

**KALMAN FİLTRESİNİN ENZİMATİK REAKSİYONLARIN
MODELLENMESİNDE KULLANIMI**

**APPLICATION OF KALMAN FILTERING TO MODELLING OF
ENZYMATIC REACTIONS**

YALÇIN ÖKSÜZ

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Prof. Dr. Abdurrahman Tanyolaç

Üye (Danışman) :
Prof. Dr. Mehmet Mutlu

Üye :
Doç. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../2006

Prof.Dr. Ahmet R. ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

KALMAN FİLTRESİNİN ENZİMATİK REAKSİYONLARIN MODELLENMESİNDE KULLANIMI

Yalçın Öksüz

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Michaelis-Menten denkleminin model alındığı enzimatik reaksiyonlara uygulanabilecek genişletilmiş Kalman filtresinin tasarlanması ve tasarlanan filtrenin özelliklerinin benzetim çalışmaları ile belirlenmesidir. Tezin son aşamasında tasarlanan genişletilmiş Kalman filtresi (GKF) glukoz oksidaz enzimine ait kinetik verilere uygulanmış ve parametre kestirimleri (maksimum reaksiyon hızı (V_{max}), Michaelis-Menten sabiti (K_m)) yapılmıştır. Yapılan parametre kestirimleri kullanılarak, glukoz oksidaz enziminin zamanla parçalanmasına dayanan bir model önerilmiş, modelin geçerliliği deneysel verilerle doğrulanmıştır.

Kalman filtresi doğrusal durum-uzay modeline dayanan sistemler için, durum değişkenlerinin ölçüm ve model denklemleri kullanılarak kestirildiği bir algoritmadır. Kalman filtresi ölçüm gürültüsü ve sistem gürültüsünün normal dağılım gösterdiği durumda kuramsal olarak en iyi kestirim sonuçlarını vermektedir. Hatanın normal dağılım göstermediği durumda da doğrusal kestiriciler arasında en iyi kestirimi Kalman filtresi vermektedir. Kuramsal olarak üstün özelliklere sahip olmasının yanında Kalman filtresi havacılık, yön güdüm ve elektronik gibi birçok alanda pratik olarak uygulanmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji ve reaksiyon kinetiği çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Çalışmada model denklem olarak alınan Michaelis-Menten denklemi enzimatik reaksiyonların kinetiğini açıklamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Michaelis-Menten denklemi basit enzim kinetiğini açıklamak üzere türetilmiş olmasına rağmen ürün ya da substrat inhibisyonun gerçekleştiği durumlarda denkleme ek kinetik sabitlerin eklenmesi ile modifiye edilerek kullanılmaktadır. Bu çalışmada önerilen modelde ise denkleme ek parametrelerle modifiye etmek yerine V_{max} 'ın zamanla değiştiği varsayımı kabul edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle V_{max} ve K_m 'nin ayrı ayrı ve eş zamanlı kestirimi için 3 farklı filtre tasarlanmıştır. Yapılan benzetim çalışmalarında GKF'nin parametreleri ayrı ayrı olarak gerçek değerlerine yakın kestirebildiği ve parametrelerde zamana bağlı görülebilecek üssel değişimleri de takip edebildiği gösterilmiştir. Her iki parametrenin eş-zamanlı kestiriminde ise filtrenin gerçek değerleri kestiremediği, yapılan başlangıç tahminine göre deneysel veriye uyan parametre çiftini kestirebildiği gösterilmiştir. Bunun yanında filtrenin başlangıç tahmininden bağımsız olarak V_{max}/K_m oranını doğru kestirebildiği gösterilmiştir. Filtrenin eşzamanlı parametre kestirimi için sistem gürültü matrisinin filtre denklemlerinde sabit alınması yerine zamanla değişen bir fonksiyon olarak kullanıldığı ve ölçüm modelinde 1 yerine 2 farklı substrat derişim profillerinin kullanıldığı 2 yöntem önerilmiş ve bu yöntemlerle tasarlanan filtrelerin parametreleri eş zamanlı olarak kestirebildiği benzetim çalışmalarında gösterilmiştir.

Deneysel çalışma kısmında glukoz oksidaz enziminin glukozu glukonik aside parçaladığı reaksiyon pH-stat cihazı ile takip edilmiş ve enzime ait Michaelis-Menten parametreleri kestirilmiştir. Kestirilen parametrelerin kullanılarak hesaplandığı kuramsal substrat derişim profilleri deneysel profillerle karşılaştırılmış ve modelin geçerli olduğu gösterilmiştir. GKF ile yapılan parametre kestirimlerine dayanarak glukoz oksidaz enziminin reaksiyon süresince parçalandığı ve bu parçalanmanın 1. derece kinetik davranış gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Genişletilmiş Kalman filtresi, parametre kestirimi, Michaelis-Menten denklemi, glukoz oksidaz.

Danışman: Prof.Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

APPLICATION OF KALMAN FILTERING TO MODELLING OF ENZYMATIC REACTIONS

Yalçın Öksüz

ABSTRACT

This study's aim is firstly to design an extended Kalman filter for application of enzymatic reactions based on Michaelis-Menten kinetics and determine the properties of the designed filter. In the last part of the study, Extended Kalman Filter is applied to kinetic data obtained from enzymatic reaction of glucose oxidase and parameters of Michaelis-Menten equation (maximum reaction rate (V_{max}), Michaelis-Menten constant (K_m)) are estimated. Based upon the parameters estimated by Extended Kalman Filter, a model in which glucose oxidase is decomposed simultaneously is proposed and validity of the model is confirmed with experimental data.

Kalman filter is an algorithm, which estimates state variables of a state-space model by utilizing measurements and model equations. Kalman Filter gives the best estimates when the measurement noise and system noise is normally distributed with zero mean. Kalman Filter is practically applied to aerospace, navigation and electronics. Recently it has been applied to biotechnological applications and reaction kinetics.

Michaelis-Menten equation, taken as model equation in this study, is derived with assumption of irreversible reactions with no inhibition. In case of substrate or product inhibition, the equation is modified with additional parameters. In this study model is not modified in case of inhibition, instead the parameters V_{max} and K_m are drifted during the process. In this study, firstly, 3 separate filters are designed for estimation of Michaelis-Menten parameters individually and simultaneously. The results of simulations have shown that Extended Kalman Filter can estimate true values of the parameters individually however correct values can not be estimated in case of simultaneous estimation of both parameters. Estimated parameters give good fit to substrate concentration profiles changing according to initial guesses in the initialization of Extended Kalman Filter. It is founded that independent of initial guess, Extended Kalman Filter can estimate correctly the ratio of V_{max}/K_m . In order to improve estimation of simultaneous parameters; the error covariance matrix is given as a function of time. Another method to improve estimation is to use two different substrate concentration profiles in the measurement model. It has been shown in simulation studies that if these two methods is used, Extended Kalman Filter can estimate the correct values of the parameters.

In the experimental study, the reaction of glucose decomposition to gluconic acid is traced with a pH-stat device and Michaelis-Menten parameters are estimated. Theoretical substrate concentrations calculated by using estimated parameters in Michaelis-Menten equation is found to be in accordance with experimentally obtained substrate concentration profiles. These results have shown that model used in this study is valid. Based upon estimated parameters by Extended Kalman Filtering, it is found that glucose oxidase is decomposed and decomposition process has shown first degree kinetic behaviour.

Keywords: Extended Kalman Filter, parameter estimation, Michaelis-Menten equation, glucose oxidase

Advisor: Prof.Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe University, Engineering Faculty, Dept of Food Engineering

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında, ilgi, destek ve bilgisini esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu' ya,

Bilgisini ve desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya,

Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Hacı Ali Güleç, Araş. Gör. Deniz Baş, Araş. Gör. Ufuk Bağcı, Araş. Gör. Ceyda Dudak'a,

Çalışmam süresince gösterdikleri sabır ve destekleri için Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma Grubu'ndaki arkadaşlarım; Gıda Müh. Pelin Atillasoy, Gıda Müh. Ebru Akdoğan, Biyolog Başak Beyhan, Gıda Müh. Kıvanç Kılıç'a,

Tez çalışmam boyunca, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım, Gıda Müh. Esen Eyiler, Ali Sağırlıbaş ve Mustafa Kırmızı'ya,

Destekleri ile her zaman yanımda olan amcam Bayram Öksüz ve yengem Filiz Öksüz'e,

Hayatımın her döneminde gösterdikleri sevgi ve destek ile yanımda olan sevgili aileme,

içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. Michaelis-Menten Denklemi.....	2
2.1.2 Michaelis-Menten Denklemine Geçerlilik Şartları.....	4
2.1.2. Michaelis-Menten parametrelerinin deneysel veriler kullanılarak kestirimi	6
2.2 Kalman Filtresi.....	8
2.2.1. Genişletilmiş Kalman filtresi.....	14
2.4.2 Kalman filtresinin Biyoteknolojik Uygulamaları.....	16
2.3 Glukoz Oksidaz.....	17
3. BENZETİM VE DENEYSEL ÇALIŞMA.....	19
3.1 Benzetim Çalışması.....	19
3.1.1. Substrat derişimi ve Vmax kestirimi için kullanılan Kalman filtresinin oluşturulması.....	19
3.1.2. Substrat derişimi ve Km kestirimi için Kalman filtresinin oluşturulması.....	29
3.1.3. Substrat derişimi, Vmax ve Km kestirimi için kullanılan GKF'nin oluşturulması	34
4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	53
5.SONUÇLAR.....	60
6.KAYNAKLAR.....	62

7. EKLER DİZİNİ.....	66
1.GKF {S, Vmax}.....	69
2.GKF {S, Km}.....	71
3.GKF {S, Vmax, Km}.....	73
4.GKF {SA, SB, Vmax, Km}.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kalman filtresinin şematik gösterimi (Grewal ve Andrews, 2001).....	12
Şekil 3.1: GKF {S,Vmax} ile kestirilen substrat derişim profili. Ölçüm gürültüsüne ait standart sapma 0.1'e eşittir (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; – : hatasız veri).....	24
Şekil 3.2 Farklı Q2,2 değerleri için Vmax kestirimleri. (+ : Q2,2 =10-7 ; • : Q2,2 =10-6 ; -- : Q2,2 =5.10-6 ; — : Q2,2 =0.0008 e-0.1t).....	25
Şekil 3.3: Filtre denklemlerinde farklı Km değerleri kullanıldığında Kalman filtresi {S, Vmax} ile yapılan Vmax kestirimleri. (x: Km=5; *: Km=7.5; •: Km=10; +: Km=12.5; -: Km=15).....	27
Şekil 3.4: Filtre denklemlerinde kullanılan farklı Km değerleri için Vmax kestirimlerinin eğimi.....	28
Şekil 3.5: Enzim parçalanmasının gerçekleştiği reaksiyon için GKF {S, Vmax} ile yapılan Vmax kestirimi. (•: Üssel olarak azalan gerçek Vmax değeri, $V_{max}(t) = 0.1 \cdot \exp(-0.1t)$; -: GKF ile kestirilen Vmax).....	29
Şekil 3.6: Michaelis-Menten kinetiğine göre oluşan substrat derişim profilleri (-: Sabit enzim derişimi ; --- Enzim miktarının üssel olarak azaldığı durum).....	29
Şekil 3.7 : GKF {S, Km } ile yapılan Km kestirimi.....	32
Şekil 3.8: Substrat inhibisyonun gerçekleştiği durumda GKF ile yapılan substrat derişim kestirimi. (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; – : hatasız veri)	34
Şekil 3.9: Substrat inhibisyonu olduğu durumda GKF ile yapılan Km kestirimi. (--: KI = 0.05 değeri kullanılarak hesaplanan Kgör ; -: Kalman filtresi kullanılarak kestirilen Km)	34
Şekil 3.10: GKF {S,Vmax,Km} ile yapılan substrat derişim kestirimi. (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; – : hatasız veri)	36
Şekil 3.11: GKF {S, Vmax, Km} ile yapılan Vmax kestirimi. Vmax'ın gerçek değeri 0.1'dir.....	37
Şekil 3.12: GKF {S, Vmax, Km} ile yapılan Km kestirimi. Km'nin gerçek değeri 10'a eşittir.....	37
Şekil 3.13: GKF ile yapılan Vmax-Km kestirimleri için yapılan Monte-Carlo benzetim çalışması sonuçları. Şekildeki her bir nokta farklı benzetim çalışması sonucu elde edilen Vmax -Km çiftini göstermektedir.	39
Şekil 3.14: Monte-Carlo benzetim çalışmasında elde edilen Vmax-Km kestirimlerinin oranı.....	40
Şekil 3.15: GKF ile kestirilen Vmax ve Km değerlerinin oranı. Gerçek oran değeri 0.01'dir.....	42

Şekil 3.16: Enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonun gerçekleştiği durumda GKF {S, Km, Vmax} ile yapılan Vmax ve Km kestirimlerinin oranı (--: gerçek Vmax(t)/Km, -: GKF ile yapılan Vmax ve Km kestirimlerinin oranı ($V_{max}(t)=0.1 \cdot \exp(-0.05 \cdot t)$)).	43
Şekil 3.17: Değişken sistem gürültü ilinti matrisi ile uygulanan GKF {S, Vmax, Km} ile yapılan Vmax kestirimi.	44
Şekil 3.18: Değişken sistem gürültü ilinti matrisi ile uygulanan GKF {S, Vmax, Km} ile yapılan Km kestirimi.	45
Şekil 3.19: GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Vmax kestirimi.	47
Şekil 3.20: GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Km kestirimi.	48
Şekil 3.21: Enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonunun gerçekleştiği reaksiyon için GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Vmax kestirimi. (•: Üssel olarak azalan gerçek Vmax değeri, $V_{max}(t)=0.1 \cdot \exp(-0.1t)$); -: GKF ile kestirilen Vmax).	50
Şekil 3.22: Farklı başlangıç glukoz derişimleri için glukonik asit derişim profilleri (+: $1.4479 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, x: $3.5255 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, -: $4.4465 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, •: $5.8886 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, --: $7.4402 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml).	51
Şekil 3.23: Farklı başlangıç glukoz derişimleri için reaksiyon başlangıcındaki glukonik asit derişim profilleri (+: $1.4479 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, x: $3.5255 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, -: $4.4465 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, •: $5.8886 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, --: $7.4402 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml).	52
Şekil 4.1: GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Vmax kestirimi.	55
Şekil 4.2: GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Km kestirimi.	55
Şekil 4.3: GKF {SA, SB, Vmax, Km} ile yapılan Vmax ve Km kestirimlerinin oranı.	56
Şekil 4.4: Deneyisel glukoz derişim profilleri ile GKF kullanılarak elde edilen kestirimler ile çizilen kuramsal eğrilerin karşılaştırılması. (—: deneyisel eğri; - -: Michaelis-Menten denkleminin sayısal olarak çözülmesi ile elde edilen eğri).	57
Şekil 4.5: GKF ile yapılan Vmax kestirimin 1. derece kinetik varsayımı yapılarak modellenmesi. (—: GKF kullanılarak elde edilen Vmax kestirimi; - -: Vmax'ın üssel olarak azaldığı varsayımına dayanan model denklemleri kullanılarak elde edilen eğri).	59
Şekil 4.6 : GKF ile kestirilen Km değeri ve t=0 için hesaplanan Vmax değeri ile hesaplanan kuramsal substrat derişim profilinin deneyisel substrat profili ile karşılaştırılması. (- -: Kuramsal hesaplanan ($V_{max}=1.048 \cdot 10^{-7}$ M/s, $K_m=1.1 \cdot 10^{-3}$ M), -: deneyisel veri).	60
Şekil 7.1: Michaelis-Menten denklemine göre hesaplanan reaksiyon hızının, Taylor serisi açılımı kullanılarak hesaplanan hızın karşılaştırılması. (-: Michaelis-Menten denklemi, - -: Taylor serisi açılımı).	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E	: Enzim derişimi, mM
S	: Substrat derişimi, mM
C	: Enzim-substrat kompleksi derişimi, mM
P	: Ürün derişimi, mM
$k_{1,-1,2}$	: Reaksiyon kinetik sabitleri
GYDV	: Geçici-yatışkın durum varsayımı
GKF	: Genişletilmiş Kalman filtresi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti, mM
V_{max}	: Maximum reaksiyon hızı, mM/s
t_c	: Hızlı geçiş zaman ölçeği, s
t_s	: Yavaş zaman ölçeği, s
$\bar{S}$	: Toplam substrat derişimi, mM
x_k	: k anındaki durum hal vektörü
A	: Durum geçiş matrisi
w_k	: k anındaki sistem modeline ait gürültü vektörü
v_k	: k anındaki ölçüm gürültü vektörü
Z_k	: k anındaki ölçüm vektörü
H_k	: Ölçüm matrisi
$E(\bullet)$	: Matematiksel beklenti operatörü
Q_k	: k anındaki sistem gürültüsü ilinti matrisi
R_k	: k anındaki ölçüm gürültüsü ilinti matrisi
P_{k+1}^-	: Ölçüm öncesi yapılan hata ilinti matrisi kestirimi
x_{k+1}^-	: Ölçüm öncesi yapılan sistem durum vektörü kestirimi

P_{k+1}^+	: Ölçüm sonrası yapılan hata ilinti matrisi kestirimi
x_{k+1}^+	: Ölçüm sonrası yapılan sistem durum vektörü kestirimi
I	: Birim matrisi,
K_k	: Kalman Kazanım matrisi
$a(x_n, t_n)$	: Doğrusal olmayan model denklemlerinden oluşan fonksiyon
Φ	: Doğrusallaştırılmış durum geçiş matrisi
Θ	: Parametre vektörü
$S(t_n)^-$	: Ölçüm öncesi substrat derişimi kestirimini,
$V_{\max}(t_n)^-$	: Ölçüm öncesi $V_{\max}$ kestirimini ifade eder.
$K_m(t_n)^-$	: Ölçüm öncesi Kalman filtresi ile yapılan K_m kestirimi
K_i	: İnhibisyon sabiti
$K_{\text{gör}}$	: Görünen Michaelis-Menten sabiti, mM
h	: Zaman aralığı, saniye
$kr_{1,2,3,4}$	: Düzeltme katsayıları
k_{in}	: Enzim inaktivasyonu sabiti, 1/s

1.GİRİŞ

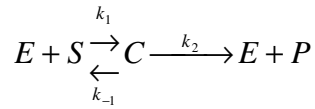
Kalman filtresi durum-uzay modelleri ile tanımlanan sistemlerde deneysel veriyi kullanarak durum değişkenlerinin kestirimini özyinemeli olarak yapan bir algoritmadır. Kalman Filtresi havacılık, yön güdüm, elektronik gibi çeşitli alanların dışında son yıllarda biyoteknoloji ve reaksiyon kinetiği gibi alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada Kalman filtresinin doğrusal olmayan sistemlere uygulanması olan GKF kullanılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğini model alan filtreler tasarlanmış ve filtrelerin parametre kestirim performansları benzetim çalışmaları ile incelenmiştir. Parametrelerin modelleme hatalarına bağlı olarak zamanla değiştiği durumda Kalman filtresinin parametreleri gerçek değerlerine yakın olarak kestirebildiği gösterilmiştir. Tasarlanan Kalman Filtreleri, model denkleminde yer alan durum değişkenleri ile adlandırılmıştır. Örneğin substrat derişiminin ve K_m 'nin kestirildiği filtre için "{S, K_m }" kullanılmıştır.

Deneysel çalışma kısmında glukoz oksidaz enziminin kinetiği incelenerek bu enzime ait Michaelis-Menten parametreleri GKF kullanılarak kestirilmiştir. Kestirilen parametre değerleri kullanılarak hesaplanan substrat derişim profilleri, deneysel olarak ölçülen substrat derişim profilleri ile karşılaştırılarak Kalman filtresinin kestirim performansı incelenmiştir. Kestirim sonuçları kullanılarak glukoz oksidaz enziminin reaksiyon boyunca parçalanmasına dayanan bir model önerilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Michaelis-Menten Denklemleri

Enzimatik reaksiyon için önerilen kinetik mekanizmalar genellikle ilk-hız verilerini açıklamak için oluşturulmuştur. Kinetik mekanizmalar çoğunlukla Brown (1902) tarafından önerilen, enzim ve substratın reaksiyon öncesindeki belirli bir zaman süresi içinde birleşmeleri gerekliliği ilkesine dayanır (Herbert,1979). Brown tarafından önerilen reaksiyon şeması aşağıdaki şekilde verilmektedir.



Brown tarafından önerilen model önce Henri (1902) ve daha sonra Michaelis ve Menten (1913) tarafından matematiksel ifadeye dönüştürülmüştür. Substratın tersinmez olarak ürüne dönüştüğü durumda sistemi açıklayan diferansiyel denklemler aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\frac{dS(t)}{dt} = -k_1 E(t) S(t) + k_{-1} C(t) \quad (2.1)$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = -k_1 E(t) S(t) + (k_{-1} + k_2) C(t) \quad (2.2)$$

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_1 E(t) S(t) - (k_{-1} + k_2) C(t) \quad (2.3)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = k_2 C(t) \quad (2.4)$$

Bu diferansiyel denklemlere ek olarak kütle denkliliği ile başlangıç enzim ve substrat derişimi için aşağıdaki denklemler elde edilir.

$$S(0) = S(t) + C(t) + P(t) \quad (2.5)$$

$$E(0) = E(t) + C(t) \quad (2.6)$$

Burada $S(t)$, $E(t)$, $C(t)$, $P(t)$, t sırasıyla substrat derişimi, enzim derişimi, enzim-substrat kompleksi derişimi, ürün derişimi ve zamanı, k_1 , k_{-1} , k_2 kinetik sabitleri göstermektedir. Doğrusal olmayan bu diferansiyel denklem sisteminin bazı özel durumlar (örn: $k_{-1}=0$; (Segel,1988)) dışında genel analitik çözümü yoktur.

Henri ve Michaelis-Menten tarafından önerilen model reaksiyona giren substrat ve enzim ile reaksiyon sırasında oluşan enzim-substrat kompleksi arasında hızlı denge oluşumuna dayanmaktadır. Reaksiyon başlangıcında oluşan bu dengeden sonra kompleks substrat ve ürüne göreli olarak yavaş hızda parçalanmaktadır. Önerilen bu modele göre k_2 kinetik sabitinin k_{-1} kinetik sabitine göre küçük olması gerekmektedir. Briggs ve Haldane (1925) tarafından önerilen geçici-yatışkın durum varsayımı (GYDV) modelin daha genel durumlar için de geçerli olduğu gösterilmiştir. Bu varsayıma göre kompleks derişiminin reaksiyonun başlangıcından hemen sonra dengeye geldiği ve reaksiyon süresince sabit kaldığı kabul edilmektedir. Önerilen 2 farklı reaksiyon mekanizması sonuç olarak aynı denklemi vermektedir.

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_1 E(t) S(t) - (k_{-1} + k_2) C(t) \cong 0 \quad (2.7)$$

Buradan $C(t)$ için aşağıdaki denklem elde edilebilir.

$$C(t) = \frac{k_1 (E_0 - C(t)) S(t)}{k_{-1} + k_2} = \frac{E_0 S}{(k_{-1} + k_2) / k_1 + S} \quad (2.8)$$

$C(t)$ 'ye ait bu ifade denklem 2.4 içinde kullanılırsa

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} S(t)}{K_m + S(t)} \quad (2.9)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad V_{\max} = k_2 E_0 \quad (2.10a,b)$$

Burada K_m Michaelis-Menten sabitini, $V_{\max}$ maksimum reaksiyon hızını gösterir. Substrat derişimi için yapılan kütle denkliğinden aşağıdaki ifade elde edilebilir.

$$\frac{dS(t)}{dt} + \frac{dP(t)}{dt} + \frac{dC(t)}{dt} = 0 \quad (2.11)$$

Kompleks derişimi GTDV 'ye göre sabit kabul edildiği için substrat derişimine ait hız ifadesi aşığıdaki gibi verilmektedir.

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{V_{\max}S(t)}{K_m + S(t)} \quad (2.12)$$

Denklem 2.12 Michaelis-Menten denklemi olarak adlandırılmaktadır. Michaelis-Menten sabiti farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin substrata karşı olan ilgilerinin karakterize edilmesinde kullanılmaktadır.

$$\frac{C(t)}{E_0} = \frac{S(t)}{K_m + S(t)} \quad (2.13)$$

Farklı kaynaklardan elde edilen enzimler sabit substrat derişiminde K_m değerlerine göre enzim-substrat kompleksi oluşturmaktadırlar. K_m değeri azaldıkça enzim-substrat kompleksi derişiminin, başlangıç enzim derişimine oranı artmaktadır. Bu da ortamda daha fazla oranda enzimin substratla reaksiyona girerek kompleks oluşturduğunu göstermektedir. K_m için yapılan bir diğer tanıma göre K_m değeri, maksimum reaksiyon hızının yarısına ulaşılabilmesi için gerekli substrat derişimidir.

