



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MISIR NIŞASTASINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE
PREBİYOTİK BİR ÜRÜN OLAN
İZOMALTOOLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ

GÖKHAN AYGÜN
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MISIR NIŞASTASINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE
PREBİYOTİK BİR ÜRÜN OLAN
İZOMALTOOLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ

GÖKHAN AYGÜN
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN KOLA

ADANA 2021



Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Gökhan AYGÜN

ÖZET

MISIR NİŞASTASINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE PREBİYOTİK BİR ÜRÜN OLAN İZOMALTOOLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ

Gökhan AYGÜN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KOLA

Ocak 2021, 68 sayfa

Bu çalışmada, bir prebiyotik ürün olan izomaltooligosakkaritin farklı hammadde maltoz şurupları ve farklı beta amilaz ve transglukosidaz enzim dozajları kullanılarak laboratuvar ölçeğinde üretimi amaçlanmıştır. Hammadde %maltoz içeriği, beta amilaz enzim dozajları ve transglukosidaz enzim dozajları gibi parametrelerin elde edilen izomaltooligosakkarit şurubunun IMO fraksiyonları ve toplam IMO yüzdesine etkileri incelenmiştir. HPLC analizi ile her reaksiyon sonucunda elde edilen izomaltooligosakkarit şurubunun IMO fraksiyon dağılımları incelenmiştir. Elde edilen IMO profilinin ticari ürünlere uygunluğu göz önüne alınarak üretim şartları belirlenmiştir. En yüksek toplam IMO içeriği %61.1 olarak elde edilmiştir. Bu çıktıya karşılık gelen reaksiyon şartları; %80 hammadde maltoz değeri, 1.4 kg/TDS beta amilaz enzim dozajı ve 0.70 kg/TDS transglukosidaz enzim dozajıdır. Ek olarak reaksiyon, sıcaklık 61°C, pH 4.5 şartlarında 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: prebiyotik, izomaltooligosakkarit, transglukosilasyon, mısır nişastası, maltoz, şurup, amilaz

ABSTRACT

PRODUCTION OF ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE AS A PREBIOTIC PRODUCT FROM CORN STARCH WITH THE ENZYMATIC METHOD

Gökhan AYGÜN

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Osman KOLA

Ocak 2021, 68 pages

In this study, it was aimed to produce isomaltooligosaccharide, a prebiotic product, in laboratory scale using different raw material maltose syrups and different beta amylase and transglucosidase enzyme dosages. The effects of parameters such as raw material maltose%content, beta amylase enzyme dosages and transglucosidase enzyme dosages on IMO fractions and total IMO percentage of the obtained isomaltooligosaccharide syrup were investigated. IMO fraction distributions of the isomaltooligosaccharide syrup obtained as a result of each reaction by HPLC analysis were examined. The production conditions have been determined considering the conformity of the obtained IMO profiles to commercial products. The highest total IMO content was achieved with 61.1%. The reaction conditions corresponding to this output are; 80%raw material maltose value, 1.4 kg / TDS beta amylase enzyme dosage and 0.70 kg / TDS transglucosidase enzyme dosage. In addition, the reaction was carried out at 61 °C, pH 4.5 for 24 hours.

Keywords: prebiotic, isomaltooligosaccharide, transglucosylation, corn starch, maltose, syrup, amylase

*Bu tezi Türkiye Cumhuriyeti Kurucusu Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e
ithaf ediyorum...*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, tecrübeleri, değerli bilgi birikimi ve tavsiyeleri ile bana yol gösteren, destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman KOLA'ya; destek ve hoşgörüsü ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli eşim Nilcan Onatça AYGÜN'e, annem ve babam Vahide AYGÜN ve Suat AYGÜN'e; her yorulduğumda bana neşe veren ve hayat amacımı hatırlatan çocuklarım Poyraz AYGÜN ve Öykü AYGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans yapmam konusunda beni teşvik eden ve bana her konuda destek olan Sunar Şirketler Grubu Yönetim Kurulu Şeref Başkanı Sayın Hüseyin Nuri ÇOMU, Yönetim Kurulu Başkanı Sayın Mustafa ÇOMU ve CEO'muz Sayın Hasan ÖZKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında analizlerin, deney setlerinin düzenlenmesi ve gerçekleştirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Büşra GÖRGEN ve Nur Beliz AŞKIN'a minnetlerimi sunarım.

Gökhan AYGÜN

Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Nişastanın Yapısı.....	4
2.2. Nişasta Üretimi ve Sıvılaştırma.....	8
2.3. İzomaltooligosakkaritler.....	11
2.4. İzomaltooligosakkaritlerin Üretimi	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.2. Yöntem	32
3.2.1 İzomaltooligosakkarit Üretim Yöntemi	32
3.2.2. Analiz Yöntemleri	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. İzomaltooligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Başlangıç Maltoz Miktarının Etkisi ..	37
4.2. İzomaltooligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Beta Amilaz Enzim Dozaj Miktarının Etkisi.....	41
4.3. İzomaltooligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Transglukosidaz Enzim Dozaj Miktarının Etkisi.....	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	53
EKLER.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Amiloz ve amilopektin yapısı	5
Şekil 2.2. Mısırın yapısı	7
Şekil 2.3. Çeşitli bitkilerden elde edilen nişastaların görünüşleri	7
Şekil 2.4. Mısır nişastası ve türevleri üretim akış şeması	9
Şekil 2.5. Nişasta hammaddesi kullanılarak gerçekleştirilen izomaltooligosakkarit üretim akış şeması	11
Şekil 2.6. İzomaltooligosakkarit kimyasal yapısı	12
Şekil 3.1. Sartorius Stedim markalı Biostat A model Biyoreaktör	29
Şekil 3.2. Pilot iyon değiştirici sistemi	30
Şekil 3.3. Pilot nanofiltrasyon sistemi	31
Şekil 3.4. Döner Buharlaştırıcı	31
Şekil 3.5. İzomaltooligosakkarit üretim akış şeması	32
Şekil 4.1. Hammadde başlangıç %maltoz içeriğine göre zamana bağlı toplam %IMO içeriği	40
Şekil 4.2. Transglukosidaz dozajına göre (kg/TDS) zamana bağlı %maltoz içeriği ..	43
Şekil 4.3. Transglukosidaz dozajına göre (kg/TDS) zamana bağlı %IMO içeriği	44

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Önemli bazı nişasta kaynaklarının kimyasal bileşimleri (%)	4
Tablo 2.2. Bazı nişastaların amiloz ve amilopektin içerikleri (%)	5
Tablo 2.3. Amiloz ve amilopektinin özellikleri	6
Tablo 3.1. İşletme ve laboratuvar koşullarında IMO üretim aşamaları	33
Tablo 3.2. Başlangıç maltoz ürünlerinin elde edilmesi için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları	34
Tablo 3.3. IMO üretiminde kullanılan bileşenler / değişkenler	36
Tablo 4.1. IMO üretiminde farklı parametrelerin kullanımı ile elde edilen IMO fraksiyonları (%) ve toplam IMO içerikleri	38
Tablo 4.2. IMO üretiminde başlangıç maltoz yüzdesi ile IMO fraksiyonları ve total IMO miktarının değişimi	39
Tablo 4.3. IMO üretiminde beta amilaz enzim dozajı ile IMO fraksiyonları ve total IMO miktarının değişimi	42
Tablo 4.4. IMO üretiminde transglukosidaz enzim dozajı ile IMO fraksiyonları ve total IMO miktarının değişimi	43

KISALTMALAR

IMO	: İzomaltooligosakkarit
DE	: Dekstroz Eşdeğeri
TDS	: Ton (Kurumaddede)
α	: Alfa
β	: Beta
BBA	: Barley Beta Amilaz
DP	: Polimerizasyon Derecesi
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
RI	: Refraktif İndeks
IM2	: Polimerizasyon derecesi 2 olan izomaltooligosakkarit
IM3	: Polimerizasyon derecesi 3 olan izomaltooligosakkarit
IMH	: Yüksek polimerizasyon dereceli izomaltooligosakkarit

1. GİRİŞ

İzomaltooligosakkaritler, nişastadan başlayarak enzimatik reaksiyonlar silsilesi ile elde edilebilen α -(1→6) glikozidik bağlar yardımıyla birbirlerine bağlanmış ve Bifidobakteri türleri üzerinde prebiyotik olarak etki gösteren glikoz izomerleri olarak adlandırılmaktadır (Kolida & Gibson, 2007; Cho ve ark., 2014). IMO'lar mısır, soya, pirinç, tapyoka ve buğday gibi doğal nişasta kaynaklarından elde edilebilir. Ancak bu kaynaklardan ekstrakte edilmesi yüksek maliyetlidir. Kimyasal senteze göre daha çok tercih edilen enzimatik sentez, substrat olarak nişastanın; alfa-amilaz, pullulanaz ve transglukosidaz enzimleri kullanılarak parçalanması ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel olarak, IMO 'lar α amilaz, β amilaz ve pullulanaz enzimleri yardımıyla nişastanın hidrolizi ile elde edilir (Ojha ve ark., 2015). İzomaltoz, izomaltotrioz ve panoz; insan bağırsağında bulunan mikrobiyal flora üzerine seçici şekilde oldukça olumlu etki göstermektedir. Fermentasyon sonrasında ortamda laktik asit ve asetat miktarını artırmaktadır (Tuohy ve ark., 2005). IMO farklı yöntemler ile maltoz, nişasta gibi farklı karbonhidratlardan ekstraksiyon, asit ya da enzimatik hidroliz gibi farklı yollar ile üretilir.

IMO'nun kaynağı olan nişasta ve nişasta bazlı şekerler günümüzde şeker kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Elgün 2013). Nişasta bazlı şeker sanayinde elde edilen temel ürünler, doğal ve modifiye edilmiş nişastalar ile glikoz ve fruktoz şuruplarıdır. Son yıllarda ülkemizde kaynağı yine mısır nişastası olan sorbitol, maltitol, sitrik asit, organik asitler gibi katma değerli stratejik ürünlerin sanayi ölçeğindeki üretimi başlamıştır. Ülkemizde sakkaroz (sofra şekeri) pancardan elde edilirken, nişasta bazlı ürünler ise genellikle mısırdan elde edilmektedir. Glikoz şurubu, nişastanın hidroliz edilmesi ile elde edilen ilk ürün olma özelliğindedir ve glikozun izomerizasyonu ile elde edilen ve izoglikoz olarak bilinen ürün ise fruktoz şurubudur (Artık ve ark., 2011). Nişasta hidrolizatı sanayide "liquefact" olarak da adlandırılmaktadır.

Mısır şekerinin gıda sektöründe kullanımı, kalitesi yüksek ürünler üretilmesi ve ihracat pazarında rekabetin artırılması hususunda önem taşımaktadır. Maliyet açısından daha avantajlı olmasının yanında el değmeden üretilmesi ve kalitesinin sürdürülebilir olması durumu da tercih sebebidir (Artık ve ark., 2011).

Şekerleme sektöründe glikoz şurupları ile sofr şekerinin birlikte kullanımı, yarattıkları sinerjik etki ile ürün kalitesine sağladıkları avantajlar sebebi ile tercih edilmektedir (Artık ve ark., 2011). Örneğin, tek başına sakkaroz (sofra şekeri) kullanılarak üretilen sert şekerler, sakkarozun oda sıcaklığındaki çözünürlük değerin sınırlı olmasından dolayı kristallenmektedir. Karamel ve fudge gibi ürünlerde ise ürünün çiğnenebilir olması glikoz şurubu ile sağlanan bir özelliktir (Artık ve ark., 2011).

Ülkemiz’de şeker üretimi kotaya tabidir. Kota, Türkiye genelinde 2 milyon 700 bin ton şekerdir ve bu rakamın %2,5 ‘u olan 67.500 ton’u nişasta bazlı şeker üretim kotasıdır. Türkiye’de şeker sektöründe; 15 adet pancar şekeri, 5 adet nişasta bazlı şeker üreticisi olarak toplamda 20 adet şirket faaliyet göstermektedir. Sektörde ayrıca kota hakkına sahip olmayan, yalnızca ihracat amaçlı üretim yapan 5 adet nişasta bazlı şeker üreticisi bulunmaktadır. Bu bahsedilen beş şirketin yıllık toplam üretim kapasitesi yaklaşık 350.000 tondur. Üretilen ürünlerin tamamı ihraç edilmektedir.

IMO, düşük glisemik indekse sahiptir ve prebiyotiktir. IMO, %15-20 oranında düşük şekerler, %70-80 oranında yüksek şekerlerden oluşmaktadır. Dolayısıyla IMO, hem sindirilebilen hem de sindirilemeyen sakkaritleri içerir. Sakkarozun yaklaşık %40-50’si kadar tatlılığa sahiptir. Şeker ikamesi olarak “sağlıklı gıdalar” kategorisinde yer bulmaktadır. Düşük tatlılık özelliği ile içerisindeki gıdanın tadının daha iyi alınabilmesini sağlar. Yüksek sıcaklık stabilitesi ile fırıncılık ürünlerinde kullanımı uygundur. Günlük diyetdeki lif ihtiyacının bir kısmını sağlayabilmektedir. Düşük su aktivitesi ile mikrobiyal üremeyi önlemeye yardımcıdır. Düşük viskozite özelliği ile de gıdalarda kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Higroskopik özelliği ile gıdalarda nem tutucu özelliği bulunmaktadır. Ayrıca işlenmiş gıdalara hacim ve doku kazandırmaktadır.

Probiyotik bileşenler içeren fonksiyonel gıdalar, faydalarının bilimsel olarak kanıtlanmasıyla umut verici bir pazar olarak yer bulmaktadır. Tüketiciler, son dönemde yaygınlaşan iyi beslenme algısı ile sağlığa fayda sağlayan gıdaları daha fazla tüketir duruma gelmiştir. Prebiyotik tanımı ilk kez Gibson ve Roberfroid tarafından 1995 yılında yapılmıştır (Rolim, 2015). Prebiyotikler, insan ince bağırsağında enzimlerle sindirilmeden kalın bağırsağa geçer. Kalın bağırsakta bulunan bakterilerin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyarak

insan sağlığına faydalı, sindirilemeyen bir gıda bileşeni olarak tanımlanmıştır (Gibson & Roberfroid, 1995; Goffin ve ark., 2011).

Kısa zincirlere sahip karbonhidratlar olarak da bilinen bu prebiyotikler, insan metabolizmasında bulunan sindirim enzimleri tarafından sindirilememektedirler (Li ve ark., 2009; Wang, 2009). Prebiyotiklerin büyük çoğunluğu oligosakkaritler ve polisakkaritlerden oluşmaktadır ve bazı poliollerin de prebiyotik özellikte olduğu belirtilmiştir (Gibson, 2004; O'Donnell & Kearsley, 2012; Al-Sheraji ve ark., 2013).

Prebiyotik özelliğinin yanı sıra sindirilemediğinden dolayı kaloriye dönüşümü zordur, kandaki glikoz seviyesini arttırmaz. Sindirim sistemi sağlığının gelişmesinde rol oynamaktadır. Diş çürümesinin gelişimini azaltmaya yardımcı olduğu görülmektedir. Kolon kanseri riskini azaltmaktadır. Kandaki toksin miktarını azaltır, bağışıklığı güçlendirir.

Bu tez çalışmasında da; 10-11 dekstroz eşdeğerliğindeki nişasta hidrolizatından başlayarak beta amilaz, pullulanaz ve maltojenaz enzimleri ile ultra yüksek maltoz şurubu elde edilecek ve elde edilen ultra yüksek maltoz şurubu farklı şartlar ve enzim dozajlarında transglikozidasyon reaksiyonuna tabi tutulmak suretiyle izomaltoligosakkarit elde edilecektir. Tez çalışmasının amacı değişik maltoz oranlarına sahip ultra yüksek maltoz şuruplarının farklı L-transglikozidaz dozaj miktarlarında reaksiyon hızlarının, oluşan IMO miktarının ve reaksiyon şartlarının incelenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Nişastanın Yapısı

İzomaltooligosakkaritlerin temel hammaddesi olan nişasta; doğal olarak bitkilerin yapısında bulunan ve karbonhidratların en büyük kısmını oluşturan bir polisakkarittir. Nişasta, hayvanlar ve bitkiler için önemli bir enerji kaynağıdır ve insan beslenmesinde de büyük önem taşımaktadır. Başta farmasötik, kağıt ve gıda sanayinde kullanılan glikoz, fruktoz, şeker alkolleri, maltodekstrin ve bazı tatlandırıcılar nişastanın kimyasal -biyokimyasal yollarla parçalanmasından elde edilmektedir (Dziedzic & Kearsley, 1995). Bazı önemli nişasta kaynakları ve bu kaynakların kimyasal bileşen içerikleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Önemli bazı nişasta kaynaklarının kimyasal bileşimleri (%) (Kearney ve Maurer,1990)

Kaynak	Nem	Nişasta	Protein	Lif	Yağ
Mısır	16.7	60.0	8.3	2.2	4.0
Tane Sorgum	15.5	62.0	9.5	2.2	3.1
Buğday	12.5	59.0	10.4	2.2	1.7
Pirinç	12.0	75.0	7.5	0.6	1.7
Patates	78.0	16.5	2.2	0.4	0.1
Tatlı Patates	64.5	25.5	1.5	0.9	0.6
Tapyoka	68.0	25.0	3.0	2.0	0.5

Nişasta, birbirlerine α bağları ile bağlanmış halkalı glikoz birimlerinden oluşan bir karbonhidrattır. Bitkilerdeki fotosentez sonucu oluşur (Storz & Steffens, 2004) .

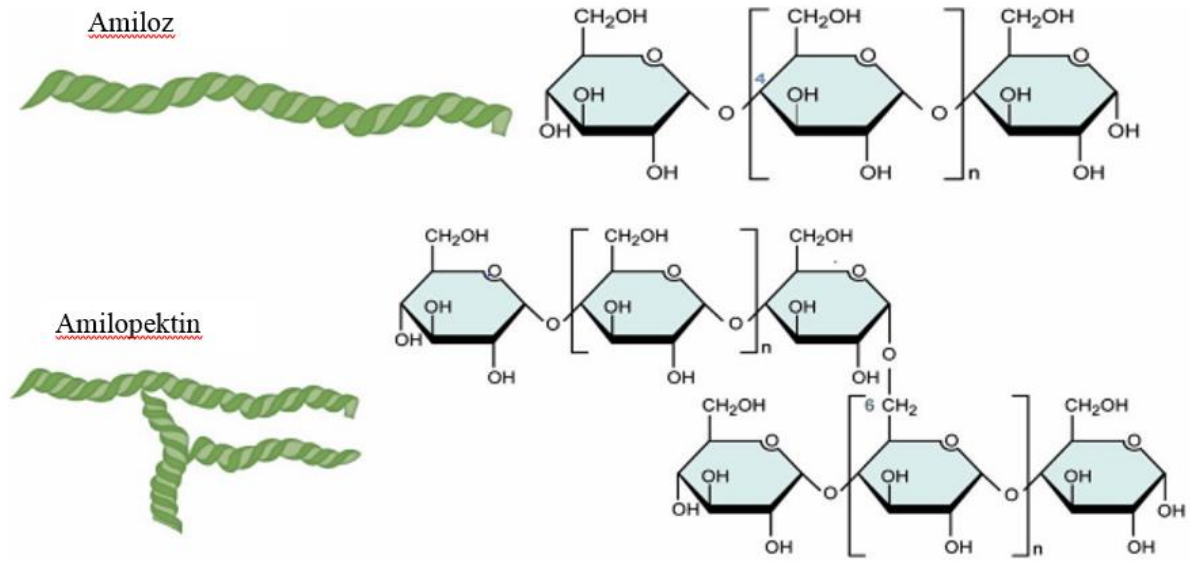


Nişasta, amiloz ve amilopektin adı verilen bileşim ve özellikleri birbirinden farklı iki ögeden oluşur. Kaynağından bağımsız olarak; doğada bulunan nişastalar, amiloz ve amilopektin isimli polimerik yapıdaki karbonhidratlardan oluşmaktadır. Bazı nişasta kaynaklarının amiloz ve amilopektin içerikleri Tablo 2.2.'de verilmiştir. Amiloz, 500-2000 kadar glikoz monomerlerinin α -1,4 bağlantıları ile uç uca eklenmesinden oluşmaktadır. Amilozdan farklı olarak amilopektin yapısında dallanma vardır ve her 24-30 glikoz monomerinden birinde α -1,6

bağlantısı ile yan bir zincir başlamaktadır. Amiloz ve amilopektinin yapıları Şekil 2.1. ve Şekil 2.2.'de sırası ile verilmiştir (Kearney ve Maurer,1990).

Tablo 2.2. Bazı Nişastaların Amiloz ve Amilopektin İçerikleri (%) (Kearney ve Maurer,1990)

Nişasta	Amiloz	Amilopektin
Mısır	28	72
Patates	21	79
Buğday	28	72
Tapyoka	17	83
Waxy Mısır	0	100
Yüksek Amilozlu Mısır	40-70	30-60
Tane Sorgum	25	75
Waxy Sorgum	0	100
Pirinç	17	83



Şekil 2.1. Amiloz ve Amilopektin Yapısı (Heinze & George, 2017)

Amiloz-amilopektin oranları, nişasta kaynağı olan bitkinin botanik çeşidine göre değişkenlik gösterir (Pomeranz, 1985). Amiloz ve amilopektinin özellikleri Tablo 2.3.' de verilmiştir.

Tablo 2.3. Amiloz ve Amilopektinin Özellikleri (Medoff & Masterman, 2010)

Özellikler	Amiloz	Amilopektin
Şekil	Lineer	Dallanmış
Bağ yapısı	α -1,4 (az miktarda α -1,6)	α -1,4 ve α -1,6
Molekül ağırlığı	< 0.5 milyon	50-500 milyon
Film oluşturma	Güçlü	Zayıf
Jelleşme	Sağlam	Yumuşak
İyot rengi	Mavi	Kırmızımsı kahverengi

Günümüzde endüstriyel olarak, nişasta ve nişasta bazlı ürünlerin elde edilmesinde kullanılan en yaygın bitki mısırdır. Buna ek olarak patates, tapyoka, buğday ve diğer bazı tahıllar da bu amaçla kullanılabilmektedir.

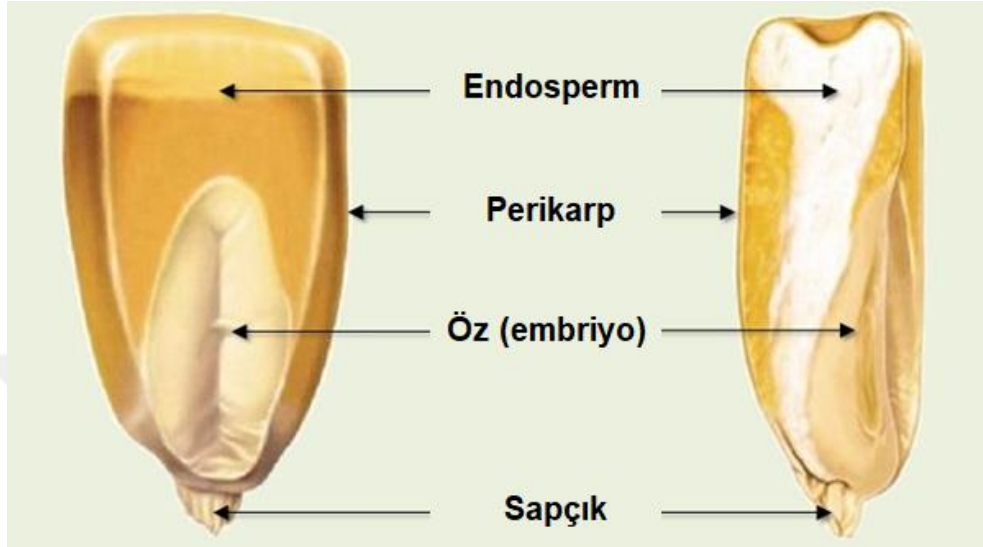
Mısırın sahip olduğu nişasta, protein ve öz miktarı üretim açısından önemlidir. Mısırdan hayvan yemi için yapılan üretimlerde aynı zamanda kepek ve kül miktarı da kontrol edilmelidir. Mısırın (Yellow Dent Corn) bileşimi incelendiğinde; kurumadde bazında nişasta (%71.8±1.5), protein (%9.6±1.1), öz (%4.6±0.5), kepek (%2.9±0.5), şeker(%2.0±0.4)'den oluşmaktadır. Bu mısır çeşidinde nem içeriği ise %15.0±1.0 oranında belirlenmiştir (Blanchard, 1992).

