

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE FERMENTASYONLARININ MATEMATİKSEL
MODELLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Mustafa GERMEÇ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE FERMENTASYONLARININ MATEMATİKSEL
MODELLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Mustafa GERMEÇ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE FERMENTASYONLARININ MATEMATİKSEL
MODELLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Mustafa GERMEÇ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FDK-2019-4761 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE FERMENTASYONLARININ MATEMATİKSEL
MODELLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Mustafa GERMEÇ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 11/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇİMEN



ÖZET

İNÜLİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE FERMENTASYONLARININ MATEMATİKSEL MODELLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Mustafa GERMEÇ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Haziran 2019; 275 sayfa

Bu çalışmanın amacı, enzim üretimi için en iyi karbon kaynağını belirlemek, enzim üretiminde kullanılan besiyeri formülasyonunu optimize etmek, üretilen enzimi kısmi saflaştırmak, enzimin özelliklerini belirlemek ve fermentasyonları ve substrat spesifikliğini matematiksel modellemektir.

Elde edilen sonuçlara göre, *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ile inülinaz (*Iase*) enziminin üretiminde kullanılan on farklı karbon kaynağı arasından en iyisi melas olmuştur (383.73 U/mL). Üretilen enzimin optimum çalışma koşulları pH 4.8, 60°C sıcaklık ve 10 dk inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Plackett-Burman Dizayn (PBD) ile besiyeri kompozisyonunun optimizasyonunda, optimum besiyeri %1 maya ekstraktı ve %1 peptondan oluşmuştur (*Iase*=1011.02 U/mL, sukraz (*Sase*)=834.28 U/mL ve I/S oranı=1.22). Besiyerinde kullanılan maya ekstraktı ve peptonun konsantrasyonu, Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile optimize edilmiş ve optimum besiyeri kompozisyonu %4.2 maya ekstraktından oluşmuştur (*Iase*=1294.50 U/mL, *Sase*=1076.85 U/mL, I/S oranı=1.20). Kinetik modelleme neticesinde, PBD ile optimize edilen besiyerinde enzim üretimi fungal gelişimden bağımsızdır ($\alpha \leq 0$ ve $\beta \neq 0$). MKD ile optimize edilen besiyerinde ise enzim üretimi karışık gelişimle ilgilidir ($\alpha \neq 0$ and $\beta \neq 0$). Küçük ölçekli biyoreaktördeki (5-L) fermentasyonlar, pH kontrolsüz ve havalandırılmalı ortamda gerçekleştirilmelidir (*Iase*=1810.76 U/mL, *Sase*=1537.88 U/mL ve I/S oranı=1.18). Büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda *Iase*, *Sase* ve I/S oranı sırasıyla 791.35 U/mL, 616.90 U/mL ve 1.28 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen enzim solüsyonu, santrifüj-süre kombinasyonu (16873 g-5 dakika, *Iase*=1181.18 U/mL, saflaştırma katsayısı (SK)=1.39) ve UF membranı (10 kDa, *Iase*=12065.20 U/mL, SK=5.33) ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Diğer yandan, enzimin substrat spesifikliğinde, aktivitesi düşük olan enzimin inüline olan afinitesinin sukrozdan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (K_m inülin=17.79 g/L < K_m sukroz=49.43 g/L). Tam tersine, aktivitesi yüksek olan enzimin sukroza olan ilgisinin inülininden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (K_m inülin=28.77 g/L > K_m sukroz=25.95 g/L).

Substrat üzerine eklenen enzim miktarının artması ile birlikte aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Mn^{2+} , enzimin aktivatörü, Cu^{2+} ve Ag^+ ise enzimin inhibitörü olmuştur. Üretilen enzimin 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda termostabil olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, enzimatik reaksiyonun termal inaktivasyon ve termodinamik parametreleri de hesaplanmıştır. Buna göre E_a , E_{ia} ve Z değerleri sırasıyla 37.3 kJ/mol.K, 112.86 kJ/mol

ve 12.80°C olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık 60°C'den 80°C'ye artırıldığında, enzimin inaktivasyon hız sabiti ve entropisi artarken yarılanma ömrü, D-değeri, entalpi ve serbest enerjisi azalmıştır. Bunun yanı sıra, enzimin moleküler ağırlığının 60-70 kDa arasında olduğu belirlenmiştir.

PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verileri matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilmiştir. Öte yandan, deneysel kinetik parametre değerleri de modellerden tahmin edilen değerler kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Son olarak, enzimin substrat spesifikliğinin deneysel verileri de matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilmiştir. Deneysel V_{max} ve K_m değerleri, modellerden tahmin edilen V_{max} ve K_m değerleri ile karşılaştırılmıştır. En iyi model(ler), model kıyaslama verilerine (ortalama karesel hata ($RMSE$), ortalama mutlak hata (MAE), ortalama standart sapma (MSD), belirleme katsayısı (R^2), eğim (m), Akaike bilgi ölçütü (AIC), ön yargı faktörü (BF) ve kesinlik faktörüne (AF)) göre tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, inülinaz enziminin üretimi, fermentasyonların kinetik modellenmesi, üretilen enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu ve fermentasyonlar ve substrat spesifikliğinin modellenmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, hem fermentasyon öncesi (upstream processing) hem de fermentasyon sonrası (downstream processing) prosesleri içermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyoreaktör, fermentasyon öncesi işlem, fermentasyon sonrası işlem, kinetik modelleme, Merkezi Kompozit Dizayn, optimizasyon, Plackett-Burman Dizayn, termodinamik parametreler, termostabilite

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇİMEN

ABSTRACT

AN INVESTIGATION ON THE PRODUCTION, PARTIAL PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF INULINASE ENZYME AND MATHEMATICAL MODELING OF ITS FERMENTATIONS

Mustafa GERMEC

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

June 2019; 275 pages

The objectives of this study were to determine the best carbon source for enzyme production, to optimize the medium formulation used in enzyme production, to make the kinetic modeling of the fermentations, to purify partially the produced enzyme, to determine the properties of the enzyme, and to model mathematically the fermentations and substrate specificity.

According to the results obtained; among the ten different carbon sources used in the production of *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) inulinase (*Iase*), molasses was the best (383.73 U / mL). The optimum working conditions of the enzyme were pH 4.8, 60°C and 10 min incubation time. In the optimization of the medium composition with Plackett-Burman Design (PBD), the optimum medium consisted of 1% yeast extract and 1% peptone (*Iase*=1011.02 U/mL, sucrase (*Sase*)=834.28 U/mL and I/S ratio=1.22). The concentration of yeast extract and peptone used in the medium was optimized by Central Composite Design (CCD) and the optimum medium composition consisted of 4.2% yeast extract (*Iase*=1294.50 U/mL, *Sase*=1076.85 U/mL, I/S ratio=1.20). As a result of kinetic modeling, the enzyme production in PBD-optimized medium is non-growth-associated ($\alpha \leq 0$ and $\beta \neq 0$). In CCD-optimized medium, the enzyme production is mixed-growth-associated ($\alpha \neq 0$ and $\beta \neq 0$). Fermentations in the small-scale bioreactor (5-L) should be carried out in a pH-uncontrolled and aerated environment (*Iase*=1810.76 U/mL, *Sase*=1537.88 U/mL and I/S ratio=1.18). As a result of fermentation in large scale bioreactor (30-L), *Iase*, *Sase* and I/S ratio were determined as 791.35 U/mL, 616.90 U/mL and 1.28, respectively.

The enzyme solution obtained was partially purified by centrifuge-time combination (16873 g-5 min, *Iase*=1181.18 U/mL, purification coefficient (PC)=1.39) and UF membrane (10 kDa, *Iase*=12065.20 U/mL, PC=5.33). On the other hand, in the substrate specificity of the enzyme, the inulin affinity of the low-activity enzyme was found to be higher than sucrose (K_m inulin=17.79 g/L < K_m sucrose=49.43 g/L). In contrast, the sucrose affinity of the high-activity enzyme was found to be higher than inulin (K_m inulin=28.77 g/L > K_m sucrose=25.95 g/L).

It was determined that activity increased with the increasing amount of enzyme added on substrate. Mn^{2+} was the activator of the enzyme whereas Cu^{2+} and Ag^+ were inhibitors of the enzyme. It was determined that the enzyme produced was thermostable at 30°C, 40°C and 50°C. In addition, thermal inactivation and thermodynamic

parameters of the enzymatic reaction were also calculated. Hereunder, the E_a , E_{ia} , and Z values were computed as 37.3 kJ/mol.K, 112.86 kJ/mol, and 12.80°C, respectively. When the temperature was increased from 60°C to 80°C, the inactivation rate constant and entropy of the enzyme increased while half-life, D-value, enthalpy and free energy decreased. Besides, it was determined that the molecular weight of the enzyme was between 60 kDa and 70 kDa.

The experimental data of fermentations performed in the medium composition optimized by PBD and CCD were estimated using mathematical models. On the other hand, the experimental kinetic parameters were also calculated and compared using the predicted values from the models. Finally, the experimental data of the substrate specificity of the enzyme were also predicted using mathematical models. Experimental V_{max} and K_m values were compared with V_{max} and K_m values estimated from the models. The best model(s) was/were determined according to the model comparison data (root-mean-square-error (*RMSE*), mean-absolute-error (*MAE*), mean standard deviation (*MSD*), regression coefficient (R^2), slope (m), Akaike's information criterion (*AIC*), bias factor (*BF*), and accuracy factor (*AF*)).

Consequently, the production of inulinase enzyme, kinetic modeling of the fermentations, partial purification and characterization of the produced enzyme and mathematical modeling of the fermentations and the substrate specificity have been performed successfully. The study includes both upstream processing and downstream processing.

KEYWORDS: Bioreactor, Central Composite Design, downstream processing, kinetic modeling, optimization, Plackett-Burman Design, thermodynamic parameters, thermostability, upstream processing

COMMITTEE: Assoc.Prof. Dr. Irfan TURHAN

Prof. Dr. Kemal KARABAG

Assist. Prof. Dr. Barçın KARAKAS BUDAK

Assist. Prof. Dr. Hatice Reyhan OZIYCI

Assist. Prof. Dr. Hüseyin CIMEN

ÖNSÖZ

Dünyadaki insan popülasyonunun her geçen gün artması ile birlikte ihtiyaçları da artmaktadır. Bu ihtiyaçlara cevap vermek için farklı ve yeni tekniklere gereksinim duyulmakta ve geliştirilen bu yeni teknikler hayata geçirilmektedir. Bunların başında, biyoteknolojik yolla enzim, biyoyakıt, mikrobiyal polisakkarit, mikrobiyal yağ, tek hücre proteini, farmasötik, organik asit, mikrobiyal plastik gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretimi gelmektedir. Bu amaçla, Dünyada yeterince değerlendirilmeyen tarımsal yan ürünler, enerji ürünleri, orman kalıntıları, tarımsal-endüstriyel atıklar, odun atıkları, çimlen, atık kâğıt, gıda endüstrisi kalıntıları, evsel atıklar ve insan ve hayvan atıkları, fermentasyon yoluyla katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu durum hem gıda atıklarının çevreye ve canlılara zarar verme problemini çözmekte hem de bu atıkların değerlendirilmesi sonucunda elde edilen katma değeri yüksek ürünler, ülke ve Dünya ekonomisine katkı sağlamaktadır. Katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde saf kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da kullanılmaktadır. Ancak, saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin ve organik atıkların değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar, alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu amaçla şeker kamışı, buğday kepeği, buğday samanı, buğday kavuzu, pirinç kepeği, pirinç samanı, pirinç kavuzu, arpa kavuzu, arpa samanı, yulaf kavuzu, yulaf kepeği, şeker kamışı, şeker pancarı, melas, mısır sapı, mısır yaprağı, mısır koçanı, çay işleme atığı, kullanılmış çay yaprakları, yer elması, keçiboynuzu, yıldızçiçeği yumru ekstraktı, karahindiba kazık kökü, muz kabuğu, enginar yaprakları, soya fasulyesi kepeği, kurutulmuş hindistan cevizi atığı, soğan kabuğu, sarımsak kabuğu, kahve posası, fil çimeni ve algler yaygın olarak kullanılmaktadır. Katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılan bu kaynaklar, "yenilenebilir kaynaklar" olarak adlandırılmaktadır. Bu kaynaklardan katma değeri yüksek bir ürün olan inülinaz enziminin üretilmesi, günümüzde bu enzimin saf karbon kaynaklarından (glukoz, fruktoz, mannoz, laktoz, sukroz vb.) üretilmesine alternatif olarak görülmekte ve ekonomik açıdan önemli ölçüde kazanç sağlamaktadır. İnülinazlar, gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın şekilde kullanılan fruktoz, fruktooligosakkaritler ve inulooligosakkaritlerin üretiminde kullanılan hidrolitik enzimlerdir. Diğer yandan inülinazlar (endo-inülinaz: 1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz; EC 3.2.1.7 ve ekzo-inülinaz: β -D-fruktan fruktohidrolaz; EC 3.2.1.80) etanol, sitrik asit, glukonik asit, bütanol, sorbitol, tek hücre yağları ve tek hücre proteinlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu kadar çok alanda inülinaz enzimin kullanılması, enzime olan talebin her geçen gün artacağını göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında öncelikli olarak 10 farklı karbon kaynağından *Aspergillus niger* A42 (ATCC 20447) ile inülinaz enziminin üretimi gerçekleştirilmiş ve aralarından en iyi karbon kaynağı olarak şeker pancarı melası seçilmiştir. Melas kullanılarak elde edilen ham enzim solüsyonu, enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Seçilen karbon kaynağının biyoteknolojik açıdan içeriğinin uygun olması ve endüstride yeterince değerlendirilememesi gibi nedenlerle çalkalamalı inkübatörde derin kültür fermentasyon yöntemi ile *A. niger* küfö kullanılarak besiyeri kompozisyonu Plackett-Burman Dizayn (PBD) ve Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) yöntemleri ile optimize edilmiştir. Sonrasında, hem PBD hem de MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen

fermentasyonların kinetik modellemesi gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonu kullanılarak küçük ölçekli (5-L) ve büyük ölçekli (30-L) reaktörlerde inülinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekli biyoreaktörlerde pH kontrolü ve havalandırmanın etkisi incelenmiştir. Ardından flask fermentasyon ve biyoreaktörden elde edilen enzim solüsyonu, santrifüj-süre kombinasyonu ve ultrafiltrasyon (UF) prosesi ile kısmi saflaştırılmış ve saflaştırma katsayısı belirlenmiştir. Diğer yandan, enzimin karakteristik özellikleri (substrat spesifikliği, V_{max} ve K_m değerleri, enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi, enzimin inhibitör ve aktivatörleri, enzimatik reaksiyonunun termal inaktivasyon ve termodinamik parametreleri, enzimin termostabilitesi ve termostabilite ile ilgili termodinamik parametreler ve moleküler ağırlık) de belirlenmiştir. Öte yandan, PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verileri, 11 farklı matematiksel model (MGM, MLM, MRM, Stannard, Weibull, MMF Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) kullanılarak modellenmiştir. Ek olarak, enzimin substrat spesifikliği, 10 farklı matematiksel model (Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Eksponansiyel, von Bertalanffy, Brody & Monomolecular, Mitscherlich, Fitzhugh ve Cone modelleri) kullanılarak tahmin edilmiştir. Elde edilen model kıyaslama verilerine göre hem fermentasyonlar için hem de substrat spesifikliği için en iyi model(ler) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların daha büyük ölçekli reaktör(ler)e aktarılabilmesi ve aktivite değerlerinin artırılabilmesi düşünülmektedir.

Dünyada inülinaz enziminin mikrobiyal yolla üretilmesi üzerine birçok çalışma olmasına rağmen ve bu enzimin endüstriyel olarak üretilmesine rağmen ülkemizde yeterli çalışma yapılmamakta ve endüstriyel üretimi gerçekleştirilmemekte, dolayısıyla inülinaz enzimi yurt dışından ithal edilmektedir. Ülkemizde endüstriyel ölçekte inülinaz enzimi üretiminin yeterli düzeyde yapılması durumunda dışa bağımlılığın büyük ölçüde azalacağı ve yeni iş alanları açılarak ülke sektöründe yeni bir pazar oluşturularak ekonomiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı veren, çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen ve fikirleriyle bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma sırasında tavsiyelerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet İNAN (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi), Prof. Dr. Ali DEMİRCİ (Department of Agricultural and Biological Engineering, Pennsylvania State University Department of Agricultural and Biological Engineering), Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Araş. Gör. Fatma ERSÖZ'e (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi),

Çalışmanın zaman içerisinde gelişimine, katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Kemal KARABAĞ (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK'a (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi) ve tez savunma sınavına dışarıdan katılım sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYİCİ (Antalya Bilim Üniversitesi, Turizm Fakültesi) ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇİMEN'e (Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi),

Ayrıca, çalışmalarım boyunca laboratuvar ortamını paylaştığım arkadaşlarım Ercan KARAHALİL, Fadime DEMİREL, Merve ILGIN, Nour Ben BADER, Ali ÖZCAN, Cansu YILMAZER, Selime Benemir ERKAN ve Hilal Nur GÜRLER'e,

Çalışmayı mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak, bana sonsuz sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme ve çalışmalarım sırasında zamanından çok çaldığım hayat arkadaşım Hacer GERMEÇ başta olmak üzere oğlum Hakan Yavuz GERMEÇ'e teşekkür ve sevgilerimi sunarım.



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum "İnülinaz Enziminin Üretimi, Kısmi Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Fermentasyonlarının Matematiksel Modellenmesi Üzerine Bir Araştırma" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/06/2019

Mustafa GERMEÇ



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. İnülinaz Enziminin Üretimi ve Mikrobiyal Kaynakları	7
2.1.1. Katı kültür fermentasyonu ile inülinaz enziminin üretimi.....	8
2.1.2. Sıvı kültür fermentasyonu ile inülinaz enziminin üretimi	10
2.1.3. Proseslerin optimizasyonunda kullanılan istatistiksel yöntemler	15
2.1.3.1. Plackett-Burman Dizayn	15
2.1.3.2. Merkezi Kompozit Dizayn	16
2.1.4. İnülinaz enziminin endüstriyel üretimi	17
2.2. İnülinaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	17
2.2.1. Santrifüjleme ile kısmi saflaştırma	21
2.2.2. Ultrafiltrasyon ile kısmi saflaştırma	21
2.2.3. SDS-PAGE ile moleküler ağırlık tayini	22
2.3. Ekzo-Inülinazın Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri	23
2.4. Endo-Inülinazın Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri	26
2.5. Ekzo ve Endo-Inülinazın Kataliz Mekanizması	27
2.6. Mikrobiyal İnulinazın Evrimsel Konumu	30
2.7. İnülinaz Enziminin Uygulama Alanları	31
2.7.1. Yüksek fruktozlu şurup üretimi	31
2.7.2. Fruktooligosakkarit üretimi	32
2.7.3. Diğer	32
2.8. Matematiksel Modelleme	33
2.9. Matematiksel Modellemenin Faydaları	36
3. MATERYAL VE METOT	39

3.1. Materyal	39
3.2. Mikroorganizma	39
3.3. Mikroorganizmanın Süspansiyon Olarak Kullanımı.....	40
3.4. Çalışmanın Deneme Deseni	40
3.5. İnülinaz Enziminin Üretimi Üzerine Karbon Kaynağının Etkisi	40
3.5.1. En iyi karbon kaynağının tespitinde kullanılan enzim analizi.....	41
3.5.2. Kalıntı şeker analizi	42
3.6. Toplam Protein Analizi	43
3.7. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi.....	43
3.7.1. Na-asetat tamponu pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	43
3.7.2. İnkübasyon sıcaklığının enzim aktivites üzerine etkisi	44
3.7.3. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	44
3.8. Besiyeri Kompozisyonunun PBD ile Optimizasyonu	45
3.9. Besiyeri Kompozisyonunun MKD ile Optimizasyonu	48
3.10. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde İnülinaz Üretimi.....	49
3.11. Büyük Ölçekli Biyoreaktörde (30-L) İnülinaz Üretimi.....	49
3.12. Santrifüj-Süre Kombinasyonu ve UF Prosesi ile Kısmi Saflaştırma	50
3.12.1. Santrifüj-süre kombinasyonu.....	50
3.12.2. Ultrafiltrasyon.....	50
3.13. Enzimin Substrat Spesifikliğı ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	51
3.14. Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi	52
3.15. Farklı Reaktiflerin Aktivite Üzerine Etkisi	52
3.16. E_a , A, Q_{10} -Değeri, Termal İnaktivasyon ve Termodinamik Parametreler.....	52
3.17. Termostabilite ve Termodinamik Parametreler.....	52
3.18. İnülinaz ve Sukraz Analizi	54
3.19. SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi.....	55
3.20. Biyokütle Analizi	55
3.21. pH Analizi	56
3.22. Kinetik Modelleme.....	56
3.22.1. Hücre gelişim kinetiğı	56
3.22.2. Ürün oluşum kinetiğı.....	57
3.22.3. Şeker tüketim kinetiğı.....	59

3.23. Fermentasyonların Modellenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması ...	61
3.24. Substrat Spesifikliğin Modellenmesi ve V_{max} ve K_m 'nin Hesaplanması	63
3.25. Matematiksel Modellerin Karşılaştırılması	65
3.26. İstatistiksel Analizler	66
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	67
4.1. Karbon Kaynağının Seçimi	67
4.2. İnülinaz Enziminin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	70
4.2.1. Optimum pH	70
4.2.2. Optimum sıcaklık.....	71
4.2.3. Optimum inkübasyon süresi	73
4.3. Besiyeri Kompozisyonunun PBD ile Optimizasyonu	77
4.3.1. Besiyeri A ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi	83
4.3.2. Besiyeri B ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi	85
4.3.3. Besiyeri C ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi	87
4.3.4. PBD doğrulama denemelerinin karşılaştırılması	89
4.4. Besiyeri Bileşimindeki Önemli Değişkenlerin MKD ile Optimizasyonu	90
4.4.1. Maya ekstraktı konsantrasyonunun fermentasyon üzerine etkisi	92
4.4.2. Pepton konsantrasyonunun fermentasyon üzerine etkisi	92
4.4.3. RSM analizi ve besiyeri kompozisyonunun optimizasyonu.....	97
4.4.4. Üç boyutlu (3D) yüzey grafikleri	102
4.4.5. MKD doğrulama denemeleri	110
4.4.6. MKD doğrulama denemelerinin karşılaştırılması	121
4.5. Fermentasyonların Kinetik Modellemesi	130
4.6. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde İnülinaz Fermentasyonu	134
4.6.1. pH kontrolsüz ve havalandırmasız biyoreaktörde inulinaz üretimi.....	135
4.6.2. pH kontrollü ve havalandırmasız biyoreaktörde inulinaz üretimi	136
4.6.3. pH kontrolsüz ve havalandırmalı biyoreaktörde inulinaz üretimi	138
4.6.4. pH kontrollü ve havalandırmalı biyoreaktörde inulinaz üretimi	141
4.6.5. Küçük ölçekli biyoreaktördeki fermentasyonların karşılaştırılması.....	143
4.7. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde İnülinaz Fermentasyonu	144
4.8. Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	147
4.8.1. Santrifüj-süre kombinasyonu ile kısmi saflaştırma	147

4.8.2. UF prosesi ile kısmi saflaştırma	148
4.9. Enzimin Substrat Spesifikliği ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	152
4.10. Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi	157
4.11. Farklı Reaktiflerin Aktivite Üzerine Etkisi	158
4.12. E_a , A , Q_{10} -Değeri, Termal İnaktivasyon ve Termodinamik Parametreler	159
4.13. Termostabilite ve Termodinamik Parametreler	166
4.14. Enzimin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	175
4.15. Optimum Koşullardaki Fermentasyonların Matematiksel Modellenmesi	176
4.15.1. PBD ile optimize edilen besiyerindeki fermentasyon	177
4.15.1.1. Şeker tüketiminin matematiksel modellenmesi	177
4.15.1.2. <i>Iase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	181
4.15.1.3. <i>Sase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	185
4.15.1.4. S/I oranının matematiksel modellenmesi	189
4.15.1.5. Deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması ...	191
4.15.2. MKD ile optimize edilen besiyerindeki fermentasyon	192
4.15.2.1. Şeker tüketiminin matematiksel modellenmesi	192
4.15.2.2. <i>Iase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	196
4.15.2.3. <i>Sase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	200
4.15.2.4. S/I oranının matematiksel modellenmesi	204
4.15.2.5. <i>SIase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	207
4.15.2.6. <i>SSase</i> üretiminin matematiksel modellenmesi	211
4.15.2.7. <i>SIase/SSase</i> oranının matematiksel modellenmesi	214
4.15.2.8. Deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması ...	217
4.16. Enzimin Substrat Spesifikliğinin Matematiksel Modellemesi	219
4.16.1. İnülin ile gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesi	219
4.16.2. Sukroz ile gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesi	223
4.16.3. Deneysel ve tahmin edilen V_{max} ve K_m değerlerinin karşılaştırılması	226
5. SONUÇLAR	231
6. KAYNAKLAR	237
7. EKLER	261
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
[S]	: Substrat konsantrasyonu
$[S]_0$	: Denklem ile aktivitenin başlangıç miktarını elde etmek için kullanılır
$[S]_L$	: $A_S = A_m/2$ olduğu nokta
A	: İnaktivasyon sıcaklıklarındaki nisbi enzim aktivitesi
a	: Gecikme fazı geçiş katsayısı
Å	: Angström
A_0	: Nisbi başlangıç enzim aktivitesi
A_0	: Minimum asimptot
A_m	: Maksimum asimptot
A_S	: "S"inci substrat konsantrasyonunda tahmin edilen değerler
A_t	: "t" inci zamanda tahmin edilen değerler
B_t ve H_t	: Geçiş fonksiyonları
d	: Birimsiz bir dizayn parametresi
D	: Denatüre olmuş enzim
Da	: Dalton
d_p	: Tanecik çapı
E	: Faktör sayısı
e	: Euler sayısı
E_a	: Aktivasyon enerjisi
E_{ia}	: İnaktivasyon enerjisi
g	: Gram
g	: Santrifüj hızının yerçekimi etkisindeki hıza oranı
h	: Planck sabiti

h_0	: Üretimin ve tüketimin başlangıç fizyolojik durumunu hesaplayan parametre
I	: İnaktif enzim
J	: Joule
K	: Kelvin
k	: Cevap değişkeninin potansiyel maksimum değerine yaklaşma oranını yöneten bir parametre
k_b	: Boltzman sabiti
k_d	: İnaktivasyon hız sabiti
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
L	: Litre
m	: Eğim
m	: Metre
N	: Toplam deneme sayısı
n	: Gözlem sayısı
N	: Model parametrelerinin sayısı
N	: Normal
N	: Doğal yapıdaki enzim
$^{\circ}\text{Bx}$	: Briks
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
pH	: Hidrojenin gücü
Q	: Maksimum üretim, spesifik üretim ve tüketim hızları
Q_{10}	: Sıcaklık katsayısı
Q_{Iase}	: Maksimum inülinaz üretim hızı
$Q_{şeker}$	: Maksimum şeker tüketim hızı
r	: Taneciğin dönme merkezinden uzaklığı
R	: Üniversal gaz sabiti

R^2	: Belirleme katsayısı
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı (devir/dakika)
S_0	: Başlangıç substrat konsantrasyonu
T	: Sıcaklık
t	: Süre
$t_{1/2}$	: Yarılanma ömrü
T_L	: $A_t = A_m/2$ olduğu nokta
U	: Ünite
V	: Volt
v	: Şekil parametresi
V_c	: Santrifüjle çöktürme hızı veya tanecik hızı
V_{max}	: Maksimum enzim hızı
X	: Biyokütle konsantrasyonu
x_t	: "t" inci zamandaki deneysel veriler
x_t	: Kodlanmış faktör seviyesi
y	: Cevap
$y (-)$	: Belirli bir faktörün düşük seviyelerindeki yanıtları
$y (+)$	: Belirli bir faktörün yüksek seviyelerindeki yanıtları
y_t	: "t" inci zamandaki tahmin edilen veriler
β	: Tüketimi, üretimi veya aktiviteyi kaydırma değeri
β_0	: Sabit
β_t	: Doğrusal katsayı
δ	: Allometrik sabit
ΔG	: Serbest enerji
ΔH	: Entalpi
ΔS	: Entropi

η	: Akışkanlık sabiti veya viskozite
λ	: Gecikme süresi
$\rho_s - \rho_1$	: Tanecik ve ortam arasındaki yoğunluk farkı
ω	: Santrifüjün açısal hızı

Kısaltmalar

[E] _t	: Toplam enzim
[ES]	: Enzim-substrat kompleksi
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
3D	: Üç boyutlu
A.Ş.	: Anonim Şirketi
a/h	: Ağırlık/Hacim
Abs	: Absorbans
AÇ	: Aseton ile çöktürme
AF	: Kesinlik faktörü
AIC	: Akaike bilgi ölçütü
AK	: Afinite kromatografisi
ANOVA	: Varyans analizi
APS	: Amonyum peroksidisülfat
ASÇ	: Amonyum sülfat ile çöktürme
ATCC	: American Type Culture Collection
B	: Belirtilmemiş
BBD	: Box-Behnken Dizayn
BF	: Ön yargı faktörü
CCD	: Central Composite Design
D	: Diyaliz
DEAE	: Dietilaminoetil

D_f	: Seyreltme katsayısı veya dilüsyon faktörü
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükelik asit
DNS	: 3,5-dinitrosalisilik asit
DoE	: Deney tasarımı
DTT	: Dithiothreitol
Düz. KO	: Düzeltilmiş kareler ortalaması
Düz. KT	: Düzeltilmiş kareler toplamı
E	: Enzim
EÇ	: Etanol ile çöktürme
FOS	: Fruktooligosakkaritler
GH	: Glikozit Hidrolaz
GRAS	: Genellikle Güvenilir Kabul Edilen
h/h	: Hacim/Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
HEK	: Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
I/S oranı	: İnülinaz/Sukraz oranı
<i>Iase</i>	: İnülinaz
IDK	: İyon değişim kromatografisi
İPÇ	: İzopropanol ile çöktürme
JFK	: Jel-filtrasyon kromatografisi
kDa	: Kilo dalton
KE	: Keçiboynuzu ekstraktı
KT	: Kareler toplamı
MAE	: Ortalama mutlak hata
MF	: Mikrofiltrasyon
mg	: Miligram

MGM	: Modifiye Gompertz model
MKD	: Merkezi Kompozit Dizayn
mL	: Mililitre
MLM	: Modifiye Lojistik model
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
MMF	: Morgan-Mercer-Flodin
MRM	: Modifiye Richards model
MSD	: Ortalama standart sapma
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
NRRL	: ARS Culture Collection
OFAT	: Her-defada-tek-etken
P	: Permeat
PAST	: Peynir altı suyu tozu
PBD	: Plackett-Burman Dizayn
PC	: Purification coefficient
P-PAGE	: Preparatif poliakrilamid jel elektroforezi
R	: Retentat
RCF	: Bağıl merkezkaç kuvveti
RDP	: Arjinin-Aspartik asit-Prolin
RMSE	: Ortalama karesel hata
RO	: Ters ozmos
RSM	: Cevap Yüzey Metodu
RSS	: Artık kareler toplamı
s	: Saniye
S/I oranı	: Sukraz/İnülinaz oranı

sa	: Saat
Sase	: Sukraz
SD	: Serbestlik derecesi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SIase	: Spesifik inülinaz
SK	: Saflaştırma katsayısı
SSase	: Spesifik sukraz
ST	: Saflaştırma tekniği
Std hata	: Standart hata
Std sapma	: Standart sapma
SucA	: Sukraz aktivitesi
SucB	: İntraselüler sukraz
SucC	: İntraselüler sukraz
SUY	: Şeker kullanım oranı
Şeker_{max}	: Maksimum şeker konsantrasyonu
Şeker_{min}	: Minimum şeker konsantrasyonu
ŞPM	: Şeker pancarı melası
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGS	: Tris-Glisin-SDS
UF	: Ultrafiltrasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnülinaz enzimleri tarafından inülinin parçalanma şekli	5
Şekil 2.2. İnülinaz enzimi tarafından sukrozun parçalanma şekli	6
Şekil 2.3. Ekzo-inülinazın sekonder yapı elementlerinin şerit gösterimi. <i>N</i> -Terminal bölgesi, beş tabakalı (blade) β -aksiyal kıvrıma aittir. Her bir tabaka farklı bir renkte gösterilmiştir (tabaka 1 sarı, tabaka 2 deniz mavisi, tabaka 3 kırmızı, tabaka 4 yeşil ve tabaka 5 turuncu). Kayrak renkli ikinci bölge, bir β -sandviç kıvrımında düzenlenmiş 12 β -iplikçiğinden oluşur. İki bölgeyi birleştiren kısa polipeptid zincir, pembe renkte gösterilmiştir. Ortorombik kristalde bulunan beş <i>N</i> -bağlı oligosakkarit, çubuk olarak gösterilmiştir.....	24
Şekil 2.4. Ekzo-inülinazın (A) ve Endo-inülinazın (B) katalitik bölgesi.....	27
Şekil 2.5. Farklı mikroorganizmalardan üretilen endo-inülinazın ortaya çıkarılan amino asit sekansı	28
Şekil 2.6. Farklı mikroorganizmalardan üretilen exo-inülinazın ortaya çıkarılan amino asit sekansı	29
Şekil 2.7. Mikrobiyal inulinazlar arasında filogenetik ağaç ilişkisi. Yakın bağlantılı filogenetik ağaç, ortaya çıkarılan amino asit dizilerine dayanarak çizilmiştir. İç düğümlerdeki sayılar, 1000 kopyalamaya dayanan önyükleme güven değerlerini (%) temsil eder. Ölçek çubuğu, bölge başına 0.1 amino asit ikamesine karşılık gelir. Parantez içindeki sayılar referans dizilerine yönelik erişim sayılarıdır.....	31
Şekil 2.8. Model, incelenen sistemdeki ilgi değişkenleri arasındaki ilişkiler dizisidir.....	34
Şekil 2.9. Model yapımının döngüsel prosesleri, doğrulama ve uygulamaları.....	35
Şekil 3.1. Kesikli fermentasyonlardaki ürün oluşumunun kinetik şekilleri: (a) gelişimle ilgili ürün oluşumu, (b) karışık gelişimle ilgili ürün oluşumu ve (c) gelişimden bağımsız ürün oluşumu	56
Şekil 3.2. PBD için X_0 , μ_{max} (a) α (b, c ve d) ve γ (e) değerlerinin belirlenmesi	58
Şekil 3.3. MKD için X_0 , μ_{max} (a) α (b, c ve d) ve γ (e) değerlerinin belirlenmesi.....	60
Şekil 4.1. Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait enzim üretim grafiği	68
Şekil 4.2. Farklı pH'larda <i>Iase</i> ve <i>Sase</i> aktivite değerleri ve <i>I/S</i> oranının değişimi	70
Şekil 4.3. Farklı pH'larda <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> aktivite değerleri.....	71

Şekil 4.4. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında <i>Iase</i> ve <i>Sase</i> aktivite değerleri ve I/S oranının değişimi.....	72
Şekil 4.5. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> aktivite değerleri.....	72
Şekil 4.6. Farklı inkübasyon sürelerinde <i>Iase</i> ve <i>Sase</i> aktivite değerleri ve I/S oranının değişimi.....	73
Şekil 4.7. Enzimatik reaksiyonun gelişimi ve kararlı konum yaklaşımı	74
Şekil 4.8. Farklı inkübasyon sürelerinde <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> aktivite değerleri	77
Şekil 4.9. PBD tarafından önerilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait şeker tüketim ve <i>Iase</i> üretim grafikleri	80
Şekil 4.10. <i>Iase</i> enzimine yönelik negatif ve pozitif etkiye sahip olan besiyeri bileşenleri	82
Şekil 4.11. <i>A. niger</i> ile melastan <i>Iase</i> enziminin üretimi üzerine besiyeri bileşenlerinin etkisini gösteren Pareto grafiği.....	83
Şekil 4.12. Standartlaştırılmış etkilerin normal olasılık grafiği.....	83
Şekil 4.13. Besiyeri A ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	85
Şekil 4.14. Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	86
Şekil 4.15. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	88
Şekil 4.16. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerlerden hesaplanan I/S oranının fermentasyon boyunca değişim grafiği	89
Şekil 4.17. <i>Iase</i> aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	103
Şekil 4.18. <i>Sase</i> aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	103
Şekil 4.19. I/S oranı üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	104
Şekil 4.20. Protein miktarı üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	105
Şekil 4.21. <i>SIase</i> aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	106
Şekil 4.22. <i>SSase</i> aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	106

Şekil 4.23. Biyokütle üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği	107
Şekil 4.24. pH üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği	108
Şekil 4.25. $Q_{şeker}$ üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği	108
Şekil 4.26. Q_{Iase} üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği	109
Şekil 4.27. SUY üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği	110
Şekil 4.28. Deneme#1 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	112
Şekil 4.29. Deneme#2 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	113
Şekil 4.30. Deneme#3 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	114
Şekil 4.31. Deneme#4 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	115
Şekil 4.32. Deneme#5 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	116
Şekil 4.33. Deneme#6 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	117
Şekil 4.34. Deneme#7 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	118
Şekil 4.35. Deneme#8 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	119
Şekil 4.36. Deneme#9 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	120
Şekil 4.37. Deneme#10 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği	121
Şekil 4.38. Fermentasyon sırasında $Iase$, $Sase$ ve I/S oranının değişimi	124
Şekil 4.39. Fermentasyon sırasında $SIase$, $SSase$ ve protein miktarının değişimi	125

Şekil 4.40. PBD ile optimize edilen besiyeri formülasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun Lojistic model, LP model ve MLP model ile fit edilen fungal gelişim, şeker tüketimi, <i>Iase</i> ve <i>Sase</i> üretimi (a), protein miktarı, I/S oranı, <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> eğrileri (b)	133
Şekil 4.41. MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun Lojistic model, LP model ve MLP model ile fit edilen fungal gelişim, şeker tüketimi, <i>Iase</i> ve <i>Sase</i> üretimi (a), protein miktarı, I/S oranı, <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> eğrileri (b)	134
Şekil 4.42. pH kontrolsüz ve havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen fermentasyon.....	135
Şekil 4.43. pH kontrolsüz ve havalandırmasız ortamda yetersiz fungal gelişim.....	136
Şekil 4.44. pH kontrollü ve havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen fermentasyon.....	137
Şekil 4.45. pH kontrollü ve havalandırmasız ortamda yetersiz fungal gelişim	138
Şekil 4.46. pH kontrolsüz ve havalandırılmalı biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon.....	139
Şekil 4.47. pH kontrolsüz ve havalandırılmalı biyoreaktörde aşırı ve düzensiz fungal gelişim.....	140
Şekil 4.48. pH kontrollü ve havalandırılmalı biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon.....	141
Şekil 4.49. pH kontrollü ve havalandırılmalı biyoreaktörde aşırı ve düzensiz fungal gelişim.....	142
Şekil 4.50. Büyük ölçekli (30-L), pH kontrollü ve havalandırılmalı karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon	145
Şekil 4.51. Fermentasyon boyunca alınan örneklerin stereo mikroskoptaki görüntüsü.....	146
Şekil 4.52. Substrat olarak inülin kullanıldığında <i>Iase</i> ve <i>SIase</i> aktivitelerindeki değişim (a ve c), substrat olarak sukroz kullanıldığında <i>Iase</i> ve <i>SIase</i> aktivitelerindeki değişim (b ve e) ve I/S oranının değişimi (c ve f)	153
Şekil 4.53. Enzim miktarının <i>Iase</i> , <i>Sase</i> ve I/S oranı üzerine etkisi (a) ve enzim konsantrasyonunun <i>SIase</i> ve <i>SSase</i> aktivitesi üzerine etkisi (b)	158
Şekil 4.54. Birinci derece kinetik model enzimatik reaksiyonların Arrhenius grafiği (a: Aktivasyon enerjisi (E_a), b: İnaktivasyon enerjisi (E_{ia}))	161
Şekil 4.55. Enzimin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	166

Şekil 4.56. SDS-PAGE analiz sonucu. K: Kontrol ve M: Marker.....176



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Katı kültür fermentasyonu ile ekzo-inülinazın mikrobiyal üretimi	9
Çizelge 2.2. Sıvı kültür fermentasyonu ile ekzo- ve endo-inülinazın mikrobiyal üretimi	12
Çizelge 2.3. Ekzo-inülinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu	19
Çizelge 2.4. Endo-inülinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu	19
Çizelge 2.5. <i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 genomunda tanımlanan GH32 familyası enzimlerinin korunmuş motifleri (Goosen 2007).....	25
Çizelge 3.1. İnülinaz enziminin üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi	41
Çizelge 3.2. PBD’de düşük ve yüksek seviyelerdeki değişkenlerin konsantrasyonları	46
Çizelge 3.3. PBD deneme deseni	47
Çizelge 3.4. Santrifüj-süre kombinasyonuna ait deneme deseni	50
Çizelge 3.5. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri koşullarında gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verilerini modellemek için kullanılan matematiksel modeller	62
Çizelge 3.6. Optimum enzim analizi koşulları altında enzimin substrat spesifikliğine ait deneysel verileri modellemek için kullanılan matematiksel modeller.....	64
Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen inülinaz fermentasyonlarına ait kinetik değerler.....	67
Çizelge 4.2. İnülinaz ve sukraz analizinde kullanılan enzimatik reaksiyon koşulları.....	76
Çizelge 4.3. PBD tarafından önerilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait sonuçlar	78
Çizelge 4.4. <i>Iase</i> enzimi için hesaplanan etki değerleri ve katsayılar	81
Çizelge 4.5. Varyans analiz (ANOVA) sonuçları.....	81
Çizelge 4.6. Besiyeri A ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler.....	84
Çizelge 4.7. Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler	85
Çizelge 4.8. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler	87

Çizelge 4.9. PBD doğrulama denemelerine ait kinetik parametrelerin karşılaştırılması	90
Çizelge 4.10. Her bir değişkenin MKD seviyesi	91
Çizelge 4.11. MKD deneme deseni	91
Çizelge 4.12. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel sonuçları	94
Çizelge 4.13. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların model tarafından tahmin edilen sonuçları	95
Çizelge 4.14. Deneysel ve model tarafından tahmin edilen sonuçlar arasındaki farklar	96
Çizelge 4.15. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen sonuçların varyans analizi	99
Çizelge 4.16. Yanıtların regresyon analizi ile elde edilen quadratik eşitlikleri	102
Çizelge 4.17. Muhtemel optimum koşullar	111
Çizelge 4.18. MKD doğrulama denemelerinin kinetik sonuçları	123
Çizelge 4.19. Besiyerinde kullanılan pepton ve maya ekstraktının bileşimi (Kampen 2014)	130
Çizelge 4.20. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyerlerindeki fermentasyonlar için hesaplanan model parametreleri	131
Çizelge 4.21. Biyoreaktörde pH kontrolü ve havalandırmanın etkisini inceleyen fermentasyonların karşılaştırılması	143
Çizelge 4.22. Santrifüj-süre kombinasyonunun <i>Iase</i> , verim artışı, protein miktarı, <i>SIase</i> ve saflaştırma katsayısı değerleri	147
Çizelge 4.23. Çalkalamalı flask fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri	150
Çizelge 4.24. Küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) havalandırmalı ve pH kontrollü fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri	150
Çizelge 4.25. Küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) havalandırmalı ve pH kontrolsüz fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri	151

Çizelge 4.26. Büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) havalandırılmalı ve pH kontrollü fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri	151
Çizelge 4.27. İnülin ve sukroza ait V_{max} ve K_m değerleri	155
Çizelge 4.28. Farklı reaktiflerin aktivite üzerine etkisi.....	159
Çizelge 4.29. Birinci derece kinetik modele uygun enzimatik reaksiyonun sonuçları	160
Çizelge 4.30. Sıcaklığın 10°C artmasıyla I_{ase} ve S_{ase} 'nin Q_{10} -değerlerinin değişimi	163
Çizelge 4.31. I_{ase} ve S_{ase} 'nin kinetik ve termodinamik parametreleri	164
Çizelge 4.32. İnaktivasyon hız sabiti (k_d) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi.....	169
Çizelge 4.33. İnülinaz enziminin yarı ömrü ($t_{1/2}$) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi.....	169
Çizelge 4.34. İnülinaz enziminin D-değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi.....	169
Çizelge 4.35. İnülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki inaktivasyon enerjisi (E_{ia}).....	170
Çizelge 4.36. İnülinaz enziminin Q_{10} -değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi.....	170
Çizelge 4.37. İnülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki Z-değerleri	171
Çizelge 4.38. Enzimatik reaksiyonun entalpisi (ΔH) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi	171
Çizelge 4.39. Enzimatik reaksiyonun serbest enerjisi (ΔG) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi	172
Çizelge 4.40. Enzimatik reaksiyonun entropisi (ΔS) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi	172
Çizelge 4.41. Deneysel şeker tüketim verilerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel şeker tüketim verileri	177
Çizelge 4.42. PBD ile deneysel şeker tüketim verilerinin modellerden hesaplanan şeker tüketim verileri ile karşılaştırılması	179
Çizelge 4.43. PBD ile optimize edilen besiyerindeki şeker tüketimi için matematiksel modellerin validasyonu.....	180

Çizelge 4.44. Deneyisel <i>Iase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneyisel <i>Iase</i> aktivite verileri	181
Çizelge 4.45. PBD ile deneyisel <i>Iase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>Iase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması	183
Çizelge 4.46. PBD ile optimize edilen besiyerindeki <i>Iase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	184
Çizelge 4.47. Deneyisel <i>Sase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneyisel <i>Sase</i> aktivite verileri.....	185
Çizelge 4.48. PBD ile deneyisel <i>Sase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>Sase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması.....	187
Çizelge 4.49. PBD ile optimize edilen besiyerindeki <i>Sase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	188
Çizelge 4.50. Deneyisel S/I oranlarının modellerden hesaplanan S/I oranları ile karşılaştırılması	189
Çizelge 4.51. S/I oranı için matematiksel modellerin validasyonu	190
Çizelge 4.52. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyondan deneyisel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması.....	191
Çizelge 4.53. Deneyisel şeker tüketim verilerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneyisel şeker tüketim verileri	193
Çizelge 4.54. MKD ile deneyisel şeker tüketim verilerinin modellerden hesaplanan şeker tüketim verileri ile karşılaştırılması	194
Çizelge 4.55. MKD ile optimize edilen besiyerindeki şeker tüketimi için matematiksel modellerin validasyonu.....	195
Çizelge 4.56. Deneyisel <i>Iase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneyisel <i>Iase</i> aktivite verileri	196
Çizelge 4.57. MKD ile deneyisel <i>Iase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>Iase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması	197
Çizelge 4.58. MKD ile optimize edilen besiyerindeki <i>Iase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	199
Çizelge 4.59. Deneyisel <i>Sase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneyisel <i>Sase</i> aktivite verileri.....	200
Çizelge 4.60. MKD ile deneyisel <i>Sase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>Sase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması.....	202

Çizelge 4.61. MKD ile optimize edilen besiyerindeki <i>Sase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	203
Çizelge 4.62. Deneysel S/I oranlarının modellerden hesaplanan S/I oranları ile karşılaştırılması	205
Çizelge 4.63. S/I oranı için matematiksel modellerin validasyonu	206
Çizelge 4.64. Deneysel <i>SIase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel <i>SIase</i> aktivite verileri	207
Çizelge 4.65. MKD ile deneysel <i>SIase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>SIase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması.....	209
Çizelge 4.66. MKD ile optimize edilen besiyerindeki <i>SIase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	210
Çizelge 4.67. Deneysel <i>SSase</i> aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel <i>SSase</i> aktivite verileri	211
Çizelge 4.68. MKD ile deneysel <i>SSase</i> üretim verilerinin modellerden hesaplanan <i>SSase</i> üretim verileri ile karşılaştırılması	213
Çizelge 4.69. MKD ile optimize edilen besiyerindeki <i>SSase</i> aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu.....	214
Çizelge 4.70. Deneysel <i>SIase/SSase</i> oranlarının modellerden hesaplanan <i>SIase/SSase</i> oranları ile karşılaştırılması.....	215
Çizelge 4.71. <i>SIase/SSase</i> oranı için matematiksel modellerin validasyonu	216
Çizelge 4.72. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyondan deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması	218
Çizelge 4.73. Substrat olarak inülin kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesinde kullanılan parametre ve <i>Iase</i> aktivitesi değerleri.....	220
Çizelge 4.74. Substrat olarak inülinin kullanıldığı deneysel çalışmanın matematiksel modellemesi	221
Çizelge 4.75. Substrat olarak inülinin kullanıldığı deneysel çalışmada kullanılan matematiksel modellerin validasyonu.....	222
Çizelge 4.76. Substrat olarak sukroz kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesinde kullanılan parametre ve <i>Sase</i> aktivitesi değerleri	223
Çizelge 4.77. Substrat olarak sukrozun kullanıldığı deneysel çalışmanın matematiksel modellemesi	225

Çizelge 4.78. Substrat olarak sukrozun kullanıldığı deneysel çalışmada kullanılan matematiksel modellerin validasyonu.....	226
Çizelge 4.79. İnülin üzerinde gerçekleştirilen <i>Iase</i> aktivitesinin deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	228
Çizelge 4.80. Sukroz üzerinde gerçekleştirilen <i>Sase</i> aktivitesinin deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	229



1. GİRİŞ

Fermentasyon, doğal yenilenebilir substratların enzimler, organik asitler, alkoller, polimerler ve daha fazlası gibi katma değerli ürünlere dönüştürüldüğü mikrobiyal bir biyoteknolojidir. Etanol ve laktik asit gibi fermentasyon son ürünleri proton tutuculardır. Burada NADH, NAD⁺ya geri dönüştürülür, bu da hücrenin substrat seviyesinde fosforilasyon ile glikoliz yoluyla enerji üretmeye devam etmesini sağlar. Böylece, mikroorganizmalar enerji dengesini korumak için birçok son veya yan ürün üretir (Demirci vd. 2014a).

Günümüzde, ekonomik açıdan önemli fermentasyon ürünlerinin geliştirilmiş üretiminde, belirlenen endüstriyel mikrobiyal suşlara yönelik hedeflenmiş genetik mühendislik tekniklerinden faydalanılmıştır (Campbell-Platt 1994). Son veya yan ürünlerin oluşumu, mikrobiyal suşa ve kullanılan çevresel koşullara bağlıdır. Optimum bir fermentasyon prosesi için, istenen ürüne dayalı olarak bir mikrobiyal suş seçilmeli ve geliştirilmelidir. Suş geliştirme teknolojileri, mutasyon ve rekombinant DNA teknolojisini içerir. Mikroorganizmaların gelişimi ve ürün oluşumu sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen ve besiyeri kompozisyonundan da etkilenir. Bu nedenle fermentasyon ortamı ve büyüme koşulları optimize edilmeli ve ayrıca, metabolik yollar belirlenmelidir. Büyüme koşulları, suş çeşitleri ve besiyerlerine ek olarak fermentasyon modları da verimliliği etkiler. Yüksek verimlilik için kesikli, tekrarlanan kesikli, yarı-kesikli ve sürekli fermentasyon modları seçilebilir. Yarı-kesikli ve sürekli modlar, fermentasyon prosesleri sırasında substrat sınırlamasının üstesinden gelebilir. Biyoreaktördeki biyokütle konsantrasyonunda artışa ve dolayısıyla reaktördeki biyokatalizör konsantrasyonunda artışa neden olan hücre immobilizasyonu ile daha yüksek verimlilik elde edilebilir. Fermentasyon prosesinden sonra, fermentasyon ortamından elde edilen ürünün geri kazanım yöntemleri değerlendirilmeli ve optimize edilmelidir ve bunlar genellikle ekonomi kısıtlama faktörüdür. Nitekim son ürünün saflaştırılması çoğu zaman prosesin yüksek maliyetli bir adımıdır. Mikrobiyal son ürünler, biyokütlenin kendisi, hücre dışı ürünler veya hücre içi ürünler olabilir. Filtrasyon, homojenizasyon ve ekstraksiyon (sıvı ve katı) geri kazanım yöntemlerine örnektir (Demirci vd. 2014a).

Enzimler (ribonükleaz enzimi hariç), biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen aktif proteinlerdir. Bunlar, hem sentezler hem de canlı organizmalar tarafından parçalanma reaksiyonları için gerekli olan biyo-moleküllerdir. Tüm canlı organizmalar, belirli bir bileşiği (substrat olarak) daha yüksek reaksiyon hızlarında ürüne dönüştürme kabiliyetine sahip olan biyolojik katalizörler olarak adlandırılan enzimleri üretir. Kimyasal katalizörler gibi, enzimler de aktivasyon enerjisini (E_a) düşürerek reaksiyon hızını artırır, bu nedenle ürünler daha hızlı oluşturulur ve reaksiyonlar denge durumuna daha hızlı ulaşır. Çoğu enzimatik reaksiyonun hızı, katalizörsüz reaksiyonlarınkinden milyonlarca kat daha hızlıdır. Enzimler, dönüşümü yüzlerce yıl sürebilecek reaksiyonları, birkaç dakika içinde veya saniyeler içinde gerçekleştirebilirler (Dalby 2003; Otten ve Quax 2005). Enzimlerin canlılardaki yaklaşık 4000 biyokimyasal reaksiyonu katalize ettiği bilinmektedir (Bairoch 2000). Örneğin, inulinaz enzimi inülini oluşturan fruktoz ve glukoz monomerlerine hidrolize edebilen bir glikozit hidrolazdır. İnulinaz enziminin bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretildiği bildirilmiş olup bitkilerde ve hayvanlarda çok düşük miktarlarda bulunur. Bu

kısıtlamaya bağılı olarak, bitkiler ve hayvanlar endüstriyel uygulamalar için kullanılmaz. Mikroorganizmalar, verimli inulinaz kaynaklarıdır. Mikroorganizmalar arasında *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Kluyveromyces* sp. ve *Bacillus* sp. çok verimli inulinaz üreticileridir (Kango ve Jain 2011; Singh ve Singh 2010). Enzimler aynı zamanda enantiyomerlerin rasemik bir karışımdan ayrılmasında veya kiral bileşiklerin sentezinde kullanılabilecek enantiyoselektif katalizörlerdir (Patel vd. 2017).

İnsanlar, binlerce yıl önce endüstriyel enzimleri, şarapların ve biraların filtrelenmesi ve berraklaştırılmasında kullanmış ve önemini kabul etmiştir. Enzimler, tarih öncesi çağlardan beri mayalama, pişirme ve alkol üretiminde kullanılmıştır. Enzimlere yapılan en eski atıflardan biri, Homeros'un M.Ö. 800 yılından kalma Yunan epik şiirlerinde bulunmakta ve burada enzimlerin peynir üretiminde kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca Japonlar, pirinçten elde edilen Japon usulü "damıtık içki" ve "sake" gibi fermente ürünlerin üretiminde doğal olarak bulunan enzimleri bin yıldan fazla kullanmıştır. Bazı enzimler, bileşenlerdeki kimyasal bağların oluşmasını sağlarken bazıları da bileşenlerdeki kimyasal bağların kopmasını sağlar. Enzimlerin substrat spesifikliğı nedeniyle, enzimler endüstriyel prosesler için kullanışlıdır ve birçok kimyasalla karışım halinde bulunsan bile belirli kimyasallar arasındaki reaksiyonları katalizleyebilirler. Bu enzimler, çevreye zararsız, doğaldır ve gıda ve ilaç endüstrilerinde güvenle uygulanır. Diğer yandan, enzimler, alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, enzimlerin üretimi ve uygulamalarına yönelik koruyucu önlemlerin alınması gerekmektedir (Patel vd. 2017).

Enzim teknolojisi "Bilim ve Teknoloji"nin gelişen bir koludur. Biyoteknoloji ve Biyoinformatik'in etkisi ve aracılığı ile sürekli yeni veya geliştirilmiş enzim uygulamaları ortaya çıkmaktadır. Yeni uygulamalarla, gelişmiş özelliklere sahip enzimlere olan ihtiyaç da aynı anda ortaya çıkmaktadır. Ticari enzimlerin geliştirilmesi, genellikle yüksek becerilere sahip şirketlerin üstlendiğı özel bir iş olup bu şirketler aşağıdaki prosesleri gerçekleştirmektedir (Patel vd. 2017):

- Yeni ve gelişmiş enzimlere yönelik tarama
- Mikroorganizmaların seçimi ve kalitatif ve kantitatif iyileştirme için suş geliştirme
- Enzim üretimi için fermentasyon
- Büyük ölçekli enzim saflaştırmaları
- Satış için enzimlerin formülasyonu

Enzim teknolojisi, hafif ve çevre dostu enzim prosesleri ile birlikte agresif kimyasallar kullanarak endüstrilere ve tüketicilere prosesleri değıştirme fırsatı sunar. Bilinen yaklaşık 3000 enzimin sadece 150-170'inden endüstriyel olarak faydalanılmaktadır. Günümüzde biyolojik bir yolla kimyasal ürünlerin yalnızca %5'i üretilmektedir. Bununla birlikte, ekonomik olarak uygulanabilir ve çevreye duyarlı enzimatik prosesler, fiziko-kimyasal ve mekanik proseslerin alternatifi olarak ortaya çıkmaktadır. Farklı uygulama alanlarına dayanan endüstriyel enzimler, şu şekilde sınıflandırılabilir: (i) gıda endüstrisinde enzimler, (ii) proses yardımcılara yönelik enzimler, (iii) endüstriyel biyokatalizör olarak enzimler, (iv) genetik mühendisliğinde enzimler ve (v) kozmetikte enzimler (Patel vd. 2017).

Günümüzde enzimler, biyoteknolojinin ekmek ve tereyağı olarak öngörülmektedir, çünkü bunlar, çeşitli biyoteknolojik teknikler, biyoprosesler ve tedavi amaçlı maddeler olarak insan ve hayvan tedavisinde kullanılan temel araçlardır. Ayrıca enzimlerin; gıda ve yem, tekstil, atık madde ve atık arıtımı, kâğıt, tabaklama, fırınlama, bira, süt, ilaç, şekerleme gibi birçok endüstriyel uygulamaları bulunmaktadır (Pandey 2006).

Günümüzde kullanılan enzimler hayvanlarda (pepsin, tripsin, pankratin ve kimozin) ve bitkilerde (papain, bromelain ve fisin) bulunur, ancak inulinaz, glukoamilaz, α -amilaz ve pektinazlar gibi enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenlidir. Bitki ve hayvanların yerine, enzim üretmek için yüksek gelişim kabiliyetleri, yüksek verimliliğe sahip olmaları ve genetik manipülasyonlara açık olmaları nedeniyle mikroorganizmaları kullanmak avantajlıdır. Endüstriyel enzim üretiminde çoğunlukla mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan üretilen enzimlere mikrobiyal enzimler denir. Bu enzimler, dünya genelindeki birçok şirket tarafından tedarik edilmekte, standardizasyonu iyi yapılmakta ve pazarlanmaktadır. Prosesin türüne bağlı olarak, enzimler çözünebilir formda (hayvan proteazları ve tabakhane lipazları) ve immobilize halde (glukoz izomeraz ile fruktoza izomerizasyon) kullanılabilir.

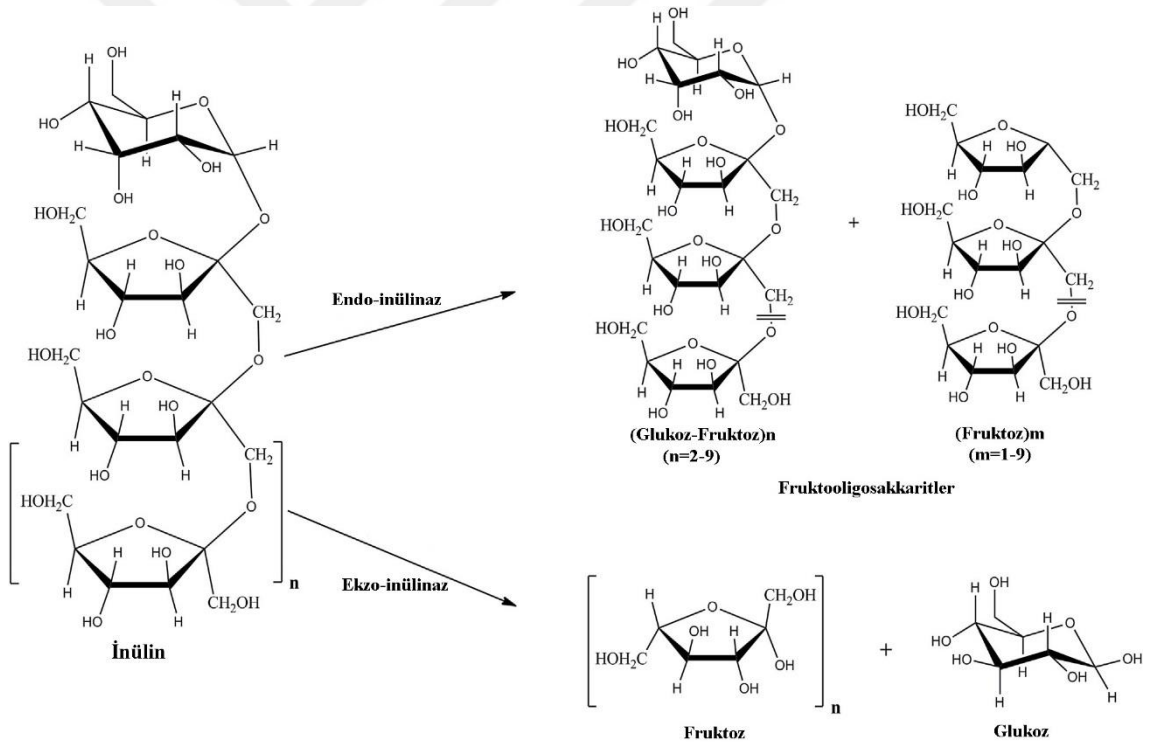
İnulinaz enzimi, glikozit hidrolaz (GH) gen ailesinden GH32 içerisinde yer alan hidrolitik enzimlerin önemli bir sınıfıdır ve ayrıca, inülin üzerindeki hidrolitik aksiyonuna göre karakterize edilir. Yapısal olarak inülin, β -D-2,1 glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış ve α -D-1,2 glikozidik bağlantı ile birleştirilen indirgen uçta bir glukoz parçasına sahip olan fruktoz monomer birimlerinden oluşan bir doğrusal bitki polimeridir. Nişastadan sonra, doğada bulunan ikinci en bol bitki polisakkaridi olup *Liliaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Campanulaceae*, vb. ailelerine ait olan birçok bitki türü tarafından doğal olarak üretilmektedir (Kaur ve Gupta 2002). İnülin, yerelması, yıldızçiçeği, hindiba, pırasa, sarımsak, kuşkonmaz ve karahindiba gibi birçok yaygın bitkide bulunur (Singh ve Singh 2010). İnulinaz enzimi bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Bitkilerde ve hayvanlarda çok düşük miktarlarda bulunduğu için bu kaynaklar endüstriyel uygulamalar için kullanılamaz. Mikroorganizmalar, verimli inulinaz kaynaklarıdır. Mikroorganizmalar arasında özellikle *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Kluyveromyces* sp. ve *Bacillus* sp. çok verimli inulinaz üreticileridir (Kango ve Jain 2011; Singh ve Singh 2010). Termotabil mikrobiyal türler, inulinaz üretimi için daha umut verici olduğundan, kontaminasyon riskini azaltır ve aşırı koşullar altında ürünlerin yüksek verimli olmasını desteklerler (Treichel vd. 2012). İnulinaz enzimi, hem derin kültür (submerged) hem de katı kültür (solid-state) fermentasyonlarda, geniş bir yelpazede substratlar ve mikroorganizmalar kullanılarak üretilmiştir (Pandey vd. 1999b). İnulinaz enziminin inülin üzerindeki hidrolitik etkisi ile ana ürün olarak fruktoz veya fruktooligosakkaritler üretilir. İnulinaz enzimi, inülin üzerindeki etkisi temelinde ekzo-inulinaz (β -D-fruktan fruktohidrolaz; EC 3.2.1.80) ve endo-inulinaz (1- β -D fruktan fruktanohidrolaz; EC 3.2.1.7) olarak sınıflandırılır. Ekzo-inulinaz, inülinin terminal fruktoz birimine etki eder ve fruktoz üretir. Endo-inulinaz ise inülin içindeki β -2,1 glikozidik bağlar üzerinde rastgele etki ederek fruktooligosakkaritleri üretir. Fruktoz ve fruktooligosakkaritlerin yanı sıra, inulinaz enzimi biyoetanol, tek hücreli yağlar ve tek hücreli proteinler, sitrik asit,

glukonik asit, bütanol, sorbitol, vb. gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Singh ve Singh 2017).

Aspergillus niger, genellikle güvenilir kabul edilen (**Generally Recognized As Safe, GRAS**) statüsünde olduğu için ürünleri de hem gıda, kozmetik, eczacılık, tıp ve biyoyakıt endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı çalışmalarında bu mikroorganizmayı kullanarak katma değeri yüksek ürünlerin üretimini gerçekleştirmiştir. Ancak, inülinaz enziminin üretiminde *A. niger* A42 (ATCC 204447) suşu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır ve yalnızca literatürde üç çalışma (Kowalska vd. 2017; Ongen-Baysal vd. 1994; Öngen-Baysal ve Sukan 1996) mevcuttur. Bu çalışmada *A. niger* A42 (ATCC 204447) ile inülinaz enziminin üretiminde saf karbon kaynaklarının yanı sıra daha önce hiç kullanılmayan karbon kaynakları da kullanılmıştır. Ayrıca, literatürdeki verilere göre bu mikroorganizmaya ait besiyeri kompozisyonunun daha önce hiç belirlenmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle besiyeri optimizasyonunda, Plackett-Buramın Dizayn (PBD, Minitab Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) ve Merkezi Kompozit Dizayn (MKD, Design Expert Version 7.00 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) istatistik yöntemleri, bu mikroorganizma için ilk kez kullanılmış olup kapsamlı bir besiyeri optimizasyonu yapılmıştır. Optimize edilen besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların fungal gelişimi, ürün oluşumu ve substrat tüketiminin kinetik modellenmesi yapılmıştır. Yapılan literatür taramalarının sonucunda, biyoreaktörde inülinaz enziminin üretimi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla, optimum besiyeri kompozisyonunda küçük ölçekli biyoreaktörlerde (5-L) pH kontrolü ve havalandırmanın etkisini inceleyen fermentasyon çalışmaları yapılmıştır. Bununla beraber, büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) de enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma bu yönleriyle özgünlük taşımaktadır. Ayrıca optimum besiyeri kompozisyonunda üretilen inülinaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması (santrifüjleme ve ultrafiltrasyon prosesi ile) ve birçok yönden karakterize edilmesi (substrate spesifikliğı, katyonların inhibitör ve aktivatör etkisi, enzim miktarının aktivite üzerine etkisi, termostabilite, termal inaktivasyon ve termodinamik parametreler ve moleküler ağırlık) de çalışmaya özgünlük katmaktadır. Diğer yandan, yine literatürdeki verilere göre inülinaz enziminin üretimi ile ilgili kapsamlı bir matematiksel modellenmenin yapılmamış olması da çalışmaya özgünlük katmaktadır. Bu nedenle, hem PKD hem de MKD ile belirlenen optimum besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların matematiksel olarak modellenmesi çalışmayı özgün kılmaktadır. Çalışmayı özgün kılan bir önemli etken de enzimin substrat spesifikliğı ile ilgili deneysel ve kinetik değerlerin matematiksel modeller ile tahmin edilmesidir. Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışması hemen her yönden özgünlük taşımaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

İnüline ($C_6H_{10n+2}O_{5n+1}$) etki eden enzimler, glikozit hidrolaz (GH) gen ailesinden GH32 ve GH91 içerisinde yer alan endüstriyel enzimlerin önemli bir sınıfıdır. GH32 ve GH91'in her ikisi de, inülinazlar, invertaz, 1-ekzohidrolaz, inülin liyaz, levanazlar, fruktan-fruktoziltransferazlar ve sukroz-fruktoziltransferazları içeren binlerce glikozit hidrolaz enzimini temsil eder. Bunların arasında, inülinazlar GH32'ye aittir. İnülinazlar birçok önemli ürünü üretmek için inülindeki β -2,1 bağlarını hedef alır. Fruktoz kalıntılarından ve sonda bir glukoz grubundan oluşan bir polifruktan olan inülin, fruktoz ve fruktooligosakkaritlerin üretimi için potansiyel bir substrattır. Yapısal özellikleri sadece $(\text{Glukoz-Fruktoz})_n$ ve $(\text{Fruktoz})_m$ olarak gösterilebilir, burada n veya m fruktoz birimlerini temsil eder ve bu birimler 2-60 arasında değişebilir (Ronkart vd. 2006). Bölgesel seçici reaksiyon ve inülin üzerindeki etki şekline göre, inülinazlar esas olarak iki kategoride bulunur: ekzo-inülinaz (EC 3.2.1.80) ve endo-inülinaz (EC 3.2.1.7). Ekzo-inülinaz (fruktan β -fruktosidaz), fruktoz birimlerini serbest bırakmak için inülinin indirgen olmayan terminal ucundan dikine parçalanmasını sağlar. Endo-inülinaz (β -2-1-D-fruktan fruktanohidrolaz) ise farklı zincir uzunluğunda fruktooligosakkarit üretmek için inülini rastgele parçalar (Singh vd. 2016) (Şekil 2.1).

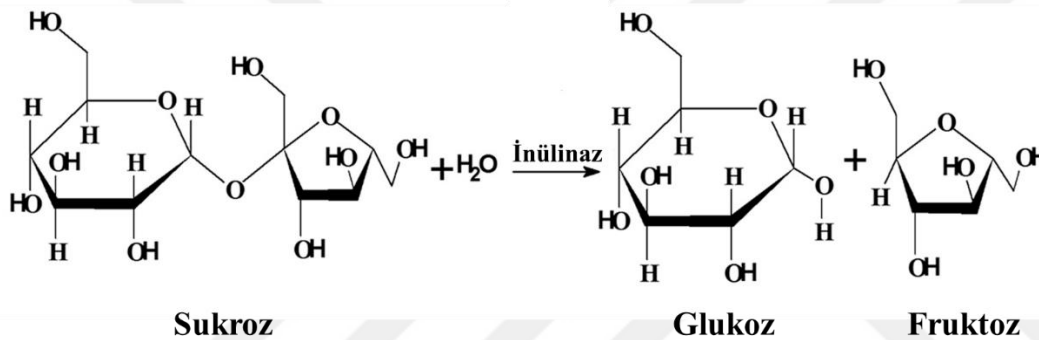


Şekil 2.1. İnülinaz enzimleri tarafından inülinin parçalanma şekli (Singh vd. 2016)

Bununla birlikte, ekzo-inülinazın sukraz (EC 3.2.1.26, β -fruktofuranozidaz) aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Nitekim, fruktanların yanı sıra sukrozun hidrolizinden enzimin sadece bir aktif bölgesi sorumludur (Fleming vd. 1979) (Şekil 2.2). Daha önce benzer substrat spesifikliği nedeniyle inülinaz ve sukraz aktivitesini ayırt etmek zordu. Ancak günümüzde, iki enzimi ayırt etmek için inülin ile sukroz spesifikliğine dayalı inülinaz/sukraz oranı (I/S oranı) çoğunlukla kabul edilmektedir. 10⁻

2'den daha yüksek oranlar inülinaz aktivitesini belirlerken, oran 10^{-4} 'ten düşük ise sukraz aktivitesini doğrular (Ettalibi ve Baratti 1987). GH32'ye ait olan diğer bir hidrolaz enzimi yani 1-ekzohidrolaz (EC 3.2.1.153) da ekzo-inülinaz aktivitelerinden birine sahiptir ancak spesifik olarak 1-kestoz, 1,1-nistoz ve bazı levan tipi fruktanlar üzerinde etki göstermektedir (Singh vd. 2016).

Hem inülinaz enzimi hem de invertaz enzimi (β -D-fructofuranosit fruktohidrolaz, E.C. 3.2.1.26), sukrozu glukoz ve fruktoza indirgemektedir (Şekil 2.2). İnülinaz enziminin sukrozu parçalaması "invertaz-tip aktivite" olarak adlandırılmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında, literatürde yaygın olarak kullanılan "invertaz-tip aktivite" terimi, "sukraz aktivitesi" olarak değiştirilmiştir. Çünkü tezin yazımı ve anlam bütünlüğünü sağlaması açısından kolaylık olduğu düşünülmüştür. Bununla beraber, inülin üzerinde gösterilen aktivite (inülinaz aktivitesi, *Iase*) "I" ile simgelenirken sukroz üzerinde gösterilen aktivite de (sukraz aktivitesi, *Sase*) "S" ile simgelenmiştir. Dolayısıyla I/S oranını tanımlamak daha kolay ve anlaşılır olmuştur.



Şekil 2.2. İnülinaz enzimi tarafından sukrozun parçalanma şekli (Magadum ve Yadav 2018)

Bir enzimin karakteristikleri ve biyokimyasal özellikleri başlıca kaynak ve kökene bağlıdır. İnülinazın hayvanlar, bitkilerdeki inülin depolama dokuları ve çeşitli mikroorganizmalar gibi kaynaklardan üretildiği bildirilmiştir. Hayvanlarda inülinaz enzimi, sindirim kanalı ve *Gryllodes sigillatus*'un tükürük bezlerinin farklı bölgelerinde ve bazı bağırsak simbiyontlarından araştırılmaktadırlar (Singh 1978; Singh vd. 2016; Verma ve Prasad 1975). Bitkilerde inülinaz enzimi ise, ilk kez bitki fruktanlarını hidrolize edebilen *Helianthus tuberosus*'un kök yumrularından keşfedilmiştir (Edelman ve Dickerson 1966). Hayvansal ve bitkisel kaynaklar, enzim veriminin düşük olması sebebiyle ticari olarak araştırılmamaktadır. Bu nedenle, ipliksi funguslar (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. ve *Rhizoctoniasolani*), mayalar (*Kluyveromyces* sp., *Pichia* sp. ve *Cryptococcus* sp.) ve bakteriler (*Streptomyces* sp. ve *Xanthomonas* sp.) gibi mikrobiyal kaynaklar, inulinaz üretimi için belirgin bir tercih haline gelmiştir. Mikrobiyal kaynakların kolay taşınması, geliştirilmesi ve genetik manipülasyonu gibi avantajları vardır. Mikroorganizmalar arasında fungal ve maya inülinazları yoğun şekilde çalışılmıştır. Buna karşılık, bakteriyel kaynaklardan elde edilen inülinazlar üzerine çok az çalışma bildirilmiştir. Basit moleküler organizasyonu ve yüksek termostabil yetenekleri nedeniyle, bakteriyel inulinaz üreticileri büyük bir ivme kazanmaktadır (Singh vd. 2016). İnülinazlar, yüksek fruktoz şurubu (Singh 2011), fruktooligosakkaritler (Moura vd. 2015; Singh ve Singh 2014), biyoetanol (Hu vd.

2012), inulooligosakkaritler (Mutanda vd. 2008), tek hücre proteini (Gao vd. 2007a), tek hücre yağı (Zhao vd. 2010), 2,3-bütandiol (Li vd. 2010), mannitol (Saha 2006), sorbitol (Wei vd. 2001), sitrik asit (Liu vd. 2010), laktik asit (Petrova vd. 2015), aseton-bütanol, pullulan ve glukonik asit (Chi vd. 2011) gibi karbonhidrat türevi ürünlerin üretimi için çoğunlukla kullanılan endüstriyel enzimlerin çok yönlü bir sınıfıdır.

Hem fruktoz hem de fruktooligosakkaritler, doğrusal bir β -2,1 bağlantılı polifruktoz zincirinden oluşur inülininden üretilebilir ve indirgeme ucunda sukroz tipi bir bağlantı yoluyla bir glukoz kalıntısı ile son bulur (Edelman ve Dickerson 1966; Rutherford ve Deacon 1972; Vandamme ve Derycke 1983). İnülin, yerelması, hindiba, yıldızçiçeği gibi çeşitli bitkilerin kökleri ve yumrularında ve ayrıca dulavratotu, altınbaşak otu ve karahindibada bir karbonhidrat rezervi olarak bulunur. İnülin, asit ile hidrolize edilebilir (80-100°C'de pH=1-2), ancak düşük pH, fruktozun bozunmasına neden olur ve proses ayrıca, renklendirilmiş ve tatlandırma kapasitesine sahip olmayan difruktoz anhidritlerin oluşumuna neden olur (Barthomeuf vd. 1991). Fruktozun geleneksel üretimi, α -amilaz ve amiloglukosidaz ile nişastanın amilolize edilmesine, ardından oluşan glukozun glikoz izomeraz ile fruktoza dönüştürülmesine dayanır. Bununla birlikte, bu işlem ile en iyi ihtimalle yaklaşık %45 fruktoz, %50 glukoz ve %8 oligosakkarit üretilmektedir. Fruktozun zenginleştirilmesi için iyon değişim kromatografisi teknikleri geliştirilmiş olsa da, bu teknikler üretim maliyetini artırmaktadır (Vandamme ve Derycke 1983; Zittan 1981). Dolayısıyla, inülininden saf fruktoz şurupları elde etmek için en umut verici yaklaşım olarak mikrobiyal inülinazların kullanımı önerilmektedir. İnülin, tek aşamalı bir proses ile büyük ölçüde (%95) D-fruktoz oluşturmak üzere glikozit bağlarını parçalayan inulinaz enzimi ile bozunur ve bu prosesin yüksek fruktozlu inülin şuruplarının endüstriyel olarak üretilmesi için oldukça cazip olduğu bildirilmiştir (Pandey vd. 1999b; Vandamme ve Derycke 1983).

2.1. İnülinaz Enziminin Üretimi ve Mikrobiyal Kaynakları

Küfler, mayalar, aktinomisetler ve diğer bakterilerin de dâhil olduğu bir takım mikroorganizmaların inülin hidrolize edici enzimler ürettiği bilinmektedir (Pandey vd. 1999b; Singh ve Gill 2006; Vandamme ve Derycke 1983). Küfler arasında *Aspergillus* ve *Penicillium* en tanınmış cins iken *Kluyveromyces* inulinaz üretimi için en çok araştırılan mayadır. Son zamanlardaki bildiriler, bazı *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* türleri de dâhil olmak üzere bakteriler arasında umut veren bazı inülinaz enzimi üreticisi bakterilerin olduğunu göstermektedir (Kango ve Jain 2011). İnulinazlar, indüklenebilir enzimlerdir ve hücre içi olmanın yanı sıra hücre dışı da üretilirler. Fakat enzimi her iki yönde de üretebilen bazı mikroorganizmalar vardır (Pandey vd. 1999b; Singh ve Singh 2010). Mikroorganizmaların çoğunluğu ya ekzo-inülinaz ya da endo-inülinaz üretir, ancak birkaç mikrobiyal türün karışık formları da ürettiği bilinmektedir (Barthomeuf vd. 1991; Chen vd. 2009; Dinarvand vd. 2012; Nakamura vd. 2001; Sheng vd. 2007). İnulinazların üretimi için kullanılan mikroorganizma ve substrat, enzimin lokalizasyonu, etki mekanizması ve verimi açısından büyük rol oynamaktadır (Ricca vd. 2007). Ekzo-inülinaz ve endo-inülinaz üreten mikroorganizmalar Çizelge 2.1'de listelenmiştir. Mikroorganizmaların çoğunda ekstraselüler inulinaz enzimi üretilirken *Fusarium oxysporum* NCIM 1072 (Gupta vd. 1990) ve *Kluyveromyces* sp. (Bourgi vd. 1986; Guiraud vd. 1987; Öngen-Baysal ve Sukan 1996; Rouwenhorst vd. 1988) ile hem

ekstraselüler hem de intraselüler inülinazların üretildiği bildirilmiştir. *Aspergillus niger* suş 12 (Nakamura vd. 2001) ve *Kluyveromyces* sp. Y-85 (Wei vd. 1997) gibi birkaç mikrobiyal suşun hem ekzo- hem de endo-inülinazları hücre içi olarak ürettiği bilinmektedir. İnülinaz enzimi, hem katı kültür hem de sıvı kültür fermentasyonu ile üretilebilmekte ve bu iki fermentasyon tekniği kullanılarak yaygın şekilde çalışmalar yapılmaktadır. Aşağıda, katı kültür ve sıvı kültür fermentasyonları ile ilgili kısaca bilgi verilmiştir.

2.1.1. Katı kültür fermentasyonu ile inülinaz enziminin üretimi

Katı kültür fermentasyonu, sıvı kültür fermentasyonu ile benzer teknolojiye sahip, iyi gelişmiş ve elverişli bir teknolojidir. Fermentasyon teknolojilerinde son yıllardaki ilerlemelerden dolayı, katı kültür fermentasyonunda, sıvı kültür fermentasyonuna göre cazip bir değişiklik görülmektedir. Katı kültür fermentasyonunun, düşük maliyetli atıkların kullanımı, daha düşük maliyetli yöntem, daha yüksek üretkenlik ve geri kazanım, azaltılmış enerji ihtiyacı ve su tüketimi, çevre dostu ve kısa süreli fermentasyon sonrası işlem (downstream process) gibi sıvı kültür fermentasyonuna kıyasla birçok avantajı vardır (Pandey 2003). Düşük nem içeriğine sahip çözünür olmayan substratın yüzeyinde veya yakınında mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu, katı kültür fermentasyonunu ayırıcı bir fermentasyon tekniği yapmaktadır. Son yıllarda, enzim, farmasötik ürünü, biyosurfaktan, aroma bileşiği gibi ürünlerin üretimindeki çeşitli potansiyel uygulamaları nedeniyle, katı kültür fermentasyonunun biyoteknoloji sektöründeki kullanım alanı genişlemiştir.

Substrat ve substratın partikül boyutu, nem, su aktivitesi, pH, sıcaklık, havalandırma ve karıştırma gibi faktörler katı kültür fermentasyonunu ayarlamak için önemli özelliklerdendir (Pérez-Guerra vd. 2003). Bunların arasında partikül boyutu substrat karakterizasyonu ile ilgilidir. Partikül boyutu, substratın toplam yüzey alanı-hacim oranını etkiler. Yüzey alanı-hacim oranı, substrat partikül boyutu azaldığında artar. Ayrıca, substrat partikül boyutu da oksijen transfer oranını etkileyen boşluk alanını belirler. Daha küçük substrat partikülleri mikrobiyal etki için geniş yüzey alanı sağlarken, çok küçük partiküller substrat birikmesine ve yetersiz büyümeye neden olabilir. Buna karşılık, daha büyük partiküller daha iyi ısı ve oksijen alışverişi sağlar. Bu nedenle substrat, kütle transferini ve mikrobiyal büyümeyi arttırmak için uygun partikül boyutu içermelidir (Pérez-Guerra vd. 2003). Buğday kepeği, pirinç kepeği, şeker kamışı küspesi, hindiba yaprakları ve kökleri, enginar yaprakları, sarımsak, soğan kabuğu gibi kaynaklar, inülinaz enziminin üretiminde substrat olarak kullanılmıştır. Katı substrat, büyüyen hücrelere besin sağlamakla kalmaz, aynı zamanda büyümeleri için fiziksel destek görevi görür (Couto ve Sanromán 2006). Bununla birlikte, düşük su aktivitesi ve yüksek oksijen transfer oranı ile istenen ürünleri üreten katı substratlar tercih edilmelidir. Katı kültür fermentasyonu, maya ve fungusların düşük nem seviyesinde yetiştirme kabiliyeti nedeniyle maya ve mantar türlerini kullanarak sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, katı kültür fermentasyonu altında inülinaz enziminin üretimi için bakteriyel suşların kullanılması için çaba gösterilmektedir. *Staphylococcus* sp. ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* suşlarının katı kültür fermentasyonu altında inülinaz enzimini üretmek için sırasıyla buğday kepeği ve soğan/sarımsak kabuğu gibi katı substratları hidroliz ettiği bildirilmiştir (Ayyachamy vd. 2007; Selvakumar ve Pandey 1999b).

Çizelge 2.1. Katı kültür fermentasyonu ile ekzo-inülinazın mikrobiyal üretimi

Mikroorganizma	Substrat	Aktivite (U/gds)	Ekzo/Endo	Kaynak
<i>A. ficuum</i> JNSP5-06	Buğday kepeği	193.6	Ekzo	(Chen vd. 2011a)
<i>A. niger</i>	Muz kabuğu	237	Ekzo	(Narayanan vd. 2013)
<i>A. niger</i> AUMC 9375	Ayçiçeği yumruları ve marul kökleri	440	Endo	(Housseiny 2014)
<i>A. tamarii</i>	Yerel2.1.ması yumruları	26.78	Ekzo	(AbdAl-Aziz vd. 2012)
<i>A. terreus</i>	Enginar yaprakları	21.058	Ekzo	(Abd El Aty vd. 2014)
<i>A. tubingensis</i> CR16	Buğday kepeği	257	Ekzo	(Trivedi vd. 2012)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Buğday kepeği ve pirinç kavuzu	420.09	Endo/Ekzo	(Sheng vd. 2009)
<i>Geotrichum candidum</i>	Pırasa	535.2	Ekzo	(Canli ve Kurbanoglu 2012)
<i>K. marxianus</i>	Buğday kepeği	122.88	Ekzo	(Selvakumar ve Pandey 1999b)
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	Kamış suyunun filtrasyonundan üretilen sıkıştırılmış şeker sanayi atığı	300.5	Ekzo	(Dilipkumar vd. 2013b)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi	445	Ekzo	(Bender vd. 2006)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi	391.9	Ekzo	(Mazutti vd. 2006)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Soya fasulyesi kepeği	250	Ekzo	(Mazutti vd. 2007)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi ve soya fasulyesi kepeği	436.7	Ekzo	(Mazutti vd. 2009)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi ve soya fasulyesi kepeği	463	Ekzo	(Mazutti vd. 2010c)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi ve soya fasulyesi kepeği	586.63	Ekzo	(Astolfi vd. 2011)
<i>Kluyveromyces</i> S120	Buğday kepeği	409.8	Ekzo	(Xiong vd. 2007)
<i>P. rugulosum</i> IMTCC 3487	Kurutulmuş hindistancevizi atığı	239	Ekzo	(Dilipkumar vd. 2014b)
<i>P. citrinum</i> ESS	Poliüretan köpük ve inülin	6650	Ekzo	(Lafuente-Castaneda vd. 2012)
<i>P. citrinum</i> ESS	Poliüretan köpük ve sukroz	2970	Ekzo	(Lafuente-Castaneda vd. 2012)
<i>Pichia guilliermondii</i>	Buğday kepeği ve pirinç kavuzu	455.9	Ekzo	(Guo vd. 2009)
<i>Saccharomyces</i> sp.	Buğday kepeği	90.15	Ekzo	(Onilude vd. 2012)
<i>Staphylococcus</i> sp.	Buğday kepeği	107.64	Ekzo	(Selvakumar ve Pandey 1999b)
<i>Streptomyces</i> sp.	Kurutulmuş hindistancevizi atığı	131	Ekzo	(Dilipkumar vd. 2013a)
<i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	Soğan kabuğu	117	Ekzo	(Ayyachamy vd. 2007)
<i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	Sarımsak kabuğu	101	Ekzo	(Ayyachamy vd. 2007)

Son zamanlarda, katı kültür fermentasyonu ile inulinaz enziminin üretimi üzerine odaklanılmıştır. Katı kültür fermentasyonunda inulinaz enziminin üretimine yönelik bir takım mikroorganizmalar kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Genellikle, *Aspergillus* sp. ve *Kluyveromyces* sp. katı kültür fermentasyonunda inulinaz enziminin üretimi için kullanılmıştır. Katı kültür fermentasyonunda inulinaz üretimi için çeşitli substratlar denenmiştir. Çoğu araştırmada, tarımsal-endüstriyel artıklar substrat olarak kullanılmışken (Chen vd. 2011a; Makino vd. 2009; Mazutti vd. 2006; Mazutti vd. 2007; Mazutti vd. 2009; Mazutti vd. 2010c; Trivedi vd. 2012) farklı kültür bitkilerinden gelen kalıntı atıklar üzerine birkaç çalışma da yapılmıştır (Dilipkumar vd. 2014b; El Aty vd. 2014; Housseiny 2014). Katı kültür fermentasyonu ile çalışan araştırmacıların çoğu, %60-70 arasında değişen nem içeriğinde ve pH 4.5-5.5 aralığında inulinaz enziminin üretildiğini bildirmiştir. Başlangıç pH 8.5 olan *Aspergillus terreus* ile inulinaz enziminin üretimi üzerine yalnızca bir yayın bulunmaktadır (El Aty vd. 2014). Endo-inülinaz üretiminde kullanılan *A. niger* AUMC 9375 (Housseiny 2014) ve ekzo- ve endo-inülinazları üreten *Cryptococcus aureus* G7a (Sheng vd. 2009) haricinde, tüm araştırmalar katı kültür fermentasyonunda ekzo-inülinazın üretimiyle ilgilidir. Sıvı kültür fermentasyona kıyasla katı kültür fermentasyonunda yüksek verimlerde inülinaz enziminin üretildiği bildirilmiştir (Singh ve Singh 2017).

2.1.2. Sıvı kültür fermentasyonu ile inülinaz enziminin üretimi

Sıvı kültür fermentasyonunun şimdiye kadar mikrobiyal kaynaklardan inulinaz enziminin üretimine yönelik en iyi teknik olduğu doğrulanmıştır. Katı kültür fermentasyonu kullanarak inulinaz enziminin üretimi ile ilgili bazı bilgiler literatürde mevcuttur, ancak bu bildiriler sıvı kültür fermentasyona kıyasla önemsizdir. Sıvı kültür fermentasyonu, kontrol kolaylığı ve sterilizasyon gibi avantajlı özellikleri nedeniyle yüzyıllar boyu kullanılan eski bir tekniktir. Ayrıca, ısı transferini ve ortam homojenliğini de kolaylaştırır (Mazutti vd. 2010a). Sıvı kültür fermentasyonunda, sıvı substrat veya fermentasyon sıvısı, mikrobiyal büyüme ve çeşitli metabolitlerin üretimi için kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu teknik büyüme için yüksek nem içeriği gerektiren mikroorganizmalar için en uygun tekniktir (Singh vd. 2016). İnülinazların üretimi için geniş bir yelpazede substratlar kullanılmıştır, ancak inülin ve doğal olarak oluşan inülin açısından zengin materyaller, sıvı kültür fermentasyonunda yaygın şekilde kullanılmaktadır. İnülin, tek karbon kaynağı ve aynı zamanda inülinazların üretimi için bir uyarıcı olarak görev yapmaktadır. İnülin saf halde veya doğal substratlar ile karıştırılarak kullanılabilir (Pandey vd. 1999b; Singh ve Singh 2010).

İnüline ilaveten, glukoz, sukroz, laktoz, maltoz, fruktan, fruktozan gibi diğer substratlar, farklı mikroorganizmalardan inulinaz üretimi için kullanılmıştır (Pandey vd. 1999b; Sandhya ve Pandey 2006; Singh ve Singh 2010). Bazı durumlarda, inulinaz aktivitesine sahip olan mikroorganizmalar aynı zamanda sukraz aktivitesi gösterir; sukroz, bu ortak girişimde inulinaz üretimi için daha iyi bir substrat olabilir, aksi halde sukroz inulinaz üretimi üzerinde engelleyici bir etki de gösterebilir (Pandey vd. 1999b; Vandamme ve Derycke 1983). Çeşitli kaynaklardan elde edilen saf inülin ve inülinin doğal olarak bulunduğu bazı bitki materyalleri inülinaz enziminin üretiminde kullanılmıştır (Çizelge 2.2). Birkaç durumda, yerelması yumruları, yıldızçiçeği yumruları, hindiba kökleri ve karahindiba kökleri gibi bitki esaslı inülin açısından zengini substratlar toz halde kullanılmış (Ertan vd. 2003; Mansouri vd. 2013; Park ve

Yun 2001; Tasar vd. 2015) ve birçok çalışmada bitkilerin bu kısımlarından elde edilen ham inülin ekstraktları kullanılmıştır (Cho vd. 2001; Ferreira vd. 1991; Kango 2008; Rawat vd. 2015; Singh ve Bhermi 2008; Singh vd. 2006; Singh ve Singh 2014; Viswanathan ve Kulkarni 1995a; Zhengyu vd. 2005). Yerli yıldızçiçeği inülininin kaproil ve kolesteril türevleri gibi modifiye edilmiş substratlar da karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (Fontana vd. 1994). Oktadekanoilsukroz türevleri de inülinaz üretimi için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (Ge ve Zhang 2005).

Inülinaz enziminin üretimi için ikinci önemli besiyeri bileşeni azot kaynağıdır. İnülinaz üreten mikrobiyal suşlar, besiyerinde hem organik hem de inorganik azot kaynakları kullanıldığında iyi gelişmektedir. Pepton, sığır özü, maya ekstraktı, et ekstraktı, mısır maserasyon sıvısı, üre vb. gibi çeşitli kompleks azot kaynakları ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 vb. gibi inorganik azot kaynakları, inülinaz enziminin üretimi için besiyeri formülasyonlarında yoğun şekilde kullanılmıştır (Pandey 2004; Sandhya ve Pandey 2006; Vandamme ve Derycke 1983). İnülinaz üretiminde besiyerinde kullanılan kompleks azot kaynakları ile inorganik azot kaynaklarının performansı karşılaştırıldığında kompleks azot kaynaklarının daha iyi olduğu bildirilmiştir (Barthomeuf vd. 1991; Gill vd. 2003; Singh vd. 2006; Singh vd. 2007a; Zhang vd. 2005). Genellikle amonyum tuzları fermentasyon ortamında asidik koşullara neden olur, çünkü asit, amonyum iyonlarının kullanımından sonra serbest bırakılır ve yüksek asidik koşullar, inülinazın sentezini ve mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilir (Ge ve Zhang 2005). Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} (Byun ve Nahm 1978; Singh vd. 2006; Singh vd. 2007a), Mg^{2+} , Fe^{2+} ve K^+ (Ge ve Zhang 2005) gibi inorganik iyonların mikrobiyal inülinaz üretimi üzerine pozitif etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Fermentasyon ortamının pH'ı ve sıcaklığı, inülinaz üretimi üzerinde güçlü bir etkiye sahip diğer önemli faktörlerdir. Genel olarak, funguslardan elde edilen inülinaz üreticileri, başlangıç fermentasyon ortamı pH 4.5 ile 7.0 arasında, bakteri suşları 4.8-7.0 ve maya suşları 4.4-6.5'de yetiştirilir. Genellikle, bakteriyel ve fungal suşların yetiştirilmesinde sıcaklık uygunluğu mezofilik-termofilik aralığa (28-60°C) düşerken, mayalar 30-45°C sıcaklık ile mezofilik aralıkta maksimum inülinaz üretir (Fontana vd. 1994). İnülinazlar üzerine yapılan çalışmaların çoğu, mezofilik aralığı üretim için daha uygun olarak tanımlamaktadır (Pandey vd. 1999b; Singh ve Gill 2006). Termofilik inülinaz üreticilerine örnek olarak *Bacillus* sp. (Allais vd. 1987), *Bacillus smithii* (Gao vd. 2009), *B. stearothermophilus* KP1289 (Keto vd. 1999) ve *Thermotoga maritima* (Liebl vd. 1998) verilebilir. Asidik ortamda çeşitli mikrobiyal kaynaklardan inülinaz üretimi üzerine birkaç çalışma bulunmaktadır (Angel vd. 2012; Ertan vd. 2003; Gao vd. 2007b; Makino vd. 2009; Mazutti vd. 2010b; Sheng vd. 2007). *Arthrobacter* sp. (Elyachoui vd. 1992), *Bacillus safensis* AS-08 (Singh ve Singh 2014), *Staphylococcus* sp. (Pandey vd. 1999a), *Xanthomonas* sp. (Park ve Yun 2001) ve *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Naidoo vd. 2009) gibi birçok mikroorganizmanın da pH 7.0'da inülinaz ürettikleri bildirilmiştir.

Çizelge 2.2. Sıvı kültür fermentasyonu ile ekzo- ve endo-inülinazın mikrobiyal üretimi

Mikroorganizma	Substrat	Aktivite (U/mL)	Ekzo/Endo	Kaynak
<i>Aspergillus oryzae</i>	Buğday kepeği	72.25	Ekzo	(Ali ve Shahzadi 2015)
<i>A. niger</i>	Saf inülin	687	Ekzo	(Nakamura vd. 1995)
<i>A. niger</i>	Yerelması ekstraktı	50	Ekzo	(Öngen-Baysal vd. 1994)
<i>A. niger</i>	Saf inülin	176	Ekzo	(Prabhakar vd. 2004)
<i>A. niger</i>	Mısır maserasyon sıvısı ve maltoz	30	Ekzo	(Derycke ve Vandamme 1984)
<i>A. niger</i> ATCC 20611*	Sukroz	3199	Ekzo	(Dinarvand vd. 2012)
<i>A. niger</i> AUP19	Saf inülin	176	Ekzo	(Pratap Kumar vd. 2005)
<i>A. niger</i> Van Tieghem UV 11	<i>Saussurea lappa</i> kökü toz ekstraktı	302	Ekzo	(Viswanathan ve Kulkarni 1995a)
<i>A. niger</i> -245	Hindiba inülin ekstraktı	3.68	Ekzo	(Cruz vd. 1998)
<i>A. niger</i> suş 13/36	Sukroz	80	Ekzo	(Skowronek ve Fiedurek 2004)
<i>A. niger</i> X-6	Saf inülin ve buğday kepeği	20.42	Ekzo	(Luo vd. 2010)
<i>A. tamarii</i>	Saf inülin	21.53	Ekzo	(AbdAl-Aziz vd. 2012)
<i>A. tamarii</i>	Tarımsal atık ekstraktı (yerelması ve hindiba)	71.97	Ekzo	(Saber ve El-Naggar 2009)
<i>Brevibacillus centrosporus</i> ZF-9	Taze yer elması	6.41	Ekzo	(Zhang vd. 2015b)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Yerelması yumru ekstraktı	210	Ekzo	(Ferreira vd. 1991)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a*	Saf inülin	85	Ekzo	(Sheng vd. 2007)
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Saf inülin	11.62	Ekzo	(Vranesic vd. 2002)
<i>K. bulgaricus</i>	Sukroz	124.36	Ekzo	(Vranesic vd. 2002)
<i>K. fragilis</i> No. 351	Yerelması yumru ekstraktı	20	Ekzo	(Byun ve Nahm 1978)
<i>K. fragilis</i> No. 352	Saf inülin	212	Ekzo	(Parekh ve Margaritis 1985)
<i>K. marxianus</i>	Sukroz	127	Ekzo	(Kalil vd. 2001a)
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Saf inülin	7.3	Ekzo	(Burkert vd. 2006)
<i>K. marxianus</i> ATCC 16046	Sukroz	110	Ekzo	(Burkert vd. 2006)
<i>K. marxianus</i> NCYC 587	Şeker kamışı melası	735	Ekzo	(Makino vd. 2009)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı melası	1294	Ekzo	(Treichel vd. 2009)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7572	Şeker kamışı melası	722	Ekzo	(Makino vd. 2009)
<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i>	Yakon ekstraktı	4.1	Ekzo	(Cazetta vd. 2005)
<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i>	Sukroz	15.29	Ekzo	(Cazetta vd. 2010)

Devamı Arkada

Çizelge 2.2'nin devamı

<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i> ATCC 16045	Sukroz	176	Ekzo	(Silva-Santisteban ve Filho 2005)
<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i> ATCC 16046	Sukroz	208	Ekzo	(Silva-Santisteban vd. 2009)
<i>K. marxianus</i> YS-1	Hint kuşkonmazı kökünün ekstraktı	47.3	Ekzo	(Singh vd. 2006)
<i>K. marxianus</i> YS-1	Saf inülin	30.8	Ekzo	(Singh vd. 2007a)
<i>K. marxianus</i> YS-2	Kuşkonmaz kökünün ekstraktı	40.2	Ekzo	(Singh ve Bhermi 2008)
<i>K. marxianus</i> YS-3	Saf inülin	64.05	Ekzo	(Singh ve Lotey 2010)
<i>K. marxianus</i> YS-4	Hindiba yumrusunun ekstraktı	140.23	Ekzo	(Singh ve Saini 2013)
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	Yerelması yumrusunun ekstraktı	68.9	Ekzo	(Wei vd. 1998)
<i>Marinimicrobium</i> sp. LS-A18	Saf inülin	14.6	Ekzo	(Li vd. 2012)
<i>Nocardiopsis</i> sp. DN-K15	Saf inülin	25.1	Ekzo	(Lu vd. 2014)
<i>Penicillium citrinum</i>	Saf inülin	18.7	Ekzo	(Flores-Gallegos vd. 2012)
<i>P. Citrinum</i>	Saf inülin	20.15	Ekzo	(AbdAl-Aziz vd. 2012)
<i>P. Citrinum</i>	Saf inülin	2241	Ekzo	(Lafuente-Castaneda vd. 2012)
<i>P. expansum</i> SK16	Malt ekstraktı	2.99	Ekzo	(Fernandes vd. 2012)
<i>P. subrubescens</i> FBCC 1632	Saf inülin	7.7	Ekzo	(Mansouri vd. 2013)
<i>P. subrubescens</i> FBCC 1633	Yerelması tozu	3.1	Ekzo	(Mansouri vd. 2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pırasa tozu	30.89	Ekzo	(Tasar vd. 2015)
<i>Staphylococcus</i> sp. RRL1	Saf inülin	0.618	Ekzo	(Selvakumar ve Pandey 1999a)
<i>Staphylococcus</i> sp. RRL2	Saf inülin	0.446	Ekzo	(Pandey vd. 1999a)
<i>Ulocladium atrum</i>	Saf inülin	36	Ekzo	(El-souod vd. 2014)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Yerelması suyu	8.67	Ekzo	(Paixao vd. 2013)
<i>A. ficuum</i> *	Saf inülin (hindiba yumruları)	B	Endo	(Wang vd. 2003)
<i>A. ficuum</i> *	Yerelması ekstraktı	B	Endo	(Zhengyu vd. 2005)
<i>A. ficuum</i> *	Yerelması ekstraktı	B	Endo	(Chen vd. 2009)
<i>A. niger</i>	Karahindiba kazık kök ekstraktı	55	Endo	(Kango 2008)
<i>A. niger</i>	Saf inülin	33.53	Endo	(Skowronek ve Fiedurek 2003)
<i>A. niger</i> suş 12*, ^a	Saf inülin (yıldız çiçeği yumruları)	108 U/mg**	Endo	(Nakamura vd. 2001)

Devamı Arkada

Çizelge 2.2'nin devamı

<i>B. safensis</i> AS-08	Saf inülin	12.56	Endo	(Singh vd. 2013)
<i>B. safensis</i> AS-09	Hint kuşkonmazının ekstraktı	28.67	Endo	(Singh ve Singh 2014)
<i>B. smithii</i>	Saf inülin	135.2	Endo	(Gao vd. 2009)
<i>Chaetomium</i> sp.	Saf inülin	B	Endo	(Zhang vd. 2004)
<i>Chrysosporium pannorum</i> *	Saf inülin	115	Endo	(Xiao vd. 1988)
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85 ^{*,a}	Saf inülin	B	Endo	(Wei vd. 1997)
<i>Paenibacillus</i> sp.	Saf inülin	B	Endo	(Gern vd. 2001)
<i>Penicillium rugulosum</i> *	Saf inülin (yıldız çiçeği yumruları)	22.6 U/mg**	Endo	(Barthomeuf vd. 1991)
<i>P. rugulosum</i> *	Saf inülin	B	Endo	(Gern vd. 2001)
<i>Penicillium</i> sp.	Saf inülin	9.9	Endo	(Nakamura vd. 1997)
<i>Penicillium</i> sp. NFCC 2768	Yıldız çiçeği yumrusunun ekstraktı	3.87	Endo	(Rawat vd. 2015)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Saf inülin (yıldız çiçeği yumruları)	B	Endo	(Kim vd. 1997a)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Hindiba kökü tozu	3	Endo	(Park ve Yun 2001)
<i>Rhizopus</i> sp.	Saf inülin (yıldız çiçeği yumruları)	1.4 U/mg**	Endo	(Ohta vd. 2002)
<i>Streptomyces rochei</i>	Saf inülin (hindiba yumruları)	1	Endo	(Yokota vd. 1995)
<i>Streptomyces</i> sp. CP01	Yerelması tozu	1.6	Endo	(Laowklom vd. 2012)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Yerelması tozu	0.75	Endo	(Ertan ve Ekinci 2002)
<i>T. viride</i>	Yerelması tozu	94	Endo	(Ertan vd. 2003)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Hindiba kökünün ekstraktı	49 U/mg**	Endo	(Cho vd. 2001)
<i>X. oryzae</i>	Hindiba kökünün ekstraktı	B	Endo	(Cho ve Yun 2002)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Yıldız çiçeği yumruları	11	Endo	(Park vd. 1999)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Hindiba kökünün tozu	15	Endo	(Park ve Yun 2001)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Saf inülin	62.85	Endo	(Gao vd. 2007b)

*Hem ekzo- hem de endo-inülinaz üretir.

**Ham ekstraktta endo-inülinazın spesifik aktivitesi

^aEnzim lokalizasyonu intraselülerdir.**B:** Belirtilmemiş

Yapılan literatür taramalarının sonucunda, inülinaz enzimi yaygın şekilde sıvı kültür fermentasyonu ile hem saf hem de alternatif ve ucuz karbon kaynaklarından üretilmektedir. Bununla beraber, yukarıda da bahsedildiği gibi, sıvı kültür fermentasyonu, katı kültür fermentasyonuna oranla daha fazla avantaja sahipken tam tersine katı kültür fermentasyonu da sıvı kültür fermentasyonuna kıyasla daha çok dezavantaja sahiptir. Dolayısıyla, bu çalışmada, inülinaz enziminin üretiminde sıvı kültür fermentasyonu kullanılmıştır.

2.1.3. Proseslerin optimizasyonunda kullanılan istatistiksel yöntemler

Deney tasarımı (DoE) metodolojisi, çalışma altındaki bireysel faktörleri ve bunların sistem yanıtları ile etkileşimlerini birbirine bağlayan matematiksel bir fonksiyon olduğundan kullanışlıdır. Bu metodoloji, ilgili fenomenolojik modellere sahip olmayan sistemlerin hızlı değişken tarama, anlama ve optimizasyonu için kullanılır. Faktöriyel tasarım ve cevap yüzeyi gibi DoE metodolojileri, deney sayısını azaltarak fermentasyonları ve proses koşullarını optimize etmek için güçlü ve etkili yollar sağlar (Mandenius ve Brundin 2008). Temel işlemlerde veya bir biyoproses içindeki birimler arasında yer alan bağımlı parametreler iyileştirilebilir ve geliştirilebilir. DoE, tanımlanmış girdi faktörlerini, yaygın ve iyi tanımlanmış çıktı faktörlerinin veya cevaplarının üretildiği bir dönüştürme biyosistemine karşı araştırır. Bu stratejinin bir başka avantajı, girdi faktörlerinin çıktı yanıtlarını nasıl etkilediğini ortaya koymasındır. Denemelerde, her defada bir parametreyi değiştiren metotlara göre DoE tercih edilir, çünkü tek değişkenli bir yaklaşım yarı-optimizasyon ile sonuçlanırken, faktöriyel tasarım yapılarak, birkaç deneme ile güvenilir bir sonuç elde edilebilir (Sindhu vd. 2017). Deneyisel bir tasarım geliştirmek, proses optimizasyonunun en etkili yoludur. Proseslerin optimizasyonunda amaca göre Tam Faktöriyel Dizayn, Fraksiyonel Faktöriyel Dizayn, Plackett-Burman Dizayn (PBD), Taguchi Dizayn, Box-Behnken Dizayn (BBD) ve Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) gibi istatistiksel yöntemler kullanılmaktadır. Literatürdeki mevcut çalışmalara bakıldığında, besiyeri formülasyonunun optimizasyonunda PBD ve MKD istatistik yöntemleri başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bununla beraber, örneğin 11 farklı besiyeri bileşeni, en az iki konsantrasyonda ayrı ayrı çalışıldığında, tekrarı ile birlikte 44 fermentasyonun ($11 \times 2 \times 2 = 44$) gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ancak, PBD ile deneme sayısı 24'e düşmektedir. Diğer yandan, örneğin 2 faktörlü 5 seviyeli bir fermentasyon denemesi yapıldığında, tekrarı ile birlikte 20 fermentasyonun ($2 \times 5 \times 2 = 20$) gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Eğer bu yöndeki bir çalışma MKD ile yapılırsa, merkez nokta üç kez tekrar edildiğinde, tekrarı ile birlikte 22 fermentasyonun yapılması gerekmektedir. Ancak, aşağıda bahsedildiği üzere MKD'nin geleneksel yöntemle göre birçok avantajı vardır ve daha kesin sonuçlar elde edilmektedir. Deneme sayısını azaltma ve daha kesin sonuçların elde edilmesi gibi nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında PBD ve MKD kullanılmıştır.

2.1.3.1. Plackett-Burman Dizayn

Plackett-Burman Dizayn (PBD)'da, parametreler iki düzeyde de incelenir. Sayı oldukça büyük olduğunda, tarama faktörleri için kullanılır. Deneme sayısı 4'ün katlarıdır. Bu nedenle dizayn 4, 8, 12, 16 ve 20 deneme olacak şekilde kurulur. Deneme sayısı, faktör sayısının bir fazlasına eşittir. Örneğin, 11 faktörlü bir dizaynda, deneme

sayısı 12 olacaktır. Standart bir PBD denemesi 7, 11, 15, 19 ve 25 faktörden oluşur. Deneysel faktörlerin sayısı standart dizayn için tanımlanan sayıdan daha az olduğunda, son faktörler etkisiz olanlardır (Brereton 2003). Modelin kalitesini göstermek ve geliştirmek için uyum iyiliği (goodness of fit), uyum eksikliği (lack of fit), kalıntı analizi (residual analysis) ve model katsayılarının istatistiksel önemi (statistical significance of model coefficients) olmak üzere dört test yapılır. Uyum iyiliği, mevcut sonuçların önerilen polinom modelinde nasıl yeniden üretilebileceğini açıklar. Uyum eksikliği, temel dizayna dâhil olmayan deneysel noktalar için modelle ilişkili hataların deneysel hatalara benzer olup olmadığını belirler. Kalıntı analizi, kalıntıların modele rastgele yerleştirildiğinden emin olmanın yanı sıra herhangi bir modelin olmadığını ve kalıntıların normal olarak dağıtılıp dağıtılmadıklarını doğrulamak için yapılır. Model katsayılarının istatistiksel önemi ise cevaplar üzerinde gerçek etkileri olan bağımsız değişkenleri tanımlamak, polinom denklemini azaltmak ve çalışılan sistemin çıkarımlarını değerlendirmek için kullanışlıdır (Sindhu vd. 2017). PBD’de deneysel sonuçlara yönelik çalışmada kullanılan faktörlerin etkileri, birinci dereceden denklem modeli (Eşitlik 2.1) kullanılarak tanımlanır (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

$$y = \beta_0 + \sum_{t=1}^k \beta_t x_t \quad (2.1)$$

Burada, y =cevap, β_0 =sabit, β_t =doğrusal katsayı ve x_t =kodlanmış faktör seviyesidir.

PBD ile hangi değişkenlerin cevap üzerine önemli etkisinin olduğu belirlendikten sonra, bu önemli değişkenlerin değerlerinin daha ileri seviyede ve noktasal açıdan optimizasyonu için önemli değişken sayısına göre ya BBD (3 faktör ve sonrası-3 seviye) ya da MKD (2 faktör ve sonrası-5 seviye) istatistik yöntemleri kullanılmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında, MKD'nin BBD'den üstün özellikleri nedeniyle MKD istatistik yöntemi tercih edilmiş olup aşağıda hakkında kısaca bilgi verilmiştir.

2.1.3.2. Merkezi Kompozit Dizayn

DoE'nin ilk adımı, deneysel alanda seçilen köşelerden bir dizi deneme ile belirli proseslerin önemli değişkenlerini taramaktır. Buna fraksiyonel faktöriyel dizayn denir, çünkü köşelerin olası değerlerinin sadece bir kısmı incelenir. Tarama denemesinde önemli faktörlerin bir alt kümesi tespit edilir. Bu faktörler optimum faktör değerlerini bulmak için kullanılır. Bu ise Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile elde edilir. Burada, değişkenlerin ek değerleri, deneysel alanın köşeleri arasındaki yüzey merkezi noktalarına dâhil edilir. MKD’de her bir faktörün beş seviyesi olduğu için, daha iyi yakalama, güçlü eğrilik ve hatta kübik cevap davranışı sağlanır (Mandenius ve Brundin 2008). MKD, deneysel bölgenin merkezindeki harici noktaları ve bir noktayı kullanan beş seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olarak tanımlanır. Bu merkez nokta, dönebilirlik veya ortogonalite gibi kuadratik polinomlara uyacak şekilde çeşitli özelliklere sahip olmalıdır. MKD, karşılaştırılabilir sonuçlar verirken daha az deney gerektirdiği için, tam faktöriyel ve üç seviyeli dizayna önemli bir alternatiftir. Bu nedenle MKD, ikinci dereceden polinom modeller için en çok kabul gören deneysel dizayndır (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

MKD, her-defada-tek-etken (one-factor-at-a-time, OFAT) yönteminden daha iyidir, çünkü daha az sayıda deneme kullanılarak MKD aracılığıyla faktörler arasındaki interaksiyonların ortaya çıkarılması mümkündür. Ayrıca, istatistiksel yaklaşımların kullanılması bireysel faktörlerin önemini ve her bir faktörün cevap üzerindeki etkisini ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, MKD'ye kıyasla, OFAT klasik bir yaklaşımdır ve zaman alıcıdır, birçok deneme gerektirir ve faktörler arasındaki interaksiyonları tespit edemez. Ayrıca, OFAT kullanılarak elde edilen optimize proses koşulları güvenilir değildir (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

MKD, orta noktalara sahip olan gömülü bir faktöriyel dizayn içerir ve bir grup eksenel nokta ile güçlendirilir. MKD'nin avantajlarından biri, çok sayıda faktör ve seviyeye sahip çalışmalarda denemelerin sayısını azaltmak, karşılaştırılabilir sonuçlar ve faktörler arasındaki interaksiyonları vermektir. Ayrıca MKD, bir sistemi etkileyen doğrusal, kuadratik ve interaksiyon etki faktörlerini incelemede yüksek kaliteli tahminler sağlar. Ayrıca, MKD sağlamdır ve veri noktaları test edilen alanın dışında olsa bile yüksek tahmin edilebilirliğe sahip bir model ortaya çıkarır. BBD'ye kıyasla, MKD'den gelen R^2 değeri, her iki dizaynın da doğrusal polinom modeline iyi uyduğu durumlarda genellikle daha yüksek bir değer gösterir. Ayrıca, MKD genellikle BBD'den daha düşük kalan standart hata değeri verir. Böylece, MKD gerçek deneme ile kıyaslandığında daha doğru veri tahmin eder ve ikinci dereceden modeller için en çok kabul edilen deneysel dizayn olarak kabul edilir (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.1.4. İnülinaz enziminin endüstriyel üretimi

Ticari olarak, sadece iki şirket inülinaz üretmektedir. İrlanda merkezli Megazyme, rekombinant *A. niger* ile E-Endoien ve E-Exoian ticari isimleri altında ultra saf endo-inülinaz ve ekzo-inülinaz üretmekte ve pazarlamaktadır. Bu enzimler, araştırma yapmak amacıyla kullanılabilir. Ayrıca Megazyme tarafından üretilen Fructan ve Fructan HK analitik kitlerinde de bu enzimler kullanılmaktadır. *A. niger*'den üretilen ekzo-inülinazın bir başka ticari preparatı, Sigma-Aldrich (ABD) tarafından Fructozyme ticari isim adı altında pazarlanmaktadır (Singh ve Singh 2017).

Fermentasyonla katma değeri yüksek ürünler (örneğin enzimler) üretildikten sonra elde edilen ham ürün, saflaştırıldıktan ve birçok yönden karakterize edildikten sonra ya toz formda, ya sıvı preparat şeklinde ya da tablet olarak piyasaya sunulmaktadır. Günümüzde enzim üreten ticari firmalar da saflaştırılmış ve karakterize edilmiş ürünleri pazarlamaktadır. Aşağıda bu tez çalışmasında üretilen inülinaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili literatür bilgisi verilmiştir. Sonrasında ise bu tez çalışmasında kullanılan saflaştırma teknikleri (santrifüjleme ve ultrafiltrasyon) ve SDS-PAGE ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

2.2. İnülinaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Çeşitli mikroorganizmalardan ekstraselüler inülinazlar santrifüj, ultrafiltrasyon ve tuz veya organik çözücü çöktürmesi, ardından kolon kromatografisi gibi geleneksel saflaştırma teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır (Pandey vd. 1999b; Singh ve Gill 2006; Singh ve Singh 2010). İntraselüler lokalizasyona sahip inülinazlar, kimyasal metotlar (bazik ve enzimatik muamele), fiziksel metotlar (de-kompresyon, ozmotik şok,

termoliz, donma-çözülme, deterjanlar, çözücüler ve sitoplazmik membranların bozunması), mekanik metotlar (ön-işlem, bozunma derecesi ve termal bozunma, karıştırma, mikro boncukla öğütme, yüksek basınçlı homojenizatörler, french press, vurma, sonikasyon, koloidal değirmenler ve kuru öğütme) ve/veya otoliz gibi ek bir hücre duvarı bozulması aşamasına ihtiyaç duyarlar (de Carvalho vd. 2017; Singh ve Singh 2017). Kullanılan saflaştırma teknikleri ve bazı saflaştırılmış inulinazların özellikleri Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'te özetlenmiştir. Fungal inulinazların çoğu ekzo-hareket eden ve ekstraselülerdir. Üç ekzo-inulinaz ve iki endo-inulinaz enzimi, iyon değiştirme ve jel-eksklüzyon kromatografisi ile *A. ficuum* JNSP5-06'dan saflaştırılmıştır (Chen vd. 2009). Saflaştırılan enzimlerin optimum sıcaklık değeri 45°C olarak belirlenmiş olup 50°C sıcaklık değerinin altında ise enzimlerin stabil olduğu saptanmıştır. Ekzo- ve endo-inulinazların 4-8 pH aralığında stabil olduğu ve optimal pH'sının, ekzo-inulinazlar için 4.5 ve endo-inulinazlar için 5.0 olduğu bildirilmiştir.

66.0, 62.7 ve 59.4 kDa'lık moleküler kütlelere sahip olan bir heterotrimerik ekzo-inulinaz, iyon değiştirme ve jel-eksklüzyon kromatografisi kullanılarak *A. fumigatus*'tan saflaştırılmıştır (Gill vd. 2004). *R. oligosporus* NRRL 2710'dan iki ekzo-inulinaz (Inu 2 ve Inu 3), DEAE Sepharose ve Sephacryl-200 kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Mohamed vd. 2015). Inu 2 ve Inu 3'ün moleküler kütleleri ve K_m 'si sırasıyla 76 ve 30 kDa ve 0.93 ve 0.70 mM olarak bildirilmiştir. *Chrysosporium pannorum*'dan ekzo- ve endo-inulinazın saflaştırılması üzerine ilginç bir çalışma bildirilmiştir (Xiao vd. 1989a, b). Bir endo-inulinaz ve iki ekzo-inulinaz (F2 ve F3), iyon değiştirme ve jel-eksklüzyon kromatografisi ile *C. pannorum*'dan saflaştırılmıştır. Ekzo-inulinaz ve endo-inulinaz için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 55°C ve 50°C iken, optimum pH değerlerinin ise üç inulinaz formunda da farklı olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılmış inulinazların özelliklerine ilişkin çeşitli raporlardan elde edilen bilgilere göre farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen inulinazların optimum pH ve sıcaklık değerlerinde fazla bir farklılığın olmadığı sonucuna varılabilir (Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4). Çeşitli kaynaklardan elde edilen inulinazların moleküler kütlesi 30 ila 300 kDa arasında değişmektedir. Çoğunlukla fungal inulinazlar 4.0-7.0, bakteriyel inulinazlar 4.5-7.5 ve maya inulinazları 4.5-7.0 aralığında optimum pH değerlerine sahiptir. Fungal inulinazların optimum sıcaklığı 30-60°C arasındadır, oysa bakteriyel ve maya inulinazlarının optimum sıcaklığı 40-70°C arasında değişmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, *A. niger* A42 inulinazının kısmi saflaştırılmasında santrifüj ve UF yöntemleri, moleküler ağırlığının belirlenmesinde ise SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılmış olup bu yöntemlere aşağıda kısaca değinilmiştir.

