.5 ve 300 devir/dak karıştırıcı hızında 0.7 g enzim ilavesi ile 30 dakika boyunca sürdürülmüştür. Ayrıca, enzim stabilitesinin reaksiyon şartlarında, etanol miktarı ile değişimini inceleyebilmek amacıyla deneyler nişastasız ortamda da tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.10'da verilmiş ve Şekil 7.10'da grafiksel olarak sunulmuştur.

Çizelge 7.10'dan da görüldüğü gibi, ortama %5 hacim/hacim oranında etanol ilavesi ile hidroliz derecesi %42.03 değerinden %47.50 değerine yükselmiş, %5-%15 etanol ilavesi arasında sabit kalmış, çözelti içerisindeki etanol oranının %20 olması durumunda ise %40.93 değerine düşmüştür. Literatürde, reaksiyon ortamında organik çözelti oranının artışının belli

bir değerden sonra enzimi yapısal olarak etkilediği ve reaksiyonu yavaşlattığı belirtilmiştir (Kudryashova vd., 1997).

**Çizelge 7.10** Etanol miktarına karşılık elde edilen deneysel veriler (T=60<sup>0</sup>C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

% Etanol (hacim/hacim)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons.(g/l)
0	42.03	49.01	64.10	5.80
5	47.50	58.91	60.10	5.25
10	47.48	65.29	57.00	5.25
15	47.35	63.41	55.00	5.26
20	40.93	61.02	54.02	5.90

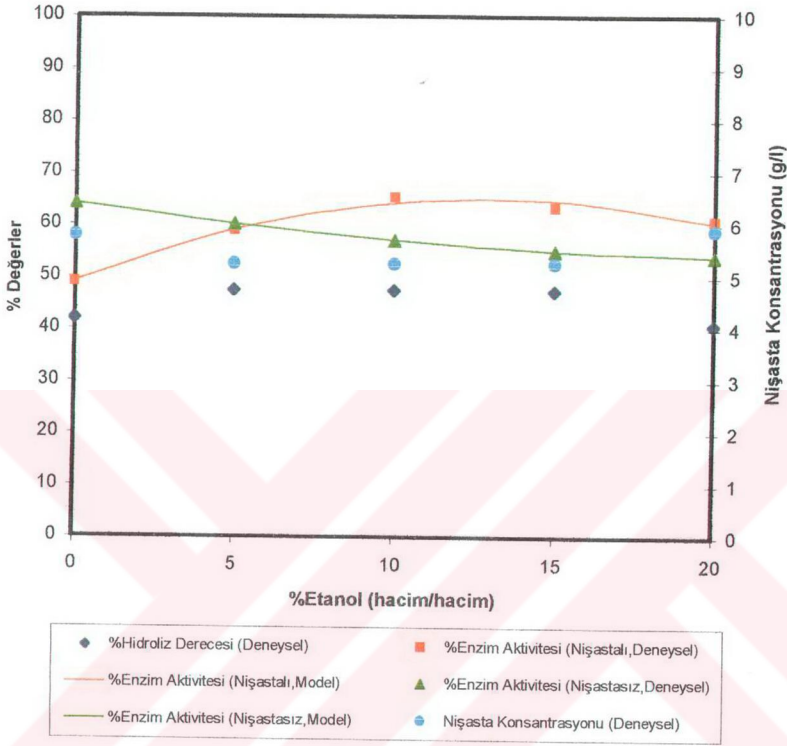
İşlem sonu enzim aktiviteleri incelendiğinde, enzim stabilitesinin nişastalı ortamda, nişastasız ortama göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Kudryashova vd. (1997),  $\alpha$ -chymotrypsin enzimi ve etanol ilavesi ile yaptıkları deneysel çalışmalarında, ortamda enzimin kompleks oluşturabileceği bir substrat veya başka bir polimer olduğunda organik çözelti içerisinde stabilitesinin daha yüksek olduğunu savunmuşlardır.

Toscano vd.'de (1994), ortamda substrat veya substrat benzeri maddelerin olması durumunda, enzim stabilitesinin organik çözelti içerisinde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum; ortamda nişasta ve enzim varken etanol moleküllerinin daha çok nişasta molekülleri ile etkileştiği yada enzimin nişasta ile kompleks oluşturması ile aktif kısmın etanol molekülleri ile etkileşiminden korunması ile açıklanabilir.

