



**TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ULTRASONİK
PÜSKÜRTMELİ DONDURARAK KURUTMA İŞLEMİ
İLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE İŞLEMİN FARKLI
KURUTMA YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

İzzet TÜRKER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Yrd.Doç.Dr. Hilal İŞLEROĞLU

**Aralık - 2017
Her hakkı saklıdır**

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ULTRASONİK
PÜSKÜRTMELİ DONDURARAK KURUTMA İŞLEMİ
İLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE İŞLEMİN FARKLI
KURUTMA YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

İzzet TÜRKER

**TOKAT
Aralık - 2017**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;


TÜBİTAK-TOVAG (Proje no: 115O216) ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2016/62) tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

İzzet TÜRKER tarafından hazırlanan “**Transglutaminaz Enziminin Ultrasonik Püskürtmeli Dondurarak Kurutma İşlemi ile Mikroenkapsülasyonu ve İşlemin Farklı Kurutma Yöntemleri ile Karşılaştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28 ARALIK 2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd.Doç.Dr. Hilal İŞLEROĞLU
Gaziosmanpaşa Üniversitesi


.....

Üye
Yrd.Doç.Dr. Aslıhan DEMİRDÖVEN
Gaziosmanpaşa Üniversitesi


.....

Üye
Yrd.Doç.Dr. Banu KOÇ
Gaziantep Üniversitesi


.....

ONAY


.....

Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

04/01/2018

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



İzzet TÜRKER

28 Aralık 2017

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ULTRASONİK PÜSKÜRTMELİ DONDURARAK KURUTMA İŞLEMİ İLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE İŞLEMİN FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

İZZET TÜRKER

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: YRD.DOÇ.DR. HİLAL İŞLEROĞLU)

Bu çalışmada, mikrobiyal transglutaminaz enzimi (mTG) melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atıklar kullanılarak üretilmiş ve kısmi olarak saflaştırılan enzim (yalın enzim) ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma (UPDK) işlemi ile kurutulmuştur. Yalın enzimin UPDK işleminin optimizasyonu için besleme debisi ve nozul frekansı bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve maksimum enzim aktivitesini sağlayan optimum ultrasonik püskürtme işlem koşulu tek faktörlü dizayn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin kurutma koşullarına karşı korunması amacıyla, mTG enzimi gam arabik, maltodekstrin ve inülin kullanılarak UPDK işlemi ile mikroenkapsüle edilmiştir. UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminde etkili bağımsız karışım değişkenleri olan kaplama materyallerinin oranı ve proses değişkenlerinin (besleme debisi ve nozul frekansı) etkisi incelenmiş, mikroenkapsülasyon verimi (kalan aktivite) yanıt olarak seçilerek D-optimal birleşik dizayn yöntemi ile işlem optimize edilmiştir. UPDK işlemi ile maksimum enzim aktivitesinin sağlandığı optimum noktada elde edilen mikroenkapsüle örnekler, yalın enzim, geleneksel dondurarak kurutma (GDK) ve geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) yöntemleriyle mikroenkapsüle edilen örnekler ile enzim aktivitesi, aktivite üzerine farklı metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın etkisi, fiziksel özellikler (nem, su aktivitesi, renk, yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, partikül boyutu ve morfolojisi, spesifik yüzey alanı, porozite, kekleşme, akabilirlik, dağılıbilirlik, çözünabilirlik, ıslanabilirlik), ısı ve depolama stabiliteleri açısından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, gıda teknolojisi alanında oldukça yeni bir yöntem olan UPDK işleminin GDK ve GPK yöntemlerine göre hem mikroenkapsülasyon verimi ve hem de son ürünün fiziksel özellikleri açısından daha başarılı olduğu ortaya konmuştur.

2017, 162 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma, optimizasyon, mikroenkapsülasyon, mikrobiyal transglutaminaz, ısıl stabilite

ABSTRACT

MASTER THESIS

MICROENCAPSULATION OF TRANSGLUTAMINASE ENZYME BY ULTRASONIC SPRAY FREEZE DRYING PROCESS AND COMPARISON OF THE PROCESS WITH DIFFERENT DRYING METHODS

İZZET TÜRKER

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASST.PROF.DR. HİLAL İŞLEROĞLU)

In this study, microbial transglutaminase (mTG) was produced using industrial wastes such as molasses and whey and partially purified enzyme (crude enzyme) was dried using ultrasonic spray freeze drying (USFD) process. To optimize the USFD process of crude enzyme, flow rate and nozzle frequency were chosen as independent variables and the optimum ultrasonic spraying process condition which ensured the maximum enzyme activity was determined using one factor design method. To preserve the enzyme activity from drying conditions, mTG was microencapsulated using gum arabic, maltodextrin and inulin by USFD process. The effect of coating material ratio which was the independent mixture variable and the process parameters (flow rate and nozzle frequency) were investigated and the microencapsulation process by USFD was optimized using D-optimal combined design by choosing the microencapsulation yield (remaining activity) as a response. The microencapsulated samples by USFD at the optimum point which provided the maximum enzyme activity were compared to crude mTG, microencapsulated samples by conventional freeze drying (CFD) and conventional spray drying (CSD) in terms of enzyme activity, enzyme activity in the presence of metal ions, pH and high temperature, physical properties (moisture, water activity, bulk and tapped densities, particle density, particle size and morphology, specific surface area, porosity, caking, flowability, dispersibility, solubility, wettability), thermal and storage stability. As a result, it was revealed that the USFD process, which is a considerably novel technique in food technology, was more successful than CFD and CSD in terms of both microencapsulation yield and physical properties of the final product.

2017, 162 Pages

KEY WORDS: Ultrasonic spray freeze drying, optimization, microencapsulation microbial transglutaminase, thermal stability

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi, manevi her anlamda her daim bana destek olan, bu zor yolda atmam gereken adımları öğreten, sadece eğitim düzeyinde değil, hayat anlamında da bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen saygı değer danışmanım Yrd.Doç.Dr. Hilal İŞLEROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazırlanan tez çalışmasında önemli katkıları olan ve bu süreçte her konuda desteğini esirgemeyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi öğretim üyesi sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Mehmet TOKATLI'ya çok teşekkür ederim.

Çalışma kapsamında uzaktan da olsa gerektiğinde telefonla bile bilgi ve birikimlerini sunan, fikirleri ve duruşu ile örnek temsil eden Gaziantep Üniversitesi öğretim üyesi sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Banu KOÇ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın en başından beri her daim yanımda olan, gerektiğinde hiçbir yardımdan kaçınmayan kardeşim gibi gördüğüm değerli arkadaşım Gökhan DOMURCUK'a çok teşekkür ederim.

Bu noktaya gelmemde en büyük emeği olan, yaptığım her şeyi destekleyen ve bana sonsuz güvenen, çok sevgili annem Nazik TÜRKER'e, saygı, sevgi ve dürüstlüğü bana öğreten, örnek aldığım insan saygı değer ve sevgili babam İsmail TÜRKER'e, ayakta durmam için gerekli gücü veren tek kardeşim Mehmet TÜRKER'e çok teşekkür ederim.

Tezime mali yönden destek olan TÜBİTAK-TOVAG'a (Proje no: 115 O 216) ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje no: 2016/62) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzzet TÜRKER
28 Aralık 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Gıdaların ve Biyoteknolojik Materyallerin Kurutulması	4
2.2 Geleneksel Püskürtmeli Kurutma İşlemi.....	5
2.3 Geleneksel Dondurarak Kurutma İşlemi	6
2.4 Püskürtmeli Dondurarak Kurutma İşlemi	9
2.4.1 Püskürtme yöntemleri.....	11
2.4.2 Dondurma yöntemleri.....	15
2.4.3 Kurutma yöntemleri.....	19
2.4.4 PDK işleminin partikül ve yığın özellikler üzerine etkisi	21
2.5 Mikroenkapsülasyon	25
2.5.1 Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan kaplama materyalleri	27
2.5.2 Mikroenkapsülasyon yöntemleri	30
2.6 Transglutaminaz Enzimi.....	35
2.7 Mikrobiyal Transglutaminaz Enzimi.....	37
2.8 Yanıt Yüzey Yöntemi ve Optimizasyon	39
2.8.1 D-optimal dizayn	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	42
3.1 Materyal.....	42
3.2 Yöntem	43
3.2.1 mTG enziminin üretimi ve kısmi saflaştırılması	43
3.2.2 Enzim aktivitesinin belirlenmesi	43

3.2.3	Yalın enzimin ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutulması (UPDK) işlemi	44
3.2.4	mTG enziminin UPDK ile mikroenkapsülasyonu.....	46
3.2.5	mTG enziminin geleneksel dondurarak kurutma (GDK) ile mikroenkapsülasyonu	48
3.2.6	mTG enziminin geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) ile mikroenkapsülasyonu	49
3.2.7	Isıl stabilitenin belirlenmesi.....	49
3.2.8	Depolama stabilitesinin belirlenmesi.....	50
3.3	Analiz Yöntemleri	51
3.3.1	Metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi	51
3.3.2	Partikül özelliklerinin belirlenmesi	52
3.3.3	Yığın özelliklerinin belirlenmesi.....	54
3.3.4	Yeniden yapılandırma (rekonstitüsyon) özelliklerinin belirlenmesi	56
3.3.5	İstatistiksel analiz	57
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1	Yalın Enzimin Ultrasonik Püskürtmeli Dondurarak Kurutulması (UPDK) İşlemi	59
4.2	mTG Enziminin UPDK ile Mikroenkapsülasyon İşlemi	63
4.2.1	Modelin oluşturulması ve kalan aktivite değerinin model yanıtı olarak incelenmesi	68
4.2.2	pH ve yüksek sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin model yanıtı olarak incelenmesi	72
4.2.3	Farklı metal iyonları ve EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin model yanıtı olarak incelenmesi	78
4.2.4	UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin nem ve su aktivitesi üzerine etkisi	83
4.2.5	UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin renk değerleri üzerine etkisi ...	88
4.2.6	UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin yığın özellikler üzerine etkisi .	91
4.2.7	UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin porozite, akabilirlik ve kekleşme değerleri üzerine etkisi.....	95

4.2.8	UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin yeniden yapılandırma (rekonstitüsyon) özellikleri üzerine etkisi	99
4.3	Optimizasyon.....	102
4.4	Optimum Noktada Elde Edilen Örneklerin Karşılaştırılması.....	104
4.4.1	Kalan aktivite açısından karşılaştırılması	104
4.4.2	Fiziksel özellikler açısından karşılaştırılması.....	107
4.4.3	Partikül boyutu açısından karşılaştırılması.....	111
4.4.4	Spesifik yüzey alanı (SYA) ve gözenek boyutu dağılımı açısından karşılaştırılması.....	115
4.4.5	Partikül morfolojisi açısından karşılaştırılması	119
4.5	Farklı Yöntemler ile Elde Edilen Örneklerin Isıl Stabilitesinin Belirlenmesi ve Enzim İnaktivasyon Kinetiği	124
4.6	Farklı Yöntemlerle Üretilen Örneklerin Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi .	135
5.	SONUÇ	144
6.	KAYNAKLAR.....	148
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	162

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
a^*	CIE yeşil ve kırmızılık değeri
a_w	Su aktivitesi
b^*	CIE mavi ve sarı değeri
C_1	Gam arabik bağımsız değişkeni
C_2	Maltodekstrin bağımsız değişkeni
C_3	İnülin bağımsız değişkeni
C_{di}	Deneysel kalan aktivite değeri
C_{ti}	Modelden hesaplanan kalan aktivite değeri
$D_{[4,3]}$	Hacim ağırlıklı ortalama partikül boyutu
d_{10}	%10 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap
d_{50}	%50 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap
d_{90}	%90 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap
$d_{üz-R^2}$	Düzeltilmiş regresyon katsayısı
E_a	Aktivasyon enerjisi
h	Planck sabiti
k	Kodlanmış faktör sayısı
K	Boltzman sabiti
k	Hız sabiti
L^*	CIE aydınlık değeri
N	Deneysel veri sayısı
P	Bağıl sapma
p	Önemlilik derecesi
R	Evrensel gaz sabiti
R^2	Regresyon katsayısı
$t_{1/2}$	Yarı ömür süresi
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
X_1	Nozul frekansı bağımsız değişkeni
X_2	Besleme debisi bağımsız değişkeni
α_i	Regresyon katsayıları

β_0	Regresyon katsayıları
ΔG	Gibbs serbest enerjisi
ΔH	Aktivasyon entalpisi
ΔS	Aktivasyon entropisi
ε	Porozite
ρ_b	Yığın yoğunluk
ρ_p	Partikül yoğunluğu
ρ_t	Sıkıştırılmış yoğunluk

Kısaltmalar

Açıklama

ALPE	Alüminyum kaplı polietilen
CI	Carr indeksi
DE	Dekstroz eşdeğerliği
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
GDK	Geleneksel dondurarak kurutma
GDK-YE	Geleneksel dondurarak kurutma işlemi ile elde edilen yalın enzim
GPK	Geleneksel püskürtmeli kurutma
GYM	Glukoz/yeast/malt
HR	Hausner oranı
KD	Kekleşme derecesi
mTG	Mikrobiyal transglutaminaz
PAS	Peynir altı suyu
RSM	Yanıt yüzey yöntemi
SD	Serbestlik derecesi
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SYA	Spesifik yüzey alanı
TCA	Trikloroasetik asit
UPDK	Ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma
UPDK-YE	Ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma işlemi ile elde edilen yalın enzim

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Saf suyun faz diyagramı	7
Şekil 2.2. PDK işleminin şematik gösterimi	10
Şekil 2.3. PDK işleminde kullanılan farklı nozulların şematik gösterimi a) Tek akışkanlı b) İki akışkanlı c) Dört akışkanlı	13
Şekil 2.4. Ultrasonik nozul şematik gösterimi	14
Şekil 2.5. Gaz içine püskürterek dondurma işlemi	17
Şekil 2.6. Kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar üzerine püskürterek dondurma işlemi	17
Şekil 2.7. Kriyojenik sıvı içine püskürterek dondurma işlemi	18
Şekil 2.8. PDK ile elde edilmiş bazı ürünlerin SEM görüntüleri (a) PAS protein izolatu ile kaplanmış vanilin- 10000x büyütme oranı, (b) PAS protein izolatu, (c) Tam yağlı süttozu, (d) Dokosaheksaenoik asit	22
Şekil 2.9. Düzensiz deneme bölgelerinin şematik gösterimi	41
Şekil 3.1. Ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma (UPDK) sistemi	45
Şekil 4.1. Deneysel ve tahminlenen kalan aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması ...	71
Şekil 4.2. Kalan aktivite (%) için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi (a) 48 kHz (b) 120 kHz (%30 inülin konsantrasyonu için)	72
Şekil 4.3. 48 kHz nozul frekansında (a) pH 3.0, (b) pH 8.0 ve (c) 80°C koşullarında kalan aktivite (%) değerleri	77
Şekil 4.4. 120 kHz nozul frekansında (a) pH 3.0, (b) pH 8.0 ve (c) 80°C koşullarında kalan aktivite (%) değerleri	77
Şekil 4.5. 48 kHz nozul frekansında EDTA ve farklı metal iyonları varlığında kalan aktivite için yanıt yüzey grafikleri (a) EDTA, (b) Fe ⁺² (c) Ca ⁺² (d) Co ⁺²	82
Şekil 4.6. 120 kHz nozul frekansında EDTA ve farklı metal iyonları varlığında kalan aktivite için yanıt yüzey grafikleri (a) EDTA, (b) Fe ⁺² (c) Ca ⁺² (d) Co ⁺²	82
Şekil 4.7. Farklı kaplama materyalleri varlığında kurutulan örneklerin kurutma sonrası görünümü (a) Deneme No: 25 (b) Deneme No: 10	83
Şekil 4.8. 48 kHz nozul frekansında kalan aktivite (%) için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi	103

Şekil 4.9. UPDK-YE ve GDK-YE örneklerinin partikül boyut dağılımları.....	113
Şekil 4.10. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örneklerin partikül boyut dağılımları	115
Şekil 4.11. Gözenek hacmine karşılık gelen gözenek boyutlarının incelenmesi.....	118
Şekil 4.12. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalnız enzime ait gözenek boyutu dağılımları	119
Şekil 4.13. UPDK işlemi ile kurutulan kaplama materyalleri için SEM görüntüleri (a) Maltodekstrin 3000x, 100x (b) Gam arabik 3000x, 100x (c) İnülin 3000x, 100x.....	120
Şekil 4.14. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen yalnız ve mikroenkapsüle toz ürünler için SEM görüntüleri (Yakınlaştırma oranı: 3000x) (a) UPDK-YE (b) GDK-YE (c) UPDK (d) GDK (e) GPK	123
Şekil 4.15. pH 5.0'te farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modelden tahminlenen değeri temsil etmektedir)	131
Şekil 4.16. pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modelden tahminlenen değeri temsil etmektedir)	132
Şekil 4.17. pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modelden tahminlenen değeri temsil etmektedir)	133
Şekil 4.18. UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı depolama koşullarında kalan aktivite (%) değerleri (a) 25°C, %50 RH, (b) 38°C, %90 RH.....	136
Şekil 4.19. 25°C %50 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta stabilitelerindeki değişim (a) pH 3.0 (b) pH 8.0 (c) 80°C.....	140
Şekil 4.20. 38°C %90 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta stabilitelerindeki değişim (a) pH 3.0 (b) pH 8.0 (c) 80°C.....	141

Şekil 4.21. 25°C %50 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında stabilitelerindeki değişim (a) EDTA (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺² 142

Şekil 4.22. 38°C %90 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında stabilitelerindeki değişim (a) EDTA (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺² 143



ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma işlemleri arasındaki farklılıklar	9
Çizelge 2.2. PDK işlemi ile kurutulan bazı materyaller	11
Çizelge 2.3. Farklı dondurma yöntemleri kullanılarak PDK işlemi ile kurutulan materyaller	19
Çizelge 2.4. PDK işlemi ile kurutulan farklı materyallerin ortalama partikül boyutları ve SYA değerleri	24
Çizelge 2.5. PDK işlemi ile elde edilen bazı toz ürünlerin yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri	25
Çizelge 3.1. GYM <i>Streptomyces</i> sıvı ve katı besiyeri bileşimi (pH 7.2)	42
Çizelge 3.2. Yalın enzimin UPDK ile kurutulması için oluşturulan deneme deseni	45
Çizelge 3.3. UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemi için oluşturulan deneme deseni	48
Çizelge 3.4. Metal iyonu ve EDTA içeren deney ortamının hazırlanışı	52
Çizelge 4.1. UPDK işleminin farklı aşamalarında elde edilen kalan aktivite (%) değerleri	60
Çizelge 4.2. İşlem değişkenlerinin kalan aktivite üzerine etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	62
Çizelge 4.3. Desirability fonksiyonu yaklaşımına göre elde edilen ve optimum noktayı veren çözümler	63
Çizelge 4.4. UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin farklı aşamalarında elde edilen kalan aktivite (%) değerleri	65
Çizelge 4.5. Kalan aktivite üzerine lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	69
Çizelge 4.6. Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında elde edilen deneysel kalan aktivite (%) değerleri	73
Çizelge 4.7. Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında kalan aktivite üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	76

Çizelge 4.8. Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında elde edilen deneysel kalan aktivite (%) değerleri	79
Çizelge 4.9. Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında kalan aktivite üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	81
Çizelge 4.10. Deneme desenine göre belirlenen nem ve a_w değerleri	84
Çizelge 4.11. Nem ve a_w değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	87
Çizelge 4.12. Deneme desenine göre belirlenen renk değerleri	89
Çizelge 4.13. Renk değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	90
Çizelge 4.14. Deneme desenine göre belirlenen yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu	92
Çizelge 4.15. Yığın özellikler üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	94
Çizelge 4.16. Deneme desenine göre belirlenen porozite, kekleşme ve akabilirlik değerleri	96
Çizelge 4.17. Porozite, kekleşme ve akabilirlik üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	98
Çizelge 4.18. Deneme desenine göre belirlenen dağılıbilirlik, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerleri	99
Çizelge 4.19. Dağılıbilirlik, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi	101
Çizelge 4.20. Desirability fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenen optimum noktayı veren üç çözüm	102
Çizelge 4.21. Modelden tahminlenen ve deneysel kalan aktivite değerleri için tek örnek t-testi sonuçları	103
Çizelge 4.22. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle elde edilen elde edilen mikroenkapsüle örneklerin kalan aktivite değerleri	104
Çizelge 4.23. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen enzim örneklerinin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta kalan aktivite (%) değerleri	106

Çizelge 4.24. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle elde edilen mikroenkapsüle örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında kalan aktivite (%) değerleri...	106
Çizelge 4.25. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle elde edilen mikroenkapsüle örneklerin fiziksel özellikleri	110
Çizelge 4.26. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalnız enzime ait partikül boyutu ve açıklık değerleri	111
Çizelge 4.27. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalnız enzime ait SYA değerleri	116
Çizelge 4.28. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalnız enzime ait ortalama gözenek hacmi değerleri	117
Çizelge 4.29. pH 5.0'te UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri.....	125
Çizelge 4.30. pH 6.0'da UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri.....	126
Çizelge 4.31. pH 7.0'de UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri.....	127
Çizelge 4.32. Farklı örnekler için tüm koşullarda hesaplanan hız sabiti, R^2 , %P değerleri ve yarı ömür süreleri.....	130
Çizelge 4.33. UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklere ait aktivasyon parametreleri.....	135

1. GİRİŞ

Proteinlerin enzimatik, kimyasal veya fiziksel yöntemler ile modifikasyonunun gerçekleştirilerek, gıdaların fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi alanında yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Enzimatik modifikasyon, hem ucuz olması, hem de sağlık açısından herhangi bir risk taşımaması gibi nedenlerle sıklıkla tercih edilmektedir. Gıda proteinlerinin enzimatik modifikasyonunda kullanılabilen enzimlerin sayısı ise oldukça sınırlıdır. Buna rağmen, protein içeren neredeyse tüm gıdalarda kullanılabilen transglutaminaz enziminin gıda endüstrisinde kullanımı giderek önem kazanmaktadır (Romeih ve Walker, 2017).

Transglutaminaz, lisin ve glutamin kalıntıları arasında çapraz bağlar oluşturarak protein molekülü içinde veya moleküller arası bağların oluşmasını sağlayan bir transferazdır. Oluşturulan bu çapraz bağlar, yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerleri meydana getirir. Transglutaminaz enzimi, ayrıca glutaminleri aminlerle çapraz bağlayarak açıl transfer reaksiyonlarının oluşumunu ve ortamdaki suyun nükleotid gibi davranması ile glutaminlerin deamidasyonunu sağlar. Böylece proteinlerin yapısında modifikasyonlar meydana getirerek farklı gıda gruplarında dokusal ve fonksiyonel özelliklerin iyileştirilmesinde kullanılabilir (Gaspar ve Goes-Favoni, 2015).

Üretimi ve saflaştırma basamakları hayvansal kaynaklı transglutaminaza oranla daha kolay olan mikrobiyal transglutaminaz (mTG) enziminin gıdalarda kullanımı ile gıdaların jelleşme, su tutma kapasitesi, emülsiyon oluşturma ve dokusal özellikleri iyileştirilebilmektedir. Ayrıca, mTG enziminin çapraz bağlanma ile esansiyel amino asitleri proteinlerin yapısına yerleştirebilme özelliği, esansiyel amino asitlerce fakir olan proteinleri içeren gıdaların besleyici değerinin artırılmasını sağlamaktadır (Motoki ve Seguro, 1998).

Üretildiklerinde genellikle sıvı formda olan enzimler gibi biyoteknolojik materyallerin kurutulması, hem stabiliteyi uzun süre korumaları hem de depolama ve nakliye masraflarını düşürmesi açısından oldukça avantajlıdır. Ancak bu ürünlerin kurutulması sırasında hücre canlılığının, biyolojik aktivitenin veya besleyici değerinin kaybolması gibi arzu edilmeyen birtakım değişiklikler meydana gelebilmektedir. Farklı avantaj ve dezavantajları olan geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) ve geleneksel dondurarak

kurutma (GDK) işlemleri enzimlerin kurutulması için en sık kullanılan yöntemlerdir. GPK işleminde kuruma oldukça kısa sürede gerçekleşir ancak kurutma işleminde kullanılan yüksek giriş sıcaklıkları ısıl duyarlılığı yüksek olan biyoteknolojik materyallerde istenmeyen sonuçlara (canlılık, aktivite kaybı, denatürasyon vb.) sebep olabilir (Adamiec ve ark., 2006). GDK işlemi ise düşük sıcaklıklarda gerçekleştiği için ısıl duyarlılığı yüksek olan biyoteknolojik materyaller için kullanımı en yaygın kurutma metodu olarak kabul edilmektedir. Ancak GDK işleminin, dondurma ve düşük basınç altında kurutma aşamalarını içermesinin yanı sıra kurutma işleminin uzun zaman alması nedeniyle diğer kurutma tekniklerine göre işletme maliyeti çok daha yüksektir (Wanning ve ark., 2015).

Püskürtmeli dondurarak kurutma (PDK) işlemi, GDK ve GPK işlemlerinin özelliklerini kombine eden, küresel ve gözenekli formda mikro veya nano boyutta partiküllerin oluşumu ile sonuçlanan oldukça yeni bir kurutma yöntemidir (Ishwarya ve ark., 2015). PDK işleminde besleme ilk aşamada püskürtülerek küçük damlacıklar haline getirilir. Bu damlacıklar kriyojenik bir ortam ile temas ettirilerek dondurulur ve düşük sıcaklık ve basınç altında süblimasyon ile kurutulur. Püskürtme işlemi ile materyalin boyutunun küçültülmesi donma ve kurutma süresini kısaltarak işletme maliyetini düşürür (Ishwarya ve ark., 2015). Kurutulacak materyalin türüne göre, PDK işleminde kullanılan püskürtme, donma ve kurutma aşamaları farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Özellikle küçük boyutta partiküller oluşturabilen ve partikül boyutu dağılımının kontrolünü oldukça iyi sağlayan ultrasonik nozullar, PDK işleminde kullanılabilir. PDK işleminin mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılması ise oldukça yeni olmasına rağmen, mikroenkapsülasyon etkinliği ve çekirdek materyalin korunması açısından son derece başarılı olduğu belirtilmektedir (Parthasarathi ve Anandharamakrishnan, 2016). PDK işleminin istenen partikül boyutuna ulaşılabilme kolaylığından dolayı çeşitli gıda ve eczacılık ürünlerinin enkapsülasyonunda başarıyla kullanılabilmesi farklı çalışmalarla ortaya konmuştur (Wanning ve ark., 2015).

Bu çalışmada, mTG enzimi melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atıklar kullanılarak üretilmiş ve kısmi olarak saflaştırılan enzim ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma (UPDK) işlemi ile kurutulmuştur. Enzim aktivitesinin UPDK işlem

koşullarına karşı korunması için, mTG enzimi gam arabik, maltodekstrin ve inülin kullanılarak UPDK işlemi ile mikroenkapsüle edilmiş ve UPDK ile mikroenkapsülasyon işlem koşullarının (kaplama materyalleri oranı, besleme debisi, nozul frekansı) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, UPDK işlemi ile maksimum enzim aktivitesinin sağlandığı optimum noktada elde edilen mikroenkapsüle örnekler yalın enzim, GDK ve GPK yöntemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler ile enzim aktivitesi, aktivite üzerine farklı metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın etkisi, fiziksel özellikleri (nem, su aktivitesi, renk, yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, partikül boyutu ve morfolojisi, spesifik yüzey alanı, porozite, kekleşme, akabilirlik, dağılıbilirlik, çözünebilirlik, ıslanabilirlik), ısıl stabiliteleri ve depolama stabiliteleri açısından karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Gıdaların ve Biyoteknolojik Materyallerin Kurutulması

Kurutma, gıdaların ve biyoteknolojik materyallerin muhafazası için kullanılan en eski ve en etkili yöntemlerden biridir. Kurutma işlemi ile nem içeriği düşürülerek ürünlerin depolanması ve taşınması daha kolay hale gelir. Bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişimi ve kimyasal reaksiyonların durdurulması veya yavaşlatılması sonucunda raf ömrünün artırılması sağlanır (Mujumdar, 2014). Çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip farklı gıdalar ile enzimler ve mikroorganizmalar gibi biyoteknolojik materyallerin kurutulmasında yüksek kaliteli ürün elde edilebilmesi için doğru kurutma metodunun seçilmesi gerekmektedir (Ratti, 2001; Jangam, 2011).

Biyoteknoloji, farklı endüstri alanlarında kullanılmak üzere çeşitli ürünlerin mikroorganizmalar, virüsler, hayvansal ve bitkisel hücreler vasıtası ile üretilmesini veya dokularda bulunan ekstraselüler ürünlerin elde edilmesini hedeflemektedir. Biyoteknolojik ürünler kompleks kimyasal yapıya sahip antibiyotikler, vitaminler ve enzimler gibi yüksek moleküler ağırlıklı polimerler veya organik asitler gibi organik bileşenler de olabilmektedir. Ayrıca, üretilen ürün direkt olarak bakteri veya maya gibi hücrenin kendisi de olabilir (Adamiec ve ark., 2006).

Bakteri, maya, küf, enzim ve vitaminler gibi biyoteknolojik materyallerde kurutma işlemi sırasında enzimatik, kimyasal ve fiziksel bozunmalar görülmektedir. Enzimler ve vitaminlerde aktivite kaybı, protein, karbonhidrat, yağ, antibiyotik ve aminoasit gibi bileşenlerde ise parçalanma gerçekleşmektedir. Kurutma işlemi sonrasında çözünürlük ve rehidrasyon gibi özelliklerde değişme ve aroma kaybı gibi fiziksel özelliklerde değişimler görülebilmektedir. Bu gibi kayıpların oluşumunu en aza indirmek, hücre canlılığı ve materyalin aktivitesi gibi son ürün özelliklerini optimum düzeyde tutmak için uygun kurutma işleminin seçimi ve kurutma koşullarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Ratti, 2001; Morgan ve ark., 2006).

Ürünlerde bulunan su, saflaştırma, taşıma ve depolama gibi aşamalarda birtakım fiziksel ve kimyasal değişimlerin gerçekleşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, enzimler gibi protein kökenli ürünlerin depolama stabilitesinin artırılması amacıyla kuru katı formlar

geliştirilmiştir. Kurutma işleminin enzim gibi ürünlerde kendi başına stres oluşturduğu bilinse de, taşıma ve depolama masraflarının azaltılması ve ürünlerin biyolojik aktivitesinin daha uzun süre korunması için bu ürünler genellikle kuru forma dönüştürülmektedir (Namaldı ve ark., 2006). Laktik asit bakterileri ve mayalar gibi gıdalarda bulunan mikroorganizmalar, gıda endüstrisinde hem işleme hem de fonksiyonel özellikler açısından büyük önem taşımaktadır. Bu tarz biyoteknolojik ürünlerin kurutulması sırasında uygulanacak işlem koşullarının doğru şekilde optimize edilmesi gerekmektedir. Düşük sıcaklıkta uygulanan kurutma işlemleri protein yapısının bozulmasına engel olurken dehidrasyon nedeniyle mikroorganizmalar inaktif hale geçebilmektedir (Fujii ve ark., 2011).

Biyoteknolojik materyallerin üretimi sonrasında elde edilen sıvı formları uzun süreli depolama için uygun değildir. Yüksek nem içeriği ve su aktivitesine sahip materyallerin düşük sıcaklıklarda depolanması bile bozunmalarını engelleyememektedir. Ayrıca sıvı formdaki ürünlerin dondurularak depolanması oldukça yüksek maliyetli bir işlemdir. Bu nedenle, biyoteknolojik materyallerin toz forma dönüştürülerek depolanması hem ürünün raf ömrü hem de maliyet açısından oldukça önemlidir. Sıvı formdaki biyoteknolojik materyallerin farklı kurutma teknikleri kullanılarak toz formlara dönüştürülmesi ile ürün özellikleri korunarak düşük maliyetle uzun süreler ile depolanması sağlanabilmektedir (Quintana ve ark., 2017).

Biyoteknolojik materyallerin kurutulmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ürünlerin ısı direnci ve yapısal özellikleri kurutma işlemini önemli derecede etkilemektedir. Genel olarak düşük sıcaklık uygulaması, vakum altında kurutma ve çok aşamalı kurutma sistemleri son ürün kalitesini artırmak için kullanılan yöntemlerdir (Adamiec ve ark., 2006). Biyoteknolojik materyallerin kurutulmasında endüstride en sık kullanılan yöntemler geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) ve geleneksel dondurarak kurutma (GDK) işlemleridir.

2.2 Geleneksel Püskürtmeli Kurutma İşlemi

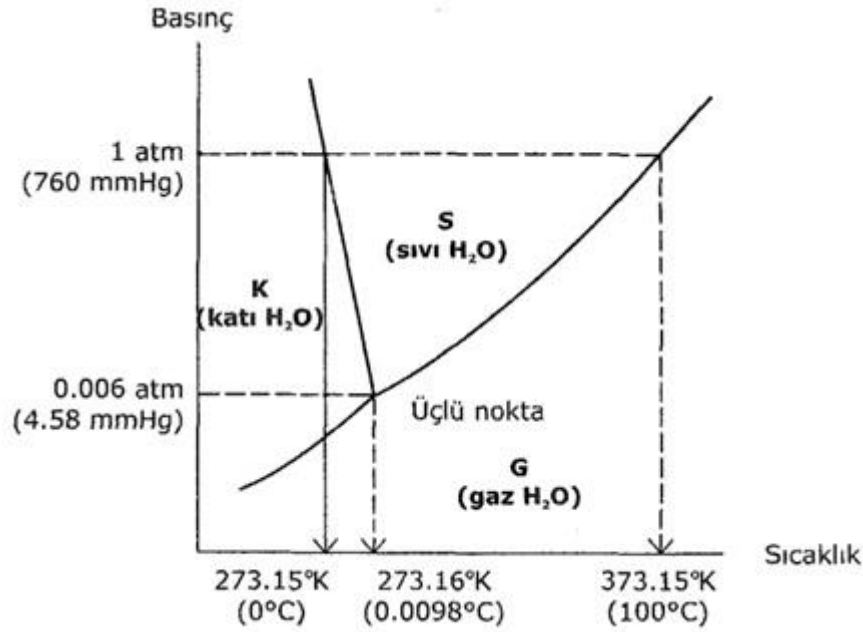
Geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) işlemi, gıdalar, kimya endüstrisinde kullanılan ürünler (nitratlar, titanyum dioksit, boya pigmentleri, amonyum tuzları vb.), maya ekstraktları, enzimler ve aşılardan oluşan biyoteknolojik materyallerin kurutulması için en sık

kullanılan yöntemlerden biridir (Koç ve ark., 2010; Sadıkoğlu, 2010). GPK işleminde çözelti, karışım, emülsiyon veya jel, iyi dağıtılmış damlacıkların elde edilmesi için genellikle kurutma bölgesinin üzerinde bulunan bir atomizere pompalanır. Atomizasyon işlemi ile iyi bir şekilde ayrılmış damlacıklar siklon tipi kurutma bölgesinde sıcak hava ile karşılaşır (Filkova ve ark., 2006). Damlacıklar sıcak hava ile temas ettiğinde ürünlerdeki nem havaya geçer ve kurutulan ürünün büyük bir kısmı kurutma haznesinin alt kısmına düşer. Ancak kurutma haznesinden ayrılan hava beraberinde bir miktar kurutulmuş ürünü de götürür. Bu nedenle ayrılan hava, kuru parçacıkların tutulabilmesi için bir siklon seperatörden geçirilir (Estevinho ve ark., 2013).

2.3 Geleneksel Dondurarak Kurutma İşlemi

Geleneksel dondurarak kurutma (GDK), materyalin dondurulması ve donmuş ürünlerdeki buzun düşük basınç altında süblimasyonla uzaklaştırılması prensibine dayanan bir işlemdir (Sabarez, 2015). GDK işlemi donma, birinci kurutma (ana kurutma) ve ikinci kurutma (son kurutma) olmak üzere üç ana basamaktan oluşur. Donma aşamasında dondurularak kurutulacak ürün, içerdiği çözücünün (çoğunlukla su) tamamı donana kadar soğutulmaktadır. Birinci kurutma aşamasında, donmuş halde bulunan çözücü süblimasyon ile uzaklaştırılır. Bu noktada kurutma sisteminin basıncı donmuş çözücünün (buz) buhar basıncından daha düşük olmalıdır. Saf suyun 0.01°C'deki süblimasyonu 0.006 atm basınçta gerçekleşir (Şekil 2.1) ancak gıdalar veya biyoteknolojik materyallerde bulunan su saf olmadığından bu materyalleri kurutabilmek için sıcaklığın 0°C'den düşük tutulması gerekmektedir. Birinci kurutma aşamasında ötektik sıcaklık aşılsa, donmuş tabaka erir ve son ürünün kalitesi olumsuz etkilenir. Kurutulan üründe donmuş haldeki su bittiği an, birinci kurutma periyodunun sonu olarak kabul edilir. İkinci kurutma periyodunda ise bağlı suyun genellikle oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda desorpsiyon ile uzaklaştırılması gerçekleştirilir (Ratti, 2001; Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003; Gieseler, 2004). Birinci kurutma aşamasında serbest suyun tamamı (toplam suyun ~%90-95'i) düşük sıcaklıkta süblimasyon ile uzaklaştırılırken, ikinci kurutma aşamasında bağlı su (toplam suyun ~%5-10'u) sıcaklık artırılarak (genellikle 30-50°C) desorpsiyon ile uzaklaştırılır. Bu nedenle ikinci kurutma aşaması birinci kurutma aşamasına göre daha kısa sürede tamamlanır. Dondurarak kurutma işlemi mevcut tüm serbest ve bağlı su uzaklaştığı zaman sonlandırılır.

Uygulanan işleme bağlı olarak son ürünün nem içeriği genellikle %0.5-5.0 aralığındadır. Ulaşılan bu sonuç nem içeriği ürünün yapısal bütünlüğüne ve raf ömrüne etki etmeyecek miktardadır (Wolti-Chanes ve ark., 2004).



Şekil 2.1. Saf suyun faz diyagramı (Brady ve ark., 1980)

GDK işlemi sırasında oluşan kurutulmuş tabakadaki gözenek boyutu ve gözenek dağılımı, dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristalleri ile yakından ilişkilidir (King, 1971). Buz kristalleri küçük ve birbirleri ile olan etkileşimi düşük ise, kurutulmuş tabakadaki su buharının taşınımı sınırlı olacaktır. Buna karşın, büyük ve homojen dağılım gösteren buz kristalleri oluştuğunda kurutulmuş tabakadaki su buharının taşınımı daha hızlı olacak ve ürün daha hızlı kuruyacaktır. Dolayısı ile dondurma metodu, dondurma hızı, buz kristallerinin oluşum şekli ve çözelti içerisinde bulunan materyallerin niteliği kurutma hızını ve toz ürün kalitesini direkt olarak etkilemektedir (Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003).

GDK işleminin optimum şekilde dizaynı, kurutulacak materyal formülasyonunun kritik özelliklerinin bilinmesi ve bu bilgilerin proses dizaynına uygulanabilmesi ile gerçekleştirilebilir (Tang ve Pikal, 2004). Bu kritik özelliklerden camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve çökme sıcaklığı (T_c), materyalin kurutulmuş toz ürün haline getirilmesi sırasında etkili faktörlerdir. Amorf katı içeren gıdalarda camsılığa geçiş karakteristik bir sıcaklık aralığında meydana gelir ve materyalin camsı yapısını kaybederek viskoz bir yapıya

dönüşmeye başladığı sıcaklık camsı geçiş sıcaklığı (T_g) olarak adlandırılır. Dondurarak kurutma sırasında materyalin camsı geçiş sıcaklığı aşılarak kurutma yapıldığında, ürün katı ve por içeren yapısını kaybederek viskoz bir yapıya sahip olur ve çökmeye başlar (Barresi ve ark., 2009). T_g 'den yüksek sıcaklıklarda, materyalin amorf matrisinin viskozitesi oldukça hızlı bir şekilde düşer (Levi ve Karel, 1995). Bunun nedeni, çökme sıcaklığı üzerinde kurutulmuş örnekteki amorf yapıların, por yapısını devam ettirecek kadar kuvvetli olmamasıdır (Yang ve ark., 2010). Bu çökmenin ilk olarak gözlemlendiği sıcaklık ise çökme sıcaklığı (T_c) olarak adlandırılır. Çökme sıcaklığı camsı geçiş sıcaklığından birkaç derece fazladır. Çökme sıcaklığı, ürünün nem miktarına ve fiziksel yapısına bağlı olarak değişir. Ana kurutma süresince ürün sıcaklığı, çökme sıcaklığı ve camsı geçiş sıcaklığının 2-3°C altında tutulmalıdır. Çökme sıcaklığı veya camsı geçiş sıcaklığı üzerinde kurutma yapıldığı takdirde son ürün yapısını olumsuz etkileyen çökme olayı, genellikle düşük moleküler ağırlıklı materyaller ile çalışıldığında görülmektedir (Tonnis ve ark., 2015). Kurutulacak ürünlerin formülasyonlarında yüksek moleküler ağırlıklı materyallerin bulunması ile çökme olayı önlenmektedir (Fernandes ve ark., 2016). Aynı zamanda ürün sıcaklığı, sistem basıncı ve ürünün nem içeriği gibi parametreler göz önünde bulundurularak kurutma koşulları belirlenmelidir (Adams, 2007).

GDK işlemi elde edilen gıdaların tat ve aromatik bileşen kaybı en düşük düzeyde olmaktadır. Sıcaklığın çok düşük oluşu proteinlerin parçalanmasını ve enzimatik reaksiyonların en aza indirgenmesini sağlar. Düşük sıcaklık ve basınç kombinasyonu; ürünün aroma, renk ve şekil özelliklerini korur, rehidrasyon esnasında kuru ürünün süngerimsi yapı kazanmasını sağlayarak hızlı bir şekilde su emilimini mümkün kılar ve ürünün taze halde iken sahip olduğu özellikleri geri kazanmasını sağlar. (Ratti, 2001; Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003; Fellows, 2009). Dondurarak kurutma gıda ve eczacılık endüstrilerinde ısı duyarlılığı yüksek olan biyoteknolojik materyaller için kullanımı en yaygın kurutma metodu olarak kabul edilmektedir (Lian ve ark., 2002; Capela ve ark., 2006). Probiyotik hücreler (*Lactobacillus* F19, *Bifidobacterium* Bb12), meyve ekstraktları, amilaz enzimi ve *Bifidobacterium longum* gibi biyoteknolojik materyallerin dondurarak kurutulması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Heidebach ve ark., 2009; Ezhilarasi ve ark., 2013; Amid ve ark., 2014; Amine ve ark., 2014).

GDK işlemi sahip olduğu tüm avantajlara rağmen, uzun işlem süresi ve yüksek maliyet gerektirmektedir. GDK işlemi sırasında GPK işlemine göre daha fazla enerji tüketilir ve yaklaşık 4 kat daha fazla enerji maliyetine sahiptir (Fissore, 2014). Tüm işlemde harcanan toplam enerjinin %45'lik kısmının kullanıldığı birinci kurutma aşaması maliyeti artıran en önemli aşamadır (Ratti, 2001). Gıdaların ve biyoteknolojik materyallerin kurutulmasında sıklıkla kullanılan GPK ve GDK işlemlerinin işlem, ürün kalitesi ve işletme maliyeti açısından karşılaştırılması Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

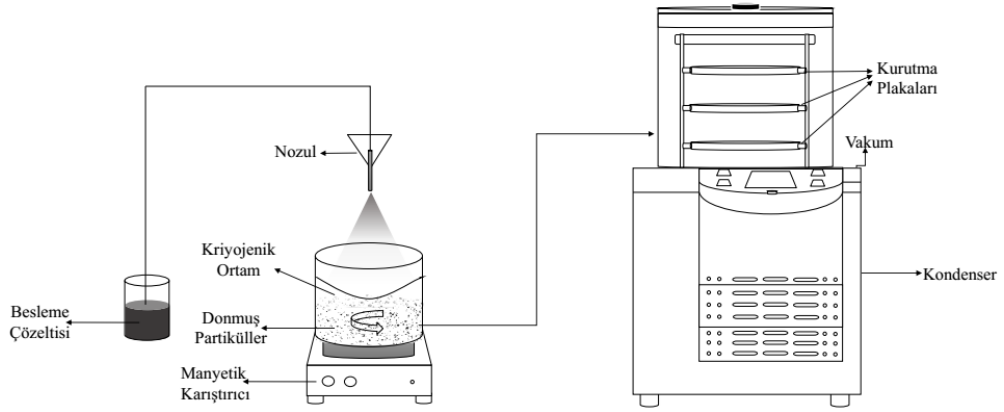
Çizelge 2.1. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma işlemleri arasındaki farklılıklar (Fellows, 2009)

GPK	GDK
Sıvı formda ve ısı dayanımı yüksek ürünlerde kullanılmaktadır.	Isıl dayanımı düşük ürünlerin kurutulmasında kullanılmaktadır.
Ürünün kurutucuya giriş sıcaklığı genellikle 100°C'nin üzerindedir.	Suyun donma noktasının altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir.
Atmosferik basınçta gerçekleştirilir.	Düşük basınç kullanılmaktadır.
Ürünlerin yapısında sıcaklığa bağlı olarak fiziksel bozunmalar meydana gelebilmektedir.	Yapısal değişimler ve büzüşme en düşük seviyededir.
Tek bir aşamada gerçekleştiğinden ürün elde etmek için gereken süre oldukça kısadır.	Dondurma, birinci kurutma ve ikinci kurutma gibi aşamaları içerdiğinden kurutma süresi oldukça uzun sürebilmektedir.
Tat ve kokuda yüksek sıcaklığa bağlı değişimler meydana gelmektedir.	Tat ve koku bileşenlerinin korunumu en yüksek düzeydedir.
Üründeki su yüksek sıcaklık vasıtası ile buharlaşarak uzaklaşır	Suyun uzaklaşması buzun süblimasyonu ile gerçekleşmektedir.
Kurutma maliyeti düşüktür.	Maliyet yaklaşık 4 kat daha fazladır.
Gözenekli yapı oluşumu sınırlıdır.	Gözenekli yapıların oluşumu oldukça fazla olduğundan son ürünün rehidrasyon özellikleri üst düzeydedir.

2.4 Püskürtmeli Dondurarak Kurutma İşlemi

Püskürtmeli dondurarak kurutma (PDK) işlemi, GPK ve GDK işlemlerinin özelliklerini kombine eden, küresel ve gözenekli formda mikro veya nano boyutta partiküllerin oluşumu ile sonuçlanan oldukça yeni bir kurutma işlemidir (Ishwarya ve Anandharamakrishnan, 2015).

PDK işlemi temel olarak üç aşamada gerçekleşmektedir. Kurutulacak olan materyal ile hazırlanan çözelti bir nozul ile mikro veya nano boyutta damlacıklar haline getirilir. Elde edilen bu damlacıklar soğutucu bir akışkan vasıtası ile dondurulur. Son aşamada, püskürtülerek dondurulan damlacıklar düşük basınçta kurutulur ve toz formda ürün eldesi sağlanır (Wanning ve ark, 2015). PDK işleminin temel basamakları Şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PDK işleminin şematik gösterimi

Çözeltinin püskürtülmesi sonucu elde edilen küçük çaplı damlacıklar, donma aşamasında daha homojen ve fazla yüzey alanı sağlayarak hem donma hem de kuruma hızını artırır. Küçük çaplı mikro-kürelerin oluşması yüzey kütle transfer katsayısında artış sağlayarak toplam kuruma zamanının GDK işlemine göre düşmesini sağlar. Püskürtme işlemi ile elde edilen küçük boyutlu kürelerin kurutulması sonucunda düzgün yapıda ve serbest halde akabilen ürünler elde edilebilmektedir (MacLeod ve ark., 2006; Her ve ark., 2010; Ishwarya ve Anandharamakrishnan, 2015). Ayrıca PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin düzgün küresel ve gözenekli yapıları sonuç ürünün rehidrasyon özelliklerini artırmaktadır (Her ve ark., 2010, Ishwarya ve ark., 2015).

PDK, genellikle eczacılık endüstrisinde kullanılan, ancak son yıllarda gıda uygulamalarında da kullanım alanı bulan bir kurutma işlemidir (Ishwarya ve ark., 2015). Çözünabilir toz ilaçlar, solunum yoluyla alınan ilaçlar ve insülin gibi eczacılık endüstrisinde kullanılan ürünlerin yanı sıra, çözünabilir kahve, peynir altı suyu (PAS) proteinleri, yumurta albümini, vitaminler, bovin serum albümin, tripsinojen, lizozim ve *Lactobacillus paracasei* gibi gıda endüstrisinde kullanılan ürünler de PDK işlemi ile başarıyla kurutulmuşlardır (Sonner ve ark., 2002; Yu ve ark., 2006; Engstrom ve ark., 2007; Semyonov ve ark., 2010; D'Addio ve ark., 2012; Parthasarathi ve Anandharamakrishnan, 2016; Teixeira ve ark., 2017). Çizelge 2.2'de PDK işlemi ile yapılan bazı çalışmalar ve kurutulan materyaller derlenmiştir. Farklı özelliklerdeki birçok ürünün PDK işlemi ile kurutulabilmesi bu yöntemin esnekliğini ve uygulama alanının genişliğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 2.2. PDK işlemi ile kurutulan bazı materyaller

Materyal	Kullanım Alanı	Kaynak
Kahve Tozu	Gıda	Khwanpruk ve ark. (2008)
E Vitamini	Gıda	Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016)
Kanamisin	Gıda	Her ve ark. (2010)
PAS proteini	Gıda	Anandharamakrishnan ve ark. (2010)
Maltodekstrin	Gıda	Khwanpruk ve ark. (2008)
Dokosaheksoenoik asit	Gıda	Karthik ve Anandharamakrishnan (2013)
Kurkumin	Gıda	Yu ve ark. (2016)
Lizozim	Gıda	Engstrom ve ark. (2007)
Poli laktik koglikolik asit, etil selüloz	Eczacılık	Ali ve Lamprecht (2017)
İnsülin	Eczacılık	Schiffter ve ark. (2010)
Tripsinojen	Eczacılık	Sonner ve ark. (2002)
Bovin serum albümin	Eczacılık	Costantino ve ark. (2002)
Albüterol sülfat	Eczacılık	Barron ve ark. (2003)
Darbepoetin alfa	Eczacılık	Nguyen ve ark. (2004)
Fenitoin	Eczacılık	Niwa ve ark. (2010)

PDK işleminin işlem basamakları olan püskürtme, dondurma ve kurutma aşamaları farklı şekillerde gerçekleştirilebilir. Kurutulacak ürünün yapısına göre bu yöntemlerin seçimi büyük önem taşımaktadır (Ishwarya ve ark., 2015).

2.4.1 Püskürtme yöntemleri

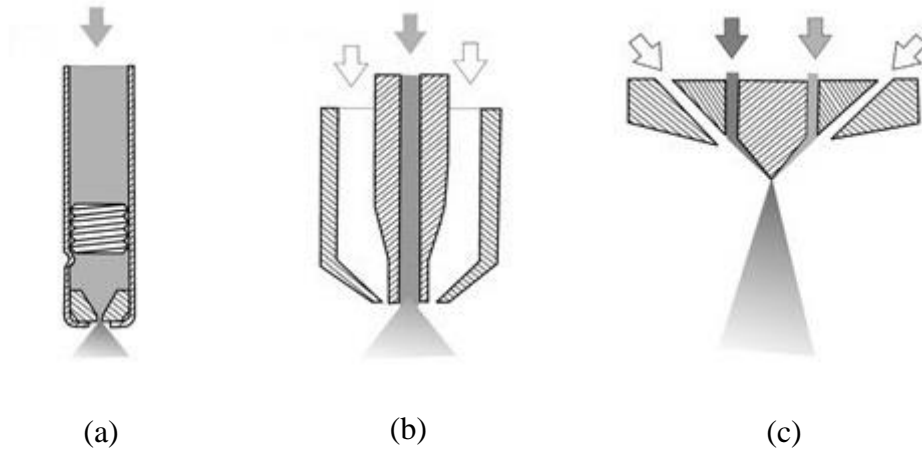
PDK işleminde ilk aşama sıvının püskürtülmesi ile çok sayıda damlacığın oluşturulmasıdır (Wanning ve ark., 2015). Püskürtme işleminde besleme; bir çözelti, süspansiyon ya da kompleks reolojiye sahip bir akışkan olabilir. Püskürtme aşamasında kullanılacak nozulun seçimi, yüksek kaliteli ürünlerin ekonomik olarak üretilmesini sağlayan en önemli aşamadır (Niwa ve ark., 2010). Zira püskürtme yöntemi damlacık boyut dağılımını direkt olarak etkilemektedir. Donma ve dondurarak kurutma aşamaları damlacığın boyutunu belirgin bir şekilde değiştirmedeği için püskürtme işlemi sırasında elde edilen damlacık boyut dağılımı son ürünün partikül boyut dağılımını belirler. PDK

işleminde hidrolik ve pnömatik nozulların yanı sıra son yıllarda üç veya dört akışkanlı nozullar ile ultrasonik nozullar özellikle eczacılık ürünlerinin kurutulmasında kullanılmıştır (Ishwarya ve ark., 2015).