Çizelge 2.3. Ekzo-inülinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu

Mikroorganizma	ST	U/mg ^a	K _m	V _m	kDa ^b	pH		T (°C)		Kaynak
						Optimum	Stabilite	Optimum	Stabilite	
<i>Alternaria alternata</i>	D, IDK, JFK	29.52	0.52 mM	8.69 mM/dk/mL	66	5	4.0-6.0	30	<40	(Sanal vd. 2005)
<i>Arthrobacter globiformis</i> S64-1	IDK, PAGE	755	B	B	100	6.5	6.0-10.0	40	<40	(Haraguchi vd. 1990)
<i>A. awamori</i> var. 2250	UF, IDK, JFK	75	0.003 mM	175 µmol/dk/mg	69	4.5	3.0-5.0	60	<70	(Arand vd. 2002)
<i>A. candidus</i>	ASÇ, IDK, JFK	106	3.8 mM/dm3	B	54	5.5	B	45	B	(Kochhar vd. 1999)
<i>A. ficuum</i> JNSP5-06										
Exo I			43.1 mg/mL	32.7 mg/mL/dk	70	4.5	4.0-8.0	4.5	<50	
Exo II	ASÇ, D, IDK, JFK, P-PAGE	B	31.5 mg/mL	217 mg/mL/dk	40	4.5	4.0-8.0	4.5	<50	(Chen vd. 2009)
Exo III			25.3 mg/mL	46.3 mg/mL/dk	46	4.5	4.0-8.0	4.5	<50	
<i>A. foetidus</i> NRRL 337	ASÇ, IDK, JFK	100.9	3.45 mg/mL	B	78	5.5	4.5-5.5	50	B	(Fawzi 2011)
<i>A. fumigatus</i>										
Isoform I	ASÇ, IDK, HEK, JFK, AK	171	0.25 mM	333.3 IU/mg	200	5.5	4.0-9.5	60	<60	(Gill vd. 2004)
Isoform II		551.72	1.25 mM	B	62	6	4.0-7.0	60	<60	(Gill vd. 2006)
<i>A. niger</i>	ASÇ, EÇ, IDK, JFK	6.6	5.8 mM	B	47	5	3.2-7.0	55	<50	(Nakamura vd. 2001)
<i>A. niveus</i>	D, IDK, JFK	378.75	B	B	B	4.8	B	45	B	(de Souza-Motta vd. 2005)
<i>A. terreus</i>	IDK, AK, SDS-PAGE	38.3	11 mM	B	57	4	4.0-6.0	60	40-60	(Coitinho vd. 2010)
<i>B. subtilis</i> 430A	ASÇ	B	8 mM	B	B	B	B	45-50	B	(Vullo vd. 1991)
<i>B. stearothermophilus</i> KP1289	ASÇ, IDK, JFK	92	80 mM	B	54	6.1	4.2-10.4	60	30-75	(Kato vd. 1999)
<i>C. kutaonensis</i> sp. nov. KRF1 ^T	UF, IDK, JFK	188	2.3 mg/mL	4.8 mg/mL	55	4.5	3.0-6.5	50	<60	(Yuan vd. 2012)
<i>Chrysosporium pannorum</i>										
F2	ASÇ, IDK, JFK	41.5	B	B	84	5	5.0-7.5	55	<50	(Xiao vd. 1989a)
F3		11.8	B	B	70	6	5.0-8.5	55	<45	(Xiao vd. 1989b)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	UF, IDK, JFK	15.826	20.06 mg/mL	0.0085 mg/dk	60	5	4.0-6.5	50	<65	(Sheng vd. 2008)
<i>Fusarium oxysporum</i>										
I	ASÇ, D, IDK	21	16.7 µmol/dm3	B	300	5.8	5.0-7.0	30	B	(Gupta vd. 1988)
II		63.3	20.0 µmol/dm3	B	300	6.2	5.0-7.0	37	B	
<i>K. marxianus</i> YS-1	EÇ, JFK	413	3.4 mM	7.6 mM/dk	B	5.5	5.0-6.0	50	<50	(Singh vd. 2007b)
<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i>	IDK, SDS-PAGE	84.1	86.9 mg/mL	B	77	4.7	B	55	<40	(Kushi vd. 2000)
<i>Kluyveromyces</i> sp.	ASÇ, IDK, JFK	B	B	B	57	4.6	B	55	B	(Wei vd. 1997)
<i>P. janczewskii</i>	ASÇ, IDK, HEK, JFK	364.5	0.063 M	0.0209 mM/dk/mL	80	6	B	40-60	B	(Pessoni vd. 2007)
<i>Penicillium</i> sp. TN-88	ASÇ, IDK, JFK	743	92.6 µmol	B	81	4	5.0-7.0	55	<50	(Moriyama vd. 2002)
<i>Pichia guilliermondii</i>	UF, IDK, JFK, SDS-PAGE	9696.9	21.1 mg/mL	0.08 mg/dk	50	6	6.0-7.0	60	<60	(Gong vd. 2008)
<i>Rhizopus oligosporus</i> NRRL 2710										
Inu II	IDK, JFK	3258	0.93 mM	B	76	5	B	50	<60	(Mohamed vd. 2015)
Inu III		7238	0.70 mM	B	76	5	B	60	<70	
<i>Sphingomonas</i> sp. JB13	AK, SDS-PAGE	73.7	10.2 mg/mL	294.1 µmol/dk/mg	55	5.5	B	55	<70	(Zhou vd. 2015)
<i>Streptomyces griseus</i>	ASÇ, JFK	6.88	B	B	140	7	B	30	<40	(Tohamy 2006)
<i>Streptomyces</i> sp.	ASÇ, IDK, Agaroz kolon	170	1.63 mM	450 mM	45	6	B	70	<70	(Sharma ve Gill 2007)
<i>Streptomyces</i> sp. CP01	ASÇ, IDK, JFK, HEK	290.2	2.34 mM	440 µmol/dk/mg	70.8	6	5.5-9.0	55	<50	(Laowklom vd. 2012)
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	ASÇ, IDK, JFK	254.9	2.15 mg/mL	B	72	4.5	4.5-5.0	75	B	(Kochhar vd. 1999)
<i>Ulocladium atrum</i>	ASÇ, D, IDK	2479.2	B	B	B	B	B	B	B	(El-souod vd. 2014)

a: Spesifik aktivite, b: Moleküler ağırlık, ST: Saflaştırma teknikleri, T: Sıcaklık, AK: Afinité kromatografisi, D: Diyaliz, JFK: Jel-filtrasyon kromatografisi, HEK: Hidrofobik etkileşim kromatografisi, IDK: İyon değişim kromatografisi, EÇ: Etanol ile çöktürme, B: Belirtilmemiş, ASÇ: Amonyum sülfat ile çöktürme, P-PAGE: Preparatif poliakrilamid jel elektroforezi, SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi, UF: Ultrafiltrasyon

Çizelge 2.4. Endo-inülinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu

Mikroorganizma	ST	U/mg ^a	K _m	V _m	kDa ^b	pH		T (°C)		Kaynak
						Optimum	Stabilite	Optimum	Stabilite	
<i>Arthrobacter</i> sp.	ASÇ, IDK, HEK	53	1.7 mM	B	75	7.5	5.0-10.5	50	30-40	(Kang vd. 1998)
<i>A. ficuum</i>	IDK, P-PAGE	348	8.1 mM	773 IU/mg	66	5	4.8-5.2	50	<60	(Uhm vd. 1999)
<i>A. ficuum</i> JNSP5-06										
Endo I	ASÇ, D, IDK, JFK, P-PAGE	B	14.8 mg/mL	40.8 mg/mL/min	34	5	4.0-8.0	45	<50	(Chen vd. 2009)
Endo II		B	25.6 mg/mL	53.8 mg/mL/min	31	5	4.0-8.0	45	<50	
<i>A. niger</i>	ASÇ, EÇ, IDK, JFK	108	0.80 mM	B	56	5.3	5.0-7.0	45	<60	(Nakamura vd. 2001)
<i>A. niger</i>	IPÇ, IDK, HEK, JFK	1158.3	6.7 g/L	0.0476 mg/ml/min	69	5	4.0-7.0	55	<55	(Skowronek ve Fiedurek 2006)
<i>A. niger</i> AUMC 9375	ASÇ, IDK, JFK	11833.3	B	B	75	5	4.0-6.0	50	B	(Housseiny 2014)
<i>A. niger</i> mutant 817										
Form P-1A	D, UF, IDK	352	0.48 mM	109 µmol/min/mg	70	5.3	5.0-7.0	50	<50	(Nakamura vd. 1994)
Form P-1B		338	0.50 mM	139 µmol/min/mg	68	5.3	3.5-9.0	50-55	<50	
<i>B. smithii</i>	ASÇ, IDK, JFK	1105.4	4.17 mM	833.3 IU/mg	47	4.5	4.0-7.0	70	<70	(Gao vd. 2009)
<i>Chaetomium</i> sp.	ASÇ, IDK, JFK, HEK	B	0.199 mmol/L	115 µmol/min/mg	66	6	B	55	B	(Zhang vd. 2004)
<i>Chrysosporium pannorum</i>	ASÇ, IDK, JFK	106.2	B	B	58	6.0-7.0	4.5-8.5	50	<45	(Xiao vd. 1989b)
<i>Kluyveromyces</i> sp.										
EI	ASÇ, IDK, JFK	B	B	B	42	4.6	B	52	B	(Wei vd. 1997)
EII	ASÇ, IDK, JFK	B	B	B	65	4.5	B	52	B	
<i>P. purpurogenum</i>	IDK, JFK	82.8	0.21 mM	B	64	5.1	5.0-7.5	55	<55	(Onodera ve Shiomi 1988)
<i>Penicillium</i> sp.	D, UF, IDK	105	0.20 mM	106 µmol/min/mg	68	5.2	5.0-7.0	50	<40	(Nakamura vd. 1997)
<i>Penicillium</i> sp. NFCC 2768	EÇ, IDK	81.7 (nkat/mg)	B	B	68	5	B	50	B	(Rawat vd. 2015)
<i>Rhizopus</i> sp.	UF, IDK, JFK	17	9.0 mM	B	83	6	5.0-8.0	40	<30	(Ohta vd. 2002)
<i>X. oryzae</i>	ASÇ, IDK, HEK	1407	16.7 g/L	12.1/L/h	139	7.5	6.0-9.0	50	<45	(Cho ve Yun 2002)

^a: Spesifik aktivite, ^b: Moleküler ağırlık, **ST**: Saflaştırma teknikleri, **T**: Sıcaklık, **D**: Diyaliz, **JFK**: Jel-filtrasyon kromatografisi, **IPÇ**: İzopropanol ile çöktürme, **AÇ**: Aseton ile çöktürme, **HEK**: Hidrofobik etkileşim kromatografisi, **IDK**: İyon değişim kromatografisi, **EÇ**: Etanol ile çöktürme, **B**: Belirtilmemiş, **ASÇ**: Amonyum sülfat ile çöktürme, **P-PAGE**: Preparatif poliakrilamid jel elektroforezi, **SDS-PAGE**: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi, **UF**: Ultrafiltrasyon

2.2.1. Santrifüjleme ile kısmi saflaştırma

Süspanse tanecikleri ayırmak için kullanımı kolay olan yer çekimi kuvveti yerine merkezkaç kuvveti uygulanırsa, katı-sıvı ayırma hızı önemli ölçüde artar. Bununla beraber, çok daha küçük tanecikler bile ayrılabilir. Santrifügasyon, 0.1 µm çaplı küçük tanecikleri ayırmada kullanılabilir ve bazı sıvı-sıvı ayırma işlemleri için son derece uygundur. Santrifüj prosesinin verimliliği, tanecik boyutu, hücre ve ortam arasındaki yoğunluk farkı ve ortam viskozitesine bağlıdır. Santrifügasyon prosesi ile bir taneciğin son ayrılış hızı Eşitlik 2.2 ile hesaplanabilir.

$$V_c = \frac{d_p^2 (\rho_s - \rho_l) \omega^2 r}{18\eta} \quad (2.2)$$

Burada,

V_c = santrifüjle çöktürme hızı veya tanecik hızı (m/s)

d_p = tanecik çapı (m)

$\rho_s - \rho_l$ = tanecik ve ortam arasındaki yoğunluk farkı (kg/m³)

ω = santrifüjün açısal hızı (rad/s)

r = taneciğin dönme merkezinden uzaklığı (m)

η = akışkanlık sabiti veya viskozite (Pa.s)

Eşitlik 2.2'den anlaşıldığı üzere, daha yüksek devir hızı (ω) ve dönme merkezine olan uzaklığın artması (m) ile daha hızlı çökme hızı (V_c) elde edilir. Santrifüjler, bağlı merkezkaç kuvveti (RCF) veya g sayısı (santrifüj hızının yerçekimi etkisindeki hıza oranı = $\omega^2 r/g$) ile karşılaştırılabilir. Santrifüj seçimi, tanecik boyutu ve yoğunluğu ile ortam viskozitesine bağlıdır. Mayalarla karşılaştırıldığında; bakteriler gibi daha küçük mikroorganizmaları ayırmak için daha yüksek hıza sahip santrifüjler gerekmektedir.

Santrifüjlem işleminin, küçük hacimli santrifüjlerle büyük hacimli malzemeyi hızlı bir şekilde işleyebilen tamamen sürekli çalışma sistemlerinin bulunabilirliği gibi avantajları vardır. Santrifüjler; buharla sterilize edilebilir, aseptik olarak kullanılabilirler. Bununla beraber, santrifüjlerin; membran, kimyasal ve filtre yardımcı maddeleri gibi sarf maliyetleri yoktur. Ancak, santrifüjleme işleminin, yüksek başlangıç sermaye maliyeti, çalışma sırasında oluşan gürültü ve elektrik maliyeti gibi dezavantajları vardır. Öte yandan, yüksek kayma gerilimi nedeniyle hücrelerde fiziki parçalanmalar oluşabilir ve sıcaklık kesin şekilde kontrol edilmeyebilir. Sıcaklığın kesin şekilde kontrol edilememesi de sıcaklığa hassas ürünleri etkileyebilir (Çekmecelioğlu 2014).

Santrifüjleme prosesi ile kısmi olarak saflaştırılan enzim preparatı, ultrafiltrasyon prosesi ile de kısmi olarak saflaştırılmakta ve protein konsantrasyonu açısından yoğun bir sıvı enzim preparatı elde edilmektedir. Kısmi saflaştırma prosesinde kullanılan ultrafiltrasyon prosesi hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir.

2.2.2. Ultrafiltrasyon ile kısmi saflaştırma

Modern filtrasyon yöntemleri, derinlikli filtreler yerine mutlak filtrelerden oluşur. Bu filtreler, gözenek boyutuna göre başlıca üç kategoriye ayrılan destekli

membranlardır. Azalan gözenek boyutu sırasına göre bunlar, mikrofiltrasyon (MF), Ultrafiltrasyon (UF) ve ters-ozmoz (RO) membranlardır. Filtre edilecek süspansiyon, geleneksel filtrasyon yöntemlerindeki gibi dik açı yerine membran boyunca pompalanmaktadır (çapraz/teğetsel akış). Bu yöntem, membranda katı partiküllerin neden olduğu tortu oluşumunu geciktirir. Boyutu membranın ayırma sınırından (cut-off değeri) küçük olan tanecikler, membrandan geçerken (permeat) geriye kalan tanecikler ise (filtrelenememiş madde) (retentat) tutulur. Filtrasyon ilerledikçe, membrandan filtrat akışı tortu oluşumu nedeniyle azalır. Derişim polarizasyonu olarak da ifade edilen bu durum, membran yüzeyinde çözünen moleküllerin katman halinde birikmesi sonucu oluşmaktadır. Silikon köpük engelleyicilerin varlığı da benzer olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında UF prosesi kullanıldığı için, aşağıda UF prosesi ile ilgili kısaca bilgi verilmiştir (Çekmecelioğlu 2014).

UF, daha küçük gözenek boyutuna sahip membranların dışında MF'ye benzer bir yöntemdir ve 2-500 kDa arasındaki çözeltileri molekül ağırlıklarına göre ayırmada kullanılır. Membranlar, anizotropik (yön bağımlı) bir yapıya sahiptir, seçici, spesifik çapta gözenekleri olan ve kalın, oldukça gözenekli bir yapıya bağlı ince bir membrandan oluşur. Örneğin, 100 kDa ayırma sınırı ile üretilen bir membran, 100 kDa'nın üzerinde protein ve diğer moleküllerden oluşan retentat üretirken, 100 kDa'nın altında bütün moleküller permeata geçmektedir. Öte yandan, küre şeklinde olmayan proteinler, membrana karşı farklı ayrılma tepkimeleri gösterebilir. Büyük ölçekli proseslerde genellikle içi boş lifli sistemler tercih edilmektedir. Ancak, düz membranlar da kullanılmaktadır. Bununla beraber, UF ünitelerinin birkaçı, daha gelişmiş bir saflaştırma sistemi oluşturmak için ardışık olarak birbirleriyle bağlanabilir. Bu yöntemler genellikle proteinlerin saflaştırılmasında ve maddelerin ayrılması ve konsantre edilmesinde kullanılmaktadır. UF prosesi, pirojenleri ve virüsleri ortamdan ayırmada ve peynir altı suyunu işlemede de kullanılmaktadır (Çekmecelioğlu 2014).

Ultrafiltrasyon prosesi ile kısmi olarak saflaştırılan enzim preparatlarının saflığını kontrol etmek ve enzimin moleküler ağırlığı hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla moleküler ağırlık tayini yapılmaktadır. Bu amaçla, bu tez çalışmasında kullanılan SDS-PAGE moleküler ağırlık tayini ile ilgili aşağıda kısaca bilgi verilmiştir.

2.2.3. SDS-PAGE ile moleküler ağırlık tayini

SDS-PAGE yöntemi, proteinlerin saflığının kontrolü ve molekül ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda SDS-PAGE, proteinin birden fazla alt birime sahip olup olmadığını belirlemede de önemlidir. SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezinden (PAGE) farklı olarak protein karışımına tiyol ayırıcı olan merkaptetanöl ve SDS eklenerek 100°C'de ısıtılarak denatüre edilir. Merkaptetanöl, proteindeki disülfid bağlarını koparır. Denatüre edici bir deterjan olan SDS proteine bağlanır (bir molekül SDS, yaklaşık iki aminoasit kalıntısı bağlar) ve proteini net negatif yük ile kaplar, bu durumda proteinin kendi yükü ihmal edilir. Proteinin doğal konformasyonu değişir, proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olurlar ve poliakrilamid jel içerisinde sadece molekül ağırlığına göre ayrılırlar. Buna göre büyük moleküller jel maktriğinde tutulurken küçükler daha hızlı göç eder. Molekül ağırlığı bilinen protein standartları (marker), ilgili protein örnekleri ile birlikte yürütülerek

saflaştırılmış proteinin veya enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak hesaplanır (Metin 2010).

2.3. Ekzo-İnülinazın Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

A. niger'den elde edilen ekzo-inulinaz (AngInuE), hidrolitik olarak inülin ve levan üzerinde bir etkisi olmayan *A. foetidus*'dan elde edilen fruktoziltransferaz 1-SST ile tamamen aynıdır. Ayrıca AngInuE ile *A. niger* 12'den elde edilen ve inülini hidroliz edebilen fakat levan üzerinde aktif olmayan ekzo-inülinaz (InuE) arasında üç aminoasidin farklı olduğu belirlenmiştir (Arand vd. 2002; Moriyama vd. 2003; Rehm vd. 1998).

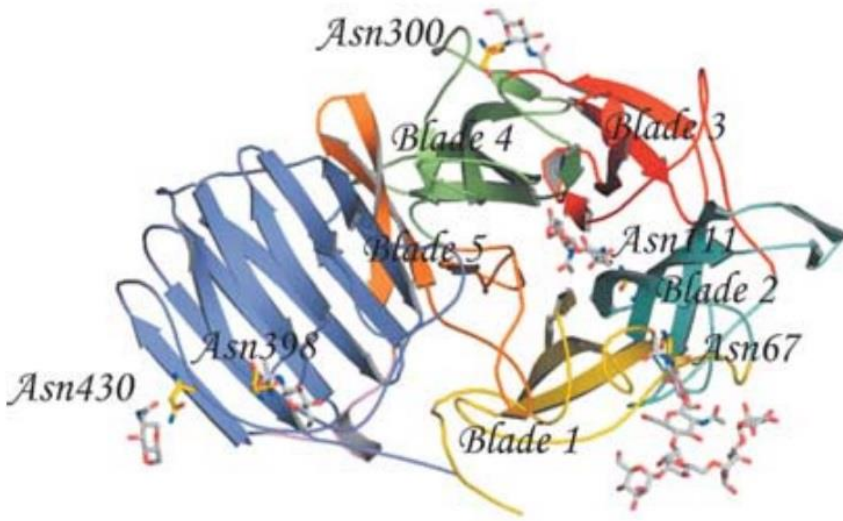
Cichorium intybus (GH32)'den elde edilen 1-ekzohidrolaz IIa (1-FEH IIa), *Thermotoga maritima* (GH32)'den elde edilen invertaz, *A. awamori* (GH32) 'den elde edilen ekzo-inülinaz ve *B. subtilis* (GH68)'ten elde edilen levansukraz enzimlerinin yapılarının karşılaştırılması, bu enzimlerin katalitik olarak önemli gruplarının β -aksiyal alan içinde konsantre edildiğini göstermiştir. Pons vd. (1998), β -aksiyal yapıya dayalı olarak, GH32'deki hidrolazlar için yapısal bir model önermiştir. Model, aktif bölgenin üç korunmuş aminoasit kalıntısı (L-Aspartik asit, L-Glutamik asit ve L-Sistein) içerdiğini göstermiştir (Holyavka vd. 2016).

X-ışını kırınım verilerine dayanarak, Nagem vd. (2004) *A. awamori* ile üretilen inülinazın 3 boyutlu yapı modelini açıklamıştır (Şekil 2.3). Araştırmacılar, enzimin iki bölgeden oluştuğunu bildirmiştir. Katalitik bölgeye sahip N-terminal alanı, 353 aminoasit kalıntısı içerir (L-Fenilalanin 20'den L-Glutamin 372'ye). Bu alan, bir eksen etrafında radyal olarak yerleştirilmiş katmanlar ile beş katmanlı β -aksiyal ailesine aittir. Her bir katman, dört anti-paralel β -iplikçiğinden oluşur. Tüm iplikler, rotasyonel yer değiştirme yapısı ile birbirine bağlanır ve her bir katmanın dördüncü ipliği, sonraki katmanın birinci ipliği ile bağlanır. Beş katmanlı β -aksiyal yapı çok yaygın değildir. Esasen *Cellvibrio japonicus*'tan üretilen taşılektin-2, α -L-arabinanaz A43 ve *B. subtilis* kaynaklı levansükraz enziminde görülmektedir (Beisel vd. 1999; Meng ve Fütterer 2003; Nagem vd. 2004; Naumoff 1999; Nurizzo vd. 2002; Pons vd. 2000; Pons vd. 1998).

İnülinazın C-terminal bölgesi (L-Arjinin 382'den L-Asparajin 537'ye kadar 156 aminoasit kalıntısı), her biri sandviç benzeri yapıya bağlı altı β -iplikçik ile oluşturulan iki β -tabakasından oluşur. Birinci ve ikinci bölgeler kısa polipeptid bağlayıcılarla bağlanır. Bölgelerin konumu ve yönelimi, çeşitli hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle dengelenir. Yapısındaki her iki bölge de, GH32'ye ait olan *Thermotoga maritima* tarafından üretilen invertaza benzemektedir. Bu enzimlerin aminoasit sekansları, esasen molekülün iç bölümlerine bağlı olarak %29 özdeştir. GH32 ailesinin iki farklı temsilcisinin yüksek homolojisi, gözlemlenen yapının bu ailenin diğer enzimleri için ortak bir şablon olduğu sonucunu doğurur (Holyavka vd. 2016; Nagem vd. 2004).

A. awamori ile üretilen inülinazın yapı modelinin Protein Veri Bankası'ndaki (Protein Data Bank) diğer proteinlerin modelleriyle karşılaştırılması, inülinaz ile GH68 ailesinden olan ve *B. subtilis*'ten elde edilen gelen levansükrazın N-terminal β -aksiyal

bölgesi arasındaki önemli yapısal benzerliği (aminoasit diziliminde sadece %13 oranında benzerlik olmasına rağmen) ortaya koymaktadır (Nagem vd. 2004). *A. awamori*'den elde edilen ekzo-inülinaz, beş *N*-bağlı oligosakkarit kalıntısı içeren bir glikoproteindir. Nagem vd. (2004) tarafından farklı derecelerde glikozilasyona sahip iki kristal yapı elde edilmiştir. 1.87 Å'luk bir çözünürlükte fruktoz ile bağlanan inülinazın X-ışını kırınım analizi, katalitik açıdan önemli iki aminoasit kalıntısını ortaya çıkarmıştır: L-Aspartik asit 41 (nükleofil) ve L-Glutamik asit 241 (proton verici). Çalışma, L-Aspartik asit 189'un (Arjinin-Aspartik asit-Prolin (RDP) lokusunun bir parçası) substratı tanımaya katılan hidrojen bağlarını oluşturduğunu göstermiştir (Nagem vd. 2004; Tsujimoto vd. 2003).



Şekil 2.3. Ekzo-inülinazın sekonder yapı elementlerinin şerit gösterimi. *N*-Terminal bölgesi, beş tabakalı (blade) β -aksiyal kıvrıma aittir. Her bir tabaka farklı bir renkte gösterilmiştir (tabaka 1 sarı, tabaka 2 deniz mavisi, tabaka 3 kırmızı, tabaka 4 yeşil ve tabaka 5 turuncu). Kayrak renkli ikinci bölge, bir β -sandviç kıvrımında düzenlenmiş 12 β -iplikçiğinden oluşur. İki bölgeyi birleştiren kısa polipeptid zincir, pembe renkte gösterilmiştir. Ortorombik kristalde bulunan beş *N*-bağlı oligosakkarit, çubuk olarak gösterilmiştir (Nagem vd. 2004)

Inülinazın *C*-terminal bölgesi, bir sıçandan elde edilen kalsiyuma-bağlı lektin p58'in içindeki karbonhidratları bağlama bölgesine benzerdir, ancak bunların aminoasit sekansları sadece %12 özdeştir. β -sandviç bölgesi, invertaz hariç fruktanı hidroliz eden fungal enzimler arasında yüksek ölçüde korunur. Bu bölge, bazı polimerleri bağlamada önemli bir rol oynayabilir (Moriyama vd. 2003; Yuan vd. 2006).

Birçok çalışma, glikozidazların aktif bölgesinin karşısındaki yüzeyin aspartik gruplar (Aspartik asit kutuları) içerdiğini göstermiştir. Aspartik asit kutuları, 5 tabakalı (GH32), 6 tabakalı (GH33 ve GH58), 7 tabakalı (GH74) ve 10 tabakalı (Vsp10-D) β -aksiyalleri için, sülfat oksidazların β -sandviç yapıları için, bazılarında yapısal olarak benzeyen enzimler için (GH20) ve bakteriyel ribonükleazlar için ortaktır. Triptofan tekrarlarının (PQQ) daha önce Aspartik asit kutuları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. β -Aksiyallerdeki Aspartik asit kutularının tekrarları, tabakalar arasındaki etkileşimde yapısal bir işlev görür (Chaudhuri vd. 2008; Quistgaard ve Thirup 2009). Bununla

birlikte, β -aksiyal Aspartik asit kutularının bazı tabakalarının, yapısal oluşum ve stabilizasyon için çok az önemli olduğu ve karbonhidratlara bağlanmada sadece sinyalleme, ek veya alternatif fonksiyonlara sahip olduğu varsayılmaktadır. Çoğu korunmuş kalıntı (WMN(D/E)PN sekansındaki iki korunmuş kalıntı: D ve W), esas olarak karbonhidrat bağlanma bölgelerinde bulunur (Boraston vd. 2004; Copley vd. 2001; García-Hernández vd. 2000).

Fruktanı modifiye eden enzimlerin çoğu, GH32 ailesinde birlikte gruplandırılmıştır. Bu proteinler, sekiz korunmuş dizi bölgesinden daha azını paylaşmaz (A bölgesinden G bölgesine) (Çizelge 2.5); bunların üçü doğrudan katalitik reaksiyona katılır. A bölgesi (sukrozu bağlayan), polifruktanlar ve sukrozun hidrolizinde önemli bir rol oynar. G bölgesinin 5 tabakalı β -aksiyal ile β -sandviç arasındaki bir yarıktaki yer aldığı gösterilmiş olup aktif alandan uzakta olsa da katalizde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. G bölgesinde korunan L-Serin 469'un yapısal ve biyokimyasal olarak benzer L-Treonin 469 ile yer değiştirmesi, sukroz, inülin ve levan üzerinde inülinazın hidrolitik aktivitesinde bir azalmaya neden olmuştur. L-Serin 469, hidrofobik L-Valin 469 ile değiştirildiğinde, enzimlerin aktivitesi tamamen kaybolmuştur (Goosen 2007; Ritsema vd. 2005).

Çizelge 2.5. *Aspergillus niger* CBS513.88 genomunda tanımlanan GH32 familyası enzimlerinin korunmuş motifleri (Goosen 2007)

Enzim	Bölge							
	A	B	B1	C	D	E	F	G
SucA (Ekstraselüler Sase)	QIGDPCL	FHVGF	-	FDGSVI	RDP	NFETGNV	FLDWGFSSYA	VLEIY
SucB (Intraselüler Sase)	WMNDPCG	YHLSFQ	WGHAVS	FTGCFR	RDP	NWEVVNW	VFDHGC_GYA	VLEVF
SucC (Intraselüler Sase)	WINDPCA	YHLFYQ	WGHATS	FTGCFL	RDP	NWECANF	YLDHG_SLYA	IVEIY
AngInuE (Ekstraselüler Ekzo-lase)	WMNDPNG	YHLFFQ	WGHATS	FSGSAV	RDP	VWECPL	WMDWGPDFYA	SVEVF
InuA (Ekstraselüler Endo-lase)	WMNEPNG	WHLFFQ	WGHATS	FTGTAY	RDP	GWVPDM	WLNNGRDFDG	SVEVF

Katalitik kalıntılar **kalin** harfle gösterilmiştir
Tamamen korunan kalıntıların altı çizilmiştir

A. awamori inülinazının aktif bölgesinin, aspartik asidin karboksil grubu ve histidinin imidazolik grubundan oluştuğu gösterilmiştir. İnülinazdaki karboksil grubu, bir hidrojen bağı tarafından histidinin imidazolik grubu ile ilişkilendirilir. Bu nedenle, karboksil-imidazol etkileşiminin elektrofilik-nükleofilik sistemi, inülin hidrolizinde önemli bir rol oynar. *A. niger* ve *Penicillium* türlerinden elde edilen ekzo-inülinazların aktif bölgesinin, aspartik ve glutamik asidin karboksil gruplarını ihtiva etmesi beklenir. Değerlerin ölçülmesi, iyonizasyonun ısısı, n-klorür-civa-benzoat ile inhibisyon ve metilen mavisi varlığında foto-oksidasyon, *B. polymyxa*'dan elde edilen enzimin aktif bölgesinin imidazolik ve sülfhidril grupları içerdiği sonucuna varılmasını sağlar (Akimoto vd. 1999; Ohta vd. 1998; Zhrebtsov vd. 2003).

Saccharomyces sp. W0 ile elde edilen inülinazın aminoasit dizisi benzerliği (*Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3'ten ifade edilen), *C. kutaonensis* sp. nov. KRF1T ile elde edilen inülinaza %88 oranında benzerlik gösterirken *K. marxianus* ve *C. aureus* ile elde edilen inülinazlarda %78 oranında benzerliğin olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, *P. guilliermondii* suş1'den elde

edilen inülinazın aminoasit dizisi benzerliği de *K. marxianus*'unki ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Zhang vd. 2015a; Zhang vd. 2009).

2.4. Endo-Inülinazın Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

Penicillium türlerinden elde edilen endo-inülinaz, *N*-bromesuksinimid ile modifikasyondan sonra tamamen inaktif hale getirilir, bu da, aktif bölgede en az bir triptofan kalıntısının mevcut olduğunu gösterir. WMN(D/E)PN sekansındaki iki kalıntı (Trp17 ve Met18), *A. ficuum* endo-inülinazı dâhil olmak üzere bazı ökaryotik fruktozid hidrolazlar için korunmuştur. Trp17'nin endo-inülinazın katalitik özelliklerinde oynadığı rol hala net değildir. İnülin zincirinin bir parçası olarak fruktoz halkasının altıncı karbonundaki hidroksil grubu ile hidrojen bağları arasında etkileşim olabilir ve böylece substratın aktif bölgeye doğru yönlendirilmesini sağlar (Park vd. 2003).

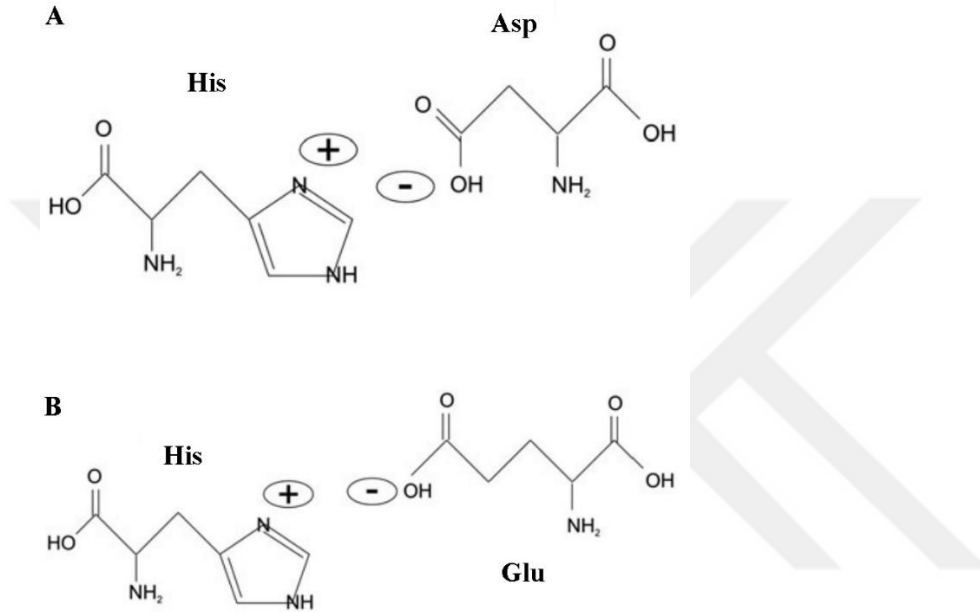
Aktif bölgelerinin yapısı nedeniyle ekzo-inülinaz ve endo-inülinaz aktivitelerinde farklılık görülür. *A. niger* endo-inülinazı ve *B. stearrowthermophilus* ekzo-inülinazı üzerine yapılan bir çalışmada, enzimin aktif bölgesinin diğer birçok kalıntı ile kompleks bir etkileşim ağı oluşturan enzim yüzeyinde bulunan belirli aminoasitler vardır ve enzimin kemoselektivitesine katkı sağlayan konformasyonunun muhafaza edilmesinde önemli bir rol oynar (Basso vd. 2010). *Penicillium* sp. TN-88 ekzo-inülinazı, endo-inülinaza kıyasla substratına daha fazla H-bağı ile bağlandığından, daha yüksek bağlanma etkinliği ile etkileşime girer ve endo-inülinazlara kıyasla substratına daha fazla stabilite gösterir. Ekzo-inülinazda gözlenen önemli şeylerden biri, Aspartik asit22, Aspartik asit128, Aspartik asit179 ve Serin84'ten oluşan ve 'Aspartik asit' aminoasidi açısından zengin bir huni büyüklüğünde aktif bölge oluşturmaktadır (Singh ve Shukla 2012).

A. niger endo-inülinazı ve *B. stearrowthermophilus* ekzo-inülinazının yapıları arasındaki temel farklılıklar enzimlerin katalitik bölgesinde bulunmuştur. İki ekzo-inülinaz, nükleofilik saldırıdan sorumlu olduğu düşünülen bir Aspartik asit kalıntısı (*B. stearrowthermophilus* enziminde Aspartik asit24, *A. awamori*'de Aspartik asit24) sunarak ortak yapısal özellikleri paylaşır (Şekil 2.4A) (Nagem vd. 2004). Endo-inülinazın aktif bölgesinde, Aspartik asit bir Glutamik asit43 kalıntısı ile değiştirilir (Şekil 2.4B). Doğal substratların büyük boyutu nedeniyle, endo-inülinazın katalitik bölgesi oldukça geniştir ve 516 kalıntının 90'ı aktif bölgeyi oluşturur. Buna karşılık, polimerin terminal kalıntısı üzerinde etkili olan ekzo-inülinazın aktif bölgesi daha küçüktür ve 493 kalıntının 42'si aktif bölgeyi oluşturur (Basso vd. 2010).

Endo-inülinaz ve ekzo-inülinaz yapıları arasında ilginç bir ortak özellik, RDP motifinin varlığıdır; bu, aynı zamanda, fruktozil-transferazlar veya invertazlar gibi diğer enzim sınıflarında da korunan bir sekanstır. Bu motifin varlığı, piranozidik halkanın tanınması için önemli olduğu ve fruktopiranozidik kalıntılara karşı enzim spesifikliğinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Basso vd. 2010; Nagem vd. 2004).

Katalitik iki glutamik asidin (Glu43 ve Glu233) pozisyonunda bulunan (Park vd. 2003) ve/veya substrat cebine ait olan birkaç kalıntı (Pouyez vd. 2012), reaksiyonun geç safhası sırasında esas olarak inülotrioz (DP3) oluşturmak için inülinin ayrılmasına yol açan endo-inülinazın katalitik mekanizmasında rol oynayabilir (Uhm vd. 1999; Uhm vd.

1998). Bu kalıntılar aşağıdaki gibidir: WMN(D/E)PN korunmuş motifte Methiyonin41 ve Asparajin42; döngü-1'den Prolin62, Triptofan67 ve İzolösin70; döngü-3'ün sonunda Asparajin265; döngü-4'ün başlangıcında Arjinin295 ve Aspartik asit298 ve korunmuş motif RDP'den Arjinin175. Substrat boşluğunda bulunan Glutamin59 ve Fenilalanin99 kalıntıları da seçilmiştir. Bu 11 kalıntı, cebin büyüklüğünü potansiyel olarak arttırmak için Glisin veya Alanin'e doğrudan mutagenez ile *A. ficuum* yabani-tip enzimde ikame edilmiştir. Son olarak, bu, yüksek oranda aktivite kaybına yol açsa da, korunan WMN(D/E)PN motifindeki katalitik Glutamik asit43, daha küçük bir kalıntı olan Aspartik asit ile değiştirilmiştir (Park vd. 2003).



Şekil 2.4. Ekzo-inülinazın (A) ve Endo-inülinazın (B) katalitik bölgesi (Holyavka vd. 2016)

A. ficuum inülinazının katalitik ortamı, diğer inülinazlarınkinden farklıdır. Nükleofil kalıntısı, diğer enzimlerde aspartat olduğu halde, endo-inülinazda glutamattır (Pouyez vd. 2012). Endo-inülinazda katalitik olarak aktif kalıntılara yakın olan Threonin100, diğer proteinlerdeki bir serin ile değiştirilir. Ekzo-inülinazda bulunan bir glutamat, katalitik bölgenin girişindeki noktaları göstermektedir. Endo-inülinaz da ise bu görevi glisin (Glisin196) üstlenir. 298 pozisyonunda, diğer GH32 enzimleri arasında korunan ve asit/baz katalizörünün yan zincirinin pKa'sını modüle etmek için önerilen Tirozin kalıntısı, *A. ficuum* inülinazında mevcut değildir ve Aspartik asit kalıntısı ile değiştirilir. Ek olarak, bir sistein kalıntısı (asit/baz katalitik Glutamik asit'ten sonra gelen kalıntı), bir valin (Valin234) ile ikame edilen endo-inülinaz dışındaki tüm enzimlerde bulunur. Sisteinin geçiş durumu stabilizasyonu ve/veya katalitik kalıntı ortamı için önemli olduğu önerilmiştir (Alberto vd. 2004; Pouyez vd. 2012).

2.5. Ekzo ve Endo-İnülinazın Kataliz Mekanizması

İnülinazın (EC 3.2.1.7), inülinin hidroliz eden GH32 ailesinin bir üyesi olduğu doğrulanmıştır. GH32'nin aktif bölgesi β -pervane modülünde bulunur ve inulinazın 12

β -iplikçiği bir β -sandviç katında düzenlenir (Şekil 2.3). İnulinaz, en az altı tane yüksek oranda korunmuş motifin varlığı ile karakterize edilir. Endo-inulinazda, korunmuş 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 motiflerinin amino asit dizileri sırasıyla WMNEPNGL, RDP, EVP, SVEVF, FT ve Q'dur (Şekil 2.5). Ekzo-inulinazda ise, korunmuş 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 motiflerinin amino asit dizileri sırasıyla WMNDPNGL, RDP, ECP, SVEVF, FS ve Q'dur (Liu vd. 2013) (Şekil 2.6). Örneğin, *Geobacillus stearothermophilus*'un inuA gen ürünü, 21-WMNDANGLVY-30, 149-DFRDPKVFHW-158 ve 202-WECP-205 olmak üzere üç korunmuş bölge içerir (Tsujimoto vd. 2003).

<i>T.stipitatus</i>		0
<i>P.purporogenum</i>		0
<i>A.niger</i>		0
<i>Arthrobacter sp.</i>	MTTATRKKVFMETLRQTQNTNLFGLGRRTFLQGAASVAIVATGALFRPAAATGDFVLRLTYDQNGSITVLDEVERSNFTVHVSNNFAERFVGVRGN	100
<i>A.ficum</i>		0
Consensus		0
<i>T.stipitatus</i>		0
<i>P.purporogenum</i>		0
<i>A.niger</i>		0
<i>Arthrobacter sp.</i>	AFRIDGFSIWAIGFAITPITQMTIQTWIALESYPSDEQFYDALITSSIIYQRTNDAGFDIAINTYGEWFTAHVGGQWRTVKAFWLFYLVWVQIAAV	200
<i>A.ficum</i>		0
Consensus		0
<i>T.stipitatus</i>		21
<i>P.purporogenum</i>		21
<i>A.niger</i>		21
<i>Arthrobacter sp.</i>	VDGDAGQLRLHLDCAAGPKVASVAIFTSRFTQAAGAPLVVGRASKDVTTGVFLINALNAAAYCDTRIYDIARGAAALIGEYTSGLIAGASFAHDVALCVTG	300
<i>A.ficum</i>		21
Consensus		21
<i>T.stipitatus</i>	FAVADDL YRHAEHCACAEW NEERGLIKIDSTWHPFQADFTANVWNGNECNGHATSSDLHMHCHIFAMIFVENG.....IESFIGTSYTGNTSSGLG.	114
<i>P.purporogenum</i>	LAVADDL YRHAEHCACAEW NEERGLIKIDSTWHPFQADFTANVWNGNECNGHATSSDLHMHCHIFAMIFVENG.....IESFIGTSYTGNTSSGLG.	114
<i>A.niger</i>	CAQSSDL YRHSYHETEDQYW NEERGLIKIGSTWHPFQADFTANVWNGNECNGHATSSDLHMHCHIFAMIFVENG.....VEAFITGAYYDPNNAAGLG.	114
<i>Arthrobacter sp.</i>	LRFADILIRHFRHAFAMFANW NEERGLVHHCSTWHPFQADFTANVWNGNECNGHATSSDLHMHCHIFAMIFVENG.....VEAFITGAYYDPNNAAGLG.	400
<i>A.ficum</i>	CAQSSDL YRHSYHETEDQYW NEERGLIKIGSTWHPFQADFTANVWNGNECNGHATSSDLHMHCHIFAMIFVENG.....VEAFITGAYYDPNNAAGLG.	114
Consensus		114
<i>T.stipitatus</i>	..TSNPPYLAFTSYTSLNETQQLRAYSTDLGTTWFRFNGFIISAFQAPHDITGGREDRKVFVHVSGRWVVLHAGGGQ..RITFWISLAK.	209
<i>P.purporogenum</i>	..TSNPPYLAFTSYTSLNETQQLRAYSTDLGTTWFRFNGFIISAFQAPHDITGGREDRKVFVHVSGRWVVLHAGGGQ..RITFWISLAK.	209
<i>A.niger</i>	..DSANPPYLAFTSYTSSQICQLRFVSVNGATWIKFCQNGFIISTQAPHDITGGREDRKVFVHVSGRWVVLHAGGGQ..RITFWISLAK.	209
<i>Arthrobacter sp.</i>	DVVSVDTGTAHFTFTWN.FGGFHPCTIRASSTQPDILITKASTGVIDKNAFAHVA...DERDE..YLWCEGCHWRTIIGARTIAGGAPHEHYTQIIGG	494
<i>A.ficum</i>	..DSANPPYLAFTSYTSSQICQLRFVSVNGATWIKFCQNGFIISTQAPHDITGGREDRKVFVHVSGRWVVLHAGGGQ..RITFWISLAK.	209
Consensus		209
<i>T.stipitatus</i>	SWTVS..ELLSSQIEGFSNSISGWEHDI.....NVVIFHAQCSFPGGNGVVALTGSFICETVADPVLSSSTLMWLDYGRDFIGALSWMNVFA	296
<i>P.purporogenum</i>	SWTVS..ELLSSQIEGFSNSISGWEHDI.....NVVIFHAQCSFPGGNGVVALTGSFICETVADPVLSSSTLMWLDYGRDFIGALSWMNVFA	308
<i>A.niger</i>	NWTWQS..DLKSTISNGLSSDITGWEHDI.....NVVIFHAQCSFPGGNGVVALTGSFICETVADPVLSSSTLMWLDYGRDFIGALSWMNVFA	308
<i>Arthrobacter sp.</i>	QWTRASRPFTSVSEASMDIGSANEVFEKIGTHAGREK..NVVVSFHGRVSKLSFPTSRVYNTG..TWNGSQFTFDYARFKSLDLTHGHISFTVHAG	592
<i>A.ficum</i>	NWTWQS..DLKSTISNGLSSDITGWEHDI.....NVVIFHAQCSFPGGNGVVALTGSFICETVADPVLSSSTLMWLDYGRDFIGALSWMNVFA	308
Consensus		308
<i>T.stipitatus</i>	SDGRRIIAAVMNSYGSNPFITINWGMLESFPTITLERRIGSKFQICQFVABISIDSTETISIQNQITIAFNQTILSSIRGTSLDVRIVFRISLGAATLSLAV	396
<i>P.purporogenum</i>	SDGRRIIAAVMNSYGSNPFITINWGMLESFPTITLERRIGSKFQICQFVABISIDSTETISIQNQITIAFNQTILSSIRGTSLDVRIVFRISLGAATLSLAV	408
<i>A.niger</i>	SDGRRIIAAVMNSYGSNPFITINWGMLESFPTITLERRIGSKFQICQFVABISIDSTETISIQNQITIAFNQTILSSIRGTSLDVRIVFRISLGAATLSLAV	408
<i>Arthrobacter sp.</i>	PDGRRIIAAVMNSYGSNPFITINWGMLESFPTITLERRIGSKFQICQFVABISIDSTETISIQNQITIAFNQTILSSIRGTSLDVRIVFRISLGAATLSLAV	692
<i>A.ficum</i>	SDGRRIIAAVMNSYGSNPFITINWGMLESFPTITLERRIGSKFQICQFVABISIDSTETISIQNQITIAFNQTILSSIRGTSLDVRIVFRISLGAATLSLAV	408
Consensus		408
<i>T.stipitatus</i>	RKGSSEQTIVIRISQLNSTLSVDFTAGGDISYDPAKGVHSPQACQENIELVHIWVVDTCVSVVFGGQGVAVISDLIEFEN.....SSGLSLEVEVGG	489
<i>P.purporogenum</i>	RKGSSEQTIVIRISQLNSTLSVDFTAGGDISYDPAKGVHSPQACQENIELVHIWVVDTCVSVVFGGQGVAVISDLIEFEN.....SSGLSLEVEVGG	501
<i>A.niger</i>	RKGSSEQTIVIRISQLNSTLSVDFTAGGDISYDPAKGVHSPQACQENIELVHIWVVDTCVSVVFGGQGVAVISDLIEFEN.....SSGLSLEVEVGG	501
<i>Arthrobacter sp.</i>	GASPDGSEITRIYYDNDIVDTRSRNFENEAVILRGAYDEAVFGKPHFTFVGVDSVIVFHN..TRPASNRIPTSRGADGAAPASGLIRLYSEGG	791
<i>A.ficum</i>	RKGSSEQTIVIRISQLNSTLSVDFTAGGDISYDPAKGVHSPQACQENIELVHIWVVDTCVSVVFGGQGVAVISDLIEFEN.....SSGLSLEVEVGG	501
Consensus		501
<i>T.stipitatus</i>	TAIFQSVTSSVSIE.....	503
<i>P.purporogenum</i>	TATLQSVNFVSIE.....	515
<i>A.niger</i>	NAVLSQSVDFVSIE.....	516
<i>Arthrobacter sp.</i>	QTRFTQITWQCSAWETFA	811
<i>A.ficum</i>	NAVLSQSVDFVSIE.....	516
Consensus		516

Şekil 2.5. Farklı mikroorganizmalardan üretilen endo-inülinazın ortaya çıkarılan amino asit sekansı (Liu vd. 2013)

Ekzo-inulinazın birinci motifi olan Asp(D)'nin bir nükleofil gibi davrandığı ve ikinci motifi olan Asp(D)'nin de bir geçiş durumu stabilizatörü olduğuna inanıldığı ve ECP motifindeki Glu(E) kalıntısı, katalitik mekanizmada önemli bir rol oynayarak bir asit/baz katalizörü gibi davrandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, endo-inulinazın birinci motifi Glu(E)'de bir nükleofil gibi hareket eder.

<i>C. aureus</i>	MFRSLLLVSAAGLAALVQLSQAQSTTSNLFYFSG..ELFRVLSLHACRSTIIE..KFNGLFVD..KNGIHLHY..CE..DCAVAGN..QH	87
<i>A. fumigatus</i>	MKLSALVQELVLMGMSASAAARFSPFSAYTE.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHVM..DAKEGVVHLY..QNGGGITIGA..MS	77
<i>A. awamori</i>	MAPLSKALSVFMLMGITAYFNYDQ.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHLMHN..GTWHIF..QNGGGIENGN..IS	69
<i>A. niger</i>	MARLLKAVTVCALAGIAHAFNYDQ.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHLMHN..GTWHIF..QNGGGIENGN..IS	69
<i>G. stearothermophilus</i>	MK..THNSE.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGISINKEP..MH	52
<i>C. intybus</i>	MCSERRVKEILGIVLWLSCLVWVQNGVGVHSSSPTEESQ.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGIENGN..IS	84
<i>P. guilliermondii</i>	MRAFLALIFLT.....FVMNVES.....SFLMADTSHG.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGIENGN..IS	65
<i>K. marxianus</i>	MKFAYSLLPLAGVSASVINYKRDGSKAINTITFSLN..ESV..TSHG.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGIENGN..IS	84
<i>P. polymyxa</i>	MN..VIRQE.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGIENGN..IS	52
<i>P. mucidolens</i>	MKVYVQE.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHVMFK..GVHIF..QNGGGIENGN..IS	53
<i>A. ficuum</i>	MARLLKAVTVCALAGIAHAFNYDQ.....EYRQFPPSEKRN.....KFNGLHLMHN..GTWHIF..QNGGGIENGN..IS	69
Consensus	r f p w n g h l q p g	
<i>C. aureus</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	170
<i>A. fumigatus</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	177
<i>A. awamori</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	169
<i>A. niger</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	169
<i>G. stearothermophilus</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	139
<i>C. intybus</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	164
<i>P. guilliermondii</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	151
<i>K. marxianus</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	170
<i>P. polymyxa</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	139
<i>P. mucidolens</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	140
<i>A. ficuum</i>	WGHTESETHCEQFVALLARGYGSVTEMYSSSAVAIVNNITSGFFGKDGKTELVMYTSYVFVAQLTFSGGTVQEDQCSGSIAYSLDGLTWTITDAA	169
Consensus	wgh s d w	
<i>C. aureus</i>	FVLGVGNSRDEKVVVWY.....EDHVMVIVYSTE..FTIGIF..ENDIKT..EHASNTDM..GLLSLQ..E..NI..QVFWENGATG...	249
<i>A. fumigatus</i>	NEVIAEFPTPYEDQYTERDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	265
<i>A. awamori</i>	NEVIAEFPTPYEDQYTERDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	257
<i>A. niger</i>	NEVIAEFPTPYEDQYTERDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	257
<i>G. stearothermophilus</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	219
<i>C. intybus</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	251
<i>P. guilliermondii</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	227
<i>K. marxianus</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	259
<i>P. polymyxa</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	220
<i>P. mucidolens</i>	FVLKHPTRKVDKDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	221
<i>A. ficuum</i>	NEVIAEFPTPYEDQYTERDEKVVVWYDETH.....QVAVISLAKL..HKLLIV..RDLK..CLASEFGP..ANAVGGVCE..SIFPLSLD..GSKKTR...	257
Consensus	f r d p w s w	
<i>C. aureus</i>	..DLAWIMLISINFGAGIG..ESISVWFFTEF..GYITFCDDGAARIS.....	292
<i>A. fumigatus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	358
<i>A. awamori</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	299
<i>A. niger</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	299
<i>G. stearothermophilus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	260
<i>C. intybus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	295
<i>P. guilliermondii</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	270
<i>K. marxianus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	304
<i>P. polymyxa</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	261
<i>P. mucidolens</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	262
<i>A. ficuum</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	299
Consensus	s y g f	
<i>C. aureus</i>	QLLNTFLNGDATIGTILTSFFFIISHRYINFLVGGGSLNLETAIRLKVNGQTVHTSTGNSGLAWQSDVLSALQKTIATVIEIINSTGGGWHINVDQISF	292
<i>A. fumigatus</i>	NST.....	458
<i>A. awamori</i>	NST.....	302
<i>A. niger</i>	NST.....	302
<i>G. stearothermophilus</i>	NST.....	260
<i>C. intybus</i>	NST.....	295
<i>P. guilliermondii</i>	NST.....	270
<i>K. marxianus</i>	NST.....	304
<i>P. polymyxa</i>	NST.....	261
<i>P. mucidolens</i>	NST.....	262
<i>A. ficuum</i>	NST.....	302
Consensus	NST.....	
<i>C. aureus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	370
<i>A. fumigatus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	546
<i>A. awamori</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	381
<i>A. niger</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	381
<i>G. stearothermophilus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	339
<i>C. intybus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	352
<i>P. guilliermondii</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	381
<i>K. marxianus</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	387
<i>P. polymyxa</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	340
<i>P. mucidolens</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	341
<i>A. ficuum</i>	FVLMMLNPGGFFGTGSGTCTVVEFEN..GTTTTPDANSYDGGGPFDSVIFEDFEGDKTLAAGGMTATGDLTSSASPAKGTLPQGNFVTGYLQG	381
Consensus	d ya w r l	
<i>C. aureus</i>	..QFSYDQDFGNNSVTIDYSNVTISGAMYSANITLPEGG..VLDTAT.....STLNTLTFSSAG..DLRAGVIFGGSNAGVGNIDRYTLG..YGEDD	455
<i>A. fumigatus</i>	GGTFS...FPRVEGVRLGRIGKTLLELITFSRRQSPA...AGR.....AEFGVAVAAATKDYSHETRVGVNF...ATCQVFDRTSGD...T	622
<i>A. awamori</i>	RPIYSRTYTFSEGSTNASTTGETFRVDFSATSKAS...T.....FAIALRASANFTECTLAGYDF...AKQCIFLDRTKSGD...V	456
<i>A. niger</i>	HPLYSRTYTFSEGSTNASTTGETFRVDFSATSKAS...T.....FAIALRASANFTECTLAGYDF...AKQCIFLDRTKSGD...V	456
<i>G. stearothermophilus</i>	QIVIH...DEIISGGIKKIDINQFSVETVLNVLNGLA...R.....QFGLVLHHTENGSTITITL...LTNLLSLDRTKSGD...V	410
<i>C. intybus</i>	AGELLKIPSITASQADVEVSFLTNLEIELIDSEVVDQLLCAQRNVISIGKFGFPGMLILASKNLTECTAVFERVFRGKNKFLVLMSCDSR...SS	478
<i>P. guilliermondii</i>	KISKRNITQDEQAVKHKNSITGTFSDFITFSVDS...KNQT.....GQLQVIS..GQN..GESIRAGFDP...TAGQFFVDRGNTSG...LKEN	429
<i>K. marxianus</i>	TYSIITNYTISENGRKKIKLD..NPGSGLEFHLXYVNGSPDIKSNV...ADLSLYFGKNNDDNEYLRLGVEY...NGGAFFLDRGHTKIFPVEN	475
<i>P. polymyxa</i>	VLSLT...EFSWEVNRNALSALQLDCYELVAEFAITG...DFGFKVRVSDECTVLGVYTS...ATCEVYVDRKRSGR...S	409
<i>P. mucidolens</i>	KLEWK...DLEVITNGVLSNISGDIFETIAEFELNTA...L.....EFGFKVRKSADCTVLGVYDA...EQMLFIDRTKSGV...S	412
<i>A. ficuum</i>	HPLYSRTYTFSEGSTNASTTGETFRVDFSATSKAS...T.....FAIALRASANFTECTLAGYDF...AKQCIFLDRTKSGD...V	456
Consensus	FAIALRASANFTECTLAGYDF...AKQCIFLDRTKSGD...V	
<i>C. aureus</i>	FETDRFVAGVALAKRIE.....GVIRFIFEMFIDDAFSGSVFF...CEFLNNITVQTGGMEGSRITAVWELDSAWQ....	531
<i>A. fumigatus</i>	SEDTFASVYHGPLFVDSG..TVSLRVLVNWSVGVFGNCEATISCFIFA..SDAVYGRFSTIDGETRCLVLRKEVRSWQ.....	703
<i>A. awamori</i>	SEDTFASVYHGPLFVDSG..TVSLRVLVNWSVGVFGNCEATISCFIFA..SDAVYGRFSTIDGETRCLVLRKEVRSWQ.....	537
<i>A. niger</i>	SEDTFASVYHGPLFVDSG..TVSLRVLVNWSVGVFGNCEATISCFIFA..SDAVYGRFSTIDGETRCLVLRKEVRSWQ.....	537
<i>G. stearothermophilus</i>	SESENINQ..VMKHIDTT...KLNLRIIVSSGVIFVNEGAHALSLITYED..KACEKISIFSLGGDIQLSNYSIFSPNIRNFY...S	493
<i>C. intybus</i>	IAQEVCKSTYGAFLDLPLERHIFPLRSILHSISFSGEGEACISRVYKLAINEQAEALYVFNNGTQVSTMTSLNANMKRAQTVIG..	518
<i>P. guilliermondii</i>	FETDRFVAGVALAKRIE.....GVIRFIFEMFIDDAFSGSVFF...CEFLNNITVQTGGMEGSRITAVWELDSAWQ....	564
<i>K. marxianus</i>	LEFTHCLAIVNFVSNYTTN...VFDVYGVINIDILYFENGVVSNITFFS..TNVIGEIDIKSPYDKATYNSFNVTQNV.....	555
<i>P. polymyxa</i>	DHEDFAGRHGASLTILFD..RMDIRIVVDSGVIFVNEGAHALSLITYED..KACEKISIFSLGGDIQLSNYSIFSPNIRNFY...S	485
<i>P. mucidolens</i>	DECEHFPCKHGVAMIPNQ..RIQMHIIVDSGVIFVNEGAHALSLITYED..KACEKISIFSLGGDIQLSNYSIFSPNIRNFY...S	500
<i>A. ficuum</i>	SEDTFASVYHGPLFVDSG..TVSLRVLVNWSVGVFGNCEATISCFIFA..SDAVYGRFSTIDGETRCLVLRKEVRSWQ.....	537
Consensus	d e g t	

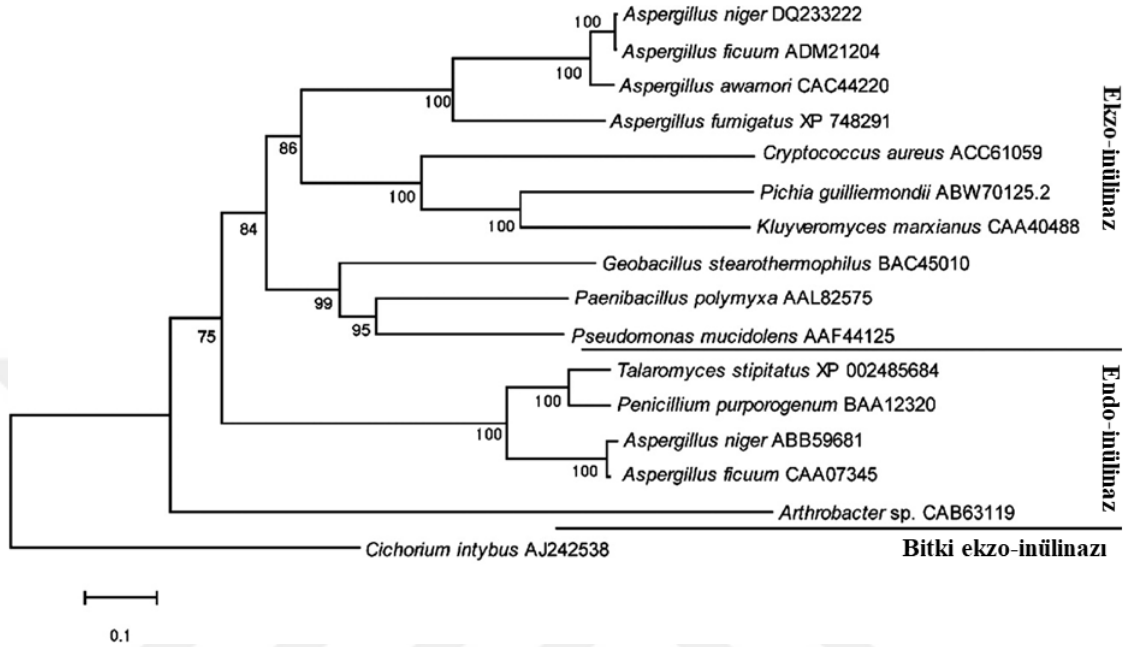
Şekil 2.6. Farklı mikroorganizmalardan üretilen exo-inülinazın ortaya çıkarılan amino asit sekansı (Liu vd. 2013)

SVEVF motifi, inüline ve levana saldıran ekzoinülinaz ve endoinülinazlar arasında korunur. Buna karşılık, Şekil 2.6'daki sonuçlar, korunmuş motif SVEVF'nin maya ekzoinülinazında görünmediğini göstermektedir (Liu vd. 2013). Sekansın, fruktanların bağlanması önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Ohta vd. 1998). Örneğin, RDP motifindeki *Arthrobacter*. sp S37 endo-inulinazının (EnIA) korunmuş Asp460'ı, katalitik bir kalıntı olarak kullanılır ve bu pozisyonda bir karboksilat grubunun varlığı kataliz için bir ön şarttır. İki iyonize edilebilir kalıntı olan EnIA'nın birinci motifindeki Glu323(E) ve üçüncü motifindeki Glu519(E) sırasıyla bir nükleofil ve bir asit/baz katalizöründen sorumluyken (Kim vd. 2008) katalitik açıdan önemli iki kalıntı olan *A. awamori*'den elde edilen ekzo-inulinazın birinci motifindeki Asp41(D) ve ikinci motifindeki Glu241(E) sırasıyla bir nükleofil ve bir katalitik asit/bazdan sorumludur (Nagem vd. 2004). EnIA'nın polar kalıntıları olan Arg459, Asp460, Asn322 ve Gln339, substrat tanıma ve bağlama için önemliyken (Kim vd. 2008) *A. awamori*'den elde edilen ekzoinülinazdaki hidrojen bağlarını, Asn40 ve Gln57'yi sağlayan Arg188, Asp189 polar kalıntıları, substrat tanıma ve bağlama için önemlidir (Nagem vd. 2004). EnIA'nın lizin (Lys347) ve arginin (Arg606) kalıntıları, amin grupları tarafından substrat bağlanmasına katılırken (Kim vd. 2008) *A. awamori*'den elde edilen ekzo-inulinazda bulunan iki triptofan kalıntısı (Trp65 ve Trp335), amin grupları tarafından substrat bağlanmasına katılır (Nagem vd. 2004). Bununla birlikte, korunan iki sekans (FS(T) ve Q), β -pervane modülünün aktif bölgesinde yer almasına rağmen şimdiye kadar bu sekansların hangi fonksiyonları yerinde getirdiği hâlâ tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, korunmuş beş motifin detaylı fonksiyonlarının moleküler ve genetik seviyelerde daha fazla açıklanmasına da ihtiyaç duyulmaktadır (Liu vd. 2013).

2.6. Mikrobiyal İnulinazın Evrimsel Konumu

Mikrobiyal inülinazı evrimsel pozisyonunu değerlendirmek için, tam uzunluktaki amino asit sekanslarından filogenetikte atası belli olmayan bir filogenetik ağaç yapılmış (Şekil 2.7) ve dalların %75-100 aralığında elde edilen önyükleme güven seviyesi, oluşturulan ağacı doğrulamıştır. Şekil 2.7'de, farklı mikroorganizmalarda bulunan ekzo- ve endo-inulinazların birbirinden uzak pozisyonlarda ayrı ayrı kümелendiği açıkça görülmektedir. Filamentli fungal ekzo-inülinazı, bakteriyel ekzoinülinazı ve maya ekzoinülinazı sırasıyla kendi kümelerine bağlanır. Şekil 2.7'den maya ekzoinülinazının, fungal ve bakteriyel ekzoinülinazı kümeleri arasında orta pozisyonlarda yer aldığına dikkat edilmelidir. Aynı zamanda, fungal endo-inulinaz ve bakteriyel endo-inulinaz da sırasıyla kendi kümelerine bağlanır. Bu sonuçlar, fungal ve bakteriyel ekzo- ve endo-inulinazların, inülinin uç ve iç kısımda bulunan β -2,1-fruktofuranozidik bağlarına yönelik ilgili hidrolitik aktiviteleri bağımsız olarak geliştirdiğini göstermektedir (Liu vd. 2013). Filogenetik ağaca göre (Şekil 2.7), *A. niger* ekzo-inülinazı ve endo-inulinazı, *A. awamori*, *A. ficuum* ve *A. fumigatus* türleriyle yakından ilişkili olarak gösterilmiştir (Ohta vd. 1998; Uhm vd. 1998). Şekil 2.7'ye göre, evrim sırasında, maya hücrelerinin endo-inulinaz kodlayan geni kaybettiğini göstermektedir. Bu, endo-inulinazın ile inülininden üretilen inulooligosakkaritin, maya gelişimi için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılamaması ile ilgili olabilir. Şekil 2.6'daki sonuçlar ayrıca, evrim sırasında, maya hücrelerinin, yüksek moleküllü fruktanların bağlanmasından sorumlu SVEVF motifini kaybettiğini göstermektedir. Maya inulinazlarının, diğer herhangi bir inulinazdan daha yüksek aktiviteye sahip

olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, SVEVF motifi olmayan ekzo-inülinaz, inüline karşı daha yüksek aktiviteye sahip olabilir. Bununla birlikte, mayaların neden SVEVF motifini kaybettiği ve motifin inulin hidrolizi üzerindeki etkisinin ne olduğu tamamen bilinmemektedir. Bu nedenle, inulinazların kataliz mekanizmaları ve bunların evrimi üzerine pek çok çalışma yapılması beklenmektedir (Liu vd. 2013).



Şekil 2.7. Mikrobiyal inulinazlar arasında filogenetik ağaç ilişkisi. Yakın bağlantılı filogenetik ağaç, ortaya çıkarılan amino asit dizilerine dayanarak çizilmiştir. İç düğümlerdeki sayılar, 1000 kopyalamaya dayanan önyükleme güven değerlerini (%) temsil eder. Ölçek çubuğu, bölge başına 0.1 amino asit ikamesine karşılık gelir. Parantez içindeki sayılar referans dizilerine yönelik erişim sayılarıdır (Liu vd. 2013)

2.7. İnülinaz Enziminin Uygulama Alanları

İnülinaz enzimi, gıdadan ilaç endüstrisine kadar birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aşağıda inülinaz enziminin çeşitli uygulamaları ile ilgili kısaca bilgiler verilmiştir.

2.7.1. Yüksek fruktozlu şurup üretimi

Araştırmaların odak noktası, çeşitli substratlar üzerinde enzimatik yaklaşımlar kullanılarak sentetikten doğal tatlandırıcılara kaymıştır. Fruktoz, sukrozdan 1.2-1.8 kat daha tatlıdır. Yağısızdır ve karyojenik ve aterosklerotik değildir, diyabetik kişiler tarafından tolere edilir ve çocuklarda demir emilimini artırır (Singh 2011). Fruktozun sukroz üzerindeki teknik üstünlükleri, dünya çapında fruktoz talebini artırmıştır. Geleneksel olarak, yüksek fruktoz şurubu, enzimatik bir işlemle nişastadan üretilir. Proses, α -amilaz, glukoamilaz ve glukoz izomeraz olmak üzere üç enzimin kullanılmasını ve sadece %45'e kadar fruktoz verimini içerir. Bu multi-enzimatik geleneksel yöntem, düşük ürün verimi sağlayan pahalı ve karmaşık bir prosedürdür. İnülininden fruktoz elde etmek için basit ve oldukça verimli bir proses kullanılabilir. Tek

adımlı reaksiyonda inulinaz kullanılarak inülinin fruktoza dönüşmesi ile %95'e kadar fruktoz verimi elde edilir. Literatürde, kesikli ve sürekli sistemlerde immobilize veya serbest inulinaz ile inülin ve inülin açısından zengin bitki materyallerinden fruktozun üretimi üzerine çok sayıda rapor mevcuttur (Ricca vd. 2007; Singh 2011). Çözünür inulinaz, yerelması yumrularından fruktoz üretimi için kullanılmış ve şekerlerin yaklaşık %90'ı olmak üzere %77 fruktoz ve %23 glukoz verimi veren hidroliz ile yumrularından ekstrakte edilmiştir (Byun ve Nahm 1978). *A. niger* TISTR 3570 ve *Candida guilliermondii* TISTR inülinazları ile kesikli sistemde inülininden yeterince fruktozun üretildiğini göstermiştir (Sirisansaneeyakul vd. 2007). *K. marxianus* YS-1 tarafından üretilen ve kısmen saflaştırılmış inulinaz, kesikli bir sistemde saf inülin ve ham *Asparagus racemosus* inülininden fruktoz üretimi için başarıyla kullanılmış (Singh vd. 2007b) ve Duolite A568 üzerine kısmen saflaştırılmış inulinazın immobilizasyonu, kesikli ve sürekli sistemlerde fruktozun hazırlanmasına yönelik yüksek çalışma kararlılığı göstermiştir (Singh vd. 2007c, 2008). Kitosan boncukları üzerine immobilize edilen *A. niger*'den elde edilen ham ekzo-inulinaz, sürekli dolgulu yatak kolonunda iyi bir üretkenlik göstermiştir (Yewale vd. 2013). Amino-Cellulofine üzerine immobilize edilen *A. niger* inulinazı kullanılarak dolgulu yatak bir reaktörde fruktozun sürekli üretildiği bildirilmiştir (Nakamura vd. 1995). Fruktozim kaplı bir duvarlı mini reaktör ile sürekli sistemde inülin'den %80 fruktoz verimi elde edilmiştir (Marques Ribeiro ve Fernandes 2013).

2.7.2. Fruktooligosakkarit üretimi

Inülin'den fruktooligosakkaritlerin (FOS) enzimatik üretimi, endo-inülinazların önemli bir uygulamasıdır. İnülin ve inülin açısından zengin doğal materyallerden fruktooligosakkarit üretimi için çeşitli mikrobiyal kaynaklardan elde edilen endo-inülinazların kullanıldığı bildirilmiştir (Singh ve Singh 2010). Çoğunlukla, bakteriyel endo-inülinazlar, FOS'ların üretimi için kullanılmıştır. FOS'ların üretimi için *A. ficuum*'dan fungal endo-inülinaz kullanımına dair tek bir rapor vardır (Zhengyu vd. 2005). *Streptomyces rochei* endo-inülinazı, inülininden inülotrioz üretmek için kullanılmıştır (Yokota vd. 1995). *Pseudomonas* sp. endo-inülinazı, 2 ila 7 arasında değişen bir polimerizasyon derecesine sahip bir FOS karışımı oluşturmuştur (Kim vd. 1997b). *Pseudomonas* sp. ve *Xanthomonas* sp. endo-inülinazı, kesikli bir sistemde hindiba köklerinin suyundan ve saf inülininden FOS'ların hazırlanmasında başarıyla kullanılmıştır (Park vd. 1998). *Xanthomonas* sp. ve *Pseudomonas* sp.'den elde edilen bir ikili endo-inülinaz sistemi kullanılarak saf inülininden FOS'ların üretilmesi için bir girişimde bulunulmuştur (Cho vd. 2001). *A. ficuum*'dan elde edilip kısmen saflaştırılmış endo-inülinaz, kesikli bir sistemde FOS'ların sentezi için kullanılmıştır (Zhengyu vd. 2005).

2.7.3. Diğer

Geleneksel olmayan, uygun maliyetli hammaddelerden biyoetanol üretimi araştırmacıların dikkatini çekmektedir. İnulinaz kullanarak inülin ve inülin içeren bitki materyalleri de biyoetanol üretimi için dikkat çekmiştir (Chi vd. 2011). *A. niger* 817 ve *S. cerevisiae*'nin bir karışımı, yerelması yumrularından eşzamanlı sakkarifikasyon ve etanol üretimi için kullanılmıştır (Nakamura vd. 1996). *Arthrobacter* sp.'den elde edilen endo-inülinaz geni, yerelması yumrularından etanol üretmek üzere *Saccharomyces*

sp.'nin δ dizisine eklenmiştir (Li vd. 2013). *Pichia guilliermondii* ve *Penicillium janthiellum*'dan ekzo-inülinaz kodlayan genler, *Saccharomyces* sp.'de ayrı ayrı ifade edilmiş ve her ikisi mikroorganizma yerelması yumrularından doğrudan etanol üretimi için kullanılmıştır (Wang vd. 2011; Wang vd. 2014).

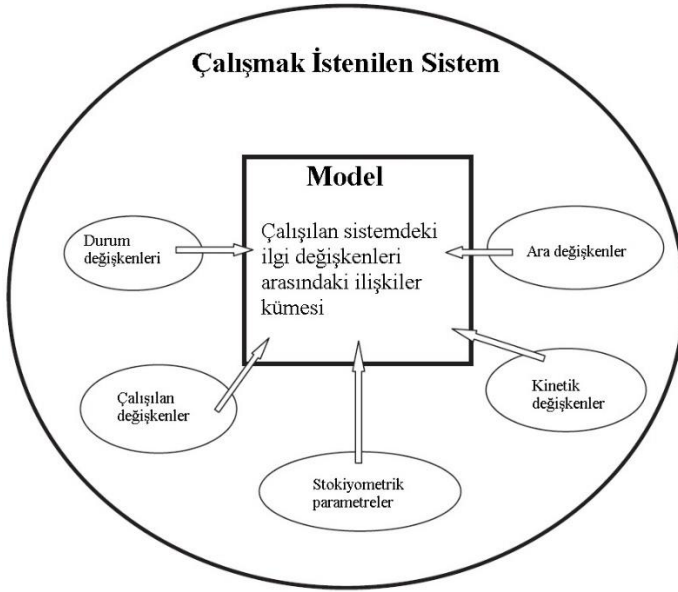
İnulinazların diğer uygulamaları, tek hücreli yağ ve tek hücreli proteinlerin üretimini içerir (Chi vd. 2011). Yerelması yumrularının hidrolizatların, tek hücreli yağ üretimi için uygun substratlar olarak rapor edilmiştir. *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a, kesikli fermentasyon sırasında saf inülinin hidrolizatından %48.8 (a/a) yağ biriktirmiştir. Oysa aynı mikroorganizma kullanılarak yerelması yumrularının hidrolizatından kesikli ve beslemeli-kesikli fermentasyonlar ile sırasıyla %48.6 (a/a) ve %52.2 (a/a) yağ üretilmiştir (Zhao vd. 2010). Deniz mayası *C. aureus*, yerelması yumrularından ekstrakte edilen inülin hidrolizatı üzerinde geliştirilerek tek hücreli proteinlerin üretimi için kullanılmıştır (Gao vd. 2007a). *K. marxianus*'un inulinaz geni INU1'i taşıyan *Yarrowia lipolytica*, tek hücreli proteinler ve sitrik asidin güçlü bir üreticisi olarak rapor edilmiştir (Cui vd. 2011; Liu vd. 2010). *A. niger* inülinazı da sitrik asit üretimi için kullanılmıştır (Drysdale ve McKay 1995). İnülinaz enzimi ayrıca 2,3-bütandiol ve laktik asit üretmek için de kullanılmıştır (Chi vd. 2011; Ji vd. 2009). *Agave tequilana*'dan ekstrakte edilen meyve suyundan tekila üretimi için ticari bir inulinaz preparatı (Fructozyme L) kullanılmıştır (Waleckx vd. 2011).

2.8. Matematiksel Modelleme

Matematiksel bir model, incelenen sistemdeki ilgi değişkenleri arasındaki bir ilişkiler dizisidir (Şekil 2.8). İlişkiler dizisi, yani model, matematiksel denklemler, grafikler, tablolar ya da neden-sonuç ilişkilerinin açıklanmamış bir kümesi olabilir. Üzerinde çalışılan sistem, bir biyoreaktör, hücre, mikrobiyal kültür, immobilize hücre, enzim, ısı değiştirici, santrifüj, HPLC kolonu vb. gibi birim operasyonlarından herhangi biri olabilir. İlgi alanı değişkenleri, besleme hızı, sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve modu, inokulum kalitesi ve işletme maliyetleri olabilir. Matematiksel olsun veya olmasın, bir model, sistemde veya çevresinde yapılan değişikliklere yanıt olarak sistemin nasıl davranacağını açıklar (Mavituna ve Sinclair 2008).

Matematiksel bir modelde, sıcaklığı arttırsak, glukoz konsantrasyonunu azaltırsak, inokulumdaki spor sayılarını azaltırsak, nitrattan amonyağa azot kaynağı olarak geçiş yaparsak, daha küçük bir biyoreaktör kullanırsak, daha yüksek karıştırma hızı kullanırsak, daha düşük bir havalandırma oranı kullanırsak, genetiği değiştirilmiş bir suş kullanırsak vb. ne olacak? gibi sistem hakkındaki soruları yanıtlamak için kullanabileceğimiz bir veya daha fazla denklemimiz olabilir. Diğer örnek sorular, ekonomik olarak başabaş noktası için çalışma koşullarının tanımlanmasını içerebilir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Şekil 2.9, model yapısının döngüsel proseslerini, modelin simülasyon, tahmin ve kontrolde doğrulanması ve uygulamaları ile birlikte, yeni deneylerin, ekipman ve proseslerin, hipotez üretimi ve hipotez testlerinin tasarımı şematik olarak göstermektedir (Mavituna ve Sinclair 2008).



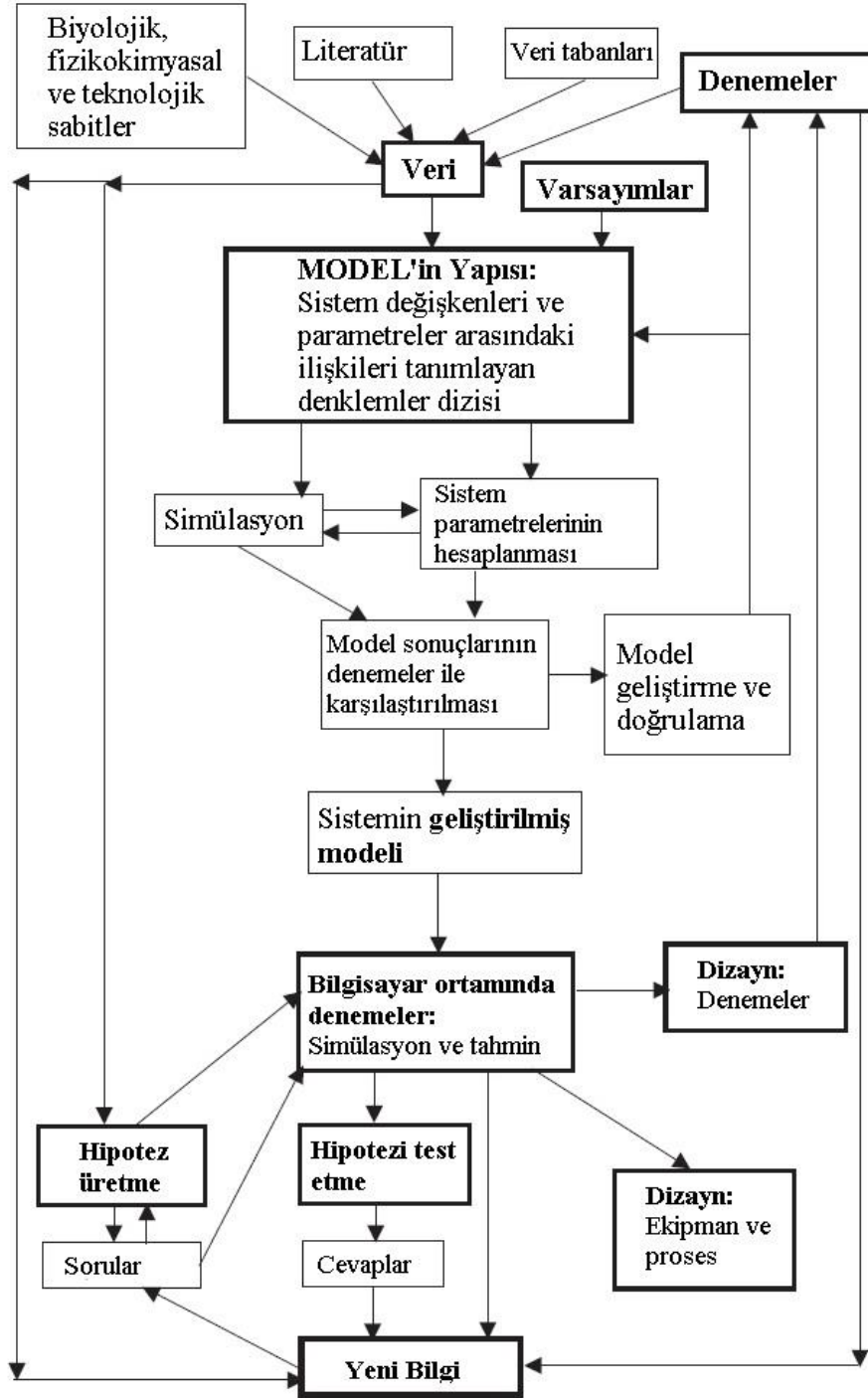
Şekil 2.8. Model, incelenen sistemdeki ilgi değişkenleri arasındaki ilişkiler dizisidir (Mavituna ve Sinclair 2008)

Enstrümantasyon, ölçüm, bilgi teknolojisi, moleküler biyoloji ve yüksek verimli tekniklerdeki ilerlemeler ile biyoteknoloji ve biyoproses mühendisliği alanlarında niceliksel ve niteliksel veri ve bilgi artışı olmuştur. Bu bilgiyi anlamlandırmak için, aralarındaki ilişkileri ve bağlantıları bulmak gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli yazılım araçları mevcuttur. İlişki kurduktan sonra, bir model elde edilebilir, ancak bu model ham veya karmaşık olabilir. Deney, gözlem ve literatür bilgileri, Şekil 2.9'da gösterildiği gibi modelleme için geleneksel başlangıç noktalarıdır. Bu bağlantı döngüsel bir yapıya sahip olduğundan, veri ve gözlemlerle başlanamayabilir, bununla beraber bir hipotez ile başlamayı, hipoteze dayanan basit bir model inşa etmeyi, hipotez ve modele dayalı bazı deneyler tasarlanabilir ve tahmin modelinin sonuçları, deneysel sonuçlar ile karşılaştırılarak test edilebilir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Küçük ölçekli kesikli fermentasyondan elde edilen sonuçları kullanarak modellemeye başlanabilir. Bir bileşiğin veya hücrenin zamana karşı konsantrasyonundaki değişimleri çizildiğinde bile modelleme yapılmaktadır. Bazı genetiği değiştirilmiş suşlar da dâhil olmak üzere bir mikroorganizmanın farklı suşları varsa, bunların spesifik gelişim hızı veya bir proteinin spesifik üretim oranı gibi basit modellere dayanan kantitatif tanımlar kullanarak bu suşların göreceli performansları karşılaştırabilir. Böyle bir niceliksel karşılaştırma, hangi suşun seçilmesine veya suşun istenen özelliklerini iyileştirmek için hangi genetik modifikasyonların uygulanmasına yardımcı olabilir. Model bazlı tanımlar veya terimler kullanarak, farklı kökenden bilim adamları ve mühendislerle iletişim kurulabilir ve tartışılabilir. Bu nedenle model, bilimsel bir iletişim dilidir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Belirli bir ortamda hücrelerin bir flaskta veya biyoreaktörde ne kadar hızlı gelişeceğini tahmin edebilecek bir model varsa, ne kadar inokulumun kullanılacağını ve fermentasyona ne zaman başlanacağını bilerek denemeler planlanabilir. Bir model varsa, neyin ölçüleceği veya izleneceği bilinir. Bazen bir model, düşünülmeyen veya

göz ardı edilen faktörlerin önemini de vurgular. Bu nedenle, sistemin bazı özelliklerini, diğer sistem bileşenlerinin veya ortamın bir fonksiyonu olarak anlamak ve tanımlamak için modeller kullanılmalıdır. Bu yeni bilgi oluşumuna yol açar.



Şekil 2.9. Model yapımının döngüsel prosesleri, doğrulama ve uygulamaları (Mavituna ve Sinclair 2008)

Modelleri tahmin modunda kullanabilir ve denemeler, ekipman ve biyoprosesler tasarlanabilir. Örneğin, belirli bir süre boyunca gerekli miktarda aminoasit üretmek için, belirli bir suşu ve bir kültür aktivitesinin bir modelini kullanarak, biyoreaktördeki fermentasyon ortamının hacmini, besiyerinin karıştırılmasını ve havalandırılmasını, inokulum seviyesini, karbon ve enerji kaynağının başlangıç konsantrasyonlarını ve nitrojen kaynağını seçmek gerekebilir. Modellerin bu uygulamaları modellemenin önemini haklı çıkarmaktadır (Mavituna ve Sinclair 2008).

Modelleri kullanabilmek için Şekil 2.9'un döngüsel proseslerini kullanarak model oluşturulmalıdır. Mevcut hesaplamalı yazılımın, başlangıç seviyesinin modellemeye eğri uydurma yaklaşımlarını kullanmalarını teşvik ettiğinden bahsetmek gerekir. Bu, modellemenin bir parçası olsa da, bir polinom denklemi kullanarak basitçe eğri uydurma yerine, biyolojik, kimyasal ve fiziksel anlamı denklemlerle ilişkilendirmeye çalışılmalıdır. Ayrıca, model parametre değerlerinin tahmin edilmesi, modellemeye doğru bir yaklaşımda, modellemenin önemli bir parçası olacak olmasına rağmen, bir model, bağımsız bir dizi denemeden elde edilen sonuçları tahmin etme kabiliyeti ile test edilmelidir. Diğer bir deyişle, model parametre değerlerinin tahmin edildiği denemelerden farklı bir set ile hesaplanmalıdır. Deneysel hataların model doğrulama ve tahmininde dikkate alınması gerektiği de belirtilmelidir. Bazen, modellemekten yüksek derecede deneysel hataya sahip olan verilerin çıkarılması gerekir. Bu nedenle denemeleri, örneklemeyi ve analizleri çoğaltmak önemlidir. Unutulmamalıdır ki, gerçek dünyada, yazılımın çözüm olarak negatif bir değer vermesi durumunda, negatif konsantrasyonlar mevcut değildir. Hatırlanması gereken bir diğer önemli nokta, sistemin kısıtlamalarıdır. Kısıtlamalar, sistem değişkenleri ve parametrelerinin alabileceği değerlerin teknik, biyolojik, kimyasal ve fiziksel üst ve alt limitleri anlamına gelir (Mavituna ve Sinclair 2008).

2.9. Matematiksel Modellemenin Faydaları

Matematiksel modellemenin faydaları şunlardır (Türker 2005):

i. Modelleme prosesin anlaşılmasını kolaylaştırır: bir prosesin matematiksel modelini oluştururken prostedeki karmaşık neden-sonuç ilişkileri ayrıntılı olarak göz önüne alınır. Matematiksel modelin öngördüğü ile prosesin gerçek davranışının karşılaştırılması prosesin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Simülasyon sonuçları bazen uygulamada karşılaşılan fakat açıklanamayan olayların sebeplerinin açıklanmasına yardımcı olur.

ii. Model, deney tasarımına yardımcı olur: modelin doğru olarak test edilebileceği deneylerin tasarlanması önemlidir. Model parametrelerinin bilinmesi için bazı özel denklemler gerekecektir. Ayrıca duyarlılık analizi bazı parametrelerin modelin davranışı üzerine etkisinin ihmal edilebilir olduğunu öngörebilir. Dolayısıyla bu etkiler modelden ve deney programından çıkarılabilir.

iii. Model, tasarım ve kontrol için kullanılabilir: model kurulduğunda prosesin performansını farklı koşullarda öngörmesi gerekir. Ayrıca matematiksel modeller kontrol algoritmalarının tasarımında kullanılabilir ve hatta kontrol algoritmalarının bir parçası olabilir.

iv. Model, eğitimde kullanılabilir: biyoprosesin çeşitli yönleri basit modeller kullanılarak simüle edilebilir. Herhangi bir etkenin biyoproses performansı üzerine

etkisi bu modelleri kullanarak bilgisayarda gösterilebilir. Deneysel olarak bunu yapmak pahalı ve zordur.

v. Model, proses optimizasyonunda kullanılabilir: optimizasyon genellikle iki veya daha fazla değişkenin etkisini göz önüne almayı gerektirir. Optimizasyondan amaç, örneğin; reaktörü maksimum hızda ürünü üretmek üzere çalıştırmak olabilir. Bununla beraber, optimizasyon ile yüksek proses maliyetleri azaltılarak prosteden kâr elde edilebilir.

Çalışma kapsamında, öncelikle 10 farklı karbon kaynağının (şeker pancarı melası, keçiyoynuzu ekstraktı, maltrin, glukoz, peynir altı suyu tozu, fruktoz, ksiloz, laktoz, sukroz ve inülin) *A. niger* inülinaz enziminin üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve belirlenen en iyi karbon kaynağında besiyeri formülasyonunun optimize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, PBD ve MKD istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Her iki istatistik yöntemle optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verileri kinetik modeller ile tahmin edilmiş olup fungal gelişim için lojistik model, enzim veya protein üretimi için Luedeking-Piret (LP) model ve substrat tüketimi için Modifiye Luedeking-Piret (MLP) model kullanılmıştır. Sonrasında, MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonu kullanılarak küçük ölçekli (5-L) ve büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörlerde enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekli biyoreaktörde pH kontrolü ve havalandırmanın enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Diğer yandan, inülinaz enzimi sukroz üzerinde de aktivite göstermekte (sukraz aktivitesi, *Sase*) ve sukrozu, glukoz ve fruktoza indirgemektedir. Dolayısıyla optimum koşullarda elde edilen örneklerde ve enzim karakterizasyonunda sukraz aktivitesi belirlenmiş olup I/S oranı hesaplanmıştır. I/S oranının belirlenmesindeki amaç, üretilen enzimin inülinaz mı yoksa sukraz mı olup olmadığını anlamaktır. Eğer bu değer, 10^{-2} 'den büyük ise enzimin inülinaz olduğu, eğer 10^{-4} 'ten küçük ise enzimin sukraz olduğu anlaşılmaktadır (Ettalibi ve Baratti 1987). Daha sonra üretilen enzim santrifüj-süre kombinasyonu ve UF prosesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Üretilen enzimin bazı özellikleri (optimum sıcaklık, inkübasyon süresi ve pH değeri, aktivasyon enerjisi, frekans faktörü, *D*-değeri, *Z*-değeri, *Q*₁₀-değeri, inaktivasyon enerjisi, enatlı, entropi ve serbest enerji), termostabilitesi, kinetik parametreleri (V_{max} ve K_m) ve substrat spesifikliğı, aktivite üzerine metal iyonlarının etkisi ve molekül ağırlığı belirlenmiştir. Bununla beraber, hem PBD hem de MKD ile belirlenen en iyi besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonların (*Iase* aktivitesi, *Sase* aktivitesi, I/S oranı, *SIase* ve *SSase* ve şeker tüketimi) 11 farklı matematiksel model (Modifiye lojistik, Modifiye Gompertz, Modifiye Richards, Stannard, Asimetrik, Baranyi, Huang, Weibull, Morgan-Mercer-flodin, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile modellenmesi amaçlanmış ve *A. niger* inülinaz enziminin üretimi için en iyi matematiksel model(ler) belirlenmiştir. Ayrıca substrat spesifikliğı ile ilgili deneysel verilerin de on farklı matematiksel model (Stannard, Weibull, Asimetrik, Morgan-Mercer-Flodin, Ekspansiyel, von Bertalanffy, Brody&Monomolecular, Mitscherlich, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile tahmin edilmesi hedeflenmiş olup elde edilen verilerden V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Tüm bu aşamaların ayrıntıları ve izlenecek yol, **Materyal ve Metot** kısmında detaylı olarak verilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yapılan bu çalışmada farklı karbon kaynaklarından (glukoz, fruktoz, ksiloz, laktoz, sukroz, inülin, melas, keçiyoynuzu ekstraktı (KE), maltrin ve peynir altı suyu tozu (PAST)) inülinaz enziminin üretimi gerçekleştirilmiş olup en iyi karbon kaynağı sonraki fermentasyon çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenmiştir. Bu amaçla, çalışma kapsamında fermentasyonlarda saf karbon kaynağı olarak kullanılan monosakkaritler (glukoz, ksiloz ve fruktoz) ve disakkaritler (sukroz ve laktoz) Sigma'dan ve bir polisakkarit olan inülin (hindiba kökünden) Acros'tan satın alınmıştır. Kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiyoynuzu meyvesi (5-7 mm kalınlığında), Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den temin edilmiştir. Şeker pancarı melası, Pakmaya'dan temin edilmiştir. Maltrin ve peynir altı suyu tozu ise sırasıyla PNS Pendik Nişasta Sanayi A.Ş. ve İzi Süt A.Ş.'den satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan saf karbon kaynakları ve maltrin, kimyasal dolabında ağzı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Keçiyoynuzu meyvesi, şeker pancarı melası ve peynir altı suyu tozu, kullanılabilecek kadar +4°C'de depolanmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan keçiyoynuzu, Turhan vd. (2010) tarafından önerilen ekstraksiyon koşullarına göre (%25 keçiyoynuzu meyvesi (a/h), 80°C ekstraksiyon sıcaklığı, 120 dk ekstraksiyon süresi ve her 15 dakikada bir karıştırma) ekstrakte edilmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın içerisindeki katı partiküller, kaba filtre kâğıdı vasıtasıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt, inülinaz üretimi için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2. Mikroorganizma

Inülinaz enziminin üretiminde *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) kullanılmıştır. Bu mikroorganizma Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) satın alınmıştır. Malt ekstrakt agar (Merck, 48 g/L), otoklavlanabilir cam şişelerin içerisine prosedüre göre hazırlanmış olup agar kaynayan suda tam olarak çözülene kadar ısıtıcı manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan katı besiyeri, 121.1°C'de 10 dk steril edildikten sonra 50°C'ye kadar bekletilmiş ve steril petri kaplarına aseptik koşullar altında 15-20 mL dökülmüştür. Petrilerdeki besiyeri soğuduktan sonra +4°C'de stokta bekletilen *A. niger* hif-spor karışımından aseptik koşullar altında bir öze dolusu alınarak "çizme plak yöntemi" ile ekim işlemi gerçekleştirilmiş ve 4 gün boyunca 30°C'de gelişime bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra taze gelişmiş kültürler +4°C'de depolanmış ve canlılığı ve üretkenliği muhafaza etmek amacıyla her 15 günde bir yenilenmiştir.

Uzun süreli muhafaza için mikroorganizmadan stok kültürler hazırlanmıştır. Bunun için steril %20'lik gliserol çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıdaki prosedürün uygulanması ile gelişimi tamamlanmış olan petrilerdeki kültürlerin üzerine %20'lik gliserol çözeltisinden aseptik koşullar altında 10-15 mL aktarılmış ve yüzeydeki *A. niger* hifleri-sporları 50 mL'lik falkon tüplerine alınmıştır. Buradan da steril otomatik pipet ve pipet uçları vasıtası ile 1.8 mL hacme sahip olan steril cryo tüplerin içerisine 1.5 mL transfer edilip -80°C'de depolanmıştır (Izmirlıoğlu ve Demirci 2016).

3.3. Mikroorganizmanın Süspansiyon Olarak Kullanımı

Stok kültürlerden, gerçekleştirilen her fermentasyon öncesinde Bölüm 3.2'deki yöntemle göre ön kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan ön kültür üzerine, önceden hazırlanmış olan 100 mL'lik %0.001 steril Tween-80 çözeltisinin 10 mL'si aseptik koşullar altında eklenerek petrinin yüzeyindeki *A. niger* sporları alınmış ve tekrar hazırlanan Tween-80 çözeltisinin içerisine aktararak spor solüsyonu hazırlanmıştır. Elde edilen karışımdaki spor sayısı Thoma lamı kullanılarak mikroskopta belirlenmiştir (2.9×10^7 spor/mL). Ön kültürden hazırlanan bu spor solüsyonu, fermentasyonu başlatmak için inokülüm olarak kullanılmıştır (Öngen-Baysal vd. 1994).

3.4. Çalışmanın Deneme Deseni

Aspergillus niger A42 (ATCC 204447) kullanılarak gerçekleştirilen inülinaz enziminin üretimi, kısmi olarak saflaştırılması, üretilen enzimin karakterizasyonu ve modellemeler ile ilgili deneme deseni aşağıdaki gibidir:

- Enzim üretiminde en iyi karbon kaynağının tespiti
- Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi
- PBD ile enzimin üretimi üzerine etkili olan optimal besiyeri içeriklerinin tespiti
- MKD ile besiyerinde kullanılan bileşenlerin konsantrasyonunun optimizasyonu
- Optimize edilen besiyeri koşullarındaki fermentasyonların kinetik modellemesi
- Küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) enzim üretimi üzerine pH kontrolü ve havalandırmanın etkisi
- Büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) enzim üretimi
- Üretilen enzimin santrifüj-süre kombinasyonu ve UF prosesi ile kısmi saflaştırılması
- Enzimin substrat spesifikliğı ve kinetik parametrelerinin (V_{max} ve K_m) belirlenmesi
- Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi
- Farklı reaktiflerin aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi
- Enzimatik reaksiyonun aktivasyon enerjisi ve Arrhenius sabitinin belirlenmesi
- İnülinazın termostabilitesi ve bazı özelliklerinin (k_d , $t_{1/2}$, D -değeri, Z -değeri, Q_{10} değeri, entalpi (ΔH), entropi (ΔS) ve serbest enerji (ΔG)) belirlenmesi
- SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığını belirleme
- Optimize edilen besiyeri koşullarındaki fermentasyonların matematiksel modellemesi ve kinetik parametrelerin hesaplanması
- Enzimin substrat spesifikliğı çalışmasını modelleme
- Matematiksel modellerin karşılaştırılması

3.5. İnülinaz Enziminin Üretimi Üzerine Karbon Kaynağının Etkisi

Yapılan bu çalışmada öncelikle farklı karbon kaynaklarından inülinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, saf ve alternatif karbon kaynakları olmak üzere toplam 10 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Karbon kaynakları farklı olan besiyerlerinde, Öngen-Baysal vd. (1994)'nın kullandığı Çizelge 3.1'deki bileşenler ve miktarları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. İnülinaz enziminin üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Bileşen	Miktar (% a/h)
Karbon kaynağı (glukoz, fruktoz, ksiloz, laktoz, sukroz, inülin, şeker pancarı melası, keçiyoynuzu ekstraktı, maltrin ve peynir altı suyu tozu)	%1 (a/h), 1°Bx veya 10 g/L
NH ₄ NO ₃	0.23
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.37
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.05
Maya ekstraktı	0.15

Çizelge 3.1'deki bileşime göre hazırlanan besiyerlerinin (100 mL) başlangıç pH değeri, 4 N NaOH veya 4 N HCl ile 5.0'a ayarlandıktan sonra 121.1°C'de 15 dk steril edilmiştir. Ön kültürden hazırlanan spor solüsyonu, inokülasyon için kullanılmış ve hazırlanan çözeltiden besiyerine 2 mL (%2, h/h) inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde (CERTOMAT® IS, Goettingen, Almanya) gerçekleştirilen fermentasyonlarda sıcaklık 30°C'de, karıştırma hızı ise 200 dev/dk'da sabit tutulmuştur (Öngen-Baysal vd. 1994). Fermentasyonlar, şeker tüketimi ve enzim üretimine göre sonlandırılmıştır.

3.5.1. En iyi karbon kaynağının tespitinde kullanılan enzim analizi

İnülinaz enziminin üretimine yönelik en iyi karbon kaynağının tespitinde kullanılan inülinaz enziminin aktivite değeri belirlenmiştir. Bu amaçla, enzim aktivite değerinin belirlenmesinde 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılmıştır (Miller 1959). Enzim analizini gerçekleştirmek için substrat olarak 100 mM Na-asetat tamponunda (pH 4.5) %2'lik (a/h) inülin veya sukroz çözeltisi hazırlanmıştır. 900 µL substrat çözeltisi, 100 mM Na-asetat tamponu (pH 4.5) ile seyreltilmiş enzim solüsyonunun 100 µL'si ile test tüpünde karıştırılmıştır. Su banyosunda 50°C'de 15 dk inkübasyondan (1. inkübasyon) sonra 1500 µL DNS çözeltisi test tüplerine eklenmiştir. Bununla beraber kontrol örneği ile kör (blank) hazırlanmıştır. Kontrol örneği, sırasıyla test tüpünün içerisine önce 100 µL enzim solüsyonu, sonra 1500 µL DNS çözeltisi, daha sonra da 900 µL substrat eklenerek hazırlanmıştır. Kör ise test tüpünün içerisine 100 µL deiyonize su, 900 µL substrat ve 1500 µL DNS çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Kontrol örneği ile kör, 1. inkübasyona dâhil edilmemiştir. Kontrol örneğinin hazırlanmasının nedeni, enzim tarafından salınmayan veya örnekten gelen indirgen şekerlerin absorbansını ölçmektir (Abs_{kontrol}). Kontrol örneği ile birlikte kör ve enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tüpler hemen 100°C'de 10 dk inkübasyona (2. inkübasyon) bırakılmıştır. 2. inkübasyonun nedeni, enzimatik reaksiyonu durdurmak ve enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimini sağlamaktır. Elde edilen örneklerin absorbans değerleri, köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution, Şangay, Çin) ölçülmüş ve renk değişimine bağlı olarak hem kontrol örneği için (Abs_{kontrol}) hem de enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örnekler için absorbans değerleri (Abs_{örnek}) elde edilmiştir. Enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği test tüplerinde hem örnekten gelen hem de enzimatik reaksiyonun sonucunda oluşan indirgen şekerler bulunmaktadır. Dolayısıyla,

kontrol örneğinin kullanılmasıyla ölçülen absorbens değeri ($Abs_{kontrol}$) daha sonra enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği test tüplerinden elde edilen absorbens değerinden ($Abs_{örnek}$) çıkartılmıştır [$Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}$]. Böylece enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin absorbens değeri hesaplanmıştır. Bu değer [$Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}$], fruktoz standart kurvesinden yararlanılarak enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Enzim analizinde kullanmak için hazırlanan fruktoz standart kurvesi EK-1’de verilmiş olup oluşturulan denklem aşağıdaki gibidir (Eşitlik 3.1).

$$y = 3.8983 \times [Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}] - 0.0156 \quad (3.1)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/mL}$)

$[Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}]$ = kontrol örneği ile enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örneğin 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbens değerleri arasındaki fark.

İnülinaz ve sukraz aktivitesinin U/mL cinsinden hesaplanması Eşitlik 3.2 ile gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mL)} = \frac{y \times R_v \times D_f}{t} \quad (3.2)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/mL}$)

$R_v = \frac{\text{Test tüpünün toplam hacmi (mL)}}{\text{Enzim solüsyonunun hacmi (mL)}}$

D_f = dilüsyon faktörü veya seyreltme katsayısı

t = reaksiyon süresi (dk)

3.5.2. Kalıntı şeker analizi

Fermentasyon sırasında alınan örneklerdeki kalıntı şeker konsantrasyonu 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemine göre belirlenmiştir (Miller 1959). DNS metodu ile şeker analizinde kullanılan DNS çözeltisinin 1 litresi için 10 g/L NaOH, 10 g/L 3,5-dinitrosalisilik asit ve 0.5 g/L sodyum sülfid kullanılmıştır. Ayrıca, renk stabilizasyonu sağlamak amacıyla 400 g/L Rachele tuz çözeltisi (potasyum sodyum tartarat çözeltisi) hazırlanmıştır.

Kalıntı şeker analizinde, 50 μL örnek üzerine 1950 μL saf su eklenmiş ve 40 μL 12 M HCl eklenerek karıştırıldıktan sonra 100°C’lik kaynayan su banyosunda 10 dk bekletilmiş ve hidroliz edilmiştir. Daha sonra hidrolizat üzerine 100 μL 5 N KOH eklenerek karıştırıldıktan sonra karışım içerisinde 640 μL sulu çözelti otomatik pipet aracılığıyla çekilerek atılmıştır. Böylece test tüpünün içerisindeki karışımın miktarı 1500 μL olmuş ve üzerine 1500 μL DNS çözeltisi eklenmiştir. Bu aşamada 1500 μL saf su üzerine 1500 μL DNS eklenerek kör olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Solüsyon karıştırıldıktan sonra 100°C’lik su banyosunda 10 dk bekletilip üzerine renk stabilizasyonunu sağlamak amacıyla 500 μL %40’lık potasyum sodyum tartarat

çözeltisi eklenerek soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda okutularak fermentasyonda kullanılan karbon kaynağına göre hazırlanan kurveler (EK-2a-d) ile kalıntı şeker miktarı hesaplanmıştır.

Karbon kaynağı olarak maltrin, glukoz, peynir altı suyu tozu, fruktoz ve laktozun kullanıldığı fermentasyon ortamlarındaki kalıntı şeker konsantrasyonunu tespit etmek için standart **glukoz** kurvesi (EK-2a), karbon kaynağı olarak sukroz, şeker kamışı melası ve keçiyoynuzu ekstraktının kullanıldığı besiyerlerindeki kalıntı şeker konsantrasyonunu belirlemek için standart **sukroz** kurvesi (EK-2b), karbon kaynağı olarak inülinin kullanıldığı besiyerlerindeki kalıntı şeker konsantrasyonunu belirlemek için standart **inülin** kurvesi (EK-2c) ve karbon kaynağı olarak ksilozun kullanıldığı besiyerlerindeki kalıntı şeker konsantrasyonunu belirlemek için standart **ksiloz** kurvesi (EK-2d) kullanılmıştır.

3.6. Toplam Protein Analizi

Örneklerin spesifik inülinaz ve sukraz aktivitelerini belirlemek için toplam protein analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ThermoScientific Coomassie (Bradford) Protein Assay kit kullanılmıştır. Bu kit, Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent (950 mL) ve Bovine serum albümin standart ampüllerinden (2 g/L, 10 ampül) oluşmaktadır.

Örnekler ilk olarak 16873 g çevirme hızında 5 dakika santrifüjlendikten sonra analizde kullanılmıştır. Toplam protein analizinde, 1500 µL Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent ile 30 µL standart, enzim solüsyonu örneği veya deiyonize su (kör) test tüpünün içerisinde karıştırılmış ve oda sıcaklığında daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra standart ve örnekler köre karşı 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur (Bradford 1976). Kör ile düzeltilmesi yapılmış olan standart absorbans değerleri kullanılarak toplam protein miktarının hesaplanabilmesi için standart kurve elde edilmiş ve örneklerin toplam protein miktarı mg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.7. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

En iyi karbon kaynağı belirlendikten sonra, bu karbon kaynağı kullanılarak elde edilen fermentasyon sıvısı, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere üretilen inülinaz enziminin optimum çalışma koşullarını tespit etmek için kullanılmıştır. Bunun için 100 mM Na-asetat tamponunun pH değerinin (4.4-5.3 pH aralığında), inkübasyon sıcaklığının (30-80°C aralığında) ve inkübasyon süresinin aktivite üzerine etkisi (1-30 dk aralığında) sırasıyla incelenmiştir.

3.7.1. Na-asetat tamponu pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

%2'lik (a/h) inülin ve sukroz çözeltilerinin hazırlanmasında farklı pH'lara sahip 100mM Na-asetat tamponları (4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2 ve 5.3) kullanılmıştır. Bu çözeltiler, inülinaz ve sukraz analizlerinde substrat olarak kullanılmıştır. Bununla beraber, tampon pH'ının aktivite üzerine etkisinin belirlenmesinde literatürdeki metotlara göre 50°C inkübasyon sıcaklığı, 100 µL 100 mM

Na-asetat tamponu ile seyreltilmiş enzim solüsyonu, 900 µL substrat (inülin veya sukroz) ve 15 dk inkübasyon süresi kullanılmış olup farklı pH tamponlarında inülinaz ve sukraz aktivite değerleri elde edilmiş ve optimum tampon pH değeri belirlenmiştir. İnülinaz ve sukraz aktivitesinin belirlenmesi ile birlikte I/S oranının da değişen tampon pH değerleri ile nasıl değiştiği belirlenmiştir. İnülinaz enziminin birçok mikrobik preparatı, inulinaz aktivitesine (I) eşlik eden dikkate değer bir sukraz aktivitesine (S) sahiptir. Bu nedenle, katalitik aktiviteleri I/S oranı açısından tanımlanmıştır. Böylece, enzimleri karakterize etmek için I/S oranı kullanılır: eğer I/S oranı 10^{-2} 'den büyükse enzim inulinaz, eğer I/S oranı 10^{-4} 'ten küçükse enzim sukraz doğasındadır. İnulinaz veya sukrazın β-fruktosidaz olarak adlandırılması, inülin ve sukroza yönelik enzimin nisbi hidrolitik kapasitesine göre yapılır (Ettalibi ve Baratti 1987). Ayrıca, kullanılan ham enzim solüsyonunun toplam protein miktarı da belirlenmiş olup spesifik inülinaz ve sukraz aktivite değerleri de hesaplanmıştır.

3.7.2. İnkübasyon sıcaklığının enzim aktivites üzerine etkisi

100mM Na-asetat tamponunda optimum çalışma pH'ı belirlendikten sonra farklı inkübasyon sıcaklıklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup optimum inkübasyon sıcaklığı tespit edilmiştir. Bu amaçla 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C inkübasyon sıcaklıklarında enzim analizleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak optimum inkübasyon sıcaklığı tespit edilmiştir. Literatürdeki metotlara göre, optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesinde, belirlenen optimum pH'nın yanı sıra inkübasyon süresi 15 dk'da, Na-asetat tamponu ile seyreltilmiş enzim solüsyonunun hacmi 100 µL'de ve substrat (inülin veya sukroz) miktarı 900 µL'de sabitlenmiştir. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında inülinaz ve sukraz aktivite değerleri elde edildikten sonra optimum inkübasyon sıcaklığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, inkübasyon sıcaklığının değişmesi ile birlikte I/S oranının nasıl değiştiği ortaya konmuştur. Diğer yandan, kullanılan ham enzim solüsyonunun toplam protein miktarı belirlenerek farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki spesifik inülinaz ve sukraz aktivite değerleri de hesaplanmıştır.

3.7.3. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

100 mM Na-asetat tamponunda optimum çalışma pH'ının yanı sıra optimum inkübasyon sıcaklığı da belirlendikten sonra farklı inkübasyon sürelerinin (1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk) enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Belirlenen optimum sıcaklıkta farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen enzim-substrat karışımının inülinaz ve sukraz analizleri yapılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması sonucunda optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bunun için literatürdeki metotlara göre kullanılan enzim ve substrat solüsyonlarının miktarı sırasıyla 100 ve 900 µL'de sabitlenmiştir. Bununla birlikte, I/S oranının farklı inkübasyon sürelerinde nasıl değiştiği anlaşılmıştır. Ayrıca, analizde kullanılan ham enzim solüsyonunun toplam protein içeriği tespit edilmiş olup spesifik inülinaz ve sukraz aktivite değerleri de belirlenmiştir. Böylece, enzim aktivitesini önemli ölçüde etkileyen Na-asetat tamponunun pH değeri, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Belirlenen bu yeni koşullara göre enzim analiz yöntemi tekrar tasarlanmış olup çalışmanın sonraki bölümlerinde yeni analiz yöntemi (Bölüm 3.18) kullanılmıştır.

3.8. Besiyeri Kompozisyonunun PBD ile Optimizasyonu

İnülinaz enziminin üretimine yönelik en iyi karbon kaynağı belirlendikten sonra, bu karbon kaynağı kullanılarak farklı besiyeri bileşenlerinin bir değerlendirmesini yapmak ve besiyeri kompozisyonunu PBD ile optimize etmek amacıyla mineraller ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve azot kaynaklarından (maya ekstraktı, et özütü ekstraktı, pepton, peynir altı suyu tozu ve mısır maserasyon sıvısı) oluşan 11 farklı besiyeri bileşeni kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Seçilen besiyeri bileşenleri, *Aspergillus* türleri ile gerçekleştirilen enzim fermentasyonlarında besiyeri bileşeni olarak kullanılmış olup bazı yayınlarda da belirtilmiştir (Çizelge 3.2). Bu yayınlardaki değerler kullanılarak çalışmada kullanılan bileşenlerin düşük (–) ve yüksek seviyeleri (+) tespit edilmiştir (Çizelge 3.2). Besiyeri bileşenlerinin düşük ve yüksek seviyeleri kullanılarak PBD deneme deseni oluşturulmuştur (Çizelge 3.3). Deneme deseninin oluşturulmasında ve sonuçların istatistiksel analizinde Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) kullanılmıştır. PBD, N deneme ile birlikte $N-1$ değişken sağlayan fraksiyonel bir faktöriyel dizayndır. Bu dizaynda, her bir faktör için düşük seviye (–) ve yüksek seviye (+) olmak üzere iki seviye kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi üzerine her bir değişkenin etkisi, Eşitlik 3.3'teki gibi hesaplanmaktadır.

$$E = \frac{\sum y (+)}{N} - \frac{\sum y (-)}{N} \quad (3.3)$$

Burada,

E = faktör etkisi

$y (+)$ ve $y (-)$ = belirli bir faktörün yüksek ve düşük seviyelerindeki yanıtları

N = toplam deneme sayısı

Eşitlik 3.3'te de görüldüğü gibi PBD, faktörler arasındaki interaksiyonları göz önünde bulundurmaz, bunun yerine sadece enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörleri taramak için kullanılmaktadır. Seçilen karbon kaynağı ile birlikte Çizelge 3.3'teki deneme desenine göre 250 mL'lik flaskların içerisine hazırlanan besiyerlerinin (substrat olarak 4°Bx 100 mL melas) başlangıç pH değerleri 5.0'a ayarlandıktan sonra 121.1°C'de 15 dk steril edilip soğutulmuştur. İnokülasyondan önce başlangıç örneği aseptik koşullar altında alınmıştır. Hazırlanan ön kültürün spor solüsyonundan %2 (h/h) oranında inokülasyon yapıldıktan sonra fermentasyonlar 30°C'de ve 200 dev/dk'da gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar, en az iki kez tekrar edilmiş olup değerler arasında farklılık gözlemlenen fermentasyonlar yeniden yapılmıştır. Her 24 saatte bir örnek alınmıştır. Örnekler, analiz anına kadar +4°C'de saklanmıştır. Fermentasyon boyunca alınan örneklerde inülinaz aktivitesi (I_{ase} , U/mL) ve kalıntı şeker analizleri yapılmıştır. Bununla beraber, en yüksek inülinaz aktivite değerlerine sahip örneklerde sukraz aktivitesi (S_{ase} , U/mL) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, substrat olarak inülin yerine sukroz kullanılmıştır. Ancak sadece I_{ase} , dizaynın istatistiksel analizine yönelik yanıt olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. PBD’de düşük ve yüksek seviyelerdeki değişkenlerin konsantrasyonları

Değişkenler (%)	Kod	Düşük seviye (-)	Yüksek seviye (+)	Kaynak
(NH ₄) ₂ HPO ₄	A	0.1	0.6	(Öngen-Baysal vd. 1994)
MgSO ₄ .7H ₂ O	B	0.01	0.1	(Öngen-Baysal vd. 1994)
KH ₂ PO ₄	C	0.01	0.2	(Öngen-Baysal vd. 1994)
NH ₄ NO ₃	D	0.1	0.5	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	E	0.01	0.1	(Michael T. Madigan 2014)
MnSO ₄ .H ₂ O	F	0.01	0.1	(Michael T. Madigan 2014)
Maya ekstraktı	G	0.1	1	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Et özütü ekstraktı	H	0.1	1	(Dinarvand vd. 2012)
Pepton	J	0.1	1	(Dinarvand vd. 2012)
Peynir altı suyu tozu	K	0.1	1	(Bhargavi ve Prakasham 2016; Hensing vd. 1994; Rech ve Ayub 2007)
Mısır maserasyon sıvısı	L	0.5	1.5	(Viswanathan ve Kulkarni 1995b)

Çizelge 3.3. PBD deneme deseni

Besiyeri	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	0.6 (+)	0.01 (-)	0.2 (+)	0.1 (-)	0.01 (-)	0.01 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.5 (+)
2	0.1 (-)	0.1 (+)	0.2 (+)	0.5 (+)	0.01 (-)	0.1 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	0.1 (-)	0.5 (-)
3	0.1 (-)	0.1 (+)	0.01 (-)	0.1 (-)	0.01 (-)	0.1 (+)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.5 (+)
4	0.6 (+)	0.01 (-)	0.2 (+)	0.5 (+)	0.01 (-)	0.1 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.5 (+)
5	0.6 (+)	0.01 (-)	0.01 (-)	0.1 (-)	0.1 (+)	0.1 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.5 (-)
6	0.1 (-)	0.1 (+)	0.2 (+)	0.1 (-)	0.1 (+)	0.01 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	1.5 (+)
7	0.6 (+)	0.1 (+)	0.01 (-)	0.5 (+)	0.01 (-)	0.01 (-)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.5 (-)
8	0.6 (+)	0.1 (+)	0.2 (+)	0.1 (-)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.5 (-)
9	0.1 (-)	0.01 (-)	0.2 (+)	0.5 (+)	0.1 (+)	0.01 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	0.5 (-)
10	0.1 (-)	0.01 (-)	0.01 (-)	0.5 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (-)	1.0 (+)	1.0 (+)	0.1 (-)	1.5 (+)
11	0.6 (+)	0.1 (+)	0.01 (-)	0.5 (+)	0.1 (+)	0.01 (-)	1.0 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	1.5 (+)
12	0.1 (-)	0.01 (-)	0.01 (-)	0.1 (-)	0.01 (-)	0.01 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	0.5 (-)

A-L: Çizelge 3.2'deki kodlar

Varyans analizinden (ANOVA) sonra, istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) pozitif ve negatif etkiye sahip olan bileşenler belirlenmiştir. Bu bileşenlerden 3 farklı besiyeri kompozisyonu (Besiyeri A, Besiyeri B ve Besiyeri C) oluşturulmuştur. **Besiyeri A**, kontrol fermentasyonudur yani istatistiksel olarak önemli **ne pozitif ne de negatif** etkiye sahip olan bileşenleri içermemiş olup fermentasyon yalnızca seçilen en iyi karbon kaynağında (4 °Bx melas) gerçekleştirilmiştir. **Besiyeri B**, istatistiksel olarak önemli **hem pozitif (yüksek seviye, %1) hem de negatif (düşük seviye, %0.1)** bileşenlerden oluşmuştur. **Besiyeri C**, istatistiksel olarak önemli sadece **pozitif (yüksek seviye, %1)** etkiye sahip olan bileşenlerden oluşmuştur. En iyi besiyeri kompozisyonunun belirlenmesinde, inülinaz aktivitesi (I_{ase} , U/mL), sukraz aktivitesi (S_{ase} , U/mL), I/S oranı, protein miktarı (mg/mL), spesifik inülinaz aktivitesi (SI_{ase} , U/mg), spesifik sukraz aktivitesi (SS_{ase} , U/mg), maksimum üretim hızı ($Q_{I_{ase}}$, U/mL/gün), maksimum tüketim hızı ($Q_{şeker}$, g/L/gün), şeker kullanım oranı (SUY , %) ve besiyerinin son pH'ı gibi değerler baz alınmıştır. Değerler arasındaki istatistiksel fark ve optimum besiyeri kompozisyonu, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlenmiştir. Daha sonra, en iyi besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyon denemesinin deneysel verileri 11 farklı matematiksel model ile fit edildikten sonra fermentasyon için en iyi matematiksel model(ler) belirlenmiştir (Bölüm 3.23).

3.9. Besiyeri Kompozisyonunun MKD ile Optimizasyonu

PBD ile belirlenen ve inülinaz aktivitesini önemli ölçüde etkileyen besiyeri bileşenleri, Design-Expert® (Version 7.0.0, Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) istatistik programı aracılığıyla Cevap Yüzey Metodolojisinin (RSM) MKD'si kullanılarak optimize edilmiştir. Her faktör, 5 farklı seviyede incelenmiş olup faktör seviyeleri PBD'den elde edilen sonuçlara göre Bölüm 4.4'te verilmiştir. Besiyeri bileşenlerinin MKD tarafından önerilen miktarları başlangıç şeker konsantrasyonu 4°Bx'e ayarlanan melasa eklendikten sonra hazırlanan besiyerinin başlangıç pH değeri 4 N NaOH ve HCl ile 5.0'a ayarlanmış ve 121.1°C'de 15 dk steril edilmiştir. Spor süspansiyonu hazırlanan *A. niger*'in %2'si fermentasyon ortamına aseptik koşullar altında inoküle edildikten sonra, çalkalamalı inkübatörde (CERTOMAT® IS, Goettingen, Almanya) ve 250 mL'lik flasklarda 100 mL besiyeri ortamında gerçekleştirilen fermentasyonların sıcaklığı 30°C'ye ve karıştırma hızı 200 dev/dk'ye ayarlanmıştır.

MKD, nötr noktaların (α) kullanılmasıyla geliştirilen merkez noktalı faktöriyel bir tasarımıdır. Tasarım alanının ortasından belirli bir faktöriyel noktaya olan uzaklık her faktör için ± 1 birim ise, tasarım alanının merkezinden nötr noktasına olan mesafe mutlaka $|\alpha| > 1$ olmalıdır. α değeri istenen tasarımın spesifik özelliklerine bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan modelin doğrulanması gerçekleştirilmiş olup MKD aracılığıyla belirlenen optimum besiyeri kompozisyonunun doğrulanması için fermentasyonlar en az iki kez tekrar edilmiştir. Fermentasyon sonuçları, modelin öngördüğü değerleri ile karşılaştırılmış ve optimum besiyeri kompozisyonu böylece tespit edilmiştir (Izmirlioglu ve Demirci 2016). Optimum besiyeri kompozisyonunun belirlenmesinde inülinaz aktivitesi baz alınmıştır. Belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyondan alınan örneklerde inülinaz aktivitesinin (U/mL) yanı sıra sukraz aktivitesi (U/mL), I/S oranı, protein miktarı (mg/mL), spesifik inülinaz aktivitesi (SI_{ase} , U/mg), spesifik sukraz aktivitesi (SS_{ase} , U/mg), maksimum üretim hızı (Q_P ,

U/mL/gün), maksimum tüketim hızı (Q_s , g/L/gün), şeker kullanım oranı (SUY , %), fermentasyonun sonundaki biyokütle miktarı (X , g/L) ve besiyerinin son pH'ı gibi değerler belirlenmiştir. Daha sonra, MKD ile belirlenen optimum besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyon denemesinin deneysel verileri 11 farklı matematiksel model ile tahmin edildikten sonra fermentasyon için en iyi matematiksel model(ler) belirlenmiştir (Bölüm 3.23).

3.10. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde İnülinaz Üretimi

MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarında pH kontrollü ve kontrolsüz fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. **pH kontrollü fermentasyon**, 5-L hacmi olan bir kap ile donatılmış (3-L çalışma hacmi) Sartorius Bioastad B Plus Biyoreaktörde (Goettingen, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon; 4 °Bx başlangıç şeker konsantrasyonu, 30°C sıcaklık, 200 dev/dk karıştırma hızı, havasız (0 vvm) veya havalandırmalı (1 vvm) ortam, pH 5.0 ve %2 (h/h) inokülasyon oranı koşullarında gerçekleştirilmiş olup ortamın pH'ı 4 N NaOH ve HCl ile kontrol edilmiştir. **pH kontrolsüz fermentasyon**, 5-L hacmi olan bir kap ile donatılmış (3-L çalışma hacmi) Sartorius Bioastad B Plus Biyoreaktörde (Goettingen, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ortamının başlangıç şeker konsantrasyonu 4 °Bx'e ayarlanıp besiyeri bileşenleri eklendikten ve besiyerinin başlangıç pH'ı 4 N HCl ile 5.0'a ayarlandıktan sonra fermentasyon; 30°C sıcaklık, 200 dev/dk karıştırma hızı, havalandırmaz (0 vvm) veya havalandırmalı (1 vvm) ortam ve %2 (h/h) inokülasyon oranı koşullarında gerçekleştirilmiştir. pH kontrolsüz fermentasyonlarda örneğin alındığı zaman pH değeri not edilmiştir. Havalandırma yapılan fermentasyonların karıştırma hızı 200 dev/dk'de başlatılmış ve fermentasyon ilerledikçe karıştırma hızı 600 dev/dk'ye kadar kademeli olarak artırılmıştır. İnokülasyon öncesi ve sonrası örnekler alındıktan sonra her gün fermentasyonun başlatıldığı zamanda örnekler alınmış ve örneklerde toplam indirgen şeker analizinin yanı sıra *Iase* aktivitesi, *Sase* aktivitesi ve protein miktarı analizleri yapılarak I/S oranı, spesifik *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri de hesaplanmıştır.

