

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ BİR METOTLA MALTOGENAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU**

OLTAN CANLI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2003

ÖZET

Maltogenaz, Eupergit C matrisinde % 60 rölatif aktivite ile immobilize edildi. İmmobilize enzim maltodekstrinden maltoz üretiminde kullanıldı ve 30 gün süresince önemli bir aktivite kaybına uğramadığı tespit edildi. Serbest ve immobilize enzim için optimum şartların değişmediği ve optimum pH'ın ve sıcaklığın sırasıyla 5 ve 60°C olduğu gözlemlendi. İmmobilize maltogenaz'ın serbest enzime göre yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde daha dayanıklı olduğu tespit edildi. İmmobilizasyonun kinetik parametreleri değiştirdiği bulundu: Serbest enzim için 19,4 g maltoz/L.dak ve 41,9 g maltodekstrin/L olan V_m ve K_m değerleri, immobilize enzim için 10,6 g maltoz/L.dak ve 62,1 g maltodekstrin/L olarak belirlendi.

SUMMARY

Maltogenase was immobilized onto Eupergit C, resulted in 60% relative activity. The immobilized enzyme was used for the production of maltose from maltodextrin and found that it has been active for 30 days without significant decrease in activity. The optimum conditions were not affected by immobilization, and the optimum pH and temperature for free and immobilized enzymes were 5.0 and 60 °C, respectively. It was determined that immobilized enzyme was more stable at high pH and temperatures. Immobilization changed the kinetic parameters: V_m and K_m for free enzyme were 19,4 g maltose/L.min, and 41,9 g maltodextrin/L respectively, whereas V_m and K_m for immobilized enzyme were 10,6 g maltose/L.min and 62,1 g maltodextrin/L, respectively.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince bilimsel katkılarını ve moral desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN'e teşekkür ederim.

Destek ve yardımlarını gördüğüm Prof.Dr. Adem KILIÇ, Prof. Dr. Bülent KESKİNLER, Kimya ve Çevre Mühendisliği Bölümü çalışma arkadaşlarım ve özellikle Arş. Grv. Mehmet ÜNSAL ayrıca hoşgörü ve destekleri için sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	10
Nişasta	10
Maltodekstrinler	13
Maltoz	14
Yapılan Çalışmalar	17
2.2.1 Maltogenaz ile Yapılan Çalışmalar	17
2.2.2 Epoxy Gruplar içeren Matrisler ile Yapılan Çalışmalar	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
Gereçler	27
Kullanılan Maddeler	27
Kullanılan Aletler	28
Enzim	28
Yöntem	29
İnce Tabaka Kromatografisi ile Maltoz Tayini	29
Maltoz Enziminin Eupergit C ile İmmobilizasyonu	29
Enzim Aktivite Tayini	29
Optimum pH ve Sıcaklığın Tayini	30
K_m , V_{max} Tayini	30
Maltodekstrinden Maltoz Üretimi	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	32
İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu	32
Tampon Çözelti pH'ı ve Konsantrasyonunun Etkisi	32
İmmobilizasyona Amonyumsülfatın Etkisi	34
İmmobilizasyon Süresinin İmm. Enzim Aktivitesine Etkisi	34
İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	37
Optimum pH ve Sıcaklığın Tayini	37
K_m , V_{max} Tayini	38
İmmobilize Maltogenazın Aktivite Kararlılığının İncelenmesi	40

KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enzim immobilizasyon Metotları	3
1.2. Eupergit üretim reaksiyon mekanizması	7
2.1.1. Amilozun Kısmi Yapısı	10
2.1.2.A.Amilopektinin Kısmi Yapısı	11
2.1.2.B.Model Yapısı	11
2.1.3. Nişasta Hidroliz Ürünleri	12
2.1.4. Nişasta süspansiyonundan maltodekstrin üretim akım şeması	14
2.1.5. Nişasta hidroliz ürünlerinden maltoz eldesi	15
2.1.6. Maltozun molekül yapısı	15
2.1.7. Nişastadan Maltoz üretimi akım şeması	16
2.2.1. Eupergit C'nin yapısı ve bir enzimin kovalent bağlanması	20
2.2.2. Çoklu kovalent bağlanmanın oluşması	21
2.2.3. Epoxy matrislere IDA bağlanması	22
2.2.4. Protein monomerlerinin ve bir araya toplanmış büyük protein topluluklarının Eupergit C gözeneklerinde immobilizasyonu	23
4.2.1. Serbest ve immobilize maltogenaz için % aktivite-pH grafiği	37
4.2.2. Serbest ve immobilize maltogenaz için % aktivite-sıcaklık grafiği	38

4.2.3.	Serbest ve immobilize enzim için Michaelis-Menten grafiği	39
4.2.4.	Serbest ve immobilize enzim için Hanes-Woolf grafiği	40
4.2.5.	İmmobilize maltogenazın aktivite-batch grafiği	41
4.2.6.	İmmobilize maltogenazın aktivite-gün grafiği	42

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Endüstride yaygın kullanılan enzimler	2
1.2. İmmobilizasyon yöntemi ve matrisi seçimindeki dikkat edilecek noktalar	4
2.1.1. Yıllık dünyada üretilen ticari nişasta miktarı (milyon ton)	13
3.1.1. Deneyde kullanılan sarf maddeler	27
3.1.2. Deneyde kullanılan demirbaş aletler	28
3.2.1. İmmobilize enzim ile elde edilen maltoz miktarı	31
3.2.2. İmmobilize enzim ile elde edilen son ürünün kompozisyonu	31
4.1.1. İmmobilizasyon pH'ının immobilize enzimin aktivitesine etkisi	33
4.1.2. 1M (PO ₄ ³⁻) Tamponunun immobilize enzim aktivitesine etkisi	33
4.1.3. Amonyum sülfat miktarının immobilize enzimin aktivitesine etkisi	35
4.1.4. İmmobilizasyon süresinin immobilize enzimin aktivitesine etkisi	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

pH	$-\log [H^+]$
MD	Maltodekstrin
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
MANU	(Maltogenic Amylase Novo Unit) pH 5.0'de 60° C'da maltotriozun 1mikromolünü hidroliz eden enzim miktarıdır.
MWCO	Molecular Weight Cut-offs Molekül ağırlığına göre membranın geçirgenliği

GİRİŞ

Birbirlerine peptid bağları ile bağlı amino asitlerin uzun zincir yapılarından oluşmuş ve canlı hücrelerdeki kimyasal reaksiyonların çoğunun katalizinden sorumlu olan enzimlerin hepsi protein yapısındadırlar ve her bir enzim spesifik katalitik etkiye sahiptir. Enzimler, neredeyse insanlığın ilk zamanlarından beri dolaylı ve direkt olarak gıda üretimlerinde bakteri ve mayalar vasıtasıyla kullanılmaktadır. Bira ve şarap üretiminin temelini oluşturan reaksiyonda, şekerin mayayla etanola biyokatalitik fermantasyonundan enzimler sorumludur.

Nişastayı glikoza çeviren, sıcaklığa karşı dayanıksız bir yapı içeren malt ekstraktı içinde alkol varlığını keşfeden bilim adamları ilk defa net bir şekilde enzimin tarifini 1835’de yaptılar. Bugün genel adı amilaz olarak bilinen bu enzim, ilk olarak diyastaz diye adlandırılmıştır.

İzole edilmiş enzimler ilk olarak 1914 yılında deterjanlarda kullanıldı. Enzimlerin protein yapısı 1926 yılında James Sumner tarafından kristal jack bean üreaz kullanılarak ispatlandı ve bu çalışma 1946 yılında Sumner’a Nobel ödülünü kazandı. Enzimlerin geniş ölçekli mikrobial üretimi ise ancak 1960’larda başladı.

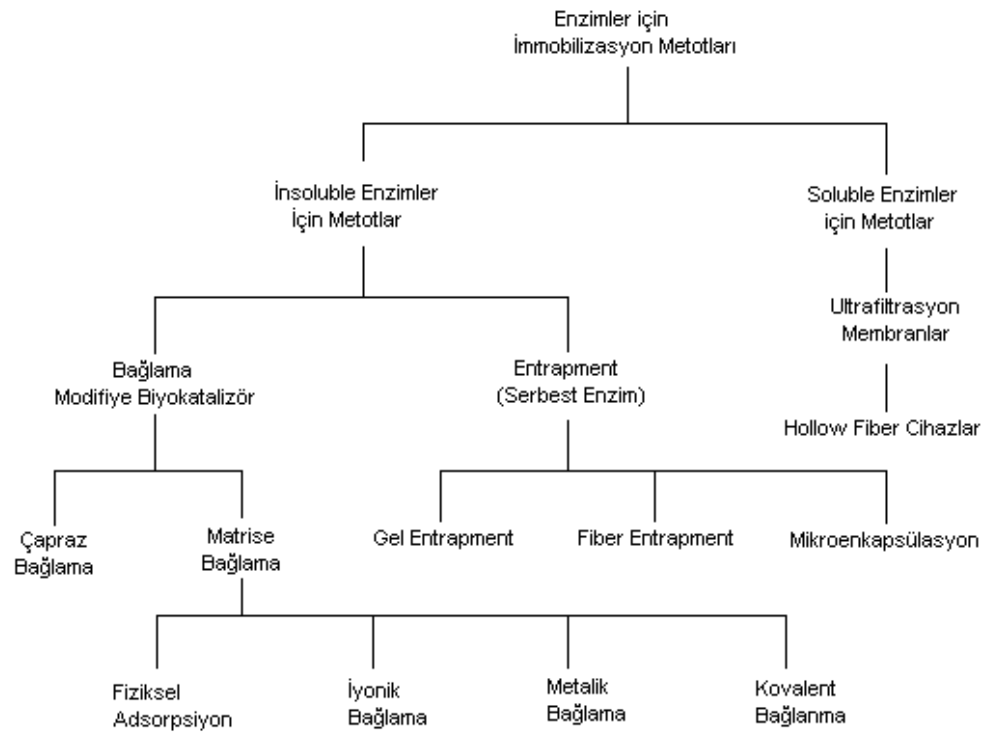
Bazı enzimlerin hala hayvan ve bitki dokularından ekstrakte edilmeleriyle birlikte enzimlerin çoğu fermentör denilen büyük reaktörlerde mikroorganizmalarla üretilirler. Geliştirilen üretim teknolojileri, enzim özelliklerinin değiştirilmesi ve yeni kullanım alanlarının doğması sebebiyle endüstriyel enzim ticareti sürekli büyümektedir.

Enzimler, endüstride organik sentezler, klinik analizler, ilaç üretimi, deterjanlar gıda üretimi ve fermantasyon gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Mikrobial enzimler için ilk geniş ölçekli kullanım deterjanlardı. Endüstride kullanılan önemli enzimlerden birkaçı Tablo 1.1.’de belirtilmiştir [Kirk et al. 2002; Beielen and Li, 2002].

Tablo 1.1. Endüstride yaygın kullanılan enzimler

Endüstri	Katalitik Etki
Deterjan	
Proteaz	Protein parçalama
Lipaz	FAT uzaklaştırma
Sellülaz	Renk ağartma
Amilaz	Niştayı uzaklaştırma
Tekstil	
Sellülaz	Mikrofibril uzaklaştırma
Lakkaz	Renk ağartma
Amilaz	Yapışmayı engelleyici
Hayvan Yemi	
Xylanaz	Kolay sindirilebilirlik
Fosfoesteraz	Fosfatı serbest bırakmada
Niştasta	
Amilaz	Sıvılaştırma sakkarifikasyon
Glukozizomeraz	Fruktoz eldesi
Kağıt ve Kağıt Hamuru	
Sellülaz	Lif modifikasyonu
Amilaz	Niştasta kaplama
Xylanaz	Biyo-ağartma
Meyve Suyu	
Pektinaz	Pektini parçalama, ezme
Amilaz	Meyve suyu iyileştirme, Düşük kalorili bira
Şeker Üretimi	
Amilaz	Maltoz, glukoz, fruktoz
CGT	Siklodekstrinler
Dekstransükraz	İzomaltooligosakkaritler
Un ürünleri	
Xylanaz	Hamuru ıslah etme
Amilaz	Ekmek yumuşaklığı ve hacmi
Glukozoksidaz	Hamuru güçlendirme
Süt ve Ürünleri	
Rennin	Protein çöktürme
Lactaz	Laktozun hidrolizi
Bira	
Amilaz	Niştastanın hidrolizi
Glukanaz	Süzme sorunlarını gidermede
Papain	Protein-polyfenol parçalama
Organik Sentezler	
Lipaz	Kiral alkol sentezi
Açilaz	Yarısentetik penisilin sentezi
Nitrilaz	Enantio-saf karboksilli asit sentezi

Endüstride yaygın kullanım alanı olan enzimler serbest halde kullanıldıkları gibi bir matrikse immobilize edilerek de kullanılabilirler. Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil1.1.'de gösterilmiştir [Bickerstaff, 1997].



Şekil 1.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları

İmmobilize enzim sistemlerinin yüksek performansı için matriks ve yöntem seçimi çok önemlidir. Bir enzim taşıyıcısını ve immobilizasyon yöntemini seçerken dikkat edilmesi gereken temel hususlar Tablo 1.2.'de gösterilmiştir [Bickerstaff, 1997].

Tablo 1.2. İmmobilizasyon yöntemi ve matriksi seçimindeki dikkat edilecek noktalar

Özellik	Uygulamada dikkat edilecek hususlar
Fiziksel	Dayanıklılık, sıkıştırılmamış tanecikler, geniş yüzey alanı, şekil/form, gözenek hacmi, gözenek derecesi, suda çözünmezlik ve yoğunluk.
Kimyasal	Hidrofiliklik (matriksle su bağlanması), enzime karşı inertlik, modifikasyon için fonksiyonel gruplar
Kararlılık	Depolama, enzim aktivitesi, destek materyalinin mekaniksel kararlılığı ve enzim aktivitesini sürdürmesi
Dayanıklılık	Bakterial atak, kimyasal, pH, sıcaklık, organik solvent, enzim ve proteazlara
Güvenlik	Biyoyuşum, bileşen reaktiflerin toksinliği, yöntemle çalışanların ve son ürünü kullananların sağlığı-güvenliği ve gıda, ilaç ve medikal kullanımlar için immobilizasyon prosesinin şartnamesi
Ekonomik	Matriks, kimyasallar, özel cihazlar, reaktifler ve gerekli teknik becerilerin kolay eldesi ve maliyeti, çevresel etki, endüstriyel ölçüde hazırlanabilirlik,
Reaksiyon	Reaksiyon kinetikleri, yan reaksiyonlar, çoklu enzim sistemleri ve kofaktör substrat ve ürün kütle transferlerinde difüzyon limitasyonları

Enzim immobilizasyon yöntemlerinin kendilerine ait avantaj ve dezavantajları mevcuttur.