2.1.2 Michaelis-Menten Denkleminin Geçerlilik Şartları

Michaelis-Menten denklemin türetilmesinde kullanılan GYDV'nin geçerli olabilmesi için Briggs ve Haldane başlangıç enzim derişiminin başlangıç substrat derişimine oranının düşük olması gerektiğini belirtmiştir.

$$\frac{E_0}{S_0} \ll 1 \quad (2.13)$$

Michaelis-Menten denklemine göre reaksiyon başlangıcında oluşan hız, reaksiyon sırasında görülebilecek en yüksek hızdır. Reaksiyon sırasında substratın harcanması ile reaksiyon hızı sürekli olarak düşmektedir. GYDV'nin geçerli olmadığı durumda ise reaksiyon başlangıcından kompleks

oluşumuna kadar geçen sürede ürün oluşumu yavaştır. Kompleks derişiminin dengeye gelmesi ile ürün oluşum hızı, substrat harcanma hızına eşitlenmekte ve reaksiyon hızlanmaktadır. Reaksiyon başlangıcında görülen bu bekleme fazı özellikle ilk-hız ölçümlerinde hatalı sonuç verebilmektedir. GYDV ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar GYDV'nın görelî olarak yüksek enzim derişimlerinde de geçerli olabileceğini göstermektedir (Segel,1988; Borghans ve ark., 1996). Segel tarafından önerilen varsayımda reaksiyon süreci iki farklı zaman ölçeğine ayrılmaktadır. Hızlı geçiş zaman ölçeği (t_c) reaksiyonun başlangıcından kompleks derişiminin dengeye geldiği ana kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Bu süreyi hesaplayabilmek için oluşan kompleks derişimi, denklem 2.1'e göre kompleks oluşumunda görülebilecek en yüksek hıza bölünmektedir.

$$t_c = \frac{(E_0 S_0 / (K_m + S_0))}{k_1 E_0 S_0} \quad (2.14)$$

$$t_c = \frac{1}{k_1 (S_0 + K_m)} \quad (2.15)$$

Yavaş zaman ölçeği (t_s) ise substrat derişimi referans alınarak hesaplanmakta ve toplam substrat derişiminin reaksiyon sırasında görülebilecek maksimum hıza bölünmesi ile bulunmaktadır.

$$t_s = \frac{S_0}{[dS(t)/dt]_{\max}} \quad (2.16)$$

$$t_s = \frac{K_m + S_0}{k_2 E_0} \quad (2.17)$$

Segel'e göre Michaelis-Menten denkleminin geçerli olabilmesi için t_c/t_s oranının 1'den küçük olması gerekmektedir.

$$\frac{k_2 E_0}{k_1 (K_m + S_0)^2} \ll 1 \quad (2.18)$$

Bu şarta ek olarak hızlı zaman ölçeği sırasında ürüne dönüşen substrat miktarının toplam substrat derişimine oranının da 1'den küçük olması gerekmektedir. Hızlı zaman ölçeğindeki harcanan substrat miktarı, t_c 'nin bu süre içinde görülebilecek maksimum hız ile çarpılarak bulunmaktadır.

$$\frac{E_0}{K_m + S_0} \ll 1 \quad (2.19)$$

Türetilen bu iki eşitsizlikten substrat derişimi değişimini referans alan eşitsizlik 2.19 değerini de kapsadığı için tek başına yeterli olmaktadır. Eşitsizlik 2.19'a göre Michaelis-Menten denklemi başlangıç enzim derişiminin K_m değerinden düşük olduğu durumda da geçerlidir. Borghans ve ark. (1996) tarafından önerilen değişken dönüştürme yöntemi ile Michaelis-Menten denkleminin geçerli olduğu parametre sınırları yüksek enzim derişimlerini kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Herhangi bir andaki toplam substrat derişimi aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$\overline{S(t)} = S(t) + C(t) \quad (2.20)$$

Toplam substrat derişimi üzerinden türetilen geçerlilik şartı ise aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$\frac{k_2 E_0}{k_1 (E_0 + S_0 + K_m)^2} \ll 1 \quad (2.21)$$

2.1.2. Michaelis-Menten parametrelerinin deneysel veriler kullanılarak kestirimi

Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler 2 grupta incelenebilmektedir. İlk grupta yaygın olarak kullanılan grafik yöntemleri, farklı başlangıç substrat derişimleri için ilk-hızların ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen veriler parametrelerin gruplanması ile doğrusallaştırılan Michaelis-Menten denklemine göre grafiğe geçirilmektedir. Yönteme göre değişmekle beraber çizilen grafiğin eğimi, x ve y eksenin kestiği noktalar bulunarak parametreler kestirilmektedir. Bu yöntemler için aşağıdaki örnekler verilmektedir.

- Lineweaver-Burk grafiği

- Eadie-Hofstee grafiği
- Hanes-Wolff grafiği
- Eisenthal-Cornish-Bowden grafiği

Parametre kestirimi kuramsal olarak 2 bilinmeyenli bir problemdir ve çözüm için 2 denklem gereklidir. Duggleby (1981) Michaelis-Menten parametrelerinin kestirimi için farklı substrat derişiminden elde edilen 2 ilk-hız değerinini yeterli olacağını ve yapılan diğer ölçümlerin sadece parametre kestirmelerinin güvenilirliğini artırmaya yönelik olduğunu belirtmiştir. İlk-hız deneylerinin önemli bir avantajı parametrelerin kestirilebilmesi için bir cetvel ve grafik kağıdının yeterli olmasıdır. Diğer grupta ise zamana karşı substrat derişiminin ölçülmesine dayalı yöntemler bulunmaktadır. Elde edilen veri, Michaelis-Menten denkleminin kapalı çözümü ya da sayısal olarak çözülmesine dayanan en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilerek parametrelerin kestirimi yapılmaktadır. Heineken (1967) parametrelerin doğru olarak kestirilebilmesi için substratın %97'e varan oranda ürüne dönüşmesi gerektiğini belirtmiştir. Yüksek oranda dönüşüm olduğunda reaksiyon tersinir özellik gösterebileceği için, reaksiyonun tersinmez olduğu kabulü ile yapılan modelde, modelleme hatalarına neden olmaktadır. Ayrıca başlangıç substrat derişimi ya da enzim derişiminde yapılabilecek bir hata elde edilen tüm veriyi sistematik olarak etkilemektedir. Bunların yanında zamana karşı substrat derişiminin ölçülmesi ile elde edilen kinetik verinin sahip olduğu avantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilmektedir (Duggleby, 2001);

- İlk hız ölçümüne dayanan deneylerde her bir veri noktası için ayrı reaksiyon çözeltisi hazırlanması gerekir, zamana karşı yapılan ölçümlerde ise tek bir reaksiyondan edilebilecek veri sayısı, az miktarda deneysel çalışma ile artırılabilir.
- Tüm veri noktaları için enzim, inhibitör, tampon derişimleri ve reaksiyona girmeyen diğer bileşenler aynıdır.
- Reaksiyon sırasında harcanan substrat ve oluşan ürün derişimleri kendiliğinden değişir.
- Oluşan ürün enantiyomerik olarak saf formda olduğü için, bu ürünlerin reaksiyon üzerindeki etkisi daha kolay çalışılabilir.

- İlk hız ölçümüne dayanan deneylerde substratın az bir kısmı harcandığı için ölçüm cihazının çok düşük derişim miktarlarına duyarlı olması gerekir. Zamana karşı yapılan ölçümlerde substratın tamamına yakın miktarı harcandığı için görelî olarak daha düşük ölçüm duyarlılıkları tolere edilebilir.

Deneyisel hataların olasılıksal dağılımının belirlenmesi deneyin aynı şartlar altında yüksek sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır. Burada tekrar edilecek deney sayısının 100'e kadar çıkması nedeniyle deneyisel hatanın olasılık dağılımını belirlemek gerekli zaman ve maliyet açısından çok güçtür. Nimmo ve Atkins (1981) deneylerin dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmeleri durumunda deneyisel hatanın normal dağılım göstermesinin kabul edilebileceğini bildirmektedir. Bu yazarların konuya yönelik inceledikleri farklı çalışmalarda heksokinaz (Siano ve ark., 1975) ve glutation S-transferaz A (Askelöf ve ark., 1976) enzimlerine ait deneyisel çalışmalarda normal dağılım görüldüğü, glukokinaz (Storer ve ark., 1975) ve asetilkolinesteraz (Nimmo ve Mabood, 1979) enzimlerinin de farklı olasılıksal dağılım gösterdikleri belirtilmiştir.

2.2 Kalman Filtresi

Kalman filtresi durum-uzay modeli ile tanımlanan doğrusal dinamik sistemlere ait durum değişkenlerinin, doğrusal ölçüm modelleriyle gözlemlenmesi ile, özyinemeli olarak, kestirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Chui ve Chen, 1987). Doğrusal durum uzay modeli ve ölçüm modeli genel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir (Lewis, 1986).

$$x_{k+1} = Ax_k + w_k \quad (\text{Durum-uzay modeli}) \quad (2.22)$$

$$z_k = H_k x_k + v_k \quad (\text{Ölçüm modeli}) \quad (2.23)$$

Burada:

x_k : k anındaki durum hal vektörünü,

x_{k+1} : $k+1$ anındaki durum hal vektörünü,

A: durum geçiş matrisini,

w_k : k anındaki sistem modeline ait gürültü vektörü,

v_k : k anındaki ölçüm gürültü vektörü,

Z_k : k anındaki ölçüm vektörünü,

H_k : ölçüm matrisini ifade eder.

Ölçüm gürültüsü ölçüm cihazına bağlı olarak deneysel veride oluşan hatayı tanımlamak için kullanılmaktadır. Süreç gürültüsü ise süreci tanımlayan modellemede yapılan ihmellere ve modelleme hatalarına bağlı olarak ortaya çıkan hatayı tanımlamak için kullanılmaktadır. Örneğin tez kapsamında yapılan deneysel çalışmada enzim hızı modellenirken kinetik sabitlerden oluşan K_m ve V_{max} değerinin sabit olduğu varsayımı yapılmıştır. Bu değerlerin pH ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Deneysel çalışmada kullanılan pH-stat cihazı ortam pH'sını 6.00'da sabit tutmak üzere ayarlanmıştır. Reaksiyon sırasında oluşan glukonik asit ile pH bu değerin altına düşmekte, pH'nın düşmesi ile reaksiyon çözeltisine baz çözeltisi pompalayarak pH'nın 6.00 değeri üstüne çıkması sağlanmaktadır. Bu sebepten dolayı reaksiyon sırasında pH'nın sabit olarak kabul edilmesine rağmen, deneysel çalışma sırasında bu nokta etrafında dalgalanmıştır. Benzer şekilde sıcaklık dalgalanmaları da aynı kapsamda değerlendirilebilir. Bu tür hatalar sistem gürültüsü olarak adlandırılmaktadır. Kalman filtresi için bir hata etkeninin sistem gürültüsü olarak değerlendirilebilmesi için hatanın ortalamasının 0 ya da 0'a yakın olması gerekir. Reaksiyon sırasında enzim parçalanmasına bağlı deaktivasyon ya da ürün inhibisyonu reaksiyon hızına sadece eksi yönde etki ettikleri için sistem gürültüsü olarak değerlendirilemezler.

Kalman filtresi denklemleri türetilirken, sistem ve ölçüm gürültüsünün normal olasılık dağılımı gösterdiği ve herhangi bir andaki gürültünün, farklı anlardaki gürültülerle ilintisiz olduğu varsayımı yapılır (Grewal ve Andrews, 2001). Bu varsayımlar aşağıda özetlenmiştir.

$$E(w_k) = 0, \quad E(v_k) = 0$$

$$E(w_k w_k') = \begin{cases} Q_k, & i = k \\ 0 & i \neq k \end{cases} \quad E(v_k v_k') = \begin{cases} R_k, & i = k \\ 0 & i \neq k \end{cases}$$

Burada:

$E(\cdot)$: matematiksel beklenti operatörünü,

Q_k : k anındaki sistem gürültüsü ilinti matrisini,

R_k : k anındaki ölçüm gürültüsü ilinti matrisini ifade eder.

Kalman filtresi durum değişkeni vektörü ile beraber hata ilinti matrisinin de kestirimini yapmaktadır.

Hata ilinti matrisi sistem durumunun gerçek değeri ile kestirim sonucu elde edilen değer farkı kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$P_x = E((x_{ger} - x_{kes})(x_{ger} - x_{kes})^T) \quad (2.24)$$

Burada:

P_x : hata ilinti matrisini

x_{ger} : sistem durum vektörünün gerçek değerini,

x_{kes} : filtre tarafından kestirilen sistem durum vektörünü ifade eder.

Sistem durum vektörünün gerçek değeri bilinmediği için hata ilinti matrisinin de gerçek değeri pratikte hesaplanamamaktadır.

Sisteme ait durum vektörüne ait bileşenlerin zaman içinde herhangi bir andaki değeri model denklemleri kullanılarak hesaplanabilmektedir. Örneğin enzimatik bir reaksiyonda substrat derişiminin değeri Michaelis-Menten denklemi kullanılarak hesaplanabilmektedir. Ayrıca durum vektörü, sistem modelinden bağımsız olarak, yapılan ölçümler ile deneysel olarak izlenebilmektedir. Kalman filtresi, sistem durumunu bu iki farklı kaynaktan gelen bilgiyi birbirleri arasında süreç gürültüsü ilinti matrisini ve ölçüm gürültüsü ilinti matrisini karşılaştırarak dengelemektedir. Her adımda hesaplanan Kalman kazanım matrisi bu dengelemeyi nicel olarak yapmaktadır. Örneğin Kalman kazanım sabitinin 0 olması durumunda filtre yapılan ölçümleri hesaplamada kullanamakta, sistem durumunu sadece model denklemi kullanarak kestirmektedir.

Filtre denklemleri kestirim ve ölçüm düzeltme olarak 2 grupta toplanabilir. Kestirme bölümünde sistemin ve hata ilinti matrisinin bir sonraki durumu model denklemi kullanılarak hesaplanır, hesaplanan bu değerler ölçümle güncellenerek, bir sonraki adım için sistem durum kestirimi yapılır. Filtrenin $t=0$ anında başlatılabilmesi için bu andaki sistem durumunun ve hata ilinti matrisinin ilk değerlerinin tahmin edilmesi gerekir.

Filtre denklemleri aşağıdaki gibi yazılabilir.

Kestirim:

$$P_{k+1}^- = A_k P_k^+ A_k^T + Q_k \quad (2.25)$$

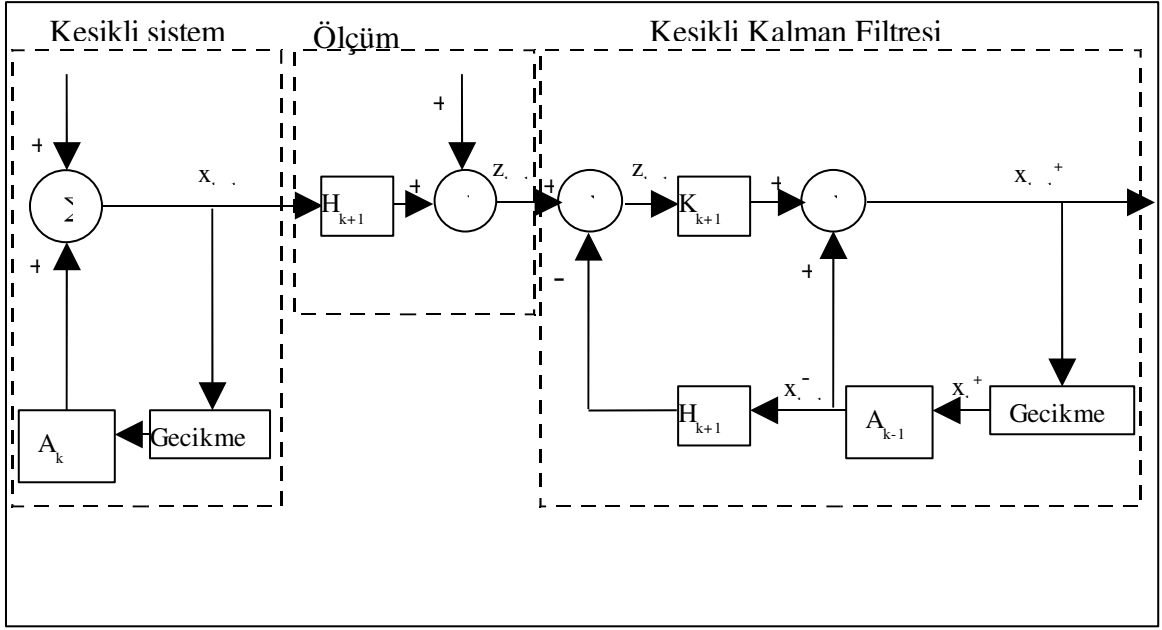
$$x_{k+1}^- = A_k x_k^+ \quad (2.26)$$

Ölçüm düzeltme:

$$K_{k+1} = P_{k+1}^- H_{k+1}^T (H_{k+1} P_{k+1}^- H_{k+1}^T + R_{k+1})^{-1} \quad (2.27)$$

$$P_{k+1}^+ = (I - K_{k+1} H_{k+1}) P_{k+1}^- \quad (2.28)$$

$$x_{k+1}^+ = x_{k+1}^- + K_{k+1} (z_{k+1} - H_{k+1} x_{k+1}^-) \quad (2.29)$$



Şekil 2.1 Kalman filtresinin şematik gösterimi (Grewal ve Andrews, 2001).

Burada:

P_{k+1}^- : ölçüm öncesi yapılan hata ilinti matrisi kestirimini,

x_{k+1}^- : ölçüm öncesi yapılan sistem durum vektörü kestirimini,

P_{k+1}^+ : ölçüm sonrası yapılan hata ilinti matrisi kestirimini,

x_{k+1}^+ : ölçüm sonrası yapılan sistem durum vektörü kestirimini,

I : birim matrisi,

K_k : Kalman kazanım matrisini ifade etmektedir.

Kalman filtresinin bilgisayar ortamında işletilmesi sırasında bilgisayarın sayıları sınırlı kesinlikle göstermesi sorun oluşturabilmektedir. Özdeş denklemlerin farklı gruplamalarla ifade edilmesi kuramsal olarak aynı sonucu vermesine rağmen bilgisayar ortamında farklı sonuçlar verebilmektedir (Grewal ve Andrews, 2001). Bu nedenle hata ilinti matrisinin güncellenmesinde eşitlik ile özdeş olan Joseph formu kullanılmıştır.

$$P_{k+1}^+ = (I - K_k H_k) P_{k+1}^- (I - K_k H_k)^T + K_k R_k K_k^T \quad (2.30)$$

Böylece hata ilinti matrisinin güncellenirken matris simetrisinin ve kesin artı olma özelliğinin korunması sağlanmıştır.

Kalman filtresinin sistem durumunu belirgin olarak yanlış olarak kestirememesi filtre ıraksaması olarak adlandırılmaktadır. Filtre ıraksaması modellemeye yapılan hatalar, bilgisayar tarafından yapılan sayı yuvarlamaları, Q , H , R matrislerinin hatalı olması, sistemin gözlemlenebilir olmaması ya da zayıf gözlemlenebilir olması gibi birçok nedene bağlı olabilmektedir (Lewis, 1986). Runge-Kutte yöntemi ile diferansiyel denklemlerin çözümünde ya da Taylor serisi açılımında, seçilen adım aralığının küçük olması bu yöntemlerin yaklaşık olmaları nedeniyle kaçınılmaz olarak ortaya çıkan kesme hatalarını azaltmaktadır. Bunun yanında adım aralığının çok küçük olması ardışık iki adımda hesaplanan değerlerin farkının küçük olmasına dolayısıyla yöntemin sayı yuvarlamalarına karşı hassas olmasına yol açmaktadır. Adım aralığının kırpma hatalarına neden olmaması sağlanarak mümkün olduğunca küçük olması gerekmektedir (Bard, 1972).

Kalman filtresinin uygulanabilmesi için başlangıç anındaki sistem durum vektörü ve hata ilinti matrisinin bilinmesi gerekmektedir. Genellikle bu değerlerin gerçek değerleri bilinmediği için kullanıcı tarafından tahmin edilmeleri gerekmektedir. Sistem durumuna ait yapılan tahminin doğruluğu ile orantılı olarak Hata ilinti matrisinin değerinin küçük olması gerekmektedir. Hata ilinti matrisinin gerçek değerine göre aşırı küçük veya büyük olması durumda filtre ıraksamaları görülebilmektedir. Bunun dışındaki durumlarda başlangıç anında filtre hızlı bir şekilde doğru değere ulaşılmakta ve sonrasında filtrenin ilerlemesi ilk tahminden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Kalman filtresinden verimli sonuçlar alabilmek için ölçüm gürültüsü ilinti matrisinin ve sistem gürültüsü ilinti matrisinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Ölçüm gürültüsü ilinti matrisinin belirlenmesinde ölçüm cihazının teknik özellikleri ve ölçüm sonuçları yardımcı olabilmektedir. Sistem gürültüsü ilinti matrisini belirlenmesi için uyarlanır filtre kullanımı gibi yöntemler bulunmakla beraber genellikle deneyime

bağlı olarak deneme-yanılma yöntemi kullanılmaktadır. Uyarlanır filtre Q matrisin filtreye sistem durum vektörünün bileşenleri olarak verilmesine ve Q matrisinin filtre ile kestirilmesine dayanmaktadır. Sistem gürültü ilinti matrisinin belirlenmesinde, ölçüm ilinti matrisi de kıstas olarak kullanılabilir.

2.2.1. Genişletilmiş Kalman filtresi

Genişletilmiş Kalman filtresinin (GKF) temel fikri Schmidt (1970;1976) tarafından önerilmiştir (Grewal ve Andrews, 2001). Sistem modelinin doğrusal olmadığına model denklemi aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x_{n+1} = a(x_n, t_n) + w_k \quad (2.31)$$

Burada :

$a(x_n, t_n)$: doğrusal olmayan model denklemlerinden oluşan fonksiyonu ifade etmektedir.

GKF'nde, durum geçiş matrisinin herhangi bir andaki değeri, Taylor serisi açılımı kullanılarak doğrusallaştırılmaktadır. Bu amaçla açılımdaki 2 ve daha büyük dereceli terimler ihmal edilmektedir.

$$\Phi_k = \left. \frac{\partial a(x, k-1)}{\partial x} \right|_{x=x^-(k-1)} \quad (2.32)$$

$$\Phi_k = \left[\begin{array}{cccc} \frac{\partial a_1}{\partial x_1} & \frac{\partial a_1}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial a_1}{\partial x_n} \\ \frac{\partial a_2}{\partial x_1} & \frac{\partial a_2}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial a_2}{\partial x_n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial a_n}{\partial x_1} & \frac{\partial a_n}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial a_n}{\partial x_n} \end{array} \right]_{x=x^-(k-1)} \quad (2.33)$$

Burada:

Φ = doğrusallaştırılmış durum geçiş matrisini ifade etmektedir.

GKF için kullanılan denklemler aşağıdaki gibi yazılabilmektedir.

Doğrusal olmayan sistem modeli

$$x_{k+1} = a_k(x_k) + w_k \quad (2.34)$$

Doğrusal olmayan ölçüm modeli

$$z_{k+1} = h_{k+1}(x_{k+1}) + v_k \quad (2.35)$$

Durum geçiş matrisinin ve ölçüm matrisinin güncelleştirilmesi

$$\Phi_k \approx \left. \frac{\partial a_k}{\partial x_k} \right|_{x=x^-(k)} \quad (2.36)$$

$$H_k \approx \left. \frac{\partial h_k}{\partial x_k} \right|_{x=x^-(k)} \quad (2.37)$$

Kestirim:

$$P_{k+1}^- = A_k P_k^+ A_k^T + Q_k \quad (2.38)$$

$$x_{k+1}^- = A_k x_k^+ \quad (2.39)$$

Ölçüm düzeltme:

$$K_{k+1} = P_{k+1}^- H_{k+1}^T (H_{k+1} P_{k+1}^- H_{k+1}^T + R_{k+1})^{-1} \quad (2.40)$$

$$P_{k+1}^+ = (I - K_{k+1}H_{k+1})P_{k+1}^- \quad (2.41)$$

$$x_{k+1}^+ = x_{k+1}^- + K_{k+1}(z_{k+1} - H_{k+1}x_{k+1}^-) \quad (2.42)$$

Kalman filtresi kullanılarak sistem durumunun kestirimi yapılabileceği gibi, model denklemde kullanılan parametrelerin kestirimi de yapılabilmektedir. Kestirimi yapılacak parametreler sistem durum vektörüne eklenmektedir. Durum geçiş matrisine her bir parametre için aşağıdaki denklem eklenerek genişletilmektedir.

$$\theta_{i+1} = \theta_i \quad i = 1, \dots, n$$

Burada θ , parametre vektörünü ifade etmektedir.