Etanol miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan matematiksel modelleme sonucunda nişastalı ve nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için elde edilen verilerin aşağıdaki bağıntıya uyduğu bulunmuştur (Karelik model, Özbec ve Ülgen, 2000).

$$[A] = a + b*(Et) + c*(Et)^2 \quad (7.21)$$

Et: % etanol miktarı (hacim/hacim)



**Şekil 7.10** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun etanol miktarı ile değişimi ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $N=300$  devir/dak)

Eşitlik 7.21'deki a, b ve c katsayıları Curve Expert 1.3 programı kullanılarak;

- Nişastalı ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 49.1326

b:  $2.4469 (\text{hacim/hacim})^{-1}$

c:  $-0.0938 (\text{hacim/hacim})^{-2}$

- Nişastasız ortamda gerçekleştirilen deneyler için,

a: 64.1160

b:  $-0.9132 (\text{hacim/hacim})^{-1}$

c:  $0.0204 (\text{hacim/hacim})^{-2}$

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen verilere ait yapılan istatistiksel analiz sonucunda standart sapma ( $\sigma$ ) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri sırasıyla, nişastalı ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 1.2519 ve 0.9902, nişastasız ortamdaki enzim aktivitesi modeli için 0.0358 ve 0.9999 olarak bulunmuştur.

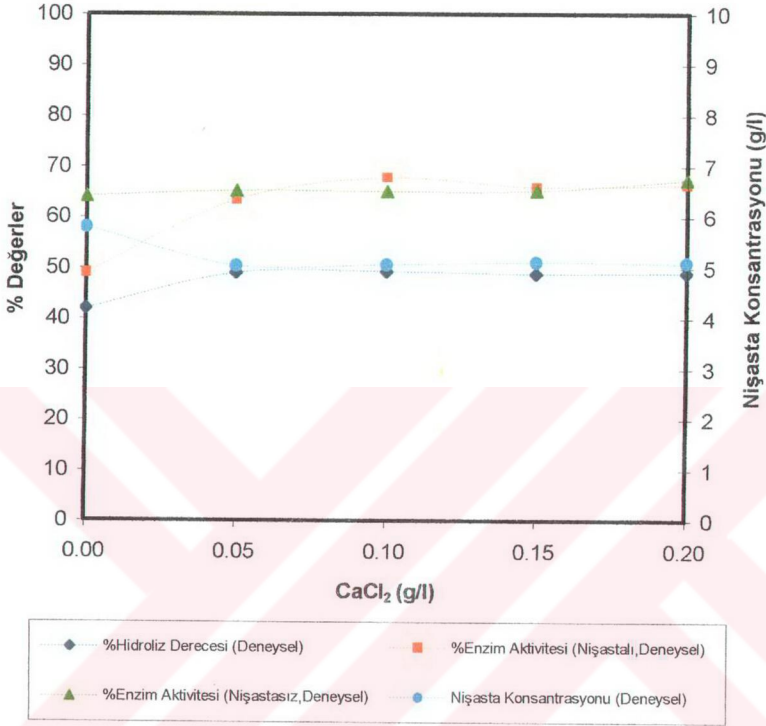
### 7.11 $\text{CaCl}_2$ 'ün Enzim Aktivitesi ve Hidroliz Üzerindeki Etkisi

$\text{CaCl}_2$ 'ün enzim aktivitesi ve hidroliz işlemine etkisini incelemek için yapılan deneysel çalışmada  $\text{CaCl}_2$ , %1 (ağırlık/hacim) oranında nişasta içeren reaksiyon çözeltisinin içerisinde, konsantrasyonunun 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 g/l olacağı miktarlarda ilave edilmiştir.  $\text{CaCl}_2$  ilavesi ile reaksiyon çözeltisi,  $60^\circ\text{C}$  sıcaklık, pH 6.5, 300 devir/dak karıştırıcı hızında, 1.4 g/l enzim ilavesi ile 30 dakika süresince hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Ayrıca,  $\text{CaCl}_2$  ilavesi ile enzimin proses şartlarına dayanıklılığını (proses şartlarındaki stabilitesini) inceleyebilmek amacıyla deneyler nişastasız ortamda da tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.11'de verilmiş ve Şekil 7.11'de grafiksel olarak sunulmuştur.