Mısırın yapısında, yaklaşık olarak %70-75 oranında nişasta bulunmaktadır. Mısırdaki bulunan bu yüksek orandaki nişasta ve nişastanın birçok farklı ürüne dönüştürülebileceği göz önünde bulundurulduğunda, mısırın hammadde olarak kullanıldığı proseslerde, temel ürün nişastadır. Mısır yapısında; orta kısımda öz, özün çevresinde protein-nişasta kompleksi ve tüm bunları da tamamen saran kepek (kabuk) kısmı mısıra genel görünümünü vermektedir. Protein ve nişasta iç içe geçmiş bir kompleks yapıdadır. Mısırın yapısı Şekil 2.3.'de verilmiştir (Blanchard, 1992).

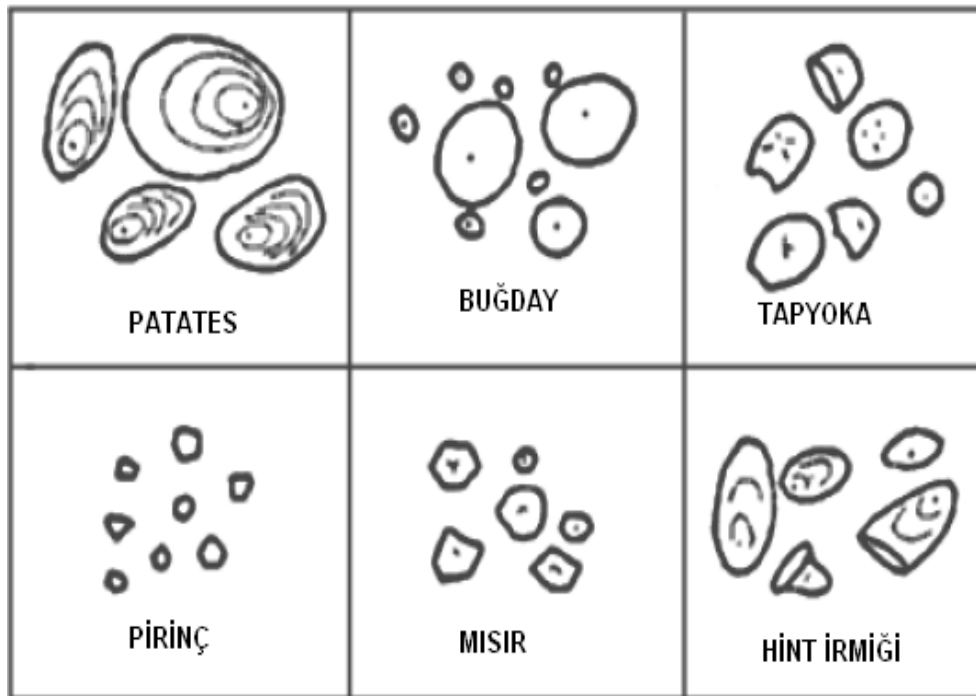
Nişasta kaynaklarının yapıları farklı olduğu gibi fiziksel olarak görünüşleri de farklıdır. Çeşitli bitkilerden elde edilen nişastaların görünüşleri Şekil 2.4.'de verilmiştir.

Farklı türleri bulunan mısır, farklı oranlarda nişasta, amiloz ve amilopektin içerir. Waxy mısırdan elde edilen nişasta yüksek oranda amilopektin ve az miktarda amiloz içerir. Mısırdan

(yellow dent corn) elde edilen nişasta kaynağına bağlı olarak %15-30 oranında amiloz içerir. Nişastanın amiloz/amilopektin oranı, nişastanın sindirilebilirliğini önemli ölçüde etkiler (Yangcheng ve ark., 2013).



Şekil 2.2. Mısırın Yapısı



Şekil 2.3. Çeşitli Bitkilerden Elde Edilen Nişastaların Görünümleri (Medoff & Masterman, 2010)

2.2. Nişasta Üretimi ve Sıvılaştırma

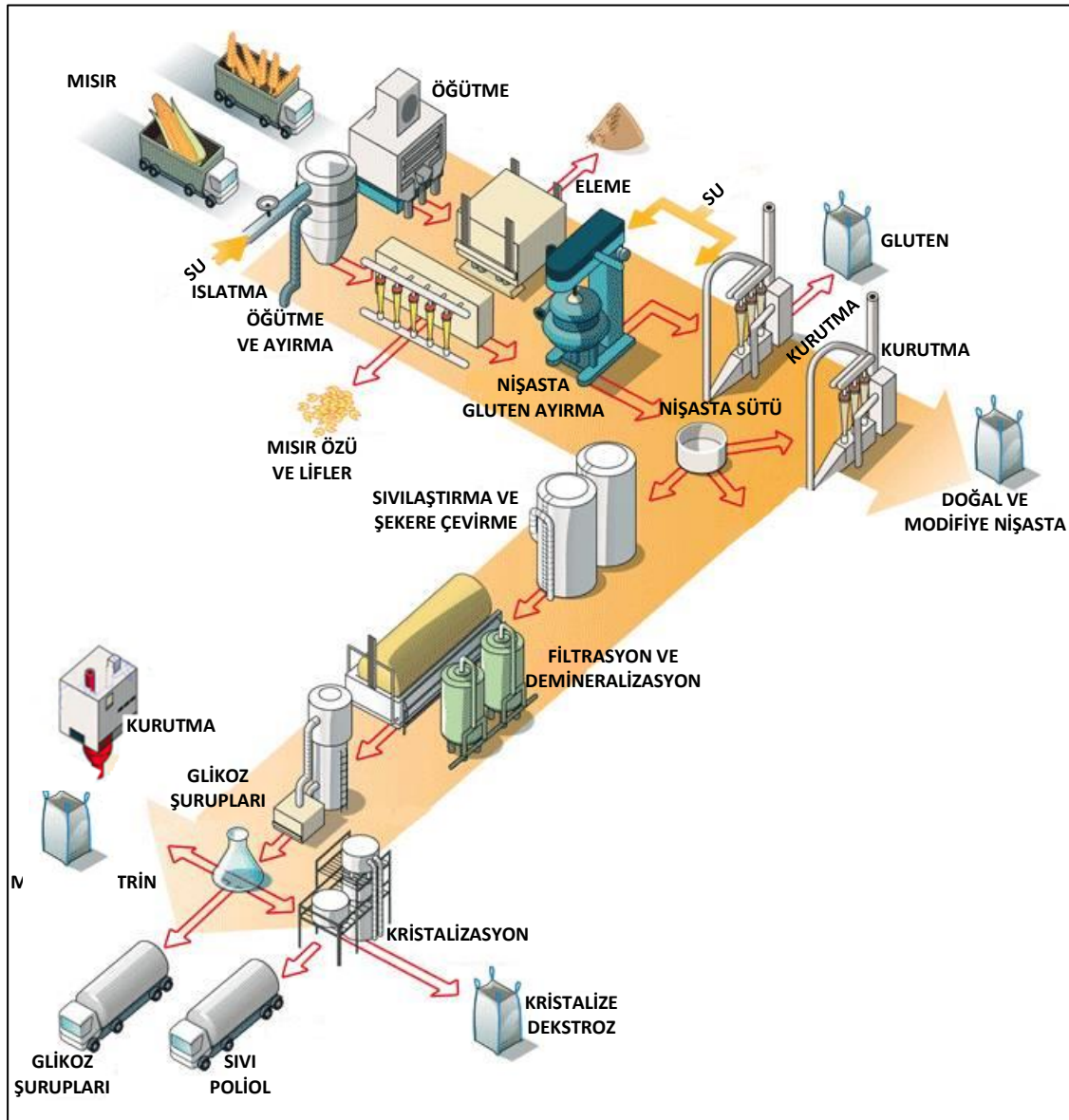
Mısır bitkisi, nişasta ve nişasta bazlı ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bitkilerden biridir. Nişasta, mısırdan yaş öğütme (wet milling) prosesi kullanılarak elde edilmektedir. Mısırın yaş öğütme prosesinde (mısır rafinasyonu), hem mekanik hem de kimyasal teknikler birlikte kullanılmaktadır (Blanchard, 1992).

Yaş öğütme teknolojisinde ilk aşama maserasyon işlemidir. Maserasyonda temizlenmiş tane mısır, kükürtdioksit ilave edilmiş, yaklaşık 49-53 °C’deki suda 36-48 saat süreyle bekletilir. Bu işlem sırasında mısır tanesi yumuşar, su alarak şişer ve mısırdaki mevcut enzimlerin aktivasyonu hızlanır. Böylece dokunun parçalanması kolaylaşır, nişasta ile protein arasındaki etkileşim azalır ve endosperm yumuşar. Maserasyon işlemi sonrasında mısır öğütme işlemine (parçalanmaya) hazırdır. İlk öğütme işleminden sonra mısır, siklonlara aktarılarak mısırdan daha hafif olan embriyo yapısı fiziksel olarak ayrılmaktadır. Kalan kısım tekrar değirmene gönderilir, sonrasında eleme işlemi kullanılarak kepek (kabuk) uzaklaştırılmaktadır. Mısır tanesinden geriye kalan nişasta ve protein kompleksi ise yoğunluk farkı ile santrifüjlenerek ayrılmaktadır. Proteinin ayrılması ile beraber saflaştırılan nişasta sütü (%30-40 kurumaddeli nişasta) elde edilmektedir. Nişasta sütü kurutulurken doğal nişasta üretilmektedir. Nişasta sütü kurutulmadan farklı biçimlerde işlenerek mısır şuruplarına da dönüştürülebilmektedir (Blanchard, 1992).

Nişastanın kendini oluşturan şekerlere ayrıştırılması “Nişastanın Konversiyonu”, “Nişastanın Hidrolizi” veya “Sıvılaştırma” olarak adlandırılmaktadır (Tegge, 1974). Bu dönüşüm derecesi nişastanın sahip olduğu glikozidik bağların parçalanma yüzdesi olan DE (dekstroz eşdeğeri) ile belirtilmektedir. Diğer bir deyişle, DE, her 100 gram glikoz şurubu kurumaddesinde bulunan susuz D-glikozun gram olarak sayısı ile ifade edilir. DE, indirgenme seviyesini, dolayısı ile kararlılığı ve şurubun fonksiyonel özelliklerini de yansıtmaktadır. DE’si 20’nin üzerinde olan nişasta hidrolizatları “şurup (mısır şurubu)” olarak belirtilmektedir. Nişasta hidrolizi işleminde asit, asit-enzim, enzim-enzim konversiyonları birlikte veya ayrı ayrı olarak kullanılabilir. Asit dönüşümünde sadece bazı asitler, asit-enzim hidrolizinde aside ek olarak enzim(ler) ve enzim-enzim dönüşümlerde ise sadece enzim(ler) kullanılmaktadır.

Günümüzde daha çok enzim-enzim dönüşümü tercih edilmekle birlikte, dönüşüm metodu seçimi üretilecek mısır şurubunun çeşidine ve istenen son ürünün özelliklerine bağlıdır. Şurup

üretiminde kullanılacak olan nişastanın; kurumadde bazında toplam protein içeriği %0.35'i, çözünebilir protein miktarı ise %0.015'i geçmemelidir (Blanchard, 1992). Asit ile dönüştürmede nişasta sütü, hidroklorik asit gibi bir asit ilavesiyle yüksek sıcaklıkta ve basınç altında tutularak, glikoz ve yüksek şekerlere parçalanmaktadır. Yüksek şekerler bünyelerinde fazla sayıda glikoz ünitesini bir arada bulundurmaktadırlar. Hidroliz işlemine devam ettikçe, giderek daha fazla sayıda glikoz parçalanır ve sayıları artarak karışımın molekül ağırlığı düşer (Junk ve Pancoast, 1975; Howling, 1984).



Şekil 2.4. Mısır Nişastası ve Türevleri Üretim Akış Şeması

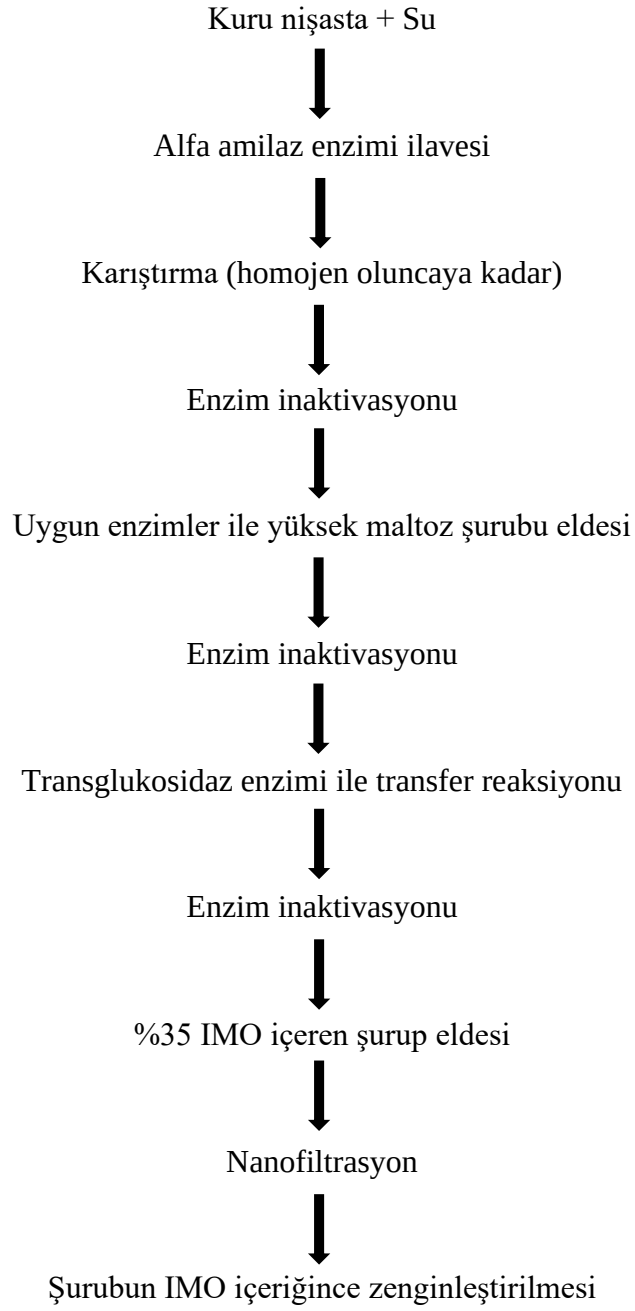
Asitle dönüşüm işlemi basınçlı bir kazanda gerçekleştirilir. Yaklaşık %30-40 kurumadde içeren nişasta sütü (nişasta + su karışımı), seyreltik hidroklorik asit ilavesiyle pH:1.5-2.0 aralığına

getirilerek yüksek sıcaklıkta bir süre bekletilir. Bu aşamada nişasta tanecikleri su alarak şişer ve önce yüksek molekül ağırlıklı şekerlere, işlem devam ettikçe de basit şekerlere (glukoz) parçalanır. İşlem koşulları istenilen DE'ye ulaşılacak şekilde ayarlanır. Nişastanın asitle hidrolizi ile 30-55 DE'li şuruplar elde edilir, DE 55'ten fazla olan mısır şuruplarının üretiminde sadece asit kullanımı yeterli olmayabilir. İstenilen DE değerine ulaşıldığında ortam pH'sı 4.5-5.0 aralığına ayarlanır. Asit hidrolizi ile nişasta rasgele parçalanmaktadır ancak sıcaklık, süre ve asit düzeylerini kontrol altında tutarak oldukça tekdüze bileşimde ürün eldesi mümkündür (Blanchard, 1992).

Asit-enzim hidrolizi ile üretimde, nişasta iki aşamalı bir işlemle parçalanmaktadır. İlk aşamada asit hidrolizi ile nişasta sütü 20-40 DE'li şuruba dönüştürülmektedir. Hidroliz süresi, istenen DE değeri ve şeker kompozisyonu ile belirlenir. Asitliği giderme ve berraklaştırma işlemlerinin ardından şurup, nişastayı parçalama özelliğine sahip enzimlerin (α amilaz, β amilaz ve glikoamilaz gibi) ilavesiyle daha yüksek dekstroz eşdeğerlikli şuruplara dönüştürülebilir. İşlem sonrasında sıcaklık artırılarak ve/veya pH düşürülerek enzim aktivitesi durdurulur (Junk ve Pancoast, 1975). Bu şekilde 26-70 DE'ye kadar değişen değerlerde mısır şurupları üretilebilir (Howling, 1984).

Ayrıca 1970'li yıllarda geliştirilen ısıya dayanıklı bakteriyel amilaz enzimin kullanımı ile daha az asit ortamda hidroliz yapılabilir ve dekstroz verimi %95-97'e kadar artırılabilir (Hebeda ve ark., 1987). Buna ilaveten yüksek miktarda maltoz içeren ve bu nedenle maltoz şurubu olarak tanımlanan mısır şurupları ise ısıya dayanıklı α -amilaz enzimi hidrolizini takiben %70-85 oranında maltoz elde edilene dek amilazlar (α -amilaz, β -amilaz), pullulanaz ve maltogenase enzimlerinin kombinasyonu ile hidrolize devam edilerek üretilebilir (Kearsley & Birch, 1985).

Yunta ve ark. (1994) tarafından yapılan bir tez çalışmasında 10-11 DE'li sıvılaştırılmış nişasta hidrolizatından başlanarak beta-amilaz, pullulanaz ve maltogenase enzimlerinin kombinasyonu ile ultra yüksek maltoz şurupları elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen ultra yüksek maltoz şurupları, malto-oligosakkaritlerin transglukozilasyon reaksiyonları için temel hammadde olarak kullanılabildiği belirtilmiştir (Yun ve ark., 1994). Bu çalışmada, hammadde olarak nişasta kullanılarak gerçekleştirilen isomaltooligosakkarit üretim akış şeması aşağıda Şekil 2.5.'de verilmiştir.

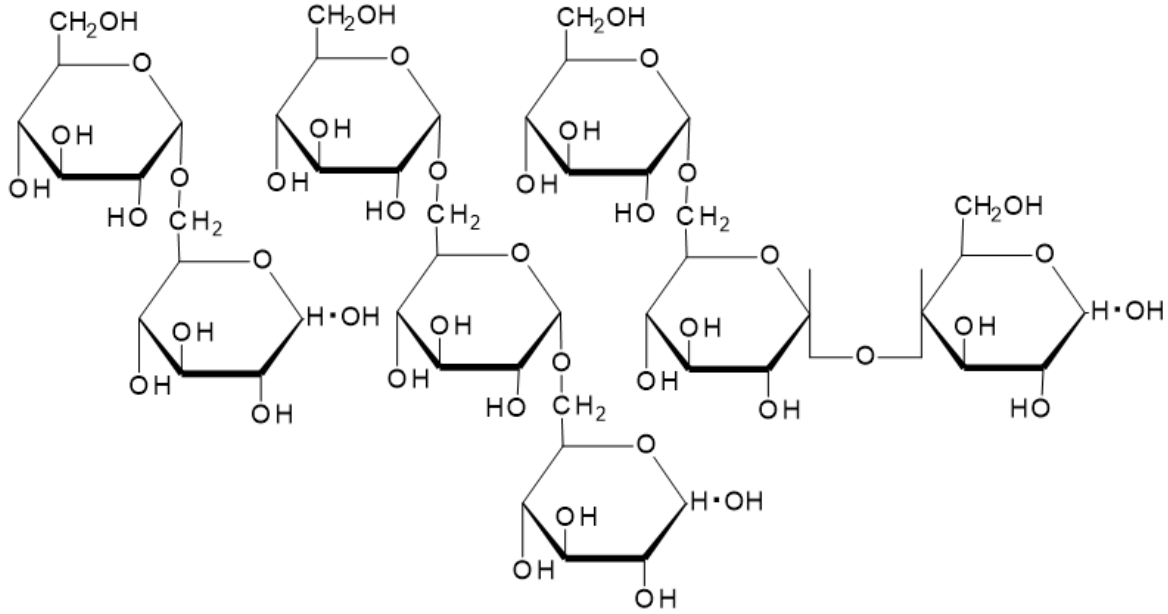


Şekil 2.5. Nişasta Hammaddesi Kullanılarak Gerçekleştirilen İzomaltooligosakkarit Üretim Akış Şeması (Yun ve ark., 1994)

2.3. İzomaltooligosakkaritler

İzomaltooligosakkarit, sindirime dirençli özelliğe sahip olabilen kısa zincirli karbonhidratlardır. IMO, bal gibi gıdalarda doğal olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda nişastanın enzimatik hidrolizi sayesinde ticari olarak üretilebilirler. IMO yapısında α -D-(1→6)-bağı ve α -D-(1→4)-l bağı içeren glikoz oligomerleridir yani izomaltoz, panoz, izomaltotrioz,

izomaltotetroz, izomaltopentoz, nigeroz, kojibioz ve diğer yüksek oranda dallı molekül yapısına sahip oligosakkaritlerden oluşur (Subhan ve ark., 2020).



Şekil 2.6: İzomaltooligosakkarit Kimyasal Yapısı (Sorndech ve ark., 2018)

İnsan vücudunda bulunan enzimler $\alpha(1,4)$ -glikozidik bağı parçalayabilirken, $\alpha(1,6)$ -glikozidik bağına sahip uzun IMO zincirleri insan vücudunda kolaylıkla hidrolize olamazlar. Bu sebeple IMO içeriği gastrointestinal sistemde az miktarda sindirilebilir (Subhan ve ark., 2020).

Farklı ülkelerdeki izomaltoligosakkarit kullanım uygunluk durumu incelendiğinde; IMO ve diğer oligosakkaritlerin kullanımı Çin ve Japonya'nın mevzuat bilgilendirmelerinde onaylanmıştır. Japonya'da IMO, FOSHU (Food for Specified Health Uses) listesinde yer almaktadır (Nakakuki, 2003). Ticari IMO'lar ise enzimatik olarak üretilir ve Japonya'da fonksiyonel gıdaların “diyet karbonhidratlar” sektöründe lider durumdadır (Goffin ve ark., 2011).

2002 yılında Japonya'da alkolsüz içecekler, dondurulmuş yoğurt, şekerleme ürünleri, tatlandırıcılar, kurabiyeler, kahve içeceği karışımları, ekmek, tofu, çikolata ve çorba karışımları gibi FOSHU gıdalarının %50'den fazlası fonksiyonel bileşen olarak oligosakkaritleri içermektedir (Nakakuki, 2003).

2009 yılında, Kanada merkezli BioNeutra şirketi, IMO için FDA-GRAS ve Health Canada onayını almıştır. GRAS bildiriminde, in vitro ve in vivo hayvan ve insan çalışmaları oral tüketimi takiben maltoz-oligosakkarit fraksiyonunun karışımın yanı sıra izomalto-disakkaritler, gastrointestinal sistemde hidrolize edildiğinden bahsedilmiştir. Vücut tarafından daha sonra metabolik yolla emilir ve vücut fonksiyonları için gereken enerji olarak kullanılmaktadır. GRAS bildirimine göre geriye kalan sindirilmemiş IMO'lar gastrointestinal sistem boyunca ilerler ve bakteriyel fermantasyona uğrarlar ve kısa zincirli yağ asitleri oluşturmaktadırlar (Larowe & Cappellen, 2011a).