Kalman filtresi kullanılarak parametre kestirimi yapıldığında doğrusal sistemler, doğrusal olmayan sistemlere dönüştüğü için GKF'nin kullanılması gerekmektedir. GKF'nin uygulanmasında görülen önemli bir fark ise ölçüm öncesi hata ilinti matrisin, Kalman kazanç matrisi ve durum geçiş matrisinin, her bir kestirim noktasında doğrusallaştırma ile bulunduğu için önceden hesaplanamamasıdır. Doğrusal Kalman filtresinde bu matrislerin filtre başlatılmadan önce tüm süreç için hesaplanması mümkün olmakta bu da gerçek zamanlı filtrelemelerde avantaj sağlamaktadır.

GKF kullanılırken, sistem modelinin belirlenen adım aralıkları arasında doğrusallaştırmaya uygun olması diğer bir deyişle doğrusallaştırma ile oluşan hatanın ihmal edilebilir olması gerekmektedir. Michaelis-Menten denkleminin Taylor serisi açılımı kullanılarak doğrusallaştırılması sonucu oluşan hata EK-1'de incelenmiştir.

2.4.2 Kalman filtresinin Biyoteknolojik Uygulamaları

Kalman filtresinin yaygın olarak kullanıldığı havacılık uygulamaları, yön güdüm gibi alanlar dışında; trafikte araç yoğunluğu kestirimi, robot tasarımları gibi farklı çalışmalarda da kullanılmaktadır. Kalman filtresinin kinetik reaksiyon sabitlerinin kestiriminde kullanımı ile ilgili literatürde çalışmalar

bulunmaktadır. Rutan ve Brown (1985) Kalman filtresini, p-nitrofenol fosfatın p-nitrofenole hidrolize olduğu enzimatik reaksiyonu takip etmekte kullanmışlardır. GKF, zamana karşı farklı dalga boylarında yapılan spektrofotometrik ölçümlerin değerlendirilmesinde kullanılmış ve reaksiyona ait kinetik sabitler kestirilmiştir. Mok ve Chau (1996) Kalman filtresini 1.dereceden ardışık reaksiyonlara ait kinetik sabitlerin kestiriminde kullanmıştır. Spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen verilerle 1. ve 0. dereceden reaksiyonların kinetiğinin incelendiği benzer çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Rutan ve Brown, 1984; Jimenez-Prieto ve ark. 1993; Wentzell ve Vanyske 1989; Monfre ve Brown 1987). Kalman filtresinin biyoteknolojide fermentasyon süreçlerinde kullanımı ile ilgili çalışmalarda bulunmaktadır. Fermentasyon sırasında biyokitle, substrat derişimi gibi sistem değişkenlerinin hızlı ve doğru olarak ölçülemediğinden dolayı Kalman filtresinin kullanımı avantaj sağlamaktadır (Hitzmann ve ark, 2000). Rutan ve ark (1988), GKF'ni , parametre kestiriminde yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem olan Levenberg-Marquardt yöntemi ile karşılaştırmıştır. 0. ve 1. derece kinetik sabitlerin kestirildiği bu çalışmada iki yöntemin benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Lai (1993) GKF'nin Michaelis-Menten parametrelerinden V_{max} 'ın kestiriminde kullanılabileceğini benzetim çalışmaları ile göstermiştir.

2.3 Glukoz Oksidaz

Glukoz oksidaz (GOD) enzimi genel olarak mikrobiyal kaynaklardan elde edilir. Üretimde *Aspergillus niger* ya da *Penicillium amagaskinense*'in kontrollü fermentasyonu kullanılmaktadır. Ticari ürünler genellikle katalaz ve koenzim olan flavin-adenin-dinükletidi de içermektedir. *Aspergillus niger*'den elde edilen GOD 'ın moleküler ağırlığı 192000'e eşittir, optimum çalışma sıcaklığı 30-50 °C arasında ve optimum çalışma pH'sı 4.5-6.5 arasında değişmektedir. GOD ağır metal tuzları (gümüş klorür, gümüş nitrat), ve sülfidril şelatlaştırma ajanları ile inhibe olurken katalaz ise üre, donma ve aerobik koşullar altında güneş ışığı ile inhibe olmaktadır (Richter, 1983).

Glukoz oksidaz enzimi gıdalarda doğal olarak bulunduğu için birçok ülkede kullanımına yasal izin verilmiştir. GOD'ın gıda endüstrisinde başlıca uygulama alanı renk ve aroma değişimlerini önlemek olarak gösterilebilir. Narenciye içecekleri, bira, şarap, süt tozu gibi gıdalarda oksidasyona bağlı bozulmayı önlemek için kullanılmaktadır. GOD ayrıca kurutulmuş yumurta üretimine yumurta beyazından glukozu uzaklaştırmada kullanılmaktadır. Yumurtada bulunan glukoz üretim sırasında uzaklaştırılmazsa Maillard reaksiyonlarına bağlı olarak renk ve tat bozulmalarına neden olmaktadır (Richter, 1983). GOD'a ait başka bir kullanım alanı ise gıdalarda glukoz miktarının ölçümüdür.

Biosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mutlu ve ark. 1997). Glukoz ölçümü ayrıca diyabet hastaları için büyük önem taşıdığından dolayı tıpta da kullanılmaktadır.

Glukoz oksidaz enzim kinetiğinde substrat (glukoz) ve ürüne (glukonik asit) bağlı olarak inhibisyon gerçekleşmektedir. Serbest enzim için substrat inhibisyonu Nicol ve Duke (1996) tarafından gösterilmiş, bu çalışmada elde edilen bulgular Tse ve Gough (1987) tarafından da teyit edilmiştir. Kozhukharova (1988) tutuklu GOD için substratın zayıf inhibe edici etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmaların yanında bir çok sayıda çalışmada substratın inhibisyon etkisi belirtilmemiştir. Benzer şekilde glukonik aside bağlı inhibisyon olduğunu bildiren veya inhibisyon etkisinin gözlemlenmediği birçok çalışma bulunmaktadır. Bu durum çalışmalarda kullanılan enzimlerin farklı kaynaktan elde edilmesi ve çalışmalarda kullanılan glukoz derişim aralıklarının çok farklı olmasına bağlanabilir (Miron ve ark., 2004).

3. BENZETİM VE DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu tez kapsamında hedeflenen amaçlar doğrultusunda Michaelis-Menten parametrelerinin ayrı ayrı ve eş zamanlı olarak kestirildiği 3 farklı GKF tasarlanmıştır. Ayrıca, 2 farklı reaksiyona ait substrat derişimlerinin kestirildiği filtre de tasarlanmış ve geliştirilen tüm filtrelerin performansları basit Michaelis-Menten denklemine uyan modeller ve parametrelerin zamanla değıştiği modeller için benzetim çalışmaları ile incelenmiştir. Deneysel çalışma kısmında ise glukoz oksidaz enzimine ait substrat derişim profilleri ile GKF kullanılarak Michaelis-Menten denkleminin parametreleri hesaplanmış ve glukoz oksidaz enzimi için enzim inaktivasyonunu da içeren bir model önerilmiştir.

3.1 Benzetim Çalışması

Benzetim çalışmalarda Matlab 6.5 (Mathworks™) programlama dili kullanılmıştır. Yapay gürültü için Matlab kütüphanesinde bulunan “randn” fonksiyonu kullanılmıştır. Bilgisayar ile yapılan hesaplamalarda çift katlı hassaslığa (64-bit) sahip kayan nokta sayı gösterimi kullanılmıştır. Substrat derişim profili için yapay veri Michaelis-Menten denkleminin 4. derece Runge-Kutta yöntemi ile sayısal olarak çözülmesi ile elde edilmiştir. Runge-Kutta yönteminde sabit adım aralıkları kullanılması, basit bir algoritmaya sahip olması ve Euler yöntemine göre daha düşük hatalı sonuç vermesi nedeni ile seçilmiştir. Tasarlanan filtreler için program kodu Ek-2’de verilmiştir.

3.1.1. Substrat derişimi ve V_{max} kestirimi için kullanılan Kalman filtresinin oluşturulması

Substrat derişiminin ve V_{max} ’ın kestirilmesi için gerekli kesik zamanlı uzay-zaman model vektörü aşağıdaki gibi yazılabilmektedir.

$$X_n = \begin{bmatrix} S(t_n) \\ V_{max}(t_n) \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

Substrat derişimi için durum-uzay modeli, Michaelis-Menten denkleminin açık çözümü bulunmadığı için 4. dereceden Runge-Kutta yöntemi ile sayısal olarak çözülerek elde edilmiştir.

$$S(t_{n+1}) = S(t_n) + (kr_1(t_n)/6) + (kr_2(t_n)/3) + (kr_3(t_n)/3) + (kr_4(t_n)/6) \quad (3.2)$$

$$kr_1(t_n) = -h * \frac{V_{\max} S(t_n)}{K_m + S(t_n)} \quad (3.3)$$

$$kr_2(t_n) = -h * \frac{V_{\max} (S(t_n) + kr_1(t_n)/2)}{K_m + S(t_n) + kr_1(t_n)/2} \quad (3.4)$$

$$kr_3(t_n) = -h * \frac{V_{\max} (S(t_n) + kr_2(t_n)/2)}{K_m + S(t_n) + kr_2(t_n)/2} \quad (3.5)$$

$$kr_4(t_n) = -h * \frac{V_{\max} (S(t_n) + kr_3(t_n))}{K_m + S(t_n) + kr_3(t_n)} \quad (3.6)$$

Burada

h : zaman aralığını,

$kr_{1,2,3,4}$: düzeltme katsayılarını belirtmektedir.

Bu durumda sistem modeli aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$\begin{bmatrix} S(t_{n+1}) \\ V_{\max}(t_{n+1}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S(t_n) + k_1(t_n)/6 + k_2(t_n)/3 + k_3(t_n) + k_4(t_n) & + & v_1 \\ V_{\max}(t_n) & + & v_2 \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

Burada:

v_1 : Substrat derişimine ait sistem gürültüsünü,

v_2 : $V_{\max}$ 'a ait sistem gürültüsünü ifade etmektedir.

Sürekli diferansiyel denklemler Runge-Kutta yöntemi gibi sayısal çözüm yöntemleri kullanılarak kesikli hale dönüştürülebilmektedir (Bard, 1974). Bu şekilde Runge-Kutta yöntemi kullanılarak Michaelis-Menten denklemi sürekli halden kesikli hale dönüştürülmüştür. Durum geçiş matrisinin substrat

derişimine bağlı terimlerinin hesaplanabilmesi için, kesikli hale dönüştürülen reaksiyon hız ifadesinin substrat derişimine ve V_{max} 'a göre türevlerinin alınması gerekmektedir. Kesikli çözüm substrat derişimini t_n ve t_{n+h} aralığında sürekli olarak tanımlamadığı için, türevinin alınması hatalı sonuçlar vermektedir. Bu sebepten dolayı t_n anındaki durum geçiş matrisini hesaplamak için Michaelis-Menten denkleminin bu noktadaki türevleri kullanılmıştır.

$$\Phi = \begin{bmatrix} \frac{\partial r}{\partial S} & \frac{\partial r}{\partial V_{max}} \\ \frac{\partial V_{max}}{\partial S} & \frac{\partial V_{max}}{\partial V_{max}} \end{bmatrix}, \quad S = S(t_n)^-, V_{max} = V_{max}(t_n)^- \quad (3.8)$$

Burada :

$S(t_n)^-$: ölçüm öncesi substrat derişimi kestirimini,

$V_{max}(t_n)^-$: ölçüm öncesi V_{max} kestirimini ifade etmektedir.

$$r = -\frac{V_{max}S(t)}{K_m + S(t)} \quad (3.9)$$

Burada r, reaksiyon hızını ifade etmektedir.

Durum geçiş matrisinin belirlenebilmesi için reaksiyon hızının, substrat derişimi ve V_{max} 'a göre türevi hesaplanmalıdır. Burada V_{max} substrat derişimine bağlı olmadığı için hızın substrat derişimine göre kısmi türevi ile tam türevi birbirine eşittir.

$$\frac{dr}{dS} = \frac{\partial r}{\partial S} \quad (3.10)$$

$$\frac{dr}{dS} = -\frac{V_{max}K_m}{(K_m + S)^2} \quad (3.11)$$

$$\frac{dr}{dV_{\max}} = \frac{\partial r}{\partial V_{\max}} + \frac{\partial r}{\partial S} \frac{\partial S}{\partial V_{\max}} \quad (3.12)$$

Substrat derişimi $V_{\max}$ 'ın fonksiyonu olduğu için kısmi türevinin hesaplanması gerekmektedir. K_m 'nin sabit $V_{\max}$ ve substrat derişiminin değışken olarak alındığı durumda Michaelis-Menten denklemi için kapalı çözüm aşağıdaki gibi 2 farklı fonksiyonun farkı olarak yazılabilir.

$$f(S) = S e^{\frac{S}{K_m}} \quad (3.13)$$

$$g(V_{\max}) = S_0 e^{\frac{S_0 - V_{\max} * t}{K_m}} \quad (3.14)$$

$$f(S) - g(V_{\max}) = 0 \quad (3.15)$$

Kapalı çözümün $V_{\max}$ 'a göre türevi alınırsa

$$\frac{\partial(f(S) - g(V_{\max}))}{\partial V_{\max}} = 0 \quad (3.16)$$

$$\frac{\partial f}{\partial S} \frac{\partial S}{\partial V_{\max}} - \frac{\partial g}{\partial V_{\max}} = 0 \quad (3.17)$$

$$e^{\frac{S}{K_m}} \left(\frac{S}{K_m} + 1 \right) \frac{\partial S}{\partial V_{\max}} + \frac{S_0 t}{K_m} e^{\frac{S_0 - V_{\max} * t}{K_m}} = 0 \quad (3.18)$$

Bu denklem düzenlenirse substrat derişiminin $V_{\max}$ 'a göre türevi aşağıdaki gibi yazılabilir .

$$\frac{\partial S}{\partial V_{\max}} = \frac{-t S}{K_m + S} \quad (3.19)$$

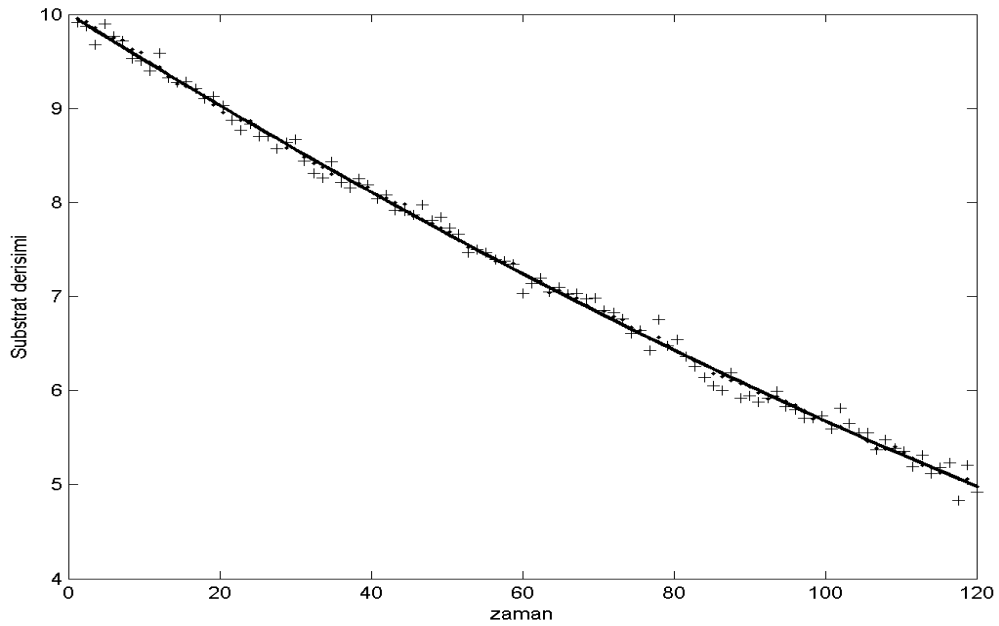
Reaksiyon hızının $V_{\max}$ ' a göre kısmi türevi aşağıdaki gibidir.

$$\frac{\partial r}{\partial V_{\max}} = -\frac{S}{K_m + S} \quad (3.20)$$

Durum geçiş matrisinin t_n anındaki değeri, sistem durum vektörünün ölçüm öncesi yapılan kestirimleri kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\Phi_n = \begin{bmatrix} -\frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S)^2} & -\frac{S}{K_m + S} + \frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S)^2} \frac{t S}{K_m + S} \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \bigg|_{S=S(t_n)^-, V_{\max}=V_{\max}(t_n)^-} \quad (3.21)$$

Filtre performansını incelemek için Michaelis-Menten denklemi $V_{\max}=0.1$, $K_m=10$, $S_0=10$ değerleri kullanılarak $h=0.12$ adım aralığı ile sayısal olarak çözülerek substrat derişim profilleri elde edilmiştir. Substrat derişim profiline sıfır ortalamaya sahip normal dağılım gösteren gürültü eklenerek yapay ölçüm verileri elde edilmiştir.



Şekil 3.1: GKF $\{S, V_{\max}\}$ ile kestirilen substrat derişim profili. Ölçüm gürültüsüne ait standart sapma 0.1'e eşittir (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; - : hatasız veri).

Benzetim çalışmasında kullanılan, Q , R , X^+ , P^+ , H matrisleri aşağıda verilmiştir.

$$Q = \begin{bmatrix} 0.001 & 0 \\ 0 & 0.00001 \end{bmatrix}$$

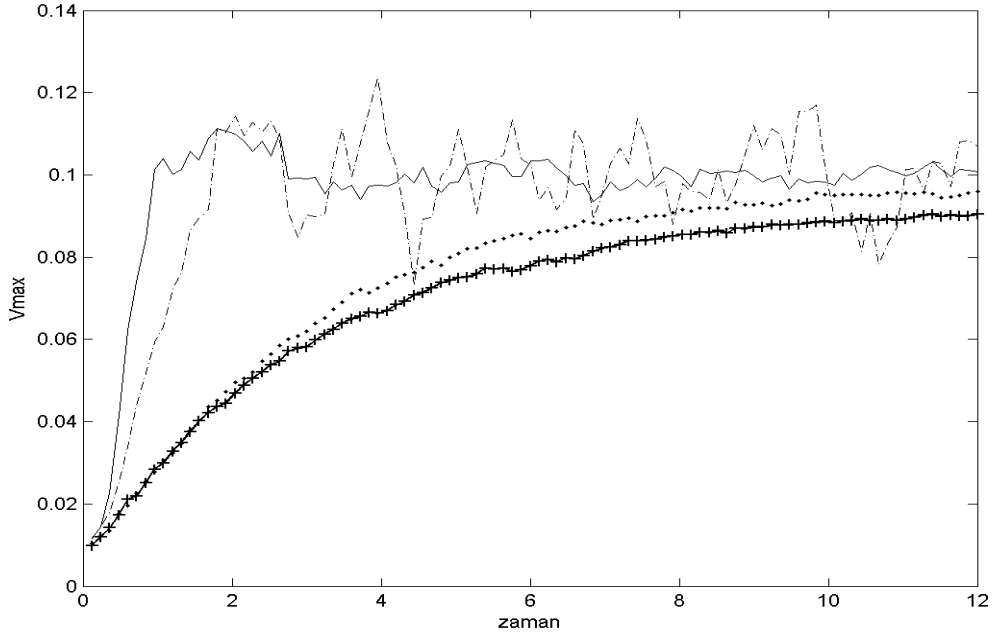
$$R = [0.025]$$

$$P_0^+ = \begin{bmatrix} 0.001 & 0 \\ 0 & 0.001 \end{bmatrix}$$

$$X_0^+ = \begin{bmatrix} 10 \\ 0.01 \end{bmatrix}$$

$$H = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}$$

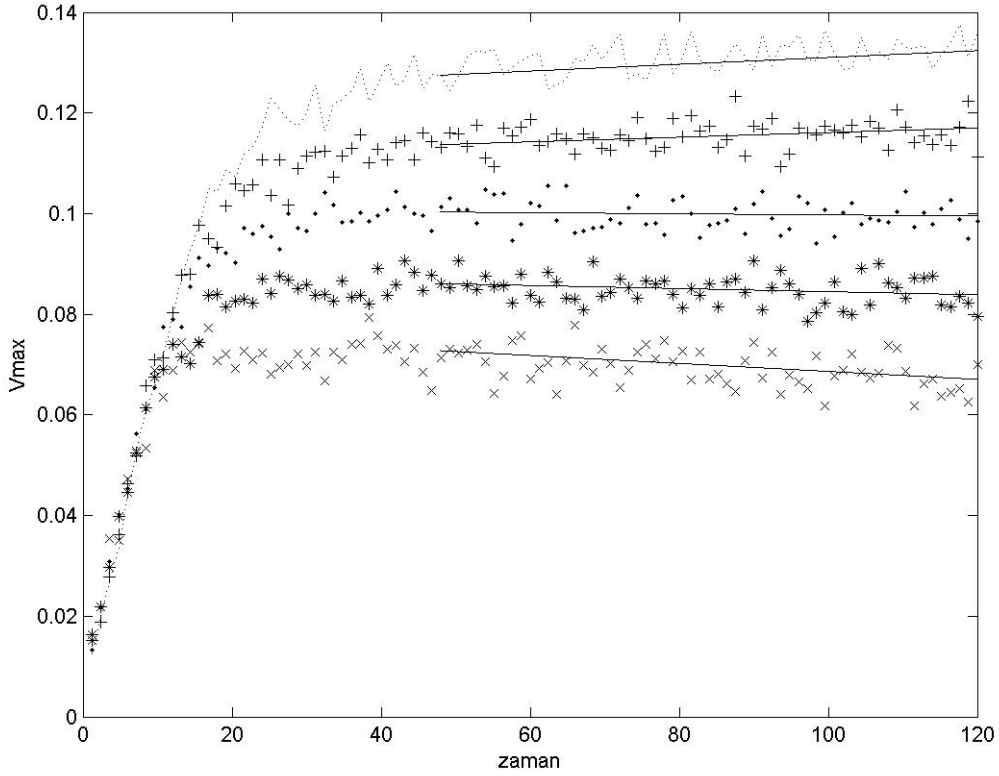
Kestirilen V_{max} değerinin, gerçek değeri etrafında salınım yaptığı görülmüştür. V_{max} değerinin kestiriminde Q matrisinin 4. bileşeni ($Q_{2,2}$), kestirimin gerçek değerine yakınsama süresinde etkili olmaktadır. Q değerinin yüksek olduğu durumda kestirilen V_{max} 'ın gerçek değerine ulaşma süresi kısalmaktadır. Bunun yanında yüksek Q değerleri, substrat dönüşümünün %50'yi geçtiği durumda kırpma hatasına bağlı olarak filtre ıraksamasına neden olmaktadır. Farklı $Q_{2,2}$ değerleri için V_{max} kestirimleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Farklı $Q_{2,2}$ değerleri için V_{max} kestirimleri. (+ : $Q_{2,2}=10^{-7}$; • : $Q_{2,2}=10^{-6}$; -- : $Q_{2,2}=5 \cdot 10^{-6}$; — : $Q_{2,2}=0.0008 e^{-0.1t}$)

Q matrisi bileşenlerinin yüksek olması durumunda kestirilen V_{max} değerleri ölçüm hatalarına daha duyarlı hale gelmektedir. $Q_{1,1}$ değerinin düşük olması durumunda ise kestirilen V_{max} değerinin gerçek değerine ulaşma süresi artmaktadır. Q değeri için sabit bir değer kullanmak yerine zamanla üssel olarak azalan bir fonksiyon kullanıldığında ise gerçek değere hızlı bir şekilde ulaşıldığı ve reaksiyon süresince ölçüm hatalarına karşı daha az duyarlı olduğu görülmektedir. Fakat $Q_{2,2}$ için zamanla azalan bir fonksiyon kullanımı ancak reaksiyon Michaelis-Menten kinetiğine tam olarak uyuyorsa avantajlıdır. Reaksiyon süresince enzim parçalanmasına bağlı inaktivasyon nedeniyle V_{max} değerinin azaldığı durumda, küçük $Q_{2,2}$ değerleri için filtrede kestirilen V_{max} değeri bu değişimi yansıtmayacaktır.

Oluşturulan filtrenin V_{max} değerini doğru olarak kestirebilmesi için K_m değerinin doğru olarak verilmesi gerekmektedir. Farklı K_m değerleri ($K_m = 5; 7.5; 10; 12.5; 15$) kullanıldığında, filtrenin davranışı şekil 3.3'te incelenmiştir.