**Çizelge 7.11**  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonuna karşılık elde edilen deneysel veriler ( $T=60^\circ\text{C}$ , pH=6.5, N=300 devir/dak)

$\text{CaCl}_2$ (g/l)	% Hidroliz Derecesi	% Enzim Aktivitesi (Nişastalı ortam)	% Enzim Aktivitesi (Nişastasız ortam)	Nişasta Kons. (g/l)
0.00	42.03	49.01	64.10	5.80
0.05	49.60	63.38	65.11	5.04
0.10	49.34	67.76	65.08	5.07
0.15	48.89	66.00	65.24	5.11
0.20	49.00	66.50	67.46	5.10

Çizelge 7.11'den de görüldüğü gibi, ortama  $\text{CaCl}_2$  ilavesi ile hidroliz derecesi %42.03'den %49.60'a yaklaşık olarak %18 oranında artmış, ancak bu artış 0.05-0.2 g/l  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonları için sabit kalmıştır.



**Şekil 7.11** %Enzim aktivitesi, %hidroliz derecesi ve nişasta konsantrasyonunun CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile değişimi (T=60<sup>0</sup>C, pH=6.5, N=300 devir/dak)

İşlem sonu enzim aktivitelerine bakıldığında nişastalı ortamda CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile enzimin stabilitesi artmıştır. Şekil 7.11'den de görüldüğü gibi, nişastasız ortamda CaCl<sub>2</sub>'ün enzim stabilitesine önemli bir etkisi olmamış, değerler sabit kalmıştır.

Ca<sup>+2</sup> iyonlarının reaksiyon ortamında  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin stabilitesini artırdığı bilinmektedir (Salieri vd., 1994). Somers vd. (1991)  $\alpha$ -amilaz enzimi ile yaptıkları çalışmalarında, CaCl<sub>2</sub>'ün belirli bir konsantrasyona kadar enzim stabilitesini arttırdığını, fakat bir optimumdan sonra enzimi inaktive ettiğini belirtmişlerdir. Bajpai vd. (1992), deneysel çalışmalarında  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin maksimum olduğu CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunu 0.2 g/l

olarak belirlemiş, bu konsantrasyondan sonra aktivitede bir azalma gözlemlediklerini belirtmişlerdir\*.



---

\*Bölüm 7'de sunulan tüm deneysel çalışmalara ait verilere uyan matematiksel ifadeler ve istatistiksel veriler Ek 1, Çizelge E1.1 ve Çizelge E1.2'de verilmiştir.

## 8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Birçok biyoteknolojik proses hızlı bir gelişim gösterirken, enzimlerin deaktivasyonu bu proseslerin verimini önemli ölçüde etkilemektedir. Hidroliz işlemi katalizeyecek alternatif teknolojilerin olmaması, endüstride amilaz enzimlerinin önemini daha çok arttırmıştır. Bundan dolayı, kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi araştırmacıların ilgisini çeken bir konu olmuştur.

Bu çalışmada mısır nişastasının ticari bir enzim olan *Bacillus* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi (Sigma, ürün kodu: A6211) ile hidroliz işlemine ait proses parametrelerinin (sıcaklık, pH, karıştırıcı hızı, zaman ve enzim miktarı) ve buna ilave olarak; reaksiyon çözeltisine ilave edilen her bir maddenin (maltoz, glikoz, gliserin,  $\text{CaCl}_2$  ve etanol) enzim aktivitesi (nişastalı ve nişastasız ortamda) ve mısır nişastasının hidroliz derecesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İşlem sonu  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesi ve mısır nişastasının hidroliz derecesi ile ilgili elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- 1) Sıcaklığın etkisi incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda enzimin stabilitesini koruduğu ancak reaksiyonu katalizlemediği için hidroliz derecesinin düşük olduğu, sıcaklık artışı ile hidroliz derecesinin arttığı görülmüştür. Yüksek sıcaklıklarda enzimin stabilitesini koruyamadığı,  $65^{\circ}\text{C}$ 'den sonra sıcaklıkla aktivitesini tamamen yitirdiği tesbit edilmiştir. Deneysel sonuçları incelendiğinde elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele ( $30-70^{\circ}\text{C}$  sıcaklık aralığında), ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile ilgili değerlerin ( $30-70^{\circ}\text{C}$  sıcaklık aralığında) Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen modele uyduğu saptanmıştır.
- 2) pH'nın etkisi incelendiğinde, asidik ortamlarda enzimin stabil olmadığı ( $\text{pH}<6.5$ ), bazik ortamda ise reaksiyonu daha az katalizlediği tesbit edilmiş ve reaksiyon için optimum pH değerinin 6 olduğu saptanmıştır. Deneysel verilere dayanılarak yapılan matamatiksel modelleme sonucunda enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele (pH 5.5'dan itibaren), ortamda kalan nişasta konsantrasyonu ile ilgili değerlerin ise polinom denkleme uyduğu görülmüştür.

