

BAKTERİSEL ALFA - AMİLAZ ÖNEMİ, ÖZELLİKLERİ VE ÜRETİM TEKNOLOJİSİ

A. Aydın ESENER

*Sectie Biochemische Reactoren, Jaffalaan 9
Technische Hogeschool Delft, Delft Holland*

Giriş :

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar, çevrelerini yaşamları için elverişli bir hale getirebilme çabası ile bazı enzimleri bünyelerinde sentez edip hücre duvarından dışarıya salgılamaktadırlar. Alfa - amilaz da bu tür bir enzim olup, özellikle nişasta gibi doğal kaynaklı ham maddelerin parçalanmasında kullanılmaktadır. Endüstride geniş tüketim olanakları bulan bu enzimin, modern yöntemlerle üretilmesi, özellikle fermente olabilir tarım ürünü maddelerin bol olduğu Türkiye gibi bir ülkede, ekonomik bakımdan caziptir. Bu yazın alfa - amilaz enziminin özellikleri, önemi ve modern üretim teknolojisinin bir özeti niteliğindedir.

Kullanılma Alanları :

Alfa - amilaz günümüzde belli başlı şu amaçlar için endüstride kullanılmaktadır :

- (a) Biracılıkta; sakkarifikasyon öncesi nişastalı ham maddenin sıvılaştırılmasında (ayrıca, enzim ilavesinin, elde edilen biranın tadını olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir.)
- (b) Nişasta endüstrisinde; özellikle dekstroz ve yüksek fruktoz oranlı şurupların üretiminde. (1)
- (c) Kağıt endüstrisinde; yapıştırma ve kaplama maddelerinin yapımında.
- (d) Tekstil Endüstrisinde; ürünün, yapım sırasında bulaşmış olan nişastadan tamamen arıtılmasında.

- (e) Şekercilikte; karışım viskozitelerinin düşürülmesinde ve artık şekerin geri kazanılmasında.
- (f) Ekmek endüstrisinde; hamurdak. fermente olabilir şekerlerin oluşumunun çabuklaştırılmasında ve ekmeğin bayatlama hızının azaltılmasında.
- (g) Fermentasyon endüstrisinde; nişasta kaynaklı besi ortamı hazırlanmasında.

Enzimin Özellikleri :

Çeşitli kaynaklardan elde edilen amilazlar önemli değişiklikler gösterirler. Fischer ve Stein alfa - amilazın birinci protein yapısını ayrıntılarıyla incelemişlerdir (2). Amino asit yapı elemanları dizisi henüz saptanmamıştır. Bu yazı enzimin makro özellikleri, önemi ve endüstriyel üretimi üzerine eğildiğinden enzimin biyokimyasal yapısı ile ilgilenen okuyucuların (2, 3, 4, 5, 6) nolu makalelere başvurmaları yararlı olacaktır.

Bakteriler tarafından üretilen amilazlar genellikle alfa - amilaz türündedir. Beta - amilazlar ise bitki hücreleri tarafından sentez edilirler. Bakterisel amilazlar hücre dışına salgılanabildiklerinden dolayı fermentasyon kültüründen ilk ayırımı kolaydır. Çeşitli üreticiler tarafından pazarlanmakta olan amilazlar benzer özellikler gösterirlerse de, üretimde uygulanan farklı yöntemler, koşullar ve/veya değişik tür bakteriler nedeniyle, ayrı kökenli alfa - amilazları mutlak bir düzeyde karşılaştırmak olanaksızdır. Bir başka deyişle özellikler benzer fakat aynı değildir.

Alfa - amilazın Nişasta Üzerindeki Etkisi :

