

Sakkarozun Enzimatik Olarak Hidrolizinin Optimizasyonu

Abdulkadir GÜL^{1*}, Muhammet Şaban TANYILDIZI²

¹ Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane, Türkiye

² Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye

*¹ kadirgul@gumushane.edu.tr, ² mtanyildizi@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 23/09/2023;

Kabul/Accepted: 19/02/2024)

Öz: Nişasta kaynaklı glukoz şurupları endüstriyel uygulamalarda geniş bir paya sahip olmasına rağmen temelde sağlıkla ilgili tartışmalar tüketicilerde sakkarozun kullanımını öne çıkarmaktadır. Sakkaroz, asitleştirme veya enzimatik yöntemlerle invert şekerler adı verilen glukoz ve fruktoz monomerlerine hidroliz edilebilirler. Bu yöntemlerden enzimatik hidroliz işlemi geleneksel kimyasal proseslere göre daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi ve daha az toksik atık üretmesinden dolayı endüstride tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte, hidroliz işleminde kullanılan enzimler genellikle yeniden kullanımı zor ve stabilitesi düşük moleküller olup, üretim maliyetlerinin yüksek olması endüstriyel ölçekte uygulanmasını zorlaştırılmaktadır. Bu çalışmanın amacı sakkarozun invertaz enzimi yardımıyla hidrolizinde önemli olan bağımsız değişkenlerin sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisinin Merkez Kompozit Dizayn (MKD) deneysel tasarım yöntemi kullanılarak detaylı olarak belirlenmesidir. MKD ile gerçekleştirilen deneylerde incelenen bağımsız değişkenler ve cevap değişkenleri arasında enzim aktivitesini de içeren model bir denklem oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenlerin incelenen aralıkları içerisinde, matematiksel model ifadenin hem indirgen şeker konsantrasyonu hem de dönüşümün maksimum olduğu şartlar için yapılan optimizasyon işlemi sonucunda; sakkaroz konsantrasyonu 190,16 g/L, enzim aktivitesi 55,36 U/mL, sıcaklık 33,46 °C, reaksiyon süresi 131,10 dk ve karıştırma hızı 120,86 rpm olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, sakkarozun enzimatik hidrolizi için verimli çalışma koşulları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: İnvvertaz enzimi, hidroliz verimi, optimizasyon, sakkaroz dönüşüm oranı.

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Sucrose

Abstract: Although starch-derived glucose syrups have a wide share in industrial applications, health-related discussions mainly highlight the use of sucrose by consumers. Sucrose can be hydrolyzed by acidification or enzymatic methods to form glucose and fructose monomers, called invert sugars. Among these methods, enzymatic hydrolysis process is a preferred method in the industry because it occurs at lower temperatures and produces less toxic waste compared to traditional chemical processes. However, the enzymes used in the hydrolysis process are generally molecules that are difficult to reuse and have low stability, and their high production costs make it difficult to apply them on an industrial scale. The aim of this study was to determine in detail the effect of the independent variables that are important in the hydrolysis of sucrose by the invertase enzyme on sucrose conversion rate, hydrolysis efficiency, and total reducing sugar concentration using the Central Composite Design (CCD) experimental design method. A model equation including enzyme activity was established between the independent variables and response variables examined in the experiments performed with MKD. Within the examined ranges of the independent variables, as a result of the optimization process for the conditions where both the reducing sugar concentration and the conversion of the mathematical model expression are maximum; sucrose concentration was determined as 190.16 g/L, enzyme activity as 55.36 U/mL, temperature as 33.46 °C, reaction time as 131.10 min, and mixing speed as 120.86 rpm. As a result, efficient processing conditions for the enzymatic hydrolysis of sucrose were determined.

Keywords: Invertase enzyme, hydrolysis yield, optimization, sucrose conversion rate.

1. Giriş

Şekerler modern beslenmenin önemli bir bileşenidir ve sadece birçok meyve, sebze ve yemişlerde doğal olarak bulunan miktarlarla değil, aynı zamanda işlenmiş yiyecek ve içeceklerle eklenen tatlandırıcılar olarak da uygulama bulmaktadır. Ayrıca, besinlere metabolize edilebilir enerji kattıklarından dolayı bunlara ‘kalorili’ veya ‘besleyici’ tatlandırıcılar da denir [1]. Yaklaşık %70’i şeker kamışından, geri kalan %30’u ise şeker pancarından üretilen sakkaroz en önemli bir şeker türüdür [2]. Sakkaroz, glikozil alt ünitesindeki C1 (hemiasetal) ile fruktozil ünitesindeki C2 (hemiketal) arasında bir eter bağıyla (yani glikozidik bağ) bağlanan [3] ve su moleküllerinin açığa çıkmasıyla glukoz ve fruktoz moleküllerinden oluşan bir disakkarittir [4]. Ayrıca, sakkaroz birçok alanda

* Sorumlu yazar: kadirgul@gumushane.edu.tr. Yazarların ORCID Numarası: ¹ 0000-0003-4879-6194, ² 0000-0001-6456-1593

hammadde olarak kullanılabilen ve kolayca bulunabilen en ucuz karbon kaynaklarından biridir [5]. Sakkaroz, glukoz ve fruktoz esaslı mısır şurupları gibi farklı hammadde kaynaklarına göre daha ekonomik olduğu ifade edilmektedir [6-8]. Yiyecek ve içecek endüstrisinde genellikle tatlandırıcı olarak kullanılan sakkaroz ayrıca önemli bir biyoyakıt olan etanolün dışında 5-Hidroksimetil furfural (HMF), biyodizel ve levülinik asit gibi diğer biyoyakıtların/yeşil kimyasalların üretimi için bir hammadde olarak da kullanılmaktadır [9].

Sakkaroz, yüksek sıcaklıklarda asit ilavesi ile asidik veya ılımlı koşullarda invertaz enzimi yardımıyla enzimatik olarak hidrolize edilebilir [10]. Enzim bazlı proseslerin geleneksel kimyasal proseslere göre daha düşük sıcaklıklarda (30-40 °C civarında) çalıştığı, daha az toksik atık ürettiği ve çok daha az yan ürün içerdiği bilinmektedir [11]. İvertaz veya β -fruktofuranosidaz (EC.3.2.1.26) enzimi, sakkarozun monomerlerine parçalanmasını katalize eden hidrolitik bir enzimdir [12]. İvertaz enzimi geniş bir pH aralığında (3,5-5,5) nispeten yüksek aktivite sergilemekle birlikte optimum pH'sı 4,5'e yakındır. Genel olarak invertaz enzim aktivitesi 55°C civarında maksimuma ulaşır. İvertaz enzimi, ağır metaller tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilebilir [13]. Sakkaroz invertaz enzimiyle hidroliz edildiğinde başlangıçta hazırlandığı konsantrasyondan daha düşük (yaklaşık %10) konsantrasyonlarda invert şeker olarak bilinen glukoz ve fruktozun eşmolar bir karışımı oluşur [14, 15]. Bu invert şekerlerden biri olan fruktoz, sakkarozdan daha tatlıdır ve yiyecek ve içecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [16]. Bu ekstra tatlılık (invert şurup), meyve aromalı içeceklerde kullanılan karbonhidrat tatlandırıcılarının miktarına yaklaşık %20 daha az ihtiyaç duyulmasına ve dolayısıyla daha uygun bir maliyet etkinliğine yol açabilmektedir [17, 18]. İvert şekerler, kremler, reçeller, yapay bal ve sıvı şeker üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır [19]. Fruktoz ayrıca biyoyakıtlar ve biyodizelin yanı sıra dimetilfuran (DMF), 5-etoksümetilfurfural (EMF), HMF ve 2,5-furandikarboksilik asidi (FDCA) üretmek için hammadde olarak da tercih edilmektedir [9]. Bununla birlikte, fruktozun yüksek fiyatı bu değerli ürünlerin üretiminde önemli bir dezavantajdır. Glukoz ise gıdaların birçoğunda bulunmasının yanı sıra insan ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde de merkezi bir rol oynar [1]. Ayrıca, farmasötikler, deterjanlar, betonlar, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve gıda endüstrilerinde yaygın uygulamaları olan glukonik asit (GA) üretmek için temel hammadde kaynağı olarak da kullanılmaktadır [20, 21]. Glukoz GA'nın dışında, naylon, plastik ve gıda katkı maddelerinin üretimi için önemli kimyasallar olan glukuronik asit ve türevlerine de oksitlenebildiği farklı çalışmalardan bilinmektedir [22]. Glukozun bu değerli ürünlerinde üretimlerinde kullanılması yüksek girdi maliyetlerinden dolayı farklı hammadde arayışlarına neden olmaktadır [23].