- 3) Karıştırıcı hızının etkisi incelendiğinde, karıştırıcı hızı artışı ile enzim stabilitesinin düşüş gösterdiği ve hidroliz derecesi için optimum karıştırıcı hızının 300 devir/dak olduğu tesbit edilmiştir. Deneyle sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin ise polinom denkleme uyduğu belirlenmiştir.
- 4) Zamanın etkisi incelendiğinde, 90 dakika sonunda  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin nişastalı ortamda %14.7, nişastasız ortamda %27.71 olduğu ve nişastanın %49.49'unun hidrolizlendiği belirlenmiştir. Elde edilen enzim aktivitesi değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortam için) birinci mertbe enzim inaktivasyon modeline, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin Komolpraset ve Ofoli (1991) tarafından geliştirilen modele uyduğu saptanmıştır.
- 5) Enzim konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, 1.6 g/l enzim miktarının reaksiyon için doygunluk konsantrasyonu olduğu tesbit edilmiştir. Deneyle sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin ise Komolpraset ve Ofoli (1991) tarafından geliştirilen modele uyduğu belirlenmiştir.
- 6) Viskozitenin ve ilave edilen gliserin miktarının etkisi incelendiğinde, ortama gliserin ilavesi ile viskozite artarken hidroliz derecesinin düşüş gösterdiği ancak enzim stabilitesinin arttığı belirlenmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar viskozite değerlerine ve gliserin miktarına göre ayrı ayrı değerlendirilmiş ve her iki koşul için enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen modele uyduğu belirlenmiştir.
- 7) Hidrolizat miktarının etkisi incelendiğinde, hidroliz ürünlerinin reaksiyonu inhıbe ettiği ve hidroliz derecesinin azaldığı, işlem sonu enzim aktivite değerleri incelendiğinde inhibitör etkisinin tersinir olduğu ve ortamda hidroliz ürünleri varken enzim stabilitesinin daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Deneyle sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen modele uyduğu belirlenmiştir.

- 8) Maltoz miktarının etkisi incelendiğinde, yüksek konsantrasyonlarında (10 g/l nişasta içeren çözelti için 10g/l ve üzerinde maltoz kullanıldığında) maltozun reaksiyonu inhibe ettiği ve hidroliz derecesinin azaldığı görülmüştür. İşlem sonu enzim aktivite değerleri incelendiğinde inhibitör etkisinin tersinir olduğu ve ortamda maltoz varken enzim stabilitesinin daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen modele uyduğu belirlenmiştir.
- 9) Glikoz miktarının etkisi incelendiğinde, maltoz miktarı değişiminin etkisine benzer sonuçlar elde edilmiş, yüksek konsantrasyonlarında (10 g/l nişasta içeren çözelti için 10g/l ve üzerinde glikoz kullanıldığında) glikozun reaksiyonu inhibe ettiği ve hidroliz derecesinin azaldığı görülmüştür. İşlem sonu enzim aktivite değerleri incelendiğinde inhibitör etkisinin tersinir olduğu ve ortamda glikoz var iken enzim stabilitesinin daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele, ortamda kalan nişasta konsantrasyonu değerlerinin Hill vd. (1997) tarafından geliştirilen modele uyduğu belirlenmiştir.
- 10) Etanolün etkisi incelendiğinde, ortama %5 ile %15 aralığında hacim/hacim oranında etanol ilavesi ile hidroliz derecesinin yaklaşık %12 arttığı, çözelti içerisinde etanol oranının daha fazla artırılması durumunda ise, enzimin yapısal olarak bozulduğu ve hidroliz derecesinin azalma gösterdiği tesbit edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen enzim aktivite değerlerinin (nişastalı ve nişastasız ortamda) Quadratik modele uyduğu saptanmıştır.
- 11)  $\text{CaCl}_2$ 'ün etkisi incelendiğinde, reaksiyon ortamında 0.05 g/l konsantrasyonunda  $\text{CaCl}_2$  bulunması ile enzim stabilitesinin yaklaşık %29, hidroliz derecesinin yaklaşık %18 arttığı belirlenmiştir.  $\text{CaCl}_2$ 'ün daha yüksek konsantrasyonlarda kullanımının (0.2 g/l'ye kadar) ise stabilize ve hidroliz derecesindeki artışa daha fazla bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