Enzim immobilizasyonu ile sağlanan genel avantajlar aşağıda sıralanmıştır;

- Arttırılmış enzim kararlılığı
- Enzim maliyetini azaltma
- Tekrar kullanım için enzimin reaksiyon ortamından kolayca ayrılması
- Sürekli proseslere imkan vermesi
- Ürünün ortamdan kolayca ayrılması
- Fabrika atık suyu problemlerini azaltması
- Bazı durumlarda enzim aktivitesinin artması

Bu avantajlarıyla birlikte immobilize enzim prosesinin kullanılması bazı faktörler tarafından sınırlanmaktadır;

- Serbest enzimin oldukça düşük maliyeti
- Immobilizasyon proses ve matriksinin yapısı ve maliyeti
- Sistemin performansı

Amilazlar, günümüz biyoteknolojisinde önemli enzimler arasındadır. Amilazlar bitki, hayvan ve mikro-organizmalardan elde edilmelerine rağmen, genelde endüstriyel olarak mikrobial kaynaklı enzimler tercih edilir. Amilazlar, biyoteknolojinin ilerlemesiyle; gıda, tekstil, kağıt ve bira endüstrisine ilave olarak analitik kimya gibi diğer alanlarda da kullanılmaktadır.

Amilazlar; α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilaz (GA) diye üç başlık altında sınıflandırılabilirler. α -amilaz [endo(iç kısımdan)-1,4- α -glukan glukohidrolaz] lineer

amilo α zincirindeki glikoz birimleri arasındaki α -1,4-D-glikozidik ba β larını hidroliz eden h β cre dı β bir enzimdir. β -amilaz (α -1,4-glukan maltohidrolaz) genel olarak bitki k β kenli olmasına ra β men β -amilaz β retmek i β in birka β mikrobial kaynak bilinmektedir. Bu enzim amilo α , amilopektin ve glikojenin indirgen olmayan u β larından hidroliz ederek β malto β meydana getirir. β -amilaz, amilopektindeki α -1,6 glikozidik ba β larını par β alayamadı β ından molekul β n hidrolizinden elde edilen son β r β n kompozisyonu i β inde ancak %50-60 malto β bulunur. Glukoamilaz (amiloglikozidaz, glikojenik enzim, ni β asta glikojenik ve γ -amilaz olarak da adlandırılabilir; exo-1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz) amilo α ve amilopektinin indirgen olmayan u β larından tek glikoz birimlerini hidroliz eder. β o β u amilazdan farklı olarak glikoamilaz α -1,4 ba β larından daha yava β olsa da amilopektinin dallanma noktasındaki α -1,6 ba β larını da hidroliz edebilir. Uzun s β reli reaksiyonlarda, ni β astayı tamamen glikoza d β on β st β rebilir [Pandey et al. 2000]

1960'lardaki ilk β alı β malarından beri enzim immobilizasyonu ve immobilize enzim hakkında 10000 den daha fazla yayın ve patent hazırlanmı β tır. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan matrikslerden bir tanesi ticari olarak β retilen Eupergit'tir. Eupergit enzimlerin kovalent immobilizasyonu i β in k β resel ta β ıyıcı bir materyaldir. Eupergit 1974-1980 yılları arasında R β hm firması tarafından Almanya'da geli β tirilmi β tir [Katzir and Kraemer, 2000]. Eupergit N,N¹-metilen bis(metakrilamid), metakrilamid ve reaktif epoksit gruplarını i β eren glisidil metakrilat veya allil glisidil eterin kopolimerizasyon reaksiyonuyla elde edilir. β ekil 1.2.'de Eupergit polimerinin β retim reaksiyon mekanizması g β sterilmi β tir. Aktif grup olan epoksitler enzimlerin yapılarındaki amino, s β lfidril ve hidrosil gruplarıyla reaksiyon vererek onları kovalent olarak ba β layabilirler [Hermanson et al. 1992]. Ticari olarak iki farklı Eupergit satılmaktadır; Eupergit C ve Eupergit C 250L. Hem Eupergit C hem de Eupergit C 250L 100-250 μ m β aplı epoxy-aktive edilmi β mikroporlara sahip akrilik taneciklerdir. Yapılarındaki oksiran grubu sayısı ve g β zenek yapısı birbirlerinden farklıdır. Eupergit C ortalama g β zenek b β y β kl β ğ β r=10 nm ve oksiran yo β ğunlu β u 600 μ mol/g kuru tanecik iken Eupergit C 250L daha b β y β k g β zenek yarı β apına (r=100 nm) ve daha d β üş β k oksiran yo β ğunlu β una sahiptir (300 μ mol/g kuru tanecik) [Menzler et al. 2002].

Asitle yapılan nişasta hidrolizi, monomerlerden normal nişasta polimeri aralığında farklı boyutlarda moleküllerin bir karışımını içeren hidroliz ürünlerinin ortaya çıktığı kontrolsüz bir prosestir (Nişasta hidrolizinde, enzimlerin kullanımının asit kullanımına göre üstün yönleri vardır). Nişasta hidrolizinde sıkça kullanılan, α -amilaz α -1,4 bağlarını kırarken nişastadaki α -1,6 bağlarını da kırabilir. Bununla birlikte α -amilaz maltoz ve maltotriozdaki α -1,4 bağlarını kıramaz. Bu yüzden maltoz, maltotrioz ve özellikle α -1,6 bağları içeren düşük molekül ağırlıklı sakkaritler son ürün olarak ortamda bulunurlar [Wang and Wang, 2000].

1980'li yıllarda yeni bir amilaz *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edildi. Enzim verimliliğini arttırmak için; Novo genetik laboratuvarlarında maltogenik amilazın üretimi için sorumlu gen izole edildi ve gen *bacillus subtilis*'e transfer edildi. Maltogenaz olarak adlandırılan bu enzimin exo bir enzim olduğu ve nişastadan α -maltoz oluşturduğu bulundu. Maltogenaz, exo hidroliz yapan β -amilazlar gibi sadece α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz edebilir; fakat bu enzimler dekstrin moleküllerindeki α -1,6 glikozidik bağlarını hidroliz edemez. Maltogenaz ile birlikte α -1,6 glikozidik bağlarının hidroliz eden enzimlerin beraber kullanılmasının sebebi hidrolizi hızlandırmaktır [Nebesyn, 1992].

Maltoz (4-O- α -D-glikopiranosil-D-glikopiranoz) ($C_{12}H_{22}O_{11}$) kimyasal yapısına sahip α -1,4 bağları ile bağlı iki glikoz biriminden oluşan bir disakkarittir. Maltoz nişastadan enzimler (Maltogenaz, β -amilaz) kullanılarak üretilir. Elde edilen hidroliz ürünlerinin kuru ağırlığının % 40-90'ını maltoz oluşturur. Konsantrasyon ve saflaştırmadan sonra elde edilen ürünlere maltoz miktarına göre yoğun ve çok yoğun maltoz şurupları denir.

Nemden çok az etkilenme, düşük viskozite, kolay kristallenmeme, hafif ve hoş bir tat, kararmama ve sıcaklığa karşı dayanıklılık bu şurupların genel özellikleri arasındadır. Bu özelliklerinden dolayı maltoz içeren şuruplar, nem tutucu, kristalleşmeyi önleyici, koruyucu ve şekil verici olarak gıda endüstrisinde kullanılır. Çok yoğun maltoz şurubunun kristalleştirilmesinden elde edilen saf maltoz, serumlarda, düşük kalorili tatlandırıcı olarak endüstride kullanılan sorbitol gibi düşük

kalorili bir tatlandırıcı olan maltitol yapımında hammadde olarak ve antibiyotik ve aşıların üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır.

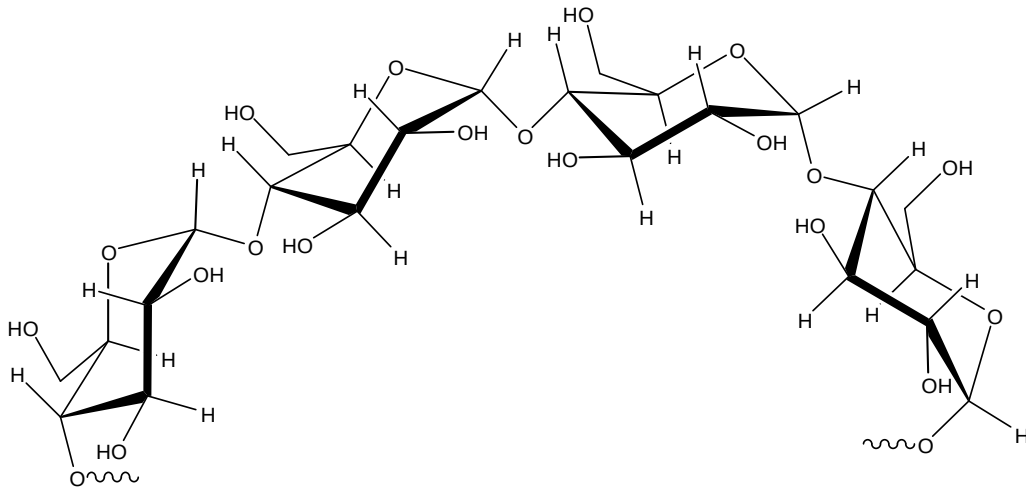
Maltoz, yüksek konsantrasyonlarda kirlilikte dahi kristalleşebilen glikoz gibi kolayca kristalleşmez. Maltoz, %90 saf olmadıkça kristalleşmez, ancak daha yüksek saflıkta kristalleşebilir. Bununla birlikte maltozun kolayca kristalleşmemesi gerçeği, şekerleme endüstrisinde maltozun başlıca kullanılma sebebidir [Norman and Hendriksen, 2002; Rios, 1997]

Yapılan çalışmada Maltogenaz, Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edildi ve elde edilen immobilize enzimin kinetik parametreleri tespit edildi. Bu yöntem, Eupergit C'nin hem kimyasal hem de kullanılabilirlik açısından oldukça kararlı olmasından dolayı endüstriye uygulanabilir özelliğe sahiptir. Eupergit C kullanılan bütün reaktörlere uyum sağladığından, özel tip biyoreaktörlere ihtiyaç duymaması da Eupergit C ile immobilizasyonları cazip kılmaktadır. İmmobilizasyon yönteminin basit olması, immobilize enzimin sıcaklığa ve pH'a karşı kararlılığının artması ve Eupergit C'nin sahip olduğu özellikler yöntemin uygulanabilirliğini arttırmaktadır.

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

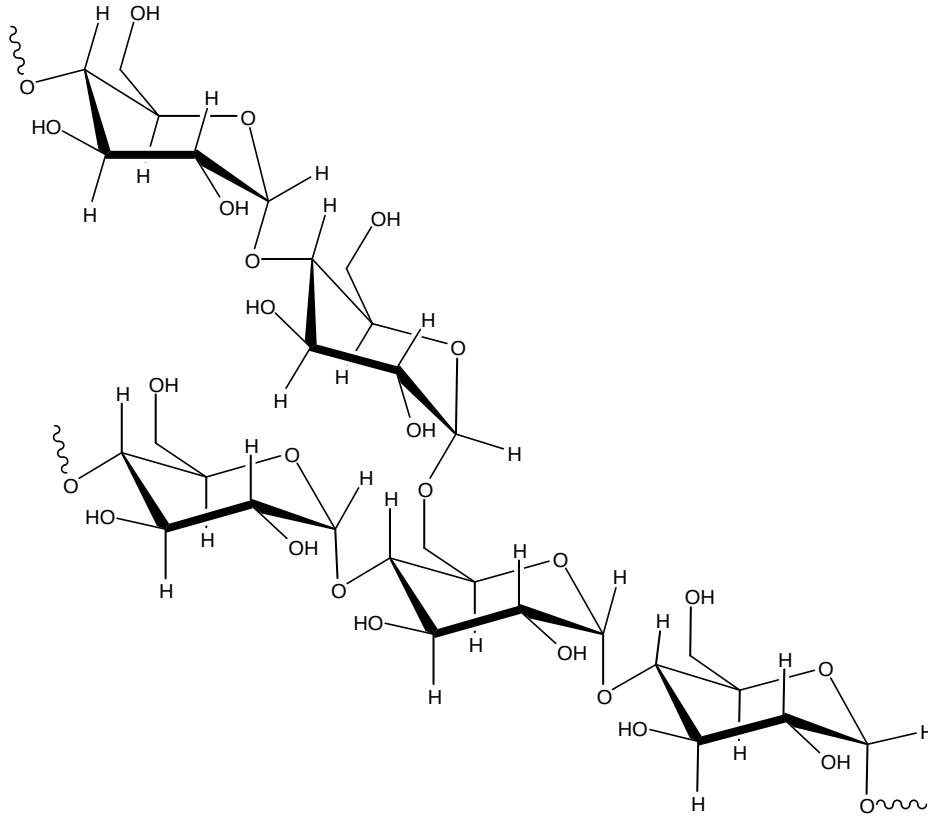
2.1. Nişasta

Nişasta bitkilerde depo edilen en yaygın karbonhidrattır. Bitkiler fotosentezin bir sonucu olarak nişastayı sentezlerler. Bu proses sonucunda güneş ışığı enerjisi kimyasal enerjiye dönüştürülmüş olur. Mısır(maize), buğday, patates ve pirinç nişasta üretiminde yaygın olarak kullanılır. Nişasta iki tip polimerin karışımından oluşur; amiloz (genelde %20-30) ve amilopektin (genelde %70-80) [Ball, 1998; Li and Yeh, 2001; Maarel et al. 20002]. Farklı bitki kaynaklı nişastaların hepsi türden türe boyutlarında ve fiziksel karakterlerinde farklılık gösteren granül yapısındadır. Kimyasal özellikler tür farklılığından daha az etkilenmektedir. Asıl farklılık amilozun amilopektine oranıdır. Waxy mısırdan elde edilen mısır nişastasası neredeyse amiloz içermezken amilomısırdan elde edilen mısır nişastasası % 80 amiloz içerir [Cheetham and Tao, 1997]. Patatesten elde edilen nişasta gibi bazı nişastalar, hidrolizini etkilemeyen ama nişastanın fiziksel özelliklerini etkileyen az miktarda (yaklaşık % 0.2) kovalent bağlı fosfat grupları içerir. Amilopektin (amilozsuz) waxy mısır nişastasından izole edilebilirken, amiloz ise amilopektinin pullanaz ile muamelesiyle izole edilebilir [Vorwerk et al. 2002]. Amiloz başlıca dallanmamış, heliks şeklinde bükülmüş, kaynağına göre değişen 200-2000 D-glikoz biriminin α -1,4 bağlı lineer polisakkarit zincirlerinden oluşmuştur ve heliksin her bir dönüşü altı glikoz birimini içerir.