Sakkaroz ayrıca invert şeker üretmek için asidik ortamda (pH 2-3) yüksek sıcaklıklarda da (70-85 °C) hidroliz edilebilir. Ancak asit hidrolizi, istenmeyen ürün oluşumu, yüksek enerji tüketimi, düşük verim ve ekipmanın yüksek korozyif eğilimi gibi dezavantajlara sahiptir [24]. Enzimatik olarak sakkarozun hidrolizi, hidroliz reaksiyonunun daha ılımlı sıcaklık ve pH koşulları altında gerçekleştirilmesi [24] ve daha yüksek kalitede invert şekerlerin elde edilmesi nedeniyle asit hidrolizine göre daha fazla kullanılan bir yöntemdir [25, 26]. Ayrıca, asit hidrolizi ile elde edilen renkli hidroliz ürünlerinin aksine enzimatik hidroliz ürünlerinin rensiz olma avantajı da bulunmaktadır [25, 27]. Bu durum, enzimatik hidroliz işlemini özellikle yiyecek ve içecek endüstrisindeki uygulamalarda tercih edilir hale getirmektedir [26]. Özetle, sakkarozun hidrolizinde enzimatik hidroliz işlemi, asidik hidroliz yöntemleri gibi geleneksel tekniklerden daha verimli bir yöntemdir [4]. Bununla birlikte, kullanılan enzimlerin yeniden kullanımının zor, stabilitesinin düşük ve üretim maliyetinin yüksek olması, bunların endüstriyel ölçekte uygulanmasını zorlaştırmaktadır [28]. Ayrıca, kullanılan biyokütle kaynağının maliyeti de endüstriyel üretimlerde önemli bir girdi kalemidir. Bu kapsamda çalışmanın amacı, doğada farklı bitkisel maddelerden bol miktarlarda elde edilebilen ve kısmen daha uygun maliyetli sakkarozun invertaz enzimi yardımıyla hidrolizinin optimize edilmesidir. Sakkarozun invertaz enzimiyle hidrolizi [29, 30] uzun zamandır bilinen ve buna yönelik gerçekleştirilen birçok çalışma olmasına rağmen, substrat kaynağı olarak sakkarozun ticari olarak temin edilen invertaz enzimi yardımıyla hidroliz şartlarının optimizasyonunu ve etkisini ortaya koyan modellemesinin yapıldığı bir çalışma bilgimize göre literatürde bulunmamaktadır.

Sakkarozun enzimatik olarak hidroliz verimi, inkübasyon süresi, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi çevresel koşulların yanı sıra kullanılan enzimin aktivitesi ve sakkaroz konsantrasyonunun optimize edilmesiyle artırılabilir. Optimize edilmiş şartlar hidroliz verimini artırır ve üretim maliyetlerini de azaltır. Geleneksel optimizasyon yöntemleri zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca bu yöntemler uygulanırken değişkenler arasındaki etkileşimler dikkate alınmaz. Proses optimizasyonuna alternatif bir yaklaşım, proses optimizasyonu için birden fazla faktörü aynı anda inceleyebilen, Merkez Kompozit Dizaynı (MKD) adı verilen istatistiksel yöntemdir. İstatistiksel optimizasyon ile uygun şekilde planlanmış bir dizi deney yalnızca zaman kaybını ve üretim maliyetlerini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda söz konusu değişkenlerin etkileşimleri de dahil olmak üzere optimum değerlerin belirlenmesine de yardımcı olur [31]. Sonuç olarak, bu çalışmada, enzimatik hidroliz, sakkaroz biyokütlesinden glukoz ve fruktozun elde edildiği temel proseslerden biri olduğundan hidroliz prosesinin optimize edilmesiyle

indirgen şeker üretim veriminin artırılması ve üretim maliyetlerinin azaltılmasını sağlayacak model denklemin elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metotlar

2.1 Deneyleerde kullanılan cihazlar ve kimyasallar

Çalışmada %99,5 saflıktaki ticari olarak temin edilen sakkaroz, enzimatik hidroliz deneylelerinde substrat kaynağı olarak kullanılmıştır. Sakkarozun hidrolizinde ticari olarak temin edilen Alfaol NT100 marka invertaz (β -fruktofuranozidaz, E.C 3.2.1.26) enzimi kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Tekkim, TK.170500.01002) ve pH'sının ayarlanmasında hidroklorik asit (HCl) (Merck, 1.00314.2500) kimyasalları kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin pH değerleri Thermo Scientific marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür. İvertaz enzim aktivitesi deneylelerinde inkübasyon işlemleri Wisebath markalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Sakkarozun enzimatik hidrolizi işleminde karıştırıcı olarak Selecta marka çalkalayıcı kullanılmıştır. İvertaz enzim aktivitesi ve hidroliz ortamında bulunan şekerlerin (sakkaroz, glukoz ve fruktoz) analizleri için Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC, Shimadzu marka, LC-20AT) kullanılmıştır.

2.2 İvertaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Deneysel tasarımda bağımsız değişken olarak tanımlanan invertaz enzim aktivitesi 'Creative Enzymes: Enzymatic Assay of invertase [32]' protokolü takip edilerek ölçülmüştür. İlk olarak, 100 mM sodyum asetat tampon çözeltisi (25 °C, pH 4,6), 200 mL distile suda $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kimyasalının çözdürülüp, 1 M HCl ile pH'nın 4,6 ya ayarlanmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra, invertaz enzimi aktivite deneylelerinde kullanılmak üzere distile su yardımıyla 10 kat seyreltilerek enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi hazırlandıktan sonra, %99,5 saflıktaki sakkaroz kullanılarak konsantrasyonu 200 g/L olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 0,5 M 100 mL HCl çözeltisi deney sonunda enzim aktivitesini durdurmak için kullanılmıştır. Aktivite tayini için gerekli tüm malzemeler hazırlandıktan sonra 2 mL'lik küvet içerisine sırasıyla 1 mL tampon, 0,5 mL substrat ve son olarak 0,1 mL enzim çözeltisi eklenerek 37 °C'lik bir su banyosunda 5 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 0,1 mL HCl çözeltisi ile reaksiyon durdurulmuştur. Numuneler 0. saatten başlayarak belirli sürelerde HPLC ile analiz edilerek her bir sürenin sonundaki sakkaroz, glukoz ve fruktoz konsantrasyonları belirlenmiştir. Son olarak elde edilen sonuçlar kullanılarak aşağıda verilen Denklem 1 yardımıyla invertaz enziminin aktivitesi hesaplanmıştır. İvertaz enziminin aktivitesi belirlendikten sonra tasarımdaki enzim miktarına denk gelecek şekilde gerekli hacimdeki enzim hidroliz ortamına eklenmiştir. Bir ünite (U) değeri, 25 °C'de dakikada sakkarozdan 1 μmol glukoz eşdeğer indirgen şeker salınımını katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzimatik aktivite değeri sakkaroz çözeltisi için U/mL olarak ifade edilmiştir [33, 34].

$$U/mL = \frac{\mu\text{mol glukoz}}{\text{mL enzim} \times \text{dakika}} \times (\text{seyreltme oranı}) \quad (1)$$

2.3 Sakkarozun enzimatik hidrolizi ve optimizasyon çalışmaları

Sakkarozun invertaz enzimi yardımıyla hidroliz edilmesi deneylelerinde %99,5 saflıktaki sakkaroz substrat kaynağı olarak kullanılmıştır. Sakkarozun enzimatik hidrolizi için enzim aktivitesi, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve karıştırma hızı gibi bağımsız değişkenlerin en uygun değerleri deneysel tasarım ile belirlenmiştir. Deneysel çalışma şablonu MKD'ye göre tasarlanmış ve Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1 yardımıyla farklı konsantrasyonlardaki sakkaroz çözeltileri hazırlanarak 250 mL'lik erlenlere 50 mL sıvı hacmi olacak şekilde ayrılmıştır. Her bir erlene belirlenen miktarlarda enzim eklendikten sonra farklı sıcaklık, süre ve karıştırma hızlarında sakkarozun enzimatik hidrolizi işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneyleler sonunda, sakkaroz, glukoz ve fruktoz miktarları HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel çalışma sonrasında istatistiksel analizler DesignExpert 8.0® (State-Ease, USA) yazılımı yardımıyla incelenerek en uygun hidroliz şartları belirlenmiştir. Cevap değişkenleri olarak sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu seçilmiş ve aşağıda verilen Denklem 2, 3 ve 4 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Sakkaroz dönüşüm oranı (\%)} = \frac{C_{\text{başlangıç sakkaroz}} - C_{\text{kalan sakkaroz}}}{C_{\text{başlangıç sakkaroz}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Hidroliz verimi (g/g)} = \frac{C_{\text{glukoz}} + C_{\text{fruktoz}}}{C_{\text{başlangıç}}} \quad (3)$$

$$\text{Toplam indirgen şeker konsantrasyonu (g/L)} = C_{\text{glukoz}} + C_{\text{fruktoz}} \quad (4)$$

Tablo 1. Enzimatik hidroliz için en uygun şartların belirlenmesi amacıyla seçilen değişkenler ve incelenen aralık değerleri.