3.11. Büyük Ölçekli Biyoreaktörde (30-L) İnülinaz Üretimi

Büyük ölçekli (30-L) karıştırmalı tank biyoreaktörde (Sartorius Bioastad C Plus Biyoreaktör, Goettingen, Almanya), pH kontrollü (5.0) ve havalandırmalı (0.3-0.5 vvm) ortamda inülinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Besiyeri, başlangıç şeker içeriği 4°Bx'e ayarlandıktan sonra %4.20 maya ekstraktı ile zenginleştirilmiştir. Fermentasyon ortamı steril edilindikten sonra besiyerinin başlangıç pH değeri 4 N NaOH ve 2 N HCl ile 5.0'a ayarlanmış ve sıcaklık 30°C'ye set edilmiştir. Fermentasyon ortamı, %0.001 steril Tween-80 çözeltinde hazırlanan spor solüsyonu (600 mL, 2%, h/h) ile inoküle edildikten sonra karıştırma hızı ve havalandırma 100 dev/dk ve 0.3 vvm'e ayarlanmıştır. Çünkü aşırı köpürmenin önlenmesi ve böylece küflerin yukarı taşınması engellenmelidir. Fermentasyonun 1. gününün sonunda havalandırma hızı 0.5 vvm'e sabitlenmiştir. Bununla beraber, karıştırma hızı da 100 dev/dk'den 200 dev/dk'ye kademeli olarak artırılmıştır. İnokülasyon öncesi ve sonrasında örnekler alındıktan sonra her gün fermentasyonun başlatıldığı saatte örnekler alınmış olup kalıntı şeker miktarı, enzim aktivitesi ve protein miktarı için analiz edilene kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.12. Santrifüj-Süre Kombinasyonu ve UF Prosesi ile Kısmi Saflaştırma

Fermentasyon sonrası elde edilen ham enzim solüsyonunu safsızlıklardan ayırmak, kısmi olarak saflaştırmak ve konsantre etmek amacıyla santrifüj-süre kombinasyonu ve UF prosesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, MKD ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sıvısı kullanılmıştır. Önce santrifüj-süre kombinasyonu kullanılarak aktivite üzerine etkisi incelendikten sonra belirlenen en iyi santrifüj-süre kombinasyonunda supernatant santrifüjlendikten sonra UF prosesi gerçekleştirilmiştir. Tüm santrifüj-süre kombinasyonu ve UF denemeleri en az iki kez tekrar edilmiştir.

3.12.1. Santrifüj-süre kombinasyonu

Santrifüj prosesinin aktivite üzerine etkisini tespit etmek amacıyla 3 farklı çevirme hızı (1377 g (4000 rpm) 6973 g (9000 rpm) ve 16873 g (14000 rpm)) ve 3 farklı süre (5, 10 ve 15 dk) kombinasyonları denenmiştir (Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4. Santrifüj-süre kombinasyonuna ait deneme deseni

Deneme	Çevirme hızı (g)	Süre (dk)
Kontrol	0	0
1	1377 ^a	5
2	1377	10
3	1377	15
4	6973 ^b	5
5	6973	10
6	6973	15
7	16873 ^c	5
8	16873	10
9	16873	15

a: 4000 rpm, b: 9000 rpm ve c: 14000 rpm

Denemeler gerçekleştirildikten sonra katı partiküllerden ayrılmış üstte kalan berrak kısımda inülinaz aktivitesi ve toplam protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden yararlanarak *SIase*, verim artışı ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırma katsayısını belirlemedeki amaç, santrifüj-süre kombinasyonunun konsantrasyon amacıyla kullanılabilirliğini belirlemektir.

3.12.2. Ultrafiltrasyon

Bölüm 3.12.1'den elde edilen en iyi santrifüj-süre kombinasyonu tespit edildikten sonra, elde edilen enzim solüsyonunun UF prosesi ile kısmi saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Öncelikle fermentasyon sıvısına belirlenen en iyi santrifüj-süre kombinasyonu uygulanmıştır. Daha sonra elde edilen berrak kısım, UF prosesinde kullanılmıştır. Kısmi saflaştırılmış ham enzim solüsyonu elde etmek için laboratuvar tipi Sartocoon Slice 200 model (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Almanya) cihaz ile UF prosesleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, fungal kaynaklı inülinaz enziminin molekül ağırlığı literatürden 50 kDa'nın üzerinde olduğu bildirildiğinden (Chi vd.

2009), bu enzimin kısmi olarak saflaştırılmasında en fazla 4 bar basınca kadar dayanabilen 200 cm² yüzey alanı olan 10 ve 30 kDa'lık ayırma sınırlarına sahip polietersülfon UF kartuşları kullanılmıştır. Belirlenen en iyi santrifüj-süre kombinasyonu kullanılarak elde edilen enzim solüsyonu, UF prosesine dahil edilmeden önce UF kartuşları cihaza yerleştirildikten sonra 2000 mL deiyonize su geçirilerek UF kartuşun stok çözeltisi (%20'lik etanol:su karışımı) uzaklaştırılmıştır. Daha sonra UF kartuştan 100 mL enzim çözeltisi geçirilerek membran şartlandırılmıştır. Membranın şartlanmasından hemen sonra UF prosesine 500 mL enzim solüsyonu ile başlanmıştır. Bu proses, 50 mL retentat ve 450 mL permeat olacak şekilde devam etmiştir. Şu halde UF prosesi, hacmen %10 retentat ve %90 permeat olacak şekilde ayarlanmıştır. Retentat ve permeattan alınan örneklerde inülinaz aktivitesi ve toplam protein miktarı analizleri yapılmış olup spesifik inülinaz aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırma katsayısının hesaplanmasıyla birlikte prosesin etkinliği de belirlenmiştir. UF prosesi tamamlandıktan sonra öncelikle sistemden 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir. Daha sonra 50°C'ye ısıtılmış 1 N NaOH çözeltisinin sistemde 1 saat boyunca sirkülasyonu sağlanmıştır. 1 saatin sonunda bazik çözelti permeat vanası açılarak sistemden uzaklaştırılmıştır. Ardından bazik çözeltiyi tamamen uzaklaştırmak için sistemden 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir. Daha sonra sistemden 500 mL %20'lik etanol:su karışımı geçirilerek ultra filtre kartuşun tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Proses tamamlandıktan sonra temizlenen ultra filtre kartuş %20'lik etanol:su karışımında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.13. Enzimin Substrat Spesifikliği ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

A. niger ile üretilen inülinaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesinde substrat olarak inülin ve sukroz kullanılmıştır. Bununla beraber, kinetik parametrelerin ve substrat spesifikliğinin belirlenmesinde iki farklı fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonu kullanılmıştır. Bunların ilki, Bölüm 4.1'de çalkalamalı flask fermentasyon ile melastan elde edilen enzim solüsyonudur. İkincisi ise, pH kontrolsüz ve havalandırılmalı biyoreaktördeki fermentasyon ile melastan elde edilen ham enzim solüsyonudur. Optimum pH değerine sahip 100 mM Na-asetat tamponu ile inülin ve sukrozdan farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmış ve enzim aktivitesi analizlerinde substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aracılığıyla substrat-enzim aktivitesi grafiği GraphPad Prism 7 programı (Versiyon 7.03, GraphPad Software, Inc.) kullanılarak elde edilmiştir. Oluşturulan grafikten enzimin substrat ilgisi ve enzimin hızı hakkında bilgi veren Michaelis-Menten sabiti (K_m), maksimum enzim aktivitesi (V_{max}) ve belirleme katsayısı (R^2) değerleri hesaplanmıştır. Bununla beraber, K_m , V_{max} ve R^2 değerleri Lineweaver-Burk grafiği, Eadie-Hofstee grafiği ve Hanes-Woolf grafiği aracılığıyla da hesaplanmış ve GraphPad Prism 7 programı kullanılarak elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Ardından kullanılan enzim solüsyonunun toplam protein miktarı belirlenerek spesifik inülinaz ve sukraz aktivitesi değerleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, enzimin substrat spesifikliğine ait deneysel veriler 10 farklı matematiksel model ile tahmin edildikten sonra enzimin substrat spesifikliği ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi için en iyi matematiksel model(ler) belirlenmiştir (Bölüm 3.24).

3.14. Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesi analizinde reaksiyon ortamına (%2 (a/h) inülin veya sukroz içeren çözelti üzerine) eklenen ham enzim solüsyonu miktarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş olup bu amaçla reaksiyon ortamına 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 180 ve 200 µL ham enzim solüsyonu eklenerek inülinaz ve sukraz analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca spesifik inülinaz ve sukraz aktivitelerini de hesaplamak için kullanılan ham enzim solüsyonunun toplam protein miktarı belirlenmiştir. Bununla beraber I/S oranının değişen enzim konsantrasyonu ile nasıl değiştiği de açıklanmıştır.

3.15. Farklı Reaktiflerin Aktivite Üzerine Etkisi

Aktivite değeri belirlenmiş olan ham enzim solüsyonuna farklı reaktiflerin eklenmesi ile aktivite değerlerindeki değişimin nasıl olduğu incelenmiştir. Bu amaçla 100 mM Na-asetat tamponunda (pH 4.8) 1 mM hazırlanan metal iyonları (Li^+ , Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} ve Cu^{2+}) ile 50°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 30 dk boyunca buz içerisinde soğutulmuştur. Ardından enzimin optimum çalışma koşullarında enzim aktivitesi analizi yapılarak enzimin aktivite kaybı veya artışı belirlenmiştir (Katrolia vd. 2012).

3.16. E_a , A , Q_{10} -Değeri, Termal İnaktivasyon ve Termodinamik Parametreler

Farklı sıcaklıklarda ($T^\circ\text{C}$) inülinaz ve sukraz (V) analizleri yapılmıştır. Daha sonra $1/T$ (K°)'ye karşı $\ln(V)$ değerlerinin grafiği çizilerek negatif eğimli bir doğru elde edilmiştir. Doğrunun eğimi $-E_a/R$ 'dir. R değeri sabit olduğu için (8.314 J/molK veya 1.987 cal/molK) aktivasyon enerjisi kolaylıkla hesaplanmıştır. Bu doğru $y = -ax + b$ şeklinde bir doğru olduğundan dolayı Frekans faktörü (A) de " b " değerinden hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2015). Diğer yandan, I_{ase} ve S_{ase} aktivitelerin termal inaktivasyon ve termodinamik parametreleri de Bölüm 3.17'deki formüller aracılığıyla hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2015; Pal ve Khanum 2011).

3.17. Termostabilite ve Termodinamik Parametreler

Yüksek sıcaklıkta inülinaz enziminin ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, enzim solüsyonu (2 mL) 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda 6 saat boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir. İlk 30 dk ve sonraki her saat, inkübe edilen enzim solüsyonundan 100 µL örnek alınarak kalan aktivite ölçülmüş ve böylece termostabilite hesaplanmıştır. Veriler, %100 etkinlik için normalize edilmiştir. En yüksek enzim aktivite değeri %100 olarak tanımlanmış ve her sıcaklık nispeten %100'ün bir yüzdesi olarak tanımlanmıştır. Diğer yandan, inülinaz enziminin termodinamik parametreleri, termostabilite analizinden elde edilen değerler ile aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2015; Pal ve Khanum 2011). Öncelikle, inülinaz enziminin termostabilitesi ile ilgili analizinden elde edilen veriler kullanılarak inaktivasyon hız sabiti (k_d , sa^{-1}) hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4).

$$k_d = \left(\frac{2.303}{t} \right) \times \log \left(\frac{A_0}{A} \right) \quad (3.4)$$

İnaktivasyon hız sabiti değerleri kullanılarak inülinazın yarı ömrü ($t_{1/2}$, sa) Eşitlik 3.5 ile hesaplanmıştır.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (3.5)$$

D-değeri (sa), desimal azalma süresi veya bir enzimin sabit bir sıcaklıkta %90'ının inaktivasyonunu sağlamak için gereken süre olarak adlandırılır. İnülinaz enziminin D-değerleri, Eşitlik 3.6 ile hesaplanmıştır.

$$D - \text{değeri} = \frac{\ln 10}{k_d} \quad (3.6)$$

İnülinaz enziminin inaktivasyon enerjisi (E_{ia} , kJ/mol), mutlak sıcaklığın tersine ($1/K$) karşı aktivite değerlerinin logaritması ($\ln V$) Arhenius grafiğine konularak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.7 ve 3.8).

$$V = A \times e^{E_a/(RT)} \quad (3.7)$$

$$E_{\text{ğim}} = \frac{E_{ia}}{R} \quad (3.8)$$

Q_{10} -değeri, bir enzimatik reaksiyonda sıcaklığın 10°C artması ile reaksiyon hızının kaç kat artacağını ifade eder. Bu değer, boyutsuz bir büyüklüktür. Eşitlik 3.9, Q_{10} -değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$Q_{10} - \text{değeri} = \frac{V_{max_2}}{V_{max_1}} \quad (3.9)$$

Diğer yandan, Z-değeri ($^\circ\text{C}$) de hesaplanmıştır (Eşitlik 3.10). Z-değeri, bir enzimin sabit bir sıcaklıktaki desimal azalma süresinin (yani D-değerinin) 10 kat azalması için bu sıcaklığın kaç derece artırılması gerektiğini ifade eder. Z-değeri, sıcaklık ($^\circ\text{C}$) değerlerine karşı log D değerleri arasındaki grafiğin eğiminden hesaplanmıştır.

$$E_{\text{ğim}} = \frac{-1}{Z} \quad (3.10)$$

İnülinaz enziminin termal denatürasyonu sırasında entalpi (ΔH , kJ/mol, Eşitlik 3.11), serbest enerji (ΔG , kJ/mol, Eşitlik 3.12) ve entropideki (ΔS , J/molK, Eşitlik 3.13) değişim, aşağıdaki eşitliklerin yardımıyla belirlenmiştir:

$$\Delta H = E_{ia} - RT \quad (3.11)$$

$$\Delta G = -R \times T \times \ln\left(\frac{k_d \times h}{k_b \times T}\right) \quad (3.12)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (3.13)$$

Burada,

k_d = inaktivasyon hız sabiti (sa^{-1})

t = süre (sa)

A_0 = nisbi başlangıç enzim aktivitesi (%)

A = inaktivasyon sıcaklıklarındaki nisbi enzim aktivitesi (%)

E_{ia} = inaktivasyon enerjisi (kJ/mol)

T = mutlak sıcaklık (K)

R = universal gaz sabiti (8.314 J/molK)

h = Planck sabiti (6.626×10^{-34} J×san)

k_b = Boltzman sabiti (1.38×10^{-23} J/K)

3.18. İnülinaz ve Sukraz Analizi

Örneklerde inülinaz ve sukraz aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla, enzim aktivite değerlerinin belirlenmesinde 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılmıştır (Miller 1959). Enzim analizini gerçekleştirmek için substrat olarak 100 mM Na-asetat tamponunda (**pH 4.8**) %2'lik (a/h) inülin ve sukroz çözeltisi hazırlanmıştır. 900 μL substrat çözeltisi, 100 mM Na-asetat tamponu (**pH 4.8**) ile seyreltilmiş (10-2000 kat) enzim solüsyonunun 100 μL 'si ile test tüpünde karıştırılmıştır. Su banyosunda **60°C**'de **10 dk** inkübasyondan (1. inkübasyon) sonra 1500 μL DNS çözeltisi test tüplerine eklenmiştir. Bununla beraber kontrol örneği ile kör hazırlanmıştır. Kontrol örneği, sırasıyla test tüpünün içerisine önce 100 μL enzim solüsyonu, sonra 1500 μL DNS çözeltisi, daha sonra da 900 μL substrat (inülin veya sukroz çözeltisi) eklenerek hazırlanmıştır. Kör ise test tüpünün içerisine 100 μL deiyonize su, 900 μL substrat ve 1500 μL DNS çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Kontrol örneği ve kör, 1. inkübasyona dâhil edilmemiştir. Kontrol örneğinin hazırlanmasının nedeni, enzim tarafından salınmayan veya örnekten gelen indirgen şekerlerin absorbens değerini ölçmektir ($\text{Abs}_{\text{kontrol}}$). Kontrol örneği ile birlikte kör (blank) ve enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tüpler hemen **100°C**'de 10 dk inkübasyona (2. inkübasyon) bırakılmıştır. 2. inkübasyonun nedeni, enzimatik reaksiyonu durdurmak ve enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimini sağlamaktır. Elde edilen örnekler, köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution, Şangay, Çin) ölçülerek renk değişimine bağlı olarak hem kontrol örneği için ($\text{Abs}_{\text{kontrol}}$) hem de enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örnekler için ($\text{Abs}_{\text{örnek}}$) absorbens değerleri elde edilmiştir. Enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği test tüplerinde hem örnekten gelen hem de enzimatik reaksiyonun sonucunda oluşan indirgen şekerler bulunmaktadır. Dolayısıyla, kontrol örneğinin kullanılmasıyla ölçülen absorbens değeri ($\text{Abs}_{\text{kontrol}}$) daha sonra enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği test tüplerinden elde edilen absorbens değerinden ($\text{Abs}_{\text{örnek}}$) çıkartılmıştır [$\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}$]. Böylece enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin absorbens değeri hesaplanmıştır. Bu değer [$\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}$], fruktoz standart kurvesinden yararlanılarak enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Enzim analizinde kullanmak için hazırlanan fruktoz standart kurvesi EK-1'de verilmiş olup oluşturulan denklem aşağıdaki gibidir (Eşitlik 3.14).

$$y = 3.8983 \times [\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}] - 0.0156 \quad (3.14)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/mL}$)

$[\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}]$ = kontrol örneği ile enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örneğin 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri arasındaki fark

İnülinaz ve sukraz aktivitesinin U/mL cinsinden hesaplanması Eşitlik 3.15 ile gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mL)} = \frac{y \times R_v \times D_f}{t} \quad (3.15)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/mL}$)

$R_v = \frac{\text{Test tüpünün toplam hacmi (mL)}}{\text{Enzim solüsyonunun hacmi (mL)}}$

D_f = dilüsyon faktörü veya seyreltme katsayısı

t = reaksiyon süresi (dk)

3.19. SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), OWL P8D8 cihazında (ThermoScientific, IL, ABD) gradient jel (%5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli, 0.8 mm) hazırlanarak yapılmıştır. Fermentasyon sonrasında elde edilen fermentasyon sıvısı kaba filtreden geçirildikten sonra 16873 g çevirme hızında 5 dk santrifüj edilmiştir. Bununla beraber, elde edilen supernatantlar daha sonra 10 kDa, 30 kDa ve 50 kDa Spin-X UF membranları ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Santrifüjleme sonrası elde edilen supernatant ve UF prosesinden elde edilen retentat ve permeatlar, toplam 50 μL olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromfenol mavisi, %40 gliserol ve 100 mM DTT ile karıştırılarak 70°C sıcaklıkta 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra hazırlanan örneklerin 25 μL 'si, hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, jelin, 1X TGS tamponunda (0.025 M Tris bazı, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) 150 V akımda 1 saat yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Sonrasında jeller, IRDye® Blue Protein Stain (Li-Cor, NE, ABD) ile 1 saat orbiatal çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boyası giderilene kadar metanol-asetik asit çözeltisinde yıkandıktan sonra Odyssey® FC görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE, ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak, PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır (Ersöz 2016).

3.20. Biyokütle Analizi

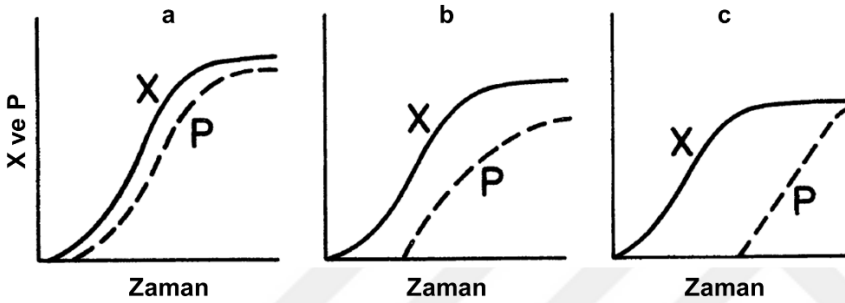
Fermentasyon sonunda, toplam biyokütle analizi gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla 65°C'de kurutulduktan sonra darası alınmış petri+filtre kâğıdı kullanılmıştır. Analiz kapsamında fermentasyon sıvısı, filtre kâğıdından süzülükten sonra petri üzerinde etüvde 24 saat boyunca 65°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Desikatörde soğutulduktan sonra sabit tartıma gelene kadar her 24 saatte bir tartım alınmıştır (Karahalil vd. 2017).

3.21. pH Analizi

Fermentasyon tamamlandıktan sonra elde edilen fermentasyon sıvılarının pH'ları, pH metre (Mettler-Toledo, FE20-ATC Kit FiveEasy™ Benchtop pH Metre, Columbia, MD, USA), pH'ı 4.01 ve 7.0 olan kalibrasyon sıvıları ile kalibre edildikten sonra ölçülmüştür (Cemeroğlu 2010).

3.22. Kinetik Modelleme

Mikrobiyal gelişim, ürün oluşumu ve substrat tüketim hızları, biyolojik reaksiyonlar otokatalitik olduğundan genellikle spesifik hızlar şeklinde ifade edilir. Spesifik hızlar, çeşitli fermentasyon şemalarının ve biyokatalizörlerin etkinliğini karşılaştırmak için kullanılır (Shuler vd. 2017). Mikrobiyal ürünler üç ana kategoride sınıflandırılabilir (Şekil 3.1):



Şekil 3.1. Kesikli fermentasyonlardaki ürün oluşumunun kinetik şekilleri: (a) gelişimle ilgili ürün oluşumu, (b) karışık gelişimle ilgili ürün oluşumu ve (c) gelişimden bağımsız ürün oluşumu (Shuler vd. 2017)

i. Gelişim ile ilgili ürünler, mikrobiyal büyüme ile eş zamanlı olarak üretilir. Spesifik ürün oluşum hızı, spesifik gelişim hızıyla orantılıdır. Yapısal bir enzimin üretimi, gelişimle ilgili ürünün bir örneğidir (Shuler vd. 2017).

ii. Gelişimden bağımsız ürün oluşumu, gelişim hızı sıfır olduğunda, durağan fazda meydana gelir. Spesifik ürün oluşum hızı sabittir. Antibiyotikler (örneğin penisilin) gibi çoğu ikincil metabolit, gelişimden bağımsız ürünlerdir (Shuler vd. 2017).

iii. Karışık gelişim ile ilgili ürün oluşumu, yavaş gelişim ve durağan fazlarda meydana gelir. Bu durumda, spesifik ürün oluşum hızı Eşitlik 3.19 ile verilir. Hücre kültüründen laktik asit fermentasyonu, ksantan gam ve sekonder bazı metabolitler, karışık gelişim ile ilgili ürünlerin örnekleridir (Shuler vd. 2017).

3.22.1. Hücre gelişim kinetiği

Hücre gelişim kinetiği, birçok fermentasyon sisteminde lojistik denklem ile ifade edilir; bu, log fazın başlangıcından durağan faza kadar hücre gelişimini temsil eder (yavaşlama fazı dâhil) (Pearl ve Reed 1920). Lojistik denklem, aşağıdaki gibi yazılır (Eşitlik 3.16):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \quad (3.16)$$

Burada; X_{max} , maksimum biyokütle konsantrasyonudur (g/L). Eşitlik 3.16'nın uygun başlangıç koşullarında ($t = 0$ da $X = X_0$) integrali alınırsa Eşitlik 3.17 elde edilir.

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu_{max} t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu_{max} t})} \quad (3.17)$$

Veya Eşitlik 3.17 yeniden düzenlendiğinde Eşitlik 3.18 elde edilir.

$$\ln \left(\frac{X}{X_{max} - X} \right) = \mu_{max} t - \ln \left(\frac{X_{max} - X_0}{X_0} \right) \quad (3.18)$$

X_{max} , doğrudan deneysel verilerden kullanılabilir. $\ln \left(\frac{X}{X_{max} - X} \right)$ 'nin t 'ye karşı grafiği çizildiğinde, μ_{max} ve X_0 , sırasıyla grafiğin eğimi ve y -eksenini kesen noktadan hesaplanabilir (Şekil 3.2a ve Şekil 3.3a).

3.22.2. Ürün oluşum kinetiği

Ürün oluşumu için Luedeking Piret (LP) modeli (Eşitlik 3.19) en yaygın kullanılan yapısal olmayan kinetik modeldir (Luedeking ve Piret 1959). LP modelin, MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel üretim verilerini tanımlamak için kullanılmıştır. Eşitlik 3.19'da görüldüğü gibi, ürün oluşum hızı, doğrusal bir şekilde X ve dX/dt 'ye bağlıdır.

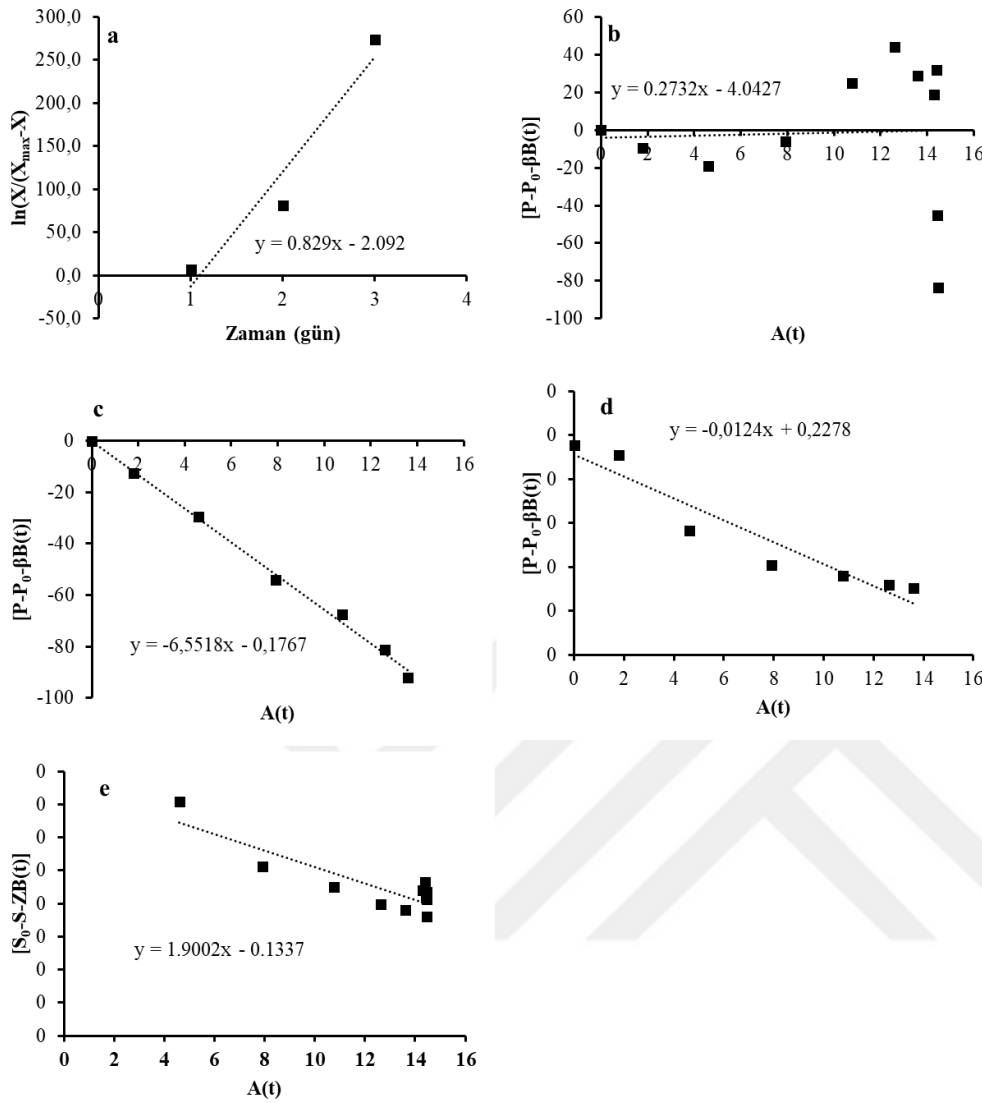
$$\frac{dP}{dt} = a \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3.19)$$

Burada; a ve β , fermentasyon koşulu ile değişebilen ürün oluşum sabitleridir. Eğer $a \neq 0$ and $\beta = 0$ ise ürün oluşumu gelişim ile ilgilidir. Eğer $a \neq 0$ and $\beta \neq 0$ ise ürün oluşumu karışık gelişim ile ilgilidir. Eğer $a = 0$ and $\beta \neq 0$ ise ürün oluşumu gelişim ile ilgili değildir (Don ve Shoparwe 2010). β değeri (Eşitlik 3.20), durağan fazdaki verilerden kolaylıkla hesaplanabilir. Durağan fazda $X = X_{max}$ ve $dX/dt = 0$ 'dır.

$$\beta = \frac{(dP/dt)_{durağan}}{X_{max}} \quad (3.20)$$

Ürün (P), Eşitlik 3.19'dan aşağıdaki gibi zamanın bir fonksiyonu olarak elde edilir (Eşitlik 3.21).

$$dP = a dX + \beta \int X(t) d(t) \quad (3.21)$$



Şekil 3.2. PBD için X_0 , μ_{max} (a) α (b, c ve d) ve γ (e) değerlerinin belirlenmesi

$X(t)$ için Eşitlik 3.17 kullanılarak, Eşitlik 3.21'in $t = 0$ 'da $P = P_0$ başlangıç koşulunda integrali alındığında, zamanla ürün konsantrasyonunun değişimi, aşağıdaki denklemle belirlenebilir (Eşitlik 3.22).

$$P = P_0 + aX_0 \left(\frac{e^{\mu_{max}t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}}(1 - e^{\mu_{max}t})} - 1 \right) + \beta \frac{X_{max}}{\mu_{max}} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{max}}(1 - e^{\mu_{max}t}) \right) \quad (3.22)$$

Eşitlik 3.22, ayrıca aşağıdaki gibi yazılabilir (Eşitlik 3.23).

$$P = P_0 + aA(t) + \beta B(t) \quad (3.23)$$

Burada;

$$A(t) = X_0 \left(\frac{e^{\mu_{max} t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu_{max} t})} - 1 \right)$$

$$B(t) = \frac{X_{max}}{\mu_{max}} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu_{max} t}) \right).$$

$[P - P_0 - \beta B(t)]$ 'nin $A(t)$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde, gelişime bağlı ürün oluşum sabiti (a), grafiğin eğiminden hesaplanabilir (Şekil 3.2b, c ve d ve Şekil 3.3b, c ve d).

3.22.3. Şeker tüketim kinetiği

Substrat tüketim oranı, hücre kütlesi ve ürüne substrat dönüşümünü ve bakım için substrat tüketimini hesaba katan Modifiye Luedeking Piret (MLP) modeli (Eşitlik 3.24) ile temsil edilir (Mohammad vd. 1995). MLP modeli, MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi ile ilgili deneysel verileri tanımlamak için kullanılmıştır.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y^0_{X/S}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y^0_{P/S}} \frac{dP}{dt} + mX \quad (3.24)$$

Burada; m , hücre bakımını desteklemek için kullanılan substratı temsil eder.

Eşitlik 3.19 Eşitlik 3.24'e yazıldığında, Eşitlik 3.25 elde edilir.

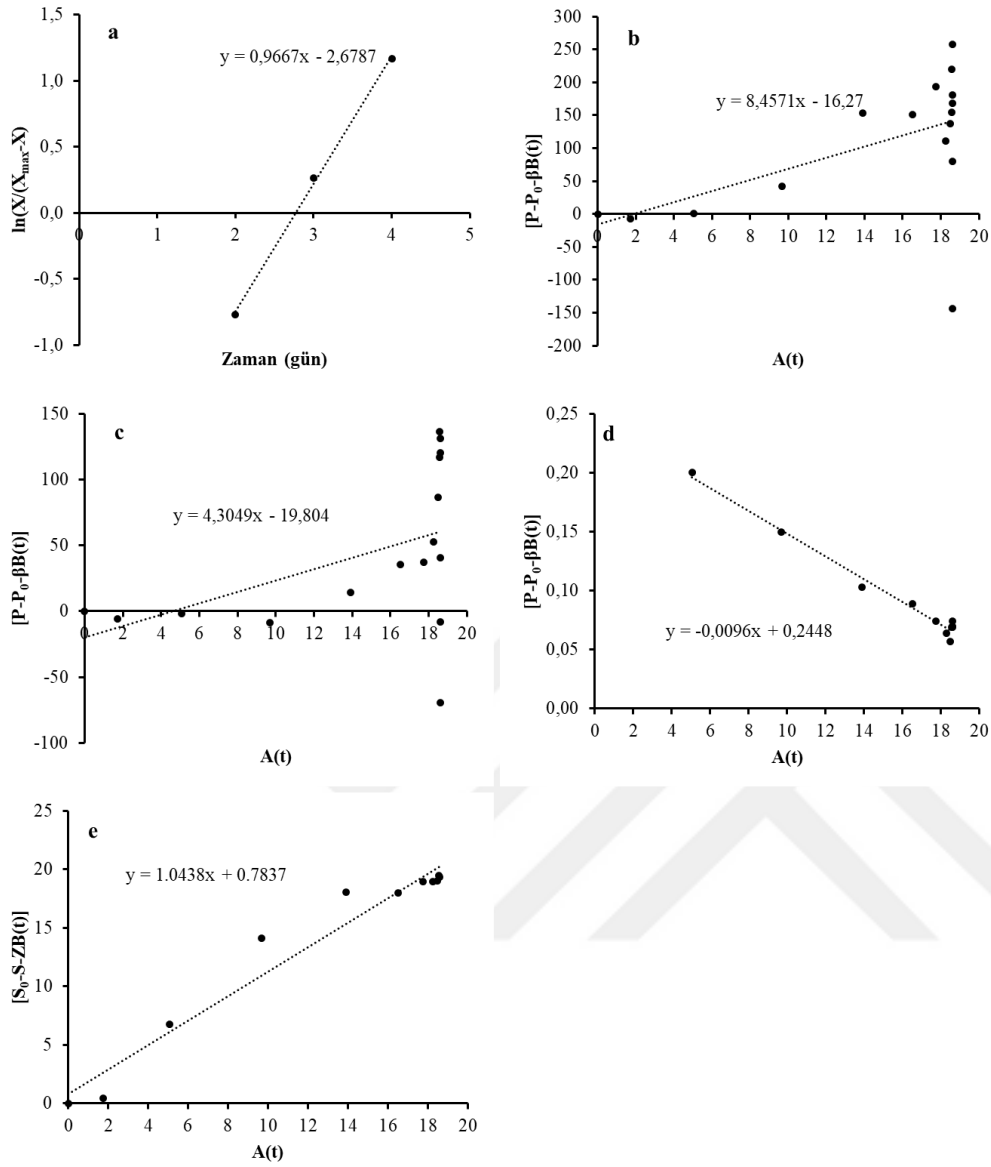
$$-\frac{dS}{dt} = \left[\frac{1}{Y^0_{X/S}} + \frac{a}{Y^0_{P/S}} \right] \frac{dX}{dt} + \left[\frac{\beta}{Y^0_{P/S}} + m \right] X \quad (3.25)$$

Durağan fazda $dX/dt = 0$ ve $X = X_{max}$ 'tır. Dolayısıyla, Eşitlik 3.25'e yerleştirildiğinde Eşitlik 3.26 elde edilir.

$$\frac{\beta}{Y^0_{P/S}} + m = Z = \frac{-(dS/dt)_{stationary}}{X_{max}} \quad (3.26)$$

Substrat (S), Eşitlik 3.25'ten aşağıdaki gibi zamanın bir fonksiyonu olarak elde edilir (Eşitlik 3.27).

$$-dS = \left[\frac{1}{Y^0_{X/S}} + \frac{a}{Y^0_{P/S}} \right] dX + Z \int X(t) d(t) \quad (3.27)$$



Şekil 3.3. MKD için X_0 , μ_{max} (a) α (b, c ve d) ve γ (e) değerlerinin belirlenmesi

Eğer, Eşitlik 3.17, Eşitlik 3.27 içerisine eklenirse ve $S = S_0$ için $t = 0$ sınır değerlerinde integrali alındığında, Eşitlik 3.28 elde edilir.

$$S = S_0 - \left[\frac{1}{Y_{0\frac{X}{S}}} + \frac{a}{Y_{0\frac{P}{S}}} \right] X_0 \left(\frac{e^{\mu_{max}t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}}(1 - e^{\mu_{max}t})} - 1 \right) - Z \frac{X_{max}}{\mu_{max}} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{max}}(1 - e^{\mu_{max}t}) \right) \quad (3.28)$$

$$\left[\frac{1}{Y_{X/S}^0} + \frac{a}{Y_{P/S}^0} \right] = \gamma'yı \text{ bulmak için Eşitlik 3.28 aşağıdaki gibi yazılır (Eşitlik}$$

3.29).

$$S = S_0 - \gamma A(t) - ZB(t) \quad (3.29)$$

$[S_0 - S - ZB(t)]$ 'nin $A(t)$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde, γ , grafiğin eğiminden bulunur (Şekil 3.2e ve Şekil 3.3e).

3.23. Fermentasyonların Modellenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Bu çalışmada, PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri koşullarında gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları matematiksel modeller ile modellenmiştir. Bu amaçla, optimal besiyeri koşulları ile gerçekleştirilen fermentasyonların inülinaz üretimi, sukraz üretimi, I/S oranı, spesifik inülinaz aktivitesi, spesifik sukraz aktivitesi ve protein miktarının deneysel verilerini tahmin etmek için 11 farklı matematiksel model kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Optimal koşullarda gerçekleştirilen en az iki fermentasyonun deneysel sonuçlarının ortalama değerleri, kullanılan matematiksel modellerin en uygununu belirlemek için kullanılmıştır. Modellemelerde, Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılmıştır.

Önemli not: Baranyi ve Huang modelleri (Çizelge 3.5), fermentasyonların enzim aktivitesi ile ilgili deneysel verilerinin tahmininde kullanıldığında, aktivite değerleri belirli bir değerin üzerine ulaştığında, söz konusu modeller, deneysel verileri tahmin etmede başarısız olmuştur. Hesaplamalarda kullanılan Excel 2013 programı hata vermiştir. Bu sorunu çözmek için, deneysel değerler, verinin büyüklüğüne bağlı olarak 10'a veya 20'ye bölündükten sonra model parametreleri hesaplanmıştır. Daha sonra, bölünmüş deneysel değerler, tahmin edildikten sonra tekrar 10 veya 20 ile çarpılmış ve olması gereken tahmin verileri elde edilmiştir. Bu veriler kullanılarak, modeller karşılaştırılmış ve deneysel kinetik parametreler tahmin edilmiştir. Böyle hatalarla karşılaşmamak için Exel 2013 programı yerine MATLAB, MAPLESOFT ve OriginPro gibi programların kullanılması önerilmektedir.

Burada (Çizelge 3.5),

A_t = " t "inci zamanda tahmin edilen değerler (g/L, U/mL veya U/mg)

A_m = maksimum asimptot (g/L, U/mL veya U/mg)

Q = maksimum üretim (Q_{Iase} , Q_{Sase} , U/mL/sa veya U/mL/gün), spesifik üretim (Q_{SIase} , Q_{SSase} , U/mg/sa veya U/mg/gün) ve tüketim hızları ($Q_{şeker}$, g/L/sa veya g/L/gün),

B_t ve H_t = geçiş fonksiyonları

λ = inülinaz aktivitesi, sukraz aktivitesi, spesifik inülinaz aktivitesi, spesifik sukraz aktivitesi ve şeker tüketimi eğrilerinin gecikme süreleri (sa),

e = Euler sayısı, sabit (2.718)

t = örneğin alındığı zaman (sa veya gün)

v (v_1 , v_2 , v_3 , ve v_4) = birimsiz şekil parametresi. Bu parametreler, en az hata değeri ve 1'e en yakın belirleme katsayısını (R^2) elde etmek amacıyla doğrusal olmayan en küçük kareler regresyon prosedürüyle hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri koşullarında gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verilerini modellemek için kullanılan matematiksel modeller

Model ve parametre sayısı	Model denklemi	Kaynak
MGM (4)	$A_t = A_m \times \exp \left[-\exp \left\{ \frac{Q \times e \times (\lambda - t)}{A_m} + 1 \right\} \right]$	(Zwietering vd. 1990)
MLM (4)	$A_t = A_m \times \left[1 + \exp \left(\frac{4 \times Q \times (\lambda - t)}{A_m} + 2 \right) \right]^{-1}$	(Zwietering vd. 1990)
MRM (5)	$A_t = A_m \times \left[\left\{ 1 + v_1 \times \exp(1 + v_1) \times \exp \left(\frac{Q \times (1 + v_1)^{(1+\frac{1}{v_1})} \times (\lambda - t)}{A_m} \right) \right\}^{\left(\frac{1}{v_1}\right)} \right]^{-1}$	(Zwietering vd. 1990)
Stannard (5)	$A_t = A_m \times \left[1 + \exp \left(-\frac{\beta + Q \times t}{v_2} \right) \right]^{-v_2}$	(Stannard vd. 1985)
Weibull (4)	$A_t = A_m - A_m \times \exp[-(k_1 \times t)^{\delta_1}]$	(Weibull 1951)
MMF (4)	$A_t = A_m - A_m \times [1 + (k_2 \times t)^{\delta_2}]^{-1}$	(Morgan vd. 1975)
Asimetrik (4)	$A_t = A_m \times \left[1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{T_L}\right)^d} \right]$	(Dantigny vd. 2011)
Baranyi (4)	$A_t = Q \times B_t - \ln \left[1 + \frac{\exp(Q \times B_t) - 1}{\exp(A_m - A_0)} \right]$ $B_t = t + \frac{1}{Q} \times \ln[\exp(-Q \times t) + \exp(-h_o) - \exp(-Q \times t - h_o)]$ $h_o = Q \times \lambda$	(Baranyi ve Roberts 1994)
Huang (4)	$A_t = A_m - \ln[\exp(A_0) + [\exp(A_m) - \exp(A_0)] \times \exp(-Q \times H_t)]$ $H_t = t + \frac{1}{a} \times \ln \left[\frac{1 + \exp(-a \times (t - \lambda))}{1 + \exp(a \times \lambda)} \right]$	(Huang 2013)
Fitzhugh (4)	$A_t = A_m \times [1 - \exp(-k_3 \times t)]^{v_3}$	(Fitzhugh 1976)
Cone (4)	$A_t = A_m \times \left[1 + \left(\frac{1}{k_4 \times t} \right)^{v_4} \right]^{-1}$	(Cone vd. 1996)

β = tüketimi ve üretimi kaydırma değeri

h_0 = üretimin ve tüketimin başlangıç fizyolojik durumunu hesaplayan bir parametre (g/L)

d = birimsiz bir dizayn parametresi

$T_L = A_t = A_m/2$ olduğu nokta (sa veya gün)

k (k_1, k_2, k_3 , ve k_4) = cevap değişkeninin potansiyel maksimum değerine yaklaşma oranını yöneten bir parametre

δ (δ_1 ve δ_2) = allometrik sabit

a = gecikme fazı geçiş katsayısı. Huang (2003), $a = 4$ parametresinin Huang modelindeki mikrobiyal gelişim, üretim ve tüketim eğrilerini analiz etmek için uygun olduğunu önermiştir.

Bununla birlikte, kalıntı şeker konsantrasyonunu tahmin etmek amacıyla hesaplanan A_t değerleri, hesaplanan A_m değerinden çıkartılmıştır [$A_m - A_t$]. Diğer yandan, fermentasyonun biyolojik anlamlı parametreleri de matematiksel modellerin daha ileri doğrulanması için modeller ile tahmin edilen değerler kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.30-3.43).

$$\bullet \text{ İnülinaz aktivitesi } (Iase, \text{ U/mL}) = Iase_{max} \quad (3.30)$$

$$\bullet \text{ Sukraz aktivitesi } (Sase, \text{ U/mL}) = Sase_{max} \quad (3.31)$$

$$\bullet \text{ S/I oranı } = Sase_{max}/Iase_{max} \quad (3.32)$$

$$\bullet \text{ Spesifik inülinaz aktivitesi } (SIase, \text{ U/mg}) = SIase_{max} \quad (3.33)$$

$$\bullet \text{ Spesifik sukraz aktivitesi } (SSase, \text{ U/mg}) = SSase_{max} \quad (3.34)$$

$$\bullet \text{ SSase/SIase oranı } = SSase_{max}/SIase_{max} \quad (3.35)$$

$$\bullet \text{ Protein}_{Iase} (\text{ mg/mL}) = Iase_{max}/SIase_{max} \quad (3.36)$$

$$\bullet \text{ Protein}_{Sase} (\text{ mg/mL}) = Sase_{max}/SSase_{max} \quad (3.37)$$

$$\bullet \text{ Maksimum } Iase \text{ üretim hızı } (Q_{Iase}, \text{ U/mL/sa veya U/mL/gün}) = (d_{Iase}/d_t)_{max} \quad (3.38)$$

$$\bullet \text{ Maksimum } Sase \text{ üretim hızı } (Q_{Sase}, \text{ U/mL/sa veya U/mL/gün}) = (d_{Sase}/d_t)_{max} \quad (3.39)$$

$$\bullet \text{ Maksimum } SIase \text{ üretim hızı } (Q_{SIase}, \text{ U/mg/sa veya U/mg/gün}) = (d_{SIase}/d_t)_{max} \quad (3.40)$$

$$\bullet \text{ Maksimum } SSase \text{ üretim hızı } (Q_{SSase}, \text{ U/mg/sa veya U/mg/gün}) = (d_{SSase}/d_t)_{max} \quad (3.41)$$

$$\bullet \text{ Maksimum şeker tüketim hızı } (Q_{şeker}, \text{ g/L/sa veya g/L/gün}) = (-d_{şeker}/d_t)_{max} \quad (3.42)$$

$$\bullet \text{ Şeker kullanım oranı } (SUY, \%) = [(şeker_{max} - şeker_{min})/şeker_{max}] \times 100 \quad (3.43)$$

Burada; $şeker_{max}$ ve $şeker_{min}$ sırasıyla maksimum ve minimum şeker konsantrasyonlarını ifade eder.

3.24. Substrat Spesifikliğinin Modellenmesi ve V_{max} ve K_m 'nin Hesaplanması

Bu çalışmada, optimum enzim analizi koşulları altında enzimin substrat spesifikliğine ait deneysel veriler matematiksel modeller ile modellenmiştir. Bu amaçla, substrat olarak kullanılan inülinin farklı konsantrasyonlarındaki inülinaz aktivitesi ve substrat olarak kullanılan sukrozun farklı konsantrasyonlarındaki sukraz aktivitesi değerlerinin deneysel verilerini tahmin etmek için 10 farklı matematiksel model kullanılmıştır (Çizelge 3.6). En az iki analizin deneysel sonuçlarının ortalama değerleri, matematiksel modelleri uydurmak için kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Optimum enzim analizi koşulları altında enzimin substrat spesifikliğine ait deneysel verileri modellemek için kullanılan matematiksel modeller

Model ve parametre sayısı	Model denklemi	Kaynak
Stannard (5)	$A_S = A_o + [A_m - A_o] \times \left[1 + \exp\left(-\frac{\beta + Q \times [S]}{v_1}\right) \right]^{-v_1}$	(Stannard vd. 1985)
Weibull (4)	$A_S = A_m - [A_m - A_o] \times \exp[-(k_1 \times [S])^{\delta_1}]$	(Weibull 1951)
MMF (4)	$A_t = A_m - [A_m - A_o] \times [1 + (k_2 \times [S])^{\delta_2}]^{-1}$	(Morgan vd. 1975)
Asimetrik (4)	$A_S = A_o + [A_m - A_o] \times \left[1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{[S]}{[S]_L}\right)^d} \right]$	(Dantigny vd. 2011)
Exponansiyel (3)	$A_S = A_m - [A_m - A_o] \times \exp[-k_3 \times [S]]$	(Henderson vd. 2006)
von Bertalanffy (3)	$A_S = A_m \times (1 - \exp[-k_4([S] - [S]_0)])$	(Henderson vd. 2006)
Brody & Monomolecular (3)	$A_S = A_m \times \left[1 - \left(1 - \frac{A_0}{A_m}\right) \times \exp(-k_5 \times [S]) \right]$	(Koya ve Goshu 2013)
Mitscherlich (2)	$A_S = A_m \times [1 - \exp(-k_6 \times e) \times \exp(-k_6 \times [S])]$	(Koya ve Goshu, 2013)
Fitzhugh (4)	$A_S = A_o + (A_m - A_o) \times [1 - \exp(-k_7 \times [S])]^{v_2}$	(Fitzhugh 1976)
Cone (4)	$A_S = A_o + [A_m - A_o] \times \left[1 + \left(\frac{1}{k_8 \times [S]}\right)^{v_3} \right]^{-1}$	(Cone vd. 1996)

Burada (Çizelge 3.6),

A_S = "S"inci substrat konsantrasyonunda tahmin edilen değerler (U/mL veya U/mg)

A_o = düşük asimptot (U/mL veya U/mg)

A_m = yüksek asimptot (U/mL veya U/mg)

Q = maksimum üretim (Q_{Iase} ve Q_{Sase} , U/mL/[S]) ve spesifik üretim (Q_{SIase} ve Q_{SSase} , U/mg/[S]) hızları

e = Euler sayısı (2.718)

$[S]$ = substrat konsantrasyonu (g/L)

v (v_1 , v_2 ve v_3) = birimsiz bir şekil parametresi. Bu parametreler, en az hata değeri ve 1'e en yakın R^2 değerini elde etmek amacıyla doğrusal olmayan en küçük kareler regresyon prosedürüyle hesaplanmıştır.

β = aktiviteyi kaydırma değeri

d = birimsiz bir dizayn parametresi

$[S]_L = A_S = A_m/2$ olduğu nokta (g/L)

$[S]_0$ = denklem ile aktivitenin başlangıç miktarını elde etmek için kullanılır.

k (k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , k_7 ve k_8) = cevap değişkeninin potansiyel maksimum değerine yaklaşma oranını yöneten bir parametre

Modellemelerde, Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılmıştır. Bununla beraber, modellerden tahmin edilen sonuçlar kullanılarak Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee ve Hanes-Woolf hız eşitlikleri ve GraphPad Prism 7 programı aracılığıyla V_{max} , K_m ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

3.25. Matematiksel Modellerin Karşılaştırılması

Bu çalışmada kullanılan matematiksel modellerin karşılaştırılmasında ve en iyi model(ler)in seçilmesinde ortalama karesel hata (RMSE), ortalama mutlak hata (MAE), ortalama standart sapma (MSD), R^2 , eğim (m), Akaike bilgi ölçütü (AIC), ön yargı faktörü (BF) ve kesinlik faktörü (AF) değerleri kullanılmıştır.

RMSE, proseslerin performansını değerlendirmek için standart bir istatistiksel metrik olarak kullanılmış olup Eşitlik 3.44 ile hesaplanmıştır (Chai ve Draxler 2014). MAE de model değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılan bir ölçüt olup Eşitlik 3.45 ile hesaplanmıştır (Chai ve Draxler 2014).

$$RMSE = \sqrt{\left[\sum_{t=1}^n (x_t - y_t)^2 \right] / n}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.44)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n |x_t - y_t|, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.45)$$

Matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilen veriler elde edildikten sonra, tahmin edilen değerlerin deneysel verilere karşı grafiği çizilmiş ve R^2 ve m değerleri, çizilen doğru denklemine göre belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, MSD değerleri de Microsoft Office Excel 2013 programı yardımıyla hesaplanmıştır. Ayrıca, AIC

değerleri, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasında seçim yapmaya yardımcı olan bir ölçüttür. Bu ölçüt kullanılarak, en iyi model, en düşük AIC değerine sahip olan modeldir. Bu ölçüt, modelin noktalarına uymanın yakınlığını ve model tarafından kullanılan parametrelerin sayısını hesaba katar. AIC, Eşitlik 3.46 kullanılarak hesaplanmıştır (Akaike 1974; Henderson vd. 2006).

$$AIC = n \times \ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + 2 \times (N + 1) + \frac{2 \times (N + 1) \times (N + 2)}{(n - N - 2)} \quad (3.46)$$

İlaveten, BF değeri, deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki ortalama fark için bir tahmin değeri olup Eşitlik 3.47 kullanılarak hesaplanmıştır. Herhangi bir yapısal sapma yoksa ve BF değeri 1'e eşit ise tamdır (Cayré vd. 2003; Ross 1996).

$$BF = 10^{\sum_{t=1}^n \frac{\log(x_t/y_t)}{n}}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.47)$$

AF değeri, deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki ortalama mutlak fark için bir tahmin değeri olup Eşitlik 3.48 kullanılarak hesaplanmıştır. Daha büyük değer, daha az kesin tahmin demektir (Cayré vd. 2003; Ross 1996).

$$AF = 10^{\sum_{t=1}^n \frac{|\log(y_t/x_t)|}{n}}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.48)$$

Burada,

n = gözlem sayısı,

N = model parametrelerinin sayısı,

RSS = artık kareler toplamı

x_t ve y_t = sırasıyla " t " inci zamandaki deneysel ve tahmin edilen verilerdir.

3.26. İstatistiksel Analizler

Enzim üretiminde kullanılan deneme deseni ve istatistiksel analizinde Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) ile Design-Expert® (Version 7.0.0, Stat-Ease, Minneapolis, MN) istatistik programı kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı ise varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güvenlik seviyesinde tespit edilmiştir. Diğer yandan, Minitab ve Design-Expert® istatistik programlarının kullanılmadığı durumlarda veriler SAS istatistik programı (SAS Institute, Cary, NC, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, %95 önem seviyesinde kullanılmıştır ($P=0.05$). Tüm parametrelerin değerleri, en az iki tekerrürün ortalaması olarak verilmiş olup tablolarda ortalama±standart sapma (aynı çalışma ise) ve ortalama±standart hata (grupların ortalamaları karşılaştırılırken) olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında inülinaz enzimin üretiminde kullanılan karbon kaynağının seçimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimin optimum çalışma koşulları belirlenmiş ve enzim analiz yöntemi yeniden dizayn edilmiştir. *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ile inülinaz enziminin üretiminde kullanılan besiyeri kompozisyonu, PBD ve MKD ile optimize edilmiştir. Diğer yandan, optimal besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik modellenmesi yapılmıştır. Bununla beraber, küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) pH kontrolü ve havalandırmanın etkisi incelenmiş olup büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) ise pH kontrollü ve havalandırmalı ortamda enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında üretilen enzim, santrifüj-süre kombinasyonu ve UF prosesi ile kısmi olarak saflaştırılmış ve enzimin bazı özellikleri karakterize edilmiştir. Son olarak yapılan bu çalışmada optimum besiyeri kompozisyonlarında (PBD ve MKD) gerçekleştirilen fermentasyonlar ve enzimin substrat (inülin ve sukroz) spesifikliği ile ilgili deneysel veriler, matematiksel modeller kullanılarak modellenmiştir.

4.1. Karbon Kaynağının Seçimi

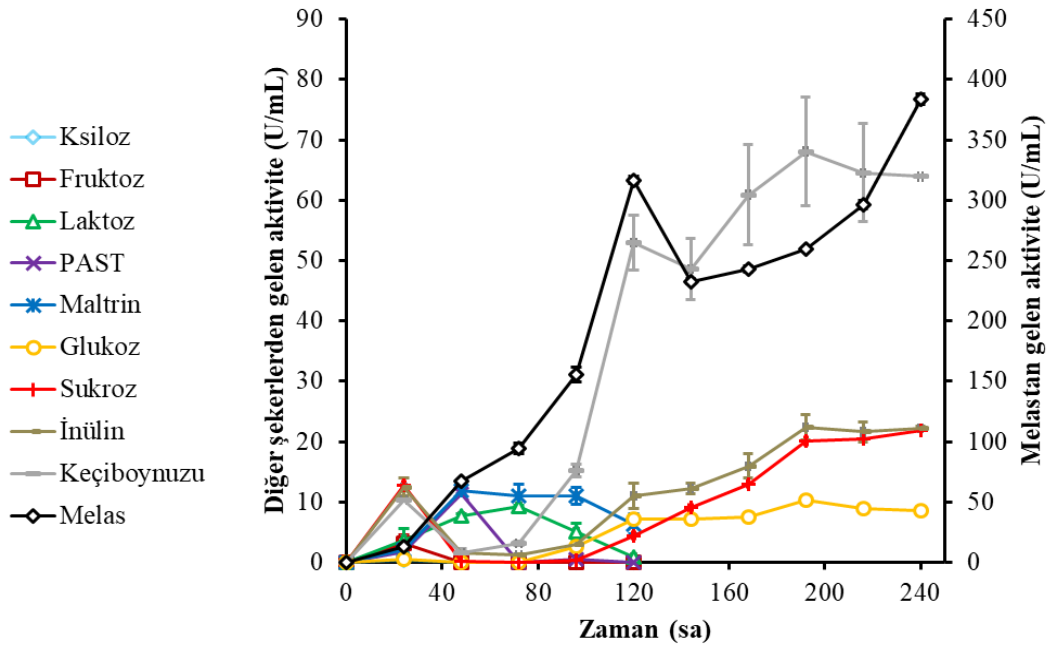
On farklı karbon kaynağı, maksimum I_{ase} aktivitesi (U/mL), maksimum üretim hızı (Q_{Iase} , U/mL/sa), maksimum tüketim hızı ($Q_{şeker}$, g/L/sa) ve şeker kullanım oranını (SUY , %) veren karbon kaynağını belirlemek için taranmıştır. İki tekerrürlü olarak çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonlar, başlangıç pH değeri 5.0 olan besiyerlerine %2 (h/h) inokülasyon oranı ile aşılama yapılarak başlatılmış ve 30°C’de 200 dev/dk’de devam ettirilmiştir. Fermentasyonun durumuna göre bazı fermentasyonlar 5. günde, bazı fermentasyonlar da 10. günde sonlandırılmıştır. Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik değerler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen inülinaz fermentasyonlarına ait kinetik değerler

Karbon kaynağı ve fermentasyon süresi (sa)	Kinetik değerler			
	I_{ase} (U/mL)	Q_{Iase} (U/mL/sa)	$Q_{şeker}$ (g/L/sa)	SUY (%)
Glukoz (240 sa)	10.40 ^{cd} ±0.31	0.15 ^c ±0.01	0.13 ^d ±0.00	92.22 ^{ab} ±0.27
Fruktoz (120 sa)	3.09 ^d ±1.97	0.13 ^c ±0.08	0.14 ^d ±0.00	92.87 ^{ab} ±0.23
Ksiloz (120 sa)	0.44 ^d ±0.09	0.02 ^c ±0.00	0.29 ^{cb} ±0.01	87.92 ^b ±0.20
Sukroz (240 sa)	21.87 ^c ±0.00	0.18 ^c ±0.01	0.25 ^c ±0.02	94.90 ^{ab} ±0.53
İnülin (240 sa)	22.37 ^c ±3.04	0.25 ^c ±0.03	0.23 ^c ±0.05	97.93 ^a ±0.00
Laktoz (120 sa)	9.28 ^{cd} ±0.25	0.22 ^c ±0.09	0.09 ^d ±0.04	44.93 ^c ±1.49
Maltrin (120 sa)	11.90 ^{cd} ±1.11	0.41 ^c ±0.09	0.43 ^a ±0.03	51.38 ^c ±6.04
PAST (120 sa)	11.37 ^{cd} ±0.10	0.40 ^c ±0.04	0.10 ^d ±0.00	95.75 ^{ab} ±6.02
KE (240 sa)	68.07 ^b ±12.73	1.57 ^b ±0.21	0.24 ^c ±0.00	95.43 ^{ab} ±0.36
Melas* (240 sa)	383.73 ^a ±6.16	6.73 ^a ±0.53	0.37 ^{ab} ±0.05	98.99 ^a ±0.04

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). *: Şeker pancarından elde edilmiştir. **PAST**: Peynir altı suyu tozu, **KE**: Keçiyoynuzu ekstraktı

Elde edilen sonuçlara göre en düşük enzim aktivitesi (I_{ase} , 0.44 U/mL) ve Q_{Iase} (0.02 U/mL/sa) değerleri ksiloz kullanıldığında elde edilirken ($P>0.05$) en düşük $Q_{şeker}$ (0.09 g/L/sa) ve SUY (%44.93) değerleri de laktoz kullanıldığında elde edilmiştir ($P>0.05$). Bununla beraber, en yüksek I_{ase} (383.76 U/mL), Q_{Iase} (6.73 U/mL/sa) ve SUY (%98.99) değerleri, melastan elde edilirken ($P<0.05$) maksimum $Q_{şeker}$ değeri (0.43 g/L/sa) de maltrinden tespit edilmiştir. Ancak melasın fermentasyonundan hesaplanan $Q_{şeker}$ değeri (0.37 g/L/sa) ile maltrinin fermentasyonundan hesaplanan $Q_{şeker}$ değeri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Bununla beraber, melas ve maltrinden hesaplanan $Q_{şeker}$ değerleri ile diğer karbon kaynaklarından elde edilen $Q_{şeker}$ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur ($P<0.05$). Ayrıca, glukoz, fruktoz, ksiloz, sukroz, inülin, PAST ve KE'nin fermentasyonları sırasında şekerin tüketim oranı %90 ve üstü civarında iken inülinaz enziminin üretimi melastan üretilen inülinaz enziminin seviyesine göre önemli ölçüde düşük olmuştur ($P<0.05$). Diğer yandan, enzim üretim hızı değerleri de inülinaz enziminin üretimi ile aynı derecede paralellik göstermiştir ($P<0.05$). Sonuç olarak, maksimum kinetik değerler, melasın fermentasyonundan elde edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarından inülinaz enziminin üretim grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait enzim üretim grafiği

Şekil 4.1'e göre melasta enzim üretimi maksimum seviyede olmuştur. Ancak, Şekil 4.1'den de anlaşılabacağı üzere inülinaz aktivitesi fermentasyonun 5. gününde 316.84 U/mL iken fermentasyonun 6. gününde 232.60 U/mL'ye düşmüştür (Şekil 4.1). Bu düşüşün nedeni, fermentasyon ortamında küflerin aşırı gelişimi ve ortam pH'nın düşmesi nedeniyle üretilen enzimlerin denatüre olması olabilir. Dolayısıyla enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Ancak, fermentasyonun 6. gününden itibaren enzim aktivitesinde bir artış gözlemlenmiş olup fermentasyonun sonunda 383.73 U/mL'ye artmıştır (Şekil 4.1). Bu artışın nedeni ise hücre içi enzimlerin pH'daki

azalmaya bağlı olarak hücrelerin parçalanması ile ortaya çıkması olabilir. Sonuç olarak, 10 farklı karbon kaynağından inülinaz enziminin üretiminde en yüksek kinetik değerler melasın kullanımı ile elde edilmiştir. Dolayısıyla, bundan sonraki fermentasyon çalışmalarında melas kullanılmıştır. Ayrıca keçiyoynuzu ekstraktı (KE) da *Iase*'nin üretiminde umut veren bir karbon kaynağı olmuştur.

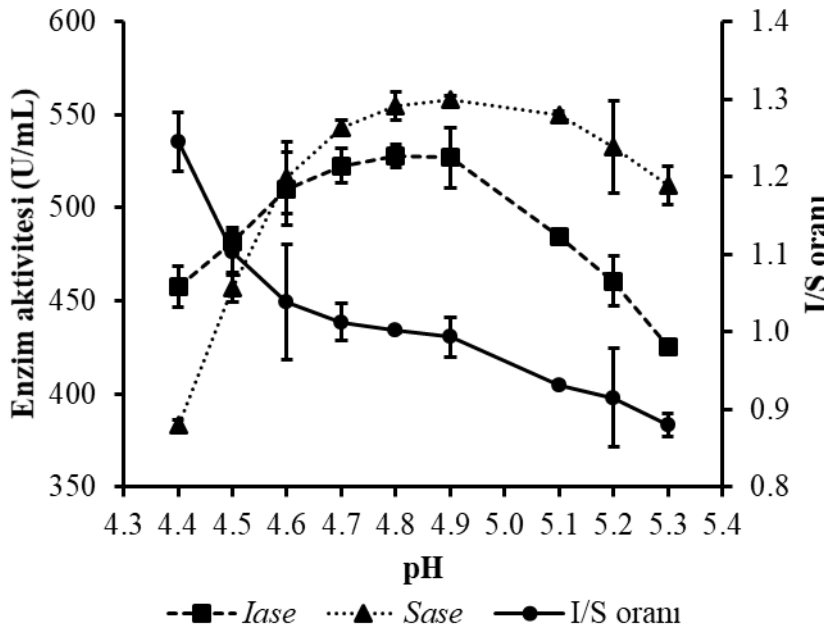
Endüstriyel ölçekteki fermentasyonlarda saf glukoz ve sukroz özellikle maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı çok nadiren kullanılmaktadır. Şeker pancarı ve şeker kamışından şeker üretiminde bir yan ürün olan melas, sukroza göre daha ucuz ve fermentasyon için de kullanışlı bir kaynaktır. Melas, kristal şeker üretimi sırasında, berrak meyve suyundan (şeker kamışı veya pancardan) su buharlaştırıldıktan sonra sukroz kristallerinin ayrılmasıyla üretilir. Konsantre meyve suyu sukrozun kristalleşmesini kolaylaştırır. Sukroz kristalleri santrifüj yoluyla uzaklaştırılır ve kalan viskoz sıvı melastır. Melas, önemli bir kısmı sukroz olan %50-60'ını (a/h) karbonhidratlar, %2'sini azotlu bileşikler ve bazı vitamin ve minerallerin oluşturduğu koyu renkli, viskoz bir şuruptur. Şeker üretimini en üst seviyeye çıkarmak için melas bu proste daha fazla geri dönüştürülebilir. Genel kural olarak, melasın maruz kaldığı geri dönüşüm adımlarının sayısı artmasıyla birlikte fermentasyonda hammadde olarak kullanılan melasın kalitesi düşer. Bununla beraber, melasın genel kompozisyonu, bitki kaynağına, ürünün yerine gelişimin yapıldığı iklim şartlarına ve işlendiği fabrikaya bağlı olarak değişmektedir. Karbonhidrat kompozisyonu depolama sırasında mikroorganizmalarla kontamine olmasından dolayı azalabilmektedir. Melas, birçok endüstriyel biyoproseslerde kullanılan ucuz yenilenebilir bir karbon kaynağıdır. Başlıca kullanımı etanol üretimindedir, ancak melas; butanol, alkollü içecekler, sorbitol, sitrik asit, laktik asit, süksinik asit, fruktooligosakkaritler, enzimler ve tek hücre proteininin üretiminde de substrat kaynağı olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan melas, tuzluluğu, ozmolaritesi ve toksik elementler ve fermentasyon inhibitörlerinin varlığı nedeniyle birçok organizmaya karşı oldukça inhibitördür (de Oliveira Lino vd. 2018; Demirci vd. 2014b). Her ne kadar birçok mikroorganizmaya karşı inhibitör olduğu belirtilmiş olsa da bizim sonuçlarımızdan elde edilen verilere göre şeker pancarı melası, *A. niger* A42 inülinazının üretiminde umut vermiştir. Dolayısıyla karbon kaynağı olarak melas seçilmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı karbon kaynaklarından (glukoz, fruktoz, sukroz, maltoz, inülin ve fruktan) *A. niger* ATCC20611 inülinazının üretimi gerçekleştirilmiş olup elde edilen aktivite değerleri sırasıyla 321 U/mL, 318 U/mL, 347 U/mL, 295 U/mL, 278 U/mL ve 267 U/mL olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değeri sukroz kullanılarak elde edilmiştir (Dinarvand vd. 2012). Saber and El-Naggar (2009), farklı karbon kaynaklarından (glukoz, fruktoz, maltoz, sukroz, rafinoz, nişasta, inülin, enginar yumrusu, yıldız çiçeği yumrusu, hindiba kökü, pancar posası, portakal kabuğu, kamış melası ve pancar melası) *A. tamarii* AR-IN9 inülinazının üretimini gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite değeri yıldız çiçeği yumrusundan 26.50 U/mL olarak elde edilirken en düşük aktivite değeri ise maltozdan 7.66 U/mL olarak elde edilmiştir. Bununla beraber, kamış ve pancar melasından da sırasıyla 13.17 U/mL ve 15.87 U/mL aktivite değerine sahip inülinaz üretilmiştir. Makino vd. (2009), *K. marxianus* NCYC 587 ve *K. marxianus* NRRL Y-7571 suşları ile şeker kamışı melasından inülinaz enziminin üretimi gerçekleştirmiş ve maksimum enzim aktivitelerini sırasıyla 735 U/mL ve 722 U/mL olarak belirlemiştir. Ayrıca bu aktivite değerlerinin sukroz bazlı sentetik besiyerinden elde edilen aktivite değerlerinden yaklaşık 7 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir.

4.2. İnülinaz Enziminin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Melasın fermentasyonu sonrasında daha sağlıklı sonuçlar elde etmek amacıyla, inülinaz enziminin optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Buna göre sırasıyla Na-asetat tamponu pH değerinin aktivite üzerine etkisi, inkübasyon sıcaklığının aktivite üzerine etkisi ve inkübasyon süresinin aktivite üzerine etkisi belirlenmiştir.

4.2.1. Optimum pH

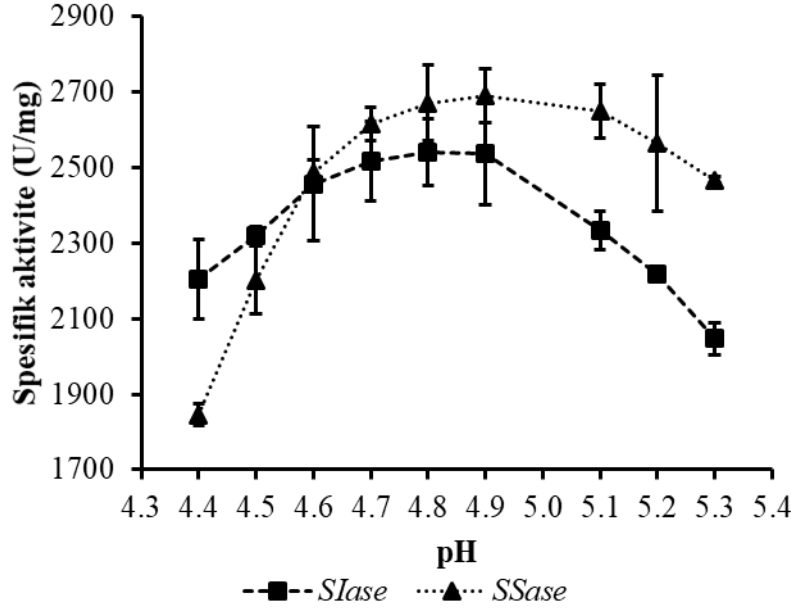
İnülinaz enziminin optimum çalışma pH değerinin tespit edilmesi amacıyla pH 4.4-5.3 aralığında hazırlanan %2'lik inülin veya sukroz solüsyonu ile enzim analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonucunda elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı pH'larda *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri ve I/S oranının değişimi

Elde edilen sonuçlara göre en düşük *Iase* and *Sase* aktivite değerleri sırasıyla pH 5.3'te 424.91 ± 1.17 U/mL ve pH 4.4'te 383.01 ± 2.92 U/mL olarak belirlenmiştir. Buna göre *Iase*'nin en düşük aktivite değeri pH 5.3'te elde edilirken *Sase*'nin en düşük aktivite değeri pH 4.4'te tespit edilmiştir. Yani, substrat olarak inülin kullanıldığında en düşük aktivite değeri pH 5.3'te saptanırken substrat olarak sukroz kullanıldığında en düşük aktivite değeri pH 4.4'te belirlenmiştir. Diğer yandan, maksimum *Iase* and *Sase* aktivite değerleri sırasıyla pH 4.8'de 527.63 ± 6.04 U/mL ve pH 4.9'da 558.43 ± 1.95 U/mL olarak tespit edilmiştir. Maksimum aktivite değerleri nisbi olarak %100 kabul edildiğinde pH 5.3'teki *Iase* aktivite değerinde yaklaşık %20'lik bir kayıp söz konusu iken ($P < 0.05$), pH 4.4'teki *Sase* aktivite değerinde ise yaklaşık %32'lik bir kayıp söz konusu olmuştur ($P < 0.05$). Dolayısıyla *Iase* aktivite değeri pH 5.3 seviyelerinde yaklaşık %80 düzeyinde aktivite gösterirken *Sase* aktivite değerinin pH 4.4'te yaklaşık %68 dolaylarında aktivite gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan, I/S oranı

değerleri de pH 4.4'ten pH 5.3'e azalmış olup değerler 1.19 ± 0.04 ile 0.83 ± 0.01 arasında değiştiği tespit edilmiş olup ($P < 0.05$) (Şekil 4.2). Bu değerlere göre enzimin inülinaz doğasında olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, enzim solüsyonunun protein miktarı da 0.208 ± 0.005 mg/mL olarak belirlenmiştir. Enzim solüsyonunun protein miktarı tespit edildiği için farklı pH aralıklarında belirlenen *Iase* ve *Sase* aktivite değerlerine ait *SIase* and *SSase* aktivite değerleri hesaplanmış olup sonuçlar Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



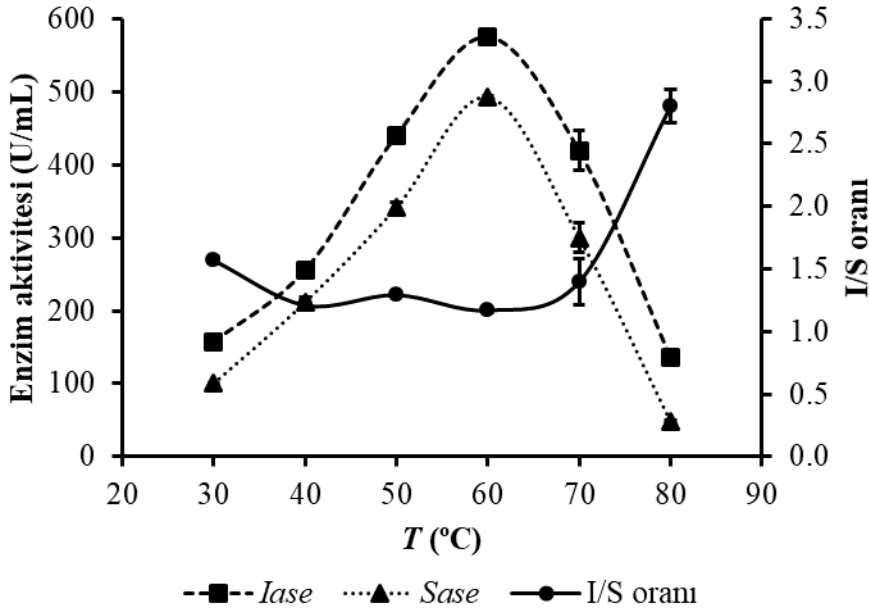
Şekil 4.3. Farklı pH'larda *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri

Elde edilen bulgulara göre, minimum ve maksimum *SIase* aktivite değerleri sırasıyla pH 5.3 ve pH 4.8'de 2046.60 ± 42.30 U/mg ve 2541.36 ± 88.81 U/mg olarak elde edilmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan, en düşük ve en yüksek *SSase* aktivite değerleri de sırasıyla pH 4.4 ve pH 4.9'da 1844.76 ± 29.24 U/mg ve 2689.69 ± 72.79 U/mg olarak saptanmıştır ($P < 0.05$). Sonuç olarak, enzim analizinde substrat olarak inülin kullanıldığında optimum pH değeri 4.8 olarak bulunurken, substrat olarak sukroz kullanıldığında ise optimum pH değeri 4.9 olarak tespit edilmiştir.

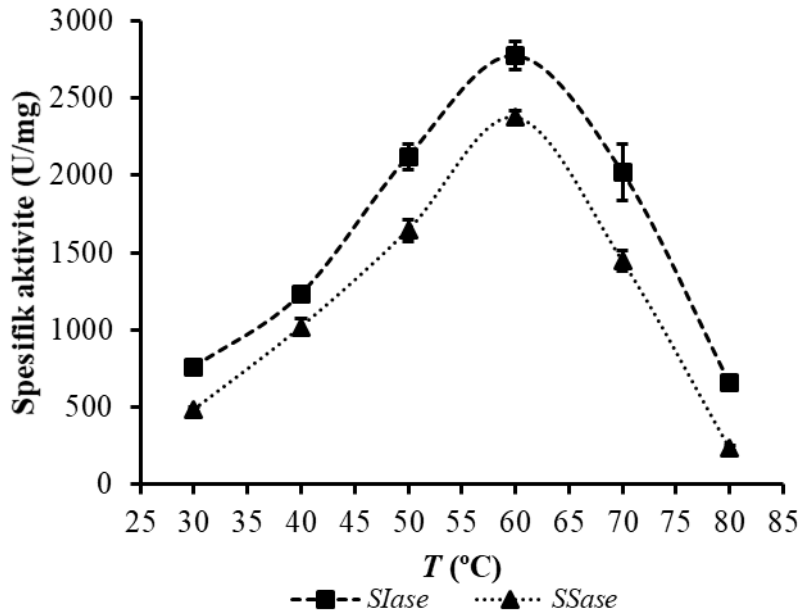
4.2.2. Optimum sıcaklık

Iase enziminin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30-80°C) aktivite analizleri yapılmış olup sonuçlar Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Iase* ve *Sase* aktivitelerin maksimum olduğu sıcaklık 60°C olarak belirlenmiş olup bu sıcaklık noktasındaki aktivite değerleri sırasıyla 575.97 ± 5.85 U/mL ve 492.65 ± 2.44 U/mL olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Bununla beraber, minimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri de 80°C'de elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla 136.44 ± 0.97 U/mL ve 48.73 ± 1.95 U/mL olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Ayrıca, maksimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri nisbi olarak %100 kabul edildiğinde, *Iase* ve *Sase*'nin 30°C'deki nisbi aktiviteleri sırasıyla %27.33 ve %20.38 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, *Iase* ve *Sase*'nin bu sıcaklıkta tam olarak aktif

olmadığı ve toplam aktivite kaybının yaklaşık olarak sırasıyla %73 ve %80 oranında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri ve I/S oranının değişimi



Şekil 4.5. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri

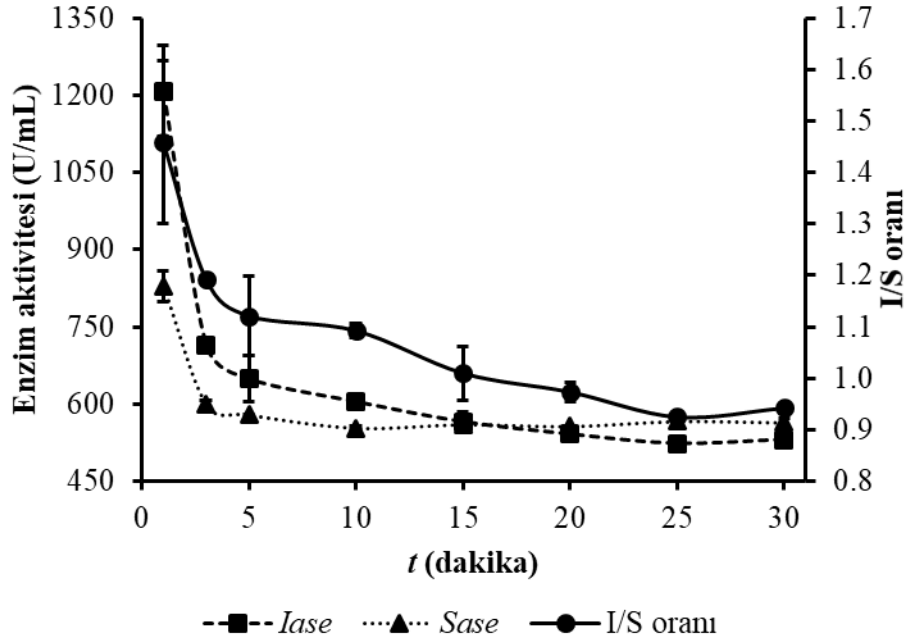
Diğer yandan, inkübasyon sıcaklığı 80°C olduğunda enzim, büyük ölçüde denatüre olmuş olup *Iase* ve *Sase*'nin aktivite kaybı sırasıyla yaklaşık olarak %76 ve %90 olduğu belirlenmiştir. İlâveten, I/S oranı ise inkübasyon sıcaklığı 80°C olduğunda

maksimum değere ulaşmış olup (2.80 ± 0.13) inkübasyon sıcaklığı 60°C olduğunda ise I/S oranı minimum değerde kalmıştır (1.17 ± 0.02) ($P < 0.05$). Dolayısıyla I/S oranı, 10^{-2} 'den büyük olduğu için enzimin inülinaz doğasında olduğu da belirlenmiştir.

Kullanılan enzim solüsyonunun protein miktarı 0.208 ± 0.005 mg/mL olarak belirlenmişti. Farklı inkübasyon sıcaklıklarında gerçekleştirilen aktivite analizleri sonucunda belirlenen *Iase* ve *Sase* aktivitelerinin protein miktarına bölünmesi sonucunda *SIase* ve *SSase* aktiviteleri hesaplanmış olup sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Sonuçlar, maksimum ve minimum *SIase* aktivitesinin (sırasıyla 2774.18 ± 93.34 U/mg ve 657.16 ± 10.74 U/mg) inkübasyon sıcaklığı 60°C ve 80°C olduğunda elde edildiğini göstermiştir ($P < 0.05$). Benzer şekilde, en düşük ve en yüksek *SSase* aktivite değerleri (sırasıyla 234.69 ± 14.91 U/mg ve 2372.84 ± 43.99 U/mg) de yine aynı sıcaklıklarda elde edilmiştir ($P < 0.05$). Sonuç olarak, enzimin optimum çalışma sıcaklığı, *Iase*, *Sase*, *SIase* ve *SSase* aktivite değerlerinin maksimum olduğu sıcaklık olan 60°C olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. Optimum inkübasyon süresi

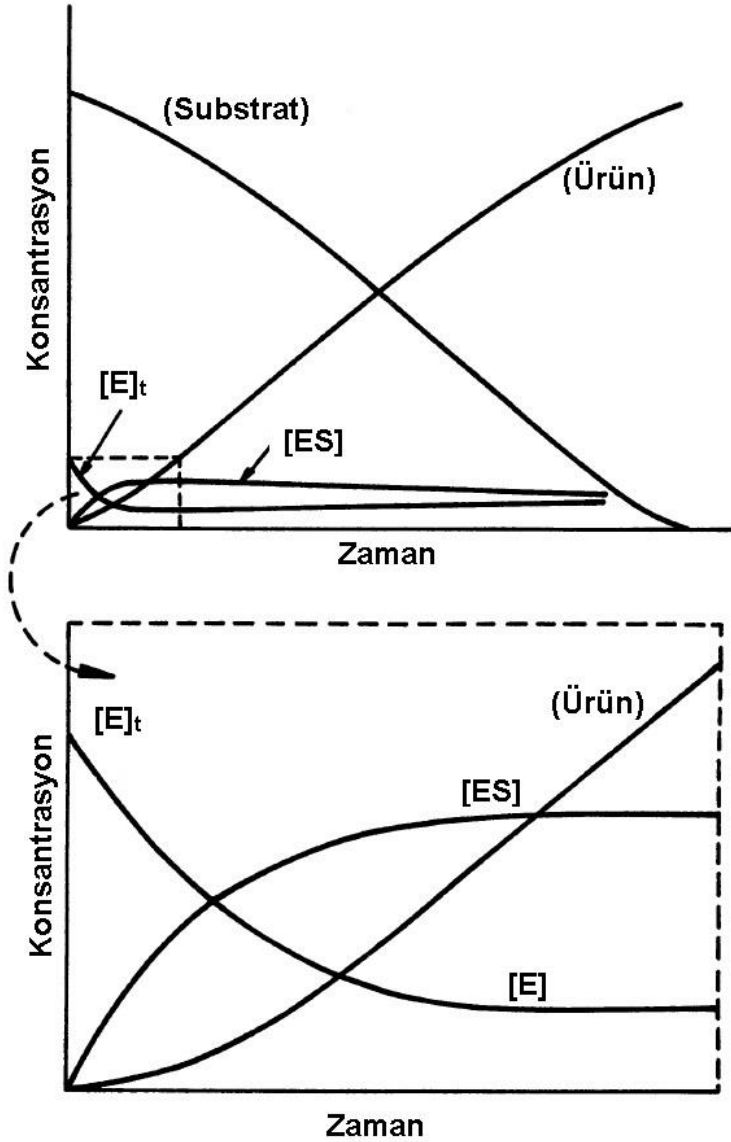
Inülinaz enziminin optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla substrat olarak %2'lik inülin veya sukroz solüsyonu kullanılarak farklı inkübasyon sürelerinde (1-30 dakika) enzim analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonucunda elde edilen aktivite değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı inkübasyon sürelerinde *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri ve I/S oranının değişimi

Sonuçlara göre maksimum *Iase* ve *Sase* aktiviteleri (sırasıyla 1208.46 ± 87.71 U/mL ve 828.37 ± 29.24 U/mL), inkübasyon süresi 1 dakika olduğunda elde edilmiş olup

maksimum I/S oranı da 1.46 ± 0.16 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, minimum *Iase* ve *Sase* aktiviteleri de (sırasıyla 523.35 ± 4.09 U/mL ve 553.07 ± 4.39 U/mL) inkübasyon süreleri sırasıyla 25 dakika ve 10 dakika olduğunda belirlenmiştir. Inkübasyon süresi 3 dakika olduğunda *Iase* aktivitesi yaklaşık 1.7 kat azalırken *Sase* aktivitesi de yaklaşık 1.4 kat azalmış olup 3 dakika inkübasyon süresinden sonraki sürelerde, enzim aktivitesinde çok az bir değişimin olduğu ve belirli bir noktadan sonra da aktivitenin sabit kalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu durum, “kararlı konum yaklaşımı” ile açıklanabilir (Shuler vd. 2017) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Enzimatik reaksiyonun gelişimi ve kararlı konum yaklaşımı (Shuler vd. 2017)

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, başlangıç substrat konsantrasyonu, başlangıç enzim konsantrasyonuna göre çok yüksektir. $S_0/[E]_t$ oranı arttıkça, kararlı konum bölgesi, toplam reaksiyon süresinin daha fazlasını kapsar. Ayrıca, kısa bir geçiş süresinden sonra substrat (inülin veya sukroz) ve ürün (fruktoz ve/veya glukoz) konsantrasyonlarındaki değişim hızı, [ES] ve [E] konsantrasyonlarındaki değişim hızlarına göre daha yüksektir.

Diğer yandan, substrat ve ürün konsantrasyonlarındaki değişim hızı o kadar yüksektir ki, [E] ve [ES]'deki değişim hızı bunlarla karşılaştırıldığında sıfır olarak kabul edilebilir. Özetle, enzimatik bir reaksiyonun başlaması ile birlikte, bu reaksiyon hemen kararlı konuma ulaşmakta ve o konuma yerleşmektedir (Şekil 4.7). Kararlı konum boyunca, geçiş ara ürünlerinin konsantrasyonlarının zamana göre değişim hızları, substratın ve ürünün konsantrasyonundaki değişim hızına göre sıfır olarak kabul edilebilir (Cemeroğlu 2015).

Aktivitenin ilk hızlı düşüşüne ilişkin muhtemel bir açıklama da şu şekilde yapılmıştır: Reaksiyon ortamında fazla miktarda substrat bulunduğunda inülinaz enzimi, uzun zincirli inüline daha yüksek bir afinite gösterirken fruktooligosakkaritlere ve/veya inulooligosakkaritlere daha düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla, uzun substrat zincirleri daha kısa olanlara parçalanırken, enzim aktivitesi azalmaktadır (Li vd. 2015).

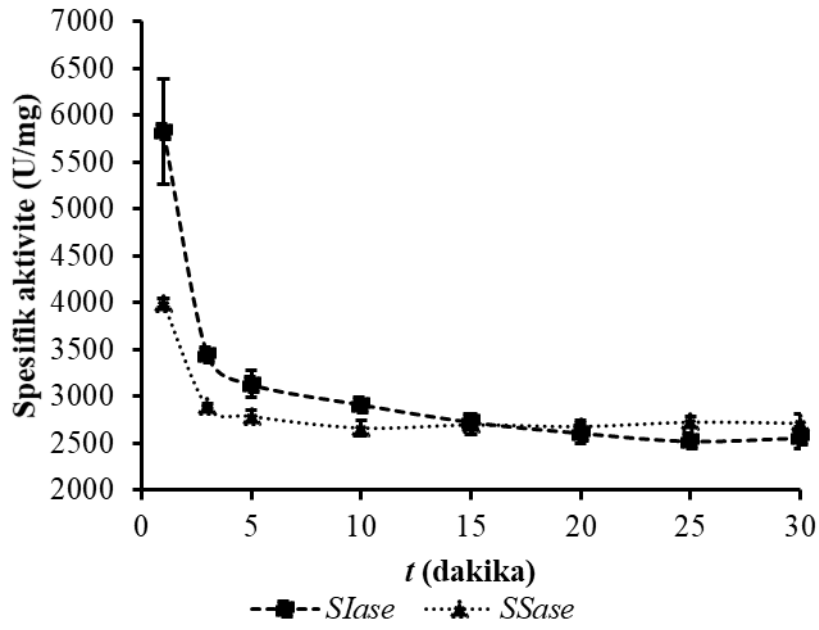
Ayrıca, I/S oranındaki değişim de kararlı konum yaklaşımına uymaktadır. Çünkü enzim aktivite değerleri belirli bir süreden sonra sabitlendiği için I/S oranı da sabit kalmıştır (Şekil 4.6). Yapılan çalışma sonucunda, I/S oranı $1.46 \pm 0.16 - 0.92 \pm 0.01$ arasında değişmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan, *Iase* analizine ait değerler, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne tabi tutulduğunda; 3, 5 ve 10 dakikalık inkübasyon süreleri ile elde edilen aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). Bununla beraber, 1 dakikalık inkübasyon süresi ile belirlenen aktivite değerinin diğer değerlere göre istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca, 5-30 dakika arasındaki inkübasyon sürelerinde ulaşılan aktivite değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşılmamıştır ($P > 0.05$). Benzer istatistiki sonuçlar, *Sase* ve I/S oranı için de elde edilmiştir.

Ham enzim solüsyonunun protein miktarının 0.208 ± 0.005 mg/mL olarak belirlenmesi ile birlikte inkübasyon süresinin artması ile *SIase* ve *SSase* aktivitelerindeki değişim de belirlenmiştir (Şekil 4.8). Şekil 4.8'e göre, maksimum *SIase* ve *SSase* aktiviteleri (sırasıyla 5820.55 ± 559.41 U/mg ve 3989.86 ± 47.18 U/mg) inkübasyon süresi 1 dakika olduğunda tespit edilmiştir. Minimum değerleri de (sırasıyla 2520.70 ± 39.48 U/mg ve 2663.87 ± 83.71 U/mg) sırasıyla inkübasyon süresi 25 ve 10 dakika olduğunda belirlenmiştir. Maksimum ve minimum *SIase* ve *SSase* aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$). Sonuç olarak, optimum inkübasyon süresi 5-15 dk arasında değişmektedir. Ancak, literatürdeki *Iase* aktivite analizlerinde kullanılan inkübasyon süreleri dikkate alındığında, optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Özetlemek gerekirse, enzimin optimum çalışma koşulları; 100 mM Na-asetat pH'ı 4.8, sıcaklık 60°C ve inkübasyon süresi de 10 dakika olarak belirlenmiştir. Yapılan literatür taramalarının sonucunda inülinaz enzimi; inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, tampon türü, tampon molaritesi, ve tampon pH'ı açısından genel olarak benzer koşullarda analiz edilmiştir (Çizelge 4.2). Literatürden elde edilen verilere göre inülinaz enzimi analizinin inkübasyon sıcaklığı 37°C-60°C, inkübasyon süresi 5-40 dakika ve tampon pH'ının ise 4.0-6.0 aralığında olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Analizde ayrıca asetat, fosfat ve McIlvaine tampon türleri tercih edilmiş olup analiz için 10-500 mM aralığında tamponlar hazırlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, inülinaz enziminin literatürdeki mevcut analiz koşulları ile oldukça uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2. İnülinaz ve sukraz analizinde kullanılan enzimatik reaksiyon koşulları

Tampon	pH	Substrat (% a/h)	Sıcaklık (°C)	İnkübasyon süresi (dk)	Kaynak
100 mM Na-asetat	5.5	%2 sukroz	50	B	(Silva vd. 2013)
10 mM Na-asetat	4.6	%0.2 inülin	50	20	(Poorna ve Kulkarni 1995)
100 mM Sit-fosfat	4.0	%1 sukroz	60	10	(Yewale vd. 2013)
50 mM Na-fosfat	6.0	%1 inülin	55	20	(Laowklom vd. 2012)
50 mM Na-asetat	5.0	%0.5 inülin veya sukroz	45	10	(Naidoo vd. 2009)
100 mM asetat	5.0	%2 inülin	50	10	(Sheng vd. 2008; Sheng vd. 2009)
100 mM Na-asetat	5.5	%2 inülin	50	15	(Canli vd. 2013)
50 mM fosfat	6.0	%2 inülin	60	10	(Liu vd. 2014)
100 mM Na-asetat	5.5	%2 inülin	50	15	(Singh vd. 2006)
200 MM Na-asetat	5.0	%1 inülin	50	30	(Jain vd. 2012)
100 mM Na-asetat	4.5	%2 sukroz	50	B	(Bender vd. 2006)
100 mM fosfat	6.0	%2 inülin	60	10	(Gong vd. 2007)
100 mM asetat	4.8	%2 sukroz	50	8 veya 40	(Silva-Santisteban vd. 2009)
100 mM asetat	4.5	%2 sukroz	50	B	(Kalil vd. 2001b)
100 mM asetat	5.0	%1.5 inülin	55	10	(Gou vd. 2015)
100 mM fosfat	6.0	%2 inülin	60	10	(Gong vd. 2008)
100 mM asetat	5.0	%2 inülin veya sukroz	50	30	(Yuan vd. 2012)
500 mM McIlvaine	5.5	%0.5 inülin	37	5	(Zhou vd. 2015)
100 mM asetat	5.0	%2 inülin	50	30	(Hu vd. 2012)
100 mM asetat	5.0	%2 inülin	50	15	(Wang vd. 2016)
500 mM McIlvaine	5.0	%0.5 inülin	40	30	(Sirisansaneeyakul vd. 2007)
20 mM Na-asetat	4.6	%2 inülin	55	10	(Gao vd. 2015)
100 mM Na-asetat	5.5	%5 inülin	50	5	(Chen vd. 2016)
200 MM Na-asetat	5.0	%1 inülin	50	20	(Dinarvand vd. 2012)
100 mM Na-asetat	4.8	%2 inülin	60	10	Bu çalışma
100 mM Na-asetat	4.9	%2 sukroz	60	10	Bu çalışma

B: Belirtilmemiş



Şekil 4.8. Farklı inkübasyon sürelerinde *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri

4.3. Besiyeri Kompozisyonunun PBD ile Optimizasyonu

Aspergillus niger ile melastan inülinaz enzimin üretiminde öncelikle besiyeri kompozisyonu PBD aracılığı ile optimize edilmiştir. Bu amaçla, 11 farklı besiyeri bileşeninin inülinaz enziminin üretimi üzerine etkisi PBD'nin önermiş olduğu besiyeri formülasyonları (Çizelge 3.3) kullanılarak incelenmiştir. Bu formülasyonlara göre hazırlanan besiyerlerinde inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. PBD ile besiyeri kompozisyonunun optimizasyonunda kullanılan fermentasyon parametreleri; 4 °Bx başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık 30°C, karıştırma hızı 200 dev/dk, pH 5.0, besiyeri hacmi 100 mL ve inokülasyon oranı %2 (h/h) olmuştur. Besiyeri optimizasyonu içine gerçekleştirilen fermentasyonlar 19 gün boyunca devam etmiş olup fermentasyonun 15. güne kadar olan değerleri baz alınmıştır. Elde edilen bulgular, *Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *SIase*, *SSase*, biyokütle (*X*), pH, $Q_{şeker}$, Q_{Iase} ve şeker kullanım oranı (*SUY*) açısından değerlendirilmiş olup Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. PBD tarafından önerilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait sonuçlar

Besiyeri	<i>Iase</i> (U/ml)	<i>Sase</i> (U/ml)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>X</i> (g/L)	pH	<i>Qşeker</i> (g/L/gün)	<i>QIase</i> (U/mL/gün)	<i>SUY</i> (%)
1	1234.53 ^{ab}	627.62 ^{cde}	1.97 ^{abc}	0.520 ^{ab}	2373.35 ^{ab}	1206.59 ^{bcd}	16.17 ^{abc}	6.19 ^{ab}	5.67 ^{bcd}	164.57 ^a	92.65 ^{ab}
2	1132.31 ^{bc}	815.23 ^{bc}	1.39 ^{cde}	0.382 ^{bc}	2960.50 ^{ab}	2131.46 ^{ab}	13.62 ^{bc}	5.81 ^{ab}	5.86 ^{abcd}	165.05 ^a	92.89 ^a
3	1304.62 ^a	1140.25 ^a	1.14 ^e	0.545 ^a	2393.16 ^{ab}	2091.65 ^{ab}	18.39 ^{ab}	6.45 ^a	7.57 ^{ab}	168.36 ^a	89.56 ^{cd}
4	907.21 ^e	507.26 ^{def}	1.79 ^{bcde}	0.408 ^{abc}	2223.22 ^{ab}	1243.10 ^{bcd}	15.41 ^{abc}	5.55 ^b	5.22 ^{cd}	118.88 ^{bc}	90.04 ^{bcd}
5	1185.12 ^{ab}	955.57 ^{ab}	1.24 ^{de}	0.460 ^{abc}	2577.21 ^{ab}	2078.00 ^{abc}	16.08 ^{abc}	5.56 ^b	5.25 ^{cd}	154.12 ^{ab}	88.42 ^d
6	1083.69 ^{bcd}	824.00 ^{bc}	1.32 ^{cde}	0.370 ^{bc}	2926.61 ^{ab}	2225.29 ^{ab}	11.54 ^c	5.50 ^b	6.13 ^{abcd}	149.78 ^{abc}	91.53 ^{abc}
7	976.32 ^{cde}	419.06 ^{ed}	2.33 ^{ab}	0.424 ^{abc}	2303.16 ^{ab}	988.58 ^d	20.37 ^a	5.83 ^{ab}	4.85 ^d	108.00 ^c	92.76 ^{ab}
8	935.79 ^{de}	485.33 ^{def}	1.93 ^{abcd}	0.440 ^{abc}	2128.04 ^b	1103.68 ^{cd}	19.38 ^a	5.85 ^{ab}	5.84 ^{abcd}	107.69 ^c	91.95 ^{abc}
9	1110.16 ^{bcd}	738.24 ^{bcd}	1.50 ^{cde}	0.456 ^{abc}	2433.52 ^{ab}	1618.26 ^{abcd}	16.88 ^{abc}	5.96 ^{ab}	6.29 ^{abcd}	129.56 ^{abc}	92.21 ^{abc}
10	1005.23 ^{cde}	714.36 ^{bcde}	1.41 ^{cde}	0.445 ^{abc}	2257.79 ^{ab}	1604.49 ^{abcd}	17.28 ^{ab}	5.88 ^{ab}	6.18 ^{abcd}	119.88 ^{bc}	91.33 ^{abc}
11	999.74 ^{cde}	387.39 ^f	2.58 ^a	0.306 ^c	3270.24 ^a	1267.19 ^{bcd}	18.95 ^{ab}	5.48 ^b	7.98 ^a	158.93 ^{ab}	91.87 ^{abc}
12*	966.76 ^{cde}	853.72 ^{abc}	1.13 ^e	0.345 ^c	2799.69 ^{ab}	2472.35 ^a	11.51 ^c	5.98 ^{ab}	7.16 ^{abc}	136.51 ^{abc}	93.69 ^a
Ortalama	1070.12	705.67	1.64	0.43	2553.87	1669.22	16.30	5.83	6.17	140.11	91.58
Std hata	3.04	3.35	0.02	0.01	58.51	32.34	0.08	0.08	0.03	1.82	0.12

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

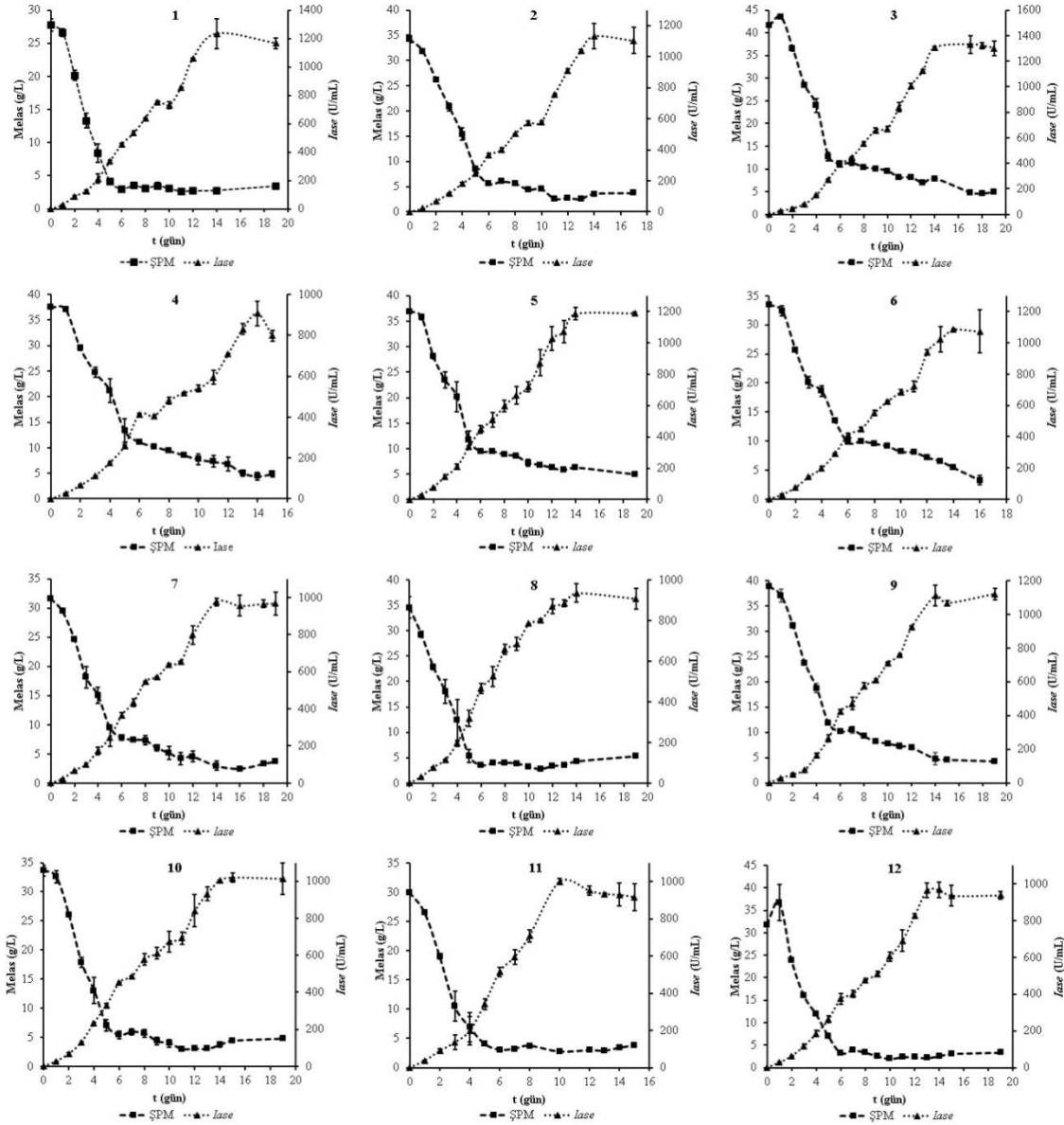
*Kontrol fermentasyonu: Besiyeri kompozisyonuna bileşenlerin düşük seviyeleri (–) eklenmiştir.

Std hata: Standart hata

Sonuçlara göre minimum ve maksimum *Iase* aktiviteleri (sırasıyla 907.21 U/mL ve 1304.62 U/mL), sırasıyla Besiyeri#4 ve Besiyeri#3 ile elde edilmiştir ($P<0.05$). Bununla beraber, en düşük ve en yüksek *Sase* aktiviteleri de sırasıyla 387.39 U/mL ve 1140.25 U/mL olarak Besiyeri#11 ve Besiyeri#3 ile tespit edilmiştir ($P<0.05$). Ayrıca, I/S oranı da 1.13 ile 2.58 arasında değişmiş olup minimum ve maksimum değerler sırasıyla Besiyeri#12 ve Besiyeri#11 ile belirlenmiştir ($P<0.05$). Dolayısıyla, I/S oranları 10^{-2} 'den büyük olduğu için (Çizelge 4.3) üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, fermentasyon denemelerinden maksimum enzim aktivitesine sahip olan örneklerin protein miktarı da tespit edilmiş olup en düşük (0.306 mg/mL) ve en yüksek protein miktarları (0.545 mg/mL) sırasıyla Besiyeri#11 ve Besiyeri#3'ten elde edilmiştir ($P<0.05$). Protein miktarlarının tespiti ile birlikte *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri hesaplanmış olup bu değerler sırasıyla 2128.04 U/mg (Besiyeri#8) ile 3270.24 U/mg (Besiyeri#11) arasında ve 988.58 U/mg (Besiyeri#7) ile 2472.35 U/mg (Besiyeri #12) arasında değişmiştir ($P<0.05$). İlave olarak, fermentasyonların sonunda biyokütle miktarları da gravimetrik olarak saptanmış olup biyokütle değerlerinin 11.51 g/L (Besiyeri#12) ile 20.37 g/L (Besiyeri#7) arasında değiştiği ve sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Ancak, Besiyeri#12 ile Besiyeri#7'den elde edilen *Iase* aktivite değerleri arasında (sırasıyla 966.76 U/mL ve 976.32 U/mL) istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmezken ($P>0.05$), *Sase* aktivite değerleri arasında önemli bir farklılık meydana gelmiştir ($P<0.05$). Fakat maksimum biyokütle değerinin elde edildiği fermentasyon denemesinden elde edilen *Sase* aktivitesi, minimum biyokütle değerinin elde edildiği fermentasyon denemesinden elde edilen *Sase* aktivitesine göre yaklaşık 2.04 kat daha düşük olmuştur ($P<0.05$). Dolayısıyla, biyokütle konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerinde önemli ölçüde etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($P>0.05$). Ek olarak, fermentasyonların sonunda elde edilen fermentasyon sıvılarının pH değerleri de ölçülmüş olup bu değerler 5.48 ile 6.45 arasında değişmiştir ve fermentasyonların sonunda ortam pH'larının asidik pH'da ve nötre yakın olduğu anlaşılmış olup fermentasyonun sonundaki pH değerlerinin başlangıç pH değerinden (5.0) yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, $Q_{şeker}$, Q_{Iase} ve SUY kinetik parametrelerinin sırasıyla 4.85 g/L/gün (Besiyeri#7) ile 7.98 g/L/gün (Besiyeri#11) arasında, 107.69 U/mL/gün (Besiyeri#8) ile 168.36 U/mL/gün (Besiyeri#3) ve %88.42 (Besiyeri#5) ile %93.69 (Besiyeri#12) arasında değiştiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Sonuç olarak Çizelge 4.3'ten de anlaşılabileceği üzere, maksimum *Iase*, *Sase* ve Q_{Iase} değerleri Besiyeri#3 ile elde edilmiştir. Minimum *Iase*, *Sase* ve Q_{Iase} değerleri de sırasıyla Besiyeri#4, Besiyeri#11 ve Besiyeri#8 ile saptanmıştır.

Besiyeri optimizasyonu için gerçekleştirilen fermentasyonlara ait şeker tüketim ve enzim üretim eğrileri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Buna göre, fermentasyon ortamındaki şeker çalışmada kullanılan mikroorganizma tarafından sorunsuzca kullanılmıştır. Fermentasyonların sonunda ortamdaki şekerin yaklaşık %10'unun mikroorganizma tarafından tüketilmediği yapılan hesaplamaların sonucunda anlaşılmıştır (Çizelge 4.3). Bununla beraber, fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir bölümü fermentasyonun 6. gününde mikroorganizma tarafından tüketilmiş olup enzim aktivitesinin ise fermentasyonun 6. gününden itibaren daha yüksek seviyelere çıktığı görülmüştür (Şekil 4.9). Buna göre fermentasyon ortamındaki şeker, hemen hemen tamamen tükense bile *A. niger* tarafından enzim üretimi devam etmiştir. Buradan, *A. niger*'in fermentasyon ortamındaki şekeri hızlı bir şekilde metabolize ettiği

anlaşılmış olup fermentasyonun 6. gününe kadar şekerin hızlı bir şekilde hem ürüne dönüştürüldüğü hem de mikroorganizmanın kendi gelişimi için harcadığı düşünülmektedir. Mikroorganizma, fermentasyon ortamındaki yeterli gelişimini tamamladıktan (6. gün) sonra da metabolize ettiği şekerin tamamını ürüne dönüştürdüğü düşünülmektedir.



Şekil 4.9. PBD tarafından önerilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait şeker tüketim ve *Iase* üretim grafikleri

PBD ile besiyeri kompozisyonunun optimizasyonunda cevap olarak *Iase* aktivite değerleri kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te besiyeri kompozisyonunda kullanılan bileşenlerin *Iase* üretimine yönelik etki değerleri ve katsayıları gösterilmiştir. Buna göre A, C, D ve E bileşenlerinin negatif etkiye sahip olduğu PBD tarafından tespit edilmiş olup negatif etkiye sahip bileşenler arasından yalnızca D bileşeninin (NH_4NO_3) istatistiksel öneme sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0.01$). Bununla beraber B, F, G, H, J,

K ve L bileşenlerinin ise enzim üretimi üzerinde pozitif etkiye sahip bileşenler olduğu belirlenmiş olup bu bileşenler arasından G (maya ekstraktı) ve J (pepton) bileşenlerinin enzim üretimi üzerinde istatistiksel öneme sahip olduğu bulunmuştur ($P<0.01$ ve $P<0.05$).

Çizelge 4.4. *Iase* enzimi için hesaplanan etki değerleri ve katsayılar

Terim	Etki	Katsayılar	T	P
Sabit		1070.12	72.17	0.000**
A	-60.68	-30.34	-2.05	0.063
B	3.91	1.96	0.13	0.897
C	-5.68	-2.84	-0.19	0.851
D	-96.59	-48.30	-3.26	0.007**
E	-33.67	-16.84	-1.14	0.278
F	16.51	8.26	0.56	0.588
G	181.91	90.96	6.13	0.000**
H	48.63	24.32	1.64	0.127
J	65.49	32.75	2.21	0.047*
K	48.79	24.40	1.65	0.126
L	38.09	19.05	1.28	0.223

$R^2 = 0.846$, Düzeltilmiş $R^2 = 0.705$

** $P<0.01$ ve * $P<0.05$, önemli parametreleri temsil eder.

PBD tarafından *Iase* aktivite değerleri ile ilgili regresyon denklemi de Eşitlik 4.1'de verilmiştir. *A. niger* ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen *Iase* aktivitesine ait eşitliğin (Eşitlik 4.1) R^2 değeri 0.846 olarak belirlenmiştir. Bu da; örnek varyasyonlarının %84.6'sının model tarafından tam temsil edildiği anlamına gelmektedir (Çizelge 4.4).

$$Iase (U/mL) = 947 - 121A + 43B - 30C - 241D - 374E + 183F + 202G + 54H + 72.8J + 54.2K + 38.1L \quad (4.1)$$

Çizelge 4.5'te *Iase* enziminin aktivite değerlerine ait varyans analiz (ANOVA) sonuçları görülmektedir. Buna göre, modelin %99 güvenlik seviyesinde önemli olduğu Çizelge 4.5'ten anlaşılmıştır ($P=0.002<0.01$).

Çizelge 4.5. Varyans analiz (ANOVA) sonuçları

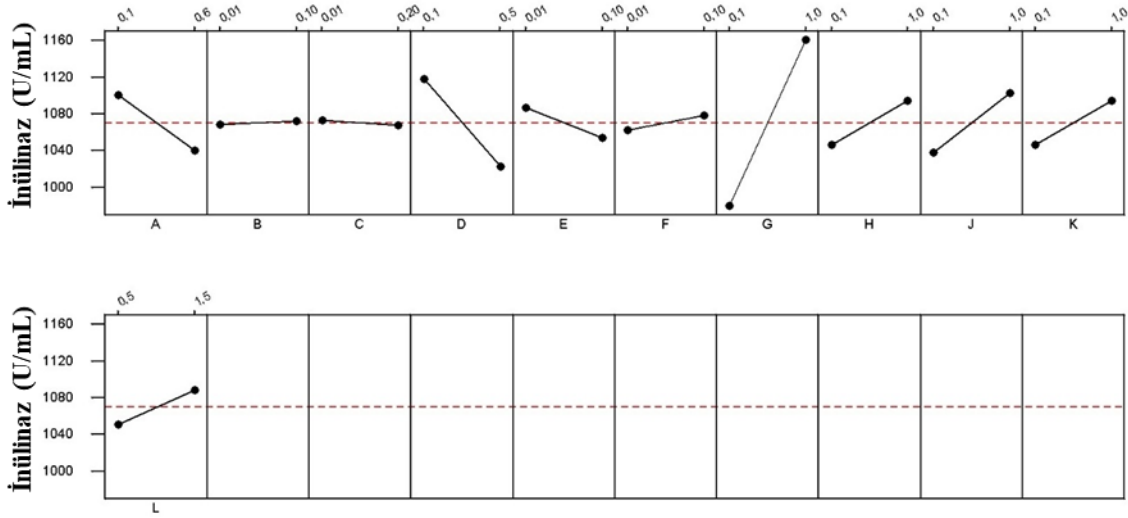
Kaynak	SD	KT	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Ana etkenler	11	348265	348265	31660	6.00	0.002**
Artık hata	12	63328	63328	5277		
Saf hata	12	63328	63328	5277		
Toplam	23	411593				

$R^2 = 0.846$, Düzeltilmiş $R^2 = 0.705$, SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, Düz. KT: Düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması

** $P<0.01$, güven seviyesi %99'dur.

Bununla beraber besiyeri optimizasyonunda, *Iase* enziminin üretiminde kullanılan besiyeri bileşenleri arasından pozitif ve negatif etkiye sahip olan

bileşenlerinin ana etkileri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.10'a göre, A, C, D ve E, değişkenlerinin enzimin üretimi üzerine negatif yönde etki gösterdiği ve hatta besiyerindeki konsantrasyonunun artması ile *Iase* aktivitesinde azalma olduğu görülmüş olup bunların arasından yalnızca D değişkeninin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). B, F, G, H, J, K ve L değişkenlerinin ise üretimi pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, G ve J bileşenlerinin besiyerindeki konsantrasyonunun artması ile enzim aktivitesinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$) (Şekil 4.10). Ayrıca, Şekil 4.10'daki çizgilerin eğimlerinden de anlaşılabileceği üzere G değişkeninin üretim üzerinde daha çok etki gösterdiği açıktır. Zaten G bileşenin etki değeri, J bileşeninkinden yaklaşık 2.78 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

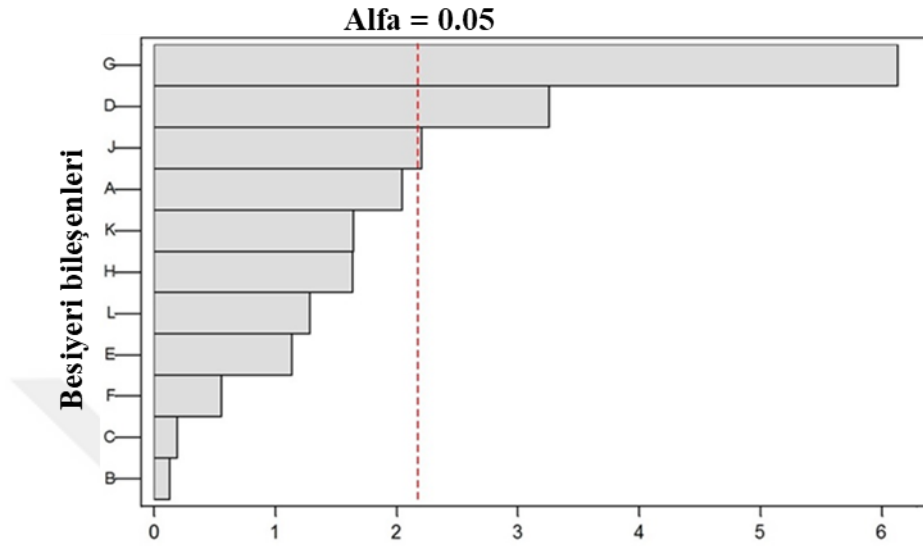


Şekil 4.10. *Iase* enzimine yönelik negatif ve pozitif etkiye sahip olan besiyeri bileşenleri

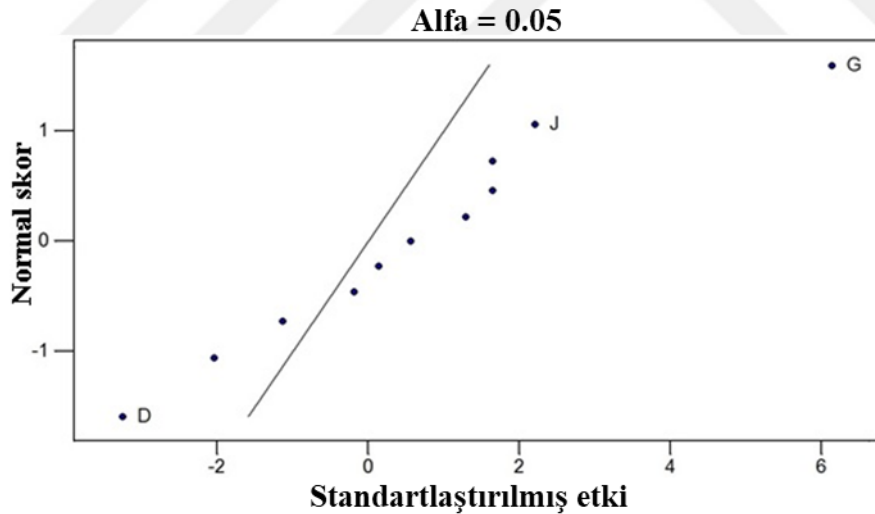
Diğer yandan, Pareto grafiği de enzim aktivitesi üzerine pozitif ve negatif etkiye sahip olan besiyeri değişkenlerini, istatistiksel olarak belirlenen güven seviyesine göre (%95) göstermektedir (Şekil 4.11). Besiyerinde kullanılan D, G ve J bileşenlerinin enzim aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu gösterilmiştir ($P<0.05$). Fakat Pareto grafiği, istatistiksel olarak önemli bileşenlerin enzim aktivitesi üzerinde pozitif veya negatif etkiye sahip olduğunu göstermez. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'e benzer şekilde *Iase* aktivitesi üzerinde önemli ölçüde etki gösteren parametrelerin varlığı standartlaştırılmış etkilerin normal olasılık grafiği ile de anlaşılmaktadır (Şekil 4.12). Şekil 4.12'ye göre, J ve G bileşenlerinin değeri Normal Skor değeri 0 noktasının üzerinde olduğu için bu bileşenlerin enzim üretimi üzerinde pozitif bir etkisinin olduğu anlaşılmış olup D bileşeninin ise Normal Skor değeri 0 noktasının altında olduğu için enzim aktivitesi üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, besiyeri bileşiminde *Iase* enziminin üretimi üzerine amonyum nitrat (D, NH_4NO_3 , negatif etki), maya ekstraktı (G, pozitif etki) ve pepton (J, pozitif etki) olmak üzere 3 bileşen etkili olmuştur ($P<0.05$). Bu sonuca göre **Besiyeri A** (kontrol, zenginleştirilmemiş besiyeri), **Besiyeri B** (D, G ve J içerir) ve **Besiyeri C** (G ve J içerir) olmak üzere 3 farklı besiyeri oluşturulmuştur. Bu hazırlanan besiyerleri doğrulama fermentasyonları için kullanılmış olup fermentasyon koşulları olarak 4°Bx

başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık 30°C, karıştırma hızı 200 dev/dk, başlangıç pH 5.0, besiyeri hacmi 100 mL ve inokülasyon oranı %2 (h/h) kullanılmıştır. Besiyeri optimizasyonu için iki tekerrürlü gerçekleştirilen fermentasyonlar 15 gün boyunca devam etmiş ve her 24 saatte bir fermentasyonun başlatıldığı saatte örnek(ler) alınmıştır.



Şekil 4.11. *A. niger* ile melastan *Iase* enziminin üretimi üzerine besiyeri bileşenlerinin etkisini gösteren Pareto grafiği



Şekil 4.12. Standartlaştırılmış etkilerin normal olasılık grafiği

4.3.1. Besiyeri A ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi

Besiyeri A ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre fermentasyonun sonunda 2.86 g/L şekerin mikroorganizma tarafından tüketilmediği tespit edilmiştir. Bu miktar toplam şeker miktarının yaklaşık %8'ine tekabül etmektedir. Maksimum *Iase* aktivitesi,

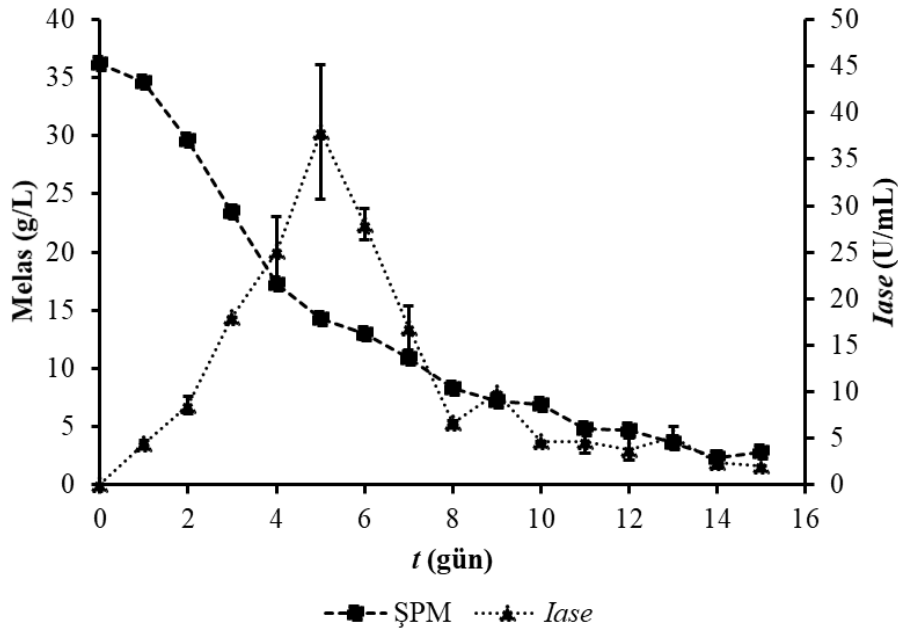
fermentasyonun 5. gününde 37.93 U/mL olarak belirlenmiş olup (Çizelge 4.6) diğer günlerde elde edilen aktivite değerlerine göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca fermentasyonun 5. günündeki kalıntı şeker miktarı 14.24 g/L olarak belirlenmiş olup en yüksek aktivite değeri elde edildiğinde şekerin yaklaşık %71'i tüketilmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.6. Besiyeri A ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler

<i>t</i> (gün)	Şeker (g/L)	<i>Iase</i> (U/mL)
0	36.19±0.27 ^a	0.00±0.00 ^f
1	34.62±0.21 ^b	4.46±0.37 ^{def}
2	29.61±0.10 ^c	8.53±0.93 ^{de}
3	23.47±0.53 ^d	18.00±0.02 ^c
4	17.23±0.19 ^e	25.12±3.68 ^b
5	14.24±0.29 ^f	37.93±7.24 ^a
6	12.96±0.44 ^g	27.99±1.68 ^b
7	10.93±0.07 ^h	16.86±2.34 ^c
8	8.33±0.09 ⁱ	6.63±0.29 ^{def}
9	7.19±0.26 ^j	9.94±0.00 ^d
10	6.93±0.17 ^j	4.63±0.05 ^{def}
11	4.78±0.03 ^k	4.68±1.27 ^{def}
12	4.67±0.32 ^k	3.83±1.15 ^{def}
13	3.64±0.54 ^l	5.14±1.15 ^{def}
14	2.35±0.57 ^m	2.46±0.66 ^{def}
15	2.86±0.00 ^{lm}	2.05±0.00 ^{ef}

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Fermentasyon boyunca şeker tüketimi ve enzim üretimine ait değişim Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Şekil 4.13'ten de anlaşılacağı üzere fermentasyon ortamındaki şeker mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketilmiştir. Fermentasyonun ilk 5 günü boyunca şeker çok hızlı bir şekilde mikroorganizma tarafından tüketilmiş olup buna paralel olarak enzim aktivitesinde de artış görülmüş olup *Iase* enziminin maksimum aktivite değeri, fermentasyonun 5. gününde belirlenmiştir (Şekil 4.13). Fakat fermentasyonun şeker tüketimi azalan şekilde devam etmesine rağmen fermentasyonun 8. gününe kadar enzim aktivitesinde keskin bir düşüş gözlemlenmiş olup aktivite değeri 37.93 U/mL'den 6.63 U/mL'ye kadar azalmıştır ($P<0.05$). Fermentasyonun 8. gününden sonra da aktivite de bir artış gözlemlenmemiş olup ($P>0.05$) şeker tüketimindeki azalma devam etmiştir. *Iase* aktivitesine ait en düşük değer ise fermentasyonun 15. gününde 2.05 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun sonunda elde edilen fermentasyon sıvısının pH değeri, 2.12 olarak ölçülmüş olup enzim aktivitesinin neden 5. günden itibaren düşmeye başladığını açıklamaktadır. Çünkü bu kadar düşük bir pH değerinde enzimin fermentasyonun 5. gününden itibaren denatüre olmaya başladığı düşünülmektedir. Fermentasyonun kinetik değerleri, Bölüm 4.3.4'te tartışılmıştır.