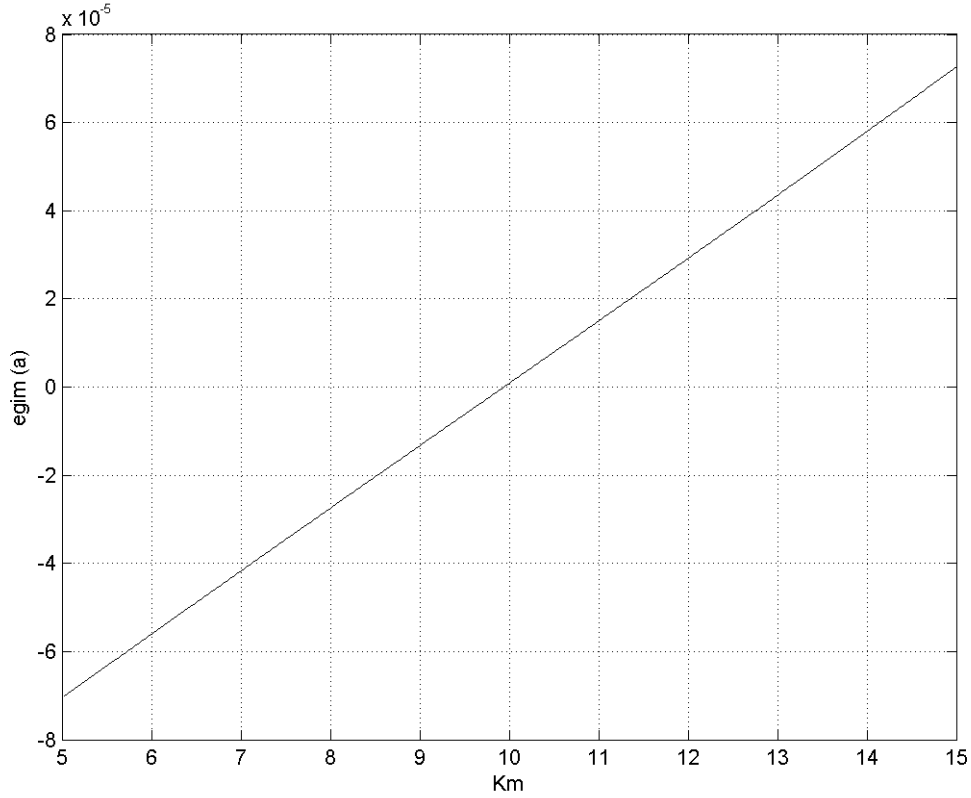


Şekil 3.3: Filtre denklemlerinde farklı K_m değerleri kullanıldığında Kalman filtresi $\{S, V_{max}\}$ ile yapılan V_{max} kestirimleri. (x: $K_m=5$; *: $K_m=7.5$; •: $K_m=10$; +: $K_m=12.5$; -: $K_m=15$)

Şekil 3.3'te görüldüğü gibi K_m değeri doğru olarak verildiğinde kestirilen V_{max} değeri reaksiyon başladıktan kısa bir süre sonra gerçek değerine ulaşmakta ve bu değer etrafında salınım yapmaktadır. Kestirilen V_{max} değeri en küçük kareler yöntemi ile bir doğruya uydurulduğunda doğrunun eğiminin 0'a çok yakın olduğu ve doğrunun y eksenini kestiği noktanın gerçek V_{max} değerine eşit olduğu görülmektedir (Eşitlik 3.22).

$$V_{max} = -0.00001t + 0.10085 \quad (3.22)$$

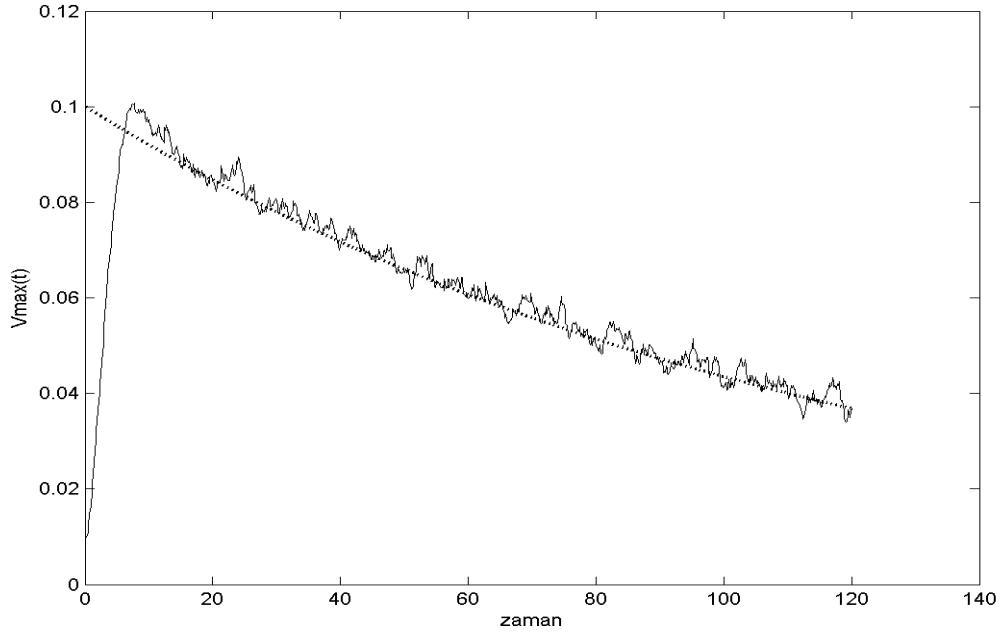
Filtre denklemlerinde kullanılan K_m değerinin gerçek K_m değerine göre artırılması ile doğrunun eğimi artmakta ve azaltılması ile doğrunun eğimi de azalmaktadır. Farklı K_m değerleri ($K_m=5-15$) için çizilen doğruların eğimleri grafiğe geçirildiğinde eğimin 0 olduğu K_m değeri, gerçek K_m değerine eşit olmaktadır.



Şekil 3.4: Filtre denklemlerinde kullanılan farklı K_m değerleri için V_{max} kestirimlerinin eğimi.

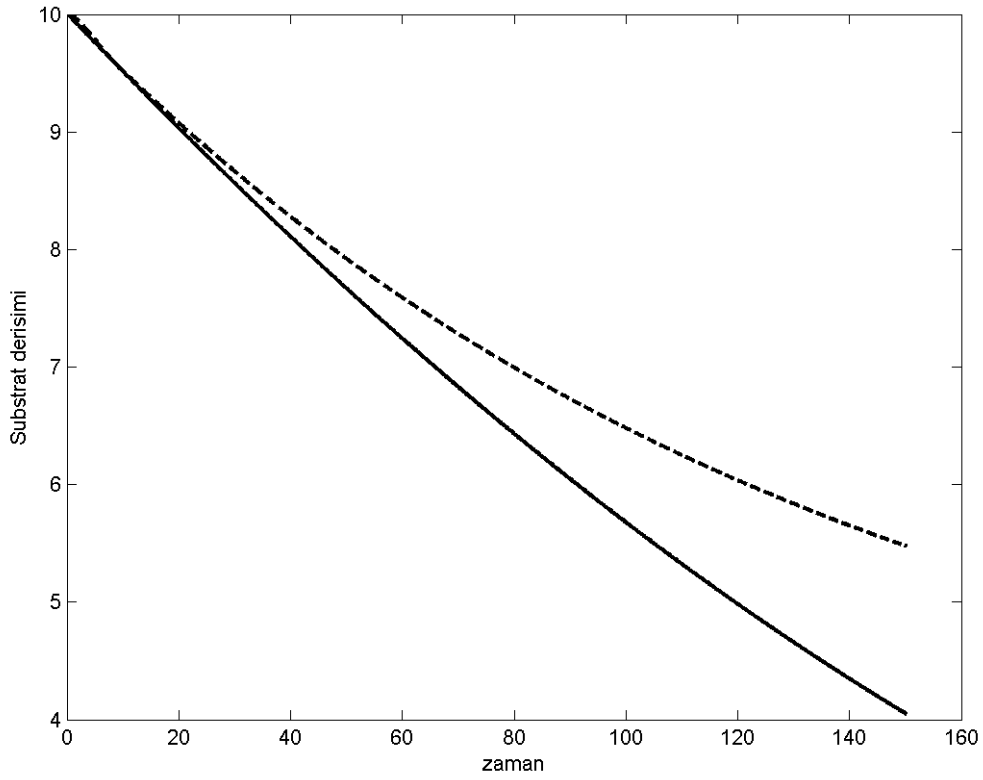
Gerçek K_m değerini veren doğru bulunduğundan sonra V_{max} değeri de bu doğrunun y eksenini kestiği nokta belirlenerek bulunabilmektedir. Fakat bu yöntemin uygulanabilmesi için reaksiyonun Michealis-Menten kinetiğine kesin olarak uyması gerekmektedir. Zamana bağlı olarak azalan enzim aktivitesi ya da reaksiyon ortamında bulunan inhibitör varlığı bu yöntemi geçersiz kılmaktadır.

Enzim aktivitesinin zamanla azalması, ortamda bulunan toplam enzim miktarının parçalanmasına bağlı olabilmektedir. Bu durumda birim enzimin aktivitesi reaksiyon boyunca sabit kalmasına rağmen toplam enzim miktarı başlangıç değerine göre azaldığında toplam enzim aktivitesinde azalma görülmektedir. Miron ve ark. (2004) glukoz oksidaz enzimin reaksiyon boyunca anlık olarak parçalandığını deneysel çalışmalarla göstermiş ve parçalanma hızının en basit varsayımla 1. derece kinetiğe uyduğunu varsayarak reaksiyon hızının modellenmesinde parçalanmaya ait kinetik ifadeyi model denkleminde kullanmışlardır. V_{max} , k_2 kinetik sabiti ile başlangıç enzim derişiminin çarpımından oluştuğu için, toplam enzim miktarının azalması model içinde V_{max} değeri üzerinden izlenebilmektedir. Enzim parçalanmasının üssel olarak gerçekleştiği durumda GKF'nin V_{max} değerini doğru bir şekilde kestirebildiği benzetim çalışmalarında gösterilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.5: Enzim parçalanmasının gerçekleştiği reaksiyon için GKF $\{S, V_{max}\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi. (•: Üssel olarak azalan gerçek V_{max} değeri, $V_{max}(t) = 0.1 * \exp(-0.1t)$; -: GKF ile kestirilen V_{max})

Enzim parçalanmasına bağlı inaktivasyon ile oluşan substrat derişim profili ile, enzim inaktivasyonun olmadığı durumdaki substrat derişim profili Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6: Michaelis-Menten kinetiğine göre oluşan substrat derişim profilleri (-: Sabit enzim derişimi ; --- Enzim miktarının üssel olarak azaldığı durum).

3.1.2. Substrat derişimi ve K_m kestirimi için Kalman filtresinin oluşturulması

Substrat derişimi, V_{max} ve K_m 'den oluşan kesik zamanlı durum-uzay modeli aşağıdaki gibidir.

$$X_n = \begin{bmatrix} S(t_n) \\ K_m(t_n) \end{bmatrix} \quad (3.23)$$

Durum geçiş matrisi aşağıdaki gibi verilir.

$$\Phi = \begin{bmatrix} \frac{\partial r}{\partial S} & \frac{\partial r}{\partial K_m} \\ \frac{\partial K_m}{\partial S} & \frac{\partial K_m}{\partial K_m} \end{bmatrix}, \quad S = S(t_n)^-, \quad K_m = K_m(t_n)^- \quad (3.24)$$

Burada $K_m(t_n)^-$, ölçüm öncesi Kalman filtresi ile yapılan K_m kestirimini ifade etmektedir.

Durum geçiş matrisinin hesaplanabilmesi için reaksiyon hızının K_m 'ye göre türevinin alınması gerekmektedir.

$$\frac{dr}{dK_m} = \frac{\partial r}{\partial K_m} + \frac{\partial r}{\partial S} \frac{\partial S}{\partial K_m} \quad (3.25)$$

$$\frac{\partial r}{\partial K_m} = \frac{V_{\max} S}{(K_m + S)^2} \quad (3.26)$$

Substrat derişiminin K_m 'ye göre türevinin alınabilmesi için Michaelis-Menten denkleminin kapalı çözümü kullanılmıştır.

$$K_m \ln(S_0 / S) + S_0 - S = V_{\max} S \quad (3.27)$$

Eşitliğin her iki tarafının K_m 'ye göre türevi alınırsa aşığıdaki ifade elde edilir.

$$\ln(S_0) - \ln(S) - \frac{K_m}{S} \frac{\partial S}{\partial K_m} - \frac{\partial S}{\partial K_m} = 0 \quad (3.28)$$

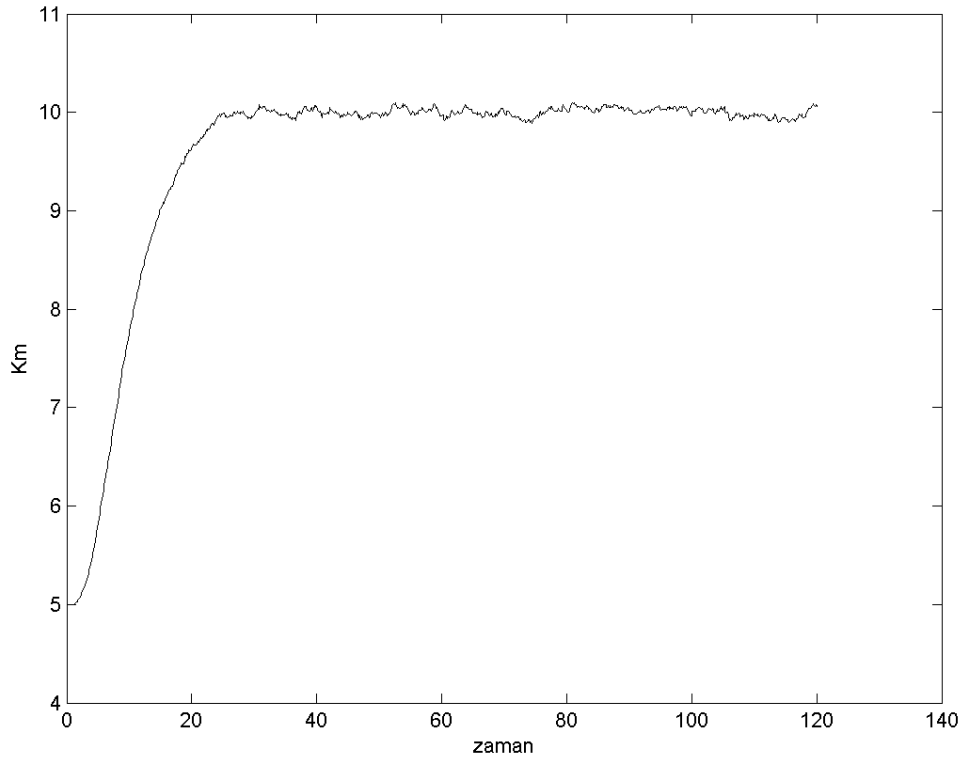
Bu eşitlik düzenlenirse substrat derişiminin K_m 'ye göre kısmi türevi aşığıdaki gibi verilir.

$$\frac{\partial S}{\partial K_m} = \frac{S \ln(S_0 / S)}{K_m + S} \quad (3.29)$$

Elde edilen bu türev ifadeleri kullanılarak her kestirim noktasındaki durum geçiş matrisi hesaplanabilir.

$$\Phi = \begin{bmatrix} \frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S)^2} & \frac{V_{\max} S}{(K_m + S)^2} - \frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S)^2} \frac{S \ln(S_0 / S)}{K_m + S} \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.30)$$

Kalman filtresi $\{S, K_m\}$ kullanılarak yapılan K_m kestirimleri Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7 : GKF $\{S, K_m\}$ ile yapılan K_m kestirimi

Filtrede kullanılan Q , R , P^+ matrisleri deneme-yanılma yöntemi ile bulunmuştur.

$$Q = \begin{bmatrix} 0.005 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$R = [0.1]$$

$$P_0^+ = \begin{bmatrix} 0.001 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$X_0^+ = \begin{bmatrix} 10 \\ 5 \end{bmatrix}$$

Genişletilmiş Kalman filtresinin substrat inhibisyonu olduğu durumdaki kestirim performansı yapılan benzetim çalışmasında incelenmiştir. Substrat inhibisyonu olduğu durumda reaksiyon hız ifadesi aşağıdaki gibi verilir.

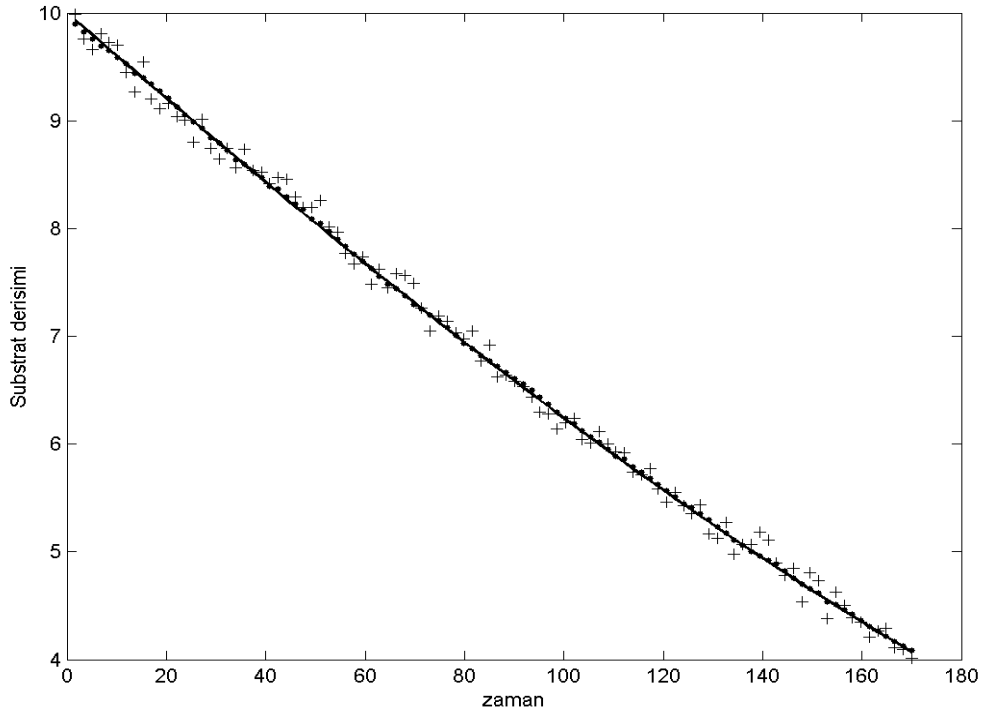
$$\frac{\partial S}{\partial t} = - \frac{V_{\max} S}{K_m + S + K_I S^2} \quad (3.31)$$

Burada K_I inhibisyon sabitini göstermektedir. İnhibisyon sabitine ait terim ve K_m , görünen K_m değeri olarak gruplanırsa hız ifadesi aşağıdaki şekle dönüşmektedir.

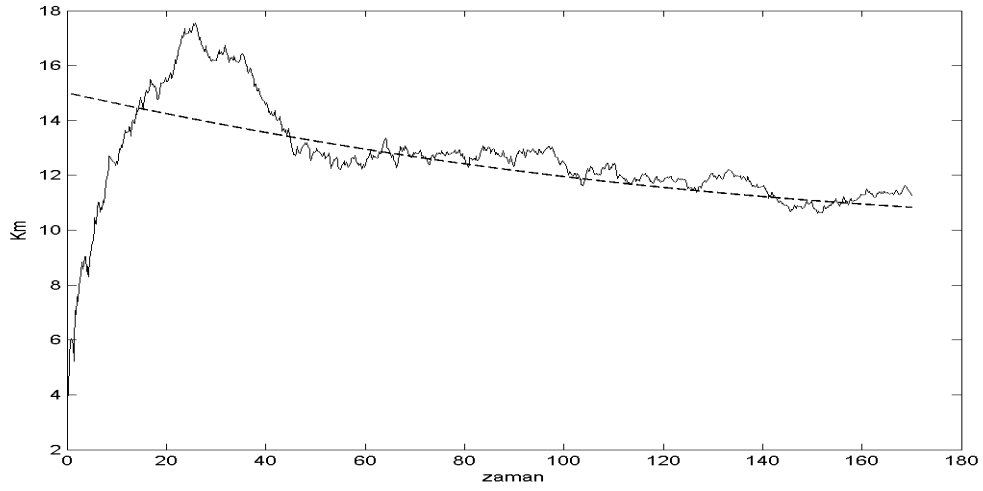
$$\frac{\partial S}{\partial t} = - \frac{V_{\max} S}{K_{\text{gör}}(S) + S} \quad (3.32)$$

$$K_{\text{gör}} = K_m + K_I S \quad (3.33)$$

Burada $K_{\text{gör}}$, görünen Michaelis-Menten sabitini ifade eder. $K_{\text{gör}}$, substrat derişiminin dolayısıyla zamanın bir fonksiyonudur. Benzetim çalışmasında kullanılan GKF'nin tasarımında model olarak inhibisyonun dikkate alınmadığı Michaelis-Menten denklemini kullanılmıştır.



Şekil 3.8: Substrat inhibisyonunun gerçekleştiği durumda GKF ile yapılan substrat derişim kestirimi. (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; – : hatasız veri)



Şekil 3.9: Substrat inhibisyonu olduğu durumda GKF ile yapılan K_m kestirimi. (–: $K_l = 0.05$ değeri kullanılarak hesaplanan $K_{gör}$; - : Kalman filtresi kullanılarak kestirilen K_m)

GKF basit enzim kinetiği temel alınarak tasarlanmış olmasına rağmen K_m değeriindeki değişimi takip edebilmektedir.