Hidrolik ve pnömatik nozullar

Hidrolik nozullar (tek akışkanlı) genellikle düşük viskoziteli akışkanlar için kullanılmaktadır. Basınç arttıkça damlacık çapı azalmasına rağmen, nozul içerisinde girdap (eddy) oluşumu sebebiyle akışkan dinamiği tam gelişmemiş olduğundan elde edilen damlacık boyutu uniform değildir. Damlacıkların hızı atmosferik sürtünme ve çarpışma sebebiyle azalır, hem ortalama hacim hem de dispers fazın ortalama hacim dağılımı koalesans sebebiyle artar (Wanning ve ark., 2015). Ayrıca dondurma amacıyla kullanılan kriyojenik sıvının çok düşük sıcaklığından dolayı besleme çözeltisinin nozul içerisinde donabilmesi hidrolik nozulların kullanımını sınırlandırmaktadır (Ishwarya ve ark., 2015).

Pnömatik (iki akışkanlı) nozullar viskoz veya Newton tipi olmayan akışkanların püskürtülmesinde hidrolik nozullara göre daha sık tercih edilirler. Besleme çözeltisi kargaşalı gaz (genellikle hava) akımı ile nozul içinde (orifis öncesinde) veya dışında çarpıştırılarak püskürtme işlemi gerçekleştirilir. Pnömatik nozullar hidrolik nozullara göre daha küçük damlacık oluşmasını sağlar ancak sisteme sıcak gaz girişi de gerçekleştirdiğinden donma hızını olumsuz etkileyebilmektedir (Wanning ve ark., 2015). Tek akışkanlı ve iki akışkanlı nozulların dezavantajlarını giderebilmek için dört akışkanlı nozullar bazı PDK sistemlerinde kullanılmıştır. Dört akışkanlı nozullarda iki farklı sıvı besleme, farklı hava akımları ile püskürtülür ve damlacıklar nozulun uç kısmında çarpışırlar. Yapılan çalışmalar bu şekilde püskürtülerek kurutulan ürünlerin yüksek spesifik yüzey alanına sahip gözenekli yapıda olduklarını göstermiştir. Bu sayede özellikle suda çözünürlüğü düşük eczacılık ürünlerinde çözünebilir özellikte yeni formülasyonların geliştirilmesinde dört akışkanlı nozulların kullanılacağı belirtilmiştir (Niwa ve ark., 2010). Şekil 2.3'te tek akışkanlı, iki akışkanlı ve dört akışkanlı nozulların şematik gösterimleri verilmiştir.



Şekil 2.3. PDK işleminde kullanılan farklı nozulların şematik gösterimi a) Tek akışkanlı, b) İki akışkanlı, c) Dört akışkanlı (Wanning ve ark., 2015)

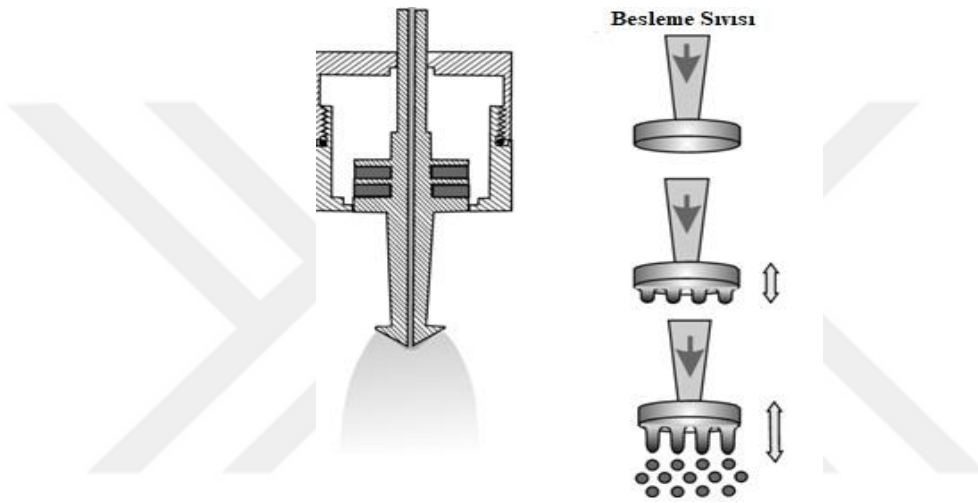
Ultrasonik nozullar

Ultrasonik nozullar, insan kulağının duyma eşiğinin üzerinde yüksek frekansta ses dalgaları üretirler. Disk şeklindeki seramik piezoelektrik malzemeden üretilmiş transformatörler elektrik enerjisini mekanik enerjiye dönüştürürler. Transformatörler, bir güç kaynağından aldıkları yüksek frekanslı sinyal şeklindeki elektriği, sıvı içerisinde kapiler dalgalar yaratan aynı frekansta titreşim hareketine dönüştürürler. İki adet titanyum silindir ise bu hareketi büyütür ve atomizasyon yüzeyindeki titreşim genliğini artırır. Böylece sıvı, yüksek frekanslı ses titreşimleri kullanılarak ince bir sis şeklinde püskürtülür (Şekil 2.4) (Wanning ve ark., 2015).

Ultrasonik püskürtme teknolojisini bulan ve 1970'lerde patentini alan Harvey Berger'in kurucusu olduğu Sono-Tek Inc. (ABD-Milton, NY) tarafından üretilen ultrasonik nozullar günümüzde farklı endüstri alanlarında kullanılmaktadır. Nozul gövdeleri iyi akustik özellikleri, yüksek gerilme mukavemetleri ve korozyona karşı dirençli olması nedeniyle titanyumdan üretilmiştir. Bu nozullar farklı frekanslarda çalışabilmektedirler. Kullanılan dalga boyu çalışma frekansını belirlediği için nozul boyutları çalışma frekansına bağlı olarak değişir. Genellikle yüksek frekansta çalışan nozullar daha küçük boyutlardadır ve daha küçük damlacık oluştururlar. Ayrıca düşük frekansta çalışan nozullara göre maksimum akış debileri daha düşüktür. Ultrasonik nozullar ile püskürtme işlemi basınca bağlı olmadığı için birim zamanda püskürtülecek olan sıvı miktarı tamamen nozula bağlanan pompalama sistemi tarafından kontrol edilir.

Ultrasonik püskürtme işlemi için güç seviyesi ise genellikle 15W'ın altındadır (SonoTek, 2017).

Ultrasonik püskürtme işlemi ile daha dar aralıkta değişen damlacık boyut dağılımı elde edilir. Ayrıca soğuk gaz içine püskürtme işleminde düşük sedimentasyon hızı donma işlemini kolaylaştırır. Ultrasonik nozullar ile elde edilen mikropartiküller oldukça gözenekli bir yapıya sahiptirler ve konvansiyonel nozullarla elde edilen mikro-kürelere göre spesifik yüzey alanları daha büyüktür (D'addio ve ark., 2012).



Şekil 2.4. Ultrasonik nozul şematik gösterimi (Wanning ve ark., 2015)

Kullanılan nozul çeşidinin partikül boyutu üzerindeki etkisi oldukça önemlidir. Farklı nozulların kullanıldığı çalışmalarda elde edilen partikül boyutları da farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda tek akışkanlı nozullar ile elde edilen partikül boyutlarının iki akışkanlı, dört akışkanlı ve ultrasonik nozullara kıyasla daha büyük olduğu belirlenmiştir. Ultrasonik nozul kullanıldığında ise partikül boyutlarının önemli oranda küçüldüğü ve partikül boyut dağılımının daha dar bir aralıkta değiştiği bildirilmiştir (Niwa ve ark., 2010).

D'addio ve ark. (2012) farklı yoğunluklarda aerosol partikülleri oluşturmak için yaptıkları çalışmada 40 kHz ultrasonik nozul kullanarak geniş gözenekli ve suda çözünebilir partiküller elde etmişlerdir. Gao ve ark. (2011) PDK işleminde ultrasonik nozul kullanarak elde ettikleri lipid bazlı mikro-kürelere gerek yüzeyinde, gerekse iç kısımlarında oldukça homojen bir yapı bulunduğunu belirtmişlerdir. Nguyen ve ark. (2004) ile Burke ve ark. (2004), darbepoetin alfa'nın PDK işleminde farklı kriyojenik

sıvılar kullanmalarına karşın ultrasonik nozul kullanılarak küçük çaplı ve üniform yapıda mikro-partiküller elde etmişlerdir. Ancak Sonner ve ark. (2002), tripsinojen enzimi için PDK işlemini ultrasonik nozul kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmada kullandıkları yüksek besleme debisi nedeniyle geniş aralıkta değişen (20-90 µm) partikül boyut dağılımı belirlemişlerdir.

2.4.2 Dondurma yöntemleri

PDK işleminde ikinci aşama püskürtülerek küçük damlacıklar haline getirilen besleme çözeltisinin dondurulmasıdır. Dondurma işlemi için genellikle sıvı azot, argon, hidrofloreter veya pentan gibi bir kriyojenik sıvı kullanılır. Alternatif olarak, yüksek basınç altında sıvı karbondioksit, propan veya etan da kullanılabilir (Ishwarya ve ark., 2015).

Elde edilen damlacıkların dondurulması beş aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama sıvı damlacığın sıcaklığının başlangıç sıcaklığından donma noktasının altındaki bir sıcaklığa düşürülmesi ile gerçekleşen aşırı soğuma aşamasıdır. Yeterli oranda aşırı soğuma gerçekleştikten sonra nükleasyon işlemi kendiliğinden meydana gelir. Aşırı soğuma durumunda çekirdek oluştuktan sonra kristal büyürken erime gizli ısının açığa çıkması ani bir sıcaklık artışına sebep olur. Bu sıcaklık artışı aşırı soğuma durumu bittiğinde sonlanır ve damlacık denge donma sıcaklığına ulaşır. Donma aşamasında, damlacıktan ortama olan ısı transferi ile katı faz büyür. Bu işlem damlacık tamamen donana kadar devam eder. Bu aşamada donmamış sıvı fazdaki çözünen konsantrasyonunun artışına bağlı olarak donma noktası sürekli olarak düşebilir. Son aşamada ise donmuş damlacıkların sıcaklığı ortam sıcaklığına yakın bir kararlı hal sıcaklık değerine düşürülür.

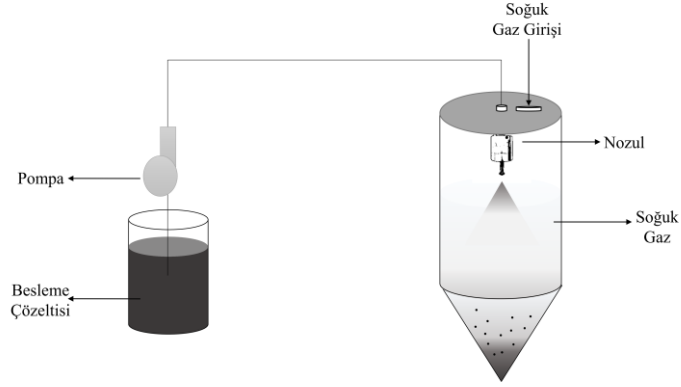
Hem kriyojenik sıvının çok düşük sıcaklığı hem de püskürtme aşamasında oluşturulan küçük damlacıkların artan yüzey alanı sayesinde donma işlemi çok hızlı gerçekleşir. Oldukça küçük boyutları ve yüksek spesifik yüzey alanları sayesinde damlacık ve çevre arasındaki ısı denge hızlıca kurulur. Bu küçük damlacıklarda yeteri kadar soğuk bir ortamda nükleasyon ve donma işlemi bir milisaniyeden daha kısa sürede tamamlanabilir (Al-Hakim ve ark., 2006). Hızlı donma buz çekirdeklerinin oluşumunu ve suyun kristalizasyonunu minimize ederek daha homojen ve oldukça küçük

kristallerin oluşmasını sağlar. Bu sayede özellikle liposomal yapının parçalanması engellenerek protein ve peptitlerin denatürasyonu önlenir (Heller ve ark. 1999; MacLeod ve ark., 2006).

PDK işleminde dondurma aşaması besleme soğuk gaz içine, kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar içine ve kriyojenik sıvı içine püskürtülerek üç farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Ishwarya ve ark., 2015).

Soğuk gaz içine püskürterek dondurma

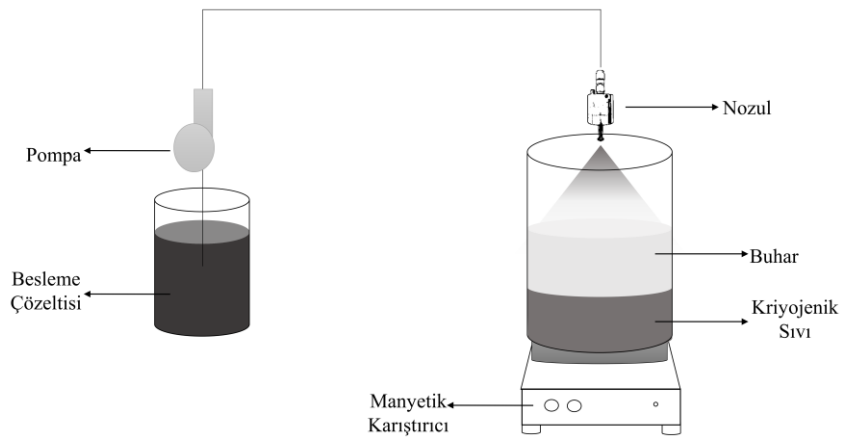
Gaz içine püskürterek dondurma işleminde besleme çözeltisi nemi alınmış soğuk bir gaz içerisine püskürtülür (Şekil 2.5). Püskürtme ve dondurma işleminde donma ve nükleasyon hızı, partiküllerin morfolojik yapısını etkileyen en önemli faktörlerdir (Wanning ve ark., 2015). Damlacık yüzeyindeki konvektif ısı transfer katsayısı ve buna bağlı olarak nükleasyon ve donma zamanı ise damlacığın kayma hızına bağlıdır (Ishwarya ve ark., 2015). Ayrıca gaz sıcaklığı ve oluşturulan damlacık sıcaklığı da donma hızını etkilemektedir. Krämer ve ark. (1999) su damlacıkları için homojen nükleasyon hızını belirlemişler ve saniyede birim hacim sıvı içerisinde oluşan çekirdek sayısının sıcaklık düşüşü ile birlikte hızlı bir şekilde arttığını gözlemleyerek sıcaklığın 1°C düşürülmesinin nükleasyon hızını yaklaşık 40 kat arttırdığını belirtmişlerdir. Soğuk gaz içine püskürtme yönteminde damlacıklar tamamen donmadan önce silindirik ve/veya konik haznenin duvarlarına yapışıp burada bir buz tabakası oluşturabilirler. Wang ve Finlay (2006) bu sorunu gidermek için soğutucu bir gaz ya da kriyojenik bir sıvıyı dondurma haznesinin duvarları boyunca geçirerek merkeze doğru bir soğutucu akışkan hareketi sağlamışlar ve böylece damlacıkların hazne duvarlarına yapışmasını önlemişlerdir.



Şekil 2.5. Gaz içine püskürterek dondurma işlemi

Kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar içine püskürterek dondurma

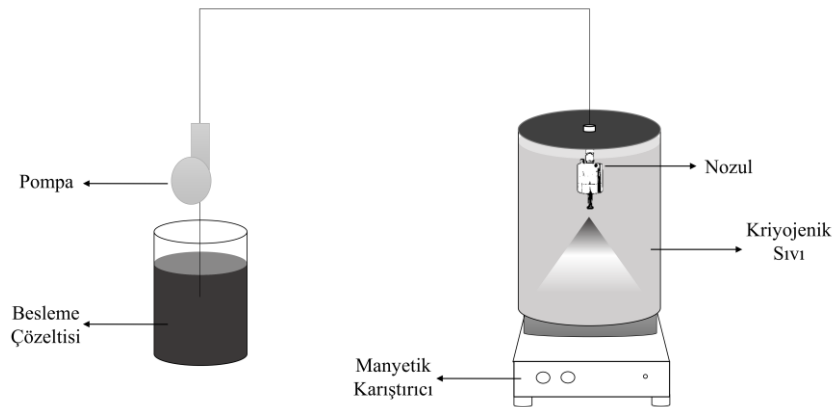
Kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar içine püskürterek dondurma işleminde besleme çözeltisi kaynamakta olan kriyojenik sıvıya belirli bir mesafede bulunan nozul vasıtası ile püskürtülür (Şekil 2.6). Damlacıklar buhar içerisinden geçerken donmaya başlar ve kriyojenik sıvı ile temas ettiklerinde tamamen donarlar. Bu işlem bazı proteinler ve aktif eczacılık ürünleri kullanılarak uygulanmıştır (Gusman ve Johnson, 1990; Constantino ve ark., 2000, 2002; Gombotz ve ark., 2003). Su-buz arayüzeyinde oluşan protein adsorpsiyona bağlı olarak biyolojik ürünlerde oluşan instabilite sorunları yöntemin en önemli dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Webb ve ark., 2002).



Şekil 2.6. Kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar üzerine püskürterek dondurma işlemi

Kriyojenik sıvı içine püskürterek dondurma

Kriyojenik sıvı içine püskürterek dondurma işleminde nozul direkt olarak kriyojenik sıvının içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 2.7). Bu yöntemde damlacıklar oluşur oluşmaz donmaya başlarlar. Kap içerisinde partiküllerin yığılmasını engellemek için kriyojenik sıvı bir karıştırıcı vasıtası ile karıştırılabilir. Gaz ile kıyaslandığında daha yüksek viskoziteye ve yoğunluğa sahip olan kriyojenik sıvı sayesinde daha küçük damlacık boyutu elde edilebilmektedir (Hu ve ark., 2003). Böylece hem kriyojenik sıvının çok düşük sıcaklığı ve hem de damlacıkların yüksek spesifik yüzey alanlarına bağlı olarak artan ısı transfer katsayıları sayesinde donma işlemi çok hızlı gerçekleşir. Bu yüksek hızda gerçekleşen donma işlemi sayesinde, besleme çözeltisindeki çözünür maddenin faz ayrımı engellenir ve protein denatürasyonunu azaltan amorf yapıların hızlı bir şekilde oluşumu sağlanır (Engstrom ve ark., 2007). Bu işlemde, kriyojenik sıvının çok düşük sıcaklığı nedeniyle besleme çözeltisinin nozul içerisinde donmasını engellemek için nozul ısıtılabilir. Fakat bu durumda sıcak besleme sebebiyle kriyojenik sıvıda kaynama hızı artarak buharlaşma kaybı görülebilir. Kaynama hızının artması ile birlikte oluşan buhar, bazı damlacıkların etrafında yalıtım etkisi yaratarak düşük soğuma ve donma hızlarına neden olabilir (Leidenfrost etkisi). Engstrom ve ark. (2007) bu etkiyi sıvı azot kullanıldığında belirlemelerine rağmen iso-pentan kullanılması durumunda gözlemlememişlerdir. Bu durum daha yüksek kaynama noktasına (27°C) sahip iso-pentanın sıvı azota göre daha az buharlaşma eğiliminde olması ile açıklanmıştır.



Şekil 2.7. Kriyojenik sıvı içine püskürterek dondurma işlemi

Çizelge 2.3'te PDK işlemi sırasında farklı dondurma yöntemleri uygulanan bazı materyaller derlenmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı dondurma yöntemleri kullanılarak PDK işlemi ile kurutulan materyaller

Dondurma yöntemi	Materyal	Kaynak
KS üzerinde bulunan buhar içine PD	Tripsinojen	Sonner ve ark. (2002)
KS üzerinde bulunan buhar içine PD	Darbepoetin alfa	Nguyen ve ark. (2004)
KS üzerinde bulunan buhar içine PD	Dokosaheksaenoik asit	Karthik ve Anandharamakrishnan (2013)
KS üzerinde bulunan buhar içine PD	Vanilin	Hundre ve ark. (2015)
KS içine PD	Bovin serum albümin	Yu ve ark. (2006)
KS içine PD	Tripsinojen	Henczka ve Badyga (2006)
KS içine PD	E vitamini	Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016)
KS içine PD	<i>Lactobacillus casei</i>	Her ve ark. (2015)
KS içine PD	Kurkumin	Yu ve ark. (2016)
Soğuk gaz içine PD	PAS proteini	Al-Hakim ve Stapley (2004)
Soğuk gaz içine PD	Poli laktik koglikolik asit, etil selüloz	Ali ve Lamprecht (2017)

*KS: Kriyojenik sıvı, PD: Püskürterek dondurma

2.4.3 Kurutma yöntemleri

PDK işleminde, püskürtme sonrasında elde edilen donmuş partiküller geleneksel dondurarak kurutma (GDK), atmosferik dondurarak kurutma veya akışkan yataklı dondurarak kurutma yöntemleri ile kurutulabilmektedir.

Püskürtme ve dondurma işlemi tamamlandığında, kriyojenik sıvı uzaklaştırıldıktan sonra donmuş partiküller liyofilizatörün önceden soğutulmuş (<-40°C) plakaları üzerine yerleştirilir. Düşük basınç ve sıcaklıkta önce birinci kurutma aşaması gerçekleştirilir. Serbest su süblimasyon yolu ile uzaklaştırıldıktan sonra ikinci kurutma aşaması uygulanır. Bu aşamada ise bağlı su uzaklaştırılarak GDK işlemi tamamlanır (Ratti, 2001; Ishwarya ve ark., 2015). GDK işlemi vakum altında gerçekleşir ve kurutma işleminin maliyetini artıran en önemli etkenlerden biri budur. Kurutma işleminin maliyetinin düşürülmesi için dondurarak kurutma aşamasını atmosferik koşullarda gerçekleştirmek, suyun kısmi basıncı düşük kaldığı sürece prensip olarak termodinamik açıdan mümkündür. Atmosferik dondurarak kurutma işlemi, donmuş materyalden suyun

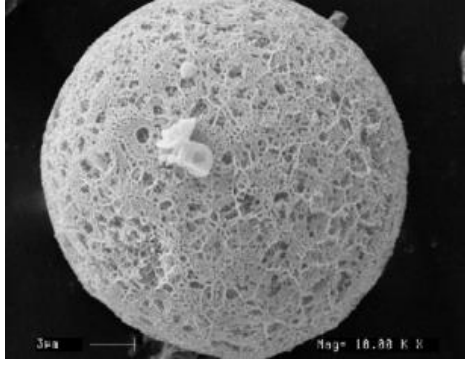
atmosferik basınçta, ısı transfer ortamı olarak kullanılan kuru soğuk bir gazın (hava, helyum veya azot gibi) materyal üzerinden geçirilmesi ile uzaklaştırılması işlemidir (Mumenthaler and Leuenberger, 1991). Meryman (1959) bu yöntemin uygulanabilirliğini ilk olarak ortaya koymuş ve kuruma hızının buz sıcaklığı ve materyal üzerinde su buharı oluşan bölge ile kurutucu ortam (soğuk gaz) arasındaki buhar basıncı (kabin içindeki toplam basınç arasındaki değil) gradyanının bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Claussen ve ark. (2007) atmosferik dondurarak kurutma işleminin, kütle transferine olan iç direnç nedeniyle oldukça uzun alıkonma zamanına sahip olduğunu vurgulamışlar ve hızı kontrol eden parametrenin kuru poroz ürün yapısından olan buharın moleküler difüzyonu olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Wanning ve ark. (2015) da kurutma işleminin etkinliğinin materyalin gözenek yapısına, spesifik dış yüzey alanına ve soğuk gazının akış hızına bağlı olarak değişebildiğini bildirmişlerdir.

GDK işleminde süblimasyon gizli ısıyı iletim veya ışıyım ile sağlanmaktadır. Ancak, bu şekilde toz ürüne üniform olarak ısının dağıtılması oldukça güçtür. Isının üniform şekilde kurumakta olan ürüne aktarılması erime ve çökme riskini ortadan kaldırarak daha kısa sürede kurumanın gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu nedenle kuru ve soğuk bir akışkan ile partiküllerin temasının sağlandığı ve ısı-kütle transfer hızının artırıldığı akışkan yatak sistemleri dondurarak kurutma amacıyla da kullanılmaktadır. Büyük ölçekli üretimlerde iyi bir karışma sağlayarak kurutma süresini kısaltması ve yatırım maliyetinin düşük olması bu yöntemin avantajlarıdır (Leuenberger ve ark., 2006; Anandharamakrishnan, 2008). Akışkan yatak dondurarak kurutma işlemleri atmosferik basınç altında gerçekleştirilebileceği gibi bir miktar vakumun uygulandığı yarı-atmosferik koşullarda da gerçekleştirilebilir. Atmosferik basınç altında dondurarak kurutma işlemleri vakum uygulaması gerektirmediği için maliyeti düşürse de çok büyük miktarda soğuk ve kuru gazın materyal üzerinden sirküle ettirilmesini gerektirmektedir. Kullanılan gazın sıcaklığı ise materyalin çökme sıcaklığının (genellikle $<-30^{\circ}\text{C}$) altında olmalıdır. Bu durum da işlemin ekonomisini olumsuz etkilemektedir (Mumenthaler and Leuenberger, 1991).

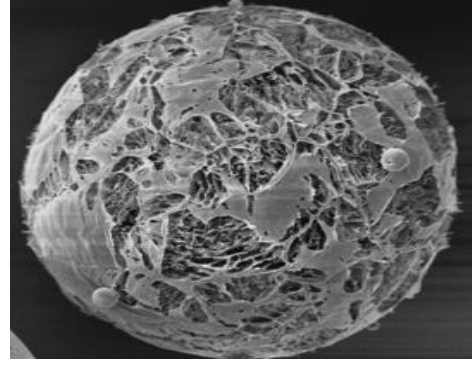
2.4.4 PDK işleminin partikül ve yığın özellikler üzerine etkisi

PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin morfolojileri püskürtme, donma ve kurutma aşamaları sırasında uygulanan yöntemlere bağlıdır. Ayrıca besleme çözeltisinin bileşimi ile kuru madde oranı da partikülün yüzey morfolojisini etkilemektedir. PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin porozitesinin, besleme çözeltisinin kuru madde oranı azaldıkça arttığı belirlenmiştir (Mueannoom ve ark., 2012).

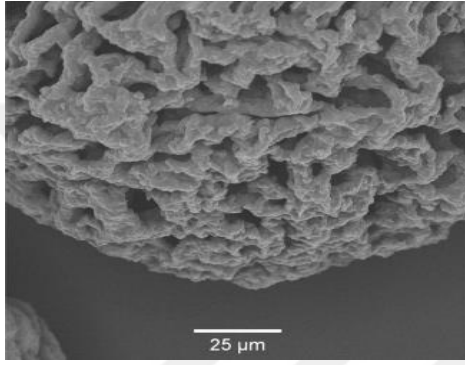
Donma hızı damlacık morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir. Nükleasyon yüksek oranda sıcaklığa bağımlı rastgele gerçekleşen bir işlemdir. Hızlı soğuma nedeniyle damlacık içerisinde belirgin bir sıcaklık gradienti oluşması durumunda ilk çekirdek oluşumu damlacığın yüzeyinde başlar. Sıcaklık dağılımının sabit olması halinde damlacığın iç kısımlarında homojen nükleasyon da meydana gelebilir. Yüzey nükleasyonu, kurutulmuş partiküllerdeki porlarda karakteristik desenlerin oluşmasına neden olur (Wanning ve ark., 2015). Donma aşaması düzgün bir şekilde gerçekleştirilirse kurutma aşamasında suyun uzaklaşması dışında mikro yapıda bir değişiklik olmaz (Anandharamakrishnan, 2008). Al-Hakim ve Stapley (2004) GPK ve PDK işlemi ile elde edilen PAS tozlarının morfolojilerini taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak karşılaştırmışlardır. GPK işlemi ile elde edilen örneklerde SEM görüntüleri, partikülden olan nem kaybı sebebiyle içe doğru büzülmüş, pürüzsüz ve kabuk oluşmuş bir morfoloji ortaya koymuştur. PDK işlemi ile elde edilen örneklerde ise poroz bir mikro yapı ve bu poroz mikro yapıyı çevreleyen bir yüzey tabakası belirlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda PDK işlemi sonucu elde edilen bazı SEM görüntüleri Şekil 2.8'de verilmiştir.



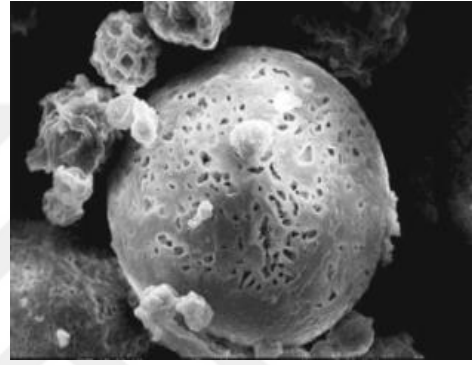
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 2.8. PDK ile elde edilmiş bazı ürünlerin SEM görüntüleri (a) PAS protein izolatu ile kaplanmış vanilin- 10000x büyütme oranı (Hundre ve ark., 2015), (b) PAS protein izolatu (Anandharamakrishnan, 2008), (c) Tam yağlı süttozu (Rogers ve ark., 2008), (d) Dokosaheksaenoik asit (Karthik ve Anandharamakrishnan, 2013)

Vanilin, PAS protein izolatu, süt ve dokosaheksaenoik asit gibi farklı materyaller PDK işlemleri ile kurutulmuş ve yüzeylerinde çok sayıda gözeneğe sahip düzgün küresel yapıda partiküller elde edilmiştir. Elde edilen gözenekli yapıların, kuruma süresinin GDK işlemine göre kısılmasını sağladığı belirtilmiştir (Anandharamakrishnan, 2008; Rogers ve ark., 2008; Karthik ve Anandharamakrishnan, 2013; Hundre ve ark., 2015). Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015) PDK işlemi ile elde ettikleri çözünebilir kahvenin fiziksel özelliklerini GDK ve GPK işlemleri ile elde ettikleri örneklerle karşılaştırdıkları çalışmada, PDK işlemi ile elde edilen ürünlerde ortalama partikül boyutu değerlerinin GDK ile elde edilenlere (636.8 μm) göre yaklaşık 6 kat daha küçük, GPK ile elde edilen partiküllere (50.4 μm) göre yaklaşık iki kat daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. PDK ve GPK işlemleri ile elde edilen örneklerde dar bir aralıkta değişen partikül boyut dağılımı (mono-modal) gözlemlenirken, GDK işlemi ile kurutulmuş örneklerde partikül boyut dağılımının geniş bir aralıkta değiştiği görülmüştür. Bu durum GDK işleminde partikül boyut dağılımının kontrolünün sağlanamaması ile açıklanmıştır. Ayrıca, PDK

işlemi ile elde edilen ürünlerde uçucu aromatik bileşenlerin tutumunun (%93), GDK (%77) ve GPK işlemlerine göre (%57) oldukça iyi olduğu bildirilmiştir.

Spesifik yüzey alanı (SYA), kurutma sonrası elde edilen tozların morfolojik özellikleri açısından en önemli kalite parametrelerinden biridir. SYA, toz partikülün yüzeyindeki gözenekliliğe bağlı olarak, tek bir kürenin yüzey alanından daha yüksek değerlere sahip olabilmektedir. SYA'nın belirlenmesi, genel olarak toz partiküllerinin inert bir gazı (azot gazı adsorpsiyonu) adsorbe etme kapasitesinin ölçülmesi prensibine dayanır. Kurutma tekniğine göre elde edilen tozların porozitesi ve gözenek çapları arttıkça SYA değerleri artar ve bu değer yüksek oluşu çözünübilirlik özelliği yüksek, rekonstitüsyon özellikleri iyi tozların üretildiğinin bir ifadesi olarak belirtilir. Küresel ve üniform yapıda damlacıklar elde edilmesi, elde edilen damlacıkların hızlı bir şekilde donması ve buzun süblimasyon ile uzaklaştırılması sayesinde PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin sahip oldukları SYA'nın, genel olarak GDK ve GPK ile elde edilen partiküllerden daha yüksek olduğu bilinmektedir. (Hundre ve ark., 2015). PDK işlemi ile elde edilen farklı materyallerin partikül boyutları ve SYA değerleri Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk, toz ürünlerde paketleme, depolama ve taşıma gibi aşamalarda önemli kalite parametreleridir (Fernandes ve ark., 2014). Gıda tozlarının yığın özellikleri, sahip oldukları partikül boyutu ve partikül boyut dağılımları ile doğrudan ilişkilidir (Koç ve ark., 2011). Tekdüze partikül boyut dağılımı ve küçük partikül boyutuna sahip tozların daha yüksek yığın yoğunluğa sahip olduğu bilinmektedir (Caparino ve ark., 2012). Toz ürünlerin paketlenmesinde sıkıştırılmış yoğunluk değerleri paket tasarımı ve maliyeti için oldukça önemli bir parametredir ve daha yüksek yoğunluklu tozlar daha küçük paketlerde taşınabilmektedir (Fernandes ve ark., 2014). PDK işlemi ile elde edilen toz ürünlerin GDK ile elde edilen toz ürünlere göre genel anlamda daha yüksek yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerlerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu durum, PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin daha küçük boyutta olması ile açıklanmaktadır (Semyonov ve ark., 2010; Rajam ve Aanandharamakrsihnan, 2015).

Çizelge 2.4. PDK işlemi ile kurutulan farklı materyallerin ortalama partikül boyutları ve SYA değerleri

Materyal	Koruyucu/Kaplama Materyali	Nozul Tipi	Partikül Boyutu (µm)	SYA (m ² /g)	Kaynak
10-Hidroksi Kamptotesin	Gliserol türevleri	Ultrasonik	29.8-42.17	-	Gao ve ark. (2011)
<i>Baccharis dracunculifolia</i> ekstraktı	Mannitol, modifiye mısır nişastası	Tek akışkanlı	4.80-6.12	-	Teixeira ve ark. (2017)
Bovın serum albumin	Polilaktitglikolit	Ultrasonik	10	-	Bittner ve Kissel (1999)
Bovın serum albümin	-	Tek akışkanlı	100-300	19.2-97.7	Yu ve ark. (2006)
Çözünebilir kahve	-	İki akışkanlı	91.1	-	Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015)
Darbepoetin alfa	Trehaloz	Ultrasonik	3.2-5.2	24-29	Nguyen ve ark. (2004)
Diterpeonid lakton	Hidroksipropilselüloz	İki akışkanlı	0.6-2.5	-	Wei ve ark. (2017)
E vitamini	PAS protein izolatu	İki akışkanlı	145.3	-	Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016)
Epitelyal büyüme faktörü (rhEGF)	Yumurta lesitini, sükröz	Ultrasonik	2.39-8.10	43.5-108.7	Yin ve ark. (2014)
Fenitoin	-	Dört akışkanlı	25	36.5-58.5	Niwa ve ark., (2010)
Kanamisin	-	İki akışkanlı	6.4-13.5	-	Her ve ark. (2010)
Klaritomisin	Mannitol, sükröz	Ultrasonik	0.2-0.7	-	Ye ve ark. (2017)
Kolesterol-etilen glikol	Mannitol	Ultrasonik	21	-	D'addio ve ark. (2013)
Kurkumin	Kitosan	İki akışkanlı	30-120	-	Yu ve ark. (2016)
<i>Lactobacillus casei</i>	Mannoz, glukoz, sakaroz, sükröz	İki akışkanlı	24.8	-	Her ve ark. (2015)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Trehaloz, maltodekstrin	Tek akışkanlı	400-1400	-	Semyonov ve ark. (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PAS protein izolatu, frukto-oligosakkarit, sodyum aljinat	İki akışkanlı	54.0-104.1	-	Rajam ve Anandharamakrishnan (2015)
Lizozim	Trehaloz	İki akışkanlı	9-129	-	Engstrom ve ark. (2007)
Ovalbümin	-	İki akışkanlı	11.8	-	Yeom ve Song (2010)
PAS proteini	-	Tek akışkanlı	393-480	-	Anandharamakrishnan (2008)
Poli laktik koglikolik asit, etil selüloz	-	Tek akışkanlı	166-415	-	Ali ve Lamprecht (2017)
rhDNase, anti IgE	Mannitol, trehaloz, sükröz	İki akışkanlı	5.9-32.0	44.1-127.7	Maa ve ark. (1999)
Salmaterol ksinafoat	Laktoz, mannitol, trehaloz	Tek akışkanlı	10.9-34.9	-	Rahmati ve ark. (2013)
Sodyum floresin	Mannitol, maltodekstrin	Dört akışkanlı	50	-	Wanning ve ark. (2017)
Şitake mantarı aromatik ekstraktı	-	İki akışkanlı	19.3	-	Her ve ark. (2015)
Tripsinojen	Trehaloz	Ultrasonik	20-80	-	Sonner ve ark. (2002)
Vanilin	PAS izolatu, β-siklodekstrin	İki akışkanlı	24-165	-	Hundreve ark. (2015)
Yağlı-Yağsız süt tozu	-	-	415	-	Rogers ve ark. (2008)

Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015) PDK, GDK ve GPK ile çözünebilir kahve üretimini gerçekleştirdikleri çalışmada, PDK işlemi ile elde edilen toz ürünlerin yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerlerinin GDK (350-360 kg/m³) ve GPK (330-

390 kg/m³) ile elde edilen tozlara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin düzgün küresel şekle sahip olması ve partikül boyut dağılımlarının daha dar bir aralıkta değişmesi bu yöntem ile GDK ve GPK işlemlerine göre daha iyi akabilirlik özelliklerine sahip tozlar elde edilmesini sağlamaktadır (Parthasarathi ve Anandharamakrishnan, 2016). PDK işlemi ile elde edilen bazı tozların yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. PDK işlemi ile elde edilen bazı toz ürünlerin yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri

Materyal	Yığın Yoğunluk (kg/m ³)	Sıkıştırılmış Yoğunluk (kg/m ³)	Kaynak
<i>Baccharis dracunculifolia</i> ekstraktı	250-400	340-490	Teixeira ve ark. (2017)
Çözünabilir Kahve	610	680	Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015)
E vitamini	270	320	Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016)
İnsülin	3.2	4.6	Schiffter ve ark. (2010)
Kurkumin	-	30	Yu ve ark. (2016)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	170-370	180-400	Rajam ve Anandharamakrishnan (2015)
PAS proteini tozu	220	-	Al-Hakim ve Stapley (2004)
Sodyum floresin	12	14	Wanning ve ark. (2017)
Toz grip aşısı	170	260	Garmise ve ark. (2007)

2.5 Mikroenkapsülasyon

Enkapsülasyon; bir maddenin veya karışımın başka bir madde veya sistem ile kaplanması veya hapsedilmesi olarak tanımlanmaktadır. Enkapsülasyonda temel amaç, hassas bileşenin çevresel faktörlerden korunması amacıyla katman oluşturacak maddeyi içeren solüsyon ile emülsifiye edilmesi ve ardından kurutulmasıdır (Desobry ve ark., 1997). Mikroenkapsülasyon ise aktif bir maddenin (çekirdek materyal) çevresinin bir veya daha fazla kaplama materyali ile sarılıp mikrometre ile milimetre aralığında büyüklüğe sahip kapsüllerin (mikrokapsül) elde edilmesinde kullanılan bir teknolojidir (Koç ve ark., 2010). En temel tanımıyla bir mikrokapsül, çevresinde düzenli yapıda bir katman bulunan küçük bir küredir (Poshadri ve Kuna, 2010). Mikroenkapsülasyon işlemi ile temel bileşen ve ürünün diğer bileşenleri arasında fiziksel bir katman oluşturulur. Bu teknikle sıvı damlacıklar, katı partiküller veya gazlar, ince bir film içerisine veya gıdalarla kullanılabilen bir kaplama materyali içerisine hapsedilir. Hapsedilmesi istenen bileşen tek veya birkaç farklı madde olabilir ve tek veya çift

katman ile sarılabilir. Bu bileşen veya bileşenlerin tutulması onların kimyasal fonksiyonlarına, çözünürlüklerine, kutuplaşma ve uçuculuk derecelerine bağlıdır (Sadıkoğlu, 2010). Enzimlerin ve diğer biyoteknolojik materyallerin katı formlarının oluşturulmasında en önemli konu, oluşturulan katı formun sulu çözelti haline getirildiğinde stabilitesini ve aktivitesini koruması gerekliliğidir (Namaldı ve ark., 2006).

Enkapsülasyon teknolojisi günümüzde eczacılık, kimya, kozmetik, gıda ve boya gibi farklı birçok sektörde kullanılmaktadır (Augustin ve ark., 2001; Heinzen, 2002). Mikroenkapsülasyon tekniği, gıda sektöründe genellikle sıvı damlacıkların, katı partiküllerin veya uçucu bileşenlerin gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplanması için kullanılmaktadır (Gharsallaoui ve ark., 2007; Kaushik ve Roos, 2007; Mahdavi ve ark., 2016). Gıda ürünleri içerisinde çoğunlukla katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, vitaminler, mineraller, renk bileşenleri ve enzimler mikroenkapsülennmişlerdir (Estevinho ve ark., 2013; Mahdavi ve ark., 2016; Parthasarathi ve Anandharamakrishnan, 2016).

Gıda bileşenlerinin mikroenkapsülasyonunda birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon yönteminin seçilmesinde, çekirdek materyalin ve kaplama materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile kaplanacak olan gıda bileşeninin nerede kullanılacağı en önemli faktörlerdir. Farklı kaplama materyallerinin kullanılması ve yeni kurutma tekniklerinin ortaya çıkması ile birlikte günümüzde farklı özellikte fonksiyonel gıdalar elde edilebilmektedir. Enkapsüle edilmiş bileşenlerin salınımı ortam pH'sının değiştirilmesi, mekanik etki, sıcaklık uygulaması ve osmotik kuvvet gibi faktörlerle değiştirilebilmektedir. Gıda endüstrisinde gerçekleştirilen enkapsülasyon işlemlerinde maliyet eczacılık veya kozmetik endüstrisine göre daha büyük önem arz etmektedir (Desai ve Park, 2005). Kaplama materyallerinin seçimi ve kullanılacak olan mikroenkapsülasyon yöntemi uygulanacak olan gıdaya spesifik olmalı ve gıda özelliklerini en iyi şekilde koruyabilmelidir. Dolayısı ile bu iki unsur birlikte düşünülerek mikroenkapsülasyon işlemi özenle tasarlanmalıdır.

2.5.1 Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan kaplama materyalleri

Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan kaplama materyalleri, son ürünün fonksiyonel, fiziksel ve duyuşsal özelliklerine etki etmektedir. Dolayısı ile kullanılan kaplama materyalleri belirli özellikleri taşıma zorunluluğundadır. Buna göre kaplama materyali;

- Kolay işlenebilmeli ve yüksek konsantrasyonlarda bile reolojik özelliklerini koruyabilmelidir.
- Emülsifikasyon yeteneği yüksek olmalı ve çekirdek materyal ile stabil emülsiyonlar oluşturmalıdır.
- Mikroenkapsülasyon işlemi sırasında ve daha sonraki aşamalarda (depolama vb.) çekirdek materyal ile herhangi bir reaksiyona girmemelidir.
- Çekirdek materyalin bütününe kaplayabilmeli ve dış etkenlere karşı koruma sağlayabilmelidir.
- Kaplama sonrasındaki kurutma işlemlerinde sıkı bir yapı oluşturarak stres faktörlerine karşı koruma sağlamalıdır.
- Kullanım kolaylığı açısından arzu edilen çözgünde çözünür özelliğe sahip olmalıdır.
- Salınım sırasında çekirdek materyalin tamamen açığa çıkmasını sağlamalıdır.
- Ucuz, inert ve kolay bulunabilir olmalıdır (Güngör, 2013).

Enzimler gibi biyolojik değeri yüksek maddelerin mikroenkapsülasyonunda kullanılacak kaplama materyallerinin suda çözünürlüğü yüksek, yüksek kuru madde içeriğinde düşük viskoziteli, film oluşturucu özellikleri yüksek, düşük higroskopik özellikte ve kuruma özelliği yüksek olmalıdır (Gharsallaoui ve ark., 2007).

Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, küresel ve pürüzsüz mikro-kapsül oluşumu sağlamalarının yanı sıra kaplama materyalleri ile çekirdek materyalinin arasındaki yapışma kuvvetini artırır (Bruschi ve ark., 2003). Mikroenkapsülasyon işleminde genellikle nişasta, maltodekstrin ve mısır şurubu gibi karbonhidratlar tercih edilmektedir (Dezarn, 1995;

Kenyon, 1995). Yüksek konsantrasyonlarda bile düşük viskoziteye sahip olmaları ve çözünürlüklerinin iyi olması sayesinde bu materyaller kaplama materyalleri olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ucuz olmaları ve gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılmalarından ötürü de tercih edilirler (Balasubramani ve ark., 2015; Mahdavi ve ark., 2016; Kalušević ve ark., 2017). Fakat emülsifiye edici özelliklerinin olmaması veya düşük olması sebebi ile mikroenkapsülasyon işleminde tek başlarına kullanılmalarından ziyade proteinlerle birlikte kullanımları daha yaygındır (Güngör, 2013).

Maltodekstrin, mısır nişastasının asidik veya enzimatik yöntemlerle kısmi hidrolizi sonucunda elde edilen ve dekstroz eşdeğeri (DE) 20 veya 20'den küçük olan bir maddedir (Madene ve ark., 2006). Yüksek sıcaklıklarda (90-100°C) ve pH 4.0-5.0 koşullarında nişasta α -amilaz ünitelerine parçalanır ve bu işlemin sonucunda maltodekstrin ve mısır şurubu elde edilir (Kaçar ve Şahan, 2004). Düşük DE değerine sahip maltodekstrinler dondurma gibi gıdalarda yağ ikamesi olarak kullanılmaktadır. Maltodekstrinler yüzey aktif bileşikler olup çözeltileri düşük viskoziteye sahiptir. Maltodekstrinler katı ve sıvı yağların, vitaminlerin, minerallerin ve renk maddelerinin mikroenkapsülasyonu işleminde Maillard reaksiyonunun hızını düşürmektedir. Mikroenkapsülasyon işleminde maltodekstrinler emülsifiye edici özelliklerinin az olması sebebiyle genellikle yardımcı kaplama materyali olarak kullanılmaktadır (Christensen ve ark., 2001; Fernandes ve ark., 2014; Medina-Torres ve ark., 2016; Kalusevic ve ark., 2017; Yamashita ve ark., 2017). Literatürde maltodekstrin, β -karoten, balık yağı, *Lactobacillus paracasei*, meyve pulpları ve antosiyaninler gibi birçok materyalin dondurarak kurutma ile mikroenkapsülasyonunda farklı kaplama materyalleri ile birlikte kullanılmıştır (Desobry ve ark., 1997; Heinzelmann ve ark., 1999; Semyonov ve ark., 2010; Fongin ve ark., 2017; Souza ve ark., 2017).

Nişasta, pullulan, sakaroz, laktoz, maltoz, glukoz ve inülin gibi karbonhidratlar da çeşitli özellikleri nedeniyle farklı gıdalarda kaplama materyali olarak kullanılabilir. İnülin, β -2-1 fruktoz ünitelerinin son kısmına glukoz bağlı olan zincir şeklinde bir karbonhidrattır. İnülin, kalsiyum biyoyararlılığını artırabilen ve prebiyotik etki gösterebilen bir diyet lifidir. Sağlık açısından olumlu etkilere sahip olan inülin, kaplama materyali olarak da kullanılabilir. Literatürde inülin, esansiyel yağlar, kuş kirazı

(*Aronia melanocarpa L.*) ekstraktı ve *Lactobacillus plantarum* gibi farklı bileşenlerin dondurarak kurutma ile mikroenkapsülasyon işlemlerinde kaplama materyali olarak kullanılmıştır (Fernandes ve ark., 2014; Ćujić ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016).

Gamlar

Gam ve kıvam artırıcı gibi maddeler, kendilerinin belirgin tatları olmamasına rağmen gıdalar ile birlikte kullanıldıklarında duyuşsal özelliklere etki edebilmektedir. Yüksek viskoziteye sahip olduklarından ve difüzyonu geciktirdiklerinden tatlılık unsurunun azalmasına neden olmaktadır (Godshall, 1997). Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan gamlar arasında akasya gamı olarak da bilinen gam arabik, yüksek emülsifiye etme gücünden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. %2 protein, D-galaktoz, L-arabinoz ve D-glukronik asit içeren polimer yapıda bir madde olan gam arabığın, içerdiği proteinler nedeniyle emülsifikasyon kapasitesi oldukça iyidir (Dickinson, 2003). Diğer gamlara göre daha kolay çözünebilmesi, uçucu bileşenlerin salınımını engellemesi ve düşük viskozitesi nedeniyle mikroenkapsülasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Madene ve ark., 2006). Literatürde gam arabik, uçucu yağlar, β -karoten, polifenoller, kahveden elde edilen fenolik bileşikler ve kurkumin gibi birçok bileşenin dondurarak kurutma ile mikroenkapsülasyonunda kaplama materyali olarak kullanılmıştır (Desobry ve ark., 1997; Kaushik ve Roos, 2007; Fang ve Bhandari, 2010; Cano-Higueta ve ark., 2015; Ballesteros ve ark., 2017).

Proteinler

Proteinler, fonksiyonel özellikleri açısından mikroenkapsülasyon uygulamaları için uygun kaplama materyalleridir. Özellikle aromatik bileşenler ve lezzet bileşenlerinin tutulmasında diğer kaplama materyallerine göre daha başarılıdırlar (Landy ve ark., 1995). Molekül ağırlıklarının yüksek olması, molekül zincirlerinin esnek oluşu, suda çözünen ve çözünmeyen grupları aynı anda içermesi gibi kimyasal özelliklere sahip olmasının yanında film oluşturma ve çözünürlüklerinin iyi olması gibi teknolojik özelliklere sahip olan proteinler mikroenkapsülasyon işlemlerinde yaygın bir şekilde kullanılabilir (Madene ve ark., 2006). Jelatin, PAS proteinleri ve kazein gibi proteinler sıklıkla tercih edilen kaplama materyalidir (Güngör, 2013).

2.5.2 Mikroenkapsülasyon yöntemleri

Gıda bileşenlerinin enkapsülasyonu amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Enkapsülasyon bileşenlerinin çoğunlukla sıvı formda olmasından dolayı birçok teknoloji kurutma esasına dayanmaktadır (Nedovic ve ark., 2011). Mikroenkapsülasyon yönteminin seçilmesi esnasında, çekirdek materyal ve kaplama materyallerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ve kaplanacak olan gıda bileşeninin kullanılacağı yerin büyük önemi vardır. Akışkan yatak kaplama, kokristalizasyon, koaservasyon, ekstrüzyon, GPK ve GDK işlemleri endüstride kullanılan başlıca mikroenkapsülasyon teknikleridir (Güngör, 2013). Ayrıca püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerini kombine eden PDK işlemi, son yıllarda enzimler ve mikroorganizmalar gibi değerli biyoteknolojik materyallerin mikroenkapsülasyonunda kullanılabilir yenilikçi bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır (Ishwarya ve ark., 2015).

GPK işlemi ile mikroenkapsülasyon

Tripsin, amilaz, proteaz, glukoz oksidaz, pektinaz, laktaz ve pepsin gibi GPK ile elde edilmiş enzimler özellikle gıda endüstrisinde yaygın kullanım alanına sahiptir (Bhandari ve ark., 2008). Ticari enzimlerin üretiminde, depolama boyunca aktivitenin korunması önemli bir konudur. Dolayısıyla depolama süresinin artırılması için enzimlerin kaplama materyalleri kullanılarak üretilen toz formları geliştirilmiştir (Namaldı ve ark., 2006). Eğer işlem koşulları optimize edilmiş ve ortama stabilizör maddeler eklenmişse, GPK işlemi ısı duyarlılığı yüksek enzimler için kullanılabilir bir yöntem olabilmektedir (Pilosof ve Sanchez, 2006).