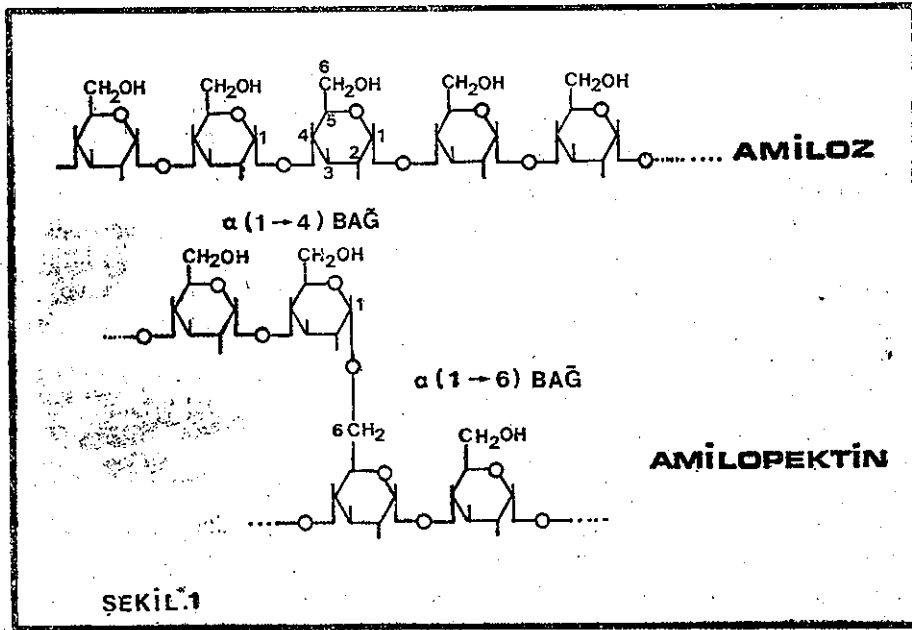
Nişasta yüksek molekül ağırlıklı bir D-glukoz polimeri olup bitkilerde karbonhidrat deposu olarak bulunur. Başlıca iki tür polimerin; alfa - amiloz ve amilopektin, karışımından oluşur.

Amiloz, alfa (1→4) bağları ile uç uca uzun ve dalsız zincirler oluşturan D-glukoz ünitelerinden meydana gelir. Bu tür zincirlerin molekül ağırlığı birkaç binden 500.000 e kadar değişebilir. (7) (Şekil 1)

(örneğin, alfa (1→6) glukoz - 6 - glukozhidrolaz) ilave edilirse, amilopektin tamamen glukoz ve maltoz ünitelerine bölünür. Alfa - amilazın hidroliz reaksiyon kinetiği teorik ve deneysel olarak incelenmiştir. Banks ve Greenwood bu konudaki en yararlı eserlerden birini yayınlamışlardır. (8)

Alfa - amilaz Sentez Edebilen Mikroorganizmalar :

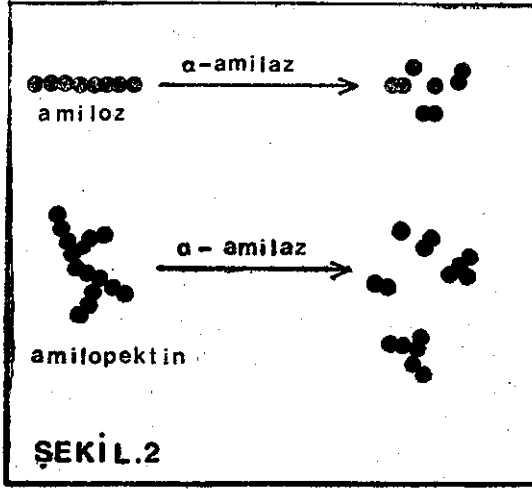
Bu enzimi sentez edebilme özelliği yan-



Amilopektin ise, herbiri 24 - 30 glukoz ünitesi içeren çok sayıda dallardan oluşur. Ana yapı, alfa (1→4) glikosidik bağları ile bir arada tutturulmuştur. Dallar alfa (1→6) bağları ile ana yapıya bağlanmışlardır. Molekül ağırlığı 100 milyon kadar yüksek olabilir. (Şekil 1) Alfa - amilaz, veya enzim komisyonunca kararlaştırılmış adıyla alfa (1→4) glukoz - 4 - hidrolaz (E.K. No: 3.2.1.1.) amilozu alfa (1→4) bağlarını gelişigüzel kırarak hidroliz eder. Reaksiyon son ürünleri glukoz ve serbest maltozdur. Son ürünlerin oranı alfa - amilazın kaynağına ve reaksiyon koşullarına bağlıdır. Alfa - amilazın amilopektini etkilemesi sonucunda D-glukoz, maltoz ve limit dekstrinler oluşur. Limit dekstrin, enzimin alfa (1→6) bağlarını hidroliz edememesi nedeni ile meydana gelen dallı merkeze verile addır. (Şekil 2) Reaksiyon ortamına bu tür bağları hidroliz eden bir enzim

luzca birkaç tür mikroorganizmaya kısıtlı değildir. Genellikle *Bacillus* ailesinin hemen hemen bütün üyeleri uygun ortamda yüksek aktivitede alfa-amilaz üretirler. (9) Ayrıca *Pseudomonas saccharophila*, *Aspergillus oryzae* ve *Klebsiella aerogenes* de enzimi üretebilen diğer organizmalar arasındadır.