3.1.3. Substrat derişimi, V_{max} ve K_m kestirimi için kullanılan GKF'nin oluşturulması

Substrat derişimi, K_m ve V_{max} 'ın kestirileceği durumda modele ait durum-uzay model vektörü üç bileşenden oluşmaktadır.

$$X_n = \begin{bmatrix} S(t_n) \\ V_{max}(t_n) \\ K_m(t_n) \end{bmatrix} \quad (3.34)$$

Bu durumda modele ait durum geçiş matrisi aşağıdaki gibi verilir.

$$\Phi = \begin{bmatrix} -\frac{V_{max} K_m}{(K_m + S)^2} & -\frac{S}{K_m + S} + \frac{V_{max} K_m}{(K_m + S)^2} \frac{t S}{K_m + S} & \frac{V_{max} S}{(K_m + S)^2} - \frac{V_{max} K_m}{(K_m + S)^2} \frac{S \ln(S_0/S)}{K_m + S} \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.35)$$

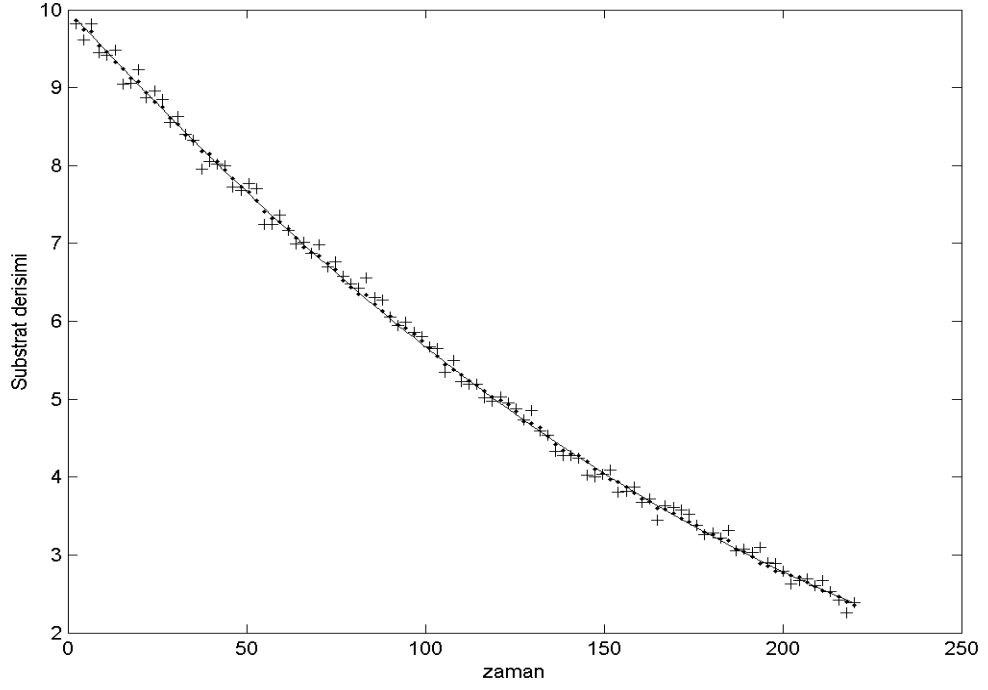
Oluşturulan GKF'nin kestirim başarımını incelemek amacıyla aşağıda verilen Q , R , P_0^+ matrisleri kullanarak benzetim alışmaları yapılmıştır.

$$Q = \begin{bmatrix} .01 & 0 & 0 \\ 0 & 0.00001 & 0 \\ 0 & 0 & 0.5 \end{bmatrix}$$

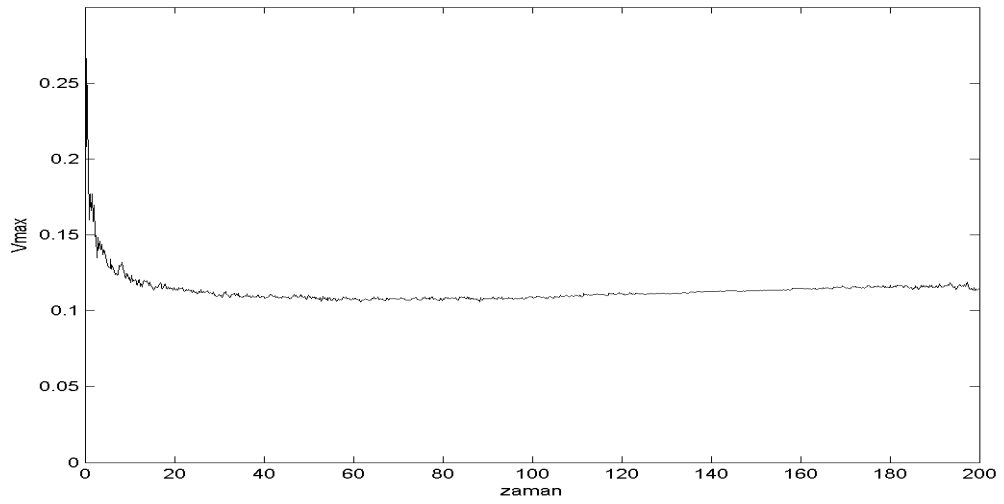
$$R = [0.01]$$

$$P_0^+ = \begin{bmatrix} 0.01 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 10 \end{bmatrix}$$

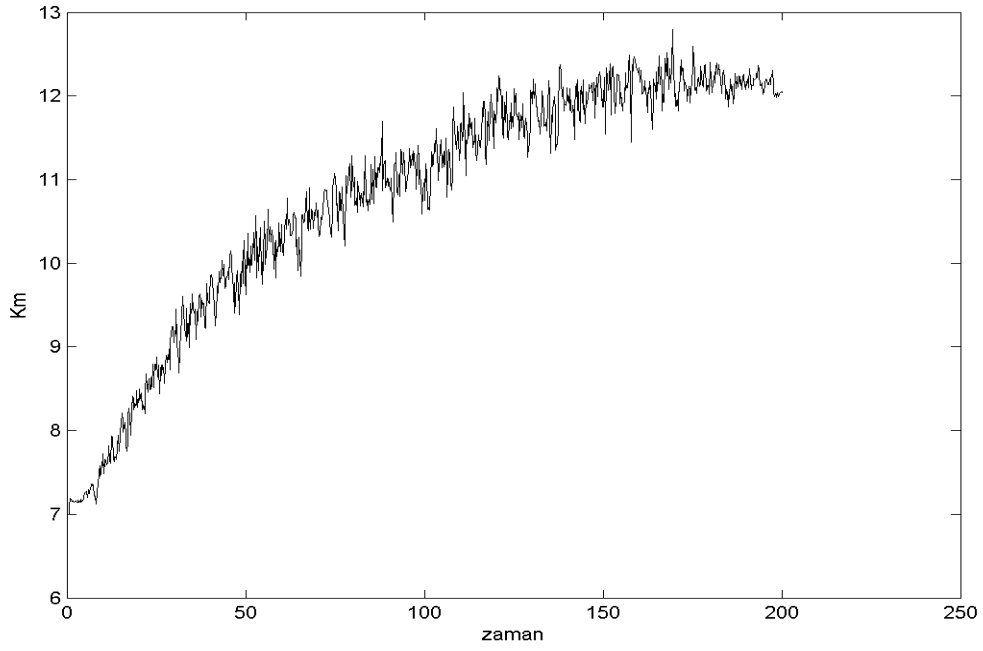
Benzetim çalışmalarında substrat derişiminin kestirilmesinde GKF'nin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.



şekil 3.10: GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan substrat derişim kestirimi. (+: hata eklenmiş veri; • : Substrat derişim kestirimi; – : hatasız veri)

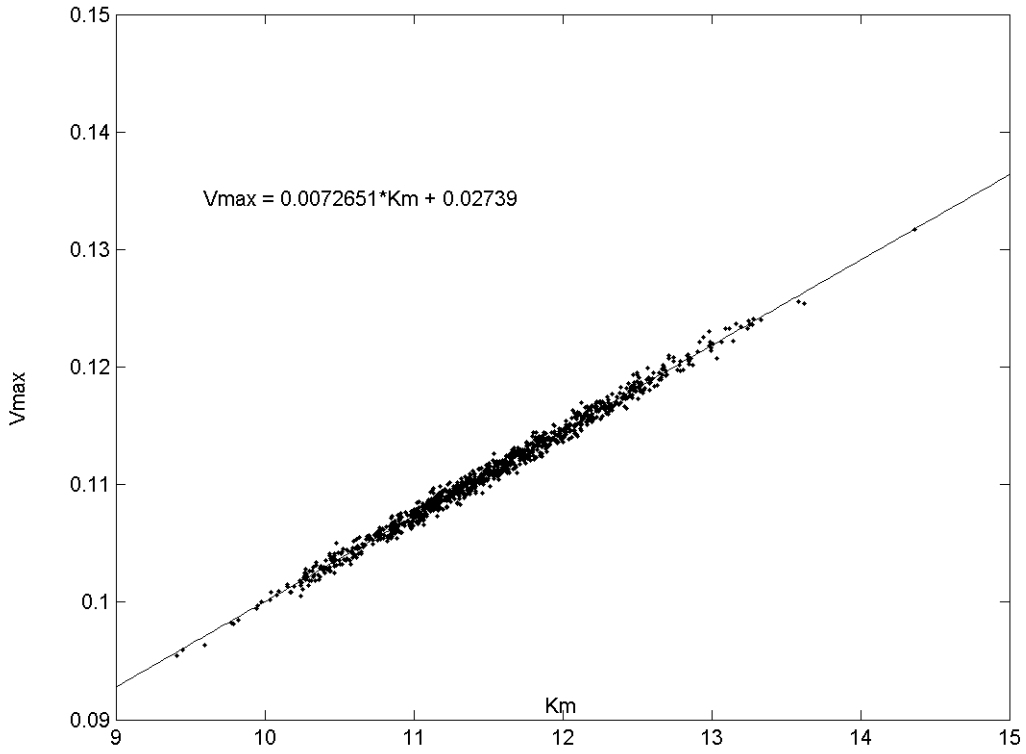


şekil 3.11: GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi. V_{max} 'ın gerçek değeri 0.1'dir



Şekil 3.12: GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan K_m kestirimi. K_m 'nin gerçek değeri 10'a eşittir.

Yapılan benzetim çalışmasında, V_{max} ve K_m kestiriminde yaklaşık %20 bağıl hata bulunmuştur. Benzetim çalışmalarının yüksek sayıda tekrarlanmasına dayanan Monte-Carlo benzetimleri ile parametre kestirimlerine dair daha fazla bilgi edinilebilmektedir. Bu amaçla benzetim çalışması 1000 kere tekrarlanmış ve her bir benzetim çalışmasından elde edilen V_{max} ve K_m değeri, y eksenini V_{max} , x eksenini K_m olmak üzere şekle geçirilmiştir.



Şekil 3.13: GKF ile yapılan V_{max} - K_m kestirimleri için yapılan Monte-Carlo benzetim çalışması sonuçları. Şekildeki her bir nokta farklı benzetim çalışması sonucu elde edilen V_{max} - K_m çiftini göstermektedir.

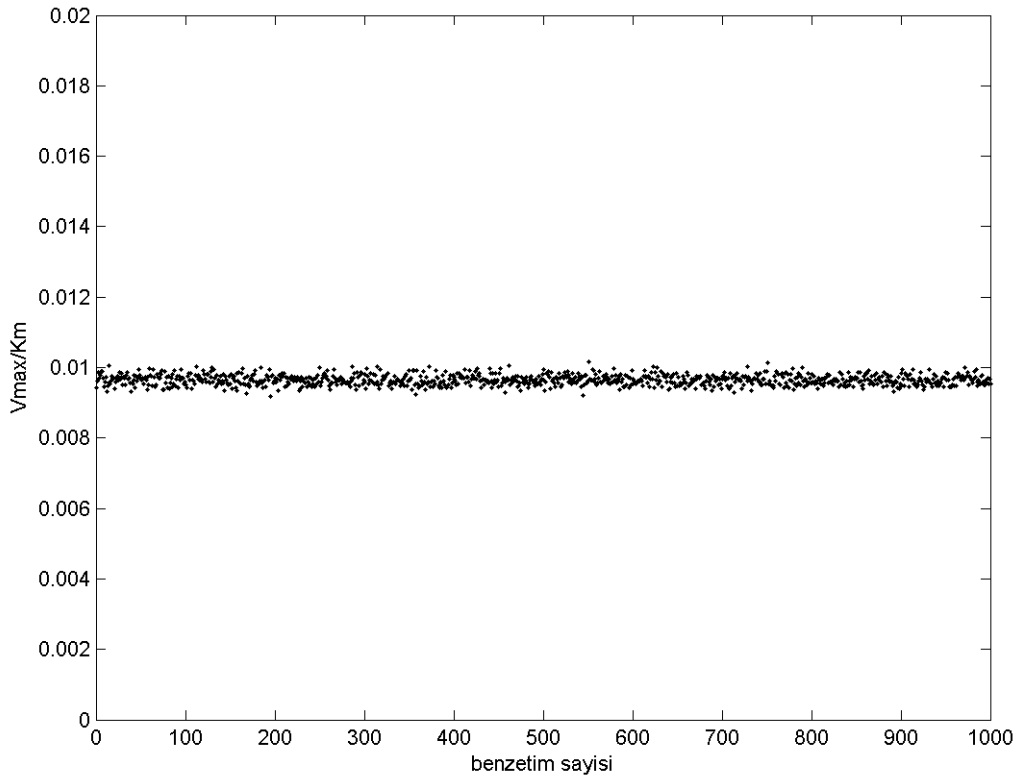
Yapılan Monte-Carlo benzetim çalışması ile elde edilen V_{max} ve K_m değerleri arasında doğrusal ilişki kurulabilmektedir. Bu ilişki kullanılarak deneysel veriye uyan bir çok V_{max} - K_m çifti seçilebilir. Bu durum V_{max} ve K_m 'nin birbiri ile ilintili olduğunu gösterir. Parametrelerin birbirleriyle ilintili olduğu durumda parametre kestirimini oldukça güçleştirmektedir (Baker, 2005).

Parametrelerin ilintili olması nedeniyle GKF, Michaelis-Menten parametrelerinin kestiriminde gerçek parametre değerlerini kestirememekte, yapılan parametre kestirimleri büyük ölçüde K_m için yapılan başlangıç tahminine dayanmaktadır.

Bu durum Lai (1993) tarafından yapılan Michaelis-Menten parametrelerinin GKF ile kestirdiği çalışmanın sonuçları ile değerlendirilebilmektedir. Lai V_{max} için kullanılan başlangıç tahmin değerini belirtmemesine rağmen kestirim sonuçlarının verildiği şekle bakılarak başlangıç tahminin gerçek değerine çok yakın olduğu söylenebilir. Bunun yanında K_m kestirimleri için herhangi bir sonuç verilmemiştir. Çalışmada verilen hata ilinti matrisine bakılarak kestirimi yapılan parametreler için ilk

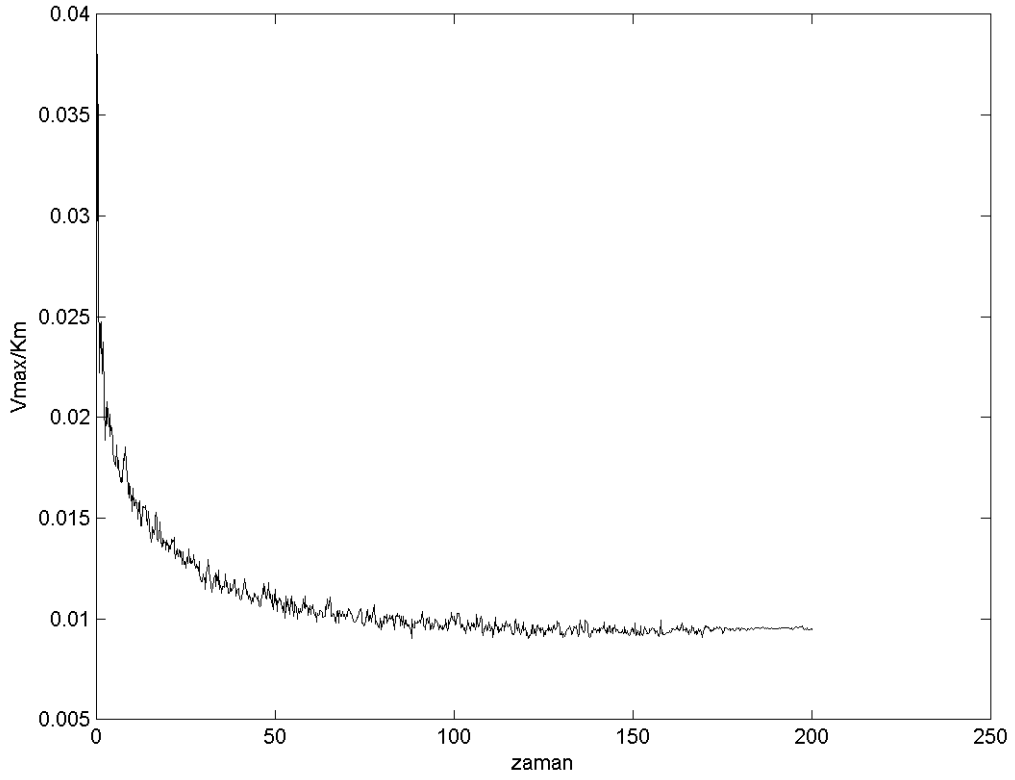
tahminlerin gerçek değerlerine çok yakın verildiği söylenebilir. Bu durumda GKF'nin, parametrelerin gerçek değerlerine yakın tahminler yapıldığında parametreleri doğru olarak kestirebildiği söylenebilir. Tez kapsamında oluşturulan GKF'de doğru K_m değeri verildiğinde V_{max} 'ın gerçek değerini doğru kestirebilmektedir.

Her bir benzetim çalışmasından elde edilen V_{max} değerinin, K_m değerine oranı alındığında, GKF'nin V_{max}/K_m oranını kestirmekte daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.14).



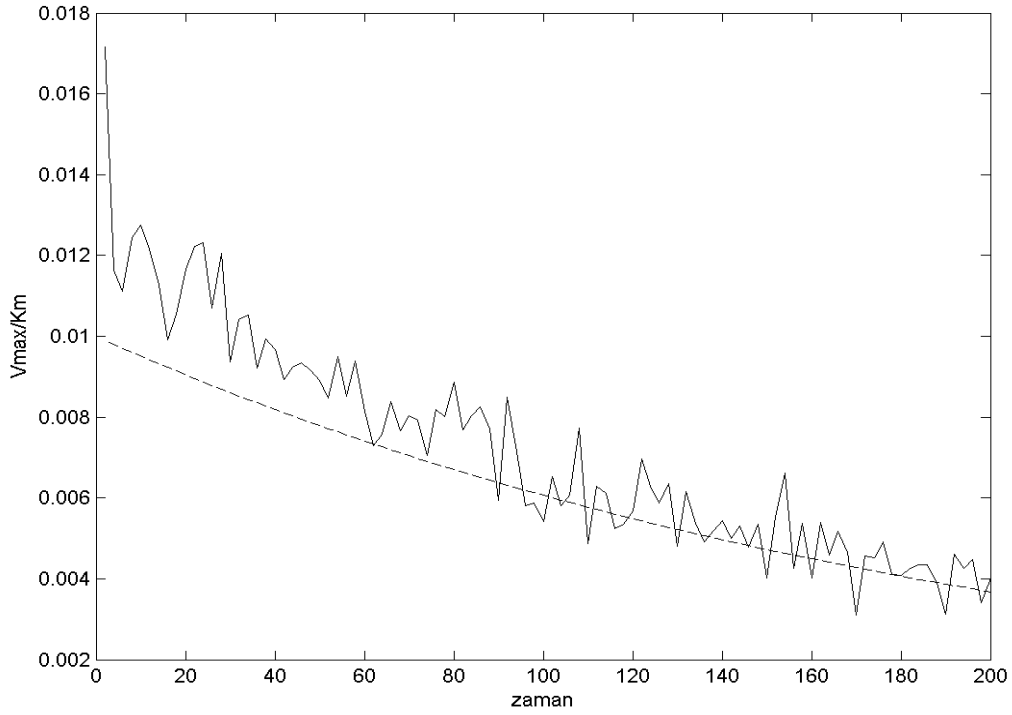
Şekil 3.14: Monte-Carlo benzetim çalışmasında elde edilen V_{max} - K_m kestirimlerinin oranı.

Kalman filtresinin V_{max}/K_m oranını, V_{max} ve K_m 'nin ayrı olarak kestirimlerine göre gerçek değerine daha kısa sürede ulaşmaktadır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: GKF ile kestirilen V_{max} ve K_m değerlerinin oranı. Gerçek oran değeri 0.01'dir.

Enzim aktivitesinin zamanla azaldığı durumda da GKF'nin V_{max}/K_m oranını gerçek değerine yakın olarak kestirebildiği gözlemlenmiştir. Enzim inaktivasyonun olduğu durumda yapılan V_{max} ve K_m kestirimleri ise gerçek değerlerine yakınsamamaktadır.



Şekil 3.16: Enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonun gerçekleştiği durumda GKF $\{S, K_m, V_{max}\}$ ile yapılan V_{max} ve K_m kestirimlerinin oranı (--: gerçek $V_{max}(t)/K_m$, -: GKF ile yapılan V_{max} ve K_m kestirimlerinin oranı ($V_{max}(t)=0.1*exp(-0.05*t)$).

Elde edilen bulgular GKF'nin, sistem tanımlanabilirliğinin zayıf olması nedeni ile parametre kestiriminde başarısız olduğunu göstermektedir. Literatürde de bu sonucu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Stigter ve Beck (2004) GKF kullanılarak Michaelis-Menten kinetiğini temel alan biyokitle üreme modelinde, maksimum üreme hızının ve Michaelis-Menten sabitinin gerçek değerlerinin kestirilemeyeceğini bildirmiştir.

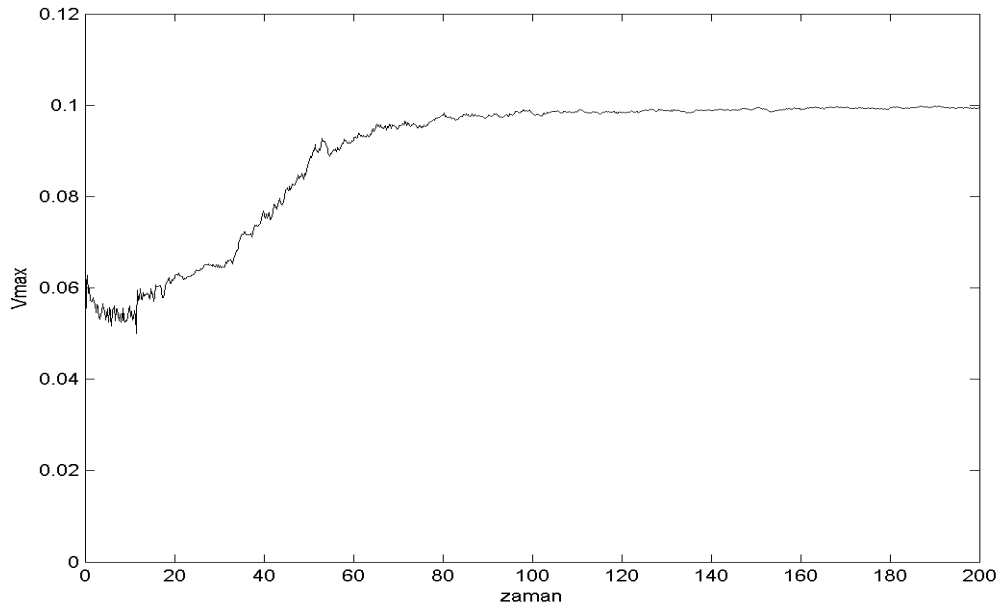
Michaelis-Menten kinetiği gösteren enzimatik reaksiyonlarda, başlangıç anındaki hızın V_{max} 'a karşı olan duyarlılığı K_m 'ye göre daha fazladır. GKF, reaksiyon başlangıcında V_{max} 'ı kestirdikten sonra, V_{max} 'a ait sistem gürültüsü ilinti matrisi bileşeni azaltılarak, reaksiyonun ileri aşamalarında Kalman filtresinin K_m 'yi gerçek değerine yakın olarak kestirmesi sağlanabilmektedir. Sistem gürültüsü ilinti matrisi aşağıda verilen zamana bağlı matris kullanıldığında GKF'nin V_{max} ve K_m parametrelerini eş zamanlı olarak kestirebildiği görülmüştür.

$$Q = \begin{bmatrix} 0.0000001 & 0 & 0 \\ 0 & 0.002 e^{-0.5t} & 0 \\ 0 & 0 & 0.0001 \end{bmatrix}$$

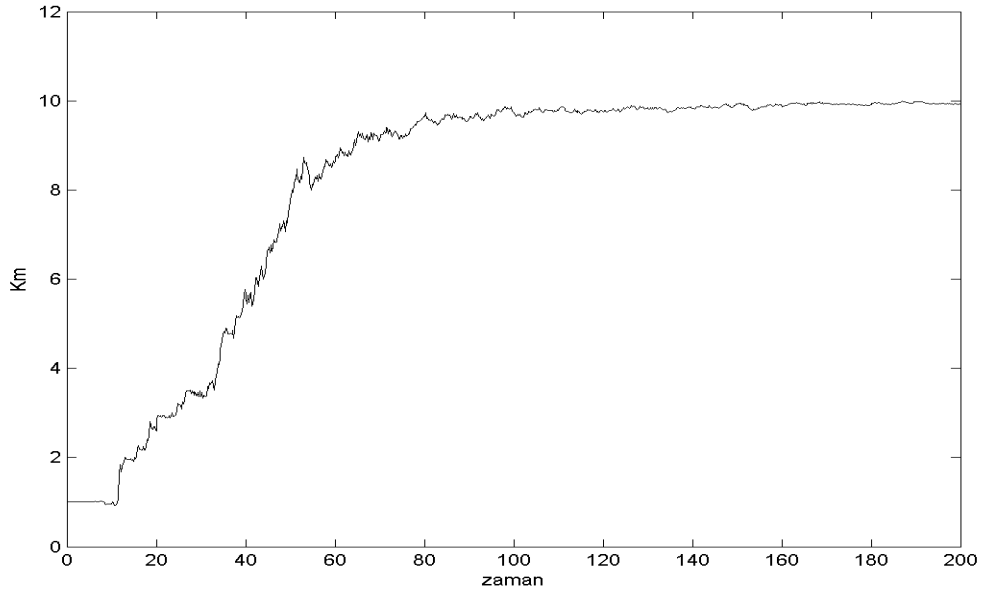
$$R=[0.000001]$$

$$P_0^+=\begin{bmatrix} 0.01 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 5 \end{bmatrix}$$

Oluşturulan GKF'nin gerçek V_{max} ve K_m değerlerini kestirebildiği benzetim çalışmalarında gösterilmiştir.



Şekil 3.17: Değişken sistem gürültü ilinti matrisi ile uygulanan GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi.



Şekil 3.18: Değişken sistem gürültü ilinti matrisi ile uygulanan GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan K_m kestirimi.

Heineken ve ark. (1967) V_{max} ve K_m 'nin yüksek kesinlikle bulunabilmesi için %97 oranında dönüşümün sağlanması gerektiğini belirtmiştir. GKF'nde değişken sistem gürültü ilinti matrisi kullanıldığında, substratın %60'ının ürüne dönüşmesi, gerçek V_{max} ve K_m değerlerini bulmak için yeterlidir. Değişken sistem gürültü matrisi kullanıldığında GKF'nin reaksiyonun ileri aşamalarında kestirim değerlerini sabitlenmeye zorlanması nedeni ile filtre enzim inaktivasyonu ya da substrat inhibisyonu gibi parametrelerde değişime yol açabilecek modelleme hatalarına duyarlı hale gelmektedir. Sistem tanımlanabilirliğinin zayıf olduğu durumda, durum değişkenleri için ek ölçüm yapılarak ya da model denklemleri tekrar düzenlenip parametreler gruplanarak iyileştirme yoluna gidilebilir. GKF ile V_{max}/K_m oranını kestirme, parametre gruplama yöntemine örnek olarak gösterilebilir. Bu durumda Kalman filtresinin doğru sonuçlar verdiği benzetim çalışmalarında gösterilmiştir.