Şekil 2.1.1. Amilozun Kısmi Yapısı

Amilopektin dallanmış bir polimerdir. Bazı nişastalar yaklaşık %100 amilopektinden oluşmuş olabilir. Yaklaşık 20-24 D-glikoz biriminin α -1,4 bağlı lineer zincirleri α -1,6 glikozidik bağlarıyla birbirlerine bağlanmışlardır.



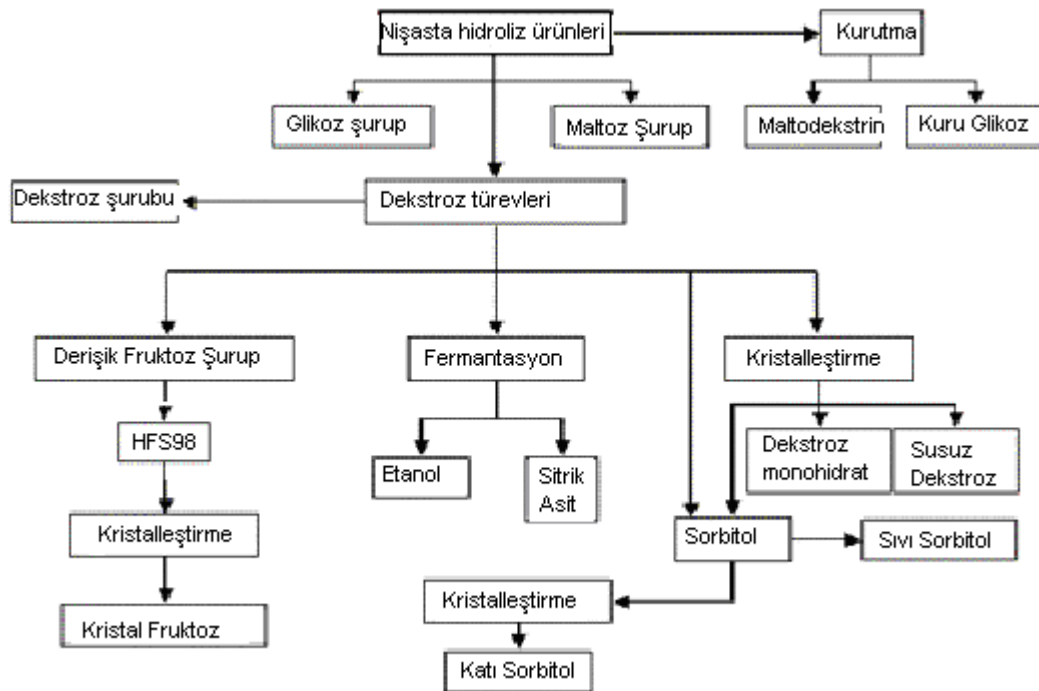
Şekil 2.1.2. A. Amilopektinin Kısmi Yapısı **B.** Amilopektinin Model Yapısı

Nişastanın iki bileşeninden biri olan amilopektinin enzimlerle hidrolizi α -1,6 bağları yüzünden zor olmaktadır. Yapısındaki glikoz birimlerinin yaklaşık % 4-6'sı

α -1,6-glikozidik bağlarıyla bağlanmıştır. Hidroliz enzimlerinin çoğu α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz eder ve α -1,6 bağları amilopektinin glikoza tamamen hidrolizi için mutlaka hidroliz edilmelidir. Son zamanlarda yeni enzimlerin geliştirilmesinde etkili çalışmalar dallanma bölgelerini hidroliz eden enzimler üzerine yapılmaktadır.

Geçmişte nişastanın asit hidrolizi yaygın olarak kullanılmıştır. Asit hidrolizinin korozyona dayanıklı malzemelere ihtiyaç duyması, renk değişimine neden olması, nötralizasyondan sonra tuz ihtiva etmesi, yüksek sıcaklık ve daha fazla enerjiye ihtiyaç duymasından dolayı, bugün endüstriyel olarak nişasta hidrolizi tamamen enzimatik prosesler kullanılarak yapılmaktadır [Legin, 1998].

Nişasta hidroliz ürünleri gıda, tekstil, yapıştırıcı, kozmetik, deterjan ve kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılır ve her geçen gün yeni kullanım alanları bulunmaktadır [Davis, 2003]. Şekil 2.1.3.'de gıda endüstrisinde yaygın olarak nişastadan üretilen nişasta hidroliz ürünleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1.3. Nişasta Hidroliz Ürünleri

Nişasta ve türevleri ayrıca mannitol gibi şeker alkollerinin siklodekstrin gibi değerli karbonhidratların ve biyoparçalanabilen plastiklerin üretiminde de yaygın

olarak kullanılır. Farklı kaynaklardan elde edilen yıllık nişastanın üretim miktarları Tablo 2.1.1’de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi üretilen nişasta miktarı zamanla artış göstermiştir.

Tablo 2.1.1. Yıllık dünyada üretilen ticari nişasta miktarı (milyon ton)

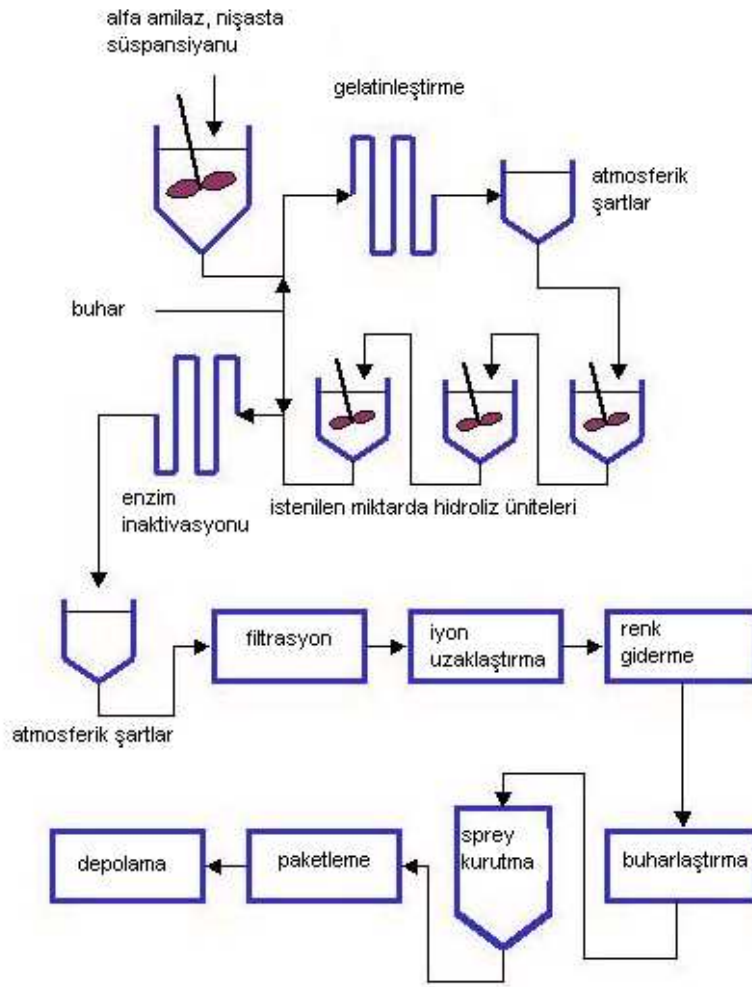
Kaynak	1980	1990	1993	1995/1996
Mısır	11.6	20	26.3	35.2
Patates	1.4	2.4	2.5	2.1
Tapioca & diğerleri	1.5	1.7	3.2	3.8
Buğday	0.6	1.5	1.7	2.8
Toplam	15.1	25.6	33.7	43.9

2.1.1. Maltodekstrinler

1950’lerin başlarında, maltoz, maltotrioz, maltotetraoz, maltopentaoz vs. karbohidratları içeren sakkarit karışımlara maltodekstrin adı verildi (Whelan and Roberts, 1952). Kısmen hidroliz olmuş nişasta ürünleri olan maltodekstrinler ilk olarak American Maize Product şirketi tarafından 1959’da Frodex 15 ticari adı altında piyasaya sürülmüştür.

Nişastanın asit veya enzim kullanılarak parçalanmasıyla oluşurlar. Küçük molekül, tatsız, suda çözünebilen ve kolay adsorblanabilen karbohidratlardır. Nişasta hidroliz ürünleri, kuru ağırlıktaki dekstroz olarak hesaplanmış indirgen şekerin % si olan dekstroz ekivalent (DE) olarak adlandırılan, kendi hidroliz dereceleriyle karakterize edilirler.

Maltodekstrinler ilk çıktığından beri geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Maltodekstrinler taşıyıcı sistem, şekil verici, yağların yerine, film oluşturucu, bayatlamayı önleyici, sprey kurutmaya yardımcı olarak, donmadan koruyucu, kristalleşmeyi önleyici ve besleyici özelliğinden dolayı besin maddelerinde sıkça kullanılır. Değişik molekül ağırlığında çok sayıda maltodekstrin karışımları ticari olarak üretilmektedir.

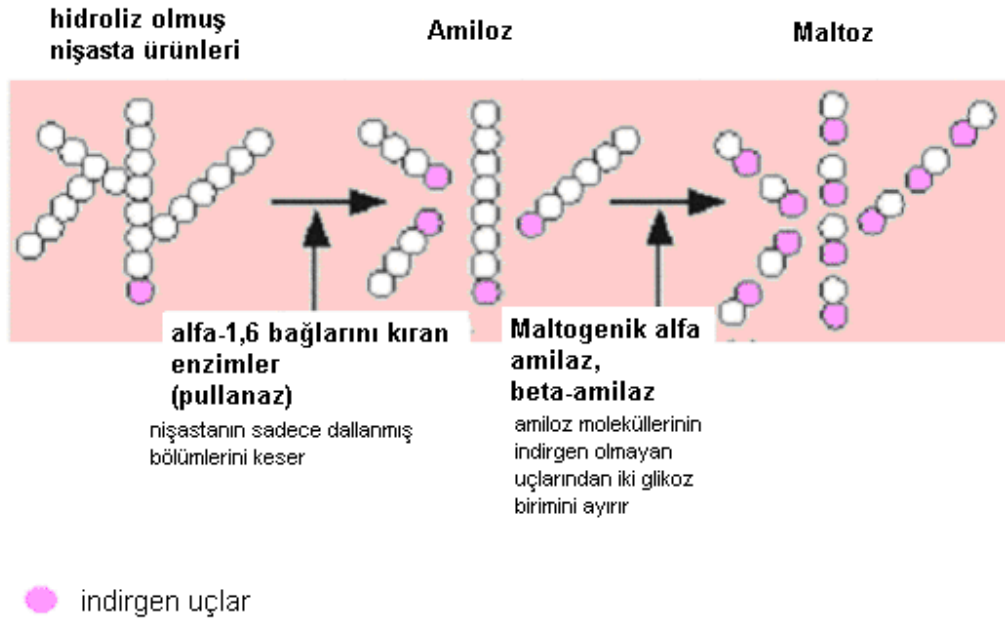


Şekil 2.1.4. Nişasta süspansiyonundan maltodekstrin üretim akım şeması

2.1.2. Maltoz

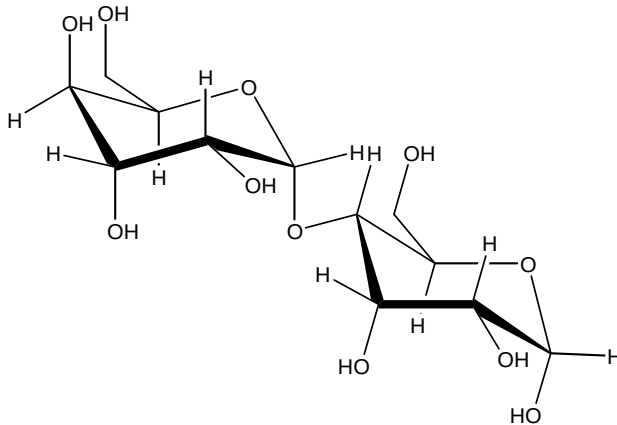
Maltoz (4-O- α -D-glikopiranosil-D-glikoz), kalorisiz bir tatlandırıcı olan maltitol üretiminde, “dihteheria-pertussis-tetanus” aşısı üretiminde özel karbon kaynağı olarak ve serumlarda kullanılır. Maltoz kullanılan serumlar, glikoz serumlara göre iki kat daha fazla enerji içerir, lipidler ve proteinlerle olumlu etkileşimler yapar ve kan şekeri seviyesini değiştirmede için şeker hastalığı tedavisinde kullanılır. İçerikleri özdeş olmasına rağmen: yoğun maltoz şurubu (% 35-60) (Bohnenkamp&Reilly 1980), çok yoğun maltoz şurubu (%70-95) (Martensson 1974) ve saf maltozun kullanım yerleri birbirlerinden tamamen farklıdır [Nehete et al.1992].

Niştastadan maltoz üretimi α -amilaz, β -amilaz ve maltogenik amilaz enzimleri kullanılarak ayrı ayrı yöntemlerde yapılmıştır. Bazı yöntemlerde α -1,6 glikozidik bağlarını hidroliz eden enzim pullanaz (promozyme) daha saf maltoz şurupları elde etmek için kullanılmıştır [Artin and Lee, 2002; Noda et al.2001; Kelly et al. 1999]. Şekil 2.1.5’de niştasta hidroliz ürünleri kullanılarak maltoz eldesi gösterilmiştir.