Bağımsız değişkenler	- α	0	+ α
Sakkaroz konsantrasyonu, g/L	50	200,0	350
Enzim aktivitesi, U/mL	10	42,5	75
Sıcaklık, °C	20	30,0	40
Reaksiyon süresi, dk	15	97,5	180
Karıştırma hızı, rpm	30	115,0	200

2.4 Analizler

Çalışma boyunca gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalar, iki paralel numune ile gerçekleştirilmiş ve bunların ortalaması deneysel sonuç olarak kullanılmıştır. Numune analizleri ölçülen iki numune değeri arasındaki bağıl hata %10'dan fazla olduğunda tekrarlanmıştır. Çalışmada, optimizasyon işlemlerinde MKD deneysel tasarım metodundan faydalanılmıştır. Bu araştırma yöntemiyle, farklı cevap değişkenlerini (sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu) dikkate alarak optimizasyon yapılmasına imkân sağlayacak model ifadeler elde edilmiştir. Elde edilen bu model denklemlerin ANOVA (Analysis of Variance) test sonuçları incelenmiştir. Önerilen model denklemin sayısal çözümlene yöntemi yardımıyla farklı cevap değişkenleri için çözümlü yapılmış ve belirlenen optimum noktalarda doğrulama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarımın oluşturulması ve sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve model ifadenin çözümlenmesi işlemlerinde DesignExpert 8.0® (Stat-Ease Inc. Version 8.0) yazılımından faydalanılmıştır.

Deneysel çalışma sürecinde, ortamda bulunan glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi şekerlerin miktarları HPLC ile ICE-Coregel-87H3 HPLC kolonu ve 5 mM H₂SO₄ mobil fazı kullanılarak analiz edilmiştir. Enzim aktivite belirlenme ve hidroliz deneylerinde ortamda bulunan şeker miktarları Refraktif Index Dedektörü (RID) ile analiz edilmiştir. Akış hızı 0,6 mL/dk olup kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. Analiz süresi her bir örnek için toplam 25 dk olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi belirlenme ve hidroliz ortamı numuneleri, 50 kat oranlarda seyreltilerek, 0,45 µm'lik polipropilen filtreler yardımıyla filtreleme işlemi yapıldıktan sonra içerdiği şeker miktarları tespit edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Sakkarozun enzimatik hidrolizi için optimizasyon sonuçları

Sakkarozun hidrolizi, asidik veya enzimatik olarak gerçekleştirilebilir. Kullanılan asit çevreyi kirletmesinin yanında ekipman için korozif etkiye sahip olması ve yan ürünlerin oluşması gibi dezavantajlara sahiptir. Yüksek özgülük ve afiniteye sahip enzimatik işlem çok daha ılımlı şartlarda gerçekleşen bir reaksiyondur ve yan ürün oluşumunun olmaması enzimatik yöntemin önemli avantajlarıdır [35].

Bu çalışmada, sakkarozun hidrolizi için ticari invertaz enziminin en uygun hidroliz şartları araştırılmıştır. Sakkarozun enzimatik hidrolizinde önemli olan değişkenlerin, sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisinin detaylı olarak belirlenmesi amacıyla MKD yardımıyla oluşturulan deneysel çalışma tablosu ve elde edilen deneysel sonuçlar Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. Sakkaroz dönüşüm oranı, hidrolizi verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu için MKD tasarım matrisi ve deneysel sonuçlar.

Deney no	Sakkaroz konst., g/L	Enzim aktivitesi, U/mL	Sıcaklık, °C	Süre, dk	Karıştırma hızı, rpm	Sakkaroz dönüşüm oranı, %	Hidroliz verimi, g/g	Toplam indirgen şeker konst., g/L
1	136,93	28,84	25,80	62,81	79,26	56,42	0,57	76,15
2	263,07	28,84	25,80	62,81	79,26	40,08	0,40	104,50
3	136,93	56,17	25,80	62,81	79,26	80,85	0,81	109,65
4	263,07	56,16	25,80	62,81	79,26	56,50	0,56	146,95
5	136,93	28,84	34,20	62,81	79,26	68,40	0,67	92,43
6	263,07	28,84	34,20	62,81	79,26	49,25	0,49	129,20
7	136,93	56,16	34,20	62,81	79,26	88,99	0,89	122,18
8	263,07	56,16	34,20	62,81	79,26	65,47	0,64	171,25
9	136,93	28,84	25,80	132,19	79,26	84,52	0,85	115,10
10	263,07	28,84	25,80	132,19	79,26	70,27	0,70	184,70
11	136,93	56,16	25,80	132,19	79,26	100,00	0,99	135,88
12	263,07	56,16	25,80	132,19	79,26	87,05	0,87	228,18
13	136,93	28,84	34,20	132,19	79,26	90,60	0,89	123,03
14	263,07	28,84	34,20	132,19	79,26	75,59	0,76	198,60
15	136,93	56,16	34,20	132,19	79,26	100,00	0,99	135,63
16	263,07	56,16	34,20	132,19	79,26	91,37	0,92	240,03
17	136,93	28,84	25,80	62,81	150,74	58,70	0,59	80,25
18	263,07	28,84	25,80	62,81	150,74	32,91	0,32	85,10
19	136,93	56,16	25,80	62,81	150,74	83,61	0,82	114,40
20	263,07	56,16	25,80	62,81	150,74	54,27	0,54	141,88
21	136,93	28,84	34,20	62,81	150,74	70,24	0,69	95,65
22	263,07	28,84	34,20	62,81	150,74	39,61	0,39	103,20
23	136,93	56,16	34,20	62,81	150,74	90,98	0,89	123,13
24	263,07	56,16	34,20	62,81	150,74	62,41	0,61	163,33
25	136,93	28,84	25,80	132,19	150,74	81,72	0,81	112,63
26	263,07	28,84	25,80	132,19	150,74	61,74	0,63	163,68
27	136,93	56,16	25,80	132,19	150,74	100,00	0,99	136,10
28	263,07	56,16	25,80	132,19	150,74	81,56	0,81	213,45
29	136,93	28,84	34,20	132,19	150,74	91,53	0,91	124,93
30	263,07	28,84	34,20	132,19	150,74	72,31	0,73	190,75
31	136,93	56,16	34,20	132,19	150,74	100,00	0,99	136,18
32	263,07	56,16	34,20	132,19	150,74	89,43	0,90	234,20
33	50,00	42,50	30,00	97,50	115,00	100,00	1,02	50,85
34	350,00	42,50	30,00	97,50	115,00	57,51	0,57	199,75
35	200,00	10,00	30,00	97,50	115,00	37,01	0,37	73,18
36	200,00	75,00	30,00	97,50	115,00	97,19	0,97	193,33
37	200,00	42,50	20,00	97,50	115,00	67,06	0,65	129,50
38	200,00	42,50	40,00	97,50	115,00	96,29	0,96	191,95
39	200,00	42,50	30,00	15,00	115,00	25,09	0,25	50,38
40	200,00	42,50	30,00	180,00	115,00	95,69	0,96	191,98
41	200,00	42,50	30,00	97,50	30,00	85,16	0,83	166,10
42	200,00	42,50	30,00	97,50	200,00	89,95	0,88	176,85
43	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,63	0,89	177,00
44	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,55	0,88	176,50
45	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,28	0,89	178,25
46	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,48	0,89	177,30
47	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,65	0,88	176,00
48	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,38	0,89	177,55
49	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	88,88	0,57	177,05
50	200,00	42,50	30,00	97,50	115,00	89,33	0,40	177,45

MKD'ye göre hazırlanan deneysel matrise uygun elde edilen deneysel çalışma sonuçları DesignExpert 8.0® yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uyumluluğu istatistiksel olarak incelenmiştir. Sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu için istatistiksel analizler sonucunda elde edilen deneysel verilere en uygun matematiksel model ifadenin kuadratik (ikinci derece) formdaki denklem olduğu Tablo 3'den görülmektedir.