Endüstride genellikle *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*'den yararlanılmaktadır. Genetik mutasyon ve eleme yöntemleri ile bu organizmaların normalden çok yüksek aktivitede enzim üretebilme yeteneğine sahip şuşları elde edilmekte ve kullanılmaktadır. Bu durum literatürde bu organizmaların adlandırılmasında anlaşmazlıklara yol açmaktadır. Örneğin Cambell ve Walker'a göre bazı üreticiler tarafından *B. subtilis* olarak adlandırılan organizma gerçekte *B. amyloliquefaciens* dir. (10, 11) Bi-



yoteknoloji alanında elde edilen ilerlemeleri gerçekçi olarak koruyabilecek patent yasaları olmadığından üreticiler kullandıkları organizmalarla ilgili yayın ve açıklamalardan kaçınmaktadırlar.

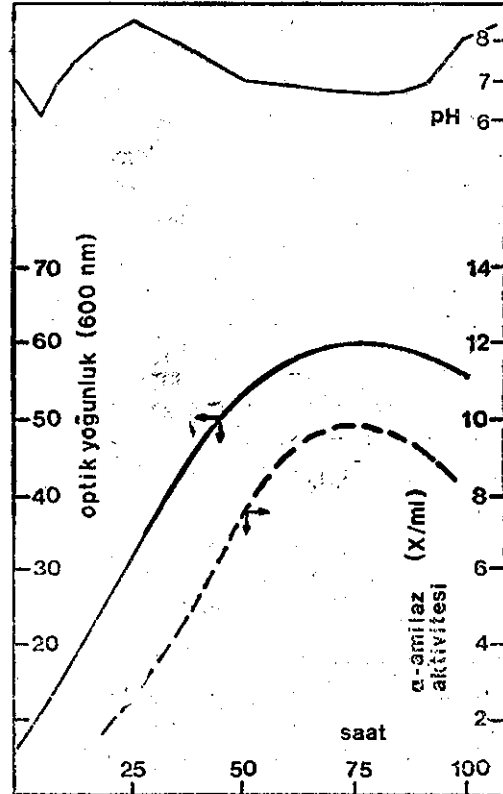
Bakterisel Alfa-amilazın Biyokimyasal Sentezi :

Bu konuda bir çok araştırmalar yapılmışsa da, kullanılan değişik organizmalar ve farklı deney koşullarından ötürü yayınlanmış neticelerden genellemeler yapabilmemiz olanaksızdır. Farklı prensiplere dayanan yöntemlerle ölçülmüş olan enzim aktivitelerini belli bağıntılar ve katsayılar uygulayarak karşılaştırma olanaksızlığı dolayısı ile literatürdeki yüksek enzim verimi iddialarını onaylayabilmek çok zordur.

Amilaz sentez eden bakterilerin üreme eğrisi genellikle geçikme, üssel üreme, duraklama ve ölüm dönemlerinden oluşan klâsik üreme eğrilerine benzer. Enzim sentezi, erken üssel dönemde başlar ve hızlanarak duraklama döneminde maksimuma erişir. (Şekil 3) (12) (üssel üreme döneminde olan bir kültür inokulum olarak kullanıldığı için şekilde geçikme dönemi yoktur.) Bazı araştırmacılar sentez edilmiş olan enzimin hemen hemen tamamının ölüm döneminde dışarıya geçtiğini savunmaktadırlar. Bir başka deyişle enzimin hücre duvarından dışarıya diffüzyonu, prosesin hızını limitleyen etkindir. (13) Yazarın deneysel neticeleri ve literatürde yakın geçmişte yayınlanmış olan çalışmalar, bu hipotezin en azından

B. subtilis için geçerli olmadığını göstermektedir. (12)

Endüstride, üretim koşulları genellikle empirik bulgulardan saptanmaktadır. Çoğunlukla yüksek amilaz aktivitesi, ancak doğal besi maddelerinin kullanılması ile elde edilmektedir. Bu tür maddeler arasında melas, malt ekstraktı, soya unu, balık artıkları ve ıslatılmış mısır özü (corn steep liquor) vardır. Sentetik besi ortamında yeterli bakteri derişimi sağlamakta ise de enzim aktivitesi düşük olmaktadır. O halde kültürdeki bakteri sayısı ve enzim aktivitesi arasında doğrusal bir bağıntı yoktur. Organizma yaşı, sayısına oranla daha önemli bir parametredir. Kompleks besi maddelerinin içerdikleri amino asitler, iz elementler, vitaminler ve bazı nukleik asit molekülleri enzim sentez hızını ve verimini arttırmaktadır. Organizma, sentez sırasındaki enerji gereksinimini basit karbonhidratları glikoliz ve Krebs siklusu (Krebs cycle) metabolik yollarını izleyerek parçalaması ve dönüştürmesi sonucunda kar-



ŞEKİL.3 *B.subtilis* fermentasyonu ile amilaz üretimi (Esener) (12)