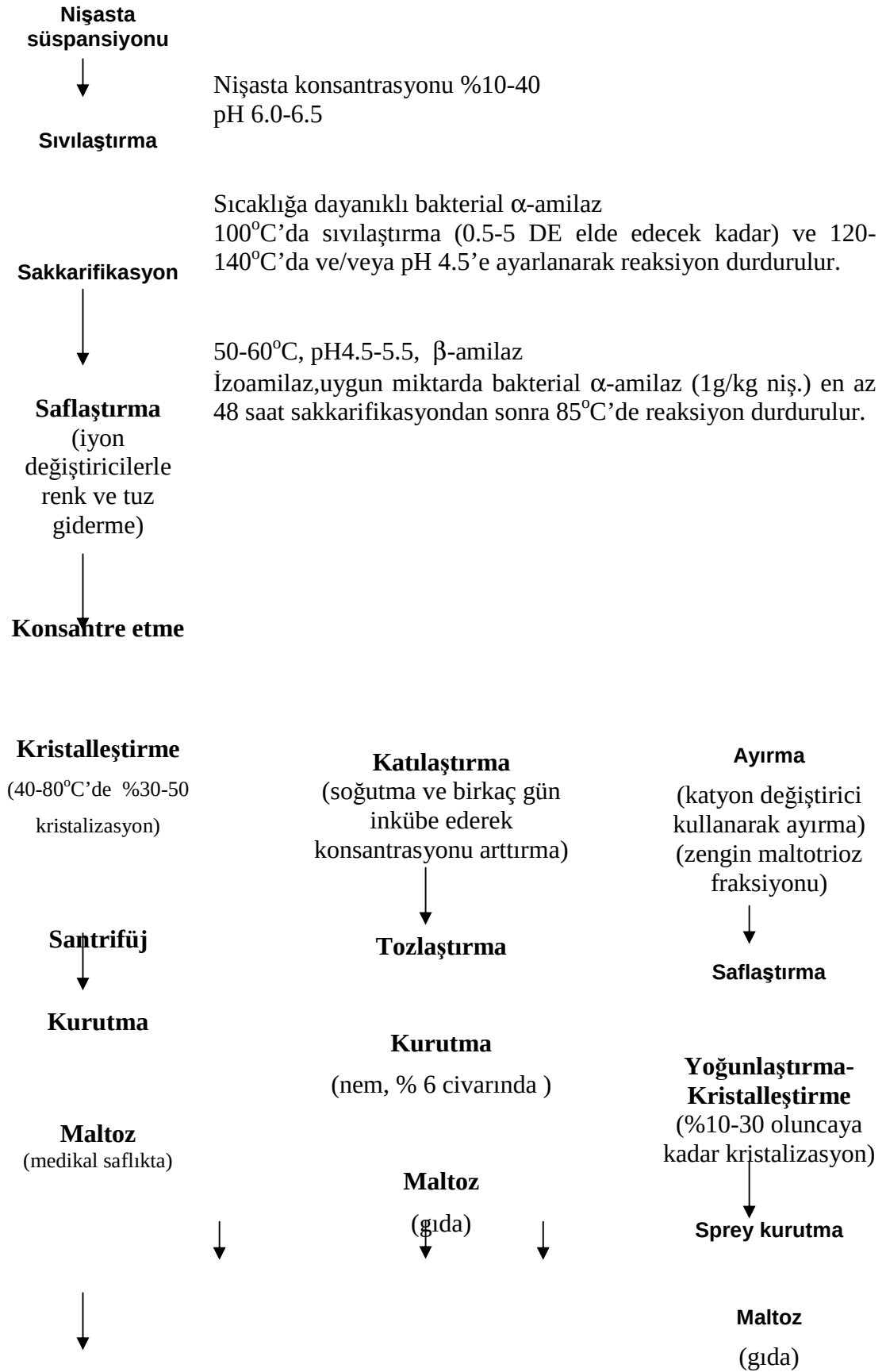


Şekil 2.1.5. Niştasta hidroliz ürünlerinden maltoz eldesi

Molekül yapısı Şekil 2.1.6’da gösterilen maltozun basitleştirilmiş üretim prosesi Şekil 2.1.7’de gösterilmiştir [Pergamon Press, 1988].



Şekil 2.1.6. Maltozun molekül yapısı



Şekil 2.1.7. Nişastadan Maltoz üretimi akım şeması

2.2. Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Maltogenaz ile Yapılan Çalışmalar

N. Zakhia et al. ultrafiltre reaktörde promozye ve maltogenaz kullanarak cassava nişastadan maltoz şurubu üretimini kullanıldığını çalışmışlardır. Çalışmada 10, 50 ve 150 kDa molekül ağırlığına bağlı geçirgenliğe sahip Carbosep membranlar kullanılmış ve 50 kDa MWCO membran maltoz içeriği ve membrandan geçiş değişimleri bakımından en uygun sonuçları vermiştir. Promozye enzimi nişastanın dallanma bölgelerini kırmak, maltogenaz ise son ürün maltozu elde etmek için kullanılmıştır.

İlk olarak 60 °C'deki (reaksiyon boyunca ısıtıcı ile reaktör içi sıcaklık sabit tutulmuştur) nişasta çözeltisi reaktöre konulmuş sonrasında enzim ilave edilmiştir. Tankı membrana bağlayan pompa çalıştırılarak istenilen akış hızında ve uygun basınçla substrat çözeltisi ultrafiltre edilmiştir. Zamanla oluşan hacim azalması reaktöre taze çözelti eklenmesiyle düzenlenmiştir.

Membran, 3 Carbosep M4 tüp membran içermektedir (molekül ağırlığı geçirme büyüklüğü:50 kDa; iç çap 6 mm; uzunluk 1,2 m; ve toplam membran alanı 0,07 m²). Membran, geçirgen karbon yüzeyde ZrO₂ içermektedir.

Farklı membranlarda yapılan sakkarifikasyon işlemlerinde en yüksek maltoz oranı 10 kDa MWCO membran ile %67 olarak elde edilmesine rağmen uzun zaman almasından (14,5saat) dolayı 50 kDa MWCO (4,9 saat, %55) tercih edilmiştir. Daha sonra bu sistemde enzim miktarı artırılıp maksimum verime ulaşılmıştır (%66 Maltoz ve %8 Glikoz, 4,5 saat) [Gaouar et al. 1998].

Cassava nişastanın maltoza enzimatik dönüşümü için membran reaktörün kullanımıyla ilgili diğer bir çalışma G. M. Rios et al. tarafından yapılmıştır. Çalışmada Maltogenaz ve Promozyme (Novo Nordisk) enzimleri kullanılmıştır. Sıvılaştırılmış nişastanın (%30 w/w) Maltogenaz ve Promozyme ile yapılan batch hidrolizi nişastanın %72'sinin maltoza dönüşümüyle sonuçlanmış bununla birlikte dallanma bölgelerindeki α -1,6 bağlarını kıran enzimin kullanılmaması halinde ise maltoz veriminin %11 daha az olduğu bulunmuştur. Ultrafiltre reaktörde kalış zamanı ideal devamlı karıştırmalı tank reaktördekiyle eşit olarak ayarlanmıştır.

Carbosep M4 membran (MWCO:50 kDa) ile Maltogenazın geçişini engellemesi %100 başarılammış olup, 5 saat filtrasyon sonucunda toplam enzim aktivite kaybı %28 olarak bulunmuş bununla birlikte bu kaybın yarısı reaktör içindeki enzim denaturasyonundan ileri geldiği gözlenmiştir. %30 nişasta konsantrasyonunda, ultrafiltre reaktörde yapılmış sakkarifikasyon reaksiyonları esnasında önemli membran bozuklukları ortaya çıktığı gözlenmiştir. 100 ve 200 kPa'da sabit membran basınçlarıyla, membrandan substrat geçiş hızları sırasıyla 14 ve 23 $\text{dm}^3\text{h}^{-1}\text{m}^{-2}$ olarak tespit edilmiştir. Reaktörde kalma süresi 4,2 saat olarak tespit edildiğinde ve akış hızı sabit tutulduğunda nişastanın maltoza dönüşüm oranı %55-56 civarında olduğu bulunmuştur.

M4 membranlarla maltogenazın reaktörde tutulması iki basamakta yapılmıştır: ilk basamakta membran boyunca asetat tamponuyla maltogenaz çözeltisi diafiltre edilmiş ve daha sonra aynı türden çözelti süzüntüyle ve membran içinde kalan substrat çözeltisiyle ultrafiltre reaktörde sirküle edilmiştir. Reaktör içindeki enzim aktivitesi sistemli olarak ölçülmüştür.

65°C'da maltogenaz ile maltoz üretiminde enzimin aktivitesinin 5 saat boyunca azalmadığı bunun yanında promozyme için 37°C'da dahi enzimin aktivitesini ilk 5 saat içinde %26 civarında azaldığı 60°C'da ise yaklaşık %91 veriminin azaldığı

gözlenmiştir. Bu farklılıklar her iki enzimle uzun süre çalışılamayacağını göstermiştir [Rios et al. 1997].

O. Gaouar et al. sürekli membran reaktörde maltoz şurubu üretimi için ticari Maltogenaz enzimi kullanımıyla enzimin bazı kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Deneylerde suda çözünür nişasta substrat olarak kullanılmıştır. pH 5.0 ve 60°C’de Michaelis-Menten kinetik sabiti ve maksimum hız sırasıyla 2,47 mmol maltoz/dak.l ve 9,64 g nişasta/l elde edilmiştir. Maltoz varlığında ve yüksek nişasta konsantrasyonlarında ilk hidroliz hızının azaldığı gözlenmiştir. Maltogenaz ile sıvılaştırılmış nişastanın hidrolizi esnasında farklı başlangıç konsantrasyonlarında ve farklı enzim miktarlarıyla yapılan hidrolizler esnasında reaksiyon karışımında oluşan maltozun konsantrasyonunun değişimleri incelenmiş ve değişen başlangıç substrat konsantrasyonu ile oluşan ürünlerdeki glikozun maltoza oranının deneysel hatalarda dikkate alınarak değişmediği bulunmuştur [Gaouar et al, 1997]

E. Nebesyn’in yaptığı çalışmada; bakterial α -amilaz ile nişasta 0,7 saat reaksiyona tabi tutulmuş hidroliz sonunda, nişasta %41 oranında sıvılaştırılmış ve çözelti 10 dakika kaynatılarak enzim inaktif yapılmıştır. Sıvılaştırılmış nişasta daha sonra maltogenaz enzimiyle çeşitli sürelerde muamele edilerek oluşan maltoz ve glikoz ile diğer maltodekstrin miktarları tespit edilmiştir. Farklı maltogenaz miktarları ile yapılan sakkarifikasyonda elde edilen maksimum maltoz miktarı %69,5 olarak bulunmuş; bununla birlikte maltogenaz ile pullanaz beraber kullanıldığında maltoz verimi %80’e kadar çıkarılmıştır [Nebesyn, 1990].

M.R. Sarmidi et al. sürekli dönen halka biçimli kromatografik(Continuous rotating annular chromatography-CRAC) yöntemle nişastanın maltoza sakkarifikasyonu konulu çalışmalarında; maltogenaz enzimi ile hem sıvılaştırılmış nişastanın maltoza sakkarifikasyonunu hem de ürünün ortamdan ayrılmasını eş zamanlı yaparak, %15,5 w/v substrat ve 400 cm³/h akış hızında yükleme yaparak patates nişastasından %79 maltoz ihtiva eden karışım elde etmişlerdir [Sarmidi and Barker, 1993].

Maltogenaz, Amberlite XAD761 kullanılarak immobilize edilmiştir. Nişasta (%31), termamyl ve pulluzyme kullanılarak aşağıda bileşeni verilen karışım elde edilmiştir.

DP1: %1,4 DP2: %82,4

DP3: %13,2 DP4 ve daha büyük maltodekstrinler: %2,6

Elde edilen hidroliz ürünü, Maltogenaz enziminin immobilize edildiği amberlite kolonlardan geçirilerek maltoz miktarı zenginleştirilmiştir.

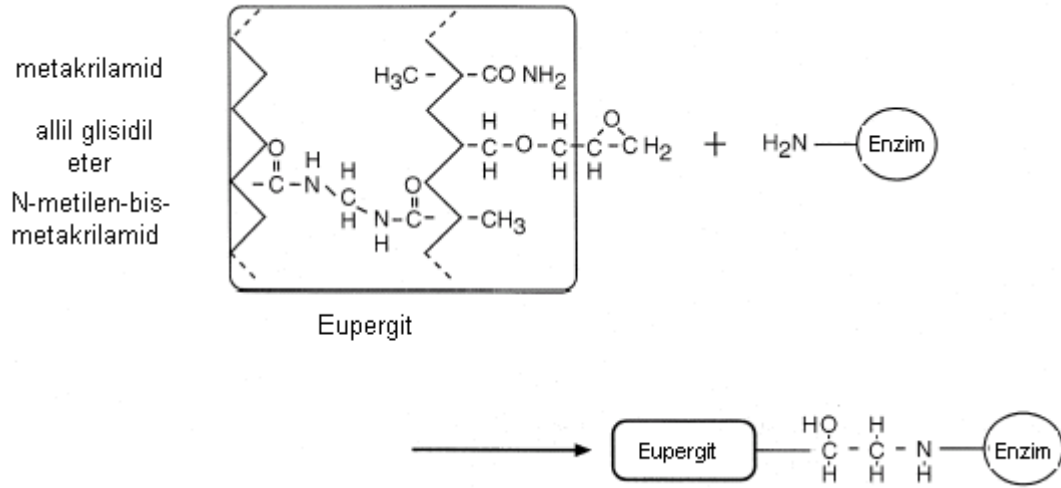
DP1: %6,2 DP2: %90,5

DP3: %0,8 DP4 ve daha büyük maltodekstrinler: %2,4

Kromatografik yöntemler kullanılarak maltoz miktarı daha da arttırılmıştır (%95,5 maltoz) ve kristalizasyon işlemleri yapılarak; kristal maltoz elde edilmiştir (%97,5 maltoz). Bu çalışmada ayrıca maltoz indirgenerek maltitol üretiminde kullanılmıştır [Duflot et al.2001]

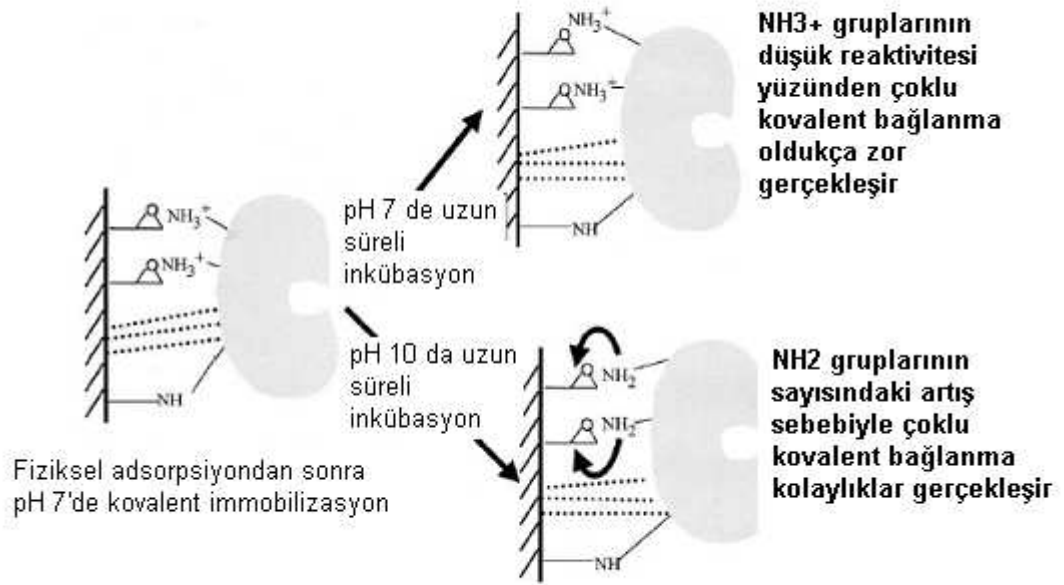
2.2.2 Epoxy Gruplar İçeren Matrikslerle Yapılan Çalışmalar

Eupergit C'nin epoxy grupları, yapısında amino, hidroksil ve merkaptto grupları taşıyan ligandları kovalent olarak bağlar. Kovalent bağlanma olurken matrikste veya ligandda yük değişimi olmaz [Katzir and Kraemer, 2000].