Biyolojik materyallerin ve enzimlerin katı formlarının oluşturulmasında en önemli konu, üretim aşamasında ürünün stabilitesini ve aktivitesini olabilecek en yüksek oranda koruması gerekliliğidir (Namaldı ve ark., 2006). Enzimatik aktivitenin korunabilmesi için bu materyaller laktoz, süktroz, mannitol, gamlar, maltodekstrinler ve siklodekstrinler gibi kaplama materyalleri varlığında kurutulmaktadır (Güngör, 2013). Samborska ve Witrowa-Rajchert (2005), maltodekstrin kullanılarak α -amilaz enziminin GPK işlemi ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, α -amilazın farklı sıcaklıklarda ve farklı besleme hızlarında değişik oranlarda enzim aktivitesine sahip

olduğunu ve en yüksek besleme hızı ile 220°C’de %90 oranında enzim aktivitesinin korunduğunu belirlemişlerdir.

GPK işlemi, aroma maddeleri, lipidler ve pigmentlerin enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılmasına rağmen bu işlemin mikroorganizma, esansiyel yağlar, enzimler ve protein bazlı bileşenler gibi ısıl direnci düşük olan materyaller için kullanımı sınırlıdır (Gharsallaoui ve ark., 2007). Anekella ve Orsat (2013) GPK işlemi ile ahududu suyundaki probiyotiklerin 130°C giriş sıcaklığında canlılık oranının %55’e kadar gerilediğini ancak giriş sıcaklığı 100°C’ye düşürüldüğünde canlılık oranının %81’e yükseldiğini belirlemişlerdir. Anjani ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada fungal proteaz-peptidaz enzimini enkapsüle etmişler ve %70 oranında mikroenkapsülasyon etkinliğine ulaşmışlardır. Ancak Namaldı ve ark. (2006), proteaz enziminin mikroenkapsülasyonu sırasında 130°C giriş sıcaklığı kullanıldığında protein denatürasyonuna bağlı olarak enzim aktivitesinde %32 kayıp oluştuğunu belirtmişlerdir. GPK işlemi, GDK ile kıyaslandığında, enzim veya probiyotik bakteriler gibi sıcaklığa oldukça duyarlı bileşenler için zararlı olabilmektedir (Knorr, 1998).

GDK işlemi ile mikroenkapsülasyon

Gıdaların ve biyoteknolojik ürünlerin mikroenkapsülasyonu amacıyla kullanılan en önemli yöntemlerden biri GDK işlemidir. Bu yöntem ile ısıl duyarlılığı yüksek olan materyaller kurutulmuş homojen yapıda tozlar elde edilebilmektedir. Ancak bu kurutma işlemi, biyolojik aktivitenin kaybına yol açabilecek buz kristali oluşumu, düşük sıcaklık ve dehidrasyon stresi gibi durumlar gözlemlenebilir. Bu nedenle GDK işlemi ile elde edilen enzimlerin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla birçok farklı stabilizör madde kullanılmaktadır (Capela ve ark., 2006).

Amid ve ark. (2014), pitaya meyvesinden saflaştırdıkları amilaz enziminin GDK işlemi ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kaplama materyali olarak gam arabik ve kitozan karışımının kullanıldığı çalışmada yüksek enkapsülasyon etkinliğine (%96) ulaşılmış ve bu kaplama materyallerinin kombinasyonunun dondurarak kurutma sırasında enzim aktivitesi kaybını engellediği sonucuna ulaşılmıştır. Heidebach ve ark. (2009) probiyotik hücrelerin modifiye nişasta kullanarak GDK işlemi ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri ve depolama stabilitesini inceledikleri

çalışmada, mikroenkapsüle *Bifidobacterium* suşunun kaplama yapılmamış örneklerle göre 4°C’de depolama stabilitesinin 90 güne kadar arttığını belirlemişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada *Bifidobacterium longum*’un GDK işlemi sırasında aljinat ile mikroenkapsülasyonun canlılık oranı üzerine etkisi araştırılmış ve ortamda %3 aljinat çözeltisi bulunduğunda %67’lik bir enkapsülasyon etkinliğine ulaşıldığı belirlenmiştir (Amine ve ark., 2014).

PDK işlemi ile mikroenkapsülasyon

PDK işleminin mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılması oldukça yeni bir yöntem olmasına rağmen mikroenkapsülasyon etkinliği ve çekirdek materyalin korunması açısından en başarılı yöntemlerden biridir (Ishwarya ve Anandharamakrishnan, 2015). PDK işlemi dondurarak kurutma aşamasını da içerdiğinden nispeten uzun zaman gerektiren bir metot olmasına karşın, bu işlem ile istenen partikül boyutuna ulaşılabilme kolaylığından dolayı çeşitli gıda ve eczacılık ürünlerinin enkapsülasyonunda başarıyla kullanılabileceği literatürde farklı çalışmalarda belirtilmiştir.

Kumar ve Kar (2014), PDK ile mikroenkapsülasyon işleminin ısıl duyarlılığı yüksek bileşenler için başarılı bir şekilde uygulanabileceğini ve diğer enkapsülasyon tekniklerinden daha kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir. Drooge ve ark. (2005), inulin kullanarak tetrahidrokannabinol (THC-a) enziminin enkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, PDK işlemi ile elde edilen ürünlerde havayla temas sonucunda oksidasyonun neredeyse hiç gerçekleşmediğini, 20°C’de %45 bağıl nemde 3.5 ay sonunda kalan aktivitenin %85 olduğunu, GDK işlemi ile elde edilen ürünlerde ise 1.5 aylık depolama sonunda kalan aktivitenin ancak %20 olduğunu belirlemişlerdir. Karthik ve Anandharamakrishnan (2013), dokosaheksaenoik asidin (DHA) PDK işlemi ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirmiş ve örneklerin oksidatif stabilitesini GDK ve GPK işlemleri ile karşılaştırmışlardır. PDK işlemi ile düşük işlem sıcaklıkları nedeniyle GPK ve GDK işlemlerine göre oksidasyonun daha iyi önlendiği görülmüştür. Oksidasyon oranı PDK işleminde %13, GPK işleminde %33, GDK işleminde ise %31 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, oda sıcaklığında ve buzdolabı koşullarında depolama süresince PDK işlemi ile elde edilen örneklerin oksidasyon stabilitesinin diğer

örneklere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak, enkapsülasyon etkinliğinin (yağ tutumu) PDK işlemi ile elde edilen örneklerde (%71), GPK (%83) ve GDK (%73) ile elde edilmiş örneklere göre biraz daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Maa ve ark. (1999), kaplama materyali olarak mannitol, trehaloz ve sükröz kullandıkları çalışmada rhDNase ve anti-IgE aerosol tozları elde etmek için PDK ve GPK işlemlerini karşılaştırmıştır. PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin yüzeyindeki gözenekliliğin GPK ile elde edilen partiküllere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar GPK işleminde PDK işlemine göre maliyetin daha düşük olmasına ve daha kısa sürede sonuç alınmasına rağmen, PDK işleminde %95 oranında mikroenkapsülasyon verimine ulaşıldığı için, bu işlemin tüm koşullar göz önünde bulundurulduğunda yüksek kapasiteli üretimlerde daha ekonomik bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir. Rahmati ve ark. (2013), eczacılık ürünlerinde aktif bir bileşen olan salmeterol ksinafoatı laktoz, mannitol, trehaloz ve siklodekstrin kullanılarak PDK işlemi ile kurutmuşlardır. PDK işleminin kristalizasyonu minimize ettiğini ve faz ayrımını önlediğini, bu durumun elde edilen tozların fizikokimyasal özelliklerini olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Formülasyonlarda siklodekstrin bulunduğu, gözenekli küresel yapıların oluşumunun arttığı ve partikül boyutu dağılımının 10-30 µm aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca saf haldeki salmeterol ksinafoat tozunun çözünürlük değeri %22 iken PDK işlemi ile mikroenkapsüle edilen ürünün çözünürlük değerinin %90'a çıktığı tespit edilmiştir.

Rajam ve Anandharamakrishnan (2015), PDK işlemi ile *Lactobacillus plantarum*'un mikroenkapsülasyonunu farklı kaplama materyalleri kullanarak gerçekleştirmişler ve farklı kaplama materyallerinin depolama süresince mikro-kapsüllerin fiziksel özellikleri, mikroenkapsülasyon verimi ve hücre canlılığı üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada GDK işlemi, PDK işleminin etkinliğini ortaya koymak için kontrol yöntem olarak kullanılmıştır. PDK işlemi ile mikroenkapsülasyon veriminin %88-95 aralığında olduğu belirlenmiş ve işlemin hücre canlılığını etkilemediği vurgulanmıştır. PDK işlemi ile küresel şekle sahip mikro-kapsüller elde edilmiş, örneklerin akabilirliklerinin iyi, higroskopisitetlerinin ise düşük olduğu bulgulanmıştır. PDK işlemi ile elde edilen mikro-kapsüllerin yığın yoğunluk değerlerinin GDK ile elde edilen mikro-kapsüllere (150-300 kg/m³) göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu

durum GDK ile elde edilen mikro-kapsüllerin PDK işlemi ile elde edilenlere göre partikül boyut dağılımının daha geniş bir aralıkta değişmesi ve partikül şekillerinin tekdüze olmamasına bağlanmıştır. Partikül boyutu açısından örnekler karşılaştırıldığında, PDK ile elde edilen partiküllerin GDK işlemi ile elde edilen partiküllere (344-380 µm) göre oldukça küçük olduğu tespit edilmiştir.

Her ve ark. (2015) ise glukoz, sükroz ve mannoz gibi farklı kaplama materyalleri ile probiyotik tozu elde etmek için PDK işlemi kullanmışlar ve kurutma sonrasında probiyotiklerin %98 oranında canlılıklarını devam ettirebildiklerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, PDK işleminin probiyotik hücrelerin kuru mikro-kapsüllerinin elde edilmesinde uygun bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın, Semyonov ve ark. (2010) yaptığı çalışmada *Lactobacillus paracasei* hücrelerinin PDK işlemi ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdiklerinde %60 canlılık oranına ulaşmışlardır.

Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016), E vitamininin PAS protein izolatu kullanarak PDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada mikroenkapsülasyon verimlerini sırasıyla %89.3, 86.1 ve 89.6, suda çözünme hızlarını ise sırasıyla 0.364, 0.392 ve 0.287 dak⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, hem yüksek mikroenkapsülasyon verimi hem de yüksek çözünürlüklü bir ürün istendiğinde en uygun yöntemin PDK işlemi olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada GPK ile elde edilen tozların nem içeriği %7.16 ve GDK ile elde edilen tozların nem içeriği %6.99 iken, PDK işlemi ile elde edilen tozların nem içeriği %5.41 olarak belirlenmiştir. PDK işlemi ile elde edilen daha düşük nem içeriği, oluşturulan damlacıkların sıvı azot ile hızlı bir şekilde dondurulması sonucunda elde edilen düzgün küresel buz kristallerinin kuruma sırasında ısı ve kütle transferini artırması ile açıklanmıştır. PDK işlemi ile elde edilen toz ürünlerin yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri GDK ile elde edilen tozlara (230-280 kg/m³) benzer, GPK ile elde edilen tozlara (350-510 kg/m³) göre ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. PDK ve GDK ile elde edilen örneklerin yığın yoğunluklarının düşük olması, partiküllerin yüzeyinde çok fazla boşluk olması ile açıklanmıştır. Ayrıca, GPK işlemi ile elde edilen E vitamini örneklerinin akabilirlik özellikleri “çok zayıf” olarak nitelendirilirken PDK ve GDK işlemleri ile elde edilen örneklerin akabilirlikleri “iyi” olarak bulgulanmıştır. Yapılan partikül boyutu analizlerine göre, PDK işlemi ile elde

edilen partiküllerin GDK (279 µm) ve GPK (195.8 µm) ile elde edilen partiküllere göre daha küçük boyutta olduğu belirlenmiştir.

Hundre ve ark. (2015), kaplama materyali olarak PAS proteinleri veya siklodekstrin kullanmış ve PDK işlemi ile vanilinin mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca PDK işlemi morfoloji, partikül boyutu, nem içeriği, ısıl stabilite ve mikroenkapsülasyon verimi gibi parametreler açısından GDK ve GPK işlemleri ile karşılaştırılmıştır. PDK, GDK ve GPK için mikroenkapsülasyon verimleri sırasıyla %72, 86.2 ve 76.8 olarak belirlenmiştir. PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin gözenekli yapısı sebebiyle yüzeye yakın olan vanilinin mikroenkapsülasyon verimini azalttığı belirtilmiştir. PDK ve GPK işlemi kullanılarak elde edilen tozların partikül boyut dağılımının GDK ile elde edilen tozlara göre daha dar bir aralıkta değişim gösterdiği tespit edilmiştir. PDK işleminde GDK işlemine göre (36.91 µm) daha küçük partikül boyutu elde edilmesinin kurutma süresini kısalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, PDK işlemi ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilen örneklerin ısıl stabilitesinin ise GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen örneklerden daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

2.6 Transglutaminaz Enzimi

Gıda proteinleri ürünlerin, doku, stabilite, viskozite, jelleşme, emülsifikasyon ve su tutma gibi özelliklerini etkileyen fonksiyonel bileşenlerdir (Færgemand ve ark., 1998). Gıdaların bu özelliklerinin geliştirilmesi, proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin modifikasyonuna bağlıdır. Proteinlerin modifikasyonu kimyasal, fiziksel ve enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir ve bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılan enzimatik modifikasyonlardır (Imm ve Lee, 2000). Enzimlerin substrata spesifik olmaları, az miktarda kullanılmaları ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumunun daha az görülmesi nedeniyle, enzimatik modifikasyonlar kimyasal modifikasyonlara göre daha sık tercih edilirler (Gerrard ve ark., 2002). Gıdaların dokusal özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak olan en uygun enzimler proteinler arası kovalent çapraz bağlanma gerçekleştirebilen enzimlerdir (Serdaroğlu ve Turp, 2003). Proteinlerin modifikasyonunu gerçekleştirerek gıdalarda arzu edilen özellikleri sağlayabilen en önemli enzimler transglutaminazlardır (Zhang ve ark., 2009).

Transglutaminazlar bir serbest amin grubu ile (proteine bağlı lizin veya peptite bağlı lizin gibi) protein ya da peptite bağlı glutamin γ -karboksiamid grubu arasında proteolitik parçalanmaya dirençli çapraz bağların oluşumunu katalizleyen bir enzim ailesidir (EC 2.3.2.13) (Griffin ve ark., 2002). Transglutaminaz, lizin ve glutamin kalıntıları arasında çapraz bağlar oluşturarak protein molekülü içinde veya moleküller arası bağların oluşmasını sağlayan bir transferazdır. Proteinlerin çapraz bağlanması yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasına sebep olur. Oluşan izopeptit bağlar ϵ -(γ -glutamin) lizin olarak adlandırılmakta ve polimerizasyonun oluşumunu sağlamaktadırlar. Protein içeren gıdalarda bu bağlar, hızlı bir şekilde ve diğer reaksiyonlardan daha önce gerçekleşmektedir. Ortamda enzim tarafından kullanılabilir glutamin veya lizin tükenene kadar bu reaksiyon devam etmektedir (Kuraishi ve ark., 2001).

Transglutaminazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu oluşan kovalent bağlar, hidrojen bağları ve hidrofobik bağlardan yaklaşık 20 kat daha güçlüdür. Kovalent bağların kas proteinlerinin çapraz bağlanmasını sağlama becerileri sayesinde, transglutaminazlar gıda işlemede önemli bir yer edinmiştir (Akamittath ve Ball, 1992; Stangierski ve Baranowska, 2008). Transglutaminazların çapraz bağ oluşturma yeteneği, substrat olarak kullanılacak proteinin yapısına bağlıdır. En etkili çapraz bağlar, esnek bölgesinde glutamin kalıntısı bulunan proteinlerde meydana gelmektedir (Dickinson, 1997).

Transglutaminazların endüstriyel olarak elde edilmesi konusunda üç temel yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşım domuz, sığır ve balık gibi hayvanların vücut sıvılarından ekstrakte edip saflaştırmaktır. Transglutaminazların bir tipi olan faktör XIII, kesim sırasında domuz ve sığır kanından ticari olarak ekstrakte edilebilmektedir (Zhang ve ark., 2009). Ancak kandan elde edilen bu enzimin aktif hale gelebilmesi için trombine ihtiyaç duyması ve ayrıca ürünün rengi açısından olumsuzluklar yaratacağı için gıda endüstrisinde çok fazla kullanılmamaktadır. İkinci yaklaşım, enzimin *E.coli*, *Bacillus* ve *Aspergillus* ile bazı mayaların genetik modifikasyonu ile elde edilmesidir (Seguro ve ark., 1995). Birçok araştırmacı bu konu üzerine çalışmaktadır ancak henüz gıda standartlarına uygun transglutaminaz elde edilememiştir. Üçüncü yaklaşım ise transglutaminaz üreten mikroorganizmalardır (Zhu ve ark., 1998). Bunlar arasında en uygun olan *Streptoverticillium mobaraense*'nin bir varyantı olarak sınıflandırılmıştır.

Enzimin ticarileştirilmesi son zamanlarda artmış ve molekül ağırlığı, sekonder yapısı, enzimatik özellikleri gibi fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir (Romeih ve Walker, 2017).

Yapılan tüm çalışmalarda transglutaminazların gıda matrikslerinde proteinlerin çapraz bağlanmasına dayalı olarak ısıya dayanıklılık, su tutma kapasitesi, elastikiyet, sıklık, emülsifikasyon, çözünürlük ve jelleşme özelliklerini geliştirdiği bildirilmiştir (Motoki ve Kumazawa, 2000; Kuraishi ve ark., 2001). Ayrıca transglutaminazların bazı proteinlerin allerjen özelliklerini azaltma potansiyellerinin bulunduğu da bilinmektedir (Watanabe ve ark., 1994; Gerrard, 2002). Transglutaminaz enzimi proteinleri çeşitli yollarla modifiye edebilme özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde et ürünleri, deniz ürünleri, PAS proteinleri ve unlu mamuller gibi farklı alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca yenilebilir protein filmleri üretiminde de kullanılabilir (Di Pierro ve ark., 2011; Porta ve ark., 2011). Fırıncılık ürünlerinde transglutaminaz un kalitesinin, ekmeğin dokusal özelliklerinin ve makarna gibi ürünlerin pişme sonrasındaki dokusal özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Kuraishi ve ark., 2001; Moore ve ark., 2006). İşlenmemiş et ürünlerinde kullanıldığında ise dokusal özellikleri iyileştirerek herhangi bir ısıl işlem veya tuz ilavesi olmaksızın tek başına et parçalarını bir bütün haline getirebilmektedir. Ayrıca, düşük kaliteli etlerde aminoasit içeriğini artırarak kaliteyi artırabilmektedir (Motoki ve Seguro, 1998). Sodyum kazein-transglutaminaz kompleksi etten uzaklaştırılan yağa ikame olarak kullanılır ve bu şekilde üretilen ürünler yağ içeren ürünlere göre görsel ve duyuşal olarak farklılık göstermez (Nielsen, 1995). Süt ürünlerinde ise, transglutaminaz ilavesinin yoğurta sineresisi önlediği, transglutaminaz-kazein kompleksinin ise yoğurta homojen bir yapı sağladığı, ayrıca transglutaminaz ilavesi ile peynir üretiminde pıhtı veriminin arttığı çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Kuraishi ve ark., 2001; Özer ve ark., 2007).

2.7 Mikrobiyal Transglutaminaz Enzimi

Mikrobiyal Transglutaminaz (mTG) lizin içeren proteinlerin glutamin kalıntılarının γ -karboksiamid grupları ile birincil aminler arasında açıl transfer reaksiyonu katalizleyen Ca^{+2} 'den bağımsız bir enzimdir. mTG *Streptoverticillium* türleri tarafından üretilmektedir. mTG'nin Ca^{+2} 'den bağımsız bir enzim olması, kazein ve miyosin gibi

gıda proteinlerinin fonksiyonlarının modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca mTG iki farklı gıda proteini arasında çapraz bağlar oluşturabilmekte, böylelikle daha yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin oluşumunu sağlayabilmektedirler (Motoki ve Seguro, 1998).

mTG'nin çalışma pH aralığı 5.0-8.0 arasındadır, bununla beraber pH 4.0 ve 9.0'da az da olsa enzimatik aktiviteye sahiptir. Enzimatik aktivite açısından en yüksek sıcaklık 50°C'dir ve aktivitesini 50°C'de 10 dakika boyunca sürdürebilir. Diğer taraftan sıcaklığın 70°C'ye yükselmesi ile aktivitesini birkaç dakika içinde kaybedebilmektedir. mTG, 10°C ve donma noktasında da bir miktar aktiviteye sahiptir (Motoki ve Seguro, 1998). mTG'nin izoelektrik noktası yaklaşık pH 8.9'dur. Molekül ağırlığı ise 38.000 Dalton olarak bulunmuştur. Ayrıca yaklaşık olarak 331 aminoasitten oluşmaktadır (Yüksel ve Erdem, 2007).

mTG, tipik memeli transglutaminazından farklıdır. Deneysel olarak kobay karaciğerinden elde edilen transglutaminazlar enzimatik aktivitesi açısından Ca^{+2} iyonuna gerek duymaktadır. mTG enzimin karakteristik özelliği Ca^{+2} 'den bağımsız katalizör olmasıdır. Bu özellik gıda proteinlerine uyarlanması açısından çok önemlidir. Çünkü, çoğu gıda proteini, kazeinlerde olduğu gibi, düşük kalsiyum iyon derişiminde çökme eğilimi göstermektedir (Zhang ve ark., 2009).

mTG'nin aktif merkezi, SH- grubu katalitik reaksiyona katılan bir sistin kalıntısıdır. Proteinlerin mTG ile reaksiyona sokulmasının jelatin, kazeinat, serum proteini, soya proteini, yumurta sarısı, yumurta beyazı ve gluten gibi geniş bir alanda gıda proteini için kovalent olarak çapraz bağlanmış jel/kolloitlerin üretilmesini sağladığı bilinmektedir. Ancak çapraz bağlanma oranı her bir proteinin makromoleküler yapısıyla yakından alakalı olduğu için, bu proteinlerin hepsi ideal substratlar değildir. Çapraz bağlama benzer türde protein yapıları arasında gerçekleşip benzer olmayan protein yapıları arasında gerçekleşmemektedir (Schorsch ve ark., 2000; Yüksel ve Erdem, 2007).

Cu^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Li^{+} , mTG'ı önemli ölçüde inhibe etmektedir çünkü ağır metaller mTG'nin aktif bölgelerinin bir parçası olan sistein uçlarındaki tiyol gruplarını bağlarlar (Yüksel ve Erdem, 2007). mTG'nin aktif bölgesinde bulunan bu grup nedeniyle belirli şartlar altında enzim okside olabilmektedir. Bu nedenle özel paketlerde ve genel olarak

maltodekstrin veya bir diğerk inert taşıyıcı üzerinde standardize edilmiş olarak satılmaktadır (Payne, 2009).

2.8 Yanıt Yüzey Yöntemi ve Optimizasyon

Yanıt yüzey yöntemi (RSM), deneme setlerinden türetilen basit empirik modellerin kullanıldığı bir optimizasyon tekniğidir ve gıda mühendisliği araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Koç ve ark., 2010). RSM, “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. Myers ve Montgomery (1995)’e göre, RSM proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir.

RSM, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini kapsamaktadır (Eren, 2004). RSM, eleme denemeleri, bölge araştırması ve optimizasyon aşamalarını içermektedir. Eleme denemelerinde esas denemelerinin daha verimli uygulanmasına olanak sağlayacak ön denemeler gerçekleştirilir. İkinci aşama olan bölge araştırmasında amaç, eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin sistemin yanıtında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Optimum noktaya yaklaştıkça yanıt yüzeydeki eğrilik daha belirgin hale gelmektedir. RSM’in bu aşamasında birinci dereceden modeller kullanılır. Birinci dereceden modeller sistemin yanıtını belirlemede yeterli ise seçilen deneme bölgesinin optimum noktadan uzakta olduğu anlaşılır ve yeni bir deneme bölgesi seçilir. Bu işlem, oluşturulan yanıt yüzeydeki eğriliğin önemli olduğu bölgeler bulununcaya kadar devam eder. RSM’in üçüncü aşaması, işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlar. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinomial modeller, üssel modeller veya eksponansiyel modeller kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır (Koç ve ark., 2010). Denemelerin

dizayn edilmesi, modelin seçimi ve geliştirilmesi, modelin istatistiksel olarak doğrulanması ve optimizasyon, RSM'in başlıca kısımlarını oluşturmaktadır.

Optimizasyon işlemi, ulaşılması istenen hedeflere bağımsız değişkenlerin birbiri ile etkileşimlerinin etkisinin incelenmesi sonucunda bir araya getirilerek uygulanmasıdır. Günümüz koşullarında, piyasalarda rekabet edilebilmesi için üretim sistemlerinin mutlaka optimize edilmesi gerekmektedir (Banga ve ark., 2003). Optimizasyon işlemlerinde proses tasarımlarının verimini artırmak amacıyla matematiksel veriler ve bilgisayar yazılımları kullanılmaktadır. Ancak gıdaların yapısal özelliklerinin kompleks yapıya sahip olması nedeniyle modellemeler zorlaşmakta, dolayısı ile gıda mühendisliğinde yapılan optimizasyon çalışmalarının sayısının artırılması gerekmektedir (Koç ve ark., 2010).

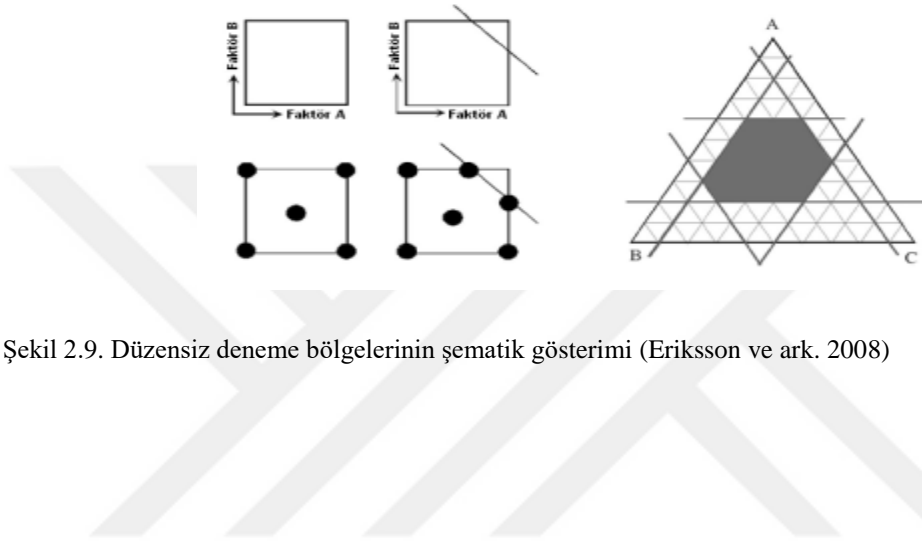
2.8.1 D-optimal dizayn

Deney bölgesi düzensiz olduğunda, nitel faktörler iki seviyeden daha fazlasına sahip ise, deneme sayılarının azaltılması isteniyorsa, özel regresyon modellerinin fit edilmesi gerekiyorsa ve proses ile karışım faktörleri aynı dizayn içerisinde kullanılacaksa D-optimal dizaynın kullanılması tercih edilir.

Deneme bölgesi araştırılan faktörler tarafından tanımlanır. Her bir faktörün tek tipi, onların bölgeleri ve toplam faktör miktarı bölgenin alanını etkiler. Bölgede göstermek için, basit bir plan kullanımı çok etkili bir araçtır. Kübik ve kuadratik dizaynların aksine diğer deneme bölgeleri hiperküplere benzemektedir (Eriksson ve ark. 2008).

Düzensiz deneysel alanda veriyi işlemek için iki yol vardır (Şekil 2.9). İlki, tekrar bir kuadratik forma sahip olana kadar alanı küçültmektir. Ancak, bu tüm deneme desenini bozacağı için tavsiye edilmez. Daha etkin bir çözüm bilgisayar kaynaklı D-optimal dizayn kullanımıdır. Şekil 2.9'da sol kısımda verilen diyagram 2 proses faktörlü denemeyi temsil etmektedir. İlk parça faktöriyal dizayn ile birlikte düzenli deneme bölgesini göstermektedir. İkinci parça ise üst sağ köşesi kısıtlanmış bir bölgedir ve sonuç olarak D-optimal dizayn kullanılmaktadır. Burada 4 karenin sağ altında, D-optimal algoritması hariç köşeler yerine kısıtlanmış çerçevenin üzerinde 2 nokta seçer. Bu durum deneme sayılarını artırmaktadır ancak kısıtlı deneme bölgesinin karmaşıklığı

ile başa çıkmak için gereklidir. Ayrıca, merkez noktası manipüle edilmektedir (Eriksson ve ark. 2008). Karışım dizaynı düzensiz deneme bölgelerini de içerebilmektedir. Şekil 2.9’da verilen üçgen ise üç faktörlü bir karışım dizaynını göstermektedir ve deneme bölgesi düzensizdir. Normal olarak, üçgenin tüm köşeleri ulaşılabilir ancak bu örnekte faktörler kısıtlanmıştır. Karışım dizaynı için kısıtlamanın anlamı alt ve üst sınırlarının 0 ve 1’den farklı olmasıdır (Eriksson ve ark. 2008).



Şekil 2.9. Düzensiz deneme bölgelerinin şematik gösterimi (Eriksson ve ark. 2008)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Mikroenkapsülasyon çalışmalarında kullanılan mikrobiyal transglutaminaz (mTG) enziminin üretimi Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA), Tarımsal Araştırma Merkezi'nden (ARS) liyofilize toz formda temin edilen *Streptomyces mobaraensis* (NRRL B-3729) suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *S. mobaraensis* liyofilize bakteri kültürünün aktifleştirme ve canlandırma işlemleri Alman Hücre Kültürü ve Mikroorganizma Koleksiyonu (DSMZ) kataloğunda belirtilen prosedüre göre hazırlanan “GYM *Streptomyces* sıvı besiyeri” ve “GYM *Streptomyces* katı besiyeri” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. GYM *Streptomyces* sıvı ve katı besiyeri bileşimi (pH 7.2)

Bileşen	Miktar (g/l)	
	Sıvı	Katı
Glukoz	4	4
Yeast ekstrakt	4	4
Malt ekstrakt	10	10
CaCO ₃	-	2
Agar	-	12

S.mobaraensis'in aktifleştirilmesi sağlandıktan sonra mTG enziminin üretimi, Tokat Organize Sanayi Bölgesi'nde beyaz peynir üretimi yapan bir fabrikadan ticari atık olarak temin edilen PAS ve Turhal Şeker Fabrikası'ndan temin edilen melas (suda çözünür kuru madde oranı: %79) kullanılarak hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi için gam arabik, maltodekstrin (DE: 20) ve inülinin ticari formları kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmanın aktifleştirilmesi, enzim üretimi, enzimin kısmi saflaştırılması, mikroenkapsülasyon ve depolama çalışmaları Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 mTG enziminin üretimi ve kısmi saflaştırılması

mTG enziminin üretimi amacıyla melas ve PAS'ndan oluşan bir besiyeri hazırlanmıştır. 30g melas/1000g PAS konsantrasyonunda hazırlanan besiyeri (pH 6.0) sterilize edildikten sonra (121°C, 15 dak) %1 oranında aktifleştirilmiş *S. mobaraensis* kültürü ile aşılansarak 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 4 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her inkübasyon işleminin sonunda enzim aktivitesi belirlenerek enzimin üretilip üretilmediği kontrol edilmiştir.

Üretilen mTG enziminin kısmi saflaştırılması amonyum sülfat tuzu kullanılarak çöktürme işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Enzim üretiminin gerçekleştirildiği sıvı besiyeri, Tween 80 (%0.1 v/v) ilave edilerek 2 saat süre ile karıştırılmış ve ardından biyo-kütlenin uzaklaştırılması amacıyla 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen sıvı faz içerisine %80 doygunlukta amonyum sülfat eklenerek iki saat inkübasyonun ardından 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti saf su yardımı ile toplanmıştır (Estevinho ve ark., 2013). Elde edilen çökelti diyaliz torbası (Sigma, selüloz membran 49 mm çap, 14 kDa cut off) kullanılarak 4°C'de diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işlemi enzim çözeltisinin % kuru madde içeriği takip edilerek sonlandırılmış ve çalışmada kullanılacak enzimin kısmi saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

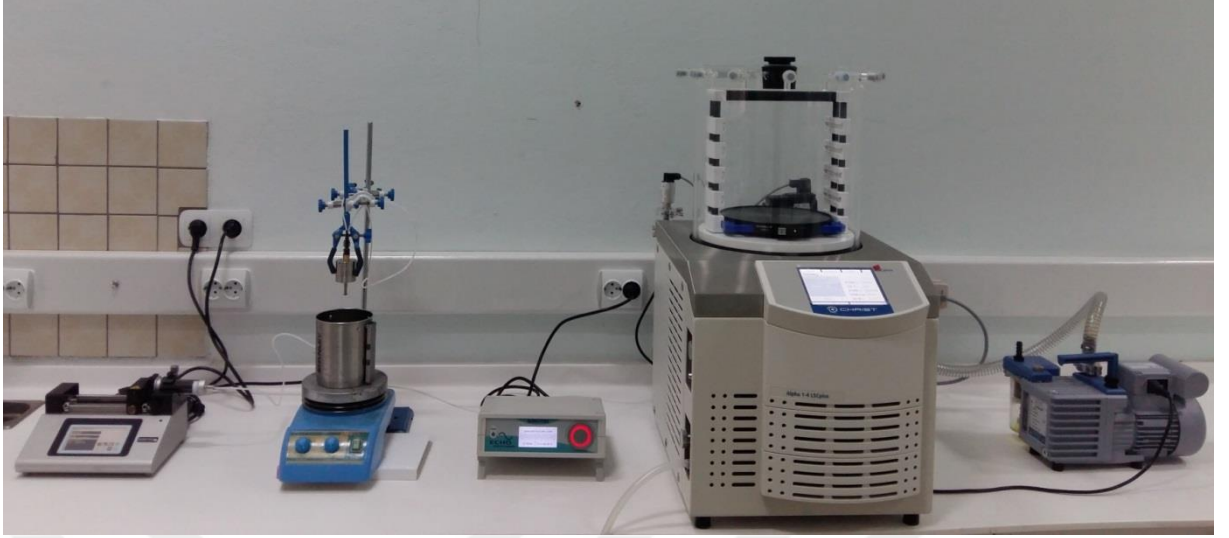
3.2.2 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

mTG enziminin aktivitesi, enzimin spesifik bir substratı olan Z-Gln-Gly peptidi ve hidroksilamin arasındaki reaksiyon sonucu oluşan hidroksimat miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan hidroksimat metodu kullanılarak belirlenmiştir (Folk ve Cole, 1965). Bu amaçla, 100 µl enzim çözeltisi üzerine 200 µl 200 mM pH 6.0 Tris-HCl, 25 µl 12.5 mM glutation, 25 µl 125 mM hidroksilamin ve 75 µl 37.5 mM Z-Gln-Gly çözeltileri sırasıyla eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzimatik reaksiyonun durdurulması ve renk oluşumu için reaksiyon ortamına 425 µl TCA-FeCl₃ çözeltisi eklenmiş ve 11000 rpm'de

5 dakika santrifüj (Hettich Micro 200, Almanya) işlemi uygulanan örneklerin üst fazlarının spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda EZ 201, ABD) 525 nm'deki absorbansları belirlenmiştir. Standart kurvenin oluşturulması amacıyla hazırlanan standart çözelti (0–1.20 μmol L-glutamik asit γ -monohidroksimat) dilüsyonlarına enzim aktivitesi belirleme prosedürü uygulanarak spektrofotometrede 525 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Hazırlanan L-glutamik asit γ -monohidroksimat konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans grafiğinden elde edilen doğrunun denklemi ile analize alınan örneklerdeki L-glutamik asit γ -monohidroksimat (μmol) miktarı belirlenmiştir. mTG enziminin aktivitesi (ünite, U/ml); reaksiyon ortamında (pH 6.0) 37°C'de 1 dakikada 1.0 μmol hidroksimat açığa çıkaran enzimin miktarı olarak tanımlanmıştır (Bourneow ve ark., 2012; Estevinho ve ark., 2013).

3.2.3 Yalın enzimin ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutulması (UPDK) işlemi

Tuz ile çöktürme ve diyaliz işlemlerinin ardından belirli bir kuru madde içeriğine (%4.5 KM) sahip çözelti “yalın enzim” olarak adlandırılmıştır. Yalın enzimin püskürtme işlemlerinde iki farklı frekansta çalışan ultrasonik nozul (48 ve 120 kHz, SonoTek Inc., ABD), bir güç kaynağı (ECHO Ultrasonic Generator, SonoTek Inc., ABD) ve sıvı örneğin nozula beslenmesinde şırınga pompa (Syringe Pump TI, SonoTek Inc., ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Püskürtme işlemleri, içinde yaklaşık 500 ml sıvı azot bulunan paslanmaz çelik kap (çap: 10 cm, yükseklik: 12 cm) kullanılarak sıvı azot seviyesinden 7 cm uzaklıktan, kriyojenik sıvı üzerinde bulunan buhar içine püskürterek gerçekleştirilmiştir. Yalın enzimin UPDK işleminin optimizasyonu için besleme debisi (X_1) ve nozul frekansı (X_2) bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve Çizelge 3.2'de verilen tek faktörlü deneme desenine göre ultrasonik püskürtme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik püskürtme işlemi tamamlandıktan sonra donmuş damlacıklar bir miktar sıvı azot ile birlikte paslanmaz çelik bir tepsiye aktarılmış ve dondurarak kurutma işleminin gerçekleştirileceği dondurarak kurutucuya (CHRIST, Alpha 1-4 LSC, Almanya) transfer edilmiştir. Dondurarak kurutma işlemi, 6 saat birinci kurutma (1 mbar) ve 2 saat ikinci kurutma (0.01 mbar) olacak şekilde toplam 8 saatte tamamlanmıştır. İkinci kurutma aşamasında plaka sıcaklığı tüm denemelerde 30°C'de sabit tutulmuştur.



Şekil 3.1. Ultrasonik püskürtmeli dondurarak kurutma (UPDK) sistemi

Çizelge 3.2. Yalın enzimin UPDK ile kurutulması için oluşturulan deneme deseni

Deneme No	Besleme debisi (ml/dak) (X_1)	Nozul frekansı (kHz) (X_2)
1	3.5	120
2	2	48
3	6.5	48
4	8	48
5	3.5	48
6	5	120
7	6.5	120
8	2	120
9	5	48
10	8	120

UPDK işlemi ile yalın enzimin kurutulması aşamasında maksimum enzim aktivitesini sağlayan, optimum ultrasonik püskürtme işlem koşulu ‘desirability’ yaklaşımı ile belirlenmiştir. Çalışma boyunca başlangıç enzim çözeltisi aktivitesinde olabilecek farklılıkları ortadan kaldırmak için, kurutma sonrası elde edilen toz ürünün aktivitesi başlangıç aktivitesine oranlanmış (Eşitlik 3.1) ve hesaplanan “kalan aktivite (%)” değerleri optimizasyon işleminin yanıtı olarak kullanılmıştır. Ayrıca, sadece ultrasonik püskürtme ve donma işleminin enzim aktivitesi üzerine etkisinin görülebilmesi ve yorumlanabilmesi için püskürtme ve donma işleminden sonra elde edilen aktivite

başlangıç aktivitesine oranlanarak “donma sonrası kalan aktivite (%)” değerleri hesaplanmıştır. Sadece kurutma aşamasının etkisinin görülebilmesi için ise kurutma sonrasında elde edilen toz ürünün aktivitesi, püskürtme ve donma işleminden sonra elde edilen aktiviteye oranlanarak “kurutma sonrası kalan aktivite (%)” değerleri elde edilmiştir.

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = \frac{\text{Kurutma sonrası aktivite (U/ml)}}{\text{Başlangıç aktivitesi (U/ml)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4 mTG enziminin UPDK ile mikroenkapsülasyonu

D-optimal birleşik dizayn deneme desenine göre (Çizelge 3.3) kısmi saflaştırma ve diyaliz yoluyla elde edilen enzim çözeltisinin, UPDK ile mikroenkapsülasyonunda etkili bağımsız karışım değişkenleri olan kaplama materyallerinin oranı [gam arabik (C_1), maltodekstrin (C_2), inülin (C_3)] ve proses değişkenlerinin [besleme debisi (X_1) ve nozul frekansı (X_2)] etkisi incelenmiş, mikroenkapsülasyon verimi (kalan aktivite) yanıt olarak seçilerek işlem optimize edilmiştir. Burada C_1 , C_2 ve C_3 karışım oranlarını, X_1 ve X_2 ise proses değişkenlerini simgelemektedir. Yalın enzimde olduğu gibi, püskürtme işlemleri 48 ve 120 kHz ultrasonik nozullar kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.1’de görülen sistem kullanılmıştır.

Mikroenkapsülasyon çalışmasında yapılacak olan tüm analizler için (fiziksel analizler, aktivite hesaplamaları) gerekli olan örnek miktarı göz önünde bulundurularak besleme çözeltisi kuru madde oranı %10’a yükseltilmiştir. Kuru maddenin yaklaşık iki katına çıkarılması nedeniyle kurutma süresi 12 saat birinci kurutma (1 mbar) ve 4 saat ikinci kurutma (0.01 mbar) olmak üzere toplam 16 saat olarak değiştirilmiştir. Yapılan ön denemelerde kaplama materyali olarak sadece inülin kullanıldığında kurutma sırasında çökme gözlenmiş ve bu sebeple inülin oranının karışımda en fazla %60 olmasına karar verilmiştir.

Mikroenkapsülasyon işleminde kaplama materyallerinin karışım oranları bağımsız değişken olarak seçilmiş ve bu oranlar deneme deseni kullanılarak belirlenmiştir. Tüm denemelerde toplam kuru madde sabit olacak şekilde (%10 KM), enzim çözeltisi KM: kaplama materyali KM oranı 1:2 olarak belirlenmiştir. Gam arabik, maltodekstrin ve

inülinin %10'luk stok çözeltileri hazırlanarak denemelerde bu stok çözeltiler kullanılmıştır. Kaplama materyalleri için, deneme deseninden belirlenen miktarlar hesaplanarak stok çözeltiden gerektiği kadar alınmış ve kaplama materyalleri karışımı 5 dakika boyunca 11200 rpm hızında homojenize edilmiştir (Ultra-Turrax IKA T-18 Basic, ABD). Daha sonra bu karışıma her bir deneme için ayrı ayrı hesaplanan miktar kadar enzim çözeltisi ilave edilip (toplam KM %10 olacak şekilde) 11200 rpm hızında 5 dakika süre ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan karışımlar her iki ultrasonik nozul (48 ve 120 kHz) ile 2-8 ml/dak besleme debisi aralığında deneme desenine göre püskürtülmüş ve donmuş damlacıklar bir miktar sıvı azot ile birlikte paslanmaz çelik tepsiye alınarak birinci ve ikinci dondurarak kurutmanın gerçekleştirileceği dondurarak kurutucuya transfer edilmiştir.

Mikroenkapsülasyon veriminin maksimum olmasını sağlayan optimum işlem koşulları desirability fonksiyonu yaklaşımı uygulanarak belirlenmiştir. Kurutma sonrası elde edilen ürünün aktivitesi başlangıç aktivitesine oranlanmış (Eşitlik 3.1) ve hesaplanan "kalan aktivite (%)" değerleri optimizasyon işleminin yanıtı olarak kullanılmıştır. Sadece ultrasonik püskürtme ve donma işleminin etkisinin belirlenmesi için püskürtme ve donma işleminden sonra elde edilen aktivite başlangıç aktivitesine oranlanarak "donma sonrası kalan aktivite (%)" değerleri hesaplanmıştır. Sadece kurutma aşamasının etkisinin belirlenmesi için ise kurutma sonrasında elde edilen ürünün aktivitesi, püskürtme işleminden sonra elde edilen aktiviteye oranlanarak "kurutma sonrası kalan aktivite (%)" değerleri hesaplanmıştır. Belirlenen optimum koşulda kurutma işlemleri iki tekerrülü olarak gerçekleştirilmiş, optimum nokta deneysel olarak doğrulanmıştır. Mikroenkapsülasyon işleminin enzim aktivitesi üzerine olan koruyucu etkisinin ortaya konması amacıyla yalın enzim, bu aşamada belirlenen optimum koşulda, kaplama materyalleri olmaksızın ayrıca kurutulmuş ve UPDK işlemi ile elde edilen yalın enzim (UPDK-YE) olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 3.3. UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemi için oluşturulan deneme deseni

Deneme No	Gam arabik (%) (C ₁)	Maltodekstrin (%) (C ₂)	İnülin (%) (C ₃)	Besleme debisi (ml/dak) (X ₁)	Nozul frekansı (kHz) (X ₂)
1	35	35	30	2.0	48
2	100	0	0	8.0	48
3	40	0	60	2.0	120
4	50	50	0	8.0	120
5	100	0	0	5.0	48
6	50	50	0	8.0	48
7	40	0	60	2.0	48
8	0	100	0	8.0	120
9	70	0	30	6.5	48
10	40	0	60	8.0	120
11	0	100	0	5.0	120
12	100	0	0	5.0	120
13	35	35	30	5.0	48
14	0	100	0	2.0	120
15	40	0	60	8.0	48
16	35	35	30	8.0	120
17	0	40	60	5.0	120
18	35	35	30	8.0	48
19	40	0	60	8.0	48
20	0	40	60	2.0	48
21	50	50	0	8.0	120
22	35	35	30	2.0	120
23	100	0	0	2.0	120
24	50	50	0	5.0	120
25	0	100	0	2.0	48
26	0	100	0	8.0	48
27	100	0	0	8.0	120
28	0	40	60	8.0	48
29	40	0	60	2.0	48
30	70	0	30	3.5	120
31	50	50	0	2.0	48
32	70	0	30	3.5	48
33	40	0	60	8.0	120
34	50	50	0	2.0	120
35	0	100	0	5.0	48
36	100	0	0	2.0	48
37	40	0	60	5.0	48
38	0	40	60	2.0	120
39	0	40	60	8.0	120
40	0	40	60	8.0	120

3.2.5 mTG enziminin geleneksel dondurarak kurutma (GDK) ile mikroenkapsülasyonu

Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin UPDK ile mikroenkapsülasyonu aşamasında maksimum kalan aktivite değerinin sağlandığı optimum karışım oranı koşulu ile hazırlanan besleme çözeltisi GDK işlemi ile kurutulmuştur. Hazırlanan karışım püskürtülmeksizin -80°C'de 4 saat süre ile dondurulmuş, dondurulan örnekler

dondurarak kurutucuya aktarılmış ve UPDK işleminin dondurarak kurutma aşaması ile aynı olacak şekilde (12 saat birinci kurutma + 4 saat ikinci kurutma) kurutulmuştur.

3.2.6 mTG enziminin geleneksel püskürtmeli kurutma (GPK) ile mikroenkapsülasyonu

Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin UPDK işlemi ile mikroenkapsülasyonu aşamasında maksimum kalan aktivite değerinin sağlandığı optimum karışım oranı koşulu ile hazırlanan besleme çözeltisi GPK işlemi ile kurutulmuştur. GPK işleminde işlem koşullarının belirlenebilmesi için, UPDK işlemi ile ulaşılan sonuç ürün nem içeriğine sahip ürün eldesi hedeflenmiş ve yapılan ön denemeler sonucunda hava giriş sıcaklığı 150°C ve çıkış sıcaklığı 79°C olacak şekilde çalışılmıştır. Ayrıca, UPDK işleminde belirlenen optimum besleme debisinin (6.83 ml/dak) sağlanabilmesi için pompa gücü %29 olarak ayarlanmıştır. GPK ile mikroenkapsülasyon işlemi Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan püskürtmeli kurutucu (Büchi Mini Spray Dryer B-290, İsviçre) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 Isıl stabilitenin belirlenmesi

UPDK-YE ile optimum koşulda UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örneklerinin ısıl stabiliteyi 5 farklı sıcaklık (40, 45, 50, 55 ve 60°C) ve 3 farklı pH (pH 5.0, 6.0 ve 7.0) koşulunda belirlenmiştir. Bu amaçla dört farklı örnek kullanılarak aynı kuru madde oranında enzim çözeltileri hazırlanmış, her bir enzim çözeltisinin, her bir pH için ayrı ayrı olacak şekilde farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerde su banyosunda inkübasyonun ardından enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnkübasyon süreleri her bir koşul için 5 adet olacak şekilde ön denemeler ile belirlenmiş, aktivite düşüşünün düzgün olarak takip edilebileceği süre aralıkları tespit edilmiştir. Farklı pH'larda enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimine ait elde edilen veriler kinetik modellemeye tabi tutulmuştur. Enzim aktivitesindeki değişim (enzim inaktivasyonu) birinci derece reaksiyon kinetiği ile açıklanmıştır (Eşitlik 3.2). Tüm örneklerin yarı ömür süreleri ($t_{1/2}$, dak) ise hesaplanan hız sabiti (k , dak^{-1}) değerleri kullanılarak Eşitlik 3.3 ile belirlenmiştir.

$$\ln(U_t/U_0) = -k.t \quad (3.2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.3)$$

Enzim aktivitesindeki değişimlerin sıcaklığa bağımlılık düzeyi Arrhenius eşitliği ile açıklanmış (Eşitlik 3.4) ve her bir örnek için aktivasyon enerjisi (E_a , kJ/mol) hesaplanmıştır.

$$k = k_0 e^{(-E_a/RT)} \quad (3.4)$$

Ayrıca, aktivasyon entalpisi (ΔH , kJ/mol), Gibbs serbest enerjisi (ΔG , kJ/mol) ve aktivasyon entropisi (ΔS , J/mol.K) sırası ile Eşitlik 3.5, Eşitlik 3.6 ve Eşitlik 3.7 kullanılarak tüm sıcaklık ve koşullar için belirlenmiştir.

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3.5)$$

$$\Delta G = -R.T. \ln \left(\frac{k.h}{K.T} \right) \quad (3.6)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (3.7)$$

Burada;

t: süre (dak),

U_0 : başlangıç enzim aktivitesi (U/ml),

U_t : t süresi sonunda enzim aktivitesi (U/ml),

R: Evrensel gaz sabiti (8.3145 J/mol.K),

h: Planck sabiti (6.6262×10^{-34} J.s),

K: Boltzmann sabiti (1.3806×10^{-23} J.K⁻¹)'dir.

3.2.8 Depolama stabilitesinin belirlenmesi

UPDK-YE ile optimum koşulda UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örnekleri alüminyum kaplı polietilen (ALPE) (12 µm PET + 8 µm AL + 50 µm LDPE) ambalaj materyali içerisinde iki farklı koşulda depolanmış ve depolama stabilite belirlenmiştir. Örnekler, oda sıcaklığı ve yüksek sıcaklık olmak üzere; 25°C'de %50 RH koşulunda 6 ay, 38°C'de %90 RH koşulunda ise 3 ay süre ile

depolanmıştır. Depolama denemeleri 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz yöntemleri başlığı altında verilen kalan aktivite, enzimin yüksek sıcaklık, farklı pH ve metal iyonları varlığında stabilitesindeki değişim 25°C ve %50 RH'da 30 günlük, 38°C ve %90 RH'da ise 15 günlük periyotlar aralığında belirlenmiştir.