şılar. Glukoz, özellikle, yüksek derişimde, enzim sentezini olumsuz bir yönde etkiler. Bu etki 'Katabolik Represyon' olarak adlandırılmıştır. (14)

Geniş kapsamlı bir literatür araştırması bu konuda anlaşmazlıklar olduğunu göstermektedir. Pastan ve Pearlman kültüre c-AMP (cyclic adenosine - monophosphate) ilâvesinin Katabolik represyon olayını etkisiz kıldığı göstermişlerdir. (15)

Bu tez, Beşinci Dünya Fermantasyon kongresinde de desteklenmiştir. (16, 17) Buna karşın Priest *B. subtilis* B.20 üzerinde yaptığı çalışmalar sonucunda c-AMP ilâvesinin etkisiz olduğu kanısına varmıştır. (18)

Genellikle nişasta ve basit karbonhidrat karışımları içeren besi ortamında amilaz üretimi düşük molekül ağırlıklı karbonhidrat moleküllerinin parçalanmasından sonra başlamaktadır. Bundan sonra nişastadan üretilen dekstrinler, enzim etkisi ile parçalanabilir şekerlere dönüşmekte ve devamlı olarak serbest şeker derişimi Katabolik Represyon olayını etkili kılabileceğinin altında tutulmuş olmaktadır. Bu, organizmanın termodinamik verimini yüksek bir düzeyde tutabilmesi için yararlandığı bir tür 'geri beslemeli denetim' mekanizmasıdır. Bu tür mekanizmaları devamlı kültürde Meers incelemiş ve üreme hızı ile Katabolik Represyon derecesinin bu enzimin sentezi için en önemli parametreler olarak tanımlamıştır. (19)

Kültür sıcaklığı ve çözünmüş oksijen derişiminin etkileri değişik tür organizmalar için değişmektedir. Mazza ve Ertola üssel üreme dönemi sonunda, kültür havalandırılmasında yapılan azaltmanın enzim aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. (20) Bu yöntem daha sonra Markkannen ve Bailey tarafından *B. subtilis* sistemine uygulanmış ve doğrulanmıştır (21)

6 ve 8 arası pH değerleri bir çok sistemlerde enzim üretimi için uygun bulunmuştur. Bazı üreticilerin özel olarak pH kontrolü kullanmadıkları bilinmektedir. Dixon da pH kontrolünün verimde fark edilir bir artma sağlamadığını bildirmiştir. (22) Ancak doğal besi maddeleri içeren besi ortamında zayıf da olsa, tam-

pon etkilerinin varlığı unutulmamalıdır. pH kontrolsüz *B. subtilis* fermentasyonu sırasında pH değişimi şekil 3 de gösterilmiştir.

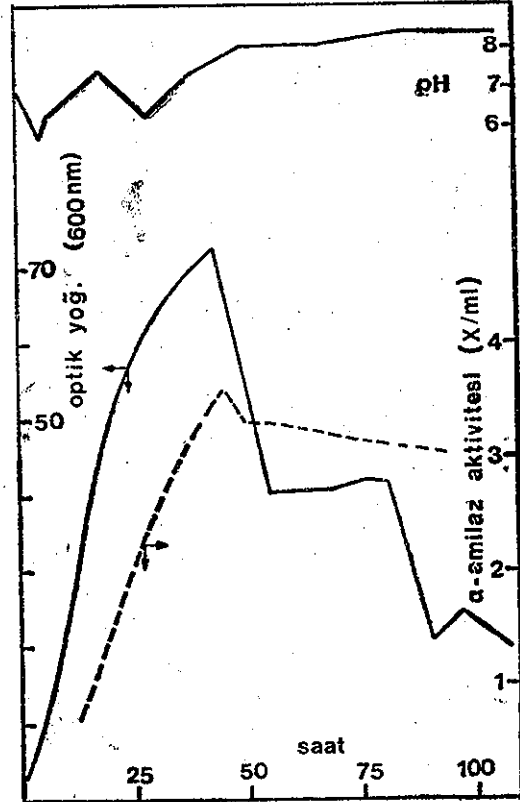
Fermentasyonun ilk saatlerinde görülen ani pH düşmesi serbest şekerlerin organik asitlere dönüşümü sonucu olmalıdır. pH değişiminin izlenmesi, fermentasyonun nasıl geliştiği hakkında bilgi verdiği için önemlidir. (Şekil 3 ve 4. deki pH gelişimlerini ve amilaz aktivitelerini karşılaştırınız) Manganez ve Kalsiyum elementleri *Bacillus* ailesinin gerek birinci ve gerekse ikinci, metabolizmaları bakımından önemlidir. (23) Kalsiyum, biyokimyasal yararına ek olarak alfa-amilaz ile 'Chelate' kompleksleri oluşturarak enzimin ısısal kararlılığını arttırmaktadır. (24)

Endüstriyel Üretim :

(1) Mikrobiyolojik etkenler

a. Üretici organizmanın elde edilişi :

Yüksek verimli şuşların elde edilmesi alfa-amilaz üretimi için son derece önemlidir.