Şekil 2.2.1. Eupergit C'nin yapısı ve bir enzimin kovalent bağlanması

Epoxy grupları taşıyan matriksler (Eupergit C) enzimlerin birden fazla kovalent bağ yaparak immobilizasyonu için çok uygundur. Böylece üç boyutlu yapıları daha kararlı hale getirilebilir. Bunun için deneysel şartlar oldukça önemlidir. Enzimi matrikse çoklu bağlarla kovalent olarak bağlamak için pH 7.0'de immobilize edilen enzimin immobilizasyonuna pH 10'da devam edilir.



Şekil 2.2.2. Çoklu kovalent bağlanmanın oluşması

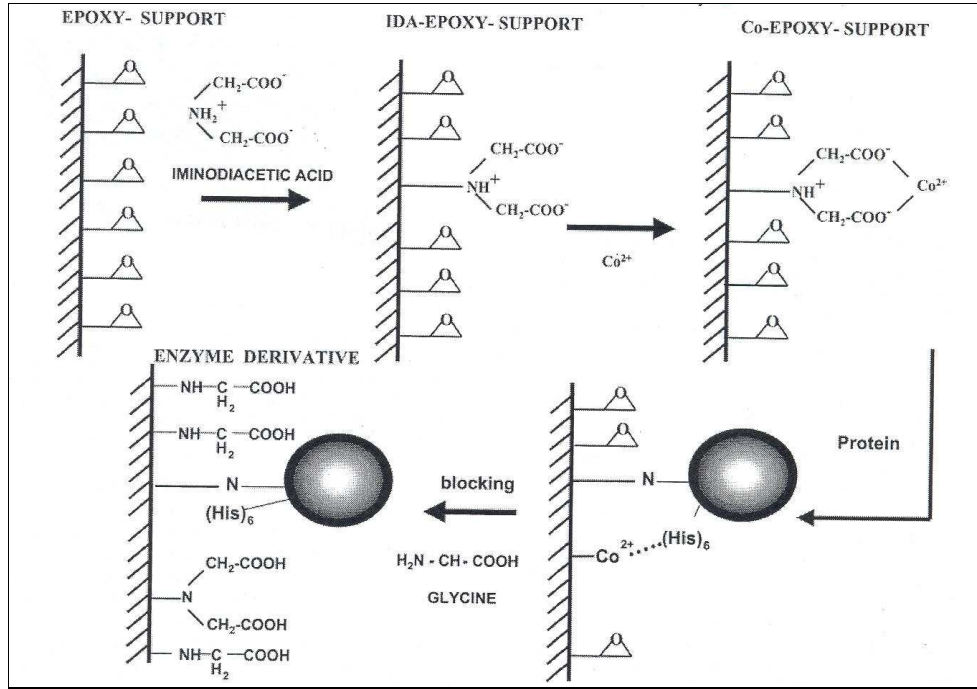
Çoklu bağlanma yapılan ve yapılmayan Eupergit C ile immobilize edilmiş penisilin açılaz pH 8 ve 50°C'de 5 saat tutulup aktiviteler ölçüldüğünde matrikse çoklu bağlanma yapılan enzimin aktivitesinin %50'sini koruduğu gözlenirken yapılmayan penisilin açılazın aktivitesinin neredeyse tamamını kaybettiği gözlenmiştir [Guisan et al, 2000].

Epoxy matrikslerin hidrofilik karakterde olması immobilizasyon verimini arttırmaktadır. Penisilin açılaz, hidrofilik olan Sepabead'e hidrofobik olan Eupergit C'de göre daha fazla bağlanmıştır [Guisan et al. 2002].

Guisan et al. protein saflaştırmada immobilize metal-şelat affinite kromatografisinin yüksek performansı ile enzim immobilizasyonu için epoxy gruplarının mükemmelliğini birleştiren tek basamakta proteinleri saflaştırmak ve immobilize etmek için yeni bir metod geliştirmişlerdir.

Enzimi (β -galaktosidaz) epoxy gruplarına yakınlaştırmak için enzim üzerine rekombinant DNA teknolojisiyle polyhistidin, matriks üzerine ise histidine affinitesi olan Co grupları ilave edilmiştir.

Şekil 2.2.3.'de enzimin immobilizasyon verimini arttırmak için Eupergit C'nin modifikasyonu gösterilmiştir.



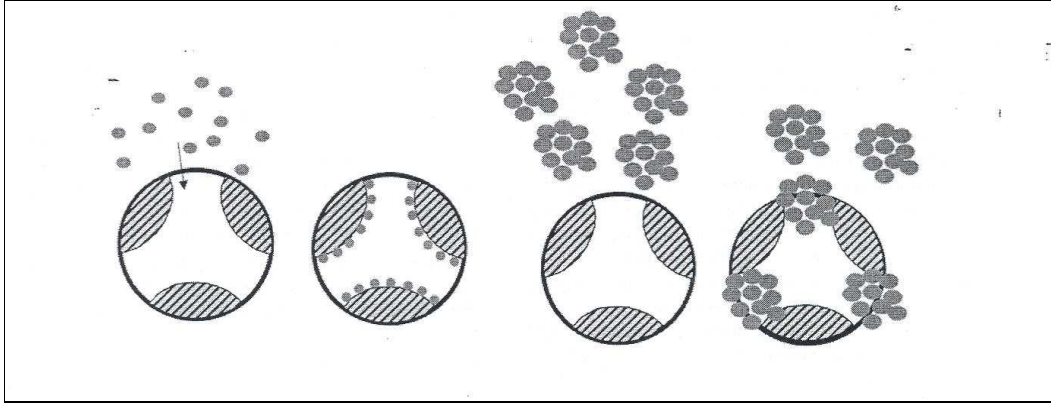
Şekil 2.2.3. Epoxy matrislere IDA bağlanması

Epoxy matriksler, matrikse IDA bağlamak için iminodiasetik asit varlığında bekletilmiştir. Epoxy-IDA matriksler metal şelat-epoxy matriksleri elde etmek için kobalt tuzlarıyla inkübe edilmiş ve bu matriksler poli-his eklenmiş proteinleri immobilize etmek için kullanılmışlardır. Kalan epoxy gruplar ise glisin ile muamele edilerek bloke edilmiştir.

Eupergit C Şekil 2.2.4'de gösterildiği gibi gözenekli bir yapıdadır. Bir araya toplanan yüksek molekül ağırlığına sahip enzim molekülleri bu gözenekleri tıkararak enzim moleküllerinin iç kısımlara bağlanmasına engel olabilmektedir [Guisan et al. 2003]

Maksimum enzim immobilizasyonu
Çok aktif biyokatalizör

Gözenekler tıkanmış
İmmobilizasyon kapasitesi azalmış
Aktivitesi düşük biyokatalizör



Şekil 2.2.4. Protein monomerlerinin ve bir araya toplanmış büyük protein topluluklarının Eupergit C gözeneklerinde immobilizasyonu

Epoxy içeren çok fonksiyonlu matriksler enzimlerin nötral pH, düşük iyonik etki ve düşük sıcaklıkta immobilizasyonu için epoxy matrikslerin aktive edilmesiyle J.M. Guisan et al. tarafından elde edilmiştir.

Genelde bu multifonksiyonel gruplar iki tip fonksiyonel grup içermelidir: (i) gruplar proteinlerin fiziksel adsorpsiyonunu arttırmalıdır (iyon değiştirici, metal-şelat adsorpsiyonu), (ii) gruplar enzimi kovalent immobilize edebilmelidirler (epoxy grup).

Eupergit C değişik gruplarla modifiye edilerek enzim immobilizasyonu için daha uygun hale getirilebilmektedir. Etilendiaminle modifiye edilen Eupergit C ile *A. Oryzae* β -galaktosidaz immobilize edildiğinde % 95 lik bir verim elde edildiği halde ticari Eupergit C kullanıldığında aktivite verimi gözlenmemiştir.

Bu çalışmada etilendiamin, iminodiasetik asit (IDA), bakır-IDA ve aminofenil boronik asit ile epoxy matriksler modifiye edilmiştir. Bu yöntemde ilk olarak enzim adsorbe edilir sonrasında ise proteinin reaktif nükleofilik gruplarıyla (amino, tiyol, hidroksil) matriks yüzeyinde yoğun epoxy grupları arasında kovalent bağlar

oluşabilir. Molekül içi kovalent immobilizasyon aynı şartlarda moleküller arası kovalent immobilizasyondan çok daha hızlı olabilir [Guisan et al. 2000]

Eupergit C immobilizasyon verimini artırmanın bir başka yolu ise immobilizasyonu organik çözelti ortamında gerçekleştirmektir. P. Grunwald et al. üreazı susuz ve sulu ortamlarda epoxy grupları içeren polimer (aynı zamanda OH grupları da içermektedir) taşıyıcıda immobilize etmişlerdir. Tampon çözelti olarak su ve PO₄ çözeltileri kullanıldığında hemen hemen hiç immobilizasyon olmadığı gözlenmiş, toluen, aseton, dioksan, DMF, N-metilformamid çözücü sistem olarak kullanıldığında immobilizasyon veriminin arttığı bulunmuştur [Grunwald et al. 1993].

Eupergit C immobilizasyon verimi, immobilizasyonu enzimin optimum pH'ının dışında bir pH'da veya konsantrasyon ortamında gerçekleştirilmesiyle de arttırılabilmektedir. M.T. Martin et al. CGTase enzimini Eupergit C ile kovalent olarak immobilize etmiştir. Yapılan çalışmada farklı immobilizasyon parametreleri (immobilizasyon süresi, iyonik etki, pH, enzim/matriks oranı) optimize edilmiştir.

İmmobilizasyon PO₄³⁻ tampon çözeltisinde inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim matriks oranı optimize edildikten sonra sırasıyla tampon çözeltisinin konsantrasyonu, immobilizasyon süresi ve immobilizasyon tampon çözeltisinin pH değerleri optimize edilmiştir. Yapılan çalışmada 0.2 M tampon çözelti kullanıldığında bağlanan protein %68 iken 1 M tampon çözelti kullanıldığında bağlanan protein miktarı %74 'e çıkmıştır. 1.2 M tuz kullanıldığında ise %69 protein bağlandığı gözlenmiştir.

Maksimum immobilizasyon verimi %80 olmasına rağmen, immobilize enzimin katalitik etkisi % 15'den daha düşüktür. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığı değişmezken, optimum pH daha yüksek pH'lara kaymıştır [Martin et al. 2000].

İmmobilizasyonda Eupergit C ve Eupergit C 250L kullanıldığında farklı verimler elde edilmektedir. D.H.G. Crout et al. β-galaktosidazı Eupergit C ve Eupergit C 250L ile kovalent immobilize etmiştir. Yapılan çalışmada (pH 7,5, 1 M, 10 ml PO₄ tampon çöz.) 200 mg Eupergit C ile enzimin tamamı bağlanırken gözlenen katalitik etki %67,3 olarak bulunmuştur. Aynı şartlarda Eupergit C 250L ile yapılan immobilizasyonda 200 mg matriks üzerinde enzimin %90'ı immobilize

olmuş ve %53,4 katalitik aktivite göstermiştir. 300 mg Eupergit C 250L ile enzimin tümü immobilize edilmiş ve katalitik aktivite %90 olarak tespit edilmiştir. Serbest enzime göre immobilize sıcaklığına karşı daha yüksek bir kararlılık göstermiştir [Hernaiz and Crout, 2000].

Farklı proteinlerin epoxy gruplar içeren immobilizasyonunda eklenen tuzların immobilizasyon verimine etkisini J. Turkova et al. gözlemlemiştir. Kovalent bağlı aktif enzimin verimi eklenen tuzların tipine ve konsantrasyonuna bağlı olduğu tespit edilmiştir. Kovalent bağlanma için gerekli protein-matriks arasındaki hidrofobik etkileşime tuz iyonları sebep olmuştur. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonundaki değişikliğe karşı aminoasılazın immobilizasyon veriminin tuzsuz ortamda yapılan immobilizasyon aktivitesine oranı grafiğe geçirilmiş; eklenen tuz konsantrasyonu 1.75 M olduğunda maksimum immobilizasyon verimi elde edilmiştir. 2 M tuz eklendiğinde ise immobilizasyon aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Aynı çalışmada Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve NaCl 'de kullanılmıştır. NaCl 'nin immobilizasyon verimine etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Aminoasılazın immobilizasyonu için optimum tuz konsantrasyonu reaksiyon karışımındaki protein konsantrasyonuna bağlı olduğu gözlenmiştir. Artan protein miktarına karşı tuz miktarının da arttığı gözlenmiştir.

Farklı proteinleri immobilize ederken, farklı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonlarında çalışılmış; her proteinin farklı konsantrasyonlarda tuz miktarında maksimum immobilize olduğu gözlenmiştir [Turkova et al. 1998].

Schmith et al. yapısında $-\text{NH}_2$ grubu bulunduran alkilglutasyonları epoxy grupları içeren matrikslerde immobilize ederken farklı tuz tipleri ve konsantrasyonlarının immobilizasyona etkisini incelemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanarak değişik proteinlerin immobilizasyon verimi artırılmıştır [Wheatley and Schmidt, 1999; Schmidt et al 1998].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Maddeler

Tablo 3.1.1 Deneyde kullanılan sarf maddeler

ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATOLOG NO
Maltogenaz 4000L	Nova Nordisk	
Eupergit C	Röhm&Haas	
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka	09978
KH ₂ PO ₄	Fluka	60218
NaOH	Fluka	71692
HCl	Merck	100.317.2500
NaCl	Carlo Erba	368257
Maltodekstrin	Avebe(Holland)	
Maltoz	Sigma	M-2250
Kalsiyum Acetat	Sigma	C-1000
Sodyum Azide	Merck	1.06688.0250
Asetik asit	Merck	1.00056
Thymol	Sigma	T-0501
α-naftol	Sigma	N-1000
H ₂ SO ₄	Sigma	732.2500
C ₂ H ₅ OH	Merck	1.00030
Acetonitril	Merck	13.2500
K5 TLC plak	Whatman	4850-820

3.1.2. Kullanılan Aletler

Tablo 3.1.2. Deneyde kullanılan demirbaş aletler

ALETİN ADI	MODEL
Densitometre	Biorad GS 670

pH metre	Inolab pH Level 1
Çalkalayıcı	Heidolp-Promax 2020
Karıştırıcı	Hediolp MR 3003

3.1.3. Enzim

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

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

Maltogenaz, maltooligosakkaritlerde, kısmen hidroliz edilmiş nişasta ve nişastadaki $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidik bağları hidroliz ederek indirgen olmayan zincir uçlarından maltoz birimlerini ayırır. Açığa çıkan maltoz birimleri alfa konfigürasyonundadır. Enzim yüksek maltoz ihtiva eden maltoz şurubunun üretiminde, amilopektinin $\alpha(1\rightarrow6)$ bağlarını hidrolize eden bir enzimle birlikte kullanılabilirdiği gibi tek olarak kullanılabilir. Endüstriyel kullanımlar için tavsiye edilen operasyon şartları 60 °C ve pH 5,0-5,5'dir.