Şekil 4.13. Besiyeri A ile gerçekleştirilen fermentasyon

4.3.2. Besiyeri B ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi

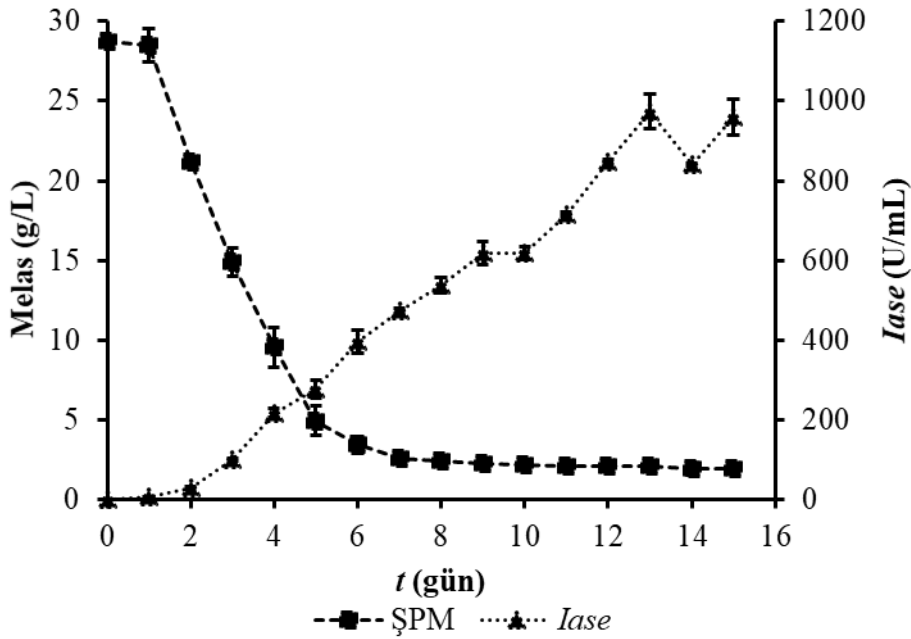
Kontrol fermentasyonundan sonra (Besiyeri A: zenginleştirilmemiş besiyeri), Besiyeri B ile doğrulama denemesi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler

t (gün)	Şeker (g/L)	Iase (U/mL)
0	28.75±0.01 ^a	0.00±0.00 ^j
1	28.50±1.06 ^a	4.51±1.49 ^j
2	21.14±0.23 ^b	29.14±3.02 ^j
3	14.88±0.87 ^c	100.36±3.00 ⁱ
4	9.54±1.23 ^d	216.84±12.77 ^h
5	4.92±0.95 ^e	275.44±23.02 ^h
6	3.42±0.50 ^{ef}	396.02±29.97 ^g
7	2.58±0.32 ^f	472.59±6.31 ^f
8	2.43±0.20 ^f	537.38±18.52 ^e
9	2.23±0.17 ^f	618.19±29.21 ^d
10	2.17±0.06 ^f	617.64±16.81 ^d
11	2.06±0.17 ^f	715.04±4.82 ^c
12	2.06±0.11 ^f	847.00±6.72 ^b
13	2.09±0.03 ^f	972.70±43.39 ^a
14	1.92±0.43 ^f	839.45±3.75 ^b
15	1.92±0.09 ^f	959.34±46.41 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Elde edilen bulgulara göre, fermentasyon ortamındaki şeker sorunsuzca mikroorganizma tarafından tüketilmiş olup fermentasyonun 14. ve 15. günlerindeki kalıntı şeker miktarı 1.92 g/L olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.7'deki şeker tüketim verilerine göre, şekerin %6.67'si mikroorganizma tarafından tüketilmemiştir. Diğer yandan, maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 13. gününde 972.70 U/mL olarak tespit edilmiştir ($P<0.05$). Fermentasyon ortamındaki şekerin, fermentasyonun 5. gününde yaklaşık %83'ü mikroorganizma tarafından tüketilmiş olmasına rağmen enzim aktivitesinin 275.44 U/mL'de kaldığı saptanmıştır. Maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinde ise besiyerindeki şekerin yaklaşık %93'ü mikroorganizma tarafından tüketilmiştir ($P>0.05$).



Şekil 4.14. Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyon

Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir bölümü (%80-90) fermentasyonun ilk 5 gününde mikroorganizma tarafında tüketilmiş olup maksimum tüketim hızının 1. gün ila 4. arasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Ayrıca fermentasyonun 5. gününden sonra şeker tüketimi azalan oranda devam etmiştir ($P>0.05$). Şeker tüketimine paralel olarak enzim üretiminde de bir artışın olduğu da görülmektedir. Bununla beraber, enzim aktivitesinde fermentasyonun 2. gününden 9. gününe kadar sürekli bir artış olmuştur. Ancak fermentasyonun 10. günündeki enzim aktivitesinin 9. gündeki enzim aktivitesine hemen hemen eşit olduğu tespit edilmiş olup enzim üretiminin olmadığı anlaşılmıştır ($P>0.05$). Bununla beraber, fermentasyonun 10. gününden sonra enzim aktivitesinde bir sıçrama olduğu görülmüş olup en yüksek aktivite değerine fermentasyonun 13. gününde ulaşılmıştır ($P<0.05$). Fermentasyonun 14. gününde enzim aktivitesinde bir azalma tespit edilirken (839.45 U/mL) ($P<0.05$) fermentasyonun sonundaki aktivite değerinin maksimum enzim aktivitesine yakın olduğu belirlenmiştir (959.34 U/mL) ($P>0.05$). Ayrıca Şekil 4.14'te görüldüğü gibi fermentasyonun 6. gününden sonra besiyerindeki

şeker miktarı çok düşük olmasına rağmen enzim aktivitesinde önemli ölçüde artış gerçekleşmiştir ($P<0.05$). Fermentasyona ait kinetik değerler, Bölüm 4.3.4'te verilmiştir.

4.3.3. Besiyeri C ile gerçekleştirilen doğrulama denemesi

PBD ile istatistiksel olarak önemli besiyeri bileşenlerinin belirlenmesi işleminde maya ekstraktı ve peptonun enzim aktivitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Besiyeri C ile doğrulama denemesi gerçekleştirilmiş olup fermentasyona ait deneysel veriler Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

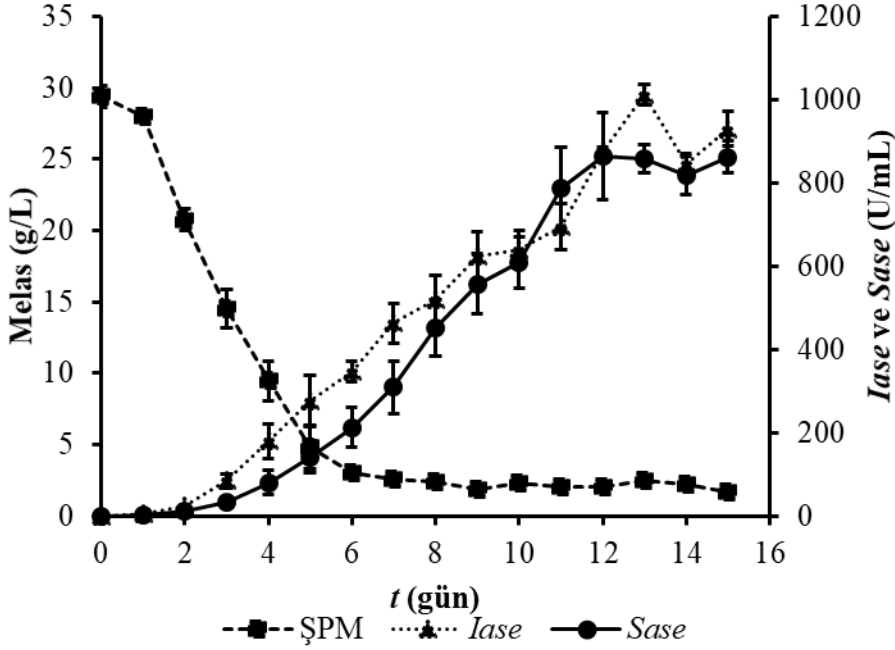
Çizelge 4.8. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerler

<i>t</i> (gün)	Şeker (g/L)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı
0	29.38±0.79 ^a	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^f	
1	27.96±0.09 ^a	5.19±1.44 ⁱ	1.61±0.93 ^f	5.60±4.12 ^a
2	20.74±0.74 ^b	24.27±3.02 ⁱ	11.99±11.93 ^f	2.09±0.51 ^b
3	14.51±1.30 ^c	83.33±16.52 ^{hi}	31.58±7.31 ^f	2.66±0.09 ^{ab}
4	9.45±1.40 ^d	178.74±40.15 ^{gh}	79.91±28.46 ^{ef}	2.36±0.34 ^{ab}
5	4.84±1.52 ^e	275.93±61.52 ^{fg}	141.07±39.23 ^{def}	1.99±0.12 ^b
6	2.98±0.23 ^{ef}	346.61±24.41 ^f	212.55±48.24 ^{de}	1.69±0.27 ^b
7	2.60±0.11 ^f	462.02±47.24 ^e	308.35±63.44 ^{cd}	1.53±0.16 ^b
8	2.35±0.06 ^f	518.47±59.64 ^{de}	451.42±67.05 ^{bc}	1.15±0.04 ^b
9	1.83±0.29 ^f	624.29±58.99 ^{cd}	556.53±72.36 ^b	1.13±0.04 ^b
10	2.29±0.23 ^f	640.29±45.32 ^c	607.65±61.89 ^b	1.06±0.03 ^b
11	2.06±0.06 ^f	695.48±55.48 ^c	786.87±97.55 ^a	0.89±0.04 ^b
12	2.06±0.06 ^f	874.78±11.69 ^b	864.84±104.67 ^a	1.02±0.11 ^b
13	2.52±0.29 ^f	1011.02±25.34 ^a	857.72±32.94 ^a	1.18±0.07 ^b
14	2.23±0.23 ^f	845.25±23.88 ^b	817.28±46.39 ^a	1.04±0.03 ^b
15	1.63±0.03 ^f	929.74±40.93 ^{ab}	861.77±38.74 ^a	1.08±0.10 ^b

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Elde edilen sonuçlara göre, fermentasyon ortamındaki şekerin sorunsuz bir şekilde mikroorganizma tarafından metabolize edildiği anlaşılmış olup fermentasyonun sonunda 1.63 g/L (toplam şekerin %5.55'i) şeker tüketilmemiştir. Yani fermentasyonun sonunda şekerin %94.45'i mikroorganizma tarafından tüketilmiştir. Bununla beraber, ortamdaki şekerin %83.5'i fermentasyonun 5. gününde tüketilmiş olup üretilen enzim aktivitesi 275.93 U/mL olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, fermentasyonun 5. gününden itibaren fermentasyon ortamındaki şekerin tüketimi azalan oranda devam etmiştir ($P>0.05$). Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum *Iase* aktivitesi fermentasyonun 13. gününde 1011.02 U/mL olarak saptanmış olup ($P<0.05$) kalıntı şeker miktarı da 2.52 g/L olarak belirlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği günde şekerin %91.42'si mikroorganizma tarafından tüketilmiştir. Maksimum *Iase* aktivitesi Besiyeri C ile elde edildiği için fermentasyon boyunca alınan örneklerde *Sase* aktivite analizleri de yapılmış olup I/S oranları da belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum *Sase* aktivitesi fermentasyonun 12. gününde 864.84 U/mL olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla I/S oranları da hesaplanmış olup sonuçlar aşağıda ayrıca tartışılmıştır. Çizelge 4.8'den enzim aktiviteleri incelendiğinde *Iase*

aktivitelerinin *Sase* aktivitelerine göre (fermentasyonun 11. günündeki aktiviteler hariç) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, enzimin substrat spesifikliğı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. İnülinaz enziminin substrat olarak sukrozdan daha çok inüline ilgili olduğu sonuçlardan anlaşılmış olup bu durum Bölüm 4.9'da ayrıca incelenmiştir.

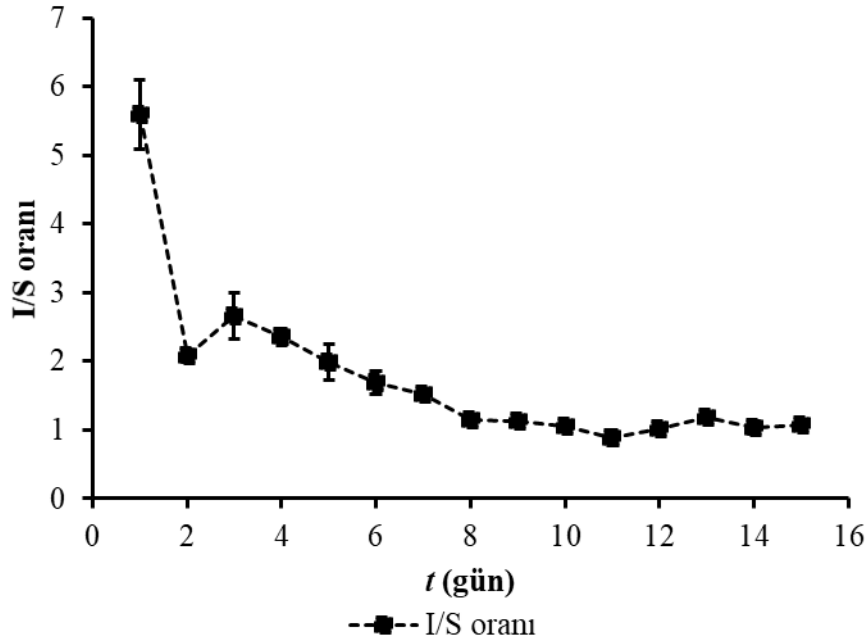


Şekil 4.15. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyon

Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve enzim üretim grafiğı Şekil 4.15'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Besiyeri B ile gerçekleştirilen fermentasyonun sonuçlarına benzer olmuştur. Açıklamak gerekirse, Şekil 4.15'e göre fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir bölümü fermentasyonun ilk 5-6 gününde mikroorganizma tarafında tüketilmiş olup 1. ve 4. gün arasında maksimum tüketim hızına ulaşılmıştır ($P<0.05$). Ayrıca fermentasyonun 5. gününden sonra şeker tüketimi azalan oranda devam etmiş olup 6. gününden sonra fermentasyon ortamındaki şeker miktarı stabil kalmıştır ($P>0.05$). Şeker tüketimine paralel olarak enzim üretiminde de bir artışın olduğu da görülmektedir. Bununla beraber, *Iase* aktivitesinde fermentasyonun 2. gününden 13. gününe kadar sürekli bir artış olmuş olup maksimum aktivite değerine fermentasyonun 13. gününde ulaşılmıştır ($P<0.05$). Ayrıca, maksimum *Iase* üretim hızı da fermentasyonun 11. günü ile 13. günü arasında gerçekleşmiştir. Fermentasyonun 14. gününde enzim aktivitesinde bir azalma tespit edilirken (845.25 U/mL) ($P<0.05$) fermentasyonun sonundaki aktivite değerinin maksimum enzim aktivitesine yakın olduğu belirlenmiştir (929.74 U/mL) ($P>0.05$). *Sase* aktivitesine gelince, maksimum değer fermentasyonun 12. gününde elde edilmiş olup (864.84 U/mL) 11, 13, 14 ve 15. günlerdeki aktivite değerleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Şekil 4.15 incelendiğinde, enzim aktivitesi fermentasyonun 2. gününden itibaren artmaya başlamış olup bu durum fermentasyonun 12-13. günlerine kadar devam etmiştir. Bununla beraber, fermentasyonun 6. gününden sonra besiyerindeki şeker miktarı stabil bir şekilde seyretmesine rağmen enzim aktivitesinde önemli ölçüde

artışlar gerçekleşmiştir ($P<0.05$). Fermentasyona ait kinetik değerler, Bölüm 4.3.4'te verilmiştir.

Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum *Iase* aktivitesi elde edildiği için örneklerde *Sase* aktivite analizleri de yapılmıştır. Dolayısıyla, I/S oranının fermentasyon boyunca nasıl değiştiği de belirlenmiştir (Şekil 4.16). I/S oranları, fermentasyon boyunca 0.89 ila 5.60 arasında değişmiştir ($P<0.05$). Ayrıca, I/S oranları fermentasyonun 1. gününden 11. gününe kadar azalan oranda devam ettiği anlaşılmış olup 11. günden sonra I/S oranlarında nispeten bir artış söz konusu olmuştur ($P>0.05$) (Şekil 4.16). I/S oranlarının fermentasyonun başlangıcından 7. gününe kadar yüksek seyretmesinin nedeninin, enzimin substrat spesifikliği ile ilgili olduğu düşünülmüş olup bu durum Bölüm 4.9'da ayrıca incelenmiştir. I/S oranına ait değerler 10^{-2} 'den büyük olduğu için üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.16. Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyona ait değerlerden hesaplanan I/S oranının fermentasyon boyunca değişim grafiği

4.3.4. PBD doğrulama denemelerinin karşılaştırılması

PBD ile besiyeri kompozisyonunun optimizasyonunda kullanılan besiyeri bileşenlerinden *Iase* aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı pozitif (maya ekstraktı ve pepton) ve negatif (amonyum nitrat) etkiye sahip olan bileşenler tespit edilmiş olup doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber, doğrulama denemelerinden hesaplanan kinetik parametreler de ayrıca tartışılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Sonuçlar, I/S oranı hariç (2.64 , $P<0.05$) en düşük kinetik değerlerin Besiyeri A ile yani kontrol fermentasyonu ile elde edildiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, elde edilen protein miktarının çok düşük olması nedeniyle (0.04 mg/mL, $P>0.05$) *SIase* ve *SSase* aktiviteleri de hesaplanmış olup istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$). Bununla beraber, Besiyeri A (kontrol) ile gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum

Iase üretim ve şeker tüketim hızları sırasıyla 9.53 U/mL/gün ve 5.83 g/L/gün olarak belirlenmiştir ($P>0.05$). Öte yandan fermentasyon ortamındaki şekerin yaklaşık %94'ünün mikroorganizma tarafından tüketildiği saptanmıştır. Fermentasyonun sonunda ölçülen pH değeri 2.12 olarak ölçülmüş olup ($P>0.05$) şekerin mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketilmesine rağmen üretilen enzim aktivitesinin neden bu kadar düşük olduğunu açıklamaktadır (asidik pH, ortamdaki proteinlerin denatürasyonuna neden olmuştur).

Çizelge 4.9. PBD doğrulama denemelerine ait kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Kinetik parametreler	Besiyeri A	Besiyeri B	Besiyeri C
<i>Iase</i> (U/mL)	37.93±7.24 ^b	972.70±43.39 ^a	1011.02±25.34 ^a
<i>Sase</i> (U/mL)	14.25±1.19 ^b	875.46±48.14 ^a	834.28±39.91 ^a
I/S oranı	2.64±0.29 ^a	1.11±0.01 ^b	1.22±0.09 ^b
Protein (mg/mL)	0.04±0.003 ^b	0.31±0.004 ^a	0.34±0.01 ^a
<i>SIase</i> (U/mg)	975.04±102.95 ^b	3146.28±177.44 ^a	3008.21±22.76 ^a
<i>SSase</i> (U/mg)	369.81±1.18 ^b	2832.10±189.09 ^a	2488.24±199.89 ^a
<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	9.53±2.26 ^b	136.33±16.60 ^a	158.49±39.69 ^a
<i>Q_{şeker}</i> (g/L/gün)	5.83±0.16 ^a	6.32±0.12 ^a	6.18±0.50 ^a
SUY (%)	93.59±1.55 ^a	94.22±0.61 ^a	94.54±0.34 ^a
pH	2.12±0.02 ^b	6.17±0.08 ^a	6.30±0.12 ^a

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Diğer yandan, Besiyeri B ve Besiyeri C ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan hesaplanan kinetik değerler son derece benzerlik göstermiş olup istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Besiyeri C'den elde edilen ham enzim solüsyonunda Besiyeri B'ye göre daha fazla protein miktarı tespit edildiği için ($P>0.05$) *SIase* ve *SSase* aktiviteleri nispeten düşük hesaplanmıştır ($P>0.05$). Ancak, Besiyeri C ile nispeten daha yüksek I/S oranı, *Iase* aktivitesi ve *Q_{Iase}* değerleri elde edilmiştir ($P>0.05$). Besiyeri B ve C'den hesaplanan I/S oranının 10^{-2} 'den daha büyük olması üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğunu göstermektedir (sırasıyla 1.11 ve 1.22, $P>0.05$). Bununla beraber her iki besiyerindeki (Besiyeri B ve C) şekerin neredeyse tamamına yakınının (%94'ün üzerinde) mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketilmiş olduğu da hesaplanmıştır ($P>0.05$). Fermentasyonların sonunda elde edilen fermente sıvıların pH değerleri de birbirine benzerlik göstermiş olup 6.0-6.30 arasında belirlenmiştir ($P>0.05$). Sonuç olarak, Besiyeri B ve C'den hesaplanan kinetik parametre değerlerinde önemli bir farklılığın belirlenmemesi, amonyum nitratın nispeten doğrulama denemelerinde de negatif etki göstermesi ve ekonomik olarak Besiyeri C'nin Besiyeri B'ye göre daha uygun olması nedeniyle Besiyeri C'nin PBD ile belirlenen optimum besiyeri olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, besiyeri kompozisyonunda kullanılan maya ekstraktı (G) ve peptonun (J) *Iase* aktivitesi üzerinde “**önemli değişkenler**” olduğu belirlenmiştir.

4.4. Besiyeri Bileşimindeki Önemli Değişkenlerin MKD ile Optimizasyonu

PBD ile besiyeri optimizasyonunda *Iase* aktivitesi üzerine önemli değişkenler olarak maya ekstraktı ve pepton bulunmuştur. Şekil 4.10'da besiyerinde maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun artması ile birlikte *Iase* aktivitesinin de arttığı

görülmektedir. Bu nedenle her iki bileşenin MKD’de kullanılmak üzere minimum konsantrasyonu ($-a$ değeri = -1.41421), PBD’nin maksimum konsantrasyonu olan %1 olarak belirlenmiş olup maksimum değerleri ($+a$ değeri = +1.41421) ise literatürden %5 olarak belirlenmiştir. Alfa değerleri (a) açısından değişen her bir değişkenin seviyeleri Çizelge 4.10’da verilmiş olup merkez nokta değerleri 3 tekerrürlü olarak çalışılmıştır. Çizelge 4.10’daki bağımsız değişkenlerin seviyesi Design Expert® İstatistik programına yerleştirildiğinde Çizelge 4.11’deki deneme deseni elde edilmiş olup bağımsız değişkenlerin verilen konsantrasyonlarına göre besiyeri içerikleri hazırlandıktan sonra (100 mL) başlangıç pH değerleri 4 N NaOH ve HCl ile 5.0’a ayarlanmıştır.

Çizelge 4.10. Her bir değişkenin MKD seviyesi

Bağımsız değişkenler	Kodlanmış değerler ve ilgili konsantrasyonları				
	-1.41421 ($-a$)	-1	Merkez nokta (0)	+1	+1.41421 ($+a$)
Maya ekstraktı (%)	1	1.59	3	4.41	5
Pepton (%)	1	1.59	3	4.41	5

Hazırlanan besiyerleri sterilize edilip (121.1°C’de 15 dakika) oda sıcaklığına soğutulduktan sonra *A. niger* spor süspansiyonundan %2 (h/h) oranında inokülasyon yapılmış çalkalamalı inkübatörün karıştırma hızı ve sıcaklığı 200 dev/dk ve 30°C’ye ayarlandıktan sonra 15 gün boyunca fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyonun başlatıldığı saatte her gün örnek(ler) alınmış olup analiz anına kadar +4°C’de saklanmıştır. Örnekler, kalıntı şeker konsantrasyonu ve *Iase* analizleri açısından değerlendirilmiştir. Bununla beraber, en yüksek *Iase* aktivitesine sahip örneklerin *Sase* aktiviteleri ve protein miktarları da belirlenmiş olup *I/S* oranı, *SIase* ve *SSase* aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca fermentasyonun sonunda biyokütle ve pH analizleri de yapılmıştır. Öte yandan $Q_{şeker}$, Q_{Iase} ve SUY kinetik parametreleri de hesaplanmıştır. MKD’nin önermiş olduğu besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinden elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olup olmadığı da Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir. Fermentasyonlardan elde edilen deneysel sonuçlar, model tarafından tahmin edilen sonuçlar ve sonuçlar arasındaki farkı gösteren tablolar sırasıyla Çizelge 4.12, Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14’te sunulmuştur.

Çizelge 4.11. MKD deneme deseni

Deneme	Maya ekstraktı (G, %)	Pepton (J, %)
1	1	3
2	3	1
3	5	3
4	3	3
5	3	5
6	1.59	4.41
7	4.41	1.59
8	3	3
9	1.59	1.59
10	3	3
11	4.41	4.41

4.4.1. Maya ekstraktı konsantrasyonunun fermentasyon üzerine etkisi

Çizelge 4.12'den Deneme#3 ve 4 incelendiğinde besiyerinde pepton konsantrasyonu %3'te sabit tutulmuş olup maya ekstraktının konsantrasyonu %3'ten %5'e artırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonunun artmasıyla birlikte *Iase*, *Sase*, protein miktarı, *SSase*, *X*, *Q_{şeker}*, *Q_{Iase}* ve *SUY* değerlerinde artış sağlanmıştır. Ancak, istatistiksel olarak yalnızca protein miktarı ve *X* değerleri arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). Diğer yandan, maya ekstraktı konsantrasyonunun artmasıyla *I/S* oranı, *SIase* ve pH değerlerinde azalma saptanmış olup değerler arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($P>0.05$).

Bununla beraber, Deneme#7 ve 9 ile gerçekleştirilen fermentasyonların sonucunda hesaplanan kinetik değerler, Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Deneme#7 ve 9 da pepton konsantrasyonu sabit tutulmuş olup (%1.59) besiyerinde kullanılan maya ekstraktı konsantrasyonu ise %1.59'dan (Deneme#9) %4.41'e (Deneme#7) artırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ile *Iase* ve *X* değerlerinde önemli ölçüde bir artış sağlanırken ($P<0.05$) *Sase*, *I/S* oranı, protein miktarı, *SIase*, pH, *Q_{şeker}* ve *Q_{Iase}* değerleri ise nispeten artmıştır ($P>0.05$). Diğer yandan, *SSase* ve *SUY* değerlerinde ise besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonunun azalması ile artış sağlanmış olup *SSase* değerleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık belirlenmezken ($P>0.05$) *SUY* değerleri arasında önemli bir farklılık bulunmuştur ($P<0.05$).

Öte yandan, pepton konsantrasyonu %4.41'de sabit tutulmuş olup (Deneme#6 ve 11) besiyerindeki maya ekstraktının konsantrasyonu %1.59'dan %4.41'e artırılmıştır. Sonuçlar, *Iase*, *I/S* oranı, *SIase*, *X* ve *Q_{şeker}* değerlerinde artışın olduğunu göstermiştir. Ancak, yalnızca *I/S* oranındaki artışın istatistiksel anlamda önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Bununla beraber, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ile birlikte *Sase*, protein miktarı, *SSase*, pH, *Q_{Iase}* ve *SUY* değerlerinde azalma söz konusudur. Bunların arasından *Sase*, *SSase* ve *SUY* değerlerindeki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.12).

Besiyerinde kullanılan pepton konsantrasyonu %3'te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1'den %3'e artırıldığında (Deneme#1 ve 10), söz konusu değerlerin nasıl değiştiği Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Şöyle ki; *Iase*, *I/S* oranı, protein miktarı, *X*, pH ve *Q_{Iase}* değerlerinde nispeten bir artış belirlenmiştir ($P>0.05$). Aksine, kullanılan maya ekstraktındaki artış ile birlikte *Sase*, *SIase*, *SSase*, *Q_{şeker}* ve *SUY* değerlerinde nispeten bir düşüş tespit edilmiş olup değerler arasından anlamlı bir farklılık yoktur ($P>0.05$). Özetle, fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonunun artırılması ile birlikte PBD'de olduğu gibi söz konusu değerlerde genellikle bir artışın olduğundan söz etmek mümkündür.

4.4.2. Pepton konsantrasyonunun fermentasyon üzerine etkisi

Deneme#2 ve Deneme#8 incelendiğinde fermentasyon ortamında maya ekstraktının konsantrasyonu %3'te sabit tutulmuş olup pepton konsantrasyonu %1 den (Deneme#2) %3'e (Deneme#8) artırılmıştır. Fermentasyon sonuçlar incelendiğinde

yalnızca I/S oranında ve biyokütle konsantrasyonunda artış sağlanmıştır ($P>0.05$). Ancak, besiyerinde pepton konsantrasyonunun artması ile birlikte *Iase*, *Sase*, protein miktarı, *SIase*, *SSase*, pH, $Q_{şeker}$, Q_{Iase} ve *SUY* değerlerinin azaldığı tespit edilmiş olup *Iase*, *Sase* ve *SSase* değerleri arasında da anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.12).

Besiyerindeki pepton konsantrasyonu %1.59'dan %4.41'e artırıldığında maya ekstraktı konsantrasyonu %1.59'da sabit tutulmuştur (Deneme#6 ve 9). Elde edilen sonuçlara göre *Iase*, protein miktarı, *X*, pH ve Q_{Iase} değerlerinde nispeten artma görülürken ($P>0.05$) I/S oranı değerlerinde önemli bir artış tespit edilmiştir ($P<0.05$). Öte yandan, fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonunun artırılması ile birlikte *Sase*, *SIase* ve $Q_{şeker}$ değerlerinde nispeten bir azalma tespit edilmiştir ($P>0.05$). Bununla beraber, *SSase* ve *SUY* değerlerinde de istatistiksel olarak önemli ölçüde bir düşüş belirlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.12).

Fermentasyon ortamında maya ekstraktının konsantrasyonu %4.41'de sabit tutulmuş olup pepton konsantrasyonu ise %1.59'dan %4.41'e artırılmıştır (Deneme#7 ve 11). Fermentasyon sonuçları incelendiğinde istatistiksel anlamda yalnızca I/S oranında önemli artış sağlanırken (1.42 kat, $P<0.05$) $Q_{şeker}$ değerinde çok az bir artış sağlandığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Diğer yandan *Iase*, *Sase*, *SSase* ve pH değerlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma saptanırken ($P<0.05$) protein miktarı, *SIase*, *X*, Q_{Iase} ve *SUY* değerlerinde azalma belirlenmiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.12).

Ek olarak, Deneme#2 ve Deneme#5 incelendiğinde, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonu %3'te sabit tutulmuş olup pepton konsantrasyonu ise %1'den %5'e artırılmıştır. Fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonunun artması ile birlikte biyokütle konsantrasyonunda önemli ölçüde artış sağlanmış olup ($P<0.05$) I/S oranı, protein miktarı, pH ve $Q_{şeker}$ değerlerinde ise nispeten artış görülmüştür ($P>0.05$). Ancak, *SSase* değerleri arasında pepton konsantrasyonunun artması ile birlikte önemli ölçüde bir azalma belirlenmiştir ($P<0.05$). Bununla beraber *Iase*, *Sase*, *SIase*, Q_{Iase} ve *SUY* değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamsız şekilde bir düşüş gözlemlenmiştir ($P>0.05$). Özetlemek gerekirse, genel olarak fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonunun sabit tutulup pepton konsantrasyonunun artırılması ile birlikte Çizelge 4.12'deki değerlerde azalmanın olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel sonuçları

Deneme	G (%)	J (%)	Iase (U/mL)	Sase (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	Slase (U/mg)	SSase (U/mg)	X (g/L)	pH	Q _{şeker} (g/L/gün)	Q _{Iase} (U/mL/gün)	SUY (%)
1	1	3	839.35 ^c	499.22 ^{cd}	1.68 ^{bc}	0.41 ^{bc}	2043.5 ^{ab}	1216.7 ^{bcd}	21.83 ^d	5.28 ^b	11.09 ^a	127.30 ^a	96.79 ^{ab}
2	3	1	1131.07 ^{ab}	898.31 ^a	1.29 ^{ef}	0.50 ^{ab}	2269.3 ^{ab}	1797.5 ^a	19.53 ^d	5.83 ^b	11.60 ^a	175.58 ^a	96.42 ^{abc}
3	5	3	910.37 ^{bc}	681.96 ^{abcd}	1.36 ^{def}	0.50 ^{ab}	1843.1 ^{ab}	1366.0 ^{abcd}	38.87 ^a	5.21 ^b	10.38 ^a	177.53 ^a	95.73 ^c
4	3	3	795.64 ^c	450.98 ^{cd}	1.66 ^{bcd}	0.33 ^c	2243.4 ^{ab}	1353.5 ^{abcd}	28.07 ^{bcd}	5.96 ^{ab}	9.77 ^a	143.13 ^a	94.65 ^d
5	3	5	950.57 ^{bc}	675.38 ^{abcd}	1.42 ^{cdef}	0.57 ^a	1665.5 ^b	1177.5 ^{bcd}	35.28 ^{ab}	5.84 ^b	12.23 ^a	152.85 ^a	95.83 ^c
6	1.59	4.41	864.06 ^{bc}	568.30 ^{bcd}	1.54 ^{cde}	0.49 ^{ab}	1751.3 ^{ab}	1143.8 ^{cd}	25.84 ^{bcd}	5.51 ^b	10.85 ^a	153.79 ^a	96.01 ^{bc}
7	4.41	1.59	1223.55 ^a	802.56 ^{ab}	1.52 ^{cdef}	0.52 ^{ab}	2348.4 ^a	1541.6 ^{abc}	33.08 ^{abc}	6.81 ^a	11.61 ^a	186.53 ^a	95.84 ^c
8	3	3	808.04 ^c	594.98 ^{bcd}	1.36 ^{def}	0.49 ^{ab}	1687.6 ^b	1243.8 ^{bcd}	26.69 ^{bcd}	5.81 ^b	10.60 ^a	128.79 ^a	96.38 ^{abc}
9	1.59	1.59	861.77 ^{bc}	702.42 ^{abc}	1.22 ^f	0.43 ^{bc}	2048.8 ^{ab}	1679.3 ^{ab}	19.81 ^d	5.39 ^b	11.13 ^a	145.93 ^a	97.17 ^a
10	3	3	872.92 ^{bc}	474.74 ^{cd}	1.91 ^{ab}	0.48 ^{ab}	1869.5 ^{ab}	979.2 ^d	23.15 ^{cd}	6.01 ^{ab}	10.00 ^a	138.61 ^a	95.73 ^c
11	4.41	4.41	871.66 ^{bc}	402.74 ^d	2.16 ^a	0.47 ^{ab}	1885.1 ^{ab}	869.5 ^d	32.41 ^{abc}	5.49 ^b	12.84 ^a	126.61 ^a	95.60 ^c
Ortalama			918.27	613.78	1.56	0.47	1968.67	1306.22	27.69	5.74	11.1	151.08	96.01
Std hata			6.72	7.97	0.01	0.00	2.18	5.27	0.26	0.02	0.10	0.90	0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$).

Std hata: Standart hata

Çizelge 4.13. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların model tarafından tahmin edilen sonuçları

Deneme	G (%)	J (%)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>X</i> (g/L)	pH	<i>Q_{şeker}</i> (g/L/gün)	<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	<i>SUY</i> (%)
1	1	3	790.52	521.61	1.52	0.41	1942.17	1341.73	19.92	5.15	10.62	134.94	96.81
2	3	1	1146.46	902.11	1.24	0.51	2254.12	1674.69	22.80	6.18	11.73	176.55	96.50
3	5	3	956.62	589.85	1.69	0.48	1995.20	1270.71	35.46	5.61	11.14	164.80	95.67
4	3	3	825.53	506.90	1.64	0.43	1968.68	1306.22	27.69	5.93	10.12	136.84	95.59
5	3	5	932.60	601.87	1.64	0.55	1683.24	937.74	32.57	5.76	12.38	146.78	95.71
6	1.59	4.41	910.76	590.01	1.53	0.50	1748.10	1070.77	25.65	5.72	11.14	151.63	96.07
7	4.41	1.59	1179.43	850.56	1.36	0.53	2189.27	1541.66	29.73	6.34	11.04	193.78	95.82
8	3	3	825.53	506.90	1.64	0.43	1968.68	1306.22	27.69	5.93	10.12	136.84	95.59
9	1.59	1.59	884.89	669.46	1.40	0.42	2151.77	1591.88	18.74	5.30	11.43	138.79	97.09
10	3	3	825.53	506.90	1.64	0.43	1968.68	1306.22	27.69	5.93	10.12	136.84	95.59
11	4.41	4.41	851.12	505.41	1.81	0.50	1785.60	1020.56	36.63	5.32	12.26	138.85	95.72

Çizelge 4.14. Deneysel ve model tarafından tahmin edilen sonuçlar arasındaki farklar

Deneme	G (%)	J (%)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>X</i> (g/L)	pH	<i>Q_{şeker}</i> (g/L/gün)	<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	<i>SUY</i> (%)
1	1	3	48.83	-22.39	0.16	0.00	101.33	-125.03	1.91	0.13	0.47	-7.64	-0.02
2	3	1	-15.39	-3.80	0.05	-0.01	15.18	122.81	-3.27	-0.35	-0.13	-0.97	-0.08
3	5	3	-46.25	92.11	-0.33	0.02	-152.1	95.29	3.41	-0.40	-0.76	12.73	0.06
4	3	3	-29.89	-55.92	0.02	-0.10	274.72	47.28	0.38	0.03	-0.35	6.29	-0.94
5	3	5	17.97	73.51	-0.22	0.02	-17.74	239.76	2.71	0.08	-0.15	6.07	0.12
6	1.59	4.41	-46.70	-21.71	0.01	-0.01	3.20	73.03	0.19	-0.21	-0.29	2.16	-0.06
7	4.41	1.59	44.12	-48.00	0.16	-0.01	159.13	-0.06	3.35	0.47	0.57	-7.25	0.02
8	3	3	-17.49	88.08	-0.28	0.06	-281.08	-62.42	-1.00	-0.12	0.48	-8.05	0.79
9	1.59	1.59	-23.12	32.96	-0.18	0.01	-102.97	87.42	1.07	0.09	-0.30	7.14	0.08
10	3	3	47.39	-32.16	0.27	0.05	-99.18	-327.02	-4.54	0.08	-0.12	1.77	0.14
11	4.41	4.41	20.54	-102.67	0.35	-0.03	99.50	-151.06	-4.22	0.17	0.58	-12.24	-0.12

4.4.3. RSM analizi ve besiyeri kompozisyonunun optimizasyonu

Melastan çalkalamalı inkübatörde enzim üretimlerinin gerçekleştirildiği bu çalışmada RSM'nin "Full Quadratic" MKD'si kullanılmıştır. PBD'den fermentasyon ortamında kullanılan maya ekstraktı (G, %) ve peptonun (J, %) enzim aktivitesi üzerine istatistiksel olarak önemli ölçüde pozitif yönde etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan doğrulama fermentasyonlarının sonucu da bunu göstermiştir (Bölüm 4.3.3). Dolayısıyla maya ekstraktının konsantrasyonu (G, %) ve pepton konsantrasyonu (J, %), MKD'de kullanılan bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Design Expert® programındaki MKD kullanılarak *Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *SIase*, *SSase*, X, pH, *Qşeker*, *QIase* ve *SUY* değerlerinin varyans analizi (ANOVA) (Çizelge 4.15) ve regresyon eşitlikleri (Çizelge 4.16) incelenmiştir.

ANOVA sonuçları, *Iase* aktivitesi için modelin güvenilir olduğunu göstermiştir ($P=0.0075<0.01$). Ayrıca, istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenen uyumsuzluk değeri (Lack of Fit) ($P=0.3545>0.05$), modelin deneysel veriler ile iyi uyuştuğunu göstermiştir. Bununla beraber, *Iase* aktivitesi için G, J, G×J ve J×J model terimlerinin de istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuş olup ($P<0.05$) G×G interaksiyonunun önemsiz olduğu saptanmıştır ($P>0.05$). *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen *Iase* aktivitesine ait eşitliğin (Çizelge 4.16) R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri sırasıyla 0.93, 0.85, 0.56 ve 10.09 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Bu da; örnek varyasyonlarının %93'ünün model tarafından tam temsil edildiği anlamına gelmektedir. Tahmin edilen R^2 değerinin düzeltilmiş R^2 değerine yakın olmaması, geniş bir blok etkisini gösterir. Yeterli hassasiyet değeri, sinyalin sese oranını ölçer. Bu oranın 4'ten büyük olması istenir. *Iase* aktivitesinin yeterli hassasiyet değerinin 4'ten büyük olması, yeterli bir sinyalin olduğunu gösterir ve dolayısıyla model, tasarım alanını yönlendirmek için kullanılabilir.

Diğer yandan, *Sase* aktivitesinin ANOVA sonuçlarına göre modelin istatistiksel olarak önemsiz olmasının yanı sıra G, G×J, G×G model terimlerinin de istatistiksel olarak önemsiz olduğu anlaşılmıştır ($P>0.05$). Ancak J ve J×J model terimlerinin %95 güvenlik seviyesinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Öte yandan, istatistiksel olarak önemsiz Lack of Fit değeri ($P=0.4051>0.05$), modelin deneysel veriler ile uyuştuğunu göstermiştir. Fermentasyonlardan elde edilen *Sase* aktivitesine ait model denkleminin (Çizelge 4.16) R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet ile ilgili değerleri sırasıyla 0.83, 0.66, 0.03 ve 5.95 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.15). Bu da; örnek varyasyonlarının %83'ünün model tarafından tam temsil edilmiştir. Tahmin edilen R^2 değerinin düzeltilmiş R^2 değerine yakın olmaması, geniş bir blok etkisini gösterir. *Sase* aktivitesine ait yeterli hassasiyet değerinin (5.95) 4'ten büyük olması, yeterli bir sinyalin olduğunu gösterdiği için model, tasarım alanını yönlendirmek için kullanılabilir.

I/S oranının ANOVA sonuçları, modelin ve diğer model terimlerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermiştir ($P>0.05$). Ancak, istatistiksel olarak önemsiz Lack of Fit değeri ($P=0.4025>0.05$), Çizelge 4.16'daki I/S oranı ile ilgili modelin deneysel verileri ile uyuştuğunu göstermiştir. Bu denklemin R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet ile ilgili değerleri sırasıyla 0.34, -0.31, -2.73 ve 2.37

olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Sonuçlara göre, örnek varyasyonlarının %34'ünü model tam olarak temsil etmiştir. Negatif "tahmin edilen R^2 " değeri, çalışmadan elde edilen deneysel sonuçların mevcut modelden daha iyi bir tahmin edici olduğunu gösterir. Bununla beraber, sinyalin sese oranının 4'ten küçük olması (2.37), yetersiz bir sinyalin olduğunu ve bu modelin tasarım alanını yönlendirmek için kullanılmaması gerektiğini gösterir. Benzer sonuçlar protein miktarı, pH ve *SUY* için de elde edilmiş olup model ve model parametreleri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Lack of Fit değerlerinin de istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiş olup modellerin (Çizelge 4.16) deneysel veriler ile uyduğunu göstermiştir (sırasıyla $P=0.9629$, 0.0518 ve $0.9943>0.05$). Model denklemlere ait R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet ile ilgili değerleri sırasıyla protein miktarı için 0.55 , 0.10 , -0.26 ve 3.02 , pH için 0.69 , 0.38 , -1.14 ve 4.59 ve *SUY* için 0.65 , 0.30 , 0.16 ve 3.62 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Sonuçlar, protein miktarı, pH ve *SUY*'a ait örnek varyasyonlarının sırasıyla %55, %69 ve %65'inin modeller tarafından tam temsil edildiğini göstermiştir. Ayrıca, protein miktarı ve pH için belirlenen negatif tahmin edilen R^2 değerleri, genel ortalama değerlerin mevcut modelden daha iyi bir tahmin edici olduğunu göstermiştir. Öte yandan pH için tespit edilen 4'ten büyük yeterli hassasiyet değeri ile (4.59) modelin tasarım alanını yönlendirmek için kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, *SUY* için tahmin edilen R^2 değerinin 0.16 düzeltilmiş R^2 değeri (0.30) ile kabul edilebilir anlaşma içerisinde olduğu anlaşılmıştır.

Diğer yandan, *SIase*, *SSase* ve $Q_{şeker}$ değerlerine ait ANOVA sonuçları ve regresyon eşitlikleri sırasıyla Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre modellerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu bunun yanı sıra *SIase* ve *SSase* için yalnızca J model teriminin, $Q_{şeker}$ için yalnızca J×J intraksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiş olup ($P<0.05$) geri kalan model terimlerinin ve Lack of Fit değerlerinin (sırasıyla $P=0.8304$, 0.6420 ve $0.2580>0.05$) istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, istatistiksel olarak önemsiz Lack of Fit değerleri, modellerin deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermiştir. Model denklemlerinin R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri sırasıyla *SIase* için 0.60 , 0.19 , -0.51 ve 3.59 , *SSase* için 0.81 , 0.62 , 0.12 ve 6.16 ve $Q_{şeker}$ için 0.76 , 0.53 , -0.47 ve 4.79 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Modellerin R^2 değeri örnek varyasyonlarının sırasıyla %60, %81 ve %76'sının modeller tarafından tam temsil edildiğini göstermektedir.

SIase ve $Q_{şeker}$ için belirlenen negatif tahmin edilen R^2 değerleri, genel ortalama değerlerin mevcut modelden daha iyi bir tahmin edici olduğunu göstermiştir. Bununla beraber *SSase* için tahmin edilen R^2 değerinin düzeltilmiş R^2 değerine yakın olmaması nedeniyle geniş bir blok etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *SIase*'e ait modelde sinyalin sese oranı 4'ten küçük olduğu için (3.59) model, tasarım alanını yönlendirmek için kullanılmamalıdır. Öte yandan, *SSase* ve $Q_{şeker}$ için belirlenen yeterli hassasiyet değerlerinin 4'ten büyük olması (sırasıyla 6.16 ve 4.79) yeterli bir sinyalin olduğunu gösterdiği için modellerin tasarım boşluğunu yönlendirmek için kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen sonuçların varyans analizi

Kaynak	Iase (U/mL)				Sase (U/mL)			I/S oranı			Protein miktarı (mg/mL)		
	KT	SD	KO	P	KT	KO	P	KT	KO	P	KT	KO	P
Model	169679.1	5	33935.8	0.0075**	198088.8	39617.8	0.0537	0.27	0.05	0.7507	0.022	0.004	0.4195
G	27591.1	1	27591.1	0.0244*	4656.8	4656.8	0.4837	0.03	0.03	0.6308	0.005	0.005	0.2985
J	45732.8	1	45732.8	0.0094**	90144.8	90144.8	0.0209*	0.16	0.16	0.2661	0.001	0.001	0.5498
G×J	31360.9	1	31360.9	0.0194*	17649.1	17649.1	0.201	0.03	0.03	0.6414	0.003	0.003	0.4023
G×G	3257.7	1	3257.7	0.3239	3366.7	3366.7	0.5486	0.00	0.00	0.8968	0.000	0.000	0.8087
J×J	64651.2	1	64651.2	0.0046**	84802.6	84802.6	0.0233*	0.06	0.06	0.4908	0.012	0.012	0.1258
Artık hata	13612.1	5	2722.4		40726.2	8145.2		0.52	0.10		0.018	0.004	
Uyum eksikliği	10166.9	3	3389.0	0.3545	28806.8	9602.3	0.4051	0.37	0.12	0.4025	0.002	0.001	0.9629
Saf hata	3445.1	2	1722.6		11919.4	5959.7		0.15	0.08		0.016	0.008	
Toplam	183291.2	10			238815.0			0.80			0.040		
R ²	0.93				0.83			0.34			0.55		
Düz. R ²	0.85				0.66			-0.31			0.1		
Tah. R ²	0.56				0.03			-2.73			-0.26		
Yet. hassasiyet	10.09				5.95			2.37			3.02		

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, Düz. R²: Düzeltilmiş R², Tah. R²: Tahmin edilen R², Yet. hassasiyet: Yeterli hassasiyet

**P<0.01 ve *P<0.05, istatistiksel olarak önemlidir.

Devamı Arkada

Çizelge 4.15'in devamı

Kaynak	Slase (U/mg)			SSase (U/mg)			X (g/L)			pH		
	KT	KO	P	KT	KO	P	KT	KO	P	KT	KO	P
Model	341279.0	68255.8	0.3404	644936.5	128987.3	0.0671	368.8	73.8	0.0267*	1.40	0.28	0.1975
G	2812.2	2812.2	0.8151	5043.0	5043.0	0.6982	241.3	241.3	0.0051**	0.21	0.21	0.2490
J	325907.9	325907.9	0.0453*	543096.9	543096.9	0.0080**	95.5	95.5	0.0304*	0.18	0.18	0.2879
G×J	6872.4	6872.4	0.7159	4664.9	4664.9	0.7090	11.2	11.2	0.3519	0.52	0.52	0.0967
G×G	1862.8	1862.8	0.8489	4872.1	4872.1	0.7030	20.7	20.7	0.2217	0.43	0.43	0.1222
J×J	5154.6	5154.6	0.7522	91725.0	91725.0	0.1401	1.1	1.1	0.7594	0.00	0.00	0.9023
Artık hata	231539.7	46307.9		149346.6	29869.3		53.3	10.7		0.62	0.12	
Uyum eksikliği	70938.9	23646.3	0.8304	75297.3	25099.1	0.6420	40.4	13.5	0.3397	0.60	0.20	0.0518
Saf hata	160600.8	80300.4		74049.2	37024.6		12.9	6.4		0.02	0.01	
Toplam	572818.8			794283.1			422.1			2.02		
R ²	0.60			0.81			0.87			0.69		
Düz. R ²	0.19			0.62			0.75			0.38		
Tah. R ²	-0.51			0.12			0.25			-1.14		
Yet. hassasiyet	3.59			6.16			8.24			4.59		

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, Düz. R²: Düzeltilmiş R², Tah.R²: Tahmin edilen R², Yet. hassasiyet: Yeterli hassasiyet

**P<0.01 ve *P<0.05, istatistiksel olarak önemlidir.

Devamı Arkada

Çizelge 4.15'in devamı

Kaynak	$Q_{şeker}$ (g/L/gün)			$Q_{İase}$ (U/mL/gün)			SUY (%)		
	KT	KO	P	KT	KO	P	KT	KO	P
Model	6.59	1.32	0.1116	3846.8	769.4	0.0338*	2.92	0.58	0.2580
G	0.27	0.27	0.4536	891.6	891.6	0.0442*	1.31	1.31	0.0970
J	0.42	0.42	0.3545	886.3	886.3	0.0446*	0.62	0.62	0.2186
$G \times J$	0.57	0.57	0.2899	1148.5	1148.5	0.0290*	0.21	0.21	0.4500
$G \times G$	0.80	0.80	0.2199	239.4	239.4	0.2247	0.60	0.60	0.2247
$J \times J$	5.27	5.27	0.0156*	869.8	869.8	0.0460*	0.38	0.38	0.3218
Artık hata	2.04	0.41		624.0	124.8		1.58	0.32	
Uyum eksikliği	1.67	0.56	0.2580	516.5	172.2	0.2469	0.05	0.02	0.9943
Saf hata	0.37	0.18		107.5	53.7		1.53	0.76	
Toplam	8.63			4470.9			4.49		
R^2	0.76			0.86			0.65		
Düz. R^2	0.53			0.72			0.30		
Tah. R^2	-0.47			0.12			0.16		
Yet. hassasiyet	4.79			7.13			3.62		

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, Düz. R^2 : Düzeltilmiş R^2 , Tah. R^2 : Tahmin edilen R^2 , Yet. hassasiyet: Yeterli hassasiyet

** $P < 0.01$ ve * $P < 0.05$, istatistiksel olarak önemlidir.

Çizelge 4.16. Yanıtların regresyon analizi ile elde edilen quadratik eşitlikleri

Yanıt	Sabit	G	J	G×J	G×G	J×J
<i>Iase</i> (U/mL)	825.53	58.73	-75.61	-88.55	24.02	107.00
<i>Sase</i> (U/mL)	506.90	24.13	-106.15	-66.43	24.42	122.54
I/S oranı	1.64	0.06	0.14	0.08	-0.02	-0.10
Protein miktarı (mg/mL)	0.43	0.02	0.01	-0.03	0.01	0.05
<i>SIase</i> (U/mg)	1933.50	18.75	-201.84	-41.45	18.16	30.21
<i>SSase</i> (U/mg)	1192.17	-25.11	-260.55	-34.15	29.37	127.45
<i>X</i> (g/L)	25.97	5.49	3.45	-1.68	1.92	0.44
pH	5.93	0.16	-0.15	-0.36	-0.28	0.02
<i>Qşeker</i> (g/L/gün)	10.12	0.18	0.23	0.38	0.38	0.97
<i>QIase</i> (U/mL/gün)	136.84	10.56	-10.53	-16.95	6.51	12.41
SUY (%)	95.59	-0.40	-0.28	0.23	0.33	0.26

Biyokütle konsantrasyonu (*X*) ve *QIase* için ANOVA sonuçları ve regresyon eşitlikleri sırasıyla Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16’da gösterilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre, modellerin *X* ve *QIase* için güvenilir olduğunu tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0.00267$ ve $0.0338<0.05$). Diğer yandan, *X*’in varyans analizinde G ve J model terimlerinin istatistiksel olarak önemli olduğu, *QIase*’in varyans analizinde ise G, J, G×J ve J×J model terimlerinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *X* ve *QIase* için istatistiksel olarak önemsiz Lack of Fit değerleri (sırasıyla $P=0.33397$ ve $0.2469>0.05$), modellerin deneysel veriler ile oldukça iyi uyduğunu göstermiştir. Fermentasyonlardan elde edilen *X* ve *QIase*’e ait model eşitliklerinin (Çizelge 4.16) R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri sırasıyla *X* için 0.87, 0.75, 0.25 ve 8.24 ve *QIase* için 0.86, 0.72, 0.12 ve 7.13 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.15). Modellerin R^2 değeri, örnek varyasyonlarının sırasıyla %87 ve %86’sının modeller tarafından tam temsil edildiğini göstermektedir. *X* ve *QIase* için tahmin edilen R^2 değerlerinin düzeltilmiş R^2 değerlerine yakın olmaması, geniş bir blok etkisini göstermektedir. *X* ve *QIase* için yeterli hassasiyet değerinin 4’ten büyük olması, yeterli bir sinyalin olduğunu gösterir ve dolayısıyla *X* ve *QIase* için önerilen modellerin tasarım boşluğunu yönlendirmek için kullanılabilir olduğu ortaya konmuştur.

4.4.4. Üç boyutlu (3D) yüzey grafikleri

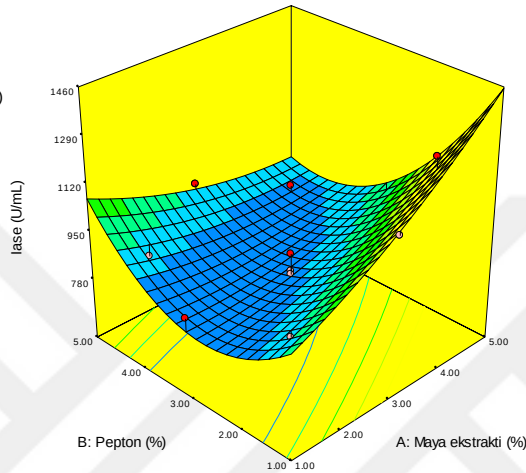
Maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun fermentasyon sonuçları (*Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *SIase*, *SSase*, *X*, pH, *Qşeker*, *QIase* ve SUY) üzerine etkilerinin görsel olarak daha kolay anlaşılabilmesi amacıyla elde edilen modeller kullanılarak üç boyutlu (3D) cevap yüzey grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.17-4.27). Bu grafikler, iki değişkenin yanıt üzerine sonsuz sayıda kombinasyonunu verir. Aşağıda, maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun yanıtlar üzerine etkisini gösteren 3D yüzey grafikleri sunulmuş ve açıklanmıştır.

Şekil 4.17’de *Iase* aktivitesi üzerine, Şekil 4.18’de *Sase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafikleri gösterilmiştir. 3D yüzey grafiklerinden de anlaşıldığı üzere fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonu %3 düzeylerinde ve maya ekstraktı konsantrasyonu ise %1 seviyelerinde olduğunda en düşük *Iase* ve *Sase* aktiviteleri elde edilmiştir. Bununla

beraber, pepton ve maya ekstraktı konsantrasyonu %5 olduğunda da düşük *Iase* ve *Sase* aktiviteleri tespit edilmiştir. Öte yandan, maksimum *Iase* ve *Sase* aktiviteleri pepton konsantrasyonu ve maya ekstraktı konsantrasyonu sırasıyla %1 ve %5 olduğunda ölçülmüştür. Ayrıca, maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonu sırasıyla %1 ve %5 olduğunda da enzim aktivitesinde nispeten artış sağlanmıştır. Şu halde, besiyerinde pepton konsantrasyonu minimum ve maya ekstraktı konsantrasyonu maksimum düzeyde olduğunda en yüksek *Iase* ve *Sase* aktiviteleri elde edilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Design-Expert® Software

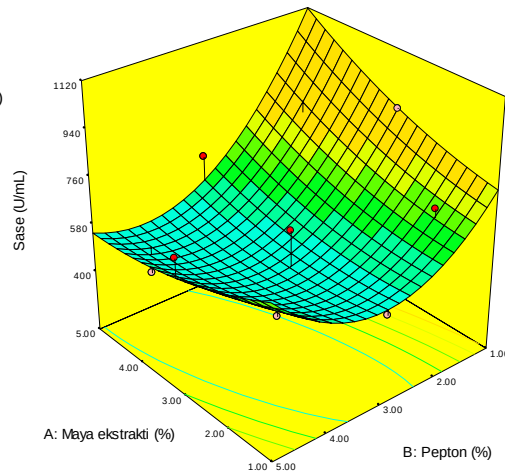
Iase (U/mL)

1223.55
795.64X1 = A: Maya ekstraktı (%)
X2 = B: Pepton (%)

Şekil 4.17. *Iase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

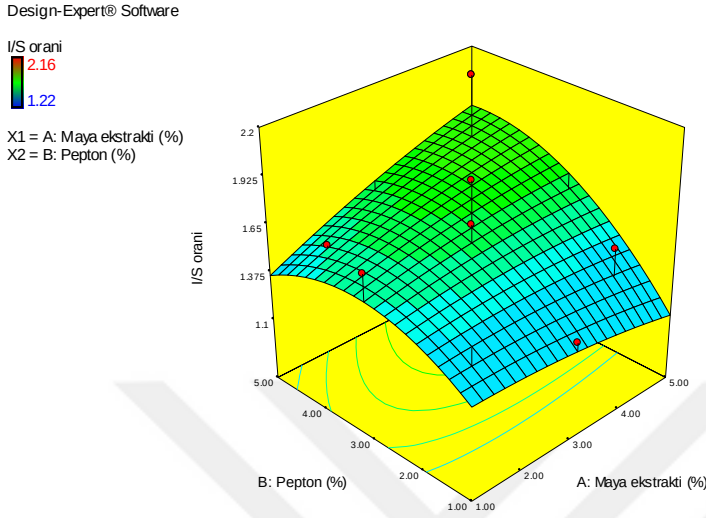
Design-Expert® Software

Sase (U/mL)

898.31
402.74X1 = A: Maya ekstraktı (%)
X2 = B: Pepton (%)

Şekil 4.18. *Sase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

I/S oranı üzerine fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisi, Şekil 4.19’da sunulmuştur. Şekil 4.19’a göre fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonu minimum düzeyde (%1) ve pepton konsantrasyonu %3-4 seviyelerine kadar arttığında I/S oranında artış sağlanmıştır.

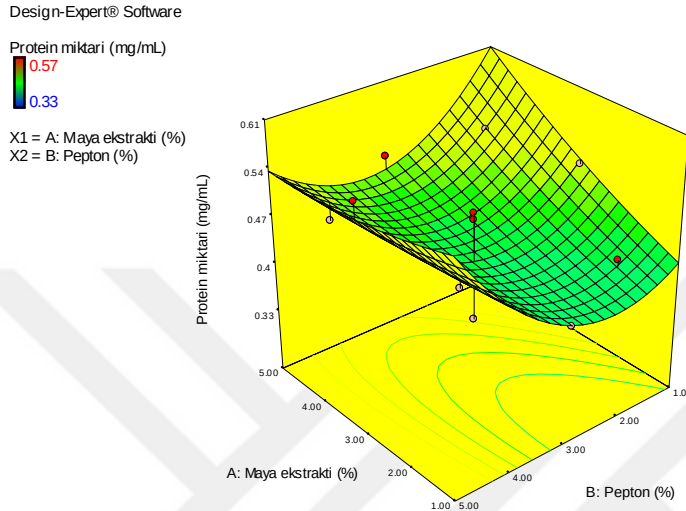


Şekil 4.19. I/S oranı üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Ancak, pepton konsantrasyonu %3-4’ten %5’e arttığında ise I/S oranında azalma tespit edilmiştir. Öte yandan, pepton konsantrasyonu minimum düzeyde olduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1’den %5’e artırıldığında ise I/S oranında nispeten bir azalma belirlenmiştir. Ancak pepton konsantrasyonu maksimum seviyede olduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1’den %5’e artırıldığında da I/S oranında artış sağlanmıştır. Diğer yandan fermentasyon ortamındaki maya ekstraktının konsantrasyonu %5’te sabit tutulduğunda ise pepton konsantrasyonunun %1’den %5’e artırılmasıyla I/S oranında önemli ölçüde azalan oranda artış sağlanmıştır. Bununla beraber, besiyerine maksimum düzeyde maya ekstraktı ve pepton ilave edildiğinde maksimum I/S oranı elde edilirken, fermentasyon ortamına maksimum düzeyde maya ekstraktı ve minimum düzeyde pepton ilave edildiğinde ise minimum I/S oranı elde edilmiştir (Şekil 4.19).

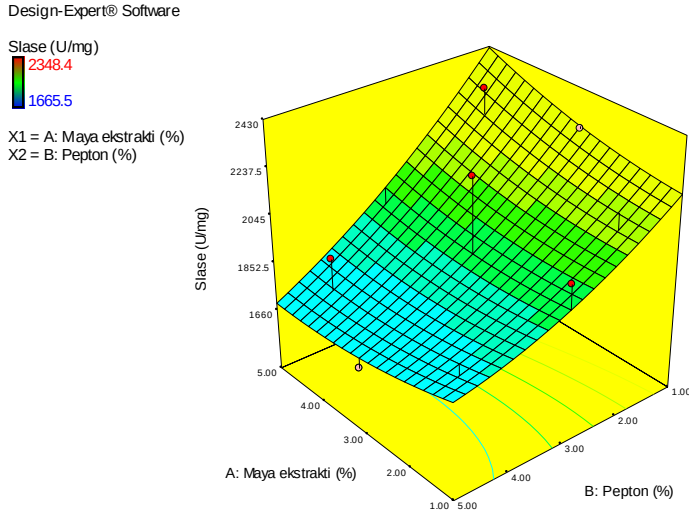
Şekil 4.20’de protein miktarı üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D yüzey grafiği gösterilmiştir. Oluşan proteinin minimum düzeyleri fermentasyon ortamında %1 maya ekstraktı ve %2-3 civarında pepton konsantrasyonu olduğunda tespit edilmiştir. Ayrıca, maya ekstraktı konsantrasyonu %1’de sabit tutulduğunda pepton konsantrasyonu %2-3’ten %5’e artırıldığında ve %1’e azaltıldığında protein miktarında artış sağlanmıştır. Bununla beraber, pepton konsantrasyonu %1’de sabit tutulduğunda maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ile birlikte fermentasyon ortamında oluşan protein miktarı artmıştır. Öte yandan pepton konsantrasyonu %5’te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1’den %5’e artırıldığında protein miktarında nispeten azalma belirlenmiştir. Diğer yandan, fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı

konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %3 olduğunda protein miktarının azaldığı, pepton konsantrasyonu %3'ten %5'e artırıldığında ve %3'ten %1'e düşürüldüğünde protein miktarının arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak maksimum protein seviyeleri, pepton konsantrasyonu maksimum ve maya ekstraktı konsantrasyonu minimum düzeyde olduğunda ve ayrıca pepton konsantrasyonu minimum ve maya ekstraktı konsantrasyonu maksimum olduğunda belirlenmiştir (Şekil 4.20).



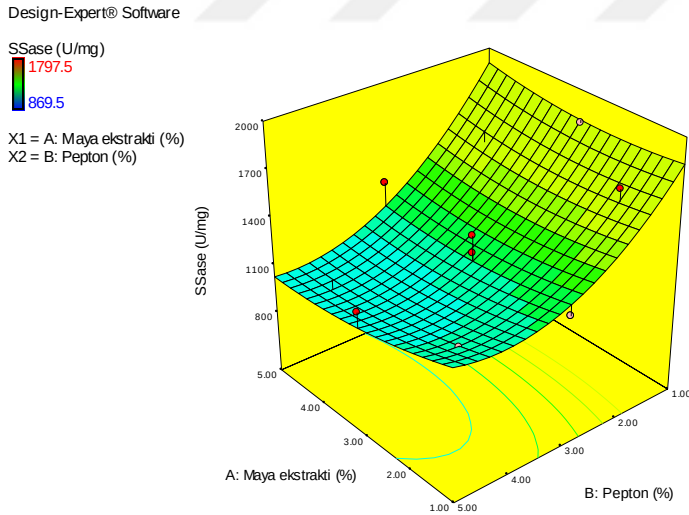
Şekil 4.20. Protein miktarı üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun *SIase* aktivitesi üzerine etkisi, Şekil 4.21'de incelenmiştir. Besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda pepton konsantrasyonunun %5'ten %1'e azaltılması ile *SIase* aktivitesinde artış sağlanmıştır. Öte yandan, pepton konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda ise maya ekstraktı konsantrasyonunun %1'den %5'e artırılması ile *SIase* aktivitesi nispeten artmıştır. Bununla beraber, fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında *SIase* aktivitesinde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Ancak besiyerinde maya ekstraktı seviyesinin %1'den %5'e artırılması ve pepton konsantrasyonunun %5'te sabit tutulduğunda ise *SIase* aktivitesinde herhangi bir artış görülmemiştir. Sonuç olarak maksimum *SIase* aktivitesi, fermentasyon ortamında maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonu sırasıyla maksimum ve minimum düzeyde bulunduğu elde edilmiştir. En düşük *SIase* aktivitesi ise besiyerinde pepton konsantrasyonu maksimum, maya ekstraktı konsantrasyonu minimum düzeyde ve ayrıca pepton konsantrasyonu maksimum, maya ekstraktı konsantrasyonu minimum düzeyde olduğunda belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *Slase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Şekil 4.22’de *SSase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D yüzey grafiği verilmiştir. Fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonu %1 veya %5’te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1’den %5’e artırıldığında *SSase* aktivitesinde artışın olmadığı görülmektedir.

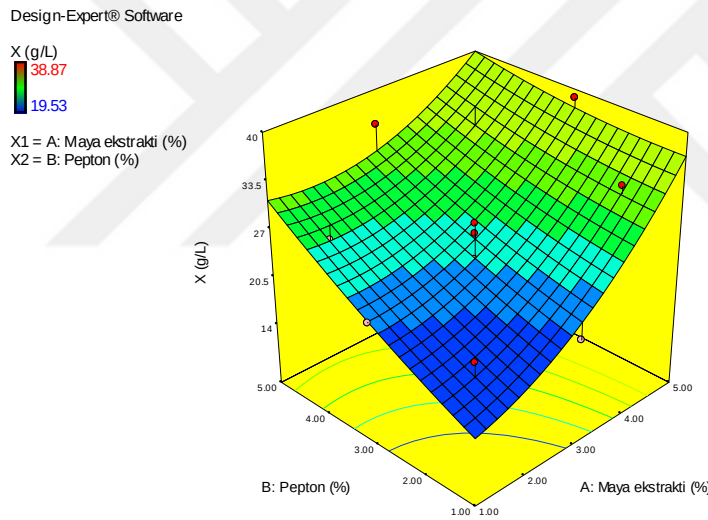


Şekil 4.22. *SSase* aktivitesi üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Diğer yandan, maya ekstraktı konsantrasyonu minimum veya maksimum düzeyde fermentasyon ortamına eklendiğinde (%1 veya %5) ve pepton konsantrasyonu %1’den %5’e artırıldığında *SSase* aktivitesinde önemli ölçüde azalma görülmüştür. Bununla beraber, maksimum *SSase* aktivitesi besiyerinde maya ekstraktı

konsantrasyonu maksimum ve pepton konsantrasyonu minimum düzeyde eklendiğinde elde edilmiştir. Minimum SSase aktivitesi ise besiyerinde hem pepton hem de maya ekstraktı konsantrasyonu maksimum düzeyde eklendiğinde tespit edilmiştir (Şekil 4.22).

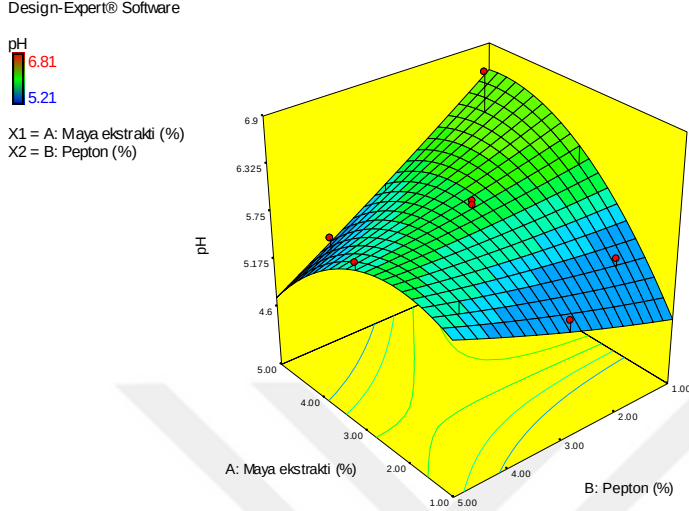
Biyokütle üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği, Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında biyokütle konsantrasyonu önemli ölçüde artmıştır. Besiyerinde pepton konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda ve maya ekstraktının konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında da biyokütle konsantrasyonu önemli ölçüde artmıştır. Bununla beraber, pepton konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında biyokütle konsantrasyonunda nispeten artış sağlanmış olup benzer bir sonuç, fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında da elde edilmiştir. Sonuç olarak, minimum biyokütle konsantrasyonu, besiyerinde pepton ve maya ekstraktı konsantrasyonu minimum düzeyde eklendiğinde tespit edilirken maksimum biyokütle konsantrasyonu fermentasyon ortamına maksimum düzeyde maya ekstraktı ve pepton ilave edildiğinde belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Biyokütle üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

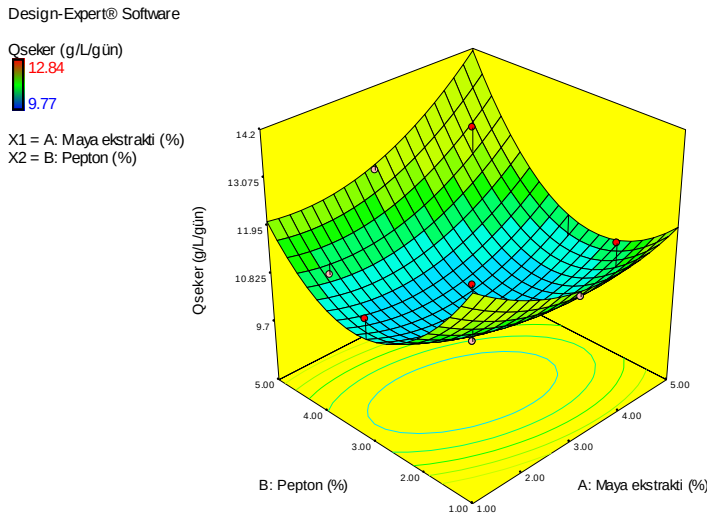
Şekil 4.24'te pH üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği verilmiştir. Fermentasyon ortamına maya ekstraktı maksimum düzeyde eklendiğinde (%5) ve pepton konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında pH düşmüştür. İlâveten, besiyerinde pepton konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1'den %5'e artırıldığında pH'da azalan oranda bir artış tespit edilmiştir. Diğer yandan pepton konsantrasyonu %5'ten %1'e azaltıldığında ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1 olduğunda pH'da nispeten azalma tespit edilmiştir. Bununla beraber, fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı %1'den %3'e artırıldığında pH nispeten artarken %3'ten %5'e artırıldığında ise pH azalmıştır. Sonuçta maksimum pH değeri

pepton konsantrasyonu minimum, maya ekstraktı konsantrasyonu maksimum düzeyde olduğunda belirlenmiştir. Minimum pH değeri ise besiyerine minimum pepton ve maya ekstraktı konsantrasyonu eklendiğinde veya maksimum pepton ve maya ekstraktı ilave edildiğinde tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. pH üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

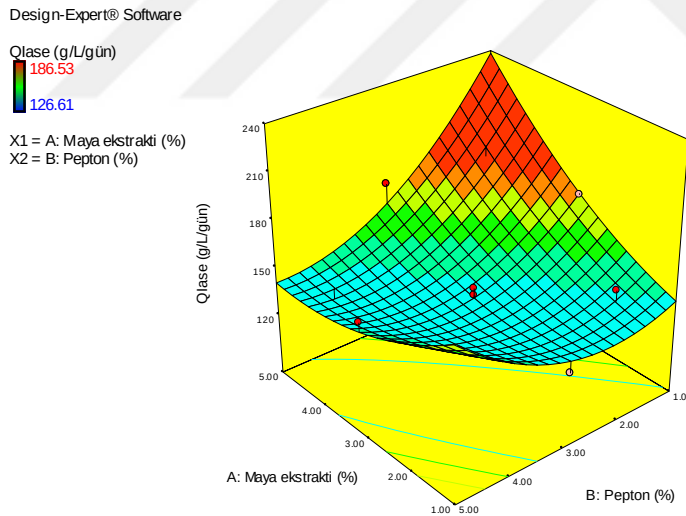
Şekil 4.25'te $Q_{şeker}$ üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren şemsiye şeklinde 3D cevap yüzey grafiği gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde $Q_{şeker}$ 'in minimum seviyeleri fermentasyon ortamında maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonu %3 oranında eklendiğinde elde edilmiştir.



Şekil 4.25. $Q_{şeker}$ üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Diğer yandan, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonu %1 veya %5'te sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %1'den %2-3 seviyelerine artırıldığında $Q_{şeker}$ azalırken pepton seviyesi %2-3 dolaylarından %5'e artırıldığında ise artmıştır. $Q_{şeker}$, pepton konsantrasyonu %1 veya %5'te sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1'den %2-3 seviyelerine artırıldığında azalırken %2-3'ten %5'e artırıldığında ise artmıştır. Sonuç olarak maksimum $Q_{şeker}$ değeri, fermentasyon ortamında maksimum düzeyde maya ekstraktı ve pepton bulunduğu elde edilmiştir (Şekil 4.25).

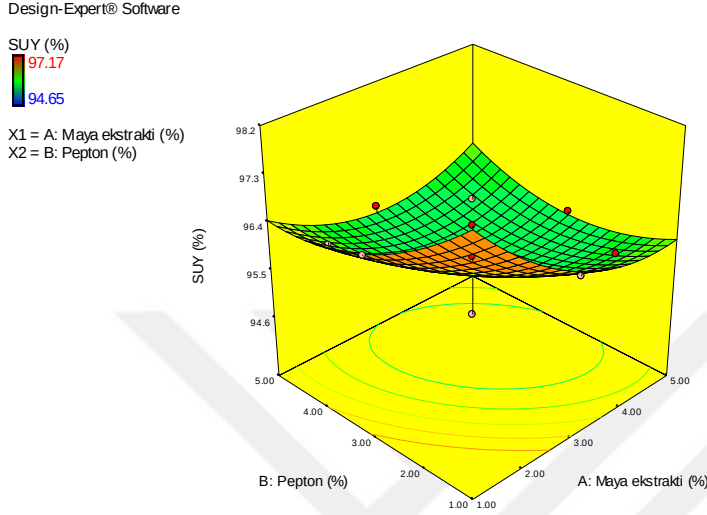
Q_{Iase} üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği, şekil 4.26'da sunulmuştur. Fermentasyon ortamında maya ekstraktı seviyesi %1'de sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %1'den %2-3 seviyelerine artırıldığında Q_{Iase} değeri azalırken pepton konsantrasyonu %3 düzeyinden %5'e artırıldığında Q_{Iase} değeri artmıştır. Öte yandan, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonu %5'ten %1'e azaltıldığında ve pepton konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ise Q_{Iase} değerinde nispeten bir artış sağlanmıştır. Ancak Q_{Iase} değeri, fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonu %1'de sabit tutulduğunda ve maya ekstraktı %1'den %5'e artırıldığında artmıştır. Bununla beraber, besiyerinde maya ekstraktı konsantrasyonu %5'te sabit tutulduğunda ve pepton konsantrasyonu %5'ten %1'e azaltıldığında da artmıştır. Sonuç olarak, maksimum Q_{Iase} değeri fermentasyon ortamına maksimum oranda maya ekstraktı ve minimum oranda pepton ilave edildiğinde elde edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Q_{Iase} üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

Şekil 4.27'de SUY üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği verilmiştir. Maksimum SUY seviyeleri, besiyerinde hem maya ekstraktı hem de pepton konsantrasyonunun seviyeleri %1 olduğunda elde edilirken minimum SUY seviyeleri ise bu bileşenlerin konsantrasyonunun fermentasyon ortamında %4 dolaylarında olduğunda tespit edilmiştir. Öte yandan, pepton konsantrasyonu minimum veya maksimum düzeyde sabit tutulduğunda (%1 veya %5)

ve maya ekstraktı konsantrasyonu %1'den %3' artırıldığında *SUY* nispeten azalırken maya ekstraktı seviyesi %3'ten %5'e artırıldığında da nispeten artmıştır. Bununla beraber, fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonu en düşük veya en yüksek seviyelerde eklendiğinde (%1 veya %5) ve pepton konsantrasyonu %1'den %3'e artırıldığında *SUY* değerinde nispeten düşüş gözlemlenirken %3'ten %5'e artırıldığında ise *SUY* değerinde nispeten bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. *SUY* üzerine maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

4.4.5. MKD doğrulama denemeleri

RSM kullanılarak optimum koşulların belirlenmesinde *Iase* aktivitesi (U/mL), *Sase* aktivitesi (U/mL), I/S oranı, protein miktarı (mg/mL), *SIase* aktivitesi (U/mg), *SSase* aktivitesi (U/mg), *X* (g/L), pH, *Qşeker* (g/L/gün), *QIase* (U/mL/gün) ve *SUY* (%) kullanılmıştır. Bu amaçla, modelin belirlemiş olduğu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların sonucunda elde edilen değerler, Design Expert® istatistik programının optimizasyon fonksiyonu kullanılarak muhtemel optimum koşullar belirlenmiştir. Bununla beraber, Çizelge 4.15 ve 3D yüzey grafikleri sonuçlarından da anlaşıldığı üzere fermentasyon ortamında pepton konsantrasyonunun azalması ve maya ekstraktı konsantrasyonunun artması, sonuçlarda olumlu yönde etki etmiştir. Bu durum ve PBD'den elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurularak muhtemel optimum koşullar tespit edilmiş olup Çizelge 4.17'de verilmiştir.

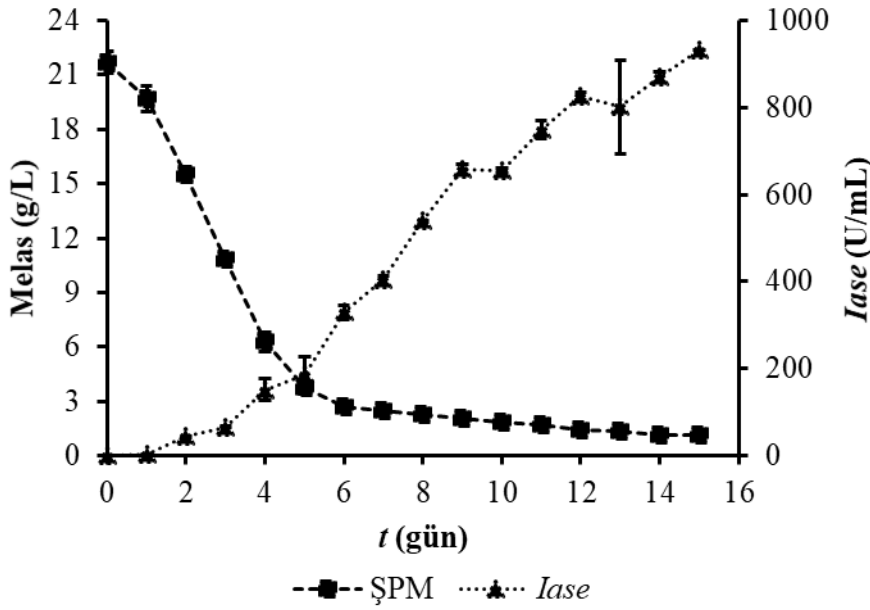
Çizelge 4.17. Muhtemel optimum koşullar

Deneme	Maya ekstraktı (G, %)	Pepton (J, %)
1	4.41	1.59
2	4.20	1.59
3	4.41	1.00
4	4.20	1.00
5	4.41	0.10
6	4.20	0.10
7	1.00	0.10
8	4.41	0.00
9	4.20	0.00
10	1.00	0.00

Çalkalamalı inkübatörde, MKD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlar tamamlandıktan sonra optimum besiyeri kompozisyonunu belirlemek için Çizelge 4.17’de belirlenen muhtemel optimum besiyeri kompozisyonları hazırlandıktan sonra gerçekleştirilen fermentasyonların sonuçları alt başlıklar şeklinde aşağıda tartışılmıştır.

4.4.5.1. Deneme#1 (%4.41 G ve %1.59 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

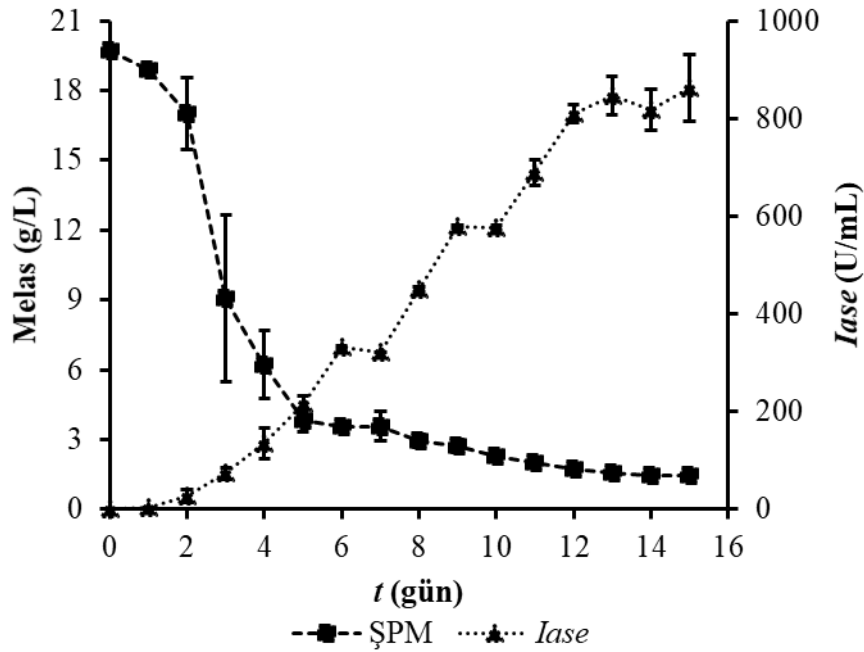
Fermentasyon ortamına %4.41 maya ekstraktı ve %1.59 pepton eklenerek gerçekleştirilen fermentasyonun (Deneme#1) şeker tüketim ve enzim üretimi ile ilgili sonuçları Şekil 4.28’de sunulmuştur. Fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir bölümü (yaklaşık %83’ü) fermentasyonun ilk 5 gününde mikroorganizma tarafında tüketilmiş olup maksimum tüketim hızının 2-4 gün arasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Ayrıca fermentasyonun 4. gününden sonra şeker tüketiminin azalan oranda devam ettiği belirlenmiştir. Bununla beraber, 4. ve 6. gün arasındaki şeker tüketim değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık olmasına rağmen ($P<0.05$) 6. ve 14. günler arasındaki şeker tüketim değerlerinin istatistiksel anlamda önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($P>0.05$). Fermentasyonun sonunda ise ortamdaki şekerin yaklaşık %95’i kullanılan mikroorganizma tarafından tüketilmiştir. Şeker tüketimine paralel olarak enzim üretimi de fermentasyonun 1. gününden 9. gününe kadar sürekli artarken ($P<0.05$) 9. gününden sonra ise enzim aktivitesinin azalan oranda arttığı belirlenmiştir. Öte yandan, fermentasyonun 10. günündeki enzim aktivitesinin 9. gününe göre nispeten azaldığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Benzer bir durum fermentasyonun 12. ve 13. günlerindeki enzim aktivitesi değerlerinde de elde edilmiştir ($P>0.05$). Bununla beraber, Şekil 4.28’de görüldüğü gibi fermentasyonun sonunda maksimum enzim aktivitesi (931.20 ± 0.00 U/mL) tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Deneme#1 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.2. Deneme#2 (%4.20 G ve %1.59 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

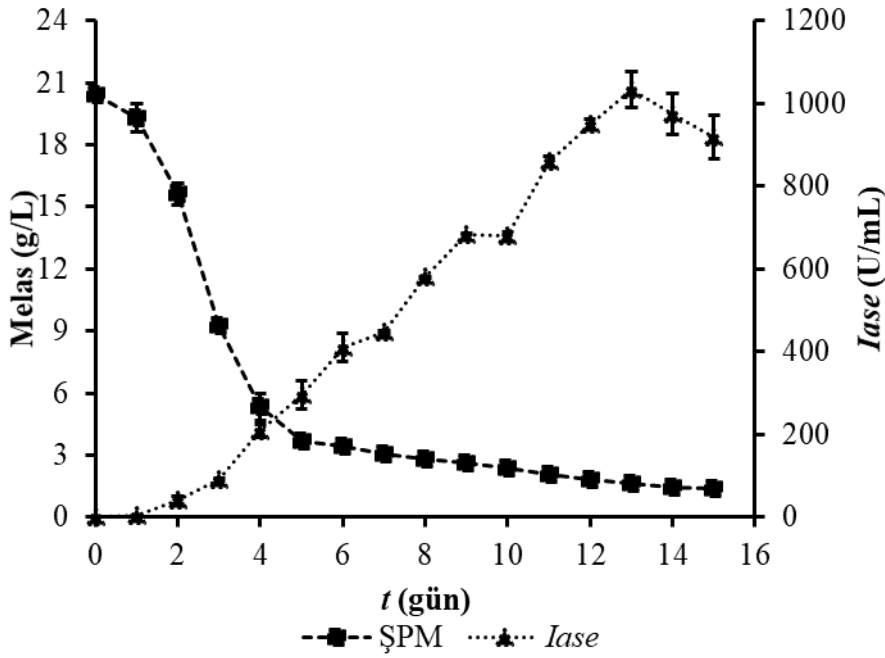
Besiyerine %4.2 maya ekstraktı ve %1.59 pepton ilave edileerek gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi ve enzim üretimine ait veriler, Şekil 4.29'da gösterilmiştir (Deneme#2). Elde edilen bulgulara göre, fermentasyon ortamındaki şekerin mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketildiği tespit edilmiştir. Bununla beraber, fermentasyonun 2. ve 3. günlerinde şekerin tüketim hızı maksimum düzeyde iken ($P < 0.05$) fermentasyonun 3. gününden sonra şekerin tüketimi azalan oranda devam etmiştir. Fermentasyonun 4. gününün sonunda ortamdaki şekerin yaklaşık %81'i mikroorganizma tarafından tüketilirken fermentasyonun sonunda şekerin yaklaşık %93'ü tüketilmiştir ($P > 0.05$). Ayrıca, fermentasyonun 5. gününden sonuna kadarki şeker tüketim değerlerinde istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Fermentasyon ortamındaki şekerin tüketilmesi ile birlikte enzim üretimi de artmıştır. Enzim aktivitesinin fermentasyonun 1. gününden 6. gününe kadar kesintisiz arttığı belirlenmiş olup 6. günden sonra enzim aktivitesi nispeten azalmıştır (6-7. gün arası) ($P > 0.05$). Ayrıca enzim aktivitesi 7. günden sonra 9. güne kadar doğrusal olarak artmış olup 9. günden sonra da aktivitede artış tespit edilmemiştir (9-10. gün arası) ($P > 0.05$). 10-12. günler arasında enzim aktivitesinde doğrusal bir artış sağlanırken 12. günden sonra aktivite de azalan bir artış görülmüştür. Diğer yandan, 12. gün ve 15. gün arasında üretilen enzim aktivitesi değerleri arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Fakat bu değerler ile diğer günlerdeki enzim aktivitesi değerleri arasında önemli bir farklılık bulunmuştur ($P < 0.05$). Öte yandan, maksimum enzim aktivitesi değeri fermentasyonun sonunda 861.77 ± 68.71 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Deneme#2 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.3. Deneme#3 (%4.41 G ve %1.00 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

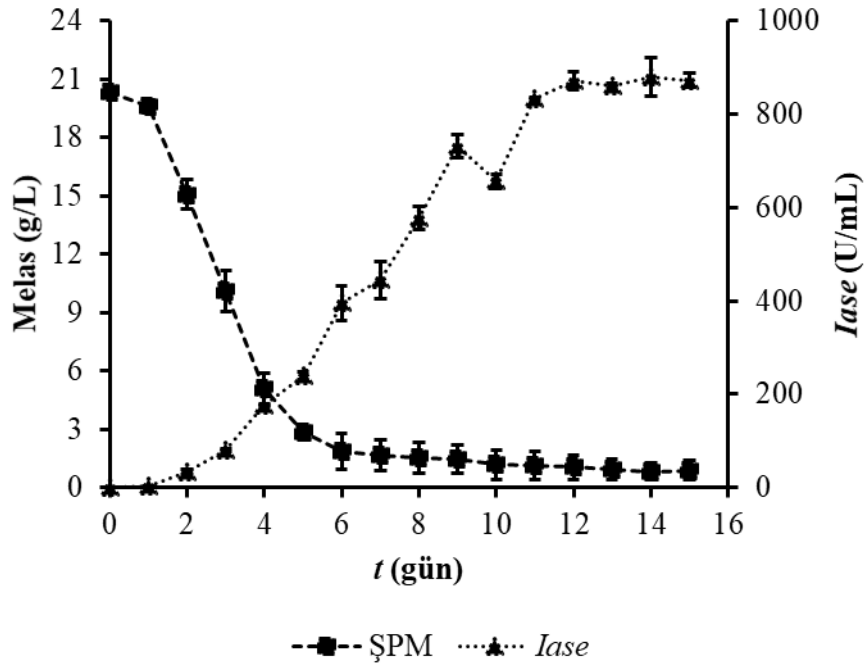
Fermentasyon ortamına %4.41 maya ekstraktı ve %1 pepton eklenerek gerçekleştirilen fermentasyondaki şeker tüketimi ve enzim üretiminin değişimini gösteren grafik, Şekil 4.30'da gösterilmiştir (Deneme#3). Sonuçlar, fermentasyon ortamındaki şekerin mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, fermentasyon ortamındaki şekerin tüketim hızı fermentasyonun 2. ve 3. günlerinde en yüksek seviyede iken ($P < 0.05$) şekerin tüketim hızı fermentasyonun 3. gününden sonra azalan oranda devam etmiştir. Fermentasyonun 5. gününde ortamdaki şekerin yaklaşık %82'si tüketilmiş olup fermentasyonun sonunda şekerin yaklaşık %93.28'i tüketilmiştir ($P > 0.05$). Besiyerindeki şekerin tüketilmesi ile enzim üretimi artmıştır. Enzim aktivitesinin fermentasyonun 1. gününden 6. gününe kadar sürekli arttığı belirlenmiş olup 6. ve 9. günlerden sonra enzim aktivitesi kademeli bir şekilde azalmış ve sonra tekrar artmıştır. Aktivitenin kademeli olarak azaldığı günlerdeki değerler arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($P > 0.05$). Diğer yandan, enzim aktivitesi 7. günden sonra 9. güne kadar doğrusal olarak artmış olup aktivite değerleri arasında önemli bir farklılık saptanmıştır ($P < 0.05$). Fermentasyonun 9. gününden 13. gününe kadar aktivitede azalan oranda artış tespit edilmiş ($P < 0.05$) maksimum Iase aktivitesi fermentasyonun 13. gününde elde edilmiştir (1031.93 ± 43.71 U/mL). *A. niger* ile melastan enzim üretiminde gerçekleştirilen fermentasyonun 13. gününden sonra aktivite değerlerinde azalma tespit edilmiş olup 13. gün ile 15. gündeki aktivite değerleri arasında önemli bir farklılık belirlenmiştir ($P < 0.05$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Deneme#3 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.4. Deneme#4 (%4.20 G ve %1.00 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

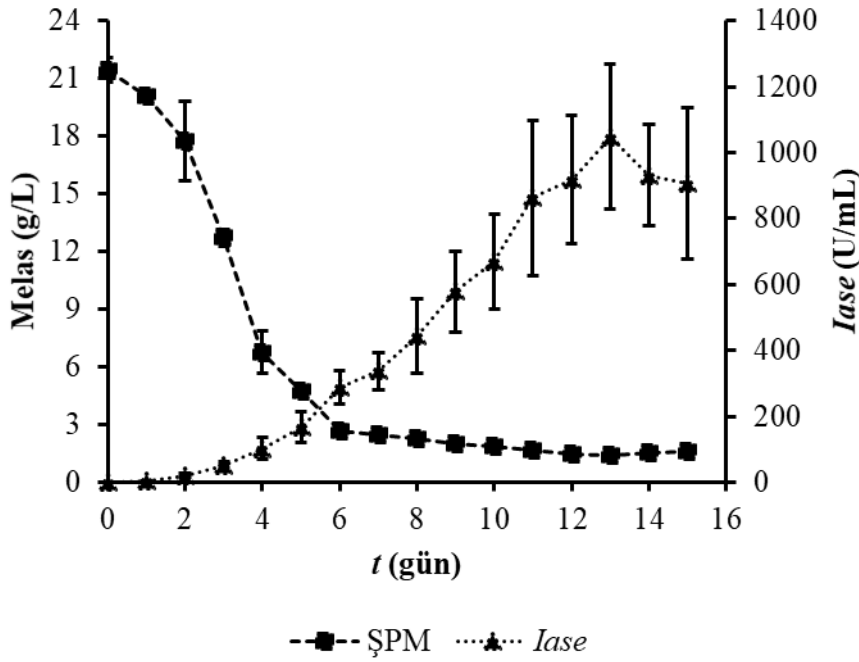
Besiyerine %4.20 maya ekstraktı ve %1.00 pepton eklenerek gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi ve enzim üretimi ile ilgili grafiği Şekil 4.31'de verilmiştir (Deneme#4). Elde edilen sonuçlara göre besiyerindeki şeker mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketilmiştir. Besiyerindeki şekerin tüketim hızı fermentasyonun 1. ve 4. günleri arasında maksimum seviyede olup ($P<0.05$) şekerin tüketim hızı fermentasyonun 4. gününden sonra istatistiksel olarak azalan oranda devam etmiştir ($P>0.05$). Fermentasyonun 5. gününde ortamdaki kalıntı şeker konsantrasyonu 2.83 ± 0.37 g/L olarak belirlenmiş olup şekerin yaklaşık %84'ü mikroorganizma tarafından tüketilmiş olup fermentasyonun sonunda şekerin yaklaşık %96'sı tüketilmiştir. Fermentasyonun sonunda besiyerindeki kalıntı şeker konsantrasyonu 0.88 ± 0.49 g/L olarak belirlenmiştir ($P>0.05$). Besiyerindeki şekerin tüketilmesi ile enzim aktivitesi artmıştır. Enzim aktivitesinin fermentasyonun 1. gününden 9. gününe kadar sürekli arttığı belirlenmiştir (2.34 ± 1.36 U/mL'den 730.42 ± 25.22 U/mL'ye artmıştır). Fermentasyonun 9. gününden sonra enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir azalma tespit edilmiş olup ($P<0.05$) 10. günden 14. güne kadar aktivitede azalan oranda artış görülmüş olup ($P<0.05$) fermentasyonun 11. günü ile 15. günü arasında elde edilen aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Deneme#4 ile gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi, fermentasyonun 14. gününde 880.04 ± 41.61 U/mL olarak elde edilmiş olup kalıntı şeker konsantrasyonu 0.83 ± 0.43 g/L olarak ölçülmüştür (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Deneme#4 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.5. Deneme#5 (%4.41 G ve %0.10 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

Fermentasyon ortamına %4.41 maya ekstraktı ve %0.10 pepton ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyondaki şeker tüketimi ve enzim üretiminin değişimini gösteren grafik, Şekil 4.32’de verilmiştir (Deneme#5). Şekil 4.32’ye göre, besiyerindeki şeker, mikroorganizma tarafından sorunsuzca tüketilmiştir. Bununla beraber, besiyerindeki şekerin tüketim hızı fermentasyonun 2. ve 4. günlerinde maksimumdur ($P < 0.05$). Besiyerindeki şekerin tüketimi fermentasyonun 4. gününden sonra azalan oranda devam etmiş olup fermentasyonun 6. gününden itibaren ölçülen kalıntı şeker konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yoktur ($P > 0.05$). Besiyerindeki şekerin %87.45’i fermentasyonun 6. gününde tüketilmiş olup ($P > 0.05$) fermentasyonun sonunda ise şekerin %92.53’ü kullanılan mikroorganizma tarafından tüketilmiştir ($P > 0.05$). Fermentasyon ortamında enzim aktivitesinde şekerin tüketimi ile birlikte artış sağlanmıştır. Enzim aktivitesi, fermentasyonun 1. gününden 11. gününe kadar sürekli artmıştır. Maksimum *Iase* aktivitesi, fermentasyonun 13. gününde 1048.4 ± 219.32 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun 13. gününden sonra aktivite değerlerinde azalma tespit edilmiş olup 13. gün ile 15. gündeki aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemsiz bir farklılık belirlenmiştir ($P > 0.05$) (Şekil 4.32).

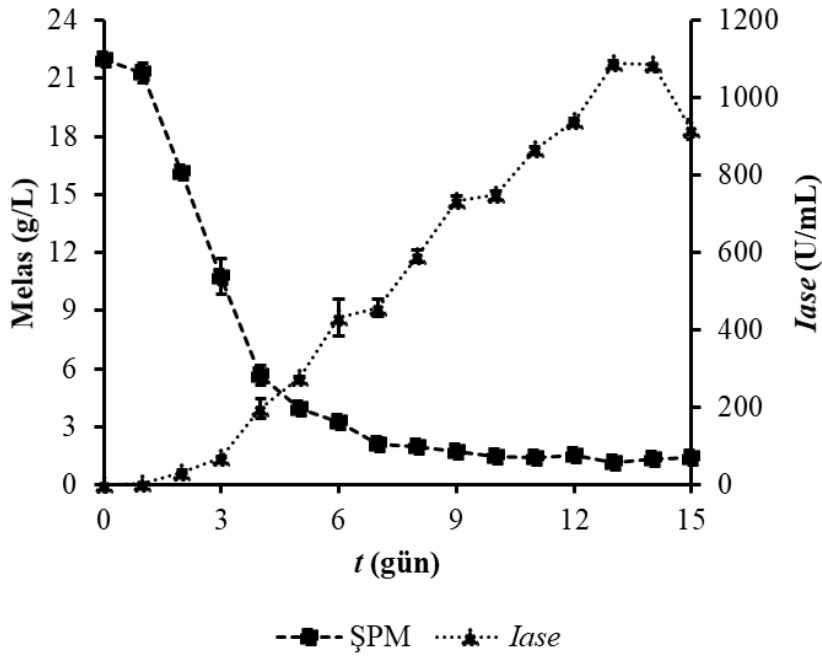


Şekil 4.32. Deneme#5 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.6. Deneme#6 (%4.20 G ve %0.10 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

%4.20 maya ekstraktı ve %0.10 pepton eklenerek hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon denemesinde şeker tüketimi ve enzim üretimi ile ilgili elde edilen sonuçları gösteren grafik Şekil 4.33'te gösterilmiştir (Deneme#6). Elde edilen bulgulara göre, fermentasyon ortamındaki şekerin tüketim hızı, fermentasyonun 1. ve 4. günleri arasında maksimum düzeydedir ($P<0.05$). Fermentasyonun 4. gününden sonra şeker tüketimi azalan oranda devam etmiş olup fermentasyonun 6. gününde şeker konsantrasyonunun büyük bir bölümü (%85'in üzerinde) mikroorganizma tarafından tüketilmiş ve en düşük şeker konsantrasyonu ise fermentasyonun 13. gününde 1.17 ± 0.09 g/L olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla besiyerindeki şekerin %94.68'i mikroorganizma tarafından tüketilmiştir. Bununla beraber, fermentasyonun 2. ve 5. günleri arasında ölçülen kalıntı şeker konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiş olup ($P<0.05$) 7. ve 15. günler arasında ölçülen kalıntı şeker konsantrasyonları arasında ise önemli bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Fermentasyon ortamındaki şekerin tüketimi ile birlikte enzim aktivitesi artmıştır. Fermentasyonun 1. gününden 6. gününe kadar aktivitede sürekli artış tespit edilmiş ve 3. gün ile 6. gün arasındaki enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($P<0.05$). Fermentasyonun 6. ve 7. günlerinde ölçülen aktivite değerleri arasında önemsiz bir farklılık belirlenmiş olup nispeten aktivite de düşüş tespit edilmiştir ($P>0.05$). Fermentasyonun 7. günü ile 9. günü arasındaki aktivite değerlerinde bir sıçrama saptanmış ($P<0.05$), 9. gün ve 10. gün aktivite değerleri arasındaki aktivite değerlerinde önemli bir fark belirlenmemiştir ($P>0.05$). Melastan enzim üretimi ile ilgili gerçekleştirilen fermentasyonun 10. gününden 13. gününe kadar

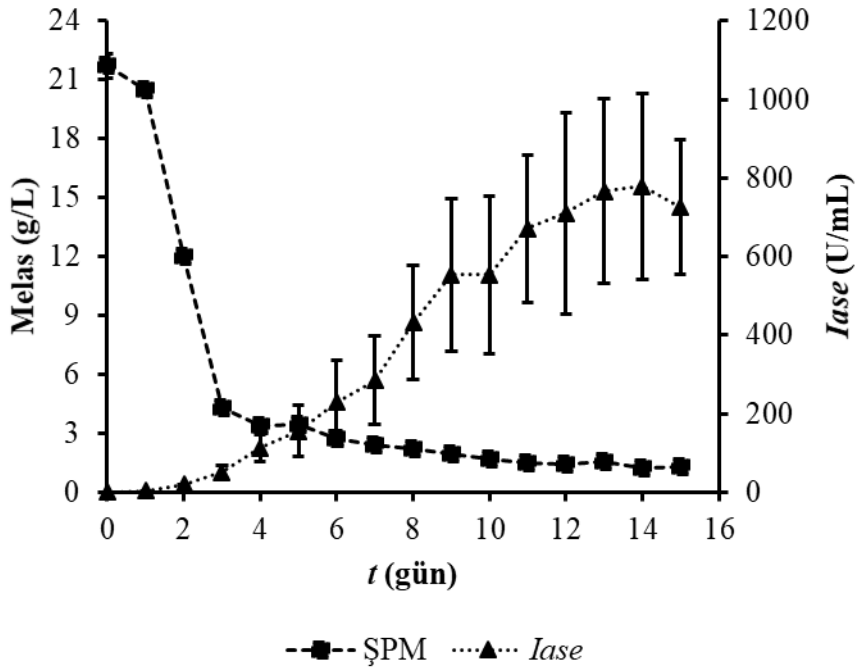
aktivite önemli ölçüde artış tespit edilmiş ($P<0.05$), 13. günden sonra da aktivite de kayıp görülmüştür (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Deneme#6 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.7. Deneme#7 (%1.00 G ve %0.10 J) ile gerçekleştirilen fermentasyon

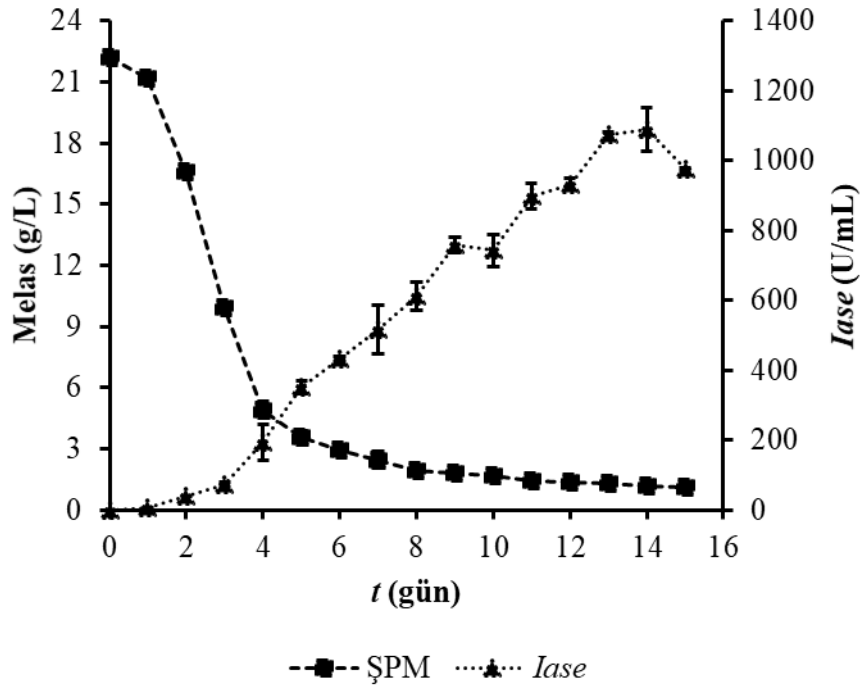
Deneme#7 ise besiyerine %1.00 maya ekstraktı ve %0.10 pepton eklenerek gerçekleştirilmiş fermentasyonu temsil eder. Fermentasyona ait şeker tüketim ve enzim üretim grafiği Şekil 4.34'te sunulmuştur. Fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir bölümü (%80) fermentasyonunun 3. gününe kadar tüketilmiş olup ($P<0.05$) kalıntı şeker konsantrasyonu 4.32 ± 0.14 g/L olarak ölçülmüştür. Bu günden sonra besiyerindeki şekerin azalan oranda tüketildiği görülmektedir. Besiyerindeki şekerin maksimum tüketim hızının fermentasyonun 1. ve 3. günleri arasında olduğu belirlenmiştir. Minimum kalıntı şeker konsantrasyonu ise (1.26 ± 0.00 g/L) fermentasyonun 14. gününde tespit edilmiştir. Öte yandan şekerin tüketimi ile birlikte ve enzim aktivitesi fermentasyonun 9. gününe kadar artan oranda devam etmiş olup 10. günde aktivitede nispeten düşüş gözlemlenmiştir ($P>0.05$). Fermentasyonun 10. gününden 14. gününe kadar enzim aktivitesinde azalan oranda artış tespit edilmiş olup aktivite değerleri arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Deneme#7 ile gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 14. gününde 779.76 ± 236.72 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Deneme#7 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.8. Deneme#8 (%4.41 G) ile gerçekleştirilen fermentasyon

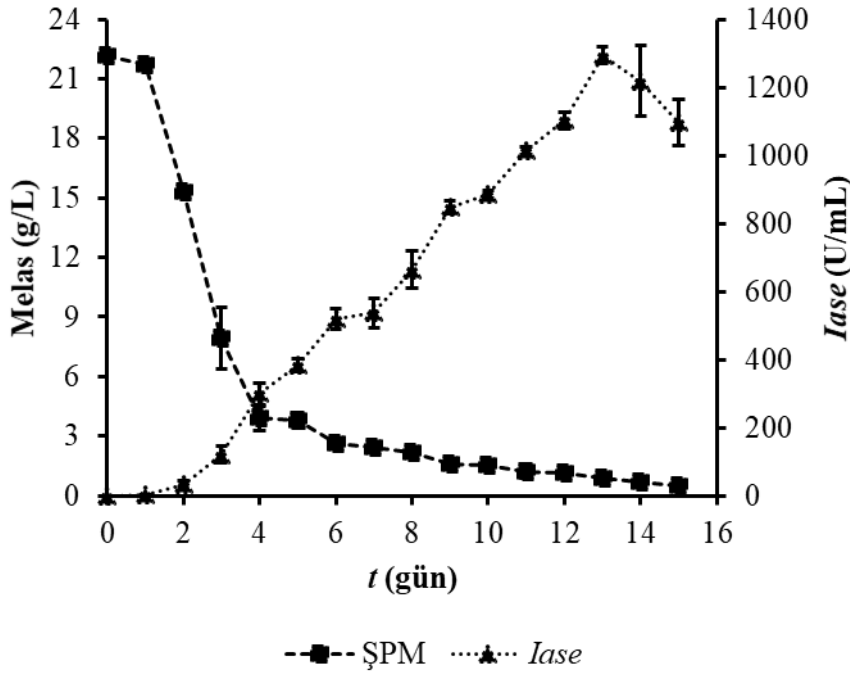
Peptonun eklenmediği fermentasyon ortamına %4.41 maya ekstraktı eklenerek gerçekleştirilen fermentasyonla ilgili şeker tüketim ve enzim üretim grafiği Şekil 4.35'te gösterilmiştir (Deneme#8). Analizler sonucunda 8. günde fermentasyon ortamındaki şekerin neredeyse tamamının (%95) mikroorganizma tarafından kullanıldığı tespit edilmiştir. Şeker tüketiminin maksimum tüketim hızının fermentasyonun 1. ve 4. günleri arasında olduğu belirlenmiş olup ($P<0.05$) fermentasyonun 4. gününde şekerin büyük bir bölümü (%77.84) enzim üretiminde kullanılmış ve bu günden sonra şeker tüketiminde azalan oranda düşüş tespit edilmiştir. Şeker tüketimine paralel olarak enzim aktivitesi değerleri de artmıştır. Fermentasyonun 1. gününden 9. gününe kadar aktivite değerleri artan oranda artarken, fermentasyonun 10. gününde aktivite de nispeten kayıp söz konusudur ($P>0.05$). Fermentasyonun 10. gününden 14. gününe kadar ki aktivite değerlerinde ise azalan oranda artış görülmüş olup maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 14. gününde 1090.16 ± 62.76 U/mL olarak belirlenmiştir. %4.41 maya ekstraktı içeren besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun 14. gününden sonra ise aktivite değerinde düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Deneme#8 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.9. Deneme#9 (%4.20 G) ile gerçekleştirilen fermentasyon

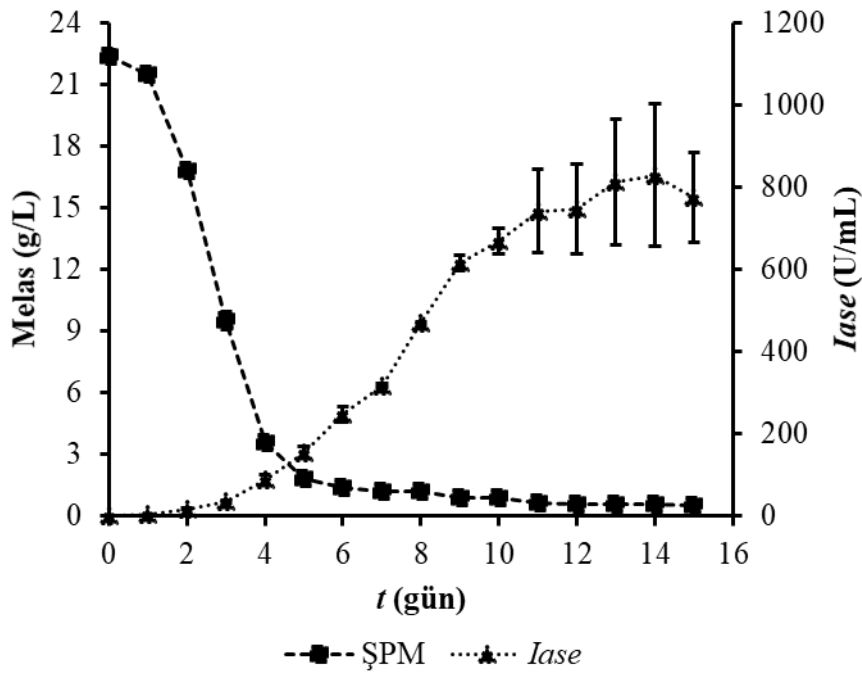
Deneme#9'da ise fermentasyon ortamında yalnızca %4.20 maya ekstraktı eklenmiş olup enzim fermentasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların grafik şeklinde gösterimi Şekil 4.36'da verilmiştir. Fermentasyon sonuçları, besiyerindeki şekerin %82.45'inin fermentasyonun 4. gününde enzim üretiminde kullanılmış olduğunu göstermiş olup maksimum tüketim hızının fermentasyonun 1 ve 3. günleri arasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Fermentasyonun 3. gününden sonra şekerin tüketimi azalan oranda devam etmiştir. Öte yandan fermentasyonun sonunda ise besiyerindeki şekerin %97.7'si mikroorganizma tarafından ürüne dönüştürülmek ve kendi gelişimini sağlamak amacıyla tüketilmiştir. Fermentasyon ortamındaki şekerin tüketimine bağlı olarak enzim aktivitesi de fermentasyonun 1. gününden 13. gününe kadar artan oranda devam etmiştir. Maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 13. gününde 1294 ± 24.39 U/mL olarak ölçülmüş olup daha sonraki günlerde aktivite değerleri azalmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. Deneme#9 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.5.10. Deneme#10 (%1.00 G) ile gerçekleştirilen fermentasyon

Son olarak, Deneme#10'da besiyerine yalnızca %1.00 maya ekstraktı eklenmiş olup pepton ilave edilmemiştir. Deneme#10 ile gerçekleştirilen fermentasyonla ilgili şeker tüketiminin ve enzim üretiminin nasıl değiştiğini gösteren grafik, Şekil 4.37'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, fermentasyon ortamındaki şekerin %91.82'si fermentasyonun 5. gününde tüketilmiş olup ($P<0.05$) fermentasyonun sonunda ise şekerin %97.59'u tüketilmiştir. Diğer yandan, şekerin maksimum tüketim hızının, fermentasyonun 2. ve 4. günleri arasında olduğu ($P<0.05$), Şekil 4.37'de görülmektedir. Mikroorganizma tarafından şeker tüketimine paralel olarak enzim üretimi de gerçekleşmiştir. Fermentasyonun 1. gününden 9. gününe kadar enzim aktivitesi artan oranda devam ederken fermentasyonun 10. gününden 14. gününe kadar azalan oranda aktivite de artış gözlemlenmiştir ($P>0.05$). Maksimum enzim aktivitesi, fermentasyonun 14. gününde 827.85 ± 172.94 U/mL olarak ölçülmüş olup bu günden sonra aktivite değeri azalmıştır.



Şekil 4.37. Deneme#10 ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketim ve enzim üretim grafiği

4.4.6. MKD doğrulama denemelerinin karşılaştırılması

MKD tarafından önerilen koşullarda optimum besiyeri kompozisyonunu belirlemek amacıyla fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre de muhtemel optimum besiyeri formülasyonları tespit edilmiş ve doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiştir. Doğrulama denemeleri ile gerçekleştirilen fermentasyonların şeker tüketimi ve enzim üretimi ile ilgili grafikler, Bölüm 4.4.5'te verilmiş ve fermentasyonların sonuçları tartışılmıştır. Bununla beraber, doğrulama denemelerinden hesaplanan kinetik parametreler de ayrıca tartışılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar *Iase* ve *Sase* aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, *Iase* aktivite değerleri 779.6 ± 236.72 U/mL ile 1294.50 ± 24.39 U/mL arasında değişirken *Sase* aktivitesinin de 626.26 ± 223.08 U/mL ile 1090.03 ± 62.76 U/mL arasında değiştiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). En düşük *Iase* ve *Sase* aktiviteleri Deneme#7 ile elde edilirken en yüksek *Iase* ve *Sase* aktiviteleri de sırasıyla Deneme#9 ve Deneme#8'den tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Bununla beraber, Deneme#9'dan elde edilen *Iase* aktivitesi ile Deneme#2 ve Deneme#10'daki besiyeri kompozisyonları kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilen *Iase* aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan, Deneme#8 ile gerçekleştirilen fermentasyondan tespit edilen *Sase* aktivitesi ile Deneme#4, Deneme#5 ve Deneme#7 ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen *Sase* aktiviteleri arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark tespit edilmiştir ($P < 0.05$). *Iase* aktivitesinin *Sase* aktivitesine oranı I/S oranını verir. Eğer I/S oranı 10^{-2} 'den büyükse üretilen enzim *Iase* doğasıdır. Buna göre, Çizelge 4.18'den de anlaşıldığı üzere I/S oranı 0.94 (Deneme#2) ile 1.50 (Deneme#5) arasında değişmiştir ($P < 0.05$). Dolayısıyla, tüm denemelerden üretilen enzimlerin *Iase* doğasında olduğu

belirlenmiştir. Maksimum enzim aktivitelerine sahip örneklerin *Sase* aktivitelerinin yanı sıra protein miktarları da belirlenmiştir. Dolayısıyla *SIase* ve *SSase* aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, maksimum ve minimum protein miktarları sırasıyla Deneme#1 ve Deneme#10 ile elde edilmiş olup (sırasıyla 0.44 mg/mL ve 0.19 mg/mL) aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Diğer yandan, protein miktarları dikkate alındığında minimum *SIase* (2159.26 ± 159.04 U/mg) ve *SSase* (1561.40 ± 752.08 U/mg) aktiviteleri sırasıyla Deneme#2 ve Deneme#1'den belirlenmiş olup bunların maksimum değerleri de protein seviyesi minimum düzeyde olduğu için (0.19 mg/mL) Deneme#10'dan (sırasıyla 5191.06 ± 1579.07 U/mg ve 5338.57 ± 2531.71 U/mg) tespit edilmiştir. *SIase* ve *SSase* aktivitelerinin minimum ve maksimum değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.18).

Fermentasyonların sonunda ham enzim solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra sıvıların pH değerlerini ölçmenin yanı sıra örneklerin biyokütle konsantrasyonu da belirlenmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonu (24.65 ± 1.42 g/L) Deneme#1 ile elde edilirken minimum biyokütle konsantrasyonu (10.69 ± 2.24 g/L) ise Deneme#10 ile belirlenmiş olup değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). Diğer yandan, Deneme#7 ile gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda da biyokütle konsantrasyonu 11.34 ± 1.42 g/L olarak belirlenmiştir. Deneme#1 ile Deneme#7 ve 10 ile elde edilen biyokütle konsantrasyonları incelendiğinde, fermentasyon ortamında maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ile birlikte biyokütle konsantrasyonunun da arttığı anlaşılmıştır (Çizelge 4.18).

Öte yandan, fermentasyon sıvılarının pH'ları ölçüldüğünde ise minimum ve maksimum pH değerleri sırasıyla Deneme#10 ve Deneme#6 ile 5.28 ± 1.15 ve 8.07 ± 0.26 olarak ölçülmüş olup aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Bununla beraber, Deneme#3, 5 ve 6'dan elde edilen fermentasyon sıvılarının pH değerlerinin bazik pH'da (>7.0) olduğu belirlenmiş olup geri kalan fermentasyon sıvılarının pH değerlerinin asidik pH'da (<7.0) olduğu tespit edilmiştir. İlaveten, fermentasyon ile maksimum şeker tüketim hızı ($Q_{şeker}$), maksimum enzim üretim hızı (Q_{Iase}) ve şeker kullanım oranı (*SUY*) değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en düşük ve en yüksek $Q_{şeker}$ değerleri sırasıyla Deneme#1 ve Deneme#7'den 4.96 ± 0.03 g/L/gün ve 8.48 ± 0.11 g/L/gün olarak hesaplanmış olup maksimum ve minimum $Q_{şeker}$ değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). Deneme#7'den daha yüksek $Q_{şeker}$ elde edilmesine rağmen, daha düşük $Q_{şeker}$ 'in elde edildiği Deneme#1 fermentasyonundan nispeten yüksek *Iase* ve *Sase* aktiviteleri elde edilmiştir ($P>0.05$). Diğer yandan, minimum ve maksimum Q_{Iase} değerleri de sırasıyla Deneme#3 ve Deneme#9'dan 127.13 ± 0.00 U/mL/gün ve 159.42 ± 8.42 U/mL/gün olarak hesaplanmış olup değerler arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($P>0.05$). Ayrıca, maksimum Q_{Iase} değerinin elde edildiği Deneme#9'dan maksimum *Iase* aktivitesi elde edilmiştir. Bununla beraber, fermentasyon ortamındaki şekerin mikroorganizmalar tarafından sorunsuzca tüketildiği tespit edilmiş olup şeker tüketim oranlarının %90'ın üzerinde olduğu hatta bazı fermentasyon denemelerinde neredeyse şekerin tamamının tüketildiği tespit edilmiştir. Öyle ki minimum ve maksimum şeker tüketim oranları sırasıyla Deneme#2 ve Deneme#9'dan $\%92.90\pm0.35$ ve $\%98.08\pm0.11$ olarak hesaplanmış olup değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$).