ŞEKİL.4 Düşük verimli bir fermentasyon (12)

Araştırılması en uzun süren safha da budur. Bu tür şuşların elde edilmesi için alışlagelmiş mutasyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler kolay olmalarına karşın uzun zaman ve emek gerektirirler. Bu yöntemlerde aday şuşlara mutasyon yapan bir etken uygulanır. Bu etkenin kuvveti ve uygulama süresi, söz konusu şuşların yüzde 95-99 kadarını öldürecek şekilde ayarlanır. Canlı kalan organizmalar alfa-amilaz üretimi için test edilirler. Mor ötesi ışınlar, etilen imin, N-metil-N'-nitro-N-guanidin uygulaması mutasyonu gerçekleştirmek için en çok kullanılan etkenlerdir. Elde edilen yüksek verimli şuşlar alışılmış mikrobiyolojik yöntemlerle saklanmakta ve gelecekteki mutasyon denemeleri için aday organizmalar olarak kullanılmaktadır. Elde edilen yeni şuşların bir kısmı, yüksek aktivitede enzim sentez özelliklerini, bir süre veya fermentasyon sonucunda genetik geri dönüşme gösterip kaybetmektedirler. Bu olaya, özellikle, devamlı fermentasyonlarda sık sık rastlanmaktadır. (22)

b. Besi ortamı bileşimi :

Genellikle, sanayiden ucuz ve bol olarak temin edilebilen doğal maddeler içeren besi solüsyonları kullanılmaktadır. Uygun karbon : azot oranının saptanması ve sağlanması çok önemlidir. Bu oranın değişik şuşlar için değişebileceği unutulmamalıdır. Nişasta, soya, melâs, bira sanayii yan ürünlerinden yararlanılabilir. Ayrıca bazı poliaminlerin ve nükleotidlerin enzim sentezinde başlangıç ünitelerini (precursor) oluşturarak üretimi hızlandırdığı için ortama ilâvesinde yarar olduğu bildirilmiştir. (25, 26)

(ii) Biyoteknolojik etkenler

Yazarın bilgisine göre alfa-amilaz endüstride yalnız kesikli kültürde üretilmektedir. Devamlı kültür çalışmaları henüz laboratuvar düzeyindedir. Geçmişte kullanılmakta olan tepsi fermentörlerin yerlerini günümüzde havalandırılmalı derin fermentörler almıştır. Dolayısı ile bu bölümde sadece havalandırılmalı kesikli kültür teknolojilerinden söz edilecektir.

a. Sterilizasyon :

Fermentör, enfeksiyonu fermentasyon süresince yeterli bir düzeyde tutabilecek şekilde tasarlanmalıdır. Genellikle, türbin türü ka-

rıştırıcı fermentörler kullanılmakta ve hava debisi, özellikle, üssel üreme döneminde çözülmüş oksijen limitasyonu meydana getirecek şekilde ayarlanmalıdır. Havanın sterilitesi, derin cam yünü filtrelerden geçirilmesi veya adyabatik sıkıştırılması sonucunda ısısının yükseltilmesi ile sağlanır.

Besi ortamının sterilizasyonu bazı zorluklara yol açabilir. Genellikle, çökeltmeyen katı cisimler içeren besi ortamları, ısı değiştirgeçleri ile sterilize edilemezler (tıkanma, yenim v.s. gibi nedenlerden). Bu tür besi ortamları fermentörün içinde dolaysız veya dolaylı buhar uygulaması ile sterilize edilirler. Aşırı yüksek ısı, ortamdaki karbonhidratlar ve azotlu bileşikler arasında istenmeyen ürünler veren reaksiyonlara neden olabileceğinden, sterilizasyon süresi ve ısısı kullanılan besi ortamının bileşimine göre saptanmalı ve ayarlanmalıdır.