Enzimler depolama sıcaklığına bağlı olarak zamanla aktivitelerini kaybederler. Maltogenaz 4000 L, 5 °C'de saklandığında 6 ay, 25 °C'de ise 3 ay aktivitesini korur [NovoNordisk, 1999] .

3.2. Yöntem

3.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi ile Maltoz Analizi

Yapılan çalışmada; Whatman K5 cam plakları kullanıldı. Yürütme çözeltisi olarak asetonitril/su (85/15, v/v) kullanıldı. TLC tabakası üzerinde karbonhidratları görünür hale getirmek için asetonitril su çözeltisinde yürütülen TLC tabakası, % 0.5 α -naftol ve %5 sülfürik asit içeren etanol çözeltisine daldırılıp, 110 °C’da hotplate üzerinde 5 dakika ısıtıldı. Görünür hale gelen karbonhidratların miktarları densitometre ile karbonhidrat standartları kullanılarak tespit edildi.

3.2.2. Maltogenazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

0.3 gr Eupergit C üzerine ilk olarak 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 10 ml kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ve daha sonra 50 μl Maltogenaz 4000L enzimi ilave edilerek 150 rpm’de bir çalkalayıcıda oda sıcaklığında 40 saat tutuldu. Süzüntüde bulunan ve Eupergite kovalent olarak bağlanmamış enzimin ayrılması için, eupergit C sinterlenmiş cam filtre kullanılarak süzüldü ve 1 M NaCl ihtiva eden Ca-asetat tampon çözeltiyle (25 mM, pH 5.0) yıkandı (3 x 20 ml).

3.2.3. Enzim Aktivite Tayini

25 ml kalsiyum asetat tampon çözeltide (pH 5.0, 25 mM) hazırlanmış %5 lik maltodekstrin çözeltisine (60 °C) serbest enzim ilave edilerek 500 rpm’de magnetik karıştırıcıda 5 dakika maltodekstrin hidroliz edildi. Oluşan maltoz miktarı TLC metodu ile tayin edilerek serbest enzimin aktivitesi tespit edildi.

İmmobilize maltogenaz, serbest enzim ile aynı şartlarda % 5’lik MD çözeltisiyle muamele edilerek maltoz miktarı tayin edildi ve serbest enzime göre immobilize maltogenazın relatif aktivitesi bulundu.

3.2.4 Optimum pH ve Sıcaklığın Tayini

30 ml farklı pH'larda (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, kalsiyum asetat ve pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 KH_2PO_4) tampon çözeltilerinde (25 mM) hazırlanmış %5 lik maltodekstrin çözeltilisine (60 °C) serbest enzim ilave edilerek 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda 20 dakika maltodekstrin hidroliz edildi. Oluşan maltoz miktarı TLC metodu ile tayin edilerek serbest enzimin optimum pH'ı tespit edildi.

İmmobilize maltogenaz, serbest enzim ile aynı şartlarda farklı pH'lardaki % 5'lik MD çözeltilisiyle muamele edilerek maltoz miktarı tayin edildi ve immobilize maltogenazın optimum pH'ı bulundu.

30 ml farklı sıcaklıklarda (45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ve 95 °C) kalsiyum asetat tampon çözeltilisinde (pH 5.0 ve 25 mM) hazırlanmış %5'lik MD çözeltilisine serbest enzim ilave edilerek 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda 20 dakika muamele edilerek serbest enzimin optimum sıcaklığı bulundu.

İmmobilize maltogenaz, serbest enzim ile aynı şartlarda farklı sıcaklıklardaki % 5'lik MD çözeltilisiyle muamele edilerek maltoz miktarı tayin edildi ve immobilize maltogenazın optimum sıcaklığı tespit edildi.

3.2.5. K_m , V_{max} Tayini

Farklı konsantrasyonlarda (% 2,5, 5.0, 10, 15, 20, 25) kalsiyum asetat tamponunda hazırlanmış MD çözeltileri serbest ve immobilize enzim ile enzim aktivite tayin metodu ile aynı şartlarda muamele edilerek 1. dakika sonunda reaksiyon ortamında oluşan maltoz miktarları tayin edildi.

Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve reaksiyonun maksimum hızı (V_{max}) Hanes-Woolf grafiği çizilerek hesaplandı.

3.2.6. Maltodekstrinden Maltoz Üretimi

İmmobilize Maltogenaz 4000L, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltilisinde (25 mM, pH 5.0) hazırlanmış olan % 5'lik 25 ml maltodekstrin ile 60 °C'da muamele edildi.

Reaksiyon ortamından belirli zaman aralıklarıyla alınan örneklerdeki maltoz miktarı, TLC metoduyla tespit edildi.

Tablo 3.2.1 İmmobilize enzim ile elde edilen maltoz miktarı

Numune alış zamanı	5. dak	20. dak	1. saat	2. saat	3. saat
Maltoz miktarı					
(% kuru ağırlık)	41.9	57	70.8	71.9	72.4

Tablo 3.2.2. İmmobilize enzim ile elde edilen son ürünün kompozisyonu

Son Ürün	Glikoz	Maltoz	Oligosakkaritler
%	14.6	72.4	13
(kuru ağırlık)			

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

Eupergit enzim immobilizasyonu için bir matriks olarak uygun karakteristik özelliklere sahip akrilik bir polimerdir. Eupergit'in farklı iki formu (Eupergit C , Eupergit C 250L) ticari olarak sağlanabilir. Bu çalışmada Eupergit C kullanılmıştır. Farklı miktarlarda alınan Eupergit C'de yapılan immobilizasyonda Eupergit C'nin miktarının immobilizasyon verimini etkisi olmadığı gözlenmiştir.

4.1.1. Tampon Çözelti pH'ı ve Konsantrasyonunun Etkisi

Tablo 4.1.1. de tampon çözeltinin pH'ının immobilizasyon verimine etkisi gösterilmiştir. İmmobilizasyon, 0.5 gr Eupergit C, 50 µl Maltogenaz 4000L, 25mM Ca(Ac)₂ tamponunun (pH 5.0, 5.5, 6.0) ve 25 mM (PO₄³⁻) tamponunun (pH 6.5, 7.0, 8.0), 10 ml çözeltileriyle, 25°C'da, 150 rpm'de, ve 48 saat süreyle çalkalayıcıda inkübasyon yapılarak gerçekleştirildi.

Eupergit C ile yapılan immobilizasyonlarda genelde nötral ve bazik pH değerleri tercih edilmektedir [Crout and Hernaiz, 2000; Madoery and Fdelio, 2001; Arroyo et al. 2001; Arroyo et al.2000]. Bu pH değerlerinde enzim üzerindeki amino, tiyol ve hidroksil grupları epoxy ile reaksiyona girmek için uygun yapıdadırlar. Asidik pH değerlerinde ise epoksi grupları proteinlerin karboksil ve histidin gruplarıyla kovalent olarak bağlanırlar [Katzir and Kraemer, 2000]. Asidik ortamda pH 5,5'ta en yüksek aktiviteyle immobilize olan Maltogenaz 4000L için, pH yükseldikçe immobilize enzimin aktivitesinin önce azalıp sonra artması ortamda sekonder amin gruplarının artan sayısından ileri gelmektedir. pH 8,0'de ise enzim hızla inaktif olmaya başlamıştır ve böylece kovalent bağlanan enzimler aktivite göstermemektedir.

Tablo 4.1.1. İmmobilizasyon pH'ının immobilize enzimin aktivitesine etkisi^a

pH	İmmobilize Enzimin Aktivitesi % ^b
5,0	27
5,5	45
6,0	40
6,5	42
7,0	46
8,0	35

^aİmmobilizasyon şartları: 0.5g E.C, 50µl Maltogenaz 4000L, 10 ml tampon çözelti, 25°C, 150 rpm, 48 saat.

^bİmmobilize enzimin maltodekstrini relatif hidroliz oranı: İmmobilize enzimin aktivitesinin aynı miktardaki serbest enzimin aktivitesine oranıdır. Serbest enzimin 25 ml (25 mM pH 5.0 Ca(Ac)₂) %5'lik MD çözeltisiyle 60°C'da 5 dakikada oluşturduğu maltoz miktarı %100 olarak alınmıştır.

1 M (PO₄³⁻) tamponunun değişik pH'lardaki çözeltilerinde yapılan immobilizasyonlarda verim en yüksek pH 7,0'de elde edildi (Tablo 4.1.2.). İmmobilize olan enzimin aktivitesinin artan iyon şiddetiyle birlikte yükseldiği gözlemlendi.

Tablo 4.1.2. 1M (PO₄³⁻) Tamponunun immobilize enzim aktivitesine etkisi^a

pH	İmmobilize Enzimin Aktivitesi % ^b
5	29
5,5	46
6	49
6,5	51
7	54
7,5	27

^aİmmobilizasyon şartları: 0.5g Eupergit C, 50µl Maltogenaz 4000L, 10 ml tampon çözelti, 25°C, 150 rpm, 48 saat.

^bİmmobilize enzimin maltodekstrini relatif hidroliz oranı: İmmobilize enzimin aktivitesinin aynı miktardaki serbest enzimin aktivitesine oranıdır

4.1.2. İmmobilizasyona Amonyumsülfatın Etkisi

Potasyum fosfat ve amonyum sülfat gibi belirli tuzların yüksek konsantrasyonlarda kullanılması ile matriks üzerindeki reaktif epoksit gruplara affiniti ligandların immobilizasyon verimi artırılmıştır. Matriksin epoksi yüzeyi ve affiniti ligand arasında tuz-etkili hidrofobik etkileşimin buna sebep olduğu düşünülmektedir [Wheatley and Schmidt, 1999; Schmidt, 1998]. Reaktif epoksi gruplara yakın affiniti ligandın konsantrasyonundaki artış epoksit ve affiniti ligand üzerindeki nükleofilik gruplar arasındaki reaksiyon hızının artmasına sebep olur .

Amonyum sülfat miktarını optimize etmek için yapılan deneylerin sonuçları Tablo 4.1.3’de gösterilmiştir. 0.5 M amonyum sülfat içeren, 10 ml 25 mM Ca(Ac)₂ tampon çözeltisiyle yapılan immobilizasyonda, immobilize enzim en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Destek yüzeyi ve enzim arasındaki yaklaşma tuz etkili olmaktadır; böylece reaktif epoksit gruplar yakınındaki enzimin etkin nükleofilik gruplarının konsantrasyonunun artmasıyla sonuçlanmış olarak açıklanabilen bu etki bağlanmayı arttırdığı varsayılır.

İmmobilizasyon tampon çözeltisine eklenen 0.5 M (NH₄)₂SO₄, asidik pH’lardaki immobilizasyon veriminin %55’e çıkmasını sağlamıştır. Daha yüksek pH’larda Maltogenaz 4000L’nin inaktif olmaya başlaması, immobilize olan enzimin katalitik aktivitesini yitirmesine sebep olabilir. Optimum pH’ının pH 5.0-5.5 olduğu göz önüne alındığında bazik ortamda immobilize olan enzimin yüksek katalitik aktivite göstermemesi beklenebilir. Ayrıca bazik pH’da ortamdaki sekonder amino ve tiyol gruplarının sayısının artmasıyla enzim ile epoksit grupları arasındaki reaksiyonun amonyum sülfatın etkisiyle artıp enzimin katalitik aktivitesini göstermesinde etkin olan amino asitlerle de reaksiyon yapması sonucu immobilize enzimin aktivitesinde azalma gözlenmiş olabilir.

Tablo 4.1.3. Amonyumsülfat miktarının immobilize enzim verimine etkisi ^a

Amonyumsülfat (Mol/L)	İmmobilize Enzimin Aktivitesi %^b
0	45
0,5	55
1	45
1,5	37
2	23
0,2	48
0,3	51
0,4	52

^aİmmobilizasyon şartları: 0.5 g EC, 50µl Maltogenaz 4000L, 25mM pH 5,5 Ca(Ac)₂ tamponu, 25°C, 150 rpm, 48 saat.

^bİmmobilize enzimin maltodekstrini relatif hidroliz oranı: İmmobilize enzimin aktivitesinin aynı miktardaki serbest enzimin aktivitesine oranıdır

4.1.3. İmmobilizasyon süresinin immobilize enzim aktivitesine etkisi

Herhangi bir enzim immobilize edildiğinde bağlanma verimi, aktivite verimi ve immobilize enzimin operasyonel kararlılığı immobilizasyon süresine bağlıdır.

Tablo 4.1.4.'de görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon verimi 40 saat sürede yapılan immobilizasyonda elde edildi. Daha uzun süreli immobilizasyonlarda ise verim düşmeye başlamıştır. Hernaiz tarafından yapılan bir çalışmada immobilizasyon süresi 24 saatten daha fazla olduğunda immobilizasyon verimi düştüğü gözlenmiştir.

Enzimin aktif sitesinde rol alan aminoasitlerin artan immobilizasyon süresiyle birlikte epoksit grupları ile yapacağı reaksiyon sayısının artmasıda enzimin aktivitesinin kaybolmasına sebep olacağından immobilize enzimin katalitik aktivitesi azalmış olabilir.