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

- kaynağı farklı nişastalar ve  $\alpha$ -amilaz enzimleri,
- tutuklanmış  $\alpha$ -amilaz enzimleri,
- enzim stabilitesini sağlayan farklı katkı maddeleri,
- enzimin katalitik aktivitesine etki eden farklı maddeler,
- farklı reaktör tipleri (membran reaktörler veya kombine reaktör sistemleri).



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

Kudryashova, V.E., Gladilin, A.K., Vakurov, A.V., Heitz, F., Levashov, A.V., Mozhaev, V.V., (1997), "Enzyme-Polyelectrolyte Complexes in Water-Ethanol Mixtures: Negatively Charged Groups Artificially Introduced into  $\alpha$ -Chymotrypsin Provide Additional Activation and Stabilization Effects", *Biotechnology and Bioengineering*, 55(2):267-277.

Marchal, L.M., Jonkers, J., Franke, G., Gooijer, C.D., Tramper, J., (1999), "The effect of Process Conditions on the  $\alpha$ -Amylolytic Hydrolysis of Amilopectin Potato Starch: An Experimental Design Approach", *Biotechnology and Bioengineering*, 62(3):348-357.

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

Özbek (Kın), B. and Ülgen, K., (2000), "The Stability of Enzymes After Sonication", *Process Biochemistry*, 35(9):1037-1043.

Özbek (Kın), B. and Yüceer, S., (2001), " $\alpha$ -Amylase Inactivation During Wheat Starch Hydrolysis Process", *Process Biochemistry*, 37(1): 87-95.

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

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

Rariy, R.V., Bec, N., Klyachko, N.L., Levashov, A.V., (1998), "Thermobarostability of  $\alpha$ -Chymotrypsin in Reversed Micelles of Aerosol OT in Octane Solvated by Water-Glycerol Mixtures", *Biotechnology and Bioengineering*, 57(5):552-556.

Reed, G. and Undekofler, A.L., (1966), *Enzymes in Food Processing*, Academic Press Inc., New York.

Salieri, G., Vinci, G. and 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.

Somers, W., Rozi, H., Bonte, A., Visser, J., Rombouts, K., Riet, K., (1991), "On the Interaction of  $\alpha$ -Amylase with Crosslinked Starch: Evaluation of Process Conditions", *Enzyme Microb. Technol.*, 13:997-1006.

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

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

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

Toscano, G., Pirozzi, D., Maremonti, M., Greco, G. (1994), "Solid-State Enzyme Deactivation in Air and in Organic Solvents", *Biotechnol. Bioeng.*, 44:682-689.

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

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

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

Yüceer, S., (2000), "Buğday Nişastasının Hidrolizinde  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

## İNTERNET KAYNAKLARI

[1]: [http://www.europabio.org/pages/module\\_14.asp](http://www.europabio.org/pages/module_14.asp)

[2]: <http://www.chem.wsu.edu/chem102/102-EnzStrClassMech.htm#Struct>.

[3]: <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/Metabolism/Enzymes.html>

[4]: "Enzyme Kinetics", [www.indstate.edu/thcme/mwking/enzymekinetcs.htm](http://www.indstate.edu/thcme/mwking/enzymekinetcs.htm).

[5]: "Enzymes", [www.ann.com.au/MedSci/enzymesh.htm](http://www.ann.com.au/MedSci/enzymesh.htm).

[6]: <http://www.mills.edu/RESARCH/FUTURES/JOHNB/Structurefunction/727.html>.