Son otuz yılda fonksiyonel gıda pazarı dünya genelinde gıda endüstrisinin hızla büyüyen bir bölümü haline gelmiştir. Bağırsakların mikrobiyal ekolojisinin prebiyotikler ve probiyotikler kullanılarak düzenlenmesi, onlarca yıldır bilimsel çalışmalarda ve tüketiciler arasında özel ilgi kazanmıştır. Bununla beraber son yıllarda prebiyotikler, sindirim bariyerine direnç, düşük maliyet, az risk, yeni teknik özellikler sağlama ve diyetle dahil edilmesinin kolaylığı gibi avantajlarından ötürü probiyotiklerin yerini alma eğilimindedir. Prebiyotikler, sindirim sisteminden kolona geçen ve insan/hayvan kolonuna özgü faydalı bakteri popülasyonlarının aktivitesini seçici olarak uyaran sindirilemeyen diyet bileşenleridir. Bu prebiyotiklerin arasında en dikkat çekici olanlardan biri sindirilemeyen oligosakkaritlerdir. Bu fonksiyonel oligosakkaritler arasında IMO, gıda endüstrisindeki uygulamalar için birçok elverişli özelliği sayesinde yıllar içerisinde en çok tercih edilen oligosakkarittir. IMO, benzersiz özellikleri ile gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında fazlaca ilgi görmektedir. En önemli özelliği ve özellikle Asya ülkelerindeki başarısının anahtarı prebiyotik karakteridir. Daha iyi bir bağırsak sağlığı, mineral emilimi, kolesterol regülasyonu, bağışıklığın yanı sıra çeşitli hastalıklara karşı direnç sağlamaktadır. Diğer önemli özellikleri ise; anti-karyojeniktir, fermente edilemez, düşük tatlılığa sahiptir. Düşük viskozite ve nem tutma özelliği vardır. Gıda dokusunu korur ve bozulmayı geciktirir. IMO'lar doğal olarak miso, sake veya soya sosu gibi çeşitli fermente gıdalarda ve aynı zamanda balda bulunmaktadır (Goffin ve ark., 2011).

European Parliament and of the Council tarafından 1997 yılında yeni gıdalar ve yeni gıda bileşenleri ile ilgili hazırlanan yayında, izomaltooligosakkarit içeriğinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisinin bulunmaması konusu incelenmiştir. İzomalto oligosakkarit içeriği günümüzde hem düşük kalorili olması (1.5-2 kalori/gram) hem de gastrointestinal sağlığı koruması, ayrıca prebiyotik ve diyet lif olması sebebiyle gıda sektöründe sıkça

kullanılmaktadır. IMO, dondurulmuş yoğurt, gazsız içecekler, şekerlemeler, kurabiye, ekmek ve pastacılık ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. IMO karışımındaki maltoz-oligosakarit fraksiyonu ve disakkaritler sindirim sisteminde büyük ölçüde glikoza hidrolize olur ve bu daha sonra ince bağırsakta emilir ve kullanılır. Kalan sindirilmemiş IMO, gastrointestinal sistemden geçer ve kalın bağırsakta bakteriyel fermentasyona uğrar. Genelde, izomaltooligosakaritlerin karışımları hem sindirilebilir hem de sindirilemeyen sakkaritlerden oluşur. Sindirilemeyen oligosakkaritler, ince bağırsaktan absorbe edilmeden geçer ve kalın bağırsakta mikrobiyal fermentasyona maruz kalır (Qureshi, 2008). Yedi kişiden oluşan yetişkin erkek denek grubunda yapılan bir çalışmada, 30 gün boyunca 8-24 g aralığında izomaltooligosakkarit tüketiminin etkileri gözlemlenmiştir. Çıkan sonuçlara göre bu kişilerin kandaki glikoz miktarlarında, toplam proteinde, trigliserid, yüksek yoğunlukta lipoprotein kolestrollerinde ve kalsiyum değerlerinde deney süresince kayda değer bir değişim gözlemlenmemiştir (Chen ve ark., 2001). Ek olarak, bir takım hayvan toksisite çalışmaları da yapılmıştır. Çeşitli oligosakkaritlerin, kan lipid seviyeleri ve bağırsak fizyolojisi üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için yapılan bu çalışmada, standart keklerin sakkaroz içeriğinin %40'ı IMO karışımı ile değiştirilmiş ve yetişkin Sprague-Dawley cinsi farelere bu kekler verilmiştir. 25 günlük deney süresi boyunca denek farelerin günlük tüketimi sonucu yaklaşık 6 g IMO/kg vücut ağırlığı olmuştur. Sonuç olarak denek grubu standart sakkaroz içerikli kek verilen kontrol grubundaki fareler ile kıyaslandığında kayda değer bir farklılık görülmemiş; vücut ağırlığı artışı, gıda tüketim etkinliği, kan üre nitrojen (BUN) seviyesi ve karaciğer ağırlığı incelendiğinde iki grubun da yakın değerlere sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak IMO karışımlarının tüketimiyle ilgili herhangi bir sistemik toksisite riski olmadığı belirtilmiştir (Larowe & Cappellen, 2011b).

Niştastadan elde edilen izomaltooligosakkaritler, fonksiyonel gıda sektöründe diyet karbonhidratların yaygın olarak kullanılan bir türüdür. Malto-oligosakkaritlerin aksine isomalto oligosakkaritler (IMO), daha yüksek bifidojenik etkiye sahiptir. IMO'nun tadı göreceli olarak hafiftir ve üretim maliyeti düşüktür. Bu oligosakaritler, düşük tatlılık, düşük viskozite ve hacim oluşturma gibi istenen fizikokimyasal özelliklere sahiptir. IMO'lar, diyabet hastalarının tüketimine uygun, diş çürümesine sebep olmayan veya bağırsak florasını iyileştiren etkiye sahiptir. IMO, diğer prebiyotik oligosakkaritlerin aksine, bağırsak geçişi sırasında önemli ölçüde sindirim meydana getirir. Bu bileşenin büyük bir kısmı bağırsağa ulaşır ve bağırsak enzimleri geri kalanını parçalayarak kan şekeri seviyelerinde bir artışa yol açar. Bu nedenle IMO'nun bir kısmı, bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilmek üzere midede

parçalanmaz. In vitro fermentasyon çalışmaları, IMO'nun bifidobakterilerin seçici proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. İnsanların beslenme düzeniyle ilgili yapılan araştırmalarda izomaltoligosakkarit içeren ürünlerin tüketiminin sağlık üzerine faydalı etkileri tespit edilmiştir. Yetişkin insanlarda 10 g/gün IMO alınması bağırsak hareketini uyarıcı etki yaptığı görülmüştür. Sonuç olarak, izomaltoligosakkaritlerin, inulin veya oligofruktoz gibi diğer tipik oligosakkaritlerden daha yüksek bifidojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Meyer ve ark., 2015).

1994 yılında yapılan bir çalışmaya ve sonuçlarına göre; izomaltoligosakkaritler, diğer oligosakkaritlerle kıyaslandığında tadı yumuşak ve üretim maliyeti nispeten ucuz olması sebebiyle ilgi görmüş ve 1980'lerin başından beri ticari olarak üretilmiştir (Yun ve ark., 1994).

Izomaltoligosakkaritler yapıları, çözünürlük, tatlılık ve viskozite talebine bağlı olarak farklı gıda uygulamaları için kullanılmaktadırlar (Sorndech ve ark., 2018). IMO, yiyecek ve içeceklerde kullanılabilen tatlandırıcı bir üründür. Tatlandırıcı olarak IMO'yu dahil edebilecek yiyecek ve içecekler örneğin, gazlı içecekler, soya sütü, meyveli içecekler, çay, bira, şarap, şekerler, çikolata, bisküviler, kurabiyeler, kekler, ekmek ve diğer pastacılık ürünleridir. Ticari olarak üretilen IMO, gıdalarda uygulama için tercihen genellikle beyaz bir toz veya berrak şurup formundadır (Dinges & Llp, 2009).

Bugüne dek IMO üretim teknolojisiyle ilgili çok sayıda patent başvurusu yapılmış ve bunların sayısı özellikle Asya, ABD, Avrupa, Avusturalya, Yeni Zelanda ve Kanada pazarlarında artış göstermiştir. Bu ürünlerin popüleritesinin artmasının sebebi, sağlığa faydaları ve verimli pazarlamadır. Çok sayıda in vitro ve in vivo test; IMO'ların diğer etkilerin yanı sıra potansiyel sağlık yararlarını, kanser riskini azaltmayı, serum triglisderidini düşürmeyi, bifidobakteriler ve laktobasil gibi yararlı bağırsak mikroplarının düzeylerini artırmayı ve bağırsak epitelyal üst yapısındaki hasarın onarımını sağladığını desteklemektedir (Sorndech ve ark., 2018).

Bir patentte, izomaltoligosakkarit içeriğine sahip uygulama alanları ve IMO Pazar talebinden bahsedilmiştir. IMO içeren ürünler için Pazar talebi oldukça geniştir. IMO ürünleri, amaçlanan uygulamaya bağlı olarak toz veya sıvı formda olabilmektedir. Potansiyel uygulamaların çoğu gıda alanındadır. Örnek olarak; çeşniler, şekerlemeler, işlenmiş meyve ve sebzeler, et ve balık ürünleri, unlu mamuller, hazır pişmiş gıdalar, konserve ve şişelenmiş gıdalar, hazır yiyecekler,

ham alkollü içecekler ve alkolsüz içecekler sıralanabilir. IMO ayrıca hayvan yemlerinde de besinsel içerik olarak kullanılabilmektedir. Gıda dışı kullanım alanları ise kozmetik ve ilaçtır. Oligosakkaritlerin prebiyotik etkisi, kalın bağırsakta bifidobakterilerin ve laktobasillerin sayısını artırmak ve çürük bakterilerin konsantrasyonunu azaltmaktadır. Bifidobakteriler, ya asit oluşumu ya da anti-mikrobiyal aktivite ile patojenlerin büyümesinin engellenmesi gibi sağlığı geliştiren bazı özelliklerle ilişkilidir. Ayrıca bağışıklık sisteminin modülasyonu (anti-tümör özellikleri) trigliserit ve kolesterol seviyelerinin azalması, vitamin üretimi (B grubu), kan amonyak konsantrasyonlarının azaltılması, önlenmesi gibi çeşitli etkilerle ilişkilendirilmiştir (Shetty ve ark., 2011).

2.4. İzomaltooligosakkaritlerin Üretimi

Izomaltooligosakkarit üretiminde kullanılan enzimler başlangıçta kullanılan hammaddeye göre değişkenlik göstermektedir. Hidrolaz ve transferaz familyalarındaki çeşitli enzimlerin di-, oligo- ve polisakkarit substratlarının IMO üretimi için kullanıldığı bilinmektedir. Örneğin hammadde olarak maltoz kullanılan çalışmalarda genellikle α -glukosidaz enzimi tercih edilmiştir. Substrat olarak dekstran kullanıldığında ise endodekstran enzimi ya da Cycloizomaltooligosaccharide glucanotransferase enzimi kullanılmıştır. Nişasta için α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri reaksiyonda birlikte görev almaktadır. Buna ek olarak nişastanın hammadde olduğu farklı çalışmalarda α -amilaz enzimi ile birlikte ayrı ayrı maltojenik α -amilaz, β -amilaz, pullulanaz ya da invertaz enzimleri kullanılmış ve izomaltooligosakkarit elde edilmiştir. Nişasta yerine dekstrin kullanıldığında ise α -amilaz enzimi ile beraber α -transglukosidaz enzimi sayesinde IMO elde edilmiştir (Sorndech ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada, nişasta hammaddesi olarak patates artığı ve kırık pirinç kullanmış, oluşan nişasta hidrolizatının sakkarifikasyonu için fungal α -amilaz (Fungamyl 800L), transglukosidasyon için α -glukosidaz (Transglucosidase L, Amano Enzymes) kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan hammaddeler, değerleri göreceli olarak düşük veya zirai üretim artığı olan patates artığı ve kırık pirincin değerlendirilmesi için de uygundur. Örneğin; kırık pirinç genellikle bira üretiminde kullanılan %60-70 nişasta içeren düşük değerli bir hammaddedir. Patates artığı ise yapısında %60 nişasta içeren genellikle hayvan yeminde kullanılan zirai hammadde artığıdır. Farklı hammaddeler ile üretilen şuruplarda toplam izomaltooligosakkarit konsantrasyonunun deneme genelinde patates artığı ile kırık pirinçten elde edilen nişasta ile yapılan reaksiyona göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Oluşan şurubun IMO

konsantrasyonu g/L cinsinden izomaltose 13.83, maltotrioz 5.58, panoz 39.40, tetrasakkaritler (DP4) 16.1, pentasakkaritler (DP5) 11.29 ve diğer yüksek oligosakkaritler ($\geq$ DP6) 8.86 olarak elde edilmiştir. 2016 yılında yayınlanan bu çalışmada enzimler eş zamanlı olarak kullanılmış (SST) veya sırasıyla eklenerek (CST) reaksiyon sürdürülmüş, böylece iki farklı yöntem ile deneme gerçekleştirilmiştir. CST yöntemi ile toplam IMO seviyesi 24 saatte 89.66 ± 2.64 g/L ulaşırken, SST yönteminde 95.08 ± 1.22 g/L toplam IMO elde edilmiştir. SST ile aynı miktarda izomaltooligosakkarit CST yöntemine göre daha kısa reaksiyon süresinde elde edilmiş, bu sayede verimlilik artmıştır. Üretim maliyeti ise CST'ye göre azalmıştır. SST sisteminde glikoz birikimi (86.43 ± 4.66 g/L) CST'ye göre (109.87 ± 3.03 g/L) daha düşüktür (Basu ve ark., 2016).

IMO genellikle endüstriyel olarak nişasta hidrolizatlarından (maltoz veya maltodekstrin) alfa transglukosidaz enzimi yardımıyla üretilmektedir. IMO üretiminin alternatif bir yöntemi ise pullulanaz ile birleştirilmiş alfa amilaz ve transglukosidaz kullanımıdır. Substrat doğası ve transglukosilasyon reaksiyonu nedeniyle, IMO şurupları genellikle düşük DP, yani zararlı sindirilebilir oligosakkaritler ve monosakkaritler içerir. Maya fermantasyonu, membran ayırma işlemi ve kromatografi gibi çeşitli saflaştırma yöntemleri uygulanabilmektedir. Enzimatik üretim yönteminin bazı dezavantajları vardır. Proses basamaklarının bazıları, nihai üründe istenmeyen mono ve/veya oligosakkaritlerin üretimine yol açan polisakkaritlerin jelleştirilmesi, sıvılaştırılması, sakkarifikasyonu ve hidrolizini gerektiren çok aşamalı işlemlerdir. Bu sindirilebilir yan ürünler; ürünün sağlık açısından yararlarını ve ticari değerini önemli ölçüde azaltabilir. Membran filtrasyon işlemi, mono ve disakkaritleri üründen uzaklaştıran ve daha yüksek DP'ye sahip diğer oligosakkaritleri tutan bir saflaştırma yöntemidir. Bununla beraber bu işlem maliyetli ekipman gerektirmektedir, verimliliği düşüktür ve disakkaritlerin aktif bileşimlerinin kaybına yol açar. Diğer bir yöntem, mono ve disakkaritlerin iyon değişim kromatografisi veya monosakkaritlerin aktif karbon kolonu ile uzaklaştırılması basamaklarını içeren adsorpsiyon-ayırma işlemidir. Özellikle izomaltos, zeolit veya tuzdan arındırılmış beta-zeolit kullanılarak IMO karışımından ayrılabilir. Bununla beraber, kolon kapasitesi düşüktür ve bu nedenle birden fazla geri dönüşüm adsorpsiyonu işlemi gereklidir (Goffin ve ark., 2011).

2011 yılında yapılan bir patent çalışmasında, IMO'ları içeren substrat ve tane bileşimlerinin üretimi için yöntemler tarif edilmektedir. IMO'lar, bir D-glukosiltransferaz kullanılarak enzim katalizli transglukosilasyon reaksiyonu ile sentezlenir. Bu enzim, alfa-D-glukooligosakkaritler

ile inkübasyon sırasında hem hidrolitik hem de transfer reaksiyonlarını katalizler. Transfer en sık olarak 6-OH'ta (glikoz molekülünün 6. hidroksil grubu) meydana gelir ve D-glikozdan izomaltoz veya maltozdan panoz üretilir. Enzim ayrıca kojibiyoz veya nigeroz oluşturmak için D-glikozun 2-OH veya 3-OH'ına veya yeniden maltozu oluşturmak için 4-OH'a aktarılabilir. Transglukosidaz reaksiyonlarının bir sonucu olarak, malto-oligosakkaritler izomaltooligosakkaritlere dönüştürülür. İzomalto oligosakkaritler, yüksek katı konsantrasyonundaki glikoz şuruplarının (%60-80) glukoamilaz ile muamele edilmesi ile de üretilebilir. Esas olarak DP2 olmak üzere izomaltooligosakkaritlerin oluşumu ile sonuçlanır. Reaksiyonu hidroliz lehine (normal yöntem tersine) çevirmek için yüksek kurumadde seviyeleri mevcuttur (Shetty ve ark., 2011).

Buğday, arpa, mısır gibi tahıllar; un, nişasta ve nişasta hidrolizatları (glikoz, fruktoz, yüksek maltoz şurubu vb.) gibi birçok katma değerli fonksiyonel gıda bileşenlerinin ticari üretimi için mükemmel hammaddelerdir. Yüksek seviyede maltoz içerikli şurup, birçok mikrobiyal fermentasyonda antibiyotik, ilaç, aşı, biyokimyasal üretiminde karbon kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Alkol, aminoasitler, organik asitler vb. ve son zamanlarda fonksiyonel sağlık/gıda oligosakkaritlerinin üretiminde kullanılır. Maltoz şurupları gibi nişasta hidrolizatının üretimi için geleneksel bir işlemde, nişasta genellikle sıvılaştırma ve maltojenik alfa amilaz enzimleri ile hidroliz edilir. Maltoz, 1-4 glikozidik bağ ile bağlanan iki glikoz molekülünden oluşan bir disakkarittir ve malto oligosakkarit ailesinin en küçüğüdür. Yüksek maltoz şurubu, izomaltooligosakkaritlerin endüstriyel ölçekli üretimi için önemli bir hammadde niteliğindedir (Shetty ve ark., 2011).

Sakkarozun hammaddesi dekstransukroz (*Leuconostoc mesenteroides*'den elde edilen 1,6-(a)-D-glucan 6-(a)-D-glucosyltransferase) ve dekstranaz (*Penicillium lilacinum*'dan elde edilen 1,6-(a)-D-glucanhydrolase) enzimleri kullanılarak "recycle-membrane" reaktörü ile izomaltooligosakkarit üretimi üzerine çalışmışlardır. Reaksiyonda sakkaroz hammaddesinden dekstransukroz ve dekstranaz enzimleri yardımıyla glikozil birimlerinin hidrolizi sonucu dekstran oluşur. Dekstran molekkülleri dekstranaz enzimi tarafından rastgele hidrolize edilir ve oligodekstranlar ile oligosakkaritler oluşur. Halihazırda ticari olarak üretilen ve kısa molekül zincirlerinden oluşan izomaltooligosakkarit içerikli ürünler ile ilgili problem; bu ürünlerin ince bağırsakta kısmen emiliminin gerçekleşmesi ve prebiyotik verimliliğinin bu sebeple göreceli olarak düşük olmasıdır. Bu problemi ortadan kaldırmak amacıyla dekstran enzimi ile membran

reaktöründe yapılan çalışmalar ürünün moleküler ağırlığının kontrolünde fayda sağlayacaktır. Daha büyük molekül ağırlığına sahip şeker türleri ince bağırsakta daha düşük emilime sahiptir. Bu çalışmada reaksiyon ürünlerinin moleküler ağırlık dağılımı yüksek performanslı boyut kromatografisi ile belirlenmiştir (HPSEC). Bu çalışmada elde edilen ürünün azalan moleküler ağırlık ile bağırsaktan emiliminin arttığı düşünüldüğünde, bu tür ürünlerin halihazırda var olan daha yüksek molekül ağırlıklı şekerler içeren ticari IMO karışımlarına göre daha iyi prebiyotik aktiviteye sahip olacağı konusunda araştırmalar devam etmektedir. Artan substrat konsantrasyonları ile polimerizasyon derecesi 5'ten büyük IMO ve oligodekstran konsantrasyonları artmıştır, ancak kullanılan dekstranaz enzim miktarı, bu şekerlerin konsantrasyonları üzerinde daha önemli bir etkiye sahip olmuştur. Reaksiyon sonucunda, IMO (DP>5) ve oligodekstranlar, ürünün toplam şekerinin %35'inden fazlasını oluşturmaktadır (Goulas ve ark., 2004).

Yapılan bir çalışmada (Kuriki ve ark., 1993), nişastadan izomaltooligosakkarit şurubu üretiminde ilk kez neopullulanaz enzimini kullanılmıştır. Neopullulanaz, pullulan hidrolizasyonu için kullanılan *Bacillus stearothermophilus*'tan üretilmiş yeni bir enzimdir. Bu enzim, panoz üretmek için esas olarak pullulanın α -(1-4) glikozidik bağlantılarını hidrolize eder. Çalışmalarda görüldüğü üzere, neopullulanaz, yalnızca α -(1-4) glikozidik bağları değil, aynı zamanda birkaç dallı oligosakkaritin α -(1-6) glikozidik bağlarını da hidrolize eder. Neopullulanaz enzimi ile yapılan çalışma sonucunda IMO verimliliği %60 olan şurup elde edilmiştir. Bu yeni sistem geleneksel sistemden daha basittir; yöntemde sadece iki enzim, neopullulanaz ve α -amilaz kullanılır. Oysa klasik yöntem dört enzim, α -amilaz, pullulanaz, β -amilaz ve ct-D-glikozidaz kullanır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan yeni yöntem (Glikoz %20) ile klasik izomaltooligosakkaritçe zengin şurup üretim yöntemlerine (Glikoz %40) göre daha az glikoz içeren şurup elde edilmiştir (Kuriki ve ark., 1993).