Tablo 4.1.4. İmmobilizasyon süresinin immobilize enzimin aktivitesine etkisi ^a

Süre (saat)	İmmobilizasyon Verimi % ^b
5	12
10	38
20	50
30	54
40	60
50	55
72	50
96	42
120	36

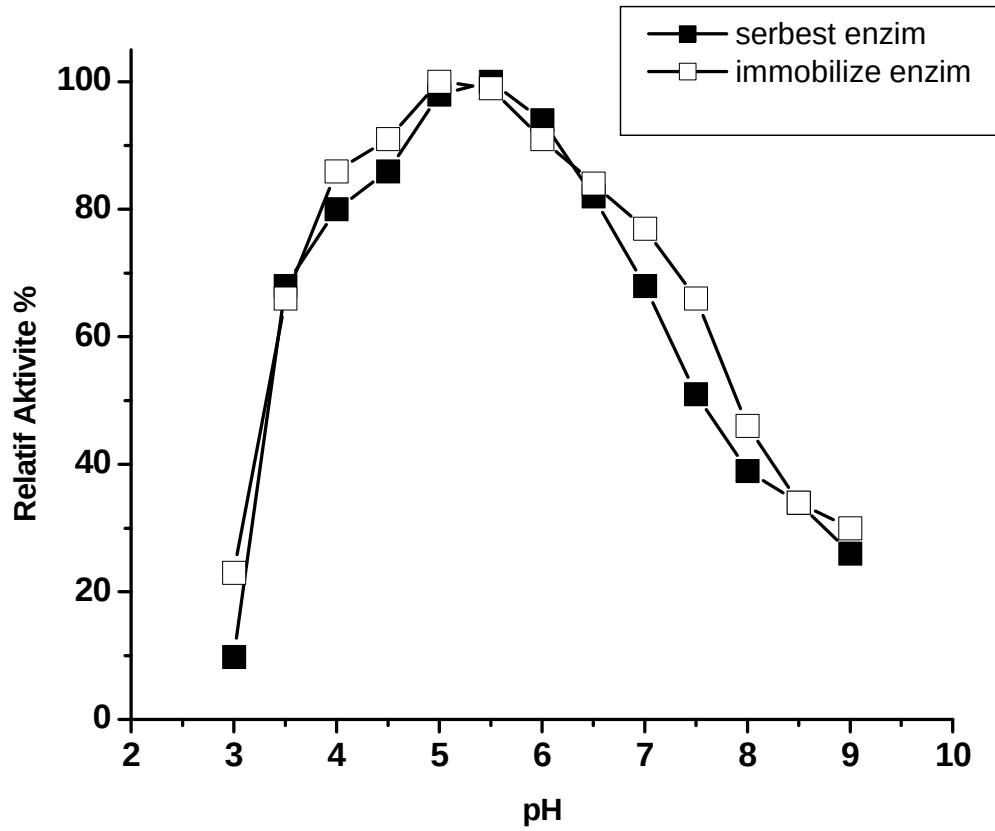
^aİmmobilizasyon şartları: 0.5 g EC, 50µl Maltogenaz 4000L, 25mM pH 5,5 Ca(Ac)₂ tamponu, 0.5 M (NH₄)₂SO₄ 25°C, 150 rpm

^bİmmobilize enzimin maltodekstrini rölatif hidroliz oranı: İmmobilize enzimin aktivitesinin aynı miktardaki serbest enzimin aktivitesine oranıdır

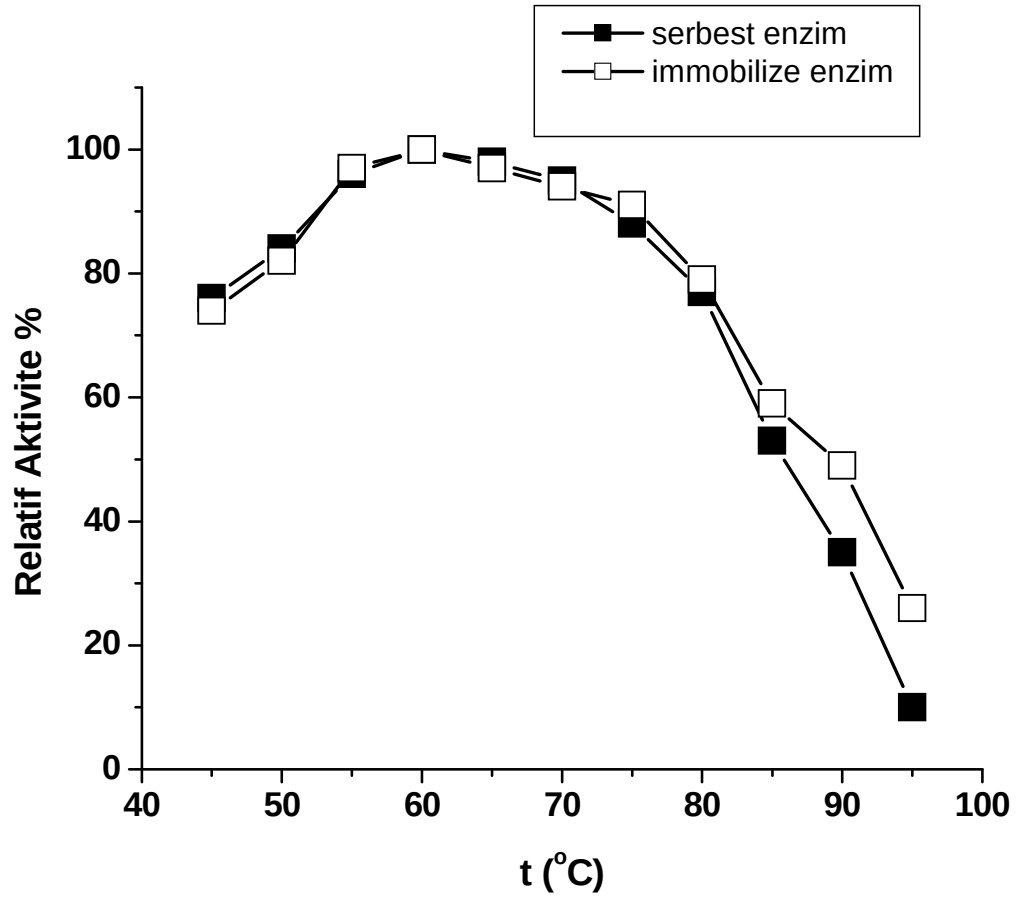
4.2. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

4.2.1. Optimum pH ve Sıcaklığın Tayini

Şekil 4.2.1. de görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimin her ikisi içinde optimum pH aralığı pH 5.0-5.5 olarak tespit edildi. Yüksek pH değerlerinde immobilize enzimin daha aktif olduğu belirlendi.



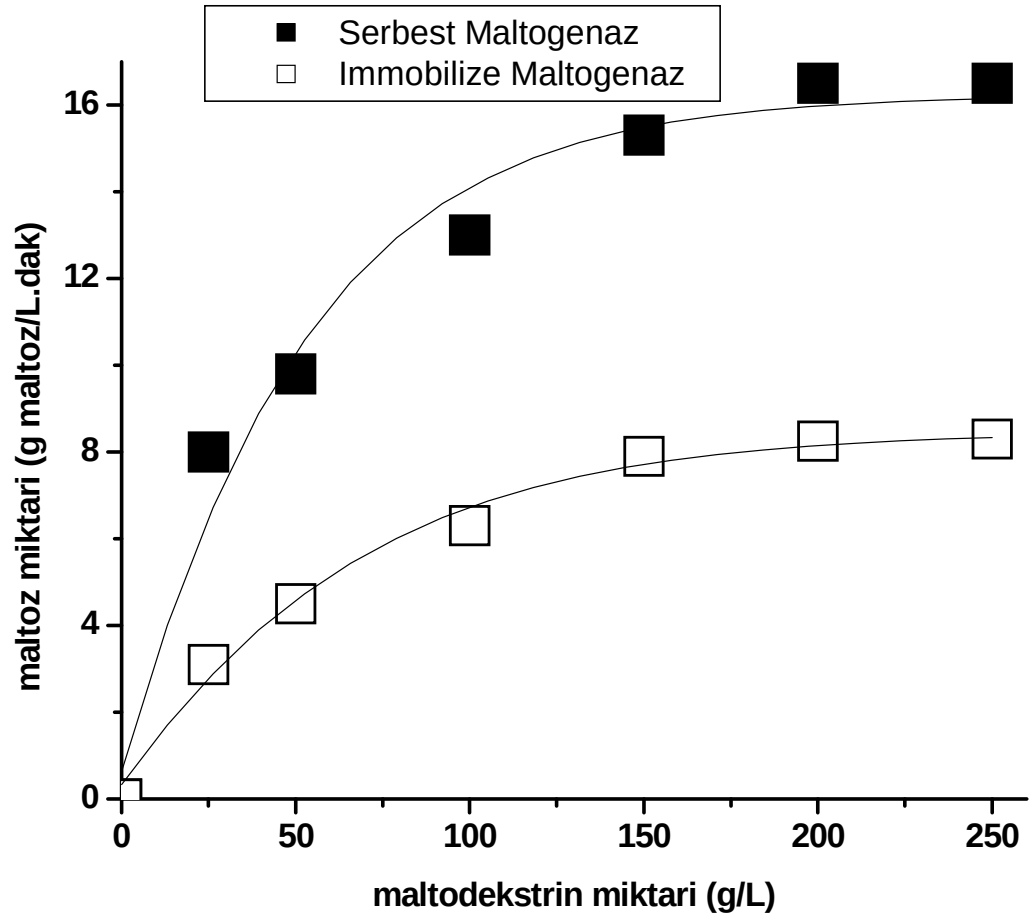
Şekil 4.2.1. Serbest ve İmmobilize Maltogenaz için % aktivite-pH grafiği



Şekil 4.2.2. Serbest ve İmmobilize Maltogenaz için % aktivite-sıcaklık grafiği

4.2.2. K_m , V_{max} Tayini

İmmobilize ve serbest enzim için en yüksek aktivite % 25 lik MD substrat çözeltilerinde elde edildi. 50 µl serbest enzim kullanılarak yapılan hidrolizin 1. dakikasında numune alındığında ortamdaki maltoz konsantrasyonu 16,5 g/l olduğu bulundu. 300 mg Eupergit C’de kovalent immobilize olan Maltogenaz ile aynı şartlarda yapılan hidroliz sonucu elde edilen çözeltideki maltoz konsantrasyonu ise 8,3 g/l olarak bulundu.

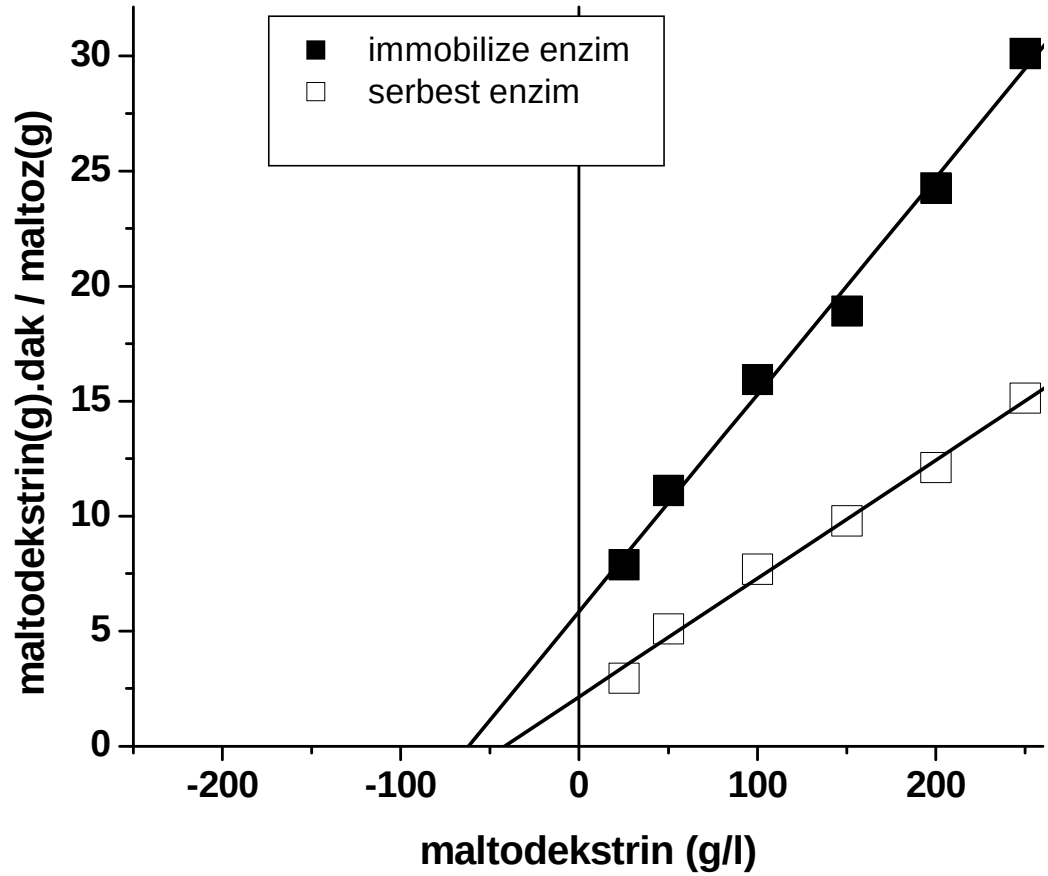


Şekil 4.2.3. Serbest ve İmmobilize Enzim İçin Michaelis-Menten Grafiği

Serbest enzimin V_{max} değeri 19.4 g.maltoz / L.dak, K_m değeri ise 41,9 g MD/ L olarak bulundu. İmmobilize maltogenazın V_m ve K_m değerleri ise sırayla 10,6 g maltoz / L.dak ve 62.1 g MD / L olarak belirlendi.

İmmobilize enzim K_m değerinin büyük çıkması, eupergit C nin hidrofobik yapıda bir matriks oluşuyla veya immobilize olan enzimin substrat bağlanma bölgesinde meydana gelebilecek bir değişiklik ile açıklanabilir.