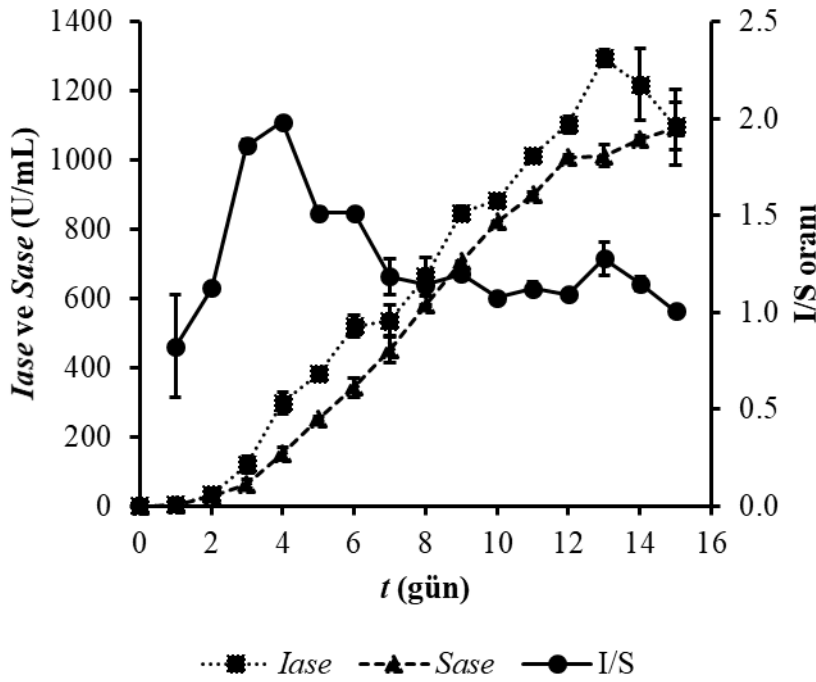
Çizelge 4.18. MKD doğrulama denemelerinin kinetik sonuçları

Deneme	G (%)	J (%)	Iase (U/mL)	Sase (U/mL)	I/S	Protein (mg/mL)	SIase (U/mg)	SSase (U/mg)	X (g/L)	pH	Q _{şeker} (g/L/gün)	Q _{Iase} (U/mL/gün)	SUY (%)
1	4.41	1.59	931.20 ^{ab}	936.32 ^{ab}	1.00 ^{bc}	0.44 ^a	2193.87 ^b	1561.40 ^b	24.65 ^a	6.10 ^a	4.96 ^b	127.63 ^a	94.83 ^{bc}
2	4.2	1.59	861.77 ^b	915.17 ^{ab}	0.94 ^c	0.40 ^{ab}	2159.26 ^b	2293.67 ^b	22.74 ^a	6.48 ^a	7.94 ^a	128.50 ^a	92.90 ^c
3	4.41	1	1031.93 ^{ab}	813.87 ^{ab}	1.27 ^{abc}	0.36 ^{abc}	2897.76 ^b	2286.36 ^b	21.09 ^{ab}	7.47 ^a	7.16 ^{ab}	127.13 ^a	93.92 ^{bc}
4	4.2	1	880.04 ^{ab}	684.25 ^b	1.33 ^{ab}	0.36 ^{abc}	2468.81 ^b	1875.05 ^b	22.40 ^a	6.52 ^a	6.10 ^{ab}	142.81 ^a	95.93 ^{ab}
5	4.41	0.1	1048.40 ^{ab}	701.64 ^b	1.50 ^a	0.40 ^{ab}	2582.96 ^b	1721.45 ^b	20.94 ^{ab}	7.82 ^a	6.62 ^{ab}	148.31 ^a	93.45 ^{bc}
6	4.2	0.1	1089.57 ^{ab}	920.97 ^{ab}	1.19 ^{abc}	0.32 ^{abc}	3473.42 ^{ab}	2943.79 ^{ab}	17.21 ^b	8.07 ^a	5.79 ^{ab}	137.89 ^a	94.68 ^{bc}
7	1	0.1	779.76 ^b	626.26 ^b	1.27 ^{abc}	0.24 ^{bc}	3424.77 ^{ab}	2686.39 ^b	11.34 ^c	6.08 ^a	8.48 ^a	153.78 ^a	94.33 ^{bc}
8	4.41	0	1090.16 ^{ab}	1090.03 ^a	0.99 ^{bc}	0.38 ^{ab}	2873.72 ^b	2896.52 ^{ab}	17.84 ^b	6.87 ^a	6.70 ^{ab}	144.41 ^a	95.49 ^{abc}
9	4.2	0	1294.50 ^a	1076.85 ^a	1.20 ^{abc}	0.40 ^{ab}	3209.83 ^b	2671.61 ^{ab}	17.35 ^b	6.84 ^a	7.39 ^{ab}	159.57 ^a	98.08 ^a
10	1	0	827.85 ^b	769.52 ^{ab}	1.07 ^{bc}	0.19 ^c	5191.06 ^a	5338.57 ^a	10.69 ^c	5.28 ^a	7.31 ^{ab}	149.58 ^a	97.83 ^a
Ortalama			938.52	854.38	1.18	0.35	3047.55	2627.48	18.62	6.75	6.84	141.96	95.14
Std hata			4.53	0.22	0.00	0.00	25.58	35.23	0.15	0.05	0.09	1.18	0.00

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Std hata: Standart hata

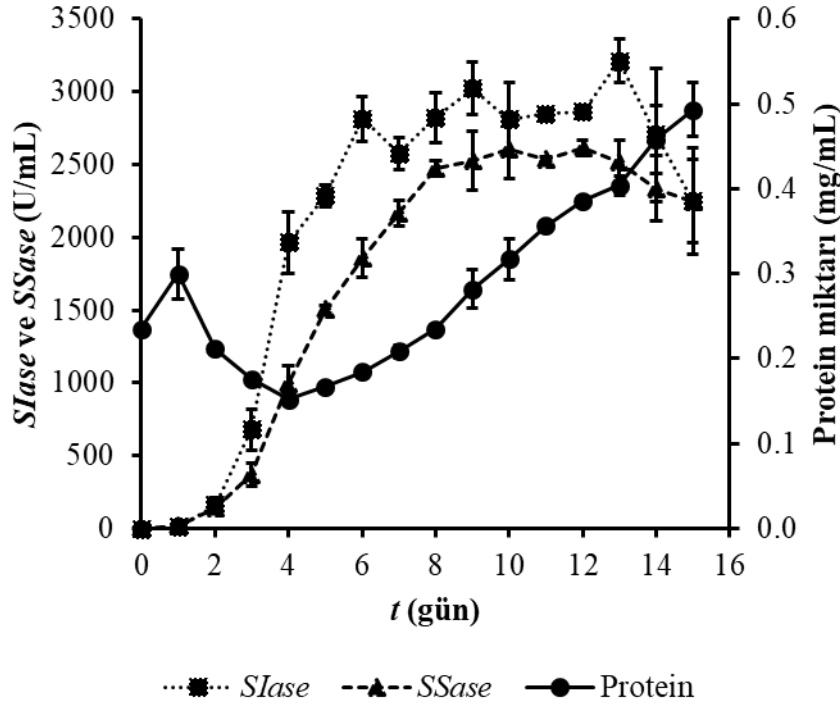
Özetlemek gerekirse, maksimum inülinaz aktivitesi, enzim üretim hızı ve şeker kullanım oranı değerleri Deneme#9 (%4.2 maya ekstraktı içerir) ile elde edildiği için, Deneme#9 inülinaz enziminin üretimi için optimum besiyeri kompozisyonu olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, Deneme#9'un fermentasyonu sırasında alınan örneklerin tamamında *Sase* ve protein miktarı analizleri de yapılmış olup I/S oranı, protein miktarı, *Slase* ve *SSase* değerlerinin fermentasyon boyunca nasıl değiştiği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda tartışılmıştır. Fermentasyon boyunca üretilen inülinaz enziminin substrat olarak sukrozu da hidroliz ettiği Şekil 4.38'den anlaşılmaktadır. *Iase* aktivitesinin maksimum olduğu günde (13. gün) *Sase* aktivitesi 1013.56 ± 32.94 U//mL olarak belirlenmiş olup I/S oranı da 1.28 ± 0.02 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.38. Fermentasyon sırasında *Iase*, *Sase* ve I/S oranının değişimi

Sase aktivitesinin fermentasyonun 1. gününden 9. gününe kadar arttığı yapılan analizlerin sonucunda anlaşılmış olup 9. günden fermentasyonun sonuna kadar ki *Sase* aktivite değerlerinde ise azalan oranda artış tespit edilmiştir. Maksimum *Sase* aktivitesi fermentasyonun 15. gününde 1095.30 ± 110.01 U/mL olarak belirlenmiş olup I/S oranı 1.01 ± 0.04 olarak hesaplanmıştır. Öte yandan, maksimum I/S oranı fermentasyonun 4. gününde hesaplanmış olup ortalama *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 298.90 ± 31.09 U/mL ve 151.06 ± 18.13 U/mL olarak tespit edilmiştir. Minimum I/S oranı ise fermentasyonun 1. gününden 0.83 ± 0.03 olarak hesaplanmış olup *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri de sırasıyla 3.44 ± 0.07 U/mL ve 4.17 ± 0.22 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun 4. gününden fermentasyonun sonuna kadar I/S oranının 1.0 seviyelerine doğru azalmaya başladığı anlaşılmaktadır. Diğer yandan, maksimum *Iase* ve *Sase* üretim hızının (Q_{Iase} ve Q_{Sase} , U/mL/gün) fermentasyonun 7. günü ile 9. günü arasında olduğu tespit edilmiş olup sırasıyla 159.57 ± 8.42 U/mL ve 127.30 ± 17.49 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır.

Fermentasyon boyunca alınan örneklerde protein miktarı analizi yapılmış olup ham enzim solüsyonlarının *Slase* ve *SSase* aktivite değerleri de belirlenmiştir. Fermentasyon boyunca protein miktarı, *Slase* ve *SSase* aktivite değerlerinin değişimini gösteren grafik Şekil 4.39’da verilmiştir.



Şekil 4.39. Fermentasyon sırasında *Slase*, *SSase* ve protein miktarının değişimi

Fermentasyon ortamındaki protein miktarı, fermentasyonun 1. gününden fermentasyonun 4. gününe kadar azaldığı belirlenmiş olup bunun besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktının içerdiği proteinlerin ve/veya aminoasitlerin mikroorganizma tarafından metabolize edildiği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra enzim üretiminin devam ettiği dolayısıyla fermentasyon ortamında protein seviyesinin de artmakta olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, fermentasyon ortamındaki azot kaynaklarının tamamen tüketilmiş olduğu fermentasyonun 4. gününden anlaşılmaktadır. Çünkü bu günden sonra fermentasyon ortamındaki protein seviyesinin fermentasyonun sonuna kadar arttığı tespit edilmiştir. Minimum protein miktarı fermentasyonun 4. gününde 0.15 ± 0.00 mg/mL olarak belirlenmiş olup maksimum protein miktarı da fermentasyonun sonunda 0.49 ± 0.03 mg/mL olarak tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan, maksimum protein üretim hızının ($Q_{protein}$, mg/mL/gün) fermentasyonun 8. günü ile 11. günü arasında olduğu tespit edilmiş olup $Q_{protein}$ değeri 0.04 ± 0.00 mg/mL/gün olarak hesaplanmıştır. *Iase* ve *Sase* aktivite değerlerinin protein miktarına bölünmesiyle *Slase* ve *SSase* aktivite değerleri hesaplanmış olup fermentasyon boyunca değişimi Şekil 4.39’da gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Slase* ve *SSase* aktivitelerinin fermentasyonun 1. gününden 4. gününe kadar sürekli arttığı belirlenmiştir. Ancak fermentasyonun 4. gününden 13. gününe kadar *Slase* aktivitesinin azalan oranda arttığı tespit edilmiş olup ($P < 0.05$) fermentasyonun 13. gününden sonra azalmıştır. Bunun yanı sıra *SSase* aktivitesinin de fermentasyonun 4. gününden 12.

gününe kadar azalan oranda arttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). Maksimum *SIase* ve *SSase* aktiviteleri sırasıyla 3209.83 ± 147.57 U/mg ve 2617.09 ± 52.80 U/mg olarak belirlenmiş olup maksimum *SIase* ve *SSase* üretim hızlarının (sırasıyla Q_{SIase} ve Q_{SSase} , U/mg/gün) sırasıyla 901.94 ± 129.48 U/mg/gün ve 570.58 ± 25.70 U/mg/gün olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, besiyerine %4.20 maya ekstraktı eklenerek gerçekleştirilen fermentasyon, optimum besiyeri kompozisyonu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda *Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *SIase*, *SSase*, *X*, pH, $Q_{şeker}$, Q_{Iase} , Q_{Sase} , $Q_{protein}$, Q_{SIase} , Q_{SSase} ve *SUY* kinetik değerleri sırasıyla 1294.50 ± 24.39 U/mL, 1076.85 ± 41.96 U/mL, 1.20 ± 0.02 , 0.40 ± 0.01 mg/mL, 3209.83 ± 147.57 U/mg, 2671.61 ± 176.46 U/mg, 17.35 ± 0.22 g/L, 6.84 ± 0.41 , 7.39 ± 1.38 g/L/gün, 159.57 ± 8.42 U/mL/gün, 127.30 ± 17.49 U/mL/gün, 0.04 ± 0.00 mg/mL/gün, 901.94 ± 129.48 U/mg/gün, 70.58 ± 25.70 U/mg/gün ve $\%98.08\pm0.11$ olarak belirlenmiştir. Bununla beraber fermentasyon süresi, spesifik aktivite değerine göre 10 gün olarak belirlenmiş olup 15 günden 10 güne düşürülmüştür. Çünkü, her ne kadar maksimum *Iase* ve *Sase* aktiviteleri fermentasyonun sırasıyla 13. ve 15. günlerinde belirlense de (Şekil 4.38) *SIase* ve *SSase* aktivite değerlerinin 10. günden sonra nispeten sabit kaldığı hatta azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.39).

Aspergillus niger, GRAS statüsünde olduğu için ürünleri de gıda, kozmetik, eczacılık, tıp ve biyoyakıt endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı çalışmalarında bu mikroorganizmayı kullanarak katma değeri yüksek ürünlerin üretimini gerçekleştirmiştir. Ancak *A. niger* A42 (ATCC 204447) suşu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır ve yalnızca literatürde 4 çalışma mevcuttur. Öngen-Baysal vd., 1994, yer elmasından *A. niger* A42 kullanarak inülinaz enziminin üretimini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada besiyeri kompozisyonu olarak %1 yer elması tozu, %0.23 NH_4NO_3 , %0.37 $(NH_4)_2HPO_4$, %0.1 KH_2PO_4 , %0.05 $MgSO_4$ ve %0.15 maya ekstraktı kullanılmış olup başlangıç besiyeri pH değeri 5.0'a ayarlanmıştır. Fermentasyon; 50 mL besiyeri/250 mL flask, 28°C sıcaklık, %2 inokülasyon oranı ve 200 dev/dk çalkalama hızı koşullarında gerçekleştirilmiş olup fermentasyonun 192. saatinde inülinaz aktivitesi 54 U/mL olarak bulunmuştur (Öngen-Baysal vd. 1994).

Diğer bir çalışmada, *A. niger* A42 ve *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587'nin karışık kültürü ile inülinaz enziminin üretimi çalışılmıştır. Bu çalışmada yukarıda bahsedilen besiyeri kompozisyonu kullanılmıştır (Öngen-Baysal vd. 1994). Fermentasyonlar, 150 mL besiyeri/500 mL flask içerisinde gerçekleştirilmiş olup besiyerine 3 mL küf ve 1 mL maya inoküle edilmiştir. Fermentasyon koşulları yukarıda gerçekleştirilmiş olan çalışma ile aynı olmuştur (Öngen-Baysal vd. 1994). Yapılan çalışmada mayanın inokülasyon oranının (10^4 - 10^8 hücre/mL) aktivite üzerine etkisi incelenmiş olup en yüksek aktivite değeri 10^6 hücre/mL inokülasyon oranı ile 43.7 U/mL sukraz ve 18.2 U/mL inülinaz aktivitesi olarak elde edilmiştir. Sonuç olarak, *A. niger* A42'nin tekli kültürü ile elde edilen inülinaz enziminin karışık kültür ile elde edilen inülinaz enzimine göre daha düşük sukraz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada yer elması ekstraktının üretilen inülinaz enzimi ile hidrolizi 50°C sıcaklıkta, pH 5.0 da, %5 ham enzim ilavesi ile ve 4 saat boyunca gerçekleştirilmiş olup hidroliz verimi %90 olarak elde edilmiştir (Öngen-Baysal ve Sukan, 1996).

Öte yandan Kowalska vd., 2017, çalkalamalı inkübatör ve karıştırmalı tank biyoreaktörde *A. niger* A42 kullanarak inülinaz enzimini üretmiştir. Glukoz, fruktoz, sukroz ve inülin, çalkalamalı inkübatörde inülinaz enzimini üretmek için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. En yüksel hacimsel aktivite (0.68 U/mL) ve spesifik aktivite (184 U/gX) değerleri, 20 g/L inülin ve sukroz konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Aynı araştırmacılar, son zamanlarda yoğun şekilde çalışılan fermentasyon ortamına İnokülasyondan önce aseptik olarak eklenen mikropartikülün de inülinazın üretimi üzerine etkisini incelemiştir. Karıştırmalı tank biyoreaktörde mikropartikül destekli fermentasyonun uygulaması ve inokülüm yoğunluğunun etkisi çalışılmıştır. Elde edilen bulgulara göre araştırmacılar en düşük çalışılan spor yoğunluğunun ($3.33 \times 10^8/L$) inülinaz aktivitesini bir dereceye kadar etkilediğini bildirmiş ve en yüksek hacimsel ve spesifik aktivite değerlerini sırasıyla 0.7 U/mL ve 165 U/gX olarak tespit etmiştir. Ayrıca araştırmacılar, biyoreaktörde gelişen dağılmış hiflerin yüksek görünür viskozite (yaklaşık 0.05 s^{-1} kayma hızında 200 Pa.s'yi aşan) ve kayma incelenmesi özellikleri (akış davranış indeksi 0.2'nin altında) nedeniyle havalandırmanın zorlaştığını belirtmiştir. Mikropartikül uygulamasında (10 μm talc mikropartikülleri) ise, 1-2 mm arasında çapa sahip olan pelletlerin oluştuğunu, dolayısıyla bunun, fermentasyon ortamının havalandırılmasını kolaylaştırdığını ve böylece spesifik aktivitenin 3.5 kat arttırdığını bildirmiştir (Kowalska vd., 2017).

Bununla beraber, keçiboynuzu ekstraktından *A. niger* A42 (ATCC 204447) inülinazının üretimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle besiyeri kompozisyonu PBD ile optimize edilmiş olup optimum besiyeri formülasyonu 5°Bx keçiboynuzu ekstraktı ve %1 maya ekstraktı olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda *Iase*, *Sase*, I/S oranı, *SIase*, *SSase*, şeker tüketimi, *Q_{Iase}*, *Q_{şeker}*, *SUY*, biyokütle ve pH değerleri sırasıyla 1548.84 U/mL, 1377.17 U/mL, 1.13, 6135.69 U/mg, 5001.63 U/mg, 40.26 g/L, 559.15 U/mL/gün, 9.89 g/L/gün, %98.52, 13.2 g/L ve 6.34 olarak belirlenmiştir. Daha sonra fermentasyon koşulları Box-Behnken RSM ile optimize edilmiş olup bağımsız değişkenler olarak çalkalama hızı, inokülasyon oranı ve besiyeri hacmi olarak belirlenmiştir. Yapılan fermentasyon çalışmalarının sonucunda optimum fermentasyon koşulları sırasıyla 250 dev/dk, %2.3 (h/h) ve 135 mL olarak tespit edilmiştir. Bu koşullar altında *Iase*, *Sase*, I/S oranı, *SIase*, *SSase*, şeker tüketimi, *Q_{Iase}*, *Q_{şeker}*, *SUY*, biyokütle ve pH değerleri sırasıyla 1560.17 U/mL, 1198.36 U/mL, 1.30, 4471.60 U/mg, 3441.34 U/mg, 38.42 g/L, 186.09 U/mL/gün, 13.44 g/L/gün, %98.41, 18.25 g/L ve 6.45 olarak bulunmuştur (İlgın 2017).

Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada şeker kamışı endüstrisinin bir yan ürünü olan Pressmud, katı kültür fermentasyonunu ile inülinaz enziminin üretimi için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Besinlerin taranması ve *Kluyveromyces marxianus* ile inulinaz enziminin üretimi için besiyeri kompozisyonunun optimizasyonu için PBD ve MKD kullanılmıştır. PBD ile fermentasyon ortamı kompozisyonunun ön incelemesi için 18 farklı besin seçilmiştir. 18 farklı besiyeri bileşeninden 5'i (mısır maserasyon sıvısı, üre, et ekstraktı, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve K_2HPO_4) istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve MKD ile optimize edilmiştir. İnülinaz enziminin katı kültür fermentasyonunda üretilmesi için optimum besiyeri kompozisyonundaki miktarlar sırasıyla 0.06072 g/gds (gram/gram kuru katı), 0.01916 g/gds, 0.00957 g/gds, 0.00013 g/gds ve 0.00441 g/gds olarak bulunmuştur. Daha sonra inülinaz üretimi üzerine substrat olarak kullanılan

Presmud'un konsantrasyonunun (6-10 g) etkisi incelenmiş olup maksimum enzim aktivitesi (288 U/gds) 10 g Presmud ile elde edilmiştir (Dilipkumar vd. 2014a).

Bir başka çalışmada, *A. terreus* ile katı kültür fermentasyonu yöntemiyle substrat olarak kullanılan düşük maliyetli enginar yapraklarından maksimum inülinaz enzim verimi elde edilmiştir. PBD ve Taguchi yöntemleri ile optimizasyondan sonra optimum besiyeri kompozisyonu başlangıç pH 8.5, fermentasyon sıcaklığı 30°C, %0.8 KH₂PO₄ and 6 mM Ca²⁺, %1 glukoz, %1 sukroz, %1 NH₄H₂PO₄, 5 mM Mg²⁺ ve 3 g enginar yaprağı olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullar altında maksimum enzim verimi de 21.058 U/gds olarak elde edilmiş olup başlangıç besiyeri ortamından 4.79 kat daha fazla aktivite değerine ulaşmıştır (El Aty vd. 2014).

Katı kültür fermentasyonunda *Kluyveromyces* S120 inülinazının üretimi için besin seviyelerinin optimizasyonu, PBD tasarımı ve Box-Behnken tasarımı dayanan cevap yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk optimizasyon aşamasında, ilgili faktörlerin etkisini değerlendirmek için PBD kullanılmıştır. İnulin, mısır maserasyon sıvısı ve (NH₄)₂SO₄'ün buğday kepeği substratı ile daha uyumlu olduğu ve inülinaz üretiminin olumlu etkilendiği bulunmuştur. İkinci aşamada, belirlenen besinlerin konsantrasyonları BBD kullanılarak optimize edilmiş olup buğday kepeğindeki besinlerin optimum konsantrasyonları sırasıyla %12.72 inulin, %10.76 mısır maserasyon sıvısı ve %1.61 (NH₄)₂SO₄ olarak belirlenmiştir. Optimum besiyeri koşullarında gerçekleştirilen fermentasyondan 409.8 U/gds inülinaz aktivitesi elde edilmiştir (Xiong vd. 2007). Benzer bir çalışma Chen vd. (2011b) tarafından gerçekleştirilmiş olup katı substrat olarak buğday kepeğinde *A. ficuum* inülinazının üretimi için besiyeri kompozisyonu PBD ve BBD ile optimize edilmiştir. Optimum besiyeri kompozisyonu %11.47 inulin, %5.71 mısır maserasyon sıvısı ve %0.76 (NH₄)₂SO₄ bileşenlerinden oluşmuştur. Bu koşullar altında maksimum enzim aktivitesi 205.63 U/gds olarak belirlenmiştir.

Sıvı kültür fermentasyonunda *Geotrichum candidum* ekzo-inülinazının üretimi için proses parametreleri (inkübasyon süresi, sukroz konsantrasyonu, pH, inokülasyon oranı ve üre) PBD ile optimize edilmiş olup bu parametrelerin optimum değerleri sırasıyla 48 saat, 5 g/L, 6.0, %2 (h/h) ve %0.2 olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında elde edilen inülinaz aktivitesi (71.85 U/mL) ile 52 kat artış sağlanmıştır (Mughal vd. 2009).

Dinarvand vd. (2017), *A. niger* ATCC 20611 ile intraselüler ve ekstraselüler inülinaz ve invertazın derin kültür fermentasyonunda üretimi için fermentasyon koşullarını MKD ile optimize etmiştir. Bağımsız değişkenler olarak pH, sıcaklık, inokülasyon oranı ve karıştırma hızı kullanılmış olup bunların optimum değerleri sırasıyla 6.5, 30°C, %6 (h/h) ve 150 dev/dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında intraselüler ve ekstraselüler inülinaz aktiviteleri sırasıyla 2801 U/mL ve 3949 U/mL olarak elde edilirken intraselüler ve ekstraselüler invertaz aktiviteleri ise sırasıyla 2193 U/mL ve 4954 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada ise *Penicillium oxalicum* inülinazının laktoz bazlı besiyeri formülasyonu ve proses değişkenleri sıralı olarak Merkezi Kompozit Dizayn ile optimize edilmiştir. Dizayn-1 için bağımsız değişkenler laktoz (%1-3), NH₄H₂PO₄ (%0.2-0.5), NaNO₃ (%0.2-0.5) ve pH (5.0-7.0) olarak belirlenmiştir. Dizayn-2 için

bağımsız değişkenler sıcaklık (25-35°C), inkübasyon süresi (4-6 gün), inokülasyon oranı (1-3 misel agar disk) ve karıştırma hızı (100-200 dev/dk) olarak belirlenmiştir. Optimize edilen laktoz bazlı besiyeri formülasyonunda (sırasıyla 3.7%, 0.35%, 0.35% ve 6.5) 44.44 U/mL inülinaz aktivitesi elde edilirken proses koşullarının optimizasyonu ile (sırasıyla 25°C, 5 gün, 2 agar disk ve 150 dev/dk) inülinaz aktivitesi 50.45 U/mL'ye artmıştır (Singh ve Chauhan 2018).

PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarında kullanılan maya ekstraktı (her ikisinde de ortak) ve peptonun (yalnızca PBD) bileşimi (Kampen 2014), Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Çizelge 4.19'a göre, maya ekstraktının kül içeriğinin peptona göre oldukça fazla olduğu görülmektedir. Bununla beraber, maya ekstraktının bileşiminde çözünür ekstrakt, amonyum nitrojen, serbest aminoazot, sistin, organik sülfür ve inorganik sülfür belirlenmemiştir. Ayrıca, maya ekstraktının izolösin, lösin, treonin, triptofan, valin, fosfor, bakır, çinko, biotin, tiamin ve riboflavin açısından peptona göre daha zengin bir kompozisyona sahiptir (Çizelge 4.19). Özellikle maya ekstraktının vitamin ve çinko açısından zengin olduğu görülmektedir. Diğer yandan, peptonun toplam azot, amonyum nitrojen, serbest aminoazot, arjinin, aspartik asit, sistin, glutamik asit, glisin, histidin, lisin, metiyonin, fenilalanin, tirozin, organik sülfür, inorganik sülfür, potasyum, sodyum, magnezyum, kalsiyum, klor ve manganez açısından konsantrasyonlarının maya ekstraktına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.19 incelendiğinde, peptonun aminoasit ve mineral madde açısından maya ekstraktına göre daha zengin olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle, peptondaki arjinin, glutamik asit, glisin, tirozin, potasyum ve sodyum varlığının maya ekstraktına göre yüksek olması dikkat çekmektedir (Kampen 2014). Sonuç olarak, fermentasyon sırasında azotlu bileşikler hücre gelişimi ve ürün oluşumu için metabolize edilmektedir. Organik azot bileşiklerinin çoğu karbonhidratlar ve lipitler arasında bir oksidasyon seviyesine sahiptir. Dolayısıyla azotlu bileşikler; azot, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Shuler ve Kargi 2002). Bu durum, inülinaz üretim eğrisindeki dalgalanmaların neden kaynaklandığını açıklamaktadır. Şöyle ki; fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak şeker kalmadığında (genellikle fermentasyonların 6. gününden sonra besiyerindeki şeker seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır), besiyerinde kullanılan maya ekstraktı veya peptonun bileşiminde bulunan aminoasit ve vitaminlerin mikroorganizma tarafından karbon kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir. Böylece fermentasyon sırasında inülinaz seviyesi, karbon kaynağı olarak kullanılan aminoasit ve vitaminlerin mikroorganizma tarafından metabolize edilme sıralamasına bağlı olarak (dioksik etki gibi düşünülebilir) önce artmakta, sonra yeni bir karbon kaynağına geçme aşamasında stabil olmakta, daha sonra da yeni bir karbon kaynağına (aminoasit veya vitamin) geçtiğinde tekrar artmaktadır (Şekil 4.9, 4.14, 4.15, 4.28-4.37). Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada kontrol fermentasyonu (zenginleştirilmemiş besiyeri) ve PBD (%1 maya ekstraktı ve %1 pepton) ve MKD (%4.20 maya ekstraktı) ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarından elde edilen *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 37.93 ve 14.25 U/mL, 1011.02 ve 834.28 U/mL ve 1294.50 ve 1076.85 U/mL olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla enzim aktivitesi değerleri kontrol fermentasyonuna göre PBD ile 26.65 ve 58.55 kat, MKD ile 34.13 ve 75.57 kat artırılmıştır.

Çizelge 4.19. Besiyerinde kullanılan pepton ve maya ekstraktının bileşimi (Kampen 2014)

Bileşen	Pepton	Maya ekstraktı
Kül (%)	3.53	10.10
Çözünür ekstrakt (%)	0.37	-
Toplam azot (%)	16.16	9.18
Amonyum nitrojen (%)	0.04	-
Serbest aminoazot (%)	3.20	-
Arjinin (%)	8.00	0.78
Aspartik asit (%)	5.90	5.10
Sistin (%)	0.22	-
Glutamik asit (%)	11.00	6.50
Glisin (%)	23.00	2.40
Histidin (%)	0.96	0.94
İzolösin (%)	2.00	2.90
Lösin (%)	3.50	3.60
Lisin (%)	4.30	4.00
Metiyonin (%)	0.83	0.79
Fenilalanin (%)	2.30	2.20
Treonin (%)	1.60	3.40
Triptofan (%)	0.42	0.88
Tirozin (%)	2.30	0.60
Valin (%)	3.20	3.40
Organik sülfür (%)	0.33	-
İnorganik sülfür (%)	0.29	-
Fosfor (%)	0.07	0.29
Potasyum (%)	0.22	0.04
Sodyum (%)	1.08	0.32
Magnezyum (%)	0.056	0.03
Kalsiyum (%)	0.058	0.04
Klor (%)	0.27	0.19
Manganez (mg/L)	8.60	7.80
Bakır (mg/L)	17.00	19.00
Çinko (mg/L)	18.00	88.00
Biotin (µg/g)	0.32	1.40
Tiamin (µg/g)	0.50	3.20
Riboflavin (µg/g)	4.00	19.00

4.5. Fermentasyonların Kinetik Modellemesi

Fungal gelişimi tanımlamaya yönelik kinetik bir model oluşturmak için gelişim eğrisini ölçmek gerekir. Fungal gelişimi tanımlamak için kinetik model kullanılabilir. Bunun için lojistic model kullanılmıştır. Fungal gelişim için lojistic modelin hesaplanan kinetik parametreleri (μ_{max} ve X_0) Çizelge 4.20'de gösterilmiş ve bu değerler sırasıyla PBD için 0.83/gün ve 1.79 g/L ve MKD için 0.97/gün ve 1.25 g/L olarak hesaplanmıştır. Buradan, MKD ile optimize edilen besiyerindeki spesifik fungal gelişimin daha hızlı olduğu anlaşılmaktadır. Çizelge 4.20 ayrıca *Iase* üretimi, *Sase*

üretimi ve protein üretimi için Luedeking-Piret (LP9 eşitliğinin hesaplanan kinetik parametrelerini (α ve β) gösterir. Elde edilen sonuçlara göre, PBD için gelişimle ilgili katsayının (α) negatif değerleri Sase ve protein üretiminin gelişim ile ilgili olmadığını gösterir. Ayrıca, α değeri sıfıra (0) çok yakın olduğundan dolayı inülinaz üretimi de gelişim ile ilgili değildir (Çizelge 4.20). Dolayısıyla, PBD ile optimize edilen besiyerinde üretimin fungal gelişimden bağımsız olduğu anlaşılmıştır. Benzer sonuçlar lakkaz üretimi ve lipid birikimine yönelik elde edilmiştir (Saat vd. 2014; Tavares vd. 2005; Tevatia vd. 2012). Bir diğer çalışmada ise α ve β değerleri sırasıyla 16.73-19.79 U/mL ve 0.497-0.603 U/mL/sa arasında değiştiği için inülinaz üretiminin gelişim ile ilgili olduğu bulunmuştur (Mazutti vd. 2009). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasındaki farklılığın mikroorganizmanın bakteriyal veya fungal kaynaklı olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, MKD ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda üretim ile ilgili kinetik parametreler (α ve β) sırasıyla *Iase* için 8.46 U/mgX, 5.15 U/mgX.gün, *Sase* için 4.31 U/mgX ve 4.83 U/mgX.gün ve protein için -0.0096 g protein/gX ve 0.00174 g protein/gX.gün olarak hesaplanmıştır. Protein üretimi için hesaplanan negatif α değeri, üretimin gelişimden bağımsız olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, Bölüm 3.22.2'deki koşullara göre $\alpha \neq 0$ and $\beta \neq 0$ olduğundan dolayı (Çizelge 4.20) MKD ile optimize edilen besiyerinde *Iase* ve *Sase* üretiminin karışık gelişim ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır.

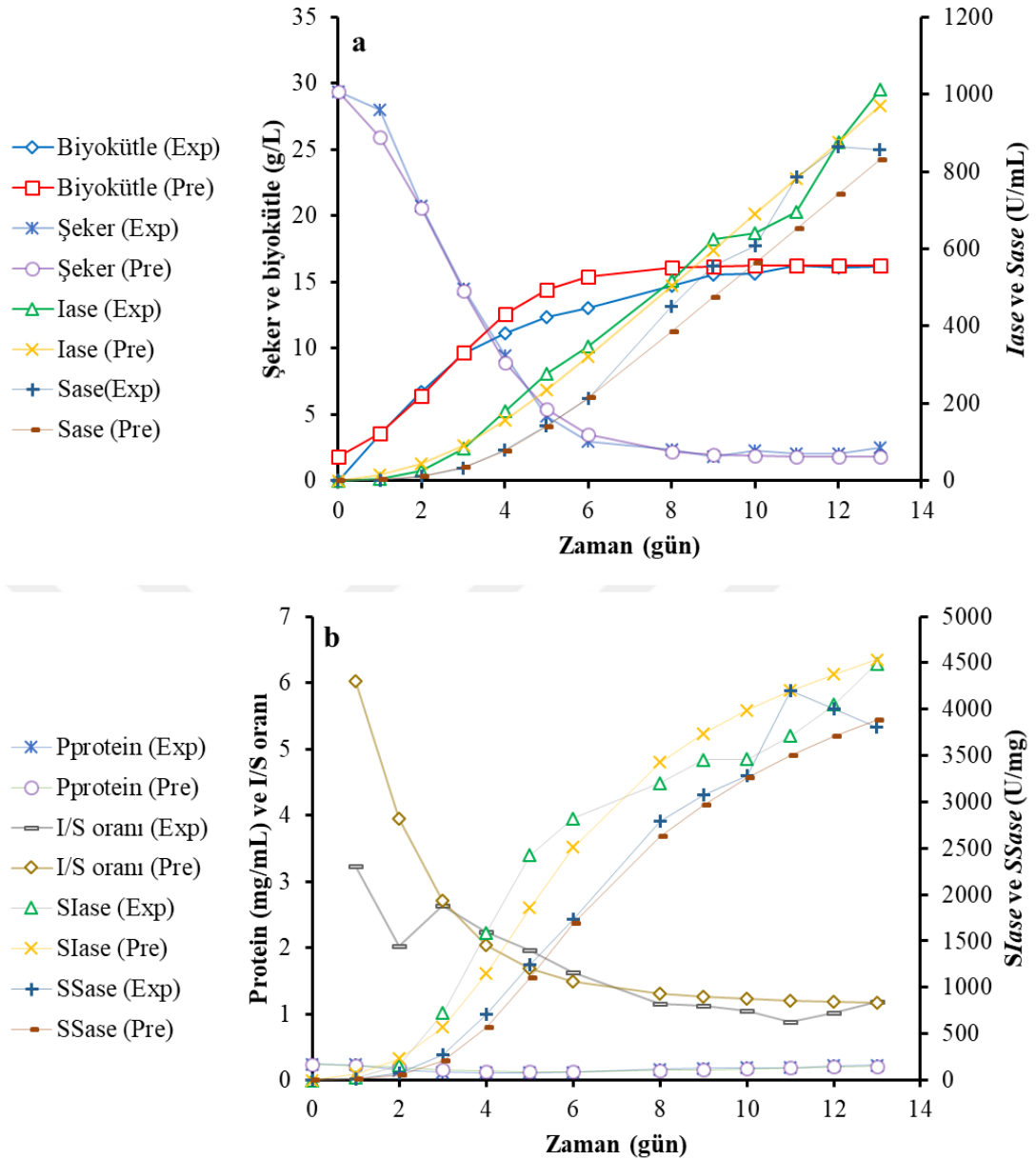
Çizelge 4.20. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyerlerindeki fermentasyonlar için hesaplanan model parametreleri

Kinetik parametreler	PBD	MKD
Fungal gelişim		
μ_{max}	0.83	0.97
X_0	1.79	1.25
X_{max}	16.25	19.86
R^2	0.9720	0.9912
<i>Iase</i> üretimi		
β (U/mgX.gün)	5.75	5.15
α (U/mgX)	0.27	8.46
R^2	0.9889	0.9935
<i>Sase</i> üretimi		
β (U/mgX.gün)	5.51	4.83
α (U/mgX)	-6.55	4.31
R^2	0.9913	0.9931
Protein üretimi		
β (g protein/gX.gün)	0.00085	0.0017
α (g protein/gX)	-0.0116	-0.0096
R^2	0.7904	0.9436
Substrat tüketimi		
Z (gS/gX.gün)	0.00057	0.0090
γ (gS/gX)	1.90	1.044
R^2	0.9967	0.9637

Diğer yandan, tipik olarak, enerji ve karbon kaynakları ortamda fazla olduğunda, mikroorganizmalar, depolama bileşikleri veya hücre dışı ürünlerin oluşumu yoluyla

fazla enerjiyi ve karbonu dağıtma eğilimindedir. Fermentasyon sırasında oluşan asetik asit, laktik asit ve hatta etanol gibi bazı ürünler hücre büyümesini olumsuz yönde etkiler (Don ve Shoparwe 2010). Bu nedenle, hücresel bakım için spesifik substrat alım hızını tanımlamak için bir bakım katsayısı (Z) kullanılmıştır. Z değerinin spesifik gelişim hızına göre değişebileceği bildirilmiştir (Zeng vd. 1994). Daha sonra, Z değerinin; hasarlı hücresel bileşenlerin onarımı, belirli besin ve ürünlerin hücrelerin içine ve dışına aktarılması, hücrelerin iç hacimdeki ozmolaritesinin taşınması ve ayarlanması için gerekli enerji harcamasını temsil ettiği belirtilmiştir (Shuler vd. 2017). Z değerlerinin, hücreyi çevreleyen çevresel koşullara ve gelişim hızına bağlı olarak 0.02 ila 4.0 g substrat/gX.sa arasında değişebileceği de belirtilmiştir (Don ve Shoparwe 2010; Sinclair vd. 1987). Çizelge 4.20'deki sonuçlardan görüldüğü gibi, her iki fermentasyon ortamında da inulinaz fermentasyonunun Z değeri, γ değerinden düşüktür; bu, *A. niger*'in fermentasyon ortamındaki şekerleri enzim üretimi ve fungal gelişim için kullandığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, substrat tüketimi ile ilgili elde edilen sonuçlar, MLP modelinin, inulinaz fermentasyonu için iyi bir doğrulukla substrat tüketiminin deneysel sonuçlarını tahmin edebildiğini göstermiştir.

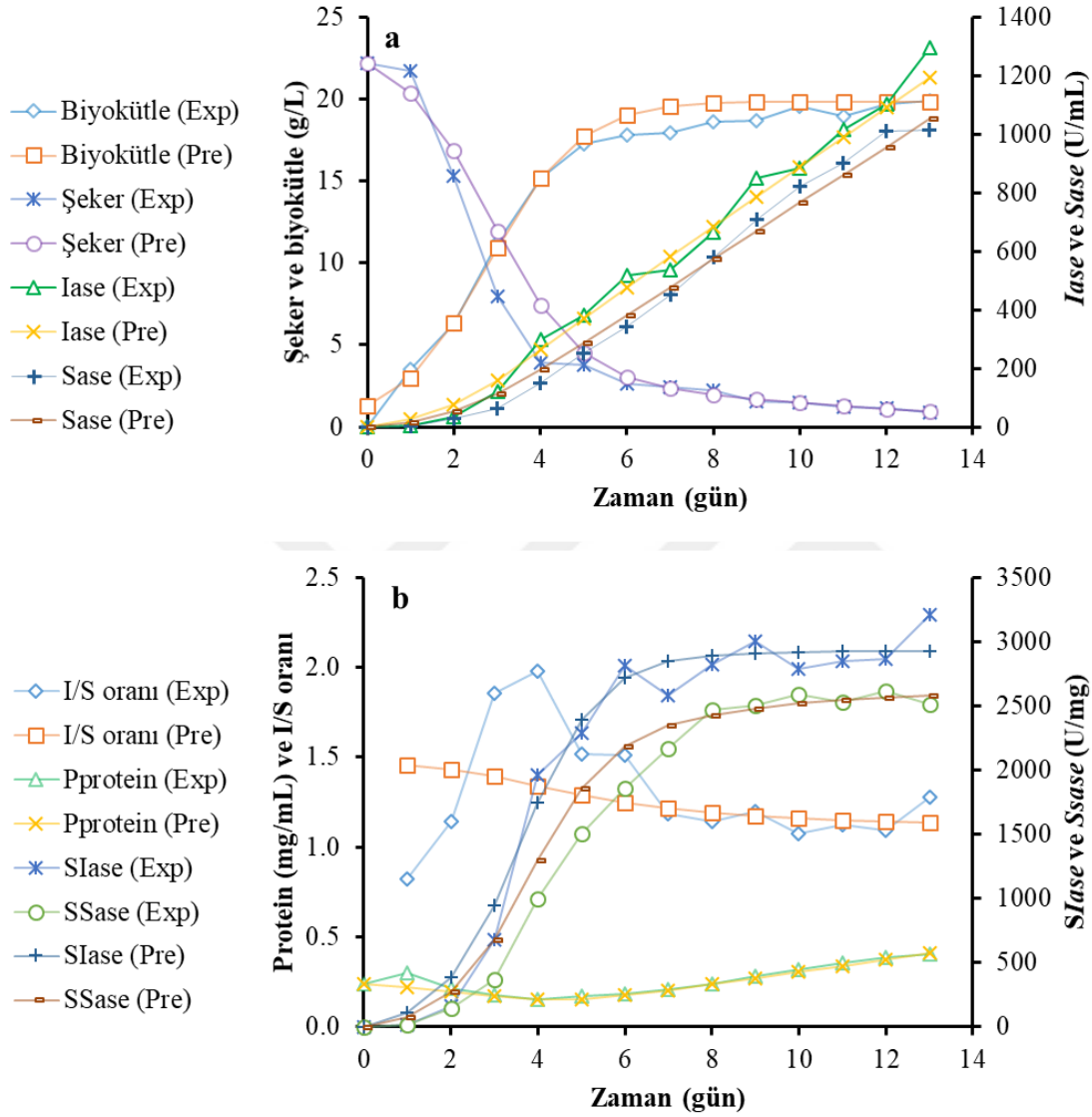
Ek olarak, fungal gelişim hızını (dX/dt), enzim veya protein üretim hızını (dP/dt) ve substrat tüketim hızını (dS/dt) tanımlayan kinetik modellerin simülasyonu da gerçekleştirilmiştir. Her iki besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonların uydurulan kurveleri Şekil 4.40 ve 4.41 de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tahmin edilen değerler ile deneysel veriler iyi bir uyum göstermiştir. Şekil 4.40a ve Şekil 4.41a da görüldüğü gibi, *A. niger*'in logaritmik gelişim fazının (fermentasyonun 1. ve 4. günleri) substrat tüketim hızının maksimum olduğu bölge ile çakışmaktadır. Yavaşlama fazında (Şekil 4.40) ve durağan fazda (Şekil 4.41), kinetik model deneysel fungal gelişim verilerini nispeten yüksek tahmin etmiş olup R^2 değerleri PBD ve MKD için sırasıyla 0.9720 ve 0.9912 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Bu durum, fungal gelişim için önerilen kinetik modelin deneysel verileri tanımlamada başarılı olduğunu göstermektedir. Her iki fermentasyon ortamının durağan fazında, ortamdaki düşük şeker miktarı küfler tarafından tüketilmemiştir (Şekil 4.40a ve Şekil 4.41a). Öte yandan, PBD ile belirlenen besiyeri formülasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun logaritmik fazındaki deneysel şeker tüketim verileri MLP model tarafından başarılı bir şekilde tahmin edilirken ($R^2 = 0.9967$) (Şekil 4.40a) MKD ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun logaritmik fazındaki şeker tüketim verileri nispeten yüksek tahmin edilmiş olup R^2 değeri 0.9637 olarak hesaplanmış ve tatminkar bir sonuç vermiştir (Şekil 4.41a ve Çizelge 4.20). Bununla beraber, enzim veya protein üretimi artmıştır. Enzim üretimi için önerilen kinetik modellerle tahmin edilen veriler, deneysel değerler ile çok iyi uyum sağlamıştır (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). *Iase* için R^2 değerleri 0.9889 (PBD) ve 0.9935 (MKD) olarak hesaplanmış olup *Sase* için bu değerler sırasıyla 0.9913 ve 0.9931 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Bunun yanı sıra, fungal gelişim, fermentasyonun 5-6. günlerinden itibaren yavaşlamasına veya durmasına rağmen enzim veya protein üretiminin devam ettiği anlaşılmış olup üretimin gelişimden bağımsız veya karışık gelişim olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Çizelge 4.20). Ayrıca, protein konsantrasyonu her iki fermentasyon ortamında da küflerin logaritmik fazında azalırken durağan fazında artmıştır. Tahmin edilen protein miktarlarının da aynı eğilimde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.40b ve Şekil 4.41b).



Şekil 4.40. PBD ile optimize edilen besiyeri formülasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun Logistic model, LP model ve MLP model ile fit edilen fungal gelişim, şeker tüketimi, *Iase* ve *Sase* üretimi (a), protein miktarı, I/S oranı, *SIase* ve *SSase* eğrileri (b)

Bu durumun fermentasyon ortamında kullanılan organik azot kaynaklarından (PBD için maya estraktı ve pepton; MKD için maya ekstraktı) kaynaklandığı düşünülmüş olup ortamdaki azot kaynağı tüketildiğinde (fermentasyonun 3-4. günleri) protein üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum aslında fermentasyon boyunca protein üretiminin devam ettiğini göstermektedir. Diğer yandan, deneysel *SIase* ve *SSase* verileri, tahmin edilen *Iase*, *Sase* ve protein değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.40b ve Şekil 4.41b). *SIase* ve *SSase* değerleri, fungal gelişim ile birlikte durağan faza kadar hızlı bir şekilde artıktan sonra azalan oranda artmaya devam etmiştir (Şekil 4.40b ve Şekil

4.41b). Spesifik aktivite değerlerinin tahmini ile ilgili sonuçlar R^2 değerlerine göre son derece tatmin edici bulunmuş olup PBD ve MKD ile ilgili *Slase* için bu değerler sırasıyla 0.9693 ve 0.9825 olarak bulunurken *SSase* için R^2 değerleri sırasıyla 0.9879 ve 0.9798 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.20).



Şekil 4.41. MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun Logistic model, LP model ve MLP model ile fit edilen fungal gelişim, şeker tüketimi, *Iase* ve *Sase* üretimi (a), protein miktarı, I/S oranı, *Slase* ve *SSase* eğrileri (b)

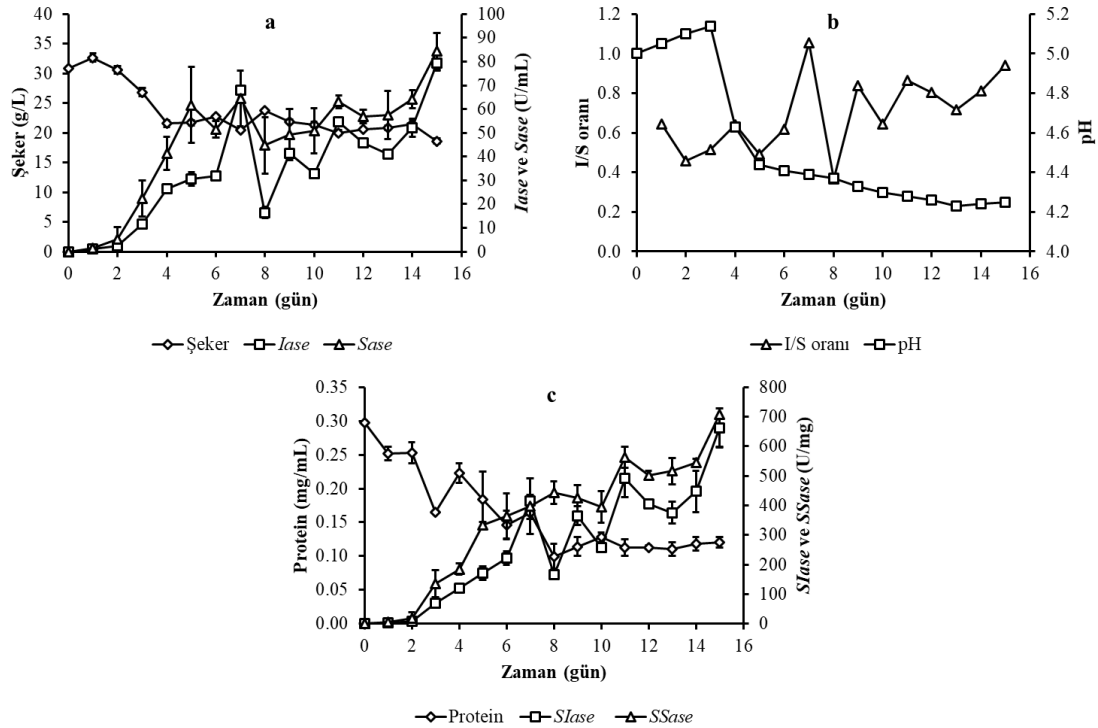
4.6. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde İnülinaz Fermentasyonu

Laboratuvar ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon koşulları Bölüm 3.10'da açıkça belirtilmiştir. Fermentasyon sırasında alınan örneklerde toplam indirgen şeker, *Iase*, *Sase* ve protein

miktarı analizleri yapılmış olup I/S oranı, *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri de hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.6.1. pH kontrolsüz ve havalandırmasız biyoreaktörde inulinaz üretimi

Havalandırmasız ve pH kontrolsüz küçük ölçekli karıştırmalı tank biyoreaktörde inulinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiş olup fermentasyonlar 15 gün boyunca devam etmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonun neticesinde fermentasyon ortamındaki şekerin önemli bir bölümü (>56%) mikroorganizma tarafından tüketilememiştir (Şekil 4.42a). Bunun temel nedeni, fermentasyon ortamında fungal gelişimin yetersiz olmasıdır (Şekil 4.43). Bununla beraber, minimum şeker konsantrasyonu fermentasyonun sonunda 18.58 g/L olarak ölçülmüş olup maksimum şeker tüketim hızı fermentasyonun 2-4. günleri arasında olmuştur. Diğer yandan, *Iase* aktivitesi fermentasyonun 7. gününe kadar artmış ve 7. günde aktivite değeri 68.03 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra aktivite de sert bir düşüş tespit edilmiş olup 8. günde aktivite değeri 16.37 U/mL olarak elde edilmiştir. Ancak fermentasyonun sonuna kadar inişli-çıkışlı artışlar yapılan analizlerin neticesinde belirlenmiş olup maksimum *Iase* aktivite değeri fermentasyonun sonunda 79.28 U/mL olarak ölçülmüştür. *Sase* aktivitesi de *Iase* aktivitesine paralellik göstermiş olup fermentasyonun 5. gününe kadar aktivite düzenli bir şekilde atmış olup aktivite değeri 61.69 U/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.42a). Ancak *Sase* aktivitesi *Iase* aktivitesi gibi değişkenlik göstermeyip aktivitenin nispeten daha stabil seyrettiği belirlenmiştir (Şekil 4.42a). Maksimum *Sase* aktivite değeri fermentasyonun sonunda ölçülmüş olup bu değer 84.30 U/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.42. pH kontrolsüz ve havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen fermentasyon



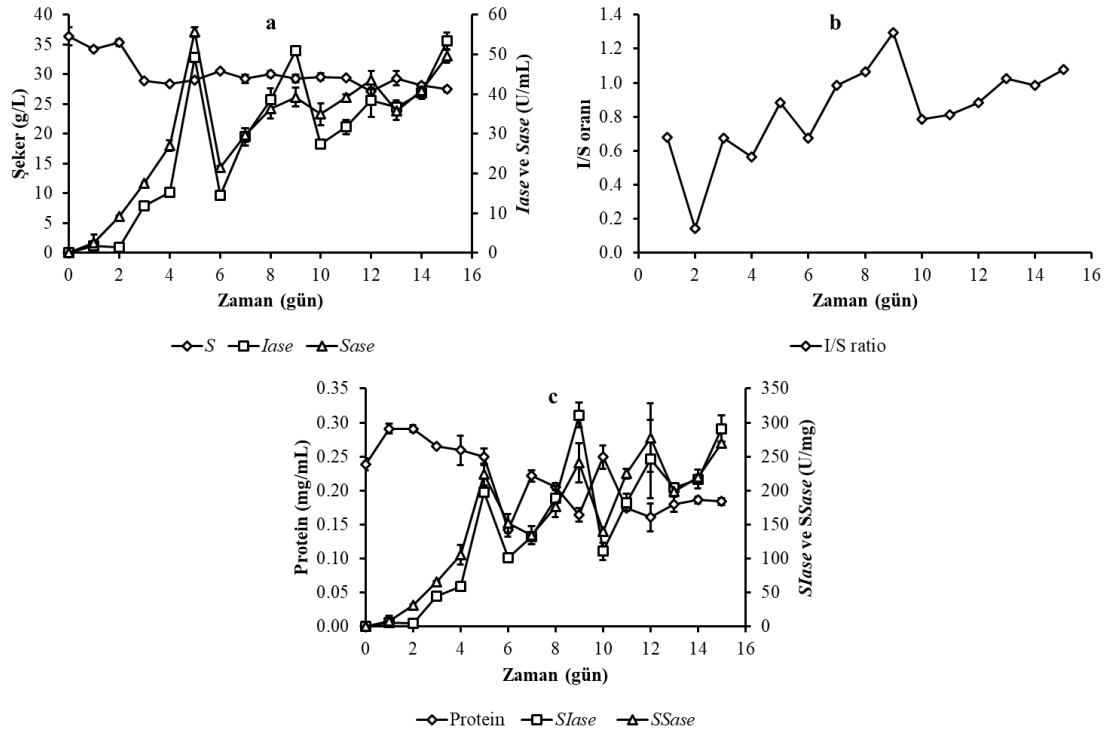
Şekil 4.43. pH kontrolsüz ve havalandırmasız ortamda yetersiz fungal gelişim

Öte yandan, *Iase* ve *Sase* aktiviteleri hesaplandığından dolayı I/S oranının fermentasyon boyunca nasıl seyrettiği de belirlenmiş olup 0.37-1.06 arasında değişmiştir (Şekil 4.42b). I/S oranının 10^{-2} 'den büyük olması üretilen enzimin inülinaz dosğasında olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ı 5.0'a ayarlandıktan sonra ilk üç gün boyunca 5.14'e kadar artmış ve sonrasında 4.63'e düşmüş ve fermentasyonun 13. gününe kadar azalmaya devam etmiştir (Şekil 4.42b). Bu durumun temel nedeninin fermentasyon sırasında üretilen organik asitler olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, Şekil 4.42c fermentasyon boyunca protein miktarı, *SIase* ve *SSase* değişimini göstermektedir. Elde edilen bulgulara göre, başlangıç protein konsantrasyonu 0.30 mg/mL olarak ölçülmüş olup bu değer yüksek olmasının nedeni besiyerine eklenen organik azot kaynağından (%4.42 maya ekstraktı, a/h) kaynaklanmaktadır. Fermentasyonun 8. gününe kadar protein miktarı 0.10 mg/mL seviyesine kadar azalmış olup bu günden sonra protein miktarında nispeten artış tespit edilmiş ve fermentasyonun sonunda protein miktarı 0.12 mg/mL olarak ölçülmüştür. Protein miktarı hesaplandığından dolayı *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Şekil 4.42c'de gösterilmiştir. *SIase* aktivite değerleri *Iase* aktivite değerleri ile aynı eğilimde olduğu belirlenmiş olup fermentasyonun 7. gününe kadar spesifik aktivite düzenli olarak 415.47 U/mg'a arttıktan sonra düşüş gözlemlenmiş ve maksimum *SIase* aktivite değeri fermentasyonun sonunda 662.69 U/mg olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, *SSase* aktivite değerlerinin de *Sase* aktivite değerleri ile aynı eğilimde olduğu ve maksimum *SSase* değerinin fermentasyonun sonunda 706.94 U/mg olarak tespit edilmiştir.

4.6.2. pH kontrollü ve havalandırmasız biyoreaktörde inülinaz üretimi

Karıştırmalı tank biyoreaktörde pH kontrollü ve havalandırmasız fermentasyon gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.44'te sunulmuştur. Elde edilen

sonuçlara göre fermentasyon ortamındaki şekerin fermentasyonun 3. gününden sonra tüketilmediği belirlenmiş olup (Şekil 4.44a) fermentasyonun sonunda şekerin %27.27'si tüketildiği (yani %72.73'ünün tüketilmediği) belirlenmiştir. Bunun temel nedeni, fermentasyon ortamındaki yetersiz fungal gelişimdir (Şekil 4.45). Öte yandan, besiyerindeki şekerin fermentasyonun 2-4. günleri arasında maksimum hızda tüketildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla fermentasyonun 5. gününe kadar *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sürekli olarak artmış olup 5. gündeki değerler sırasıyla 49.22 U/mL ve 55.65 U/mL olarak ölçülmüştür. Fermentasyonun 5. gününden sonra *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sert bir şekilde azalmış olup (Şekil 4.44a) aktiviteler sırasıyla 14.42 U/mL ve 21.44 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun 5. gününden sonra aktivite değerleri inişli-çıkışlı şeklinde devam etmiştir. Maksimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 53.36 U/mL (fermentasyonun 9. günü) ve 55.65 U/mL (fermentasyonun 5. günü) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.44a). Fermentasyon boyunca *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri belirlendiğinden dolayı I/S oranı değerleri de hesaplanmış olup 0.14 (fermentasyonun 2. günü)-1.30 (fermentasyonun 9. günü) arasında değişmiştir (Şekil 4.44b). Dolayısıyla I/S oranları 10^{-2} 'den büyük olduğundan, üretilen enzim inülinaz doğasıdır.



Şekil 4.44. pH kontrollü ve havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen fermentasyon

Diğer yandan, alınan örneklerde protein analizi yapılmış olup sonuçlar Şekil 4.44c'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara fermentasyon ortamındaki protein konsantrasyonu fermentasyonun 2. gününe kadar 0.24 mg/mL'den 0.29 mg/mL'ye artmış olup sonrasında fermentasyonun 6. gününe kadar düşüş gözlemlenmiştir (0.142 mg/mL). Sonraki günlerde ise besiyerindeki protein seviyesinde zaman zaman artma ve azalma belirlenmiş olup fermentasyonun 10. gününde 0.25 mg/mL'ye artmıştır. Fermentasyonun sonunda protein konsantrasyonu 0.184 mg/mL olarak ölçülmüştür.

Alınan örneklerdeki protein seviyesi belirlendiğinden dolayı *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri de hesaplanmıştır (Şekil 4.44c). Elde edilen sonuçlara göre hem *SIase* hem de *SSase* aktivite değeri fermentasyonun 5. gününe kadar düzenli bir şekilde artmıştır (sırasıyla 197.48 U/mg ve 223.80 U/mg) (Şekil 4.44c). Sonrasında ise aktivite değerleri düzenli olarak artış göstermemiştir (tıpkı *Iase* ve *Sase* aktivite değerlerinde olduğu gibi, Şekil 4.44a). Maksimum *SIase* ve *SSase* değerleri sırasıyla 310.87 U/mg (fermentasyonun 9. günü) ve 277.80 U/mg (fermentasyonun 12. günü) olarak hesaplanmıştır.

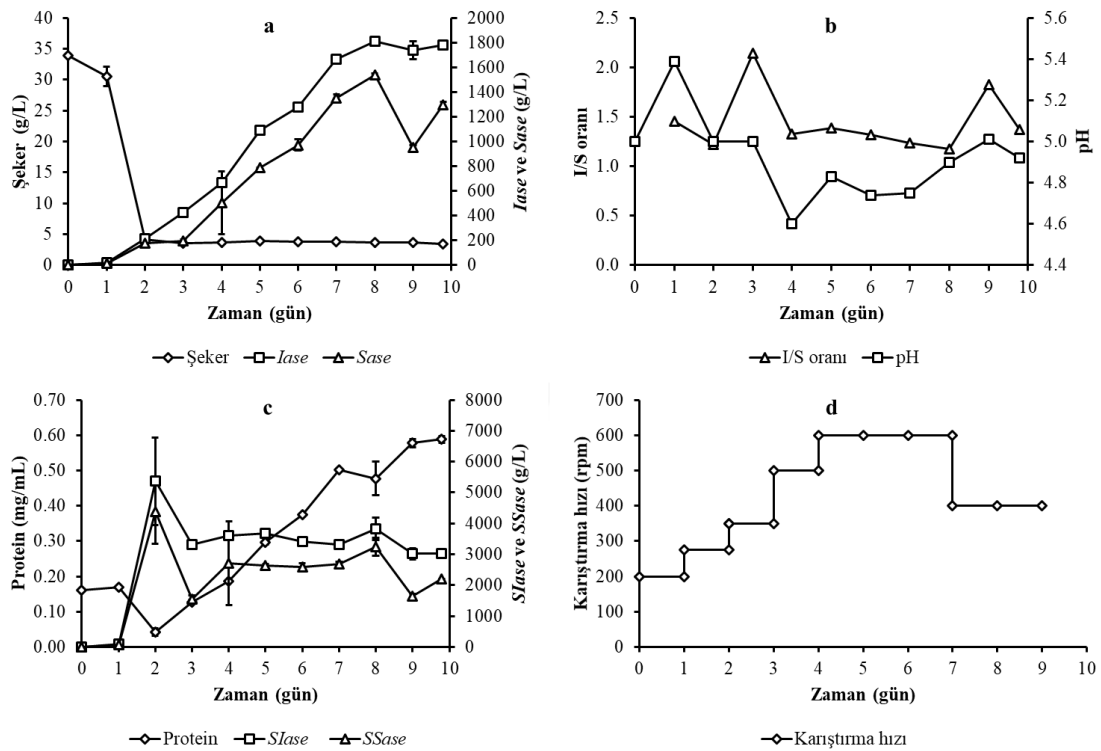


Şekil 4.45. pH kontrollü ve havalandırmasız ortamda yetersiz fungal gelişim

4.6.3. pH kontrolsüz ve havalandırılmalı biyoreaktörde inulinaz üretimi

Karıştırılmalı tank biyoreaktörde pH kontrolsüz ve havalandırılmalı inulinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Havalandırmasız fermentasyon ortamında fungal gelişimin yetersiz olduğu Şekil 4.43 ve Şekil 4.45'te gösterilmiştir. Bu nedenle gelişimi ve üretimi teşvik etmek amacıyla fermentasyon ortamına 1 vvm hava verilmiştir. Böylece pH kontrolünün yanı sıra havalandırmanın da etkisi incelenmiştir. Diğer yandan, aşırı fungal gelişim nedeniyle havalandırmanın etkisi azalacağından dolayı karıştırma hızı da 200 dev/dk'den 600 dev/dk'ye kademeli olarak artırılmıştır. Havalandırılmalı ve pH kontrolsüz gerçekleştirilen fermentasyon ile ilgili sonuçlar Şekil 4.46'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara fermentasyon ortamındaki şekerin %87.67'si fermentasyonun 2. gününde tüketilmiş olup fermentasyonun sonunda toplam şekerin %10'u tüketilmemiştir. Maksimum şeker tüketim hızı fermentasyonun başlangıcı ile 2. günü arasındadır (Şekil 4.46a). Şeker tüketimi ile birlikte aşırı ve düzensiz fungal gelişim gözlemlenmiştir (Şekil 4.47). Fakat enzim aktivite değerlerinde şeker tüketimi ve fungal gelişime paralel olarak önemli bir artış tespit edilmemiştir (Şekil 4.46a).

Diğer yandan aşırı fungal gelişim nedeniyle yetersiz havalandırmayı önlemek için fermentasyonun 1. günü sonrasında karıştırma hızı 275 dev/dk'ye, 2. günü sonrasında 350 dev/dk'ye, 3. günü sonrasında 500 dev/dk'ye, ve 4. günü sonrasında 600 dev/dk'ye artırılmış olup fermentasyonun 7. gününden sonra karıştırma hızı 400 dev/dk'ye düşürülmüştür (Şekil 4.46d). Çünkü ortamda substrat olmadığından veya düşük seviyede olduğundan ve küflerin canlılığı önemli ölçüde kaybolduğundan dolayı yüzeye tutunma kabiliyeti azalmakta ve bu küfler fermentasyon ortamına karışmaktadır. Bu da yüksek karıştırma hızı değerinde aşırı köpürmeye neden olmakta ve fermentasyonun etkinliğini azaltmaktadır. Karıştırma hızı artışına paralel olarak enzim üretiminde de doğru orantılı olarak artış sağlanmıştır (şekil 4.46a). Öyle ki en yüksek *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri fermentasyonun 8. gününde sırasıyla 1810.76 U/mL ve 1537.88 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.46a).



Şekil 4.46. pH kontrolsüz ve havalandırmalı biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon

Fermentasyon boyunca I/S oranı 1.18-2.14 arasında değişmiş olup minimum ve maksimum değerleri sırasıyla fermentasyonun 8. ve 3. günlerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.46b). Dolayısıyla, I/S oranları 10^{-2} 'den büyük olduğundan, üretilen enzim inülinaz doğasıdadır. Fermentasyon, besiyerinin başlangıç pH değeri 5.0'a ayarlandıktan sonra başlatılmış olup sonrasında pH kontrol edilmemiştir (Şekil 4.46b). Besiyerinin pH değeri ilk gün 5.39'a kadar arttıktan sonra 4. güne kadar 4.60 seviyesine kadar gerilemiştir (Şekil 4.46b). Besiyeri pH'nın azalmasının nedeni fermentasyon sırasında ortama salınan organik asitlerdir. Sonrasında ise nispeten pH değerinde artış tespit edilmiş olup fermentasyonun 9. gününde pH değeri 5.01 olmuştur. Düşük pH nedeniyle hücrelerin paraçlanması ve böylece hücre içinden başka metabolitlerin açığa çıkması ve aynı zamanda canlı hücreler tarafından enzim üretiminin devam etmesi, fermentasyon

ortamı pH'ının artmasına neden olmuş olabilir. Fermentasyonun sonunda ise pH değeri 4.92 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.46b).



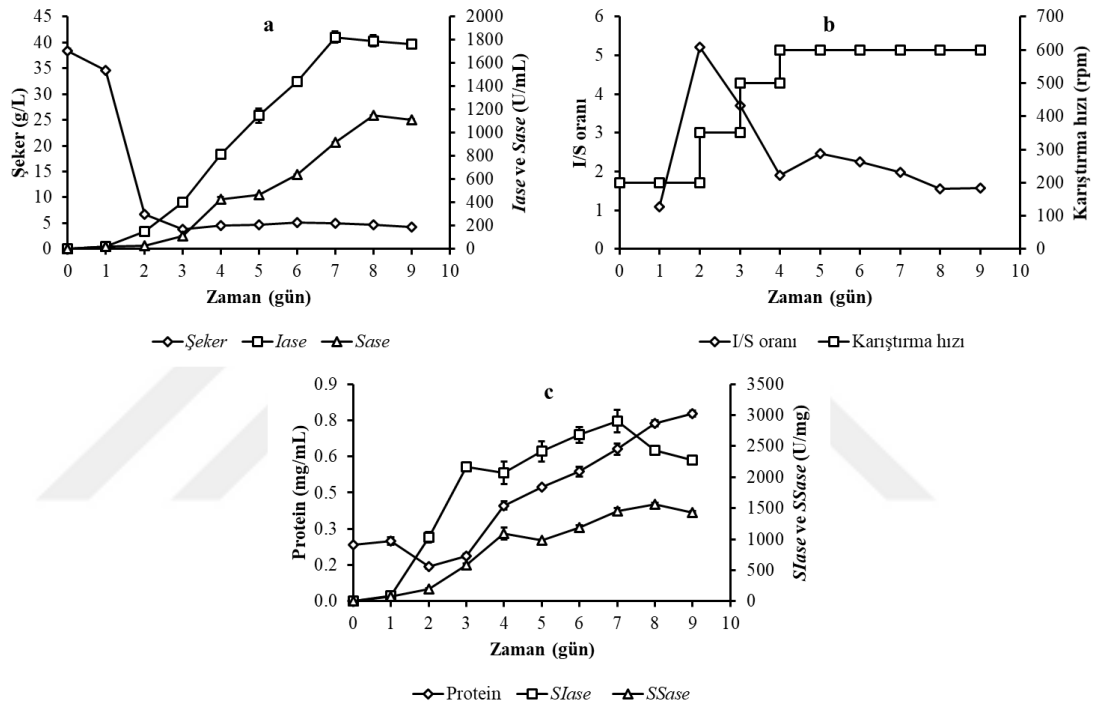
Şekil 4.47. pH kontrolsüz ve havalandırılmalı biyoreaktörde aşırı ve düzensiz fungal gelişim

Fermentasyon boyunca protein konsantrasyonu da ölçülmüştür (Şekil 4.46c). Elde edilen bulgulara göre protein seviyesi (0.04 mg/mL) fermentasyonun 2. gününde minimum olarak ölçülmüştür (Şekil 4.46c). Sonrasında ise fermentasyonun 7. gününe kadar düzenli bir artış tespit edilmiş olup fermentasyonun 8. gününde 0.50 mg/mL'den 0.48 mg/mL'ye azalmıştır. Fermentasyonun sonunda ise protein konsantrasyonu 0.59 mg/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 4.46c). *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri de hesaplanmış olup maksimum değerleri sırasıyla fermentasyonun 2. gününde 5361.45 U/mg ve 4371.58 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.46c). Sonraki günde ise spesifik aktivite değerleri önemli ölçüde azalmıştır (sırasıyla 5361.45 U/mg'dan 3321.49 U/mg'a, 4371.58 U/mg'dan 1552.53 U/mg'a) (Şekil 4.46c). Enzim aktivite değerlerinin artması

ile birlikte (Şekil 4.46a) fermentasyonun 4. gününde spesifik aktivite değerlerinde nispeten artış olsa da fermentasyonun 7. gününe kadar stabil kalmıştır (Şekil 4.46c). Fermentasyonun 8. gününde ise *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri 3829.83 U/mg ve 3250.44 U/mg'a artsa da fermentasyonun sonunda sırasıyla 3029.22 U/mg ve 2206.65 U/mg'a azalmıştır (Şekil 4.46c).

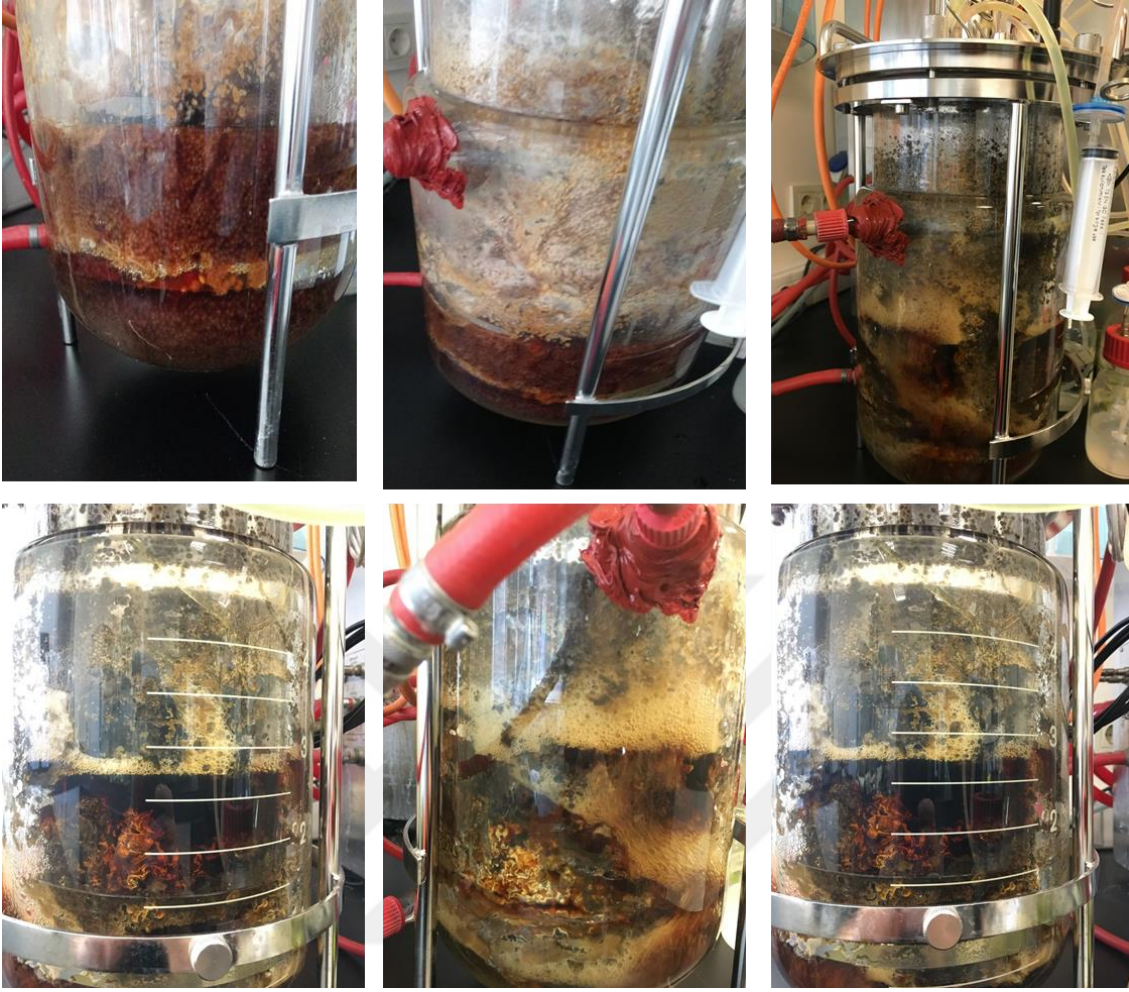
4.6.4. pH kontrollü ve havalandırmalı biyoreaktörde inulinaz üretimi

Küçük ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktöre pH kontrolü ve havalandırma yapılarak da inulinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiş olup fermentasyon sonuçları Şekil 4.48'de gösterilmiştir.



Şekil 4.48. pH kontrollü ve havalandırmalı biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon

Elde edilen sonuçlara göre fermentasyon ortamındaki şekerin yaklaşık %83'ü fermentasyonun 2. gününde küfler tarafından sorunsuzca tüketilmiş olup fermentasyonun sonunda 3.69 g/L şeker tüketilememiştir (%9.6) (Şekil 4.48a). Fermentasyonun başlangıcı ile 2. günü arasında maksimum şeker tüketim hızı gerçekleşmiştir. Fermentasyon ortamındaki şekerin büyük bir kısmı fermentasyonun 2. gününde tüketilmesine rağmen enzim aktivitesinde kayda değer bir artış tespit edilememiş olup *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 148.43 U/mL ve 28.46 U/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 4.48a). Ancak havalandırmanın da etkisiyle fermentasyonun başlangıcından 2. gününe kadar aşırı ve düzensiz bir hücre gelişimi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.49) olup hücre gelişimine paralel olarak aktivite değerinde önemli bir artış belirlenmemiştir.



Şekil 4.49. pH kontrollü ve havalandırmalı biyoreaktörde aşırı ve düzensiz fungal gelişim

Etkin bir havalandırma sağlamak için karıştırma hızı fermentasyonun 2. gününde 350 dev/dk'ye, 3. gününde 500 dev/dk'ye ve 4. gününde ise 600 dev/dk'ye artırılmıştır (Şekil 4.48b). Fermentasyonun 3. gününden itibaren aktivite değerleri hızlı bir şekilde artmaya başlamış olup maksimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 1825.38 U/mL (7. gün) ve 1151.94 U/mL (8. gün) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.48a). Fermentasyonun sonunda ise aktivite değerleri nispeten azalmış olup *Iase* ve *Sase* aktiviteleri sırasıyla 1765.92 U/mL ve 1115.40 U/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 4.48a). *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri ölçüldüğünden dolayı I/S oranları da hesaplanmış olup sonuçlar Şekil 4.48b'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum I/S oranı fermentasyonun 2. gününde 5.22 olarak hesaplanırken minimum değeri fermentasyonun 1. gününde 1.09 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.48b). Dolayısıyla üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır. Çünkü fermentasyon boyunca hesaplanan I/S oranları 10^{-2} 'den büyüktür.

Fermentasyon boyunca alınan örneklerde protein konsantrasyonu da ölçülmüş olup sonuçlar Şekil 4.48c'de sunulmuştur. pH kontrolsüz ve havalandırmalı fermentasyonun sonuçların bezer şekilde minimum protein aktivitesi fermentasyonun 2. Gününde 0.14 mg/mL olarak ölçülmüştür. Bu günden sonra ise protein konsantrasyonu

sürekli artış göstermiş olup maksimum protein seviyesi fermentasyonun sonunda 0.78 mg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.48c). Protein, *Iase* ve *Sase* seviyelerine bağlı olarak *SIase* ve *SSase* değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Şekil 4.48c'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *SIase* aktivitesi fermentasyonun 3. gününe kadar, *SSase* aktivitesi de fermentasyonun 4. gününe kadar sürekli bir artış göstermiş olup spesifik aktivite değerleri sırasıyla 2165.92 U/mg ve 1090.07 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.48c). Maksimum *SIase* ve *SSase* değerleri sırasıyla fermentasyonun 7. ve 8. günlerinde 2902.80 U/mg ve 1561 U/mg olarak hesaplanmıştır. Fermentasyonun sonunda ise spesifik aktivite değerlerinde nispeten düşüş gözlemlenmiş olup sırasıyla 2273.56 U/mg ve 1435.60 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.48c).

4.6.5. Küçük ölçekli biyoreaktördeki fermentasyonların karşılaştırılması

Küçük ölçekli karıştırmalı tank biyoreaktörde pH kontrollü/kontROLSÜZ ve havalandırılmalı/havalandırmasız ortamlarda inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiş olup sonuçlar yukarıda tartışılmıştır. Bununla beraber, fermentasyonlardan elde edilen veriler kullanılarak kinetik parametreler de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Biyoreaktörde pH kontrolü ve havalandırmanın etkisini inceleyen fermentasyonların karşılaştırılması

Kinetik parametreler	pH kontROLSÜZ		pH kontrollü	
	Havalandırmasız	Havalandırılmalı	Havalandırmasız	Havalandırılmalı
<i>Iase</i> (U/mL)	79.28±3.07 ^b	1810.76±5.85 ^a	53.36±2.19 ^b	1825.38±47.75 ^a
<i>Sase</i> (U/mL)	84.30±7.80 ^c	1537.88±15.59 ^a	55.65±1.27 ^c	1170.46±0.97 ^b
I/S oranı	0.95±0.05 ^c	1.18±0.01 ^b	0.96±0.02 ^c	1.56±0.04 ^a
<i>SIase</i> (U/mg)	662.69±65.76 ^b	5361.45±1412.68 ^a	290.95±19.65 ^b	2902.80±176.81 ^{ab}
<i>SSase</i> (U/mg)	706.94±107.72 ^b	4371.58±1028.60 ^a	223.80±16.01 ^b	1561.31±24.43 ^b
<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	19.08±1.34 ^b	333.96±5.77 ^a	14.72±0.14 ^b	376.48±29.53 ^a
<i>Q_{Sase}</i> (U/mL/gün)	22.19±0.13 ^c	316.71±16.79 ^a	14.92±0.50 ^c	256.80±2.44 ^b
<i>Q_{Şeker}</i> (g/L/gün)	4.53±0.14 ^c	14.85±0.04 ^b	3.44±0.11 ^d	15.87±0.34 ^a
SUY (%)	43.13±0.18 ^b	89.95±0.25 ^a	27.27±2.79 ^c	90.84±0.62 ^a

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Elde edilen bulgulara göre fermentasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için besiyerine mutlaka havalandırma yapılmalıdır. Havalandırma ile hem hücre gelişimi, hem enzim üretimi hem de substrat tüketimi teşvik edilmektedir. Bununla beraber, fermentasyon ortamına verilen havalandırmanın etkinliğini artırmak ve havanın besiyerinde homojen dağılımını sağlamak amacıyla karıştırma hızı da belirli aralıklarla artırılmalıdır (Şekil 4.46d ve Şekil 4.48b). Böylece, enzim üretimi karıştırma hızının artırılmasıyla birlikte doğru orantılı olarak artmıştır (Şekil 4.46a ve Şekil 4.48a) Diğer yandan aşırı ve düzensiz fungal gelişim (Şekil 4.47 ve Şekil 4.49), farklı fermentasyon stratejileri ve modları ile mutlaka kontrol edilmeye çalışılarak üretim etkinliği ve seviyesi daha ileri seviyelere artırılmalıdır.

Çizelge 4.21'deki fermentasyonlar incelendiğinde, fermentasyon ortamına hava verilen fermentörde çalışılan tüm kinetik parametrelerin, havalandırmasız ortamda yapılan fermentasyonun kinetik verilerinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Öyle ki, pH kontROLSÜZ ve havalandırılmalı

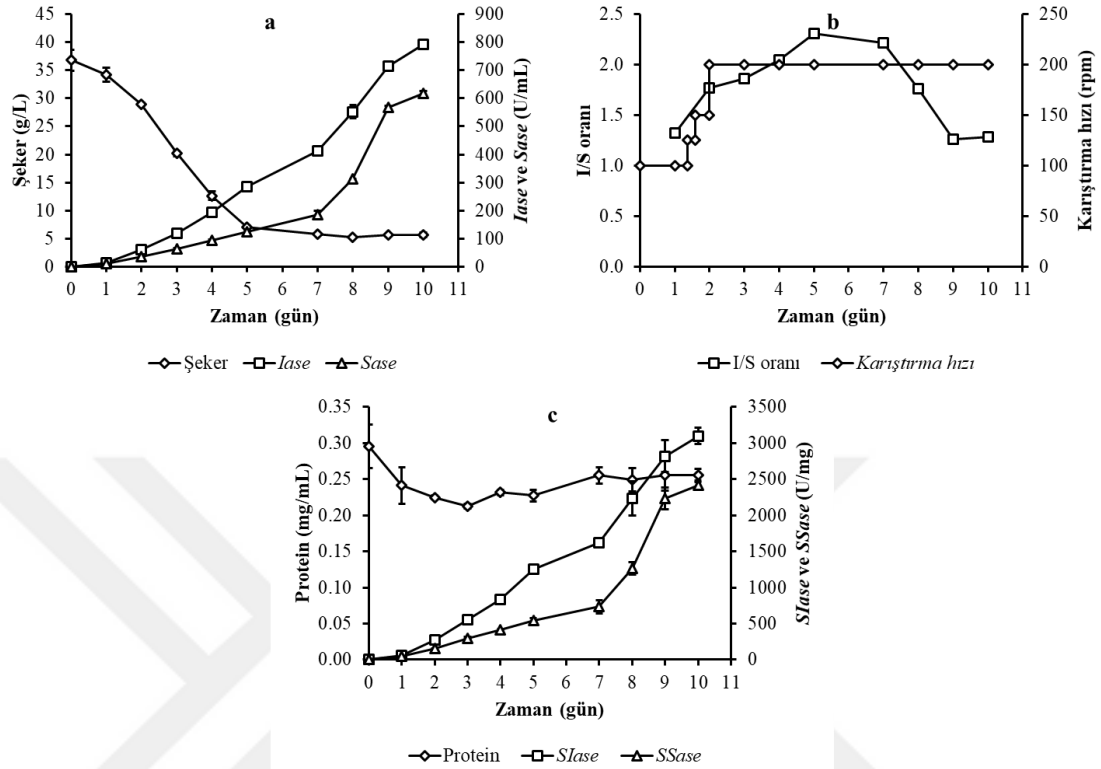
biyoreaktörden elde edilen kinetik değerler (I_{ase} , S_{ase} , SI_{ase} , SS_{ase} , Q_{Iase} , Q_{Sase} , $Q_{Şeker}$ ve SUY), pH kontrolsüz ve havalandırmasız fermentörden elde edilen kinetik değerlerden sırasıyla 22.84, 18.24, 8.09, 6.18, 17.50, 14.27, 3.28 ve 2.09 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Benzer şekilde, pH kontrollü ve havalandırmasız/havalandırmalı biyoreaktörlerde de bu değerlerin sırasıyla 34.21, 21.04, 9.98, 6.98, 25.58, 17.21, 4.61 ve 3.33 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Öte yandan, pH kontrolsüz fermentasyondan elde edilen kinetik verilerin pH kontrollü fermentasyondan elde edilen kinetik verilerden genellikle daha yüksek olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 4.21). Örneğin, pH kontrolsüz ve havalandırmasız biyoreaktörden hesaplanan kinetik veriler (I/S oranı hariç), pH kontrollü ve havalandırmasız biyoreaktörden hesaplanan kinetik verilerden daha yüksek elde edilmiştir. Benzer sonuçlar, pH kontrolsüz/havalandırmalı fermentasyondan da elde edilmiş olup pH kontrollü/havalandırmalı fermentasyondan elde edilen I_{ase} aktivitesi, I/S oranı, Q_{Iase} , $Q_{Şeker}$ ve SUY değerleri nispeten yüksek belirlenmiştir. Ancak $Q_{Şeker}$ hariç ($P<0.05$) tüm kinetik parametrelerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P>0.05$). Diğer yandan, hesaplanan I/S oranları 10^{-2} 'den büyük olduğundan dolayı üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.21). **Sonuç olarak, bundan sonraki yapılacak çalışmalarda biyoreaktörde gerçekleştirilecek inülinaz fermentasyonları pH kontrolsüz ve havalandırmalı ortamda gerçekleştirilmelidir.** Ayrıca, elde edilen bu sonuçlar, sonraki yapılacak çalışmalara ışık tutmakta ve bu çalışmaların temelini oluşturmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, *Kluyveromyces marxianus* ile inülinaz üretimi için hava akış hızı ve çalkalama hızı, metabolik ısı salma profillerine dayanarak optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, karıştırma hızının 100 dev/dk'den düşük olması, daha az inülinaz üretimine yol açmıştır. Ancak, 150 dev/dk'den büyük karıştırma hızlarında biyokütle kaybının daha az inülinaz aktivitesine neden olduğu da bildirilmiştir. Havalandırma oranları ≤ 0.5 vvm olan denemede düşük k_{La} hesaplanırken, 1.5 vvm'de ise reaktör içeriğinin köpürmesi, biyokütle ve inülinaz aktivitesinde kayba neden olmuştur. Sonuç olarak, optimum havalandırma ve karıştırma hızları sırasıyla 1 vvm ve 150 dev/dk olarak belirlenmiştir (Santharam vd. 2019). Silva-Santisteban and Filho (2005) havalandırma ve karıştırmanın *K. marxianus* ile inülinaz üretimi üzerine etkisini kesikli-karıştırmalı reaktörde çalışmıştır. Çalkalama hızı 50-550 dev/dk, havalandırma oranı da 0.5-2.0 vvm arasında değişmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim üretiminin karıştırma koşullarından kuvvetli bir şekilde etkilendiği, havalandırma oranının daha az önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, karıştırma hızındaki artışın, yüksek hızlarda büyük ölçüde ölüm oranını artırdığından dolayı enzim üretimini azalttığı bildirilmiştir.

4.7. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde İnülinaz Fermentasyonu

Büyük ölçekli (30-L) karıştırmalı tank biyoreaktörde inülinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.50'de sunulmuştur. Şeker tüketim grafiği incelendiğinde (Şekil 4.50a), şekerin küfler tarafından sorunsuzca tüketildiği gözlemlenmiş olup fermentasyonun 5. gününde ortamdaki şekerin yaklaşık %81'i küfler tarafından metabolize edilmiştir. Fermentasyonun sonunda ise 5.70 g/L şeker tüketilmeden kalmış olup toplam şeker kullanım oranı (SUY) %85.60 olarak

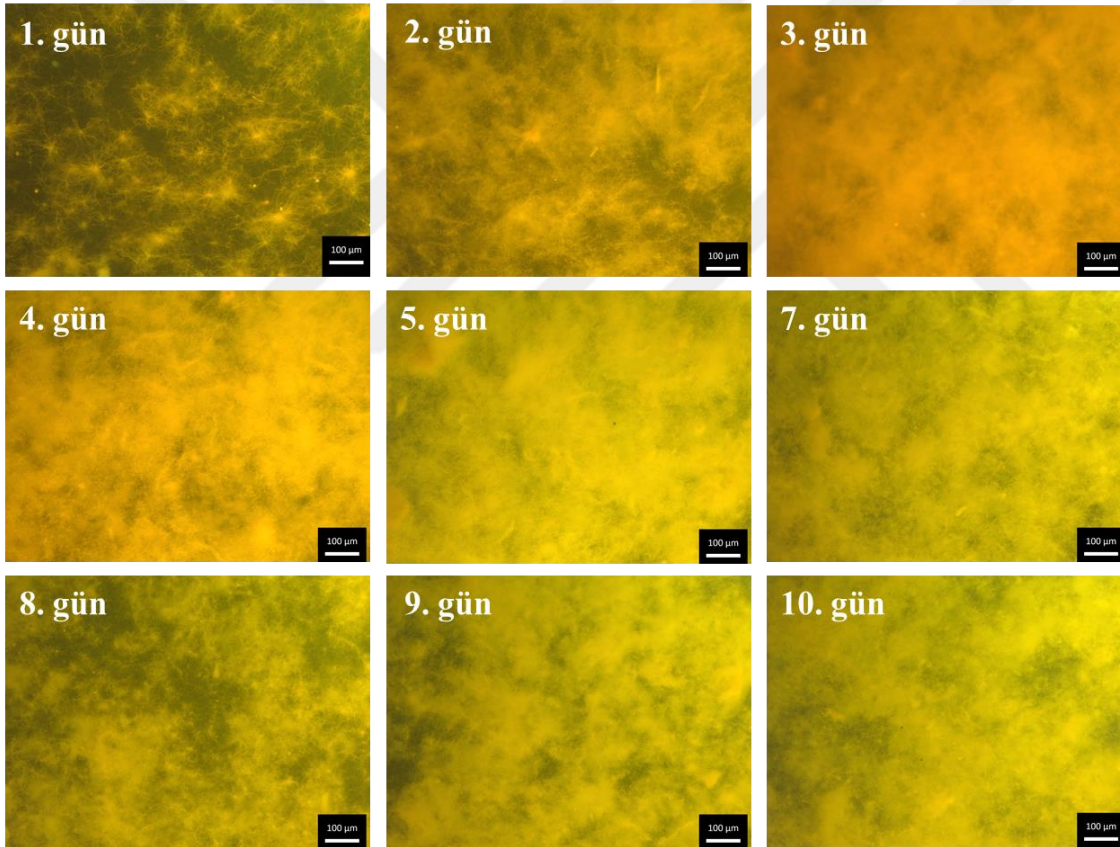
hesaplanmıştır. $Q_{\text{Şeker}}$ ise fermentasyonun 2-4. günleri arasında olduğu tespit edilmiş olup bu değer 8.11 g/L/gün olarak bulunmuştur.



Şekil 4.50. Büyük ölçekli (30-L), pH kontrollü ve havalandırmalı karıştırma tank biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon

Fermentasyon boyunca alınan örneklerde görüntüleme analizi yapılmış olup fermentasyonun 1. gününden itibaren 5. gününe kadar hücre yoğunluğu veya misel oluşumunun giderek arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.51). Fermentasyonun 7. gününden sonra ise ortamdaki şeker konsantrasyonu minimum seviyelerde olduğundan dolayı hücrelerin canlılık fonksiyonlarını kaybetmeye başladığı ve karıştırmanın da etkisiyle hücre parçalanmasının olduğu gözlemlenmiş olup (Şekil 4.51) bu günden sonra hem *Iase* hem de *Sase* aktivite değerlerinde sıçrama meydana gelmiştir (Şekil 4.50a). Öyle ki; Q_{Iase} ve Q_{Sase} , fermentasyonun 7-9. günleri arasında olup bu değerler sırasıyla 150.82 U/mL/gün ve 190.04 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, Şekil 4.50a incelendiğinde enzim üretiminin fermentasyon boyunca devam ettiği görülmüş ve fermentasyonun sonunda maksimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 791.35 U/mL ve 616.90 U/mL olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla fermentasyonun I/S oranı 1.28 olarak hesaplanmış olup üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğu anlaşılmıştır. I/S oranı değerleri 1.26-2.31 arasında değişmiştir. Fermentasyonun 5. gününe kadar I/S oranı 2.31'e kadar artmış, sonrasında ise azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.50b). Öte yandan, Şekil 4.50b fermentasyon sırasında karıştırma hızının değiştirildiğini göstermektedir. Fermentasyonun 33. saatinde havalandırmanın etkinliğini artırmak ve homojen bir karışım sağlamak amacıyla karıştırma hızı 25 dev/dk daha artırılarak 125 dev/dk'ye ayarlanmıştır. Ancak bir süre sonra 125 dev/dk karıştırma hızının da yetersiz olduğu yapılan gözlem değerlendirmesinin sonucunda anlaşılmış olup karıştırma hızı

fermentasyonun 38. saatinde 150 dev/dk'ye artırılmıştır. Fungal gelişime bağlı olarak fermentasyonun 2. gününde karıştırma hızı tekrar artırılarak 200 dev/dk'ye ayarlanmış olup fermentasyonun sonuna kadar karıştırma hızı 200 dev/dk de sabit tutulmuştur (Şekil 4.40b). Ayrıca, fermentasyon ortamına başlangıçta 0.3 vvm hava verilmiş olup fermentasyonun 26. saatinde havalandırma hızı 0.5 vvm'e artırılmış ve fermentasyonun sonuna kadar besiyerine 0.5 vvm havalandırma yapılmıştır. Fermentasyon boyunca alınan örneklerde protein miktarı analizi yapılmış olup sonuçlar Şekil 4.50c'de gösterilmiştir. Fermentasyonun 3. gününe kadar protein seviyesi azalmakta ve bu günden sonra protein konsantrasyonunda nispeten artış görülmektedir (Şekil 4.50c). Minimum ve maksimum protein konsantrasyonu sırasıyla 0.21 mg/mL ve 0.30 mg/mL olarak belirlenmiştir. Protein konsantrasyonunun hesaplanmasıyla birlikte spesifik aktivite değerleri de hesaplanmış olup maksimum *SIase* ve *SSase* değerleri sırasıyla fermentasyonun sonunda 3097.68 U/mg ve 2413.39 U/mg olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, fermentasyonun 7. gününden sonra hem *Iase/Sase* (Şekil 4.50a) hem de *SIase* ve *SSase* (Şekil 4.50b) değerlerinde kayda değer bir artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.51. Fermentasyon boyunca alınan örneklerin stereo mikroskoptaki görüntüsü

Yapılan bir çalışmada, *Candida kefyr* DSM 70106'nın havalandırılmış kültürlerinde inülinaz üretiminin ölçek büyütmesi, $K_L\alpha$ 'nın sabit tutulması kriteri dikkate alınarak incelenmiştir. Fermentasyon, 15 L'lik bir fermentörde, 25-199 h⁻¹ arasında değişen $K_L\alpha$ değerleri ile kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek inülinaz üretimi, 46 h⁻¹ başlangıç $K_L\alpha$ değerinde elde edilmiştir. Daha sonra aynı kültür ortamı koşulları kullanılarak büyük ölçekli bir fermentasyon (300-L kapasiteli fermentör)

gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekli ve büyük ölçekli denemelerde elde edilen sonuçlar benzer eğilimler göstermiş olup üretkenlik için sırasıyla 0.60 U/mL/sa ve 0.58 U/mL/sa, enzim aktiviteleri için ise sırasıyla 43.0 U/mL ve 41.5 U/mL olarak bulunmuştur (Pessoa vd. 1996). Bir diğer çalışmada ise, *Kluyveromyces* sp. Y-85 ile inülinaz üretimi için kültür koşulları cevap yüzey metodu (MKD) ile optimize edildikten sonra (%8 yerelması, %2 üre, %0.2 et ekstraktı ve %4 mısır maserasyon sıvısı içeren ortamda 30°C sıcaklık, 24 saat fermentasyon süresinde 59.5 U/mL inülinaz aktivitesi) 15 litrelik fermentörde fermentasyon ve 1000 litrelik kuleli fermentörde ölçek büyütme araştırılmış olup üretilen enzim aktivitesi 68.9 U/mL'de kalmıştır.

4.8. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda üretilen ham enzim solüsyonunun kısmi olarak saflaştırılması üzerine önce santrifüj-süre kombinasyonunun sonra da UF prosesinin etkisi incelenmiş olup elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

4.8.1. Santrifüj-süre kombinasyonu ile kısmi saflaştırma

Üretilen enzimin kısmi olarak saflaştırılmasında önce santrifüj-süre kombinasyonunu belirlemek amacıyla üç farklı çevirme hızı (1377, 6973 ve 16873 g) ve uygulama süresi (5, 10 ve 15 dk) kombinasyonları denenmiştir. Denemeler sonrasında süpernatanttan (üstteki berrak sıvı) alınan örneklerde enzim aktivitesi ve protein miktarı analizleri gerçekleştirilmiş olup spesifik aktivite değerleri, verim, saflaştırma katsayısı değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. Santrifüj-süre kombinasyonunun *Iase*, verim artışı, protein miktarı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri

Deneme	Çevirme hızı (g)	Süre (dk)	<i>Iase</i> (U/mL)	Verim artışı (%)	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	SK
K	0	0	826.44 ^c	0.00 ^c	0.55 ^a	1507.97 ^d	1.00 ^e
1	1377	5	913.66 ^{bc}	10.55 ^{bc}	0.58 ^a	1584.86 ^{cd}	1.05 ^{de}
2	1377	10	955.57 ^{bc}	15.62 ^{bc}	0.57 ^a	1680.15 ^{bcd}	1.12 ^{bcde}
3	1377	15	1005.27 ^b	21.55 ^b	0.57 ^a	1775.15 ^{bcd}	1.17 ^{bcde}
4	6973	5	1071.05 ^{ab}	29.70 ^{ab}	0.57 ^a	1886.09 ^{abc}	1.25 ^{abc}
5	6973	10	936.08 ^{bc}	13.30 ^{bc}	0.58 ^a	1626.58 ^{bcd}	1.08 ^{cde}
6	6973	15	1052.54 ^{ab}	27.39 ^{ab}	0.57 ^a	1852.58 ^{abc}	1.23 ^{abcd}
7	16873	5	1181.18 ^a	43.02 ^a	0.56 ^a	2098.86 ^a	1.39 ^a
8	16873	10	1022.81 ^{ab}	23.74 ^{ab}	0.57 ^a	1788.99 ^{abcd}	1.18 ^{bcde}
9	16873	15	1064.23 ^{ab}	28.75 ^{ab}	0.55 ^a	1945.75 ^{ab}	1.29 ^{ab}
Ortalama			1002.88	21.36	0.57	1774.7	1.18
Std hata			0.60	0.43	0.00	12.75	0.00

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$). **SK:** Saflaştırma katsayısı, **K:** Kontrol denemesi (Çevirme hızı: = 0 g, Süre: = 0 dk) ve **Std hata:** Standart hata

Santrifüj-süre kombinasyonu denemelerine ait sonuçlar incelendiğinde maksimum *Iase*, verim artışı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla Deneme#9 (16873 g-5 dakika) ile 1181.18 ± 76.02 U/mL, $\%43.02 \pm 10.55$, 2098.86 ± 57.88 U/mg ve 1.39 ± 0.07 olarak elde edilmiş olup santrifüj-süre kombinasyonunun *Iase*,

verim artışı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Santrifüj süre kombinasyonu uygulamaları sonucunda *Iase* aktivitesi 913.66 ± 10.23 U/mL ile 1181 ± 76.02 U/mL arasında, verim artışı $\%10.55\pm0.20$ ile $\%43.02\pm10.55$ arasında, *SIase* aktivitesi 1584.86 ± 47.87 U/mg ile 2098.86 ± 57.88 U/mg arasında ve saflaştırma katsayısı ise 1.05 ± 0.01 ile 1.39 ± 0.07 arasında değişmiş olup minimum ve maksimum değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). Sonuç olarak, santrifüj-süre kombinasyonunun kısmi saflaştırma üzerinde önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiş olup en iyi kombinasyonun 16873 g-5 dakika olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu prosesin, maliyetin artışında önemli ölçüde etkili olacağı düşünülmüştür. Ancak, elde edilen *Iase*, verim artışı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerlerine göre artan proses maliyetini amorte edeceği de göz ardı edilmemelidir. Bunun yanı sıra, belirlenen santrifüj-süre kombinasyonunun fermentasyon sıvısını hücreden ayırmak amacıyla da başarıyla kullanılabileceği düşünülmektedir.

4.8.2. UF prosesi ile kısmi saflaştırma

Santrifüj-süre kombinasyonu prosesinden sonra elde edilen süpernatanttan daha konsantrte enzim solüsyonu elde etmek amacıyla UF prosesleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, çalkalamalı flask fermentasyon için iki farklı ayırma sınırına sahip membran (30 kDa ve 10 kDa) ve küçük ölçekli ve büyük ölçekli biyoreaktörlerdeki fermentasyonlar için üç farklı ayırma sınırına sahip UF membranları (50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa) kullanılmıştır. UF prosesi sonrasında permeat ve retentat toplanmıştır. Alınan örneklerde protein miktarı ve enzim aktivitesi analizleri yapılarak I/S oranı, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.23-4.26). Çalkalamalı flasktan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF prosesi öncesi *Iase*, protein miktarı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 1101.27 U/mL, 0.57 mg/mL, 1930.87 U/mg ve 1.00 olarak belirlenmiştir. 30 kDa'lık UF membranının permeat kısmından alınan örneklerde *Iase*, protein miktarı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 6.72 U/mL, 0.07 mg/mL, 98.66 U/mg ve 0.05 olarak tespit edilirken retentat kısmından alınan örneklerde ise bu değerler sırasıyla 9316.90 U/mL, 1.04 mg/mL, 8941.12 U/mg ve 4.63 olarak belirlenmiş olup değerler arasında önemli bir farklılık saptanmıştır ($P<0.05$). Benzer şekilde, 10 kDa'lık UF membranının permeat kısmından alınan örneklerde *Iase*, protein miktarı, *SIase* ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 6.58 U/mL, 0.03 mg/mL, 199.32 U/mg ve 0.10 olarak belirlenirken retentat kısmından alınan örneklerde ise bu değerler sırasıyla 12065.20 U/mL, 1.17 mg/mL, 10281.77 U/mg ve 5.33 olarak tespit edilmiş olup değerler arasında önemli bir farklılık bulunmuştur ($P<0.05$).

Diğer yandan, küçük ve büyük ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde pH kontrollü/kontROLSÜZ ve havalandırılmalı olarak gerçekleştirilen fermentasyonların ham enzim solüsyonları da UF prosesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma prosesinde Spin-X[®] UF konsantratörler kullanılmıştır (Amsterdam, Hollanda) (20 mL toplam hacim, çalışma hacmi 14 mL). UF prosesi santrifüjde gerçekleştirilmiş olup çevirme hızı 8000 g, süre 17 dakika ve sıcaklık 20°C olarak ayarlanmıştır. UF prosesi sonrasında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.24-4.26'da sunulmuştur. Buna göre, küçük ölçekli pH kontrollü ve havalandırılmalı biyoreaktörden elde edilen sıvının saflaştırılmasında maksimum *Iase* ve *Sase* aktiviteleri, protein konsantrasyonu ve *SIase*

ve *SSase* aktiviteleri 10 kDa UF kartuşu kullanıldığında elde edilmiş olup ($P<0.05$) I/S oranı 1.15 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, UF prosesi ile saflaştırıldıktan sonra protein konsantrasyonu 50 kDa membran ile 3.56 kat, 30 kDa UF membranı ile 4.43 kat ve 10 kDa membran ile 7.60 kat artırılmıştır ($P<0.05$). Saflaştırma prosesi sonrasında ise *Iase* için saflaştırma katsayısı 50 kDa'dan 10 kDa'ya doğru artmış olup 50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa ayırma sınırına sahip olan membranlar ile yapılan kısmi saflaştırma neticesinde saflaştırma katsayıları sırasıyla 1.09, 1.33 ve 1.38 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde *Sase* içinde saflaştırma katsayıları sırasıyla 1.16, 1.40 ve 1.81 olarak hesaplanmış olup *Iase* için hesaplanan verilerden yüksek olmuştur. Ancak, çalkalamalı flask fermentasyonun sıvısının saflaştırma katsayısı değerlerinden oldukça düşük çıkmıştır (Çizelge 4.23 ve 4.24).

Küçük ölçekli havalandırmalı ve pH kontrolsüz biyoreaktörden elde edilen fermente sıvısının kısmi olarak saflaştırılması neticesinde (Çizelge 4.25) maksimum *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri 10 kDa membran kartuş kullanıldığında elde edilmiş olup I/S oranı 1.26 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, ortamdaki protein konsantrasyonu saflaştırma ile birlikte 0.61 mg/mL'den 2.96-3.21 mg/mL'ye artırılmış olup (Çizelge 4.25) maksimum *SIase* aktivitesi 10 kDa UF kartuşu kullanıldığında elde edilirken maksimum *SSase* aktivitesine de 30 kDa membran kartuş kullanıldığında ulaşılmıştır (Çizelge 4.25). *Iase* için saflaştırma katsayıları 50 kDa için 1.21, 30 kDa için 1.39 ve 10 kDa için 1.46 olarak hesaplanırken *Sase* için sırasıyla 1.25, 1.45 ve 1.44 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.25).

Büyük ölçekli pH kontrollü ve havalandırmalı karıştırmalı tank biyoreaktörden elde edilen ham enzim solüsyonu UF prosesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, maksimum *Iase*, *Sase*, protein konsantrasyonu, *SIase*, *SSase* ve saflaştırma katsayısı değerleri 30 kDa UF kartuşu kullanıldığında elde edilmiş olup I/S oranı 1.46 olarak belirlenmiştir. Bununla beraber, 50 kDa membran kartuş ile saflaştırma neticesinde *Sase* aktivitesi 1.83 kat artmasına rağmen *SSase* aktivitesinde azalma tespit edilmiş olup saflaştırma katsayısı 0.89 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.26). Elde edilen sonuçlara göre örneklerin permeat kısmından alınan örneklerin enzim aktivitesi, protein miktarı, spesifik enzim aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmezken ($P>0.05$) retentat kısmından alınan örneklerin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). Bununla beraber, özellikle 10-30 kDa membran kartuşlar ile yapılan saflaştırmalarda, retentat örnekleri arasında da genel anlamda istatistiksel olarak önemli bir farklılık söz konusu değildir ($P>0.05$). Ancak bu durum, küçük ölçekli biyoreaktörde pH kontrollü ve havalandırmalı fermentasyon içi geçerli değildir ($P<0.05$) Ayrıca, UF ile kısmi saflaştırma prosesinde membranın ayırma sınırının hesaplanan enzim aktivitesi, protein miktarı, spesifik enzim aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri üzerinde de önemli ölçüde etkisinin olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Bunların göze çarpan değerleri, çalkalamalı flask ve küçük ölçekli biyoreaktörde pH kontrollü ve havalandırmalı fermentasyon için 10 kDa, küçük ölçekli biyoreaktörde pH kontrolsüz ve havalandırmalı fermentasyon ve büyük ölçekli biyoreaktörde pH kontrollü ve havalandırmalı fermentasyon 30 kDa ayırma sınırına sahip membran ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.23. Çalkalamalı flask fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri

UF	<i>Iase</i> (U/mL)	Protein (mg/mL)	<i>Slase</i> (U/mg)	<i>SK_{Iase}</i>
UF öncesi*	1101.27±1.95 ^c	0.57±0.01 ^c	1930.87±23.38 ^c	1.00±0.00 ^c
UF30P	6.72±0.19 ^d	0.07±0.00 ^d	98.66±1.54 ^d	0.05±0.00 ^d
UF30R	9316.90±194.91 ^b	1.04±0.01 ^b	8941.12±285.97 ^b	4.63±0.09 ^b
UF10P	6.58±0.56 ^d	0.03±0.00 ^d	199.32±7.84 ^d	0.10±0.00 ^d
UF10R	12065.20±29.24 ^a	1.17±0.01 ^a	10281.77±87.15 ^a	5.33±0.02 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$).

*: UF prosesi için 500 mL ham enzim solüsyonu kullanılmış olup bunun 450 mL'si permeat, 50 mL'si de retentat olarak alınmıştır.

SK: Safaştırma katsayısı, **UF:** Ultrafiltrasyon, **UF50P:** 50 kDa Permeat, **UF50R:** 50 kDa Retentat, **UF30P:** 30 kDa Permeat, **UF30R:** 30 kDa Retentat, **UF10P:** 10 kDa Permeat, **UF10R:** 10 kDa Retentat

Çizelge 4.24. Küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) havalandırmalı ve pH kontrollü fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri

UF	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>Slase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>SK_{Iase}</i>	<i>SK_{Sase}</i>
UF öncesi*	2079.20±5.63 ^d	1382.92±12.86 ^d	1.50±0.02 ^c	0.63±0.02 ^d	3304.56±117.19 ^c	2199.82±92.44 ^c	1.00±0.00 ^b	1.00±0.00 ^c
UF50R	7970.54±201.01 ^c	5665.67±18.76 ^c	1.41±0.08 ^c	2.24±0.03 ^c	3564.14±140.54 ^{bc}	2529.36±27.43 ^c	1.09±0.08 ^b	1.16±0.06 ^c
UF50P	8.67±0.24 ^e	0.29±0.05 ^e	32.8±9.29 ^a	0.10±0.00 ^e	90.81±5.12 ^d	3.11±0.60 ^d	0.03±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d
UF30R	12242.59±300.17 ^b	8544.08±21.44 ^b	1.43±0.06 ^c	2.79±0.02 ^b	4393.22±143.58 ^{ab}	3063.81±32.78 ^b	1.33±0.00 ^a	1.40±0.04 ^b
UF30P	10.43±0.24 ^e	0.58±0.10 ^e	20.39±7.63 ^{ab}	0.07±0.01 ^e	179.27±36.93 ^d	8.65±0.19 ^d	0.06±0.01 ^c	0.00±0.00 ^d
UF10R	21789.04±308.21 ^a	18964.24±144.72 ^a	1.15±0.05 ^c	4.79±0.18 ^a	4584.70±232.09 ^a	3977.63±115.29 ^a	1.38±0.02 ^a	1.81±0.02 ^a
UF10P	35.57±0.24 ^e	2.83±0.05 ^e	12.61±0.61 ^{bc}	0.11±0.00 ^e	316.76±9.02 ^d	25.11±0.11 ^d	0.10±0.01 ^c	0.01±0.00 ^d

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$).

*: Başlangıç çalışma hacmi 14 mL'dir.

Çizelge 4.25. Küçük ölçekli biyoreaktörde (5-L) havalandırmalı ve pH kontrolsüz fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri

UF	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>SK_{Iase}</i>	<i>SK_{Sase}</i>
UF öncesi*	1561.26±14.62 ^c	1252.81±38.74 ^b	1.25±0.05 ^a	0.61±0.01 ^c	2551.24±31.96 ^c	2043.33±18.53 ^b	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^b
UF50R	9882.17±102.33 ^b	8220.52±60.91 ^a	1.20±0.01 ^a	3.21±0.04 ^a	3078.57±1.72 ^b	2561.25±8.98 ^a	1.21±0.01 ^b	1.25±0.02 ^a
UF50P	5.51±0.12 ^d	0.34±0.12 ^c	34.05±25.05 ^a	0.04±0.00 ^d	141.64±2.02 ^d	8.87±3.20 ^c	0.06±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c
UF30R	10474.22±296.03 ^b	8727.29±387.39 ^a	1.22±0.18 ^a	2.96±0.03 ^b	3539.18±60.00 ^a	2958.63±164.52 ^a	1.39±0.04 ^a	1.45±0.09 ^a
UF30P	9.94±0.78 ^d	2.53±0.00 ^c	3.92±0.62 ^a	0.04±0.00 ^d	247.51±17.57 ^d	63.23±0.48 ^c	0.10±0.01 ^d	0.03±0.00 ^c
UF10R	11292.86±54.82 ^a	8931.95±51.17 ^a	1.26±0.00 ^a	3.03±0.01 ^b	3722.78±4.99 ^a	2944.45±6.52 ^a	1.46±0.02 ^a	1.44±0.01 ^a
UF10P	8.97±1.12 ^d	1.12±0.32 ^c	13.42±9.59 ^a	0.04±0.00 ^d	206.62±23.07 ^d	26.42±7.72 ^c	0.08±0.01 ^d	0.01±0.00 ^c

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$).

*: Başlangıç çalışma hacmi 14 mL'dir.

Çizelge 4.26. Büyük ölçekli biyoreaktörde (30-L) havalandırmalı ve pH kontrollü fermentasyondan elde edilen ham enzim solüsyonunun UF öncesi ve sonrasındaki aktivite değerleri

UF	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Protein (mg/mL)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SSase</i> (U/mg)	<i>SK_{Iase}</i>	<i>SK_{Sase}</i>
UF öncesi*	787.45±0.97 ^c	789.40±1.95 ^c	1.00±0.01 ^c	0.26±0.00 ^c	3056.46±3.08 ^b	3064.12±14.45 ^{bc}	1.00±0.00 ^b	1.00±0.00 ^b
UF50R	1988.12±24.36 ^b	1442.35±24.36 ^b	1.38±0.08 ^c	0.53±0.00 ^b	3766.33±67.86 ^b	2730.59±30.39 ^c	1.23±0.02 ^b	0.89±0.01 ^c
UF50P	5.26±1.07 ^d	0.63±0.02 ^d	8.10±2.76 ^{ab}	0.04±0.01 ^d	115.45±9.23 ^c	15.26±1.46 ^d	0.04±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d
UF30R	2948.07±143.75 ^a	2017.35±9.75 ^a	1.46±0.13 ^c	0.58±0.01 ^a	5093.11±324.81 ^a	3475.91±69.61 ^a	1.67±0.01 ^a	1.13±0.02 ^a
UF30P	8.48±0.73 ^d	0.78±0.10 ^d	11.11±0.09 ^a	0.03±0.00 ^d	243.35±8.27 ^c	22.18±1.65 ^d	0.08±0.00 ^c	0.01±0.00 ^d
UF10R	2689.81±38.98 ^a	1949.13±43.86 ^a	1.38±0.10 ^c	0.57±0.01 ^a	4682.74±3.3 ^a	3400.21±123.24 ^{ab}	1.53±0.00 ^a	1.11±0.03 ^a
UF10P	4.58±0.24 ^d	0.78±0.00 ^d	5.88±0.63 ^b	0.05±0.00 ^d	99.37±5.93 ^c	16.89±0.11 ^d	0.03±0.00 ^c	0.01±0.00 ^d

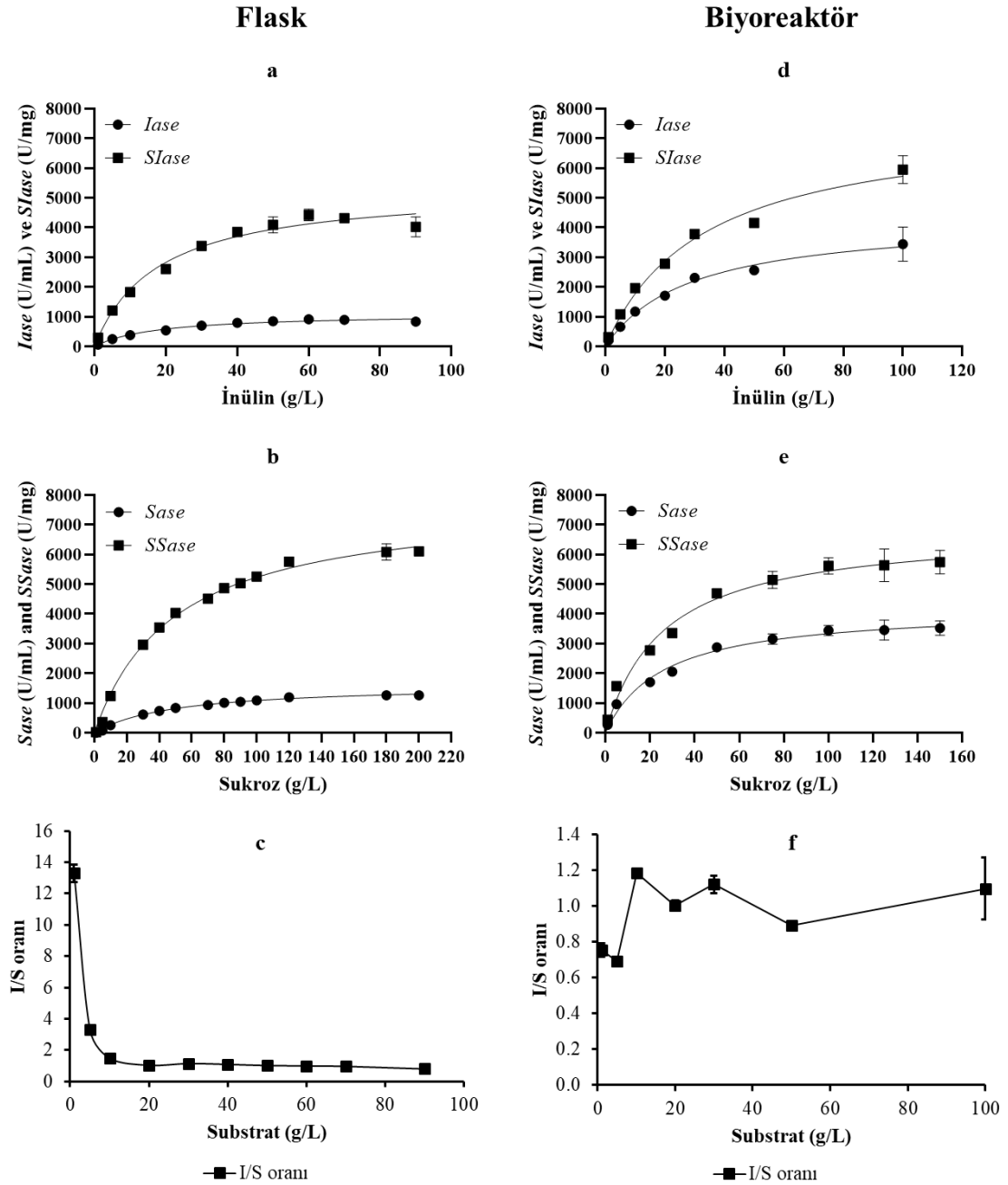
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$).

*: Başlangıç çalışma hacmi 14 mL'dir.

Ekzo-inülinaz enzimi, DEAE-selüloz üzerinde ASÇ ve IDK kullanılarak saflaştırılmıştır. Üç aktif inulinaz formunun (INI, INII ve INIII) her biri DEAE selüloz için çözülmüştür. INI'nin spesifik aktivite değeri 1915 U/mg olarak belirlenmiş olup yapılan saflaştırma tekniği ile ekzo-inülinaz enzimi 2.5 kat saflaştırılmıştır. Böylece CM selüloz kromatografisi üzerine yerleştirilmiş INI'nin %42.8'i geri kazanılmıştır. INI; INIa, INIb ve INIc'ye çözümlenmiştir. CM selüloz kromatografisi ile saflaştırılan INIa'nın spesifik aktivitesi 2479.2 U/mg olarak belirlenmiş olup saflaştırma katsayısı 3.43 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda %24.2 geri kazanım oranına ulaşılmıştır (El-souod vd. 2014). Bir başka çalışmada, *Aspergillus niger* ekzo-inülinazı ASÇ, EÇ, IDK ve JFK ile saflaştırılmış ve inüline karşı spesifik aktivite değeri 6.6 U/mg olarak belirlenirken sukroza karşı spesifik aktivite değeri 22 U/mg olarak hesaplanmıştır. Aynı proses *Aspergillus niger* endo-inülinazı için de yapılmış ve inüline karşı spesifik aktivite değeri 108 U/mg olarak tespit edilirken sukroza karşı spesifik aktivite göstermemiştir (Nakamura vd. 2001). Bir başka çalışmada da optimum besiyeri ve fermentasyon koşullarında keçiyoynuzu ekstraktından üretilen *A. niger* A42 inülinazı UF prosesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu proseste 50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa ayırma sınırlarına sahip membran filtreler kullanılmıştır. Çalışma hacmi olarak 200 mL fermentasyon sıvısı kullanılmış olup %10 retentat, %90'ı da permeat olarak alınmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda; 10 kDa ve 30 kDa membran filtreler ile yapılan kısmi saflaştırma prosesinde permeat kısmından alınan örneklerde *Iase*, *Sase* ve protein miktarı belirlenmemiştir. 50 kDa ayırma sınırına sahip membran filtre ile gerçekleştirilen kısmi saflaştırma prosesinde ise permeat kısmından alınan örnekte *Iase*, *Sase*, I/S oranı, toplam *Iase*, toplam *Sase*, toplam protein, *SIase*, *SSase* ve SK değerleri sırasıyla 188.09 U/mL, 50.67 U/mL, 3.71, 33856.12 U, 9121.41 U, 8.17 mg, 4143.08 U/mg, 1116.22 U/mg, *Iase* için SK=0.59 ve *Sase* için SK=0.17 olarak belirlenmiştir. Retentatlarda ise protein ve enzim aktivitesi tespit edilmiş olup 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa membran retentat kısmından alınan örneklerde *Iase*, *Sase*, I/S oranı, toplam *Iase*, toplam *Sase*, toplam protein, *SIase*, *SSase* ve SK değerleri sırasıyla 10 kDa için 6343.26 U/mL, 7750.30 U/mL, 0.82, 126865.13 U, 155005.98 U, 17.22 mg, 7366.35 U/mg, 9000.33 U/mg ve *Iase* için SK=1.05 ve *Sase* için SK=1.34, 30 kDa için 6278.69 U/mL, 7622.39 U/mL, 0.82, 125573.82 U, 152447.72 U, 15.12 mg, 8304.08 U/mg, 10081.23 U/mg ve *Iase* için SK=1.19 ve *Sase* için SK=1.50 50 kDa için 6133.72 U/mL, 6923.13 U/mL, 0.89, 122674.46 U, 138462.57 U, 15.04 mg, 8158.99 U/mg, 9209.05 U/mg ve *Iase* için SK=1.17 ve *Sase* için SK=1.37 olarak bulunmuştur (İlgın 2017).