Tablo 3. Matematiksel model ifadelerinin istatistiksel analiz sonuçları.

Cevap değişkenleri	Model	Standart sapma	R ²	R ² _{adj}	R ² _{pred}
Sakkaroz dönüşüm oranı	Doğrusal	8,60	0,831	0,812	0,790
	2FI	9,17	0,852	0,786	0,780
	İkinci dereceden	3,84	0,978	0,963	0,903
	Üçüncü dereceden	2,11	0,997	0,989	0,558
Hidroliz verimi	Doğrusal	0,084	0,84	0,82	0,80
	2FI	0,090	0,86	0,79	0,79
	İkinci dereceden	0,040	0,98	0,96	0,90
	Üçüncü dereceden	0,023	0,99	0,99	0,56
Toplam indirgen şeker konsantrasyonu	Doğrusal	21,93	0,80	0,78	0,75
	2FI	20,25	0,87	0,81	0,81
	İkinci dereceden	7,75	0,98	0,97	0,93
	Üçüncü dereceden	4,25	0,99	0,99	0,70

Önerilen modelin tanımlayıcılığını artırmak amacıyla kuadratik model içerisinde bulunan sonuç değişkenine etkisi önemsiz olan terimler çıkarıldıktan sonra elde edilen matematiksel model ifadenin istatistik değerleri Tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri

	Sakkaroz dönüşüm oranı	Hidroliz verimi	Toplam indirgen şeker konsantrasyonu
Standart sapma	3,63	0,038	7,51
Ortalama	76,85	0,76	147,46
Varyans katsayısı (C.V) %	4,72	5,03	5,09
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS)	1690,39	0,19	7363,04
R ²	0,978	0,976	0,984
Adj-R ²	0,967	0,962	0,974
Pred-R ²	0,91	0,902	0,931
Adeq. Precision	37,38	33,21	41,57

Modelin deneysel sonuçlarla uyum derecesi, korelasyon katsayısı R ve çoklu regresyon katsayısı R²'nin değerine bakılarak kararlaştırılır [36]. R²'nin değeri 1'e ne kadar yakınsa, deneysel sonuçlar ile indirgenmiş model ifadenin elde edilmiş değerler arasındaki ilişki o ölçüde iyidir. Guan ve Yao [37] tarafından yapılan araştırmalar, iyi bir model uyumu için regresyon katsayısı R²'nin 0,8 olmasının genel olarak yeterli olduğunu göstermektedir. Matematiksel modele eklenen her bir bağımsız değişken, bağımlı değişkeni açıklama yeteneği olmasa bile R² değerinin büyümesine neden olmaktadır. Bu durum ise modelin açıklayıcılığının iyileştiği gibi yanlış bir sonuç doğurmaktadır. Bu nedenle modele katkısı olmayan değişkenleri dikkate almayarak daha gerçekçi bir R² değeri hesaplanmakta ve bu değer ayarlanmış/düzeltilmiş R² (Adj-R²) olarak ifade edilmektedir [38, 39]. Bu bilgiler doğrultusunda Tablo 3.3'de görüldüğü gibi sakkaroz dönüşüm oranı için önerilen model denklemin R²'si yaklaşık %98 gibi bir değerde olması, Adj-R²'nin ise yaklaşık %97 olması modelin deneysel verilerle uyumunu doğrulamaktadır. Hidroliz verimi için önerilen model denklemin R²'si ise yaklaşık %98, Adj-R²'nin ise %96 olması modelin uyumlu olduğunu göstermektedir. Son olarak, toplam indirgen şeker konsantrasyonu için önerilen model denklemin R²'sinin %98, Adj-R²'sinin ise %97 olması modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu doğrulamaktadır. Bu sonuçlar tasarımda elde edilen deneysel verilerle, program tarafından önerilen indirgenmiş kuadratik model denklemin sonuçları arasındaki uyumun yeterli olduğuna işaret etmektedir. 'Adequate Precision (Yeterli Kesinlik)', sinyal gürültü oranını ölçer. Bu ifadenin 4'ten büyük bir değerde elde edilmesi hedeflenir. Sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu için elde edilen değerler (37,38, 33,21 ve 41,57) yeterli bir sinyalin olduğunu göstermektedir.

Deneyler sonucunda elde edilen sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu için önerilen kuadratik formdaki model ifadelerin ANOVA test sonuçları Tablo 5'de görülmektedir. ANOVA test sonuçlarına göre *p*-değeri 0,05'ten küçük olan terimler sonuç değişkeni için önemli terimlerdir. Bu durumda, sakkaroz konsantrasyonu, enzim aktivitesi, ortam sıcaklığı ve reaksiyon süresi bağımsız değişkenlerinin hem lineer hem de üssel etkileri tüm sonuç değişkenleri için önemli etkiye sahiptir. Ayrıca, sakkaroz konsantrasyonu ile reaksiyon süresi ve karıştırma hızı arasındaki etkileşim ile invertaz enzim aktivitesi ile reaksiyon süresi arasındaki etkileşim, incelen tüm sonuç değişkenleri için önemli olarak görülmektedir. Bu bağımsız değişkenlerdeki değişim ile diğer bağımsız değişkenlerin de optimum değerini değiştirecektir. Her üç

cevap değişkeni için de 0,1'den büyük değerler, model terimlerinin önemli olmadığını göstermektedir. Sonuç değişkeni olarak toplam indirgen şeker konsantrasyonu incelenen model ifadenin ANOVA test sonucunda sakkaroz konsantrasyonu ile enzim aktivitesi ve reaksiyon ortam sıcaklığının etkisinin de önemli olduğu görülmektedir. Diğer parametreler ile karşılaştırıldığında karıştırma hızının, incelenen aralıkta ve erlen sisteminde sonuç değişkenleri üzerine etkisinin çok önemli olmadığı da görülmektedir.

Tablo 5. Sakkarozun enzimatik hidrolizi deneylerinde sakkaroz dönüşüm oranı, hidroliz verimi ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu için ANOVA test sonuçları.