3.3 Analiz Yöntemleri

3.3.1 Metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine farklı metal iyonları ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot XH_2O$, $Cl_2Co \cdot 6H_2O$) ve EDTA'nın ($EDTA \cdot 2H_2O$) etkisini belirlemek için Çizelge 3.4'te belirtilen şekilde reaksiyon ortamına 1 mM konsantrasyonda metal iyonları ve EDTA ilave edilmiştir (Nagy ve Szakacs, 2008; Ekren, 2013). Hiçbir metal içermeyen deney ortamı, kontrol grubu olarak kabul edilerek standart analiz koşullarında 525 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde kontrol grubu örneklerinin aktivitesi 100 kabul edilerek, deneme gruplarının kontrole göre kalan aktivite değişimleri belirlenmiştir. Yüksek sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacı ile standart prosedürdeki inkübasyon sıcaklığı artırılarak 80°C olarak uygulanmış, elde edilen aktivite değeri standart analiz koşullarında (37°C) elde edilen aktivite değeri ile oranlanarak kalan aktivite (%) değerleri belirlenmiştir. Benzer şekilde, farklı pH değerlerinin aktiviteye etkisi, standart prosedürde kullanılan pH 6.0 Tris-HCl tamponu yerine pH 3.0 ve 8.0 tampon çözeltileri kullanılarak aktivite ölçümünün gerçekleştirilmesi ve elde edilen aktivite değerlerinin standart analiz koşullarında (pH 6.0) elde edilen aktivite değeri ile oranlanmasıyla kalan aktivite (%) değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. Metal iyonu ve EDTA içeren deney ortamının hazırlanışı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek	Kontrol
Enzim çözeltisi	100 µl	100 µl	100 µl
200 mM Tris-HCl (pH 6.0) tamponu	180 µl	180 µl	200 µl
Metal iyonları	20 µl*	20 µl*	-
12.5 mM Glutation	25 µl	25 µl	25 µl
125 mM Hidroksilamin	25 µl	25 µl	25 µl
37.5 mM Z-Gln-Gly	-	75 µl	75 µl
Saf su	75 µl	-	-
37 °C’de 1 saat inkübasyon			
%15 TCA - %5 FeCl ₃ çözeltisi	425 µl	425 µl	425 µl
11000 rpm’de 5 dak santrifüj 525 nm’de spektrofotometrede okuma			

*1 mM metal içeren deney ortamı için 21.25 mM stok metal çözeltisi kullanılmıştır.

3.3.2 Partikül özelliklerinin belirlenmesi

Partikül boyutu analizi

UPDK-YE ve GDK işlemleri ile elde edilen yalnızca enzim (GDK-YE) örnekleri ile optimum koşullarda UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle enzim tozlarının partikül boyutu ve partikül boyut dağılımları, Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan LLD (Laser Light Diffraction) cihazı (Masterseizer-2000 Malvern Instruments Ltd., UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler için iki tekerrürlü olacak şekilde $D_{[4,3]}$, d_{10} , d_{50} , d_{90} ve açıklık değerleri belirlenmiş, ayrıca partikül boyutu dağılımı grafikleri çıkartılmıştır. $D_{[4,3]}$ değeri Eşitlik 3.8, açıklık değerleri ise Eşitlik 3.9 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (3.8)$$

$$\text{Açıklık} = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (3.9)$$

Burada;

$D_{[4,3]}$: hacim ağırlıklı ortalama partikül boyutu değeri (μm),

n_i : partikül sayısı,

d_i : partikül çapı (μm),

d_{10} : %10 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap (μm),

d_{50} : %50 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap (μm),

d_{90} : %90 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çap (μm)'tır.

Spesifik yüzey alanı (SYA) ve gözeneklilik analizi

UPDK-YE ve GDK-YE ile optimum koşulda UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örneklerinin SYA ve gözenek boyutu analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı-Yüzey ve Gözenek Karakterizasyon Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin SYA değerleri tek noktalı BET (Brauner-Emmett Teller) yöntemi ile AUTOSORB 6-B yüzey karakterizasyon cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Degaz işlemi tüm örnekler için 40°C'de 16 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

Partikül morfolojisinin belirlenmesi

UPDK-YE ve GDK-YE ile optimum koşulda UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örneklerinin partikül morfolojileri taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri kullanılarak belirlenmiştir. SEM çalışmaları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÜSKİM) Mikroskopik Analiz Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 0.05 mbar vakum ve 40 mA akım koşullarında 200 saniye boyunca altın ile kaplanmıştır (Cressington Sputter Coater 108 Auto, UK). Görüntüler 20 kV hızlandırma geriliminde ve 9.75×10^{-5} torr basınçta, Zeiss Evo LS 10 marka SEM cihazı kullanılarak alınmıştır.

Partikül yoğunluğu

Toz örneklerin partikül yoğunluğu (ρ_p) Barbosa-Cánovas ve ark. (2005)'e göre, sıvı piknometresi yöntemi ile toluen kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Eşitlik 3.10'a göre örneklerin partikül yoğunlukları hesaplanmıştır.

$$\rho_p = \frac{(m_s - m_0)\rho}{(m_1 - m_0) - (m_{s1} - m_s)} \quad (3.10)$$

Burada;

m_s : toz ürün ile dolu piknometre ağırlığı (g),

m_0 : boş piknometre ağırlığı (g),

ρ : toluenin yoğunluğu (0.865 g/ml),

m_1 : toluen dolu piknometre ağırlığı (g),

m_{s1} : toz ürün ve toluen dolu piknometre ağırlığı (g)' dir.

3.3.3 Yığın özelliklerinin belirlenmesi

Nem tayini

Tüm örneklerde nem tayini 400 W halojen lambaya sahip kızılötesi nem tayin cihazı (Shimadzu MOC-63U) kullanılarak 90°C'de gerçekleştirilmiştir.

Su aktivitesi tayini

Tüm toz örneklerde su aktivitesi (a_w), su aktivitesi ölçüm cihazı (AquaLab Model Series 3TE, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

Renk

Toz örneklerin rengi, Hunter L^* , a^* ve b^* değerleri ölçülerek (Minolta, CR-300) belirlenmiştir.

Yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk

Toz örneklerin yığın yoğunluğu (ρ_b , kg/m^3), 10 ml hacme sahip silindirik bir kap içerisine hava boşluğu kalmayacak şekilde ancak herhangi bir basınç uygulamaksızın doldurulmasıyla, kütle/hacim oranından hesaplanmıştır. Sıkıştırılmış yoğunluk (ρ_t , kg/m^3) ise, 2 g toz örneğin 10 ml hacme sahip silindirik kabın içerisine doldurulup sıkıştırılması ile kütle/hacim oranından belirlenmiştir (Bhandari ve ark., 1999).

Porozite

Örneklerin porozitesi (ε) partikül yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk arasındaki ilişki kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.11).

$$\varepsilon = \frac{\rho_p - \rho_t}{\rho_p} \times 100 \quad (3.11)$$

Akabilirlik

Carr indeks (CI) değerleri ve Hausner oranı (HR) yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri kullanılarak sırasıyla Eşitlik 3.12 ve Eşitlik 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır (Carr, 1965; Hausner, 1967).

$$CI = \frac{(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} \times 100 \quad (3.12)$$

$$HR = \frac{\rho_t}{\rho_b} \times 100 \quad (3.13)$$

Carr indeks (CI) değerlerine göre; CI değerinin 15'ten küçük olması durumunda akabilirlik çok iyi, 15-20 arasında iyi, 20-35 arasında zayıf, 35-45 arasında kötü, 45'ten büyük ise çok kötü olarak tanımlanmıştır (Carr, 1965). HR değerinin 1.2'den küçük olduğu durumlarda akabilirlik yüksek; 1.2 ile 1.4 arasında orta; 1.4'ten büyük olduğunda ise düşük olarak tanımlanmıştır (Hausner, 1967).

Kekleşme

Etüvde 1 saat boyunca 105°C’de bekletilen örnekler daha sonra soğuması için 30 dakika süre ile desikatöre yerleştirilmiştir. Kuru örnek tartılarak 500 µm’lik eleğe aktarılıp 5 dakika boyunca elenmiştir. Elek üzerinde kalan örnek miktarı tartılarak kekleşme derecesi (KD) Eşitlik 3.14’e göre hesaplanmıştır (Jaya ve Das, 2004).

$$KD (\%) = \frac{(100 \times b)}{a} \quad (3.14)$$

Burada,

a: kullanılan toz miktarı (g),

b: elek üzerinde kalan toz miktarı (g)’dir.

3.3.4 Yeniden yapılandırma (rekonstitüsyon) özelliklerinin belirlenmesi

Islanabilirlik

Toz örneğin ıslanabilirlik analizi için 250 ml’lik bir behere, 25°C’de 100 ml saf su hazırlanmıştır. Beher ve cam huniden oluşan bir düzenek oluşturulup, beherdeki sıvı yüzeyi ile huninin alt kısmı arasındaki mesafe 10 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Huninin içerisine bir cam test tüpü yerleştirilip, toz örnek (0.1 g) test tüpünün çevresine konulmuştur. Son olarak toz örneğin tamamıyla ıslanma süresi (s) ölçülmüştür (Jinapong ve ark., 2008).

Dağılılırlik

Dağılılırlik analizi için 50 ml’lik behere 25°C’de 10 ml saf su konulup, üzerine toz örnek (1 g) eklenmiştir. Bir kaşık yardımıyla, 15 s içerisinde saat yönünde ve aksi yönde 25 dairesel hareket yapıldıktan sonra karıştırmaya son verilmiştir. Rekonstitüe örnek 212 µm’lik elekten süzülüp ve süzüntüden 1 ml örnek alınıp, darası alınmış alüminyum kaba aktarılmıştır. Etüvde 105°C’de 4 saat süreyle bekletilmiş ve dağılılırlik değeri Eşitlik 3.15’e göre hesaplanmıştır (Jinapong ve ark., 2008).

$$\text{Dağılılabirlik (\%)} = \frac{(10+a) \times \%TS}{a \times \left(\frac{100-b}{100}\right)} \times 100 \quad (3.15)$$

Burada;

a: kullanılan toz miktarı (g),

b: kullanılan tozun nem içeriği (%),

%TS: elekten geçen rekonstitüte örneğin kuru madde miktarı (%),

olarak alınmıştır.

Çözünabilirlik

Çözünabilirlik analizi için 1 g toz örnek 25 ml saf su ile seyreltildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika süre boyunca mekanik bir karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar ependorf tüplerine aktarılıp, 5 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı, metal petri kaplarına aktarılmış ve etüvde 105°C'de 4 saat süreyle kurutulmuştur. Çözünabilirlik (%) değeri kütle farkından hesaplanmıştır (Cano-Chauca ve ark., 2005).

3.3.5 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasında fark olup olmadığını belirlemeye yönelik tek örnek t-testi ile optimum noktada farklı yöntemler ile elde edilen örneklerin karşılaştırılmasında kullanılan “Univariate Varyans Analizi, Duncan post hoc” testi SPSS 22.0 paket programı kullanılarak, kaplama materyallerinin ve işlem değişkenlerinin kalan aktivite ve fiziksel özellikler üzerine etkisini belirlemede uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, izohips grafikleri, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon işlemleri Design Expert 7.0 (StatEaseInc., USA) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Uygun kaplama materyallerinin oranlarının ve işlem koşullarının belirlenmesinde D-optimal birleşik dizaynı kullanılarak desirability fonksiyonu yaklaşımı yöntemine göre

optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Oluşturulan matematiksel modellere göre her bir yanıt için çoklu lineer regresyon analizi uygulanmıştır. Modeldeki önemli terimler varyans analizi (ANOVA) kullanılarak tespit edilmiş ve optimizasyon için desirability fonksiyonu yaklaşımı kullanılmıştır (Koç ve ark., 2010). Elde edilen modele göre optimum işlem koşullarında en az üç deneme yapılarak optimum noktanın deneysel olarak doğrulanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yanıtla göre optimum noktanın doğrulanması sonucunda elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak fark olup olmadığı tek örnek t-testi kullanılarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Yalın enzimin UPDK ile kurutulması sonucunda elde edilen yanıtların regresyon analizi için Eşitlik 3.16'da, enzimin UPDK ile mikroenkapsülasyonu sonucunda elde edilen yanıtların regresyon analizi için ise Eşitlik 3.17'de verilen modeller oluşturulmuştur.

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} \quad k=1 \quad (3.16)$$

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i C_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} C_i^2 + \sum_{i=1}^k \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^k \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \alpha_{ij} C_{ij} X_{ji} \quad (3.17)$$

$k=1,2,3$

Isıl stabilite için regresyon katsayısı (R^2) ve kinetik katsayılar doğrusal regresyon analizi ile Microsoft Office Excel 2016 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Oluşturulan modellerinin tahminlenmesinde, incelenen eşitliğin amaca uygunluğunun saptanabilmesi için bağıl yüzde sapma (%P) değerleri kullanılmıştır (Eşitlik 3.18).

$$\%P = \frac{100}{N} \sum_i^N \frac{|C_{di} - C_{ti}|}{C_{di}} \quad (3.18)$$

Burada;

C_{di} : deneysel kalan aktivite değerleri (%),

C_{ti} : modelden tahminlenen kalan aktivite değerleri (%),

N: veri sayısı

olarak alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Yalın Enzimin Ultrasonik Püskürtmeli Dondurarak Kurutulması (UPDK) İşlemi

Üretimi ve kısmi saflaştırılması gerçekleştirilen yalın enzim çözeltisinin (%4.5 KM) UPDK işlemi sonrasında elde edilen “kalan aktivite (%)” değerleri ile, sadece ultrasonik püskürtme ve donma işleminin enzim aktivitesi üzerine etkisini ifade eden “donma sonrası kalan aktivite (%)” ve sadece kurutma aşamasının etkisinin görülebilmesi için belirlenen “kurutma sonrası kalan aktivite (%)” değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ultrasonik püskürtme ve kriyojenik sıvının çok düşük sıcaklığı (~-196°C) sayesinde gerçekleşen hızlı donma aşamasında enzim aktivitesinde düşüş görülmediği, aksine tüm koşullarda aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Özbek ve Ülgen (2000), ultrasonikasyon işleminin enzimleri alt birimlerine ayırabildiğini belirtmişler, Arzeni ve ark. (2012) protein izolatına ultrasonikasyon uygulanması sonucunda proteinler ile ortamda bulunan safsızlıkların oluşturdukları agregat boyutunun azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, proteinlere ultrasonik işlem uygulaması sonucunda hidrofobisite, emülsiyon stabilitesi ve biyolojik aktivite gibi fiziko-kimyasal veya fonksiyonel özelliklerinde değişiklikler meydana gelebildiği de bildirilmektedir (O’Sullivan ve ark., 2016). Ultrasonik püskürtme ve donma sonrası kalan aktivitedeki artış, püskürtme aşamasında uygulanan ultrasonikasyon işleminin kısmi olarak saflaştırılmış besleme çözeltisi içinde bulunan ve enzime bağlanmış haldeki farklı proteinler gibi safsızlıkları enzim molekülünden ayırması sonucu ortamda bulunan serbest mTG miktarının artması ile açıklanabilir. Ayrıca, püskürtme işlemi ile damlacık boyutunun küçülmesi sonucunda artan yüzey alanı ile birlikte enzimin substratla olan bağlantısının artmış olması da aktivitedeki artışı açıklayabilir. Ultrasonik püskürtme sonrasında oluşan damlacıkların hızlı bir şekilde donması da aktivite üzerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Nitekim, Cao ve ark. (2003) enzimlerin aktivitesini korumak için sıvı azot ile hızlı bir şekilde dondurulmasını önermektedirler. Ayrıca, oluşan küçük boyutlu damlacıkların çok düşük sıcaklıkta hızlı bir şekilde donması sonucu oluşan küçük buz kristallerinin enzimlerin üç boyutlu yapısında meydana getirdikleri değişiklikler, enzim aktivitesini artırıcı yönde etki yapabilmektedir (Breda ve ark., 1992).

Çizelge 4.1. UPRK işleminin farklı aşamalarında elde edilen kalan aktivite (%) değerleri

No	Besleme Debisi (ml/dak)	Nozul Frekansı (kHz)	Donma Sonrası Kalan Aktivite (%)	Kurutma Sonrası Kalan Aktivite (%)	Kalan Aktivite (%)
1	3.5	120	103.10 (± 0.65)	69.94 (± 1.04)	72.12 (± 1.34)
2	2.0	48	114.71 (± 1.08)	60.99 (± 0.57)	69.96 (± 0.37)
3	6.5	48	122.31 (± 0.92)	67.27 (± 0.22)	82.33 (± 0.13)
4	8.0	48	108.40 (± 0.37)	73.51 (± 0.37)	79.68 (± 0.76)
5	3.5	48	131.02 (± 1.57)	59.05 (± 0.25)	77.36 (± 0.58)
6	5.0	120	111.88 (± 2.64)	64.77 (± 0.31)	72.42 (± 0.52)
7	6.5	120	118.94 (± 0.17)	65.86 (± 0.27)	78.33 (± 0.04)
8	2.0	120	102.46 (± 1.04)	64.90 (± 0.02)	66.49 (± 0.06)
9	5.0	48	131.93 (± 0.31)	62.40 (± 0.09)	82.33 (± 0.11)
10	8.0	120	119.62 (± 0.98)	62.67 (± 0.43)	74.95 (± 0.28)

Püskürtme işlemini etkileyen en önemli parametrelerin nozul frekansı, besleme debisi, besleme çözeltisinin viskozitesi ve yüzey gerilimi olduğu bilinmektedir (Masters, 1991). Aynı nozul tipi ve besleme materyali için, damlacık boyutu uygulanan nozul frekansı ile ters orantılı olarak değişmektedir. Düşük nozul frekanslarında büyük damlacık boyutu elde edilirken, yüksek frekans uygulamalarında daha küçük damlacık boyutu sağlanmaktadır (Wanning ve ark., 2015). Gerçekleştirilen çalışmada, yüksek nozul frekansı (120 kHz) kullanıldığında kalan aktivite değerlerinin tüm besleme debisi koşullarında daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Yüksek frekans kullanılarak elde edilen daha küçük boyutlu damlacıklar, düşük frekansta elde edilen damlacıklara göre daha kısa sürede donarak daha iyi bir mikro-yapı oluşturmaya rağmen, elde edilen bu küçük boyutlu yapı protein agregasyonunu artırarak kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinde bulunan diğer proteinlerin (safsızlıkların) enzim molekülünden ayrılmasını engellemiş olabilir. Ayrıca, ultrasonik püskürtme aşamasında ultras ses dalgaları tarafından nozul içerisinde oluşturulan mekanik stres enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Feng ve ark., 2011). Yüksek frekanslı nozul (120 kHz) daha yüksek ultrasonik titreşim enerjisi oluşturduğundan, düşük frekanslı nozula göre (48 kHz) daha fazla mekanik strese sebebiyet vermiş ve dolayısıyla enzimin maruz kaldığı bu yüksek mekanik stres aktiviteye olumsuz yansiyarak daha düşük kalan aktivite değerlerinin elde edilmesine neden olmuştur.

Her iki nozul frekansı için düşük besleme debilerinde, enzimin ultrasonik titreşim enerjisine maruz kalma süresinin artmasına bağlı olarak kalan aktivite değerlerinin azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). 120 kHz nozul kullanıldığında artan besleme debilerinde kalan aktivite değerleri artarken, 48 kHz nozul kullanıldığında yüksek besleme debisi değerlerinde (5-8 ml/dak) kalan aktivite değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Düşük frekansta (48 kHz) yüksek besleme debilerinde kalan aktivite değerlerindeki bu düşüş, düşük frekans ve yüksek debi etkisi ile yeterli püskürtme etkinliğinin sağlanamamış olması ile açıklanabilir.

Ultrasonik püskürtme ve donma sonrasında kalan aktivite değerlerinde düşüş olmamasına rağmen, kurutma sonrasında tüm koşullarda kalan aktivitede belirgin oranda düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Dondurarak kurutma işleminde düşük sıcaklık, buz kristallerinin oluşumu ve dehidrasyon gibi stres faktörleri enzimleri inaktif hale getirebilmektedir (Amid ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada, tripsinojen enziminde PDK işlemi sırasında püskürtme ve donma aşamalarında aktivite kaybı görülmemesine rağmen aktivitenin kurutma aşamasında büyük oranda kayba uğradığı belirlenmiştir (Sonner ve ark. 2002). Gerçekleştirilen çalışmada, 48 kHz nozul frekansı kullanıldığında kurutma sonrası kalan aktivite değerlerinde artan besleme debisi ile birlikte artış gözlenmiştir. Bu durum, düşük frekansta yüksek besleme debisi kullanıldığında ultrasonik püskürtme işleminin etkin bir şekilde gerçekleştirilememesi sebebiyle enzim molekülünden safızlıkların yeterince ayrılabilmesi ve bu safızlıkların dondurarak kurutma aşamasında koruyucu ajan gibi davranarak enzim molekülünü kurutma streslerine karşı koruması ile ilişkilendirilmiştir.

Yalın enzimin UPDK işleminin optimizasyonunda hem ultrasonik püskürtme-donma hem de kurutma işleminin etkilerini bir arada gösteren kalan aktivite değerleri kullanılmıştır. En yüksek kalan aktivite değerini sağlayan nozul frekansı ve besleme debisi değerleri “desirability” fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. İşlem değişkenlerinin kalan aktivite üzerindeki etkisi ve regresyon eşitliği katsayıları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Kalan aktivite için oluşturulan kuadratik model %99 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı R^2 , düzeltilmiş R^2 (düz- R^2) ve varyasyon katsayısı (%C.V.) hesaplanarak belirlenmiştir. R^2 , deneysel verideki model tarafından açıklanabilen

varyasyonun toplam varyasyona oranı olarak tanımlanmıştır (Myers ve Montgomery, 1995; Khuri ve Cornell, 1996). Elde edilen modellerin tümünde varyasyonun büyük bir kısmı ($R^2 > 0.93$) model tarafından açıklanabilmiştir (Çizelge 4.2). Ancak modele yeni terimlerin eklenmesi, bu terimler istatistiksel olarak önemsiz olsa da R^2 'yi her zaman arttırmaktadır. Bu nedenle düz- R^2 değerlerinin modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılması önerilmektedir (Myers ve Montgomery, 1995).

Çizelge 4.2. İşlem değişkenlerinin kalan aktivite üzerine etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	SD	Katsayı	Kareler Toplamı	F Değeri	<i>p</i> -Değeri
Model	4		238.083	17.330	0.004
X ₁	1	4.76	113.064	32.919	0.002
X ₂	1	-2.73	74.784	21.774	0.006
X ₁ X ₂	1	-0.13	0.079	0.023	0.886
X ₁ ²	1	-5.35	50.156	14.603	0.012
Kalıntı	5		17.173		
Toplam	9		255.256		
Saf Hata	0				
R ²	0.9327				
Düz- R ²	0.8789				
Yeterli tahminleme	12.633				
PRESS	68.82				
C.V. (%)	2.45				

X₁: Besleme Debisi (ml/dak), X₂: Nozul Frekansı (kHz)

Belirlenen R^2 ve düz- R^2 değerlerinin birbirine yakın olması (%5.48), modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini ifade etmektedir. Varyasyon katsayısı değeri, deneysel verilerin ortalamaya yakınlığının bir ifadesidir ve küçük değerlerde olması istenmektedir (Lazić, 2004). Varyasyon katsayısı değeri elde edilen model için %2.45 olarak hesaplanmıştır. Bir regresyon modelinin daha sonra yapılacak gözlemlerde bir tahminleme modeli olarak kullanılabilmesi için yeterli tahminleme (adequate precision) ve tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) istatistikleri kullanılabilir. Yeterli tahminleme değerinin 4'ten büyük olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Elde edilen model için yeterli tahminleme değeri 4'ten büyük olarak bulunmuştur.

Kalan aktivite değerini etkileyen en önemli parametrenin besleme debisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca, nozul frekansının lineer etkisi ve besleme debisinin kuadratik etkisi kalan aktivite değerini etkileyen diğer önemli parametrelerdir. Buna

karşın besleme debisi ve nozul frekansı interaksiyonunun model üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Optimizasyon çalışmasında kullanılan, kalan aktivite için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomiyal model, kodlanmış değişkenler cinsinden Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$\text{Kalan Aktivite} = +4.76X_1 - 2.73X_2 - 5.35X_1^2 \quad (4.1)$$

Elde edilen deneysel verilerin işlenmesi sonucunda tespit edilen üç farklı çözüm Çizelge 4.3’te verilmiştir. Optimum nokta olarak, programın belirlemiş olduğu çözümlerden birinci koşulda elde edilen besleme debisi ve nozul frekansı seçilmiştir.

Çizelge 4.3. Desirability fonksiyonu yaklaşımına göre elde edilen ve optimum noktayı veren çözümler

No	Besleme Debisi (ml/dak)	Nozul Frekansı (kHz)	Kalan Aktivite (%)	Desirability
1	6.37	48	82.1205	0.987
2	6.33	48	82.1197	0.987
3	6.30	120	76.5396	0.635

Optimum noktada (6.37 ml/dak besleme debisi, 48 kHz nozul frekansı) tahminlenen kalan aktivite değeri %82.12 olarak belirlenmiş, aynı noktada iki kez üretim yapılarak tahminlenen değer deneysel olarak doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Optimum koşulda elde edilen deneysel kalan aktivite değeri %82.43 (± 1.55) olarak tespit edilmiştir. Yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t-testi uygulanarak belirlenmiş, deneysel ve tahminlenen kalan aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.2 mTG Enziminin UPDK ile Mikroenkapsülasyon İşlemi

UPDK işlemi ile elde edilen mikroenkapsüle mTG enzimi için optimum işlem koşulları D-optimal birleşik dizayn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan ön denemeler ile bağımsız değişken olarak seçilen kaplama materyalleri oranı (gam arabik, maltodekstrin, inülin), besleme debileri (2-8 ml/dak) ve nozul frekansları (48 ve 120 kHz) belirlenmiştir. Kurutma sonrası aktivite başlangıç aktiviteye oranlanarak

ultrasonik püskürtme, donma ve kurutma aşamalarının tümünü kapsayan “kalan aktivite (%)” değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminde, sadece ultrasonik püskürtme ve donma aşamasının enzim aktivitesine etkisinin belirlenebilmesi için “donma sonrası kalan aktivite (%)” ve sadece kurutma aşamasının etkisinin belirlenmesi için de “kurutma sonrası kalan aktivite (%)” değerleri belirlenmiştir. Kurutma işlemi sonrasında maksimum aktivitenin (kalan aktivite değerinin en yüksek olduğu) sağlandığı koşul ise optimum nokta olarak saptanmıştır. Model eşitliğindeki katsayıların belirlenmesi ve modelin oluşturulması için tasarlanan deneme planı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’te verilmiştir. Ayrıca, her bir deneme sonrası aktivite üzerine farklı metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın etkisi belirlenmiş ve tüm koşullarda fiziksel analizler (nem, su aktivitesi, renk, yağın ve sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, porozite, kekleşme, akabilirlik, dağılıbilirlik, çözünebilirlik, ıslanabilirlik) gerçekleştirilmiştir.

Donma sonrası kalan aktivite değerleri incelendiğinde, ultrasonik püskürtme ve oluşan damlacıkların hızlı bir şekilde donmasının, enzim aktivitesini olumsuz etkilemediği, aksine hangi kaplama materyali kullanılmış olursa olsun enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür (Çizelge 4.4). Bu durum, ultrasonik püskürtme ve donma aşamasının enzimin yapısına zarar vermediğini, aksine aktiviteyi olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Yalın enzimin UPDK işlemi ile kurutulmasında olduğu gibi, besleme çözeltisinde mTG enzimi ile birlikte bulunan safsızlıkların ultrasonik püskürtme işlemi ile enzim molekülünden ayrılması sonucu serbest halde bulunan enzim miktarındaki artışın aktiviteyi artıcı yönde etkilediği düşünülmektedir. Ancak, yalın enzimin UPDK işleminde donma sonrasında en yüksek ~%32’lik bir aktivite artışı tespit edilmesine rağmen (Çizelge 4.1), kaplama materyalleri varlığında ultrasonik püskürtme ve donma aşamasında en fazla ~%8’lik bir aktivite artışı sağlanabilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin farklı aşamalarında elde edilen kalan aktivite (%) değerleri

BD (ml/dak)	NF (kHz)	GA (%)	MD (%)	IN (%)	Donma Sonrası Kalan Aktivite (%)	Kurutma Sonrası Kalan Aktivite (%)	Kalan Aktivite (%)
2.0	48	35	35	30	102.54 (±0.30)	89.07 (±0.02)	91.60 (±0.02)
8.0	48	100	0	0	104.01 (±0.27)	86.62 (±0.50)	90.09 (±0.52)
2.0	120	40	0	60	102.22 (±1.11)	91.97 (±0.37)	94.01 (±0.38)
8.0	120	50	50	0	107.57 (±0.75)	82.32 (±0.70)	88.55 (±0.75)
5.0	48	100	0	0	105.03 (±0.27)	84.54 (±0.02)	88.79 (±0.02)
8.0	48	50	50	0	106.47 (±0.40)	84.28 (±0.08)	89.74 (±0.08)
2.0	48	40	0	60	102.81 (±0.28)	93.11 (±0.41)	95.73 (±0.42)
8.0	120	0	100	0	101.98 (±0.40)	86.86 (±0.33)	88.58 (±0.34)
6.5	48	70	0	30	102.61 (±0.28)	90.42 (±0.04)	92.78 (±0.04)
8.0	120	40	0	60	102.70 (±0.32)	94.01 (±0.14)	96.55 (±0.14)
5.0	120	0	100	0	103.88 (±0.20)	85.54 (±0.10)	88.86 (±0.10)
5.0	120	100	0	0	105.16 (±0.40)	86.08 (±0.06)	90.53 (±0.06)
5.0	48	35	35	30	103.21 (±0.40)	89.67 (±0.23)	92.55 (±0.24)
2.0	120	0	100	0	105.66 (±0.20)	83.09 (±0.40)	87.80 (±0.43)
8.0	48	40	0	60	103.13 (±0.16)	93.12 (±0.02)	96.04 (±0.02)
8.0	120	35	35	30	103.82 (±0.40)	88.11 (±0.27)	91.48 (±0.28)
5.0	120	0	40	60	103.58 (±0.16)	90.52 (±0.12)	93.76 (±0.12)
8.0	48	35	35	30	103.57 (±0.16)	89.58 (±0.27)	92.78 (±0.27)
8.0	48	40	0	60	104.13 (±0.45)	93.25 (±0.16)	97.10 (±0.16)
2.0	48	0	40	60	103.75 (±0.39)	90.24 (±0.25)	93.63 (±0.26)
8.0	120	50	50	0	105.01 (±0.24)	84.00 (±0.13)	88.64 (±0.14)
2.0	120	35	35	30	105.92 (±0.59)	85.53 (±0.36)	90.60 (±0.38)
2.0	120	100	0	0	104.62 (±0.40)	85.55 (±0.29)	89.51 (±0.30)
5.0	120	50	50	0	104.63 (±0.32)	84.34 (±0.23)	88.25 (±0.24)
2.0	48	0	100	0	103.73 (±0.16)	83.28 (±0.14)	86.39 (±0.14)
8.0	48	0	100	0	103.52 (±0.24)	84.45 (±0.14)	87.42 (±0.14)
8.0	120	100	0	0	104.78 (±0.44)	87.35 (±0.13)	91.53 (±0.14)
8.0	48	0	40	60	103.69 (±0.12)	90.76 (±0.10)	94.11 (±0.10)
2.0	48	40	0	60	103.26 (±0.36)	91.97 (±0.27)	94.97 (±0.28)
3.5	120	70	0	30	102.31 (±0.23)	90.41 (±0.25)	92.50 (±0.25)
2.0	48	50	50	0	103.00 (±0.08)	86.32 (±0.14)	88.91 (±0.14)
3.5	48	70	0	30	102.92 (±0.24)	89.26 (±0.08)	91.86 (±0.08)
8.0	120	40	0	60	103.77 (±0.76)	93.11 (±0.00)	96.63 (±0.00)
2.0	120	50	50	0	103.39 (±0.16)	85.15 (±0.08)	88.04 (±0.08)
5.0	48	0	100	0	103.81 (±0.04)	83.34 (±0.11)	86.51 (±0.11)
2.0	48	100	0	0	104.54 (±0.43)	83.05 (±0.34)	86.82 (±0.36)
5.0	48	40	0	60	101.96 (±0.44)	94.70 (±0.12)	96.56 (±0.12)
2.0	120	0	40	60	103.34 (±0.56)	89.56 (±0.10)	92.55 (±0.10)
8.0	120	0	40	60	103.57 (±0.16)	91.17 (±0.10)	94.43 (±0.10)
8.0	120	0	40	60	103.69 (±0.24)	90.98 (±0.06)	94.34 (±0.06)

BD: Besleme Debisi, NF: Nozul Frekansı, GA: Gam Arabik, MD: Maltodekstrin, IN: İnülin

UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin tüm koşullarında, sadece kurutma aşamasının etkisinin görülebilmesi amacıyla kurutma sonrasında elde edilen toz ürünün aktivitesi, püskürtme ve donma işleminden sonra elde edilen aktiviteye oranlanarak kurutma sonrası kalan aktivite değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlardan, enzim aktivitesindeki düşüşün kurutma aşamasından kaynaklandığı

görülmüştür. Püskürtme ve donma aşamalarına göre oldukça uzun süren kurutma işlemi sırasında enzimin maruz kaldığı düşük sıcaklık, buz kristali ve dehidrasyon stresi gibi faktörler bu aşamada aktivite düşüşüne sebep olmuştur. En düşük kurutma sonrası kalan aktivite değeri (%82.3); 8 ml/dak besleme debisinde, 120 kHz nozul frekansında, inülin konsantrasyonunun %0, maltodekstrin ve gam arabik konsantrasyonlarının %50 olduğu durumda hesaplanmıştır. Ayrıca, maltodekstrin konsantrasyonunun %100 olduğu tüm koşullarda kurutma sonrası kalan aktivite değerinin düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek kurutma sonrası kalan aktivite değeri (%94.7) ise; 5 ml/dak besleme debisinde, 48 kHz nozul frekansında, inülin ve gam arabik konsantrasyonlarının sırasıyla %60 ve %40 olduğu koşulda belirlenmiştir. Kaplama materyali olarak inülin kullanılmasıyla birlikte kurutma aşamasının aktiviteyi düşürücü etkisine karşı gösterilen direnç artmış, inülin konsantrasyonunun %60 olduğu tüm koşullarda kurutma sonrası kalan aktivite değerleri %90'ın üzerinde bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Farklı yapıdaki karbonhidratlar, protein içeren çözeltiler ile karıştırılarak kurutulduklarında protein stabilitesini farklı oranda etkiler (Desai ve Park, 2005). Yapılan çalışmada kurutma sonrası kalan aktivite değerlerinin kaplama materyallerine göre farklılık göstermesinin nedenlerinden biri farklı yapıdaki karbonhidratların protein (enzim) molekülleri ile bağ yapma özellikleri olabilir. Protein moleküllerinin donma ve dondurarak kurutma aşamalarında çevrelerinde bulunan su kabuğunu (hydration shell) kaybetmeleri sonucunda, intramoleküler hidrojen bağlarının oluşması ile üç boyutlu yapılarında değişiklikler meydana gelebilir. Kurutma öncesinde ortama kaplama materyalleri (karbonhidratlar) eklendiğinde su ve protein molekülleri arasında bulunan hidrojen bağları, dondurarak kurutma sırasında protein ve karbonhidratların hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları ile yer değiştirir. Böylelikle proteinin üç boyutlu yapısı korunmuş olur (Carpenter ve ark., 1989; Allison ve ark., 1999; Anchordoquy ve ark., 2001). Maltodekstrin gibi rijid yapıda polisakkaritler, proteinler ile interaksiyona girebilmesine rağmen bazı açık bölgeler bırakırlar. (Tonnis ve ark., 2015). İnülin yapısında herhangi bir şeker halkası içermeyen özgün bir oligo- ya da polisakkarittir. Temel yapısının polietilen oksit olması, moleküle esneklik sağlayarak hareket etmesini kolaylaştırır. Ayrıca inülin çoğunlukla, piranoz halkalarından daha esnek olan furanoz gruplarından oluşur (French, 1988; Livingston ve ark., 2007; Barclay ve ark., 2010). Maltodekstrine göre daha esnek bir yapıya sahip olan inülinin, mTG moleküllerini daha

iyi sararak enkapsülasyon etkinliğinin artmasını ve mTG'nin kurutma sırasında maruz kaldığı stresin azalmasını sağladığı düşünülmektedir.

Maltodekstrin ve inülinin kurutma sırasında protein stabilizasyonunu farklı oranda sağlaması, partiküllerin kristal veya camsı özellik göstermesi ile açıklanabilir. Camsılaşma teorisine göre, proteinler karbonhidratlar ile matriks oluşturduğunda, proteinlerin moleküler hareketi azalır ve böylece bozunma hızları düşer. Kaplama materyali olarak inülin kullanıldığında oluşan ve kristal özellik göstermeyen amorf yapının kurutma sırasında enzim molekülünü buz ve dehidrasyon stresi gibi mekanik streslerden koruduğu düşünülmektedir.

İnülinin özellikle dondurarak kurutma işlemlerinde proteinleri korumadaki başarısını gösteren çalışmalar mevcuttur. Tonnis ve ark. (2014), hepatit B aşısının toz forma getirilmesi için PDK işlemini kullanmışlar ve inülinin protein stabilizasyonunda kullanılmasının en önemli nedeninin donma sırasında kristalleşmeye karşı gösterdiği direnç olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca inülinin hidrofilik yapısı, üstün hidrojen bağlama kapasitesi ve toksik olmayışı protein stabilizasyonunda kullanılmasını sağlamaktadır (Grasmeijer ve ark., 2013). Furlán ve ark. (2012), plazma proteinlerini dondurarak kurutma ile toz forma getirdikleri çalışmada, inülinin dondurarak kurutma sırasında proteinlerin yapısını koruyarak denatüre olan protein yüzdesini azalttığını bildirmişlerdir. İnülinin uygulanan farklı işlemlerde protein stabilizasyonunu artırdığına ilişkin farklı çalışmalar da mevcuttur (Hinrichs ve ark., 2001; Eriksson ve ark., 2002; Eriksson ve ark., 2003; Amorij ve ark., 2007; Saluja ve ark., 2010).

Mikroenkapsülasyon verimini ifade eden püskürtme, donma ve kurutma aşamalarının tümünün enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren kalan aktivite değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. En düşük kalan aktivite değeri (%87.8); 2.0 ml/dak besleme debisi, 120 kHz nozul frekansı ve maltodekstrin konsantrasyonunun %100 olduğu durumda elde edilmiş, en yüksek kalan aktivite değeri (%97.1) ise; 8.0 ml/dak besleme debisi, 48 kHz nozul frekansı, gam arabik konsantrasyonunun %40 ve inülin konsantrasyonunun %60 olduğu durumda belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Kaplama materyallerinin etkisinin dışında, işlem parametrelerinin (nozul frekansı ve besleme debisi) de kalan aktivite değerleri üzerine etkisi olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 4.4). Artan besleme debilerinde kalan aktivite değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Düşük

besleme debilerinde her iki nozul frekansında da daha düşük kalan aktivite değerlerinin elde edilmesi, besleme çözeltisinin maruz kaldığı ultrasonik titreşim enerjisinin artması ile açıklanmıştır. Gam arabik konsantrasyonunun %100 olduğu koşullarda kalan aktivite değerlerinde, besleme debisi 2 ml/dak'dan 8 ml/dak'ya çıkarıldığında 48 kHz nozul frekansında %4, 120 kHz nozul frekansında ise %2 artış görülmüştür. Benzer durumlar gam arabik (%40)– inülin (%60) ve maltodekstrin (%40)– inülin (%60) karışımlarında da tespit edilmiştir.

Kalan aktivite değerlerinin 120 kHz nozul frekansı kullanıldığında genel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Aynı besleme çözeltisi kullanıldığında, damlacık boyutunu etkileyen en önemli parametre püskürtme frekansıdır ve yüksek frekanslarda daha küçük damlacık boyutu elde edilir (Wanning ve ark., 2015). Ancak, yüksek frekansta püskürtme sırasında nozul içerisinde üretilen ultrasonik dalgalar, oluşan girdap (eddy) nedeniyle enzim üzerinde mekanik bir stres yaratarak aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir (Feng ve ark., 2011). Gerçekleştirilen çalışmada, yüksek frekanslı nozul içerisinde meydana gelen daha yüksek ultrasonik titreşim enerjisi, kalan aktivite değerlerinin düşük frekanslı nozula göre daha düşük olarak belirlenmesine neden olmuştur.

4.2.1 Modelin oluşturulması ve kalan aktivite değerinin model yanıtı olarak incelenmesi

Gerçekleştirilen optimizasyon işleminde bağımsız değişkenler ile deneysel yanıt (kalan aktivite) arasındaki ilişkiyi ifade eden matematiksel modeller, çoklu lineer regresyon analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla modellere tüm değişkenlerin ilk olarak lineer etki terimleri, sonrasında kuadratik etki terimleri ve interaksiyon etki terimleri toplu olarak eklenerek kareler toplamındaki değişimler ve model uygunsuzluğu (lack of fit) değerleri tespit edilmiştir. Kaplama materyallerinin karışım oranları, besleme debisi ve nozul frekansı kullanılarak elde edilen ikinci dereceden polinomial modellerin kalan aktivite değerini tahminlemek için en uygun modeller olduğu saptanmıştır. Bağımsız değişkenlerin kalan aktivite üzerindeki lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin istatistiksel analizi Çizelge 4.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, regresyon modelinin %99 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Kalan aktivite üzerine lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	SD	Katsayı	Kareler Toplamı	F Değeri	p-değeri
Model	29	-	386.8003	83.588	< 0.0001
Lineer Karışım	2	-	349.2797	1094.453	< 0.0001
C ₁ C ₂	1	1.32	0.0879	0.551	0.475
C ₁ C ₃	1	-1.11	0.0133	0.083	0.7788
C ₁ X ₁	1	1.31	6.9782	43.732	< 0.0001
C ₁ X ₂	1	1.01	6.3209	39.612	< 0.0001
C ₂ C ₃	1	-6.07	0.2624	1.644	0.2287
C ₂ X ₁	1	0.45	0.8141	5.102	0.0475
C ₂ X ₂	1	0.82	4.0754	25.540	0.0005
C ₃ X ₁	1	1.14	0.2002	1.255	0.2888
C ₃ X ₂	1	-0.58	0.0673	0.422	0.5308
C ₁ C ₂ X ₁	1	-2.03	0.7818	4.900	0.0513
C ₁ C ₂ X ₂	1	-5.98	8.5537	53.605	< 0.0001
C ₁ C ₃ X ₁	1	-1.09	0.0328	0.205	0.6602
C ₁ C ₃ X ₂	1	-1.58	0.0959	0.601	0.4561
C ₁ X ₁ X ₂	1	-0.30	0.3675	2.303	0.1601
C ₂ C ₃ X ₁	1	-1.09	0.0321	0.201	0.6632
C ₂ C ₃ X ₂	1	-1.05	0.0373	0.234	0.6391
C ₂ X ₁ X ₂	1	-0.06	0.0143	0.090	0.7706
C ₃ X ₁ X ₂	1	1.47	0.3350	2.099	0.178
C ₁ X ₁ ²	1	-0.12	0.0198	0.124	0.7321
C ₂ X ₁ ²	1	-0.13	0.0216	0.135	0.7205
C ₃ X ₁ ²	1	-1.47	0.0678	0.425	0.5291
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	1	0.42	0.0343	0.215	0.6528
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	1	-1.74	0.0829	0.519	0.4876
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	1	-2.19	0.1302	0.816	0.3876
C ₁ C ₂ X ₁ ²	1	0.00	2.33x10 ⁻⁸	1.46x10 ⁻⁷	0.9997
C ₁ C ₃ X ₁ ²	1	1.84	0.0224	0.140	0.7159
C ₂ C ₃ X ₁ ²	1	1.94	0.0199	0.124	0.7316
Kalıntı	10		1.5957		
Model Uygunsuzluğu	5		0.7396		0.5618
Saf Hata	5		0.8560		
Toplam	39		388.3960		
R ²	0.9959				
Düz- R ²	0.9840				
Yeterli tahminleme	30.006				
PRESS	57.28				
C.V. (%)	0.44				

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz),

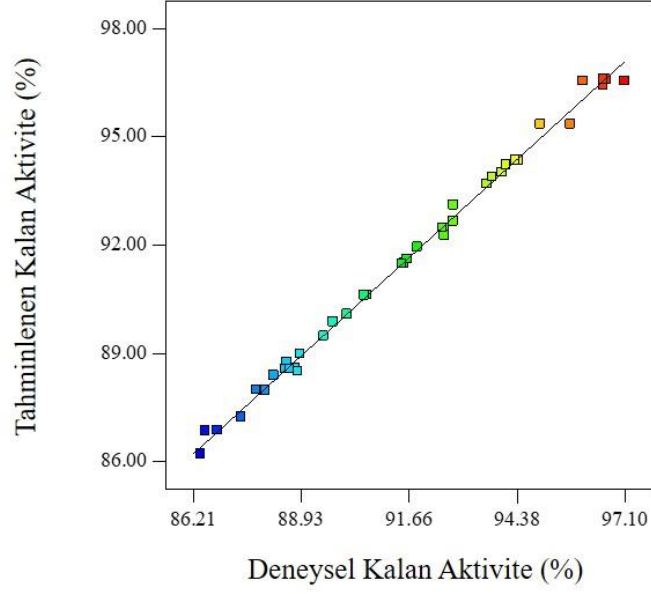
Çizelge 4.5'te ayrıca model uygunsuzluğu ve saf hata olarak ayrılan kalıntı hata gösterilmektedir. Oluşturulan modelin, model uygunsuzluğu değerinin istatistiksel açıdan önemsiz, regresyon modeli için ise istatistiksel olarak önemli olması

gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Kalan aktivite yanıtı için oluşturulan ikinci dereceden polinomial model istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$), model uygunsuzluğu ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$) (Çizelge 4.5).

Modelin elde edilen deneysel verileri hangi oranda karşıladığını ortaya koyan istatistiksel veriler (R^2 , düz- R^2 , varyasyon katsayısı) Çizelge 4.5'te verilmiştir. Deneysel veriler ile elde edilen model tarafından açıklanabilen varyasyonun toplam varyasyona oranı olarak tanımlanan R^2 değeri 0.9959 olarak hesaplanmış ve varyasyonun oldukça büyük bir kısmının model tarafından açıklanabildiği bulgulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, düz- R^2 değeri 0.9840 olarak belirlenmiş, bu değer kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, R^2 ve düz- R^2 değerlerinin birbirine yakın oluşu (%1.19) istatistiksel olarak önemsiz terimlerin model içerisinde yer almadığını göstermiştir. Modelden elde edilen varyasyon katsayısı değeri %0.44 olarak belirlenmiş, bu değer küçük olması deneysel verilerin ortalama değerlerle yakın olması ile açıklanmıştır. 4'ten büyük yeterli tahminleme değeri (30.006) ve düşük PRESS değeri, modelin tahminleme yapılabilmesi açısından uygun bir model olduğunu göstermiştir.

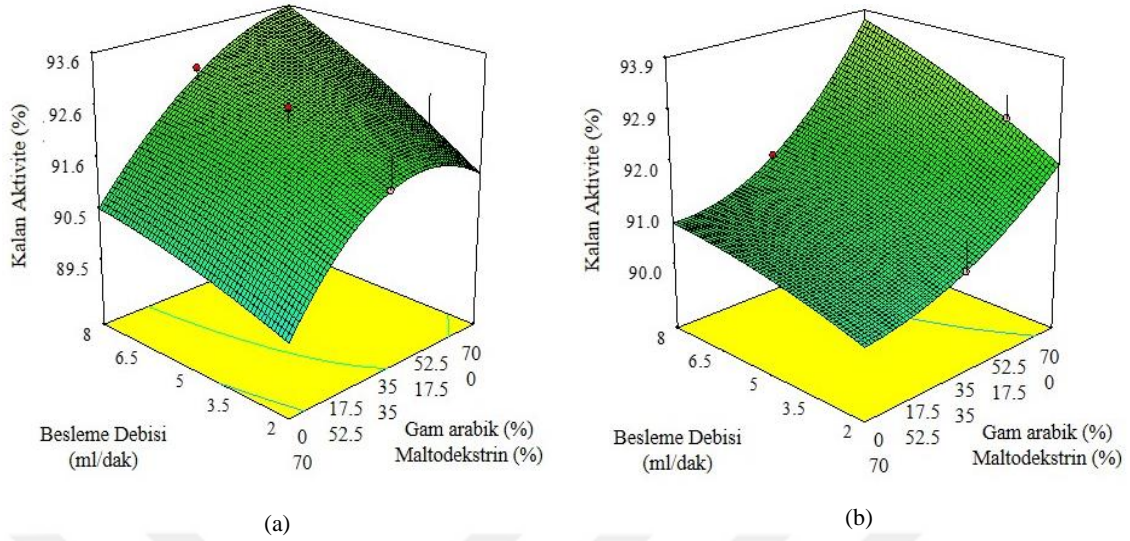
UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda elde edilen kalan aktivite (mikroenkapsülasyon verimi) değeri, tüm işlemin enzim aktivitesi üzerine etkisini göstermesi nedeniyle mikroenkapsülasyon işleminin başarısını ifade eden en önemli parametredir. Optimizasyon amacıyla kalan aktivitenin belirlenebilmesi için elde edilen ikinci dereceden polinomial model, kodlanmış değişkenler cinsinden Eşitlik 4.2'de verilmiştir. Deneysel kalan aktivite verileri ile modelden tahminlenen değerler ise Şekil 4.1'de karşılaştırılmıştır. Tahminlenen değerler ile deneysel olarak belirlenen kalan aktivite değerlerinin oldukça uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +89.60C_1 + 87.67C_2 + 100.90C_3 + 1.31C_1X_1 + 1.01C_1X_2 + 0.82C_2X_2 - 5.98C_1C_2X_2 \quad (4.2)$$



Şekil 4.1. Deneysel ve tahminlenen kalan aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

Bağımsız işlem değişkenlerinin kalan aktivite üzerindeki etkilerinin görsel olarak kolayca belirlenebilmesi için, elde edilen modeller kullanılarak yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri oluşturulmuştur. Bu grafikler, işlem değişkenlerinden herhangi birinin deneysel dizaynın merkez noktasında sabit tutulup, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. 48 kHz ve 120 kHz nozul frekansı için merkez noktasındaki inülin konsantrasyonunun fonksiyonu olarak kalan aktivite değişimini veren yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. 48 kHz nozul frekansı için; kalan aktivitenin en düşük değeri maltodekstrin oranının %100 ve besleme debisinin 2 ml/dak olduğu durumda elde edilmiştir. En yüksek kalan aktivite değeri ise gam arabik oranı %40, inülin oranı %60 ve besleme debisi 8 ml/dak’da saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kalan aktivite (%) için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi (a) 48 kHz (b) 120 kHz (%30 inülin konsantrasyonu için)

4.2.2 pH ve yüksek sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin model yanıtı olarak incelenmesi

UPDK ile farklı koşullarda elde edilen mikroenkapsüle toz ürünlerin aktivitesi, standart enzim aktivitesi belirleme prosedüründeki ortam pH değeri ve ortam sıcaklığı değiştirilerek (pH 3.0, pH 8.0 ve 80°C) belirlenmiş ve işlem değişkenlerinin farklı pH ve sıcaklık kullanıldığında kalan aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır. Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında elde edilen deneysel kalan aktivite değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. pH 3.0 koşulunda kalan aktivite değerlerinin ~%87-91 aralığında değiştiği gözlenmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalarda mTG enziminin optimum çalışma pH aralığının pH 5.0-7.0 olduğu belirlenmiştir (Ando ve ark., 1989; Cui ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2009). pH 3.0 gibi asidik ortamlar mTG enziminin çalışabilmesi için uygun olmamasına rağmen, tüm koşullarda oldukça yüksek kalan aktivite değerleri elde edilmiştir. Buna karşın Cui ve ark. (2007) mTG enziminin asidik pH değerlerinde aktivitesinin önemli bir kısmını kaybettiğini belirtmişlerdir. Farklı kaplama materyalleri kullanılarak UPDK işlemi ile mikroenkapsülasyonun enzimin asidik pH değerlerine karşı stabilitesini artırdığı görülmüştür. pH 8.0 koşulunda ise, kalan aktivite değerlerinin ~%45-52 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Alkali pH koşulunda (pH 8.0) mTG enziminin izoelektrik noktasına (pH 8.9) yaklaşılmasına bağlı olarak meydana gelen aktivite

düşüşünün, asidik pH değerlerinde meydana gelen düşüşe oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Yapılan bir çalışmada, mTG enziminin pH 3.0'te kalan aktivite değeri %65, pH 8.0'de ise %45 olarak belirlenmiştir (El-Hofi ve ark. 2014). Ayrıca, izoelektrik noktaya yaklaşılması ile birlikte mikroenkapsülasyon işlem koşullarının etkisi azalmış, yüksek pH'larda kalan aktivite değerleri işlem koşullarından daha az etkilenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında elde edilen deneysel kalan aktivite (%) değerleri

Deneme No	pH 3.0	pH 8.0	80°C	Deneme No	pH 3.0	pH 8.0	80°C
1	87.02 (±0.17)	49.22 (±0.89)	13.93 (±1.06)	21	89.49 (±1.03)	49.58 (±1.86)	16.32 (±0.65)
2	88.61 (±0.13)	49.99 (±0.59)	13.49 (±0.03)	22	88.07 (±0.11)	47.39 (±1.33)	16.08 (±1.37)
3	89.92 (±0.32)	50.79 (±0.18)	17.96 (±0.26)	23	87.72 (±0.36)	47.72 (±0.35)	18.90 (±0.09)
4	88.28 (±0.97)	47.52 (±0.34)	14.47 (±0.12)	24	89.53 (±1.13)	48.51 (±3.01)	17.46 (±0.44)
5	88.23 (±0.14)	52.01 (±0.14)	12.11 (±0.15)	25	89.36 (±0.46)	46.31 (±0.30)	15.97 (±0.91)
6	89.28 (±0.03)	50.18 (±0.56)	16.41 (±0.36)	26	86.89 (±0.46)	45.35 (±0.26)	16.12 (±1.03)
7	88.49 (±0.57)	48.13 (±0.67)	17.19 (±0.03)	27	88.20 (±0.50)	48.32 (±0.94)	17.67 (±0.48)
8	90.81 (±0.82)	48.05 (±0.67)	16.88 (±0.41)	28	87.50 (±0.13)	46.27 (±1.21)	17.71 (±0.02)
9	90.53 (±0.70)	48.86 (±0.36)	19.84 (±0.50)	29	88.01 (±0.50)	47.65 (±0.52)	17.02 (±0.62)
10	87.86 (±0.50)	48.20 (±0.16)	18.14 (±0.07)	30	89.12 (±0.39)	48.49 (±0.01)	18.58 (±0.41)
11	89.41 (±0.96)	47.85 (±0.60)	16.67 (±0.43)	31	88.76 (±0.29)	49.59 (±0.06)	15.64 (±0.00)
12	88.44 (±0.10)	47.93 (±0.10)	17.04 (±0.32)	32	88.80 (±0.36)	48.01 (±0.28)	18.26 (±0.30)
13	87.96 (±0.31)	49.91 (±1.97)	14.38 (±0.07)	33	87.27 (±0.02)	48.43 (±0.48)	18.37 (±0.21)
14	89.96 (±0.72)	47.97 (±0.30)	16.20 (±1.03)	34	89.13 (±1.15)	50.65 (±2.08)	18.68 (±0.27)
15	87.79 (±0.58)	48.26 (±0.78)	18.12 (±0.87)	35	87.83 (±0.41)	46.55 (±0.38)	17.34 (±0.44)
16	88.59 (±0.47)	48.63 (±1.68)	14.81 (±0.30)	36	88.62 (±0.48)	51.41 (±0.21)	15.37 (±0.15)
17	87.96 (±0.71)	47.08 (±0.04)	18.30 (±0.29)	37	87.51 (±0.17)	48.55 (±0.06)	17.32 (±0.10)
18	88.41 (±0.13)	48.87 (±1.75)	15.70 (±0.00)	38	88.02 (±0.24)	46.69 (±0.74)	17.84 (±0.17)
19	87.40 (±0.67)	48.30 (±0.33)	17.93 (±0.85)	39	87.44 (±0.31)	47.41 (±0.43)	18.37 (±0.27)
20	87.21 (±0.22)	46.47 (±1.50)	17.90 (±0.06)	40	88.36 (±0.41)	47.51 (±1.00)	18.43 (±0.24)

Farklı mikroenkapsülasyon koşullarında, kalan aktivite üzerine yüksek sıcaklığın (80°C'de 1 saat) etkisi incelenmiş ve elde edilen kalan aktivite değerlerinin %12-19 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Özellikle gam arabik ve inülinin birlikte kullanıldığı koşullarda, kalan aktivite değerlerinin %18'in üzerinde olduğu görülmüştür. Kaplama materyallerinden inülinin esnek oligosakkarit yapısına bağlı olarak enzim moleküllerini çözelti ortamında yüksek sıcaklığa karşı daha iyi koruduğu düşünülmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda mTG enziminin yüksek sıcaklıklardaki stabilitesi belirlenmiştir. Ho ve ark. (2000) 60°C'de 5 dakika koşullarında mTG enziminin aktivitesini önemli oranda kaybettiğini belirtmişlerdir. Cui ve ark. (2007), 70°C'de mTG aktivitesinin tamamen kaybolduğunu, 60°C'de 30 dakika inkübasyon sonucunda ise kalan aktivite değerinin %7 olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde Nagy ve Szakacs (2008) 70°C'de aktivite kayıplarının %90-100 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Literatürde mTG enziminin yüksek sıcaklık stabilitesi ile ilgili yapılan bu çalışmalar, kısmi ya da tam olarak saflaştırılmış enzim ile gerçekleştirilmiş, ancak tez kapsamındaki benzer şekilde mikroenkapsüle mTG enziminin yüksek sıcaklık stabilitesinin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda ulaşılan kalan aktivite değerleri literatür ile karşılaştırıldığında, UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin enzimin yüksek sıcaklıklara dayanımını artırdığı görülmüştür.

Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında kalan aktivite üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkileri ise Çizelge 4.7'de verilmiştir. Yüksek sıcaklık ve farklı pH değerlerinde elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). pH 3.0, pH 8.0 ve 80°C koşullarında kalan aktivite değerleri üzerine karışımın lineer etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Hem farklı pH değerlerinde, hem de yüksek sıcaklıkta model uygunsuzluğu değerleri ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). İşlem değişkenleri ile kalan aktivite arasındaki ilişkiyi ifade eden ve farklı pH ile yüksek sıcaklık için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller pH 3.0 için Eşitlik 4.3, pH 8.0 için Eşitlik 4.4 ve 80°C için Eşitlik 4.5 ile verilmiştir.

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +88.30C_1 + 89.05C_2 + 81.16C_3 + 17.46C_1C_3 + 13.90C_2C_3 + 1.01C_2X_2 - 49.98C_1C_2C_3 \quad (4.3)$$

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +49.45C_1 + 46.99C_2 + 48.95C_3 + 6.03C_1C_2 - 1.44C_1X_2 + 0.97C_2X_2 \quad (4.4)$$

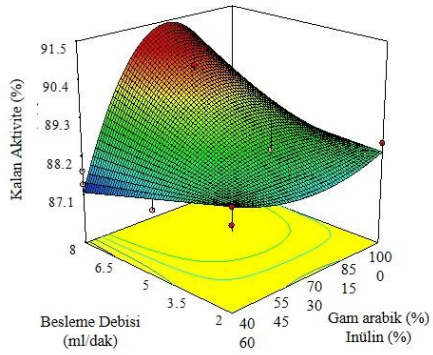
$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +15.76C_1 + 16.53C_2 + 8.31C_3 + 27.05C_1C_3 + 2.11C_1X_2 + 26.71C_2C_3 - 123.66C_1C_2C_3 \quad (4.5)$$

Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında elde edilen yanıt yüzey grafikleri 48 kHz nozul için Şekil 4.3 ve 120 kHz nozul için Şekil 4.4'te gösterilmiştir. pH 3.0 koşulu için, kalan aktivite üzerine besleme debisi doğrudan etkiye sahip olmamasına rağmen, kalan aktivite değerinin yüksek besleme debilerinde en yüksek değerlerde olduğu bulgulanmıştır (Şekil 4.3a, Şekil 4.4a). pH 8.0 koşulunda, 48 kHz nozul frekansında en yüksek kalan aktivite değerleri gam arabik oranının maksimum olduğu koşulda elde edilmiştir. 120 kHz nozul frekansında ise gam arabik ve inülin konsantrasyonunun kalan aktivite üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Gam arabik-nozul frekansı interaksiyonunun model üzerine etkisi, ANOVA çizelgesinden belirlendiği gibi, yanıt yüzey grafiklerinde de ortaya konulmuştur (Şekil 4.3b, Şekil 4.4b). 80°C koşulunda, besleme debisi kalan aktivite üzerine doğrudan etkiye sahip olmamasına rağmen, yüksek besleme debilerinde kalan aktivite değerinin yüksek değerlerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.3c, Şekil 4.4c).

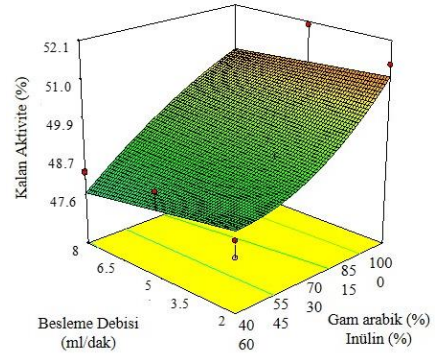
Çizelge 4.7. Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında kalan aktivite üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	pH 3.0			pH 8.0			80°C		
	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri
Model	27.1287	20	0.004	64.4217	17	0.0002	91.2429	20	0.0002
Lineer Karışım	6.3618	2	0.0026	30.5913	2	< 0.0001	20.4905	2	0.0004
C ₁ C ₂	0.5463	1	0.247	9.3168	1	0.0018	0.4037	1	0.4922
C ₁ C ₃	4.2886	1	0.0034	0.1923	1	0.6146	10.2883	1	0.0022
C ₁ X ₁	0.0544	1	0.7105	0.1318	1	0.6764	2.4043	1	0.1037
C ₁ X ₂	0.2034	1	0.475	13.0667	1	0.0004	26.5966	1	< 0.0001
C ₂ C ₃	2.3834	1	0.022	1.0504	1	0.2453	8.8043	1	0.004
C ₂ X ₁	0.6508	1	0.2079	0.1868	1	0.6197	0.1677	1	0.6568
C ₂ X ₂	6.1770	1	0.0007	5.6100	1	0.0115	0.0170	1	0.8871
C ₃ X ₁	2.4114	1	0.0213	1.0197	1	0.2521	1.1324	1	0.2553
C ₃ X ₂	0.0152	1	0.8442	0.9590	1	0.2663	1.0452	1	0.2738
C ₁ C ₂ C ₃	3.9820	1	0.0045	-	-	-	24.3779	1	< 0.0001
C ₁ C ₂ X ₁	0.0720	1	0.6694	0.1975	1	0.6099	0.8267	1	0.3288
C ₁ C ₂ X ₂	0.5019	1	0.2665	0.4471	1	0.4444	1.4113	1	0.206
C ₁ C ₃ X ₁	1.9176	1	0.0374	0.7388	1	0.3276	1.5427	1	0.1869
C ₁ C ₃ X ₂	0.0079	1	0.8872	0.0001	1	0.9906	1.8250	1	0.1529
C ₂ C ₃ X ₁	2.5204	1	0.0189	1.4997	1	0.1678	1.1306	1	0.2557
C ₂ C ₃ X ₂	0.0301	1	0.7823	1.3618	1	0.1878	0.8366	1	0.326
C ₁ C ₂ C ₃ X ₁	0.9825	1	0.1257	-	-	-	0.6689	1	0.3786
C ₁ C ₂ C ₃ X ₂	0.0151	1	0.8446	-	-	-	0.9971	1	0.2848
Kalıntı	7.2757	19	-	16.2150	22	-	15.6369	19	-
Model Uygunsuzluğu	5.7521	14	0.3949	13.9481	17	0.2655	13.8529	14	0.133
Saf Hata	1.5235	5	-	2.2669	5	-	1.7839	5	-
Toplam	34.4044	39	-	80.6368	39	-	106.8798	39	-

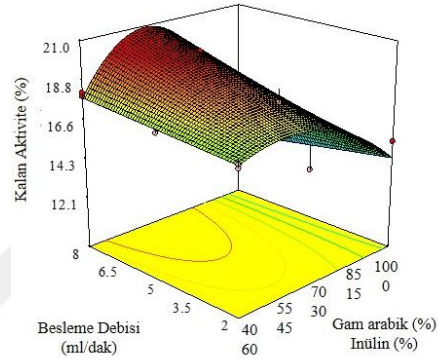
C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)



(a)

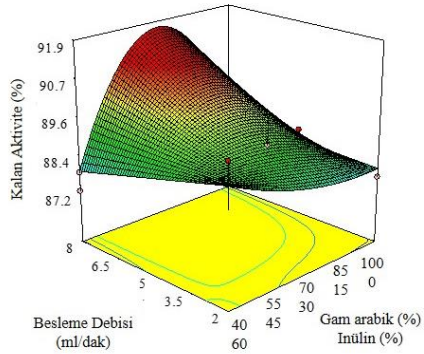


(b)

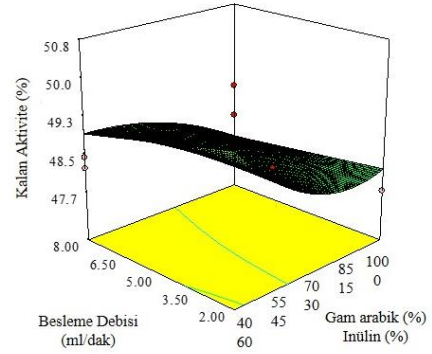


(c)

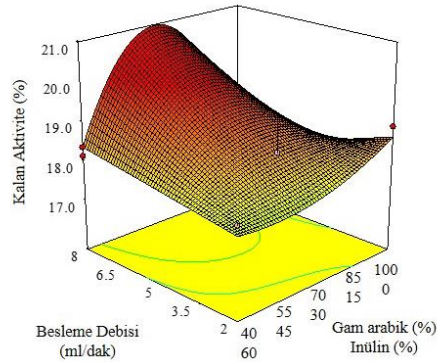
Şekil 4.3. 48 kHz nozul frekansında (a) pH 3.0, (b) pH 8.0 ve (c) 80°C koşullarında kalan aktivite (%) değerleri



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.4. 120 kHz nozul frekansında (a) pH 3.0, (b) pH 8.0 ve (c) 80°C koşullarında kalan aktivite (%) değerleri

4.2.3 Farklı metal iyonları ve EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin model yanıtı olarak incelenmesi

UPDK ile farklı koşullarda elde edilen mikroenkapsüle toz ürünlerin aktivitesi, standart enzim aktivitesi belirleme prosedüründeki ortama farklı metal iyonları (Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2}) ve EDTA eklenerek belirlenmiş ve deneme desenine göre deneysel kalan aktivite değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Ortamda bulunan EDTA'nın enzim aktivitesini artırıcı etki gösterdiği belirlenmiş ve kalan aktivite değerleri tüm koşullarda %100'ün üzerinde bulunmuştur. EDTA'nın enzim moleküllerine bağlanmış olan metal iyonları ile şelat oluşturması sayesinde, enzim molekülleri daha fazla substrat ile çalışma olanağı bulmuş ve buna bağlı olarak kalan aktivite değerleri artış göstermiştir (Ekren, 2013).

Fe^{+2} iyonu varlığında kalan aktivite değerlerinin ~%61-71, Ca^{+2} iyonu varlığında ~%75-91, Co^{+2} iyonu varlığında ise ~%48-61 arasında değiştiği belirlenmiştir. Her iki nozul frekansında da en yüksek kalan aktivite değerleri gam arabik ve inülin oranının eşit olduğu durumlarda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.8). UPDK ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilen mTG enziminin stabilitesi Zn^{+2} iyonu varlığında da araştırılmış ancak mikroenkapsüle enzimin aktivitesinin tüm işlem koşullarında kaybolduğu belirlenmiştir. Bu nedenle Zn^{+2} iyonu varlığında kalan aktivite değerlerine Çizelge 4.8'de yer verilmemiştir.

mTG aktif merkezinde asparajin, sistein ve histidin aminoasitlerini içermektedir ve Zn^{+2} , Pb^{+2} , Li^{+2} ve Cu^{+2} gibi ağır metal iyonlarının sistein amino asitlerinde bulunan tiyol gruplarına bağlanarak enzim aktivitesini inhibe edebileceği bilinmektedir (Ho ve ark., 2000; Macedo ve ark., 2010). Buna karşın Co^{+2} , Ba^{+2} ve K^{+} gibi iyonların mTG aktivitesini artırıcı yönde etki gösterebileceği belirtilmiştir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Gerçekleştirilen çalışmada, Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} iyonları varlığında tüm koşullarda aktivitede düşüş belirlenmesine rağmen, kalan aktivite değerlerinin literatürde mTG enzimi ile yapılan çalışmalarla (Ho ve ark., 2000; Cui ve ark., 2007) karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüş ve UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemiyle enzimin metal iyonlarına karşı gösterdiği dirençte artış sağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8. Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında elde edilen deneysel kalan aktivite (%) değerleri

Deneme No	EDTA	Fe ⁺²	Ca ⁺²	Co ⁺²	Deneme No	EDTA	Fe ⁺²	Ca ⁺²	Co ⁺²
1	106.31 (±0.06)	60.93 (±0.01)	86.67 (±0.02)	48.97 (±0.62)	21	108.83 (±0.64)	64.48 (±0.73)	79.30 (±1.12)	52.66 (±0.64)
2	111.63 (±1.14)	62.26 (±0.30)	74.81 (±0.26)	47.93 (±0.69)	22	109.34 (±0.76)	61.21 (±1.00)	84.57 (±0.76)	48.78 (±0.97)
3	112.57 (±0.49)	70.09 (±0.31)	77.90 (±0.33)	52.14 (±0.15)	23	110.01 (±0.57)	63.83 (±0.43)	77.20 (±0.61)	48.95 (±1.54)
4	109.25 (±0.86)	63.34 (±0.22)	79.79 (±0.16)	51.88 (±0.23)	24	110.08 (±1.03)	65.45 (±0.75)	79.09 (±1.52)	52.86 (±0.35)
5	113.59 (±0.13)	62.67 (±0.14)	81.69 (±0.14)	55.94 (±0.14)	25	111.24 (±0.85)	64.50 (±0.55)	82.74 (±0.10)	60.49 (±0.70)
6	107.48 (±0.44)	64.11 (±0.32)	79.13 (±0.15)	51.96 (±0.60)	26	108.67 (±1.55)	63.03 (±1.07)	81.29 (±0.38)	59.10 (±0.94)
7	108.72 (±0.05)	70.03 (±0.96)	85.03 (±0.69)	56.03 (±0.61)	27	110.69 (±0.69)	63.30 (±0.92)	75.09 (±1.14)	48.08 (±0.18)
8	110.58 (±1.93)	68.20 (±0.26)	82.97 (±0.56)	59.87 (±0.51)	28	106.36 (±0.01)	69.80 (±0.12)	83.04 (±0.26)	57.03 (±0.53)
9	111.08 (±0.31)	70.17 (±0.65)	91.47 (±0.41)	61.28 (±2.06)	29	107.29 (±0.36)	70.58 (±0.44)	85.63 (±1.19)	55.72 (±0.34)
10	108.67 (±0.22)	69.69 (±1.15)	87.17 (±1.19)	56.64 (±0.15)	30	109.00 (±0.94)	70.25 (±0.36)	88.44 (±0.88)	57.78 (±0.03)
11	110.42 (±1.68)	67.38 (±1.20)	82.32 (±1.35)	59.27 (±0.11)	31	107.58 (±0.12)	64.88 (±1.83)	80.62 (±0.62)	59.53 (±0.97)
12	111.15 (±0.08)	63.22 (±0.24)	74.66 (±0.01)	47.87 (±0.49)	32	110.36 (±0.68)	69.50 (±0.64)	83.15 (±0.14)	58.71 (±0.50)
13	107.50 (±0.10)	61.55 (±0.09)	85.48 (±0.42)	49.02 (±0.64)	33	108.27 (±0.12)	70.09 (±0.29)	86.96 (±0.87)	57.21 (±0.21)
14	109.59 (±0.58)	67.45 (±1.40)	84.12 (±1.70)	60.58 (±0.30)	34	109.17 (±0.78)	67.87 (±0.45)	82.13 (±1.88)	53.43 (±0.56)
15	108.20 (±0.38)	68.94 (±2.62)	86.62 (±2.21)	56.98 (±1.10)	35	109.52 (±0.95)	63.74 (±0.01)	81.97 (±0.31)	60.39 (±0.63)
16	108.47 (±0.52)	60.98 (±0.99)	84.98 (±0.39)	48.74 (±0.87)	36	114.73 (±0.08)	64.84 (±0.21)	81.46 (±0.11)	56.07 (±0.52)
17	108.27 (±0.33)	69.67 (±0.15)	83.72 (±0.49)	56.13 (±0.62)	37	107.21 (±0.63)	66.37 (±0.25)	84.44 (±1.12)	57.69 (±0.76)
18	107.21 (±1.06)	60.66 (±0.50)	85.07 (±0.17)	48.80 (±0.26)	38	108.73 (±0.74)	69.16 (±0.12)	82.01 (±1.52)	56.50 (±0.58)
19	108.50 (±0.43)	66.35 (±0.14)	88.31 (±0.32)	57.11 (±0.41)	39	108.64 (±0.87)	69.51 (±0.45)	83.70 (±0.74)	56.07 (±0.45)
20	106.57 (±0.15)	69.34 (±0.40)	82.89 (±0.22)	57.08 (±0.41)	40	108.68 (±0.60)	70.16 (±0.12)	84.42 (±0.92)	57.22 (±0.62)

* Zn⁺² iyonu varlığında hiçbir koşulda aktivite elde edilememiştir.

Farklı koşullarda mikroenkapsüle edilen enzimin EDTA, Fe⁺², Ca⁺² ve Co⁺² varlığında belirlenen kalan aktivite değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin etkisi Çizelge 4.9'da verilmiştir. EDTA, Fe⁺², Ca⁺² ve Co⁺² varlığında elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin tümünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Farklı metal iyonları ve EDTA kullanılarak elde edilen model uygunsuzluğu değerleri EDTA ve Fe⁺² için istatistiksel olarak önemsiz, ($p > 0.05$), Ca⁺² ve Co⁺² için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında işlem değişkenleri ile kalan aktivite arasındaki ilişkiyi ifade eden ve regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller EDTA varlığında Eşitlik 4.6, Fe⁺² varlığında Eşitlik 4.7, Ca⁺² varlığında Eşitlik 4.8 ve Co⁺² varlığında Eşitlik 4.9 ile verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Kalan Aktivite (\%)} = & +111.93C_1 + 110.00C_2 + 109.52C_3 - 9.97C_1C_2 - 1.44C_1X_2 - 9.04C_2C_3 + 4.30C_3X_2 + 6.71C_1C_2X_2 \\ & + 0.96C_1X_1X_2 - 4.01C_1C_2X_1 \end{aligned} \quad (4.6)$$

$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +63.35C_1 + 65.72C_2 + 48.95C_3 + 56.17C_1C_2 + 42.92C_1C_3 + 39.89C_2C_3 + 1.96C_2X_2 - 269.45C_1C_2C_3 \quad (4.7)$$

$$\begin{aligned} \text{Kalan Aktivite (\%)} = & +77.48C_1 + 82.57C_2 + 49.72C_3 + 99.04C_1C_3 - 2.19C_1X_1 - 1.83C_1X_2 + 84.49C_2C_3 - 30.78C_2X_1 - 20.09C_3X_2 \\ & - 135.62C_1C_2C_3 + 90.90C_1C_3X_1 + 47.41C_1C_3X_2 + 80.48C_2C_3X_1 + 50.02C_2C_3X_2 - 225.42C_1C_2C_3X_1 - 126.83C_1C_2C_3X_2 \end{aligned} \quad (4.8)$$

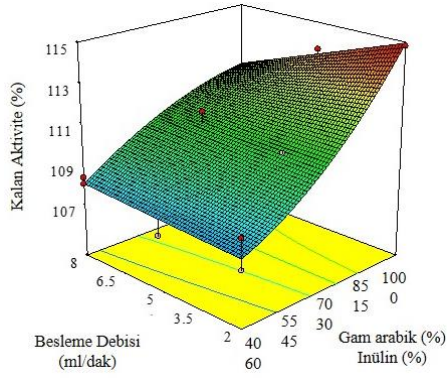
$$\text{Kalan Aktivite (\%)} = +50.81C_1 + 59.95C_2 + 31.45C_3 + 69.20C_1C_3 - 2.26C_1X_1 - 2.51C_1X_2 + 57.96C_2C_3 - 333.56C_1C_2C_3 \quad (4.9)$$

Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında elde edilen yanıt yüzey grafikleri 48 kHz nozul için Şekil 4.5'te ve 120 kHz nozul için Şekil 4.6'da gösterilmiştir. EDTA varlığında besleme debisinin bireysel olarak kalan aktiviteyi etkilemediği Çizelge 4.9'da olduğu gibi yanıt yüzey grafiklerinde de görülmüştür (Şekil 4.5a, Şekil 4.6a). Gam arabik-inülin interaksiyonunun kalan aktiviteyi artırıcı etkisi Fe⁺², Ca⁺² ve Co⁺² için oluşturulan yanıt yüzey grafiklerinden belirlenmiştir. Ortamda Fe⁺² iyonu bulunduğu, besleme debisinin kalan aktiviteyi etkilemediği gözlenmiştir (Şekil 4.5b, Şekil 4.6b). Ca⁺² iyonu varlığında ise, besleme debisi kalan aktivite üzerine doğrudan etkiye sahip olmamasına rağmen, kalan aktivite değerinin yüksek besleme debilerinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5c, Şekil 4.6c). Co⁺² iyonu varlığında kalan aktivite değerlerinin Ca⁺² iyonu varlığındaki değişime benzer şekilde yüksek besleme debilerinde daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5d, Şekil 4.6d). Ayrıca, Fe⁺², Ca⁺² ve Co⁺² iyonları varlığında kalan aktivite üzerine nozul frekansının etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

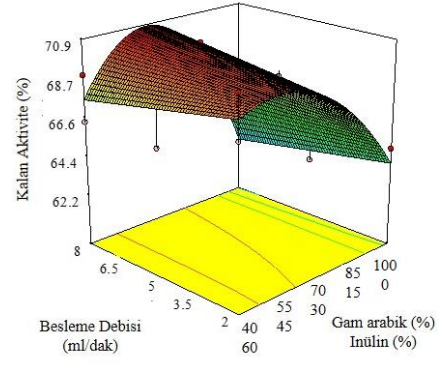
Çizelge 4.9. Farklı metal iyonları ve EDTA varlığında kalan aktivite üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	EDTA			Fe ⁺²			Ca ⁺²			Co ⁺²		
	Kareler Toplamı	SD	p-değeri	Kareler Toplamı	SD	p-değeri	Kareler Toplamı	SD	p-değeri	Kareler Toplamı	SD	p-değeri
Model	130.0223	23	< 0.0001	409.9880	20	< 0.0001	505.3352	20	< 0.0001	644.1390	20	< 0.0001
Lineer Karışım	46.4337	2	< 0.0001	159.9886	2	< 0.0001	183.9144	2	< 0.0001	157.5502	2	< 0.0001
C ₁ C ₂	25.2221	1	< 0.0001	0.9674	1	0.334	0.0185	1	0.931	3.0213	1	0.2699
C ₁ C ₃	1.3015	1	0.0832	25.9079	1	< 0.0001	137.9395	1	< 0.0001	67.3409	1	< 0.0001
C ₁ X ₁	1.1142	1	0.1066	2.4138	1	0.1339	19.2110	1	0.0108	20.3431	1	0.0082
C ₁ X ₂	13.0089	1	< 0.0001	0.0568	1	0.8128	20.1906	1	0.0092	37.7565	1	0.0007
C ₂ C ₃	3.1370	1	0.0111	19.6425	1	0.0003	88.1157	1	< 0.0001	41.4618	1	0.0005
C ₂ X ₁	0.5786	1	0.2357	0.1286	1	0.7217	1.6949	1	0.4116	1.0977	1	0.5016
C ₂ X ₂	0.1880	1	0.4925	23.0414	1	0.0001	1.9463	1	0.3796	0.0118	1	0.9441
C ₃ X ₁	1.4047	1	0.0729	1.3120	1	0.2626	22.3552	1	0.0066	2.2843	1	0.3355
C ₃ X ₂	4.2227	1	0.0043	0.3069	1	0.5831	32.6596	1	0.0016	2.3338	1	0.3305
C ₁ C ₂ C ₃				115.7371	1	< 0.0001	29.3195	1	0.0024	177.3669	1	< 0.0001
C ₁ C ₂ X ₁	0.1934	1	0.4864	1.9470	1	0.1758	0.6094	1	0.6205	0.8707	1	0.5491
C ₁ C ₂ X ₂	11.4231	1	< 0.0001	0.8177	1	0.3735	2.6724	1	0.3051	0.0000	1	0.9991
C ₁ C ₃ X ₁	0.6365	1	0.2145	1.0429	1	0.3163	31.8686	1	0.0017	4.4084	1	0.1858
C ₁ C ₃ X ₂	0.5403	1	0.2511	0.0242	1	0.877	31.6073	1	0.0018	2.6899	1	0.297
C ₁ X ₁ X ₂	3.7734	1	0.0062	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁	1.5514	1	0.0607	1.5051	1	0.2313	24.0586	1	0.0051	2.4536	1	0.3187
C ₂ C ₃ X ₂	1.4767	1	0.0666	0.8227	1	0.3721	30.8755	1	0.002	1.8585	1	0.3839
C ₂ X ₁ X ₂	3.2069	1	0.0104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₃ X ₁ X ₂	0.1422	1	0.5498	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	3.1054	1	0.0115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	0.3750	1	0.3359	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	0.0281	1	0.7894	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₃ X ₁	-	-	-	0.4138	1	0.5245	28.4194	1	0.0028	1.8471	1	0.3854
C ₁ C ₂ C ₃ X ₂	-	-	-	0.0034	1	0.9537	25.6427	1	0.0041	0.1205	1	0.8229
Kalıntı	6.0966	16	-	18.7039	19	-	45.6961	19	-	44.4536	19	-
Model Uygunsuzluğu	4.8618	11	0.2702	14.2545	14	0.4771	43.6794	14	0.0169	43.2705	14	0.0051
Saf Hata	1.2348	5	-	4.4494	5	-	2.0167	5	-	1.1831	5	-
Toplam	136.1190	39	-	428.6919	39	-	551.0314	39	-	688.5926	39	-

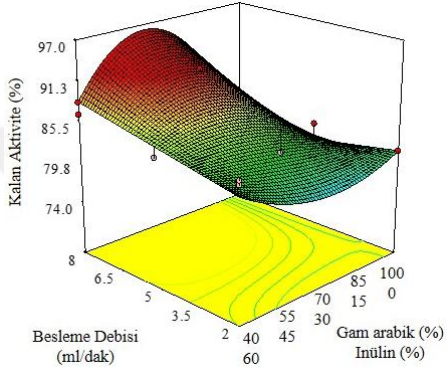
C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)



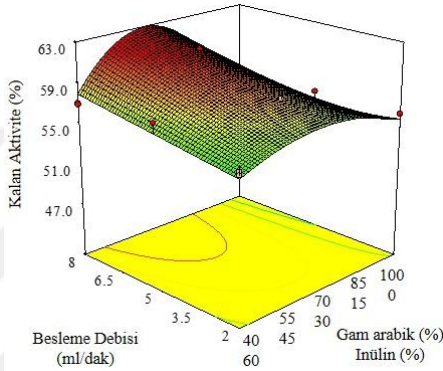
(a)



(b)

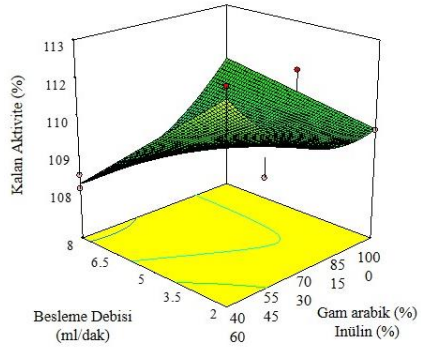


(c)

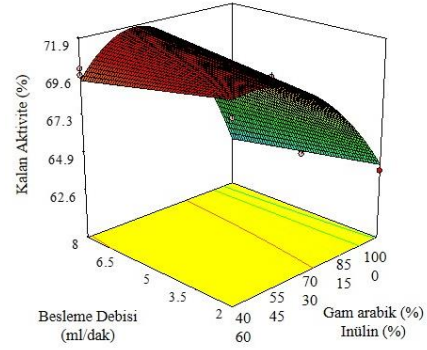


(d)

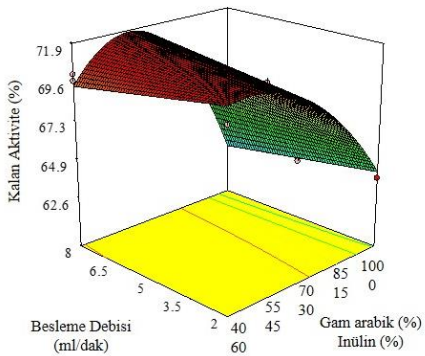
Şekil 4.5. 48 kHz nozul frekansında EDTA ve farklı metal iyonları varlığında kalan aktivite için yanıt yüzey grafikleri (a) EDTA, (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺²



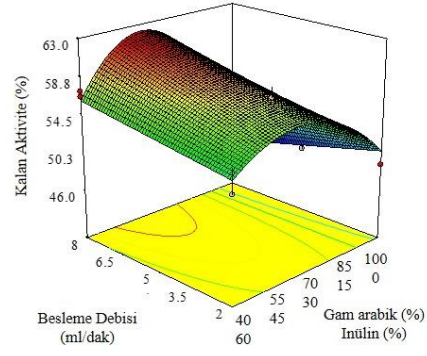
(a)



(b)



(c)

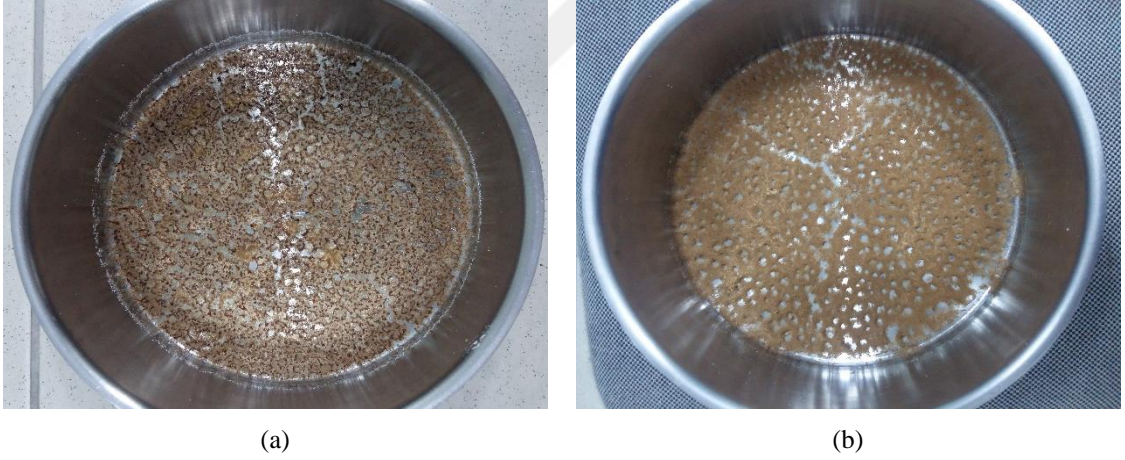


(d)

Şekil 4.6. 120 kHz nozul frekansında EDTA ve farklı metal iyonları varlığında kalan aktivite için yanıt yüzey grafikleri (a) EDTA, (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺²

4.2.4 UPRK ile mikroenkapsülasyon işleminin nem ve su aktivitesi üzerine etkisi

UPDK işlemleri ile farklı koşullarda elde edilen mikroenkapsüle toz ürünlerin nem ve su aktivitesi (a_w) değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, inülin konsantrasyonunun artması ile birlikte nem değerlerinin azaldığı, maltodekstrin konsantrasyonunun artması ile birlikte ise nem değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Karışımlarda maltodekstrin bulunması ile birlikte T_g değerinde meydana gelen düşüşün kurutma sırasında yapısal çökmeyi hızlandırdığı, meydana gelen çökme sonucunda ise kurutma işleminin etkin şekilde gerçekleştirilemediği ve son ürünün nem içeriğinin artış gösterdiği düşünülmektedir. Kurutma sırasında meydana gelen bu çökme olayı, %100 maltodekstrin konsantrasyonunda (Deneme No: 25) görsel olarak tespit edilmiş ve Şekil 4.7a'da gösterilmiştir. Buna karşın inülin konsantrasyonunun %60, gam arabik konsantrasyonunun %40 olduğu koşulda (Deneme No: 10) kurutma sırasında çökme gerçekleşmemiş ve bu durum görsel olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7b).



Şekil 4.7. Farklı kaplama materyalleri varlığında kurutulmuş örneklerin kurutma sonrası görünümü (a) Deneme No: 25 (b) Deneme No: 10

Çizelge 4.10. Deneme desenine göre belirlenen nem ve a_w değerleri

Deneme No	Nem (%)	a_w	Deneme No	Nem (%)	a_w
1	4.78 (±0.33)	0.089 (±0.004)	21	6.32 (±0.15)	0.047 (±0.006)
2	6.33 (±0.33)	0.054 (±0.005)	22	7.08 (±0.83)	0.091 (±0.003)
3	5.22 (±0.06)	0.077 (±0.004)	23	7.59 (±0.50)	0.056 (±0.008)
4	5.97 (±0.12)	0.036 (±0.001)	24	7.41 (±0.18)	0.046 (±0.004)
5	6.08 (±0.31)	0.047 (±0.005)	25	6.31 (±0.04)	0.082 (±0.004)
6	5.89 (±0.15)	0.036 (±0.001)	26	6.14 (±0.15)	0.094 (±0.001)
7	5.46 (±0.23)	0.083 (±0.002)	27	4.82 (±0.38)	0.043 (±0.002)
8	5.89 (±0.28)	0.093 (±0.005)	28	5.68 (±0.09)	0.070 (±0.004)
9	4.56 (±0.64)	0.042 (±0.003)	29	5.97 (±0.11)	0.041 (±0.001)
10	3.87 (±0.26)	0.039 (±0.002)	30	5.78 (±0.49)	0.083 (±0.005)
11	5.57 (±0.04)	0.053 (±0.005)	31	7.38 (±0.24)	0.042 (±0.002)
12	5.85 (±0.20)	0.043 (±0.005)	32	5.45 (±0.26)	0.084 (±0.001)
13	5.12 (±0.50)	0.087 (±0.001)	33	4.85 (±0.34)	0.078 (±0.004)
14	5.51 (±0.08)	0.059 (±0.008)	34	7.75 (±0.12)	0.055 (±0.006)
15	6.06 (±0.09)	0.067 (±0.008)	35	6.23 (±0.04)	0.063 (±0.002)
16	6.40 (±0.08)	0.081 (±0.001)	36	6.06 (±0.06)	0.048 (±0.003)
17	4.64 (±0.66)	0.090 (±0.002)	37	5.03 (±0.13)	0.060 (±0.004)
18	6.44 (±0.15)	0.086 (±0.002)	38	4.43 (±0.19)	0.098 (±0.001)
19	5.63 (±0.20)	0.057 (±0.004)	39	5.29 (±0.04)	0.106 (±0.006)
20	5.55 (±0.11)	0.046 (±0.007)	40	5.53 (±0.05)	0.094 (±0.004)

Toz ürünlerde arzu edilen en önemli özelliklerden biri düşük nem içeriğidir (Ratti, 2001). Sıvı formdaki ürünlerin düşük nem içeriğine sahip toz forma dönüştürülmesi ve bu işlemin en düşük maliyet ile gerçekleştirilmesi kurutma ve mikroenkapsülasyon işlemlerinin en önemli amaçlarından biridir (Desai ve Park, 2005). Ayrıca, toz partiküllerin düşük nem içeriğine sahip olması aglomerat oluşumunu engeller. Bununla birlikte toz ürünlerde yüksek nem içeriği, T_g değerinin önemli oranda azalmasına neden olarak ürün stabilitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Tonnis ve ark., 2015). Bu doğrultuda,

mikroenkapsülasyon işleminde gam arabik-inülin karışımları kullanıldığında inülin oranının artırılması nem değerlerini azaltarak protein stabilizasyonunu sağlamaktadır. Buna karşın, yapılan ön denemelerle inülin konsantrasyonunun %60'tan daha fazla olmasının kurutma işlemi sırasında çökmeye neden olduğu belirlenmiş, bu nedenle inülin konsantrasyonu en fazla %60 olacak şekilde deneme deseni hazırlanmıştır. Gam arabik konsantrasyonunun artırılması ile oluştuğu düşünülen daha gözenekli yapıların nem içeriğini artırdığı tespit edilmesine karşın, gam arabik inülin ile birlikte kullanıldığında, yüksek moleküler ağırlığı sayesinde T_g değerinin yükselmesini sağlayarak çökme oluşumunu engellemiştir. Yapılan çalışmaya benzer şekilde Fernandes ve ark. (2016), GPK işlemi ile mikroenkapsülasyonda yalnızca gamlar kullanıldığında elde edilen toz ürünün nem içeriğini %4.4 olarak tespit etmiş, inülin ve gam karışımının kullanılması ile nemin %2.0'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Engstrom ve ark. (2007), lizozim enzimini PDK ile kuruttukları çalışmada nem içeriğini %2-3 aralığında belirlemiş, kurutma koşullarının oda sıcaklığından oldukça yüksek T_g değerine sahip lizozim tozları üretmek için uygun olduğunu vurgulamışlardır. Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016), E vitamininin PDK ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada püskürtme ve hızlı donma işlemleri sonucunda oluşan düzgün dağılımlı buz kristallerinin kurutma aşamasında ısı ve kütle transferini artırması sonucunda düşük nem değerlerine (%5.4) ulaşıldığını belirtmişlerdir. Buna karşın, Khwanpruk ve ark. (2008), PDK ile toz kahve üretiminde son ürünün nem içeriğini %15 olarak tespit etmiş ve bu durumu kurutma aşamasının yetersizliği ile açıklamışlardır. Bu duruma benzer şekilde Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015), PDK işlemi ile elde ettikleri kahve tozunda nem içeriğini %8.7 olarak belirlemişlerdir.

Farklı koşullarda mikroenkapsüle edilen örneklerin a_w değerleri %0.036-0.106 aralığında değişmiştir (Çizelge 4.10). Her iki nozul frekansında da en yüksek a_w değerleri gam arabik oranının %70 olduğu koşullarda tespit edilmiştir. Tüm deneme deseninde elde edilen oldukça düşük a_w değerleri, bakteri ($a_w > 0.91$), maya ($a_w > 0.88$), küf ($a_w > 0.80$) ve hatta osmofilik mayaların ($a_w > 0.61$) gelişimini engelleyecek düzeydedir (Mossel ve Ingram, 1955).

Nem içeriği ve a_w değerleri üzerine linear ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA tablosu Çizelge 4.11 ile verilmiştir. Nem ve a_w değerleri için elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Nem ve a_w değerleri üzerine karışımın linear etkisinin istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$), model uygunsuzluğunun ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). Farklı nozul frekanslarında nem içeriğinin ve a_w değerlerinin benzer şekilde değişiklik göstermesi, nozul frekansının belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir.



Çizelge 4.11. Nem ve a_w değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	Nem			a_w		
	Kareler Toplamı	SD	p-değeri	Kareler Toplamı	SD	p-değeri
Model	22.78	17	0.0007	9.309×10^{-3}	5	< 0.0001
Lineer Karışım	8.83	2	< 0.0001	5.22×10^{-3}	2	0.0002
C ₁ C ₂	3.06	1	0.0044	1.03×10^{-3}	1	0.0412
C ₁ C ₃	0.02	1	0.7825	2.70×10^{-3}	1	0.0016
C ₁ X ₁	1.79	1	0.024	3.64×10^{-3}	1	0.0003
C ₁ X ₂	7.79×10^{-3}	1	0.8746	-	-	-
C ₂ C ₃	5.53×10^{-4}	1	0.9664	-	-	-
C ₂ X ₁	8.55×10^{-3}	1	0.8685	-	-	-
C ₂ X ₂	0.49	1	0.2199	-	-	-
C ₃ X ₁	0.50	1	0.2133	-	-	-
C ₃ X ₂	3.57	1	0.0024	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁	0.67	1	0.1509	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₂	0.52	1	0.2029	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁	0.68	1	0.1492	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₂	2.74	1	0.0066	-	-	-
C ₁ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₂	0.94	1	0.0921	-	-	-
C ₂ X ₁ X ₂	2.96	1	0.005	-	-	-
C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-
Kalıntı	6.70	22	-	7.81×10^{-3}	34	-
Model Uygunsuzluğu	5.91	17	0.1965	5.99×10^{-3}	29	0.8479
Saf Hata	0.79	5	-	1.82×10^{-3}	5	-
Toplam	29.48	39	-	-	39	-

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)

4.2.5 UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin renk değerleri üzerine etkisi

UPDK işlemi uygulanarak farklı koşullarda elde edilen toz ürünlerin renk değerleri üzerine işlem değişkenlerinin etkileri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, L^* değerleri ~34-70 aralığında değişmiş, her iki nozul frekansında da inülin konsantrasyonunun azalması ile örneklerin L^* değerleri artış göstermiştir. Maltodekstrin konsantrasyonu %100 olduğunda ise daha yüksek L^* değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. a^* değerlerinin ~8-15 aralığında değiştiği bulgulanmış, en yüksek a^* değerlerinin gam arabik-inülin karışımlarında elde edildiği belirlenmiştir. b^* değerlerinin ise ~18-28 aralığında değiştiği görülmüş, her iki nozul frekansında da gam arabik oranının %70, inülin oranının %30 olduğu durumda düşük b^* değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

L^* , a^* ve b^* değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel etkisini gösteren ANOVA çizelgesi ise Çizelge 4.13’te verilmiştir. L^* , a^* ve b^* değerleri için elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin tümünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulgulanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca model uygunsuzluğunun, tüm renk değerleri için istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$). Sonuçlara göre L^* ve a^* değerleri üzerine en önemli etkiyi gerçekleştiren faktörün karışımın lineer etkisi olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Buna karşın b^* değerleri üzerine karışımın lineer etkisi istatistiksel olarak önemli etkiye sahip olsa da, en önemli etkiyi gerçekleştiren faktörün gam arabik-inülin interaksiyonu olduğu görülmüştür (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.12. Deneme desenine göre belirlenen renk değerleri

Deneme No	L^*	a^*	b^*	Deneme No	L^*	a^*	b^*
1	51.48 (±0.36)	10.91 (±0.20)	21.98 (±0.49)	21	54.20 (±0.64)	10.68 (±0.66)	24.36 (±1.10)
2	54.91 (±0.04)	13.34 (±0.04)	27.87 (±0.07)	22	49.73 (±1.36)	10.76 (±0.71)	22.80 (±1.08)
3	57.77 (±0.37)	12.02 (±0.09)	25.94 (±0.12)	23	60.92 (±0.14)	10.84 (±0.59)	25.17 (±1.07)
4	56.67 (±0.40)	9.39 (±0.04)	21.41 (±0.14)	24	67.61 (±0.32)	9.58 (±0.22)	23.40 (±0.53)
5	61.39 (±0.30)	11.36 (±0.08)	25.52 (±0.12)	25	51.87 (±0.27)	10.36 (±0.11)	21.86 (±0.11)
6	59.40 (±0.01)	12.10 (±0.04)	26.80 (±0.08)	26	59.27 (±0.82)	9.05 (±0.90)	21.29 (±1.46)
7	39.28 (±0.37)	10.79 (±0.16)	18.55 (±0.39)	27	53.36 (±1.62)	11.40 (±0.25)	25.07 (±0.51)
8	47.87 (±0.10)	9.30 (±0.04)	18.51 (±0.11)	28	50.65 (±0.37)	13.25 (±0.94)	27.57 (±1.31)
9	49.17 (±0.15)	9.51 (±0.07)	19.41 (±0.13)	29	47.63 (±0.79)	12.71 (±1.16)	26.16 (±2.01)
10	52.03 (±0.43)	11.50 (±0.18)	24.48 (±0.13)	30	53.91 (±0.08)	10.64 (±0.51)	23.53 (±0.88)
11	51.98 (±0.04)	10.03 (±0.02)	20.74 (±0.06)	31	69.97 (±0.59)	8.03 (±0.58)	20.53 (±0.90)
12	56.24 (±0.04)	10.58 (±0.04)	24.58 (±0.02)	32	49.83 (±0.78)	9.71 (±0.46)	21.12 (±0.99)
13	45.14 (±0.22)	9.61 (±0.06)	20.47 (±0.27)	33	52.79 (±1.90)	12.36 (±0.73)	26.38 (±1.36)
14	54.48 (±0.08)	9.17 (±0.05)	22.03 (±0.01)	34	50.94 (±1.35)	11.13 (±0.71)	23.91 (±1.27)
15	46.82 (±0.04)	12.98 (±0.05)	27.09 (±0.12)	35	65.17 (±1.27)	10.10 (±0.40)	24.79 (±0.82)
16	51.47 (±0.05)	7.95 (±0.06)	17.99 (±0.08)	36	61.85 (±1.06)	10.57 (±1.01)	24.86 (±1.59)
17	50.37 (±0.61)	9.97 (±0.20)	21.18 (±0.33)	37	36.87 (±18.60)	11.77 (±0.70)	24.83 (±1.30)
18	49.30 (±0.12)	9.58 (±0.04)	21.07 (±0.04)	38	58.32 (±2.60)	12.79 (±0.77)	27.79 (±3.72)
19	34.08 (±0.65)	14.71 (±0.30)	26.15 (±0.13)	39	50.53 (±1.59)	11.77 (±0.78)	25.48 (±1.26)
20	50.18 (±0.54)	12.29 (±0.09)	26.61 (±0.19)	40	50.21 (±0.99)	12.10 (±0.57)	25.29 (±0.95)

Çizelge 4.13. Renk değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	<i>L</i> *			<i>a</i> *			<i>b</i> *		
	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri
Model	1289.58	8	< 0.0001	74.55	23	0.0028	140.17	5	0.0004
Lineer Karışım	702.72	2	< 0.0001	29.49	2	< 0.0001	40.23	2	0.0202
C ₁ C ₂				0.16	1	0.6559	0.08	1	0.898
C ₁ C ₃				17.92	1	0.0002	90.25	1	< 0.0001
C ₁ X ₁	41.33	1	0.2128	2.93	1	0.0734	-		
C ₁ X ₂	2.21	1	0.7704	0.67	1	0.372			
C ₂ C ₃				11.42	1	0.0016	48.81	1	0.0025
C ₂ X ₁	0.23	1	0.9257	0.34	1	0.5224	-	-	-
C ₂ X ₂	148.95	1	0.0218	0.14	1	0.6773	-	-	-
C ₃ X ₁	9.47	1	0.5471	8.13	1	0.0057	-	-	-
C ₃ X ₂	435.41	1	0.0003	0.24	1	0.5938	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁	-	-	-	0.77	1	0.3414	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₂	-	-	-	0.23	1	0.6002	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁	-	-	-	8.39	1	0.0051	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₂	-	-	-	0.19	1	0.6354	-	-	-
C ₁ X ₁ X ₂	-	-	-	1.42	1	0.2011	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁	-	-	-	7.90	1	0.0062	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₂	-	-	-	5.39x10 ⁻⁴	1	0.9796	-	-	-
C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	0.51	1	0.4366	-	-	-
C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	0.77	1	0.3409	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	3.62	1	0.049	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	0.48	1	0.4514	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	0.37	1	0.507	-	-	-
Kalıntı	791.77	31	-	12.77	16	-	155.88	34	-
Model Uygunsuzluğu	672.40	26	0.5182	8.18	11	0.6435	120.33	29	0.837
Saf Hata	119.37	5	-	4.59	5	-	35.55	5	-
Toplam	2081.35	39	-	87.32	39	-	296.04	39	-

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)

4.2.6 UPRK ile mikroenkapsülasyon işleminin yağın özellikler üzerine etkisi

UPDK işlemi uygulanarak farklı koşullarda elde edilen toz ürünlerin yağın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu üzerine işlem değişkenlerinin etkileri belirlenmiş ve deneysel sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmiştir. Yağın yoğunluk değerlerinin ~153-453 kg/m³ aralığında değiştiği görülmüştür. Her iki nozul frekansında da gam arabik konsantrasyonunun artması ile yağın yoğunluk değerleri düşüş göstermiştir. Özellikle gam arabik konsantrasyonu %70'in üzerine çıktığında, partiküllerin topaklanması azalmış, partiküller arasındaki boşluklar artmış ve dolayısı ile yağın yoğunluk değerlerinde azalma görülmüştür. UPRK ile mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda elde edilen toz ürünlerin sıkıştırılmış yoğunluk değerleri ise ~276-754 kg/m³ aralığında değişmiştir. Özellikle yüksek besleme debilerinde gam arabik-inülin karışımlarının sıkıştırılmış yoğunluk değerini artırdığı, yağın yoğunluk değerlerine benzer şekilde %70'ten daha yüksek gam arabik konsantrasyonlarında sıkıştırılmış yoğunluk değerlerinin azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.14).