4.9. Enzimin Substrat Spesifikliği ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İnülinaz enziminin substrat spesifikliği ve kinetik parametrelerinin (V_{max} ve K_m) belirlenmesi amacıyla 100 mM Na-asetat tamponunda (pH 4.8) farklı konsantrasyonlarda inülin ve sukroz hazırlanarak enzim aktivitesi analizinde substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri hem U/mL hem de U/mg olarak hesaplanmış olup sonuçlar sırasıyla Şekil 4.52'de gösterilmiştir. Flask fermentasyonun ham enzim solüsyonundan elde edilen sonuçlara göre maksimum *Iase*, *SIase*, *Sase* ve *SSase* aktivite değerleri sırasıyla 918.63 ± 28.63 U/mL, 4424.61 ± 138.01 U/mg, 1266.56 ± 12.86 U/mL ve 6100.38 ± 61.96 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.52a ve b). Havalandırmalı ve pH kontrolsüz biyoreaktörün solüsyonundan elde edilen maksimum sonuçlar ise sırasıyla 3442.67 ± 407.86 U/mL, 5616.10 ± 665.35 U/mg, 3521.61 ± 171.04 U/mL ve 5744.88 ± 279.02 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 4.52d ve e).



Şekil 4.52. Substrat olarak inülin kullanıldığında *Iase* ve *SIase* aktivitelerindeki değişim (a ve c), substrat olarak sukroz kullanıldığında *Iase* ve *SIase* aktivitelerindeki değişim (b ve e) ve I/S oranının değişimi (c ve f)

Farklı substrat konsantrasyonlarına karşılık belirlenen aktivite değerleri kullanılarak kinetik parametreler (V_{max} ve K_m) hesaplanmıştır (Çizelge 4.27). Kinetik parametrelerin hesaplanmasında Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee ve Hanes-Woolf hız denklemleri (Eşitlik 4.2-4.4) ile GraphPad Prism 7 programı kullanılmıştır.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4.2)$$

$$V = -K_m \times \frac{V}{S} + V_{max} \quad (4.3)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \times S \quad (4.4)$$

Burada,

V = Enzimatik reaksiyonun başlangıç hızı (U/mL veya U/mg)

S = Substrat konsantrasyonu (g/L)

V_{max} = Substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla deney koşullarında ulaşılabilen maksimum hız değeri (U/mL ve U/mg)

K_m = Michaelis-Menten sabiti veya maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) erişilmesini sağlayan substrat konsantrasyonu (g/L); K_m değeri, substratın enzime bağlanma ilgisinin bir ölçüsü olup bu değer küçük ise substrata yüksek bir ilgi vardır, diğer bir deyişle maksimum hıza (V_{max}) daha çabuk ulaşılır.

Flask ile ilgili kinetik veriler incelendiğinde minimum K_m değerleri substrat olarak inülinin kullanıldığı deneme de elde edilmiştir. Lineweaver-Burk hız eşitliği (Eşitlik 4.2) ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 16.13 ± 1.43 g/L ve 1055.56 ± 55.56 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden 16.00 ± 0.50 g/L ve 5000 ± 0.00 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 53.00 ± 2.83 g/L ve 1666.67 ± 0.00 U/mL olarak belirlenirken $SSase$ aktivitesi üzerinden 66.50 ± 3.50 g/L ve 10000 ± 0.00 U/mg olarak tespit edilmiştir. Eadie-Hofstee hız eşitliği (Eşitlik 4.3) ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 17.04 ± 0.50 g/L ve 1091.50 ± 2.60 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden 17.04 ± 0.50 g/L ve 5257.10 ± 12.50 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 45.51 ± 3.10 g/L ve 1578.30 ± 38.40 U/mL olarak belirlenirken $SSase$ aktivitesi üzerinden 45.51 ± 3.10 g/L ve 7601.85 ± 184.95 U/mg olarak tespit edilmiştir. Diğer bir hız eşitliği olan Hanes-Woolf (Eşitlik 4.4) ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 15.51 ± 1.61 g/L ve 1055.56 ± 55.56 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden 15.25 ± 0.75 g/L ve 5000 ± 0.00 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 44.20 ± 5.63 g/L ve 1547.62 ± 119.05 U/mL olarak tespit edilirken $SSase$ aktivitesi üzerinden 59.00 ± 3.00 g/L ve 10000 ± 0.00 U/mg olarak belirlenmiştir. Öte yandan, GraphPad Prism 7 programı kullanılarak da kinetik parametreler hesaplanmış olup substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden K_m ve V_{max} değerleri 17.79 ± 4.79 g/L ve 1110 ± 92.0 U/mL olarak belirlenirken $SIase$ aktivitesi üzerinden V_{max} değeri 5345 ± 442.5 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 49.43 ± 5.89 g/L ve 1623 ± 70.0 U/mL olarak hesaplanırken $SSase$ aktivitesi üzerinden V_{max} değeri 7817 ± 337.0 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Sonuç olarak, GraphPad Prism 7 programı ile elde edilen kinetik parametre değerlerine en yakın değerler, Eadie-Hofstee hız eşitliği (Eşitlik 4.3) ile belirlenmiştir. Diğer bir sonuç olarak da inülinaz enziminin substrat olarak kullanılan inüline düşük K_m değerleri nedeniyle sukrozdan daha çok affinite gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.27. İnülin ve sukroza ait V_{max} ve K_m değerleri

Hız denklemi	Kinetik parametreler	Flask ^a		Biyoreaktör ^b	
		İnülin	Sukroz	İnülin	Sukroz
Lineweaver-Burk	V_{max} (U/mL)	1055.56±55.56	1666.67±0.00	2916.67±416.67	3333.33±0.00
	K_m (g/L)	16.13±1.43	53.00±2.83	13.79±3.54	11.33±0.67
	R^2	0.9996	0.9881	0.9943	0.9968
	V_{max} (U/mg)	5000±0.00	10000±0.00	5000±0.00	5000±0.00
	K_m (g/L)	16.00±0.50	66.50±3.50	14.25±1.75	10.50±0.50
	R^2	0.9996	0.9881	0.9943	0.9968
Eadie-Hofstee	V_{max} (U/mL)	1091.50±2.60	1578.30±38.40	3632.10±425.9	3558.20±136.7
	K_m (g/L)	17.04±0.50	45.51±3.10	19.07±3.95	13.20±0.22
	R^2	0.9459	0.9492	0.8836	0.8858
	V_{max} (U/mg)	5257.10±12.50	7601.85±184.95	5925.05±694.75	5804.33±223.28
	K_m (g/L)	17.04±0.50	45.51±3.10	19.07±3.95	13.20±0.22
	R^2	0.9459	0.9492	0.88355	0.88575
Hanes-Woolf	V_{max} (U/mL)	1055.56±55.56	1547.62±119.05	4166.67±833.33	4166.67±833.33
	K_m (g/L)	15.51±1.61	44.20±5.63	25.92±7.58	21.17±4.83
	R^2	0.9760	0.9952	0.9774	0.9911
	V_{max} (U/mg)	5000±0.00	10000±0.00	7500±2500	7500±2500
	K_m (g/L)	15.25±0.75	59.00±3.00	29.00±12.00	23.50±8.50
	R^2	0.976	0.9952	0.9774	0.9911
GraphPad Prism 7	V_{max} (U/mL)	1110±92.0	1623±70.0	4321±660.5	4202±356.5
	K_m (g/L)	17.79±4.79	49.43±5.89	28.77±10.83	25.95±7.76
	R^2	0.9731	0.9939	0.9704	0.9744
	V_{max} (U/mg)	5345±442.5	7817±337.0	7624±1020	6854±581.5
	K_m (g/L)	17.79±4.79	49.43±5.89	33.05±10.37	25.95±7.76
	R^2	0.9731	0.9939	0.9807	0.9744

^aBölüm 4.1'de çalkalamalı flask fermentasyon ile melastan elde edilen ham enzim solüsyonu kullanılmıştır.^bHavalandırılmalı ve pH kontrolsüz biyoreaktörden elde edilen fermentasyon sıvısı kullanılmıştır.

Havalandırılmalı ve pH kontrolsüz biyoreaktörün fermentasyon sıvısından elde edilen veriler incelendiğinde flasktan elde edilen sonuçların aksine minimum K_m değerleri substrat olarak sukrozun kullanıldığı denemede elde edilmiştir. Lineweaver-Burk hız eşitliği (Eşitlik 4.2) ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 13.79 ± 3.54 g/L ve 2916.67 ± 416.67 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden 14.25 ± 1.75 g/L ve 5000 ± 0.00 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 11.33 ± 0.67 g/L ve 3333.33 ± 0.00 U/mL olarak belirlenirken $SSase$ aktivitesi üzerinden 10.50 ± 0.50 g/L ve 5000 ± 0.00 U/mg olarak tespit edilmiştir. Eadie-Hofstee hız eşitliği (Eşitlik 4.3) ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 19.07 ± 3.95 g/L ve 3632.10 ± 425.9 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden V_{max} değeri 5925.05 ± 694.75 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 13.20 ± 0.22 g/L ve 3558.20 ± 136.7 U/mL olarak belirlenirken $SSase$ aktivitesi üzerinden V_{max} değeri 5804.33 ± 223.28 U/mg olarak tespit edilmiştir. Hanes-Woolf (Eşitlik 4.4) hız denklemi ile K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden 25.92 g/L ve 4166.67 U/mL olarak hesaplanırken $SIase$ aktivitesi üzerinden 29.00 g/L ve 7500 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden bu değerler sırasıyla 21.17 g/L ve 4166.67 U/mL olarak tespit edilirken $SSase$ aktivitesi üzerinden 23.50 g/L ve 7500 U/mg olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, GraphPad Prism 7 programı kullanılarak da kinetik parametreler hesaplanmış olup substrat olarak inülin kullanıldığında $Iase$ aktivitesi üzerinden K_m ve V_{max} değerleri 28.77 g/L ve 4321 U/mL olarak belirlenirken $SIase$ aktivitesi üzerinden bu değerler sırasıyla 33.05 g/L ve 7624 U/mg olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise K_m ve V_{max} değerleri $Sase$ aktivitesi üzerinden 25.95 g/L ve 4202 U/mL olarak hesaplanırken $SSase$ aktivitesi üzerinden V_{max} değeri 6854 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Sonuç olarak, GraphPad Prism 7 programı ile elde edilen kinetik parametre değerlerine en yakın değerler Hanes-Woolf hız eşitliği (Eşitlik 4.4) ile belirlenmiştir. Diğer bir sonuç olarak da inülinaz enziminin substrat olarak kullanılan sukroza düşük K_m değerleri nedeniyle inülinde daha çok affinite (ilgi) gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin yüksek enzim aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Yani inülinaz enzimi düşük enzim aktivitesinde inüline daha çok ilgi gösterirken yüksek enzim aktivitesinden sukroza daha çok ilgi gösterdiği sonucuna varılabilir.

Diğer yandan, kinetik parametrelerin belirlenmesinde kullanılan inülin ve sukrozun ortak konsantrasyonlarından elde edilen $Iase$ ve $Sase$ aktivite değerlerinin birbirine oranı ile I/S oranının nasıl değiştiği de belirlenmiştir (Şekil 4.52c ve f). Elde edilen sonuçlara göre minimum ve maksimum I/S oranları sırasıyla flask için 0.80 ± 0.03 ve 13.31 ± 0.55 , biyoreaktör için ise sırasıyla 0.69 ± 0.01 ve 1.18 ± 0.01 olarak belirlenmiş olup aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Flask için I/S oranının 1 g/L substrat konsantrasyonundan 90 g/L substrat konsantrasyonuna doğru azaldığı belirlenmiş olup 10 g/L ile 70 g/L substrat konsantrasyonları arasında belirlenen I/S oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). Bununla beraber, hem flask hem de biyoreaktör için 1 g/L ile 10 g/L substrat konsantrasyonları arasında belirlenen I/S oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Flask ile ilgili düşük substrat konsantrasyonlarında yüksek I/S oranının hesaplanmasının nedeni olarak düşük enzim aktivitesi değerlerinde

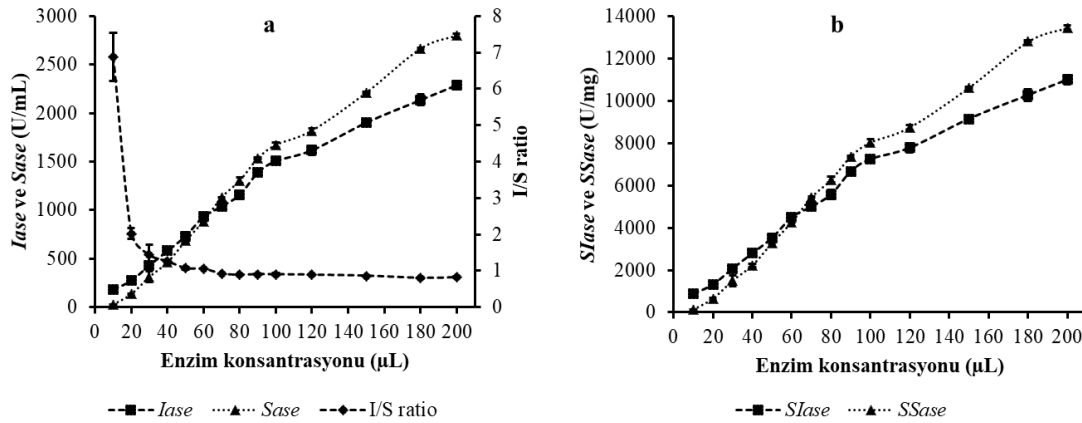
enzimin substrat olarak kullanılan inüline daha yüksek affinite (ilgi) göstermesinden kaynaklanmaktadır (Çizelge 4.27).

Yapılan bir çalışmada inülinaz izoformalarının (Ekzo-I ve Ekzo-II) inülin, laktoz, sukroz ve rafinoz üzerinde substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Ekzo-I tarafından gösterilen substrat spesifikliğinin sırası, inülin > sukroz > laktoz > rafinoz iken, Ekzo-II için inülin > laktoz > sukroz > rafinoz olmuştur. Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak, inülin için Ekzo-I ve Ekzo-II'nin K_m değerleri sırasıyla 5.2 mM ve 4.34 mM olarak hesaplanırken V_{max} değerleri de 19.49 mM/min.mg ve 31.25 mM/min.mg olarak hesaplanmıştır. Sukroz için K_m değerleri de sırasıyla 71.42 mM ve 55.55 mM olarak hesaplanırken V_{max} değerleri de 3.62 mM/min.mg ve 1.81 mM/min.mg olarak hesaplanmıştır (Singh ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada 3 ekzo-inülinaz (Ekzo-I, Ekzo-II ve Ekzo-III) ve 2 endo-inülinaz (Endo-I ve Endo-II), ASÇ, DEAE-selüloz kolon kromatografi, Sephaloz-CL-6B kolon kromatografi ve P-PAGE ile *A. ficuum*'un fermentasyon sıvısından saflaştırılmıştır. Substrat olarak inülin kullanıldığında K_m değerleri sırasıyla 43.1 mg/mL, 31.5 mg/mL, 25.3 mg/mL, 14.8 mg/mL, ve 25.6 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber V_{max} değerleri de sırasıyla 32.7 mg/mL.dk, 217 mg/mL.dk, 46.3 mg/mL.dk, 40.8 mg/mL.dk, and 53.8 mg/mL.dk olarak belirlenmiştir (Chen vd. 2009). Substrat spesifikliğı, enzimlerin önemli bir özelliğidir. Bununla birlikte tüm enzimler, enzim ve substrat arasındaki enzimin, kaynağın ve kimyasal reaksiyonun tipine bağlı olan tek bir substrat üzerinde etkili değildir. Bu nedenle, enzimin substrat spesifitesinin oldukça değışken bir özellik olduğu öne sürülebilir. Geniş substrat spesifikliğı sergileyen bir enzim, aktif bölgeleri ve çevredeki değışim ile gelişme kabiliyeti sayesinde yüksek derecede esnekliğe sahip olduğunun kanıtıdır (Singh ve ark., 2018). Yapılan bu çalışmada da inülinaz için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri nedeniyle *A. niger* A42 inülinazının kinetik değerlerinin literatürdeki verilerden farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *A. ficuum*'dan elde edilen inülinazların K_m değerlerine kıyasla (Chen ve ark., 2009) *A. niger* A42'den elde edilen inülinazın daha düşük K_m değerine sahip olması, onun katalitik etkinliğini ve seçiciliğini ortaya koymaktadır.

4.10. Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi

Enzim miktarının (10-200 µL) *Iase*, *Sase*, *SIase* ve *SSase* aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup sonuçlar Şekil 4.53'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 10-100 µL arasındaki enzim miktarları substrat (inülin ve sukroz) üzerine eklendiğinde aktivite değerlerinin enzim miktarının artması ile birlikte doğrusal olarak arttığını göstermiştir. 120-200 µL arasındaki enzim miktarları substrat üzerine eklendiğinde ise aktivite değerlerinde azalan oranda ve doğrusal olarak artış sağlanmıştır.

Kullanılan enzim solüsyonunun protein içeriğı 0.208±0.05 mg/mL olarak belirlenmiştir. Maksimum *Iase*, *Sase*, *SIase* ve *SSase* aktivite değerlerine substrat üzerine 200 µL enzim solüsyonu eklenen analizden ulaşılmış olup sırasıyla bu değerler 2286.35±42.88 U/mL, 2798.00±22.42 U/mL, 10992.07±206.16 U/mg ve 13451.93±107.77 U/mg olarak belirlenmiştir. Bunların minimum değerleri ise substrat üzerine 10 µL enzim solüsyonu eklenerek gerçekleştirilen analizden belirlenmiş olup bu değerler sırasıyla 180.29±10.72 U/mL, 26.31±0.97 U/mL, 866.79±51.54 U/mg ve 126.49±4.69 U/mg olmuştur (Şekil 4.53a ve b).



Şekil 4.53. Enzim miktarının *Iase*, *Sase* ve *I/S* oranı üzerine etkisi (a) ve enzim konsantrasyonunun *SIase* ve *SSase* aktivitesi üzerine etkisi (b)

Enzim miktarına bağlı olarak elde edilen tüm aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P < 0.05$). Ayrıca *Iase* ve *Sase* aktivite değerlerinde enzim miktarının artması ile birlikte sırasıyla 12.68 kat ve 106.35 kat artış sağlanmış olup aynı artışlar sırasıyla *SIase* ve *SSase* aktiviteleri için de elde edilmiştir ($P < 0.05$). Öte yandan, değişen enzim miktarı ile birlikte *I/S* oranının da nasıl değiştiği incelenmiş olup sonuçlar Şekil 4.53a'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde maksimum *I/S* oranı (6.88 ± 0.66) substrat üzerine 10 µL enzim eklendiğinde hesaplanmıştır ($P < 0.05$). Minimum *I/S* oranı ise substrat üzerine 180 µL enzim solüsyonu eklendiğinde 0.80 ± 0.02 olarak belirlenmiştir ($P > 0.05$). Çünkü substrat üzerine 70 µL enzim solüsyonu ile gerçekleştirilen analizden sonra yapılan analizlerin sonucunda *Iase* ve *Sase* aktivitelerinin değerleri arasındaki makasın arttığı gözlemlenmiş olup maksimum farkın substrat üzerine 180 µL enzim solüsyonu eklenerek gerçekleştirilen analizden elde edildiği belirlenmiştir. Dolayısıyla *I/S* oranı bu noktada minimum olmuştur. Genel bir değerlendirme yapılacak olursa substrat üzerine eklenen enzim konsantrasyonunun artmasıyla birlikte aktivite değerlerinde artışın olduğu, *I/S* oranında ise belirli bir konsantrasyon seviyesine kadar azalma olduğu, sonrasında ise *I/S* oranının nispeten sabit kaldığı tespit edilmiştir.

4.11. Farklı Reaktiflerin Aktivite Üzerine Etkisi

Enzim solüsyonu içerisinde farklı reaktiflerin bulunması durumunda aktivitedeki değişimin belirlenmesi amacıyla 100 mM Na-asetat tamponunda hazırlanan 1 mM metal iyonları (Li^+ , Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} ve Cu^{2+}) ile 50°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim aktivitesi analizi yapılmış olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.28'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, yalnızca Mn^{2+} 'nin aktiviteyi %4.07 oranında artırdığı tespit edilmiş olup elde edilen aktivite değeri ile kontrol örneğinden elde edilen aktivite değeri arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Diğer yandan Li^+ , Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} ve Co^{2+} 'nin enzimin aktivite değerini nispeten azalttığı tespit edilmiş olup %90'ın üzerinde aktivite değerleri elde edilmiştir ($P > 0.05$). Öte yandan, Ag^+ ve Cu^{2+} 'nin enzimin aktivite değerini sırasıyla %82.51 ve %44.47 oranında azalttığı tespit edilmiş

olup diğer reaktiflerin eklenmesiyle elde edilen aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmiştir ($P<0.05$). Bununla beraber, Ag^+ ve Cu^{2+} 'nın *Iase* enziminin inhibitörleri olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca farklı reaktiflerin kullanılmasıyla istatistiksel olarak önemli veya önemsiz derecede enzimin aktivite göstermiş olması, *Iase* enziminin farklı koşullarda çalışabileceğini göstermiştir. Metal iyonları, enzime yönelik stabilizatör/aktivatör veya inhibitör görevi görür. Bunlar enzim ko-faktörü olarak yeterlidir ve enzim-substrat kompleksi yakınlığını veya asit-baz katalizini indükleyerek enzim-katalizli reaksiyonu hızlandırır.

Çizelge 4.28. Farklı reaktiflerin aktivite üzerine etkisi

Reaktif	Nisbi aktivite (%)
Kontrol	100.00 ^{ab} ±0.00
Li^+	96.08 ^{bc} ±0.08
Sr^{2+}	92.12 ^c ±1.99
Na^+	93.81 ^{bc} ±1.81
K^+	95.22 ^{bc} ±2.78
Ca^{2+}	92.54 ^c ±0.99
Ba^{2+}	94.52 ^{bc} ±2.41
Ag^+	17.49 ^e ±0.05
Fe^{3+}	95.18 ^{bc} ±2.85
Zn^{2+}	97.12 ^{bc} ±1.79
Mn^{2+}	104.07 ^a ±2.18
Al^{3+}	96.63 ^{bc} ±0.41
Co^{2+}	97.55 ^{bc} ±3.88
Cu^{2+}	55.53 ^d ±1.14

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Yapılan bir çalışmada, Ag^+ , Hg^{2+} , Ba^{2+} ve Cu^{2+} , *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının aktivitesi üzerinde uyarıcı etki gösterirken Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve EDTA ise enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir (Singh ve ark., 2018). Diğer yandan, *A. ficuum* inülinazının aktivitesinin Ag^+ tarafından tamamen inhibe edildiği, Fe^{2+} ve Al^{3+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği ve K^+ , Ca^{2+} , Li^{2+} , EDTA ve ürenin ise inülinaz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2009). Öngen-Baysal vd. (1994), Ag^+ ve Hg^{2+} metal iyonlarının *A. niger* A42 (ATCC 204447) inülinazının aktivitesini tamamen inhibe ettiğini, Na^+ 'nın ise aktivite üzerinde ise aktivatör etkisinin olduğunu tespit etmiştir. Öte yandan, -SH gruplarını etkilediği bilinen Hg^{2+} , *Streptomyces* sp. inülinazının aktivitesini tamamen ortadan kaldırmıştır. Hg^{2+} ile gözlemlenen güçlü inhibitör etki, protein içindeki bazı -SH grubunun aktivite için önemli olabileceği öne sürülmüştür. Sadece CoCl_2 'nin inülinaz aktivitesini uyardığı, AgNO_3 ve CaNO_3 'ün ise inhibe edici etkisinin marjinal olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enzim aktivitesinin EDTA tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği de bildirilmiştir (Sharma ve Gill 2007).

4.12. E_a , A , Q_{10} -Değeri, Termal İnaktivasyon ve Termodinamik Parametreler

Aktivasyon enerjisi (E_a), inaktivasyon enerjisi (E_{ia}), frekans faktörü (A), Q_{10} -değeri, termal inaktivasyon ve termodinamik parametrelerin hesaplanmasında, Bölüm

4.1'de karbon kaynağı olarak seçilen melastan elde edilen ham enzim solüsyonu kullanılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (30-80°C) enzim analizleri gerçekleştirilerek I_{ase} ve S_{ase} için reaksiyon hızları belirlenmiş olup sıcaklık birimleri (T , °C), Kelvin (K) birimlerine çevrilmiş ve bunların resiprokalları ($1/T$, K^{-1}) hesaplanmıştır. Elde edilen V_{Iase} ve V_{Sase} değerleri, $\ln(V_{Iase})$ ve $\ln(V_{Sase})$ değerlerine dönüştürülmüştür (Çizelge 4.29). Daha sonra $1/T$ (K^{-1}) değerlerine karşı $\ln(V_{Iase})$ ve $\ln(V_{Sase})$ değerlerinin grafiği çizilerek negatif eğimli (Şekil 4.54a) ve pozitif eğimli (Şekil 4.54b) doğrular elde edilmiştir.

Çizelge 4.29. Birinci derece kinetik modele uygun enzimatik reaksiyonun sonuçları

T (°C)	V_{Iase} ($\mu\text{mol/mLdk}$)	V_{Sase} ($\mu\text{mol/mLdk}$)	T (K)	$1/T$ (K^{-1})	$\ln(V_{Iase})$	$\ln(V_{Sase})$
30	157.39 ^e ±1.46	100.38 ^e ±0.97	303	0.0033	5.059±0.009	4.609±0.010
40	255.82 ^d ±1.46	211.48 ^d ±6.82	313	0.0032	5.544±0.006	5.354±0.032
50	440.51 ^b ±6.82	341.10 ^b ±6.82	323	0.0031	6.088±0.015	5.832±0.020
60	575.97 ^a ±5.85	492.65 ^a ±2.44	333	0.0030	6.356±0.010	6.200±0.005
70	419.55 ^c ±27.78	300.17 ^c ±20.47	343	0.0029	6.005±0.034	5.702±0.068
80	136.44 ^f ±0.97	48.73 ^f ±1.95	353	0.0028	4.919±0.004	3.885±0.040

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Şekil 4.54a'daki doğru denklemlerinde de görüldüğü gibi doğruların eğimleri sırasıyla -4486.1 K ve -5319.0 K olarak belirlenmiş olup aktivasyon enerjileri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

I_{ase} için aktivasyon enerjisi (E_{aIase});

$$\begin{aligned} \text{Eğim} &= -E_{aIase}/R \\ -4486.1 \text{ K} &= -E_{aIase}/8.314 \text{ (J/molK)} \end{aligned}$$

$$E_{aIase} = 37297.44 \text{ (J/molK)}$$

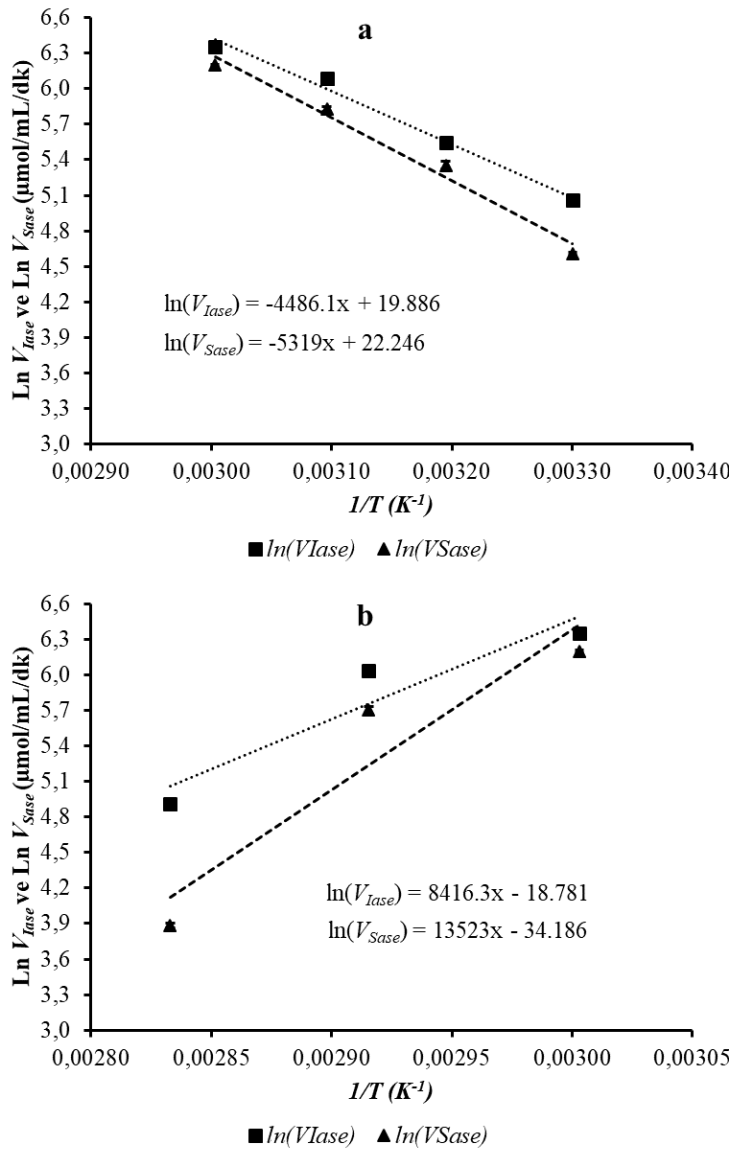
$$E_{aIase} \approx 37.30 \pm 0.58 \text{ kJ/mol}$$

S_{ase} için aktivasyon enerjisi (E_{aSase});

$$\begin{aligned} \text{Eğim} &= -E_{aSase}/R \\ -5319 \text{ K} &= -E_{aSase}/8.314 \text{ (J/molK)} \end{aligned}$$

$$E_{aSase} = 44222.17 \text{ (J/molK)}$$

$$E_{aSase} \approx 44.22 \pm 0.45 \text{ kJ/mol}$$



Şekil 4.54. Birinci derece kinetik model enzimatik reaksiyonların Arrhenius grafiği (a: Aktivasyon enerjisi (E_a), b: İnaktivasyon enerjisi (E_{ia}))

Aktivasyon enerjisi, gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sırasında substratın ürüne dönüşebilmesi için aşılması gereken en düşük enerji bariyeridir. Gerçekleşen reaksiyon da substrat önce maksimum noktaya ulaşarak geçiş kompleksi niteliği kazanmalıdır. Bu noktada, substrattaki mevcut bağlar zayıflayıp yeni bağların oluşmasını sağlamaktadır. Reaksiyonda geçiş kompleksi oluşumunu sağlayan enerji, aktivasyon enerjisi olarak adlandırılmaktadır (Cemeroğlu, 2015). Bu çalışmadan elde edilen aktivasyon enerjileri incelendiğinde E_{aIase} değerinin E_{aSase} değerinden düşük olduğu tespit edilmiş olup aktivasyon enerjisi yüksek olan Sase aktivitesinin reaksiyon hızının yavaş olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla Iase aktivitesinin substrat olarak inülinde gösterdiği reaksiyon hızının Sase aktivitesinin substrat olarak sukrozda gösterdiği reaksiyon hızından yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber, enzimatik bir reaksiyonda "enzim-substrat reaksiyonu" (aktivasyon) ve "enzim denatürasyon

reaksiyonu" (inaktivasyon) aynı anda gerçekleşmektedir. Enzim inaktivasyonunun ısı etkisiyle olmasının nedeni, enzimin protein yapıda olmasıdır. Enzim kinetiğinde, enzim-substrat reaksiyonu ile enzim denatürasyon reaksiyonundaki aktivasyon enerji seviyelerinin birbirinden oldukça farklıdır. Nitekim enzim-substrat reaksiyonunun aktivasyon enerjisi (E_a), enzim denatürasyon reaksiyonunun aktivasyon (inaktivasyon) enerjisinden (E_{ia}) daima düşüktür (Cemeroğlu, 2015). Yapılan bu çalışmada da *Iase* ve *Sase* için inaktivasyon enerji değerleri de hesaplanmış olup hesaplamalarda Çizelge 4.29'daki değerler kullanılmış ve $1/T$ (K^{-1}) değerlerine karşı $\ln(V_{Iase})$ ve $\ln(V_{Sase})$ değerlerinin grafiği çizilmiştir (Şekil 4.54b). Elde edilen sonuçlara göre *Iase* için inaktivasyon enerjisi (E_{ia}) 112.86 ± 7.40 kJ/mol olarak hesaplanırken *Sase* için E_{ia} değeri 182.87 ± 10.90 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi hem *Iase* hem de *Sase*'in inaktivasyon enerji değerleri aktivasyon enerji değerlerinden oldukça yüksektir. *Iase* için E_{ia} değeri E_a değerinden 3.03 kat, *Sase* için E_{ia} değeri E_a değerinden 4.14 kat daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Diğer yandan, Şekil 4.54a'daki doğru denklemlerinin y-kesen noktaları ile frekans faktörleri (A) de hesaplanmıştır. y-kesen noktası $\ln(A)$ değerine eşit olduğundan $\ln(A_{Iase})$ ve $\ln(A_{Sase})$ değerleri sırasıyla 19.886 ve 22.246 olarak Şekil 4.54'teki denklemlerden belirlenmiştir. Buna göre E_a ile ilgili *Iase* ve *Sase* için frekans faktörleri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Iase için frekans faktörü (A_{Iase});

$$\ln(A_{Iase}) = 19.886$$

$$A_{Iase} = e^{19.886}$$

$$A_{Iase} = 4.3 \times 10^8 \mu\text{mol/mL.dk}$$

Sase için frekans faktörü (A_{Sase});

$$\ln(A_{Sase}) = 22.246$$

$$A_{Sase} = e^{22.246}$$

$$A_{Sase} = 4.6 \times 10^9 \mu\text{mol/mL.dk}$$

Benzer hesaplamalar Şekil 54b'deki y-kesen noktalarından (*Iase* ve *Sase* için sırasıyla 18.781 ve 34.186) da yapılmış olup E_{ia} ile ilgili *Iase* ve *Sase* için frekans faktörleri sırasıyla $1.43 \times 10^8 \mu\text{mol/mL.dk}$ ve $7.03 \times 10^{14} \mu\text{mol/mL.dk}$ olarak hesaplanmıştır. Frekans faktörü (A), substratın birim zamanda aktivasyon bariyerine yaklaşma sayısıdır. Bu çalışmadan *Iase* ve *Sase*'nin aktivasyon enerjisi ile ilgili elde edilen A_{Iase} ve A_{Sase} değerleri sırasıyla $4.3 \times 10^8 \mu\text{mol/mLdk}$ ve $4.6 \times 10^9 \mu\text{mol/mLdk}$ olarak belirlenirken inaktivasyon enerjisi ile ilgili bu değerler sırasıyla $1.43 \times 10^8 \mu\text{mol/mL.dk}$ ve $7.03 \times 10^{14} \mu\text{mol/mL.dk}$ olarak tespit edilmiştir. Bu değerler ile substrat olarak kullanılan inülin ve sukrozun sırasıyla $4.3 \times 10^8 \mu\text{mol/mL.dk}$ ve $4.6 \times 10^9 \mu\text{mol/mL.dk}$ ile enerji engelini aşmak için aktivasyon enerjisinin olduğu noktaya doğru yaklaşmış olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, inülin ve sukrozun sırasıyla $1.43 \times 10^8 \mu\text{mol/mL.dk}$ ve $7.03 \times 10^{14} \mu\text{mol/mL.dk}$ ile enerji engelini aşmak için inaktivasyon enerjisinin olduğu noktaya doğru yaklaştığı anlaşılmaktadır. Elde edilen veriler ışığında,

Iase ve *Sase*'nin aktivasyon ve inaktivasyon enerjileri ile ilgili Arrhenius denklemleri (Eşitlik 4.7-4.10) aşağıdaki gibidir.

Aktivasyon enerjisi için;

$$V_{Iase} = 4.3 \times 10^8 \times e^{-\frac{37297.44}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.7)$$

$$V_{Sase} = 4.6 \times 10^9 \times e^{-\frac{44222.17}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.8)$$

İnaktivasyon enerjisi için;

$$V_{Iase} = 1.43 \times 10^8 \times e^{-\frac{11286}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.9)$$

$$V_{Sase} = 7.03 \times 10^{14} \times e^{-\frac{18287}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.10)$$

Q_{10} -değeri, reaksiyon hızının sıcaklığa bağımlılığını tanımlamada kullanılan bir katsayıdır. Ayrıca Q_{10} -değeri, bir reaksiyonda sıcaklığın 10°C artması ile reaksiyon hızının kaç kat artacağını ifade eden boyutsuz bir büyüklüktür (Cemeroğlu, 2015). Buna göre, Q_{10} -değerleri, Eşitlik 3.9 kullanılarak hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.30'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Iase* aktivitesinin en yüksek Q_{10} -değeri (1.72±0.02) sıcaklık aralığı 40-50°C olduğunda elde edilirken *Sase* aktivitesinin (2.11±0.05) ise 30-40°C aralığında elde edilmiştir ($P<0.05$). Bu sıcaklık aralıklarından sonra Q_{10} -değerleri azalmaya başlamıştır. Q_{10} -değerinin 1'den küçük olduğu sıcaklık aralıklarında (60-70°C) ise enzim, sıcaklık etkisi ile denatüre olmaktadır. Dolayısıyla bu, reaksiyon hızının daha fazla artmayacağını gösterir. Özellikle hem *Iase* hem de *Sase* için 60°C sıcaklıktan sonra Q_{10} -değerlerinin 1'in altına düştüğü tespit edilmiş olup en düşük Q_{10} -değerleri (sırasıyla 0.33±0.02 ve 0.16±0.02) 70-80°C sıcaklık aralığında hesaplanmıştır.

Çizelge 4.30. Sıcaklığın 10°C artmasıyla *Iase* ve *Sase*'nin Q_{10} -değerlerinin değişimi

T (°C)	Q_{10} -değeri	
	<i>Iase</i>	<i>Sase</i>
30-40	1.63 ^b ±0.02	2.11 ^a ±0.05
40-50	1.72 ^a ±0.02	1.61 ^b ±0.02
50-60	1.31 ^c ±0.01	1.45 ^c ±0.04
60-70	0.73 ^d ±0.04	0.61 ^d ±0.04
70-80	0.33 ^e ±0.02	0.16 ^e ±0.02

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Yapılan bir çalışmada, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinaz enzimi izoformları (Ekzo-I ve Ekzo-II) için aktivasyon enerjisi 37.65 kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Singh vd. 2018). Bu sonuç, bu çalışmadan elde edilen sonuç (37.30 kJ/mol) ile neredeyse aynı olmuştur. Diğer yandan, modifiye edilmemiş ve kimyasal olarak modifiye edilmiş (Pridoksal-5'-fosfat ve askorbat sırasıyla modifiye edici indirgeyici ajanlar olarak kullanılmıştır) inülinaz enzimlerinin aktivasyon enerjileri sırasıyla 24.19 kJ/mol ve 39.98 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Kimyasal olarak modifiye edilen inülinazın aktivasyon enerjisi bu çalışmadan elde edilen aktivasyon enerjisinden

daha yüksek hesaplanmıştır. Bu da *A. niger* inülinazının gerektirdiği enerjiden daha yüksek olduğunu gösterir (Torabizadeh vd. 2011). Bununla beraber, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinaz enzimi izoformlarının Q_{10} -değerleri de hesaplanmıştır. 45-50°C ve 50-55°C sıcaklık aralıklarındaki Q_{10} -değerleri sırasıyla 1.56 ve 1.30 olarak belirlenmiştir. 55°C'nin ötesinde, Q_{10} -değerinin 1'in altına (0.73) düştüğü belirlenmiş olup bu da 55°C'nin üzerine sıcaklık artışının reaksiyon hızını daha fazla artırmayacağını göstermiştir (Singh vd. 2018).

Öte yandan, *Iase* ve *Sase*'nin 70°C ve 80°C'de inaktivasyon hız sabiti (k_d), yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), D-değeri, entalpi (ΔH), serbest enerji (ΔG) ve entropi (ΔS) değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.31'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, k_d değeri sıcaklığın artması ile birlikte artmıştır. Bu, aynı zamanda sıcaklığın *Iase* ve *Sase*'nin yarılanma ömrü üzerindeki etkisini de gösterir. Sıcaklıktaki artma, $t_{1/2}$ değerinde kademeli olarak azalmaya neden olur. 70°C ve 80°C sıcaklıkta *Iase* için $t_{1/2}$ değerleri sırasıyla 0.56 ve 0.12 saat, *Sase* için bu değerler sırasıyla 0.35 ve 0.07 saat olarak hesaplanmıştır. Bu durum, *Iase* ve *Sase*'nin termostabil olmadığını ancak *Iase*'nin *Sase*'ye göre daha termostabil olduğunu (özellikle 70°C) gösterir.

Çizelge 4.31. *Iase* ve *Sase*'nin kinetik ve termodinamik parametreleri

T (°C)		70	80
T (K)		343	353
k_d (h ⁻¹)	<i>Iase</i>	2.28±0.22	5.76±0.07
	<i>Sase</i>	1.99±0.25	9.26±0.18
$t_{1/2}$ (h)	<i>Iase</i>	0.56±0.10	0.12±0.00
	<i>Sase</i>	0.35±0.05	0.07±0.00
D değeri (h)	<i>Iase</i>	1.86±0.33	0.40±0.00
	<i>Sase</i>	1.18±0.15	0.25±0.00
ΔH (kJ/mol)	<i>Iase</i>	34.45±0.58	34.36±0.58
	<i>Sase</i>	41.37±0.45	41.29±0.45
ΔG (kJ/mol)	<i>Iase</i>	60.40±0.51	57.78±0.04
	<i>Sase</i>	59.11±0.36	56.38±0.06
ΔS (J/molK)	<i>Iase</i>	-75.67±0.22	-66.33±1.75
	<i>Sase</i>	-51.72±0.24	-42.72±1.43

Iase için $Z = 7.21 \pm 1.64^\circ\text{C}$

Sase için $Z = 11.10 \pm 1.85^\circ\text{C}$

Iase için $E_a = 37.30 \pm 0.58$ kJ/mol

Iase için $E_{ia} = 112.86$ kJ/mol

Sase için $E_a = 44.22 \pm 0.45$ kJ/mol

Sase için $E_{ia} = 182.87$ kJ/mol

Iase için $A = 4.3 \times 10^8$ µmol/mL.dk

Sase için $A = 4.6 \times 10^9$ µmol/mL.dk

Benzer şekilde, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının $t_{1/2}$ değeri de yüksek sıcaklıkta (80°C) 0.66 saat olarak hesaplanmıştır (Singh vd. 2018). Sıcaklığın artması ile birlikte D değeri azalmış olup sıcaklık 70°C olduğunda D değeri *Iase* ve *Sase* için sırasıyla 1.86 saat ve 1.18 saat olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık 80°C'ye artırıldığında ise D-değeri sırasıyla 4.65 ve 4.72 kat azalmıştır. Bu durum, yüksek sıcaklıkta enzimin denatüre olduğunu gösterir. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada

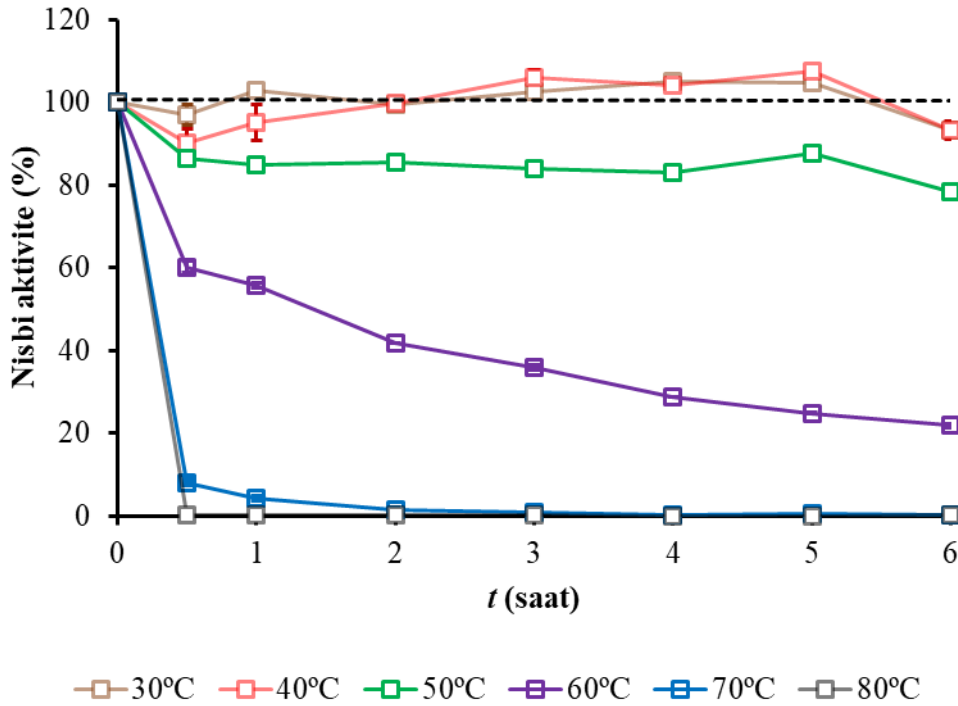
sıcaklığın 50°C'den 80°C'ye artması ile birlikte inülinaz enziminin D-değerlerinin de 164.47 saatten 2.30 saate kadar azaldığı tespit edilmiş olup 70°C ve 80°C sıcaklıklardaki D-değerleri ise sırasıyla 4.28 saat ve 2.30 olarak hesaplanmıştır (Singh vd. 2018).

Diğer yandan, hesaplanan D-değerleri kullanılarak *Iase* ve *Sase* için Z-değerleri sırasıyla $7.21 \pm 1.64^\circ\text{C}$ ve $11.10 \pm 1.85^\circ\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Yüksek Z-değeri uygulanan ısı muamelesinin süresine daha duyarlı olduğu, düşük Z-değeri ise sıcaklıktaki artışa daha duyarlı olduğu anlamı taşır. Dolayısıyla, sukroz üzerindeki aktivitenin Z-değerine kıyasla (11.10°C) inülin üzerindeki aktivitenin daha düşük Z-değeri (7.21°C), inülin üzerinde gösterilen aktivitenin uygulanan ısı muamelesinin süresinden ziyade sıcaklıktaki artışa daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, ısıya dayanıklı ve ısıya dayanıksız *Iase*'nin Z-değerleri sırasıyla 83.33°C ve 60.98°C olarak belirlenmiştir (Lago ve Noreña 2014). Benzer şekilde, Fante and Noreña (2012) beyazlatılmış sarımsak dilimlerinde elde ettikleri hız sabitleri değerleri kullanılarak, ısıya dayanıklı ve ısıya dayanıksız *Iase* için Z-değerleri sırasıyla 75.76°C ve 57.47°C olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının Z-değeri 16.20°C olarak hesaplanmış olup bu sıcaklık, D-değerinde 10 kat azalma elde etmek için gerekli olan sıcaklık değeri olarak bildirilmiş olup (Singh vd. 2018) bu durum yüksek sıcaklıkta *P. oxalicum* BGPUP-4 inülinazının *A. niger* A42 inülinazından daha stabil olduğunu ve D-değerini 10 kat azaltmak için daha fazla enerji harcanması gerektiğini gösterir.

Termal geri dönüşümsüz inaktivasyon, temelde $N \leftrightarrow D \rightarrow I$ olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Burada, N = doğal yapıdaki enzim, D = denatüre olmuş enzim (sıcaklık düştüğünde tekrar katlanabilir) ve I = inaktif enzimi (yüksek sıcaklığa sürekli maruz kalma nedeniyle soğutmadan sonra bile geri katlanmaz) temsil eder. Yüksek sıcaklığa uzun süre maruz kalmak, kovalent olmayan bağları veya proteinin aminoasitleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri bozar (Singh ve ark., 2018). *Iase* ve *Sase*'nin ΔH değerleri sıcaklığın artması birlikte azalmıştır. *Sase*'nin *Iase*'ye göre daha yüksek ΔH değerlerine sahip olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.31). Bununla beraber, *Iase* ve *Sase*'nin ΔG değerleri birbirine oldukça yakın hesaplanmıştır. Sıcaklığın artması ile birlikte ΔG değerleri azalmıştır (Çizelge 4.31). Sıcaklık artışı ile ΔH ve ΔG değerlerindeki bir azalma, *Iase* ve *Sase*'nin geniş aralıklı termostabilitesini doğrular (Singh ve ark., 2018). Bununla beraber, *Iase* ve *Sase* için ΔS değerleri sıcaklığın artması ile birlikte sıfır (0) noktasına doğru yaklaşmıştır. Hem *Iase* hem de *Sase* için ΔS değerlerinin negatif olması sistemdeki düzensizliğin azalması yani düzenliliğin artması demektir (Tunail, 2009). Yani, *Iase* ve *Sase*'nin anlamlı bir şekilde bir araya geldiğini gösterir (Singh ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada, 50-80°C sıcaklık aralığında inülinazın ΔH , ΔG ve ΔS değerleri sırasıyla 34.71-34.96 kJ/mol, 104.14-113.83 kJ/mol ve -240.97 J/molK ila -196.59 J/molK arasında değiştiği belirlenmiş olup 70°C sıcaklıkta bu değerler sırasıyla 34.79 kJ/mol, 109.58 kJ/mol ve -217.95 J/molK, 80°C sıcaklıkta ise bu değerler sırasıyla 34.71 kJ/mol, 104.14 kJ/mol ve -196.59 J/molK olarak hesaplanmıştır (Singh ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise *K. lactis* inülinazının 50-70°C sıcaklık aralığındaki ΔH , ΔG ve ΔS değerleri sırasıyla 234.21-234.05 kJ/mol, 249.6-284.7 kJ/mol ve -47 J/molK ila -148 J/molK arasında değiştiği belirlenmiştir (Zhao vd., 2016).

4.13. Termostabilite ve Termodinamik Parametreler

Iase enziminin termostabilite testinde, MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun ham enzim solüsyonu kullanılmıştır. *Iase* enziminin termostabilitesi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.55'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, *Iase* enziminin aktivitesinde 30°C ve 40°C sıcaklıkta 6 saatin sonunda sırasıyla %6.8 ve %6.7 kayıp olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, aynı sıcaklıklarda yarım saatlik inkübasyonun sonunda da sırasıyla %3.1 ve %10 aktivite kaybı söz konusudur. Öte yandan, 30°C sıcaklıkta inkübasyon süresi 1, 3, 4 ve 5 saat olduğunda ise aktivite de sırasıyla %2.9, %2.6, %4.9 ve %4.7 artış olmuş olup 2 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ise %0.5 kayıp tespit edilmiştir. Inkübasyon sıcaklığı 40°C olduğunda ve 3, 4 ve 5 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda ise aktivite de sırasıyla %6.1, %4 ve %7.5 artış görülmüş olup inkübasyon süresinin 1. ve 2. saatinin sonunda ise aktivitede sırasıyla %5 ve %0.1 kayıp tespit edilmiştir. Inkübasyon sıcaklığı 50°C olduğunda, inkübasyonun ilk yarım saatinde aktivitede %13.6 kayıp tespit edilmiş olup 5 saatlik inkübasyonun sonunda aktivitede %12-17 arasında kayıp tespit edilmiştir. 6. saatin sonunda ise aktivite kaybı yaklaşık %22 olmuştur.



Şekil 4.55. Enzimin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Diğer yandan, 60°C inkübasyon sıcaklığı kullanıldığında ve inkübasyon süresinin artması ile birlikte aktivitede de kayıp söz konusu olmuş olup 6 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yaklaşık %22 aktivite tespit edilmiş olup aktivite kaybı %78 civarındadır. İlaven, inkübasyon sıcaklığı 70°C olduğunda ise test tüpündeki enzim solüsyonunun proteinlerinin daha hızlı denatüre olduğu görülmektedir. 6 saatlik inkübasyon süresinin sonunda aktivite kaybı %99.7 olmuştur. Bununla beraber, 70°C inkübasyon sıcaklığında ortamdaki proteinlerin yaklaşık %92'si ve %96'sı sırasıyla

yarım saatlik ve 1 saatlik inkübasyon süresinin sonunda denatüre olmuştur. %98.4'lük aktivite kaybı ise 2 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tespit edilmiştir. Ek olarak, inkübasyon süresi 80°C olduğunda ise aktivitenin neredeyse tamamı (%99.83) yarım saatlik inkübasyon süresinin sonunda kaybolmuştur. Geri kalan inkübasyon sürelerinin sonunda da buna benzer aktivite kayıpları elde edilmiştir. İnülinazların 50°C'den daha yüksek bir optimum sıcaklığa sahip olmaları, inülinden fruktooligosakkaritlerin ve fruktozun ticari üretimi için çok önemli bir faktördür. Çünkü yüksek sıcaklık, inülinin uygun çözünürlüğünü sağlamakta ve aynı zamanda mikrobiyal kontaminasyonu önlemektedir. Aynı şekilde yüksek bir termostabilite, bazı endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin üretim maliyetini de düşürmektedir, çünkü istenen ürünü üretmek için daha düşük miktarlarda enzim gerekmektedir (Flores-Gallegos vd. 2015; Vandamme ve Derycke 1983). Yapılan bir çalışmada, *Rhizopus microsporus* inülinazının termostabilitesini belirlemek için, enzim çözeltisi, pH 5.0'da 6 saate kadar 60-80°C'de ısıtılmıştır. Muameleden sonra, kalan aktivite 50°C'de ölçülmüştür. İnülinazın 60°C'de 6 saatlik inkübasyonunda aktivitenin yaklaşık %87'sinin korunduğu bildirilmiştir. 70°C'de ise kademeli bir aktivite kaybının olduğu bununla beraber 6 saatlik inkübasyonun sonunda aktivitenin %57'sinin korunduğu belirlenmiştir. 80°C'de 4 saat inkübasyona bırakılan inülinazın %72'lik kalıntı aktiviteye sahip olurken 6 saatin sonunda ise aktivitenin %61'inin kaybolduğu rapor edilmiştir (Flores-Gallegos vd. 2015). Bununla beraber, *A.niger* inülinazının 60°C'de 30 dk, *A. candidus* inülinazının ise 55°C'de 60 dk boyunca stabil kaldığı tespit edilmiştir (Nakamura vd. 1995).

Diğer yandan, farklı sıcaklık ve sürede gerçekleştirilen enzim aktivitelerinin inaktivasyon hız sabitleri hesaplanmıştır. İnaktivasyon hız sabiti (k_d), protein denatürasyon prosesinin kantitatif bir özelliğidir. Çoğu durumda enzim inaktivasyonu, birinci derece bir reaksiyondur (Shkutina vd. 2016). *Iase* enziminin inaktivasyon hız sabiti üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.32'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre sıcaklığın artması ile birlikte inaktivasyon hız sabiti değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Öyle ki maksimum inaktivasyon hız sabiti 80°C sıcaklıkta ve yarım saat inkübasyon süresinde $12.742.3 \pm 0.25 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır ($P<0.05$). Düşük inkübasyon sıcaklıklarında (30°C ve 40°C) ve sürelerinde (1, 2, 3, 4 ve 5. saatler), bazı inaktivasyon hız sabiti değerleri, bu inkübasyon sıcaklık ve sürelerinde enzim aktivitesi değerinin nisbi olarak %100'ün üzerine çıktığı için (Şekil 4.55) negatif olmaktadır. Dolayısıyla bu koşullardaki inaktivasyon hız sabiti değerleri hesaplanmamıştır. Diğer yandan, yüksek inkübasyon sıcaklıklarında (50°C-80°C) inkübasyon süresinin artması ile birlikte inaktivasyon hız sabitinin kademeli olarak azaldığı belirlenmiş olup bu durum enzimin protein yapısının denatüre olduğunu ve aktivite kaybının olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla *Iase* enziminin yüksek sıcaklıklara göre (60°C-80°C) düşük sıcaklıklarda (30°C-50°C) daha stabil olduğu, düşük inaktivasyon hız sabiti değerlerinden de anlaşılmaktadır.

Inülinaz enziminin $t_{1/2}$ değeri, k_d değerine bağlıdır ($t_{1/2} = \ln(2)/k_d$). Sıcaklığın artması ile birlikte, k_d değerleri arttığı için enzimin $t_{1/2}$ değerinde kademeli olarak düşüş gözlemlenmiştir. Örneğin, inkübasyon süresi sabit tutulduğunda (0.5 sa) inülinazın $t_{1/2}$ değeri, sıcaklığın 30°C'den 80°C'ye artması ile birlikte 28.77 saatten 0.05 saate kademeli olarak azalmıştır. Yüksek sıcaklıklarda (80°C) dahi $t_{1/2}$ değerinin inkübasyon süresine bağlı olarak 0.05-0.64 saat arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.33). Dolayısıyla

bu, inülinazın yüksek sıcaklıktaki termostabilitesini gösterir. Diğer yandan, sıcaklık sabit tutulduğunda, termostabilite için inkübasyon süresinin artması ile birlikte $t_{1/2}$ değerinin genel olarak arttığı belirlenmiştir. Örneğin, 50°C'de gerçekleştirilen bir termostabilite analizinde sürenin 5 saate kadar artması ile birlikte $t_{1/2}$ değeri de düzenli olarak artmıştır. Ancak, 6. saatte $t_{1/2}$ değerinde azalma görülmüştür. Benzer şekilde, sıcaklık 60°C'de sabit tutulduğunda gerçekleştirilen termostabilite testinde, inkübasyon süresinin artması ile birlikte $t_{1/2}$ değeri sürekli olarak artmıştır (Çizelge 4.33). Bu durum, *A. niger* inülinazının uzun süre yüksek sıcaklıkta stabil kaldığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, 50°C'den 80°C'ye sıcaklığın artması ile birlikte, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının k_d değeri 0.014/sa'dan 1.046/sa'ye artarken $t_{1/2}$ değeri 49.51 saatten 0.66 saate azalmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının yüksek sıcaklıkta termostabil olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Singh vd. 2018).

Inülinaz enziminin D-değeri üzerine sıcaklık ve sürenin etkisini gösteren deneysel veriler Çizelge 4.34'te gösterilmiştir. D-değeri, k_d 'nin bir fonksiyonudur (D-değeri = $\ln(10)/k_d$). Dolayısıyla, D-değeri ile k_d arasında ters orantı söz konusudur. Yani, k_d 'nin artması ile birlikte D-değeri azalacaktır. Sıcaklığın artması ile birlikte k_d değeri artmış olup D-değeri de azalmıştır. Örneğin, termostabilite testi için uygulanan süre 0.5 saat olduğunda ve sıcaklık 30°C'den 80°C'ye artırıldığında D-değeri 95.58 saatten 0.18 saate azalmıştır. Benzer sonuçlar inkübasyon süresi 1, 2, 3, 4, 5, ve 6 saat olduğunda da elde edilmiştir (Çizelge 4.34). Diğer yandan, termostabilite için uygulanan sıcaklık sabit tutulduğunda (örneğin 50°C veya 70°C), inkübasyon süresi 5 saate kadar artırıldığında D-değerinin de arttığı tespit edilmiş olup (50°C için 7.88 saatten 88.49 saate, 70°C için 0.46 saatten 2.30 saate) inkübasyon süresi 6 saat olduğunda D-değerinde azalma tespit edilmiştir (50°C için 56.73 saat, 70°C için 2.19 saat). Ancak, sıcaklık değeri 60°C veya 80°C olduğunda, inkübasyon süresinin artması ile birlikte D-değeri de kademeli olarak artmıştır (60°C için 2.26 saatten 9.07 saate, 80°C için 0.18 saatten 2.14 saate) (Çizelge 4.34). Sonuç olarak, sıcaklıktaki artış ile birlikte *A. niger* inülinazının D-değeri azalmıştır. Bu durum, yüksek sıcaklıkta denatürasyonun başladığını doğrular. Singh vd. (2018), *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazı D-değerinin sıcaklığın 50°C'den 80°C'ye artması ile birlikte 164.47 saatten 2.30 saate kadar azaldığını bildirmiştir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuç, literatürdeki mevcut sonuçlar ile örtüşmektedir.

Diğer yandan, inülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki inaktivasyon enerjisi (E_{ia}) ile ilgili veriler, Çizelge 4.35'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, termostabilite testinde inkübasyon süresi 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 saat olduğunda E_{ia} değerleri sırasıyla 285.42 kJ/mol, 285.00 kJ/mol, 293.16 kJ/mol, 203.77 kJ/mol, 238.75 kJ/mol, 244.36 kJ/mol ve 207.69 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. En düşük E_{ia} değeri inkübasyon süresi 3 saat olduğunda elde edilirken en yüksek E_{ia} değeri de inkübasyon süresi 2 saat olduğunda elde edilmiştir. Inkübasyon süresi, E_{ia} değeri üzerinde önemli bir etki göstermiştir ($P < 0.05$). Ancak, inkübasyon süresinin artmasıyla E_{ia} değeri artmıştır veya azalmıştır şeklinde bir yorumda bulunmak çok zordur. Genel olarak inkübasyon süresinin artması ile birlikte E_{ia} değeri 203.77-293.16 kJ/mol arasında değişmiştir (Çizelge 4.35). Literatür çalışmaları incelendiğinde, inülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki E_{ia} değerinin değişimi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.32. İnaktivasyon hız sabiti (k_d) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	k_d (sa ⁻¹)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	0.064 ^d ±0.05	H	H	H	H	H	0.012b±0.00
40	0.212 ^d ±0.08	0.052 ^{de} ±0.05	H	H	H	H	0.012b±0.00
50	0.293 ^d ±0.01	0.162 ^d ±0.01	0.079 ^d ±0.01	0.059 ^c ±0.01	0.047 ^c ±0.00	0.026 ^d ±0.00	0.041b±0.00
60	1.019 ^c ±0.05	0.583 ^c ±0.01	0.436 ^c ±0.00	0.343 ^c ±0.01	0.312 ^c ±0.00	0.278 ^c ±0.00	0.254b±0.00
70	5.043 ^b ±0.13	3.172 ^b ±0.10	2.064 ^b ±0.02	1.576 ^b ±0.07	1.397 ^b ±0.01	1.001 ^b ±0.03	1.091a±0.21
80	12.742 ^a ±0.25	6.425 ^a ±0.01	3.435 ^a ±0.16	2.750 ^a ±0.68	2.149 ^a ±0.42	1.510a±0.07	1.079a±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır

Çizelge 4.33. İnülinaz enziminin yarı ömrü ($t_{1/2}$) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	$t_{1/2}$ (sa)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	28.77 ^a ±22.75	H	H	H	H	H	61.99 ^a ±14.07
40	3.76 ^a ±1.35	55.22 ^a ±48.10	H	H	H	H	67.99 ^a ±23.35
50	2.37 ^a ±0.09	4.30 ^a ±0.37	8.85 ^a ±0.82	11.89 ^a ±1.03	14.81 ^a ±0.49	26.64 ^a ±3.27	17.08 ^b ±0.37
60	0.68 ^a ±0.03	1.19 ^a ±0.02	1.59 ^b ±0.00	2.02 ^b ±0.03	2.22 ^b ±0.01	2.49 ^b ±0.00	2.73 ^b ±0.04
70	0.14 ^a ±0.00	0.22 ^a ±0.01	0.34 ^b ±0.00	0.44 ^b ±0.02	0.50 ^c ±0.00	0.69 ^b ±0.02	0.66 ^b ±0.13
80	0.05 ^a ±0.00	0.11 ^a ±0.00	0.20 ^b ±0.01	0.27 ^b ±0.07	0.34 ^c ±0.07	0.46 ^b ±0.02	0.64 ^b ±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır

Çizelge 4.34. İnülinaz enziminin D-değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	D-değeri (sa)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	95.58 ^a ±75.58	H	H	H	H	H	205.92 ^a ±46.72
40	12.49 ^a ±4.47	183.45 ^a ±159.80	H	H	H	H	225.85 ^a ±77.57
50	7.88 ^a ±0.30	14.29 ^a ±1.24	29.40 ^a ±2.73	39.48 ^a ±3.41	49.20 ^a ±1.63	88.49 ^a ±10.85	56.73 ^b ±1.24
60	2.26 ^a ±0.10	3.95 ^a ±0.08	5.28 ^b ±0.01	6.72 ^b ±0.11	7.39 ^b ±0.02	8.27 ^b ±0.00	9.07 ^b ±0.13
70	0.46 ^a ±0.01	0.73 ^a ±0.02	1.12 ^b ±0.01	1.46 ^b ±0.06	1.65 ^c ±0.01	2.30 ^b ±0.07	2.19 ^b ±0.42
80	0.18 ^a ±0.00	0.36 ^a ±0.00	0.67 ^b ±0.03	0.89 ^b ±0.22	1.11 ^c ±0.22	1.53 ^b ±0.07	2.14 ^b ±0.03

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır

Çizelge 4.35. İnülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki inaktivasyon enerjisi (E_{ia})

İnkübasyon süresi (sa)	0.5	1	2	3	4	5	6
E_{ia} (kJ/mol)	285.42 ^a ±5.07	285.00 ^a ±1.08	293.16 ^a ±15.80	203.77 ^c ±4.09	238.75 ^b ±6.36	244.36 ^b ±11.47	207.69 ^c ±2.50

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.36. İnülinaz enziminin Q_{10} -değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	Q_{10} -değeri						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30-40	0.93 ^a ±0.06	0.92 ^a ±0.04	1.00 ^a ±0.00	1.03 ^a ±0.01	0.99 ^a ±0.01	1.03 ^a ±0.01	1.00 ^a ±0.04
40-50	0.96 ^a ±0.03	0.90 ^a ±0.05	0.85 ^b ±0.00	0.79 ^b ±0.03	0.80 ^a ±0.00	0.82 ^b ±0.02	0.84 ^b ±0.02
50-60	0.70 ^b ±0.01	0.66 ^b ±0.00	0.49 ^c ±0.01	0.43 ^c ±0.00	0.35 ^b ±0.00	0.28 ^c ±0.00	0.28 ^c ±0.00
60-70	0.13 ^c ±0.01	0.08 ^c ±0.01	0.04 ^d ±0.00	0.03 ^d ±0.01	0.01 ^c ±0.00	0.03 ^d ±0.00	0.01 ^d ±0.01
70-80	0.02 ^d ±0.00	0.04 ^c ±0.00	0.07 ^d ±0.00	0.14 ^d ±0.14	0.14 ^{bc} ±0.13	0.08 ^e ±0.01	H

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır.

Çizelge 4.37. İnülinaz enziminin farklı inkübasyon sürelerindeki Z-değerleri

İnkübasyon süresi (sa)	0.5	1	2	3	4	5	6
Z-değeri (°C)	20.75 ^a ±3.29	17.05 ^a ±3.32	18.87 ^a ±0.18	17.77 ^a ±0.71	17.85 ^a ±0.70	17.14 ^a ±0.25	20.99 ^a ±0.79

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.38. Enzimatik reaksiyonun entalpisi (ΔH) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	ΔH (kJ/mol)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	282.90 ^a ±5.07	282.48 ^a ±1.08	290.64 ^a ±15.80	201.25 ^a ±4.09	236.23 ^a ±6.36	241.84 ^a ±6.36	205.17 ^a ±2.50
40	282.82 ^a ±5.07	282.40 ^a ±1.08	290.56 ^a ±15.80	201.17 ^a ±4.09	236.15 ^a ±6.36	241.75 ^a ±6.36	205.09 ^a ±2.50
50	282.73 ^a ±5.07	282.31 ^a ±1.08	290.47 ^a ±15.80	201.09 ^a ±4.09	236.06 ^a ±6.36	241.67 ^a ±6.36	205.00 ^a ±2.50
60	282.65 ^a ±5.07	282.23 ^a ±1.08	290.39 ^a ±15.80	201.00 ^a ±4.09	235.98 ^a ±6.36	241.59 ^a ±6.36	204.92 ^a ±2.50
70	282.57 ^a ±5.07	282.15 ^a ±1.08	290.31 ^a ±15.80	200.92 ^a ±4.09	235.90 ^a ±6.36	241.51 ^a ±6.36	204.84 ^a ±2.50
80	282.48 ^a ±5.07	282.06 ^a ±1.08	290.23 ^a ±15.80	200.84 ^a ±4.09	235.81 ^a ±6.36	241.42 ^a ±6.36	204.75 ^a ±2.50

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.39. Enzimatik reaksiyonun serbest enerjisi (ΔG) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	ΔG (kJ/mol)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	103.03 ^a ±2.70	H	H	H	H	H	106.13 ^{cd} ±0.58
40	102.31 ^a ±0.98	107.63 ^a ±3.48	H	H	H	H	109.86 ^a ±0.93
50	104.61 ^a ±0.10	106.20 ^a ±0.23	108.14 ^a ±0.25	108.93 ^a ±0.23	109.53 ^a ±0.09	111.09 ^a ±0.33	109.91 ^{ab} ±0.06
60	104.48 ^a ±0.12	106.02 ^a ±0.05	106.83 ^b ±0.00	107.50 ^b ±0.04	107.76 ^b ±0.01	108.07 ^b ±0.00	108.33 ^{cd} ±0.04
70	103.14 ^a ±0.08	104.46 ^a ±0.09	105.69 ^c ±0.03	106.80 ^c ±0.12	106.80 ^c ±0.02	107.75 ^c ±0.09	107.56 ^d ±0.55
80	103.51 ^a ±0.06	105.52 ^a ±0.00	107.36 ^b ±0.14	108.79 ^{bc} ±0.74	108.79 ^b ±0.59	109.77 ^b ±0.13	110.76 ^{bc} ±0.04

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır.

Çizelge 4.40. Enzimatik reaksiyonun entropisi (ΔS) üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi

T (°C)	ΔS (J/molK)						
	0.5 sa	1 sa	2 sa	3 sa	4 sa	5 sa	6 sa
30	661.73 ^a ±7.81	H	H	H	H	H	394.95 ^a ±6.33
40	644.78 ^{ab} ±13.09	626.44 ^a ±7.65	H	H	H	H	372.32 ^{ab} ±5.01
50	619.55 ^{abc} ±15.38	613.33 ^a ±2.63	632.59 ^a ±49.68	353.40 ^a ±11.96	459.83 ^a ±19.98	472.37 ^a ±36.52	362.48 ^b ±7.55
60	603.13 ^{bc} ±14.85	597.24 ^b ±3.09	619.33 ^a ±47.45	348.89 ^a ±12.17	453.13 ^a ±19.14	469.04 ^a ±34.43	358.16 ^b ±7.38
70	591.20 ^c ±14.57	586.12 ^b ±2.91	606.34 ^a ±46.14	343.48 ^a ±11.58	444.46 ^a ±18.61	458.04 ^a ±33.69	351.70 ^{bc} ±5.67
80	575.09 ^c ±14.20	568.21 ^c ±3.06	586.11 ^a ±45.14	330.79 ^a ±9.50	427.92 ^a ±19.69	441.03 ^a ±32.85	334.36 ^c ±6.98

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

H: Hesaplanmamıştır.

Q_{10} -değeri, Eşitlik 3.9 ile hesaplanmıştır. İnülinaz enziminin Q_{10} -değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi ile ilgili sonuçlar, Çizelge 4.36'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Q_{10} -değeri üzerine inkübasyon süresi genel olarak dalgalı şekilde etki etmiştir. Örneğin, 30-40°C aralığında ve inkübasyon süresi 0.5 saatten 6 saate arttığında Q_{10} -değerleri sırasıyla 0.93, 0.92, 1.00, 1.03, 0.99, 1.03 ve 1.00 olarak hesaplanmıştır. Benzer sonuçlar, sıcaklık aralığı 40-50°C, 60-70°C ve 70-80°C olduğunda da elde edilmiştir. Ancak, sıcaklık aralığı 50-60°C olduğunda ise inkübasyon süresinin artması ile birlikte Q_{10} -değeri azalmıştır (Çizelge 4.36). Diğer yandan, sıcaklığın artması ile birlikte Q_{10} -değeri azalmıştır (40-50°C sıcaklık aralığı ve 0.5 sa inkübasyon süresindeki değer hariç). Örneğin, inkübasyon süresi 1 saat olduğunda Q_{10} -değeri 0.92'den 0.04'e azalmıştır ($P < 0.05$). Benzer şekilde, inkübasyon süresi 5 saat olduğunda Q_{10} -değeri 1.03'ten 0.03'e azalmıştır ($P < 0.05$) (Çizelge 4.36). Sonuç olarak, düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru sıcaklıktaki her 10°C'lik yükselme ile birlikte uygulanan tüm inkübasyon süreleri de göz önüne alındığında Q_{10} -değerinde genel olarak azalma görülmüştür. Bu da reaksiyon hızının azalması yani enzimin yüksek sıcaklıkta ve uzun inkübasyon sürelerinde denatüre olduğunun bir göstergesidir.

İnülinaz enziminin Z -değeri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi ile ilgili sonuçlar, Çizelge 4.37'de sunulmuştur (Eşitlik 3.10). Elde edilen sonuçlara göre, sıcaklık 30-80°C arasında değiştiğinde ve inkübasyon süresinin 0.5 saatten 6 saate artması ile birlikte Z -değeri doğrusal olarak artmamıştır ($P > 0.05$). Çizelge 4.37'deki verilere göre inkübasyon süresi 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 saat olduğunda bu sürelerdeki Z -değerleri sırasıyla 20.75°C, 17.05°C, 18.87°C, 17.77°C, 17.85°C, 17.14°C ve 20.99°C olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.37'deki veriler, D -değerinde 10 kat azalma elde etmek için her bir inkübasyon süresine karşılık gelen sıcaklık değeri kadar bir artışın olması gerektiğini ortaya koymaktadır. Örneğin; 0.5 saat inkübasyon süresi uygulandığında D -değerinde 10 kat azalma elde etmek için artırılması gereken sıcaklık 20.75°C'dir (Çizelge 4.37). Yapılan bir çalışmada, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazının Z -değeri 16.20°C olarak hesaplanmış olup bu sıcaklık değerinin bu çalışmadan elde edilen değerler ile oldukça uyumlu olduğu anlaşılmıştır (Singh vd. 2018).

Entalpi, kimyasal reaksiyonlarda reaksiyona giren maddeler ile reaksiyon ürünlerinin moleküllerinde bulunan bağ çeşitlerine ve sayılarına göre değişen bağ enerjisidir. Entalpideki değişim, sistemin ısı içeriğindeki değişimdir. Isının açığa çıktığı ekzotermik reaksiyonlarda, reaksiyona giren maddelerde bağ enerjisi daha yüksek, reaksiyon ürünlerinde ise daha düşük değerler gösterir. Salınan bağ enerjisi ısıya dönüşmüştür. Dolayısıyla entalpideki değişim negatiftir ($-\Delta H$). Tam tersine, reaksiyon ürünleri reaksiyona giren maddelerden daha yüksek bağ enerjisine sahip olmuştursa reaksiyonda ısı absorbe edilmiştir. Endotermik reaksiyonda entalpideki değişim pozitif yöndedir ($+\Delta H$) (Tunail 2009). *Iase* enziminin enzimatik reaksiyonunun ΔH değerleri üzerine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi de incelenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.38'de verilmiştir. ΔH değerleri, E_{ia} , R ve T 'nin bir fonksiyonu olarak hesaplanmıştır ($\Delta H = E_{ia} - R \times T$). Elde edilen sonuçlar, sıcaklığın artması ile birlikte entalpinin istatistiksel olarak önemli olmayacak ölçüde azaldığını göstermiştir ($P > 0.05$). Nitekim literatürdeki sonuçlar da bu yönde olmuştur. Ancak, bu çalışmada termal inaktivasyon ile ilgili verilerden ΔH değerleri hesaplandığı için (yani E_{ia} değerleri kullanıldığı için) ve literatürde genel olarak aktivasyon ile ilgili verilerden ΔH değerleri hesaplandığı için (yani E_a değerleri kullanıldığı için), literatürdeki mevcut sonuçlardan yüksek

hesaplanmıştır. Çünkü E_a 'nın E_{ia} 'dan her daim düşük olduğu Bölüm 4.12'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Örneğin, Singh vd. (2018), inülinazın ΔH değerlerinin E_a ile hesaplanmış olup sıcaklığın artması ile ΔH değerlerinin azaldığını bildirmiştir. Çalışmalarından elde edilen verilere göre, sıcaklık 50-80°C arasında değiştiğinde ΔH değerleri de 34.96-34.71 kJ/mol arasında değişmiştir. Bir başka çalışmada ise modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş inülinaz enzimlerinin 60°C'deki ΔH değerlerinin hesaplanmasında da yine E_a değerleri kullanılmış olup ΔH değerleri sırasıyla 21.42 kJ/mol ve 37.11 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, maksimum ΔH değerleri inkübasyon süresi 2 saat olduğunda hesaplanırken, minimum ΔH değerleri de inkübasyon süresi 3 saat olduğunda hesaplanmıştır (Torabizadeh vd. 2011). Bir diğer çalışmada ise *K. lactis* inülinazının 50, 60 ve 70°C sıcaklıklardaki ΔH değerleri E_{ia} (236.9 kJ/mol) ile hesaplanmış olup bu değerler sırasıyla 234.21 kJ/mol, 234.13 kJ/mol ve 234.05 kJ/mol olarak belirlenmiştir (Zhao vd. 2016). Görüldüğü üzere ΔH değerleri E_{ia} ile yüksek hesaplanmaktadır. Ancak inkübasyon süresinin ΔH değerlerini doğrusal yönde etkilediğinden bahsedilemez. Çünkü inkübasyon süresinin artması ile birlikte ΔH değerleri bazen artmakta bazen de azalmaktadır. Bu durum, tamamen her inkübasyon süresi için E_{ia} değerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Çizelge 4.35).

Termodinamik biliminin kurucusu olan Josiah Willard Gibbs, iş yapma potansiyeline sahip enerjiyi serbest enerji olarak tanımlamış, sistemdeki toplam enerji değişiminin ifadesi olan serbest enerji değişimini (ΔG), termodinamiğin yasaları ile bağlantılı olarak Eşitlik 3.12 ile göstermiştir. Serbest enerji değişimini etkileyen ΔH ve ΔS olmak üzere iki önemli parametre vardır. ΔH 'deki değişim, serbest enerjideki değişimle hemen hemen aynıdır. ΔH 'deki değişim $\Delta H < 0$ olursa ısı enerjisi salınır ve bu sonuç serbest enerji değişimi negatife yönlendirir. ΔG negatif olur ve tepkime ileri yönlüdür. Tam tersine, $\Delta H > 0$ olursa ΔG pozitif yönlendirir ve tepkime geriye doğrudur. $\Delta G = 0$ olduğunda ise tepkime dengede demektir. ΔS 'ye gelince, reaksiyonda ΔS 'nin artması ΔS 'deki değişimin pozitif olduğuna ve olayın rastgele devam ettiğini gösterir. ΔS 'deki artış serbest enerji değişimini negatife yönlendirir. Sistemin ΔS 'inde azalma, serbest enerji değişimini pozitif yönlendirme eğilimindedir (Tunail 2009). *Iase* enziminin termostabilitesi ile ilgili gerçekleştirilen analizlerin sonucunda elde edilen verilerden yola çıkarak enzimatik reaksiyonun farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerindeki ΔG değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.39). Bazı sıcaklık-inkübasyon süresi kombinasyonlarındaki k_d değerleri negatif hesaplandığı için (çünkü Eşitlik 3.4'teki A_0 değeri A değerinden düşük hesaplanmıştır) ΔG değerleri hesaplanmamıştır. Elde edilen sonuçlar, inkübasyon süresinin artması ile birlikte ΔG değerlerinin genel olarak arttığını göstermiştir. Örneğin 80°C'deki sonuçlarda inkübasyon süresi 0.5 saatten 6 saate arttığında ΔG değerleri de 103.51 kJ/mol'den 110.76 kJ/mol'e artmıştır (Çizelge 4.39). Bununla beraber, inkübasyon süresi sabit olduğunda sıcaklığın artması ile birlikte ΔG değerleri doğrusal olarak artış göstermemiştir. Örneğin 6 saatlik inkübasyon süresinde sıcaklığın 30°C'den 80°C'ye artması halinde ΔG değerleri 50°C sıcaklığa kadar artmış, sonra 70°C sıcaklığa kadar azalmış, sonra tekrar artmıştır (Çizelge 4.39). Dolayısıyla, bu durumda sıcaklığın anlamlı olacak şekilde ΔG değerleri üzerine etkili olmadığı anlaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şöyle ki, sıcaklık 50°C'den 80°C'ye artırıldığında ΔG değerleri bazen artmış bazen de azalmıştır. Öyle ki maksimum ΔG değeri (113.82 kJ/mol) sıcaklık 55°C olduğunda elde edilirken minimum ΔG değeri (104.14 kJ/mol) de sıcaklık 80°C olduğunda hesaplanmıştır (Singh vd. 2018). Diğer yandan, modifiye edilmiş/edilmemiş inülinazın

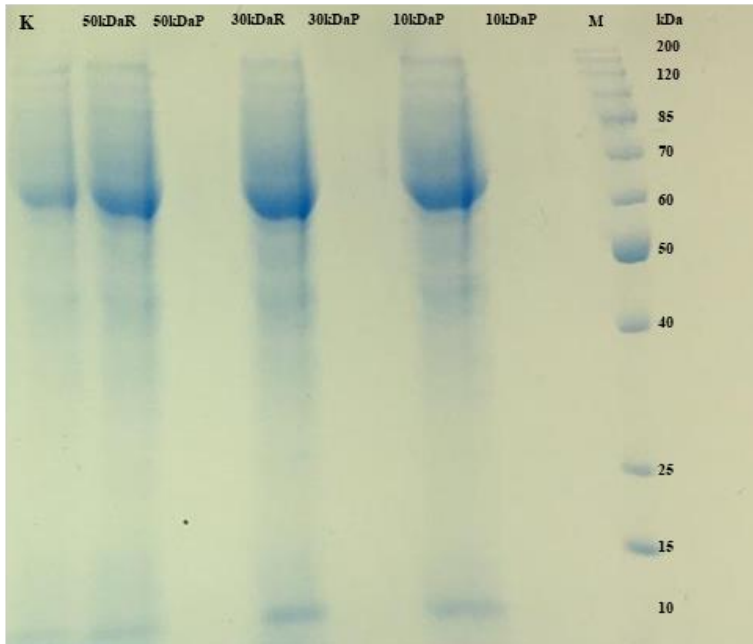
60°C'deki ΔG değerleri de sırasıyla 46.62 kJ/mol ve 46.06 kJ/mol olarak tespit edilmiştir (Torabizadeh vd. 2011). Başka bir çalışmada ise sıcaklık 50°C'den 70°C' arttığında ΔG değeri de artmış olup bu değer 249.6 kJ/mol'den 284.7 kJ/mol'e artmıştır (Zhao vd. 2016).

Termodinamiğin 2. temel yasası entropi ile ilgilidir. Bu yasa, Einstein'a göre yerçekimi yasasından ve kendi bulduğu görelilik yasasından bile önde gelmektedir. Entropi, sistemdeki düzensizliğinin ve rastgeleliğin bir ölçüsü olarak kabul edilebilir. Bu yasa, madde ve enerjinin bir yöne doğru değişebileceğini, yönün ise sürekli düzenden düzensizliğe olduğunu belirtir. Sistemdeki düzensizliğin artması ile birlikte sistemin entropisi artar. Sistemin düzensizliğinin artması yani düzenliliğin azalması durumunda ΔS değeri pozitifdir. Tam aksine, sistemdeki düzensizliğin azalması yani düzenliliğin artması durumunda ise ΔS değeri negatiftir (Tunail 2009). *Iase* enziminin termostabilitesi ile ilgili gerçekleştirilen analizlerin sonucunda elde edilen verilerden yola çıkarak enzimatik reaksiyonun farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerindeki ΔS değerleri Çizelge 4.40'ta verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, sıcaklığın artması ile birlikte ΔS değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Örneğin, inkübasyon süresi 0.5 saat olduğunda ve sıcaklık değeri 30°C'den 80°C'ye artırıldığında, ΔS değerleri 661.73 J/molK'den 575.09 J/molK'e azalmıştır. Benzer durum, diğer inkübasyon süreleri için de geçerli olmuştur. Bununla beraber, sıcaklık sabit olduğunda ve inkübasyon süresi arttığında, ΔS değerlerinin düzenli bir şekilde azaldığı veya arttığından bahsedilemez. Ancak, örneğin sıcaklık 60°C'de sabit tutulduğunda ve inkübasyon süresi doğrudan 0.5 saatten 6 saate artırılsaydı, ΔS değerinin azaldığından bahsedilebilirdi. Benzer durumlar, diğer sıcaklık değerleri içinde geçerli olmuştur. ΔS değerleri incelendiğinde, verilerin tamamının pozitif olduğu görülmektedir. Bu durum, yukarıda da belirtildiği gibi sistemdeki düzensizliğin artması yani düzenliliğin azalması anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, enzimlerin protein yapısının denatüre olduğunun bir göstergesidir. Eğer ΔS değerleri negatif olsaydı, bu durum enzimlerin anlamlı bir şekilde bir araya toplandığını gösterebilirdi (Pal ve Khanum 2011). Yani enzimatik aktivitenin arttığı ve enzimin protein yapısının bozulmadığı anlaşıldı. Dolayısıyla, Çizelge 4.40'tan elde edilen verilere dayalı olarak, sıcaklığın ve inkübasyon süresinin artması ile birlikte enzimatik aktivitede kaybın olduğu (Şekil 4.55) ve böylece enzimin protein yapısının bozularak bir araya toplanmanın zorlaştığı söylenebilir. Ayrıca bu durumun Çizelge 4.35'teki yüksek E_{ia} değerlerinden de kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada inülinazın 50-80°C sıcaklık aralığında termal inaktivasyonuna yönelik hesaplanan termodinamik parametrelerden birisi olan ΔS değeri, sıcaklığın artması ile birlikte -240.97 J/molK ile -196.59 J/molK arasında değişmiştir. Ayrıca sıcaklığın artması ile birlikte ΔS değeri de artmıştır (Singh vd. 2018). Bir diğer çalışmada ise modifiye edilmemiş/edilmiş inülinaz enzimlerinin 60°C'de ΔS değerler karşılaştırılmış ve modifiye edilmiş inülinazın daha yüksek bir ΔS değerine (-0.182 kJ/molK) sahip olduğu tespit edilmiştir (modifiye edilmemiş inülinazın ΔS değeri = -0.227 kJ/molK). Sonuç olarak, ΔS değerinin hesaplanmasında E_{ia} değeri kullanıldığı için pozitif ΔS değeri elde edilmiş olup sonuçlar literatürdeki mevcut verilerden oldukça farklı çıkmıştır.

4.14. Enzimin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Mikrobiyal yolla melastan üretilen *Iase* enzimi fraksiyonunun moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanılmış olup alınan görüntü Şekil 4.56'da

gösterilmiştir. SDS-PAGE analiz sonucu incelendiğinde *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ile üretilen *Iase* enzimi fraksiyonunun moleküler ağırlığının 60-70 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, *Iase* enzimi fraksiyonunun olduğu bantta 10 kDa ve 15 kDa civarında moleküler ağırlığına sahip olan moleküllerin olduğu görülmektedir. Ancak literatürde, fungus kaynaklı *Iase* enzimlerinin moleküler ağırlığının 50 kDa'dan fazla olduğu bildirilmiştir (Chi vd. 2009). Dolayısıyla, bu çalışmada belirlenen moleküler ağırlığının fungus kaynaklı *Iase* enzimlerinin moleküler ağırlıkları ile uyumlu olduğunu göstermiştir. *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 inülinazı izoformlarının (Ekzo-I ve Ekzo-II) moleküler ağırlıkları MALDI-TOF kullanılarak sırasıyla 64.85 kDa ve 32.54 kDa olarak belirlenmiştir (Singh ve ark., 2018). *A. ficuum* ekzo-inülinazı (Ekzo-I, Ekzo-II ve Ekzo-II) ve endo-inülinazının (Endo-I ve Endo-II) moleküler ağırlıkları SDS-PAGE ile sırasıyla 70 kDa, 40 kDa, 46 kDa, 34 kDa ve 31 kDa olarak tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2009).



Şekil 4.56. SDS-PAGE analiz sonucu. K: Kontrol ve M: Marker

4.15. Optimum Koşullardaki Fermentasyonların Matematiksel Modellenmesi

Bu çalışmada, *Aspergillus niger* A42 ile *Iase* üretimi için besiyeri kompozisyonu PBD ve MKD ile optimize edilmiştir. PBD ile optimum besiyeri kompozisyonu %1 maya ekstraktı ve %1 pepton olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonrasında besiyerinde kullanılan maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonu, MKD ile optimize edilmiş olup belirlenen optimum besiyeri kompozisyonunda %4.2 maya ekstraktı bulunmaktadır. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen çalkalamalı flask fermentasyonların deneysel verileri matematiksel modeller kullanılarak modellenmiştir. Bu amaçla, PBD ile gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, *Iase* aktivitesi, *Sase* aktivitesi ve S/I oranının deneysel verilerini tahmin etmek için Çizelge 3.5'teki matematiksel modeller kullanılmıştır. MKD ile gerçekleştirilen fermentasyonun da şeker tüketimi, *Iase* aktivitesi, *Sase* aktivitesi, *SIase* aktivitesi, *SSase* aktivitesi, S/I oranı, *SIase*/*SSase* oranı ve protein

miktarının deneysel verileri, Çizelge 3.5'teki matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilmiştir. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen iki tekerrürlü fermentasyonların ortalama değerleri, matematiksel modellere uydurmak için kullanılmış olup modellemelerde Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılmıştır. PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların matematiksel modellemesi sırasıyla gerçekleştirilmiş olup sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

4.15.1. PBD ile optimize edilen besiyerindeki fermentasyon

4.15.1.1. Şeker tüketiminin matematiksel modellenmesi

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.41) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.41'de verilmiştir.

Çizelge 4.41. Deneysel şeker tüketim verilerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel şeker tüketim verileri

Parametre	S (g/L)	t (gün)	t (sa)	S (g/L)	S/10 (g/L)
A_0 (g/L)	1.63	0	0	29.38	2.94
$A_0/10$ (g/L)	0.163	1	24	27.96	2.80
A_m (g/L)	29.38	2	48	20.74	2.07
$A_m/10$ (g/L)	2.94	3	72	14.51	1.45
Q (g/L/sa)	0.28	4	96	9.45	0.95
$Q/10$ (g/L/gün)	0.67	5	120	4.84	0.48
λ (sa)	18.929	6	144	2.98	0.30
λ (gün)	0.789	7	168	2.60	0.26
v_1	0.01	8	192	2.35	0.23
v_2	9.15	9	216	1.83	0.18
h_o	5.304	12	288	2.06	0.21
$h_o/10$	0.530	13	312	2.52	0.25
β	4.22	15	360	1.63	0.16
k_1	0.012				
k_2	0.014				
δ_1	3				
δ_2	3.08				
d	2.58				
T_L	73.502				
k_3	0.03				
v_3	4.82				
k_4	0.015				
v_4	3.045				

S: Deneysel kalıntı şeker miktarı

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel şeker tüketim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.42) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte

gösterilmiştir (EK-3). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, Weibull, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile tahmin edilen $\text{Şeker}_{\max}$, fermentasyonun başlangıcındaki deneysel $\text{Şeker}_{\max}$ değerine (29.38 g/L) eşit olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, MGM, MLM, MRM, Stannard, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen $\text{Şeker}_{\max}$, deneysel $\text{Şeker}_{\max}$ değerinden nispeten düşük olmuştur. Benzer şekilde, deneysel fermentasyonun sonundaki $\text{Şeker}_{\min}$ (1.63 g/L), Stannard, Weibull ve Fitzhugh modelleri ile eşit olarak tahmin edilirken MGM, MLM, MRM, Asimetrik, Baranyi ve Huang modellerinin kullanımı ile tahmin edilen $\text{Şeker}_{\min}$, deneysel $\text{Şeker}_{\min}$ değerinden daha düşük hesaplanmıştır. Bununla beraber, MMF ve Cone modelleri ile deneysel $\text{Şeker}_{\min}$ değeri nispeten yüksek tahmin edilmiştir. Diğer yandan, deneysel fermentasyonun 1. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonu (27.96 g/L), MGM, MLM, MRM, Asimetrik, Baranyi ve Huang modelleri ile nispeten düşük tahmin edilirken modellerin geri kalanı (Weibull, MMF, Fitzhugh ve Cone) ile deneysel kalıntı şeker konsantrasyonu nispeten yüksek tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 2. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonu (20.74 g/L), yalnızca Baranyi ve Huang modellerinin kullanımı ile nispeten düşük tahmin edilmiştir. MLM, Stannard, Baranyi, Fitzhugh ve Cone modelleri, fermentasyonun 3. günündeki deneysel kalıntı şeker konsantrasyonunu (14.51 g/L) nispeten düşük hesaplarken modellerin geri kalanı (MGM, MRM, Weibull, MMF, Asimetrik ve Huang) yüksek tahmin etmiştir. Öte yandan, MMF, Asimetrik, Baranyi ve Huang modellerinin dışındaki modeller, fermentasyonun 4. günündeki deneysel kalıntı şeker konsantrasyonunu (9.45 g/L) nispeten düşük hesaplamıştır. Deneysel fermentasyonun 5. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (4.84 g/L) yalnızca MLM ve Weibull modelleri düşük tahmin etmiştir. İlaveten, MGM, MLM, MRM ve Weibull modellerinin fermentasyonun 6. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (2.98 g/L) düşük tahmin ettiği belirlenmiştir. Diğer yandan, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasında yalnızca MMF, Asimetrik ve Cone modelleri, deneysel fermentasyonun 7. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (2.60 g/L) yüksek tahmin etmiştir. Ek olarak, MMF ve Cone modelleri ise fermentasyonun 8. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (2.35 g/L) yüksek tahmin etmiştir. Ayrıca, Stannard, MMF ve Cone modelleri deneysel fermentasyonun 9. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (1.83 g/L) nispeten yüksek hesaplarken Fitzhugh modeli ise eşit olarak tahmin etmiştir. Modellerin geri kalanı (MGM, MLM, MRM, Weibull, Asimetrik, Baranyi ve Huang) da düşük hesaplamıştır. Deneysel fermentasyonun 12. ve 13. günlerindeki kalıntı şeker konsantrasyonları (sırasıyla 2.06 g/L ve 2.52 g/L) ise çalışmada kullanılan tüm modeller tarafından düşük tahmin edilmiştir (Çizelge 4.42).

Çizelge 4.41'de verilen model parametrelerinin kullanımı ile PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonundaki kalıntı şeker konsantrasyonu, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.5) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.43'te özetlenmiştir. Çizelge 4.43'ten elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (0.52 g/L), MAE (0.41 g/L) ve MSD (0.29 g/L) değerleri sırasıyla Stannard, Fitzhugh ve hem Stannard hem de Fitzhugh modelleri ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri ve 1'e en yakın veya eşit m değeri ise sırasıyla Stannard ve Cone modelleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.42. PBD ile deneysel şeker tüketim verilerinin modellerden hesaplanan şeker tüketim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (g/L)	Matematiksel modeller (g/L)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	29.38	29.03	27.56	29.02	29.06	29.38	29.38	29.38	27.75	27.75	29.38	29.38
1	27.96	26.67	25.23	26.65	26.90	28.72	28.44	27.83	23.62	25.93	28.26	28.19
2	20.74	21.20	20.83	21.20	21.34	24.55	23.07	22.04	18.92	20.41	21.84	21.92
3	14.51	14.59	14.50	14.59	14.37	16.19	15.33	15.08	14.13	14.86	14.01	13.89
4	9.45	9.06	8.25	9.04	8.82	7.65	9.59	9.82	9.77	10.10	8.37	8.51
5	4.84	5.27	3.97	5.25	5.38	3.03	6.30	6.47	6.23	6.37	5.10	5.60
6	2.98	2.96	1.73	2.94	3.50	1.79	4.50	4.40	3.69	3.75	3.36	4.06
7	2.60	1.63	0.72	1.61	2.55	1.64	3.49	3.11	2.06	2.09	2.49	3.20
8	2.35	0.88	0.29	0.87	2.07	1.63	2.89	2.28	1.11	1.12	2.05	2.70
9	1.83	0.48	0.12	0.47	1.84	1.63	2.52	1.71	0.58	0.59	1.83	2.38
12	2.06	0.07	0.01	0.07	1.65	1.63	2.00	0.84	0.08	0.08	1.65	1.95
13	2.52	0.04	0.00	0.04	1.65	1.63	1.92	0.69	0.04	0.04	1.64	1.88
15	1.63	0.01	0.00	0.01	1.63	1.63	1.82	0.48	0.01	0.01	1.63	1.79
Ortalama	9.45	8.61	7.94	8.60	9.29	9.32	10.10	9.55	8.31	8.70	9.35	9.65

Diğer yandan, maksimum RMSE (1.83 g/L) Baranyi modeli ile belirlenirken maksimum MAE (1.52 g/L) ve MSD (1.08 g/L) ise MLM ile hesaplanmıştır. Benzer şekilde minimum R^2 değeri ve 1'e en uzak m değeri Baranyi model ile elde edilmiştir. Bunun anlamı, Baranyi modelinin kalıntı şeker konsantrasyonunun deneysel verilerini tanımlamada başarısız olduğudur. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki şeker tüketiminin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Fitzhugh model olduğu tespit edilmiştir (AIC=2.08).

Çizelge 4.43. PBD ile optimize edilen besiyerindeki şeker tüketimi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	Şeker tüketimi (g/L)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	1.24	0.99	0.70	0.9933	1.04	18.03	3.22	3.27
MLM	1.72	1.52	1.08	0.9934	1.01	26.52	8.33	8.33
MRM	1.24	1.00	0.71	0.9934	1.04	23.18	3.25	3.31
Stannard	0.52	0.42	0.29	0.9976	0.99	7.10	1.05	1.10
Weibull	1.48	1.10	0.78	0.9871	1.08	27.63	1.21	1.27
MMF	0.99	0.75	0.53	0.9945	1.01	17.28	0.89	1.18
Asimetrik	1.01	0.79	0.56	0.9906	1.02	12.73	1.21	1.42
Baranyi	1.83	1.51	1.07	0.9811	0.94	33.22	3.01	3.25
Huang	1.42	1.26	0.89	0.9850	0.99	26.70	2.93	3.21
Fitzhugh	0.55	0.41	0.29	0.9974	1.02	2.08	1.06	1.10
Cone	0.66	0.56	0.39	0.9959	1.00	6.77	0.95	1.14

İlaveten, Çizelge 4.43'te BF ve AF değerleri gösterilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna göre, MGM, MLM, MRM, Baranyi ve Huang modellerinin BF değerleri 1'den daha büyük elde edilmiş olup en yüksek BF değeri MLM ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.43). Bu sonuç, MGM, MLM, MRM, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modellerin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna göre, MMF ve Cone modellerinin BF değeri 1'in altında hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan 1'e en yakın BF değerleri Stannard ve Fitzhugh modelleri ile sırasıyla 1.05 ve 1.06 olarak hesaplanmıştır. Böylece, Stannard ve Fitzhugh modellerinin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır.

Diğer yandan, Çizelge 4.43'te AF değerleri de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %227, MLM için %733, MRM için %231, Stannard için %10, Weibull için %27, MMF için %18, Asimetrik için %42, Baranyi için %225, Huang için %221, Fitzhugh için %10 ve Cone için %14 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük

farklılık Stannard ve Fitzhugh modeli ile %10 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %733 ile MLM’de gözlemlenmiştir (Çizelge 4.43). Sonuç olarak Stannard ve Fitzhugh modellerini kullanmanın şeker tüketimini açıkça temsil ettiğini düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değerleri, 1’e yakın m değerleri, 1’e yakın BF değerleri ve %10 olan AF değerleri göstermiştir. Böylece, Stannard ve Fitzhugh modelleri, şeker tüketiminin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi tahmin etmiştir. Ayrıca, Stannard ve Fitzhugh modellerinin kullanılmasıyla tahmin edilen değerler, şeker tüketiminin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.1.2. *Iase* üretiminin matematiksel modellenmesi

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* üretimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.44) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.44’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.44. Deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	<i>Iase</i> (U/mL)	t (gün)	t (sa)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Iase</i> /10 (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0	0	0
$A_0/10$ (U/mL)	0.00	1	24	5.19	0.52
A_m (U/mL)	1011.02	2	48	24.27	2.43
$A_m/10$ (U/mL)	101.10	3	72	83.33	8.33
Q (U/mL/sa)	4.01	4	96	178.7	17.87
$Q/10$ (U/mL/gün)	9.63	5	120	275.9	27.59
λ (sa)	51.307	6	144	346.6	34.66
λ (gün)	2.138	7	168	462	46.2
v_1	0.01	8	192	518.5	51.85
v_2	303	9	216	624.3	62.43
h_0	205.87	12	288	874.8	87.48
$h_0/10$	20.59	13	312	1011	101.1
β	1133	15	360	929.7	92.97
k_1	0.0049				
k_2	0.0056				
δ_1	3				
δ_2	3.09				
d	2.9				
T_L	184.38				
k_3	0.0126				
v_3	6.02				
k_4	0.0056				
v_4	2.82				

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.40) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-4). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM, MLM,

MRM ve Stannard modelleri dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen minimum *Iase* aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel *Iase* aktivite değerine (0.00 U/mL) eşit olarak hesaplanmıştır. MGM, MLM, MRM ve Stannard modellerinin ise deneysel minimum *Iase* aktivite değerinden nispeten yüksek sonuçlar tahmin ettiği saptanmıştır. Bununla beraber, çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile tahmin edilen maksimum *Iase* aktivite değerleri, deneysel maksimum *Iase* aktivite değerinden (1011.02 U/mL) nispeten düşük hesaplanmış olup Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile deneysel maksimum *Iase* aktivite değerine (1011.02 U/mL) oldukça yaklaşılmıştır. Bununla birlikte, deneysel fermentasyonun 1. günündeki *Iase* aktivite değeri (5.19 U/mL), MGM, MLM, MRM ve Stannard modelleri ile yüksek tahmin edilirken Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri ile nispeten düşük tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 2. günündeki *Iase* aktivitesi (24.27 U/mL), MGM, MLM, MRM ve Cone modellerinin kullanımı ile nispeten yüksek hesaplanmış olup modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Fitzhugh ve Cone modelleri, fermentasyonun 3. günündeki deneysel *Iase* aktivitesini (83.33 U/mL) nispeten düşük tahmin ederken modellerin geri kalanı (MGM, MLM, MRM ve Huang) yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, MGM, MLM, MRM, Baranyi ve Huang modelleri, fermentasyonun 4. günündeki deneysel *Iase* aktivitesini (178.74 U/mL) nispeten yüksek tahmin etmiştir. Deneysel fermentasyonun 5. günündeki *Iase* aktivitesi (275.93 U/mL) yalnızca MGM, MLM ve MRM modelleri tarafından yüksek hesaplanmış olup geri kalan modeller ile düşük tahmin edilmiştir. Ayrıca, Weibull, MMF, Asimetrik ve Fitzhugh modellerinin fermentasyonun 6. günündeki *Iase* aktivitesini (346.61 U/mL) düşük hesaplamıştır. Diğer yandan, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasından yalnızca Weibull, MMF ve Asimetrik modelleri, deneysel fermentasyonun 7. günündeki *Iase* aktivitesini (462.02 U/mL) düşük tahmin etmiştir. Öte yandan, çalışmada kullanılan modellerin tamamı fermentasyonun 8. ve 9. günlerindeki *Iase* aktivitelerini (sırasıyla 518.47 U/mL ve 624.29 U/mL) yüksek hesaplamıştır. Ek olarak, deneysel fermentasyonun 12. günündeki *Iase* aktivitesini (874.78 U/mL) Weibull, Baranyi ve Huang modelleri nispeten yüksek tahmin ederken modellerin geri kalanı da düşük hesaplamıştır. Deneysel fermentasyonun 15. günündeki *Iase* aktivitesi ise (929.74 U/mL) çalışmada kullanılan MGM, MRM, MMF, Asimetrik ve Cone modelleri tarafından düşük hesaplanmıştır. Fermentasyonun 4. günü ve sonrasındaki Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen *Iase* aktivite değerleri birbirine eşit olmuş olup aralarındaki fark yalnızca adaptasyon ve geçiş fazlarında görülmektedir (Çizelge 4.45).

Çizelge 4.44'te verilen model parametrelerinin kullanımı ile PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun *Iase* aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.5) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.46'da verilmiştir. Çizelge 4.46'dan tespit edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (35.69 U/mL), MAE (22.33 U/mL) ve MSD (15.79 U/mL) değerleri Huang modeli ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9967) Huang modelin kullanımı ile tespit edilirken ve 1'e en yakın veya eşit m değeri ise sırasıyla Stannard ve Fitzhugh modelleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.45. PBD ile deneysel *Iase* üretim verilerinin modellerden hesaplanan *Iase* üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	8.94	57.17	9.40	0.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	5.19	26.29	81.54	26.94	5.60	1.64	2.04	2.73	0.00	0.25	0.31	3.51
2	24.27	60.44	115.05	61.11	22.83	13.07	17.15	20.00	2.35	10.95	8.69	24.28
3	83.33	114.92	159.97	115.42	63.78	43.44	57.59	62.08	83.03	83.78	45.01	72.45
4	178.74	188.71	218.15	188.98	135.00	99.94	129.52	132.38	179.33	179.34	119.82	149.65
5	275.93	276.74	290.27	276.83	233.26	185.99	228.98	225.93	275.63	275.63	225.74	248.55
6	346.61	371.89	374.96	371.93	347.49	299.49	343.39	331.71	371.93	371.93	346.55	356.68
7	462.02	467.18	468.30	467.28	464.58	432.27	457.99	437.73	468.23	468.23	466.99	462.12
8	518.47	557.14	564.26	557.37	574.01	571.36	561.90	535.16	564.53	564.53	576.88	557.01
9	624.29	638.25	656.12	638.65	669.59	702.10	649.99	619.53	660.83	660.83	671.27	637.98
12	874.78	818.24	862.30	818.94	862.51	950.18	823.08	793.35	949.71	949.70	859.83	802.53
13	1011.02	858.69	904.45	859.41	900.63	982.65	858.03	830.39	1010.70	1010.70	897.34	837.43
15	929.74	917.28	958.32	917.94	950.97	1006.84	907.08	884.03	1011.00	1011.00	947.53	888.06
Ortalama	410.34	408.05	439.30	408.48	402.39	406.84	387.44	375.00	429.02	429.76	397.38	387.71

Diğer yandan, maksimum RMSE (60.50 U/mL) Asimetrik model ile belirlenirken maksimum MAE (47.28 U/mL) ve MSD (33.43 U/mL) ise MLM ile belirlenmiştir. Benzer şekilde minimum R^2 değeri (0.9830) Cone modelin kullanımı ile belirlenirken ve 1'e en uzak m değeri (0.89) ise MLM ile tespit edilmiştir. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki *Iase* aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Huang model olduğu belirlenmiştir (AIC=110.44).

Çizelge 4.46. PBD ile optimize edilen besiyerindeki *Iase* aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>Iase</i> aktivitesi (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	49.49	31.77	22.47	0.9876	0.90	113.89	0.80	1.29
MLM	56.33	47.28	33.43	0.9906	0.89	117.26	0.66	1.54
MRM	49.37	31.87	22.54	0.9876	0.90	118.88	0.80	1.30
Stannard	41.19	27.45	19.41	0.9865	0.99	120.67	1.05	1.10
Weibull	55.76	47.06	33.28	0.9843	1.08	122.05	1.29	1.36
MMF	51.53	33.53	23.71	0.9840	0.94	119.99	1.19	1.22
Asimetrik	60.50	37.90	26.80	0.9860	0.91	119.11	1.17	1.18
Baranyi	36.02	22.99	16.26	0.9966	1.06	110.68	2.57	2.73
Huang	35.69	22.33	15.79	0.9967	1.06	110.44	1.30	1.39
Fitzhugh	45.43	32.67	23.10	0.9844	1.00	116.72	1.47	1.52
Cone	55.87	32.23	22.79	0.9836	0.91	122.10	1.08	1.10

Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.46'da verilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, Baranyi modelinin BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.46). Bu sonuç, Baranyi modeli ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MGM, MLM ve MRM modellerinin BF değeri 1'in altında tespit edilmiş olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu belirlenmiştir. Öte yandan 1'e en yakın BF değerleri Stannard ve Cone modelleri ile sırasıyla 1.05 ve 1.08 olarak saptanmıştır. Böylece, Stannard ve Cone modellerinin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az bir farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır. İlaveten, Çizelge 4.46'da AF değerleri de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %29, MLM için %54, MRM için %30, Stannard için %10, Weibull için %36, MMF için %22, Asimetrik için %18, Baranyi için %173, Huang için %39, Fitzhugh için %52 ve Cone için %10 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Stannard ve Cone modelleri ile %10 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %173 ile Baranyi modelinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.46). Sonuç olarak Huang modelini kullanmanın *Iase* aktivitesini açıkça temsil ettiğini düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değeri ve 1'e yakın m değeri göstermiştir.

Ayrıca, 1'e yakın BF ve AF değerleri ile de Stannard modelin *Iase* aktivitesini temsil ettiği de görülmektedir. Böylece, Stannard ve Huang modelleri, *Iase* aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır. Ayrıca, Stannard ve Huang modellerinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, *Iase* aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.1.3. Sase üretiminin matematiksel modellenmesi

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *Sase* üretimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.47) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.47'de sunulmuştur. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.48) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-5). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM, MLM ve MRM modelleri dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen minimum *Sase* aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel *Sase* aktivitesi (0.00 U/mL) ile eşit tahmin edilmiştir. Bu modellerin arasından MGM ile *Sase* aktivitesi (0.02 U/mL), fermentasyonun başlangıcındaki *Sase* aktivitesine oldukça yakın hesaplanmış olup MLM ve MRM ile ise yüksek tahmin edilmiştir.

Çizelge 4.47. Deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	<i>Sase</i> (U/mL)	<i>t</i> (gün)	<i>t</i> (sa)	<i>Sase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> /10 (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0	0.00	0.00
$A_0/10$ (U/mL)	0.00	1	24	1.61	0.16
A_m (U/mL)	864.84	2	48	11.99	1.20
$A_m/10$ (U/mL)	86.48	3	72	31.58	3.16
Q (U/mL/sa)	4.57	4	96	79.91	7.99
$Q/10$ (U/mL/gün)	10.97	5	120	141.07	14.11
λ (sa)	97.077	6	144	212.55	21.26
λ (gün)	4.045	7	168	308.35	30.84
v_1	0.93	8	192	451.42	45.14
v_2	300	9	216	556.53	55.65
h_o	443.59	12	288	864.84	86.48
$h_o/10$	44.36	13	312	857.72	85.77
β	930	15	360	861.77	86.18
k_1	0.00471				
k_2	0.0053				
δ_1	3				
δ_2	4.5				
d	4.37				
T_L	192.54				
k_3	0.0154				
v_3	12.12				
k_4	0.00532				
v_4	4.26				

Deneysel fermentasyonun 12. gününde maksimum Sase aktivitesi elde edilmiştir (864.84 U/mL). Çalışmada kullanılan Baranyi ve Huang modelleri ile fermentasyonun 13. ve 15. günlerinde tahmin edilen maksimum Sase aktivite değerleri, deneysel maksimum Sase aktivitesine eşit olmuştur. Ancak fermentasyonun 12. gününde tahmin edilen bütün Sase aktivite değerleri, deneysel fermentasyonun 12. gününde belirlenen maksimum Sase aktivite değerinden düşük olmuştur. Diğer yandan, deneysel fermentasyonun 1., 2. ve 4. günlerindeki Sase aktivite değerleri (sırasıyla 1.61 U/mL, 11.99 U/mL, ve 79.91 U/mL), yalnızca MLM ve MRM modelleri ile yüksek tahmin edilirken modellerin geri kalanı (MGM, Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile düşük hesaplanmıştır. Öte yandan, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri fermentasyonun 1. günündeki aktivite değerini 0.00 U/mL olarak tahmin ederken ilginç şekilde Baranyi modeli fermentasyonun 2. ve 3. günündeki aktivite değerlerini de 0.00 U/mL olarak hesaplamıştır. Bununla beraber, MLM, MRM ve Weibull modelleri, fermentasyonun 3. ve 5. günlerindeki deneysel Sase aktivite değerleri (sırasıyla 31.58 U/mL ve 141.07 U/mL) yüksek tahmin ederken modellerin geri kalanı (MGM, Stannard, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) düşük hesaplamıştır. Diğer yandan, Stannard, MMF, Asimetrik ve Cone modelleri, fermentasyonun 6. günündeki deneysel Sase aktivitesini (212.55 U/mL) nispeten düşük tahmin etmiştir. Deneysel fermentasyonun 7. günündeki Sase aktivitesi (308.35 U/mL) yalnızca Stannard ve Asimetrik modelleri tarafından düşük hesaplanmış olup geri kalan modeller (MGM, MLM, MRM, Weibull, MMF, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile yüksek tahmin edilmiştir. Ayrıca, Weibull, Fitzhugh ve Cone modellerinin fermentasyonun 8. günündeki Sase aktivitesini (451.42 U/mL) yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasında yalnızca Weibull, MMF ve Cone modelleri, deneysel fermentasyonun 9. günündeki Sase aktivitesini (556.53 U/mL) düşük tahmin etmiştir. Öte yandan, çalışmada kullanılan modellerden Baranyi ve Huang modelleri haricinde geri kalan modellerin tamamı deneysel fermentasyonun 13. ve 15. günlerindeki Sase aktivitelerini (sırasıyla 857.72 U/mL ve 861.77 U/mL) düşük hesaplamıştır (Çizelge 4.48).

Çizelge 4.47'de verilen model parametrelerinin kullanımı ile PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun Sase aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.5) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.49'da sunulmuştur. Çizelge 4.49'dan elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (23.54 U/mL) Huang modeli ile elde edilirken minimum MAE (13.01 U/mL) ve MSD (9.20 U/mL) değerleri de Weibull modeli ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9967) ve 1'e en yakın m değeri Huang model ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, maksimum RMSE (51.36 U/mL), MAE (36.43 U/mL) ve MSD (25.76 U/mL) ise Stannard modeli ile belirlenmiştir. Benzer şekilde minimum R^2 değeri (0.9910) Fitzhugh modelin kullanımı ile belirlenirken ve 1'e en uzak m değerleri (0.90) ise MGM, MLM ve MRM ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüttür. Deneysel verileri tanımlamada en iyi model, minimum AIC değerine sahip olan modelin olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki Sase aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Huang model olduğu belirlenmiştir (AIC=99.63).

Çizelge 4.48. PBD ile deneysel Sase üretim verilerinin modellerden hesaplanan Sase üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	0.02	14.79	13.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.61	0.37	24.28	22.29	0.08	1.25	0.08	0.10	0.00	0.00	0.00	0.13
2	11.99	3.53	39.59	37.15	1.39	9.94	1.82	1.99	0.00	0.01	0.33	2.57
3	31.58	17.56	63.81	61.08	9.80	33.08	11.18	11.59	0.00	0.42	6.75	14.27
4	79.91	54.70	101.04	98.36	38.36	76.36	39.46	39.43	4.77	16.65	37.57	46.74
5	141.07	122.33	155.77	153.62	99.25	142.86	99.82	97.23	104.75	105.34	108.27	111.37
6	212.55	216.35	231.18	229.94	192.25	231.79	197.73	189.70	214.41	214.42	213.90	210.34
7	308.35	324.04	326.29	325.94	304.43	337.89	321.97	307.28	324.08	324.08	335.17	330.90
8	451.42	431.42	433.75	433.74	418.95	452.02	449.38	429.76	433.75	433.75	452.83	451.94
9	556.53	528.39	541.04	540.67	522.95	563.10	560.07	538.82	543.41	543.41	555.10	556.83
12	864.84	725.85	764.88	762.98	731.02	793.56	752.62	737.84	860.99	860.99	748.47	744.00
13	857.72	763.88	801.75	799.94	769.62	828.63	783.36	771.27	864.84	864.84	782.79	775.30
15	861.77	812.60	840.84	839.63	817.61	858.23	820.04	812.12	864.84	864.84	824.72	813.75
Ortalama	336.87	307.77	333.77	332.20	300.44	332.98	310.58	302.86	324.29	325.29	312.76	312.16

Çizelge 4.49. PBD ile optimize edilen besiyerindeki *Sase* aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	Sase aktivitesi (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	50.57	32.10	22.70	0.9927	0.90	114.45	1.38	1.39
MLM	37.19	29.21	20.65	0.9966	0.90	106.46	0.69	1.51
MRM	37.19	28.45	20.12	0.9965	0.90	111.52	0.70	1.48
Stannard	51.36	36.43	25.76	0.9941	0.92	126.41	1.84	1.84
Weibull	23.61	13.01	9.20	0.9963	0.96	99.70	1.03	1.07
MMF	43.10	28.93	20.46	0.9924	0.94	115.35	1.75	1.76
Asimetrik	49.17	34.01	24.05	0.9939	0.92	113.72	1.74	1.74
Baranyi	26.19	16.85	11.91	0.9961	1.03	102.40	19.08	19.28
Huang	23.54	15.86	11.21	0.9969	1.02	99.63	5.82	5.89
Fitzhugh	43.74	28.66	20.27	0.9910	0.94	115.74	3.00	3.04
Cone	45.22	28.30	20.01	0.9916	0.92	116.60	1.57	1.58

Öte yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.49'da sunulmuştur. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modellerinin BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.49). Bu sonuç, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MLM ve MRM modellerinin BF değeri 1'den oldukça düşük hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu saptanmıştır. Öte yandan 1'e en yakın BF değeri Weibull modeli ile 1.03 olarak hesaplanmıştır. Böylece, Weibull modelinin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az bir farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.48). İlaveten, Çizelge 4.49'da AF değerleri de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %39, MLM için %51, MRM için %48, Stannard için %84, Weibull için %7, MMF için %76, Asimetrik için %74, Baranyi için %1828, Huang için %489, Fitzhugh için %204 ve Cone için %58 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Weibull modeli ile %7 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %1828 ile Baranyi modelinde hesaplanmıştır (Çizelge 4.49). Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile hesaplanan BF ve AF değerlerinin 1'den oldukça yüksek olmasının nedeni olarak lag fazı ve geçiş fazı değerlerinin deneysel fermentasyon değerlerinden daha düşük hesaplanması olarak düşünülmüştür (Çizelge 4.48). Sonuç olarak düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değeri ve 1'e yakın m değerleri ile Weibull ve Huang modelini kullanmanın *Sase* aktivitesini başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Ayrıca, 1'e yakın BF ve AF değerleri ile de Weibull modelin *Sase* aktivitesini başarılı bir şekilde hesapladığı belirlenmiştir. Böylece, Weibull ve Huang modelleri, *Sase* aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi tahmin etmiştir. Öte yandan Weibull ve Huang modellerinin kullanılmasıyla tahmin edilen değerler, *Sase* aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.1.4. S/I oranının matematiksel modellenmesi

PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* ve *Sase* üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesi ile hesaplanan *Iase* ve *Sase* değerlerinin birbirine oranı ile deneysel ve tahmin edilen S/I oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.50). Bununla beraber, hem deneysel hem de hesaplanan S/I oranları grafikte gösterilmiştir (EK-6). *Iase* ve *Sase* aktivitelerinin model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre S/I oranları hesaplanmış ve deneysel S/I oranları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.50). Deneysel fermentasyonun başlangıcındaki *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri 0.00 U/mL olduğu için S/I oranları hesaplanmamıştır. Fermentasyonun 1. ve 2. günü için hesaplanan S/I oranları sırasıyla 0.31 (minimum değer) ve 0.49 olarak hesaplanmış olup MRM ve Weibull modelleri ile S/I oranları yüksek tahmin edilmiştir. Modellerin geri kalanı (MGM, MLM, Stannard, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ise düşük tahmin etmiş olup bunların arasından MLM modeli S/I oranını deneysel S/I oranına en yakın tahmin etmiştir. Öte yandan, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile fermentasyonun 1. günündeki S/I oranlarını 0.00 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.50. Deneysel S/I oranlarının modellerden hesaplanan S/I oranları ile karşılaştırılması

Model	t (gün)												Ortalama
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	15	
Deneysel	0.31	0.49	0.38	0.45	0.51	0.61	0.67	0.87	0.89	0.99	0.85	0.93	0.66
MGM	0.01	0.06	0.15	0.29	0.44	0.58	0.69	0.77	0.83	0.89	0.89	0.89	0.54
MLM	0.30	0.34	0.40	0.46	0.54	0.62	0.70	0.77	0.82	0.89	0.89	0.88	0.63
MRM	0.83	0.61	0.53	0.52	0.55	0.62	0.70	0.78	0.85	0.93	0.93	0.91	0.73
Stannard	0.02	0.06	0.15	0.28	0.43	0.55	0.66	0.73	0.78	0.85	0.85	0.86	0.52
Weibull	0.76	0.76	0.76	0.76	0.77	0.77	0.78	0.79	0.80	0.84	0.84	0.85	0.79
MMF	0.04	0.11	0.19	0.30	0.44	0.58	0.70	0.80	0.86	0.91	0.91	0.90	0.56
Asimetrik	0.04	0.10	0.19	0.30	0.43	0.57	0.70	0.80	0.87	0.93	0.93	0.92	0.56
Baranyi	0.00	0.00	0.00	0.03	0.38	0.58	0.69	0.77	0.82	0.91	0.86	0.86	0.49
Huang	0.00	0.00	0.00	0.09	0.38	0.58	0.69	0.77	0.82	0.91	0.86	0.86	0.50
Fitzhugh	0.00	0.04	0.15	0.31	0.48	0.62	0.72	0.78	0.83	0.87	0.87	0.87	0.55
Cone	0.04	0.11	0.20	0.31	0.45	0.59	0.72	0.81	0.87	0.93	0.93	0.92	0.57

Fermentasyonun 2. ve 3. günündeki S/I oranları da Baranyi ve Huang modelleri ile 0.00 olarak tahmin edilmiştir. Bunun nedeni olarak bu modellerden *Sase* aktivite değerlerinin 0.00 U/mL olarak hesaplanmasıdır. Maksimum S/I oranı ise deneysel fermentasyonunun 12. gününde 0.99 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile deneysel fermentasyonun 12. günündeki S/I oranı düşük tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 3., 4., ve 5. günlerindeki S/I oranları (sırasıyla 0.38, 0.45 ve 0.51) MRM ve Weibull modellerinin yanı sıra MLM modeli ile de yüksek hesaplanmış olup geri kalan modeller (MGM, Stannard, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile S/I oranları düşük tahmin edilmiştir. Bununla beraber, MLM, MRM, Weibull ve Fitzhugh modelleri, 6. günündeki deneysel S/I oranını (0.61) yüksek hesaplamıştır. Fermentasyonun 7. günündeki S/I oranı (0.67) yalnızca Stannard modeli ile düşük tahmin edilmiş olup 8., 9., 12. ve 15. günlerindeki S/I oranları (sırasıyla 0.87, 0.89, 0.99 (maksimum değer) ve 0.93) çalışmada kullanılan

bütün modeller tarafından düşük hesaplanmıştır. Öte yandan, 13. gündeki S/I oranı (0.85) yalnızca Weibull model tarafından düşük hesaplanmış, yalnızca Stannard model ile eşit tahmin edilmiş ve modellerin geri kalanı (MGM, MLM, MRM, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile de yüksek hesaplanmıştır. Ayrıca, modeller ile 5. günden itibaren hesaplanan S/I oranlarının deneysel S/I oranlarına genel olarak yaklaştığı da Çizelge 4.50'deki değerlerden anlaşılmaktadır (EK-6). Modellerin yardımı ile hesaplanan S/I oranlarının sonuçları model değerlendirme kriterlerine tabi tutulmuş olup model validasyonları Çizelge 4.51'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.51'den elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (0.07), MAE (0.05) ve MSD (0.04) MLM ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9293) ve 1'e en yakın m değeri de MLM ile hesaplanmıştır. Ayrıca, maksimum RMSE (0.61) Baranyi modeli ile, maksimum MAE (0.20) ve MSD (0.14) ise Weibull modeli ile belirlenmiştir. Benzer şekilde minimum R^2 değeri (0.5496) MRM'nin kullanımı ile belirlenirken ve 1'e en uzak m değeri (1.54) ise Baranyi modeli ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüttür. Deneysel verileri tanımlamada en iyi model, minimum AIC değerine sahip olan modelin olduğu öne sürülmektedir. Bu açıklamadan yola çıkarak en düşük AIC değerine sahip olan modelin MLM olduğu belirlenmiştir (AIC=-58.87). Tam tersine, maksimum AIC değeri (3.73) Baranyi modeli ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.51'de gösterilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.51). Bu sonuç, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile hesaplanan değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modellerin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MRM ve Weibull modellerinin BF değeri 1'den düşük hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu saptanmıştır. Öte yandan 1'e en yakın BF değeri MLM ile 1.05 olarak hesaplanmıştır. Böylece, MLM'nin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az bir farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.51).