İzomaltooligosakkaritler, alfa 1-4 ve alfa 1-6 glikozidik bağlarının karışımına sahip oligosakkaritlerdir. IMO'lar; izomaltoz, panoz, izomaltotrioz, izomaltotetraoz, izopanoz ve fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, xylooligosakkaritler ve gentiooligosakkaritler gibi diğer yüksek dallı oligosakkaritleri içermektedir. IMO üretimi, karmaşık bir enzimatik işlem yolu ile gerçekleşir, bu sayede hammadde bir maltoz şurubuna dönüştürülür. Ardından IMO'lar enzimle kataliz edilen bir transglikozidik reaksiyon ile sentezlenir. IMO, fonksiyonel sağlıklı gıda oligosakkaritleri (FHFO) olarak sınıflandırılan bir grup oligosakkarittir. IMO'lar,

düzenli olarak tüketildiğinde sağlıkta bir iyileşme ile ilişkilendirilmiştir ve prebiyotikler olarak adlandırılmıştır. Prebiyotikler, faydalı mikroorganizmaların büyümesini uyararak birey üzerinde bazı biyolojik etkiler gösteren sindirilemeyen maddeler, örneğin diyet lifi olarak tanımlanır. IMO, yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı bir ürün olarak kullanılabilir (Kuriki ve ark., 1993). EP2422630A1 no'lu patentte bir IMO bileşimi elde etmek için nişasta bulamacının sıvılaştırma enzimi ile muamele edilmesi, ürünün bir maltojenik enzim ve bir invertaz ile muamele edilmesi ile ilgili bir yöntem açıklanmaktadır. Burada maltojenik enzim ve invertaz, IMO üretmek için ayrı ayrı, sırayla veya aynı anda kullanılabilir. Patentte oligosakkaritleri, özellikle IMO'yu üretmeye yönelik yöntemler açıklanmaktadır. Patentte yer alan örneklerde, maltoz bazlı mısır şurubu substratından IMO üretmek için *Aspergillus niger* invertazı kullanılmıştır. Ayrıca başka bir kaynaktan elde edilen (*Aspergillus oryzae*) üretilen bir invertazın da kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Maltozun hidrolizi ve transglukosilasyonu, IMO için çok önemlidir. Konvansiyonel IMO üretimi, iki aşamalı bir sakkarifikasyon ile gerçekleştirilir. İki reaksiyon, ayrı veya sıralı maltojenik ve transglukozidik reaksiyonları içermektedir. Geleneksel yöntem kullanılarak ise, beta-amilaz önce maltoz şurubu üretmek için sıvılaştırılmış şurup ile reaksiyona sokularak daha sonra IMO üretmek için transglukosidaz ilave edilmiştir. Bununla birlikte, geliştirilmiş eşzamanlı yöntem kullanılarak beta-amilaz enzimi varlığında IMO üretimi için sıvılaştırılmış şuruba invertazın birlikte eklenmesi de mümkündür. Sonuç olarak, *Aspergillus niger*'den elde edilen bir invertazın önceden keşfedilmemiş bir transglukozidik mekanizma yolu ile bir maltoz substratından IMO üretme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu invertaz enzimi bir maltoz substratı ile temas etme ve reaksiyona girme yeteneğine sahip olma gibi beklenmedik bir özellik göstermiştir. İnvertaz enziminin IMO üretimini geliştirerek reaksiyon için gereken süre ve enerjiyi azalttığı belirtilmiştir (David & Data, 2015)

İzomalto oligosakkarit şurupları; izomaltoz, panoz, izomaltotrioz, izomaltotetraoz, nigeroz, kojibioz, izopanoz ve daha yüksek dallı oligosakkaritler gibi önemli miktarlarda dallı oligosakkaritler içerir. Ürünler kullanım amacına göre toz veya sıvı formda üretilmektedir. IMO'nun standart üretim yöntemi mısır, patates veya tapyoka nişastasının %30 kurumaddelik bir bulamacının ısıya dayanıklı bir alfa amilaz enzimi ile 6-10 DE'ye sıvılaştırılmasıyla başlar. Bu sıvılaştırılmış ürün pH 5 ve 60 °C'ye getirilir, ardından beta amilaz ve transglukosidaz eklenir. Sakkarifikasyon 48-72 saat devam eder. Sakkarifikasyon süresinin sonunda şurup filtrelenir ve aktif karbon-iyon değiştiriciler ile rafine edilir. Saf ürün son olarak yaklaşık %80

kurumaddeye getirilir. Kullanılan beta amilaz soya fasulyesi veya buğday kaynaklıdır. Transglukosidaz ise çoğunlukla bir mantar, tercihen *Aspergillus niger* kaynaklıdır. Diğer üretim yöntemlerinden biri, nişasta hidrolizatının bir alfa amilaz ve transglukosidaz karışımı ile dönüştürülmesini ve nişastanın yüksek DP3 veya DP4 oluşturunca alfa amilazlar ve dallı oligosakkaritler üretmek için transglukosidaz enzimlerinin birlikte kullanılmasını içerir. İzomalto oligosakkaritlerin üretimi için çözünür enzim sistemleri fazlaca dikkat çekmiştir. Hareketsizleştirilmiş enzimler alanında yoğunlaşma görülmemiştir. Japonya’da yapılan bir patent başvurusunda (JP63-109790), izomalto oligosakkarit şuruplarının üretimi için hareketsiz bir transglukosidaz konjugatının kullanımını tarif etmektedir. Konjugat, jelatinin transglukosidaz varlığında glutarik dialdehit ile çapraz bağlanmasıyla yapılır. Elde edilen konjugat daha düşük bir mekanik stabiliteye sahiptir ve tutma kolonlarına taşınması mümkün olmadan önce öğütülmelidir. Oldukça heterojen bir reaksiyon olması sebebi ile enzim, taşıyıcı malzeme içinde homojen olarak dağılmaz. Bu da kinetiğin bozulmasına yol açar. Böylece verim düşer. Başka bir dezavantaj ise taşıyıcının tekrar kullanılamamasıdır. Enzim aktivitesinin tükenmesinden sonra bütün konjugat ekonomik ve ekolojik olarak tercih edilmeyen biçimde atıklaştırılır. Bahsi geçen buluş, izomalto oligosakkarit şurupları üretmeye yönelik bir yöntemi açıklamaktadır. Burada bir nişasta hidrolizatı, transglukosidazın hareketsizleştirilmesi için yeniden kullanılabilir bir taşıyıcı kullanılarak enzimatik olarak dönüştürülür. Nişasta hidrolizatı tercihen 20-60 DE’ye sahip bir şuruptur. Taşıyıcı tercihen bir anyon değişim reçinesidir ve transglukosidaz adsorpsiyon ile bunun üzerine immobilize edilir. Diğer enzimlerin transglukosidaz ile birlikte hareketsizleştirilmesi buluşun başka bir yönüdür. Bu diğer enzimler pullulanaz veya bir alfa amilazdır. Enzimler aynı taşıyıcı üzerinde birlikte hareketsiz hale getirilebilir. Aynı zamanda enzimleri ayrı ayrı hareketsizleştirmek de mümkündür. Buluşun başka bir yönü de, taşıyıcı/enzim konjugatı, bir veya daha fazla çapraz bağlama ajanı ile güçlendirilmektedir (Vercauteren Ronny L. M. ve ark., 1998).

Basu ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Aspergillus niger*’den üretilen α -glukosidaz enzimi kullanılarak izomalto oligosakkarit üretimi gerçekleştiren kesintili bir sistem) (batch proses) tasarlanmıştır. Kesintili sistemde karşılaşılan verim düşüşünü engellemek için “fed-batch” sistemini tasarlamışlar ve maltozu kademeli olarak reaktöre eklemişlerdir. 24 saat ve 60 saat süren iki farklı deneme seti iki farklı yöntem için de uygulanmıştır. Fed-batch sistem denemeleri hammadde akışı 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 litre/saat olacak şekilde tekrarlanmıştır. 60 saat süren reaksiyonda, 0.005 L/saat hammadde akışına sahip fed-batch sistemde IMO

konsantrasyonu 280.22 g/L, batch sistemde oluşan IMO konsantrasyonu 227.32'dir. Sonuç olarak maltozdan transglukosilasyon sonucu izomaltooligosakkarit üretiminde, hammaddenin sisteme reaksiyon başında ve tek seferde eklenmesi (batch sistem), verimliliği göreceli olarak azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere, reaktör içerisine sabit hızda (0.5-0.005 litre/saat) aktarılan maltozun reaksiyona girmesi sonucu daha yüksek konsantrasyonda izomaltooligosakkarit elde edilmiştir (Basu ve ark., 2016).

Yüksek verimlilikte izomaltooligosakkarit üretimi için bir enzim kokteyli ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. IMO üretiminde proses verimliliğini artırmak için bir yöntem geliştirilmiş ve farklı enzimleri içeren bir kokteyl hazırlanmıştır. *Bacillus licheniformis*'den üretilen rekombinant *Bacillus naganoensis* pullulanaz (PulA), *Bacillus amyloliquefaciens* kaynaklı α -amilaz (BAA), arpa kepeği β -amilaz (BBA) ve *Aspergillus niger*'den üretilen α -transglukosidaz (An-TGase) ile nişasta hidrolizatından eşzamanlı sakkarifikasyon ve transglukosilasyon reaksiyonları gerçekleşir. Toplam 13 saat süren reaksiyon sonucunda %49 IMO içeren (toplam izomaltoz, izomaltotrioz ve panoz miktarına göre) şurup elde edilmiştir. Denemeler için 500 mL reaktör kullanılmıştır. Öncelikle mısır nişasta bulamacı pH 5.8 ve 100 °C'de farklı reaksiyon süreleri belirlenerek nişasta hidrolizati oluşturulmuştur. Sakkarifikasyon basamağı ise BBA 0.1°DP/g, PulA 0.1 U/g ve An-Tgase 500g/KM enzimlerinin eklenmesiyle 55°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada enzimlerin etkisi tek tek incelendiğinde; PulA miktarının artırılması, molekülerdeki dallı yapının parçalanması ve nişasta hidrolizatının oluşması için olumlu etki yaratmıştır. Ancak oligosakkaritlerin α -1,6 bağının hidrolizinde büyük bir etkisi gözlenmemiştir. BBA enzimi ile, α -1,4 glikozidik bağlarının hidrolizi sonucu maltoz oluşturur. Sakkarifikasyonda ise $\geq 0.5^\circ\text{DP/g}$ BBA enzimi kullanımı IMO oluşma verimliliğini artırır. An-Tgase enzimi sakkarifikasyon aşamasında transglukosilasyon reaksiyonu için kullanılan enzimdir. Çalışmada enzim dozajları sırasıyla 500, 1000 ve 2000 U/g olarak denenmiştir. Son ürünlerdeki IMO verimliliği; 13 saatte %46.47, 8 saatte %45.80, ve 4 saatte %45.46'dir. Büyük ölçekli IMO üretiminde, maliyetin yüksek olmaması açısından 500-1000 U/g An-TGase dozajının uygun olduğuna karar verilmiştir. Çalışmalarda sıvılaştırma basamağında oluşan nişasta hidrolizatının dekstroz eşdeğeri (DE) ne kadar yüksek olursa, sakkarifikasyon sonucu oluşacak izomaltooligosakkaritlerinin oranının arttığını gözlenmiştir. DE'si 30 olan nişasta hidrolizatının DE'si 12 olan nişasta hidrolizatına göre IMO oluşturma konusunda aynı reaksiyon süresinde daha yüksek verime sahip olduğu görülmüştür (Niu ve ark., 2017a).

İzomaltooligosakkaritler, özellikle kolondaki faydalı bifidobakterilerin sayısını artırabilen prebiyotikler olarak uygulamalarda dikkat çekmektedir. IMO'lar, mikroorganizmalardan enzimlerin transglukosilasyon aktivitesi ile üretilmiştir. Tanım olarak IMO, α -1,4 içeren/içermeyen bir veya daha fazla α -1,6 glikozidik bağ içeren glikozil sakkaritlerdir. Ticari olarak temin edilebilen IMO, esas olarak izomaltoz, panoz ve izomaltotriozdan oluşur. IMO'ları oluşturabilmek için maltozun transglukosilasyonunu katalizleyen enzime transglukosidaz denir. α -D-glukosidazın transglukosilasyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Nişastadan izomaltooligosakkaritlerin üretimi için geleneksel yöntem, nişastayı ilk önce α -amilaz ve pullulanaz kullanarak α -1,4 bağlı α -D-gluko-oligosakkaritlere indirmektir. Sonrasında α -amilaz ve α -D-glukosidaz kullanılarak α -1,6 bağlı oligosakkaritlere dönüştürülür Transglukosilasyon aktivitesine sahip α -D-glukosidaza genellikle transglukosidaz veya D-glukosiltransferaz denir. Transglukosidaz, hem α -D-gluko oligosakkaritlerin hidrolizini hem de glikozil grubunun 6-OH glikoza transferini katalizleyebilir. Glikozilin D-glikoza aktarımı izomaltoz ve maltoza aktarımı panoz verir. Transglukosidazın etkisi sonucu oluşan ürünler α -(1,6) bağlı glikoz oligomerleri sınıfını içerir ve yan ürün olarak büyük miktarda glikoz ve bir (1,4) oligomer (maltoz) içermektedir. Transglukosidazın esas olarak mantarlarda mevcut olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, *Aspergillus niger*'den elde edilen transglukosidaz, glikozun sadece düşük dereceli polimerizasyon oligomerleri üzerinde etkilidir. Transglukosilasyon aktivitesine sahip enzimler, *Aurebasidium pullulans*, *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus nidulans* gibi diğer birçok mantarda da bulunmuştur *Bacillus subtilis*'te neopullulanaz adlı bir enzimin α -1,6 transglukosilasyon işlevine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle α -amilaz ve neopullulanazın birlikte kullanımı, nişastadan izomaltooligosakkaritler üretebilir. Nişastadan IMO üretimi için yayınlanan yöntemlere göre glikoz ve yan ürün olarak maltoz gibi α -1,4 bağlı oligomerler ile yaklaşık ağırlıkça %60 saflıkta IMO elde edilebilir. Nişastanın yanı sıra konsantre maltoz şurubu, transglukosidazın etkisi ile izomaltooligosakkaritlerin üretimi için substrat olabilir. Biyokatalizör olarak hangi enzim ve hücre kullanılırsa kullanılsın, IMO'nun en yüksek saflığı hala %60 seviyesindedir. Son zamanlarda IMO içeriği, maltojenik alfa amilaz ve bir glukanotransferazın ortak kullanımı ile %68'e yükseltilmiştir. Glikoz, maltoz, maltotrioz gibi sindirilebilir şekerleri ortadan kaldırmak için maya hücrelerinin kullanılması IMO saflığını artırabilmektedir (Pan & Lee, 2005).

Prebiyotik işlevselliğe sahip gıda bileşenleri çok büyük ve artan bir ilgiyle karşılaşmıştır. Bu sebeple di-, oligo- ve polisakkaritlere dayalı çeşitli prebiyotik bileşenlerinin üretimi teşvik

edilmiştir. İzomalto oligosakkaritler prebiyotikler olarak kabul edilir. Bu tür karbonhidratlar aynı zamanda gıda bileşenleri olarak geniş çapta uygulama bulmuştur. Hem akademik hem de endüstriyel kurumlar, IMO'ların üretim teknolojisini iyileştirmeye ve IMO'ların sağlığı teşvik edici potansiyel etkilerini daha kesin bir şekilde açıklamaya daha fazla önem vermeye başlamışlardır. IMO'lar, tipik olarak α -1,2, α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağlarla bağlanmış glikoz birimlerinden oluşur. IMO içerisinde farklı polimerizasyon derecesine sahip bileşenler DP2 (izomaltoz), $DP \geq 3$ (panoz, izopanoz, izomaltotrioz, nigeroz, kojibioz, uzun zincirli IMO'lar ve siklo-IMO'lar mevcuttur. Bu farklı IMO yapılarının tümü çözünürlük, tatlılık ve viskozite talebine bağlı olarak farklı gıda uygulamaları için girdi olabilir. IMO'ların farklı konfigürasyonları, glikoz salınımının azalmasına ve kalın bağırsağa aktarılan sindirilmemiş α -glukanların artmasına neden olan amilolitik enzim aktivitesini geciktirme yeteneğine sahiptir. Bu özellikler, bağırsak hormonlarının modülasyonu ve sağlığı geliştiren kolonik bakteriler tarafından desteklenen fermentasyon ile ilişkilidir. IMO'ların üretimi enzim teknolojisine dayanmaktadır. Hidrolaz ve transferaz familyalarındaki çeşitli enzimlerin di-, oligo- ve polisakkarit substratlarından IMO'ların üretimi için yararlı olduğu gösterilmiştir. Nişasta modifikasyonu ve fonksiyonel gıda bileşenleri endüstrisinde çeşitli yapı ve özelliklere sahip IMO'ların üretimi yüksek talep görmektedir. Geleneksel olarak, IMO'lar ilk sakkarifikasyon aşamasını takiben dirençli alfa 1,6 bağlarını kırmak için ikinci bir hidrolaz/transferaz aşamasını katalizleyen α -amilaz, maltojenaz ve pullulanaz enzimleri ile üretilmektedir. Şu anda, farklı transferaz enzimlerinin füzyonu, canlı hücrelere bağlanan enzimler, eşzamanlı sakkarifikasyon ve transglukosilasyon yaklaşımları, farklı enzim kombinasyonları, rekombinant enzimler gibi yeni teknolojiler hızla gelişmektedir. Bu gelişmeler, IMO veriminin artmasına, çeşitli IMO yapılarının oluşmasına ve üretim maliyetlerinde düşüş sağlamıştır. Gittikçe artan sağlık bilinci ile niş bir ürün olan IMO pazarı güçlenerek büyümektedir. IMO'ların ticarileştirilmesindeki artış, çeşitli gıda türlerindeki uygulamalara dayalı olarak artan potansiyel sağlık talepleri ile yakından ilgilidir. Ticari IMO, tipik olarak enzimatik protokoller kullanılarak nişastanın modifikasyonu ile üretilmektedir. Geleneksel prosedürde nişastadan IMO üretimi; sıvılaştırma, iki aşamalı sakkarifikasyon ve saflaştırma dahil olmak üzere çok aşamalı bir işlem gerektirmektedir. Bu üretim yöntemi ayrıca istenen IMO yapılarını elde etmek için en az beş enzim türü gerektirmektedir. Mevcut IMO piyasası artarken, IMO'ları üretmenin yeni ve daha üretken yollarının olasılıklarını araştırmak için akademik, kurumsal ve endüstriyel seviyelerde birçok girişimde bulunulmuştur. IMO üretimi için genel strateji, birincil kaynak olarak nişastayı ve prosedür olarak enzimatik transglukosilasyonu içermektedir. Kullanılan ana enzim

kategorikeri, glukonotransferaz, hidrolaz ve transglukosidaz aileleri içerisinde. Bu enzim grupları, nişasta ve undan, nişasta ve nişasta türevlerinden türetilen sakkaroz ve dekstran'dan IMO üretimi için birçok endüstriyel protokol de uygulanmıştır. En yaygın olarak kullanılan enzimler; glukansukraz, dallı yapı oluşturucu enzim, α -transglukosidazlar, amilomaltaz ve siklo-izomaltoligosakkarit glukonotransferaz gibi enzimlerdir. IMO içeriğini artırmak üzere glukonotransferazlar için optimal substratlar oluşturmak amacıyla, glukanolizozlar (α -amilaz, β -amilaz, endodekstranaz, α -glukosidaz, pullulanaz, maltojenik alfa amilaz) yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle farklı ürün yapılarını hedefleyen yüksek verimli IMO üretim sistemleri sağlamak için hem tekli hem de kombinatoriyal enzim destekli protokoller geliştirilmiştir. Rekombinant enzim teknolojisi, IMO üretimini önemli ölçüde geliştirmiştir (Sorndech ve ark., 2018).

İzomaltoligosakkaritler (IMO), ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanıma uygun özelliklere sahip şekerlerdir. IMO, farklı α -glikozidik bağlar ve farklı polimerizasyon dereceleri ile elde edilir. Geniş bir kimyasal çeşitliliğe (düz zincirli, dallı ve halkalı moleküler yapılar) sahiptir. Sentez için farklı substratlar kullanılmaktadır (disakkarit ve monosakkarit kombinasyonları veya nişasta veya dekstran gibi polimerik karbonhidratlar). Nişasta hammaddesinden, α -1,4 glikozidik bağları üzerinde etkili α -amilaz ve β -amilaz enzimleri kullanılarak hidrolizasyon gerçekleştirilir ve maltoz oluşur. Oluşan maltozun α -glukosidaz enzimi ile transglukosidasyonu sonucu; α -1,4 glukosidik bağları α -1,6 glukosidik moleküler bağlarına dönüşür ve izomaltoligosakkaritler oluşur. Oluşan oligosakkaritlerin polimerizasyon dereceleri DP2 ve DP5 aralığında değişir ve α -1,4 , α -1,6 glikozidik bağların yüzdeleri açısından farklılık gösterir. IMO bileşiklerinin enzimatik sentezi, transglikosil aktiviteye sahip glikozit hidrolazlar (GH'ler) ile gerçekleştirilebilir (Casa-Villegas ve ark., 2018).

IMO şurubu, endüstriyel olarak nişastadan alfa-amilaz, beta-amilaz, neopullulanaz ve alfa-glukosidaz gibi nişastanın sahip olduğu bağları kıran enzimlerin ortak reaksiyonu ile üretilmiştir. Son dönemde nişasta üzerinde neopullulanaz ve alfa amilazın etkisi ile yeni bir IMO üretim prosesi geliştirilmiştir. Kesin olarak IMO yalnızca alfa 1-6 glikozidik bağlarına sahip glikozil sakkaritler manasına gelse de, ticari IMO şurubunda hem alfa 1-6, hem de alfa 1-4 glikozidik bağları olduğu kabul edilmiştir. Daha önce yazılmış olan makalelerde; yazarlar, *Aureobasidium pullulans* kaynaklı fruktosiltransferazın transfruktozilasyon reaksiyonu ile sakkarozdan fruktooligosakkaritlerin üretildiği rapor edilmiştir. Sonraki bir çalışmada ise; bu

organizmanın, maltoz ortamında kültive edildiğinde transglukosilasyon reaksiyonu ile IMO oluşumunda yer alan enzimi üretme kabiliyetine sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaların sonucunda; %60 maltoz şurubu, IMO üretimi için en uygun substrat olarak belirlenmiştir. Elde edilen şurupta ağırlıkça %50 IMO ile birlikte yan ürün olarak %25 glikoz elde edilmiştir. Öte yandan, daha düşük maltoz konsantrasyonlarında (%30 ve aşağısı), elde edilebilen maksimum IMO konsantrasyonu %46'nın altındadır. Bu durumun sebebi ise enzimlerin hidroliz aktivitesi ile glikozda meydana gelen yükselmedir. Panoz ve DP4'ün IMO'sunun oluşum hızları tüm konsantrasyonlardaki substratlarda 20 saat sonunda plato evresine ulaşmıştır. Yüksek verimlilik düşünüldüğünde, substrat olarak yüksek konsantrasyonda maltoz kullanmak daha avantajlıdır (Yun ve ark., 1994).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Mısır nişastasından enzimatik yöntemle prebiyotik bir ürün olan izomaltooligosakkarit üretiminin amaçlandığı bu tez çalışmasında; kullanılan sarf maddeleri ve sistemlerin özellikleri, izomaltooligosakkarit üretim aşamaları ve bunlarla ilgili yapılan analiz yöntemleri aşağıda ilgili kısımlarda verilmiştir.

3.1. Materyal

Nişasta Çözeltisi (Nişasta Sütü): Sunar Mısır A.Ş. tesislerinde mısır şurubu üretiminde kullanılan yaklaşık %35-36 kurumaddeli, sulu haldeki (kurutulmamış nişasta) nişasta sütü kullanılmıştır. Kullanılan bu nişasta sütünün pH değeri 4.0-4.5 ve sıcaklığı yaklaşık 35 °C'dir.

Enzimler: Çalışmada alfa amilaz-Clearflow AA (Ek-1), beta amilaz-Optimalt BBA (Ek-2), pullulanaz-Optimax L-2500 (Ek-3), maltojenik alfa amilaz-Optimalt 2G (Ek-4) ve transglukosidaz-Transglucosidase L-2000 (Ek-5) enzimleri kullanılmıştır.

Clearflow AA (E.C.3.2.1.1): Genencor (Danisco-Danimarka) firması tarafından üretilmiştir. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus stearothermophilus* kökenlidir. Aktivitesinin 19.750-22.975 LU/g ve moleküler ağırlığı ~55/59 kD olduğu firma tarafından bildirilmiştir. Yüksek sıcaklığa dayanıklıdır. Nişastadaki α -D-1,4 glikozidik bağlarını kırarak etkin bir sakkarifikasyon yapılmasını sağlar. Üretici firma tarafından optimum çalışma koşulları (her ne kadar nişasta sütü cinsi, kurumadde miktarı, sıcaklık gibi etkenlere bağlı olsa da); pH: 5.5- 5.8, enzim konsantrasyonu: 0.30-0.45 kg/TDS, Ca^{++} konsantrasyonu: >5 ppm, reaksiyon süresi: 90-120 dakika (DE $\geq$ %10) olarak belirlenmiştir (Ek-1).

Optimalt BBA (E.C.3.2.1.2): DuPont (Amerika Birleşik Devletleri) firması tarafından üretilmiştir. Bir arpa 1,4 α -D-glukan maltohidrolazıdır. Arpa tanesinden elde edilmektedir. Beta-amilaz, dekstrin zincirinin indirgenmeyen ucundan 1,4 α -D-glikozidik bağları hidrolize ederek ardışık maltoz birimlerinin salınımını katalizleyen bir eksoamilazdır. Esas olarak alfa amilaz aktivitesinden yoksundur ve sıvılaştırılmış nişastadan maltoz şuruplarının üretimi için kullanılır. Bu enzimin aktivitesi “Degrees of

Diastatic Power” (DP°) ile ifade edilmektedir. Enzim aktivitesi 1230 DP°/g (minimum) olarak belirtilmiştir. Nişastadan maltoz açısından zengin şurup elde edilmesi amacı ile sakkarifikasyon aşamasında kullanılmaktadır. Üretici firma tarafından, yüksek maltoz şurupları üretimi için, enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH: 5.2- 5.5, enzim konsantrasyonu: 0.6-1.22 kg/TDS, reaksiyon süresi: 24-48 saat olarak belirlenmiştir (Ek-2).