Yağın ve sıkıştırılmış yoğunluk toz ürünlerin önemli kalite kriterlerindedir ve düşük yağın yoğunluk değerleri, toz ürünlerin paketlenmesi sırasında daha büyük ambalaj kullanılmasına neden olduğundan arzu edilmemektedir (Barbosa-Cánovas ve ark., 2005; Kurozawa ve ark., 2009). Constantino ve ark. (2000), bovin serum albümini PDK ile kurularak toz ürün elde ettikleri çalışmada, sıkıştırılmış yoğunluk değerlerini 100-200 kg/m³ aralığında belirlemişler ve elde edilen bu düşük sıkıştırılmış yoğunluk değerlerini PDK sonrası elde edilen gözenekli yapı ile ilişkilendirmişlerdir.

Gerçekleştirilen çalışmada, UPRK ile mikroenkapsülasyon işleminde partikül yoğunluğu değerlerinin ~1304-1525 kg/m³ aralığında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.14). Özellikle kaplama materyallerinden inülin varlığında partikül yoğunluğu değerleri artış göstermiş, bu durum inülinin esnek yapısı nedeniyle enzim molekülleri ile oluşturduğu interaksiyon ile açıklanmıştır.

Çizelge 4.14. Deneme desenine göre belirlenen yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu

Deneme No	Yığın Yoğunluk (kg/m ³)	Sıkıştırılmış Yoğunluk (kg/m ³)	Partikül Yoğunluğu (kg/m ³)	Deneme No	Yığın yoğunluk (kg/m ³)	Sıkıştırılmış Yoğunluk (kg/m ³)	Partikül Yoğunluğu (kg/m ³)
1	360.3 (±0.1)	705.5 (±21.5)	1440.1 (±19.0)	21	194.4 (±0.3)	314.0 (±0.4)	1464.1 (±16.5)
2	189.2 (±5.7)	402.5 (±20.5)	1480.4 (±5.45)	22	389.1 (±1.6)	628.6 (±2.6)	1481.4 (±15.2)
3	269.0 (±1.2)	448.3 (±2.0)	1325.2 (±15.8)	23	177.8 (±0.4)	314.5 (±0.8)	1477.0 (±36.5)
4	217.0 (±2.4)	395.9 (±3.3)	1512.0 (±43.8)	24	160.8 (±1.5)	309.2 (±2.9)	1429.0 (±20.8)
5	185.7 (±4.1)	398.7 (±4.9)	1525.0 (±49.3)	25	340.9 (±1.8)	584.4 (±3.0)	1474.3 (±1.8)
6	224.5 (±3.7)	399.8 (±0.6)	1421.5 (±41.6)	26	287.9 (±0.8)	491.1 (±1.3)	1371.4 (±47.9)
7	367.8 (±4.1)	578.0 (±6.5)	1407.3 (±55.5)	27	161.3 (±0.4)	299.6 (±0.8)	1392.73 (±14.7)
8	392.0 (±13.2)	514.5 (±17.3)	1471.6 (±18.9)	28	347.0 (±1.2)	555.2 (±1.9)	1485.2 (±33.1)
9	333.3 (±1.4)	640.9 (±2.6)	1495.7 (±24.2)	29	366.0 (±1.5)	536.8 (±2.3)	1407.5 (±87.0)
10	320.1 (±2.7)	462.3 (±3.9)	1323.2 (±26.5)	30	259.3 (±2.6)	488.0 (±5.0)	1423.0 (±6.5)
11	387.1 (±0.9)	542.0 (±1.3)	1486.1 (±15.5)	31	160.4 (±1.1)	282.0 (±1.9)	1460.6 (±55.8)
12	189.0 (±1.3)	396.0 (±2.7)	1432.0 (±20.6)	32	332.4 (±2.4)	554.0 (±4.0)	1466.6 (±5.1)
13	377.2 (±1.2)	754.4 (±2.3)	1444.3 (±53.9)	33	292.8 (±0.3)	455.4 (±0.5)	1383.1 (±5.2)
14	357.7 (±2.0)	587.7 (±3.2)	1418.0 (±4.2)	34	153.4 (±0.3)	276.1 (±0.5)	1390.7 (±72.7)
15	343.2 (±1.4)	484.5 (±2.0)	1405.4 (±11.9)	35	286.6 (±0.7)	501.6 (±1.2)	1374.2 (±6.1)
16	345.8 (±1.9)	553.3 (±3.0)	1303.7 (±8.6)	36	165.2 (±0.5)	344.3 (±1.1)	1428.6 (±38.3)
17	452.9 (±1.6)	627.1 (±2.2)	1422.8 (±68.9)	37	307.0 (±1.4)	487.7 (±2.2)	1367.0 (±1.2)
18	326.4 (±1.1)	544.0 (±1.89)	1443.0 (±54.0)	38	412.9 (±1.8)	688.2 (±3.1)	1416.3 (±4.6)
19	327.7 (±3.2)	481.9 (±4.7)	1482.9 (±5.3)	39	398.1 (±3.0)	597.1 (±4.4)	1377.2 (±23.1)
20	393.5 (±0.5)	550.9 (±0.8)	1415.6 (±50.8)	40	393.0 (±0.00)	589.4 (±0.00)	1323.3 (±15.1)

Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA tablosu Çizelge 4.15'te verilmiştir. Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu için elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin tümünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlara göre yığın yoğunluk, sıkıştırılmış

yoğunluk ve partikül yoğunluğu açısından karışımın lineer etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yığın özellikleri kullanılarak elde edilen model uygunsuzluğu değerleri sıkıştırılmış yoğunluk ve partikül yoğunluğu için istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$), yığın yoğunluk için ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Besleme debisi etkisinin yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk için istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$), inülin-besleme debisi interaksyonu etkisinin ise partikül yoğunluğu için istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.15).



Çizelge 4.15. Yiğın özellikler üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	Yiğın yoğunluk			Sıkıştırılmış yoğunluk			Partikül yoğunluğu		
	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri
Model	283747.60	17	< 0.0001	542124.48	20	< 0.0001	94938.95	23	0.0066
Lineer Karışım	212722.51	2	< 0.0001	251831.67	2	< 0.0001	20136.87	2	0.0031
C ₁ C ₂	20181.21	1	< 0.0001	54061.03	1	< 0.0001	529.59	1	0.5141
C ₁ C ₃	28959.46	1	< 0.0001	34447.32	1	0.0002	26.11	1	0.8841
C ₁ X ₁	97.59	1	0.7015	468.92	1	0.606	228.07	1	0.6673
C ₁ X ₂	114.88	1	0.6776	3054.87	1	0.1965	3770.51	1	0.094
C ₂ C ₃	30289.91	1	< 0.0001	35872.91	1	0.0002	1309.45	1	0.3097
C ₂ X ₁	70.51	1	0.7444	6937.56	1	0.058	595.87	1	0.4893
C ₂ X ₂	8016.86	1	0.0019	750.44	1	0.515	3920.71	1	0.0882
C ₃ X ₁	783.38	1	0.2831	4733.04	1	0.1121	10107.91	1	0.0101
C ₃ X ₂	69.10	1	0.7469	9.96	1	0.9399	80.47	1	0.7981
C ₁ C ₂ C ₃	-	-	-	2699.94	1	0.2235	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁	1989.64	1	0.0934	11971.34	1	0.0158	1794.65	1	0.2371
C ₁ C ₂ X ₂	2265.74	1	0.0747	286.65	1	0.6864	10.96	1	0.9247
C ₁ C ₃ X ₁	916.60	1	0.2466	3994.40	1	0.1424	8563.18	1	0.0163
C ₁ C ₃ X ₂	173.61	1	0.6096	134.44	1	0.7819	1241.35	1	0.3222
C ₁ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	4916.65	1	0.059
C ₂ C ₃ X ₁	1818.89	1	0.1078	4343.50	1	0.127	10554.27	1	0.0089
C ₂ C ₃ X ₂	315.12	1	0.4926	171.54	1	0.7546	1391.77	1	0.2954
C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	6091.56	1	0.0379
C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	6963.38	1	0.0278
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	3399.27	1	0.1103
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	6430.47	1	0.0335
C ₁ C ₂ C ₃ X ₁	-	-	-	11343.33	1	0.0184	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₃ X ₂	-	-	-	1496.68	1	0.3606	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	14906.26	1	0.0027
Kalıntı	14234.68	22	-	32395.66	19	-	19032.55	16	-
Model Uygunsuzluğu	13472.69	17	0.0386	28136.30	14	0.1755	11632.5	11	0.7024
Saf Hata	761.99	5	-	4259.36	5	-	7400.047	5	-
Toplam	297982.28	39	-	574520.14	39	-	113971.5	39	-

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)

4.2.7 UPRK ile mikroenkapsülasyon işleminin porozite, akabilirlik ve kekleşme değerleri üzerine etkisi

UPDK işlemleri uygulanarak farklı koşullarda elde edilen toz ürünlerin porozite, kekleşme ve akabilirlik değerleri üzerine işlem değişkenlerinin etkileri belirlenmiştir. Porozite, kekleşme, Carr indeks (CI) ve Hausner oranı (HR) değerlerinin analiz sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Porozite değerleri ~%60-89 aralığında değişmiş, her iki nozul frekansında da inülin konsantrasyonunun azalması ile örneklerin porozite değerleri artış göstermiştir. İnülin konsantrasyonu %0 olduğunda, en yüksek porozite değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge 4.16). Kekkleşme değerlerinin ~%5-48 aralığında değiştiği belirlenmiş, her iki nozul frekansında da %70 gam arabik ve %30 inülin konsantrasyonunda kekkleşmenin en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. Kekkleşme, kurutma ile elde edilen toz ürünlerin işlenmesinde ve ambalajlanmasında önemli problemlerden biridir. Kekkleşme değeri yükseldikçe, toz ürünlerin işlenebilirliği zorlaşmakta ve ambalajlama aşamasında sorunlar yaşanabilmektedir (Koç ve ark., 2014). Mikroenkapsülasyon çalışmasında inülin kullanımının kekkleşme değerlerini düşürmesi bu kaplama materyali ile daha kolay ambalajlanabilir ürünlerin üretilebileceğini göstermektedir. Akabilirliğin bir ifadesi olan CI değerleri ~%47-81 aralığında değişmiştir (Çizelge 4.16). Tüm koşullarda elde edilen toz ürünlerin CI değerleri >40 olduğundan, akış özellikleri kötü olarak nitelendirilmiştir. Buna rağmen, inülin konsantrasyonunun artması ile akış özelliklerinin iyileştiği görülmektedir (Çizelge 4.16). Gam arabik konsantrasyonunun artması yığın yoğunluk değerlerini oldukça düşürerek toz ürünün akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemiştir. Akabilirliğin bir diğer ifadesi olan HR değerleri ise ~1.3-2.1 aralığında değişmiştir. HR değerlerine göre elde edilen tozların büyük çoğunluğunun akış özelliği çok zayıf olarak nitelendirilse de CI değerlerinde olduğu gibi inülin konsantrasyonunun artması ile akış özelliklerinin iyileştiği tespit edilmiştir. Özellikle her iki nozul frekansında da inülin konsantrasyonu %60 olduğu durumda akış özellikleri kabul edilebilir duruma gelmiştir. İnülin konsantrasyonu hiçbir koşulda ön denemeler ile belirlenen %60 değerinin üzerine çıkmadığından, çökme oluşumu en aza indirilerek fiziksel açıdan daha uygun toz ürünlerin üretimi sağlanmıştır.

Çizelge 4.16. Deneme desenine göre belirlenen porozite, kekleşme ve akabilirlik değerleri

Deneme No	Porozite (%)	Kekleşme (%)	CI (%)	HR	Deneme No	Porozite (%)	Kekleşme (%)	CI (%)	HR
1	74.98 (±0.32)	32.00 (±1.51)	51.01 (±0.85)	1.96 (±0.06)	21	86.72 (±0.17)	30.48 (±7.41)	78.55 (±0.27)	1.62 (±0.00)
2	87.22 (±0.34)	11.12 (±0.13)	72.81 (±1.29)	2.13 (±0.04)	22	73.73 (±0.38)	27.43 (±9.27)	57.56 (±0.61)	1.62 (±0.00)
3	79.70 (±0.15)	14.87 (±0.92)	66.17 (±0.25)	1.67 (±0.00)	23	87.96 (±0.27)	10.80 (±1.24)	78.70 (±0.48)	1.77 (±0.00)
4	85.64 (±0.58)	16.76 (±4.20)	73.81 (±0.54)	1.83 (±0.04)	24	88.75 (±0.27)	10.90 (±2.35)	78.36 (±0.52)	1.92 (±0.00)
5	87.82 (±0.12)	5.00 (±1.35)	73.84 (±1.17)	2.15 (±0.07)	25	76.88 (±0.15)	37.18 (±2.79)	60.36 (±0.25)	1.71 (±0.00)
6	84.20 (±0.72)	15.16 (±6.13)	71.86 (±0.86)	1.78 (±0.03)	26	79.00 (±0.79)	40.30 (±4.22)	64.17 (±1.35)	1.71 (±0.00)
7	73.85 (±0.74)	23.47 (±4.91)	58.91 (±1.16)	1.57 (±0.00)	27	88.42 (±0.15)	18.14 (±0.96)	78.49 (±0.29)	1.86 (±0.00)
8	73.35 (±1.24)	41.16 (±1.70)	65.03 (±1.63)	1.31 (±0.00)	28	76.63 (±0.60)	16.51 (±0.62)	62.61 (±0.96)	1.60 (±0.00)
9	77.72 (±0.27)	28.12 (±5.57)	57.15 (±0.52)	1.92 (±0.00)	29	73.95 (±1.50)	18.56 (±8.50)	61.79 (±2.20)	1.47 (±0.00)
10	75.81 (±0.28)	11.51 (±0.47)	65.06 (±0.40)	1.44 (±0.00)	30	81.78 (±0.27)	17.72 (±0.10)	65.71 (±0.51)	1.88 (±0.00)
11	73.95 (±0.21)	45.85 (±5.51)	63.53 (±0.29)	1.40 (±0.00)	31	89.01 (±0.35)	36.71 (±5.82)	80.68 (±0.61)	1.76 (±0.00)
12	86.80 (±0.10)	12.70 (±3.41)	72.34 (±0.21)	2.10 (±0.00)	32	77.34 (±0.08)	42.01 (±0.32)	62.23 (±0.14)	1.67 (±0.00)
13	73.86 (±1.06)	37.37 (±0.05)	47.73 (±2.11)	2.00 (±0.00)	33	78.83 (±0.10)	15.48 (±1.92)	67.07 (±0.16)	1.56 (±0.00)
14	74.77 (±0.21)	41.78 (±1.46)	58.55 (±0.35)	1.64 (±0.00)	34	88.96 (±0.56)	38.47 (±0.01)	80.12 (±1.01)	1.80 (±0.00)
15	75.58 (±0.31)	16.99 (±1.18)	65.53 (±0.43)	1.41 (±0.00)	35	79.14 (±0.04)	47.66 (±4.37)	63.50 (±0.07)	1.75 (±0.00)
16	73.47 (±0.03)	26.77 (±0.25)	57.56 (±0.05)	1.60 (±0.00)	36	88.43 (±0.27)	18.60 (±3.98)	75.90 (±0.57)	2.08 (±0.00)
17	68.13 (±1.43)	23.38 (±0.36)	55.88 (±1.98)	1.38 (±0.00)	37	77.54 (±0.12)	9.08 (±0.77)	64.33 (±0.19)	1.59 (±0.00)
18	77.36 (±0.92)	31.79 (±5.22)	62.27 (±1.54)	1.67 (±0.00)	38	70.85 (±0.03)	18.09 (±2.14)	51.41 (±0.06)	1.67 (±0.00)
19	77.90 (±0.29)	20.23 (±2.87)	67.50 (±0.43)	1.47 (±0.00)	39	71.09 (±0.27)	16.46 (±3.27)	56.64 (±0.40)	1.50 (±0.00)
20	72.18 (±0.96)	21.29 (±0.14)	61.06 (±1.35)	1.40 (±0.00)	40	70.30 (±0.34)	14.45 (±0.30)	55.45 (±0.51)	1.50 (±0.00)

Porozite, kekleşme, CI ve HR değerleri üzerine lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA tablosu ise Çizelge 4.17'de verilmiştir. Porozite, kekleşme, CI ve HR değerleri için elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan modellerin tümünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca porozite, kekleşme, CI ve HR değerleri üzerine karışımın lineer etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Model uygunsuzluğu, tüm özellikler için

istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). Nozul frekansının porozite, kekleşme, CI ve HR değerleri üzerine etkisinin önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Ayrıca gam arabik-inülin interaksiyonunun kekleşme ve CI değerlerinde oldukça önemli düzeyde etkiye sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). HR üzerine istatistiksel olarak önemli tek etki kaplama materyallerinin lineer etkisidir. Bunun dışında besleme debisinin, nozul frekansının ve herhangi bir interaksiyonun etkili olmadığı bulgulanmıştır (Çizelge 4.17).



Çizelge 4.17. Porozite, kekleşme ve akabilirlik üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	Porozite			Kekleşme			CI			HR		
	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri
Model	1491.00	20	< 0.0001	4992.45	29	0.0023	2733.56	20	< 0.0001	1.11	2	< 0.0001
Lineer Karışım	1166.90	2	< 0.0001	2573.69	2	< 0.0001	1467.26	2	< 0.0001	1.11	2	< 0.0001
C ₁ C ₂	103.20	1	< 0.0001	329.03	1	0.0064	259.47	1	< 0.0001	-	-	-
C ₁ C ₃	11.53	1	0.0425	660.45	1	0.0007	126.09	1	0.0012	-	-	-
C ₁ X ₁	0.14	1	0.8118	1.45	1	0.8242	2.71	1	0.5846	-	-	-
C ₁ X ₂	0.01	1	0.9404	4.55	1	0.6951	8.14	1	0.3473	-	-	-
C ₂ C ₃	10.47	1	0.0521	473.18	1	0.0021	123.46	1	0.0013	-	-	-
C ₂ X ₁	0.12	1	0.824	1.13	1	0.845	26.46	1	0.0985	-	-	-
C ₂ X ₂	27.90	1	0.0031	1.87	1	0.8012	0.14	1	0.9007	-	-	-
C ₃ X ₁	0.01	1	0.9598	41.08	1	0.2534	19.05	1	0.1568	-	-	-
C ₃ X ₂	2.57	1	0.3179	40.03	1	0.2592	0.42	1	0.8297	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₃	16.54	1	0.0174	-	-	-	28.28	1	0.0884	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁	10.46	1	0.0522	217.11	1	0.0193	44.94	1	0.0354	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₂	11.73	1	0.0409	21.36	1	0.4027	1.27	1	0.7079	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁	0.04	1	0.9007	37.38	1	0.2745	14.84	1	0.2086	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₂	4.96	1	0.1698	95.44	1	0.0945	0.82	1	0.7628	-	-	-
C ₁ X ₁ X ₂	-	-	-	81.69	1	0.1183	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁	0.10	1	0.8382	32.16	1	0.3088	17.60	1	0.1726	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₂	0.82	1	0.5688	50.53	1	0.2086	1.10	1	0.7272	-	-	-
C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	2.59	1	0.767	-	-	-	-	-	-
C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	6.16	1	0.649	-	-	-	-	-	-
C ₁ X ₁ ²	-	-	-	45.14	1	0.2327	-	-	-	-	-	-
C ₂ X ₁ ²	-	-	-	59.10	1	0.1767	-	-	-	-	-	-
C ₃ X ₁ ²	-	-	-	179.35	1	0.0298	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₃ X ₁	0.21	1	0.7702	-	-	-	35.99	1	0.057	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₃ X ₂	5.44	1	0.1516	-	-	-	5.56	1	0.4356	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	-	-	-	3.66	1	0.725	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	3.56	1	0.7286	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	-	-	-	6.83	1	0.6319	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ X ₁ ²	-	-	-	287.34	1	0.0094	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ ²	-	-	-	156.08	1	0.0398	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ ²	-	-	-	218.02	1	0.0191	-	-	-	-	-	-
Kalıntı	46.33	19	-	279.72	1	-	166.50	19	-	0.78	37	-
Model Uygunsuzluğu	38.16	14	0.2983	158.39	5	0.3885	146.40	14	0.1488	0.75	32	0.0919
Saf Hata	8.16	5	-	121.33	5	-	20.11	5	-	0.04	5	-
Toplam	1537.33	39	-	5272.16	39	-	2900.06	39	-	1.90	39	-

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)

4.2.8 UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminin yeniden yapılandırma (rekonstitüsyon) özellikleri üzerine etkisi

UPDK işlemi uygulanarak farklı koşullarda elde edilen toz mikroenkapsüle ürünlerin dağılılırlık, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerleri belirlenmiş, işlem değişkenlerinin bu değerler üzerine etkisi tespit edilmiştir. Dağılılırlık, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerlerinin analiz sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Deneme desenine göre belirlenen dağılılırlık, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerleri

Deneme No	Dağılılırlık (%)	Çözünebilirlik (%)	Islanabilirlik (s)	Deneme No	Dağılılırlık (%)	Çözünebilirlik (%)	Islanabilirlik (s)
1	98.60 (±0.31)	96.20 (±0.46)	9.75 (±0.35)	21	99.38 (±0.26)	96.43 (±0.26)	3.55 (±0.35)
2	98.83 (±0.74)	96.15 (±0.11)	4.70 (±0.57)	22	95.60 (±1.62)	96.51 (±0.06)	4.70 (±0.57)
3	99.27 (±0.36)	96.32 (±0.18)	7.10 (±1.13)	23	99.18 (±0.14)	96.39 (±0.27)	6.10 (±0.42)
4	99.63 (±0.39)	96.01 (±0.02)	5.85 (±0.78)	24	99.13 (±0.12)	96.20 (±0.46)	3.95 (±0.21)
5	99.42 (±0.29)	96.47 (±0.13)	5.45 (±0.21)	25	77.12 (±3.97)	96.27 (±0.27)	6.30 (±0.28)
6	99.53 (±0.15)	96.30 (±0.08)	5.30 (±0.57)	26	97.21 (±3.58)	96.31 (±0.02)	6.60 (±0.28)
7	99.36 (±0.41)	96.77 (±0.85)	8.15 (±0.49)	27	99.44 (±0.32)	96.01 (±0.12)	4.05 (±0.07)
8	71.55 (±10.61)	96.15 (±0.47)	6.40 (±0.85)	28	99.39 (±0.42)	96.10 (±0.07)	4.95 (±0.07)
9	90.59 (±5.20)	95.24 (±0.83)	4.25 (±1.20)	29	99.58 (±0.20)	97.64 (±1.57)	4.90 (±0.28)
10	99.38 (±0.41)	96.38 (±0.12)	3.50 (±0.85)	30	99.52 (±0.18)	95.75 (±0.23)	6.25 (±0.21)
11	81.09 (±3.52)	96.29 (±0.10)	6.15 (±1.06)	31	99.08 (±0.76)	96.57 (±0.06)	4.30 (±0.14)
12	98.95 (±0.57)	96.31 (±0.24)	4.50 (±0.28)	32	87.87 (±2.19)	95.98 (±0.32)	6.60 (±0.42)
13	90.65 (±3.66)	95.79 (±0.27)	8.35 (±0.21)	33	99.29 (±0.22)	96.34 (±0.06)	3.15 (±0.21)
14	88.65 (±4.30)	95.42 (±0.08)	5.55 (±0.35)	34	98.95 (±0.50)	95.75 (±0.16)	4.20 (±0.28)
15	95.77 (±0.46)	95.53 (±0.38)	6.60 (±0.42)	35	99.68 (±0.38)	95.65 (±0.61)	6.45 (±0.07)
16	87.42 (±0.26)	95.75 (±0.15)	7.10 (±0.42)	36	98.97 (±0.18)	96.49 (±0.12)	6.35 (±0.35)
17	92.62 (±1.94)	96.38 (±0.58)	5.25 (±0.49)	37	98.89 (±0.44)	96.14 (±0.44)	7.50 (±0.14)
18	98.93 (±0.49)	96.28 (±0.31)	8.60 (±0.28)	38	99.34 (±0.43)	97.47 (±1.07)	4.70 (±0.28)
19	98.50 (±1.57)	96.31 (±0.82)	7.20 (±0.14)	39	98.70 (±0.89)	96.59 (±0.56)	4.40 (±0.28)
20	99.17 (±0.34)	96.34 (±0.51)	5.70 (±0.28)	40	99.45 (±0.56)	96.67 (±0.35)	4.60 (±0.28)

Dağılılabirlik deęerlerinin ~%72-100 aralıęında deęiřtięi belirlenmiřtir. 48 kHz nozul frekansında, besleme debisinin daęılabirlięi etkilemedięi, en dūřuk daęılabirlik deęerinin %70 gam arabik-%30 inūlin konsantrasyonunda elde edildięi tespit edilmiřtir. 120 kHz nozulda ise, inūlin konsantrasyonunun en yūksək olduęu durumda (%60) besleme debisinin merkez noktasında daęılabirlik deęeri daha dūřuk bulunmuřtur. 120 kHz nozulda elde edilen daha kūçük partikūllerin topaklanma oluřumunu artırarak daęılabirlik deęerlerinin azalmasına neden olduęu dūřūnūlmektedir. UPDK ile mikroenkapsūlasyon iřlemi ile elde edilen toz ūrūnlerin zūnebilirlik deęerleri ise %95-98 aralıęında deęiřmiřtir (izelge 4.18). 48 kHz nozul frekansında iřlem kořullarının zūnebilirlik deęerini önemli derecede etkilemedięi gōrūlmüřtūr. 120 kHz nozul frekansında ise, zūnebilirlik deęerini etkileyen en önemli faktōrūn gam arabik-inūlin interaksiyonu olduęu belirlenmiřtir. Kullanılan tūm kaplama materyallerinin sahip olduęu yūksək zūnūrlük ve uygulanan PDK iřleminin partikūl boyutunu dūřūrūcū etkisi zūnebilirlik deęerlerini olumlu yōnde etkilemiřtir. İslanabilirlik deęerlerinin ise 3.2-10.0 saniye aralıęında deęiřtięi belirlenmiřtir (izelge 4.18). Her iki nozul frekansında da, artan gam arabik konsantrasyonu ile birlikte ıslanabilirlik sūresinin arttıęı gōrūlmüřtūr. Fernandes ve ark. (2016), GPK iřleminde inūlin konsantrasyonunun 3 kat artırılması ile ıslanabilirlik deęerlerinin yaklařık olarak 3 kat azaldıęını belirlemiřlerdir. Benzer řekilde, UPDK ile mikroenkapsūlasyon iřleminde kaplama materyallerinden inūlin, ıslanabilirlik deęerlerinin azalmasına neden olmuřtur.

Dağılılabirlik, zūnebilirlik ve ıslanabilirlik deęerleri ūzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gōsteren ANOVA izelgesi izelge 4.19'da verilmiřtir. Dağılılabirlik, zūnebilirlik ve ıslanabilirlik deęerleri iin elde edilen deneysel veriler ile oluřturulan modellerin istatistiksel olarak anlamlı olduęu belirlenmiřtir ($p<0.05$). Ayrıca daęılabirlik deęerleri ūzerine karıřımın lineer etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$), ıslanabilirlik ve zūnebilirlik deęerleri iin ise karıřımın lineer etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuřtur ($p>0.05$). Model uygunsuzluęunun, tūm yeniden yapılandırma özellikleri iin istatistiksel olarak önemsiz olduęu belirlenmiřtir ($p>0.05$). zūnebilirlik ūzerine karıřımın lineer etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmaması zūnebilirlik deęerlerinin tūm kořullarda olduęu iyi olması ve bu deęerlerin ok dar bir aralıkta deęiřmesi ile aıklanmıřtır.

Çizelge 4.19. Dağılılabirlik, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik değerleri üzerine lineer ve interaksiyon terimlerinin bireysel olarak etkisini gösteren ANOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	Dağılılabirlik			Çözünebilirlik			Islanabilirlik		
	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri	Kareler Toplamı	SD	<i>p</i> -değeri
Model	1494.66	23	0.0017	2.21	5	0.0467	5.00	1	0.0427
Lineer Karışım	461.54	2	0.0002	0.72	2	0.1431	0.12	1	0.7403
C ₁ C ₂	211.43	1	0.0016	0.07	1	0.5284	3.42	1	0.0882
C ₁ C ₃	221.54	1	0.0013	1.29	1	0.0103	0.57	1	0.4720
C ₁ X ₁	4.48 x10 ⁻³	1	0.9863	-	-	-	0.77	1	0.4055
C ₁ X ₂	2.42	1	0.6898	-	-	-	0.33	1	0.5829
C ₂ C ₃	96.88	1	0.0205	0.60	1	0.0717	0.26	1	0.6257
C ₂ X ₁	2.18	1	0.705	-	-	-	1.00	1	0.3437
C ₂ X ₂	172.68	1	0.0034	-	-	-	1.13	1	0.3154
C ₃ X ₁	13.38	1	0.3537	-	-	-	5.00	1	0.0427
C ₃ X ₂	0.28	1	0.8918	-	-	-	0.12	1	0.7403
C ₁ C ₂ C ₃	-	-	-	-	-	-	9.77	1	0.0068
C ₁ C ₂ X ₁	9.44 x10 ⁻³	1	0.998	-	-	-	1.46	1	0.2546
C ₁ C ₂ X ₂	8.71	1	0.4521	-	-	-	0.00	1	0.9936
C ₁ C ₃ X ₁	18.98	1	0.272	-	-	-	1.17	1	0.3069
C ₁ C ₃ X ₂	9.42 x10 ⁻⁴	1	0.9937	-	-	-	0.43	1	0.5320
C ₁ X ₁ X ₂	0.09	1	0.938	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁	14.22	1	0.3395	-	-	-	1.18	1	0.3054
C ₂ C ₃ X ₂	0.03	1	0.9643	-	-	-	0.91	1	0.3659
C ₂ X ₁ X ₂	349.06	1	0.0002	-	-	-	-	-	-
C ₃ X ₁ X ₂	47.39	1	0.0911	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₂ C ₁ X ₁	-	-	-	-	-	-	1.55	1	0.2411
C ₁ C ₂ C ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	3.34	1	0.0916
C ₁ C ₂ X ₁ X ₂	79.66	1	0.0332	-	-	-	-	-	-
C ₁ C ₃ X ₁ X ₂	48.75	1	0.087	-	-	-	-	-	-
C ₂ C ₃ X ₁ X ₂	18.48	1	0.2781	-	-	-	-	-	-
Kalıntı	234.59	16	-	5.93	34	-	20.13	19	-
Model	230.54	11	0.0011	5.15	29	0.4857	11.94	14	0.8454
Uygunsuzluğu	4.06	5	-	0.77	5	-	8.19	5	-
Saf Hata	4.06	5	-	0.77	5	-	8.19	5	-
Toplam	1729.25	39	-	8.14	39	-	89.22	39	-

C₁: Gam arabik (%), C₂: Maltodekstrin (%), C₃: İnülin (%), X₁: Besleme debisi (ml/dak), X₂: Nozul frekansı (kHz)

4.3 Optimizasyon

mTG enziminin UPDK ile mikroenkapsülasyonu çalışmasında, kalan aktivite değerinin maksimum olduğu koşul optimum nokta olarak seçilmiştir. D-optimal birleşik dizayn deneme desenine göre yapılan diğer analiz sonuçları (yüksek sıcaklık, pH, metal iyonları ve EDTA'nın etkisi ile fiziksel özellikler) optimizasyon çalışmasına ve modele dahil edilmemiştir. Seçilen yanıtın (kalan aktivite) mikroenkapsüle enzimin kalitesini etkileyen en önemli parametre olduğu düşünülmüş ve mikroenkapsülasyon işleminin verimi olarak ifade edilmiştir.

Optimizasyon çalışmasında gam arabik ve maltodekstrin oranı %0-100, inülin oranı %0-60, besleme debisi 2-8 ml/dak aralığında ve nozul frekansı ise 48 kHz ve 120 kHz olarak seçilmiştir (Çizelge 3.4). Design Expert 7.0 paket programı kullanılarak "desirability" fonksiyonu yaklaşımı ile optimum nokta için birbirine yakın 18 çözüm hesaplanmıştır. Çizelge 4.20'de optimum noktayı veren 3 çözüm görülmektedir. Optimum nokta olarak, programın belirlediği bu çözümlerden, birinci çözümde elde edilen faktör seviyeleri seçilmiştir. Bu noktada faktör seviyeleri, gam arabik oranı %40, inülin oranı %60, besleme debisi 6.83 ml/dak ve nozul frekansı 48 kHz olarak hesaplanmıştır. Optimum noktada tahminlenen kalan aktivite değerinin ise %96.62 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. Desirability fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenen optimum noktayı veren üç çözüm

No	Besleme debisi (ml/dak)	Nozul frekansı (kHz)	Gam arabik (%)	Maltodekstrin (%)	İnülin (%)	Kalan aktivite (%)	Desirability
1	6.83	48	40	0	60	96.619	0.955
2	6.86	48	40	0	60	96.617	0.955
3	6.77	48	40	0	60	96.614	0.954

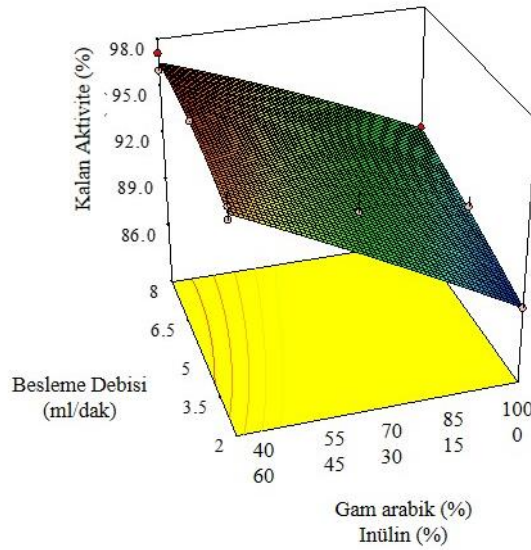
Optimum nokta sonuçlarının deneysel olarak doğrulanması için belirlenen matematiksel optimum noktada, gam arabik oranı %40, inülin oranı %60, besleme debisi 6.83 ml/dak ve nozul frekansı 48 kHz koşullarında mikroenkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen üç doğrulama denemesi sonucunda, optimum noktada elde edilen deneysel kalan aktivite değeri %96.96 (± 0.48) olarak belirlenmiştir.

Kalan aktivite için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama deneysel sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t-testi uygulanarak belirlenmiştir. Tahminlenen ve deneysel kalan aktivite için tek örnek t-testi sonuçları Çizelge 4.21’de verilmiştir. Kalan aktivite için doğrulama denemelerinden elde edilen sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.21. Modelden tahminlenen ve deneysel kalan aktivite değerleri için tek örnek t-testi sonuçları

Yanıt	Tahminlenen değer (%)	Deneysel değer (%)	Standart Hata	<i>p</i> -değeri
Kalan Aktivite (%)	96.62	96.96 (± 0.48)	0.342	0.425

Optimum noktada bağımsız işlem değişkenlerinin kalan aktivite üzerindeki etkilerinin görsel olarak belirlenmesi yanıt yüzey grafiği ile gerçekleştirilmiştir. Maltodekstrin konsantrasyonunun sabit (%0) olduğu durumda, kalan aktivite değerleri için 48 kHz nozul frekansı kullanıldığında elde edilen yanıt yüzey grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Kalan aktivite değerini etkileyen en önemli faktörün lineer karşımın etkisi olduğu Çizelge 4.5’te belirtildiği gibi yanıt yüzey grafiğinde de görülmüştür. İnülin konsantrasyonunun belirlenen sınırlar içerisinde en yüksek oranda kullanılması (%60), en yüksek kalan aktivite değerlerinin elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 4.8. 48 kHz nozul frekansında kalan aktivite (%) için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi

4.4 Optimum Noktada Elde Edilen Örneklerin Karşılaştırılması

4.4.1 Kalan aktivite açısından karşılaştırılması

UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda belirlenen optimum kaplama materyali koşulunda (%40 gam arabik, %60 inülin), hazırlanan örnekler GDK ve GPK yöntemleri ile mikroenkapsüle edilmiş ve bu farklı yöntemler kalan aktivite açısından karşılaştırılmıştır. Ayrıca mikroenkapsülasyon işleminin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kaplama materyalleri kullanılmaksızın yalnız enzim UPDK işlemi ile kurutulmuş ve bu örnekler UPDK-YE olarak adlandırılmıştır. UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK ile elde edilen mikroenkapsüle örnekler için kalan aktivite değerleri Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.22. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle elde edilen elde edilen mikroenkapsüle örneklerin kalan aktivite değerleri

Örnek	Kalan aktivite (%)
UPDK-YE	65.08 (± 0.18) ^a
UPDK	96.96 (± 0.48) ^b
GDK	79.26 (± 0.14) ^c
GPK	73.09 (± 0.29) ^d

^{a-d} Farklı üst simgeye sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).

Farklı yöntemlerle elde edilen örneklerin kalan aktivite değerleri incelendiğinde, en yüksek kalan aktivite değerinin UPDK yöntemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerde olduğu görülmüştür. Mikroenkapsüle örneklerde kalan aktivite değerleri UPDK>GDK>GPK olarak sıralanmış, optimum işlem koşullarında (besleme debisi: 6.83 ml/dak ve nozul frekansı: 48 kHz) üretilen UPDK-YE örneğinde ise kalan aktivite değeri tüm mikroenkapsüle örneklerden daha düşük olarak bulunmuştur (Çizelge 4.22). Bu durum, mikroenkapsülasyon işleminin enzim aktivitesi üzerindeki koruyucu etkisini ortaya koymuştur. Kaplama materyallerinin ortamda bulunması, farklı yöntemler kullanılsa dahi aktivite kaybını azaltmıştır.

Mikroenkapsülasyon işleminin aktivitenin korunumunda önemli bir etkisi olmasının yanında, farklı mikroenkapsülasyon yöntemlerinin enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). GDK işleminde

donma aşamasının UPDK işlemine göre çok daha uzun sürmesi, enzimin maruz kaldığı donma stresini artırarak kalan aktivite değerlerinin UPDK işlemine göre daha düşük belirlenmesine neden olmuştur. Ayrıca, GDK işleminde yavaş donma sırasında oluşan büyük buz kristallerinin (UPDK işlemine kıyasla) süblimasyonunun enzim moleküllerine zarar vererek kalan aktivite değerlerinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Ishwarya ve ark., 2015). Drooge ve ark. (2005), PDK ve GDK işlemleri ile solunum sitemlerinde kullanılabilmesi amacı ile kaplama materyali olarak inülin kullanarak toz formda tetrahidrokannabinol (THC) ürettikleri çalışmada, PDK işlemi ile GDK işlemine göre daha stabil formda THC elde ettiklerini belirtmişlerdir.

GPK işleminde, kalan aktivite değerlerinin hem UPDK hem de GDK işlemlerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.22). Aynı kaplama materyalleri oranı ve aynı besleme debisi kullanılmasına rağmen GPK işlemi sonucunda enzim aktivitesindeki düşüşün daha fazla olması bu işlemin yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesi ile açıklanmıştır. Nitekim ısı duyarlılığı yüksek olan biyolojik materyallerin kurutulmasında GDK yönteminin GPK yöntemine göre daha avantajlı olduğu farklı kaynaklarda bildirilmiştir (Ratti, 2001; Mujumdar, 2014). Ortamda kaplama materyalleri bulunmasına rağmen, kalan aktivite değeri UPDK-YE örneklerine en yakın örnekler GPK ile elde edilmiştir. UPDK, GDK ve GPK yöntemlerini mikroenkapsülasyon verimi açısından karşılaştıran çalışmalar oldukça kısıtlı olmakla birlikte, elde edilen sonuçların literatürde yer alan sınırlı sayıdaki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Karthik ve Anandharamakrishnan, 2013; Ishwarya ve Anandharamakrishnan, 2015; Parthasarathi ve Anandharamakrishnan, 2016).

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK yöntemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta kalan aktivite değerleri de karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.23). Elde edilen sonuçlara göre, reaksiyon ortam pH değerinin 3.0 olduğu koşullar ile aktivite tayini 80°C sıcaklıkta gerçekleştirildiğinde en yüksek kalan aktivite değerine sahip örneklerin UPDK ile elde edilen mikroenkapsüle örnekler olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ortam pH değeri 8.0 olduğunda ise izoelektrik noktaya yaklaşılması nedeniyle, mikroenkapsüle ürünlerde aktivite düşüşleri arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak, UPDK-YE örneklerine göre kalan aktivite

Çizelge 4.23. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen enzim örneklerinin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta kalan aktivite (%) değerleri

Örnek	pH 3.0	pH 8.0	80°C
UPDK-YE	74.93 (±0.47) ^a	35.20 (±0.06) ^a	12.59 (±0.03) ^a
UPDK	88.00 (±0.60) ^b	49.51 (±0.74) ^b	18.26 (±0.56) ^b
GDK	84.59 (±0.78) ^c	49.95 (±2.88) ^b	16.40 (±0.10) ^c
GPk	76.19 (±0.87) ^a	45.91 (±0.73) ^b	13.03 (±0.13) ^a

^{a-d} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

değerlerinin yüksek olması kaplama materyallerinin enzim moleküllerini koruması ile açıklanmıştır.

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPk yöntemleriyle mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında kalan aktivite değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.24). Ortamda EDTA bulunduğu tüm örneklerde kalan aktivite değerleri %100'ün üzerinde bulunmuştur. UPDK-YE örneklerinin herhangi bir kaplama materyali içermemesi, EDTA'nın şelatlaştırıcı etkisini mikroenkapsüle örneklere oranla daha iyi göstermesine neden olmuş ve en yüksek aktivite değerleri UPDK-YE örnekleri için elde edilmiştir ($p<0.05$).

Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} iyonları enzim aktivitesi ölçüm ortamında bulunduğu, tüm örneklerde aktivitenin azaldığı belirlenmiş, Zn^{+2} iyonu varlığında ise tüm örneklerde enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.24). Ca^{+2} iyonu aktivite değerlerinin düşmesine neden olsa da, tüm örnekler için kalan aktivite değerlerinin %80'in üzerinde olduğu bulgulanmıştır. Bu durum, Ca^{+2} iyonu ile kolayca çöktürülebilen proteinleri (kazein, soya proteinleri ve miyosin) içeren gıdaların modifikasyonunda, özellikle mikroenkapsüle mTG örneklerinin kolaylıkla kullanılabilceğini göstermiştir.

Çizelge 4.24. UPDK-YE ile farklı yöntemlerle elde edilen mikroenkapsüle örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında kalan aktivite (%) değerleri

Örnek	EDTA	Fe^{+2}	Ca^{+2}	Co^{+2}
UPDK-YE	114.36 (±1.16) ^a	43.98 (±0.40) ^a	84.84 (±0.47) ^{ab}	57.60 (±0.07) ^a
UPDK	107.72 (±0.28) ^b	68.38 (±2.21) ^b	87.37 (±1.25) ^c	57.66 (±0.49) ^a
GDK	110.05 (±0.45) ^c	60.87 (±0.08) ^c	82.85 (±0.10) ^a	53.17 (±0.57) ^b
GPk	111.40 (±0.33) ^c	43.38 (±0.40) ^a	86.26 (±0.13) ^{bc}	50.18 (±0.47) ^c

* Zn^{+2} iyonu varlığında hiçbir koşulda aktivite elde edilememiştir.

^{a-d} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

4.4.2 Fiziksel özellikler açısından karşılaştırılması

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK yöntemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler fiziksel ve yeniden yapılandırma özellikleri (nem, su aktivitesi, renk, yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, porozite, kekleşme, akabilirlik dağılıbilirlik, çözünabilirlik, ıslanabilirlik) bakımından karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.25).

Farklı örnekler için nem içeriği ve a_w değerleri incelendiğinde, yüksek sıcaklık uygulamasına bağlı olarak en düşük değerler GPK örneklerinde belirlenmiştir. Tüm örneklerin nem içeriği ve a_w değerlerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). UPDK işleminde nükleasyon hızının artması ile küçük buz kristalleri oluşmuş ve küçük buz kristallerine sahip damlacıklar ısı ve kütle transfer katsayılarını artırarak kurutma işlemi sonunda daha düşük nem içeriği elde edilmesini sağlamışlardır. UPDK ile elde edilen örneklerin GDK örneklerine oranla daha düşük nem içeriğine sahip olması, UPDK işlemi ile daha kısa kurutma süreleri uygulanabileceğinin ve dolayısı ile UPDK işleminin daha ekonojik bir yöntem olacağını ifade eder. Karthik ve Anandharamakrishnan (2013), dokosaheksaeniok asidin PDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, nem değerlerini sırasıyla %3.7, 5.5 ve 2.4 olarak belirlemişlerdir. Buna karşın, Parthasarathi ve Anandharamakrishnan (2016), E vitamininin PDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada nem değerlerini sırasıyla %5.4, 7.2 ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Ishwarya ve Anandharamakrishnan (2015), toz kahve üretimini PDK, GDK ve GPK işlemleri ile gerçekleştirmiş, en düşük nem içeriği değerlerinin GPK, en yüksek nem değerlerinin ise GDK yöntemi ile elde edildiğini bildirmişlerdir.

Farklı örneklerin renk değerleri incelendiğinde, parlaklığı ifade eden L^* değerlerinin en yüksek GPK örneğinde, en düşük GDK örneğinde elde edildiği bulgulanmıştır. Ayrıca, UPDK örneklerinin L^* değerleri GDK örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, UPDK işleminde oldukça yüksek hızda donma sonucunda oluşan küçük buz kristallerinin süblimasyonla uzaklaştırılması ile elde edilen küçük boyutlu gözeneklerin, GDK işleminde yavaş donma sonucunda elde edilen daha büyük gözeneklere oranla ışığı daha iyi dağıtması ile açıklanabilir (Ceballos ve ark., 2012). a^* ve b^* değerlerine bakıldığında, en yüksek değerlere sahip ürünler UPDK işlemi ile elde edilmiştir.

Özellikle GDK işleminde a^* ve b^* değerlerinin diğer örneklere oranla daha düşük olduğu bulgulanmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.25). Genel olarak, daha geniş partikül boyutu dağılımının materyallerin ışık geçirgenliğini etkilemesi, renk gücünün azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Heinrich, 2003). Çalışmada elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir.

Yığın yoğunluk değerlerine bakıldığında, en yüksek değerler UPDK ve GDK değerlerinde, en düşük değerler ise UPDK-YE ve GPK örneklerinde elde edilmiştir (Çizelge 4.25). UPDK-YE ve GPK örneklerinin düşük yığın yoğunluk değerlerinin UPDK ve GDK örneklerine oranla daha küçük partikül boyutuna sahip olmaları ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Sıkıştırılmış yoğunluk değerleri incelendiğinde, yığın yoğunluk değerlerine benzer şekilde en yüksek değerler UPDK ve GDK örneklerinde, en düşük değerler ise UPDK-YE ve GPK örneklerinde elde edilmiştir. Bu durum, UPDK ve GDK örneklerinin aynı miktarda UPDK-YE ve GPK örneklerine oranla daha küçük ambalajlarda saklanabileceğini ifade etmektedir. Partikül yoğunluğu değerleri tüm örnekler için birbirine yakın değerlerde bulunmasına rağmen, UPDK ve GDK işlemleri ile elde edilen örneklerin partikül yoğunlukları UPDK-YE ve GPK örneklerine göre daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Yapılan çalışmada UPDK ve GDK örneklerinin porozite değerleri birbirine yakın bulunmuş, en yüksek porozite değerleri ise UPDK-YE ve GPK örneklerinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.25). Kekleşme değerleri ise UPDK-YE, UPDK ve GDK örneklerinde düşük iken, GPK işlemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerde kekleşme değerleri %70'in üzerinde belirlenmiştir. GPK işlemi ile oldukça küçük boyuta sahip partiküllerin birleşerek meydana getirdiği topaklanma, GPK örneklerinde kekleşme değerlerinin yükselmesine neden olmuştur. Tüm örneklerin CI değerleri incelendiğinde, akış özellikleri çok kötü olarak nitelendirilirken, HR değerlerine göre UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin orta düzeyde akabilirlik değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Farklı örnekler için dağılıbilirlik değerleri incelendiğinde, UPDK-YE örneklerinin diğer örneklere göre daha yüksek dağılıbilirlik yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin daha düşük dağılıbilirlik değeri, ortamda bulunan kaplama materyallerinin enzim moleküllerini sarması nedeniyle oluşan daha sıkı yapı ile açıklanabilir. Çözünürlük değerleri ise tüm örneklerde %95'in üzerinde bulunmuştur. Kullanılan kaplama materyallerinin ve mTG

enziminin sudaki çözünürlüğünün iyi olması, tüm koşullarda elde edilen çözünürlük değerlerinin oldukça yüksek olmasını sağlamıştır. Islanabilirlik değerlerine bakıldığında, UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin diğer örneklere oranla oldukça hızlı bir şekilde ıslanabildiği belirlenmiştir. GPK işlemi ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örneklerinde elde edilen yüksek ıslanabilirlik değerleri ise, küçük partiküllerin bir araya gelerek oluşturdukları aglomeratların topaklanma oluşumunu artırması ve bireysel partiküllerin su ile temasının gecikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Çizelge 4.25. UPRK-VE ile farklı yöntemlerle elde edilen mikroenkapsüle örneklerin fiziksel özellikleri

Örnek	YY (kg/m ³)	SY (kg/m ³)	PY (kg/m ³)	L*	a*	b*	Porozite (%)	Kekleşme (%)	CI (%)	HR	Nem (%)	a _w	Dağılılılık (%)	Çözünürlük (%)	Islanabilirlik (s)
UPDK-	434.1	555.5	1454.8	56.3	11.7	26.8	70.2	34.5	61.8	1.28	4.94	0.199	97.6	95.5	14.0
YE	(±2.9) ^a	(±8.2) ^a	(±2.4) ^a	(±0.5) ^a	(±0.2) ^a	(±0.4) ^a	(±0.1) ^a	(±1.0) ^a	(±0.5) ^a	(±0.01) ^{ab}	(±0.02) ^a	(±0.002) ^a	(±0.4) ^a	(±0.3) ^a	(±0.2) ^a
UPDK	583.5	728.3	1420.8	58.4	11.7	27.0	58.9	35.9	48.7	1.25	5.19	0.293	88.6	96.2	3.2
	(±8.8) ^b	(±7.5) ^b	(±10.2) ^b	(±2.0) ^a	(±0.4) ^a	(±0.6) ^a	(±0.8) ^b	(±6.9) ^a	(±0.4) ^b	(±0.03) ^b	(±0.03) ^b	(±0.002) ^b	(±3.2) ^b	(±0.2) ^b	(±0.2) ^b
GDK	584.2	773.0	1429.9	44.8	3.6	10.1	59.1	35.2	45.9	1.32	5.89	0.378	95.4	96.6	11.1
	(±4.8) ^b	(±17.4) ^b	(±4.9) ^b	(±1.3) ^b	(±0.5) ^b	(±1.1) ^b	(±0.4) ^b	(±13.9) ^a	(±1.4) ^b	(±0.03) ^a	(±0.07) ^c	(±0.016) ^c	(±4.3) ^{ab}	(±0.1) ^c	(±1.2) ^a
GPK	444.1	666.2	1457.4	81.7	5.8	16.1	69.5	74.7	54.3	1.50	4.50	0.113	87.3	96.6	26.9
	(±18.2) ^a	(±18.2) ^c	(±10.7) ^a	(±2.1) ^c	(±0.5) ^c	(±0.4) ^c	(±0.2) ^a	(±3.2) ^b	(±1.5) ^c	(±0.03) ^c	(±0.01) ^d	(±0.005) ^d	(±2.5) ^b	(±0.16) ^c	(±4.0) ^c

*YY: Yığın yoğunluk, SY: Sıkıştırılmış yoğunluk, PY: Partikül yoğunluğu, CI: Carr İndeksi, HR: Hausner oranı, a_w: Su aktivitesi

^{a-d} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05)

4.4.3 Partikül boyutu açısından karşılaştırılması

UPDK-YE ve GDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için partikül boyutu analizi gerçekleştirilmiş, ortalama partikül boyutu değerleri ($D_{[4,3]}$) ve açıklık değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, UPDK işleminin partikül boyutu ve morfolojisi üzerine etkisinin ortaya konması ve diğer yöntemlerle karşılaştırılabilmesi için GDK işlemi ile elde edilmiş yalın enzime (GDK-YE) ait partikül boyutu belirlenmiştir. Tüm örnekler partikül boyut dağılımı açısından karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 5 farklı örnek için elde edilen hacimsel ortalama partikül boyutu ve açıklık değerleri Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.26. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalın enzime ait partikül boyutu ve açıklık değerleri

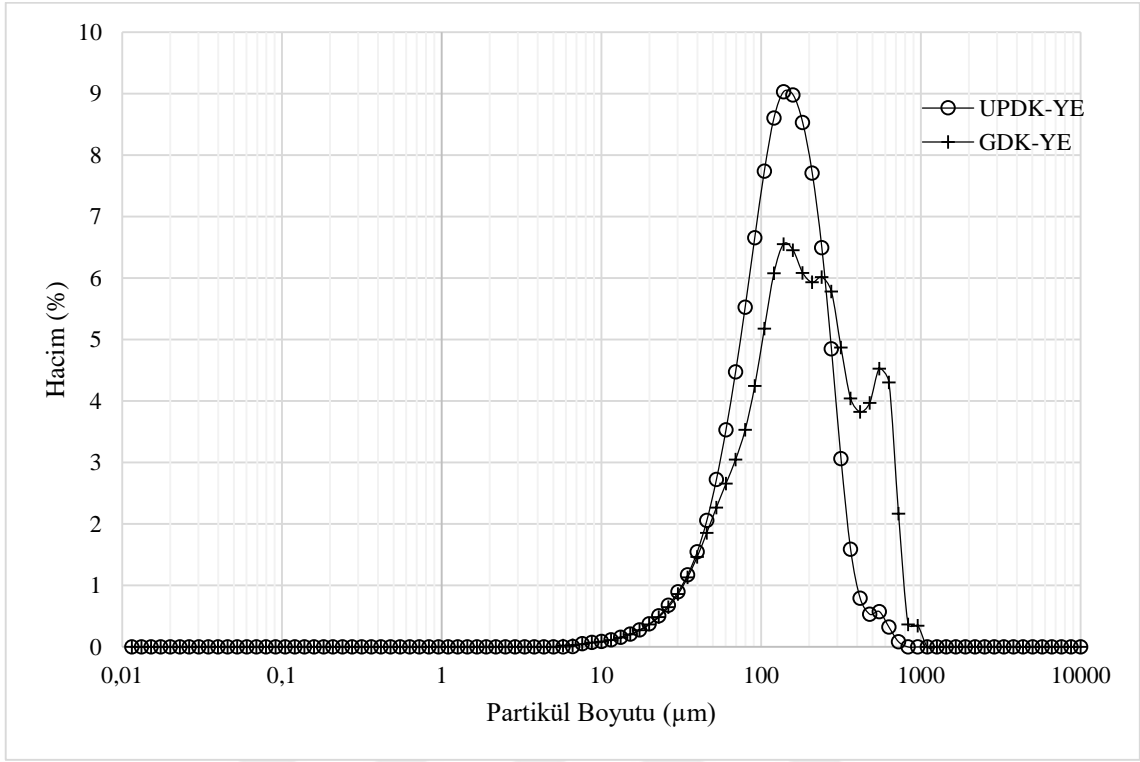
Örnek	Partikül Boyutu $D_{[4,3]}$ (μm)	Açıklık
UPDK-YE	140.53 (± 9.27) ^a	1.49 (± 0.08) ^a
GDK-YE	229.88 (± 9.38) ^b	2.84 (± 0.20) ^b
UPDK	238.10 (± 25.59) ^b	4.23 (± 0.83) ^c
GDK	348.45 (± 32.54) ^c	6.94 (± 0.83) ^d
GPK	7.44 (± 0.08) ^d	1.87 (± 0.01) ^a

^{a-d} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).