Çizelge 4.51. S/I oranı için matematiksel modellerin validasyonu

Model	S/I oranı							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	0.18	0.13	0.09	0.8930	1.35	-33.26	1.80	1.82
MLM	0.07	0.05	0.04	0.9293	0.90	-58.87	1.05	1.09
MRM	0.17	0.10	0.07	0.5496	0.51	-30.17	0.87	1.20
Stannard	0.19	0.14	0.10	0.8929	1.29	-20.64	1.84	1.84
Weibull	0.24	0.20	0.14	0.7563	0.13	-21.08	0.79	1.37
MMF	0.16	0.12	0.08	0.9137	1.36	-31.40	1.51	1.54
Asimetrik	0.16	0.12	0.08	0.9173	1.39	-35.94	1.54	1.57
Baranyi	0.61	0.15	0.12	0.8935	1.54	3.73	20.74	20.90
Huang	0.23	0.17	0.12	0.8982	1.51	-21.44	5.06	5.10
Fitzhugh	0.18	0.13	0.09	0.8612	1.33	-27.57	2.17	2.21
Cone	0.16	0.11	0.08	0.9105	1.37	-31.66	1.49	1.53

Diğer yandan Çizelge 4.51, AF değerlerini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %82, MLM için %9, MRM için %20, Stannard için %84, Weibull için %37, MMF için %54, Asimetrik için %57, Baranyi için %1990, Huang için %410, Fitzhugh için %121 ve Cone için %53 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık MLM ile %9 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %1990 ile Baranyi modelinde hesaplanmıştır (Çizelge 4.51). Sonuç olarak düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değeri, 1'e yakın m , BF ve AF değerleri ile MLM'yi kullanmanın S/I oranını başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Böylece, MLM, S/I oranının deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır. Ayrıca, MLM'nin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, S/I oranının deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.1.5. Deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Diğer yandan, modellerden hesaplanan kinetik değerler kullanılarak deneysel kinetik değerler ile daha fazla kıyaslama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hem reel değerlerden hem de modeller ile tahmin edilen değerlerden I_{ase} , S_{ase} , S/I oranı, Q_{Iase} , Q_{Sase} , $Q_{şeker}$ ve SUY kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Deneysel ve tahmin edilen kinetik değerlere ait veriler Çizelge 4.52'de verilmiştir.

Çizelge 4.52. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyondan deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Model	Kinetik parametreler						
	I_{ase} (U/mL)	S_{ase} (U/mL)	S/I oranı	Q_{Iase} (U/mL/sa)	Q_{Sase} (U/mL/sa)	$Q_{şeker}$ (g/L/sa)	SUY (%)
Deneysel	1011.02	864.84	0.86	4.01	4.57	0.28	94.45
MGM	917.28	812.60	0.89	3.97	4.26	0.25	99.96
MLM	958.32	840.84	0.88	3.94	4.22	0.26	100.00
MRM	917.94	839.63	0.91	3.97	4.25	0.25	99.96
Stannard	950.97	817.61	0.86	4.82	4.72	0.26	94.38
Weibull	1006.84	858.23	0.85	5.66	4.59	0.35	94.45
MMF	907.08	820.04	0.90	4.77	5.24	0.28	93.81
Asimetrik	884.03	812.12	0.92	4.41	5.00	0.27	98.37
Baranyi	1011.00	864.84	0.86	3.98	4.49	0.19	99.96
Huang	1011.00	864.84	0.86	4.01	4.50	0.23	99.96
Fitzhugh	947.53	824.72	0.87	5.03	4.98	0.30	94.44
Cone	888.06	813.75	0.92	4.45	5.03	0.28	93.90

Elde edilen sonuçlara göre, çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile tahmin edilen I_{ase} eaktiviteleri deneysel I_{ase} aktivitesinden düşük hesaplanmıştır. Bununla beraber, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen I_{ase} aktiviteleri, deneysel I_{ase} aktivitesine yakın hesaplanmıştır. Diğer yandan, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen S_{ase} değerleri deneysel S_{ase} değerine eşit olarak hesaplanırken diğer modeller ile tahmin edilen S_{ase} değerleri deneysel S_{ase} değerlerinden düşük tahmin edilmiştir. Ayrıca, Stannard, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen S/I oranı değerleri deneysel S/I oranına eşit olarak

hesaplanmıştır. MGM, MLM, MRM, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile S/I oranları deneysel S/I oranından yüksek hesaplanmış olup yalnızca Weibull modeli ile düşük tahmin edilmiştir. Diğer yandan, Q_{Iase} değerleri de hesaplanmış olup deneysel değeri 4.01 U/mL/sa olarak hesaplanmıştır. Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik Fitzhugh ve Cone modellerinden hesaplanan Q_{Iase} değerleri deneysel Q_{Iase} değerinden yüksek olmuş olup yalnızca Huang modeli ile deneysel değere eşit olarak hesaplanmıştır. Modellerin geri kalanı ile deneysel değerden düşük hesaplanmıştır. Hem deneysel fermentasyon verilerinden hem de modellerden hesaplanan fermentasyon verileri ile Q_{Sase} değerleri de hesaplanmış olup Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile deneysel değerden (4.57 U/mL/sa) yüksek hesaplanmıştır. Geriye kalan modeller, deneysel Q_{Sase} değerini daha düşük tahmin etmiştir. Öte yandan, MMF ve Cone modelleri ile hesaplanan $Q_{şeker}$ değeri, deneysel $Q_{şeker}$ değerine (0.28 g/L/sa) eşit olmuştur. Weibull ve Fitzhugh modelleri ile daha yüksek hesaplanmıştır. Bu dört modelin dışındaki modeller ise deneysel $Q_{şeker}$ değerini düşük tahmin etmiştir. Şeker kullanım oranı (SUY) da hesaplanmış olup Weibull modeli ile hesaplanan SUY değeri deneysel değere (%94.45) eşit olmuştur. Ayrıca, Stannard, MMF, Fitzhugh ve Cone modelleri, deneysel SUY değerini düşük hesaplamıştır (Çizelge 4.52). Sonuç olarak, model kıyaslama verilerine göre şeker tüketiminin deneysel verileri Stannard ve Fitzhugh modelleri ile, $Iase$ üretiminin deneysel verileri Stannard ve Huang modelleri ile, $Sase$ üretiminin deneysel verileri Weibull ve Huang modelleri ile ve S/I oranının deneysel verileri ise MLM ile başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir.

4.15.2. MKD ile optimize edilen besiyerindeki fermentasyon

4.15.2.1. Şeker tüketiminin matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.53) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.53'te sunulmuştur. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel şeker tüketim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.54) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-7). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, Weibull, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile tahmin edilen $Şeker_{max}$, fermentasyonun başlangıcındaki deneysel $Şeker_{max}$ değerine (22.17 g/L) eşit olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, MGM, MLM, MRM, Stannard, Baranyi ve Huang modelleri ile $Şeker_{max}$, deneysel $Şeker_{max}$ değerinden nispeten düşük tahmin edilmiştir. Benzer şekilde, deneysel fermentasyonun sonundaki $Şeker_{min}$ (0.51 g/L), Stannard, Weibull ve Fitzhugh modelleri ile eşit olarak tahmin edilirken MGM, MLM, MRM, Asimetrik, Baranyi ve Huang modellerinin kullanımı ile tahmin edilen $Şeker_{min}$, deneysel $Şeker_{min}$ değerinden daha düşük hesaplanmıştır. Bununla beraber, MMF ve Cone modelleri ile deneysel $Şeker_{min}$ değeri nispeten yüksek tahmin edilmiştir. Diğer yandan, deneysel fermentasyonun 1., 6., 7., 8., 9., 10., 11. ve 12.günlerindeki kalıntı şeker konsantrasyonu (sırasıyla 21.68 g/L, 2.63 g/L, 2.46 g/L, 2.20 g/L, 1.57 g/L, 1.52 g/L 1.23 g/L ve 1.14 g/L), çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile düşük hesaplanmıştır. Deneysel fermentasyonun 2. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonu (15.32 g/L), yalnızca Weibull ve Huang modellerinin kullanımı ile nispeten yüksektahmin edilmiş olup modellerin geri kalanı

(MGM, MLM, MRM, Stannard, MMF, Asimetrik, Baranyi, Fitzhugh ve Cone modelleri) da deneysel kalıntı şeker konsantrasyonunu nispeten düşük hesaplamıştır. Weibull, MMF, Fitzhugh ve Cone modelleri, deneysel fermentasyonun 3. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (7.93 g/L) nispeten düşük tahmin ederken modellerin geri kalanı (MGM, MLM, MRM, Stannard, Asimetrik, Baranyi ve Huang modelleri) da yüksek tahmin etmiştir. Öte yandan, yalnızca MMF ve Weibull modelleri dışındaki modeller, fermentasyonun 4. günündeki deneysel kalıntı şeker konsantrasyonunu (3.89 g/L) yüksek hesaplarken deneysel fermentasyonun 5. günündeki kalıntı şeker konsantrasyonunu (3.78 g/L) yalnızca Baranyi ve Huang modelleri ile yüksek tahmin edilmiştir. Çizelge 4.53'te verilen model parametrelerinin kullanımı ile MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonundaki kalıntı şeker konsantrasyonu, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.55'te özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (0.75 g/L), MAE (0.63 g/L) ve MSD (0.45 g/L) değerleri ve maksimum R^2 değeri (0.9958) Cone modeli ile elde edilmiştir. 1'e en yakın veya eşit m değerleri ise MMF ve Asimetrik modelleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.53. Deneysel şeker tüketim verilerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel şeker tüketim verileri

Parametre	S (g/L)	t (gün)	t (sa)	S (g/L)	S/10
A_0 (g/L)	0.51	0	0	22.17	2.22
$A_0/10$ (g/L)	0.05	1	24	21.68	2.17
A_m (g/L)	22.17	2	48	15.32	1.53
$A_m/10$ (g/L)	2.22	3	72	7.93	0.79
Q (g/L/sa)	0.29	4	96	3.89	0.39
$Q/10$ (g/L/gün)	0.69	5	120	3.78	0.38
λ (sa)	22.90	6	144	2.63	0.26
λ (gün)	0.954	7	168	2.46	0.25
v_1	0.001	8	192	2.2	0.22
v_2	8.27	9	216	1.57	0.16
h_o	6.562	10	240	1.52	0.15
$h_o/10$	0.656	11	264	1.23	0.12
β	3.5	12	288	1.14	0.11
k_1	0.0147	15	360	0.51	0.05
k_2	0.0173				
δ_1	3				
δ_2	3.07				
d	2.603				
T_L	61.76				
k_3	0.039				
v_3	6.2				
k_4	0.017				
v_4	3.169				

S: Deneysel kalıntı şeker miktarı

Çizelge 4.54. MKD ile deneysel şeker tüketim verilerinin modellerden hesaplanan şeker tüketim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (g/L)	Matematiksel modeller (g/L)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	22.17	22.12	21.29	22.12	21.84	22.17	22.17	22.17	21.66	21.66	22.17	22.17
1	21.68	20.55	19.39	20.55	19.45	21.24	20.81	20.43	18.09	20.50	21.18	20.98
2	15.32	14.98	14.83	14.98	13.94	15.76	14.35	14.60	13.98	15.62	14.48	14.72
3	7.93	8.52	8.18	8.51	8.16	7.13	7.82	8.90	9.90	10.64	7.44	7.99
4	3.89	4.17	3.20	4.17	4.30	1.82	4.28	5.34	6.41	6.70	3.50	4.30
5	3.78	1.90	1.03	1.90	2.26	0.60	2.59	3.34	3.81	3.92	1.73	2.56
6	2.63	0.84	0.31	0.84	1.30	0.51	1.75	2.20	2.13	2.16	1.00	1.71
7	2.46	0.37	0.09	0.37	0.86	0.51	1.30	1.53	1.13	1.15	0.70	1.26
8	2.20	0.16	0.03	0.16	0.66	0.51	1.04	1.10	0.59	0.59	0.59	1.01
9	1.57	0.07	0.01	0.07	0.58	0.51	0.88	0.82	0.30	0.30	0.54	0.86
10	1.52	0.03	0.00	0.03	0.54	0.51	0.78	0.63	0.15	0.15	0.52	0.76
11	1.23	0.01	0.00	0.01	0.54	0.51	0.71	0.49	0.08	0.08	0.52	0.70
12	1.14	0.01	0.00	0.01	0.52	0.51	0.67	0.40	0.04	0.04	0.51	0.65
15	0.51	0.00	0.00	0.00	0.51	0.51	0.59	0.22	0.00	0.00	0.51	0.58
Ortalama	6.29	5.27	4.88	5.27	5.39	5.20	5.70	5.87	5.59	5.97	5.39	5.73

Bununla beraber, MLM ve Cone modellerinin eğim değerleri de 1'e en yakın değerleri olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, maksimum RMSE (1.65 g/L), MAE (1.44 g/L) ve MSD (1.02 g/L) MLM modeli ile tespit edilirken minimum R^2 değeri Baranyi modeli ile saptanmıştır. Diğer yandan 1'e en uzak m değerleri MGM, MRM, Weibull ve Baranyi modelleri ile elde edilmiştir. Öte yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiştir. Minimum AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki şeker tüketiminin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Asimetrik model olduğu tespit edilmiş olup (AIC=7.92) bunu sırasıyla Cone (AIC=9.37) ve MMF (AIC=10.12) modelleri takip etmiştir. Ayrıca, Çizelge 4.55'te BF ve AF değerleri de verilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna göre, MGM, MLM, MRM, Weibull, Baranyi ve Huang modellerinin BF değerleri 1'den daha büyük elde edilmiş olup en yüksek BF değeri MLM ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.55). Bu sonuç, MGM, MLM, MRM, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modellerin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri de modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Elde edilen sonuçlara göre, modellerden tahmin edilen veriler kullanılarak 1'in altında hesaplanmış bir BF değeri elde edilmemiştir. Bununla beraber, 1'e en yakın BF değerleri MMF ve Cone modelleri ile sırasıyla 1.37 ve 1.38 olarak hesaplanmış olup bu modellerin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.54).

Çizelge 4.55. MKD ile optimize edilen besiyerindeki şeker tüketimi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	Şeker tüketimi (g/L)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	1.33	1.15	0.81	0.9902	1.05	20.35	8.75	8.93
MLM	1.65	1.44	1.02	0.9873	1.01	26.39	39.08	39.25
MRM	1.33	1.15	0.81	0.9902	1.05	25.42	8.77	8.95
Stannard	1.17	0.99	0.70	0.9900	0.98	28.30	1.67	1.70
Weibull	1.45	1.15	0.81	0.9884	1.06	27.99	2.23	2.24
MMF	0.77	0.66	0.47	0.9957	1.00	10.12	1.37	1.41
Asimetrik	0.85	0.77	0.54	0.9900	1.00	7.92	1.48	1.57
Baranyi	1.61	1.34	0.95	0.9617	0.95	30.76	3.23	3.59
Huang	1.41	1.17	0.83	0.9680	1.02	27.12	3.17	3.60
Fitzhugh	1.10	0.90	0.64	0.9944	1.03	20.11	1.82	1.82
Cone	0.75	0.63	0.45	0.9958	1.01	9.37	1.38	1.43

Diğer yandan, Çizelge 4.55'te AF değerleri de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %793, MLM için %8925, MRM için %795, Stannard için %70, Weibull için %124, MMF için %41, Asimetrik için %57, Baranyi için %259, Huang için %260, Fitzhugh için %82 ve Cone için %43 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık MMF ve Cone modelleri ile sırasıyla %41 ve %43 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %8925 ile MLM'de gözlemlenmiştir (Çizelge 4.55). Sonuç olarak MMF ve

Cone modellerini kullanmanın şeker tüketimini başarılı bir şekilde temsil ettiğini düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değerleri, 1'e yakın veya eşit m değerleri, sırasıyla 1.37 ve 1.38 BF değerleri ve sırasıyla %41 ve %43 olan AF değerleri göstermiştir. Böylece, MMF ve Cone modelleri, şeker tüketiminin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha başarılı bir şekilde tahmin etmiştir. Ayrıca, MMF ve Cone modellerinin kullanılmasıyla tahmin edilen değerler, şeker tüketiminin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.2. *Iase* üretiminin matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* üretimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.56) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.56'da gösterilmiştir. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.57) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-8).

Çizelge 4.56. Deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>t</i> (gün)	<i>t</i> (sa)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Iase</i> /10 (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0	0.00	0.00
$A_0/10$ (U/mL)	0.00	1	24	3.44	0.34
A_m (U/mL)	1103.12	2	48	34.16	3.42
$A_m/10$ (U/mL)	110.31	3	72	119.73	11.97
Q (U/mL/sa)	5.34	4	96	298.90	29.89
$Q/10$ (U/mL/gün)	12.82	5	120	382.52	38.25
λ (sa)	46.20	6	144	519.11	51.91
λ (gün)	1.92	7	168	536.89	53.69
v_1	0.26	8	192	664.07	66.41
v_2	353.51	9	216	847.95	84.80
h_o	246.73	10	240	885.16	88.52
$h_o/10$	24.67	11	264	1014.14	101.41
β	1373	12	288	1103.12	110.31
k_1	0.00529	15	360	1097.86	109.79
k_2	0.006735				
δ_1	3				
δ_2	3.03				
d	3.36				
T_L	170.769				
k_3	0.0135				
v_3	4.98				
k_4	0.00679				
v_4	3.1				

Çizelge 4.57. MKD ile deneysel *Iase* üretim verilerinin modellerden hesaplanan *Iase* üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	7.49	57.82	20.48	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	3.44	28.95	89.27	46.80	7.25	2.26	4.39	1.51	0.00	0.77	1.84	3.97
2	34.16	77.58	135.59	94.88	33.18	17.91	34.89	15.30	12.86	27.37	27.62	33.12
3	119.73	159.20	201.18	170.45	95.96	59.30	110.73	57.43	137.80	138.22	103.41	108.22
4	298.90	268.91	289.03	272.97	201.30	135.42	232.31	139.18	265.98	265.97	224.49	231.34
5	382.52	394.11	398.29	394.37	337.40	248.98	379.55	258.21	394.15	394.14	367.86	382.12
6	519.11	520.80	522.35	522.01	483.54	394.11	525.99	397.76	522.33	522.31	511.14	532.34
7	536.89	638.18	649.46	643.54	621.26	556.38	653.59	536.42	650.50	650.49	640.14	662.58
8	664.07	740.13	766.66	750.46	739.71	716.24	756.12	658.76	778.68	778.66	748.71	766.32
9	847.95	824.60	864.70	838.91	835.27	854.97	834.95	758.64	906.86	906.84	836.02	845.26
10	885.16	892.21	940.24	908.79	908.98	960.60	894.37	836.52	1035.02	1035.01	904.10	904.15
11	1014.14	944.98	994.84	962.13	964.09	1030.73	938.94	895.85	1103.09	1103.09	956.04	947.89
12	1103.12	985.42	1032.51	1001.86	1004.40	1070.99	972.48	940.65	1103.12	1103.12	995.07	980.51
15	1097.86	1055.90	1084.72	1066.93	1068.81	1102.02	1032.58	1019.89	1103.12	1103.12	1061.19	1038.12
Ortalama	536.22	538.46	573.33	549.61	521.57	510.71	526.49	465.44	572.39	573.51	526.97	531.14

Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM, MLM, MRM ve Stannard modelleri dışında kalan modeller (Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile hesaplanan minimum *Iase* aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel *Iase* aktivite değerine (0.00 U/mL) eşit olarak hesaplanmıştır. Stannard modeline göre MGM, MLM ve MRM ile tahmin edilen *Iase* aktivite değerleri daha yüksek hesaplanmıştır. Bununla beraber, Baranyi ve Huang modeli dışında çalışmada kullanılan matematiksel modeller ile tahmin edilen maksimum *Iase* aktivite değerleri, deneysel maksimum *Iase* aktivite değerinden (1103.12 U/mL) nispeten düşük hesaplanmıştır. Bununla birlikte, deneysel fermentasyonun 1. günündeki *Iase* aktivite değeri (3.44 U/mL), MGM, MLM, MRM, Stannard, MMF ve Cone modelleri ile yüksek tahmin edilirken Weibull, Asimetrik, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile nispeten düşük tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 2. günündeki *Iase* aktivitesi (34.16 U/mL), MGM, MLM, MRM ve MMF modellerinin kullanımı ile yüksek hesaplanmış olup modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. MGM, MLM, MRM, Baranyi ve Huang modelleri, fermentasyonun 3. ve 5. günlerindeki deneysel *Iase* aktivitelerini (sırasıyla 119.73 U/mL ve 382.52 U/mL) yüksek tahmin ederken modellerin geri kalanı (Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri) düşük hesaplamıştır. Diğer yandan, çalışmada kullanılan modellerin tamamı, fermentasyonun 4. günündeki deneysel *Iase* aktivitesini (298.90 U/mL) düşük tahmin etmiştir. Deneysel fermentasyonun 6. günündeki *Iase* aktivitesi (519.11 U/mL) Stannard, Weibull, Asimetrik ve Fitzhugh modelleri tarafından düşük hesaplanmış olup geri kalan modeller (MGM, MLM, MRM, MMF, Baranyi, Huang ve Cone modelleri) ile yüksek tahmin edilmiştir. Ayrıca, yalnızca Asimetrik modeli fermentasyonun 7., 8. ve 10. Günlerindeki *Iase* aktivitelerini (sırasıyla 536.89 U/mL, 664.07 U/mL ve 885.16 U/mL) düşük hesaplamış olup modellerin geri kalanı da yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasından MLM, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri, deneysel fermentasyonun 9. günündeki *Iase* aktivitesini (847.95 U/mL) yüksek tahmin etmiştir. Öte yandan, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri, fermentasyonun 11. günündeki *Iase* aktivitesini (sırasıyla 1014.14 U/mL) yüksek hesaplamıştır. Ek olarak, deneysel fermentasyonun 15. günündeki *Iase* aktivitesini (1097.86 U/mL) Baranyi ve Huang modelleri yüksek tahmin ederken modellerin geri kalanı da düşük hesaplamıştır.

Çizelge 4.57'de verilen model parametrelerinin kullanımı ile MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun *Iase* aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.58'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (53.50 U/mL) Stannard modeli ile ve minimum MAE (38.79 U/mL) ve MSD (27.43 U/mL) Fitzhugh modeli ile belirlenmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9864) Huang model ile tespit edilirken ve 1'e en yakın m değeri ise Stannard modelinin kullanımı ile 0.98 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, maksimum RMSE (60.50 U/mL), MAE (70.78 U/mL) ve MSD (50.05 U/mL) değerleri Asimetrik model ile belirlenmiştir. Benzer şekilde minimum R^2 değeri (0.9755) Cone modelin kullanımı ile belirlenirken ve 1'e en uzak m değeri (0.92) ise MGM ve MLM ile tespit edilmiştir. Belirleme katsayısı açısından sonuçlara bakılacak olursa R^2 değerlerinin 0.97 ila 0.99 arasında değiştiği görülmektedir. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC

değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki *Iase* aktivitesinin matematiksel modellenmesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Fitzhugh model olduğu belirlenmiştir (AIC=124.14). Maksimum AIC değerinin elde edildiği model ise Baranyi olmuştur (AIC=135.03).

Çizelge 4.58. MKD ile optimize edilen besiyerindeki *Iase* aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>Iase</i> aktivitesi (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	54.92	42.55	30.09	0.9848	0.92	124.61	0.80	1.32
MLM	65.48	53.25	37.65	0.9863	0.92	129.53	0.68	1.51
MRM	55.27	44.70	31.61	0.9855	0.93	129.84	0.75	1.39
Stannard	53.50	41.57	29.40	0.9832	0.98	128.93	1.00	1.16
Weibull	72.83	50.49	35.70	0.9766	1.06	132.51	1.25	1.29
MMF	62.05	42.09	29.76	0.9770	0.95	128.03	1.00	1.09
Asimetrik	91.33	70.78	50.05	0.9809	0.94	138.85	1.36	1.36
Baranyi	66.51	44.41	31.41	0.9863	1.07	135.03	2.20	2.48
Huang	66.29	43.35	30.65	0.9864	1.06	134.93	1.07	1.21
Fitzhugh	54.01	38.79	27.43	0.9819	0.97	124.14	1.09	1.14
Cone	62.38	42.32	29.93	0.9755	0.96	128.18	1.01	1.09

Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmıştır. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, Baranyi modelinin BF değeri 1'den büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.58). Bu sonuç, Baranyi modeli ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MGM, MLM ve MRM modellerinin BF değeri 1'in altında tespit edilmiş olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu belirlenmiştir. Öte yandan 1'e eşit BF değerleri Stannard ve Cone modellerini kullanımı ile elde edilmiş olup bu modellerin yapısal sapma göstermemiştir. Ayrıca Cone modelinin kullanımı ile BF değeri 1.01 olarak hesaplanmış olup bu modelin çok az bir yapısal sapma gösterdiği ve nispeten deneysel verileri çok az bir farkla yüksek tahmin ettiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.58). İlave, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin gözlemlerden MGM için %32, MLM için %51, MRM için %39, Stannard için %16, Weibull için %29, MMF için %9, Asimetrik için %36, Baranyi için %148, Huang için %21, Fitzhugh için %14 ve Cone için %9 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık MMF ve Cone modelleri ile %9 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %148 ile Baranyi modelinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.58). Sonuç olarak model kıyaslama sonuçları farklılık göstermiştir. Şöyle ki; düşük RMSE, MAE ve MSD değerleri ile Stannard ve Fitzhugh modellerinin deneysel verileri tahmin etmede başarılı olduğu, minimum AIC ile Fitzhugh modelinin başarılı olduğu, 1'e eşit BF değeri ile Stannard ve MMF modellerinin başarılı olduğu, 1'e yakın BF değeri ile Cone modelinin başarılı olduğu, MMF ve Cone modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel değerlerden %9 oranında farklı olduğu belirlenmiştir. Böylece, Stannard, MMF, Fitzhugh ve Cone

modelleri, *Iase* aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır.

4.15.2.3. Sase üretiminin matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda Sase üretimine ait deneysel verilerin (Çizelge 4.59) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.59'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.59. Deneysel Sase aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel Sase aktivite verileri

Parametre	Sase (U/mL)	t (gün)	t (sa)	Sase (U/mL)	Sase/10 (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0	0.00	0.00
$A_0/10$ (U/mL)	0.00	1	24	4.17	0.42
A_m (U/mL)	1095.30	2	48	29.82	2.98
$A_m/10$ (U/mL)	109.53	3	72	64.47	6.45
Q (U/mL/sa)	5.30	4	96	151.06	15.11
$Q/10$ (U/mL/gün)	12.73	5	120	252.41	25.24
λ (sa)	77.54	6	144	343.10	34.31
λ (gün)	3.23	7	168	452.13	45.21
v_1	0.29	8	192	580.85	58.08
v_2	358.39	9	216	706.74	70.67
h_0	411.27	10	240	821.81	82.18
$h_0/10$	41.13	11	264	901.58	90.16
β	1282	12	288	1008.68	100.87
k_1	0.00474	15	360	1095.30	109.53
k_2	0.0056				
δ_1	3				
δ_2	3.65				
d	3.49				
T_L	185.81				
k_3	0.014				
v_3	8.107				
k_4	0.0056				
v_4	3.39				

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel Sase üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.60) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-9). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM, MLM, MRM ve Stannard modelleri dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen minimum Sase aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel Sase aktivitesi (0.00 U/mL) ile eşit tahmin edilmiştir. Bu modellerin arasından MGM ve Stannard modeli ile Sase aktivitesi (sırasıyla 0.58 U/mL ve 0.02 U/mL), fermentasyonun başlangıcındaki Sase aktivitesine oldukça yakın hesaplanmış olup MLM ve MRM ile ise yüksek tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 15. gününde maksimum Sase aktivitesi belirlenmiştir (1095.30 U/mL). Çalışmada kullanılan Baranyi ve Huang modelleri ile

fermentasyonun 15. gününde tahmin edilen maksimum *Sase* aktivite değeri, deneysel maksimum *Sase* aktivitesine eşit olmuştur. Bununla beraber, modellerin geri kalanı ile fermentasyonun 15. gününde tahmin edilen *Sase* aktivite değerleri, deneysel fermentasyonun 15. gününde belirlenen maksimum *Sase* aktivite değerinden düşük hesaplanmıştır. Diğer yandan, deneysel fermentasyonun 1. günündeki *Sase* aktivite değeri (4.17 U/mL), MGM, MLM ve MRM modelleri ile yüksek tahmin edilirken modellerin geri kalanı (Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile düşük hesaplanmıştır. Baranyi ve Huang modelleri fermentasyonun 1. günündeki aktivite değerini 0.00 U/mL olarak tahmin ederken Baranyi modeli fermentasyonun 2. günündeki aktivite değerlerini de 0.00 U/mL olarak hesaplamıştır. Öte yandan, MLM ve MRM modelleri ile deneysel fermentasyonun 2. ve 3. günlerindeki *Sase* aktivite değerleri (sırasıyla 29.82 U/mL ve 64.47 U/mL) yüksek hesaplanmış olup modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. Bununla beraber sadece MLM, fermentasyonun 4. ve 5. günlerindeki deneysel *Sase* aktivite değerlerini (sırasıyla 151.06 U/mL ve 252.41 U/mL) yüksek tahmin ederken modellerin geri kalanı (MGM, MRM, Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh ve Cone modelleri) düşük hesaplamıştır. Diğer yandan, Stannard, Weibull, MMF ve Asimetrik modelleri, fermentasyonun 6. günündeki deneysel *Sase* aktivitesini (343.10 U/mL) düşük tahmin etmiştir. Deneysel fermentasyonun 7. günündeki *Sase* aktivitesi (452.13 U/mL) yalnızca Weibull modeli tarafından düşük hesaplanmış olup geri kalan modeller yüksek tahmin etmiştir. Ayrıca, Weibull ve Asimetrik modellerinin fermentasyonun 8. günündeki *Sase* aktivitesini (580.85 U/mL) düşük hesaplamıştır. Diğer yandan, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasından yalnızca MGM ve Asimetrik modelleri, deneysel fermentasyonun 9. günündeki *Sase* aktivitesini (706.74 U/mL) düşük tahmin etmiştir. Öte yandan, çalışmada kullanılan modellerden MLM, Stannard, Weibull, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri haricinde geri kalan modellerin tamamı deneysel fermentasyonun 10. günündeki *Sase* aktivitesini (821.81 U/mL) düşük hesaplamıştır. Deneysel fermentasyonun 11. günündeki *Sase* aktivitesi (901.58 U/mL) MLM, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile yüksek tahmin edilirken fermentasyonun 12. günündeki *Sase* aktivitesi (1008.68 U/mL) ise 11. günden farklı olarak Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile yüksek tahmin edilmiştir (Çizelge 4.60).

Çizelge 4.59'da verilen model parametrelerinin kullanımı ile MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun *Sase* aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.5) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.61'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, minimum RMSE (26.80 U/mL), MAE (20.23 U/mL) ve MSD (14.30 U/mL) değerleri MRM ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9982) MLM modeli ile elde edilmiş olup diğer modellere ait belirleme katsayısı değerlerinin de 0.99'dan büyük olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber 1'e eşit m değerleri, Stannard ve Fitzhugh modelleri ile hesaplanan veriler kullanılarak belirlenmiş olup 1'e en yakın m değeri ise MMF modeli kullanılarak tespit edilmiştir. Diğer yandan, maksimum RMSE (49.63 U/mL), MAE (36.39 U/mL) ve MSD (25.73 U/mL) değerleri ve 1'e en uzak m değeri, Asimetrik modelin kullanımı ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.60. MKD ile deneysel Sase üretim verilerinin modellerden hesaplanan Sase üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	0.58	32.04	6.73	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	4.17	4.48	50.14	16.84	1.04	1.61	0.72	0.87	0.00	0.00	0.04	1.21
2	29.82	19.86	77.71	38.41	8.24	12.82	8.98	9.64	0.00	0.23	3.33	12.60
3	64.47	58.85	118.73	78.84	35.29	42.68	38.39	38.63	0.52	10.65	27.60	48.16
4	151.06	129.93	177.60	144.81	98.21	98.49	103.00	99.38	97.94	99.38	94.53	119.07
5	252.41	231.47	257.96	238.24	201.64	184.10	207.96	195.61	225.25	225.27	205.75	225.93
6	343.10	352.65	360.40	353.70	334.15	298.35	343.00	318.93	352.55	352.55	343.79	356.32
7	452.13	479.36	480.20	479.84	476.33	434.26	486.91	452.33	479.85	479.85	486.84	491.20
8	580.85	599.61	606.92	603.80	610.85	579.86	619.70	578.93	607.16	607.16	618.76	614.62
9	706.74	705.91	727.54	715.52	727.30	720.82	730.54	688.30	734.46	734.46	731.31	718.41
10	821.81	795.11	831.32	809.57	821.97	844.02	817.45	777.15	861.76	861.76	822.36	801.21
11	901.58	867.17	913.15	884.73	895.61	940.94	883.29	846.75	989.07	989.07	893.37	865.36
12	1008.68	923.80	973.33	942.53	951.15	1009.26	932.39	900.25	1094.15	1094.15	947.36	914.40
15	1095.30	1025.34	1062.30	1040.18	1043.32	1087.68	1016.63	996.23	1095.30	1095.30	1039.12	1002.24
Ortalama	458.01	442.44	476.38	453.84	443.22	446.78	442.07	421.64	467.00	467.85	443.87	440.77

Öte yandan, deneysel fermentasyondaki Sase aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Weibull model olduğu (AIC=107.92) sonrasında ise sırasıyla MLM (AIC=109.03) ve MRM (AIC=109.58) modellerinin olduğu belirlenmiştir. Maksimum AIC değeri (123.62) ise Baranyi modelinin kullanımı ile elde edilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.61. MKD ile optimize edilen besiyerindeki Sase aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	Sase aktivitesi (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	34.01	23.63	16.71	0.9956	0.95	111.19	1.06	1.09
MLM	31.48	28.14	19.90	0.9982	0.95	109.03	0.73	1.38
MRM	26.80	20.23	14.30	0.9969	0.96	109.58	0.88	1.17
Stannard	32.44	25.49	18.03	0.9941	1.00	114.93	1.32	1.35
Weibull	30.26	22.12	15.64	0.9959	1.04	107.92	1.24	1.26
MMF	38.78	29.86	21.11	0.9915	0.98	114.87	1.34	1.37
Asimetrik	49.63	36.39	25.73	0.9949	0.94	121.77	1.36	1.36
Baranyi	44.26	34.45	24.36	0.9951	1.08	123.62	33.74	35.68
Huang	43.15	33.61	23.76	0.9954	1.08	122.91	2.66	2.82
Fitzhugh	35.54	28.20	19.94	0.9926	1.00	112.42	1.80	1.85
Cone	41.88	31.20	22.06	0.9916	0.95	117.02	1.22	1.26

Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.61'de sunulmuştur. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, Baranyi ve Huang modellerinin BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.61). Bu sonuç, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MLM ve MRM modellerinin BF değeri 1'den oldukça düşük hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu saptanmıştır. Öte yandan 1'e en yakın BF değeri MGM ile 1.06 olarak hesaplanmıştır. Böylece, MGM'nin çok az bir yapısal sapma gösterdiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.60). İlaveten, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel verilerden MGM için %9, MLM için %38, MRM için %17, Stannard için %35, Weibull için %26, MMF için %37, Asimetrik için %36, Baranyi için %3468, Huang için %182, Fitzhugh için %85 ve Cone için %26 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık MGM ile %9 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %3468 ile Baranyi modelinde hesaplanmıştır (Çizelge 4.61). Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile hesaplanan BF ve AF değerlerinin 1'den oldukça yüksek olmasının nedeni olarak lag fazı ve geçiş fazı değerlerinin deneysel fermentasyon değerlerinden daha düşük hesaplanması olarak düşünülmüştür (Çizelge 4.60). Sonuç olarak düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, 0.99'dan yüksek R^2 değeri ve 1'e yakın m değeri ile MRM'yi kullanmanın Sase aktivitesini başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Ayrıca, 1'e yakın BF ve AF değerleri ile de MGM'nin Sase aktivitesini başarılı bir şekilde hesapladığı belirlenmiştir. Böylece, MGM ve MRM, Sase aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer

matematiksel modellerden daha iyi tahmin etmiştir. Öte yandan MGM ve MRM'nin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, *Sase* aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.4. S/I oranının matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* ve *Sase* üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesi ile hesaplanan *Iase* ve *Sase* değerlerinin birbirine oranı ile deneysel ve tahmin edilen S/I oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.62). Bununla beraber, hem deneysel hem de hesaplanan S/I oranları grafikte gösterilmiştir (EK-10). *Iase* ve *Sase* aktivitelerinin model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre S/I oranları hesaplanmış ve deneysel S/I oranları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.62). Deneysel fermentasyonun başlangıcındaki *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri 0.00 U/mL olduğu için S/I oranları hesaplanmamıştır. Fermentasyonun 1. ve 2. günü için hesaplanan S/I oranları sırasıyla 1.21 (maksimum değer) ve 0.87 olarak hesaplanmış olup çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile S/I oranları düşük hesaplanmıştır. Ayrıca, Baranyi modeli ile bu oran 0.00 olarak hesaplanmış olup fermentasyonun 1., 2. ve 3. günlerindeki tahmin edilen *Sase* aktivitesinin 0.00 U/mL olduğu anlaşılmaktadır. Minimum S/I oranı ise deneysel fermentasyonunun 4. gününde 0.51 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan MLM, MRM, Weibull ve Asimetrik modelleri ile deneysel fermentasyonun 4. günündeki S/I oranı yüksek tahmin edilmiş olup Cone modeli ile bu oran eşit olarak hesaplanmıştır. Modellerin geri kalanı ile de 4. gündeki S/I oranı düşük tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 3. gününde hesaplanan S/I oranı (0.54) MLM, Weibull ve Asimetrik modelleri ile yüksek hesaplanmış olup geri kalan modeller ile S/I oranları düşük tahmin edilmiştir. Bununla beraber, yalnızca Weibull ve Asimetrik modelleri, 5. gündeki deneysel S/I oranını (0.66) yüksek hesaplamıştır. Bununla beraber, sadece MMF modeli 6. gündeki deneysel S/I oranını (0.66) düşük tahmin etmiştir. Modellerin geri kalanı da 6. gündeki deneysel S/I oranını yüksek hesaplamıştır. Fermentasyonun 7., 8. ve 10. günlerindeki S/I oranları (sırasıyla 0.84, 0.87 ve 0.93) Asimetrik modelin dışındaki modeller ile düşük tahmin edilmiş olup Asimetrik model ile 7. ve 10. günlerdeki S/I oranları eşit olarak tahmin edilmiş, 9. gündeki S/I oranı yüksek hesaplanmıştır. Diğer yandan, deneysel çalışmanın 9. günündeki S/I oranı (0.83), Baranyi ve Huang modelleri ile düşük tahmin edilmiş olup modellerin geri kalanı ile yüksek hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller ile deneysel fermentasyonun 11., 12. ve 15. günlerinde hesaplanan S/I oranları (sırasıyla 0.89, 0.91 ve 1.00) düşük hesaplanmıştır. Genellikle, modeller ile 5-6. günden itibaren hesaplanan S/I oranlarının deneysel S/I oranlarına genel olarak yaklaştığı da Çizelge 4.62'deki değerlerden anlaşılmaktadır (EK-10). Modellerin yardımı ile hesaplanan S/I oranlarının sonuçları model değerlendirme kriterlerine tabi tutulmuş olup model validasyonu ile ilgili datalar Çizelge 4.63'te verilmiştir. Sonuçlara göre, en düşük RMSE (0.17) Weibull modeli ile, MAE (0.11) ve MSD (0.08) MLM ve Weibull modeli ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.1580) de Weibull modeli ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.62. Deneysel S/I oranlarının modellerden hesaplanan S/I oranları ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel	Matematiksel modeller										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
1	1.21	0.15	0.56	0.36	0.14	0.71	0.16	0.57	0.00	0.01	0.02	0.31
2	0.87	0.26	0.57	0.40	0.25	0.72	0.26	0.63	0.00	0.01	0.12	0.38
3	0.54	0.37	0.59	0.46	0.37	0.72	0.35	0.67	0.00	0.08	0.27	0.45
4	0.51	0.48	0.61	0.53	0.49	0.73	0.44	0.71	0.37	0.37	0.42	0.51
5	0.66	0.59	0.65	0.60	0.60	0.74	0.55	0.76	0.57	0.57	0.56	0.59
6	0.66	0.68	0.69	0.68	0.69	0.76	0.65	0.80	0.67	0.67	0.67	0.67
7	0.84	0.75	0.74	0.75	0.77	0.78	0.74	0.84	0.74	0.74	0.76	0.74
8	0.87	0.81	0.79	0.80	0.83	0.81	0.82	0.88	0.78	0.78	0.83	0.80
9	0.83	0.86	0.84	0.85	0.87	0.84	0.87	0.91	0.81	0.81	0.87	0.85
10	0.93	0.89	0.88	0.89	0.90	0.88	0.91	0.93	0.83	0.83	0.91	0.89
11	0.89	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.94	0.95	0.90	0.90	0.93	0.91
12	0.91	0.94	0.94	0.94	0.95	0.94	0.96	0.96	0.99	0.99	0.95	0.93
15	1.00	0.97	0.98	0.97	0.98	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.97
Ortalama	0.83	0.67	0.75	0.71	0.67	0.81	0.67	0.81	0.59	0.60	0.64	0.69

Çizelge 4.63. S/I oranı için matematiksel modellerin validasyonu

Model	S/I oranı							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	0.35	0.17	0.12	0.0099	0.14	-18.36	1.36	1.38
MLM	0.21	0.11	0.08	0.1160	0.27	-32.85	1.09	1.16
MRM	0.27	0.14	0.10	0.0454	0.24	-19.80	1.20	1.23
Stannard	0.35	0.17	0.12	0.0081	0.13	-13.04	1.35	1.39
Weibull	0.17	0.11	0.08	0.1580	0.20	-37.94	1.00	1.16
MMF	0.35	0.18	0.13	0.0253	0.24	-18.35	1.37	1.40
Asimetrik	0.21	0.13	0.09	0.0233	0.11	-32.38	1.00	1.18
Baranyi	0.45	0.25	0.18	0.0243	0.30	-6.17	18.92	19.24
Huang	0.44	0.24	0.17	0.0186	0.26	-6.74	2.66	2.71
Fitzhugh	0.40	0.21	0.15	0.0076	0.15	-14.20	1.72	1.76
Cone	0.29	0.15	0.10	0.0324	0.21	-23.20	1.23	1.25

Ayrıca, maksimum RMSE (0.45), MAE (0.25) ve MSD (0.18) değerleri Baranyi modeli ile belirlenmiştir. Minimum R^2 değeri (0.0076) Fitzhugh modelinin kullanımı ile belirlenirken ve 1'e en uzak m değeri (0.11) ise Asimetrik model ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüttür. Deneysel verileri tanımlamada en iyi model, minimum AIC değerine sahip olan modelin olduğu öne sürülmektedir. Bu açıklamadan yola çıkarak en düşük AIC değerine sahip olan modelin Weibull model olduğu belirlenmiştir (AIC=-37.94). Tam tersine, maksimum AIC değeri (-6.17) Baranyi modeli ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.63'te gösterilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Bu açıklamaya göre, Baranyi ve Huang modelleri ile BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır. Bu sonuç, Baranyi ve Huang modelleri ile hesaplanan değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modellerin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir, ancak 1'den daha küçük bir BF değeri hesaplanmamıştır. Öte yandan 1'e eşit BF değeri Weibull ve Asimetrik modelleri ile hesaplanmış olup bu modellerin yapısal sapma göstermediği anlaşılmaktadır. Diğer yandan, AF değerleri ile ilgili sonuçlar da verilmiş olup elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel değerlerden MGM için %38, MLM için %16, MRM için %23, Stannard için %39, Weibull için %16, MMF için %40, Asimetrik için %18, Baranyi için %1824, Huang için %171, Fitzhugh için %76 ve Cone için %25 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Weibull modeli ile %16 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %1824 ile Baranyi modelinde hesaplanmıştır (Çizelge 4.63). Deneysel ve tahmin edilen değerlerin korelasyonu ile birlikte elde edilen sonuçlar EK-10'da gösterilmiştir. Eğer S/I oranları deneysel çalışmanın 3. gününden itibaren korelasyon gerçekleştirilirse daha yüksek belirleme katsayısı değerleri ile birlikte 1'e yakın eğim değerleri elde edilebilir. Çünkü modeller tarafından deneysel fermentasyonun başlangıcındaki *Iase* ve *Sase* aktiviteleri genellikle düşük tahmin edildiği için deneysel S/I oranlarına göre düşük hesaplanmakta dolayısıyla daha düşük belirleme katsayıları ve eğim değerleri elde edilmektedir. Sonuç olarak düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değeri, 1'e eşit BF değeri ve en düşük AF

değeri (%16) ile Weibull modelini kullanmanın S/I oranını başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Böylece, Weibull modeli, S/I oranının deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır. Ayrıca, Weibull modelinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, S/I oranının deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.5. *SIase* üretiminin matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *SIase* üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.64'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.64. Deneysel *SIase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *SIase* aktivite verileri

Parametre	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>t</i> (gün)	<i>t</i> (sa)	<i>SIase</i> (U/mg)	<i>SIase</i> /20 (U/mg)
A_0 (U/mg)	0.00	0	0	0.00	0.00
$A_0/20$ (U/mg)	0.00	1	24	11.60	0.58
A_m (U/mg)	2861.00	2	48	161.14	8.06
$A_m/20$ (U/mg)	143.05	3	72	680.50	34.03
Q (U/mg/sa)	53.52	4	96	1965.02	98.25
$Q/20$ (U/mg/gün)	64.23	5	120	2283.86	114.19
λ (sa)	59.25	6	144	2813.08	140.65
λ (gün)	2.47	8	192	2821.41	141.07
v_1	0.685	10	240	2809.14	140.46
v_2	940	11	264	2846.62	142.33
h_o	3171.03	12	288	2861.00	143.05
$h_o/20$	158.55				
β	2211				
k_1	0.0102				
k_2	0.0116				
δ_1	3				
δ_2	5.153				
d	5.548				
T_L	86.013				
k_3	0.032				
v_3	10.41				
k_4	0.012				
v_4	5.5				

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *SIase* üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.65) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-11). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM ve MRM'nin dışında kalan modeller ile tahmin edilen minimum *SIase* aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel *SIase* aktivite değerine (0.00 U/mg) eşit olarak hesaplanmıştır. MGM ve MRM'nin ise deneysel minimum *SIase* aktivite değerinden yüksek sonuçlar tahmin ettiği saptanmıştır. Bununla beraber, maksimum

SIase aktivitesi deneysel çalışmanın 12. gününde 2861 U/mg olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan MLM, MRM, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen maksimum *SIase* aktivite değerleri, deneysel maksimum *SIase* aktivite değerine (2861 U/mg) eşit hesaplanmış olup MGM, Stannard, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile deneysel maksimum *SIase* aktivite değerine oldukça yaklaşılmıştır.

Bununla birlikte, deneysel fermentasyonun 1. günündeki *SIase* aktivite değeri (11.60 U/mg), MLM, MRM ve Weibull modelleri ile yüksek tahmin edilirken modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. Ayrıca, 1. gündeki deneysel *SIase* aktivitesi (11.60 U/mg) MGM, Stannard ve Baranyi modelleri 0.00 U/mg olarak hesaplanmıştır. Deneysel fermentasyonun 2. günündeki *SIase* aktivitesi (161.14 U/mg), Weibull ve Fitzhugh modellerinin kullanımı ile yüksek hesaplanmış olup modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. Baranyi modeli, deneysel *SIase* aktivitesini 0.00 U/mg olarak tahmin etmiştir. Yalnızca Stannard modeli, fermentasyonun 3. günündeki deneysel *SIase* aktivitesini (680.5 U/mg) düşük tahmin ederken modellerin geri kalanı yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, Baranyi ve Huang modelleri, fermentasyonun 4. günündeki deneysel *SIase* aktivitesini (1965.02 U/mg) nispeten yüksek tahmin etmiştir. Deneysel fermentasyonun 5. günündeki *SIase* aktivitesi (2283.86 U/mg) yalnızca Fitzhugh modeli tarafından düşük hesaplanmış olup geri kalan modeller ile yüksek tahmin edilmiştir. Ayrıca, MLM, Baranyi ve Huang modellerinin fermentasyonun 6. günündeki *SIase* aktivitesini (2813.08 U/mg) yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, bu çalışmada kullanılan matematiksel modeller arasından yalnızca MMF ve Fitzhugh modelleri, deneysel fermentasyonun 8. günündeki *SIase* aktivitesini (2821.41 U/mg) düşük tahmin etmiştir. Öte yandan, çalışmada kullanılan modellerin tamamı fermentasyonun 10. ve 11. günündeki *SIase* aktivitesini (sırasıyla 2809.14 U/mg ve 2846.62 U/mL) yüksek hesaplamıştır. Fermentasyonun 5. günü ve sonrasında Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen *SIase* aktivite değerleri birbirine eşit olmuş olup aralarındaki fark yalnızca adaptasyon ve geçiş fazlarında görülmektedir (Çizelge 4.65).

Çizelge 4.64'te verilen model parametrelerinin kullanımı ile MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun *SIase* aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.66'da verilmiştir. Minimum RMSE (81.60 U/mg) değeri Asimetrik modelin kullanımı ile belirlenirken minimum MAE (51.73 U/mg) ve MSD (36.58 U/mg) değerleri MRM'nin kullanımı ile elde edilmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9955) Asimetrik model ile tespit edilirken ve 1'e eşit m değerleri ise Asimetrik ve Cone modelleri kullanılarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, maksimum RMSE (182.40 U/mg) Baranyi modelin kullanımı ile belirlenirken maksimum MAE (87.31 U/mg) ve MSD (61.74 U/mg) değerleri ise Weibull modelinin kullanımı ile tespit edilmiştir. Benzer şekilde minimum R^2 değeri (0.9830) ve 1'e en uzak m değeri (0.89) ise Baranyi modelinin kullanımı ile tespit edilmiştir. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki *SIase* aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Asimetrik model olduğu belirlenmiştir (AIC=132.32). Maksimum AIC değeri (159.90) ise Baranyi modelinin kullanılarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.65. MKD ile deneysel *SIase* üretim verilerinin modellerden hesaplanan *SIase* üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mg)	Matematiksel modeller (U/mg)										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	0.00	4.59	1.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	11.60	0.00	27.43	12.69	0.00	41.66	3.93	2.40	0.00	0.88	4.34	3.04
2	161.14	23.18	157.68	117.76	8.67	316.82	133.46	108.23	0.00	45.82	229.47	131.35
3	680.50	690.62	743.97	724.71	649.92	935.71	810.63	777.00	682.52	718.72	956.96	884.54
4	1965.02	1880.77	1943.21	1931.31	1960.16	1742.17	1817.22	1853.40	1967.03	1967.72	1746.06	1960.65
5	2283.86	2527.84	2653.03	2623.70	2597.97	2403.79	2420.69	2471.41	2861.00	2861.00	2281.85	2521.62
6	2813.08	2758.35	2824.26	2811.26	2791.50	2740.68	2671.12	2705.88	2861.00	2861.00	2577.57	2726.39
8	2821.41	2851.91	2859.98	2859.03	2856.43	2859.44	2815.55	2828.14	2861.00	2861.00	2797.72	2832.26
10	2809.14	2860.21	2860.98	2860.93	2860.71	2861.00	2846.45	2851.40	2861.00	2861.00	2847.27	2852.52
11	2846.62	2860.77	2861.00	2860.99	2860.93	2861.00	2852.08	2855.33	2861.00	2861.00	2854.63	2855.98
12	2861.00	2860.93	2861.00	2861.00	2860.98	2861.00	2855.30	2857.50	2861.00	2861.00	2858.04	2857.89
Ortalama	1750.31	1755.87	1799.74	1787.69	1767.93	1783.93	1747.86	1755.52	1801.42	1809.01	1741.26	1784.20

Çizelge 4.66. MKD ile optimize edilen besiyerindeki *SIase* aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>SIase</i> aktivitesi (U/mg)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	91.76	58.04	41.04	0.9951	1.02	135.61	3.16	3.25
MLM	115.04	54.03	38.20	0.9930	1.01	141.94	0.90	1.11
MRM	106.50	51.73	36.58	0.9938	1.02	144.83	1.00	1.06
Stannard	107.69	57.83	40.89	0.9939	1.03	145.14	6.07	6.26
Weibull	122.06	87.31	61.74	0.9911	0.97	143.60	0.82	1.26
MMF	85.26	58.76	41.55	0.9950	0.99	133.55	1.11	1.16
Asimetrik	81.60	56.92	40.25	0.9955	1.00	132.32	1.18	1.23
Baranyi	182.40	82.52	58.35	0.9830	1.05	159.90	0.97	1.03
Huang	179.58	81.62	57.72	0.9833	1.04	159.46	1.37	1.46
Fitzhugh	130.26	80.12	56.65	0.9893	0.96	145.42	1.05	1.19
Cone	99.43	57.99	41.01	0.9940	1.00	137.85	1.11	1.20

Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.66'da verilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre, MGM ve Stannard modellerinin BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır (Çizelge 4.66). Bu sonuç, MGM ve Stannard modelleri ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna açıklamaya göre ise MLM, Weibull ve Baranyi modellerinin BF değeri 1'in altında tespit edilmiş olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu belirlenmiştir. Öte yandan MRM'nin kullanımı ile 1'e eşit BF değeri hesaplanmıştır. Böylece, MRM'nin yapısal sapma göstermediği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.65). Ek olarak, Çizelge 4.66'da AF değerleri de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel değerlerden MGM için %225, MLM için %11, MRM için %6, Stannard için %526, Weibull için %26, MMF için %16 Asimetrik için %23, Baranyi için %3, Huang için %46, Fitzhugh için %19 ve Cone için %20 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Baranyi ve MRM ile sırasıyla %3 ve %6 düzeylerinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %526 ile Stannard modelinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.66). Sonuç olarak Hem MRM hem de Asimetrik modellerini kullanmanın *SIase* aktivitesini başarılı bir şekilde temsil ettiğini düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değerleri ve 1'e eşit veya yakın m değerleri göstermiştir. Ayrıca, 1'e eşit BF değeri ve %6 AF değeri ile de MRM'nin *SIase* aktivitesini başarılı bir şekilde temsil ettiği de görülmektedir. Böylece, MRM ve Asimetrik modelleri, *SIase* aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır. Ayrıca, MRM ve Asimetrik modellerinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, *SIase* aktivitesinin deneysel verileri ile iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.6. SSase üretiminin matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda SSase üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.67'de verilmiştir.

Çizelge 4.67. Deneysel SSase aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel SSase aktivite verileri

Parametre	SSase (U/mg)	t (gün)	t (sa)	SSase (U/mg)	SSase/20 (U/mg)
A_0 (U/mg)	0.00	0	0	0.00	0.00
$A_0/20$ (U/mg)	0.00	1	24	14.12	0.71
A_m (U/mg)	2606.04	2	48	141.05	7.05
$A_m/20$ (U/mg)	130.30	3	72	366.42	18.32
Q (U/mg/sa)	23.77	4	96	993.14	49.66
$Q/20$ (U/mg/gün)	28.52	5	120	1507.37	75.37
λ (sa)	55.80	6	144	1859.07	92.95
λ (gün)	2.32	8	192	2167.94	108.40
v_1	0.094	10	240	2523.45	126.17
v_2	690	11	264	2606.04	130.30
h_0	1326.29	12	288	2530.79	126.54
$h_0/20$	66.31				
β	2204				
k_1	0.0079				
k_2	0.009				
δ_1	3				
δ_2	3.477				
d	3.512				
T_L	110.46				
k_3	0.025				
v_3	10.49				
k_4	0.009				
v_4	3.478				

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel SSase üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.68) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafike edilmiştir (EK-12). Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, MGM, MGM ve MRM modelleri dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen minimum SSase aktivite değerleri fermentasyonun başlangıcındaki deneysel SSase aktivitesi (0.00 U/mg) ile eşit tahmin edilmiştir. Bu modellerin arasından MGM ve MRM ile SSase aktivitesi (sırasıyla 0.02 U/mg ve 0.61 U/mg), fermentasyonun başlangıcındaki SSase aktivitesine oldukça yakın hesaplanmış olup MGM ile ise yüksek tahmin edilmiştir. Deneysel fermentasyonun 11. gününde maksimum SSase aktivitesi elde edilmiştir (2606.04 U/mg). Çalışmada kullanılan Baranyi ve Huang modelleri ile fermentasyonun 8., 10., 11. ve 12. günlerinde tahmin edilen maksimum SSase aktivite değerleri, deneysel maksimum SSase aktivitesine eşit olmuştur. Ancak, Baranyi ve Huang modellerinin dışında fermentasyonun 11. gününde tahmin edilen bütün SSase aktivite değerleri,

deneysel fermentasyonun 11. gününde belirlenen maksimum SSase aktivite değerinden düşük olmuştur. Diğer yandan, deneysel fermentasyonun 1. günündeki SSase aktivitesi (14.12 U/mg), yalnızca MGM ve Weibull modelleri ile yüksek tahmin edilirken modellerin geri kalanı ile düşük hesaplanmıştır. Öte yandan, Baranyi modeli fermentasyonun 1. günündeki aktivite değerini 0.00 U/mg olarak tahmin ederken ilginç şekilde Baranyi modeli fermentasyonun 2. günündeki aktivite değerini de 0.00 U/mg olarak hesaplamıştır. Bununla beraber, yalnızca MGM, fermentasyonun 2. günündeki deneysel SSase aktivite değerini (141.05 U/mg) yüksek tahmin ederken yalnızca Stannard model, fermentasyonun 3. günündeki deneysel SSase aktivite değerini (366.42 U/mg) yüksek hesaplamıştır. Deneysel çalışmanın 4. gününde ise modellerin tamamı SSase aktivitesini (993.14 U/mg) düşük tahmin etmiştir.

Diğer yandan, MGM, Stannard, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri, fermentasyonun 5. günündeki deneysel SSase aktivitesini (1507.37 U/mg) yüksek hesaplamıştır. Deneysel fermentasyonun 6. günündeki SSase aktivitesi (1859.07 U/mg) yalnızca MMF ve Cone modelleri tarafından düşük hesaplanmış olup geri kalan modeller ile yüksek tahmin edilmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan modellerin tamamı fermentasyonun 8. günündeki SSase aktivitesini (2167.94 U/mg) yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, MMF, Asimetrik ve Cone modelleri, deneysel fermentasyonun 10. ve 12. günlerindeki SSase aktiviteleri (sırasıyla 2523.45 U/mg ve 2530.79 U/mg) düşük tahmin etmiştir.

Çizelge 4.67'de verilen model parametrelerinin kullanımı ile MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun SSase aktivitesi, deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.5) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.69'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (63.40 U/mg), MAE (42.45 U/mg), ve MSD (30.01 U/mg) değerleri Asimetrik modelin kullanımı ile elde edilmiştir. Bunların maksimum değerleri sırasıyla Baranyi modeli ile 160.4 U/mg, Stannard modeli ile 113.15 U/mg ve Stannard modeli ile 80.01 U/mg olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan maksimum R^2 değeri (0.9966) MMF ve Cone modellerinin kullanımı ile elde edilirken minimum R^2 değeri (0.9869) Baranyi modeli uygulanarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde eğim değerleri de 0.97 (MMF) ile 1.08 (Stannard ve Baranyi) arasında değişmiş olup MGM'nin kullanılması ile eğim değeri 1.00 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüttür. Deneysel verileri tanımlamada en iyi model, minimum AIC değerine sahip olan modelin olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki SSase aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Asimetrik model olduğu belirlenmiştir (AIC=125.25) (Çizelge 4.69).

Çizelge 4.68. MKD ile deneysel SSase üretim verilerinin modellerden hesaplanan SSase üretim verileri ile karşılaştırılması

<i>t</i> (gün)	Deneysel (U/mg)	Matematiksel modeller (U/mg)										
		MGM	MGM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
0	0.00	0.05	45.26	0.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	14.12	6.60	106.05	13.45	0.01	17.70	12.58	12.17	0.00	0.70	0.62	12.56
2	141.05	96.32	240.84	112.52	11.86	138.29	133.57	132.45	0.00	34.37	60.71	133.46
3	366.42	422.64	511.86	430.81	245.03	438.04	472.10	474.15	385.14	394.40	391.60	471.93
4	993.14	955.51	963.62	955.63	925.51	921.28	978.82	988.23	955.61	955.77	961.01	978.73
5	1507.37	1498.43	1523.93	1503.71	1656.60	1494.37	1476.33	1491.14	1526.09	1526.08	1525.19	1476.38
6	1859.07	1920.50	2011.11	1933.47	2137.42	2008.17	1853.58	1869.30	2096.56	2096.55	1948.81	1853.72
8	2167.94	2374.93	2478.78	2389.46	2509.02	2526.53	2267.50	2279.01	2606.04	2606.04	2389.65	2267.66
10	2523.45	2533.44	2583.02	2541.59	2587.19	2603.18	2438.46	2445.75	2606.04	2606.04	2539.07	2438.58
11	2606.04	2565.74	2596.40	2571.25	2597.78	2605.74	2483.51	2489.30	2606.04	2606.04	2569.09	2483.61
12	2530.79	2583.74	2602.02	2587.31	2602.42	2606.02	2514.37	2519.02	2606.04	2606.04	2585.70	2514.46
Ortalama	1337.22	1359.81	1423.90	1367.26	1388.44	1396.30	1330.07	1336.41	1398.87	1402.91	1361.04	1330.10

Çizelge 4.69. MKD ile optimize edilen besiyerindeki *SSase* aktivitesi için matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>SSase</i> aktivitesi (U/mg)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	72.53	47.89	33.86	0.9961	1.02	129.02	1.09	1.15
MGM	124.76	93.80	66.33	0.9924	1.00	144.21	0.75	1.34
MRM	77.30	49.16	34.76	0.9958	1.02	135.86	1.00	1.06
Stannard	154.20	113.15	80.01	0.9883	1.08	155.19	2.39	2.58
Weibull	125.52	75.07	53.08	0.9911	1.04	144.38	0.95	1.08
MMF	63.85	44.46	31.44	0.9966	0.97	125.45	1.00	1.06
Asimetrik	63.40	42.45	30.01	0.9965	0.98	125.25	1.00	1.06
Baranyi	160.40	96.69	68.37	0.9869	1.08	156.30	0.97	1.04
Huang	158.09	94.33	66.70	0.9872	1.07	155.89	1.44	1.56
Fitzhugh	80.03	53.44	37.79	0.9958	1.03	131.78	1.41	1.47
Cone	63.81	44.43	31.42	0.9966	0.98	125.43	1.00	1.06

Öte yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.69'da gösterilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Bu açıklamaya göre, Stannard modelin BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır. Bu sonuç, Stannard model ile hesaplanan değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna göre MGM, Weibull ve Baranyi modellerinin BF değeri 1'den düşük hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu saptanmıştır. Öte yandan 1'e eşit BF değerleri MRM, MMF, Asimetrik ve Cone modelleri ile hesaplanmıştır. Böylece, MRM, MMF, Asimetrik ve Cone modellerinin yapısal sapma göstermediği anlaşılmaktadır. Ek olarak, Çizelge 4.69'da AF değerleri de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel değerlerden MGM için %15, MGM için %35, MRM için %6, Stannard için %158, Weibull için %8, MMF için %6, Asimetrik için %6, Baranyi için %4, Huang için %56, Fitzhugh için %47 ve Cone için %6 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Baranyi modeli ile %4 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %158 ile Stannard modelinde hesaplanmıştır. Sonuç olarak düşük RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, yüksek R^2 değeri (0.9965), 1'e yakın m değeri (0.98), 1'e eşit BF değeri ve %6 AF değeri ile Asimetrik modeli kullanmanın *SSase* aktivitesini başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Böylece, Asimetrik modeli, *SSase* aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi tahmin etmiştir. Öte yandan Asimetrik modelinin kullanılmasıyla tahmin edilen değerler, *SSase* aktivitesinin deneysel verileri ile güzel bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.7. *SIase/SSase* oranının matematiksel modellenmesi

MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda *SIase* ve *SSase* üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesi ile hesaplanan *SIase* ve *SSase* değerlerinin birbirine oranı ile deneysel ve

tahmin edilen *SIase/SSase* oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.70). Bununla beraber, hem deneysel hem de hesaplanan *SIase/SSase* oranları grafikte gösterilmiştir (EK-13).

Çizelge 4.70. Deneysel *SIase/SSase* oranlarının modellerden hesaplanan *SIase/SSase* oranları ile karşılaştırılması

Model	t (gün)										Ortalama
	1	2	3	4	5	6	8	10	11	12	
Deneysel	0.82	1.14	1.86	1.98	1.52	1.51	1.30	1.11	1.09	1.13	1.35
MGM	0.00	0.24	1.63	1.97	1.69	1.44	1.20	1.13	1.11	1.11	1.15
MLM	0.26	0.65	1.45	2.02	1.74	1.40	1.15	1.11	1.10	1.10	1.20
MRM	0.94	1.05	1.68	2.02	1.74	1.45	1.20	1.13	1.11	1.11	1.34
Stannard	0.00	0.73	2.65	2.12	1.57	1.31	1.14	1.11	1.10	1.10	1.28
Weibull	2.35	2.29	2.14	1.89	1.61	1.36	1.13	1.10	1.10	1.10	1.61
MMF	0.31	1.00	1.72	1.86	1.64	1.44	1.24	1.17	1.15	1.14	1.27
Asimetrik	0.20	0.82	1.64	1.88	1.66	1.45	1.24	1.17	1.15	1.13	1.23
Baranyi	0.00	0.00	1.77	2.06	1.87	1.36	1.10	1.10	1.10	1.10	1.15
Huang	1.27	1.33	1.82	2.06	1.87	1.36	1.10	1.10	1.10	1.10	1.41
Fitzhugh	7.04	3.78	2.44	1.82	1.50	1.32	1.17	1.12	1.11	1.11	2.24
Cone	0.24	0.98	1.87	2.00	1.71	1.47	1.25	1.17	1.15	1.14	1.30

SIase ve *SSase* aktivitelerinin model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre *SIase/SSase* oranları hesaplanmış ve deneysel *SIase/SSase* oranları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.70). Deneysel fermentasyonun başlangıcındaki *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri 0.00 U/mg olduğu için *SIase/SSase* oranları hesaplanmamıştır. Fermentasyonun 1. günü için hesaplanan *SIase/SSase* oranı sırasıyla 0.31 olarak hesaplanmış olup MRM, Weibull, Huang ve Fitzhugh modelleri ile *SIase/SSase* oranları yüksek hesaplanmıştır. Weibull, Huang ve Fitzhugh modelleri, 2. gündeki deneysel *SIase/SSase* oranının (1.14) yüksek tahmin etmiş olup modellerin geri kalanı ile düşük hesaplanmıştır. Diğer yandan, 3. gündeki deneysel *SIase/SSase* oranı (1.86) Stannard, Weibull, Fitzhugh ve Cone modelleri ile yüksek hesaplanmış olup MGM, MLM, MRM, MMF, Asimetrik, Baranyi ve Huang modelleri ile düşük tahmin edilmiştir. Ayrıca, MGM, Weibull, MMF, Asimetrik ve Fitzhugh modelleri ile 4. gündeki deneysel *SIase/SSase* oranı (1.98) düşük hesaplanmış olup 5. gündeki deneysel *SIase/SSase* oranı (1.52) yalnızca Fitzhugh modeli ile düşük tahmin edilmiştir. Deneysel çalışmanın 6. ve 8. günlerindeki *SIase/SSase* oranları (sırasıyla 1.51 ve 1.30) çalışmada kullanılan bütün modeller tarafından düşük hesaplanmıştır. Çalışmadan elde edilen 10. gündeki *SIase/SSase* oranı (1.11) MLM ve Stannard modelleri ile eşit tahmin edilirken Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile düşük tahmin edilmiştir. MGM, MRM, MMF, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri ile de yüksek hesaplanmıştır. Fermentasyonun 11. gününde belirlenen *SIase/SSase* oranı (1.09) çalışmada kullanılan modellerin tamamı ile yüksek tahmin edilmiş olup 12. gündeki deneysel *SIase/SSase* oranı (1.13) ise MMF, Asimetrik ve Cone modelleri ile yüksek hesaplanmıştır. Öte yandan, modeller ile 4. günden itibaren hesaplanan *SIase/SSase* oranlarının deneysel *SIase/SSase* oranlarına genel olarak yaklaştığı da Çizelge 4.70'teki değerlerden anlaşılmaktadır (EK-13). Modellerin yardımı ile hesaplanan *SIase/SSase* oranlarının sonuçları model değerlendirme kriterlerine tabi tutulmuş olup validasyon sonuçları Çizelge 4.71'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.71. *SIase/SSase* oranı için matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>SIase/SSase</i> oranı							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
MGM	0.40	0.24	0.17	0.7117	1.43	-18.05	3.24	3.33
MLM	0.28	0.20	0.14	0.7640	1.20	-27.53	1.22	1.26
MRM	0.11	0.09	0.06	0.8978	0.94	-48.57	1.00	1.07
Stannard	0.40	0.26	0.19	0.8518	1.83	-13.13	2.79	3.06
Weibull	0.62	0.35	0.25	0.0226	0.21	-5.77	0.85	1.25
MMF	0.19	0.13	0.09	0.8477	1.11	-39.39	1.12	1.17
Asimetrik	0.24	0.17	0.12	0.7962	1.17	-31.93	1.20	1.25
Baranyi	0.47	0.29	0.20	0.6963	1.60	-8.48	1.01	1.06
Huang	0.21	0.15	0.11	0.7006	0.85	-31.03	0.95	1.12
Fitzhugh	2.15	1.00	0.71	0.1540	-2.02	29.10	0.72	1.49
Cone	0.20	0.12	0.08	0.8786	1.30	-36.96	1.13	1.18

Çizelge 4.71'den elde edilen sonuçlara göre, en düşük RMSE (0.11), MAE (0.09) ve MSD (0.06) MRM ile elde edilmiştir. Bunların en yüksek değerleri ise sırasıyla 2.15, 1.00 ve 0.71 olarak Fitzhugh modelinin kullanımı ile belirlenmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.8978) ve 1'e en yakın m değeri (0.94) de MRM ile hesaplanmış olup minimum değerleri sırasıyla 0.1540 ve -2.02 olarak Fitzhugh modelinden elde edilen değerlerin yardımı ile belirlenmiştir. Ayrıca, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüttür. Deneysel verileri tanımlamada en iyi model, minimum AIC değerine sahip olan modelin olduğu öne sürülmektedir. Bu açıklamadan yola çıkarak en düşük AIC değerine sahip olan modelin MRM olduğu tespit edilmiştir (AIC=-48.57). Tam tersine, maksimum AIC değeri (29.10) Fitzhugh model ile hesaplanmıştır. Diğer yandan, BF ve AF değerleri de hesaplanmıştır. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Bu açıklamaya göre, MGM ve Stannard modelleri ile BF değeri 1'den oldukça büyük hesaplanmıştır. Bu sonuç, MGM ve Stannard modelleri ile hesaplanan değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modellerin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Bu açıklamaya göre ise Weibull, Huang ve Fitzhugh modellerinin BF değeri 1'den düşük hesaplanmış olup bu modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu saptanmıştır. Öte yandan 1'e eşit BF değeri MRM ile hesaplanmıştır. Böylece, MRM'nin yapısal sapma göstermediği anlaşılmaktadır. AF değerlerine gelince, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel verilerden MGM için %233, MLM için %26, MRM için %7, Stannard için %206, Weibull için %25, MMF için %17, Asimetrik için %25, Baranyi için %6, Huang için %12, Fitzhugh için %49 ve Cone için %18 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Baranyi modeli ile %6 düzeyinde belirlenirken en yüksek farklılık ise %233 ile MGM ile hesaplanmıştır. Sonuç olarak minimum RMSE, MAE, MSD ve AIC değerleri, maksimum R^2 değeri, 1'e en yakın m değeri, 1'e eşit BF değeri ve %7 AF değeri ile MRM'yi kullanmanın *SIase/SSase* oranını başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Böylece, MRM, *SIase/SSase* oranının deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi hesaplamıştır. Ayrıca, MRM'nin

kullanılmasıyla hesaplanan değerler, $SIase/SSase$ oranının deneysel verileri ile nispeten iyi bir uyum sağlamıştır.

4.15.2.8. Deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Diğer yandan, modellerden hesaplanan kinetik değerler kullanılarak deneysel kinetik değerler ile daha fazla karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hem deneysel hem de modeller ile tahmin edilen değerlerden $Iase$, $Sase$, S/I oranı, $SIase$, $SSase$, $SIase/SSase$ oranı, $protein_{Iase}$, $protein_{Sase}$, Q_{Iase} , Q_{Sase} , Q_{SIase} , Q_{SSase} , $Q_{şeker}$ ve SUY kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Deneysel ve tahmin edilen kinetik değerlere ait veriler Çizelge 4.72'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Baranyi ve Huang modelleri hariç çalışmada kullanılan diğer matematiksel modeller ile tahmin edilen $Iase$ ve $Sase$ aktiviteleri deneysel $Iase$ ve $Sase$ aktivitesinden düşük hesaplanmıştır. Baranyi ve Huang modelleri ile hesaplanan $Iase$ ve $Sase$ aktiviteleri deneysel $Iase$ ve $Sase$ aktivitelerine eşit olarak tahmin edilmiştir. Bununla beraber, modellerin geri kalanı ile tahmin edilen $Iase$ ve $Sase$ aktiviteleri, deneysel $Iase$ ve $Sase$ aktivitesine oldukça yakın hesaplanmıştır. Bununla beraber, Weibull, MMF, Baranyi ve Huang modelleri ile tahmin edilen S/I oranı değerleri deneysel S/I oranına eşit olarak hesaplanmıştır. Modellerin geri kalanı (MGM, MLM, MRM, Stannard, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri) ile S/I oranları deneysel S/I oranından düşük ve oldukça yakın hesaplanmıştır. Modelleme çalışmasında kullanılan maksimum $Iase$ ve $Sase$ aktivitelerin kabul edildiği örneklerde protein miktarları sırasıyla 0.386 mg/mL ve 0.42 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Buradan hareketle, $SIase$ ve $SSase$ aktivite değerleri de sırasıyla 2861 U/mg ve 2606.04 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.72). Diğer yandan, deneysel $SIase$ aktiviteleri, MLM, MRM, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile eşit olarak hesaplanırken deneysel $SSase$ aktivitesi ise yalnızca Baranyi ve Huang modelleri ile eşit olarak hesaplanmıştır. Modellerin geri kalanı ile deneysel $SIase$ ve $SSase$ aktiviteleri düşük tahmin edilmiştir. Protein miktarlarının tahminine gelince, deneysel $protein_{Iase}$ ve $protein_{Sase}$ değerleri yalnızca Baranyi ve Huang modelleri ile eşit olarak tahmin edilmiş olup modellerin geri kalanı düşük hesaplanmıştır. Q_{Iase} değerleri de hesaplanmış olup deneysel değeri 5.341 U/mL/sa olarak hesaplanmıştır. MGM, MLM ve MRM'den hesaplanan Q_{Iase} değerleri deneysel Q_{Iase} değerinden düşük hesaplanmıştır. Modellerin geri kalanı ile deneysel değerden yüksek hesaplanmıştır. Hem deneysel fermentasyon verilerinden hem de modellerden hesaplanan fermentasyon verileri ile Q_{Sase} değerleri de hesaplanmış olup MGM, MLM, MRM ve Huang modelleri ile deneysel değerden (5.304 U/mL/sa) düşük hesaplanmış olup yalnızca Baranyi modeli ile deneysel değere eşit olarak hesaplanmıştır. Geriye kalan modeller, deneysel Q_{Sase} değerini yüksektahmin etmiştir. Diğer yandan, modellerin tamamı ile deneysel Q_{SIase} değeri (53.521 U/mg/sa) düşük tahmin edilmiş olup yalnızca Stannard model deneysel Q_{SSase} değerini (23.77 U/mg/sa) yüksek tahmin etmiştir. Modellerin geri kalanı ise deneysel Q_{SSase} değerini düşük hesaplamıştır (Çizelge 4.72). Weibull modeli ile hesaplanan $Q_{şeker}$ değeri, deneysel $Q_{şeker}$ değerinden (0.286 g/L/sa) yüksek olmuş olup Fitzhugh modeli ile hesaplanan $Q_{şeker}$ değeri, deneysel $Q_{şeker}$ değerine eşit olmuştur. Modellerin geri kalanı ise deneysel $Q_{şeker}$ değerini düşük hesaplamıştır. SUY değerleri de hesaplanmış olup Weibull ve Fitzhugh modelleri ile hesaplanan SUY değerleri deneysel değere (%97.69) eşit olmuştur. Ayrıca, MGM, MLM, MRM, Asimetrik, Baranyi ve Huang modelleri, deneysel SUY değerini yüksek hesaplamış olup Stannard, MMF ve Cone modelleri düşük tahmin etmiştir.

Çizelge 4.72. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyondan deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerin karşılaştırılması

Parametreler	Deneysel	Matematiksel modeller										
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh	Cone
<i>Iase</i> (U/mL)	1103.12	1055.90	1084.72	1066.93	1068.81	1102.02	1032.58	1019.89	1103.12	1103.12	1061.19	1038.12
<i>Sase</i> (U/mL)	1095.30	1025.34	1062.30	1040.18	1043.32	1087.68	1016.63	996.23	1095.30	1095.30	1039.12	1002.24
S/I oranı	0.99	0.97	0.98	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.98	0.97
<i>SIase</i> (U/mg)	2861.00	2860.93	2861.00	2861.00	2860.98	2861.00	2855.30	2857.50	2861.00	2861.00	2858.04	2857.89
<i>SSase</i> (U/mg)	2606.04	2583.74	2602.02	2587.31	2602.42	2606.02	2514.37	2519.02	2606.04	2606.04	2585.70	2514.46
<i>SIase/SSase</i> oranı	1.098	1.107	1.100	1.106	1.099	1.098	1.136	1.134	1.098	1.098	1.105	1.137
<i>Protein_{Iase}</i> (mg/mL)	0.386	0.369	0.379	0.373	0.374	0.385	0.362	0.357	0.386	0.386	0.371	0.363
<i>Protein_{Sase}</i> (mg/mL)	0.420	0.397	0.408	0.402	0.401	0.417	0.404	0.395	0.420	0.420	0.402	0.399
<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/sa)	5.341	5.144	5.022	5.164	5.858	6.517	5.876	5.585	5.332	5.339	5.793	6.016
<i>Q_{Sase}</i> (U/mL/sa)	5.304	5.130	5.117	5.095	5.708	5.887	5.746	5.347	5.304	5.299	5.759	5.421
<i>Q_{SIase}</i> (U/mg/sa)	53.521	38.700	39.772	39.562	40.656	30.585	35.078	36.358	45.385	44.631	31.596	38.110
<i>Q_{SSase}</i> (U/mg/sa)	23.770	22.412	21.823	22.352	29.408	22.643	20.922	21.187	23.770	23.653	23.616	20.926
<i>Q_{şeker}</i> (g/L/sa)	0.286	0.251	0.234	0.251	0.235	0.294	0.270	0.240	0.164	0.205	0.286	0.271
<i>SUY</i> (%)	97.69	100.00	100.00	100.00	97.65	97.69	97.33	98.99	99.98	99.98	97.69	97.38

Sonuç olarak, model kıyaslama verilerine göre şeker tüketiminin deneysel verileri MMF ve Cone modelleri ile, *Iase* üretiminin deneysel verileri Stannard, Fitzhugh, Cone ve MMF modelleri ile, *Sase* üretiminin deneysel verileri MGM ve MRM ile, S/I oranının deneysel verileri Weibull modeli ile, *SIase* üretiminin deneysel verileri MRM ve Asimetrik modelleri ile, *SSase* üretiminin deneysel verileri Asimetrik model ile ve *SIase/SSase* oranının deneysel verileri ise MRM ile başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir.

4.16. Enzimin Substrat Spesifikliğinin Matematiksel Modellemesi

Bu çalışmada, Bölüm 4.9'da gerçekleştirilen çalışmaya ait deneysel veriler, Çizelge 3.6'daki 10 farklı matematiksel model kullanılarak modellenmiş olup deneysel verilerin modellenmesi bakımından en iyi model(ler) model değerlendirme kriterlerine göre belirlenmiştir. Deneysel olarak hesaplanan kinetik parametreler (V_{max} ve K_m), modellerden tahmin edilen veriler kullanılarak da hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İki tekerrürlü olarak gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçların ortalama değerleri, matematiksel modelleri fit etmek için kullanılmış olup modellemelerde Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılmıştır. Substrat olarak inülin ve sukroz kullanılarak gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçların matematiksel modellemesi sırasıyla gerçekleştirilmiş olup sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

4.16.1. İnülin ile gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesi

Substrat olarak inülinin kullanımı ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlara ait deneysel verilerin (Çizelge 4.73) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.73'te gösterilmiştir. İnülin kullanılarak gerçekleştirilen analizden elde edilen sonuçların deneysel değerleri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.74) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafike edilmiştir (EK-14).

Model tahminlerinden elde edilen sonuçlara göre, Asimetrik, Fitzhugh ve Cone modelleri dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen *Iase* aktivite değerleri, 1 g/L inülin kullanılarak gerçekleştirilen analizin sonunda belirlenen deneysel *Iase* aktivite değerinden (61.69 U/mL) yüksek tahmin edilmiş olup von Bertalanffy modeli ile eşit olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak 5 g/L inülin kullanılarak gerçekleştirilen analizin sonunda tespit edilen *Iase* aktivitesi (250.85 U/mL), Weibull ve Mitscherlich modelleri ile yüksek hesaplanırken modellerin geri kalanı ile düşük tahmin edilmiştir. Diğer yandan, Stannard, Asimetrik, von Bertalanffy ve Brody & Monomolecular modelleri, 10 g/L inülin ile gerçekleştirilen deneysel çalışmadan elde edilen *Iase* aktivitesini (380.38 U/mL) düşük tahmin ederken modellerin geri kalanı yüksek hesaplamıştır. Substrat olarak 20 g/L ve 90 g/L inülin kullanıldığında elde edilen *Iase* aktiviteleri (sırasıyla 542.06 U/mL ve 835.01 U/mL), çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller tarafından yüksek hesaplanmıştır.

Çizelge 4.73. Substrat olarak inülin kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesinde kullanılan parametre ve *Iase* aktivitesi değerleri

Parametre	Değer	İnülin ([S], g/L)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	61.69	1	61.69
A_m (U/mL)	896.41	5	250.85
Q (U/mL/[S])	35.02	10	380.38
v_1	392	20	542.06
β	1951	30	702.28
k_1	0.0515	40	798.76
k_2	0.0769	50	849.63
δ_1	1	70	896.41
δ_2	1.611	90	835.01
d	1.718		
$[S]_L$	14.1956		
k_3	0.0485		
k_4	0.0532		
t_0	-0.3403		
k_5	0.0485		
k_6	0.04436		
k_7	0.056		
v_2	1.012		
k_8	0.089		
v_3	1.31		

30 g/L inülin kullanıldığında elde edilen *Iase* aktivitesi (702.28 U/mL) ise Stannard, Weibull, MMF, von Bertalanffy, Fitzhugh ve Cone modelleri ile yüksek hesaplanmış olup Asimetrik, Exponansiyel, Brody & Monomolecular ve Mitscherlich modelleri ile düşük tahmin edilmiştir. Öte yandan, yalnızca Stannard ve Fitzhugh modelleri, 40 g/L inülin ile elde edilen *Iase* aktivitesini (798.76 U/mL) yüksek hesaplarken modellerin geri kalanı düşük hesaplamış olup 50 g/L inülin konsantrasyonu ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucundaki deneysel *Iase* aktivitesi değeri (849.63 U/mL) ise yalnızca Stannard modeli ile yüksek tahmin edilmiş olup modellerin geri kalanı düşük hesaplamıştır. 70 g/L inülin ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise 896.41 U/mL *Iase* aktivitesi elde edilmiş olup kullanılan matematiksel modellerin tamamı düşük tahmin etmiştir.

Çizelge 4.73'te verilen model parametrelerinin kullanımı ile inülin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen *Iase* aktivitesi değerleri, deneysel verilere bağlı olarak matematiksel modeller (Çizelge 3.6) ile tahmin edilmiştir. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.75'te sunulmuştur.

Çizelge 4.74. Substrat olarak inülinin kullanıldığı deneysel çalışmanın matematiksel modellemesi

Model	İnülin ([S], g/L)								
	1	5	10	20	30	40	50	70	90
<i>Iase</i> (U/mL) (Deneysel)	61.69	250.85	380.38	542.06	702.28	798.76	849.63	896.41	835.01
Stannard	132.73	210.39	338.28	592.63	755.27	835.46	870.90	892.08	895.69
Weibull	103.59	251.19	397.66	598.41	718.36	790.02	832.84	873.72	888.31
MMF	74.87	209.07	392.04	618.24	724.12	779.04	810.85	844.42	861.00
Asimetrik	9.30	127.95	317.25	576.50	702.24	767.03	803.98	842.10	860.38
Ekspansiyel	101.21	241.44	382.48	579.98	701.59	776.46	822.56	868.41	885.80
von Bertalanffy	61.69	221.69	379.28	592.63	717.96	791.59	834.83	875.16	889.08
Brody & Monomolecular	101.21	241.44	382.48	579.98	701.59	776.46	822.56	868.41	885.80
Mitscherlich	136.30	259.88	386.50	569.19	686.43	761.66	809.94	860.80	881.75
Fitzhugh	47.14	215.25	380.49	601.08	727.54	799.90	841.27	878.41	890.54
Cone	36.17	230.54	414.06	609.87	702.39	753.61	785.32	821.61	841.31

Çizelge 4.75. Substrat olarak inülinin kullanıldığı deneysel çalışmada kullanılan matematiksel modellerin validasyonu

Model	<i>Iase</i> (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
Stannard	46.33	42.24	29.87	0.9813	1.02	109.05	1.00	1.07
Weibull	31.98	25.94	18.34	0.9909	0.96	93.25	0.98	1.03
MMF	38.88	33.46	23.66	0.9811	0.97	97.16	1.01	1.06
Asimetrik	57.45	47.77	33.78	0.9819	1.07	95.96	1.11	1.13
Eksponansiyel	29.23	24.20	17.11	0.9904	0.96	82.45	1.00	1.03
von Bertalanffy	28.48	21.53	15.23	0.9908	1.02	81.93	1.00	1.04
Brody & Monomolecular	29.23	24.20	17.11	0.9904	0.96	82.45	1.00	1.03
Mitscherlich	38.12	32.43	22.93	0.9881	0.91	81.76	1.00	1.04
Fitzhugh	31.76	24.18	17.09	0.9901	1.04	84.11	1.00	1.04
Cone	45.47	37.56	26.56	0.9773	0.95	91.29	1.01	1.06

Çizelge 4.75'ten elde edilen sonuçlara göre, minimum RMSE (28.48 U/mL), MAE (21.53 U/mL) ve MSD (15.23 U/mL) değerleri von Bertalanffy modeli ile elde edilmiş olup bunların maksimum değerleri (sırasıyla 57.45 U/mL, 47.77 U/mL, 33.78 U/mL) Asimetrik model ile belirlenmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9909) Weibull model ile tespit edilirken minimum R^2 değeri (0.9773) ise Cone modelinin kullanımı ile elde edilmiştir. Diğer yandan, 1'e en yakın m değerleri Stannard ve von Bertalanffy modelleri ile belirlenirken 1'e en uzak m değer de Mitscherlich modeli ile saptanmıştır. Öte yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki *Iase* aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin Mitscherlich model olduğu belirlenmiş olup (AIC=81.76) bunu von Bertalanffy modeli takip etmiştir (AIC=81.93). Diğer yandan, BF ve AF değerleri de önemli kıstaslardır ve değerleri hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.75'te gösterilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Bu açıklamaya göre, diğer değerleri göz önüne alındığında Asimetrik modelin BF değeri 1'den nispeten büyük hesaplanmıştır. Bu sonuç, Asimetrik model ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve ayrıca bu modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğunu gösterir. 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna göre ise yalnızca Weibull modelinin BF değeri 1'in altında tespit edilmiş olup bu, modelin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu anlamına gelir. Öte yandan 1'e eşit BF değerleri, Stannard, Eksponansiyel, von Bertalanffy, Brody & Monomolecular, Mitscherlich ve Fitzhugh modelleri ile elde edilmiştir. Böylece, bu modellerin yapısal sapma göstermediği anlaşılmıştır. Ayrıca, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel verilerden Stannard için %7, Weibull, Eksponansiyel ve Brody & Monomolecular için %3, MMF ve Cone için %6, Asimetrik için %13 ve von Bertalanffy, Mitscherlich ve Fitzhugh için %4 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Weibull, Eksponansiyel ve Brody & Monomolecular modelleri ile %3 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %13 ile Asimetrik modelinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, von Bertalanffy modelini kullanmanın *Iase* aktivitesini başarılı bir şekilde temsil ettiğini minimum RMSE, MAE

ve MSD değerleri, düşük AIC değeri (81.93), yüksek R^2 değeri (0.9908), 1'e yakın m değeri (1.02), 1'e eşit BF değeri ve %4 AF değeri göstermiştir. Ayrıca, von Bertalanffy modelinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, I_{ase} aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.16.2. Sukroz ile gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesi

Substrat olarak sukrozun kullanımı ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlara ait deneysel verilerin (Çizelge 4.76) matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri Çizelge 4.76'da verilmiştir.

Çizelge 4.76. Substrat olarak sukroz kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmanın modellenmesinde kullanılan parametre ve S_{ase} aktivitesi değerleri

Parametre	Değer	Sukroz ([S], g/L)	S_{ase} (U/mL)
A_0 (U/mL)	4.64	1	4.64
A_m (U/mL)	1266.56	5	75.43
Q (U/mL/[S])	20.52	10	256.70
v_2	421.6	30	614.56
β	2004	40	735.61
k_1	0.0212	50	837.35
k_2	0.03391	70	936.76
δ_1	1	80	1009.27
δ_2	1.469	90	1044.94
d	1.479	100	1091.13
$[S]_L$	31.55	120	1195.80
k_3	0.0212	180	1263.63
k_4	0.02085	200	1266.56
t_0	1		
k_5	0.0212		
k_6	0.0193		
k_7	0.0246		
v_2	1.19		
k_8	0.0311		
v_3	1.511		

Sukroz kullanılarak gerçekleştirilen analizden elde edilen sonuçların deneysel verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup (Çizelge 4.77) hem deneysel hem de hesaplanan veriler grafikte gösterilmiştir (EK-15). Elde edilen sonuçlara göre, von Bertalanffy modeli dışında geri kalan modeller ile tahmin edilen S_{ase} aktivite değerleri, 1 g/L sukroz kullanılarak gerçekleştirilen analizin sonundaki deneysel S_{ase} aktivite değerinden (0.00 U/mL) yüksek tahmin edilmiş olup von Bertalanffy modeli ile eşit olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak 5 g/L sukroz kullanılarak gerçekleştirilen analizin sonunda tespit edilen S_{ase} aktivitesinin (75.43 U/mL), yalnızca Stannard ve Cone modelleri ile düşüktahmin ederken modellerin geri kalanı yüksek hesaplamıştır. Diğer yandan, 10 g/L, 30 g/L, 120 g/L ve 180 g/L sukroz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen S_{ase} aktivite değerleri (sırasıyla 256.70 U/mL, 614.56 U/mL, 1195.80 U/mL ve 1263.63 U/mL)

sırasıyla yalnızca Mitscherlich modeli, MMF modeli, Stannard modeli ve Stannard modeli ile yüksek tahmin edilmiş olup modellerin geri kalanı düşük hesaplamıştır. 40 g/L sukroz kullanıldığında elde edilen *Sase* aktivitesi (735.61 U/mL), çalışmada kullanılan Stannard, MMF, Asimetrik ve Cone modelleri tarafından yüksek hesaplanırken 50 g/L sukroz kullanıldığında ise belirlenen deneysel *Sase* aktivitesini (837.35 U/mL) Stannard, MMF, Asimetrik ve Fitzhugh modelleri yüksek tahmin etmiştir. Modellerin geri kalanı ise 40 ve 50 g/L sukroz ile gerçekleştirilen reaksiyondan tespit edilen *Sase* aktivitelerini düşük hesaplamıştır. 70 g/L ve 80 g/L sukroz kullanıldığında elde edilen *Sase* aktiviteleri (sırasıyla 936.76 U/mL ve 1009.27 U/mL) ise çalışmada kullanılan bütün matematiksel modeller tarafından yüksek hesaplanmıştır. Diğer yandan, yalnızca Asimetrik model, 90 g/L sukroz ile elde edilen *Sase* aktivitesini (1044.94 U/mL) düşük hesaplarken modellerin geri kalanı yüksek tahmin etmiştir. 120 g/L sukroz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucundaki deneysel *Sase* aktivitesi değeri (1195.80 U/mL) ise MMF ve Asimetrik modelleri ile düşük hesaplanmış olup modellerin geri kalanı yüksek hesaplamıştır. 200 g/L sukroz ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise 1266.56 U/mL *Sase* aktivitesi elde edilmiş olup çalışmada kullanılan matematiksel modellerin tamamı düşük tahmin etmiştir.

Çizelge 4.76'da verilen model parametrelerinin kullanımı ile substrat olarak sukroz kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen *Sase* aktivitesi değerleri, deneysel verilere bağlı olarak matematiksel modeller (Çizelge 3.6) ile tanımlanmıştır. Elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.78'de sunulmuştur. Sonuçlara göre, minimum RMSE (27.34 U/mL), MAE (25.14 U/mL) ve MSD (17.77 U/mL) değerleri von Bertalanffy modeli ile elde edilmiş olup bunların maksimum değerleri (sırasıyla 104.14 U/mL, 80.91 U/mL, 57.21 U/mL) Stannard model ile belirlenmiştir. Maksimum R^2 değeri (0.9962) Weibull, Ekspansiyel, von Bertalanffy ve Brody & Monomolecular modelleri ile tespit edilirken minimum R^2 değeri (0.9697) ise Asimetrik modelinin kullanımı ile elde edilmiştir. Diğer yandan, 1'e eşit m değeri von Bertalanffy modeli ile belirlenirken 1'e en uzak m değeri (1.10) de Stannard modeli ile tespit edilmiştir. Öte yandan, modellerin başarılı olup olmadığının tespitinde AIC değeri de önemli bir ölçüt olarak kabul edilmiş olup en düşük AIC değerine sahip olan modelin deneysel verileri tanımlamada en iyi model olduğu öne sürülmektedir. Deneysel fermentasyondaki *Sase* aktivitesinin matematiksel modellemesinde en düşük AIC değerine sahip olan modelin von Bertalanffy model olduğu belirlenmiş olup (AIC=84.79) maksimum AIC değerine sahip olan modelin de Stannard olduğu saptanmıştır (AIC=126.93).

Çizelge 4.77. Substrat olarak sukrozun kullanıldığı deneysel çalışmanın matematiksel modellemesi

Model	Sukroz ([S], g/L)												
	1	5	10	30	40	50	70	80	90	100	120	180	200
Sase (U/mL) (Deneysel)	4.64	75.43	256.70	614.56	735.61	837.35	936.76	1009.27	1044.94	1091.13	1195.80	1263.63	1266.56
Stannard	40.26	73.95	136.35	544.85	753.96	920.69	1122.73	1176.10	1210.16	1231.58	1253.23	1265.83	1266.28
Weibull	26.57	127.38	241.96	596.03	724.13	827.75	979.39	1034.25	1078.63	1114.53	1167.07	1238.67	1248.31
MMF	8.72	87.01	214.77	641.25	772.75	867.25	988.83	1029.02	1060.62	1085.94	1123.59	1183.54	1194.77
Asimetrik	7.64	77.96	195.77	609.75	743.33	840.99	968.58	1011.21	1044.89	1071.96	1112.36	1176.98	1189.12
Ekspansiyel	26.57	127.38	241.96	596.03	724.13	827.75	979.39	1034.25	1078.63	1114.53	1167.07	1238.67	1248.31
von Bertalanffy	0.00	101.35	216.70	574.68	704.89	810.60	966.07	1022.62	1068.53	1105.80	1160.61	1236.23	1246.57
Brody & Monomolecular	26.57	127.38	241.96	596.03	724.13	827.75	979.39	1034.25	1078.63	1114.53	1167.07	1238.67	1248.31
Mitscherlich	87.70	175.28	275.67	592.98	711.21	808.68	955.30	1009.93	1054.98	1092.11	1147.97	1229.31	1241.24
Fitzhugh	15.19	97.31	206.81	584.23	725.61	839.36	1002.02	1058.85	1103.64	1138.86	1188.22	1248.58	1255.56
Cone	6.65	71.78	185.16	600.13	736.80	837.00	967.82	1011.41	1045.75	1073.29	1114.23	1179.20	1191.29

Diğer yandan, BF ve AF değerleri de önemli ölçütler olup sonuçlar Çizelge 4.78'de verilmiştir. 1'den daha büyük bir BF değeri, elde edilen model tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesine neden olduğunu gösterir. Ancak bu çalışmada böyle bir durum söz konusu değildir. Öte yandan, 1'den daha düşük bir BF değeri, modelin genel olarak başarısız olduğunu gösterir. Buna göre Weibull, Exponansiyel, Mitscherlich ve Fitzhugh modellerinin BF değeri 1'in altında tespit edilmiş olup bu, modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğu anlamına gelir. Bununla beraber 1'e eşit BF değerleri, Stannard, MMF ve von Bertalanffy modelleri ile elde edilmiştir. Böylece, bu modellerin yapısal sapma göstermediği anlaşılmıştır. Ayrıca, AF değerlerinin ortalama olarak tahminin deneysel verilerden Stannard için %13, Weibull, Eksponansiyel ve Brody & Monomolecular için %7, MMF, von Bertalanffy ve Fitzhugh için %6, Asimetrik ve Cone için %5, ve Mitscherlich için %9 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre en düşük farklılık Asimetrik ve Cone modelleri ile %5 düzeyinde elde edilirken en yüksek farklılık ise %13 ile Stannard modelinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.78. Substrat olarak sukrozun kullanıldığı deneysel çalışmada kullanılan matematiksel modellerin validasyonu

Model	Sase (U/mL)							
	RMSE	MAE	MSD	R^2	m	AIC	BF	AF
Stannard	104.14	80.91	57.21	0.9697	1.10	126.93	1.00	1.13
Weibull	27.87	25.35	17.92	0.9962	0.98	94.17	0.96	1.07
MMF	43.95	36.36	25.71	0.9900	0.96	103.28	1.00	1.06
Asimetrik	44.48	29.83	21.09	0.9923	0.96	94.53	1.03	1.05
Eksponansiyel	27.87	25.35	17.92	0.9962	0.98	85.17	0.96	1.07
von Bertalanffy	27.34	25.14	17.77	0.9962	1.00	84.79	1.00	1.06
Brody & Monomolecular	27.87	25.35	17.92	0.9962	0.98	85.17	0.96	1.07
Mitscherlich	43.38	32.22	22.78	0.9956	0.92	88.02	0.94	1.09
Fitzhugh	36.23	29.55	20.90	0.9937	1.02	90.42	0.99	1.06
Cone	44.83	30.07	21.27	0.9923	0.97	94.68	1.05	1.05

Sonuç olarak, von Bertalanffy modelini kullanmanın Sase aktivitesini başarılı bir şekilde temsil ettiğini minimum RMSE, MAE ve MSD değerleri, minimum AIC değeri (84.79), maksimum R^2 değeri (0.9962), 1'e eşit m değeri, 1'e eşit BF değeri ve %6 AF değeri göstermiştir. Ayrıca, von Bertalanffy modelinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, Sase aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağlamıştır.

4.16.3. Deneysel ve tahmin edilen V_{max} ve K_m değerlerinin karşılaştırılması

Modeller aracılığıyla tahmin edilen veriler kullanılarak hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri ile deneysel V_{max} ve K_m değerleri arasında daha fazla kıyaslama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, tahmin edilen deneysel veriler kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf hız eşitlikleri ve GraphPad Prism 7 programı ile hesaplanmıştır. Farklı substratlardan elde edilen V_{max} ve K_m değerlerine ait veriler Çizelge 4.79 ve Çizelge 4.80'de sunulmuştur.

Substrat olarak inülin ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen deneysel V_{max} ve K_m değerleri ile birlikte modellerden elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri incelendiğinde en başarılı modelin olduğu görülmektedir. Çünkü deneysel V_{max} ve K_m değerlerini yüksek korelasyon katsayısı ile birlikte en iyi tahmin eden model, von Bertalanffy modelidir (Lineweaver-Burk: $V_{max} = 1000$ U/mL, $K_m = 15.3$ g/L, $R^2 = 0.9986$; Eadie-Hofstee: $V_{max} = 1104.4$ U/mL, $K_m = 17.85$ g/L, $R^2 = 0.9732$; Hanes-Woolf: $V_{max} = 1111.11$ U/mL, $K_m = 17.33$ g/L, $R^2 = 0.9962$; ve GraphPad Prism 7: $V_{max} = 1101$ U/mL, $K_m = 17.43$ g/L, $R^2 = 0.9951$).

Substrat olarak sukroz ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen deneysel V_{max} ve K_m değerleri ile birlikte modellerden elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk hız eşitliği ile hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri incelendiğinde en başarılı modelin Mitscherlich olduğu görülmektedir (Lineweaver-Burk: $V_{max} = 1666.67$ U/mL, $K_m = 50.17$ g/L, $R^2 = 0.9926$). Diğer yandan, elde edilen veriler Eadie-Hofstee hız eşitliğine konulduğunda Stannard, von Bertalanffy, Fitzhugh modelleri hariç geri kalan modellerin tamamı yüksek belirleme katsayısı ile birlikte deneysel V_{max} ve K_m değerlerini başarılı bir şekilde tahmin etmiştir. Özellikle Mitscherlich modelinin yüksek R^2 değeri (0.9894) ile birlikte deneysel V_{max} ve K_m değerlerini başarıyla tahmin ettiği dikkat çekmektedir (Eadie-Hofstee: $V_{max} = 1583.1$ U/mL, $K_m = 47.74$ g/L, $R^2 = 0.9894$). Öte yandan, Hanes-Woolf hız eşitliği ile de deneysel V_{max} ve K_m değerleri başarılı bir şekilde kullanılan modeller tarafından başarılı bir şekilde tahmin etmiş olup belirleme katsayısı açısından en başarılı modelin Mitscherlich olduğu tespit edilmiştir (Hanes-Woolf: $V_{max} = 1666.67$ U/mL, $K_m = 48$ g/L, $R^2 = 0.9979$). Tahmin edilen sonuçlar GraphPad Prism 7 programında işlendiğinde ise hemen hemen tüm modeller tarafından deneysel V_{max} ve K_m değerlerinin başarılı bir şekilde tahmin edildiği belirlenmiş olup en başarılı modelin belirleme katsayısı açısından belirlendiğinde Mitscherlich olduğu saptanmış olup V_{max} , K_m ve R^2 değerleri sırasıyla 1554 U/mL, 45.01 g/L ve 0.9964 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, substrat olarak inülin kullanıldığında deneysel V_{max} ve K_m değerlerinin tahmininde, yüksek belirleme katsayısı ile birlikte en başarılı matematiksel modelin von Bertalanffy olduğu, substrat olarak sukroz kullanıldığında ise en başarılı matematiksel modelin Mitscherlich olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.79. İnülin üzerinde gerçekleştirilen *Iase* aktivitesinin deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

Model	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee			Hanes-Woolf			GraphPad Prism 7		
	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2
Deneyssel	1055.55	16.13	0.9996	1068.45	16.58	0.9532	1055.55	14.60	0.9817	1080	16.99	0.9832
Stannard	666.67	4.33	0.8567	841.55	6.32	0.5944	1111.11	15.33	0.9765	1148	18.49	0.9739
Weibull	769.23	6.62	0.9769	916.70	9.13	0.8457	1000.0	12.80	0.9951	1069	15.47	0.9948
MMF	833.33	10.33	0.9879	998.31	13.69	0.8976	1000.0	14.10	0.9935	1046	15.30	0.9907
Asimetrik	2500.0	87.25	0.9683	1168.90	26.16	0.5889	1250.0	28.63	0.9439	1129	21.84	0.9788
Ekspansiyel	769.23	6.77	0.9738	903.03	9.28	0.8281	1000.0	13.60	0.9941	1076	16.66	0.9951
von Bertalanffy	1000.0	15.30	0.9986	1104.40	17.85	0.9732	1111.11	17.33	0.9962	1101	17.43	0.9951
Brody & Monomolecular	769.23	6.77	0.9739	903.03	9.28	0.8281	1000.0	13.60	0.9941	1076	16.66	0.9951
Mitscherlich	714.29	4.43	0.9334	815.54	5.92	0.7260	1000.0	12.80	0.9915	1049	15.78	0.9890
Fitzhugh	1428.57	29.14	0.9997	1205.70	22.62	0.9572	1111.11	18.78	0.9918	1109	17.49	0.9933
Cone	2500.0	67.50	0.9945	1063.40	18.76	0.7518	1000.0	17.20	0.9797	998.1	13.94	0.9943

Çizelge 4.80. Sukroz üzerinde gerçekleştirilen *Sase* aktivitesinin deneysel ve tahmin edilen kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

Model	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee			Hanes-Woolf			GraphPad Prism 7		
	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2	V_{max} (U/mL)	K_m (g/L)	R^2
Deneyssel	1666.67	53.00	0.9881	1578.3	45.51	0.9492	1547.62	44.20	0.9952	1578	45.45	0.9925
Stannard	666.67	16.60	0.8869	1579.6	43.48	0.2574	2000.00	70.20	0.8524	1725	48.36	0.9624
Weibull	2000.0	71.00	0.9977	1689.5	54.97	0.9559	1666.67	48.83	0.9935	1595	46.77	0.9958
MMF	2000.0	81.20	0.9839	1566.8	46.82	0.7896	1428.57	38.29	0.9847	1486	39.00	0.9890
Asimetrik	2500.0	113.25	0.9834	1584.8	51.20	0.7598	1428.57	42.43	0.9796	1501	42.55	0.9891
Eksponansiyel	2000.0	71.00	0.9977	1689.5	54.97	0.9559	1666.67	48.83	0.9935	1595	46.77	0.9958
von Bertalanffy	2000.0	81.20	0.9959	1743.9	61.72	0.9222	1666.67	53.17	0.9895	1625	51.00	0.9942
Brody & Monomolecular	2000.0	71.00	0.9977	1689.5	54.97	0.9559	1666.67	48.83	0.9935	1595	46.77	0.9958
Mitscherlich	1666.67	50.17	0.9992	1583.1	47.74	0.9894	1666.67	48.00	0.9979	1554	45.01	0.9964
Fitzhugh	2500.0	108.00	0.9924	1782.2	61.93	0.8474	1666.67	51.67	0.9806	1643	49.16	0.9906
Cone	2500.0	121.25	0.9816	1594.1	52.62	0.7180	1428.57	44.14	0.9739	1516	44.02	0.9881

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, öncelikle farklı karbon kaynaklarından *Aspergillus niger* A42 (ATCC204447) ile *Iase* üretimi incelenmiş olup kinetik parametre sonuçlarına göre en iyi karbon kaynağı seçilmiştir. En iyi karbon kaynağı kullanılarak elde edilen *Iase* enzim solüsyonu, Na-asetat tampon pH'ı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi açısından enzimin en iyi çalışma koşullarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra, seçilen en iyi karbon kaynağında çalkalamalı inkübatörde *Iase* üretiminin besiyeri kompozisyonu, sırasıyla PBD ve MKD yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Optimum besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik modellemesi yapılmış olup fungal gelişim için lojistik model, enzim veya protein üretimi için LP model ve substrat tüketimi için MLP model kullanılmıştır. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda küçük ölçekli ve büyük ölçekli fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim, santrifüj-süre kombinasyonu ve UF prosesi ile kısmi saflaştırıldıktan sonra enzimin spesifik özellikleri (substrat spesifikliğı ve V_{max} ve K_m kinetik değerlerinin belirlenmesi, enzim konsantrasyonunun etkisi, farklı reaktiflerin etkisi, enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi, termodinamik parametrelerin hesaplanması, moleküler ağırlığın tespiti) tespit edilmiştir. Diğer yandan, hem PBD hem de MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların deneysel verileri, matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilmiş olup fermentasyonlar modellenmiştir. Model kıyaslama verilerine (RMSE, MAE, MSD, m , R^2 , AIC, BF ve AF) göre en iyi model(ler) tespit edilmiştir. Öte yandan, enzimin substrat spesifikliğıne ait deneysel veriler de matematiksel modeller kullanılarak hesaplanmış olup deneysel ve tahmin edilen kinetik parametre değerleri (V_{max} ve K_m) karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre en iyi model(ler) belirlenmiştir.

Farklı karbon kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen erlenmayer denemelerinde karbon kaynaklarının *Iase* aktivitesi ve kinetik parametre değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Maksimum *Iase*, Q_{Iase} , $Q_{şeker}$ ve SUY değerleri sırasıyla 383.73 U/mL, 6.73 U/mL/sa, 0.37 g/L/sa ve % 98.99 olarak melasın kullanımıyla belirlenmiştir. Böylece, *Iase* üretiminde en iyi karbon kaynağının melas olduğu tespit edilmiştir.

Melas kullanılarak elde edilen enzim solüsyonu, enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Substrat olarak inülin kullanılarak yapılan analizlerin sonucunda optimum pH, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi sırasıyla pH 4.8, 60°C ve 10 dakika olarak belirlenmiştir. Substrat olarak sukroz kullanılarak gerçekleştirilen analizlerin sonucunda optimum pH, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi sırasıyla pH 4.9, 60°C ve 10 dakika olarak belirlenmiştir. Enzim analizlerinde bütünlüğü sağlamak amacıyla 100 mM Na-asetat tamponunun pH değeri 4.8'e ayarlanmıştır.

Besiyeri kompozisyonu PBD kullanılarak optimize edilmiştir. Bu amaçla 11 farklı besiyeri bileşeni kullanılmış olup gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinin sonucunda maya ekstraktı, pepton ve amonyum nitratın enzim üretimi üzerinde istatistiksel olarak önemli etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca maya ekstraktı ve peptonun enzim üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli pozitif yönde etkisinin

olduğu, amonyum nitratın ise istatistiksel olarak önemli negatif yönde etkisinin tespit edilmiştir. Yani, besiyerinde maya ekstraktı ve pepton konsantrasyonunun artması ile birlikte aktivitenin arttığı, amonyum nitrat konsantrasyonunun artması ile birlikte aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Besiyeri A (kontrol), Besiyeri B (%1 maya ekstraktı, %1 pepton ve %0.1 amonyum nitrat içerir) ve Besiyeri C (%1 maya ekstraktı ve %1 pepton içerir) olmak üzere 3 farklı besiyerinde doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiş olup en iyi sonuçlar Besiyeri C kullanılarak elde edilmiştir. Besiyeri C'nin kullanımı ile *Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *Slase*, *SSase*, *Q_{Iase}*, *Q_{şeker}*, *SUY* ve pH değerleri sırasıyla 1011.02 U/mL, 834.28 U/mL, 1.22, 0.34 mg/mL, 3008.21 U/mg, 2488.24 U/mg, 158.49 U/mL/gün, 6.18 g/L/gün, %94.54 ve 6.30 olarak bulunmuştur.

PBD dizayn sonuçlarına göre maya ekstraktı ve peptonun enzim aktivitesi üzerine önemli ölçüde etkisinin olduğu yapılan doğrulama denemelerinin sonucunda anlaşılmıştır. Bu çalışmanın devamı olarak, bu önemli değişkenlerin besiyerinde kullanılan seviyelerinin daha ileri düzeyde optimizasyonu, MKD ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları ve 3D yüzey grafiklerinden elde edilen bulgulara göre besiyerinde kullanılan maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ve pepton konsantrasyonunun azalması ile birlikte enzim aktivitesi ve diğer kinetik parametre değerlerinde önemli ölçüde etkili olduğu tespit edilmiştir. Doğrulama denemeleri sonrasında optimum besiyeri kompozisyonunun %4.20 maya ekstraktından oluşması gerektiği anlaşılmıştır. Bu koşullarda gerçekleştirilen doğrulama denemesi ile *Iase*, *Sase*, I/S oranı, protein miktarı, *Slase*, *SSase*, X, pH, *Q_{Iase}*, *Q_{şeker}* ve *SUY* değerleri sırasıyla 1294.50 U/mL, 1076.85 U/mL, 1.20, 0.40 mg/mL, 3209.83 U/mg, 2671.61 U/mg, 17.35 g/L, 6.84, 159.57 U/mL/gün, 7.39 g/L/gün ve %98.08 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, MKD ile besiyeri optimizasyonunun fermentasyon sonuçlarını geliştirdiği ve artırdığı anlaşılmıştır. Ayrıca, belirlenen I/S oranlarının 10^{-2} 'den büyük olması nedeniyle enzimin *Iase* doğasında olduğu belirlenmiştir.

PBD ve MKD ile optimize edilen besiyeri formülasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonların sonuçları kinetik olarak modellenmiş olup enzim veya protein üretiminin PBD ile optimize edilen besiyeri ortamında fungal gelişimden bağımsız olduğu ($\alpha \leq 0$ ve $\beta \neq 0$), MKD ile optimize edilen besiyerinde ise enzim üretiminin karışık gelişimle ilgili ($\alpha \neq 0$ and $\beta \neq 0$) olduğu sonucuna ulaşılmış olup önerilen kinetik modellerden tahmin edilen verilerin deneysel değerler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Yapılan küçük ölçekli (5-L) biyoreaktör denemelerinin sonucunda fermentasyonların pH kontrolsüz ve havalandırmalı ortamda devam ettirilmesi gerektiği bulunmuş olup pH kontrollü ve havalandırmalı ortamda elde edilen aktivite değerlerine göre başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.21). Öte yandan MKD ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen flask fermentasyonlarına göre *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri 1294.50 U/mL ve 1076.85 U/mL'den sırasıyla pH kontrolsüz/havalandırmalı ortamda 1810.76 U/mL ve 1537.88 U/mL'ye ve pH kontrollü/havalandırmalı ortamda 1825.38 U/mL ve 1170.46 U/mL'ye artırılmıştır. Büyük ölçekli (30-L) pH kontrollü ve havalandırmalı ortamda gerçekleştirilen fermentasyon denemesinden ise *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 791.35 U/mL ve 616.90 U/mL olarak ölçülmüştür. Diğer yandan, hem küçük ölçekli hem de büyük ölçekli fermentasyonlarda aşırı fungal gelişimin olması (Şekil 4.47 ve Şekil 4.49), fermentasyon ortamının havalandırmasının ve karıştırmasının yetersiz olmasına neden olduğu belirlenmiş olup bu sorunun farklı

fermentasyon stratejileri (pH değiştirme, immobilizasyon, biyofilm reaktör, mikropartikül ekleme) ve modları (beslemeli-kesikli, tekrarlanan-kesikli, sürekli) ile üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir.

Fermentasyon sonrasında elde edilen enzim solüsyonu, santrifüj-süre kombinasyonu kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış olup sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Elde edilen sonuçlara göre, en iyi santrifüj-süre kombinasyonu 16873 g-5 dakika olarak belirlenmiş olup *Iase* aktivitesi, verim artışı, *SIase* aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 1181.18 U/mL, %43.02, 2098.86 U/mg ve 1.39 olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, flask fermentasyondan ve pH kontrolsüz/havalandırılmalı biyoreaktörden elde edilen enzim solüsyonu UF prosesi ile de kısmi olarak saflaştırılmış olup UF prosesinin de istatistiksel olarak önemli olduğu anlaşılmıştır ($P<0.05$). Flask ile elde edilen enzim solüsyonuna yönelik 10 kDa UF prosesi uygulamasında retentant için *Iase* aktivitesi, protein miktarı, *SIase* aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 12065.20 U/mL, 1.17 mg/mL, 10281.77 U/mg ve 5.33 olarak tespit edilmiştir. 30 kDa UF prosesinin uygulanması ile bu değerler sırasıyla 9316.90 U/mL, 1.04 mg/mL, 8941.12 U/mg ve 4.63 olarak bulunmuştur. Biyoreaktörden elde edilen enzim solüsyonu 50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa membran kartuşlar ile saflaştırıldığında *Iase* ve *Sase* aktivite değerleri sırasıyla 50 kDa için 9882.17 U/mL ve 8220.52 U/mL, 30 kDa için 10474.22 U/mL ve 8727.29 U/mL ve 10 kDa için 11292.86 U/mL ve 8931.95 U/mL olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hem santrifüj-süre kombinasyonu hem de UF prosesi ile enzim solüsyonu başarılı bir şekilde kısmi saflaştırılmış olup saflaştırma katsayıları kayda değer şekilde artmıştır.

Flask fermentasyondan elde edilen *Iase* enziminin substrat spesifikliğinin ve enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analizlerde, substrat olarak inülin kullanıldığında V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1110 U/mL ve 17.79 g/L olarak belirlenmiştir. Substrat olarak sukroz kullanıldığında ise bu değerler sırasıyla 1623 U/mL ve 49.43 g/L olarak tespit edilmiştir. Havalandırılmalı ve pH kontrolsüz biyoreaktörden elde edilen enzimin V_{max} ve K_m değerleri substrat olarak inülin kullanıldığında 4321 U/mL ve 28.77 g/L ve substrat olarak sukroz kullanıldığında ise bu değerler sırasıyla 4202 U/mL ve 25.95 g/L olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, düşük aktiviteli enziminin substrat olarak kullanılan inüline düşük K_m değeri nedeniyle sukrozdan daha çok (2.78 kat) affinite (ilgi) gösterdiği, tam tersine yüksek aktiviteli enzimin sukroza daha çok affinite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, hesaplanan I/S oranlarının 10^{-2} 'den büyük olması nedeniyle enzimin *Iase* doğasında olduğu anlaşılmıştır.

Diğer yandan, enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenmiş olup substrat üzeriene eklenen enzim konsantrasyonunun artması ile birlikte hem enzim aktivitesinin hem de spesifik aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Maksimum *Iase*, *Sase*, *SIase* ve *SSase* aktivite değerleri 200 µL enzim konsantrasyonu eklenerek elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla 2286.35 U/mL, 2798.00 U/mL, 10992.07 U/mg ve 13451.93 U/mg olarak belirlenmiştir. Ayrıca, substrat üzerine eklenen enzim konsantrasyonunun artması ile I/S oranının 6.88'dan 0.80'ye azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, elde edilen I/S oranı sonuçlarına göre, I/S oranının 10^{-2} 'den büyük olması nedeniyle enzimin *Iase* doğasında olduğu anlaşılmıştır.

Enzim solüsyonu üzerine eklenen ajanların aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, yalnızca Mn^{2+} 'nin aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, Li^+ , Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} ve Co^{2+} 'nin enzimin aktivite değerini nispeten azalttığı belirlenmiş olup %90'ın üzerinde aktivite değerleri elde edilmiştir ($P>0.05$). Ayrıca, Ag^+ ve Cu^{2+} 'nin enzimin aktivite değerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiş olup ($P<0.05$) bu iki ajanın enzimin inhibitörleri olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Enzimatik bir reaksiyonun E_a , E_{ia} , A , D -değeri, Z -değeri, Q_{10} -değeri, k_d , $t_{1/2}$, ΔH , ΔG ve ΔS değerleri tespit edilmiş olup sonuçlar hem *Iase* hem de *Sase* açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Iase* için E_a , E_{ia} , A ve Z -değeri sırasıyla 37.30 kJ/mol, 112.86 kJ/mol, 4.3×10^8 $\mu\text{mol/mL.dk}$ ve 12.80°C olarak bulunmuştur. *Sase* için bu değerler sırasıyla 44.22 kJ/mol, 182.87 kJ/mol, 4.6×10^9 $\mu\text{mol/mL.dk}$ ve 8.95°C olarak belirlenmiştir. Elde edilen aktivasyon enerjileri incelendiğinde *Iase*'nin E_a , E_{ia} ve Z değerlerinin *Sase*'nin E_a , E_{ia} ve Z değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiş olup aktivasyon enerjisi yüksek olan *Sase*'nin reaksiyon hızının yavaş olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, sıcaklığın artması ile birlikte Q_{10} , k_d ve ΔS değerleri artmış olup D , $t_{1/2}$, ΔH ve ΔG değerleri de azalmıştır.

Enzimin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, 6 saatlik sürenin sonunda enzimin 30°C ve 40°C 'de oldukça stabil olduğu, 50°C 'de yaklaşık %80 aktivite gösterdiği (yaklaşık %20 aktivite kaybı), 60°C 'de %78 aktive kaybının olduğu (%22 aktivite gösterdiği) ve 70°C ve 80°C sıcaklıklarda ise aktivitenin neredeyse tamamının (%99'un üzerinde) kaybolduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre, aktivitenin büyük bir bölümünün 60°C ve sonrasındaki sıcaklıklarda kaybolduğu dolayısıyla bu sıcaklıklardan sonra enzimin protein yapısının denatüre olduğu anlaşılmıştır. Diğer yandan, farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonların inaktivasyon hız sabitleri de hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, sıcaklığın artması ile birlikte inaktivasyon hız sabiti değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığını göstermiştir ($P<0.05$). Mikrobiyal yolla melastan üretilen *Iase* enziminin molekül ağırlığı da belirlenmiş olup SDS-PAGE analiz sonucu incelendiğinde *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ile üretilen *Iase* enziminin moleküler ağırlığının 60-70 kDa arasında olduğu belirlenmiştir.