Optimax L-2500 (E.C.3.2.1.41): DuPont (Amerika Birleşik Devletleri) firması tarafından üretilmiştir. Genetik olarak modifiye edilmiş bir *Bacillus licheniformis* suşunun kontrollü fermentasyonundan üretilen bir pullulanaz enzimidir. Yüksek dekstroz ve yüksek maltoz şurupları üretmek için sakkarifikasyon enzimleri olan glukoamilaz ve beta amilaz ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Enzim, yüksek sıcaklıkta ve asidik pH aralığında stabildir ve 1,4 α -D glikozidik bağlarını içeren doğrusal oligosakkarit zincirleri üretimi için amilopektin ve dekstrinlerde dallanmış 1,6 α -D glikozidik bağlarının hidrolizini katalizlemektedir. Üretici firma tarafından, yüksek maltoz şurupları üretimi için, enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH: 4.2-4.6 olarak belirtilmiştir. %70 ve üzeri maltoz içerikli şurupların üretimi için beta amilaz enzimi ile birlikte kullanımı tavsiye edilmiştir (Ek-3).

Optimalt 2G (E.C 3.2.1.133): DuPont (Amerika Birleşik Devletleri) firması tarafından üretilmiştir. Genetiği değiştirilmiş *Bacillus licheniformis* suşunun kontrollü fermentasyonundan üretilen bir maltoz oluşturuucu alfa amilaz enzimidir. Sıvılaştırılmış nişastanın 1,4 α -D glikozidik bağlarını hidrolize ederek yüksek konsantrasyonlarda maltoz üretir. Beta amilaz ve pullulanaz enzimleri ile beraber kullanıldığında yüksek maltoz içerikli şurup elde edilmesini sağlamaktadır (Ek-4).

Transglukosidaz L-2000 (E.C 2.4.1.24): DuPont (Amerika Birleşik Devletleri) firması tarafından üretilmiştir. Glukoamilaz aktivitesi içermeyen saflaştırılmış bir D-glukotransferazdır. Genetik olarak modifiye edilmiş *Trichoderma reeseri* suşu kullanılarak kontrollü fermentasyon yoluyla üretilir. Transglukosidaz, α -D-glukooligosakkaritlerle inkübasyon sırasında hem hidrolitik hem de transfer reaksiyonlarını katalizler. Transglukosidaz reaksiyonlarının bir sonucu olarak, malto-oligosakkaritler izomalto-oligosakkaritlere dönüştürülür ve bu da indirgeyici olmayan

uçtan bir α -D-1,6 bağı ile bağlanan yüksek oranlarda glikozil kalıntısı içeren farklı bir polisakkarit sınıfı ile sonuçlanır. Üretici firma tarafından tavsiye edilen dozaj miktarı 0.55-0.60 kg/TDS olarak belirtilmiştir (Ek-5).

Biyoreaktör: Sartorius Stedim markalı Biostat A model 5L hacimli biyoreaktör kullanılmıştır (şekil 3.1.).



şekil 3.1. Sartorius Stedim Markalı Biostat A Model Biyoreaktör

İyon Değiştirici Reçineler: Resindion S.R.L. (İtalya) firması tarafından üretilmiş Relite RPS (kuvvetli asidik katyon reçine, divinil benzen (DVB) stiren kopolimeri, Ek-6) ve Relite Ram1 (zayıf bazik anyon reçine, divinil benzen (DVB) stiren kopolimeri, Ek-7) iyon değiştirici reçineler kullanılmıştır. Denemelerde, iyon değiştirme kapasitesi 1.84 eq/L (Na^+), zgl ağırlığı 1.22 g/mL olan ve boyut ortalaması 464 μm olan Relite RPS kullanılmıştır. Relite Ram1 'ın ise; iyon değiştirme kapasitesi, 1.67 eq/L (Cl^-), zgl ağırlığı 1.05 g/mL olan ve boyut ortalaması 461 μm olarak belirlenmiştir. Reçineler, iki farklı 1 L'lik cam tüp içerisine (tp i hacminin

2/3'ü oranında) eklenmiştir. Denemelerde ürün, önce katyon iyon değiştiriciden sonra anyon iyon değiştiriciden geçirilmiştir.

Pilot İyon Değiştirici Sistemi: CEYKA marka pilot iyon değiştirici sistem kullanılmıştır (şekil 3.2.).



şekil 3.2. Pilot İyon Değiştirici Sistemi

Pilot Nanofiltrasyon Sistemi: CEYKA markalı pilot nanofiltrasyon sistemi kullanılmıştır (şekil 3.3.).

Döner Buharlaştırıcı: Heidolph Laborrota 4001 Efficient (Alman) marka ve model cihaz kullanılmıştır (şekil 3.4.).



Şekil 3.3. Pilot Nanofiltrasyon Sistemi

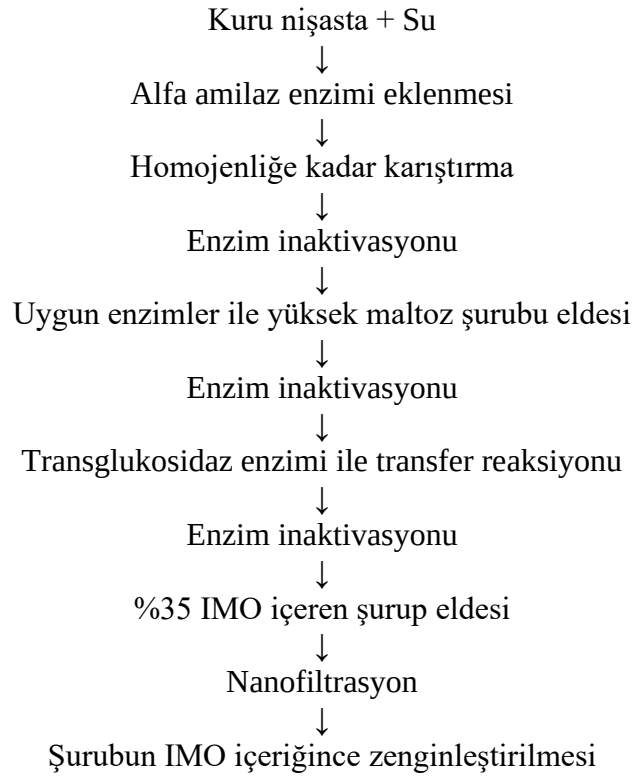


Şekil 3.4. Döner Buharlaştırıcı

3.2. Yöntem

3.2.1 İzomaltooligosakkarit Üretim Yöntemi

Bu tez çalışmasında, prebiyotik bir ürün olan izomaltooligosakkaridin, farklı hammadde maltoz şurupları ve farklı beta amilaz ve transglukosidaz enzim dozajları kullanılarak laboratuvar ölçeğinde üretilmiştir. Hammadde %maltoz içeriği, beta amilaz enzim dozajları ve transglukosidaz enzim dozajları gibi parametrelerin IMO fraksiyonları ve elde edilen izomaltooligosakkarit şurubunun toplam IMO yüzdesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Akış şemasında belirtildiği gibi (Şekil 3.5.); çalışmanın ilk bölümü nişasta çözeltisine alfa amilaz enzimi dozajlanarak sıvılaştırılma ve bekletme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesidir.



Şekil 3.5. İzomaltooligosakkarit Üretim Akış Şeması

Yaş öğütme ile nişasta sütü elde edildikten sonra α -amilaz enzimi Tablo 3.1’de belirtilen koşullarda nişasta hidrolizi sağlanmıştır. Ardından gerekli inaktivasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Denemelerde IMO üretimi için kullanılan beta amilaz enzim dozajı (kg/TDS), başlangıç maltoz hedefi (%), transglukosidaz enzim dozajı (kg/TDS) parametreleri değişken olarak kullanılarak

27 farklı uygulama ile IMO üretimi yapılmıştır. Daha sonra beta amilaz ve pullulanaz enzimleri ile yüksek maltoz içerikli şurup elde edilmiştir. Son aşamada ise yüksek maltoz içerikli şuruba transglukosidaz enzimi dozajı yapılarak IMO üretilmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.1. İşletme Ve Laboratuvar Koşullarında IMO Üretim Aşamaları

NIŞASTA ÇÖZELTİSİNİN HİDROLİZİ (İŞLETME KOŞULLARI)	– Nişasta çözeltisine alfa amilaz enzim dozajı yapılması (pH 5.5-5.8 ve enzim dozajı 0.35 kg/TDS) – Nişasta sütünün sıvılaştırma ve bekletme aşamalarından sonra nişasta hidrolizatına dönüştürülmesi – Alfa amilaz enziminin %30'luk HCl çözeltisi ile inaktivasyonu (pH'ın 3.5 seviyelerine getirilmesi)
YÜKSEK MALTOZ İÇERİKLİ ŞURUP ELDESİ (LABORATUVAR KOŞULLARI)	– %35 kurumadde içerikli nişasta çözeltisine beta amilaz, pullulanaz ve maltojenik alfa amilaz enzim dozajları yapılarak yüksek maltoz içerikli şurup eldesi 1. Beta amilaz enzim dozajı: 1.0-1.4 kg/TDS 2. Pullulanaz enzim dozajı: 0.8 kg/TDS 3. Maltojenik alfa amilaz enzim dozajı: 0.6 kg/TDS pH 4.8 ve sıcaklık 64°C Reaksiyon süresi: 20-36 saat (Farklı reaksiyon süreleri kullanılarak maltoz içerikli ürünlerin elde edilmesi) – Beta amilaz, pullulanaz ve maltojenik alfa amilaz enzimlerinin %30'luk HCl çözeltisi ile inaktivasyonu (pH'ın 3.5 seviyelerine getirilmesi)
YÜKSEK MALTOZ ŞURUBUNDAN IMO ELDESİ (LABORATUVAR KOŞULLARI)	– %75-85 maltoz içerikli şuruba transglukosidaz enzimi dozajlanarak IMO eldesi. Transglukosidaz enzim dozajı: 0.60-0.70 kg/TDS pH 4.5 ve sıcaklık 61°C Reaksiyon süresi: 24 saat – Transglukosidaz enziminin %30'luk HCl çözeltisi ile inaktivasyonu (pH'ın 3.5 seviyelerine getirilmesi)
IMO'NUN SAFLAŞTIRILMASI (PİLOT ÖLÇEK)	– Pilot iyon değiştirici sistemi ile IMO şurubunun iyonlarından ayrılması. – Pilot nanofiltrasyon sistemi ile IMO şurubunun saflaştırılması.

3.2.2. Analiz Yöntemleri

3.2.2.1. Rutubet Tayini

Rutubet tayininde, “Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, B-38” metodu uygulanmıştır. 5 g numune 90 °C’de Heraus T 12 marka vakumlu etüvde, sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir (Anon., 2006a).

Tablo 3.2. Başlangıç Maltoz Ürünlerinin Elde Edilmesi İçin Gerçekleştirilen Reaksiyon Koşulları

Beta Amilaz Dozajı (kg/TDS)	Pullulanaz Dozajı (kg/TDS)	Maltojenik Alfa Amilaz Dozajı (kg/TDS)	Reaksiyon Süresi (saat)	Maltoz İçeriği (%)
1.0	0.8	0.6	26	75
1.2	0.8	0.6	23	75
1.4	0.8	0.6	20	75
1.0	0.8	0.6	30	80
1.2	0.8	0.6	28	80
1.4	0.8	0.6	25	80
1.0	0.8	0.6	36	85
1.2	0.8	0.6	32	85
1.4	0.8	0.6	29	85

3.2.2.2. pH Tayini

pH tayinlerinde; Mısır şurupları için, “Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association CRA E-48”, nişastalar için “Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association CRA B-42” ve sulu haldeki nişastalar için “Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association CRA B-44” yöntemleri kullanılmıştır. Analizde WTW 526 marka pH metre ile 20 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Anon., 2006b).

3.2.2.3. Dekstroz Eşdeğeri Tayini

Dekstroz eşdeğeri tayininde Lane ve Eynon metodu kullanılmıştır Bu metotta, aldoz ve ketoz şeker miktarları bakırın indirgenmesi prensibine göre belirlenmiştir (Blanchard, 1992). %35’lik nişasta çözeltisinden 15.4 g alınıp 250 mL hacme saf su ile tamamlanmış ve bürete aktarılmıştır. Erlen içerisine 12.5 mL bakır sülfat çözeltisi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 70 g/L) ve 12.5 mL sodyum potasyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 346 g/L) çözeltisi eklendikten sonra metilen mavisi indikatörü yardımıyla büretteki nişasta çözeltisi ile kaynama noktasında titre edilmiştir. Örneklerin titrasyon sarfiyatı, saf D-Glikoz’un (dekstroz) titrasyonu ile, aynı şartlarda, karşılaştırılarak DE değeri belirlenmiştir (Anon., 2006d).

3.2.2.4. Şeker Bileşenleri Tayini

Şeker bileşenlerinin tayini HPLC ile gerçekleştirilmiştir (Blanchard, 1992). Bu yöntemde, 5 brikse kadar saf su ile seyreltilmiş numune, 0.20 µm membran filtreden süzülerek, cihaza enjekte edilmiştir. Yüksek maltoz içerikli şurupların ve IMO'ların analizi için HPLC koşulları;

Kromatografi cihazı	: Shimadzu HPLC
Dedektör	: RID 20A detektör
Kolon	: Bio Rad Aminex HPX 87 C (300 x 7.8 mm) (Yüksek maltoz içerikli şuruplar) Bio Rad Bio-Sil Amine 5S (IMO)
Kolon sıcaklığı	: 80 °C
Mobil faz çözeltisi	: Ultra saf su (Yüksek maltoz içerikli şuruplar) 68:32 asetonitril-su (IMO)
Akış hızı	: İzokratik akış, 1.0 mL/dakika (Yüksek maltoz içerikli şuruplar) İzokratik akış, 0.8 mL/dakika (IMO)
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL
İşlem Süresi	: 20 dakika

IMO üretiminde kullanılan bileşenler/değişkenler de Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. IMO Üretiminde Kullanılan Bileşenler/Değişkenler

No	Niştasta Çözeltisi Kurumaddesi %	Alfa Amilaz dozajı (kg/TDS)	Niştasta Hidrolizatı Dekstroz Eşdeğerliği	Beta Amilaz Dozajı (kg/TDS)	Pullulanaz Dozajı (kg/TDS)	Maltojenik Alfa Amilaz Dozajı (kg/TDS)	Başlangıç Maltoz Hedefi (KM) %	Transglukosidaz Dozajı (kg/TDS)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon pH Değeri	Reaksiyon Süresi (saat)
1	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	75	0.60	61	4.5	24
2	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	75	0.65	61	4.5	24
3	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	75	0.70	61	4.5	24
4	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	75	0.60	61	4.5	24
5	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	75	0.65	61	4.5	24
6	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	75	0.70	61	4.5	24
7	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	75	0.60	61	4.5	24
8	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	75	0.65	61	4.5	24
9	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	75	0.70	61	4.5	24
10	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	80	0.60	61	4.5	24
11	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	80	0.65	61	4.5	24
12	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	80	0.70	61	4.5	24
13	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	80	0.60	61	4.5	24
14	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	80	0.65	61	4.5	24
15	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	80	0.70	61	4.5	24
16	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	80	0.60	61	4.5	24
17	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	80	0.65	61	4.5	24
18	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	80	0.70	61	4.5	24
19	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	85	0.60	61	4.5	24
20	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	85	0.65	61	4.5	24
21	35	0.35	10-11 DE	1.0	0.8	0.6	85	0.70	61	4.5	24
22	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	85	0.60	61	4.5	24
23	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	85	0.65	61	4.5	24
24	35	0.35	10-11 DE	1.2	0.8	0.6	85	0.70	61	4.5	24
25	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	85	0.60	61	4.5	24
26	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	85	0.65	61	4.5	24
27	35	0.35	10-11 DE	1.4	0.8	0.6	85	0.70	61	4.5	24

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulguların ışığında; üretilen izomalto-oligosakkaritlerin IMO miktarı (%) üzerinde proses parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Değişken olarak aşağıdaki proses parametreleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

- Beta amilaz enzim dozaj miktarı (kg/TDS),
- Başlangıç maltoz yüzdesi (%),
- Transglukosidaz enzim dozaj miktarı (kg/TDS) dır.

Bu değişkenlerin, elde edilen IMO miktarına etkisinin belirlenmesi amacıyla da;

- Nişasta çözeltisi kurumadde miktarı (%),
- Alfa amilaz enzim dozaj miktarı (kg/TDS),
- Nişasta hidrolizatı dekstroz eşdeğeri (%),
- Pullulanaz ve maltojenik alfa amilaz enzim dozajları (kg/TDS),
- Reaksiyon pH değeri,
- Reaksiyon sıcaklığı (°C) ve
- Reaksiyon süresi (saat)

parametreleri sabit tutulmuştur (Tablo 3.3.)

Yapılan tüm IMO üretim denemelerinde; pH değeri 4.5, reaksiyon sıcaklığı 61 °C ve reaksiyon süresi 24 saat olarak sabit tutulmuştur. Başlangıç maltoz şurubu ürününün maltoz içeriği %70, %75, %80 olarak kullanılmıştır. Hem başlangıç maltoz içeriği hem de IMO üretiminde elde edilen maltoz ve IM2 değerlerine etkisi olan beta amilaz enzim dozajı 1.0 kg/TDS, 1.2 kg/TDS ve 1.4 kg/TDS olarak uygulanmıştır. Son değişken parametre olan transglukosidaz enzim dozajı ise 0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS olarak kullanılmıştır. Elde edilen IMO örneklerinde maltoz (%), IM2 (%), IM3 (%), panoz (%), IMH (%) ve toplam IMO (%) içerikleri incelenmiş ve aşağıdaki kısımlarda ayrı ayrı verilmiştir (Tablo 4.1).

4.1. İzomaltooligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Başlangıç Maltoz Miktarının Etkisi

İzomaltooligosakkaritler, alfa 1-4 ve alfa 1-6 glikozidik bağlarının karışımına sahip oligosakkaritlerdir. İzomalto-oligosakkaritlerin elde edilebilmesi için gerçekleştirilen reaksiyonda kullanılan hammaddenin maltoz içeriği (%) büyük önem arz etmektedir. Çünkü

çalışmada asıl olarak maltozun transglukosilasyonu reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. IMO'lar; izomaltoz, panoz, izomaltotrioz, izomaltotetraoz, izopanoz ve fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, xylooligosakkaritler ve gentiooligosakkaritler gibi diğer yüksek dallı oligosakkaritleri içermektedir (Kwon, 2014).

Tablo 4.1 IMO Üretiminde Farklı Parametrelerin Kullanımı ile Elde Edilen IMO Fraksiyonları (%) ve Toplam IMO İçerikleri (%)

Başlangıç Maltoz Yüzdesi (%)	Beta Amilaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Transglukosidaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Maltoz (%)	IM2 (%)	IM3 (%)	Panoz (%)	IMH (%)	Total IMO (%)
70%	1.0	0.60	11.2	11.0	0.50	22.0	2.4	35.9
		0.65	5.3	13.3	0.75	21.4	2.8	38.2
		0.70	2.0	14.5	0.92	22.5	3.1	41.0
	1.2	0.60	10.5	12.4	0.90	22.8	2.6	38.7
		0.65	6.4	13.4	1.0	23.0	2.9	40.3
		0.70	2.7	15.6	1.8	22.5	3.3	43.2
	1.4	0.60	9.1	14.8	1.5	20.8	3.0	40.1
		0.65	6.2	15.0	1.9	21.2	4.2	42.3
		0.70	1.8	16.8	2.5	21.4	4.7	45.4
75%	1.0	0.60	8.5	15.6	1.8	23.4	4.1	44.9
		0.65	5.7	16.4	2.4	23.7	5.0	47.5
		0.70	1.7	17.4	3.0	23.8	5.6	49.8
	1.2	0.60	7.8	16.4	2.6	22.1	5.3	46.4
		0.65	5.8	17.9	3.4	20.4	6.4	48.1
		0.70	1.9	18.8	4.7	19.8	7.0	50.3
	1.4	0.60	7.3	17.6	3.7	21.8	6.2	49.3
		0.65	5.4	18.5	4.0	21.2	7.8	51.5
		0.70	1.7	20.1	5.4	19.6	8.5	53.6
80%	1.0	0.60	6.8	20.4	4.6	19.4	8.3	52.7
		0.65	2.4	21.7	5.3	17.9	9.1	54.0
		0.70	1.3	22.3	6.2	15.9	10.8	55.2
	1.2	0.60	6.3	21.8	5.8	14.6	10.8	53.0
		0.65	3.5	22.4	6.0	15.7	11.6	55.7
		0.70	1.2	23.1	7.3	13.4	13.4	57.2
	1.4	0.60	5.4	22.0	7.4	14.8	12.2	56.4
		0.65	2.8	23.4	8.2	12.6	13.8	58.0
		0.70	0.9	24.2	9.4	12.2	15.3	61.1

Denemeler sonucu, toplam IMO veriminin başlangıçtaki artan maltoz değerine (%) paralel olarak arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.2.). Denemeler sırasında, başlangıçta hammadde olarak kullanılan maltoz değerleri (%); beta amilaz, pullulanaz ve maltojenik alfa amilaz enzimleri kullanılarak reaksiyon süresince maltoz içeriğindeki artış takip edilerek %75, %80 ve %85 maltoz içerikli şuruplar elde edilmiştir. Böylelikle IMO üretiminde hammadde olarak kullanılan maltoz içeriğinin, reaksiyon sonucu elde edilen ürünün şeker profiline etkileri de araştırılmıştır.