Benzetim çalışmalarında model denkleminde tek durum değişkeni olan substrat derişimi ölçüm modelinde yer almaktadır. Bu durumda ölçüm sistemini iyileştirmek için 2 farklı substrat derişim profilinin eş zamanlı olarak filtrelenebilir. Bu durumda durum değişkeni vektörü aşağıdaki gibi verilir:

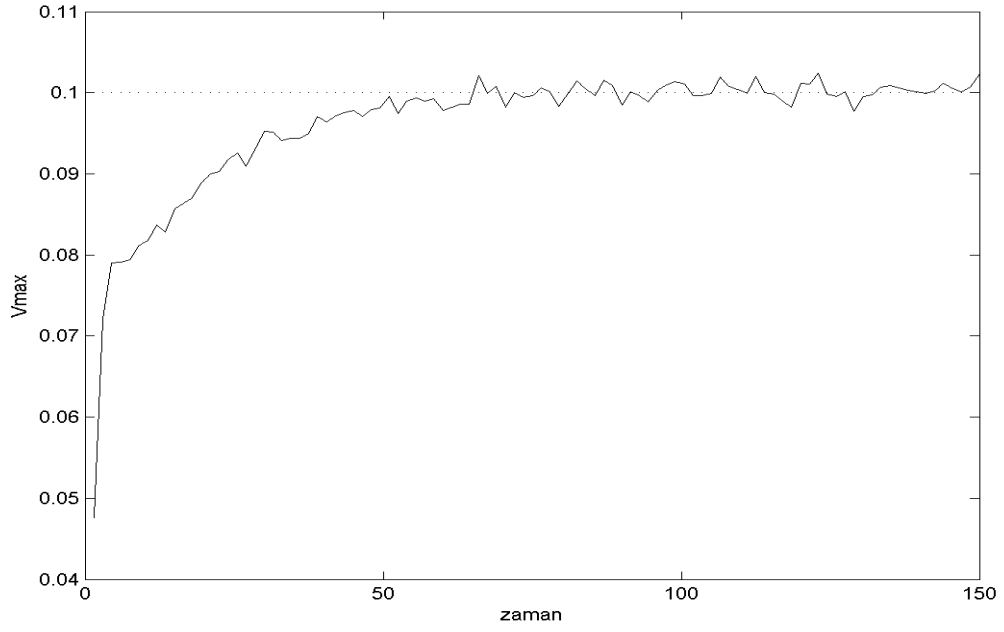
$$X(t_n) = \begin{bmatrix} S_A(t_n) \\ S_B(t_n) \\ V_{\max}(t_n) \\ K_m(t_n) \end{bmatrix} \quad (3.36)$$

Burada $S_A(t_n)$ ve $S_B(t_n)$ başlangıç substart derişimi farklı 2 reaksiyona ait substrat derişimlerini göstermektedir. Durum değışkeni vektörüne bağılı olarak ölçüm matrisi ve durum geçiş matrisi aşağıdaki gibi yazılabilir.

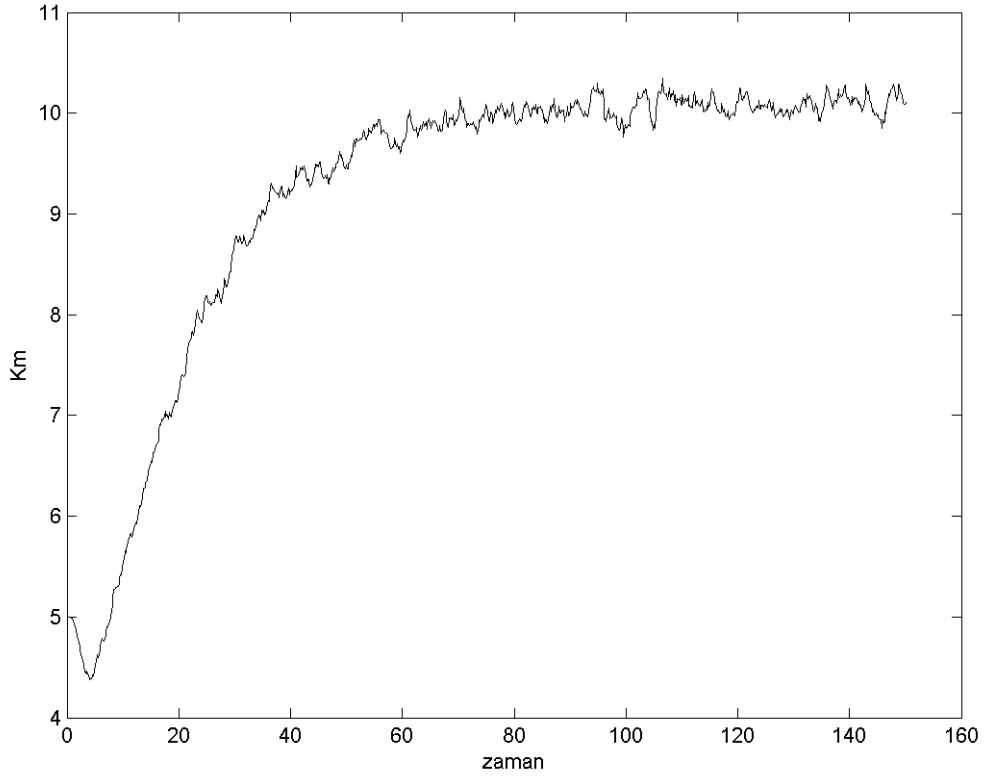
$$H = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (3.37)$$

$$\Phi = \begin{bmatrix} -\frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S_A)^2} & 0 & -\frac{S_A}{K_m + S_A} + \frac{V_{\max} K_m t S_A}{(K_m + S_A)^3} & \frac{V_{\max} S_A}{(K_m + S_A)^2} - \frac{V_{\max} K_m S_A \ln(S_0/S_A)}{(K_m + S_A)^3} \\ 0 & -\frac{V_{\max} K_m}{(K_m + S_B)^2} & -\frac{S}{K_m + S_B} + \frac{V_{\max} K_m t S_B}{(K_m + S_B)^3} & \frac{V_{\max} S_B}{(K_m + S_B)^2} - \frac{V_{\max} K_m S_B \ln(S_0/S_B)}{(K_m + S_B)^3} \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Benzetim çalışmalarında kullanılan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 10 ve 0.1'dir. Başlangıç substrat derişimleri için 20 ve 10 değerleri seçilmiştir. Benzetim çalışmalarında elde edilen kestirim sonuçları şekil 3.18 'de verilmiştir.



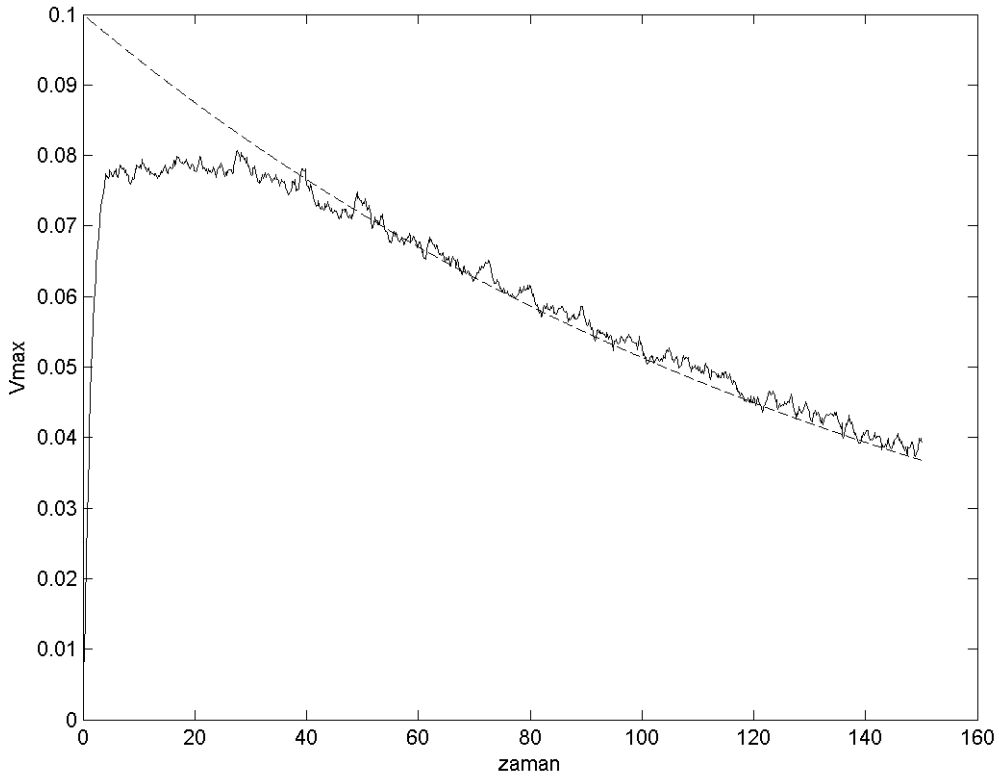
şekil 3.19: GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi.



Şekil 3.20: GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan K_m kestirimi.

Ölçüm sistemi 2 farklı substrat derişimini kapsayacak şekilde genişletildiğinde GKF'nin Michaelis-Menten parametrelerini doğru olarak kestirebildiği görülmüştür.

GKF'nin $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonu olduğu durumda V_{max} değerini gerçek değerine yakın olarak kestirebildiği yapılan benzetim çalışmalarında görülmüştür.



Şekil 3.21: Enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonunun gerçekleştiği reaksiyon için GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi. (•: Üssel olarak azalan gerçek V_{max} değeri, $V_{max}(t) = 0.1 \cdot \exp(-0.1t)$; -: GKF ile kestirilen V_{max})

Farklı substrat derişim profillerinin eş-zamanlı filtrelenmesi ile elde edilen parametre kestirimleri, önerilen diğer yöntem olan değişken sistem gürültü ilinti matrisi kullanımına göre enzim inaktivasyonu gibi parametrelerde değişime yol açabilecek modelleme hatalarını da takip edebildiği için daha avantajlıdır. Bunun yanında deneysel veri için daha fazla zaman gerekmesi ve maliyeti artırması bu yöntemin dezavantajları olarak gösterilebilir.

3.2 Deneysel Çalışma

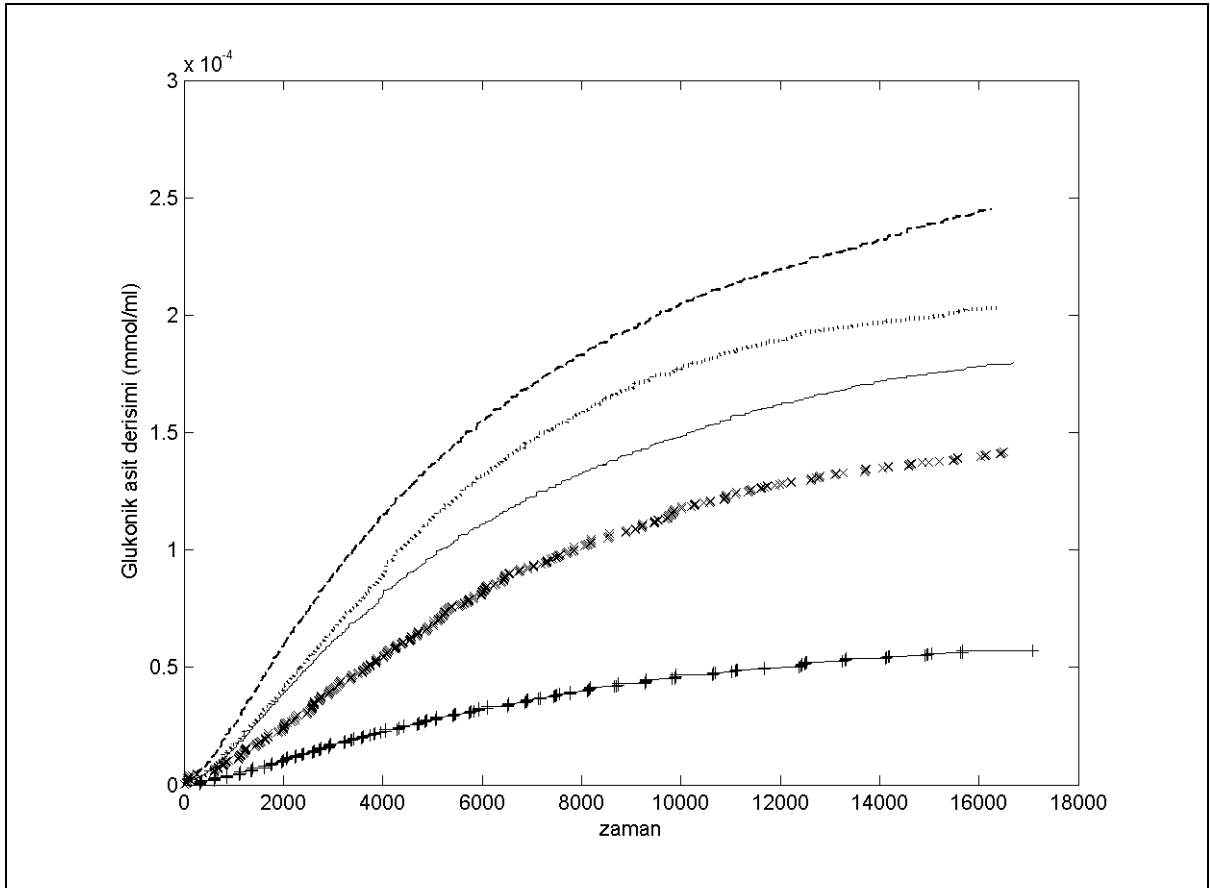
Tezin deneysel çalışma bölümünde serbest glukoz oksidaz enziminin kinetiği incelenmiştir. Glukoz oksidaz enzimi, glukozu glukonik asit ve hidrojen peroksida dönüştürür.



Reaksiyon sırasında oluşan glukonik asit ortam pH'sını düşürür. Ortam pH'sını sabit tutacak ölçüde, ortama baz çözeltisi verilirse, harcanan baz çözeltisi miktarı reaksiyon sonucu oluşan ürün miktarına

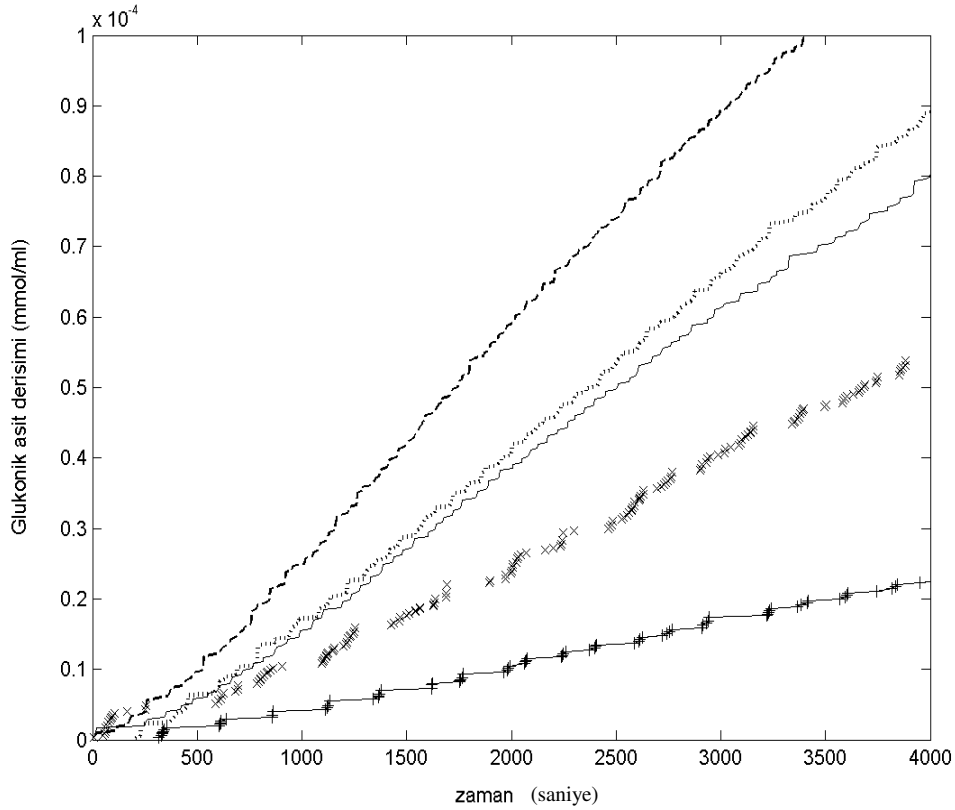
eşit olacaktır. Deneysel çalışmada Mettler-Toledo firmasından temin edilen pH-stat cihazı (DL21 titrator) kullanılmıştır. Cihaz yazıcı çıkışı üzerinden Labview (National Instruments tm) yazılımı kullanılarak bilgisayara bağlanmış ve elde edilen ölçümler metin dosyası olarak bilgisayara kaydedilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve pH=6.00'da sabit tutulmuştur. Deneyde dozajlama için 0.0028M NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Deneyler 100 ml karıştırılmalı reaktörde gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan β -glukoz, Sigma firmasından, glukoz oksidaz enzimi (EC 1.1.3.4) Biozyme Laboratories Limited (İngiltere) firmasından temin edilmiştir.

Glukoz oksidaz enzimi için farklı başlangıç substrat derişimleri ile elde edilen ürün derişim profilleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.22: Farklı başlangıç glukoz derişimleri için glukonik asit derişim profilleri (+: $1.4479 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, x: $3.5255 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, -: $4.4465 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, •: $5.8886 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, --: $7.4402 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml).

Reaksiyon hızları başlangıçta yavaş artmakta, gecikme fazı sonrası doğrusal artış göstermektedirler (Şekil 3.22). Bu durumun sebebi enzim-substrat kompleksinin dengeye gelme süresinin uzun olması olabilir. Gecikme fazını oluşturan başka nedenler; enzim stok çözeltisinde oligomer yapıda bulunan enzimin monomer yapıda etkili olması ve monomer yapıya dönüşmesinin zaman alması, ortamda tersinir karakterde inhibitör bulunması olarak sıralanabilir (Copeland, 2004).



Şekil 3.23: Farklı başlangıç glukoz derişimleri için reaksiyon başlangıcındaki glukonik asit derişim profilleri (+: $1.4479 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, x: $3.5255 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, -: $4.4465 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, •: $5.8886 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml, --: $7.4402 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml).

4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Derişim profillerinde gecikme fazının görölmesi nedeni ile ilk-hız ölçümleri ile Michaelis-Menten parametrelerinin kestirimi doğru sonuçlar verememektedir. Michaelis-Menten denkleminin sayısal olarak çözümlüp deneysel eğrileri uydurulması da, gecikme fazı nedeniyle doğru sonuç verememektedir. Michaelis-Menten parametrelerinin kestirimi için tezin önceki bölümünde oluşturulan GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ kullanılmıştır. Parametre kestirimi için 2 substrat derişim profili ($S_A(0) = 3.5255 \cdot 10^{-4}$, $S_B(0) = 7.4402 \cdot 10^{-4}$) kullanılmıştır. Filtre denklemlerinde kullanılan sabit matrisler ve başlangıç tahminleri aşağıda verilmiştir.

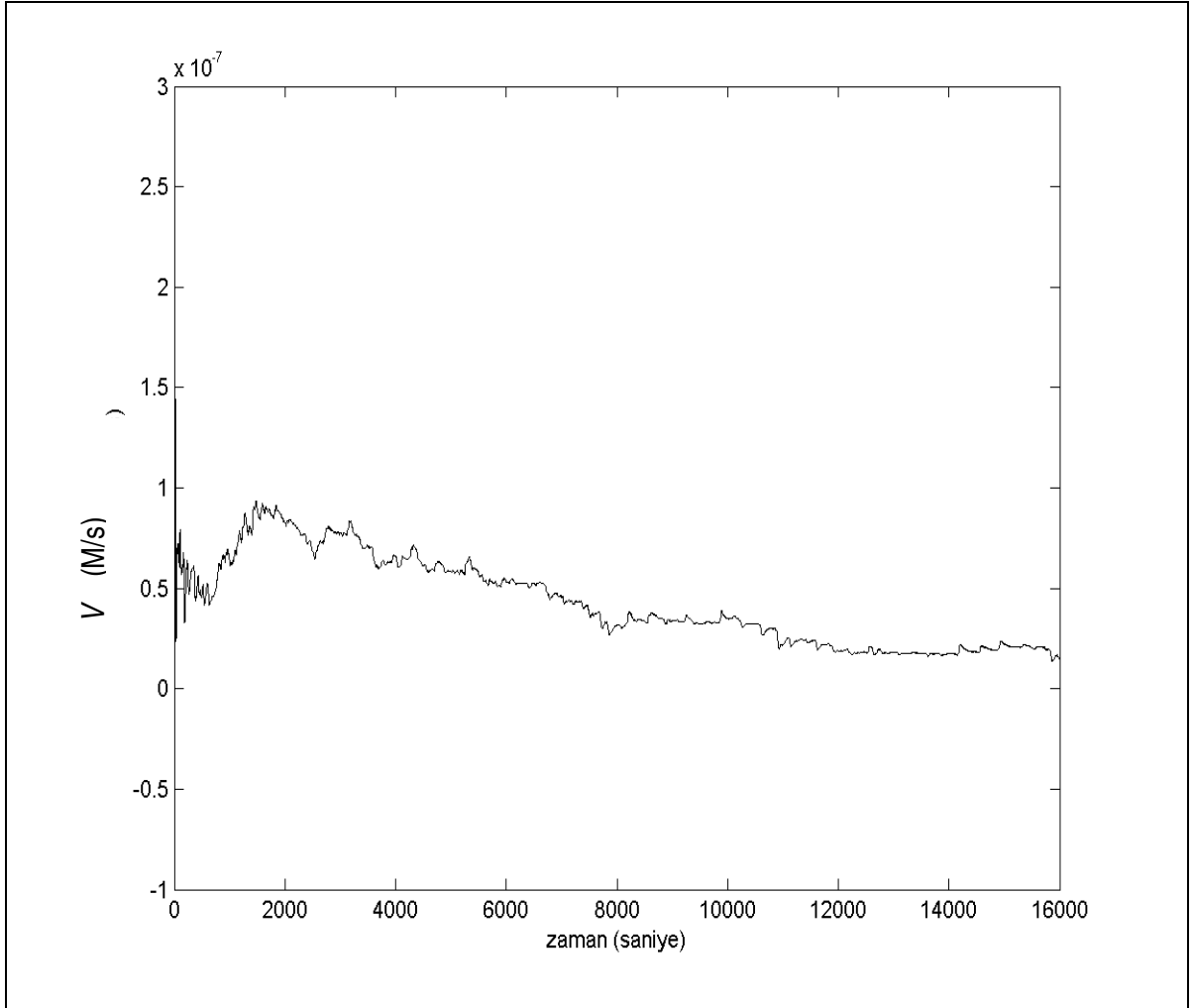
$$Q = \begin{bmatrix} 1.10e^{-4} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1.10^{-4} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1.10^{-8} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1.10^{-2} \end{bmatrix}$$

$$R = \begin{bmatrix} 0.001 & 0 \\ 0 & 0.001 \end{bmatrix}$$

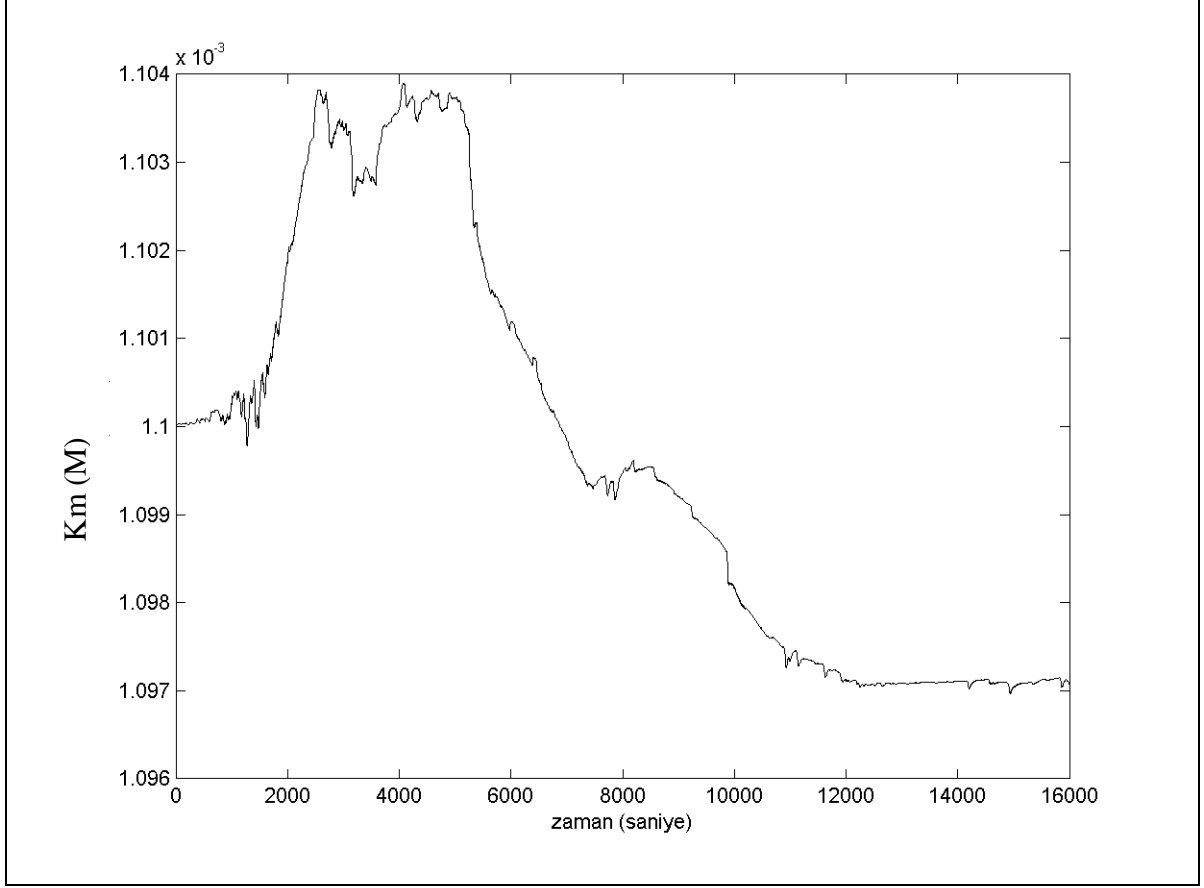
$$X_0^+ = \begin{bmatrix} 3.5255 \cdot 10^{-4} \\ 7.4402 \cdot 10^{-4} \\ 3 \cdot 10^{-7} \\ 0.0011 \end{bmatrix}$$

$$P_0^+ = \begin{bmatrix} 0.001 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.001 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Kalman filtresi ile yapılan parametre kestirimleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1, 4.2).