[7]: <http://www.awlonline.com/mathews/ch11ifm.htm>

[8]: <http://ceiba.cc.ntu.edu.tw/603371B1/lecture6.ppt>

[9]: <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851993931/3931ch13.pdf>

[10]: <http://www.sbu.ac.uk/water/hysta.htm>

## EKLER

Ek 1. Deneysel Verilere Uyan Modeller ve R<sup>2</sup> DeğerleriÇizelge E1.1  $\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesi ile ilgili modeller ve R<sup>2</sup> değerleri

Parametre	Matematiksel model	Türetilmiş denklem	R <sup>2</sup>
Sıcaklık (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[T] + c[T]^2$	0.9850
Sıcaklık (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[T] + c[T]^2$	0.9854
pH (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem (pH:5.5-9)	$[A] = a + b[pH] + c[pH]^2$	0.9933
pH (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem (pH:5.5-9)	$[A] = a + b[pH] + c[pH]^2$	0.9807
Karıştırıcı hızı (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[N] + c[N]^2$	0.9959
Karıştırıcı hızı (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[N] + c[N]^2$	0.9994
Zaman (Nişastalı ortam)	(Jones,1984)	$[A] = [A_0] * \exp(-k_D * t)$	0.9970
Zaman (Nişastasız ortam)	(Jones,1984)	$[A] = [A_0] * \exp(-k_D * t)$	0.9956
Enzim Kons. (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[E] + c[E]^2$	0.9947
Viskozite (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[\mu] + c[\mu]^2$	0.9994
Viskozite (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[\mu] + c[\mu]^2$	0.9883
Gliserin Miktarı (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[G_1] + c[G_1]^2$	0.9974
Gliserin Miktarı (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[G_1] + c[G_1]^2$	0.9970

Çizelge E1.1 (Devam)

Parametre	Matematiksel model	Türetilmiş denklem	R <sup>2</sup>
Hidrolyzat Miktarı (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[H] + c[H]^2$	0.9985
Maltoz Kons. (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[M] + c[M]^2$	0.9913
Maltoz Kons. (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[M] + c[M]^2$	0.9977
Glikoz Kons. (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[G_2] + c[G_2]^2$	0.9943
Glikoz Kons. (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[G_2] + c[G_2]^2$	0.9974
Etanol Miktarı (Nişastalı ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[Et] + c[Et]^2$	0.9902
Etanol Miktarı (Nişastasız ortam)	Quadratik denklem	$[A] = a + b[Et] + c[Et]^2$	0.9999

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>
Sıcaklık	$d[S]/dT = a \cdot \exp(-b \cdot T)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - a \cdot \exp(-b \cdot T)$	0.9812
pH	Polinom denklem	$[S_1] = a + b[pH] + c[pH]^2 + d[pH]^3$	0.9912
Karıştırıcı hızı	Polinom denklem	$[S_1] = a + b[N] + c[N]^2 + d[N]^3$	0.9909
Zaman	Ampirik formül (Komolprasert ve Ofoli, 1991)	$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot t) + c$	0.9867
Enzim Kons.	Ampirik formül (Komolprasert ve Ofoli, 1991)	$[S_1] = a \cdot \exp(-b \cdot E) + c$	0.9971
Viskozite	$d[S]/d\mu = a \cdot \exp(-b \cdot \mu)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - a \cdot \exp(-b \cdot \mu)$	0.9806
Gliserin Miktarı	$d[S]/dG_1 = a \cdot \exp(-b \cdot G_1)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - [S_{G10}] \cdot \exp(-b \cdot G_1)$	0.9670
Hidrolizat Miktarı	$d[S]/dH = a \cdot \exp(-b \cdot H)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - [S_{H0}] \cdot \exp(-a \cdot H)$	0.9985
Maltoz Kons.	$d[S]/dM = a \cdot \exp(-b \cdot M)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - [S_{No}] \cdot \exp(-a \cdot M)$	0.9847
Glikoz Kons.	$d[S]/dG_2 = a \cdot \exp(-b \cdot G_2)$ (Hill vd., 1997)	$[S_1] = [S_0] - [S_{G20}] \cdot \exp(-a \cdot G_2)$	0.9903

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum Tarihi	16.12.1976	
Doğum yeri	Almanya	
Lise	1991-1994	Pendik Lisesi
Lisans Hazırlık	1994-1995	Ege Üniversitesi, Yabancı Diller Bölümü (İngilizce)
Lisans	1995-1999	Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2002	Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Anabilim Dalı
Çalıştığı kurum(lar)	2000-Devam ediyor	YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Araştırma Görevlisi