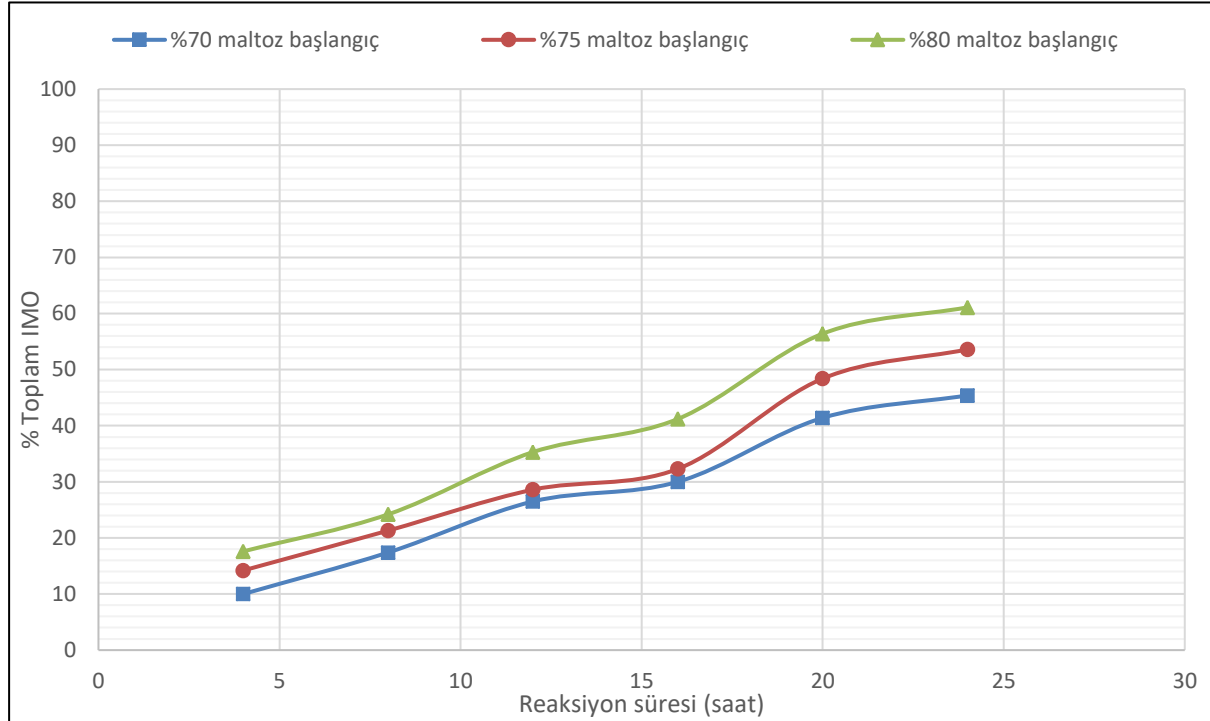
Tablo 4.2. IMO Üretiminde Başlangıç Maltoz Yüzdesi ile IMO Fraksiyonları ve Total IMO Miktarının Değişimi

Başlangıç Maltoz Yüzdesi (%)	Beta Amilaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Transglukosidaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Maltoz (%)	IM2 (%)	IM3 (%)	Panoz (%)	IMH (%)	Total IMO (%)
70	1.00	0.60	11.2	11.0	0.5	22.0	2.4	35.9
75			8.5	15.6	1.8	23.4	4.1	44.9
80			6.8	20.4	4.6	19.4	8.3	52.7
70	1.2	0.60	10.5	12.4	0.9	22.8	2.6	38.7
75			7.8	16.4	2.6	22.1	5.3	46.4
80			6.3	21.8	5.8	14.6	10.8	53.0
70	1.4	0.60	9.1	14.8	1.5	20.8	3.0	40.1
75			7.3	17.6	3.7	21.8	6.2	49.3
80			5.4	22.0	7.4	14.8	12.2	56.4

Tablo 4.2.'nin incelenmesiyle de görülebileceği gibi; diğer reaksiyon koşulları sabit tutulduğunda (pH:4.5, Sıcaklık: 61°C, Reaksiyon süresi: 24 saat), başlangıçta hammadde olarak kullanılan maltoz içeriğindeki (%) artışa paralel olarak (%70, %75 ve %80) toplam IMO yüzdesinde de artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde literatürde de yer alan çalışmalar göstermektedir ki, IMO üretiminde verimliliği etkileyen parametrelerden biri substrat konsantrasyonudur (Yun ve ark., 1994). Toplam IMO değeri (%) dışında diğer IMO fraksiyonları da incelendiğinde; IM2, IM3 ve IMH değerlerinde de artış olduğu, buna karşılık, Panoz değerlerinde azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlardan, IMO üretiminde hammadde olarak kullanılan maltoz şurubunun maltoz içeriği arttıkça, toplam IMO veriminin de arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

Bu çalışmalar sırasında, beta amilaz enzim dozajının 1.2 kg/TDS olduğu reaksiyonlar incelendiğinde (Tablo 4.2., Şekil 4.1.); başlangıç maltoz seviyesinin %70 olduğu durumda elde

edilen toplam IMO miktarı %38.7 iken, başlangıç maltoz değerinin %80 olduğu durumda ise elde edilen toplam IMO miktarının %53.0 seviyesine yükseldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Hammadde Başlangıç %Maltoz İçeriğine Göre Zamana Bağlı Toplam %IMO İçeriği

Şekil 4.1.'de de; başlangıç maltoz içeriği %70, 75 ve 80 olduğu durumlarda reaksiyon süresi boyunca meydana gelen toplam izomaltooligosakkarit (Toplam IMO) değişimi verilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan başlangıç hammaddelerinin üretiminde BBA enzimi (1.4 kg/TDS) kullanılmış ve takiben transglukosidaz (0.7 kg/TDS) ticari enzim preparatı kullanılarak reaksiyon başlatılmıştır. Tüm bu reaksiyonlar 24 saat içerisinde gerçekleştirilmiş ve meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucu; farklı maltoz içeriğine sahip hammaddelerden zamana bağlı olarak elde edilen toplam IMO miktarları saptanmıştır. Bu denemelerde, 4. saat sonunda, %70, %75 ve %80 başlangıç maltoz içeriğine sahip ürünlerden sırasıyla %10.0, %14.2 ve %17.6 oranında IMO üretilmiştir. %70, %75 ve %80 başlangıç maltoz içeriğine sahip ürünler ile yapılan denemelerde, reaksiyon hızının 20. saate kadar arttığı görülmüştür. Reaksiyonun 20-24'ncü saatleri arasında %70, %75 ve %80 başlangıç maltoz içeriğine sahip ürünler ile yapılan denemelerde toplam IMO içeriğindeki artışın son dört saatte en az %4-4.7 arasında değiştiği saptanmıştır. Elde edilen bu bulgulara göre, maltoz içeriği (%) yüksek olan reaksiyonlarda, aynı sürede daha fazla toplam IMO içeriğine ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde; %70, %75 ve %80 başlangıç maltoz içeriğine sahip ürünlerin kullanıldığı reaksiyonlarda, 15. saatten itibaren IMO'ya dönüşüm hızının azaldığı tespit edilmiştir. Reaksiyon hızındaki bu yavaşlama diğer çalışmalarda da görülmüştür ve reaksiyon süresi boyunca toplam izomaltoligosakkarit miktarındaki artış zaman içerisinde değişim göstermiştir. Bu durumun, reaksiyon sırasında substrat miktarından bağımsız olarak zaman içerisinde IMO miktarının nihai değerine ulaşması sonucu olduğu kanısına varılmıştır. Niu ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada da, α -glukoziltransferaz enzim aktivitesine bağlı olarak (500, 1000, 2000 U/g nişasta) üç farklı reaksiyon gerçekleştirilmiş ve bu çalışmanın sonuçlarına göre (Ek-8), enzim aktivitesinden bağımsız olarak IMO miktarı 12. saate kadar arttığı, 12-20'nci saat arasında ise IMO miktarı hemen hemen sabit olduğu görülmüştür (Niu ve ark., 2017b).

4.2. İzomaltoligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Beta Amilaz Enzim Dozaj Miktarının Etkisi

Beta amilaz enzim dozaj miktarı (kg/TDS), IMO üretimi için gerekli olan hammaddenin sağlanması hususunda önemli bir parametredir. Ayrıca, beta amilaz IMO üretiminde transglukosidaz enzimine yardımcı görev de görmektedir. Beta amilaz enzim dozaj miktarı arttıkça, ara ürün olan yüksek maltoz içerikli şuruptaki maltoz değeri (%) de artmaktadır. Bu da doğrudan üretilen IMO ürünündeki toplam IMO miktarını artırmaktadır. Çalışmalar sırasında, yüksek maltoz içerikli şurup elde etmek için uygulanan beta amilaz enzim dozaj miktarı (kg/TDS) değişken parametre olarak belirlenmiş ve buna bağlı olarak farklı oranlarda maltoz (%) içeren şuruplar elde edilmiştir. Elde edilen bu şuruplar transglukosilasyon reaksiyonu için hammadde olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.3.'den de görülebileceği gibi; aynı koşullarda altında, beta amilaz enzim dozajı artırıldığında (1.00 kg/TDS, 1.2 kg/TDS ve 1.4 kg/TDS) ise toplam IMO (%) oranının da arttığı tespit edilmiştir. Beta amilaz enziminin hem doğrudan başlangıçtaki maltoz (%) oranına etki ettiği hem de dolaylı olarak oluşan IMO fraksiyonlarından IM2 (%) oranını artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmalardan %70 maltoz içerikli şurubun hammadde olarak kullanıldığı reaksiyonlar incelendiğinde, beta amilaz enzim dozajının 1.0 kg/TDS değerinden 1.4 kg/TDS değerine yükselmesi ile artan enzim dozajına bağlı olarak elde edilen toplam IMO içeriğinin de %38.2'den %42.3 artış ile %42.3 oranına ulaştığı saptanmıştır.

Tablo 4.3. IMO Üretiminde Beta Amilaz Enzim Dozajı ile IMO Fraksiyonları ve Total IMO Miktarının Değişimi

Başlangıç Maltoz Yüzdesi (%)	Beta Amilaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Transglukosidaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Maltoz (%)	IM2 (%)	IM3 (%)	Panoz (%)	IMH (%)	Total IMO (%)
70	1.00	0.65	5.3	13.3	0.75	21.4	2.8	38.2
	1.20	0.65	6.4	13.4	1.0	23.0	2.9	40.3
	1.40	0.65	6.2	15.0	1.9	21.2	4.2	42.3
75	1.00	0.65	5.7	16.4	2.4	23.7	5.0	47.5
	1.20	0.65	5.8	17.9	3.4	20.4	6.4	48.1
	1.40	0.65	5.4	18.5	4.0	21.2	7.8	51.5
80	1.00	0.65	2.4	21.7	5.3	17.9	9.1	54.0
	1.20	0.65	3.5	22.4	6.0	15.7	11.6	55.7
	1.40	0.65	2.8	23.4	8.2	12.6	13.8	58.0

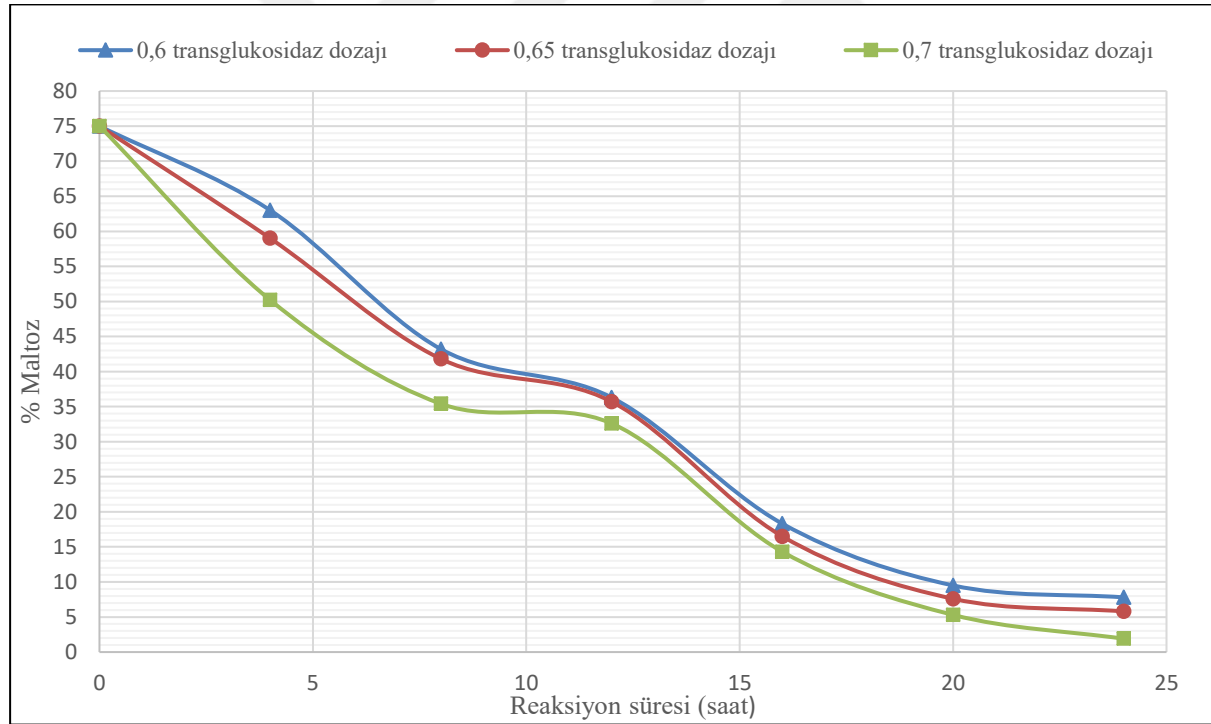
4.3. İzomaltooligosakkarit Şurubu IMO İçeriğine Transglukosidaz Enzim Dozaj Miktarının Etkisi

Izomaltooligosakkaritler (IMO), genel olarak izomaltoz, panoz ve izomaltotriozdan oluşmaktadır. Bu oluşumlar sırasında, IMO'ları oluşturabilmek için maltozun transglukosilasyonunu katalizleyen enzime de transglukosidaz adı verilmektedir (Pan, 2005). Bu enzimin elde edilen ürünlere doğrudan etkisi vardır. Transglukosidaz reaksiyonlarının bir sonucu olarak, malto-oligosakkaritler izomalto-oligosakkaritlere dönüştürülmektedir ve transglukosidaz, hem α -D-gluko oligosakkaritlerin hidrolizini hem de glikozil grubunun 6-OH glikoza transferini katalizlemektedir (Duan, 2011). Transglukosidaz enzim dozaj miktarının değiştirilmesi, doğrudan elde edilen IMO verimini de etki etmektedir.

Yapılan çalışmalarda Tablo 4.4. ve Şekil 4.2.'de transglukosidaz enzim dozaj miktarının 0.60, 0.65 ve 0.70 kg/TDS olduğu durumlarda oluşan IMO fraksiyonlarındaki değişimler verilmiştir. Tablo 4.4. incelendiğinde; hammadde özelliklerinin ve reaksiyon koşullarının aynı olduğu durumlarda, transglukosidaz enzim dozajının artırılmasının elde edilen IMO fraksiyonlarının (%) oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Başlangıç hammaddesi olarak %80 maltoz içerikli şurup kullanıldığı durumlarda, aynı şartlarda, transglukosidaz dozajı 0.60 kg/TDS'den 0.70 kg/TDS miktarına çıkarıldığında IM2, IM3, IMH (%) oranlarının da arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen toplam IMO miktarının da %56.4'den %8.3 artış ile %61.1'e yükseldiği belirlenmiştir.

Tablo 4.4. IMO Üretiminde Transglukosidaz Enzim Dozajı ile IMO Fraksiyonları ve Total IMO Miktarının Değişimi

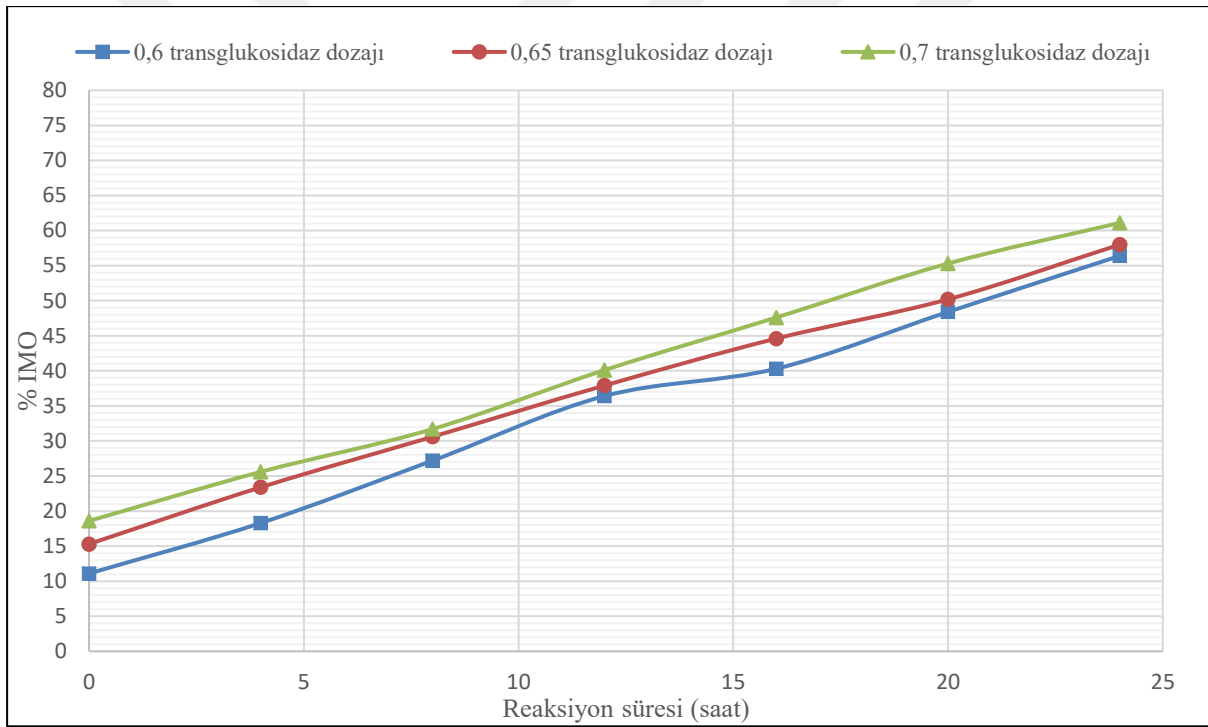
Başlangıç Maltoz Yüzdesi (%)	Beta Amilaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Transglukosidaz Enzim Dozajı (kg/TDS)	Maltoz (%)	IM2 (%)	IM3 (%)	Panoz (%)	IMH (%)	Total IMO (%)
70	1.0	0.60	11.2	11.0	0.5	22.0	2.4	35.9
		0.65	5.3	13.3	0.75	21.4	2.8	38.2
		0.70	2.0	14.5	0.92	22.5	3.1	41.0
75	1.2	0.60	7.8	16.4	2.6	22.1	5.3	46.4
		0.65	5.8	17.9	3.4	20.4	6.4	48.1
		0.70	1.9	18.8	4.7	19.8	7.0	50.3
80	1.4	0.60	5.4	22.0	7.4	14.8	12.2	56.4
		0.65	2.8	23.4	8.2	12.6	13.8	58.0
		0.70	0.9	24.2	9.4	12.2	15.3	61.1



Şekil 4.2. Transglukosidaz Dozajına Göre (kg/TDS) Zamana Bağlı %Maltoz İçeriği

Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de, transglukosidaz enzimi (0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) ve başlangıç hammaddesi olarak farklı maltoz içeriğine sahip şuruplar kullanılarak izomaltooligosakkarit üretimi sonucu elde edilen bulgular verilmiştir.

Bu amaçla yapılan çalışmalarda, başlangıç hammaddelerinde maltoz içeriği %75'tir ve 1.2 kg/TDS BBA enzimi kullanılarak elde edilmiştir. Ardından farklı transglukosidaz enzim dozajları (0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiş (Tablo 4.4) ve reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu reaksiyonlar sonucu, transglukosidaz enzim dozajındaki artışa paralel reaksiyon süresince maltoz (%) içeriğinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Bu çalışmalara göre, 16. saat sonunda 0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS enzim dozajına bağlı olarak maltoz içeriği (%) sırasıyla %18.3, %16.5 ve %14.3 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, aynı reaksiyon koşullarında transglukosidaz enzim dozajı arttıkça maltozdan izomaltooligosakkarite dönüşümün de arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Transglukosidaz Dozajına Göre (kg/ton DS) Zamana Bağlı %IMO İçeriği

Şekil 4.3.'ün incelenmesiyle de görülebileceği gibi, transglukosidaz enzim dozaj miktarındaki (0.60, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) artışa paralel olarak elde edilen izomaltooligosakkarit miktarı (%) verilmiştir. Bu çalışmalar sırasında kullanılan hammaddenin maltoz içeriği %80'dir ve 1.4 kg/TDS BBA enzimi kullanılarak elde edilmiştir. Ardından farklı transglukosidaz enzim dozajları (0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiş (Tablo 4.4) ve reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda

gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu, transglikosidaz enzim dozajındaki değişime bağlı olarak reaksiyon süresince IMO içeriğinde (%) zamana bağlı olarak meydana gelen değişim belirlenmiştir.

Bu çalışmalara göre, 24. saat sonunda 0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS enzim dozajına bağlı olarak toplam IMO içeriği (%) sırasıyla %56.4, %58.0 ve %61.1 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, aynı reaksiyon süresinde, transglikosidaz enzim dozajı arttıkça maltozdan izomaltooligosakkarite dönüşümün de arttığı tespit edilmiştir. Benzer çalışmalarda da olduğu gibi (Niu ve ark., 2017b), transglukosidaz enzim dozajındaki artışın reaksiyon süresini kısalttığı da tespit edilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, mısır nişastasından enzimatik yöntemle prebiyotik bir ürün olan izomaltooligosakkarit (IMO) üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar sonucu, izomaltooligosakkarit üretiminde kullanılan hammaddelerin özellikleri (başlangıç maltoz içerikleri, %) yanısıra kullanılan enzimlerin etkinlikleri ve dozajları belirlenmiştir. Denemelerden elde edilen bulguların ışığında;

1. Çalışmalar sonucunda elde edilen izomaltooligosakkaritlerin (IMO içeriği %50 ve üzeri), ticari olarak piyasada yer alan ve satışı yapılan ürünler ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.
2. Başlangıç maltoz içeriğine bağlı olarak (%70, %75 %80); kullanılan beta amilaz (1.0 kg/TDS, 1.2 kg/TDS ve 1.4 kg/TDS) ve transglukosidaz (0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) enzim dozajlarındaki artışa bağlı olarak elde edilen toplam IMO miktarı artırmıştır.
3. Reaksiyon süresi ve pH, sıcaklık gibi ortam şartları sabit tutulduğunda; artan beta amilaz enzim dozajı (1.0 kg/TDS, 1.2 kg/TDS ve 1.4 kg/TDS), elde edilen toplam IMO miktarını (%) artırmıştır.
4. Transglukosidaz enziminin IMO oluşumuna etkisi incelendiğinde, transglukosidaz enzim dozaj miktarı arttıkça (0.60 kg/TDS, 0.65 kg/TDS ve 0.70 kg/TDS) oluşan toplam IMO miktarı (%) artmıştır.
5. Maksimum IMO miktarına (%); %80 maltoz içeren şurupların hammadde olarak kullanıldığı ve enzim olarak 1.4 kg/TDS beta amilaz ile 0.70 kg/TDS transglukosidazın kullanıldığı denemelerde ulaşılmıştır.

Mısır nişastasının hidrolizini takiben elde edilen nişasta sütünün, beta amilaz enzimi ile sakkarifikasyonu sonucu, %70-80 maltoz içeren şuruplar elde edilmiştir. Ardından transglukosilasyon reaksiyonu için gerekli şartlar sağlanmıştır. Reaksiyonun başlangıcında

pH'yı ayarlamak ve reaksiyon bitişinde enzim inaktivasyonunu sağlamak için asit ve baz çözeltileri kullanılmıştır. İzomaltoligosakkarit içeriği yüksek olan şuruplar, pH dengesinin sağlanması için iyon değiştirici reçine ile iyon yükünden arındırılmıştır. Takiben nanofiltrasyon sistemi kullanılarak izomaltoligosakkarit içeriğinde kalan safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Izomaltoligosakkarit üretilirken nişasta hidrolizatının dekstroz eşdeğeri (DE) önemli parametrelerden biridir. Bu tez çalışmasında 10-11 DE'li sıvılaştırılmış nişasta hidrolizatından başlanarak beta-amilaz, pullulanaz ve maltogenase enzim kombinasyonları kullanılarak maltoz içeriği yüksek şuruplar elde edilmiştir. DE değeri daha düşük (6-8 DE) olan nişasta hidrolizatından elde edilecek maltoz içeriği daha yüksek olacaktır. Bu sayede elde edilecek toplam IMO miktarı (%) arttırılabilir.

İleride yapılacak çalışmalarda; izomaltoligosakkaritlerin saflaştırılması aşamalarında farklı yöntemler uygulanabilir. Enzimatik sentez ile elde edilen IMO içeriğini diğer sakkaritlerden ayırmak için iyon değiştirici reçineler kullanılarak katyonların adsorpsiyon üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla kromatografi yöntemi uygulanabilir. Bu amaçla Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ve H^+ katyonik formlarda iyon değiştirici reçinesi Dowex 50WX4 (Ek-9) kullanılabilir. Ayrıca, sürekli kromatografik ayırma (SMB) yöntemi, IMO ve prebiyotik olmayan sakkaritleri birbirinden ayırmada kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>

Artık N., Bayındırlı L., Mert İ. Karbonhidratlar, Mısır Şekeri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı, 98, Ankara, 2011.

Basu, A., Mutturi, S., & Prapulla, S. G. (2016). Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. *Process Biochemistry*, 51(10), 1464–1471. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.008>

Blanchard. (1992). Blanchard, P. H.: Technology of Corn Wet Milling (And Associated Processes). Industrial Chemistry Library Vol. 4, Elsevier Science Publishers, Amsterdam-London-New York-Tokyo 1992, xxiv + 536 p., numerous drawings and tables, price: Dfl. 425.00/US \$ 243.0. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19920441117>

Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J., & Polaina, J. (2018). Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. *Amylase*, 2(1), 17–29. <https://doi.org/10.1515/amylase-2018-0003>

Chen, H. L., Lu, Y. H., Lin, J. J., & Ko, L. Y. (2001). Effects of isomalto-oligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(1), 44–49. <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719013>

Cho, S. K., Eom, H. J., Moon, J. S., Lim, S. B., Kim, Y. K., Lee, K. W., & Han, N. S. (2014). An improved process of isomaltooligosaccharide production in kimchi involving the addition of a *Leuconostoc* starter and sugars. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.027>

David, C., & Data, R. U. S. A. (2015). (12) *Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2015/0259773 A1*. 1(19).