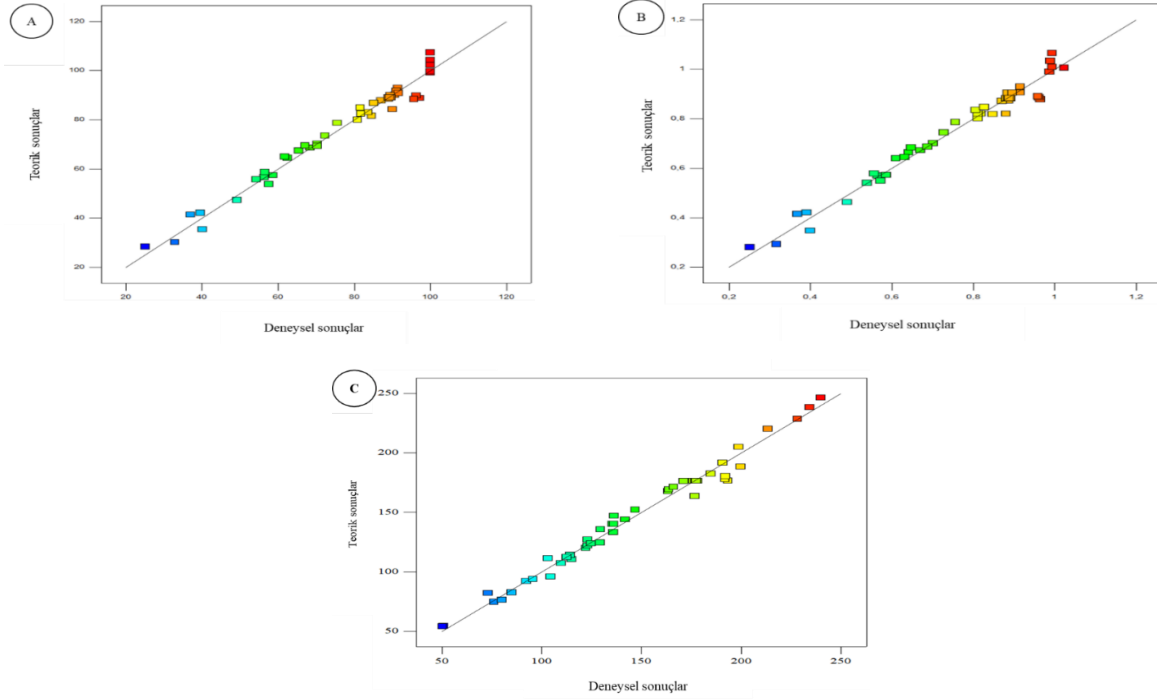
Kaynak	Sakkaroz dönüşümü		Hidroliz verimi		Toplam indirgen şeker miktarı	
	F-değeri	p-değeri	F-değeri	p-değeri	F-değeri	p-değeri
Model	89,63	<0,0001	70,73	<0,0001	103,36	< 0,0001
A-Sakkaroz konst., g/L	306,30	<0,0001	271,62	<0,0001	609,56	< 0,0001
B-Enzim aktivitesi, U/mL	327,09	<0,0001	280,44	<0,0001	301,75	< 0,0001
C-Sıcaklık, °C	60,37	<0,0001	53,77	<0,0001	60,29	< 0,0001
D-Süre, dk	524,92	<0,0001	484,39	<0,0001	542,31	< 0,0001
E-Karıştırma hızı, rpm	0,93	0,34	0,94	0,34	1,95	0,17
AB					19,30	0,0001
AC			0,26	0,62	4,41	0,044
AD	14,69	0,0005	14,92	0,0005	89,85	< 0,0001
AE	5,56	0,03	4,40	0,04	8,12	0,0077
BC	1,65	0,21	1,18	0,29	0,73	0,40
BD	5,10	0,03	4,67	0,04	3,55	0,070
BE	0,80	0,38	0,41	0,53	0,91	0,35
CD	1,87	0,18	1,17	0,29	1,27	0,27
CE			0,22	0,64		
A ²	19,95	< 0,0001	12,93	0,0011	93,28	< 0,0001
B ²	75,73	< 0,0001	65,77	< 0,0001	68,27	< 0,0001
C ²	11,61	0,0017	11,30	0,0021	11,83	0,0017
D ²	124,12	< 0,0001	104,14	< 0,0001	107,79	< 0,0001
E ²	1,61	0,21	2,79	0,11	2,41	0,13

MKD'ye göre yapılan deneysel çalışmanın yazılım yardımıyla yapılan istatistiksel analizi sonucu her bir cevap değişkeni için elde edilen matematiksel model ifade katsayıları Tablo 6'da kodlu değerler cinsinden verilmiştir.

Tablo 6. Her bir cevap değişkeni için elde edilen matematiksel model ifade katsayıları

Model terimleri	Sakkaroz dönüşüm oranı model katsayıları	Hidroliz verimi model katsayıları	Toplam indirgen şeker miktarı model katsayıları
	-208,40	-1,90	-430,93
* A	+0,03	-4,93 x10 ⁻⁴	+0,45
* B	+3,25	+0,03	+4,69
* C	+7,84	+0,07	+13,60
* D	+1,33	+0,01	+1,84
* E	+0,18	+1,64 x10 ⁻³	+0,46
*A*B	-	-	+6,76 x10 ⁻³
*A*C	+1,12 x10 ⁻³	+1,30 x10 ⁻⁵	+0,011
*A*D	-	+1,20 x10 ⁻⁵	+5,75 x10 ⁻³
*A*E	-6,71 x10 ⁻⁴	-6,31 x10 ⁻⁶	-1,68 x10 ⁻³
*B*C	-0,01	-1,28 x10 ⁻⁴	-0,02
*B*D	-3,05 x10 ⁻³	-3,09 x10 ⁻⁵	-5,28 x10 ⁻³
*B*E	+1,18 x10 ⁻³	+8,87 x10 ⁻⁶	+2,59 x10 ⁻³
*C*D	-6,01 x10 ⁻³	-5,02 x10 ⁻⁵	-0,01
*C*E	-	+2,11 x10 ⁻⁵	-
* A ²	-5,46 x10 ⁻⁴	-4,65 x10 ⁻⁶	-2,45 x10 ⁻³
* B ²	-0,02	-2,24 x10 ⁻⁴	-0,05
* C ²	-0,09	-9,79 x10 ⁻⁴	-0,20
* D ²	-4,51 x10 ⁻³	-4,37 x10 ⁻⁵	-8,69 x10 ⁻³
* E ²	-4,84 x10 ⁻⁴	-6,73 x10 ⁻⁶	-1,22 x10 ⁻³

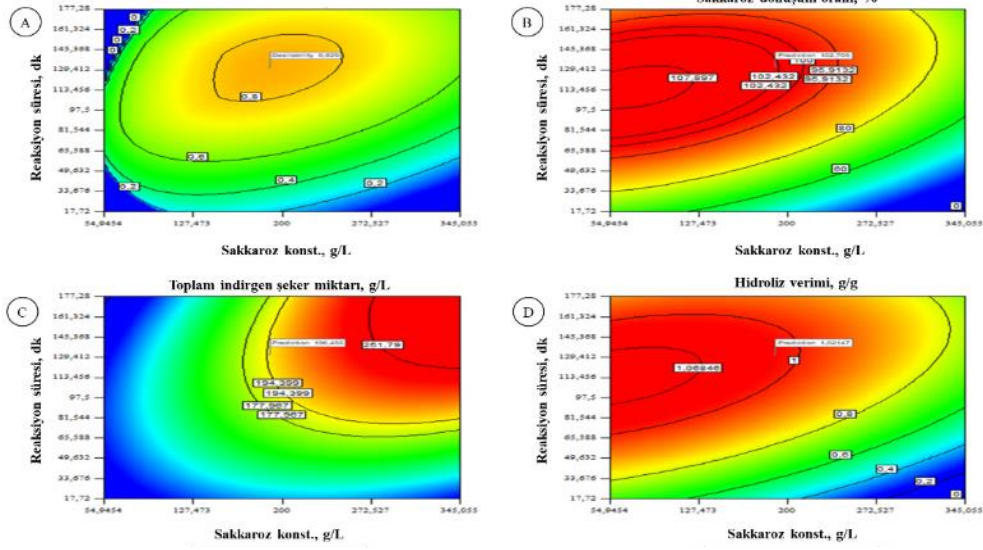
Önerilen model eşitliği kullanılarak hesaplanan teorik sonuçlara (istatistiksel olarak tahmin edilen değerler) karşı deneysel olarak belirlenen sonuçların dağılımı Şekil 1A-C'de verilmiştir. Şekil 1A-C'den de görüldüğü gibi teorik ve deneysel değerler lineer doğrunun etrafında dağılım göstermektedir. Bu dağılım, deneysel veriler ile modelden elde edilen verilerin uyumlu olduğunu göstermektedir. Şekil 1A-C'deki renkli kutuların her biri farklı şartlardaki deney sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 1. Sakkaroz dönüşüm oranı (A), hidroliz verimi (B) ve toplam indirgen şeker konsantrasyonu (C) değerlerine ait teorik sonuçlar ile deneysel olarak belirlenmiş sonuçlar arasındaki uyum grafikleri