PBD ve MKD ile tespit edilen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon denemelerine ait deneysel veriler, 11 farklı matematiksel model kullanılarak tahmin edilmiş ve bu tahmin edilen veriler kullanılarak en iyi model(ler) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyona ait verilerin matematiksel modellemesi ile hesaplanan değerler kullanılarak elde edilen model kıyaslama verilerine (RMSE, MAE, MSD, R^2 , m , AIC, BF ve AF) göre şeker tüketiminin deneysel verileri Stannard ve Fitzhugh modelleri ile, *Iase* üretiminin deneysel verileri Stannard ve Huang modelleri ile, *Sase* üretiminin deneysel verileri Weibull ve Huang modelleri ile ve S/I oranının deneysel verileri ise MLM ile başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyona ait verilerin matematiksel modellemesi ile hesaplanan değerler kullanılarak elde edilen model kıyaslama verilerine (RMSE, MAE, MSD, R^2 , m , AIC, BF ve AF) göre şeker tüketiminin deneysel verileri MMF ve Cone modelleri ile, *Iase* üretiminin deneysel verileri Stannard, Fitzhugh, Cone

ve MMF modelleri ile, *Sase* üretiminin deneysel verileri MGM ve MRM ile, *S/I* oranının deneysel verileri Weibull modeli ile, *SIase* üretiminin deneysel verileri MRM ve Asimetrik modelleri ile, *SSase* üretiminin deneysel verileri Asimetrik model ile ve *SIase/SSase* oranının deneysel verileri ise MRM ile başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir.

Enzimin substrat spesifikliğı deneysel verileri, 10 farklı matematiksel model kullanılarak tahmin edilmiş ve bu hesaplanan veriler kullanılarak en iyi model(ler) tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, substrat olarak hem inülin hem de sukroz kullanıldığında elde edilen deneysel verilerin tahmininde model karşılaştırma verilerine göre (RMSE, MAE, MSD, R^2 , m , AIC, BF ve AF) en başarılı modelin von Bertalanffy model olduğu belirlenmiş olup bu modelin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, *Iase* ve *Sase* aktivitesinin deneysel verileri ile çok iyi bir uyum sağladığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, substrat spesifikliğı ile ilgili kinetik parametrelerin hesaplanmasında ise substrat olarak inülin kullanıldığında deneysel V_{max} ve K_m değerlerinin tahmininde, yüksek belirleme katsayısı ile birlikte en başarılı matematiksel modelin von Bertalanffy olduğu, substrat olarak sukroz kullanıldığında ise en başarılı matematiksel modelin Mitscherlich olduğu belirlenmiştir.

Perspektif

Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin ışığında, çalışmanın ilerleyen zamanlarda devam ettirilmesi düşünülmektedir. Bu nedenle aşağıdaki hususlar, farklı projelerde/çalışmalarda değerlendirilmek üzere ele alınacaktır.

i. İnülinaz enziminin üretimi ile ilgili küçük ölçekli ve sonrasında büyük ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilecek fermentasyonların koşulları, istatistiksel yöntemler ile optimize edilecektir. Bu amaçla, başlangıç şeker içeriğı, karıştırma hızı, sıcaklık, pH, inokülasyon oranı, inokulum yaşı, havalandırma oranı, üretimi indükleyici ajanların tespiti, fermentasyon ortamının viskozitesi ve reolojisi, alternatif ve ucuz azot kaynaklarının konsantrasyonu gibi parametrelerin çalışılması düşünülmektedir.

ii. Yapılan bu tez çalışması kapsamında, karbon kaynağı olarak lignoselüozik maddeler inülinaz enziminin üretiminde kullanılmamıştır. Bu amaçla pirinç kavuzu, pirinç samanı, buğday samanı, mısır koçanı, arpa kavuzu, yulaf kavuzu, buğday kepeğı, çavdar kepeğı, çay fabrikası atığı, kullanılmış çay yaprakları ve kahve posası gibi lignoselüozik maddelerden inülinaz enziminin üretilmesi ve fermentasyon koşullarının optimize edilmesi düşünülmektedir.

iii. Diğer yandan, yapılan bu tez çalışması kapsamında kesikli fermentasyonlar (çalkalamalı inkübatör ve biyoreaktör) gerçekleştirilmiş olup farklı fermentasyon teknikleri çalışılmamıştır. Bu amaçla kesikli, tekrarlanan-kesikli, beslemeli-kesikli ve sürekli fermentasyonlar ile inülinaz enziminin üretiminin gerçekleştirilmesi düşünülmektedir. Ayrıca, farklı fermentasyon stratejileri ile birinci maddedeki fermentasyon parametrelerinin optimizasyonunu planlanmaktadır.

iv. Bununla beraber, farklı fermentasyon tekniklerine adapte edilebilen farklı fermentasyon stratejilerinin (immobilizasyon, biyofilm reaktör vb.) de inülinaz enziminin üretiminde uygulanması düşünülmekte ve fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu planlanmaktadır.

v. Yapılması planlanan diğer bir çalışma ise yukarıda bahsedilen koşullarda elde edilen enzimin üç boyutlu yapısının çıkarılması, aktif bölgelerinin tespiti, amino asit sekansının çıkarılması ve korunmuş bölgelerinin tespit edilmesi düşünülmektedir.

vi. Diğer yandan, *A. niger* A42 inülinazını üreten genin klonlanması, başka bir konakçı hücreye aktarılması ve ifade edilmesi planlanmaktadır. Böylece hem aktivitenin artırılması hem de sadece inülinaz enzimi üreten bir suşun elde edilmesi amaçlanmaktadır.

vii. Ayrıca, inülinaz üreten orijinal suştan rastgele mutasyon ile mutant hücrelerin elde edilmesi planlanmaktadır. Böylece orijinal suşa göre aşırı üretim yapan bir suşun elde edilebileceği öngörülmektedir.

viii. Üretilen bir metabolitin endüstriye aktarılabilir olması çok önemlidir. Bu amaçla üretilen inülinaz enziminin endüstride kullanılabilirliği de araştırılacaktır. Fruktooligosakkarit üretimi, inülooligosakkarit üretimi, yüksek fruktozlu şurup üretimi, biyoetanol üretimi, 2,3 bütandiol üretimi, sitrik asit üretimi, şeker alkollerinin üretimi, nişin, hiyauronik asit, tek hücre yağı ve proteinin üretimi gibi birçok endüstriyel ürünün de üretilmesi düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) inülinazının üretilmesi ile ilgili gelecekte birçok çalışmanın yapılması planlanmaktadır. Ayrıca, bu enzimin ülkemiz açısından katma değer taşıdığı düşünülmektedir. Diğer yandan yapılması planlanan çalışmalar ile birçok lisansüstü öğrencinin de yetiştirilmesi ve ülkemize alanında uzman bireylerin kazandırılması da amaçlanmaktadır. Yapılacak çalışmalardan çıkacak olan bilimsel çıktıların da ülkemize artı puan kazandırması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abd El Aty, A., Wehaidy, H. and Mostafa, F. 2014. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett-Burman and Taguchi methods. *Carbohydrate Polymers*, 102: 261-268.
- AbdAl-Aziz, S., El-Metwally, M. and Saber, W. 2012. Molecular identification of a novel inulinolytic fungus isolated from and grown on tubers of *Helianthus tuberosus* and statistical screening of medium components. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 245-254.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19 (6): 716-723.
- Akimoto, H., Kushima, T., Nakamura, T. and Ohta, K. 1999. Transcriptional analysis of two endoinulinase genes *inuA* and *inuB* in *Aspergillus niger* and nucleotide sequences of their promoter regions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88 (6): 599-604.
- Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B. and Czjzek, M. 2004. The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (18): 18903-18910.
- Ali, S. and Shahzadi, H. 2015. Nutritional optimization for improved exo-inulinase production from *Aspergillus oryzae* for high-fructose syrup preparations. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 618-631.
- Allais, J.-J., Hoyos-Lopez, G., Kammoun, S. and Baratti, J.C. 1987. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (5): 942-945.
- Angel, S.J., Kavitha, C., Vidyadharani, G., Roy, P. and Dhandapani, R. 2012. Isolation of inulinase producing bacteria from sugarcane soil. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3 (4): 320-326.
- Arand, M., Golubev, A.M., Neto, J.B., Polikarpov, I., Wattiez, R., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulinskaya, A.A., Shabalin, K.A. and Shishliannikov, S.M. 2002. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochemical Journal*, 362 (1): 131-135.
- Astolfi, V., Joris, J., Verlindo, R., Oliveira, J., Maugeri, F. and Mazutti, M. 2011. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59: 39-49.
- Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permaul, K. and Singh, S. 2007. Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 45 (4): 439-444.

- Bairoch, A. 2000. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28 (1): 304-305.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4): 277-294.
- Barthomeuf, C., Regerat, F. and Pourrat, H. 1991. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72 (6): 491-494.
- Basso, A., Spizzo, P., Ferrario, V., Knapic, L., Savko, N., Braiuca, P., Ebert, C., Ricca, E., Calabrò, V. and Gardossi, L. 2010. Endo-and exo-inulinases: Enzyme-substrate interaction and rational immobilization. *Biotechnology Progress*, 26 (2): 397-405.
- Beisel, H.G., Kawabata, S.i., Iwanaga, S., Huber, R. and Bode, W. 1999. Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *The EMBO Journal*, 18 (9): 2313-2322.
- Bender, J.P., Mazutti, M.A., de Oliveira, D., Di Luccio, M. and Treichel, H. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 132 (1-3): 951-958.
- Bhargavi, P.L. and Prakasham, R.S. 2016. Enhanced fibrinolytic protease production by *Serratia marcescens* RSPB11 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 4 (3): 006-014.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. and Davies, G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382 (3): 769-781.
- Bourgi, J., Guiraud, J. and Galzy, P. 1986. Isolation of a *Kluyveromyces fragilis* derepressed mutant hyperproducer of inulinase for ethanol production from Jerusalem artichoke. *Journal of Fermentation Technology*, 64 (3): 239-243.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1): 248-254.
- Brereton, R.G. 2003. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons.
- Burkert, J., Kalil, S., Filho, F. and Rodrigues, M. 2006. Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23: 163-170.
- Byun, S.M. and Nahm, B.H. 1978. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 43 (6): 1871-1873.
- Campbell-Platt, G. 1994. Fermented foods-a world perspective. *Food Research International*, 27 (3): 253-257.

- Canli, O. and Kurbanoglu, E. 2012. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid state fermentation using leek as substrate. *Toxicology and Industrial Health*, 28: 894-890.
- Canli, O., Tasar, G.E. and Taskin, M. 2013. Inulinase production by *Geotrichum candidum* OC-7 using migratory locusts as a new substrate and optimization process with Taguchi DOE. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (8): 704-710.
- Cayré, M.a.E., Vignolo, G. and Garro, O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20 (5): 561-566.
- Cazetta, M., Martins, P., Monti, R. and Contiero, J. 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Food Engineering*, 66: 301-305.
- Cazetta, M., Monti, R. and Contiero, J. 2010. Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 701-707.
- Cemeroğlu, B. 2010. Gıda Analizleri. *Gıda Teknolojileri Derneği*, (34).
- Cemeroğlu, B. 2015. Reaksiyon Kinetiği. Bizim Grup Basımevi, Ankara, Türkiye.
- Chai, T. and Draxler, R.R. 2014. Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)?—Arguments against avoiding RMSE in the literature. *Geoscientific Model Development*, 7 (3): 1247-1250.
- Chaudhuri, I., Söding, J. and Lupas, A.N. 2008. Evolution of the β -propeller fold. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71 (2): 795-803.
- Chen, G.-J., Yang, J.-K., Peng, X.-B. and He, J.-R. 2016. High-level secretory expression of *Aspergillus* exo-inulinase and its use in the preparation of fructose syrup from inulin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133: 543-551.
- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Chen, T.-X., Xu, X.-M. and Jin, Z.-Y. 2011a. Extraction optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Carbohydrate Polymers*, 85 (2): 446-451.
- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Chen, T.-X., Xu, X.-M. and Jin, Z.-Y. 2011b. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 86 (1): 249-254.
- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., Zhao, J.-W., Chen, T.-X. and Xie, Z.-J. 2009. Purification and characterisation of exo-and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 115 (4): 1206-1212.
- Chi, Z.-M., Zhang, T., Cao, T.-S., Liu, X.-Y., Cui, W. and Zhao, C.-H. 2011. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102 (6): 4295-4303.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G. and Yue, L. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2): 211-220.

- Cho, Y. and Yun, J. 2002. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Process Biochemistry*, 37: 1325-1331.
- Cho, Y.J., Sinha, J., Park, J.P. and Yun, J.W. 2001. Production of inulooligosaccharides from chicory extract by endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (4): 439-445.
- Coitinho, J., Guimaraes, V., de Almeida, M., Falkoski, D., de Queiroz, J. and de Rezende, S. 2010. Characterization of an exoinulinase produced by *Aspergillus terreus* CCT 4083 grown on sugar cane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8386-8391.
- Cone, J.W., van Gelder, A.H., Visscher, G.J. and Oudshoorn, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, 61 (1): 113-128.
- Copley, R.R., Russell, R.B. and Ponting, C.P. 2001. Sialidase-like Asp-boxes: sequence-similar structures within different protein folds. *Protein Science*, 10 (2): 285-292.
- Couto, S.R. and Sanromán, M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-a review. *Journal of Food Engineering*, 76 (3): 291-302.
- Cruz, V., Belote, J., Belline, M. and Cruz, R. 1998. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: hydrolysis of inulin from several sources. *Revista de Microbiologia*, 29: 301-306.
- Cui, W., Wang, Q., Zhang, F., Zhang, S.-C., Chi, Z.-M. and Madzak, C. 2011. Direct conversion of inulin into single cell protein by the engineered *Yarrowia lipolytica* carrying inulinase gene. *Process Biochemistry*, 46 (7): 1442-1448.
- Çekmecelioğlu, D. 2014. Fermentasyon sonrası işlemler. in: I. Turhan (Ed.), Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Ankara, 109-123 s.
- Dalby, P.A. 2003. Optimising enzyme function by directed evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, 13 (4): 500-505.
- Dantigny, P., Nanguy, S.P.-M., Judet-Correia, D. and Bensoussan, M. 2011. A new model for germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2): 176-181.
- de Carvalho, J., Medeiros, A., Letti, L., Kirnev, P. and Soccol, C. 2017. Cell disruption and isolation of intracellular products. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 807-822 s.
- de Oliveira Lino, F.S., Basso, T.O. and Sommer, M.O.A. 2018. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. *Biotechnology for Biofuels*, 11 (1): 221.
- de Souza-Motta, C., de Queiroz Cavalcanti, M., Porto, A., Moreira, K. and de Lima Filho, J. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 343-350.

- Demirci, A., Izmirlioglu, G. and Ercan, D. 2014a. Fermentation and enzyme technologies in food processing. *Food Processing: Principles and Applications*, 107-136 s.
- Demirci, A., Öziyici, H.R., Karhan, M. and Turkenburg, J.P. 2014b. Fermentasyon besiyeri. in: I. Turhan (Ed.), *Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Ankara, 86-93 s.
- Derycke, D. and Vandamme, E. 1984. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34: 45-51.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M. and Rajamohan, N. 2013a. Enhanced inulinase production by *Streptomyces* sp. in solid state fermentation through statistical designs. *3 Biotech*, 3: 509-515.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M. and Rajamohan, N. 2013b. Inulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 96: 196-199.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M. and Rajamohan, N. 2014a. Optimization, kinetics, and modeling of inulinase production by *K. marxianus* var. *marxianus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44 (3): 291-309.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M. and Rajamohan, N. 2014b. Utilization of copra waste for the solid state fermentative production of inulinase in batch and packed bed reactors. *Carbohydrate Polymers*, 102: 662-668.
- Dinarvand, M., B Ariff, A., Moeini, H., Masomian, M., Mousavi, S.S., Nahavandi, R. and Mustafa, S. 2012. Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (4): 5-5.
- Dinarvand, M., Rezaee, M. and Foroughi, M. 2017. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology*, 48 (3): 427-441.
- Don, M. and Shoparwe, N. 2010. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochemical Engineering Journal*, 49: 95-103.
- Drysdale, C. and McKay, A. 1995. Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. *Letters in Applied Microbiology*, 20 (4): 252-254.
- Edelman, J. and Dickerson, A. 1966. The metabolism of fructose polymers in plants. Transfructosylation in tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochemical Journal*, 98 (3): 787.
- El-souod, S.M.A., Mohamed, T.M., Ali, E.M., El-badry, M.O. and El-keiy, M.M. 2014. Partial purification of extracellular exo-inulinase from *Ulocladium atum*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12 (1): 15-20.
- El Aty, A.A.A., Wehaidy, H.R. and Mostafa, F.A. 2014. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. *Carbohydrate Polymers*, 102: 261-268.

- Elyachioui, M., Hornez, J. and Tailliez, R. 1992. General properties of extracellular bacterial inulinase. *Journal of Applied Microbiology*, 73 (6): 514-519.
- Ersöz, F. 2016. Rekombinant kimoziin üretiminde glikozilasyonun etkisinin araştırılması. Master, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye, 66 s.
- Ertan, F. and Ekinci, F. 2002. The production of inulinase from *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Marmara Pure Applied Science*, 18: 7-15.
- Ertan, F., Ekinci, F. and Aktaç, T. 2003. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6 (15): 1332-1335.
- Ettalibi, M. and Baratti, J.C. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26 (1): 13-20.
- Fante, L. and Noreña, C.P.Z. 2012. Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic (*Allium sativum* L.) blanched under different conditions. *Journal of Food Engineering*, 108 (3): 436-443.
- Fawzi, E. 2011. Comparative study of two purified inulinases from thermophile *Thielavia terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium intybus* L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 633-649.
- Fernandes, M., Nsabimana, C. and Jiang, B. 2012. *Penicillium expansum* SK16 as a novel inulinase producing strain isolated from decomposed dahlia tubers. *Research Journal of Biotechnology*, 7: 102-106.
- Ferreira, M., De Andrade, A. and Kennedy, J. 1991. Properties of a thermostable nonspecific fructofuranosidase produced by *Cladosporium cladosporioides* cells for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31 (1): 1-9.
- Fitzhugh, H. 1976. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. *Journal of Animal Science*, 42 (4): 1036-1051.
- Fleming, S.E., GrootWassink, J.W. and Murray, E.D. 1979. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12 (1): 1-28.
- Flores-Gallegos, A., Morlett-Chavez, J., Aguilar, C. and Rodriguez-Herrera, R. 2012. Inulinase production by a mexican semi-desert xerophylic *Penicillium citrinum* strain under submerged culture. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 4: 46-50.
- Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C. and Aguilar, C.b.N. 2015. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4): 421-426.
- Fontana, J.D., Baron, M., Diniz, A.C. and Franco, V.C. 1994. Microbial inulinase secretion using chemically modified inulins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45 (1): 257-268.

- Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S. and Bai, F. 2015. Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnology for Biofuels*, 8 (1): 1.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Ni, X. and Wang, L. 2007a. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (4): 825-832.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Wang, L., Li, J. and Gong, F. 2007b. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. *Microbial Ecology*, 54 (4): 722-729.
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J. and An, L. 2009. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157 (3): 498-506.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rodríguez-Romero, A. and Hernández-Arana, A. 2000. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology*, 10 (10): 993-1000.
- Ge, X.-Y. and Zhang, W.-G. 2005. Effects of octadecanoylsucrose derivatives on the production of inulinase by *Aspergillus niger* SL-09. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8): 1633-1638.
- Gern, R., Furlan, S., Ninow, J. and Jonas, R. 2001. Screening of microorganisms that produce only endoinulinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 632-635.
- Gill, P., Manhas, R. and Singh, P. 2006. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, 97: 894-902.
- Gill, P.K., Manhas, R.K., Singh, J. and Singh, P. 2004. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117 (1): 19-32.
- Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K. and Singh, P. 2003. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, 87 (3): 359-362.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z. and Li, J. 2007. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34 (3): 179-185.
- Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J. and Wang, X. 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13 (5): 533-539.
- Goosen, C. 2007. Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from *Aspergillus niger*. Doctorate, University of Groningen, Groningen, Netherland, 157 s.

- Gou, Y., Li, J., Zhu, J., Xu, W. and Gao, J. 2015. Enhancing inulinase yield by irradiation mutation associated with optimization of culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (3): 911-920.
- Guiraud, J.P., Bourgi, J., Stervinou, M., Claisse, M. and Galzy, P. 1987. Isolation of a respiratory-deficient *Kluyveromyces fragilis* mutant for the production of ethanol from Jerusalem artichoke. *Biotechnology and Bioengineering*, 29 (7): 850-858.
- Guo, N., Gong, F., Chi, Z., Sheng, J. and Li, J. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 499-507.
- Gupta, A., Nagpal, B., Kaur, N. and Singh, R. 1988. Mycelial and extracellular inulinases from *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 42: 69-76.
- Gupta, A.K., Rathore, P., Kaur, N. and Singh, R. 1990. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 47 (3): 245-257.
- Haraguchi, K., Hayashi, K. and Kasumi, T. 1990. Purification and properties of inulinase from *Arthrobacter globiformis* S64-1. *Starch*, 42: 28-30.
- Henderson, P., Seaby, R. and Somes, R. 2006. Growth II. *Pisces Conservation Ltd., Lymington, England*.
- Hensing, M., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R. and Van Dijken, H. 1994. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42 (4): 516-521.
- Holyavka, M., Artyukhov, V. and Kovaleva, T. 2016. Structural and functional properties of inulinases: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34 (1): 1-17.
- Housseiny, M.M. 2014. Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme. *Journal of Microbiology*, 52 (5): 389-398.
- Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S.-A. and Li, F.-L. 2012. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (5): 1359-1368.
- Huang, L. 2013. Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*, 32 (1): 283-288.
- İlgin, M. 2017. Keçiboynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak kullanımı Master, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye, 105 s.
- Izmirlioglu, G. and Demirci, A. 2016. Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste by *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (8): 2788-2795.

- Jain, S.C., Jain, P. and Kango, N. 2012. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (1): 62-69.
- Ji, X.-J., Huang, H., Du, J., Zhu, J.-G., Ren, L.-J., Li, S. and Nie, Z.-K. 2009. Development of an industrial medium for economical 2, 3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology*, 100 (21): 5214-5218.
- Kalil, S., Suzan, R., Mougeri, F. and Rodrigues, M. 2001a. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94: 257-264.
- Kalil, S.J., Suzan, R., Maugeri, F. and Rodrigues, M.I. 2001b. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94 (3): 257-264.
- Kampen, W.H. 2014. Nutritional requirements in fermentation processes. in: H.C. Vogel ve C.M. Todaro (Eds.), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. Elsevier, 37-57 s.
- Kang, S., Chang, Y., Oh, S. and Kim, S. 1998. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. *Biotechnology Letters*, 20: 983-986.
- Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of Food Engineering*, 85 (3): 473-478.
- Kango, N. and Jain, S.C. 2011. Production and properties of microbial inulinases: recent advances. *Food Biotechnology*, 25 (3): 165-212.
- Karahalil, E., Demirel, F., Evcan, E., Germeç, M., Tari, C. and Turhan, I. 2017. Microparticle-enhanced polygalacturonase production by wild type *Aspergillus sojae*. *3 Biotech*, 7 (6): 361.
- Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Moori, M. and Suzuki, Y. 1999. Purification and properties of a thermostable inulinase (b-D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch*, 51: 253-258.
- Katrolia, P., Zhou, P., Zhang, P., Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z. and Xu, H. 2012. High level expression of a novel β -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1): 480-490.
- Kaur, N. and Gupta, A.K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27 (7): 703-714.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E.S. and Azbar, N. 2016. Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (2): 368-388.
- Keto, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Moori, M. and Suzuki, Y. 1999. Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-Fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch*, 51 (7): 253-258.

- Kim, B., Kim, H. and Nam, S. 1997a. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2: 90-93.
- Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K. and Yun, J.W. 1997b. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 19 (4): 369-372.
- Kim, K.-Y., Nascimento, A.S., Golubev, A.M., Polikarpov, I., Kim, C.-S., Kang, S.-I. and Kim, S.-I. 2008. Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp. S37. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371 (4): 600-605.
- Kochhar, A., Gupta, A. and Kaur, N. 1999. Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 549-554.
- Kowalska, A., Anteck, A., Owczarz, P. and Bizukojć, M. 2017. Inulinolytic activity of broths of *Aspergillus niger* ATCC 204447 cultivated in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 17 (9): 1006-1020.
- Koya, P.R. and Goshu, A.T. 2013. Generalized mathematical model for biological growths. *Open Journal of Modelling and Simulation*, 1 (4): 42.
- Kushi, R., Monti, R. and Contiero, J. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25: 63-69.
- Lafuente-Castaneda, C., Martinez, G., Contreras-Esquivel, J., Rodriguez-Herrera, R., Prado-Barragan, A. and Aguilar, C. 2012. Inulinase production by *Penicillium citrinum* ESS in submerge and solid-state cultures. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 7: 129-134.
- Lago, C.C. and Noreña, C.P.Z. 2014. Kinetic and thermodynamic of thermal inactivation of the peroxidase, polyphenoloxidase and inulinase activities during blanching of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (12): 3560-3568.
- Laowklom, N., Chantanaphan, R. and Pinphanichakarn, P. 2012. Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resources*, 3 (3): 137.
- Li, A., Guo, L. and Lu, W. 2012. Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LSeA18 and inulin hydrolysis by the enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 81-89.
- Li, D., Dai, J.-Y. and Xiu, Z.-L. 2010. A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2, 3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology*, 101 (21): 8342-8347.
- Li, Q., Coffman, A.M. and Ju, L.-K. 2015. Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 72: 42-48.
- Li, Y., Liu, G.-L. and Chi, Z.-M. 2013. Ethanol production from inulin and unsterilized meal of Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces* sp. W0 expressing the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. *Bioresource Technology*, 147: 254-259.

- Liebl, W., Brem, D. and Gotschlich, A. 1998. Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50 (1): 55-64.
- Liu, G.-L., Chi, Z. and Chi, Z.-M. 2013. Molecular characterization and expression of microbial inulinase genes. *Critical Reviews in Microbiology*, 39 (2): 152-165.
- Liu, G.-L., Fu, G.-Y., Chi, Z. and Chi, Z.-M. 2014. Enhanced expression of the codon-optimized exo-inulinase gene from the yeast *Meyerozyma guilliermondii* in *Saccharomyces* sp. W0 and bioethanol production from inulin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (21): 9129-9138.
- Liu, X.-Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Wang, F., Madzak, C. and Chi, Z.-M. 2010. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabolic Engineering*, 12 (5): 469-476.
- Lu, W., Li, A. and Guo, Q. 2014. Production of novel alkalitolerant and thermostable inulinase from marine actinomycete *Nocardiopsis* sp. DN-K15 and inulin hydrolysis by the enzyme. *Annals of Microbiology*, 64: 441-449.
- Luedeking, R. and Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1 (4): 393-412.
- Luo, D., Yuan, H., Zeng, X. and Liu, J. 2010. Optimization of inulinase fermentation conditions of *Aspergillus niger* X-6 using Response Surface Methodology. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, DOI: 10.1109/ICBBE.2010.5515688 1-4.
- Magadam, D.B. and Yadav, G.D. 2018. Fermentative production, purification of inulinase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324 and its application for hydrolysis of sucrose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14: 293-299.
- Makino, Y., Treichel, H., Mazutti, M.A., Maugeri, F. and Rodrigues, M.I. 2009. Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84 (7): 1056-1062.
- Mandenius, C.F. and Brundin, A. 2008. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*, 24 (6): 1191-1203.
- Mansouri, S., Houbraken, J., Samson, R., Frisvad, J.C., Christensen, M., Tuthill, D., Koutaniemi, S., Hatakka, A. and Lankinen, P. 2013. *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103 (6): 1343-1357.
- Marques Ribeiro, E. and Fernandes, P. 2013. Coated-wall mini reactor for inulin hydrolysis. *Current Biotechnology*, 2 (1): 47-52.
- Mavituna, F. and Sinclair, C.G. 2008. Modelling the kinetics of biological activity in fermentation systems. *Practical Fermentation Technology*. John Wiley & Sons Ltd Chichester, UK, 167-230 s.

- Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H. and Di Luccio, M. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (1): 56-59.
- Mazutti, M., Ceni, G., Di Luccio, M. and Treichel, H. 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30 (5): 297-304.
- Mazutti, M.A., Corazza, M.L., Maugeri Filho, F., Rodrigues, M.I., Corazza, F.C. and Treichel, H. 2009. Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (1): 85-95.
- Mazutti, M.A., Skrowonski, A., Boni, G., Zabet, G.L., Silva, M.F., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Maugeri Filho, F., Rodrigues, M.I. and Treichel, H. 2010a. Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (3): 682-693.
- Mazutti, M.A., Zabet, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Rodrigues, M.I., Treichel, H. and Maugeri, F. 2010b. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Food Chemistry*, 120 (1): 163-173.
- Mazutti, M.A., Zabet, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Rodrigues, M.I., Treichel, H. and Maugeri, F. 2010c. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (1): 109-114.
- Meng, G. and Fütterer, K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10 (11): 935.
- Metin, K. 2010. Moleküler biyoloji teknikleri II: Protein analiz teknikleri. in: A. Yıldırım, F. Bardakçı, M. Karataş ve B. Tanyolaç (Eds.), Moleküler Biyoloji. Nobel Yayıncılık, Ankara, 557-600 s.
- Michael T. Madigan, J.M.M., Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, David A. Stahl 2014. Brock Biology of Microorganisms. Benjamin Cummings.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- Mohamed, S.A., Salah, H.A., Moharam, M.E., Foda, M. and Fahmy, A.S. 2015. Characterization of two thermostable inulinases from *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13 (1): 65-69.
- Mohammad, F., Badr-Eldin, S., El-Tayeb, O. and El-Rahman, O.A. 1995. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* III. The influence of initial sucrose concentration on batch kinetics. *Biomass and Bioenergy*, 8 (2): 121-129.
- Morgan, P.H., Mercer, L.P. and Flodin, N.W. 1975. General model for nutritional responses of higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72 (11): 4327-4331.

- Moriyama, S., Akimoto, H., Suetsugu, N., Kawasaki, S., Nakamura, T. and Ohta, K. 2002. Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66: 1886-1897.
- Moriyama, S., Tanaka, H., Uwataki, M., Muguruma, M. and Ohta, K. 2003. Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (4): 324-331.
- Moura, F.A., Macagnan, F.T. and Silva, L.P. 2015. Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50 (2): 275-281.
- Mughal, M., Ali, S., Ashiq, M. and Talish, A. 2009. Kinetics of an extracellular exoinulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using two-factorial design. *Bioresource Technology*, 100 (14): 3657-3662.
- Mutanda, T., Wilhelmi, B. and Whiteley, C. 2008. Response surface methodology: synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43 (4): 362-368.
- Nagem, R., Rojas, A., Golubev, A., Korneeva, O., Eneyskaya, E., Kulminskaya, A., Neustroev, K. and Polikarpov, I. 2004. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of Molecular Biology*, 344 (2): 471-480.
- Naidoo, K., Ayyachamy, M., Permaul, K. and Singh, S. 2009. Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (5): 689-695.
- Nakamura, T., Kuramori, K., Zaita, N., Akimoto, H. and Ohta, K. 2001. Purification and properties of intracellular exo-and endoinulinases from *Aspergillus niger* strain 12. *Bulletin-Faculty of Agriculture Miyazaki University*, 48 (1/2): 49-58.
- Nakamura, T., Nagatomo, Y., Hamada, S., Nishino, Y. and Ohta, K. 1994. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78: 134-139.
- Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S. and Ohta, K. 1996. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81 (6): 564-566.
- Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A. and Ohta, K. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (2): 164-169.
- Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M. and Ohta, K. 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 313-318.

- Narayanan, M., Srinivasan, B., Gayathiri, A., Ayyadurai, A. and Mani, A. 2013. Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of inulinase under solid state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Research*, 5: 376-384.
- Naumoff, D.G. 1999. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional β -xylosidases and α -L-arabinases. *FEBS Letters*, 448 (1): 177-179.
- Nurizzo, D., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Roberts, S.M., Dodson, E.J., McKie, V.A., Taylor, E.J., Gilbert, H.J. and Davies, G.J. 2002. Cellvibrio japonicus α -L-arabinanase 43A has a novel five-blade β -propeller fold. *Nature Structural and Molecular Biology*, 9 (9): 665.
- Ohta, K., Akimoto, H., Matsuda, S., Toshimitsu, D. and Nakamura, T. 1998. Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62 (9): 1731-1738.
- Ohta, K., Suetsugu, N. and Nakamura, T. 2002. Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 94: 78-80.
- Ongen-Baysal, G., Sukan, S.S. and Vassilev, N. 1994. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 16 (3): 275-280.
- Onilude, A., Fadaunsi, I. and Garuba, E. 2012. Inulinase production by *Saccharomyces* sp. in solid state fermentation using wheat bran as substrate. *Annals in Microbiology*, 62: 843-848.
- Onodera, S. and Shiomi, N. 1988. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agricultural Biology and Chemistry*, 52: 2569-2576.
- Otten, L.G. and Quax, W.J. 2005. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomolecular Engineering*, 22 (1): 1-9.
- Öngen-Baysal, G. and Sukan, S.S. 1996. Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 18 (12): 1431-1434.
- Öngen-Baysal, G., Sukan, S.S. and Vassilev, N. 1994. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 16 (3): 275-280.
- Paixao, S., Teixeira, P., Silva, T., Teixeira, A. and Alves, L. 2013. Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses. *New Biotechnology*, 30: 598-606.
- Pal, A. and Khanum, F. 2011. Characterizing and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grown on solid-state-medium. *Journal of Biochemical Technology*, 2 (4): 203-209.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2): 81-84.
- Pandey, A. 2004. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. Food Products Press New York.
- Pandey, A. 2006. Enzyme Technology. Springer Science & Business Media.

- Pandey, A., Joseph, S., Ashakumary, L., Selvakumar, P. and Soccol, C.R. 1999a. Inulinase synthesis from a mesophilic culture in submerged cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 82 (2): 103-114.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N. and Fontana, J.D. 1999b. Recent developments in microbial inulinases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81 (1): 35-52.
- Parekh, S. and Margaritis, A. 1985. Inulinase (b-fructofuranosidase) production by *Kluyeromyces marxianus* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22: 446-448.
- Park, J., Bae, J., You, D., Kim, B. and Yun, J. 1999. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 21: 1043-1046.
- Park, J. and Yun, J. 2001. Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. *Letters in Applied Microbiology*, 33 (3): 183-187.
- Park, J.P., Kim, D.H., Kim, D.S. and Yun, J.W. 1998. Enzymatic production of inulooligosaccharides from chicory juice. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 385-388.
- Park, S., Han, Y., Kim, H., Song, S., Uhm, T.-B. and Chae, K.-S. 2003. Trp17 and Glu20 residues in conserved WMN(D/E)PN motif are essential for *Aspergillus ficuum* endoinulinase (EC 3.2. 1.7) activity. *Biochemistry (Moscow)*, 68 (6): 658-661.
- Patel, A.K., Singhania, R.R. and Pandey, A. 2017. Production, purification, and application of microbial enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier, 13-41 s.
- Pearl, R. and Reed, L.J. 1920. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6 (6): 275-288.
- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C. and Pastrana, L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2 (3).
- Pessoa, A., Vitolo, M. and Hustedt, H. 1996. Use of K_{La} as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 699-709 ss,
- Pessoni, R., Braga, M. and Figueiredo-Ribeiro, R. 2007. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. *Mycologia*, 99: 493-503.
- Petrova, P., Velikova, P., Popova, L. and Petrov, K. 2015. Direct conversion of chicory flour into L (+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresource Technology*, 186: 329-333.
- Pons, T., Hernández, L., Batista, F.R. and Chinae, G. 2000. Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science*, 9 (11): 2285-2291.

- Pons, T., Olmea, O., Chinea, G., Beldarraín, A., Márquez, G., Acosta, N., Rodríguez, L. and Valencia, A. 1998. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 33 (3): 383-395.
- Poorna, V. and Kulkarni, P. 1995. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. *Bioresource Technology*, 54 (3): 315-320.
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A.-M., Roussel, G., Perpète, E.A., Wouters, J., Housen, I. and Michaux, C. 2012. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie*, 94 (11): 2423-2430.
- Prabhakar, T., Ellaiah, P., Vasu, P., Saisaha, V. and Sunitha, M. 2004. Optimization of process parameters for the production of inulinase from *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 778-781.
- Pratap Kumar, G., Kunamneni, A., Prabhakar, T. and Ellaiah, P. 2005. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1359-1361.
- Quistgaard, E.M. and Thirup, S.S. 2009. Sequence and structural analysis of the Asp-box motif and Asp-box beta-propellers; a widespread propeller-type characteristic of the Vps10 domain family and several glycoside hydrolase families. *BMC structural biology*, 9 (1): 46.
- Rawat, H.K., Chand Jain, S. and Kango, N. 2015. Production and properties of inulinase from *Penicillium* sp. NFCC 2768 grown on inulin-rich vegetal infusions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 33 (1): 61-68.
- Rech, R. and Ayub, M.A.Z. 2007. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry*, 42 (5): 873-877.
- Rehm, J., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. 1998. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *Journal of Bacteriology*, 180 (5): 1305-1310.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S. and Iorio, G. 2007. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27 (3): 129-145.
- Ritsema, T., Verhaar, A., Vijn, I. and Smeekens, S. 2005. Using natural variation to investigate the function of individual amino acids in the sucrose-binding box of fructan: fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) in product formation. *Plant Molecular Biology*, 58 (5): 597-607.
- Ronkart, S., Blecker, C., Fougnes, C., Van Herck, J., Wouters, J. and Paquot, M. 2006. Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrate Polymers*, 63 (2): 210-217.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 81 (5): 501-508.

- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van Der Baan, A.A., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (5): 1131-1137.
- Rutherford, P. and Deacon, A. 1972. The mode of action of dandelion root-fructofuranosidases on inulin. *Biochemical Journal*, 129 (2): 511.
- Saat, M.N., Annuar, M.S.M., Alias, Z., Chuan, L.T. and Chisti, Y. 2014. Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37 (5): 765-775.
- Saber, W. and El-Naggar, N.E. 2009. Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. *Biotechnology*, 8 (4): 425-433.
- Saha, B.C. 2006. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (5): 991-995.
- Sanal, F., Ertan, F. and Aktac, T. 2005. Production of exoinulinase from *Alternaria alternata* growth on Jerusalem artichoke and some biochemical properties. *Journal of Biological Sciences*, 5: 497-505.
- Sandhya, C. and Pandey, A. 2006. Inulinase. in: C.W. A. Pandey, C.R. Soccol, C. Larroche (Ed.), *Enzyme Technology*. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, 347-358 s.
- Santharam, L., Easwaran, S.N., Subramanian Mohanakrishnan, A. and Mahadevan, S. 2019. Effect of aeration and agitation on yeast inulinase production: a biocalorimetric investigation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, DOI: 10.1007/s00449-019-02101-0.
- Selvakumar, P. and Pandey, A. 1999a. Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture. *Bioresource Technology*, 69: 123-127.
- Selvakumar, P. and Pandey, A. 1999b. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 34 (8): 851-855.
- Sharma, A.D. and Gill, P.K. 2007. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 79 (4): 1172-1178.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F. and Li, J. 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144 (2): 111-121.
- Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L. and Gong, F. 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Process Biochemistry*, 42 (5): 805-811.
- Sheng, J., Chi, Z., Yan, K., Wang, X., Gong, F. and Li, J. 2009. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by

- the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (3): 333-339.
- Shkutina, I., Stoyanova, O. and Selemenov, V. 2016. Biocatalytic properties of immobilized inulinase. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42 (7): 748-751.
- Shuler, M.L. and Kargi, F. 2002. Major metabolic pathways. in: M.L. Shuler ve F. Kargi (Eds.), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ., United States of America, 133-154 s.
- Shuler, M.L., Kargi, F. and DeLisa, M. 2017. *Bioprocess Engineering: Basic concepts*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ., United States of America.
- Silva-Santisteban, B. and Filho, F. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 717-724.
- Silva-Santisteban, B.O.Y., Converti, A. and Maugeri Filho, F. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152 (2): 249-261.
- Silva, M.F., Rigo, D., Mossi, V., Dallago, R.M., Henrick, P., de Oliveira Kuhn, G., Dalla Rosa, C., Oliveira, D., Oliveira, J.V. and Treichel, H. 2013. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food and Bioprocesses*, 91 (1): 54-59.
- Sinclair, C., Kristiansen, B. and Bu'Lock, J. 1987. *Fermentation kinetics and modeling*. Open University Press, 330 s.
- Sindhu, R., Pandey, A. and Binod, P. 2017. Design and types of bioprocesses. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 29-43 s.
- Singh, P. 1978. Polysaccharide digestive enzymes in the larvae of *Stromatium barbatum* (Fabr.), a dry wood borer (Coleoptera: Cerambycidae). *Material und Organismen*.
- Singh, P. and Gill, P.K. 2006. Production of inulinases: recent advances. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2): 151-162.
- Singh, P.K. and Shukla, P. 2012. Molecular modeling and docking of microbial inulinases towards perceptive enzyme-substrate interactions. *Indian Journal of Microbiology*, 52 (3): 373-380.
- Singh, R. 2011. Enzymatic preparation of high fructose syrup from inulin. in: P. Panesar, H. Sharma ve B. Sarkar (Eds.), *Bioprocessing of Foods*. Asiatech Publishing Inc, New Delhi, India, 77-98 s.
- Singh, R. and Bhermi, H. 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. *Bioresource Technology*, 99 (15): 7418-7423.
- Singh, R., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2006. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Process Biochemistry*, 41 (7): 1703-1707.

- Singh, R. and Lotey, S. 2010. Enhanced exoinulinase production from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 1005-1013.
- Singh, R. and Saini, G. 2013. Production of inulinase from raw dahlia inulin by *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72: 603-610.
- Singh, R. and Singh, R. 2014. Response surface optimization of endoinulinase production from a cost effective substrate by *Bacillus safensis* AS-08 for hydrolysis of inulin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4): 365-372.
- Singh, R. and Singh, R. 2017. Inulinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 423-446 s.
- Singh, R., Singh, R. and Yadav, M. 2013. Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of *Bacillus safensis* AS-08. *Biologia*, 68: 1028-1033.
- Singh, R., Sooch, B.S. and Puri, M. 2007a. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology*, 98 (13): 2518-2525.
- Singh, R.S. and Chauhan, K. 2018. Sequential statistical optimization of lactose-based medium and process variables for inulinase production from *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *3 Biotech*, 8 (1): 38.
- Singh, R.S., Chauhan, K. and Kennedy, J.F. 2016. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96: 312-322.
- Singh, R.S., Chauhan, K., Pandey, A., Larroche, C. and Kennedy, J.F. 2018. Purification and characterization of two isoforms of exoinulinase from *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 for the preparation of high fructose syrup from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118: 1974-1983.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2007b. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (5): 733-738.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2007c. Production of high fructose syrup from *Asparagus* inulin using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34 (10): 649-655.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2008. Development of a stable continuous flow immobilized enzyme reactor for the hydrolysis of inulin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (7): 777-782.
- Singh, R.S. and Singh, R.P. 2010. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (4): 435.
- Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P. and Chisti, Y. 2007. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from

- Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (4): 543-552.
- Skowronek, M. and Fiedurek, J. 2003. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 686-692.
- Skowronek, M. and Fiedurek, J. 2004. Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method. *Food Technology and Biotechnology*, 42: 141-146.
- Skowronek, M. and Fiedurek, J. 2006. Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 53-58.
- Stannard, C., Williams, A. and Gibbs, P. 1985. Temperature/growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 2 (2): 115-122.
- Tasar, O.C., Erdal, S. and Algur, O.F. 2015. Utilization of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) for inulinase production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45 (6): 596-604.
- Tavares, A., Coelho, M., Coutinho, J. and Xavier, A. 2005. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80 (6): 669-676.
- Tevatia, R., Demirel, Y. and Blum, P. 2012. Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 119: 419-424.
- Tohamy, E. 2006. Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Streptomyces griseus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 911-916.
- Torabizadeh, H., Habibi-Rezaei, M., Safari, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Sharifzadeh, A., Azizian, H. and Amanlou, M. 2011. Endo-inulinase stabilization by pyridoxal phosphate modification: a kinetics, thermodynamics, and simulation approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165 (7-8): 1661-1673.
- Treichel, H., Mazutti, M., Filho, F. and Rodrigues, M. 2009. Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32: 425-433.
- Treichel, H., Oliveira, D., Lerin, L., Astolfi, V., Mazutti, M.A., Di Luccio, M. and Oliveira, J. 2012. A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. *Global Journal of Biochemistry*, 3: 7-19.
- Trivedi, S., Divecha, J. and Shah, A. 2012. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carbohydrate Polymers*, 90 (1): 483-490.
- Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T. and Suzuki, Y. 2003. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 (2-3): 180-185.

- Tunail, N. 2009. Biyoenerjiğin piresipleri ve metabolizmaya giriş. in: N. Tunail (Ed.), Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 229-264 s.
- Turhan, I., Bialka, K.L., Demirci, A. and Karhan, M. 2010. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101 (14): 5290-5296.
- Türker, M. 2005. Matematiksel modellemenin temel ilkeleri. in: M. Türker (Ed.), Biyoreaksiyon Mühendisliği: Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellenmesi. Su Vakfı Yayınları, İstanbul, 65-81 s.
- Uhm, T.-B., Chung, M.S., Lee, S.H., Gourronc, F., Housen, I., Kim, J.H., Beeumen, J.V., Haye, B. and Vandenhoute, J. 1999. Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (1): 146-151.
- Uhm, T., Chae, K.-S., Lee, D., Kim, H., Cassart, J. and Vandenhoute, J. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*. *Biotechnology letters*, 20 (8): 809-812.
- Vandamme, E.J. and Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 29: 139-176.
- Verma, P. and Prasad, M. 1975. The digestive physiology of *Gryllodes sigillatus* orthoptera gryllidae. *Indian Journal of Entomology*, 37: 19-23.
- Viswanathan, P. and Kulkarni, P. 1995a. Enhancement of inulinase production by *Aspergillus niger* van Teighem. *Journal of Applied Microbiology*, 78 (4): 384-386.
- Viswanathan, P. and Kulkarni, P. 1995b. Full factorial design to study fermentative production of inulinase using inulin from kuth (*Saussurea lappa*) root powder by *Aspergillus niger* van Teighem UV11 mutant. *Bioresource Technology*, 54 (2): 117-121.
- Vranesic, D., Kurtanjek, Z., Santos, A. and Maugeri, F. 2002. Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 67-73.
- Vullo, D., Coto, C. and Sineriz, F. 1991. Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2392-2394.
- Waleckx, E., Mateos-Diaz, J.C., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., Brin, N., García-Quezada, G., Villanueva-Rodríguez, S. and Monsan, P. 2011. Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production. *Food Chemistry*, 124 (4): 1533-1542.
- Wang, D., Li, F.-L. and Wang, S.-A. 2016. Engineering a natural *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production from inulin by consolidated bioprocessing. *Biotechnology for Biofuels*, 9 (96).
- Wang, J.-M., Zhang, T., Chi, Z., Liu, G.-L. and Chi, Z.-M. 2011. 18S rDNA integration of the exo-inulinase gene into chromosomes of the high ethanol producing yeast

- Saccharomyces* sp. W0 for direct conversion of inulin to bioethanol. *Biomass and Bioenergy*, 35 (7): 3032-3039.
- Wang, J., Zhengyu, J., Bo, J. and Xueming, X. 2003. Separation and identification of exo- and endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Current Microbiology*, 47: 109-112.
- Wang, L., Du, Y., Meng, X., Long, X., Liu, Z. and Shao, H. 2014. Direct production of bioethanol from Jerusalem artichoke inulin by gene-engineering *Saccharomyces cerevisiae* 6525 with exoinulinase gene. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148 (1): 133-139.
- Wei, W., Wu, K., Qin, Y., Xie, Z. and Zhu, X. 2001. Intergeneric protoplast fusion between *Kluyveromyces* and *Saccharomyces cerevisiae*-to produce sorbitol from Jerusalem artichokes. *Biotechnology Letters*, 23 (10): 799-803.
- Wei, W., Yu, X., Dai, Y., Zheng, J. and Xie, Z. 1997. Purification and properties of inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. *Acta Microbiologica Sinica*, 37 (6): 443-448.
- Wei, W., Zheng, Z., Liu, Y. and Zhu, X. 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86: 395-399.
- Weibull, W. 1951. A statistical distributipon function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 9: 293-297.
- Xiao, R., Tanida, M. and Takao, S. 1988. Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Fermentation Technology*, 66: 553-558.
- Xiao, R., Tanida, M. and Takao, S. 1989a. Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67 (5): 331-334.
- Xiao, R., Tanida, M. and Takao, S. 1989b. Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67 (4): 244-248.
- Xiong, C., Jinhua, W. and Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34 (2): 179-184.
- Yewale, T., Singhal, R.S. and Vaidya, A.A. 2013. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2 (2): 96-101.
- Yokota, A., Yamauchi, O. and Tomita, F. 1995. Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87. *Letters in Applied Microbiology*, 21 (5): 330-333.
- Yuan, B., Hu, N., Sun, J., Wang, S.-A. and Li, F.-L. 2012. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (6): 1517-1526.

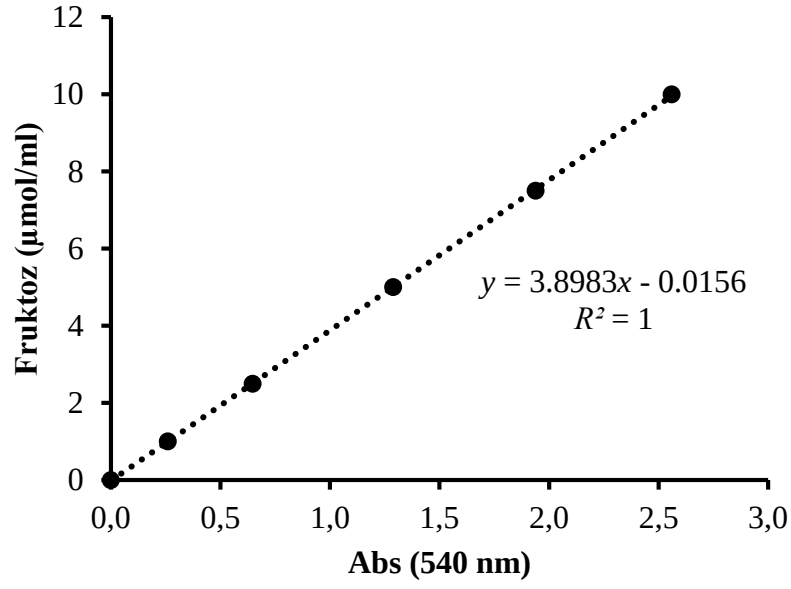
- Yuan, X.-L., Goosen, C., Kools, H., van der Maarel, M.J., van den Hondel, C.A.J., Dijkhuizen, L. and Ram, A.F. 2006. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 152 (10): 3061-3073.
- Zeng, A.P., Ross, A., Biebl, H., Tag, C., Günzel, B. and Deckwer, W.D. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (8): 902-911.
- Zhang, G., Cui, F., Yang, X. and Qian, S. 2004. Purification and properties of endoinulinases from *Chaetomium* sp. *Acta Microbiologica Sinica*, 44: 785-788.
- Zhang, L.-L., Tan, M.-J., Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y. and Chi, Z.-M. 2015a. Cloning and characterization of an inulinase gene from the marine yeast *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3 and its expression in *Saccharomyces* sp. W0 for ethanol production. *Molecular Biotechnology*, 57 (4): 337-347.
- Zhang, L., Zhao, C., Ohta, W.Y. and Wang, Y. 2005. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 40 (5): 1541-1545.
- Zhang, T., Gong, F., Chi, Z., Liu, G., Chi, Z., Sheng, J., Li, J. and Wang, X. 2009. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95 (1): 13-22.
- Zhang, Y., Zhu, H., Wang, J., Zhou, X., Xu, W. and Shi, H. 2015b. Isolation and identification of an inulinase producing strain and the optimization of its fermentation condition. in: T. Zhang ve M. Nakajima (Eds.), *Advances in Applied Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg, 93-107 s.
- Zhao, C.-H., Zhang, T., Li, M. and Chi, Z.-M. 2010. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochemistry*, 45 (7): 1121-1126.
- Zhao, Z., Zhao, Z. and Wang, X., 2016. Kinetic and thermodynamic characterizations of thermal inactivation of the inulinase produced by *Kluyveromyces latic*, 5th International Conference on Advanced Materials and Computer Science. Atlantis Press Beijing, China, 589-592.
- Zhengyu, J., Jing, W., Bo, J. and Xueming, X. 2005. Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Research International*, 38 (3): 301-308.
- Zherebtsov, N., Abramova, I., Shelamova, S. and Popova, T. 2003. Identification of catalytically active groups in inulinase from *Bacillus polymyxa* 722. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (6): 544-548.
- Zhou, J., Peng, M., Zhang, R., Li, J., Tang, X., Xu, B., Ding, J., Gao, Y., Ren, J. and Huang, Z. 2015. Characterization of *Sphingomonas* sp. JB13 exo-inulinase: a novel detergent-, salt-, and protease-tolerant exo-inulinase. *Extremophiles*, 19 (2): 383-393.

- Zittan, L. 1981. Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production. *Starch*, 33 (11): 373-377.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. and Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (6): 1875-1881.

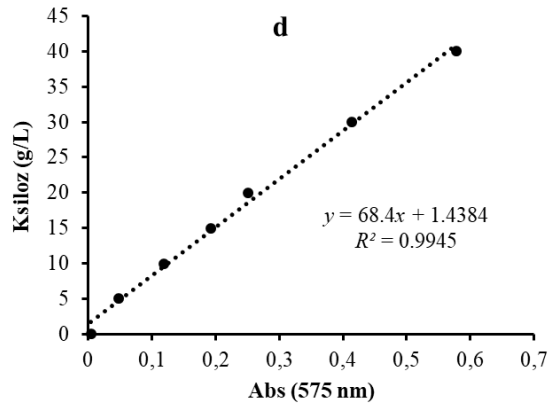
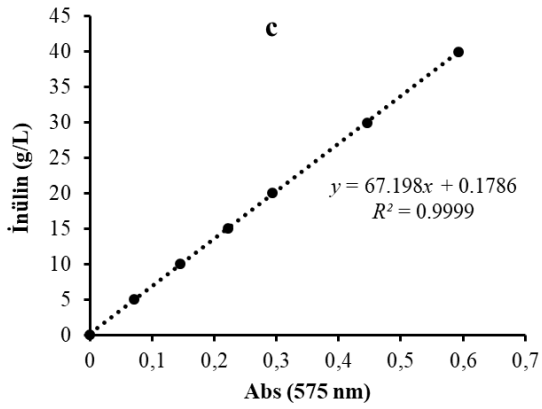
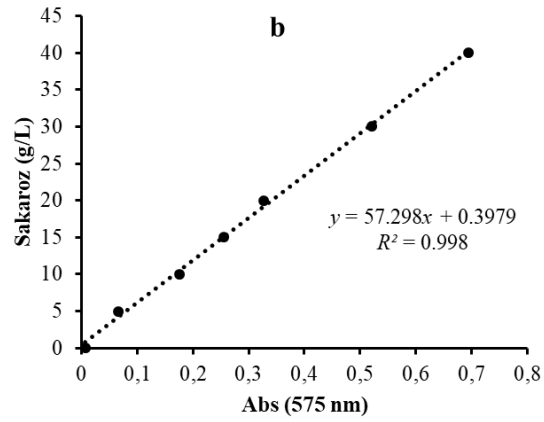
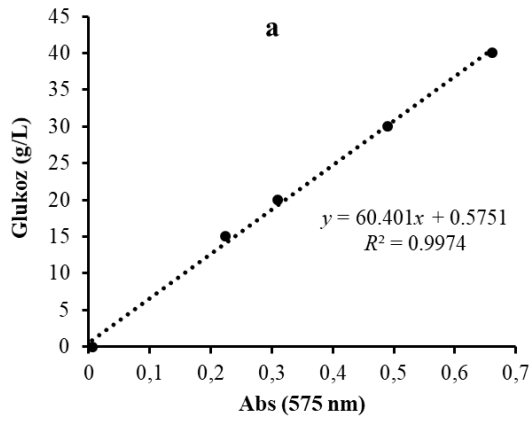


7. EKLER

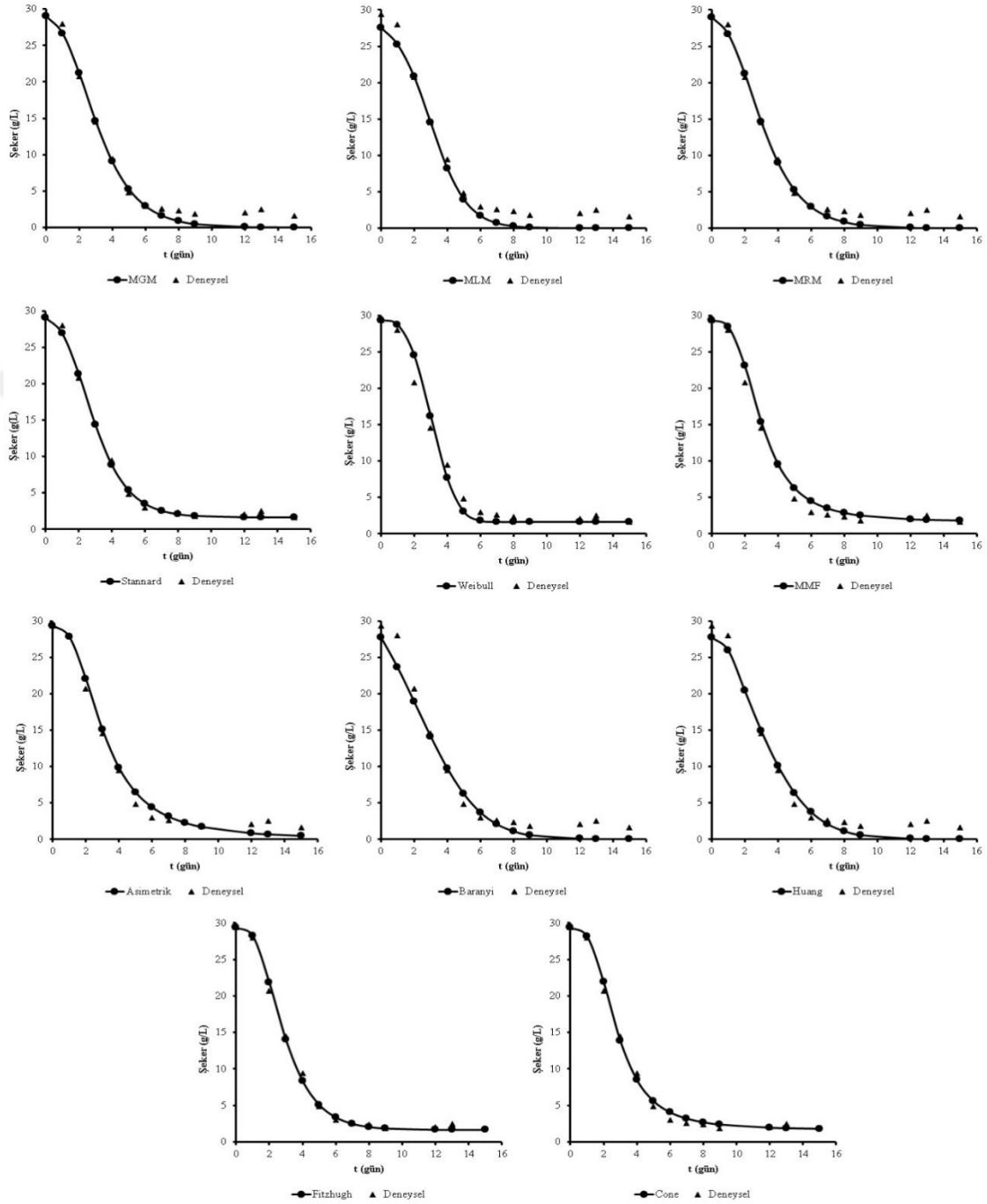
EK-1. Enzim analizinde kullanılan standart fruktoz kurvesi



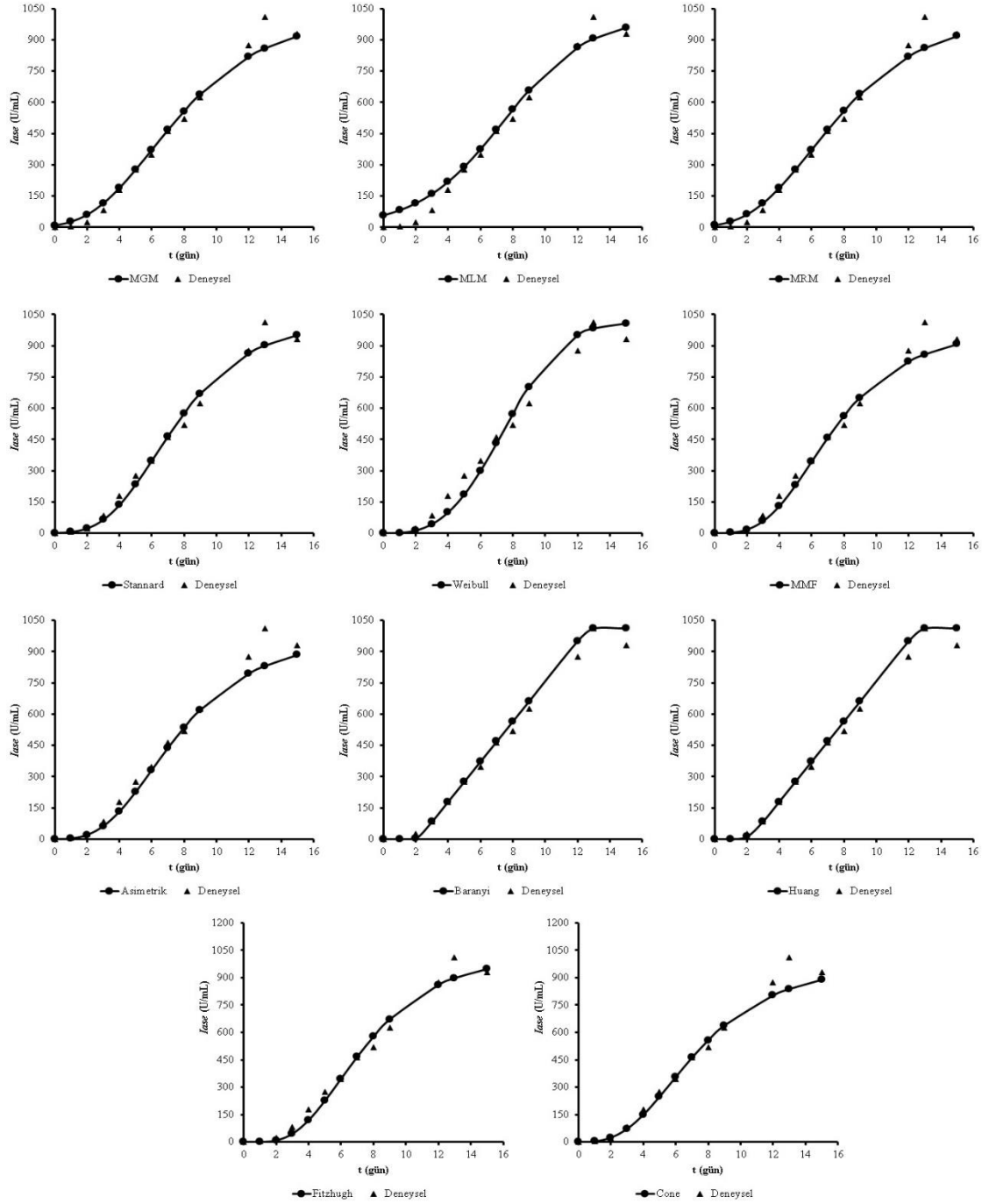
EK-2. a: Standart glukoz kurvesi, b: Standart sukroz kurvesi, c: Standart inülin kurvesi, d: Standart ksiloz kurvesi



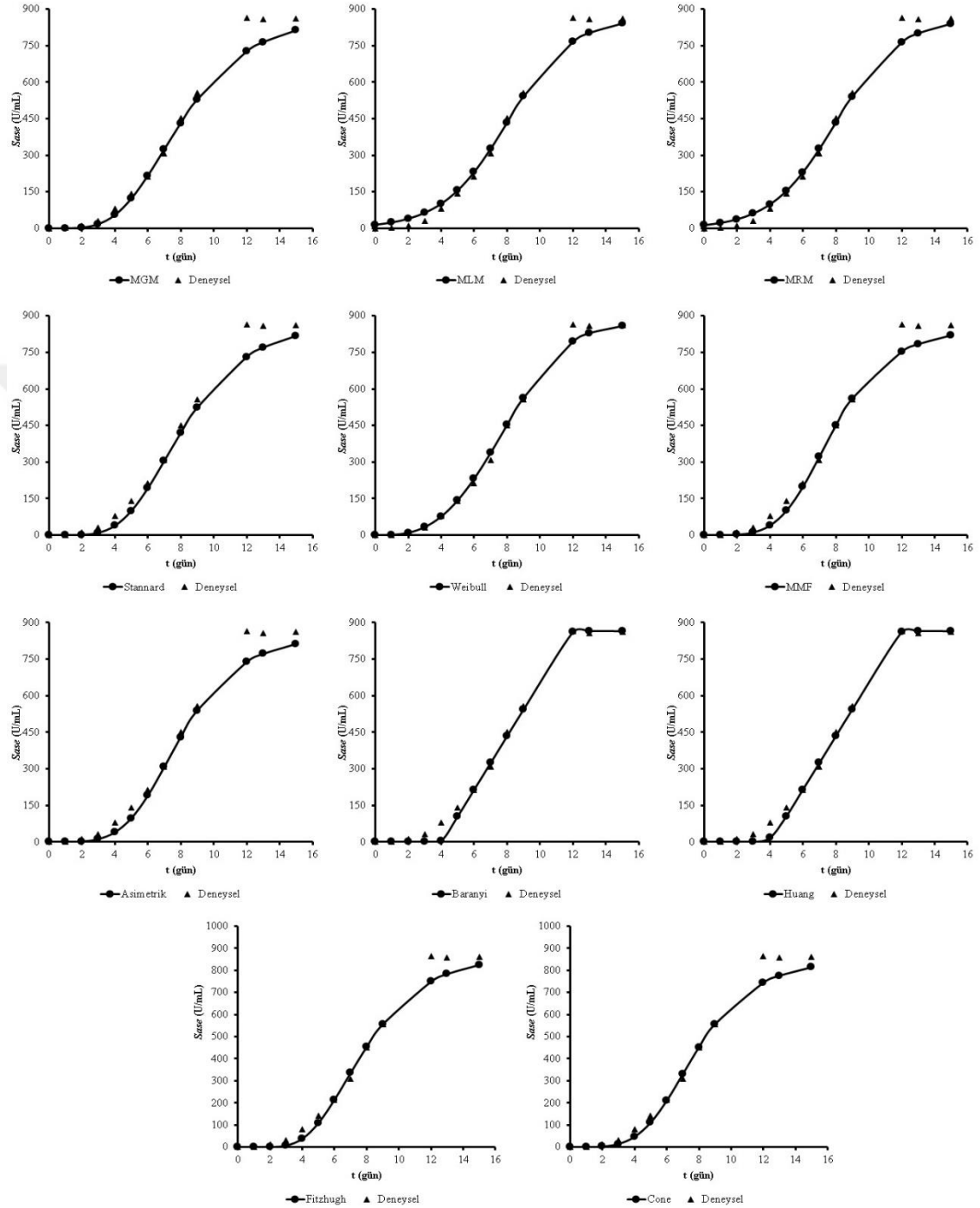
EK-3. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel kalıntı şeker konsantrasyonu verilerinin modeller ile hesaplanan kalıntı şeker konsantrasyonu verileri ile simülasyonu



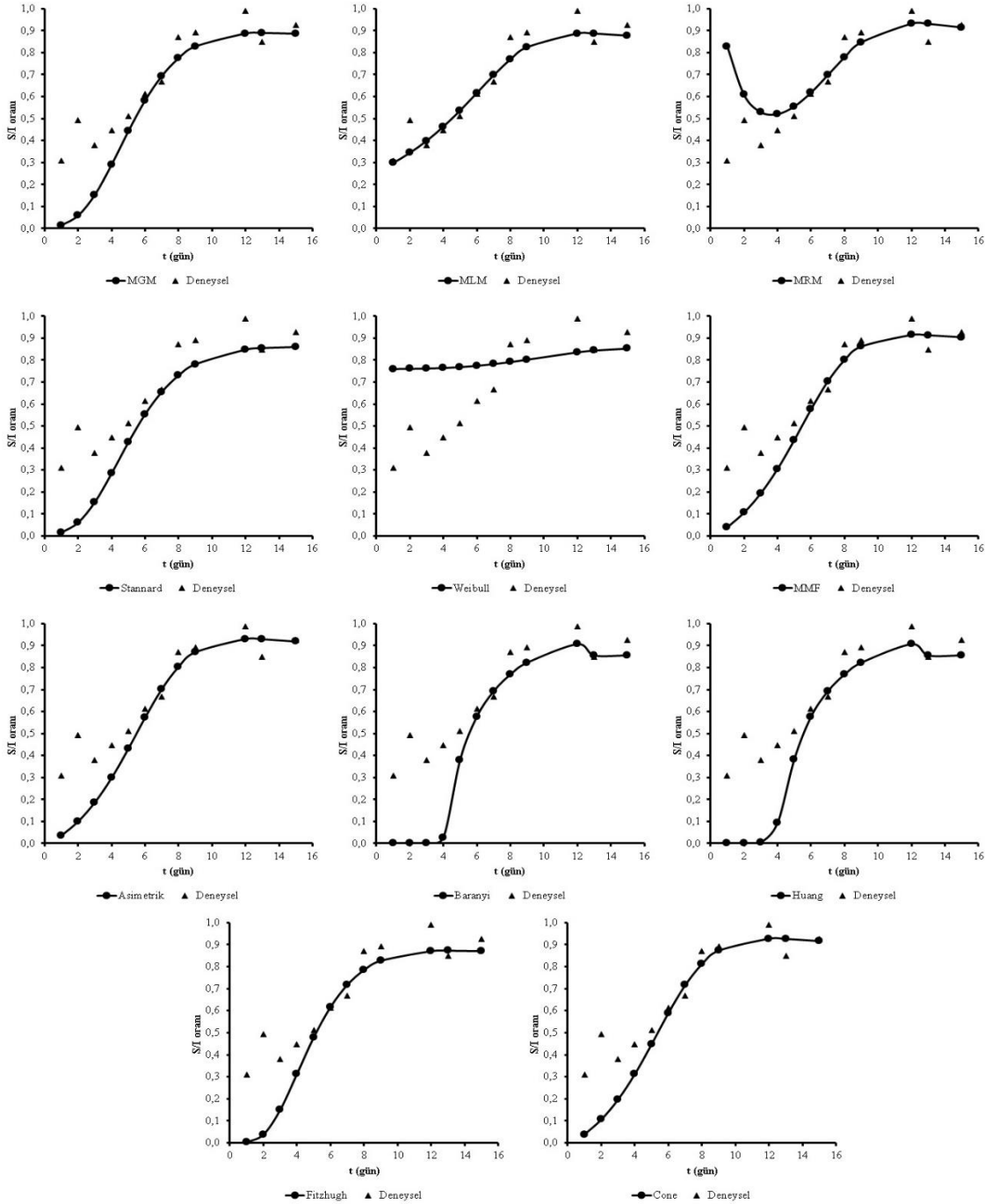
EK-4. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan *Iase* aktivitesi verileri ile simülasyonu



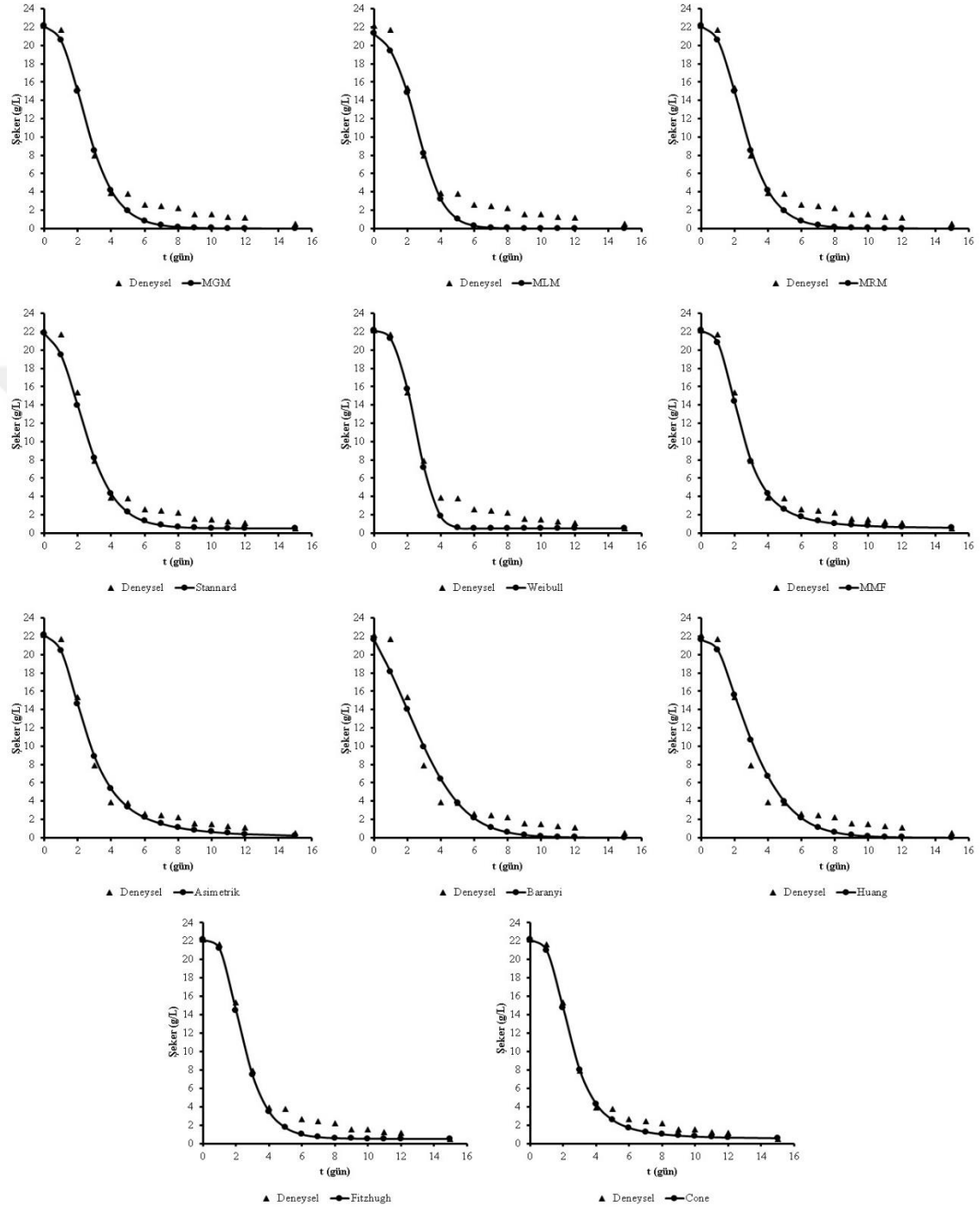
EK-5. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan *Sase* aktivitesi verileri ile simülasyonu



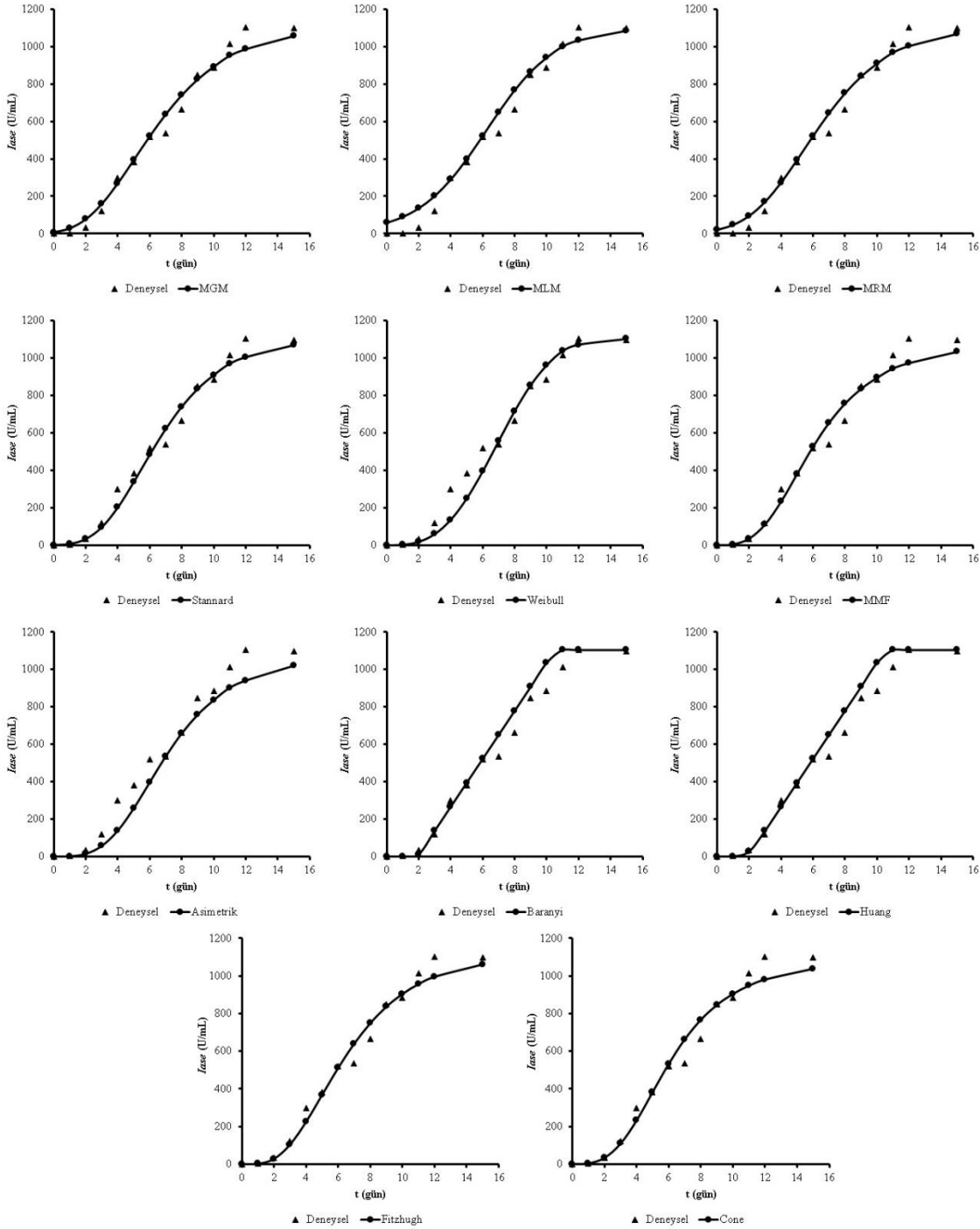
EK-6. PBD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel S/I oranı değerlerinin modeller ile hesaplanan S/I oranı değerleri ile simülasyonu



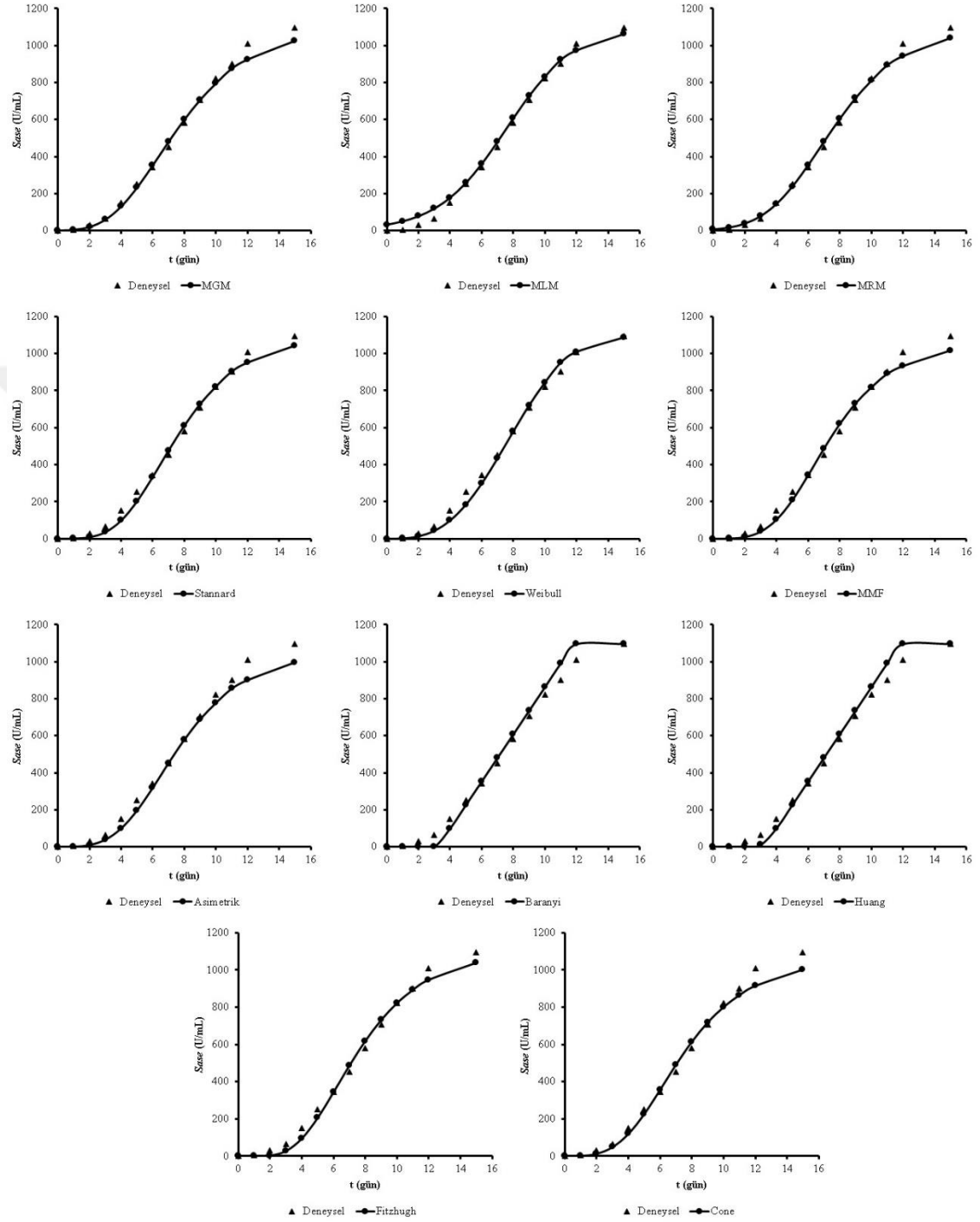
EK-7. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel kalıntı şeker konsantrasyonu verilerinin modeller ile hesaplanan kalıntı şeker konsantrasyonu verileri ile simülasyonu



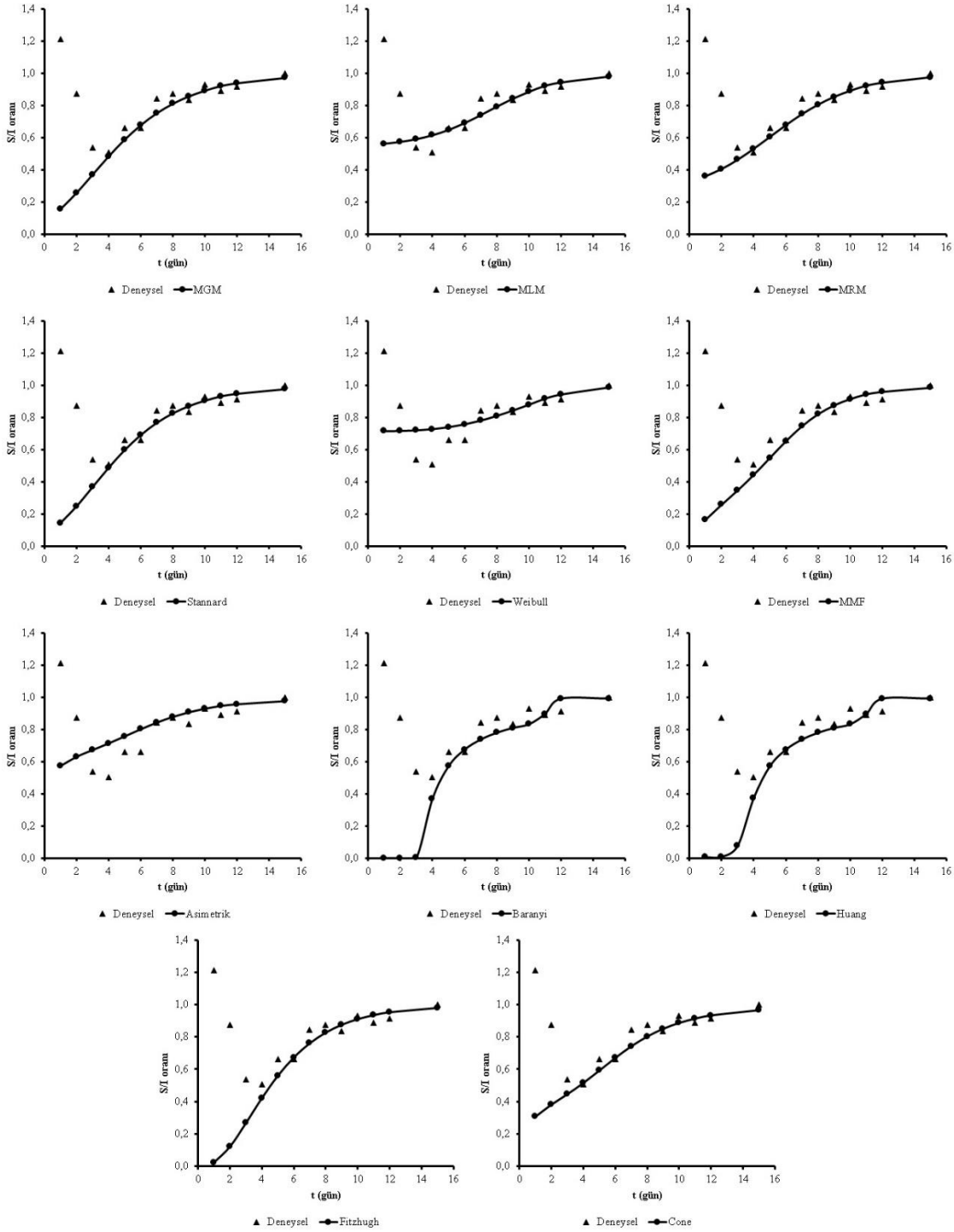
EK-8. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan *Iase* aktivitesi verileri ile simülasyonu



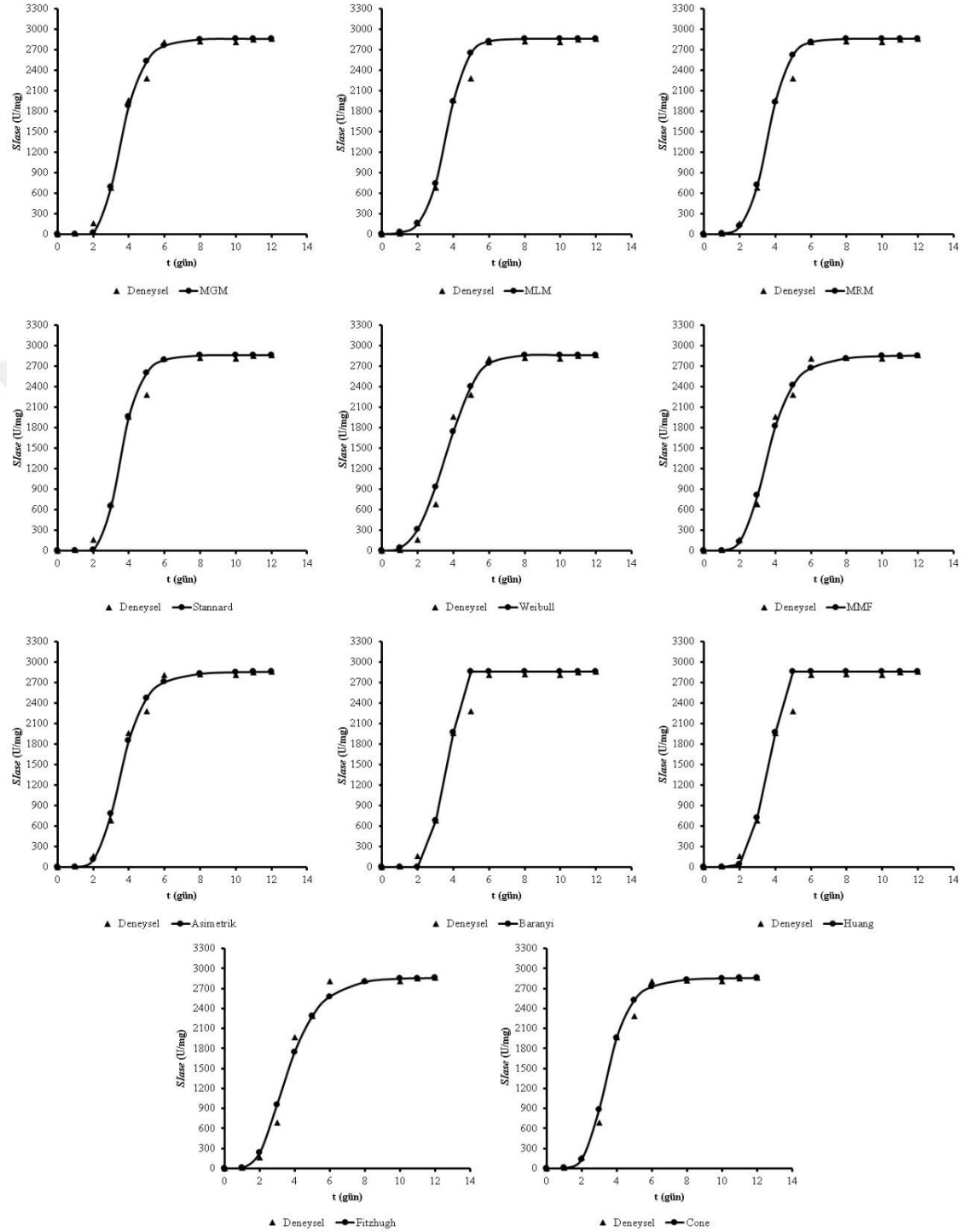
EK-9. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan *Sase* aktivitesi verileri ile simülasyonu



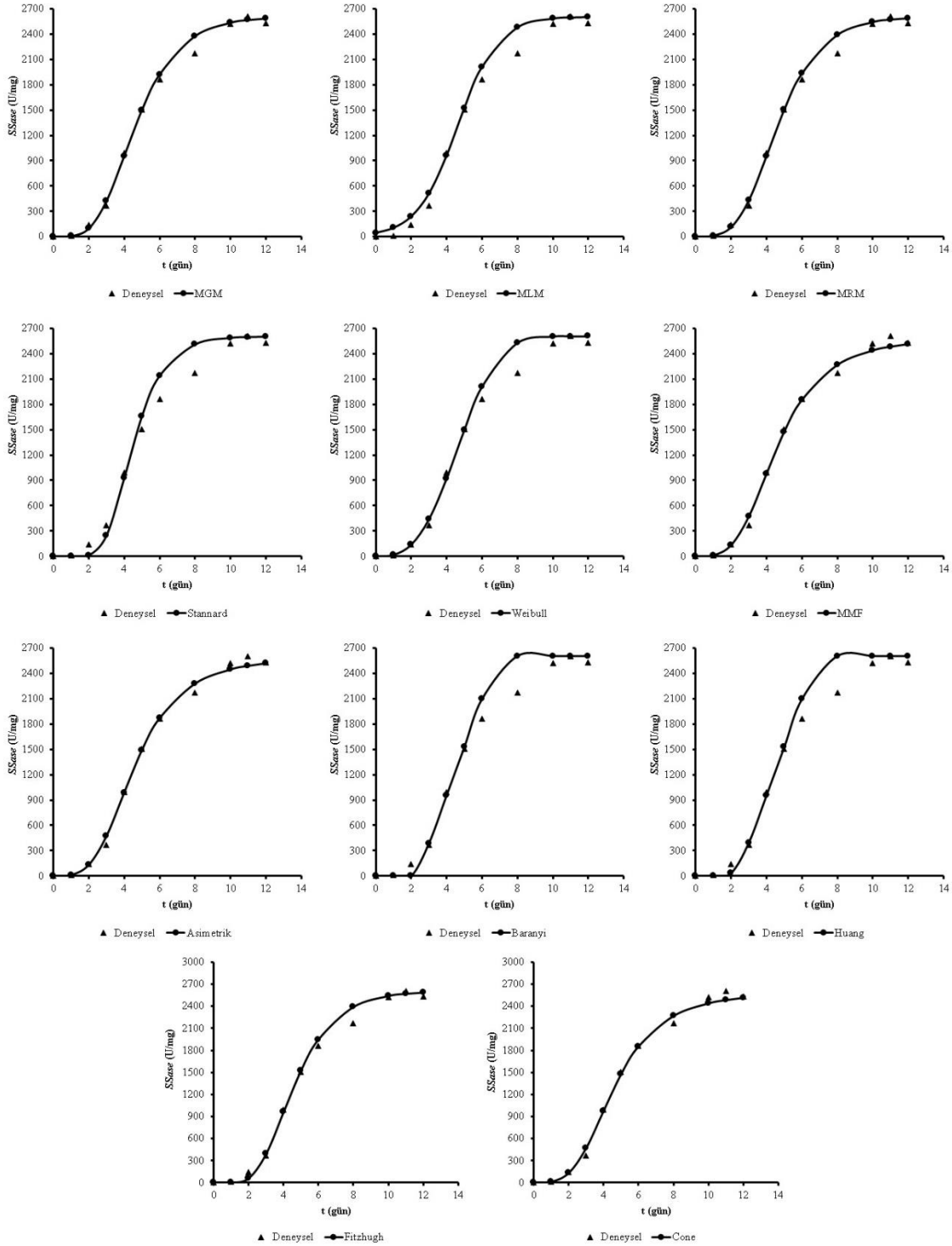
EK-10. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel S/I oranı değerlerinin modeller ile hesaplanan S/I oranı değerleri ile simülasyonu



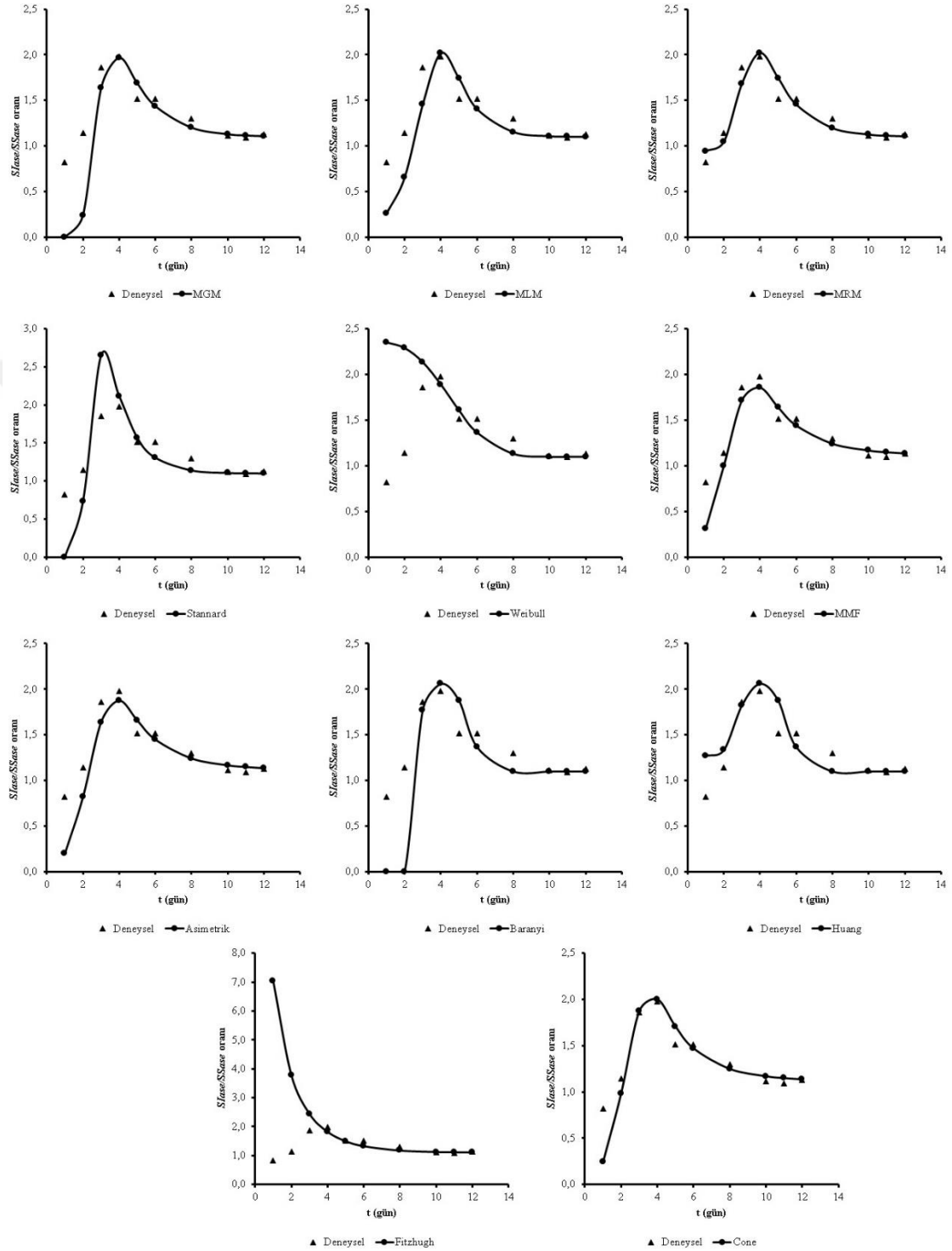
EK-11. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel S_{lase} aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan S_{lase} aktivitesi verileri ile simülasyonu



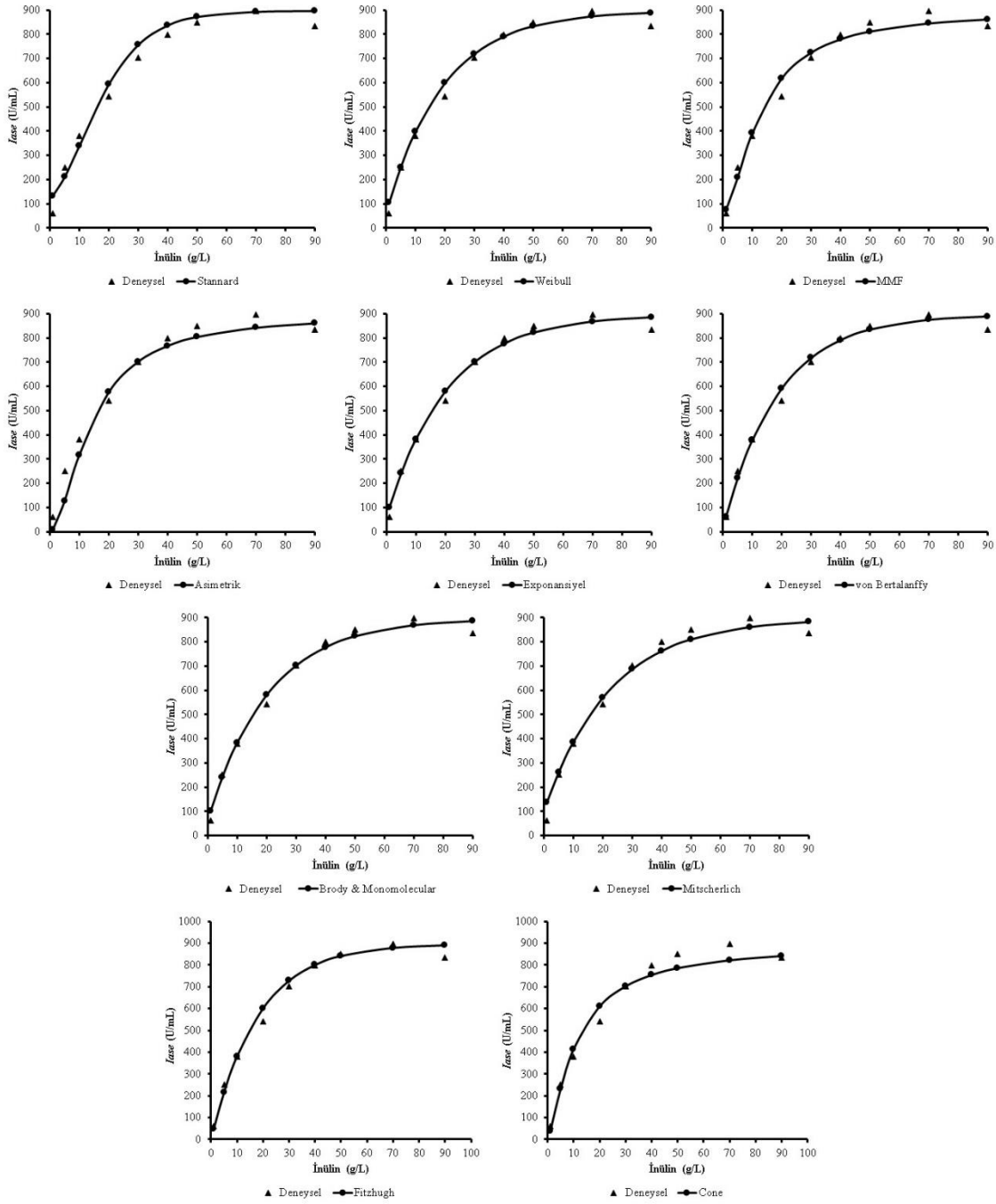
EK-12. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel SS_{ase} aktivitesi verilerinin modeller ile hesaplanan SS_{ase} aktivitesi verileri ile simülasyonu



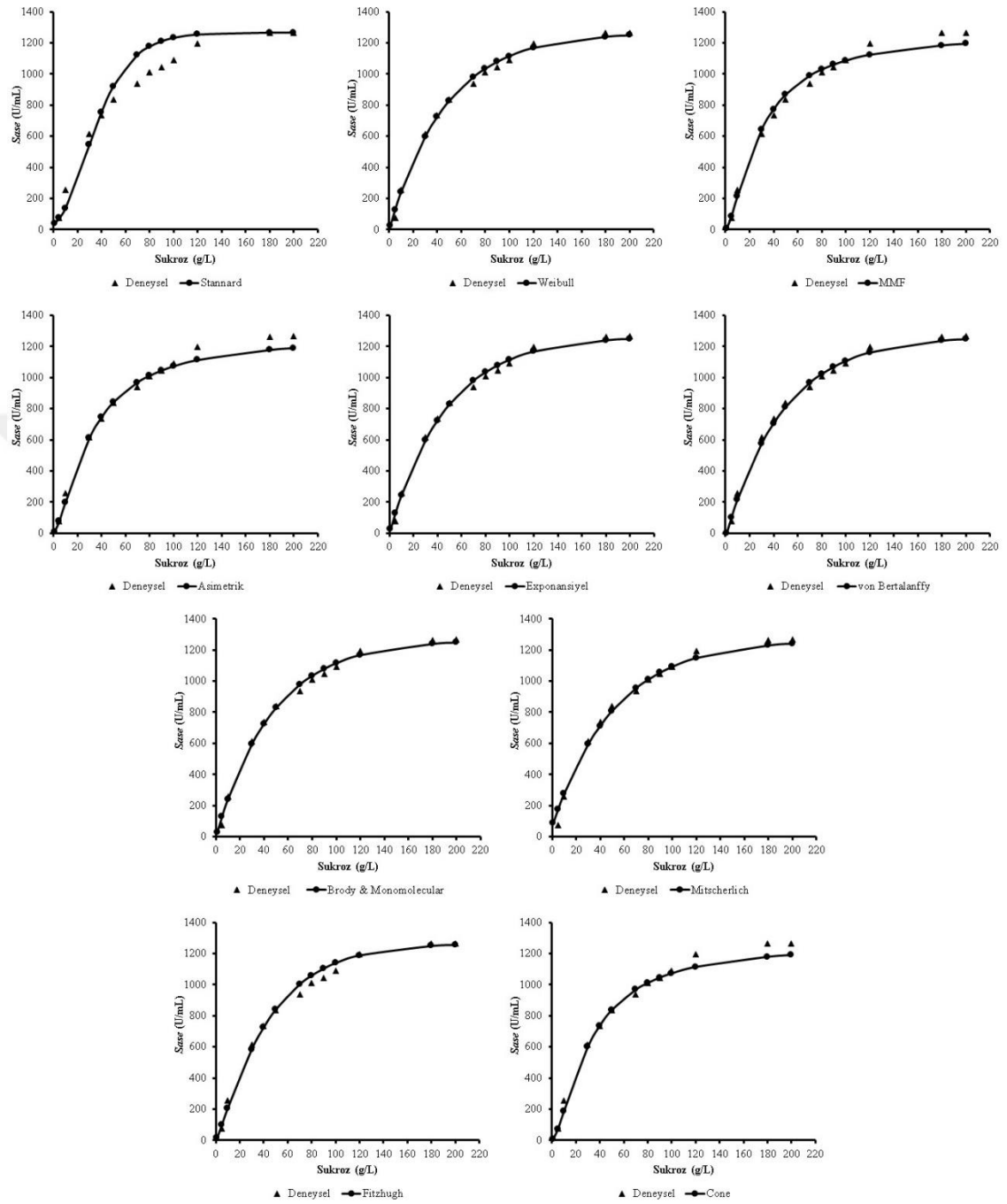
EK-13. MKD ile optimize edilen besiyeri kompozisyonunda gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel $SIase/SSase$ oranı değerlerinin modeller ile hesaplanan $SIase/SSase$ oranı değerleri ile simülasyonu



EK-14. İnülin kullanılarak gerçekleştirilen I_{ase} analizinin deneysel verilerinin modeller ile hesaplanan veriler ile simülasyonu



EK-15. Sukroz kullanılarak gerçekleştirilen Sase analizinin deneysel verilerinin modeller ile hesaplanan veriler ile simülasyonu



ÖZGEÇMİŞ

MUSTAFA GERMEÇ
mustafagermec07@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2014-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2012-2014	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2007-2012	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Germec M.,** Turhan I., Karhan M., Demirci A. Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor, *Fuel*, vol. 161, pp. 304-311, 2015.
- 2- Germec M.,** Ilgın M., İlhan E., Turhan I. Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugar production, *Energy Sources Part A-Recovery Utilization and Environmental Effects*, vol.38, no.20, pp.3103-3108, 2016.
- 3- Yatmaz E.,** Karahalil E., **Germec M.,** Ilgın M., Turhan I. Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced β -mannanase production, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol.39, pp.1391-1399, 2016.

- 4- Yatmaz E., Karahalil E., **Germec M.**, Öziyici H.R., Karhan M., Duruksu G., Ogel ZB., Turhan I. Enhanced mannanase production from alternative sources by recombinant *Aspergillus sojae*, *Acta Alimentaria*, vol.45, pp.372-380, 2016.
- 5- **Germec M.**, Kartal F.K., Bilgic M., Ilgın M., İlhan E., Güldali H., İşçi A., Turhan I. Ethanol production from rice hull using *Pichia stipitis* and optimization of acid pre-treatment and detoxification processes, *Biotechnology Progress*, vol.32, no.4, pp.872-882, 2016.
- 6- **Germec M.**, Turhan I., Demirci A., Karhan M. Effect of media sterilization and enrichment on ethanol production from carob extract in biofilm reactor, *Energy Sources Part A-Recovery Utilization and Environmental Effects*, vol.38, pp.3268-3272, 2016.
- 7- **Germec M.**, Tarhan K., Yatmaz E., Tetik N., Karhan M., Demirci A., Turhan I. Ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis of tea processing waste for production of fermentable sugar, *Biotechnology Progress*, vol.32, no.2, pp.393-403, 2016.
- 8- **Germec M.**, Yatmaz E., Karahalil E., Turhan I. Effect of different fermentation strategies on β -mannanase production in fed-batch bioreactor system, *3 Biotech* (2017) 7:77, 2017
- 9- **Germec M.**, Demirel F., Tas N., Ozcan A., Yilmazer C., Onuk Z., Turhan I. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugars production, *Cellulose* (2017) 24:4337-4353
- 10- Karahalil E., Demirel F., Evcan E, **Germec M.**, Tari C., Turhan I. Microparticle-enhanced polygalacturonase production by wild type *Aspergillus sojae*, *3 Biotech* (2017) 7:361, 2017.
- 11- Germec M., Bader N.B., Turhan I. Dilute acid and alkaline pretreatment of spent tea leaves to determine the potential of carbon sources, *Biomass Conversion and Biorefinery*, <https://doi.org/10.1007/s13399-018-0301-2> (2018).
- 12- **Germec M.**, Karhan M., Bialka K.L., Demirci A, Turhan I. Mathematical modeling of lactic acid fermentation in bioreactor with carob extract, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14 (2018) 254-263.
- 13- **Germec M.**, Turhan I. Ethanol production from acid-pretreated and detoxified rice straw as sole renewable resource, *Biomass Conversion and Biorefinery*, <https://doi.org/10.1007/s13399-018-0310-1> (2018).
- 14- **Germec M.**, Turhan I. Ethanol production from acid-pretreated tea processing waste with activated charcoal detoxification and its modeling, *Fuel* 231 (2018) 101-109.
- 15- **Germec M.**, Karhan M., Demirci A, Turhan I. Ethanol production in biofilm reactor with non-sterile carob extract media and its modeling, *Energy Sources Part A-Recovery Utilization and Environmental Effects*, DOI:10.1080/15567036.2018.1511643 (2018).

16- Demirel F., **Germec M.**, Çoban H.B., Turhan I. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition, *Cellulose*, <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2022-x> (2018).

17- **Germec M.**, Cheng K.C., Karhan M. Demirci A., Turhan I. Application of mathematical models to ethanol fermentation in biofilm reactor with carob extract, *Biomass Conversion and Biorefinery* (2019). <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00425-1>

18- **Germec M.**, Turhan I., Karhan M., Demirci A. Kinetic modeling and techno-economic feasibility of ethanol production from carob extract based medium in biofilm reactor, *Applied Sciences* (2019) 9(10), 2121

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

1- Öziyici H.R., Turhan I., Tetik N., Arslan Kulcan A., Yatmaz E., Akkoyun T., Yatmaz E., **Germec M.**, Karkan M. Concentration of D-pinitol in carob extract by using multi stage enrichment processes, *Gıda*, cilt.40, ss.125-131, 2015.

2- **Germec M.**, Turhan I., Yatmaz E., Tetik N., Karhan M. Fermentation of acid-pretreated tea processing waste for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, vol.20, pp.269-274, 2016.

3- **Germec M.**, Kartal F.K. , Güldali H., Bilgic M. , İşçi A. , Turhan I. Obtaining growth curves for *Scheffersomyces stipitis* strains and their modeling, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol.20, pp.263-268, 2016.

4- **Germec M.**, Ozcan A., Yılmaz C., Tas N., Onuk Z., Demirel F., Turhan I. Ethanol fermentation from microwave-assisted acid pretreated raw materials by *Scheffersomyces stipitis*, *AgroLife Scientific Journal*, Volume 6, Number 1, pp. 112-118, 2017

5- **Germec M.**, Turhan I., Karhan M., Demirci A. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor, *ASABE Annual International Meeting*, Orlando, ABD, 17-20 Temmuz 2016, pp.584-592.

6- **Germec M.**, Tarhan K., Yatmaz E., Tetik N., Karhan M., Demirci A., Turhan I. Optimization of ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis conditions of tea processing wastes, *ASABE Annual International Meeting*, Orlando, ABD, 17-20 Temmuz 2016, pp. 600-606.

7- Yatmaz E, Turhan I, **Germec M.**, Karahalil E. Using centrifuge and ultrafiltration as downstream processes for the concentration of microbial β -mannanase fermentation media, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. 21, pp. 133-136, 2017.

Kitap veya Kitaplarda Bölümler

1- İşçi A., **Germec M.** Yakıtlar ve Endüstriyel Kimyasallar, Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş, Turhan İ., Ed., Palme Yayınevi, Ankara, ss.144-164, 2015.

2- Turhan I., Karahalil E., **Germec M.** Gıda Analizlerinde Enzimlerin Kullanımı, Gıda Analizleri, Nobel Yayınevi, Ankara, ss. 283-299, 2019

3- Turhan I., **Germec M.**, Karahalil E. Oksijen İhtiyacının Belirlenmesi, Gıda Analizleri, Nobel Yayınevi, Ankara, ss. 367-372, 2019

Hakemli Kongre ve Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1- Gürler HN., **Germec M.**, Turhan I. The effect of different phenol concentrations on inulinase production, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

2- Gürler HN., Erkan SB., Ozcan A., Yilmazer C., Karahalil E., **Germec M.**, Yatmaz E., Turhan I. A scale-up processing with different microparticle agent for mannanase fermentation in bioreactor, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

3- Ozcan A., Yilmazer C., Gürler HN., Karahalil E., Erkan SB., **Germec M.**, Yatmaz E., Turhan I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

4- Erkan SB., Yatmaz E., **Germec M.**, Turhan I. Effects of furfural concentration on ethanol production, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

5- Ozcan A., **Germec M.**, Turhan I. Effect of immobilization on ethanol production from wheat bran using *Scheffersomyces stipitis*, III. *International Congress on Food Technology*, Nevşehir, Turkey, October 10-12, 2018.

6- Özcan A., Taş N., Yilmazer C., Onuk Z., **Germec M.**, Demirel F., Turhan I. Microwave-assisted dilute acid hydrolysis of wheat bran for bioethanol production, *International Congress of Agriculture and Environment*, Antalya, Turkey, 2017

7- Özcan A., **Germec M.**, Turhan I. Composition of organic acids and furans in acid-pretreated spent tea waste, *International Congress of Agriculture and Environment*, Antalya, Turkey, 2017

8- Özcan A., **Germec M.**, Turhan I. Fermentable sugar production from tea processing waste using acid-pretreatment, *International Congress of Agriculture and Environment*, Antalya, Turkey, 2017

9- Yatmaz E., Turhan I., **Germec M.**, Ilgın M., Karahalil E. Filamentous fungus fermentation to produce microbial β -mannanase in a stirred tank bioreactor by adding microparticle agents, *International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"*, Bükreş, Romanya, 8-10 Haziran 2017, pp.28-28

- 10- Germec M.,** Tas N., Ozcan A., Yilmazer C., Onuk Z., Demirel F., Turhan I. Microwave-assisted acid pretreatment of renewable resources: a process optimization, *The International Conference "Agriculture For Life, Life For Agriculture"*, Bükreş, Romanya, 2017.
- 11- Demirci A., Germec M.,** Turhan I., Karhan M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor, *38th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Baltimore, USA, 25-28 Nisan 2016.
- 12- Turhan İ., Germec M.,** Taş N. , Özcan A., Yilmazer C., Onuk Z. Buğday kepeğinden fermente edilebilir şekerlerin üretimi üzerine mikrodalga destekli asidik hidrolizin etkisi, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.324-324
- 13- Turhan İ., Demirel F. , Yilmazer C., Taş N. , Özcan A., Onuk Z., Germec M.** Çavdar kepeğinin mikrodalga destekli asidik hidrolizi üzerine mikrodalga gücü, katı/sıvı oranı ve hidroliz süresinin etkisi, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.322-322
- 14- Turhan İ., Germec M.,** Taş N. , Özcan A., Yilmazer C., Onuk Z. Arpa kavuzunun mikrodalga destekli asidik hidrolizi, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.309-309
- 15- Turhan İ., Germec M.** Lignoselülozik bileşiklerin mikrodalga destekli ekstraksiyonu, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.312-312
- 16- Turhan İ., Ilgın M., Germec M., İlhan E.** Fermente edilebilir şeker üretimi için pirinç kavuzunun asidik hidroliz koşullarının optimizasyonu, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.317-317
- 17- Turhan İ., Germec M.,** Onuk Z., Yilmazer C., Taş N., Özcan A. Fermente edilebilir şeker üretimi için yulaf kavuzunun mikrodalga destekli asidik hidrolizi, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, Edirne, Türkiye, 5-7 Ekim 2016, cilt.1, ss.323-323
- 18- Karhan M., Germec M.,** Turhan I., Yatmaz E., Tetik N. Fermentation of acid-pretreated tea processing waste for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*, *The International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"*, Bükreş, Romanya, 9-11 Haziran 2016, pp. 81-81.
- 19- Turhan I., Germec M.,** Kartal F.K., Guldali H., Bilgic M., Isci A. Obtaining growth curves for *Scheffersomyces stipitis* strains and their modeling, *The International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"*, Bükreş, Romanya, 9-11 Haziran 2016, pp. 83-83.
- 20- Demirel F., Germec M.,** Turhan I. Optimization of fermentable sugars production from barley and oat hulls via dilute acid hydrolysis, *Northeast Agricultural and*

Biological Engineering Conference, Orono, ABD, 31 Temmuz-3 Ağustos 2016, vol.26, no.1, pp.17-17

21- Germec M., Turhan I., Karhan M., Demirci A. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae* biofilm reactor, *Northeast Agricultural and Biological Engineering Conference*, Orono, ABD, 31 Temmuz - 3 Ağustos 2016, vol.26, no.1, pp.19-19

22- Germec M., Tarhan K., Yatmaz E., Tetik N., Karhan M., Demirci A., Turhan I. Optimization of ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis conditions of tea processing wastes, *Northeast Agricultural and Biological Engineering Conference*, Orono, ABD, 31 Temmuz - 3 Ağustos 2016, vol.26, no.1, pp.18-19

23- Yatmaz E., Turhan I., Karahalil E., **Germec M.** Microparticle usage in *Aspergillus* fermentation: A new approach for enhancing production rates of mannanase in carob extract, *Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference*, Newark, ABD, 12-15 Temmuz 2015, vol.25, no.2, pp.26-27

24- Germec M., Turhan I., Karhan M. Biyofilm reaktörde keçiyoynuzu ekstraktından etanol üretimi üzerine besiyeri sterilizasyonunun ve zenginleştirmenin etkisi, *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015, ss.100-100

25- Germec M., Karahalil E., Yatmaz E., Turhan I. Fermentasyon ortamında alüminyum oksit kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae*'nin hücre morfolojisinin kontrolü ve ürettiği enzimin artırılması, *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015, ss.99-99

26- Germec M., Turhan İ. Çay fabrikası atığından fermente edilebilir şeker üretimi ve hidrolizatın detoksifikasyonu, *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015, ss.234-234

27- Yatmaz E., Turhan I., Karaoğlu M., İnan M., Karahalil E., **Germec M.** Microbial mannanase production with different fermentation methods and characterization of enzyme-produced, *Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference*, Newark, Delaware, ABD, 12-15 Temmuz 2015, vol.25, no.2, pp.19-20

28- Yatmaz E., Turhan I., Karahalil E., **Germec M.** Purification of mannanase from fermentation broth by flocculation, centrifuge and ultrafiltration, *Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference*, Newark, Delaware, ABD, 12-15 Temmuz 2015, vol.25, no.2, pp.20-20

29- Germec M., Turhan İ. Lignoselülozik bileşenleri içeren pirinç kavuzunun hidroliz koşullarının belirlenmesi, *IV. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, Adana, Türkiye, 17-19 Nisan 2014, ss.557-561

30- Karahalil E., **Germec M.**, Turhan İ. Lignoselülozik bileşenleri içeren pirinç samanının optimum hidroliz koşullarının belirlenmesi, *III. Uluslararası Gıda Kongresi*, Bursa, Türkiye, 26-27 Eylül 2014, pp.31-31

31- Yatmaz E., Karahalil E., **Germec M.**, Turhan I. Optimization of flocculation conditions using chitosan in mannanase production, *European Biotechnology Congress*, Lecce, İtalya, 15-18 Mayıs 2014, vol.185, pp.58-58

32- Tarhan K., Aykut G., Tek S., Yatmaz E., **Germec M.**, Karahalil E., Turhan İ. Farklı çay ekstraktlarından fermentasyonla kombucha çayı üretimi, *IV. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, Adana, Türkiye, 17-19 Nisan 2014, ss.569-572

33- **Germec M.**, Turhan I. Tea waste as a carbon source for value-added production, *II. International congress on food technology*, Aydın, Türkiye, 5-7 Kasım 2014, vol.1, pp.214-214

34- **Germec M.**, Turhan İ. Çay atığının hidroliz koşullarının cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmesi, *IV. Geleneksel Gıdalar Kongresi*, Adana, Türkiye, 17-19 Nisan 2014, cilt.1, ss.578-578

35- **Germec M.**, Turhan I. Production of ethanol from carob pod extract in a biofilm reactor, *II. International Congress on Food Technology*, Aydın, Türkiye, 5-7 Kasım 2014, vol.1, no.47, pp.212-212

36- Tarhan K., Aykut G., Tek S., Yatmaz E., **Germec M.**, Karahalil E., Turhan İ. Siyah çay ekstraktından fermentasyonla kombucha çayı üretimi, *TGDF Gıda Kongresi*, Antalya, Türkiye, 12-14 Kasım 2013, ss.49-49

37- Yatmaz E., Karahalil E., **Germec M.**, Turhan I. Enhanced mannanase production by using microparticles in recombinant *Aspergillus sojae* fermentation, *VI. International Bioengineering Congress "Human Welfare"*, İzmir, Türkiye, 12-15 Kasım 2013, pp.97-97

38- Yatmaz E., **Germec M.**, Karahalil E., Turhan I. Effect of different nitrogen sources on mannanase production from carob pod extract using recombinant *Aspergillus sojae*, *VI. International Bioengineering Congress "Human Welfare"*, İzmir, Türkiye, 12-15 Kasım 2013, pp.96-96

PROJELER

1- Production of ethanol and lactic acid from tea waste with different hydrolysing methods by using fermentation, *Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)*, 2013.12.0102.001, Araştırmacı, 2014.

2- Keçiboynuzu ekstraktı kullanılarak tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretimi, *BAP Yüksek Lisans*, 2014.02.0121.020, Araştırmacı, 2014.

3- Fermentasyon ortamında alüminyum oksit kullanılarak *Aspergillus sojae*'nin hücre morfolojisinin kontrolü ve ürettiği enzimin aktivesinin artırılması, *BAP*, 2013.01.0102.017, Araştırmacı, 2015.

4- Pirinç kavuzunun asit ile hidroliz koşullarının optimizasyonu, elde edilen hidrolizatın detoksifikasyonu ve *Pichia stipitis* suşları kullanılarak etanol üretimi, *Normal Araştırma Projesi (NAP)*, FBA-2016-1205, Araştırmacı, 2017.

5- Magnezyum silikat kullanılarak *Aspergillus sojae*'nin hücre morfolojisinin kontrolü ve poligalakturonaz enziminin üretimi, *BAP Alt Yapı*, FAY-2016-1547, Araştırmacı, 2018.

6- İnülinaz enziminin üretimi, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve fermentasyonlarının matematiksel modellenmesi üzerine bir araştırma, *BAP Doktora*, FDK-2019-4761, Araştırmacı, Devam ediyor.

YAPTIĞI TEZLER

1- Yüksek Lisans, Keçiboynuzu ekstraktı kullanılarak tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretimi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya, Temmuz, 2014.