Tesisin genel temizliği fermentasyonu enfeksiyonlardan uzak tutabilmek için gereklidir. Virüs enfeksiyonlarının bu fermentasyonu etkilediği bildirilmiştir. Şekil 4 de bu tür, enfekte bir fermentasyonun gelişmesi gösterilmiştir. (12)

b. Fermentasyonun denetimi :

Yeterli aygıtlara sahip bir işletmede pH, sıvı ortamda çözülmüş oksijen derişimi, kültür ısısı ve köpük düzeyi sürekli olarak ölçülüp denetilmelidir. Kültür ısısının hassas denetimi özellikle önemlidir. Zaman zaman aşırı köpük üretimi bu fermentasyonun bilinen bir özelliğidir. Giderilmesi, köpük kırıcı maddelerin steril olarak ilâvesi ile sağlanır. Polipropilenglikol veya mısır yağı bu tür köpük kırıcılar arasındadır. Polipropilenglikol daha etkili olmasına karşın yüksek derişimde organizma için toksik olabilmektedir. (12) Ayrıca, gereğinden fazla ilâvesi sistemdeki köpük üretimini arttırabilmektedir. Bu gerçek, denetim sistemi tasarlanırken göz önüne alınmalı ve sistemin kararlılığını sağlamak için geçiktirici bir üniteden yararlanılmalıdır. Köpük kırıcı madde ilâvesinin gaz-sıvı kütle transfer katsayısının da önemli ölçüde azaltacağı unutulmamalıdır.

Bakteri derişimi, enzim aktivitesi, ve karbon ve enerji kaynağı derişimi belli aralıklarla ölçülmelidir. Katı maddeler içeren besi or-

tamında bakteri derişimini hassas olarak kısa bir sürede ölçmek olanaksızdır. Bu tür maddeler optik yoğunluk, kuru veya yaş ağırlık ölçümlerinde sapmalara sebep olurlar. Bu koşullar altında, en uygun yöntem, kütle ve enerjinin korunumu ilkelerine dayanarak ölçülemeyen değerlerin sürekli ölçülebilenlerden giderek hesaplanmasıdır. Bu yöntem, hassas ve değerli ölçüm aygıtlarını gereksindirir. Örneğin, Paramanyetik oksijen ölçer, kırmızı ötesi karbondioksit ölçer veya kültürdeki ısı üretimini hassas olarak ölçebilen mikrokalorimetre gibi. Bazı büyük üreticiler bu tür uygulamalara şimdiden girişmişlerdir. Örneğin, Gist Brocades (Delft, Hollanda) firması penisilin fermentasyonu için gerçek zamanlı bir bilgisayar sistemi ile bu tür kütle ve enerji eşitliklerini sürekli düzenleyerek, gerekli parametreleri, ölçülemeyen veya ölçülmesi zaman gerektiren değişkenlerin olasılığı en yüksek değerlerini hesaplayıp fermentasyon gelişiminin amaçta (aşağıdaki bölümde anlatılacak) göre denetlenmesini gerçekleştirmiştir. Bu tür hesaplamaların teorisi en iyi olarak yakın geçmişte yayınlanmış olan (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33) nolu çalışmalarda verilmiştir.

c. Fermentasyon ne zaman durdurulmalıdır?

Fermentasyonun devam süresinin saptanması ekonomik açıdan çok önemlidir. Erken hasat veriminin düşük olmasına, geç hasat ise fermentör işletme zamanının yararsız olarak kullanılmasına neden olur. İşletmenin kârını maksimum düzeye eriştirebilmek için bir hedef saptanmalıdır. Hedef genellikle;

— enzim ünite maliyetinin minimuma indirilmesi, veya

— birim proses zamanındaki enzim üretiminin maksimuma çıkarılması olarak saptanmaktadır. Tanımlanan değişik hedefler genellikle değişik hasat zamanı gerektirirler. Bunlardan birinin seçimi sırasında fermentasyon bölümüne ek olarak tesisin enzim arıtma, taşıma, paketleme vs. bölüm kapasiteleri, ve hatia pazar durumları ve ham madde fiyatları ve stokları göz önüne alınmalıdır.

Bu tür problemlerin, büyük işletmeler için karmaşık olacağı düşünülebilir fakat genellikle

bazı gerçekçi varsayımlar ile problem çok kolayca doğrusal optimizasyon işlemine indirgenir. Bu tür problemlerin standart çözüm yöntemleri Kimya mühendisliği literatüründe bulunabilir. (34)

d. Enzimin ayırımı ve arıtımı : (35, 36)

Endüstriyel alfa-amilaz genellikle yüksek derişimde solüsyon olarak pazarlanmaktadır. Bazı uygulamalar için kuru toz karışımı olarak da hazırlanabilir. Arıtılma işlemi kültür ortamındaki katıların ve bakterilerin ayrıştırılması ile başlar. Bu işlem için santrifüj veya fiitreler kullanılır. Filtrasyonda yüzde 2-4 (ağırlıkça) Kieselguhr ilâvesi yararlı olmaktadır. Katılardan temizlenmiş sıvının daha sonra yüksek vakumlu bir buharlaştırıcıda (evaporator) derişimi yükseltilir. Enzimin kararlılığını artırıcı maddeler ilave edilerek standart derişimde pazarlanmağa hazır duruma getirilir. Buharlaştırılma sonucunda çıkan solüsyona istenirse inorganik tuzlar karıştırılarak enzim çökeltilir. Bu çökelek sprey kurutma yöntemi ile kurutulabilir.