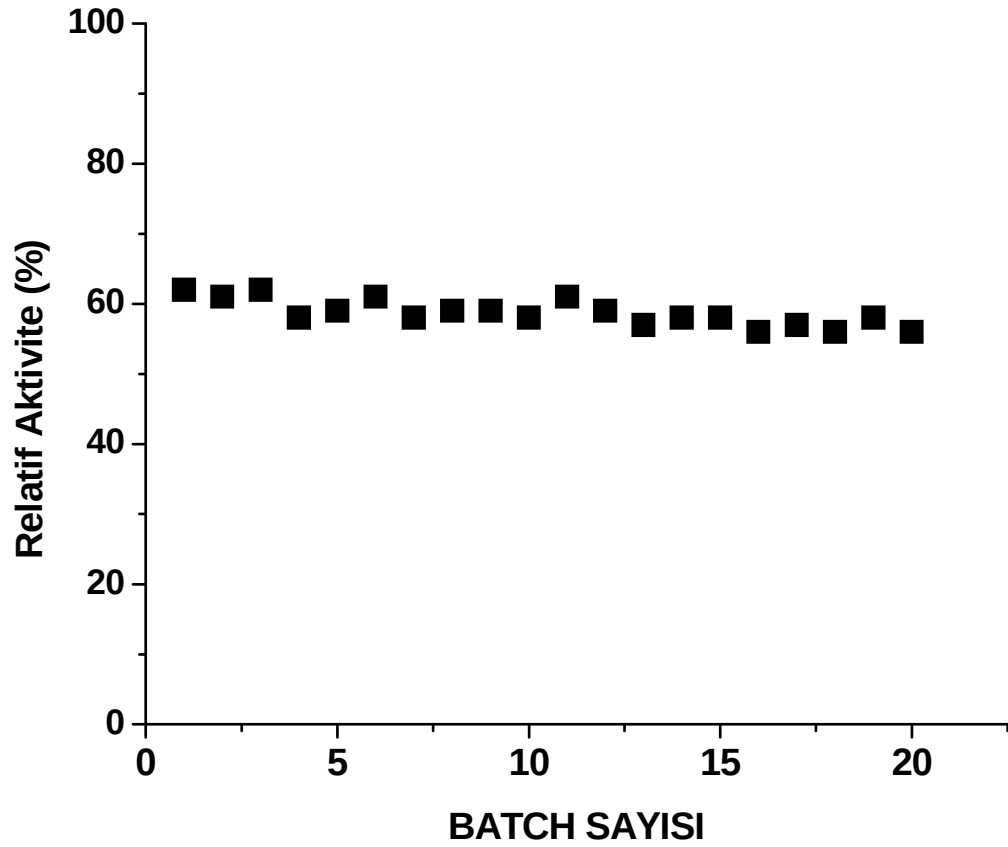
Yukarıda açıklanan sebeblere ilave olarak bir kısım immobilize enzim inaktif olarak matrikse bağlanmasıyla immobilize enzimin V_m değerini 10.6 g maltoz /L.dak ya düşürmüştür.



Şekil 4.2.4. Serbest ve İmmobilize Enzim için Hanes-Woolf Grafiği

4.2.3. İmmobilize Maltogenazın Aktivite Kararlılığının İncelenmesi

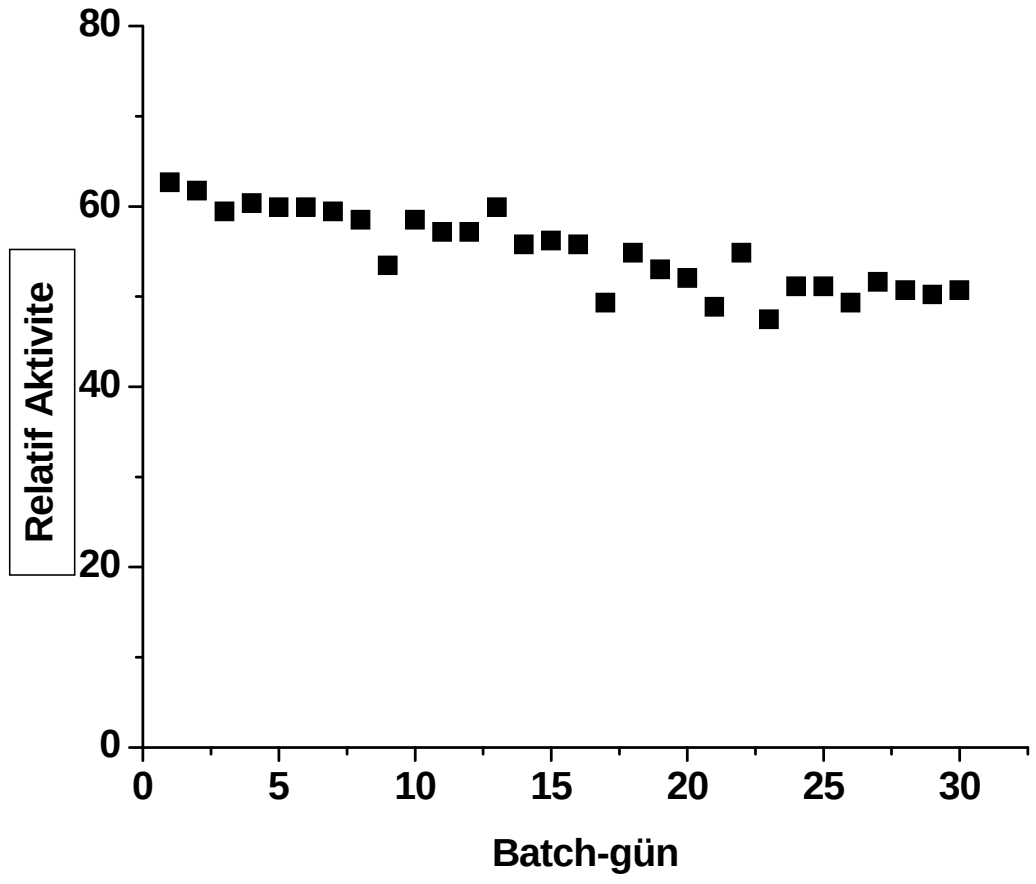
İmmobilize enzimlerin başlıca avantajı reaksiyon ortamından ve ürünlerden kolayca ayrılarak yeni substrat çözeltileriyle tekrar tekrar ve sürekli sistemlerde ise kazandığı kararlılıktan dolayı çok uzun süreli olarak kullanılabilir olmasıdır. Eupergit C'ye kovalent bağlanan Maltogenaz ile aktivite-batch deneyleri yapılarak tekrar kullanılabilirlik kapasitesi gözlendi, enzim 20 batch kullanımdan sonra aktivitesini koruduğu gözlendi.



Şekil 4.2.5. İmmobilize Maltogenazın aktivite-batch grafiği

Bununla birlikte immobilize enzimle aktivite-gün deneyleri 30 gün süreyle yapıldı. İmmobilize enzimin aktivite-gün deneyleri sonuçları Şekil 4.2.6'da gösterilmiştir.

İmmobilize enzimin uzun süreli kullanılabilirliği test etmek için; immobilize enzim 30 gün süresince ve ayrıca 20 batch reaksiyon sonunda aktivitesi ölçüldü. Şekillerden de görüldüğü gibi enzim aktivitesini 20 batch reaksiyon süresince veya 30 gün süreyle % 5 oranında bir azalma olduğu bulunmuştur. Bu azalmanın büyük bir kısmı ise aktiviteyi ölçmek için alınan numunenin içinde bir miktar immobilize enziminde olmasıdır ve bir diğer sebep ise batch reaksiyonları arasındaki süzmeler esnasında bir miktar immobilize enzimin filtre kağıdı üzerinde kalmasıdır.



Şekil 4.2.6. İmmobilize Maltogenazın aktivite-gün grafiği

O. Kirk*, T. V. Borchert and C. C. Fuglsang, “Industrial enzyme applications”, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 345–351

J. Beilen* and Z. Li, “Enzyme technology: an overview”, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 338–344

Gordon F. Bickerstaff, “*Immobilization of Enzymes and Cells*”, Humana Press, New Jersey, 1997

A. Pandey*, P. Nigam, C.R. Soccol, D. Singh and R. Mohan, “Advances in microbial amylase”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31 (2000) 135-152

E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer*, “Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (2000) 157-176

G.T. Hermanson, A.K.Mallia and P.K. Smith, “*Immobilized Affinity Ligand Techniques*”, Academic Press, California, 1992

T. Boller, C. Meier and Stefan Menzler*, “Eupergit Oxirane Acrylic Beads: How to make enzymes fit for biocatalysis”, *Organic Process Research & Development*, 6 (2002) 509-519

Yıldız Uludağ Yüksek lisans tezi, “İmmobilize Glukoamilaz ile Maltodeks-trinden Glikoz Üretimi”, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, 2000

Y.J.Wang, L.Wang, “Structures and Properties of Commercial Maltodextrins from Corn, Potato, and Rice Starches”, *Starch/Stärke*, 52 (2000) 296–304

G.1.15. L.M. Marchal,* H.H. Beftink and J. Tramper, “Towards a rational design of commercial maltodextrins”, *Starch/Stärke*, 52 (2000) 296–304

E. Nebesny, “Changes of Carbohydrates and Molecular Structure of Dextrins During Enzymatic Hydrolysis of Starch with Maltogenase Participation”, *Starch/Stärke*, 42 (1990) 432-436

M.1.B. Norman and H.V. Hendriksen, “Method for Producing Maltose syrup by using a hexosyltransferase”, World Patent Office, 2002, WO 0210427.

G.1.18. O. Gaouar, C. Aymard, N. Zakhia and G.M.Rios*, “Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch into Maltose Syrup in a Continuous Membrane Reactor”, *Journal Chem. Tech. Biotechnol.*, 69 (1997) 367-365

Buléon, P. Colonna, V. Planchot and S. Ball, Starch granules: structure and biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.* **23** (1998) 85-112.

J-Y. Li and A-I. Yeh, Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches, *J. Food Engineering* **50** (2001) 141-148.

M.J.E.C. van der Maarel*, B. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis and L. Dijkhuizen, “Review article: Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family”, *Journal of Biotechnology*, 94 (2002) 137–155

N.W.H. Cheetham* and L.Tao, “The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches” *Carbohydrate Polymers*, 33 (1997) 251-261

W. Vorwerf, S. Radosta and E. Leibnitz, Study of a preparative-scale process for the production of amylose, *Carbohydr. Polym.* **47** (2002) 181-189.

E. Legin*, A. Copinet and F. Duchiron, “A single step high temperature hydrolysis of wheat starch”, *Starch/Stärke*, 50 (1998) 84-89

J. P. Davis*, N. Supatcharee, R.L. Khandelwal, R.N. Chibbar, “Synthesis of novel starches in *Planta*: opportunities and challenges”, *Starch/Stärke* **55** (2003) 107–120

P.N. Nehete, N.K. Shah, V. Ramamurthy, R.M. Kothari, “An optimized protocol for the production of high purity maltose”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (1992) 446-450

R.L. Artin and C.P. Lee, “High purity maltose process and products”, US patent, US6436678, 2002

T. Noda*, S. Furuta and I. Suda, “Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose” *Carbohydrate Polymers*, 44 (2001) 189-195

H.E.M.McMahon, C.T. Kelly* and W.M. Fogarty, "High maltose-producing amylolytic system of a *Streptomyces* sp." *Biotechnology Letters*, 21 (1999) 23-26

The Amylase Research Society of Japan, "*Handbook of Amylases and Related Enzymes*", Pergamon Press, 1988

O. Gaouar*, C. Aymard, N. Zakhia, and G. M. Rios, "Production of Maltose Syrup by Bioconversion of Cassava Starch in an Ultrafiltration Reactor", *Industrial Crops and Products*, 7 (1998) 159-167

O. Gaouar, C. Aymard, N. Zakhia, and G. M. Rios*, "Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch into Maltose Syrup in a Continuous Membrane Reactor", *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 69 (1997) 367-375

O. Gaouar*, C. Aymard, N. Zakhia, and G. M. Rios, "Kinetic Studies on the Hydrolysis of Soluble and Cassava Starches by Maltogenase", *Starch/Stärke*, 49 (1997) 231-237

(Abstract) M.R. Sarmidi, P.E. Barker, " Saccharification of Modified Starch to Maltose in a Continuous Rotating Annular Chromatography(CRAC)", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57 (1993) 229-235

P.Duflot*, C. Fouache, S. Labourse, "Immobilized Maltogenic α -amylase and its use in the manufacture of a Maltose-Rich Syrup" US Patent, US6274355, 2001

C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan*, "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment", *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000) 509-515

C. Mateo, O. Abian, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J. Pedroche and J. M. Guisan*, "Epoxy Sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment", *Biotechnol. Prog.*, 18 (2002) 629-634

B.C.C. Pessela, C. Mateo, A.V. Carrascosa, A. Vian, J. L. Garcia, G. Rivas, C. Alfonso, J.M. Guisan* and R. Fernandez-Lafuente, "One-Step purification, Covalent

immobilization, and additional stabilization of a thermophilic poly-his-tagged β -galactosidase from thermus sp. Strain T2 by using novel heterofonctional chelate-epoxy sepabeads”, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 107-113

C. Mateo, O. Abian, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan*, “Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage” *Biomacromolecules*, 1 (2000) 739-745

P. Grunwald*, K. Hansen, M.Remus and M. Fernando, “Some new strategies for optimizing the reaction conditions for enzyme immobilization”, *Indian Journal of Chemistry*, 32 (1993) 64-66

M. T. Martin*, F. J. Plou, M. Alcalde and A. Ballesteros, “Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst”, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 21 (2000) 299-308

M. J. Hernaiz, D.H.G. Crout*, “Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from B.circulans and an α -galactosidase from Aspergillus oryzae”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (2000) 26-32

K. Smalla, J. Turkova*, J. Coupek and P. Hermann, “ Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-hidroxyethyl methacrylate with ethylene dimethacrylate”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10 (1998) 21-31

J.B.Wheatley and D.E.Schmidt Jr. *, “Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports”, *Journal of Chromatography A*, 849 (1999) 1-12

K.B.Arnaz, E.W. Napolitano, D.N. Roberts, J. A. Montali, B.R. Hughes and D.E. Schmidt Jr. *, “Salt-induced immobilization of small affinity ligands on an epoxide-activated affinity support”, *Journal of Chromatography A*, 803 (1998) 73-82

B 315f-GB, Maltogenase, Novo Nordisk, Product sheet,1999

M. J. Hernaiz and D.H.G. Crout*, “Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B.circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (2000) 26-32

R.R.Madoery* and G.D. Fidelio, “A simple method to obtain a covalent immobilized Phospholipase A₂”, *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001) 1663-1664

J.Torres-Bacete, M.Arroyo*, R.T. Guzman, I.De la Mata, M.P. Castillon and C. Acebal, “Optimization of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) production by using a new immobilized penicillin acylase”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32 (2000) 173-177

J.Torres-Bacete, M.Arroyo*, R.T. Guzman, I. De la Mata, M. P. Castillon and C. Acebal, “Covalent immobilization of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*”, *Biotechnology letters*, 22 (2000) 1011-1014

ÖZGEÇMİŞ

- ADI SOYADI** : OLTAN CANLI
- DOĞUM YERİ / TARİHİ** : GÜMÜŞHANE / 01.01.1977
- İLKÖĞRENİM** : Gebze Atatürk İlkokulu (1987)
Sarkuysan Lisesi (1990)
- ORTAÖĞRENİM** : Aslan Çim. Tek ve Anadolu Tek. Lisesi
Kimya Teknik Lisesi (1994)
- YÜKSEK ÖĞRENİM** : Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü (1999)
- YÜKSEK LİSANS** : Eylül 2000, Haziran 2001 Ders Dönemi
Eylül 2001, Haziran 2003 Tez Dönemi