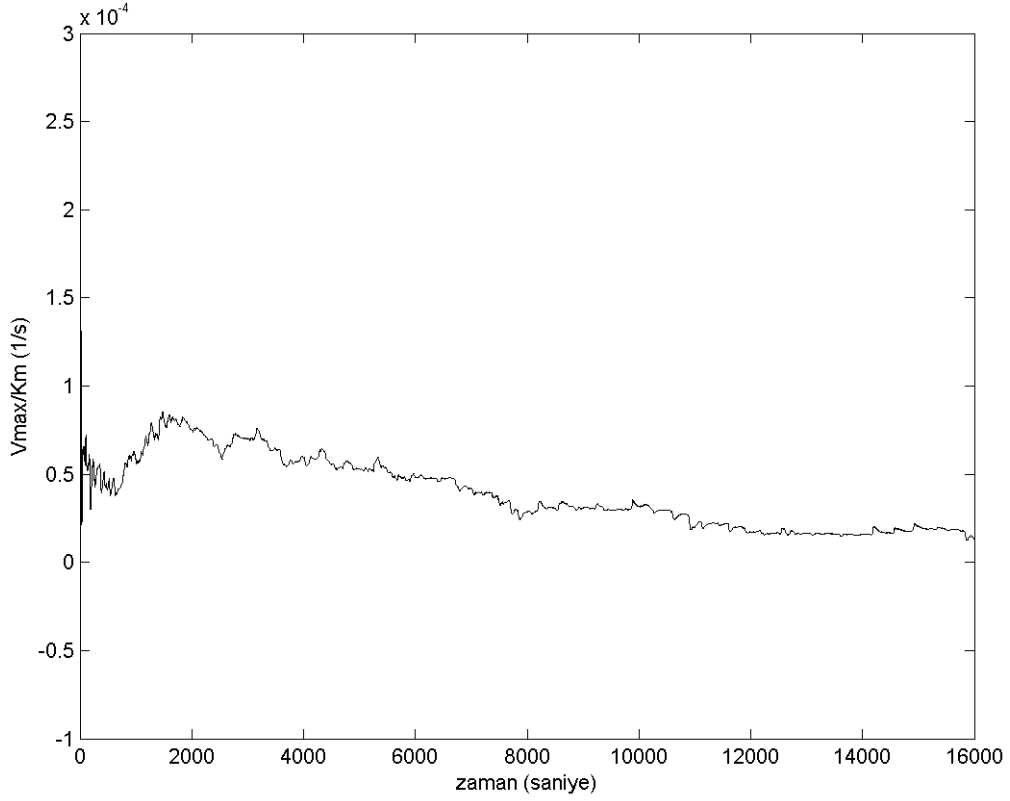
Şekil 4.1: GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} kestirimi.



Şekil 4.2: GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan K_m kestirimi.

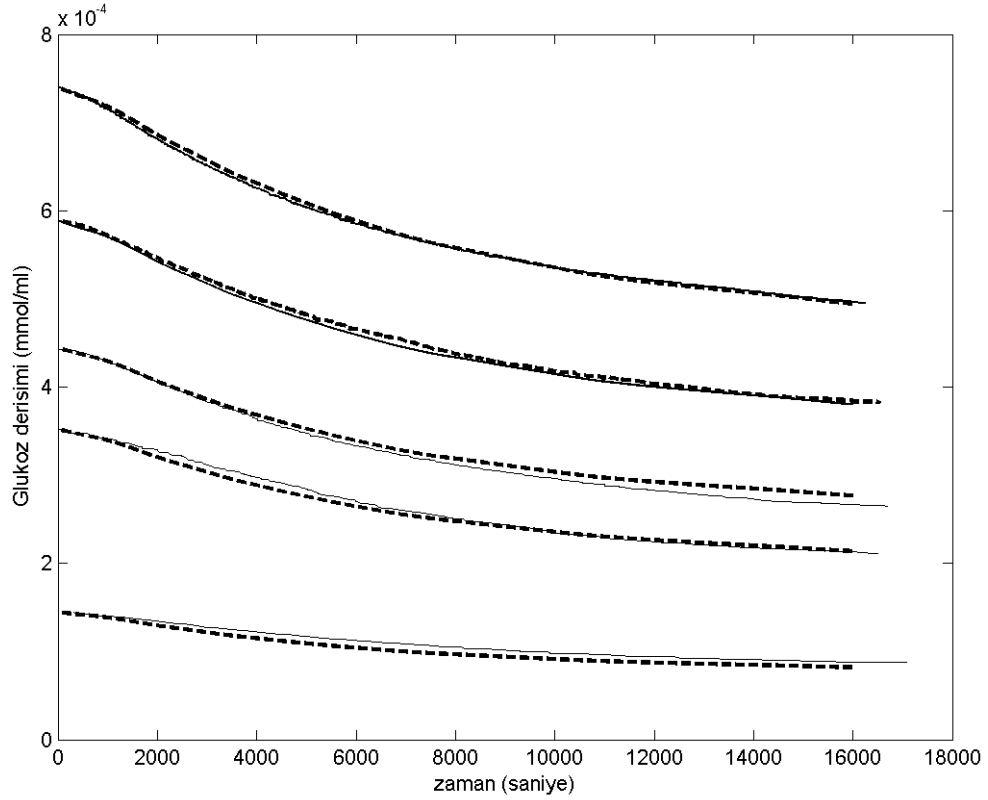
Kalman filtresi ile yapılan V_{max} kestirimi incelendiğinde kestirimin başlangıç anında $0.5 \cdot 10^{-7}$ M/s değerinde dip değerine ulaştığı daha sonra hızla artarak $1 \cdot 10^{-7}$ M/s değerine ulaşmaktadır. Bu süreç reaksiyon başlangıcında ilk 2000 saniyelik kısma denk gelmektedir. V_{max} 'ın tepe değerine ulaşması ile gecikme fazı sona ermektedir. Daha sonra V_{max} 'ın üssel olarak azaldığı görülmektedir. K_m değerindeki değişimde V_{max} 'a koştur özellik gösterebilir K_m 'nin reaksiyon başlangıç hızına etkisi V_{max} 'a göre çok daha düşük olduğu için ve K_m 'deki değişimin $\pm 0.5\%$ olması nedeni ile V_{max} 'daki değişim enzimin kinetik davranışını açıklama açısından daha önemlidir. Glukoz oksidaz enzimine ait K_m değeri $1.1 \cdot 10^{-3}$ M olarak bulunmuştur.

Elde edilen V_{max} ve K_m kestirimlerinin oranı kullanılarak V_{max}/K_m oranı hesaplanabilir (Şekil 4.3). GKF'nin V_{max}/K_m oranını kestirmekte daha başarılı olduğu tezin önceki bölümlerinde yapılan benzetim çalışmalarında gösterilmiştir. K_m kestiriminin zaman içindeki değişimi düşük olduğu için V_{max}/K_m oranı ile V_{max} kestirimi benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.3: GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$ ile yapılan V_{max} ve K_m kestirimlerinin oranı.

GKF ile kestirilen V_{max} ve K_m değerleri kullanılarak Michaelis-Menten denkleminin sayısal çözümü elde edilmiş ve deneysel olarak elde edilen substart derişim profilleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Deneyşel glukoz derişim profilleri ile GKF kullanılarak elde edilen kestirimler ile çizilen kuramsal eğrilerin karşılaştırılması. (—: deneyşel eğri ; - -:Michaelis-Menten denkleminin sayısal olarak çözülmesi ile elde edilen eğri).

Model parametrelerinin kestiriminde kullanılan eğriler dışında modelin geçerliliğini ölçmek için diğer deneyşel eğrilerde model denklemi kullanılarak hesaplanan eğrilerle de uyuşmaktadır. Bu da Kalman filtresinin Michaelis-Menten parametrelerinin kestiriminde başarılı olduğunu gösterir.

Enzim inaktivasyonun modellenmesi için GKF ile elde edilen V_{max} kestirimi 2 kısımda incelenebilir:

- Reaksiyon başlangıcında görünen gecikme fazı
- Gecikme fazı sonrası görünen V_{max} 'ın 1. derece kinetiğe uyarak üssel olarak azaldığı kısım.

Gecikme fazında V_{max} 'ın doğrusal olarak arttığı varsayımı yapılabilir. Bu durumda en küçük kareler yöntemi ile aşağıdaki doğru denklemi elde edilir.

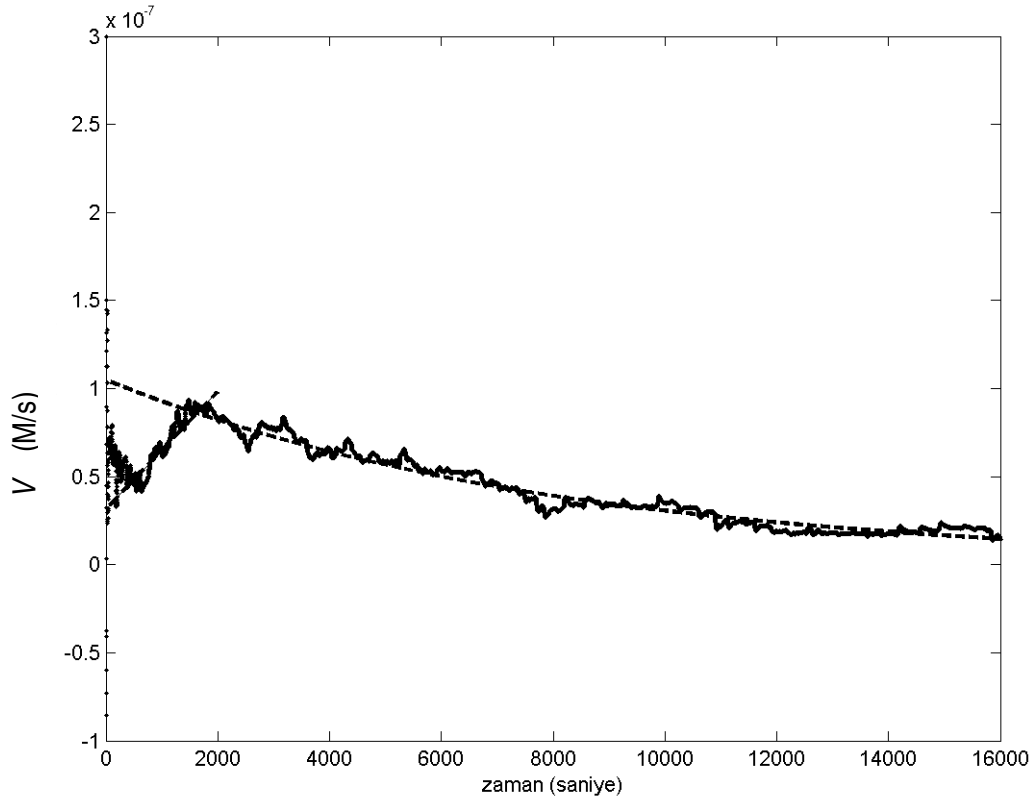
$$V_{max} = 3.1322 \cdot 10^{-8} + 3.3378 \cdot 10^{-11} t \quad t < 2000 \quad (4.1)$$

V_{max} 'ın üssel olarak azaldığı kısım ise aşağıda verilen denklemle modellenebilir.

$$V_{max}(t) = V_{max}(0) \cdot \exp(-k_{in} t) \quad (4.2)$$

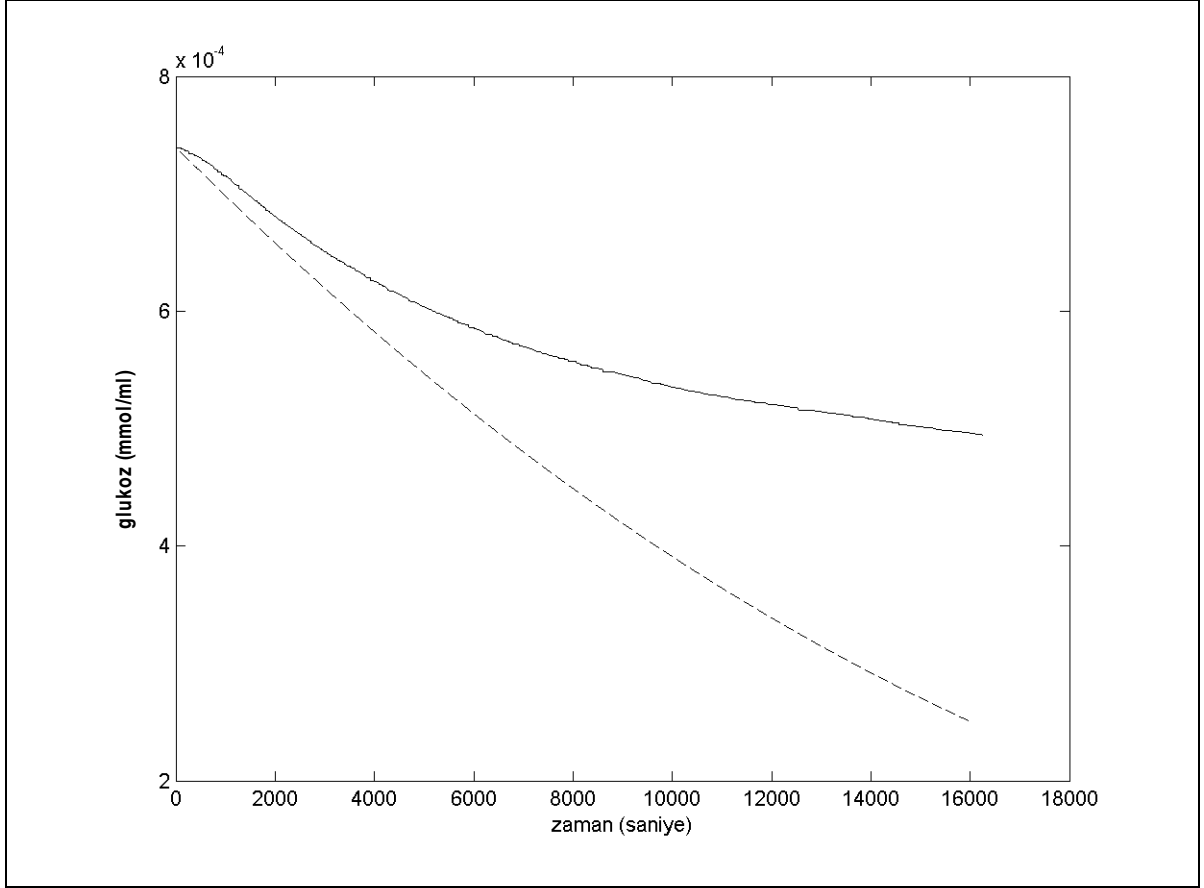
Burada k_{in} enzim parçalanma sabitini gösterir.

GKF ile kestirilen V_{max} değerlerinin en küçük kareler yöntemi ile analiz edilmesi sonucu $t=0$ 'daki V_{max} değeri $1.048 \cdot 10^{-7}$ M/s ve k_{in} değeri $1.23 \cdot 10^{-4}$ 1/s olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler kullanılarak elde edilen modele ait V_{max} eğrisi ile Kalman filtresi kullanılarak elde edilen V_{max} kestirimleri Şekil 3.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: GKF ile yapılan V_{max} kestirimin 1. derece kinetik varsayımı yapılarak modellenmesi. (—: GKF kullanılarak elde edilen V_{max} kestirimi ; ---: V_{max} 'ın üssel olarak azaldığı varsayımına dayanan model denklemleri kullanılarak elde edilen eğri.)

V_{max} 'ın üssel olarak azaldığı varsayımına model GKF kullanılarak kestirilen V_{max} değerleri ile uyumaktadır. Başlangıç anındaki V_{max} değeri ve K_m değeri kullanılarak elde edilen substrat derişim profili ve deneysel olarak elde edilen substrat derişim profili Şekil 4.6'da karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.6 : GKF ile kestirilen K_m değeri ve $t=0$ için hesaplanan V_{max} değeri ile hesaplanan kuramsal substrat derişim profilinin deneyel substrat profili ile karşılaştırılması. (- - : Kuramsal hesaplanan ($V_{max}=1.048 \cdot 10^{-7}$ M/s, $K_m= 1.1 \cdot 10^{-3}$ M), - :deneyel veri)

5.SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında Michaelis-Menten denklemini model olarak alan Genişletilmiş Kalman Filtreleri tasarlanmış, tasarlanan filtrelerin kestirim performansı benzetim çalışmaları ile incelenmiştir. Deneysel çalışma kısmında ise Glukoz oksidaz enziminin Michaelis-Menten kinetiğine tamamen uyumlu olmadığı bulunmuş ve GKF kullanılarak yapılan kestirimlerden glukoz oksidaz enziminin reaksiyon boyunca parçalandığı model önerilmiş ve modelin geçerli olduğu deneysel verilerle gösterilmiştir.

Michaelis-Menten denklemi hiperbolik bir eğri tanımlaması nedeniyle farklı alanlarda kullanılan modellere benzerlik göstermektedir. Michaelis-Menten denklemi, mikrobiyal üremenin modellenmesinde kullanılan Monod denklemi, adsorpsiyon süreçlerinin modellenmesinde kullanılan Langmuir izotermi ile matematiksel olarak özdeştir. Bunun yanında ilaçların kontrollü salınımında da Michaelis-Menten denklemine uyan kinetik davranış görülebilmektedir. Bu sebepten dolayı yapılan benzetim çalışmalarından çıkarılan sonuçların, GKF'nin yukarıda geçen farklı süreçlere uygulanması için de geçerli olduğu söylenebilir.

Yapılan benzetim çalışmalarında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- GKF'nin V_{max} ve K_m değerlerini ayrı ayrı olarak kestirebildiği ayrıca substrat inhibisyonun olduğu durumda görünen K_m değerini ve enzim parçalanmasına dayalı inaktivasyonun gerçekleştiği durumda V_{max} değerini doğru kestirebildiği gösterilmiştir.
- Her iki parametrenin eş zamanlı kestiriminde ise filtrenin parametrelerin gerçek değerini kestiremediği fakat başlangıç değerine bağlı olarak verilen substrat derişim profiline uyan V_{max} - K_m çiftini kestirebildiği ve V_{max}/K_m oranını da doğru olarak kestirebildiği gösterilmiştir.
- Filtrenin eş zamanlı kestirim performansını artırabilmek için sistem gürültüsü ilinti matrisinin zamanla değiştiği ve 2 farklı substrat profilinin aynı anda işlendiği filtreler tasarlanmış ve Michaelis-Menten parametrelerinin eş-zamanlı olarak GKF kullanılarak kestirilebileceği gösterilmiştir.

Yapılan deneysel çalışmada glukoz oksidaz enziminin kinetik davranışı incelenmiş ve bu enzime ait Michaelis-Menten parametrelerinin kestirimi Genişletilmiş Kalman Filtresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen V_{max} ve K_m kestirimleri kullanılarak farklı başlangıç substrat derişimleri için Michaelis-Menten denklemi sayısal olarak çözülmüş ve enzime ait K_m değeri $1.1 \cdot 10^{-3}$ M olarak bulunmuştur. V_{max} değerinin reaksiyon başlangıcında doğrusal olarak arttığı ve tepe değerine ulaştıktan sonra üssel olarak azaldığı ve bu azalmanın 1. derece kinetik davranış gösterdiği bulunmuştur. Zamana karşı değişen V_{max} 1. derece reaksiyon kinetiğinin model alındığı en küçük kareler yöntemi ile analiz edilmiş ve başlangıç anındaki V_{max} değeri $1.048 \cdot 10^{-7}$ M/s olarak bulunmuştur. V_{max} 'ın üssel olarak azalmasının nedeni enzimin reaksiyon boyunca parçalanması ile açıklanmış ve bu parçalanma için 1. derece kinetik sabiti $1.23 \cdot 10^{-4}$ 1/s olarak bulunmuştur.

6.KAYNAKLAR

- Askelöf, P., Korsfeldt, M. and Mannervik, B., 1976, Eur. J. Biochem. 69, s61-67.
- Bard, Y., 1974. Nonlinear parameter estimation. Academic Press, New York and London, 286s.
- Baker, C.T.H., Bocharov, G.A., Paul, C.A.H., Rihan, F.A., 2005. Computational modeling with functional differential equations: Identification, selection and sensitivity. Applied Numerical Math. 53, s107-129.
- Borghans, J.A.M., De Boer, R.J., Segel, L.A., 1996. Extending thequasi-steady state approximation by changing variables. Bull. Math. Biol. 58, s43–63.
- Briggs, G.E., Haldane, J.B.S., 1925. A note on the kinetics of enzyme action. Biochem. J. 19, s338–339.
- Brown, A.J., J. Chem. Soc. Trans. 81 (1902) 373.
- Chui, C.K., Chen, G., 1987, Kalman filtering with real-time applications, Springer-Verlag.
- Copeland, R.A., 2000, Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis, John Wiley & Sons, Inc. ,Publication, 384s.
- Duggleby, R.G. 1981, Experimental designs for the distribution-free analysis of enzyme kinetic data, Kinetic Data Analysis, Editor: Endreyini, L., Plenum Press, s169-181.
- Grewal, M.S., Andrews, A. P., 2001, Kalman filtering: theory and practice using matlab, John Wiley & Sons.
- Heineken, F.G., Tsuchiya, H. M., Aris, R., 1967. On the accuracy of determining rate constants in enzymatic reactions. Mathematical Biosciences 1 s115-141.
- Hitzmann, B., Broxtermann, Cha, Y.-L., Sobieh, Stark, E., Scheper, T., 2000, The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter, Bioprocess Engineering 23 s337-341.
- Jimenez-Prieto R., Velasco A., Silva M., Perez-Bendito D., 1993, Kalman filtering of data from first and second-order kinetics, Talanta, Vol:10 no:11, s1731-1739.
- Kozhukharova, A., Kirova, N., Popova, Y., Batsalova, K., 1988, Properties of glucose oxidase immobilized in gel of polyvinylalcohol. Biotechnol Bioeng; 32; s245-8.
- Lai, H., K., 1993, Application of the extended Kalman filter to enzyme reactions, Yüksek Lisans Tezi, Imperial College, University of London. London, 105s.
- Lewis, F., L., 1986, Optimal estimation with an introduction to stochastic control theory, Wiley-Interscience Publicaton, 342s.
- Michaelis, L., Menten, M.L., 1913. Die kinetik der invertinwirkung. Biochem. Z. 49, s333–369.