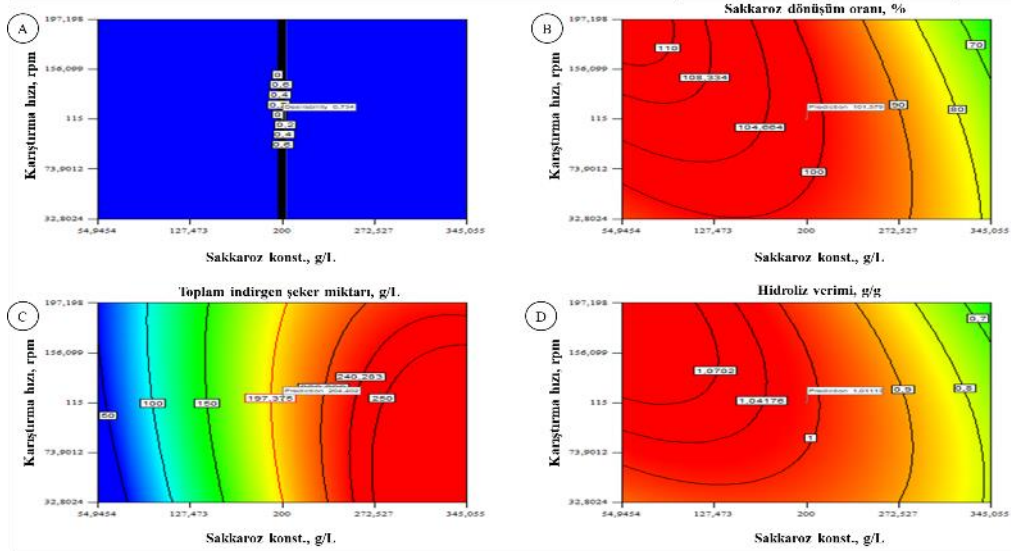
Yüzey tarama yöntemiyle az sayıda deneyde çok sayıda veri elde etmenin yanında bağımsız değişkenlerin cevap değişkenine eş zamanlı etkileri kontur veya 3D grafikler ile analiz edilebilmektedir. Sakkarozun invertaz enzimi yardımıyla invert şekerlere hidroliz edilmesini optimize etmeyi amaçlayan deneysel tasarımın grafikleri Şekil 2-4'de verilmiştir. Tablo 5'de verilen ANOVA test sonuçları incelendiğinde bağımsız değişkenlerin birbirleriyle birçok farklı varyasyonlarda etkileşime girdikleri görülmektedir. Bununla birlikte, her üç cevap değişkeni içinde *p*-değeri 0,05'den küçük olan farklı bağımsız değişkenlerin (AD, AE ve BD) birbirleriyle etkileşimleri kontur grafikler yardımıyla incelenmiştir. Verilen kontur grafiklerde incelenen iki bağımsız değişkenin cevap değişkenine eş zamanlı etkileri görülmektedir. Grafiklerin kırmızıdan maviye giden renk skalası azalan cevap değişken değerini temsil edilmektedir.

Şekil 2'de sakkaroz konsantrasyonu ve reaksiyon süresinin cevap değişkenlerine eş zamanlı etkileri görülmektedir. Artan sakkaroz konsantrasyonu ile dönüşüm oranında bir düşüş gözlenmiştir. Dönüşüm oranı ifadesinin hesaplanma şekline uygun olarak düşük sakkaroz konsantrasyonlarında (55-120 g/L) daha yüksek bir dönüşüm gözlenmektedir. İncelenen tüm sakkaroz konsantrasyonlarında artan süre ile bir artış gözlenmiş 2 saat sonraki süreçte dönüşüm oranında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Sonuç değişkeni olarak toplan indirgen şeker konsantrasyonunu esas alan model ifadeden elde edilen sonuç Şekil 2C'de görülmektedir. Sakkaroz dönüşüm oranının tam tersi ayna görüntüsü olarak elde edilen şekilde artan sakkaroz konsantrasyonu ile indirgen şeker miktarı artmaktadır. Reaksiyon süresi ve sakkaroz konsantrasyonunun üst noktasında (345 g/L sakkaroz, 177 dk) maksimum değere ulaşmaktadır. Optimum değerinin incelenen aralık dışında kaldığı grafikten görülmektedir. Dönüşüm oranının kısmen düşük kaldığı noktada indirgen şeker miktarının maksimum değere ulaştığı görülmektedir. İndirgen şeker miktarının başlangıçtaki sakkaroz oranıyla elde edilen verim ifadesinin sonuç değişkeni olarak seçildiği model için elde edilen Şekil 2D'de görülmektedir. Yan ürünlerin oluşumunun olmaması veya etkileyecek değerde olmaması dolayısıyla sakkaroz dönüşüm oranı ile benzer bir değişim gözlenmektedir.



Şekil 2. Sakkaroz konsantrasyonu ile reaksiyon süresinin takip edilen cevap değişkenlerine eş zamanlı etkisi

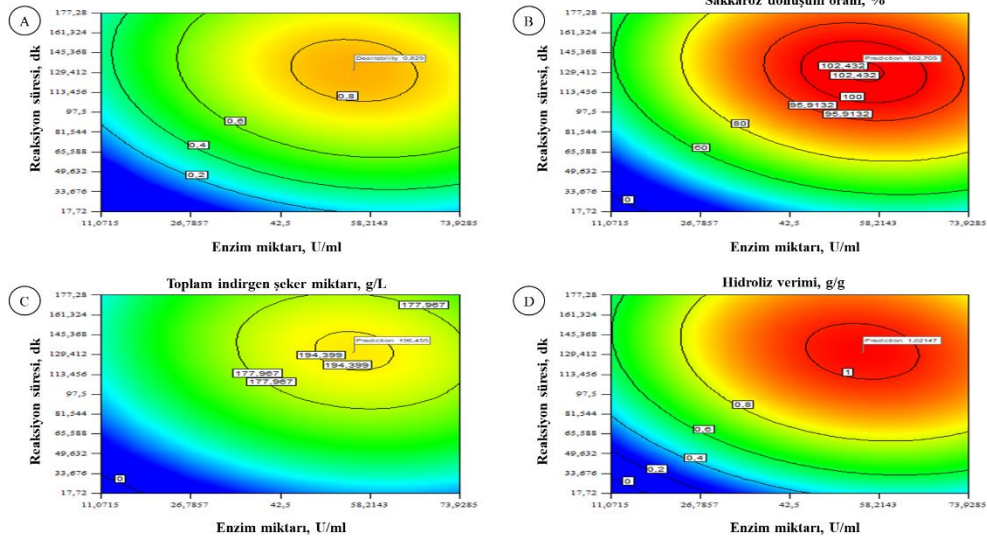
Şekil 3'de karıştırma hızı ile sakkaroz konsantrasyon değişiminin cevap değişkenlerine etkisini gösteren kontur grafikleri verilmiştir. Sakkaroz dönüşüm oranının takip edildiği model ifadeden elde edilen sonuçlar Şekil 3B'de verilmiştir. Şekil 3B'den görüldüğü üzere yüksek sakkaroz konsantrasyonunda karıştırma hızının dönüşüm oranına etkisi sınırlı kalmaktadır. Düşük sakkaroz konsantrasyonlarında artan karıştırma hızı dönüşüm oranını artırmaktadır. Toplam indirgen şeker miktarının takip edildiği sonuçlarda (Şekil 3D) ise dönüşüm oranında elde edilen değer aksine yüksek sakkaroz konsantrasyonlarında karıştırma hızının etkinliği daha önemlidir.



Şekil 3. Sakkaroz konsantrasyonu ile karıştırma hızının takip edilen cevap değişkenlerine eş zamanlı etkisi

Şekil 4 enzim miktarı ve reaksiyon süresinin cevap değişkenlerine eş zamanlı etkilerini göstermektedir. Çizilen kontur grafiklerde bulunmayan bağımsız değişkenler optimum noktada tutulmuştur. Diğer değişkenlerin optimum değerde olduğu noktada seçilen üç sonuç değişkeni için benzer bir değişim Şekil 4'den görülmektedir. 58 U/mL aktiviteye kadar enzim miktarındaki artış ile sonuç değişkenlerinde net bir artış gözlenmekle birlikte bu değerinin üzerinde azalma gözlenmektedir. Benzer şekilde 2 saat süreye kadar geçen reaksiyon sürecinde sonuç değişkenlerinde artış gözlenirken üzerindeki değerlerde azalma gözlenmektedir. En uygun hidroliz şartları 130 dk, 58 U/mL civarında olduğu görülmektedir.

Sakkarozun Enzimatik Olarak Hidrolizinin Optimizasyonu



Şekil 4. Enzim miktarı ile reaksiyon süresinin takip edilen cevap değişkenlerine eş zamanlı etkisi

Elde edilen matematiksel model ifadeler farklı şartlar ve sonuç değişkenleri için çözümlenebilir. Hidrolizatın eldesinde hem sakkarozun toplam dönüşümünü hem de elde edilen son ürünün maksimum olduğu şartlar seçilerek yapılacak optimizasyon daha ekonomik ve akılcı bir yoldur. Bu amaçla, elde edilen matematiksel model ifadeyi oluşturan bağımsız değişkenlerin incelenen aralıklar içerisinde ilk olarak sadece toplam indirgen şeker miktarını ve sakkaroz dönüşüm oranını maksimize eden rakamsal değerler program yardımıyla bulunmuştur. Tablo 7’de belirlenen en uygun ortam bileşen değerleri ve bu şartlar için Design Expert 8.0® programıyla hesaplanan toplam indirgen şeker miktarı ve sakkaroz dönüşüm oranı değerleri verilmiştir. Ayrıca maksimum hidroliz verimi ve sakkaroz dönüşüm oranı için önerilen şartlarda ulaşılan deneysel sonuçları da Tablo 7’de görülmektedir.