Ortalama partikül boyutu verileri incelendiğinde, en düşük partikül boyutuna sahip örneklerin GPK yöntemi ile, en yüksek partikül boyutuna sahip örneklerin ise GDK yöntemi ile mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek açıklık değerleri GDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde, en düşük açıklık değerleri ise UPDK-YE örneklerinde tespit edilmiştir. Bu durum, UPDK-YE partiküllerinin boyut dağılımının oldukça dar bir aralıkta değiştiğini göstermektedir. Benzer şekilde, GPK işlemi ile elde edilen mikroenkapsüle örneklerin partikül boyut dağılımının da dar bir aralıkta değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

Kurutma yönteminin (UPDK ve GDK) ortalama partikül boyutu ve partikül boyut dağılımı üzerine etkisi karşılaştırıldığında, UPDK-YE örneklerinin partikül boyutu ve açıklık değerlerinin GDK-YE örneklerine göre daha küçük olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). UPDK-YE örneklerinin küçük partikül boyutu, püskürtme ve donma

aşamalarında düzgün şekle sahip damlacıkların oluşumu ve damlacık şeklinin kurutma işleminin sonuna kadar korunması ile sağlanmıştır. Ayrıca, ultrasonik püskürtme işlemi, UPDK-YE örneklerinde partikül boyutu dağılımının GDK-YE örneklerine göre daha dar bir aralıkta (mono-modal dağılım) değişmesini sağlamıştır (Şekil 4.9). Literatürde PDK işlemi ile ilgili yapılan çalışmalarda, püskürtme aşamasında elde edilen küçük boyutlu damlacıkların sıvı azot içerisinde hızlı bir şekilde donarak boyutlarını ve şekillerini kuruma işleminin sonuna kadar koruduğu, püskürtme aşamasında elde edilen damlacık boyutu ile elde edilen üründeki partikül boyutunun neredeyse eşit olduğu bildirilmiştir (Maa ve ark. 1999; Ishwarya ve ark., 2015; Wanning ve ark., 2015). Bu nedenle çözeltinin püskürtülmesinde kullanılan yöntem (nozül tipi), son ürünün partikül boyutu ve partikül boyut dağılımını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. PDK işlemi ile ilgili yapılan çalışmalarda, ultrasonik püskürtme işlemi ile daha küçük partikül boyutu elde edildiği, ultrasonik nozullar ile diğer nozullara göre partikül boyut dağılımı kontrolünün daha iyi sağlandığı belirtilmiştir (Burke ve ark., 2004; D'addio ve ark., 2012; D'addio ve ark., 2013). GDK-YE örneklerinde daha geniş aralıkta değişen partikül boyut dağılımı ise, GDK işleminde püskürtme aşamasının uygulanmaması ve UPDK işlemine göre oldukça yavaş gerçekleşen donma işlemine de bağlı olarak farklı boyutlarda partiküllerin elde edilmesi ile açıklanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. UPDK-YE ve GDK-YE örneklerinin partikül boyut dağılımları

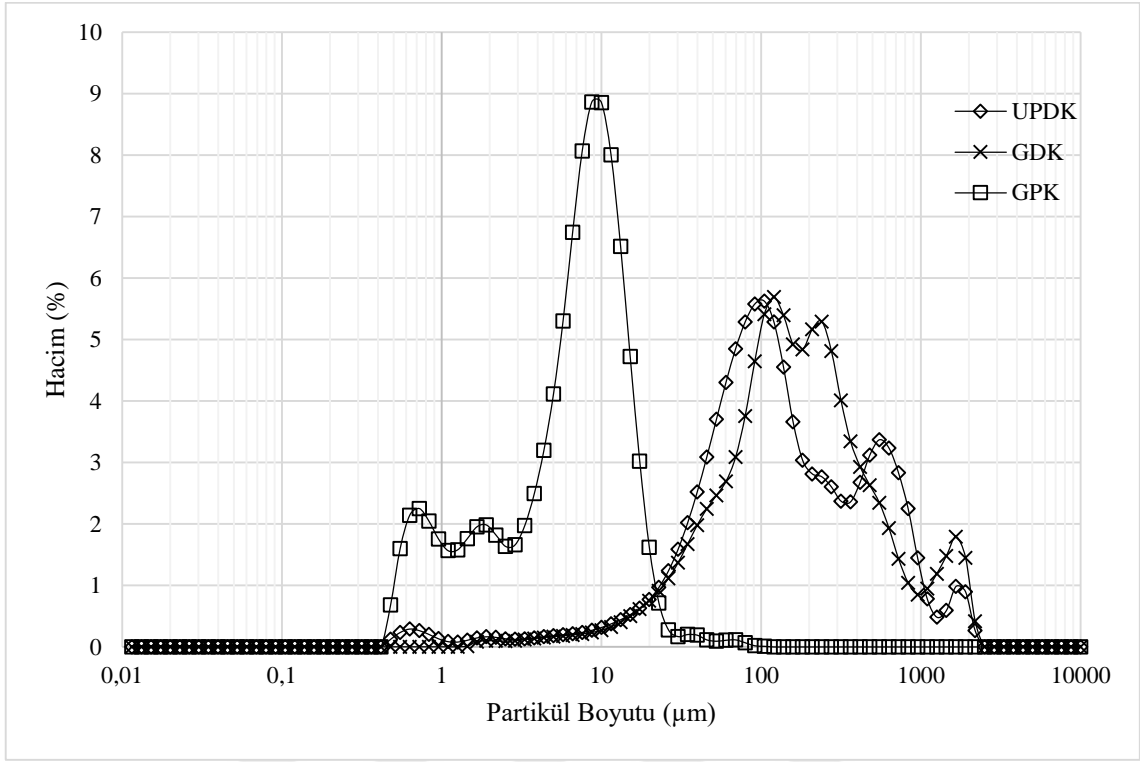
Farklı mikroenkapsülasyon yöntemlerinin (UPDK, GDK, GPK) ortalama partikül boyutu ve partikül boyut dağılımı üzerine etkisi karşılaştırıldığında, ortalama partikül boyutu açısından yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Çizelge 4.26). Mikroenkapsüle ürünlerde partikül boyutu ve morfolojisi, kullanılan kaplama materyallerinin türü, besleme çözeltisinin reolojik özellikleri, püskürtme yöntemi ve kurutma koşullarından etkilenmektedir (Dima ve ark., 2016). Aynı kaplama materyali kullanılsa dahi farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri son üründe farklı partikül boyutları elde edilmesine neden olur (Partharashati ve Anandharamakrishnan, 2016). Yapılan çalışmada, aynı kaplama materyali oranı ile hazırlanan çözelti, UPDK ve GDK işlemlerinde aynı koşullarda kurutulmasına rağmen, elde edilen ürünlerde partikül boyutunun farklı olması UPDK işlemindeki püskürtme aşamasından kaynaklanmaktadır (Çizelge 4.26). UPDK işlemi sonucunda GDK işlemine göre daha küçük boyutta partikül eldesi, UPDK işlemi ile daha kısa kurutma sürelerinin uygulanabileceğinin bir göstergesidir. GDK işleminde donma sırasında partikül boyutu ve partikül boyut dağılımının kontrol edilemeyeceği ve buna bağlı olarak kurutma süresinin uzayacağı bildirilmiştir (Sonner ve ark., 2002; Al-

Hakim ve Stapley, 2004). Yapılan çalışmada, UPDK ve GDK yöntemlerine göre GPK ile oldukça küçük boyuta sahip mikroenkapsüle partiküller elde edilmiştir. Ancak GPK işlemi ile elde edilen mikroenkapsüle ürünlerde aktivite kaybı UPDK ve GDK yöntemlerine göre daha fazladır. Ayrıca, partikül boyutunun küçülmesi ile birlikte partikül yüzey alanının artması, toz ürünlerde nem tutma kapasitesini artırarak kurutma sırasında partiküllerin topaklanmasına neden olabilmektedir (Kurozawa ve ark., 2009).

UPDK, GDK ve GPK örneklerinin partikül boyut dağılımı Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Mikroenkapsüle örneklerde, kaplama materyallerinin kullanımına bağlı olarak partikül boyutunun daha geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. UPDK ve GDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin partikül boyut dağılımları benzer olmasına rağmen, GDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde oldukça geniş aralıkta dağılım gösteren partiküllerin bulunduğu ve artan partikül boyutlarında daha fazla topaklanma olduğu görülmektedir.

UPDK yöntemi ile elde edilen mikroenkapsüle enzim örneklerinin UPDK-YE örneklerine göre daha yüksek partikül boyutu değerlerine sahip oluşu, kaplama materyallerinin etkisi ile açıklanabilir (Çizelge 4.26). Kaplama materyallerinden özellikle inülin, UPDK işlemi ile enzim moleküllerini sıkıca çevreleyerek daha büyük yapıda moleküllerin oluşmasını sağlamış ve bu nedenle mikroenkapsüle ürünlerin partikül boyutu ve açıklık değerleri yalın enzim örneklerine kıyasla daha yüksek belirlenmiş olabilir. UPDK-YE örneklerinin gösterdiği üniform yapıdaki partikül boyut dağılımı, kaplama materyallerinin kullanılması ile UPDK örneklerinde farklılık göstermiştir.

Yapılan çalışmada hem kalan aktivite, hem de partikül boyutu ve partikül boyut dağılımı sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, GDK işlemine göre daha küçük ve üniform partiküllerin üretildiği ve GPK işlemine göre daha yüksek aktiviteye sahip mikroenkapsüle enzim eldesinin sağlandığı, UPDK işleminin mikroenkapsüle mTG üretimi açısından diğer yöntemlere göre daha başarılı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örneklerin partikül boyut dağılımları

4.4.4 Spesifik yüzey alanı (SYA) ve gözenek boyutu dağılımı açısından karşılaştırılması

UPDK-YE, GDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK yöntemleri ile mikroenkapsüle edilen enzim örneklerine ait SYA ve gözenek boyutu tek noktalı BET yöntemi ile belirlenmiştir. En düşük SYA'nın UPDK yöntemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerde, en yüksek SYA'nın ise UPDK-YE örneklerinde belirlenmiş olması mikroenkapsülasyon işleminin SYA'nı belirgin şekilde etkilediğini göstermiştir ($p < 0.05$) (Çizelge 4.27). Farklı yöntemler ile mikroenkapsüle edilen örneklerde ise, UPDK ve GDK işlemleri ile elde edilen mikroenkapsüle örnekler birbirine yakın SYA değerlerine sahipken ($p > 0.05$), GPK ile elde edilen mikroenkapsüle örneklerin daha yüksek SYA'na sahip olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalın enzime ait SYA değerleri

Örnek	SYA (m ² /g)
UPDK-YE	7.57 ^a
GDK-YE	2.24 ^b
UPDK	0.65 ^c
GDK	0.89 ^c
GPK	2.14 ^b

^{a-c} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

GPK işleminde partiküllerin sahip olduğu daha yüksek SYA değerleri, bu partiküllerin UPDK ve GDK partiküllerine kıyasla daha fazla gözeneğe sahip olması ile ilişkilendirilebilir. UPDK ve GDK örneklerinin daha düşük ve benzer SYA değerlerine sahip olması ise, inülinin dondurarak kurutma aşamasında enzim molekülleri ile daha yoğun interaksiyona girerek yüzeyde daha az gözenek oluşturması ile açıklanabilir. Dondurarak kurutma aşamasında inülinin fiziko-kimyasal yapısına bağlı olarak hem UPDK hem de GDK örneklerinde camsı yapı oluşumunun arttığı düşünülmektedir.

Farklı yöntemlerle (UPDK ve GDK) kurutulan yalın enzim örneklerine ait SYA'ları incelendiğinde, UPDK-YE örneklerinin SYA değerlerinin GDK-YE örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.27). SYA değerlerinde görülen bu farklılık, UPDK işlemi ile üretilen yalın enzim partiküllerin düzgün ve gözenekli yapısı ile ilişkilendirilmiştir. PDK işlemi ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen partiküllerin yüksek SYA değerleri püskürtme işlemi ile partikül boyutunun küçültülmesi ve hızlı donma aşamalarına bağlanmıştır (Constantino ve ark., 2000; Engstrom ve ark., 2007).

Yu ve ark. (2006) protein kökenli materyallerde, yüksek SYA'nın partiküllerin hava ile olan temasını artırması nedeniyle protein denatürasyonunun arttığını, dolayısı ile daha düşük SYA'na sahip protein kökenli partiküllerin daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin düşük SYA değeri, özellikle depolama süresince bu örneklerin hava ile temasının daha az olmasını sağlayacak ve buna bağlı olarak stabilitenin artmasını ve dolayısı ile depolama süresinin daha uzun olmasını sağlayabilecektir. Bu doğrultuda en yüksek SYA'na sahip UPDK-YE örneklerinde depolama süresince stabilite sorunları oluşacağı düşünülmektedir.

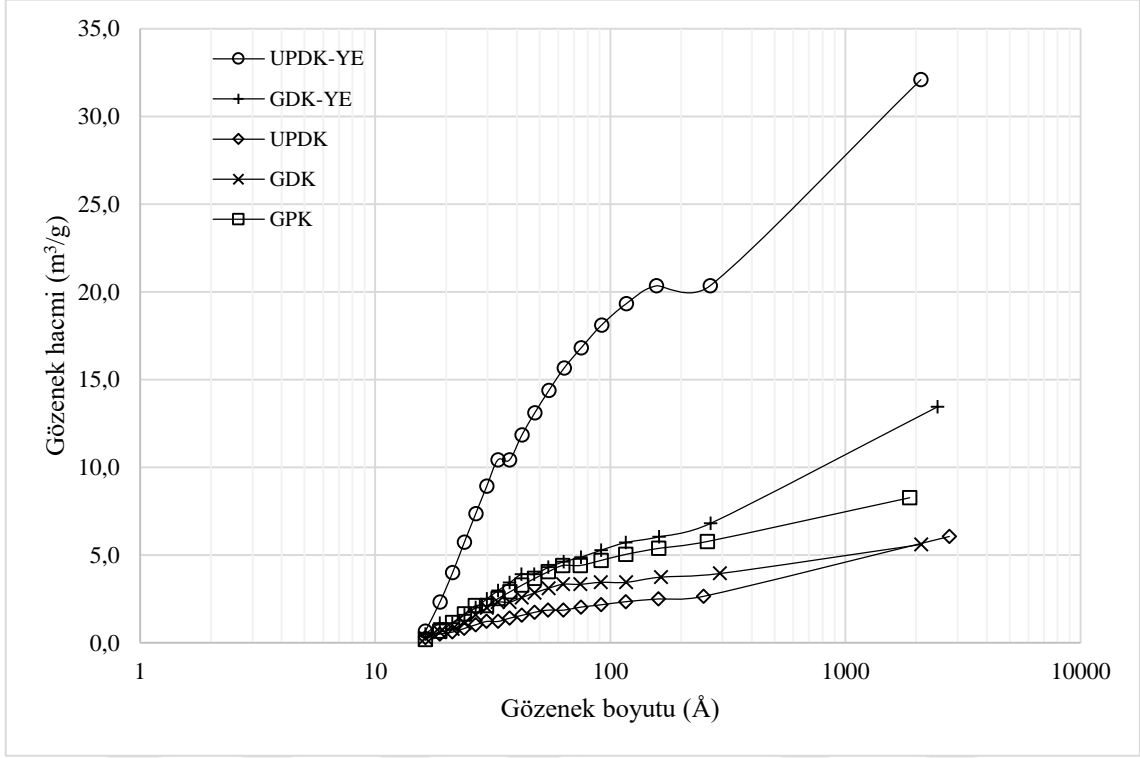
Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen mikroenkapsüle örnekler ile UPDK-YE ve GDK-YE örneklerine ait gözenek hacmi değerleri Çizelge 4.28’de verilmiştir. UPDK-YE ile GDK-YE örneklerinde görülen gözenek hacimleri arasındaki farklılık, UPDK işleminde elde edilen partiküllerin iç yapısındaki gözeneklilik ile ilişkilidir. Püskürtme ve donma işlemleri sonucunda oluşan düzgün UPDK-YE damlacıklarının iç kısmında birleşen buz kristalleri süblimasyon ile uzaklaşarak oldukça gözenekli bir yapının oluşumunu sağlamış, bu durum GDK-YE örneklerine göre daha büyük hacimde gözeneklerin elde edilmesi sağlanmıştır. Literatürde PDK işlemi ile elde edilen partiküllerin oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Constantino ve ark., 2000; Sonner ve ark., 2002; Nguyen ve ark., 2004; Engstrom ve ark., 2007; Rajam ve Anandharamkrishnan, 2015). Tüm mikroenkapsüle ürünlerde elde edilen gözenek hacminin daha düşük oluşu ise, kaplama materyallerinin partiküllerin yüzeyde oluşturduğu yapı ile ilişkilendirilebilir. Mikroenkapsüle örneklerde kaplama materyallerinden özellikle inülinin enzim molekülleri ile oluşturduğu camsı yapı sonucunda yüzeydeki gözenekliliğin UPDK-YE ve GDK-YE örneklerine göre azaldığı düşünülmektedir. Ali ve Lamprecht (2014), mikroenkapsülasyon işlemi ile kaplama materyallerinin partiküllerin yüzeyindeki gözenekleri kısmi olarak doldurduğunu ve partiküllerin mekanik kuvvetinin arttığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.28. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalın enzime ait ortalama gözenek hacmi değerleri

Örnek	Gözenek Hacmi (m ³ /g)
UPDK-YE	31.3
GDK-YE	12.7
UPDK	5.6
GDK	4.8
GPK	7.6

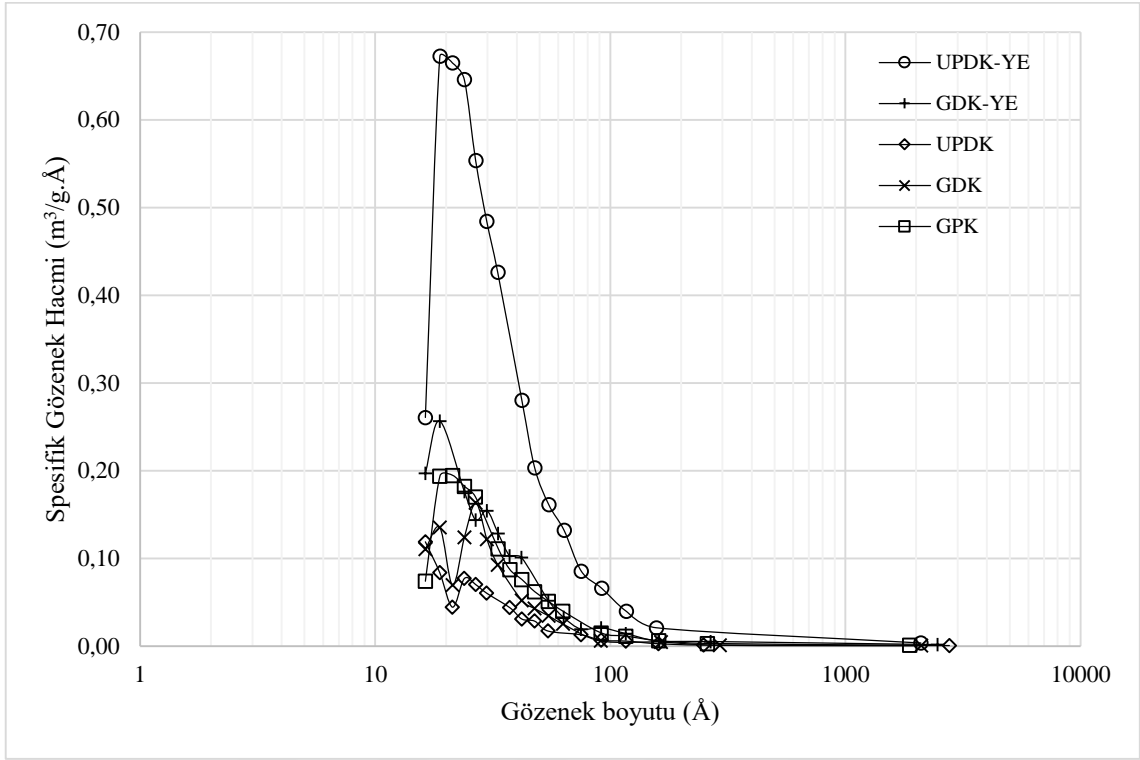
Şekil 4.11’de tüm örneklerin sahip olduğu gözenek boyutu ile gözenek hacminin değişimi gösterilmiştir. Tüm örneklerde logaritmik eksenle gözenek boyutu arttıkça gözenek hacminin de arttığı görülmüştür. UPDK-YE örneklerinde gözenek boyutuna

bağlı olarak gözenek hacmindeki artışın diğer örneklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Gözenek hacmine karşılık gelen gözenek boyutlarının incelenmesi

Şekil 4.12’de, UDK-YE ve GDK-YE örnekleri ile UDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için gözenek boyutu verileri spesifik gözenek hacmi ile grafiğe geçirilerek gözenek boyutu dağılımları elde edilmiştir. UDK-YE ve GDK örnekleri için gözenek boyutu dağılımına bakıldığında, birbirine yakın gözenek boyut dağılımına sahip olmalarına rağmen, UDK-YE örneklerinin spesifik gözenek hacminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Mikroenkapsüle örnekler için Şekil 4.12 incelendiğinde, genel olarak birbirine yakın aralıkta değişen gözenek boyut dağılımına sahip oldukları görülmektedir. Kaplama materyallerinin kullanımı ile enzim molekülü yüzeyinde oluşan matriks, UDK-YE örneklerine göre özellikle gözenek hacminin azalmasına neden olmuştur. Ayrıca kaplama materyallerinin enzim molekülleri ile oluşturduğu yapı, gözenek boyutu dağılımının uygulanan mikroenkapsülasyon yönteminden önemli düzeyde etkilenmemesine neden olmuştur.



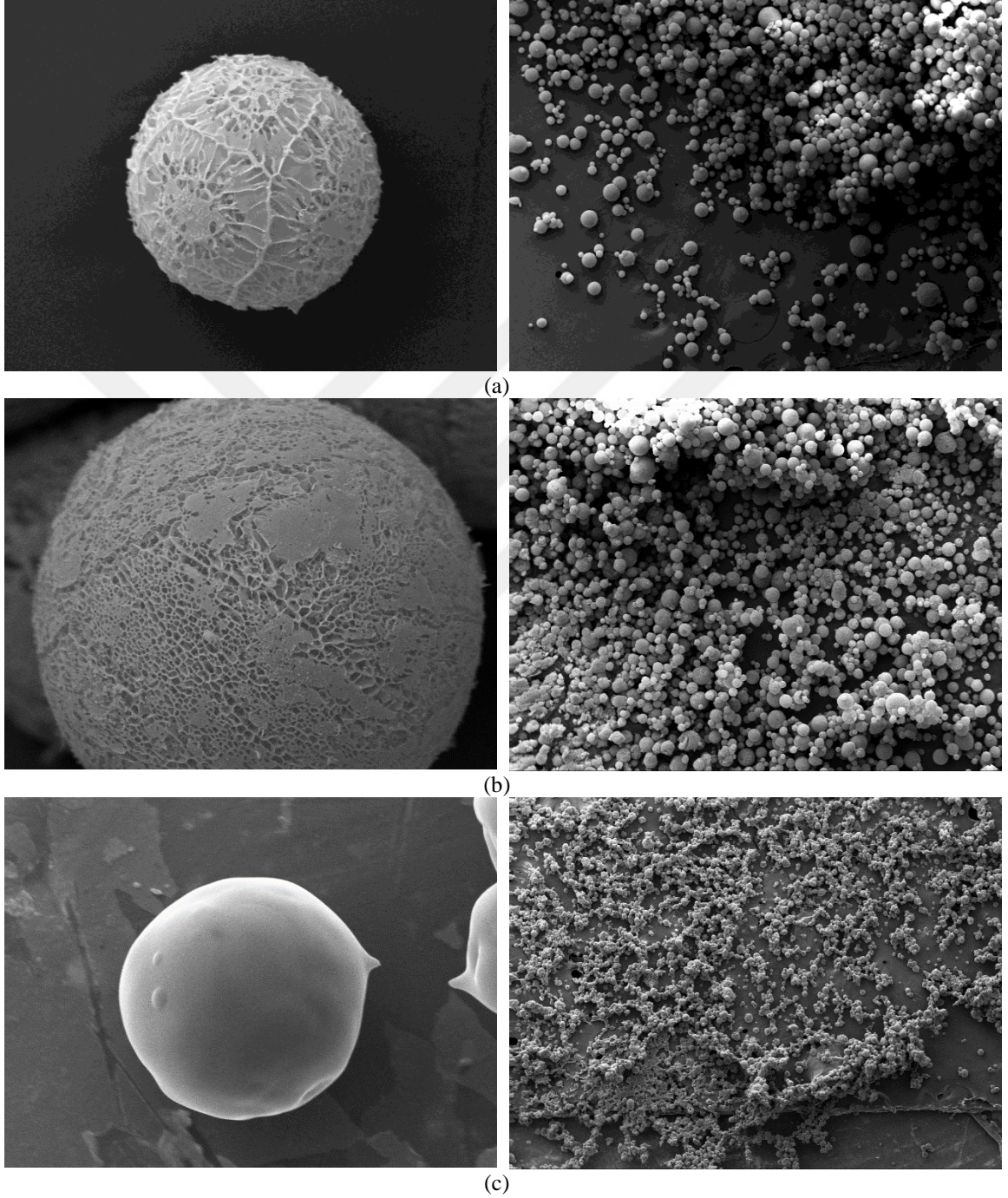
Şekil 4.12. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen örnekler ve yalın enzime ait gözenek boyutu dağılımları

4.4.5 Partikül morfolojisi açısından karşılaştırılması

UPDK-YE, GDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK yöntemleri ile optimum noktada mikroenkapsüle edilen enzim örneklerinin partikül morfolojileri SEM görüntüleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, kaplama materyali olarak kullanılan gam arabik, maltodekstrin ve inülin de UPDK işlemi ile ayrı ayrı kurutularak bu işlemin kaplama materyallerinin morfolojisini nasıl etkilediği gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Kaplama materyallerinin UPDK işlemi sonucunda küresel formda ve uniform dağılım gösteren partiküller elde edilebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.13). Maltodekstrin ve gam arabik partiküllerinin yüzeyinde porlar gözlenirken, inülin partiküllerinin yüzeyinin daha pürüzsüz olduğu görülmüştür. Maltodekstrin için elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde, yüzeyde oldukça düzenli bir gözenek yapısının oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.13a). Maltodekstrin moleküllerinin kurutma sırasında oluşturduğu kristal yapılar, partiküllerin yüzeyinde belirgin bir şekilde görülmektedir. Kristal yapının oluşumu, enzimler gibi hassas materyaller için stres faktörü olmasından dolayı aktivite açısından olumsuz durumlar oluşturabilmektedir (Tonnis ve ark., 2015). Oluşturduğu

kristal yapı nedeniyle kalan aktivite değerlerinin daha düşük bulunmasına neden olduğu düşünölen maltodekstrinin yüzeyindeki kristal yapının oluşumu SEM görüntöleri ile desteklenmiştir.



Şekil 4.13. UPDK işlemleri ile kurutulmuş kaplama materyalleri için SEM görüntöleri (a) Maltodekstrin 3000x, 100x (b) Gam arabik 3000x, 100x (c) İnülin 3000x, 100x

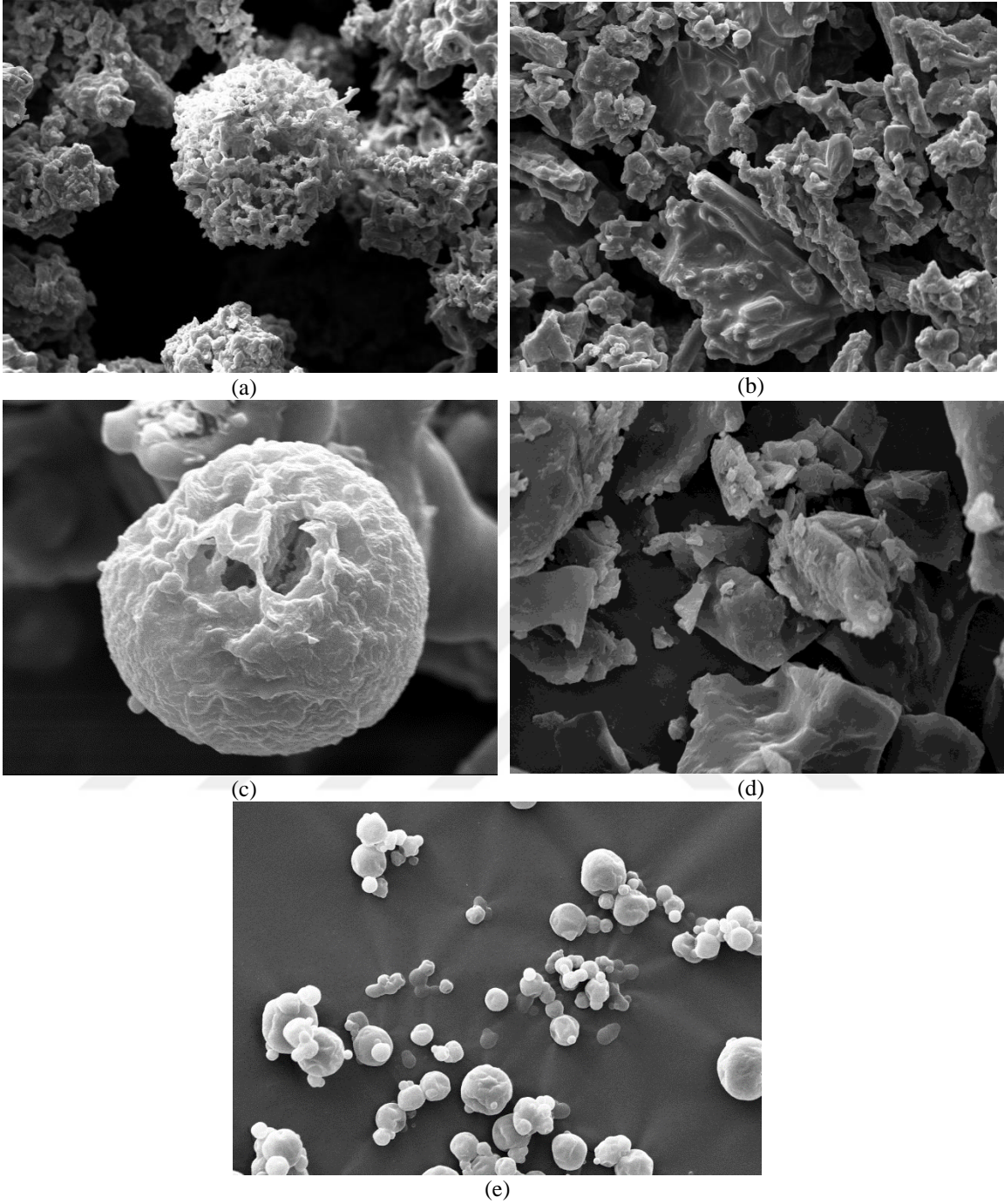
Kaplama materyallerinden inülin için elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde ise, gam arabik ve maltodekstrine benzer şekilde küresel, ancak gözenek içermeyen, pürüzsüz partiküllerin olduğu görülmektedir (Şekil 4.13c). İnülinin esnek bir oligosakkarit olması, camsı yapı oluşumunu kolaylaştırarak daha sıkı yüzey matriksine ve daha az gözeneğe sahip partiküllerin elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca, inülin moleküllerinin birbiri ile daha sıkı interaksiyona girmesi ile belirli düzeyde bir aglomerasyon gözlemlenmiştir. Bu durum, inülin moleküllerinin yüksek bağ yapma kapasitesi sonucunda ortaya çıkmış, benzer şekilde Lacerda ve ark. (2016), jussara pulpunun farklı kaplama materyalleri ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, inülin konsantrasyonunun artması ile daha yoğun aglomerasyon oluşumunu SEM görüntüleri ile desteklemişlerdir. İnülin kaplama materyali olarak kullanıldığında kalan aktivite değerlerinin özellikle maltodekstrine göre daha yüksek oluşu inülin moleküllerinin esnek yapısı ve camsı yapı oluşturma kapasitesi ile ilişkilendirilmiş, bu durum SEM görüntüleri ile ayrıca desteklenmiştir (Şekil 4.13).

UPDK-YE, GDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için SEM görüntüleri incelendiğinde, genel olarak UPDK işlemi uygulandığında yarı-küresel yapılar, GDK işlemi ile kristal benzeri yapılar, GPK işlemi ile daha küçük boyutta ve pürüzsüz küresel yapıların olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). UPDK-YE ve GDK-YE örneklerine bakıldığında, proteinlerin oluşturduğu kompleks yapılar göze çarpmaktadır (Şekil 4.14). UPDK-YE örneklerinde herhangi bir kaplama materyalinin bulunmaması, kurutulan enzim moleküllerinin dış yüzeyinde açıklık ve boşluklar görülmesine neden olmuştur. Bu durum gözeneklilik analizi verileri ile belirlenmiş ve SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir. PDK işleminin avantajlarından biri, GDK ve GPK işlemleri ile elde edilen ürünlerden daha farklı mikro-yapıya sahip ürünler elde edilebilmesidir (Ishwarya ve ark., 2015). PDK işleminde partiküllerin mikro-yapısının damlacıkların atomizasyonu ve ardından hızlı bir şekilde donması ile şekillenmesi nedeniyle, GDK ve GPK işlemlerine göre son ürünlerde yapısal farklılıklar görülmektedir (Al-Hakim ve Stapley, 2004). UPDK-YE ve GDK-YE örneklerindeki yapısal farklılıklar SEM görüntüleri ile ortaya konulmuştur.

Mikroenkapsüle örnekler için SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm mikroenkapsüle örneklerde UPDK-YE örneklerine göre daha sıkı bir yüzey matriksi görülmektedir. Ayrıca, kaplama materyallerinin oluşturduğu sıkı yüzey matriksi sonucunda

gözenekliliğin azaldığı tespit edilmiştir. Kaplama materyallerinden özellikle inülinin kullanımı ile mikroenkapsüle örneklerin pürüzsüz yüzeylere sahip olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada formülasyonlarda inülin kullanımıyla birlikte, inülinin moleküler düzeydeki esnekliğine bağlı olarak pürüzsüz yüzeylere sahip mikroenkapsüle partiküllerin oluştuğu bildirilmiştir (Lacerda ve ark., 2016). GPK örneklerinde elde edilen oldukça küçük partikül boyutuna sahip partiküllerde de pürüzsüz yüzeyler görülmesine rağmen, kullanılan yüksek sıcaklıklar protein denatürasyonuna neden olarak kalan aktivite değerlerinin azalmasına neden olmuştur. Niwa ve ark. (2010), eczacılık endüstrisinde kullanılan fenitoini PDK işlemi ile yalın ve çeşitli kaplama materyalleri ile kuruttukları çalışmada, yalın fenitoin için elde ettikleri SEM görüntülerinde, tam küresel olmayan ancak bükülmüş pamuk lifine benzer düzensiz bir yapı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın, kaplama materyalleri varlığında yapılan kurutma işlemi sonucunda elde edilen partiküllerin SEM görüntülerinde rijid bir ağ içinde küresel yapıların görüldüğünü tespit etmişlerdir. Yalın ve kaplama materyali varlığında kurutulan örneklerin partikül morfolojilerindeki bu fark, kaplama materyallerinin çekirdek materyal ile moleküler düzeyde oluşturduğu bağlar nedeniyle meydana gelen güçlü yapı ile açıklanmıştır.

PDK örneklerinin mikro düzeydeki yapısının belirlenmesi, elde edilen son ürünün kalitesi hakkında bilgi vermekle birlikte, kurutma işleminin başarılı gerçekleşip gerçekleşmediğinin de görsel olarak ifade edilmesini sağlamaktadır (Anandharamakrishnan ve ark., 2010). Ayrıca kaplama materyallerinin kullanımı ve farklı kaplama materyallerinin fiziko-kimyasal özellikleri mikro düzeydeki yapıyı etkilemektedir. Yapılan çalışmada mikroenkapsüle örneklerde inülinin bulunması, partiküllerin dış tabakasının daha sıkı yapıya sahip olmasına neden olmuştur. Bu durum, UPDK-YE ve UPDK mikroenkapsüle örneklerinin SEM görüntüleri kıyaslandığında açıkça görülmektedir.



Şekil 4.14. Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile elde edilen yalın ve mikroenkapsüle toz ürünler için SEM görüntüleri (Yakınlaştırma oranı: 3000x) (a) UPDK-YE (b) GDK-YE (c) UPDK (d) GDK (e) GPK

4.5 Farklı Yöntemler ile Elde Edilen Örneklerin Isıl Stabilitesinin Belirlenmesi ve Enzim İnaktivasyon Kinetiği

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen mTG enziminin ısıl stabilitesi 3 farklı pH (pH 5.0, 6.0, 7.0) ve 5 farklı sıcaklık (40, 45, 50, 55, 60°C) koşulunda kalan aktivite değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

Farklı sıcaklık ve farklı inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kalan aktivite değerleri pH 5.0 için Çizelge 4.29, pH 6.0 için Çizelge 4.30 ve pH 7.0 için Çizelge 4.31’de verilmiştir. Kalan aktivite değerleri incelendiğinde, hem farklı pH hem de farklı sıcaklık koşullarında en yüksek kalan aktiviteye sahip örneklerin UPDK ile mikroenkapsüle edilen örnekler olduğu görülmüştür. UPDK-YE örneklerinin ise kalan aktivite değerlerinin tüm koşullarda en düşük olduğu belirlenmiştir. GDK işlemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerinin ısıl stabilitelerinin ise genel olarak GPK işlemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Tüm örnekler için farklı pH değerlerinde aynı sıcaklıklar uygulanmasına rağmen, aynı kalan aktivite değerine ulaşmak için gerekli inkübasyon süresinin pH 5.0’te en düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.29). mTG enziminin standart enzim tayin metodunda da kullanılan pH 6.0 ortamında daha stabil olduğu, daha asidik (pH 5.0) veya daha bazik (pH 7.0) ortamda aktivitenin düşerek sıcaklık artışına karşı enzimin daha duyarlı hale geldiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.29. pH 5.0'te UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Kalan aktivite (%)			
		UPDK-YE	UPDK	GDK	GPK
40	60	76.7 (±0.3)	91.7 (±0.6)	90.2 (±0.4)	84.3 (±0.2)
	120	42.3 (±0.2)	72.9 (±0.2)	70.8 (±0.3)	69.6 (±0.2)
	210	20.6 (±0.2)	54.5 (±0.4)	51.4 (±0.1)	45.1 (±0.2)
	350	6.7 (±0.2)	35.6 (±0.3)	24.3 (±0.3)	18.8 (±0.5)
	480	2.4 (±0.2)	22.8 (±0.4)	10.8 (±0.1)	8.9 (±0.6)
45	20	69.7 (±0.4)	80.8 (±0.1)	82.0 (±0.2)	79.0 (±0.5)
	40	45.1 (±0.7)	65.9 (±0.4)	66.8 (±0.1)	62.1 (±0.4)
	80	28.9 (±0.6)	40.5 (±0.1)	37.9 (±0.4)	33.9 (±0.2)
	120	10.8 (±0.1)	23.0 (±0.3)	21.3 (±0.1)	19.4 (±0.3)
	180	4.7 (±0.1)	10.1 (±0.1)	7.5 (±0.7)	6.6 (±0.1)
50	5	73.3 (±0.1)	90.1 (±0.1)	88.7 (±0.1)	88.2 (±0.3)
	12	36.9 (±0.5)	71.7 (±0.1)	65.2 (±0.1)	66.2 (±0.1)
	20	18.2 (±0.2)	44.8 (±0.2)	39.6 (±0.3)	38.6 (±0.6)
	30	7.5 (±0.6)	26.6 (±0.2)	21.9 (±0.3)	23.9 (±0.2)
	40	3.2 (±0.2)	14.9 (±0.1)	9.7 (±0.1)	9.8 (±0.3)
55	2	78.0 (±0.1)	93.0 (±0.2)	91.8 (±0.1)	88.1 (±0.1)
	4	61.2 (±0.0)	74.7 (±0.3)	73.9 (±0.4)	70.7 (±0.1)
	8	27.5 (±0.4)	38.9 (±0.1)	33.9 (±0.1)	34.3 (±0.2)
	12	11.1 (±0.3)	21.6 (±0.2)	19.0 (±0.3)	16.1 (±0.1)
	18	2.9 (±0.1)	10.8 (±0.3)	9.0 (±0.3)	6.8 (±0.1)
60	1	71.7 (±0.4)	90.1 (±0.1)	89.4 (±0.2)	84.0 (±0.3)
	2	30.5 (±0.2)	66.4 (±0.1)	36.5 (±0.5)	32.0 (±0.4)
	3	15.1 (±0.3)	35.5 (±0.3)	19.7 (±0.2)	16.2 (±0.6)
	4	7.1 (±0.1)	28.9 (±0.7)	10.6 (±0.4)	9.2 (±0.2)
	5	2.8 (±0.1)	19.9 (±0.6)	5.4 (±0.3)	3.9 (±0.5)

Çizelge 4.30. pH 6.0'da UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikrokapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Kalan aktivite (%)			
		UPDK-YE	UPDK	GDK	GPK
40	120	77.4 (±0.2)	94.7 (±0.0)	89.6 (±0.2)	89.5 (±0.1)
	240	41.6 (±0.4)	76.2 (±0.5)	65.2 (±0.2)	56.9 (±0.2)
	360	25.7 (±0.2)	64.4 (±0.3)	56.6 (±0.1)	39.6 (±0.3)
	600	9.8 (±0.2)	40.1 (±0.2)	35.0 (±0.1)	19.6 (±0.3)
	900	3.5 (±0.3)	16.2 (±0.0)	14.4 (±0.2)	9.1 (±0.2)
45	60	68.9 (±0.5)	85.2 (±0.2)	83.4 (±0.4)	81.3 (±0.2)
	120	33.4 (±0.1)	64.1 (±0.1)	60.1 (±0.1)	59.0 (±0.4)
	180	18.3 (±0.3)	46.4 (±0.2)	33.4 (±0.2)	39.6 (±0.5)
	240	10.1 (±0.5)	25.2 (±0.2)	20.2 (±1.0)	18.6 (±0.2)
	360	3.0 (±0.5)	12.9 (±0.2)	9.0 (±0.1)	6.8 (±0.2)
50	10	71.7 (±0.5)	89.9 (±0.1)	86.2 (±0.4)	79.3 (±0.4)
	20	32.4 (±0.4)	55.6 (±0.4)	50.0 (±0.2)	45.9 (±0.4)
	30	17.3 (±0.1)	39.2 (±0.4)	34.6 (±0.1)	27.8 (±0.2)
	40	9.2 (±0.2)	27.6 (±0.2)	19.7 (±0.1)	19.2 (±0.1)
	60	2.6 (±0.4)	13.0 (±0.4)	7.8 (±0.4)	7.3 (±0.6)
55	5	65.3 (±0.1)	89.0 (±0.1)	83.9 (±0.1)	80.7 (±0.1)
	12	34.7 (±0.2)	57.3 (±0.3)	62.0 (±0.3)	44.4 (±0.2)
	20	17.1 (±0.3)	37.8 (±0.2)	38.1 (±0.4)	24.6 (±0.3)
	30	9.4 (±0.2)	22.5 (±0.3)	18.9 (±0.2)	12.0 (±0.3)
	40	2.6 (±0.2)	13.2 (±0.1)	9.1 (±0.1)	5.2 (±0.2)
60	2	74.3 (±0.5)	91.4 (±0.1)	87.9 (±0.1)	85.2 (±0.1)
	4	45.8 (±0.2)	75.2 (±0.4)	71.0 (±0.4)	54.0 (±0.1)
	8	19.8 (±0.2)	53.8 (±0.2)	48.5 (±0.4)	31.2 (±0.2)
	12	8.9 (±0.2)	25.6 (±0.4)	18.3 (±0.3)	20.4 (±0.1)
	18	2.1 (±0.1)	10.6 (±0.4)	7.2 (±0.2)	5.4 (±0.1)

Çizelge 4.31. pH 7.0'de UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin kalan aktivite (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Kalan aktivite (%)			
		UPDK-YE	UPDK	GDK	GPK
40	120	71.9 (±0.2)	86.9 (±0.1)	83.6 (±0.2)	82.5 (±0.6)
	240	49.9 (±0.1)	68.2 (±0.4)	64.9 (±0.2)	61.8 (±0.1)
	360	27.3 (±0.2)	48.3 (±0.2)	40.0 (±0.2)	39.8 (±0.2)
	540	13.3 (±0.2)	31.3 (±0.2)	28.2 (±0.4)	23.2 (±0.3)
	720	5.3 (±0.1)	21.5 (±0.2)	12.1 (±0.1)	9.7 (±0.2)
45	40	73.1 (±0.1)	83.0 (±0.1)	82.7 (±0.1)	77.8 (±0.2)
	80	50.7 (±0.1)	60.5 (±0.2)	54.5 (±0.2)	52.1 (±0.1)
	120	35.4 (±0.1)	46.4 (±0.1)	41.9 (±0.0)	40.0 (±0.0)
	180	15.0 (±0.3)	21.6 (±0.3)	18.4 (±0.0)	18.1 (±0.5)
	270	4.1 (±0.1)	13.0 (±0.3)	9.0 (±0.2)	8.0 (±0.1)
50	10	62.6 (±0.2)	89.7 (±0.2)	81.8 (±0.1)	73.1 (±0.8)
	20	38.6 (±0.1)	58.0 (±0.2)	42.4 (±0.2)	40.0 (±0.4)
	30	17.2 (±0.2)	38.4 (±0.2)	25.4 (±0.4)	18.1 (±0.4)
	40	8.8 (±0.2)	20.0 (±0.3)	18.0 (±0.3)	10.0 (±0.2)
	50	3.7 (±0.1)	14.2 (±0.3)	7.5 (±0.1)	4.6 (±0.3)
55	5	58.7 (±0.1)	78.9 (±0.3)	77.8 (±0.1)	71.2 (±0.1)
	10	39.2 (±0.1)	55.5 (±0.2)	53.0 (±0.2)	49.9 (±0.2)
	15	21.2 (±0.2)	38.6 (±0.2)	34.2 (±0.1)	32.2 (±0.5)
	20	13.3 (±0.1)	22.6 (±0.3)	18.7 (±0.2)	16.8 (±0.4)
	28	4.4 (±0.1)	14.5 (±0.2)	9.7 (±0.1)	6.9 (±0.3)
60	2	60.4 (±1.0)	83.4 (±0.3)	72.3 (±0.1)	66.9 (±0.7)
	4	26.2 (±0.2)	60.7 (±0.1)	37.6 (±0.2)	44.0 (±0.6)
	6	12.8 (±0.2)	36.5 (±0.3)	22.2 (±0.2)	19.8 (±0.3)
	8	7.2 (±0.2)	21.1 (±0.5)	11.5 (±0.1)	11.1 (±0.3)
	10	3.0 (±0.4)	14.0 (±0.6)	8.4 (±0.5)	5.4 (±0.6)

UPDK-YE ve UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen mTG enziminin farklı pH ve sıcaklık koşullarında elde edilen birinci derece reaksiyon hız sabiti değerleri ile yarı ömür süreleri Çizelge 4.32'de verilmiştir. Aynı pH koşulu için UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklere ait hız sabiti değerlerinin diğer örneklere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin ısıl stabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. UPDK-YE örneklerinin ise yüksek hız sabiti değerlerine sahip olması mikroenkapsülasyon işleminin enzimin

ısı stabilitesinin artırılmasında önemli rol oynadığını göstermiştir. Elde edilen yüksek R^2 ($R^2 > 0.960$) ve düşük %P (<10) değerleri, birinci derece reaksiyon kinetiğinin farklı örneklerin kalan aktivite değerlerindeki değişimi matematiksel olarak açıklayabildiğini göstermiştir (Çizelge 4.32).