Dinges, A., & Llp, L. (2009). Process for the Preparation of Isomaltooligosaccharide-hydrogenated WO 2009/088493 A1 (74). 2009(July).

Dziedzic, S. Z., & Kearsley, M. W. (1995). The technology of starch production. In *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2159-4_1

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gibson, Glenn R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition, Supplement*, 1(2), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.09.005>

Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., & Paquot, M. (2011). Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(5), 394–409. <https://doi.org/10.1080/10408391003628955>

Goulas, A. K., Cooper, J. M., Grandison, A. S., & Rastall, R. A. (2004). Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 778–787. <https://doi.org/10.1002/bit.20257>

Heinze, K. M., & George, M. (2017). *From Grain to Granule: The Biomechanics of Wheat Grain Fractionation with a Focus on the Role of Starch Granules*.

Howling, D., 1984. Glucose Syrup: Production, Properties and Applications 277- 318.

Kearney, R. L., MAURER, H. W., 1990. Starch and Starch Products in Paper Coating, Tappi

Press, 2-30, Atlanta, USA

Kearsley, M. W., & Birch, G. G. (1985). The chemistry and metabolism of the starch based sweeteners. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(85\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(85)90115-3)

Kolida, S., & Gibson, G. R. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2503s>

Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T., & Okada, S. (1993). A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 953–959. <https://doi.org/10.1128/aem.59.4.953-959.1993>

Larowe, D. E., & Cappellen, P. Van. (2011a). GRAS Exemption Claim for VF-DP3-IMO. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, January. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2011.01.020>

Larowe, D. E., & Cappellen, P. Van. (2011b). GRAS Exemption Claim for VF-DP3-IMO. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, January.

Li, J., Tan, B., & Mai, K. (2009). Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1–2), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.005>

Medoff, M., & Masterman, T. C. (2010). Processing biomass. In *U.S. Pat. Appl. Publ.*

Meyer, T. S. M., Miguel, A. S. M., Fernández, D. E. R., & Ortiz, G. M. D. (2015). Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry. *Food Production and Industry*. <https://doi.org/10.5772/60934>

Nakakuki, T. (2003). Development of functional oligosaccharides in Japan. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 15(82), 57–64. <https://doi.org/10.4052/tigg.15.57>

Niu, D., Qiao, J., Li, P., Tian, K., Liu, X., Singh, S., & Lu, F. (2017a). Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26(July), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.002>

Niu, D., Qiao, J., Li, P., Tian, K., Liu, X., Singh, S., & Lu, F. (2017b). Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.002>

O'Donnell, K., & Kearsley, M. (2012). Sweeteners and Sugar Alternatives in. In *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*.

Ojha, S., Mishra, S., & Chand, S. (2015). Production of isomalto-oligosaccharides by cell bound α -glucosidase of *Microbacterium* sp. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.009>

Pan, Y. C., & Lee, W. C. (2005). Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(7), 797–804. <https://doi.org/10.1002/bit.20402>

Qureshi, M. H. (2008). Application for the approval of isomalto-oligosaccharide (IMO). *Application for the Approval of Isomalto- Oligosaccharide (Imo)*, 258, 6–8.

Rolim, P. M. (2015). Prebiotic Food Development. *Food Science and Technology*, 35(1), 3–10.

Shetty, J. K., Vadakoot, J., Vadakoot, S., Alto, P., & Data, R. U. S. A. (2011). (12) *United States Patent*. 2(12).

Sorndech, W., Nakorn, K. N., Tongta, S., & Blennow, A. (2018). Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications. *Lwt*, 95, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.098>

Storz, E., & Steffens, K. J. (2004). Feasibility Study for Determination of the Dextrose Equivalent (DE) of Starch Hydrolysis Products with Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). *Starch/Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.200300220>

Subhan, F. B., Hashemi, Z., Archundia Herrera, M. C., Turner, K., Windeler, S., Gänzle, M. G., & Chan, C. B. (2020). Ingestion of isomalto-oligosaccharides stimulates insulin and incretin hormone secretion in healthy adults. *Journal of Functional Foods*, 65(November 2019), 103730. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103730>

Tegge, G. (1974). Junk, W. R., und H. M. Pancoast: Handbook of Sugars – for Processors, Chemists and Technologists (Handbuch der Zucker – für Verarbeiter, Chemiker und Technologen). The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut 1973. 327 Seiten mit 101 Tab. und 5. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19740260410>

Tuohy, K., Rouzaud, G., Bruck, W., & Gibson, G. (2005). Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics - Assessment of Efficacy. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/1381612053382331>

Vercauteren Ronny L. M., Nguyen Van Sau, & Roper Harald W. W. (1998). *Method for the production of isomalto-oligosaccharide rich syrups*.

Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.001>

Yangcheng, H., Jiang, H., Blanco, M., & Jane, J. L. (2013). Characterization of normal and waxy corn starch for bioethanol production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 379–386. <https://doi.org/10.1021/jf305100n>

Yun, J. W., Lee, M. G., & Song, S. K. (1994). Continuous production of isomalto-oligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 16(11), 1145–1150. <https://doi.org/10.1007/BF01020841>

Ek 1 Clearflow AA Enzimi



CLEARFLOW® AA

Amylases for Starch Liquefaction for Dextrose

DESCRIPTION

Clearflow® AA is the first in a new line of liquefaction enzyme products from DuPont; starch hydrolyzing α -amylases with excellent stability against the high temperatures, low pH and limited calcium levels of industrial starch liquefaction. Hydrolytic properties are optimized for dextrose production and combine the best features of the thermostable bacterial amylases from *Bacillus licheniformis* and *Geobacillus stearothermophilus* along with DuPont's latest α -amylase protein engineering technologies. Efficient production is accomplished by fermentation in our state-of-the-art recombinant host microorganisms.

Amylases reduce liquefact viscosity by liquefying starch under direct steam injection heating conditions, hydrolyzing α -D-1,4 glucosidic bonds in starch to produce soluble dextrans for efficient saccharification to dextrose hydrolyzate. Rapid viscosity reduction ensures high quality mixing and shear in the jet cooker, enabling high-solids operation without compromising hydrolyzate quality.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Trivial names: Alpha-amylase
Classifications: Carbohydrase, hydrolase
Systematic Name: 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase
E.C.: 3.2.1.1
CAS: 9000-90-2
Appearance: Dark brown, non-viscous liquid
Density: 1.10 $\pm$ 0.05 g/ml

LIMIT OF IMPURITIES

Bacterial count and heavy metals conform to Food Chemicals Codex:

Total Viable Count: $\leq$ 50m, 000/g
Production Organism: Negative in 1 ml
E. Coli, Salmonella sp.: Negative in 25 ml
Coliforms: $\leq$ 30/g
Heavy Metals, as lead: $\leq$ 30 ppm
Lead, ppm: $\leq$ 5 ppm

BENEFITS

The technologies embodied in Clearflow® AA products provide benefits not optimized with traditional amylases alone.

- Thorough and reliable removal of residual starch, leaving no iodine-staining material in dextrose hydrolyzate
- Rapid viscosity reduction, allowing high solids liquefaction, with gains in throughput and reduced evaporation costs
- Minimal spin-tube sediment in dextrose hydrolyzate, correlating with good hydrolyzate filtration
- Operation at lower pH to minimize loss of dextrose to maltulose and color formation, reducing chemical and refining costs
- Higher potency than prior FRED products, allowing economical shipping and storage
- Operation without added calcium in most systems
- No process changes are required in most systems

APPLICATION RECOMMENDATIONS

Clearflow® AA products are used primarily in the "enzyme, short time" or EST process employed widely in the dextrose industry. First is a starch preparation step in which enzyme is added after adjustments are made to solids, pH and sometimes calcium, Table 1. The warm (near gelatinization) starch slurry is then pumped under pressure into a direct steam injection jet cooker where the temperature rises immediately to 108 $\pm$ 3°C (226 $\pm$ 5°F). The starch is disrupted by the heat and shear in the cooker and, after an initial spike, the viscosity falls over the next 5-7 minutes. This first stage of cooking is critical to removal of stubborn residual starch. The hot liquefact is flashed to 96 $\pm$ 3°C (205 $\pm$ 5°F) and held in a second stage for an additional 120 $\pm$ 30 minutes during which the DE rises to above $\sim$ 10. The DE formation during this second stage of cooking prevents later retrogradation.



RECOMMENDED OPERATIONAL CONDITIONS	
Dry Substance	up to 40% weight/weight
pH	5.5 to 5.8
Calcium	≥5 ppm weight/weight
Dosage	as required to produce 10 DE approx. 0.32 kg/ton ds starch
Liquefaction	
Primary	106 to 110°C (223 to 230°F) 5-7 min
Secondary	95°F 90-120 minutes to 10 DE

Table 1

First stage - Starch paste viscosity in the jet cooker can reach peaks over 1,000 centipoise, thicker than molasses and dilatant until the granules fully rupture. High viscosity affects the efficiency of mixing and the transfer of shear energy to disrupting the starch granules. Clearflow® AA amylase improves liquefaction efficiency in part by reducing the peak viscosity, as demonstrated in a lab cooker, Figure 1.

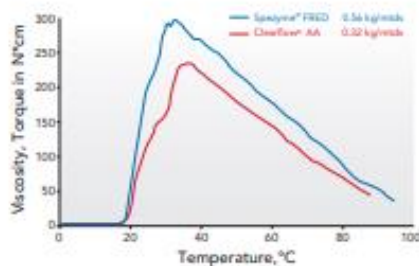


Figure 1: Liquefact Viscosity Reduction
Conditions: Torque on agitator in jacketed, stirred reactor, indicates viscosity. Temperature ramp of +1°C/min, 40% ds starch, pH 5.8, 15 ppm total CA⁺⁺.

Second stage - The recommended dosage Clearflow® AA amylase, designed to yield high quality hydrolyzate, will give a rate of DE formation essentially identical to Spezyme® FRED and FRED L products, Figure 2. Liquefact clarity and "break" will also be unchanged.

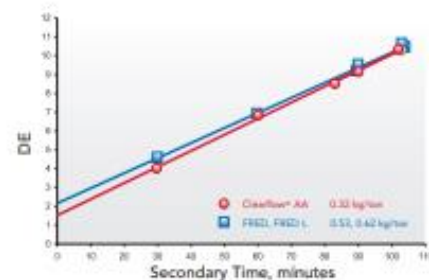


Figure 2: De Formation in 2nd Stage - Lab
Conditions: U.S. wet mill plants, 36-38% ds starch, pH 5.7-5.8 4-6 minute primary at 108.5°C (227°F), no added CA⁺⁺. Secondary at 96.7°C (206°F).

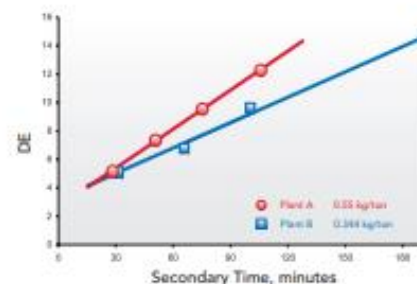


Figure 3: De Formation in 2nd Stage - Plant
Conditions: U.S. wet mill plants, 36-38% ds starch, pH 5.7-5.8 4-6 minute primary at 109°C (227-229°F) Secondary at 95°C (201-206°F).

DOSAGE

A dosage of 0.32 kg per metric ton dry starch is typical. The precise dosage required will depend on process parameters including starch quality, pH, temperature, solids level, available reaction times, and other factors. Contact a DuPont technical service representative for recommendations specific to your process and needs.

Ek-2: Optimalt BBA Enzimi



OPTIMALT® BBA

Barley Beta-Amylase for High Maltose Syrup Production

DESCRIPTION

OPTIMALT® BBA enzyme is a barley 1,4- α -D-glucan maltohydrolase (E.C.3.2.1.2) and is commonly referred to as beta-amylase. It is extracted from barley grain. Beta-amylase is an exoamylase that catalyzes the release of successive maltose units by hydrolyzing 1,4- α -D-glucosidic linkages from the nonreducing end of the dextrin chain. OPTIMALT® BBA enzyme is essentially free of α -amylase activity and is used for the production of maltose syrups from liquefied starch. This product complies with the current recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) and is GRAS (Generally Recognized As Safe) in the United States.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity: 1230 DP°/g (minimum)
Appearance: Clear brown liquid
Solubility: Completely miscible in water
Specific gravity: 1.16 - 1.28 g/ml

The activity of OPTIMALT® BBA barley β -amylase is expressed in Degrees of Diastatic Power (DP°). It is the amount of enzyme contained in 0.1 ml of a 5% solution of the sample enzyme preparation that will produce sufficient reducing sugars to reduce 5 ml of Fehling's solution when the sample is incubated with 100 ml of substrate for 1 hour at 20°C (68°F). A detailed assay method is available upon request.

APPLICATION

The starch syrup industry uses OPTIMALT® BBA enzyme to saccharify starch from various sources such as corn, potatoes, and wheat to a range of maltose-rich syrups.

Very high maltose syrups containing at least 70% maltose, less than 2% glucose, with fermentability of 90% are produced from enzyme-liquefied starch in 24 to 48 hours by the combined use of OPTIMALT® BBA enzyme and a debranching enzyme hydrolyzing

1,6- α -D-glucosidic bonds (OPTIMAX® L-1000). Typical dosage of OPTIMALT® BBA enzyme is 0.6 to 1.22 kg/MT dry substance (DS).

High maltose syrups containing 45 to 60% maltose and lowest possible glucose are obtained from both acid-liquefied and enzyme-liquefied starches. Typical dosage of OPTIMALT® BBA enzyme is 0.12 to 0.36 kg/MT DS, with a saccharification time of 4 to 24 hours.

High-conversion syrups of 60 to 63 DE containing 30 to 40% maltose and 30 to 38% glucose are readily achieved from both acid-liquefied and enzyme-liquefied starches by the combined use of OPTIMALT® BBA enzyme and glucoamylase. A saccharification time of 12 to 24 hours is typical.

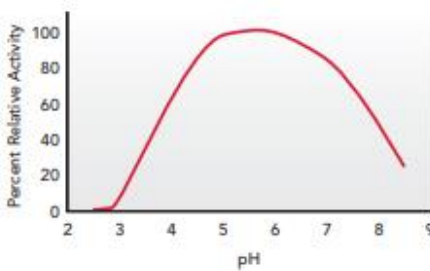
The brewing industry uses OPTIMALT® BBA enzyme to increase fermentability of the wort, especially when starchy adjuncts are added to the mash.

The alcohol industry can use OPTIMALT® BBA enzyme since this it is identical to the β -amylase found in barley malt.

EFFECT OF pH

Figures 1 and 2 illustrate the effect of pH on activity and stability of OPTIMALT® BBA enzyme. For maximum activity, the optimal pH range is from pH 5.2 to 5.5.

EFFECTS OF TEMPERATURE



pH	Percent Relative Activity
2.5	0
3.0	10
4.0	60
5.0	95
5.5	100
6.0	95
7.0	80
8.0	40
8.5	20

Figure 1: Effect of pH on Enzyme activity
 Substrate: 1% soluble starch held for 10 minutes at 25° C

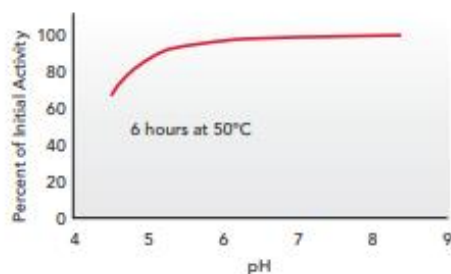


Figure 2: Effect of pH on Enzyme stability
Substrate: 30% w/w enzyme liquefied corn starch, DE 10

The recommended saccharification temperature is 55 to 60°C (131 to 140°F), optimally 57°C (135°F). With reaction times of six hours or less, 60 to 63°C (140 to 145°F) may be advantageous. At 30% substrate concentration, barley β -amylase will be inactivated in 70 minutes at 70°C (158°F) or in 15 minutes at 75°C (167°F), as shown in Figure 3.

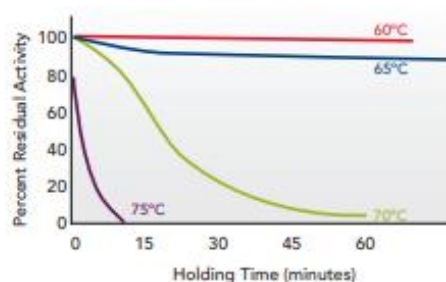


Figure 3: Residual Activity vs. Holding Time
Substrate: 30% w/w enzyme liquefied corn starch, DE 20, pH 6.5

PACKAGING

OPTIMALT® BBA enzyme is available in various package sizes. Please consult your DuPont representative for detailed information.

STORAGE

Storage of OPTIMALT® BBA enzyme under refrigerated conditions is recommended. Storage above 25°C (77°F) should be avoided. During storage, the expected activity reduction is about 1% per month at 4°C (40°F) and about 2% per month at 25°C (77°F).

SAFETY & ENZYME HANDLING

Inhalation of enzyme dust and mists should be avoided. In case of contact with the skin or eyes, promptly rinse with water for at least 15 minutes.

For detailed handling information, please refer to the appropriate Material Safety Data Sheet, the Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely With Enzymes*, and the Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*. All are available from DuPont.

TECHNICAL SERVICE

Information covering specific applications of this product is available. DuPont will work with customers to enhance processes and solve problems. Let us know what you need and we will assist you.

CONTACT INFORMATION

NORTH AMERICA
Rochester, New York (USA)
☎ +1 800 847 5311
☎ +1 585 256 5295

EUROPE, MIDDLE EAST & AFRICA
Leiden, The Netherlands
☎ +31 71 5686 168
☎ +31 71 5686 169

LATIN AMERICA
Buenos Aires, Argentina
☎ +54 11 4875 9500
☎ +54 11 4875 9529

SÃO PAULO, BRAZIL
☎ +55 11 4613 3800
☎ +55 11 4612 1101

ASIA/PACIFIC
Singapore
☎ +65 6511 5600
☎ +65 6511 5666

Shanghai, P.R. China
☎ +86 21 2307 9588
☎ +86 21 2307 9599

Mumbai, India
☎ +91 22 3008 7131
☎ +91 22 3008 7150

Lahore, Pakistan
☎ +92 300 8476 404
☎ +92 423 5437 866

www.dupont.com

Copyright © 2012 DuPont. All rights reserved. The DuPont Oval Logo, DuPont, the Leaf Globe, OPTIMALT are trademarks or registered trademarks of E. I. du Pont de Nemours and Company or its affiliates.

USE AND/OR SALE OF THIS PRODUCT MAY BE COVERED BY ONE OR MORE PATENTS IN THE U.S. AND OTHER COUNTRIES, AS WELL AS PENDING PATENT APPLICATIONS IN THE U.S. AND OTHER COUNTRIES.

The information contained in this product literature is, to the best of our knowledge, true and accurate and the product as sold is in conformance with the specifications set forth herein as determined by the assay methods described herein. Due to conditions of use, technical errors or omissions, improper handling or storage beyond our control, DuPont US Inc. hereby DISCLAIMS ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. DuPont US Inc. shall not be liable for any incidental, consequential, or special damages resulting in any way from the furnishing, performance, or use of this product literature or the product described herein.

Nothing contained herein shall be construed as a representation by DuPont US Inc. that the use or sale of the product or process described herein will not violate any rules or regulations of any countries, regions, localities, etc. or infringe upon patents or other intellectual property rights of third parties or that the recommendations and usage suggestions described constitute any authorization or inducement to infringe any such rights.

This document is subject to change without further notice.

REV1012 3203 OPTIMALTBBA 01



Ek-3: Optimax L-2500 Enzimi



OPTIMAX® L-2500

Low pH, Heat Stable Debranching Enzyme

DESCRIPTION

OPTIMAX® L-2500 enzyme is intended for use with saccharifying enzymes, glucoamylase and β -amylase, to produce high dextrose and high maltose syrups, respectively. OPTIMAX® L-2500 enzyme is a pullulanase (E.C. 3.2.1.41) produced from controlled fermentation of a genetically modified strain of *Bacillus licheniformis*. The enzyme is stable in the acidic pH range at high temperature and catalyzes the hydrolysis of branched (1,6- α -D) glucosidic linkages in amylopectin and dextrans to produce linear oligosaccharide chains containing (1,4- α -D) glucosidic linkages.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity: 2250-2750 ASPU/g

Appearance: Brown liquid

pH: 4.0 - 5.5

Specific gravity: 1.16 - 1.19 g/ml

One Acid Stable Pullulanase Unit (ASPU) is defined as the amount of enzyme which liberates one equivalent reducing potential as glucose per minute from pullulan at pH 4.5 and a temperature of 60°C. A detailed assay method is available upon request.

PERFORMANCE BENEFITS

OPTIMAX® L-2500 enzyme offers the following benefits in the commercial production of high glucose and high maltose syrups:

- Increases product yield
- Increases the reaction rate
- Allows the use of higher dissolved solids
- Increases plant capacity
- Reduces energy costs

APPLICATION RECOMMENDATIONS

The maximum performance of OPTIMAX® L-2500 enzyme matches the pH and temperature optimal performance of a commercial glucoamylase and can work in concert to

produce high-glucose syrups (Figures 1 and 2). Similarly, OPTIMAX® L-2500 enzyme and β -amylase can be used in a single reaction step to produce very high maltose syrups containing greater than 70% maltose.

EFFECT OF pH

The relative activity at 60°C shows an optimum pH range of 4.2 to 4.6 and effective pH range of 4.0 to 5.0 (Figure 1).

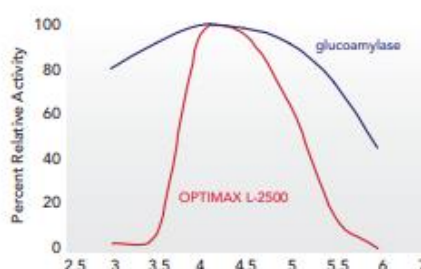


Figure 1: Effect of pH on Activity at 60°C (140°F)

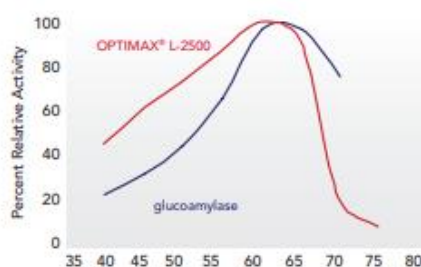


Figure 2: Effect of Temperature on Activity at pH 4.5

Ek-4: Optimalt 2G Enzimi



OPTIMALT® 2G

Maltogenic Alpha Amylase Enzyme

DESCRIPTION

OPTIMALT® 2G enzyme is a Maltose-forming alpha amylase (EC 3.2.1.133; glucan 1,4-alpha-maltohydrolase) produced from controlled fermentation of a genetically modified strain of *Bacillus licheniformis*. This product is hydrolyzing alpha-1,4 glucosidic bonds of conventional liquefied starch, producing high concentrations of Maltose (DP2).

TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity: 7500 BU/g (minimum)
Appearance: brown liquid
pH: 6.0-7.0

The activity of OPTIMALT® 2G enzyme is expressed in Beta-amylase Units. One Beta-amylase unit of activity is the quantity of enzyme which will form 1 micromole of glucose from maltotriose in one minute under specific assay conditions.

EFFECT OF PH

OPTIMALT® 2G enzyme has an optimum pH range of pH 5.0 to 6.0 at 60 °C (140°F) as seen in Figure 1. It can effectively hydrolyze liquefied starch over a pH range of pH 4.0 to 7.0 at 60 °C (140°F).

EFFECT OF TEMPERATURE

OPTIMALT® 2G enzyme has a temperature optimum of 60°C (145°F) to 70°C (158°F) and can hydrolyze liquefied starch over the temperature of 55-80°C (131-176°F).

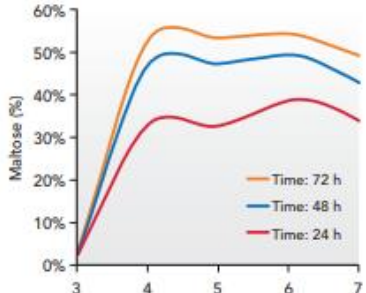


Figure 1: Effect of pH and Time on Maltose formation. Substrate: 32% w/w liquefied corn starch; 60°C 0.25 kg/MT OPTIMALT® 2G.