Yüksek aktivitede ve arılıkta enzim gerektiren uygulamalar için, buharlaştırıcıdan çıkan solüsyondaki enzim bazı organik çözücüler (etanol, izopropanol gibi) ile çökeltilir ve çökelti dondurularak vakum altında kurutulur.

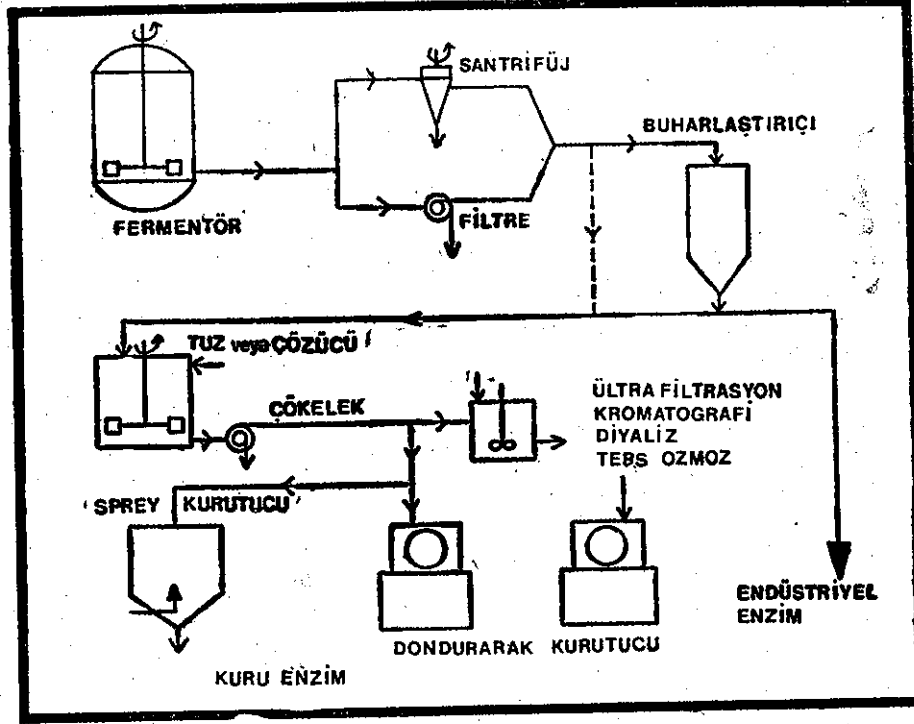
İlaç endüstrisi ve bilimsel araştırmalarda kullanılması gereken yüksek arı enzim ultrafiltrasyon, kromatografi, diyaliz ve ters ozmoz yöntemleri ile elde edilir. Ters ozmoz yöntemi endüstriyel üretim için de ekonomik açıdan uygulanabilir duruma gelmiştir.

Ayırımı ve arıtım işlemleri sırasında enzim kararlılığını bozmamak ve aktivitesini düşürmemek için kullanılan pH, sıcaklık ve ilave madde derişimleri gibi etkenler dikkatle seçilmelidir.

Enzim aktivitesi çeşitli yöntemler ile ölçülebilir. Şekil 3 ve 4. de gösterilen X aktivitesi Dixon'ın kullanmış olduğu nişasta jelindeki viskozite azalması ölçümüne dayanmaktadır. Diğer yöntemler (9; 37, 38) nolu eserlerde açıklanmıştır.

Alfa - amilaz Teknolojisinin Geleceği :

Günümüzde fermentasyon yolu ile elde edilen veya edilebilecek birçok maddeler (ase-



ŞEKİL 5. Enzim ayırım ve arıtım tesisleri akım şeması

ton, butanol, ethanol, asetik asit vs.) petrokimya endüstrisi tarafından daha ucuz olarak üretilmektedir. Ancak petrol fiyatlarının artması ve alışılmış enerji kaynaklarının azalması karşısında birçok ülkelerin fermentasyon endüstrisi geleceğine önem verdikleri bilinmektedir. Örneğin Brezilya yakıt olarak kullanılmak üzere alkol üretecek fermentasyon endüstrisi için bir milyar dolar tutacak bir yatırıma girilmiştir. (39) Bu tür uygulamalar petrol gereksinimini azaltmasına ek olarak, günümüzde artık olarak tanımlanan bazı maddelerin de yararlı olmasına neden olacaktır. Kısacası fermentasyon endüstrisinin yakın gelecekte büyük geliş-

meler göstereceğini tahmin etmek zor değildir. (40)

İleri bir fermentasyon teknolojisinde amilaz enzimlerinin önemi büyük olacaktır. Ham besin maddelerinin en etkin olarak tüketilebilmesi için bu enzimin diğer bazı enzimlerle beraber besin ortamı hazırlanmasında kullanılması gerekecektir.