- Miron, J., Gonzales, M.P., Vazquez, J.A., Pastrana, L., Murado M.A., 2004, A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions, *Enzyme and Microbial Technology*, 34; s513-522.
- Mok, K., Chau F., 1996, Application of the extended Kalman filter for analysis of a consecutive first order reaction, *Trends in Analytical Chemistry*, vol 15 no 4 s170-174.
- Monfre, S.L., Brown, S.D., 1987, Estimation of ester hydrolysis parameters by using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and the extended Kalman filter, *Analytica Chimica Acta*, 200 s397-410.
- Mutlu, M., Mutlu, S., Alp, B., Boyacı İ. H., Pişkin E., 1997, Preparation of a single layer enzyme electrode by plasma polymerisation technique, *Plasma Processing of Polymers*, Ricardo D'Agustino ve ark., (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, s477-485.
- Nicol, M.J., Duke, F.R., 1996, Substrate inhibition with glucose oxidase. *J Biol Chem*, 241(18); 4292-3.
- Nimmo, I.A. and Mabood, S.F., 1979, *Anal. Biochem.* 94, s265-269.
- Nimmo, A.L., Atkins, G.L., 1981, Errors associated with the determination of the initial velocities of enzyme-catalyzed reactions, *Kinetic Data Analysis*, Endreyne, L., Plenum Press, s309-315.
- Richter, G., 1983, Glucose oxidase, *Industrial enzymology the application of enzymes*, Godfrey T., Reichlet J., s429-436.
- Ronald, G. Duggleby, 2001, Quantitative Analysis of the Time Courses of Enzyme-Catalyzed Reactions, *Methods* 24, s168–174.
- Rutan, C.S., Brown, S.D., 1984 Estimation of first-order kinetic parameters by using the extended Kalman filter, *Analytica Chimica Acta*, 167 s23-37.
- Rutan, C.S., Brown, S.D., 1985 Two-dimensional and three-dimensional fitting of enzyme kinetic data with the Kalman filter, *Analytica Chimica Acta*, 175 s219-229.
- Rutan, C.S., Fitzpatrick, C.P., Skoug, J.W., Weiser, W.E., Pardue, H.L., 1989, Comparison of the extended Kalman filter and Marquardt algorithms for processing kinetic data, *Analytica Chimica Acta*, 224 243-261.
- Segel, L.A., 1988, On the validity of the steady-state assumption of enzyme kinetics. *Bull. Math. Biol.* 50, 579–593.
- Schmidt, S. F., 1970, "Computational techniques in Kalman filtering", in *Theory and application of kalman filtering*, AGARDograph 139, NATO Advisory Group for aerospace Research and development, Londra.
- Schmidt, S. F., 1976, "Practical aspects of Kalman filtering implementation", AGARD LS 82, NATO Advisory Group for aerospace Research and development, Londra

- Siano, D. B. , Zyskind, J.W. and Fromm, H.J. , 1975 Arch. Biochem. Biophys. 170, s587-600
- Stigter, J. D., Beck, M. B., 2004, On the development and application of a continuous-discrete recursive prediction error algorithm, Mathematical Biosciences, 191 s143-158.
- Storer, A. C., Darlinson, M.G. and Fromm, H.J. 1975, Arch. Biochem. J. 151, s361-367.
- Tse, P.H.S., Gough, D.A.,1987, Time-dependent inactivation of immobilized glucose oxidase and catalase, Biotechnol Bioeng, 29; s705-713.
- Wentzell, P.D., Vanslyke, S.J., 1992, Parallel Kalman filter networks for kinetic methods of analysis, Analytica Chimica Acta, 257 s173-181.

7. EKLER DİZİNİ

EK-1. MICHAELİS-MENTEN DENKLEMİNİN TAYLOR SERİSİ AÇILIMI İLE DOĞRUSALLAŞTIRILMASI.....	61
EK 2. GENİŞLETİLMİŞ KALMAN FİLTRELERİ İÇİN MATLAB KODLARI	63

EK 1. MICHAELİS-MENTEN DENKELMİNİN TAYLOR SERİSİ AÇILIMI KULLANILARAK DOĞRUSALLAŞTIRILMASI

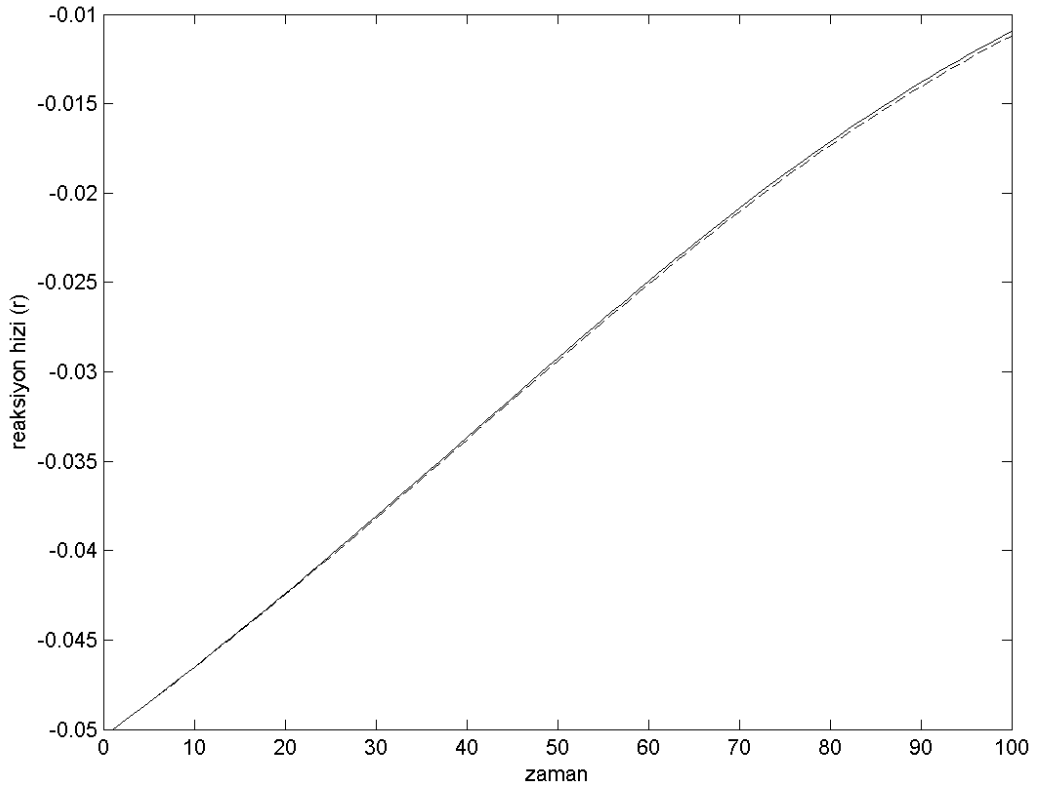
GKF'nin verimli olarak çalışabilmesi için sistem model denkleminin Taylor serisi açılımında 2 ve daha yüksek dereceli terimlerin ihmal edilebilecek kadar düşük olmaları gerekmektedir. Michaelis-Menten denkleminin Taylor serisi ile açılımı aşağıdaki gibi verilebilir.

$$r(t_{n+1}) = r(t_n) + (S(t_{n+1}) - S(t_n)) \frac{dr(t_n)}{dS} + \sum_{i=2}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n r}{dS^n} (S(t_{n+1}) - S(t_n))^n \quad (7.1)$$

Burada toplam terimi ihmal edilirse hız için doğrusal bir denklem elde edilmektedir.

$$r(t_{n+1}) = r(t_n) + (S(t_{n+1}) - S(t_n)) \frac{dr(t_n)}{dS} \quad (7.2)$$

İki ve daha büyük dereceli terimlerin ihmal edilmesi ile oluşan hatayı belirlemek amacıyla $V_{max}=0.1$, $K_m=10$ parametreleri ile başlangıç substrat derişimi $S(0)=10$ alınarak 4. dereceden Runge-Kutte yöntemi ile Michaelis-Menten denklemi çözülmüştür. Çözümde adım aralığı 0.3 olarak alınmıştır. Elde edilen substrat derişimi kullanılarak hız ifadesi Michaelis-Menten denklemi kullanılarak analitik olarak hesaplanmıştır. Denklem 7.1 $r(0) = -0.05$ başlangıç değeri kullanılarak çözülmüş ve iki denklem ile elde edilen hızlar karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.1: Michaelis-Menten denklemine göre hesaplanan reaksiyon hızının, Taylor serisi açılımı kullanılarak hesaplanan hızın karşılaştırılması. (-: Michaelis-Menten denklemi, - -: Taylor serisi açılımı).

Şekil 7.1'de görüldüğü gibi doğrusal denklem ile elde edilen hız değerleri, Michaelis-Menten denklemi ile elde edilen hız değerlerine çok yakındır. Dolayısıyla Michaelis-Menten denkleminin Taylor serisi açılımı ile doğrusallaştırılması sonucu ortaya çıkan hata ihmal edilebilir.

EK 2. GENİŞLETİLMİŞ KALMAN FİLTRELERİ İÇİN MATLAB KODLARI

1.GKF $\{S, V_{max}\}$

So=10; Km=10; Vmax=.1; h=.12; S(1)=So; ss(1)=So;

for i=1:1000

Vmax(i)=0.1;%*exp(-0.005*h*i);

k1(i)=-h*Vmax(i)*S(i)/(Km+S(i));

k2(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k1(i)/2)/(Km+S(i)+k1(i)/2);

k3(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k2(i)/2)/(Km+S(i)+k2(i)/2);

k4(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k3(i))/(Km+S(i)+k3(i));

S(i+1)=S(i)+k1(i)/6+k2(i)/3+k3(i)/3+k4(i)/6;

ss(i+1)=S(i+1);

end

for i=1:1001

z(i)=ss(i) + randn*0.1;

end

Q=[0.010 0; 0 .0005];

R=0.1;

Xilk(:,1)=[10;.01];

Xson(:,1)=[10;.01];

H=[1,0];

Pson(:,1)=[0.001 0; 0 .001];

Km=10;

for i=1:1000

sk1(i+1)=-h*Xson(2,i)*Xson(1,i)/(Km+Xson(1,i));

sk2(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk1(i)/2)/(Km+Xson(1,i)+sk1(i)/2);

sk3(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk2(i)/2)/(Km+Xson(1,i)+sk2(i)/2);

sk4(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk3(i))/(Km+Xson(1,i)+sk3(i));

Xilk(:,i+1)=[(Xson(1,i)+sk1(i)/6+sk2(i)/3+sk3(i)/3+sk4(i)/6);Xson(2,i)];

sigma(:,i)=[(-Xilk(2,i)*Km/((Km+Xilk(1,i))^2))*h,h*(((Xilk(1,i)*Xilk(2,i)*Km*h*(i-1))-
(Xilk(1,i)*((Km+Xilk(1,i))^2)))/((Xilk(1,i)+Km)^3)) ;0,1];

Pilk(:,i+1)=sigma(:,i)*Pson(:,i)*sigma(:,i)'+Q;

K(:,i)= Pilk(:,i+1)*H'*inv(H*Pilk(:,i+1)*H' + R);

Pson(:,i+1)=(eye(2)- K(:,i)*H)*Pilk(:,i+1)*(eye(2)-K(:,i)*H)' + (K(:,i)*R*K(:,i)');

Xson(:,i+1)=Xilk(:,i+1) + K(:,i)*(z(i+1) - Xilk(1,i+1));

end

subplot(2,1,2);plot(h*(1:1001),Xson(2,:), 'k',h*(1:1000),Vmax, 'k');

xlabel('zaman'), ylabel('Vmax kestirimi')

subplot(2,1,1);plot(h*(1:1001),ss, 'k',h*(1:1001),z, 'r'); xlabel('zaman'),ylabel('Substrat derisimi
kestirimi')

2.GKF {S, K_m}

So=10; Km=10; Vmax=.1; h=.17; S(1)=So; ss(1)=So;

for i=1:1000

KI=.05; %substart inhibisyon sabiti

KII(i)=10+ (S(i)^2)*.05;

k1(i)=-h*Vmax(1)*S(i)/(Km+S(i)+KI*S(i)^2);

k2(i)=-h*Vmax(1)*(S(i)+k1(i)/2)/(Km+S(i)+k1(i)/2 +KI*(S(i)+k1(i)/2)^2);

k3(i)=-h*Vmax(1)*(S(i)+k2(i)/2)/(Km+S(i)+k2(i)/2+KI*(S(i)+k2(i)/2)^2);

k4(i)=-h*Vmax(1)*(S(i)+k3(i))/(Km+S(i)+k3(i)+KI*(S(i)+k3(i)/1)^2);

S(i+1)=S(i)+k1(i)/6+k2(i)/3+k3(i)/3+k4(i)/6;

ss(i+1)=S(i+1);

end

for i=1:1001

z(i)=ss(i) + randn*0.1;

end

Q=[0.000100 0; 0 .0005];

R=0.005;

Xilk(:,1)=[10;5];

Xson(:,1)=[10;5];

H=[1,0];

```
Pson(:, :, 1)=[0.001 0; 0 10];
```

```
Vmax=.10;
```

```
for i=1:1000
```

```
    sk1(i+1)=-h*Vmax*Xson(1,i)/(Xson(2,i)+Xson(1,i));
```

```
    sk2(i+1)=-h*Vmax*(Xson(1,i)+sk1(i)/2)/(Xson(2,i)+Xson(1,i)+sk1(i)/2);
```

```
    sk3(i+1)=-h*Vmax*(Xson(1,i)+sk2(i)/2)/(Xson(2,i)+Xson(1,i)+sk2(i)/2);
```

```
    sk4(i+1)=-h*Vmax*(Xson(1,i)+sk3(i))/(Xson(2,i)+Xson(1,i)+sk3(i));
```

```
    Xilk(:, i+1)=[(Xson(1,i)+sk1(i)/6+sk2(i)/3+sk3(i)/3+sk4(i)/6);Xson(2,i)];
```

```
    sigma(:, :, i)=[(-Vmax*Xilk(2,i)/((Xilk(2,i)+Xilk(1,i))^2)),...
```

```
        (( Vmax*Xilk(1,i)/((Xilk(2,i)+Xilk(1,i))^2)) - ...
```

```
        ((-Xilk(1,i)*Vmax*Xilk(2,i)*log(So/(Xilk(1,i)))))/...
```

```
        ((Xilk(1,i)+Xilk(2,i))^3));0,1];
```

```
    Pilk(:, :, i+1)=sigma(:, :, i)*Pson(:, :, i)*sigma(:, :, i)' + Q;
```

```
    K(:, i)= Pilk(:, :, i+1)*H'*inv(H*Pilk(:, :, i+1)*H' + R);
```

```
    Pson(:, :, i+1)=(eye(2)- K(:, i)*H)*Pilk(:, :, i+1)*(eye(2)-K(:, i)*H)'...
```

```
        + (K(:, i)*R*K(:, i)');
```

```
    Xson(:, i+1)=Xilk(:, i+1) + K(:, i)*(z(i+1) - Xilk(1,i+1));
```

```
end
```

```
subplot(2,1,1);plot(h*(1:1001),Xson(1,:), 'k', h*(1:1001), z);
```

```
xlabel('zaman'),ylabel('substrat derisimi kestirimi ')
```

```
subplot(2,1,2);plot(h*(1:1000),KII,h*(1:1001),Xson(2,:));
```

```
xlabel('zaman'),ylabel('Km kestirimi')
```

3.GKF $\{S, V_{max}, K_m\}$

```
So=10; Km=10; Vmax=.10; h=.20; N=1000; S(1)=So;
```

```
for i=1:N
```

```
    Vmax(i)=0.10;%*exp(-0.001*i);
```

```
    k1(i)=-h*Vmax(i)*S(i)/(Km+S(i));
```

```
    k2(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k1(i)/2)/(Km+S(i)+k1(i)/2);
```

```
    k3(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k2(i)/2)/(Km+S(i)+k2(i)/2);
```

```
    k4(i)=-h*Vmax(i)*(S(i)+k3(i))/(Km+S(i)+k3(i));
```

```
    S(i+1)=S(i)+k1(i)/6+k2(i)/3+k3(i)/3+k4(i)/6;
```

```
end
```

```
for i=1:N+1
```

```
    z(i)=S(i) + randn*0.001;
```

```
end
```

```
R=0.00001;
```

```
Xilk(:,1)=[10;.05;5];
```

```
Xson(:,1)=[10;.05;5];
```

```
H=[1,0,0];
```

```
Pson(:,1)=[0.01 0 0 ; 0 2 0 ;0 0 5];
```

```
for i=1:N
```

```
    %zamanla azalan hata ilinti matrisi
```

```
    Q=[ 0.0000001,0,0;0,exp(-i*.1)*.0050,0 ; 0,0,.00001];%exp(i/500)*0.0005];
```

```

sk1(i+1)=-h*Xson(2,i)*Xson(1,i)/(Xson(3,i)+Xson(1,i));
sk2(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk1(i)/2)/(Xson(3,i)+Xson(1,i)+sk1(i)/2);
sk3(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk2(i)/2)/(Xson(3,i)+Xson(1,i)+sk2(i)/2);
sk4(i+1)=-h*Xson(2,i)*(Xson(1,i)+sk3(i))/(Xson(3,i)+Xson(1,i)+sk3(i));
Xilk(:,i+1)=[(Xson(1,i)+sk1(i)/6+sk2(i)/3+sk3(i)/3+sk4(i)/6);Xson(2,i);Xson(3,i)];
sigma(:,i)=[(-Xilk(2,i)*Xilk(3,i)/((Xilk(3,i)+Xilk(1,i))^2)),(((Xilk(1,i)*Xilk(2,i)....
*Xilk(3,i)*h*(i-1)) - (Xilk(1,i)*((Xilk(3,i)+Xilk(1,i))^2)))/...
((Xilk(1,i)+Xilk(3,i))^3)),((Xilk(2,i)*Xilk(1,i)/((Xilk(3,i)+Xilk(1,i))^2))...
-((Xilk(1,i)*Xilk(2,i)*Xilk(3,i)*log(So/(Xilk(1,i))))/((Xilk(1,i)+Xilk(3,i))^3)))...
;0,1, 0; 0 0 1];
Pilk(:,i+1)=sigma(:,i)*Pson(:,i)*sigma(:,i)'+Q;
K(:,i)= Pilk(:,i+1)*H'*inv(H*Pilk(:,i+1)*H' + R);
Pson(:,i+1)=(eye(3)- K(:,i)*H)*Pilk(:,i+1)*(eye(3)-K(:,i)*H)' + (K(:,i)*R*K(:,i));
Xson(:,i+1)=Xilk(:,i+1) + K(:,i)*(z(i+1) - Xilk(1,i+1));
end

subplot(3,1,1); plot(Xson(2,:)) ;
xlabel('zaman'),ylabel('Vmax kestirimi')

subplot(3,1,2); plot(Xson(3,:), 'k') ;
xlabel('zaman'),ylabel('Km kestirimi')

subplot(3,1,3) ;plot((1:1000),Vmax/Km,'k',(1:1001),Xson(2,:)./Xson(3,:));
xlabel('zaman'),ylabel('Vmax/Km kestirimi')

```

4.GKF $\{S_A, S_B, V_{max}, K_m\}$

SoA=10; KmA=10; VmaxA=.1; h=0.15; SA(1)=SoA;

for i=1:1000

VmaxA(i)=0.1;%*exp(-0.001*i);

k1A(i)=-h*VmaxA(i)*SA(i)/(KmA+SA(i));

k2A(i)=-h*VmaxA(i)*(SA(i)+k1A(i)/2)/(KmA+SA(i)+k1A(i)/2);

k3A(i)=-h*VmaxA(i)*(SA(i)+k2A(i)/2)/(KmA+SA(i)+k2A(i)/2);

k4A(i)=-h*VmaxA(i)*(SA(i)+k3A(i))/(KmA+SA(i)+k3A(i));

SA(i+1)=SA(i)+k1A(i)/6+k2A(i)/3+k3A(i)/3+k4A(i)/6;

end

SoB=20;

KmB=10;

VmaxB=VmaxA;

SB(1)=SoB;

for i=1:1000

k1B(i)=-h*VmaxB(i)*SB(i)/(KmB+SB(i));

k2B(i)=-h*VmaxB(i)*(SB(i)+k1B(i)/2)/(KmB+SB(i)+k1B(i)/2);

k3B(i)=-h*VmaxB(i)*(SB(i)+k2B(i)/2)/(KmB+SB(i)+k2B(i)/2);

k4B(i)=-h*VmaxB(i)*(SB(i)+k3B(i))/(KmB+SB(i)+k3B(i));

SB(i+1)=SB(i)+k1B(i)/6+k2B(i)/3+k3B(i)/3+k4B(i)/6;

end

for i=1:1001

z(:,i)=[SA(i) + randn*0.005;SB(i) + randn*0.005];

end

Q=[0.0001,0,0,0; 0,0.0001,0,0 ; 0,0,.000010,0 ; 0,0,0,.1];

```

R=[0.001 0; 0 0.001];

Xilk(:,1)=[SoA;SoB;0.01;5];

Xson(:,1)=[SoA;SoB;0.01;5];

H=[1,0,0,0; 0 1 0 0];

Pson(:,1)=[0.001 0 0 0 ;0 0.001 0 0; 0 0 .001 0 ;0 0 0 0.01];

for i=1:1000

    sk1A(i+1)=-h*Xson(3,i)*Xson(1,i)/(Xson(4,i)+Xson(1,i));

    sk2A(i+1)=-h*Xson(3,i)*(Xson(1,i)+sk1A(i)/2)/(Xson(4,i)+Xson(1,i)+sk1A(i)/2);

    sk3A(i+1)=-h*Xson(3,i)*(Xson(1,i)+sk2A(i)/2)/(Xson(4,i)+Xson(1,i)+sk2A(i)/2);

    sk4A(i+1)=-h*Xson(3,i)*(Xson(1,i)+sk3A(i))/(Xson(4,i)+Xson(1,i)+sk3A(i));

    Xilk(1,i+1)=[(Xson(1,i)+sk1A(i)/6+sk2A(i)/3+sk3A(i)/3+sk4A(i)/6)];

    sk1B(i+1)=-h*Xson(3,i)*1*Xson(2,i)/(Xson(4,i)+Xson(2,i));

    sk2B(i+1)=-h*Xson(3,i)*1*(Xson(2,i)+sk1B(i)/2)/(Xson(4,i)+Xson(2,i)+sk1B(i)/2);

    sk3B(i+1)=-h*Xson(3,i)*1*(Xson(2,i)+sk2B(i)/2)/(Xson(4,i)+Xson(2,i)+sk2B(i)/2);

    sk4B(i+1)=-h*Xson(3,i)*1*(Xson(2,i)+sk3B(i))/(Xson(4,i)+Xson(2,i)+sk3B(i));

    Xilk(2,i+1)=[(Xson(2,i)+sk1B(i)/6+sk2B(i)/3+sk3B(i)/3+sk4B(i)/6)];

    Xilk(3:4,i+1)=[Xson(3,i);Xson(4,i)];

    sigm(:,i)=[-Xilk(3,i)*Xilk(4,i)/((Xilk(4,i)+Xilk(1,i))^2), 0 ,...

    ((Xilk(1,i)*Xilk(3,i)*Xilk(4,i)*h*(i-1))...

    -(Xilk(1,i)*((Xilk(4,i)+Xilk(1,i))^2)))/((Xilk(1,i)+Xilk(4,i))^3), ...

    ( Xilk(3,i)*Xilk(1,i)/(Xilk(4,i)+Xilk(1,i))^2) - ...

    ((Xilk(1,i)*Xilk(3,i)*Xilk(4,i)*log(SoA/(Xilk(1,i)))))/((Xilk(1,i)+Xilk(4,i))^3)); ...

    0, -1*Xilk(3,i)*Xilk(4,i)/((Xilk(4,i)+Xilk(2,i))^2), ...

    (Xilk(2,i)*1*Xilk(3,i)*Xilk(4,i)*h*(i-1))...

    -(Xilk(2,i)*((Xilk(4,i)+Xilk(2,i))^2)))/((Xilk(2,i)+Xilk(4,i))^3), ...

    (Xilk(3,i)*Xilk(2,i)/((Xilk(4,i)+Xilk(2,i))^2)) - ((Xilk(2,i)*1*Xilk(3,i)*Xilk(4,i)*...

```

```

log(SoB/(Xilk(2,i)))/((Xilk(2,i)+Xilk(4,i))^3));

;0,0,1,0;0 0 0 1];

Pilk(:, :, i+1)=sigm(:, :, i)*Pson(:, :, i)*sigm(:, :, i)' + Q;

K(:, :, i)= (Pilk(:, :, i+1)*H')*inv(H*Pilk(:, :, i+1)*H' + R);

Pson(:, :, i+1)=(eye(4)- K(:, :, i)*H)*Pilk(:, :, i+1)*(eye(4)-K(:, :, i)*H)' + (K(:, :, i)*R*K(:, :, i)');

Xson(:, i+1)=Xilk(:, i+1) + K(:, :, i)*(z(:, i+1) - H*Xilk(:, i+1));

end

subplot(2,1,1); plot(Xson(3,:), '.k') ,xlabel('zaman'), ylabel('Vmax kestirimi')

subplot(2,1,2); plot(Xson(4,:), '.k'), xlabel ('zaman'), ylabel('Km kestirimi')

```


ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yalçın ÖKSÜZ

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Yılı : 1980

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1992-1998 Adile Mermerci Anadolu Lisesi

Lisans 1998-2002 Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