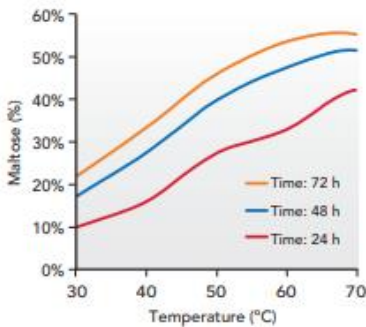


Figure 2: Effect of Temperature and Time on Maltose formation. Substrate: 32% w/w liquefied corn starch at pH 5.0; 0.25 kg/MT OPTIMALT® 2G.

PROCESS PARAMETER	OPTIMUM RANGE	OPERATIONAL RANGE
pH	5.0 to 6.0	4.5 to 6.5
Temperature	60 to 70°C (145 to 158°F)	Up to 80°C (176°F)

HIGH MALTOSE SYRUP COMPOSITION

The oligosaccharide composition of maltose syrup at different enzyme dosages using OPTIMALT® 2G enzyme (pH 5.0; 60°C) is provided below (Table 2).

The maximum concentration of DP2 can be improved by using lower dissolved solids, lower starting DE of the starch liquefact and the addition of a debranching enzyme like OPTIMAX® L 1000.



Enzyme Dose (kg/MT)	PERCENT COMPOSITION			
	DPn	DP3	DP2	DP1
0,031	65,0	4,7	27,6	2,7
0,063	57,9	3,9	34,6	3,6
0,125	52,3	3,1	40,2	4,4
0,25	45,2	2,2	47,3	5,3
0,50	37,8	1,3	54,7	6,2
1,00	32,6	0,8	59,9	6,7
2,00	29,4	0,5	62,8	7,2
4,00	28,0	0,5	63,7	7,8

Table 2: Carbohydrate profile of High Maltose Syrup using OPTIMALT® 2G. Substrate: liquefied corn starch Conditions: pH 5.25, 60°C, 32% DSB, 48 hours.

DOSAGE GUIDELINES

OPTIMALT® 2G dose will vary with different substrates and operating conditions such as pH, temperature, and reaction time. Small-scale experiments are recommended to determine optimum enzyme dosage. An OPTIMALT 2G dose of 0.25 – 2.0 kg per metric ton dry substance (DS) is recommended as a starting point for the optimization of enzyme dosage.

REGULATORY STATUS

This product complies with current recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and is GRAS (Generally Recognized As Safe) in the United States.

PACKAGING

OPTIMALT® 2G enzyme is available in various pack sizes. Please consult your DuPont representative for detailed information.

STORAGE

OPTIMALT® 2G enzyme should be stored under cool, dry conditions. Refrigeration at 4-10°C is recommended for long-term storage.

SAFETY & ENZYME HANDLING

Inhalation of enzyme dust and mists should be avoided. In case of contact with the skin or eyes, promptly rinse with water for at least 15 minutes.

For detailed handling information, please refer to the appropriate Material Safety Data Sheet, the Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely*

With Enzymes, and the Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*. All are available from DuPont.

TECHNICAL SERVICE

Information covering specific applications of this product is available. DuPont will work with customers to enhance processes and solve problems. Let us know what you need and we will assist you.

CONTACT INFORMATION

NORTH AMERICA

Rochester, New York (USA)
☎ +1 800 847 5311
✉ +1 585 256 5295

EUROPE, MIDDLE EAST & AFRICA

Leiden, The Netherlands
☎ +31 71 5686 168
✉ +31 71 5686 169

LATIN AMERICA

Buenos Aires, Argentina
☎ +54 11 4875 9500
✉ +54 11 4875 9529

SÃO PAULO, BRAZIL

☎ +55 11 4613 3800
✉ +55 11 4612 1101

ASIA/PACIFIC

Singapore
☎ +65 6511 5600
✉ +65 6511 5666

Shanghai, P.R. China
☎ +86 21 2307 9588
✉ +86 21 2307 9599

Mumbai, India
☎ +91 22 3008 7131
✉ +91 22 3008 7150

Lahore, Pakistan
☎ +92 300 8476 404
✉ +92 423 5437 866

www.dupont.com

Copyright © 2013 DuPont. All rights reserved. The DuPont Oval Logo, DuPont®, the Leaf Globe, and OPTIMALT® are trademarks or registered trademarks of E. I. du Pont de Nemours and Company (DuPont) or its affiliates.

USE AND/OR SALE OF THIS PRODUCT MAY BE COVERED BY ONE OR MORE PATENTS IN THE U.S. AND OTHER COUNTRIES, AS WELL AS PENDING PATENT APPLICATIONS IN THE U.S. AND OTHER COUNTRIES.

The information contained in this product literature is, to the best of our knowledge, true and accurate and the product as sold is in conformance with the specifications set forth herein as determined by the assay methods described herein. Due to conditions of use, technical errors or omissions, improper handling or storage beyond our control, DuPont and its affiliates hereby DISCLAIM ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. DuPont and its affiliates shall not be liable for any incidental, consequential, or special damages resulting in any way from the furnishing, performance, or use of this product literature or the product described herein.

Nothing contained herein shall be construed as a representation by DuPont and its affiliates that the use or sale of the product or processes described herein will not violate any rules or regulations of any country, region, locality, etc., or infringe upon patents or other intellectual property rights of third parties or that the recommendations and usage suggestions described constitute any authorization or inducement to infringe any such rights.

This document is subject to change without further notice.

REV0813 4090 OPTIMALT2G 01



Ek-5: Transglucosidase L-2000 Enzimi



DU PONT

TRANSGLUCOSIDASE L-2000

Enzyme for the Production of Isomalto-Oligosaccharide (IMO) Syrups

DESCRIPTION

Transglucosidase L-2000 is a purified D-glucosyltransferase (transglucosidase, EC 2.4.1.24) free from glucoamylase activity. Transglucosidase L-2000 is produced through controlled fermentation, using a genetically modified strain of *Trichoderma reesei*.

Transglucosidase catalyses both hydrolytic and transfer reactions on incubation with α -D-glucooligosaccharides. Transfer occurs most frequently to HO-6, producing isomaltose from D-glucose, and panose from maltose. The enzyme can also transfer to the HO-2 or HO-3 of D-glucose to form kojibiose or nigerose, or back to HO-4 to form maltose. The action on maltose produces equimolar concentration of panose and glucose.

As a result of transglucosidase reactions, the malto-oligosaccharides are converted to isomalto-oligosaccharides resulting in a different class of polysaccharides containing high proportions of glucosyl residues linked by a α -D-1, 6 linkages from the non-reducing end.

The enzymatic action on maltose is illustrated below (Fig. 1).

Step 1: Formation of the Glucosyl-Enzyme Complex
 $G-G + E \rightleftharpoons E-G + G$ (Glucose)
 (Maltose Enzyme)

Step 2: Glucosyl Transfer

I.) Primary Reaction

$G-G \xrightarrow{E} G-G \rightarrow G-G$ (Panose)

II.) Secondary Reaction

A)

$G \xrightarrow{E} G \rightarrow G$ (Isomaltose)

B)

$G-G \xrightarrow{E} G-G \rightarrow G-G$ (Dextran triosyl D-glucose)

$G \xrightarrow{E} G \rightarrow G$ (Isomaltotriose)

Figure 1: Transglucosylation Reaction Mechanism

REGULATORY STATUS

Transglucosidase L-2000 is Generally Recognized As Safe (GRAS) for use in making iso-maltooligosaccharides and the production of ethanol from molasses.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity: 1700 TGU/g (minimum)
Appearance: Light brown liquid
pH: 5
Specific gravity: 1.15 g/ml

The Transglucosidase Unit (TGU) is defined as the activity of enzyme required to produce one micromole of panose per minute under the conditions of the assay. A detailed assay procedure is available upon request.

OPERATIONAL CONDITIONS

DOSAGE GUIDELINES

Typical dosage for the enzyme is in the range of 0.55 to 0.6 kg using at more than 55% maltose dsb.

With Transglucosidase treatment								
	G	M	I	MT	P	I	B	Im
TGL2000 0.75 kg dsb	22	11	14	0	23	4	24	66
TGL2000 1 kg dsb	24	9	16	0	18	6	24	66
TGL500 3 kg dsb	25	15	11	0	26	2	19	59

Legend: G: Glucose, M: Maltose, I: Isomaltose
 MT: Maltotriose, P: Panose, IT: Isomalto-triose,
 B: Branch G3+, Im: IMO number

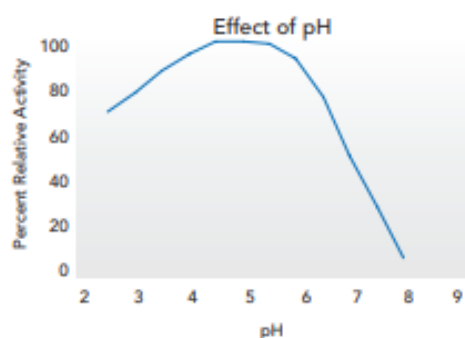
Liquefact					
BX	Iodine	DE	pH	Temp	DS
36.2	Red	13.2	5.3	60°C	34.23%

Test with Transglucosidase L-2000						
	Control		Treatment 1		Treatment 2	
	Dosage in g/ml	Dosage kg/MT	Dosage in g/ml	Dosage kg/MT	Dosage in g/ml	Dosage kg/MT
TG L500	KG5 40	2.92				
TG L2000			13.3	0.97	10	0.73
IMO no. (2times)	58.15	57.69	60.24	58.02	49.72	52.97

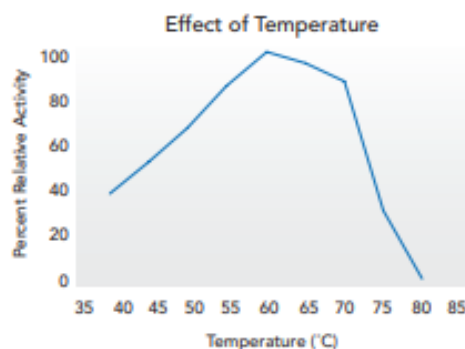
Reaction time 18 hrs pH 5-3



One plant trial was tested with 3 treatments, the control was dosed at 2.92 kg/MT of Liquefact and treatment 1 was 1/3 of Transglucosidase L-500 and still performed better on IMO production, the treatment 2 was 1/4 of Transglucosidase L-500 which had less IMO than control. So 1/3 unit of Transglucosidase L-2000 is performed as 1 unit of Transglucosidase L-500.



Reaction conditions: 50°C, 60 minutes, 30% maltose



Reaction conditions: pH 4.0, 60 minutes, 30% maltose

PACKAGING

Transglucosidase L-2000 enzyme is available in various package sizes. Please consult your DuPont representative for detailed information.

STORAGE

Transglucosidase L-2000 enzyme will meet the declared activity upon arrival at the customer's plant. Transglucosidase L-2000 enzyme can be safely stored in unopened and sealed original containers. For maximum stability, enzyme containers should be stored below 20°C (70°F), preferably refrigerated and sheltered against direct sunlight. Refrigeration at 5°C (41°F) is recommended for long-term storage.

SAFETY & ENZYME HANDLING

Inhalation of enzyme dust and mists should be avoided. In case of contact with the skin or eyes, promptly rinse with water for at least 15 minutes.

For detailed handling information, please refer to the appropriate Material Safety Data Sheet, the Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely With Enzymes*, and the Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*. All are available from DuPont.

TECHNICAL SERVICE

Information covering specific applications of this product is available. DuPont will work with customers to enhance processes and solve problems. Let us know what you need and we will assist you.

Ek-6: Relite RPS Reçine



RESINDION RESINS FOR FOOD TREATMENTS

TDS 11036

Product Information

RELITE RPS - Strongly Acidic Resin

TDS 11036

RELITE RPS

RELITE RPS is a highly porous type strongly acidic cation exchange resin.

RELITE RPS has a controlled porosity specifically developed for use in high concentrated sugar solutions and oxidising solutions. This homogeneous structure results in a key factor for the ion exchange kinetics and useful capacity of RELITE RPS, in particular treating solutions which contain inorganic salts and high level nitrogenous compounds such as amino-acids, peptides, proteins and others.

Its composition complies with the existing food processing rules and regulations.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Matrix	:	Highly porous copolymer styrene-DVB
Functional group	:	Sulphonic
Colour and physical form	:	Light brown opaque beads
Particle size range	:	0.425 ÷ 1.18 mm
Effective size	:	0.45 min mm
Uniformity Coefficient	:	1.6 max
Ionic form at the delivery	:	Na ⁺
Volume change	:	+ 10 % max Na ⁺ → H ⁺ form
Total exchange capacity	:	1.8 min eq/l
Water retention	:	48 ÷ 56 %
Chemical stability	:	stable in the whole pH range
Thermal stability	:	120 °C max
Shipping density	:	830 g/l approx.
Standard packaging	:	25 or 1000 liter bags

RECOMMENDED OPERATING CONDITIONS

Operating pH range	:	1 ÷ 14			
Operating temperature range	:	5 ÷ 120 °C			
Minimum bed depth	mm	:	800		
Linear operating flowrate	m/h	:	2 ÷ 50		
Backwash expansion	%	:	50 ÷ 80		
Regenerants	:	HCl	H ₂ SO ₄	NaCl	HNO ₃
Regenerant level range	g/l	:	40 ÷ 150	60 ÷ 200	80 ÷ 240
Concentration range	%	:	5 ÷ 10	1.5 ÷ 25	5 ÷ 15
Slow rinse volume	BV	:	1.5 ÷ 2	1.5 ÷ 2	1.5 ÷ 2
Fast rinse volume	BV	:	3 ÷ 5	3 ÷ 5	3 ÷ 5

Resindion S.r.l.

A Subsidiary of  MITSUBISHI CHEMICAL

Via Roma, 55 - 20082 Binasco (MI) - ITALY - Fax: +39.02.90090774 - Phone: +39.02.900130221-223 - E-mail: technical@resindion.com

OPERATING CAPACITY

Operating capacity depends on various parameters, such as inlet composition, endpoint, kinetic load and regenerant level.

In case of need, please contact our TECHNICAL DEPARTMENT.

Fig. 1 BED EXPANSION IN WATER

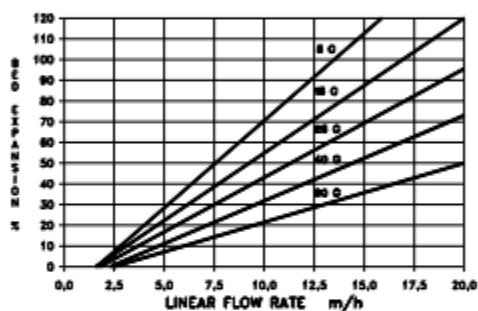
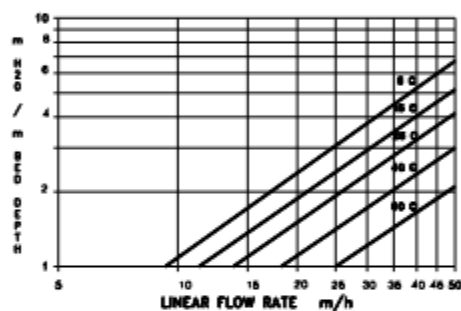


Fig. 2 PRESSURE DROP IN WATER



RECOMMENDED HCl QUALITY FOR REGENERATION (*)

Suspended solids	0 ppm
Chlorine	10 ppm
Iron	20 ppm
Heavy metals	10 ppm
Sulphates	5000 ppm

(*) Values referred to HCl 100%.

RECOMMENDED H₂SO₄ QUALITY FOR REGENERATION (*)

Purity	95	%
Suspended solids	0	ppm
Iron	50	ppm
Arsenic	5	ppm
Lead	5	ppm

(*) Values referred to H₂SO₄ 100%.

RECOMMENDED NaCl QUALITY FOR REGENERATION

Purity	97	% min
Moisture	2	% max
Suspended solids	0	%
Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺	0.5	% max
Sulphates	1	% max
Soluble iron	0	%
Alkalinity	0.001	max ppm CaCO ₃

All data and suggestions made herein are based upon our research and are believed to be accurate. However, no guarantee is made or implied since conditions and methods of use of our products are beyond our control. Our products are sold on the conditions that the user will evaluate them himself, as well as our formulae and recommendations, to determine their suitability for his own purpose. Also, statements as to the use of our products are not to be construed as recommendations for their use in the infringement of any patent.

Ek-7: Relite RAM1/M Reçine



RESINDION RESINS FOR FOOD TREATMENTS

TDS 05025

Product Information

RELITE RAM1/M - Weakly Basic Resin

TDS 05025

RELITE RAM1/M

RELITE RAM1/M is a highly porous type weakly basic anion exchange resin characterised by a highly uniform screen grade distribution, aspect granting a homogeneously distributed exchange kinetics across the whole resin bed.

Its main characteristics are a high operating capacity combined with a good exchange kinetics and a great resistance to physical, thermal and osmotic shocks.

RELITE RAM1/M is supplied in a properly calibrated screen grade so as to be applied in demineralization and decolorization of sugar solutions (sucrose and starch syrups), gelatin, glycerin and organic acids.

Its composition complies with the existing food processing rules and regulations.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Matrix	:	Highly porous copolymer styrene-DVB
Functional group	:	Tertiary amine
Colour and physical form	:	Light yellowish opaque beads
Particle size range	:	0.6 + 0.8 mm
Mean particle size	:	0.7 mm min
Uniformity Coefficient	:	1.1 max
Ionic form at the delivery	:	Free Base
Volume change	:	+ 25 % max (F.B. → Cl ⁻ form)
Total exchange capacity	:	1.5 eq/l min
Water retention	:	56 + 62 %
Chemical stability	:	stable in the whole pH range
Thermal stability	:	100 °C max (F.B.)
Shipping density	:	620 g/l approx.
Standard packaging	:	25 or 1000 liter bags

RECOMMENDED OPERATING CONDITIONS

Operating pH range	:	0 + 9
Operating temperature range	:	5 + 80 °C
Minimum bed depth mm	:	800
Linear operating flowrate m/h	:	5 + 50
Backwash expansion	:	50 + 80 %
Regenerants	:	NaOH NH ₄ OH
Regenerant level range g/l	:	60 + 80 50 + 70
Concentration range %	:	2 + 6 2 + 4
Slow rinse volume BV	:	1.5 + 2 1.5 + 2
Fast rinse volume BV	:	4 + 8 4 + 8

Resindion S.r.l.

A Subsidiary of MITSUBISHI CHEMICAL

Via Roma, 55 - 20082 Binasco (MI) - ITALY - Fax: +39.02.90090774 - Phone: +39.02.900130221-223 - E-mail: technical@resindion.com

OPERATING CAPACITY

Operating capacity depends on various parameters, such as inlet composition, endpoint, kinetic load and regenerant level.

In case of need, please contact our TECHNICAL DEPARTMENT.

Fig. 1 BED EXPANSION IN WATER

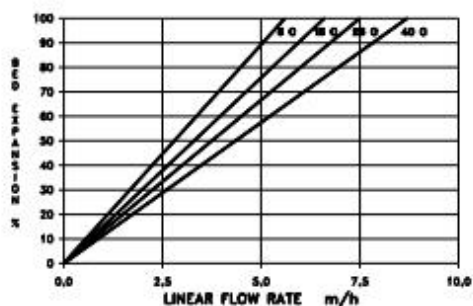
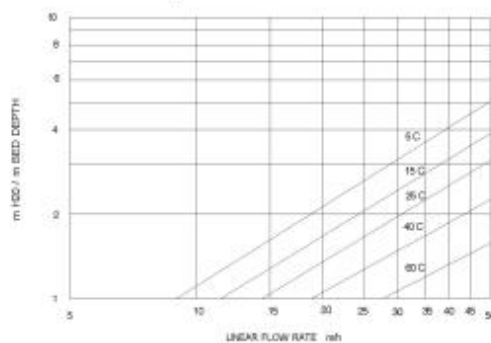


Fig. 2 PRESSURE DROP IN WATER

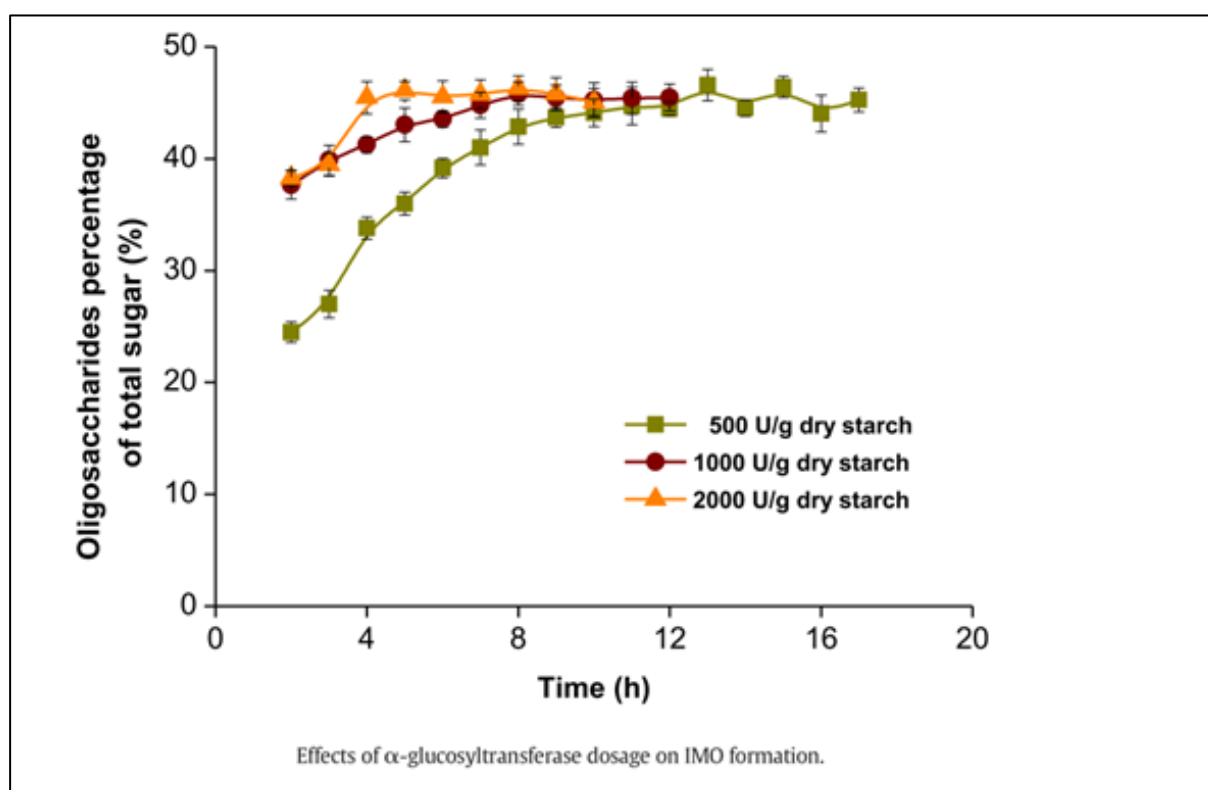


RECOMMENDED NaOH QUALITY FOR REGENERATION (*)

Silica	10 ppm	Sodium carbonate	0.5 %
Iron	10 ppm	Sodium chloride	0.5 %
Mercury	2 ppm	Sodium sulphate	0.2 %
Heavy metals	5 ppm	Hardness	0 ppm
Chlorates	10 ppm as O ₂	Suspended solids	0 ppm

(*) Values referred to NaOH 100%.

All data and suggestions made herein are based upon our research and are believed to be accurate. However, no guarantee is made or implied since conditions and methods of use of our products are beyond our control. Our products are sold on the conditions that the user will evaluate them himself, as well as our formulae and recommendations, to determine their suitability for his own purpose. Also, statements as to the use of our products are not be construed as recommendations for their use in the infringements of any patent.



Ek-9: Dowex 50 WX 4 Reçine



Specification

1.05238.0250 Ion exchanger Dowex® 50 WX 4 (strongly acidic cation exchanger), H⁺ form

Specification		
Description	moist beige spherules	
Total capacity (wet)	≥ 1.1	mol/l
Particle size (0.18-0.5 mm)	≥ 70.0	%

Dr. Manuel Schaffroth

Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.