Gıda endüstrisinde verimini arttırabilmek için enzimi çeşitli amaçlarla daha çok kullanmak zorunluluğunu duyacaktır. Ayrıca, enzimin immobilizasyonu olanağı uygulanma alanlarını genişletecektir.

L İ T E R A T Ü R

1. İngiliz patenti no. 1 133 046 (1968)
2. Fischer E.H. ve Stein E.A., 'The Enzymes', 2. baskı, 4, 313, Academic Press, New York (1960)
3. Caldwell et. al., J. Am. Chem. Soc. 67, 1079 (1945)
4. Vallee B.L. et. al., J. Biol. Chem. 234, 2901 (1959)
5. Hsu J. et. al., Biochem. 3, 61 (1964)
6. Fogarty W.M. et. al., Process Biochem. 7, 11 (1974)
7. Lehninger A., 'Biochemistry', 2. baskı, 264, Worth Publishers, New York (1975)
8. Banks W. ve Greenwood C.T., 'Starch and its components', 211, Edinburg University Press, Edinburg (1975)
9. Griffin P.J., Ph. D. Thesis, National University of Ireland, Dublin (1972)
10. Welker N.E. ve Campbell L.L., J. Bacteriol. 94, 1124 (1967)
11. Welker N.E. ve Campbell L.L., J. Bacteriol. 94, 1134 (1967)

12. Esener A.A., M. Sc. Thesis, University of Birmingham (1975)
13. Coleman G. ve Elliot W.H., *Biochem. J.* 83, 256 (1962)
14. Schafer P., *Bacteriol. Rev.* 33, 48 (1969)
15. Pastan I. ve Pearlman R., *Science*, 169, 339 (1969)
16. Dalhoff A. ve Rehm H.J, Abstracts of papers 'Fifth International Fermentation Symposium', Dellweg H. ed. 8. 07 (1976)
17. Saruno R. et. al., Abstracts of papers 'Fifth International Fermentation Symposium', Dellweg H. ed. 8. 13 (1976)
18. Priest F.G., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 63 (3), 610 (1975)
19. Meers J.L., *Antonie van Leeuwenhoek* 38, 585 (1972)
20. Mazza L.A. ve Ertola R.J., *J. app. Microbiol.* 19, 535 (1970)
21. Bailey M.J. ve Markkannen P.H., *J. app. Chem. Biotechnol.* 25, 73 (1975)
22. Dixon K., Ph. D. Thesis, University of Birmingham (1975)
23. Weinberg E.D., *Adv. Microbiol. Physiol.* 4,1 (1970)
24. Boyer P.D., 'The Enzymes', 3. baskı, V, 233, Academic Press, New York and London (1971)
25. Yoshikava ve Maruo, *Biochem. Biophys. Acta.* 45, 270 (1960)
26. Coleman G., *J. Gen. Microbiol.* 47, (1967)
27. Roels J.A., 0 - 21 Biokinetik, Diktaat 1 - 6, Afdeling der Scheikundige Technologie, Technische Hogeschool Delft (1978)
28. Roels J.A., 'The Application of Thermodynamic Principles in Microbial Energetics', (baskıda) (1979)
29. Roels J.A. ve Kossen N.W.F., 'Progress in Industrial Microbiology' 14' Bull M.J. ed., Elsevier Sc. Publ. Co. Amsterdam (1978)
30. Roels J.A. et. al., 'Optimal estimation of measured and unknown exchange flows in continuous culture and its application to the estimation of heat production' (baskıda) (1979)
31. Cooney C.L. et. al., *Biotechnol. Bioeng.* 19, 55 (1977)
32. Erickson L.E. et. al., *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1595 (1978)
33. Erickson L.E., *Biotechnol. Bioeng.* 21, 725 (1979)
34. Beveridge G.S.G. ve Schechter R.S., 'Optimization', McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo (1970)
35. Burbidge E. ve Collier B., *Process Biochem.* 10, 53 (1968)
36. Malby P.G., *Process Biochem.* 5, 8 (1970)
37. MKC Enzyme, 'Product Information', MKC 058/06/73 (1976)
38. Bergmeyer H.U., 'Methods of enzymic analysis', Academic Press, New York, London (1963)
39. Newsweek, 14 Mayıs 1979 tarihli dergi (1979)
40. Demain A., *Biotechnol. Letters*, 1, 3, 105 (1979)