Tablo 7. Cevap değişkenlerinin maksimum olduğu şartlar için indirgenmiş modelin önerdiği ve deneysel olarak bulunan değerler

Cevap değişkeni	Sakkaroz konst., g/L	Enzim aktivitesi, U/mL	Sıcaklık, °C	Süre, dk	Karıştırma hızı, rpm	Modelin önerdiği sonuçlar	Deneysel sonuçlar
Toplam indirgen şeker miktarının maksimum olduğu durum	Sakkaroz dönüşüm oranı, %					72,09	69,27
	Toplam indirgen şeker miktarı, g/L	345,055	61,18	36,25	177,28	32,81	303,22
	Hidroliz verimi, g/g					0,74	0,69
Sakkaroz dönüşüm oranının maksimum olduğu durum	Sakkaroz dönüşüm oranı, %					105,21	100,00
	Toplam indirgen şeker miktarı, g/L	114,03	59,15	26,6	122,41	160,1	120,87
	Hidroliz verimi, g/g					1,04	0,99
Sakkaroz dönüşüm oranı ve hidroliz veriminin maksimum olduğu durum	Sakkaroz dönüşüm oranı, %					102,69	98,5
	Toplam indirgen şeker miktarı, g/L	190,6	55,36	33,46	131,1	120,86	196,50
	Hidroliz verimi, g/g					1,02	0,97

Tablo 7’den de görüldüğü gibi sadece toplam indirgen şeker miktarının maksimum olduğu durumda sakkaroz dönüşüm oranı için %96,08, toplam indirgen şeker konsantrasyonu için %80 ve hidroliz verimi için %93,24 olacak şekilde model ve deneysel değerlerin uyumlu olduğu, sadece sakkaroz dönüşüm oranının maksimum olduğu durumda sakkaroz dönüşüm oranı için %95,1, toplam indirgen şeker konsantrasyonu için %93,66 ve hidroliz verimi için %95,20 olacak şekilde model ve deneysel değerlerin uyumlu olduğu belirlenmiştir. Son olarak, sakkaroz dönüşüm oranı ve hidroliz veriminin maksimum olduğu durumda sakkaroz dönüşüm oranı için %95,92,

toplam indirgen şeker konsantrasyonu için %96,26 ve hidroliz verimi için %95,10 olacak şekilde model ve deneysel değerlerin uyumlu olduğu da Tablo 7’de görülmektedir. Elde edilen model ifadelerin farklı sonuç değişkenleriyle çözümü sonucunda optimum şartların değiştiği görülmüştür. Belirlenen optimum noktalarda yapılan doğrulama deneyleri ile seçilen her bir cevap değişkeni için model ifadelerin sonuçlarının oldukça yüksek bir uyum gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, çalışmada elde edilen hidroliz işleminde en önemli reaksiyon parametreleri olan sıcaklık ve pH değerleri, farklı bir çalışmada elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında sonuçların uyum içerisinde olduğu da görülmektedir [2].

Literatürde direkt sakkaroz kullanılarak ticari olarak temin edilen invertaz enzimi yardımıyla hidroliz şartlarının optimizasyonunun yapıldığı bir çalışma bilgimize göre literatürde bulunmamaktadır. Bununla birlikte, mikroorganizma kaynaklı invertaz enzimiyle sakkarozun hidrolizinin gerçekleştirildiği bazı çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde Batista vd. [40] izole etikleri *Aspergillus carbonarius* PC-4 suşu ile ananasın atık yapraklarından (taç kısımları) invertaz enzim üretimini optimize etmeyi ve üretilen enzim yardımıyla sakkarozu hidroliz ederek invert şekerleri üretmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, kültür ortamı besin bileşenlerinin optimizasyonunda simpleks kafes tasarımı, fizikokimyasal parametrelerin optimizasyonunda ise tek faktörlü deneysel tasarım yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, optimize edilmiş koşullarda enzim üretimi 72 saat sonra maksimum 9,4 U/mL enzim aktivitesi ile $R^2=0,9185$, $R^2_{adj}=0,8506$, yüksek F-değeri (13,52) ve düşük p-değeri (0,003) ananas taç atığı ve maya ekstraktı içeren kültürlerden elde edilmiştir. Üretilen enzimin fizikokimyasal koşullarının optimizasyonu sonucunda sıcaklık 20 °C, pH 5,5, karıştırma hızı 180 rpm ve süre 72 saat olarak belirlenmiştir [40]. Başka bir çalışmada melas içeriğindeki sakkarozun enzimatik hidroliz ile invert şekerlere dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Yapılan MKD tasarım deneyleri sonucunda deneysel çalışma şartları melas konsantrasyonu 87,7 g/L, enzim konsantrasyonu %0,45 (v/v) ve hidroliz süresi 15,93 saat olarak belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon işlemi sonucunda indirgen şeker konsantrasyonu 43,936 g/L ve sakkaroz konsantrasyonu 1,879 g/L olup melastaki sakkaroz ağırlıkça yaklaşık %96’lık bir verim değeri ile fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmüştür [41]. Sonuç olarak, literatürde invertaz enzimiyle sakkarozun hidroliz edilmesine yönelik farklı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada, literatürde ifade edilen çalışmalardan farklı olarak sakkaroz hidrolizatının hazırlanması için hidroliz şartlarıyla farklı cevap değişkenleri arasında enzim aktivitesini de içeren matematiksel model bir denklem ortaya konulmuştur.

4. Sonuçlar

Gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve katma değeri yüksek endüstriyel ürünlerin üretiminde hammadde olarak kullanılabilen glukoz ve fruktoz, kısmen kolay temin edilebilen bir şeker olan sakkarozun hidroliziyle elde edilebilmektedir. Sakkarozun enzimatik hidrolizi, eşmolar glukoz ve fruktozun (invert şekerler) bir karışımını üretir. Sakkarozun hidroliziyle elde edilen fruktozun tatlandırma gücü sakkarozdan daha yüksek olmasından dolayı gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak daha yaygın kullanılmaktadır. Hidrolizatta bulunan fruktoz, sakkarozdan daha tatlı olmasından dolayı daha yüksek bir ticari değere sahiptir. Sakkarozun kısmi veya tam hidroliz ürünleri, yüksek higroskopisite ve kristalleşmeye karşı dirençleri nedeniyle yiyecek ve içecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, sakkarozun hidroliziyle elde edilen glukoz ve fruktozun katma değeri yüksek kimyasalların üretiminde yaygın bir şekilde kullanıldıkları da bilinmektedir. Bu çalışmada yiyecek ve içecek endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan indirgen şekerlerin deneysel tasarım yöntemiyle invertaz enzimi yardımıyla hidroliz reaksiyon şartları optimize edilmiştir. Enzimatik hidroliz için seçilen invertaz enziminin aktivitesi belirlenerek farklı aktivitede bulunacak enzimlerin hidroliz işleminde kullanımı için model ifadeler oluşturulmuştur. Enzim aktivite deneylerinden ve literatürde elde edilen verilere uygun tasarım oluşturulmuş ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hem verimin hem de indirgen şekerin maksimum olması amacıyla yapılan optimizasyon işlemleri sonucunda sakkaroz konsantrasyonu 190,16 g/L, enzim aktivitesi (U/mL) 55,36, sıcaklık 33,46 °C, reaksiyon süresi 131,10 dk ve karıştırma hızının 120,86 rpm olarak bulunmuştur. Optimizasyon işlemi sonucundaki şartlarda elde edilen sakkaroz dönüşüm oranı %96 ve hidrolizi verimi %95 gibi yüksek oranda olması modelin önerdiği sonuçlarla deneysel sonuçların uyumlu olduğunu göstermiştir.

Böylece, deneysel çalışmalarda kullanılabilecek sakkaroz hidrolizatının hazırlanması için hidroliz şartlarıyla farklı cevap değişkenleri arasında matematiksel bir ilişki ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, indirgen şeker üretim proseslerinde invertaz enzimi yardımıyla sakkarozun hidrolizi için verimli çalışma koşulları belirlenmiştir.

Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmaya 122M865 proje numarası ile 1002-Hızlı Destek-A projesi kapsamında maddi desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ederler.

Kaynaklar

- [1] Rippe JM. Fructose, high fructose corn syrup, sucrose, and health: modern scientific understandings (pp. 3-12). New York: Springer, 2014.
- [2] Bolotova K. Sucrose and corn fiber hydrolysis using a succinic acid catalyst, 2005.
- [3] Yamabe S, Guan W, and Sakaki S. Three competitive transition states at the glycosidic bond of sucrose in its acid-catalyzed hydrolysis. *The Journal of Organic Chemistry*, 2013; 78(6), 2527-2533.
- [4] dos Santos RP, Martins J, Gadelha C, Cavada B, Albertini AV, Arruda F, ... and Freire V. Coal fly ash ceramics: preparation, characterization, and use in the hydrolysis of sucrose. *The Scientific World Journal*, 2014.
- [5] Akdağ B. Investigation of thermostable recombinant glucose isomerase production by sucrose utilizing *Escherichia coli*. Master's thesis, M. Sc. Thesis, Middle East Technical University, Turkey, 2013.
- [6] Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA). "Şeker ve Tatlandırıcılar Yıllığı Tabloları: Tablo 2 (22.95 ¢/lb)". <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables/> (Son erişim Tarihi: 15 Temmuz 2022).
- [7] Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA). "Şeker ve Tatlandırıcılar Yıllığı Tabloları: Tablo 8 (41.0 ¢/lb)". <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables/> (Son erişim Tarihi: 15 Temmuz 2022).
- [8] Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA). "Şeker ve Tatlandırıcılar Yıllığı Tabloları: Tablo 9 (HFCS-42: 35.92 ¢/lb; HFCS-55: 42.53 ¢/lb)". <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables/> (Son erişim Tarihi: 15 Temmuz 2022).
- [9] Howard JM. Catalytic conversion of sugar manufacturing by-products to 5-(chloromethyl) furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural, Doctoral dissertation, Queensland University of Technology, 2017.
- [10] Alves L, and Paixão SM. Fructophilic behaviour of *Gordonia alkanivorans* strain 1B during dibenzothiophene desulfurization process. *New biotechnology*, 2014; 31(1), 73-79.
- [11] Solís-Fuentes JA, Guzmán-Flores LF, and Durán-de-Bazúa MC. Kinetic behavior of invertase in the hydrolysis of sucrose in complex sugarcane juice. *International Sugar Journal* 2013; 115(1375), 488-494.
- [12] Shankar T, Thangamathi P, Rama R, and Sivakumar T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MK obtained from toddy sample. *J Bioprocessing and Chemical Engineering* 2014; 1(2), 1-6.
- [13] Essel KK, and Osei YD. Investigation of some kinetic properties of commercial invertase from yeast 2014.
- [14] Kulshrestha S, Tyagi P, Sindhi V, and Yadavilli KS. Invertase and its applications—a brief review. *Journal of Pharmacy Research* 2013; 7(9), 792-797.
- [15] Nadeem H, Rashid MH, Siddique MH, Azeem F, Muzammil S, Javed MR, ... and Riaz M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physicochemical properties. *Process Biochemistry* 2015; 50(8), 1202-1210.
- [16] İşgören A, and Sungur S. Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific* 2019; 3(1), 19-33.
- [17] Monsan P, and Combes D. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnology and bioengineering* 1984; 26(4), 347-351.
- [18] Asadi M. Beet-sugar handbook. John Wiley & Sons, 2006.
- [19] Yuçekan I, and Önal S. Physicochemical properties of invertase partitioned in an aqueous two-phase system of poly (ethylene glycol)/sodium sulfate, 2012.
- [20] Diamond G, Hagemeyer A, Murphy V, and Sokolovskii V. Catalytic conversion of biorenewable sugar feedstocks into market chemicals. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2018; 21(9), 616-630.
- [21] Eblagon KM, Pereira MFR, and Figueiredo JL. One-pot oxidation of cellobiose to gluconic acid. Unprecedented high selectivity on bifunctional gold catalysts over mesoporous carbon by integrated texture and surface chemistry optimization. *Applied Catalysis B: Environmental* 2016; 184, 381-396.
- [22] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, and Larroche C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology* 2006; 44(2).
- [23] Canete-Rodríguez AM, Santos-Duenas IM, Jimenez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, and Garcia-Garcia I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process biochemistry* 2016; 51(12), 1891-1903.

- [24] Vitolo M. Invertase. In S. Said and R.C.L.R. Pietro, (Eds.), *Enzymes as Biotechnological Agents* (pp. 207–221). Legis Summa, Ribeirao Preto. Sao Paulo, Brazil, 2004.
- [25] Kotwal SM, and Shankar V. Immobilized invertase. *Biotechnology advances* 2009; 27(4), 311-322.
- [26] de Souza Soares A, Augusto PED, Júnior BRDCL, Nogueira CA, Vieira ÉNR, de Barros FAR, ... and Ramos AM. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. *Lwt* 2019; 107, 164-170.
- [27] Guimarães LHS, Terenzi HF, de Moraes MDLT, and Jorge JA. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007; 42(1), 52-57.
- [28] Gómez-Brizuela L, Luis-Orozco J, Ramírez-Pérez HL, Yll-Lavín M, Díaz-Suarez S, Michelena-Álvarez G, and Dustet-Mendoza JC. Comparison of economic indicators of the sucrose acid inversion or by enzymatic hydrolysis. *Biocología Aplicada* 2017; 34(4), 4401-4404.
- [29] Rebroš M, Rosenberg M, Mlichová Z, and Křištofiková L. Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. *Food Chemistry* 2007; 102(3), 784-787.
- [30] Keramat A, Kargari A, Sohrabi M, and Mirshekar H. Experimental investigation and determination of an optimum condition for sucrose hydrolysis by invertase, 2014.
- [31] Gopalakrishnan D, Jain A. A statistical and downstream approach for the improvement of protease production from *Bacillus toyonensis* Vkb5 isolated from *Actinidia deliciosa*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2021.
- [32] Enzymatic Assay of INVERTASE (EC 3.2.1.26) https://www.creative-enzymes.com/resource/enzymatic-assay-protocols_17.html (Son erişim tarihi: 10 Nisan 2023).
- [33] Alegre ACP, Polizeli MDLTD, Terenzi, HF, Jorge JA, Guimarães LHS. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; 40, 612-622.
- [34] Osiebe O, Adewale IO, Omafuvbe BO. Production and characterization of intracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* (OL629078. 1), using cassava-soybean as a cost-effective substrate. *Scientific Reports* 2023; 13(1), 16295.
- [35] Addezio FD, Yoriyaz EJ, Cantarella M, and Vitolo M. Sucrose hydrolysis by invertase using a membrane reactor: effect of membrane cut-off on enzyme performance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 50(2), 257-259.
- [36] Dorleku WP, Bayitse R, Hansen ACH, Saalia FK, and Bjerre AB. Response surface optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peels without chemical and hydrothermal pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022; 1-14.
- [37] Guan X, and Yao H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food chemistry* 2008; 106(1), 345-351.
- [38] Hamza SM. Impact of credit risk management on banks performance: A case study in Pakistan banks. *European Journal of Business and Management* 2017; 9(1), 57-64.
- [39] Guillemette M, Finke MS, and Gilliam J. Risk tolerance questions to best determine client portfolio allocation preferences. *Journal of Financial Planning* 2012; 25(5), 36-44.
- [40] Batista RD, Melo FG, do Amaral Santos CCA, de Paula-Elias FC, Perna RF, Xavier MCA, ... de Almeida AF. Optimization of β -fructofuranosidase production from agrowaste by *Aspergillus carbonarius* and its application in the production of inverted sugar. *Food Technology and Biotechnology* 2021; 59(3), 306-313.
- [41] Doğan NK, Kalender M. Şeker Pancarı Melasından *Escherichia coli* KO11 Suşu ile Biyoetanol Üretimi: Enzimatik Hidroliz ve Kesikli Fermantasyon. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* 2023; 35(1), 15-23.