Yarı ömür süresi, enzimlerin uygulanan sıcaklığa karşı gösterdiği direncin bir ifadesidir ve reaksiyon hız sabitinin bir fonksiyonu olarak hesaplanır (Souza ve ark., 2009). Farklı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile farklı pH ve sıcaklık koşullarının yarı ömür süresi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulgulanmıştır ($p < 0.05$). 55 ve 60°C’de tüm örnekler için en uzun yarı ömür süreleri pH 6.0, en kısa yarı ömür süreleri ise pH 5.0 koşulunda hesaplanmıştır. En uzun yarı ömür süreleri pH 6.0’da 40-60°C aralığında UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde (347.44-5.44 dak), en kısa yarı ömür süreleri ise pH 5.0’te UPDK-YE örneklerinde (86.70-0.95 dak) belirlenmiştir. Tüm örnekler için 45°C’den sonra yarı ömür sürelerinin hızlı bir şekilde düşmesi, bu sıcaklıktan sonra protein denatürasyonunun hız kazanması ile açıklanabilir (Busto ve ark., 1999). Cui ve ark. (2008), *Streptomyces hygroscopicus* suşu ile mTG üreterek farklı sıcaklıklarda enzimin ısıl stabilitesini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada 50°C’den sonra enzimin hızla inaktive olduğu belirlenmiş, yarı ömür süreleri 40, 50 ve 60°C için sırasıyla 96, 20 ve 8 dakika olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların, tez çalışmasında üretilen UPDK-YE ile kıyaslandığında, pH 5.0 koşulu için düşük sıcaklıklarda elde edilen sonuçlara benzer olduğu görülmüştür. Ancak UPDK-YE için pH değeri artırıldığında düşük sıcaklıklarda yarı ömür süreleri yükselmiş, buna rağmen yüksek sıcaklık değerlerinde (>50°C) yarı ömür sürelerinin hızla azaldığı tespit edilmiştir. Souza ve ark. (2009) ise 30-50°C sıcaklık aralığında oldukça stabil bir enzim üretmelerine rağmen, 60°C sıcaklıkta yarı ömür süresini 1.48 dakika olarak belirlemişlerdir. pH 6.0 koşulunda UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin 60°C’de yarı ömür süresinin 5.44 dakika olduğu düşünüldüğünde, ortam pH’sının ve mikroenkapsülasyon yönteminin enzimin sıcaklığa karşı stabilitesini artırdığı sonucuna ulaşılmaktadır.

UPDK ile mikroenkapsüle edilen mTG örneklerinde ısıl stabilitenin (düşük hız sabiti ve yüksek yarı ömür süreleri) GDK örneklerine kıyasla daha yüksek olduğu Çizelge 4.32’de görülmektedir. Aynı kaplama materyali oranı ve aynı kurutma koşullarında elde edilen mikroenkapsüle UPDK ve GDK örneklerinde kalan aktivitenin farklı olmasının,

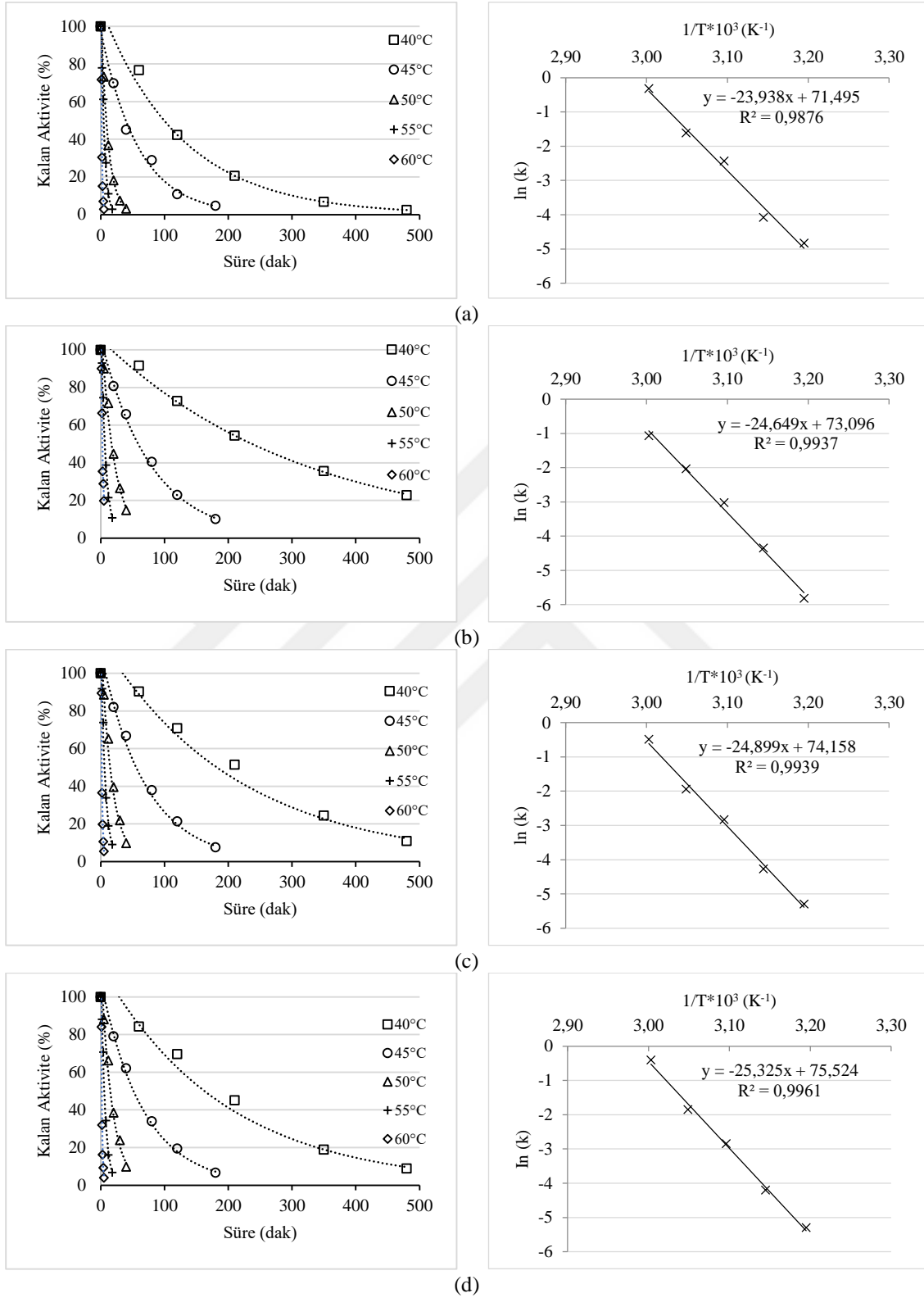
UPDK işleminin püskürtme aşamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ultrasonik püskürtme işleminin enzim molekülünün üç boyutlu yapısını değiştirerek aktiviteyi olumlu yönde etkilemesinin yanı sıra, enzimi yüksek sıcaklıklara karşı daha dirençli hale getirdiği düşünülmektedir. GPK işlemi ile mikroenkapsüle edilmiş mTG enziminin ısıl stabilitesinin ise UPDK ve GDK ile elde edilenlere oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.32). GPK işleminde uygulanan yüksek sıcaklığa bağlı protein denatürasyonunun artmasıyla birlikte enzimin üç boyutlu yapısında açılmaların meydana geldiği ve böylece enzimin sıcaklığa karşı gösterdiği direncin azalarak ısıl stabilitenin UPDK ve GDK ile mikroenkapsüllenen örneklere göre daha düşük belirlenmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Farklı yöntemlerle elde edilen dört farklı örnek için aktivasyon enerjisi (E_a , kJ/mol), aktivasyon entalpisi (ΔH , kJ/mol), Gibbs serbest enerjisi (ΔG , kJ/mol) ve aktivasyon entropisi (ΔS , J/mol.K) belirlenmiştir. Aktivasyon enerjisi (E_a , kJ/mol), enzimin üç boyutlu yapısının değişikliğe uğraması için gereken enerji miktarı olarak tanımlanmaktadır (Cobos ve Estrada, 2003). Farklı pH koşullarında dört farklı örnek için oluşturulan kalan aktivitenin zamanla değişimi ve Arrhenius eğrileri pH 5.0 için Şekil 4.15'te, pH 6.0 için Şekil 4.16'da ve pH 7.0 için Şekil 4.17'de gösterilmiş, hesaplanan aktivasyon enerjileri ise Çizelge 4.33'te verilmiştir. Elde edilen aktivasyon enerjisi değerlerinin sıcaklığa bağlı protein denatürasyonu ve enzim inaktivasyonu reaksiyonları için literatürde belirtilen aralıkta (140-629 kJ/mol) olduğu tespit edilmiştir (Souza ve ark., 2009). pH 6.0 koşulunda, tüm örnekler için elde edilen daha düşük aktivasyon enerjisi değerleri, bu koşulda enzimin sıcaklık artışından daha az etkilediğini göstermiştir.

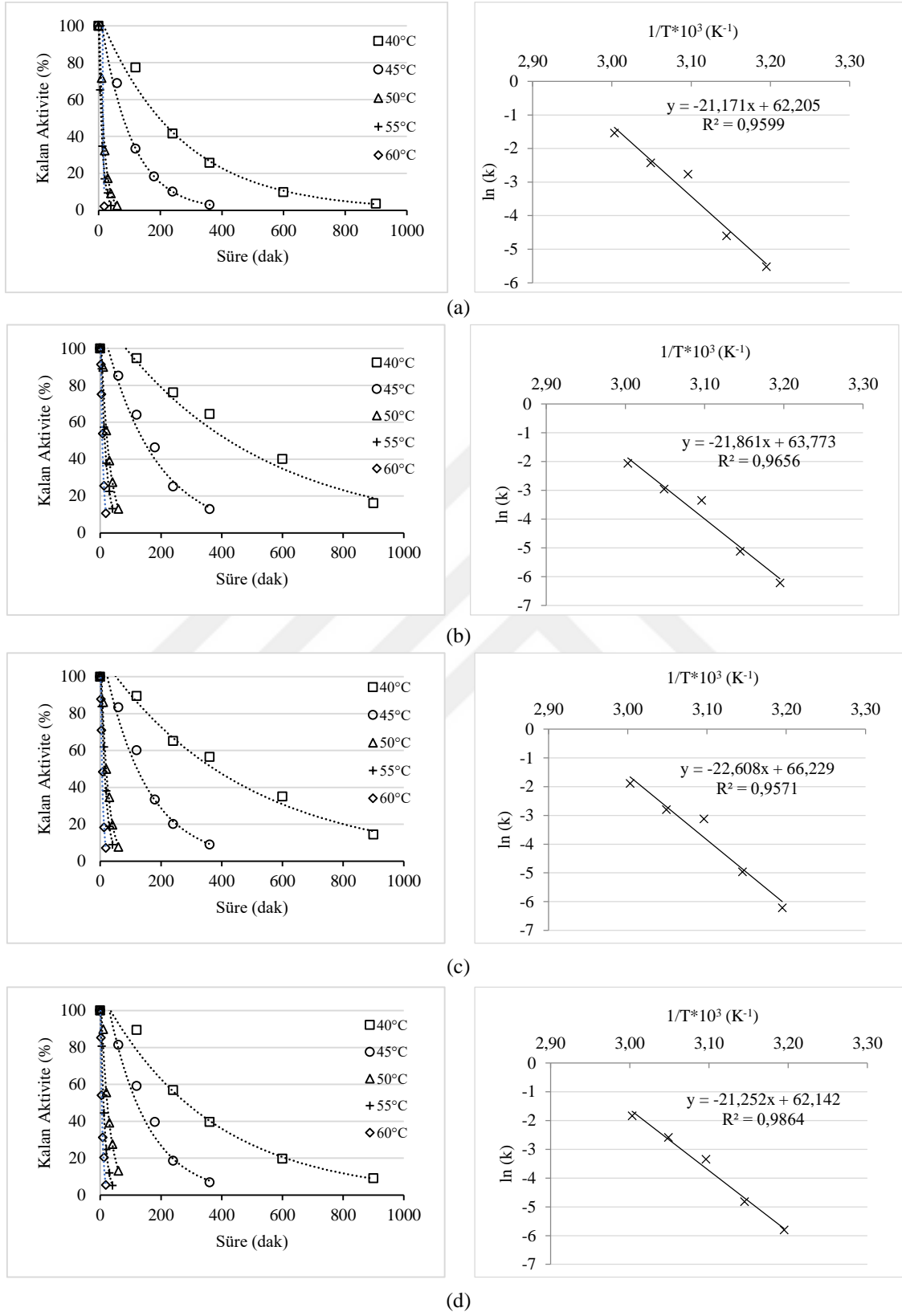
Çizelge 4.32. Farklı örnekler için tüm koşullarda hesaplanan hız sabiti, R², %P değerleri ve yarı ömür süreleri

Örnek	pH	Sıcaklık (°C)	k (dak ⁻¹)	R ²	%P	t _{1/2} (dak)	
UPDK-YE	5.0	40	0.008 (±0.000) ^{abc}	0.9978	2.63	86.64 (±2.17) ^j	
		45	0.017 (±0.000) ^c	0.9919	8.62	40.77 (±0.00) ^f	
		50	0.088 (±0.000) ^l	0.9991	1.88	7.88 (±0.00) ^{abcde}	
		55	0.201 (±0.001) ^q	0.9913	8.45	3.47 (±0.01) ^{abc}	
		60	0.730 (±0.004) ^w	0.9879	10.08	0.95 (±0.00) ^a	
	6.0	40	0.004 (±0.000) ^{ab}	0.9958	7.29	173.29 (±0.00) ^m	
		45	0.010 (±0.000) ^{abc}	0.9968	2.98	69.31 (±0.00) ⁱ	
		50	0.063 (±0.002) ^{ij}	0.9952	3.40	11.01 (±0.35) ^{abcde}	
		55	0.088 (±0.002) ^l	0.9899	9.18	7.88 (±0.18) ^{abcde}	
		60	0.215 (±0.002) ^f	0.9982	4.16	3.23 (±0.02) ^{abc}	
	7.0	40	0.004 (±0.000) ^{ab}	0.9899	6.99	173.29 (±0.00) ⁿ	
		45	0.012 (±0.000) ^{abc}	0.9835	10.53	57.78 (±0.00) ^h	
		50	0.066 (±0.000) ^{ijk}	0.9875	9.21	10.50 (±0.00) ^{abcde}	
		55	0.110 (±0.001) ^m	0.9929	8.23	6.33 (±0.03) ^{abcd}	
		60	0.354 (±0.009) ^u	0.9956	6.59	1.96 (±0.05) ^{ab}	
	UPDK	5.0	40	0.003 (±0.000) ^a	0.9964	4.21	231.05 (±0.00) ^o
			45	0.013 (±0.000) ^{abc}	0.9972	3.39	53.32 (±0.01) ^{gh}
			50	0.049 (±0.000) ^{efg}	0.9856	5.45	14.15 (±0.00) ^{bcde}
			55	0.132 (±0.002) ⁿ	0.9904	5.73	5.27 (±0.06) ^{abcd}
			60	0.346 (±0.002) ^u	0.9679	8.21	2.00 (±0.01) ^{ab}
6.0		40	0.002 (±0.000) ^a	0.9617	9.52	347.44 (±17.37) ^p	
		45	0.006 (±0.001) ^{ab}	0.9755	3.20	118.83 (±19.80) ^l	
		50	0.036 (±0.000) ^d	0.9892	3.78	19.53 (±0.28) ^e	
		55	0.052 (±0.000) ^{efgh}	0.9967	1.71	13.33 (±0.00) ^{abcde}	
		60	0.128 (±0.001) ⁿ	0.9742	7.98	5.44 (±0.02) ^{abcd}	
7.0		40	0.002 (±0.000) ^a	0.9915	9.92	346.57 (±0.00) ^p	
		45	0.008 (±0.000) ^{abc}	0.9821	8.61	86.64 (±0.00) ^j	
		50	0.042 (±0.001) ^{de}	0.9715	9.80	16.70 (±0.20) ^d	
		55	0.073 (±0.001) ^{jk}	0.9896	5.86	9.56 (±0.07) ^{abcde}	
		60	0.207 (±0.003) ^{qr}	0.9768	8.40	3.36 (±0.04) ^{abc}	
GDK		5.0	40	0.005 (±0.000) ^{ab}	0.9794	9.75	138.63 (±0.00) ^m
			45	0.015 (±0.001) ^{bc}	0.9919	6.81	47.86 (±1.65) ^{fgh}
			50	0.059 (±0.000) ^{ghi}	0.9819	8.90	11.75 (±0.00) ^{abcde}
			55	0.143 (±0.001) ^o	0.9888	7.70	4.85 (±0.03) ^{abcd}
			60	0.617 (±0.009) ^y	0.9806	6.15	1.12 (±0.02) ^a
	6.0	40	0.002 (±0.000) ^a	0.9795	8.81	346.57 (±0.00) ^p	
		45	0.007 (±0.000) ^{abc}	0.9837	7.26	99.02 (±0.00) ^k	
		50	0.045 (±0.001) ^{def}	0.9871	6.87	15.58 (±0.18) ^{cde}	
		55	0.061 (±0.001) ^{hi}	0.9871	7.18	11.46 (±0.09) ^{abcde}	
		60	0.151 (±0.001) ^{op}	0.9732	10.37	4.59 (±0.03) ^{abcd}	
	7.0	40	0.003 (±0.000) ^a	0.9716	9.75	231.05 (±7.71) ^o	
		45	0.009 (±0.000) ^{abc}	0.9878	9.02	77.02 (±0.00) ^{ij}	
		50	0.052 (±0.001) ^{efgh}	0.9759	10.32	13.46 (±0.13) ^{abcde}	
		55	0.087 (±0.001) ^l	0.9883	6.98	8.01 (±0.05) ^{abcde}	
		60	0.264 (±0.004) ^s	0.9904	6.94	2.63 (±0.03) ^{ab}	
	GPK	5.0	40	0.005 (±0.000) ^{ab}	0.9864	9.31	138.63 (±0.00) ^m
			45	0.015 (±0.000) ^{bc}	0.9951	5.50	46.21 (±0.00) ^{fg}
			50	0.058 (±0.001) ^{ghi}	0.9768	9.93	12.06 (±0.10) ^{abcde}
			55	0.158 (±0.001) ^p	0.9911	6.20	4.40 (±0.01) ^{abcd}
			60	0.673 (±0.019) ^w	0.9822	9.35	1.03 (±0.03) ^a
6.0		40	0.003 (±0.000) ^a	0.9933	10.53	231.05 (±0.00) ^o	
		45	0.008 (±0.000) ^{abc}	0.9691	10.08	86.64 (±0.00) ^j	
		50	0.045 (±0.001) ^{def}	0.9892	4.51	15.41 (±0.34) ^{cde}	
		55	0.075 (±0.001) ^k	0.9974	3.60	9.24 (±0.12) ^{abce}	
		60	0.159 (±0.001) ^p	0.9844	10.33	4.37 (±0.01) ^{abc}	
7.0		40	0.003 (±0.000) ^a	0.9754	10.17	231.05 (±0.00) ^o	
		45	0.010 (±0.000) ^{abc}	0.9918	6.97	69.31 (±0.00) ⁱ	
		50	0.064 (±0.002) ^{ij}	0.9872	8.47	10.92 (±0.26) ^{abcde}	
		55	0.096 (±0.001) ^l	0.9838	8.48	7.22 (±0.08) ^{abcde}	
		60	0.297 (±0.008) ⁱ	0.9871	6.90	2.34 (±0.06) ^{ab}	

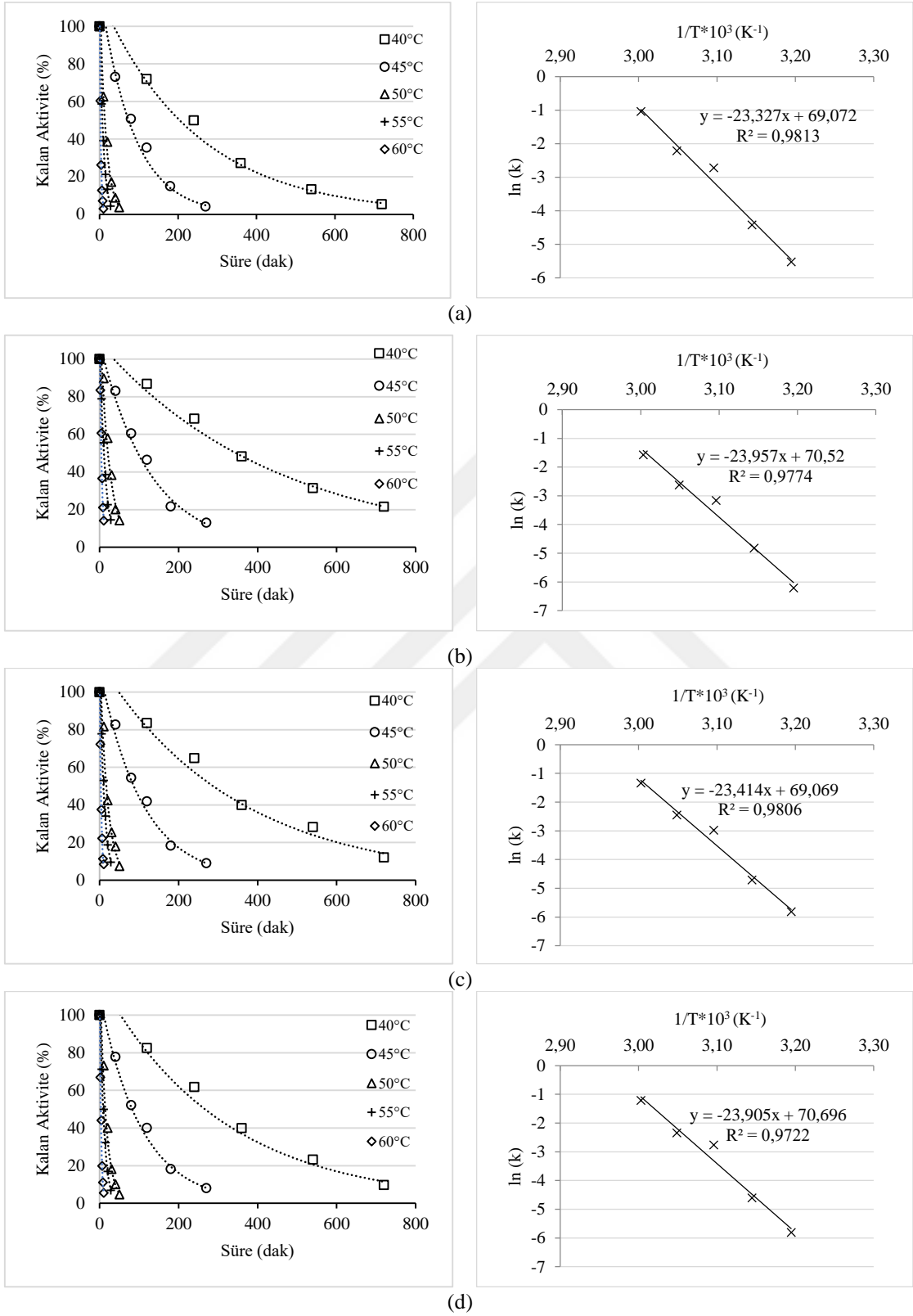
^{a-w} Aynı sütunda bulunan farklı üst simgeye sahip ortalama hız sabiti ve yarı ömür süreleri istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.15. pH 5.0'te farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modelden tahminlenen değeri temsil etmektedir)



Şekil 4.16. pH 6,0'da farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modelden tahminlenen değeri temsil etmektedir)



Şekil 4.17. pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda kalan aktivite (%) değerleri ve Arrhenius eğrileri (a) UPDK-YE, (b) UPDK, (c) GDK, (d) GPK (Kesikli çizgiler modellenen tahminlenen değeri temsil etmektedir)

Enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişiminde, aktivasyon entalpisi (ΔH), Gibbs serbest enerjisi (ΔG) ve aktivasyon entropisi (ΔS) gibi termodinamik parametrelerin hesaplanması ile proteinlerin sıcaklığa bağlı denatürasyon olayının daha iyi anlaşılması sağlanabilmektedir (Longo ve Combes, 1999). Dört farklı örnek için farklı koşullarda belirlenen ΔH , ΔG ve ΔS değerleri Çizelge 4.33'te verilmiştir. ΔH değerleri incelendiğinde, aktivasyon entalpisinin sıcaklıktan bağımsız olduğu, dolayısı ile enzimin ısı kapasitesinde değişim olmadığı görülmektedir. Benzer şekilde Souza ve ark. (2009), mTG enziminin ısıl stabilitesini inceledikleri çalışmada aktivasyon entalpisinin sıcaklıktan bağımsız olduğunu bildirmişlerdir. ΔH değeri, protein denatürasyonu sırasında parçalanmış kovalent olmayan bağların sayısı ile ilişkilendirilmektedir ve yüksek ΔH değeri, protein molekülünde bulunan kovalent olmayan bağların sayısının fazlalığı ile açıklanmaktadır (Busto ve ark., 1999).

Protein stabilitesi ile doğrudan ilişkili olan serbest enerji (ΔG), değişim reaksiyonlarında genel olarak sıcaklığın etkisini göstermektedir ve artan ΔG değerleri enzim stabilitesinin arttığını bir ifadesidir (Longo ve Combes, 1999; Souza ve ark., 2009). Yapılan ısıl stabilite çalışmasında ΔG değerlerinin tüm koşullarda pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.33). Çalışmada hesaplanan ΔG değerleri, tüm örneklerde ve farklı pH değerlerinde sıcaklık artışı ile birlikte azalma eğilimindedir. Bu durum, sıcaklığın yükselmesi ile birlikte protein denatürasyonunun arttığını göstermektedir. Ayrıca, mikroenkapsüle örneklerde ΔG değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve dolayısı ile ortamda kaplama materyallerinin bulunmasının protein denatürasyonunu azalttığı düşünülmektedir.

Farklı örnekler için farklı koşullarda hesaplanan ΔS değerlerinin tüm koşullarda pozitif olduğu Çizelge 4.33'te görülmektedir. Sistem düzensizliğinin arttığını ifade eden pozitif ΔS değerleri enzim denatürasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Sistem entropisindeki değişim ne kadar az ise, enzimin sıcaklığa karşı göstermiş olduğu direnç o kadar fazla demektir (Marangoni, 2003). Çalışmada tüm örnekler için en düşük ΔS değerleri pH 6.0 koşulunda elde edilmiş ve bu durum pH 6.0'da enzimin üç boyutlu yapısının daha iyi korunması ile açıklanmıştır. Ayrıca, protein denatüre olduğunda ΔS değerlerinin artması, polar olmayan grupların yüksek serbestlik derecesi, yani moleküler hareketin artması sonucunda kazanılan entropi ile de açıklanabilmektedir (Souza ve ark., 2009).

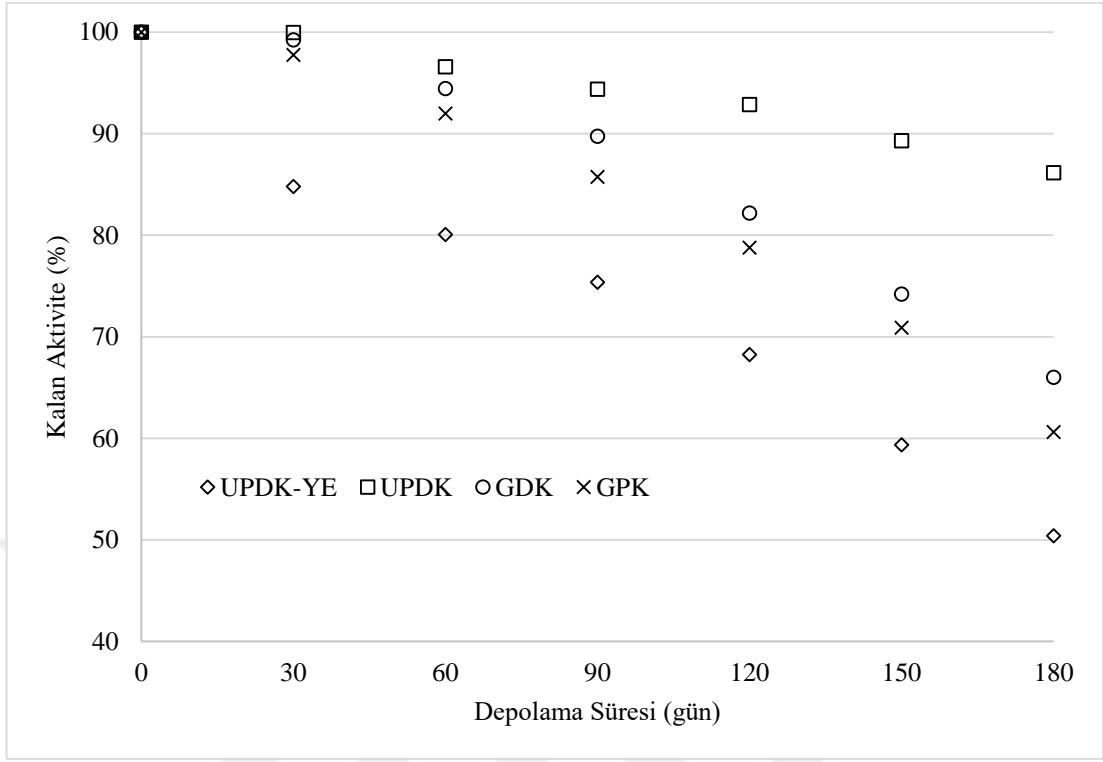
Literatürde farklı mikrobiyal kaynaklardan üretilen mTG enziminin ısıl stabilitesinin belirlendiği çalışmalar bulunmasına rağmen (Menéndez ve ark., 2006; Cui ve ark., 2008; Souza ve ark., 2009) farklı mikroenkapsülasyon yöntemlerinin ve farklı pH koşullarının ısıl stabiliteye olan etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çizelge 4.33. UPDK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklere ait aktivasyon parametreleri

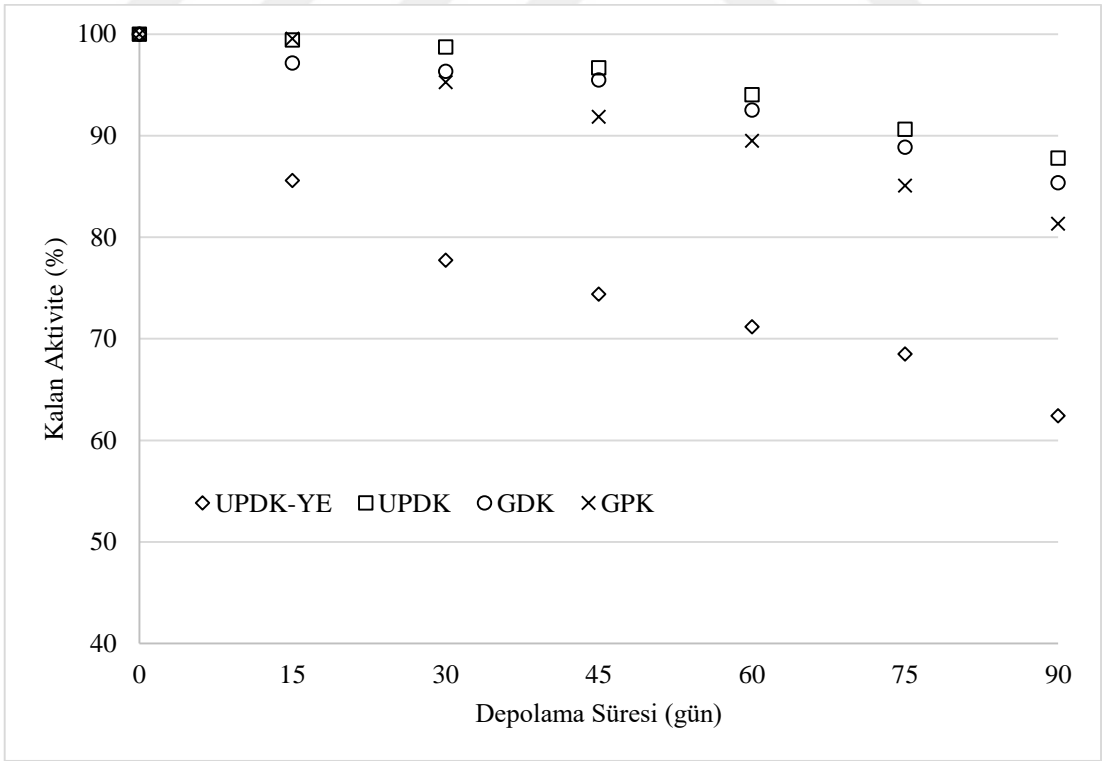
Parametre	Sıcaklık (°C)	pH 5.0				pH 6.0				pH 7.0			
		UPDK -YE	UPDK	GDK	GPK	UPDK -YE	UPDK	GDK	GPK	UPDK -YE	UPDK	GDK	GPK
E _a (kJ/mol)	-	199.1 (±0.8)	205.0 (±0.4)	206.5 (±0.2)	210.5 (±1.0)	176.2 (±0.3)	182.2 (±4.8)	187.8 (±0.4)	176.7 (±0.3)	193.9 (±0.6)	199.4 (±0.5)	194.6 (±1.7)	198.8 (±1.0)
	40	196.5 (±0.8)	202.4 (±0.4)	203.9 (±0.2)	207.9 (±1.0)	173.6 (±0.3)	179.6 (±4.8)	185.2 (±0.4)	174.1 (±0.3)	191.3 (±0.6)	196.8 (±0.5)	192.0 (±1.7)	196.2 (±1.0)
	45	196.5 (±0.8)	202.3 (±0.4)	203.8 (±0.2)	207.9 (±1.0)	173.6 (±0.3)	179.5 (±4.8)	185.2 (±0.4)	174.1 (±0.3)	191.3 (±0.6)	196.7 (±0.5)	192.0 (±1.7)	196.1 (±1.0)
	50	196.4 (±0.8)	202.3 (±0.4)	203.8 (±0.2)	207.8 (±1.0)	173.5 (±0.3)	179.5 (±4.8)	185.1 (±0.4)	174.0 (±0.3)	191.2 (±0.6)	196.7 (±0.5)	192.0 (±1.7)	196.1 (±1.0)
	55	196.3 (±0.8)	202.2 (±0.4)	203.7 (±0.2)	207.8 (±1.0)	173.5 (±0.3)	179.4 (±4.8)	185.1 (±0.4)	173.9 (±0.3)	191.1 (±0.6)	196.6 (±0.5)	191.9 (±1.7)	196.0 (±1.0)
	60	196.3 (±0.8)	202.2 (±0.4)	203.7 (±0.2)	207.8 (±1.0)	173.5 (±0.3)	179.4 (±4.8)	185.1 (±0.4)	173.9 (±0.3)	191.1 (±0.6)	196.6 (±0.5)	191.9 (±1.7)	196.0 (±1.0)
ΔG (kJ/mol)	40	89.4 (±0.1)	91.9 (±0.0)	90.6 (±0.0)	90.6 (±0.0)	91.2 (±0.0)	93.0 (±0.1)	93.0 (±0.0)	91.9 (±0.0)	91.2 (±0.0)	93.0 (±0.0)	91.9 (±0.1)	91.9 (±0.0)
	45	88.9 (±0.0)	89.6 (±0.0)	89.3 (±0.1)	89.2 (±0.0)	90.3 (±0.0)	91.7 (±0.4)	91.2 (±0.0)	90.9 (±0.0)	89.8 (±0.0)	90.9 (±0.0)	90.7 (±0.2)	90.3 (±0.0)
	50	86.7 (±0.8)	87.5 (±0.0)	87.0 (±0.0)	87.0 (±0.0)	86.8 (±0.1)	88.3 (±0.0)	87.7 (±0.0)	87.7 (±0.1)	86.7 (±0.0)	87.9 (±0.0)	87.3 (±0.0)	86.8 (±0.1)
	55	85.0 (±0.0)	86.2 (±0.0)	85.9 (±0.0)	85.7 (±0.0)	87.3 (±0.1)	88.7 (±0.0)	88.3 (±0.0)	87.7 (±0.0)	86.7 (±0.0)	87.8 (±0.0)	87.3 (±0.0)	87.0 (±0.0)
	60	82.8 (±0.0)	84.8 (±0.0)	83.2 (±0.0)	83.0 (±0.1)	86.2 (±0.0)	87.6 (±0.0)	87.1 (±0.0)	87.0 (±0.0)	84.8 (±0.1)	86.3 (±0.0)	85.6 (±0.0)	85.3 (±0.1)
	60	342.0 (±2.2)	352.7 (±1.3)	361.7 (±0.7)	374.6 (±3.2)	263.2 (±1.0)	275.3 (±14.8)	289.9 (±1.1)	262.4 (±1.0)	319.7 (±2.0)	331.4 (±1.7)	319.7 (±5.2)	332.9 (±3.3)
ΔS (J/mol.K)	40	338.2 (±2.4)	354.5 (±1.2)	360.0 (±0.4)	373.1 (±3.2)	261.9 (±1.0)	275.0 (±13.6)	295.4 (±1.1)	261.5 (±1.0)	318.9 (±2.1)	332.8 (±1.7)	318.4 (±5.9)	332.8 (±3.3)
	45	339.6 (±4.8)	355.4 (±1.2)	361.5 (±0.7)	373.9 (±3.1)	268.5 (±1.2)	281.0 (±14.9)	301.5 (±1.2)	267.2 (±0.8)	323.5 (±1.9)	336.6 (±1.5)	323.8 (±5.2)	338.4 (±3.0)
	50	339.4 (±2.3)	353.8 (±1.3)	359.0 (±0.7)	372.2 (±3.1)	262.8 (±1.1)	275.4 (±14.5)	295.1 (±1.2)	263.0 (±1.1)	318.5 (±1.9)	331.7 (±1.7)	318.8 (±5.3)	332.3 (±3.2)
	55	340.9 (±2.2)	352.4 (±1.2)	361.6 (±0.5)	374.5 (±3.3)	262.0 (±0.9)	274.4 (±14.4)	294.0 (±1.1)	261.0 (±1.0)	319.2 (±2.0)	331.2 (±1.7)	319.0 (±5.3)	332.5 (±3.3)
	60	339.4 (±2.2)	353.8 (±1.2)	359.0 (±0.5)	372.2 (±3.3)	262.8 (±0.9)	275.4 (±14.4)	295.1 (±1.1)	263.0 (±1.0)	318.5 (±2.0)	331.7 (±1.7)	318.8 (±5.3)	332.3 (±3.3)
	60	340.9 (±2.2)	352.4 (±1.2)	361.6 (±0.5)	374.5 (±3.3)	262.0 (±0.9)	274.4 (±14.4)	294.0 (±1.1)	261.0 (±1.0)	319.2 (±2.0)	331.2 (±1.7)	319.0 (±5.3)	332.5 (±3.3)

4.6 Farklı Yöntemlerle Üretilen Örneklerin Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen enzim örnekleri iki farklı koşulda depolanmış ve depolama stabilitesi belirlenmiştir. Örnekler alüminyum kaplı polietilen (ALPE) ambalaj materyali içerisinde 25°C %50 RH'da 180 gün ve 38°C %90 RH'da 90 gün süre ile depolanarak kalan aktiviteleri (%) belirlenmiştir (Şekil 4.18). Her iki depolama koşulunda farklı pH, yüksek sıcaklık ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi depolama süresince takip edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.18. UPRK-YE ve farklı yöntemlerle mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı depolama koşullarında kalan aktivite (%) değerleri (a) 25°C, %50 RH, (b) 38°C, %90 RH

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve PDK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için 38°C ve %90 RH (90 gün) depolama koşulunda her 15 günde bir, 25°C ve %50 RH (180 gün) depolama koşulunda her 30 günde bir aktivite tayini yapılarak kalan aktivite değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.18). Tüm örneklerde 38°C ve %90 RH depolama koşulunda, yüksek sıcaklık ve yüksek bağıl neme bağlı olarak aktivite kaybının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 25°C ve %50 RH koşulunda 90 gün sonunda kalan aktivite değerleri UPDK-YE için ~%75 iken UPDK, GDK ve PDK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için sırasıyla, ~%94, 90 ve 86 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18a). 38°C ve %90 RH koşulunda ise 90 gün sonunda kalan aktivite değerleri UPDK-YE için ~%62, UPDK, GDK ve PDK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örnekler için sırasıyla ~%89, 85 ve 81 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18b).

Elde edilen sonuçlara göre, her iki depolama koşulunda, depolama süresince en fazla aktivite kaybına uğrayan örnekler UPDK-YE örnekleri olmuştur. Yapılan çalışmada, farklı yöntemlerle gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemlerinin mTG enziminin depolama stabilitesini artırdığı tespit edilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi ile enzim aktivitesinin depolama koşullarına karşı daha stabil hale gelmesi, kaplama materyallerinin enzim moleküllerini koruma mekanizmaları ile ilişkilidir. Proteinlerin depolama sırasında stabilizasyonun sağlanabilmesi ancak doğru kaplama materyali seçimi ve doğru mikroenkapsülasyon yöntemi ile mümkün olabilir. Düşük moleküler ağırlığa sahip karbonhidratlar, proteinler ile daha sıkı interaksiyona girerek moleküler düzeyde hareketliliği azaltsa da, camsı yapı oluşturmaları oldukça güçtür. Bu nedenle camsı yapının oluşabilmesi ve proteinlerin depolama sırasında daha iyi korunabilmesi için yüksek moleküler ağırlıklı, yüksek camsı geçiş sıcaklığına (T_g) sahip kaplama materyallerin seçimi önemlidir (Mensink ve ark., 2017). Moleküler ağırlık ve nem içeriği gibi özelliklerden etkilenen T_g değeri arttıkça materyalin işleme ve depolama sırasındaki stabilitesi artmaktadır (Beristain ve ark., 2002; Bhandari ve Hartel, 2005). Mikroenkapsülasyon işleminde yüksek moleküler ağırlığa sahip gam arabik ve inülinin karışım halinde kullanımı ile elde edilen partiküllerin sahip olduğu yüksek T_g değeri sayesinde farklı yöntemlerle üretilen mikroenkapsüle örneklerin aktivitesini her iki depolama koşulunda da UPDK-YE örneklerine göre daha iyi koruduğu düşünülmektedir. Amid ve ark. (2014), α -amilaz enziminin gam arabik ve kitosan karışımı kullanarak GDK ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada,

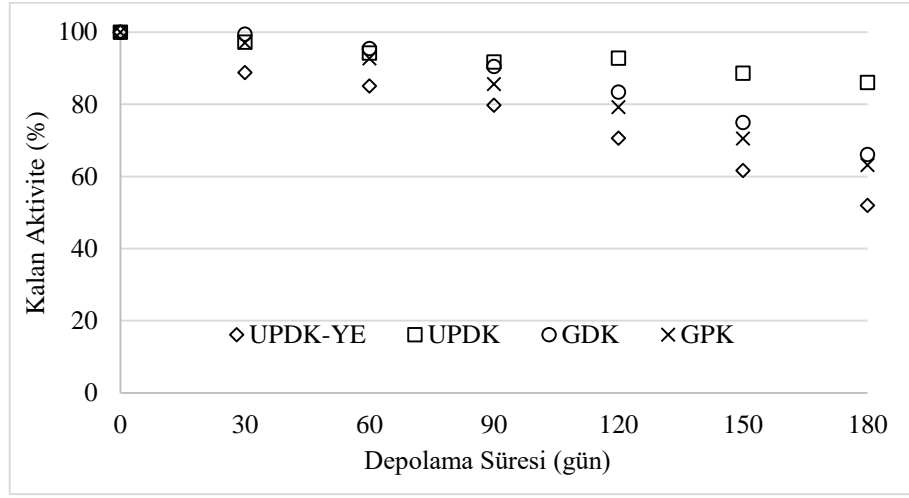
mikroenkapsüle enzim örneklerinin kaplanmamış örneklere oranla daha uzun süre depolanabildiklerini bildirmişler, gam arabik ve kitosan varlığında dondurarak kurutma ile oluşturulan rijid matriks sayesinde enzimin depolama sırasında oksidasyona karşı daha dayanıklı hale geldiğini belirtmişlerdir. Tonnis ve ark. (2015), amorf yapıdaki inülinin dondurarak kurutma sırasında protein molekülleri ile oluşturduğu yapının depolama sırasında proteinleri koruduğunu bildirmişlerdir. Teekamp ve ark. (2017), β -galaktosidaz enzimini pullulan ve trehaloz kullanarak GDK işlemi ile mikroenkapsüle ettikleri çalışmada, pullulanın yüksek moleküler ağırlığı sayesinde oldukça yüksek T_g değerine sahip ürünler elde edildiğini ve pullulanın trehalozun kristalizasyonunu önlediğini bildirmişler, elde edilen mikroenkapsüle enzimin depolama stabilitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Kreilgaard ve ark. (1999), lipaz enzimini sükroz ve trehaloz kullanarak GDK ile mikroenkapsüle etmişler ve farklı oranda kaplama materyali içeren örneklerin depolama sırasındaki aktivite değişimini takip etmişlerdir. Araştırmacılar, düşük moleküler ağırlığa sahip sükrozun depolama sırasında kristalleşme eğiliminde olduğunu ve enzim aktivitesini düşürücü yönde rol oynadığını ifade etmişler, buna karşın trehaloz için belirledikleri yüksek T_g değerine bağlı olarak amorf yapının ve enzim aktivitesinin depolama sırasında daha iyi korunduğunu belirtmişlerdir.

Mikroenkapsülasyon işleminin enzim aktivitesini korumasının yanı sıra, UPDK-YE örneklerinin sahip olduğu yüksek SYA ve gözenek hacmi nedeniyle depolama sırasında enzim moleküllerinin daha fazla oksijen ile temas etmesine bağlı olarak enzim aktivitesinin daha hızlı azaldığı düşünülmektedir. UPDK-YE örneklerinin gözenekli yapısı SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.

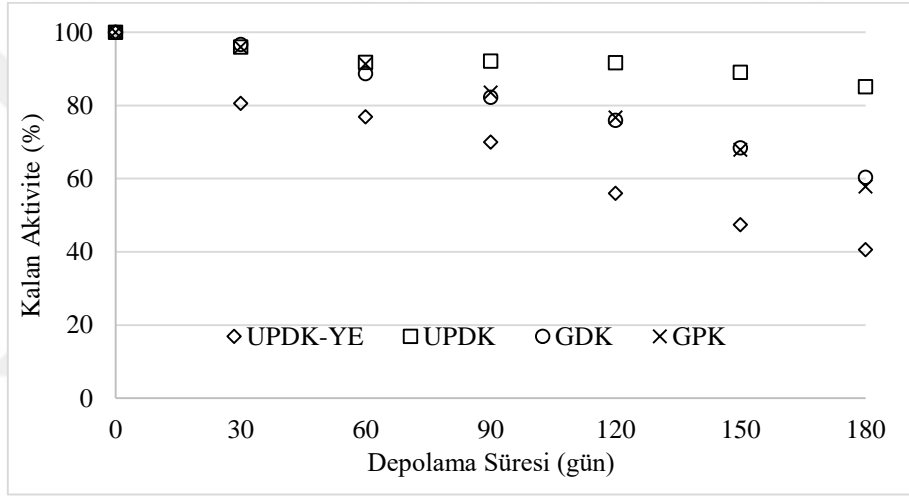
Farklı yöntemler ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilen mTG enziminin depolama stabilitesi karşılaştırıldığında, UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin aktivite açısından depolama koşullarına karşı göstermiş olduğu direncin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. GPK ile mikroenkapsüle edilen partiküllerin, UPDK ve GDK ile elde edilen örneklere göre yüksek SYA ve gözenek hacmine bağlı olarak depolama süresince oksidasyona bağlı protein denatürasyonunun daha fazla gerçekleştiği ve kalan aktivite değerlerindeki düşüşün daha hızlı olduğu düşünülmektedir.

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen enzim örneklerinin farklı pH (pH 3.0 ve pH 8.0) ve yüksek sıcaklıkta (80°C) stabilitelerindeki değişim iki farklı depolama koşulunda belirlenmiştir. Tüm örnekler için 0. gün koşulundaki enzim aktivitesi üzerine ekstrem pH ve yüksek sıcaklık uygulaması sonucunda elde edilen aktivite değerleri 100 kabul edilmiş, 25°C ve %50 RH depolama koşulunda kalan aktivitedeki değişimler Şekil 4.19'da, 38°C ve %90 RH depolama koşulundaki değişimler ise Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Her iki depolama koşulunda da, en yüksek değerlerin UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde, en düşük değerlerin ise UPDK-YE örneklerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20).

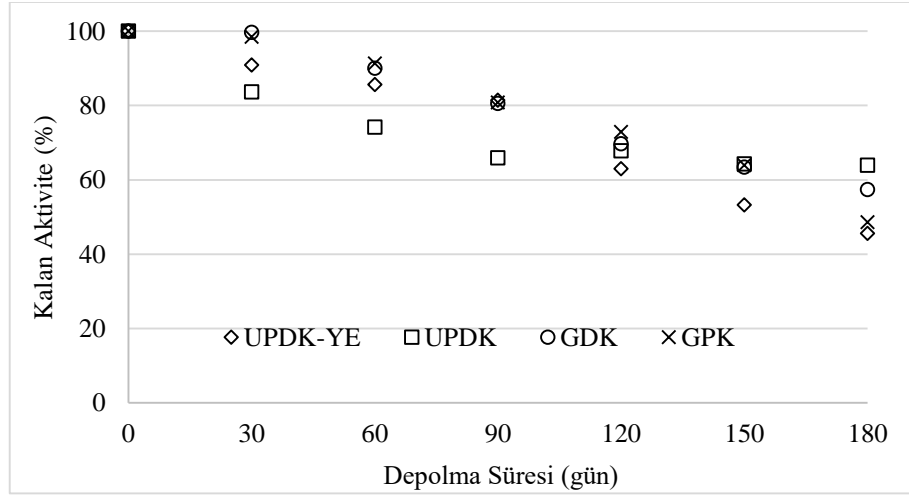
UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen enzim örneklerinin farklı metal iyonları (Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2}) ve EDTA varlığında stabilitelerindeki değişim iki farklı depolama koşulunda belirlenmiştir. Farklı örnekler için 0. gün koşulundaki enzim aktivitesi üzerine farklı metal iyonları ve EDTA'nın etkisi sonucunda elde edilen aktivite değerleri 100 kabul edilerek, 25°C ve %50 RH depolama koşulunda kalan aktivitedeki değişimler Şekil 4.21'de, 38°C ve %90 RH depolama koşulundaki değişimler ise Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Her iki depolama koşulunda da, hiçbir örnek için Zn^{+2} iyonu varlığında aktivite tespit edilememiş, bu nedenle Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de sadece EDTA, Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} iyonları varlığında aktivitedeki değişim verilmiştir. Depolama süresince enzim aktivitesindeki düşüşün tüm örneklerde 38°C ve %90 RH depolama koşulunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



(a)

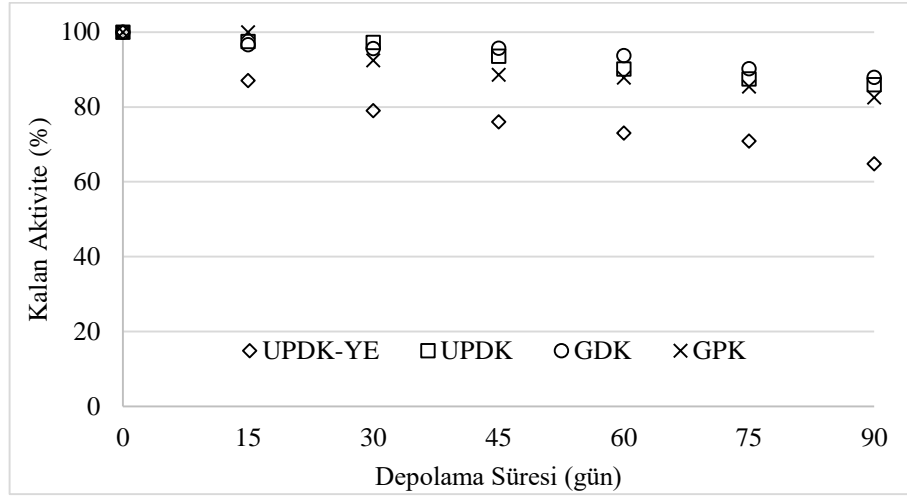


(b)

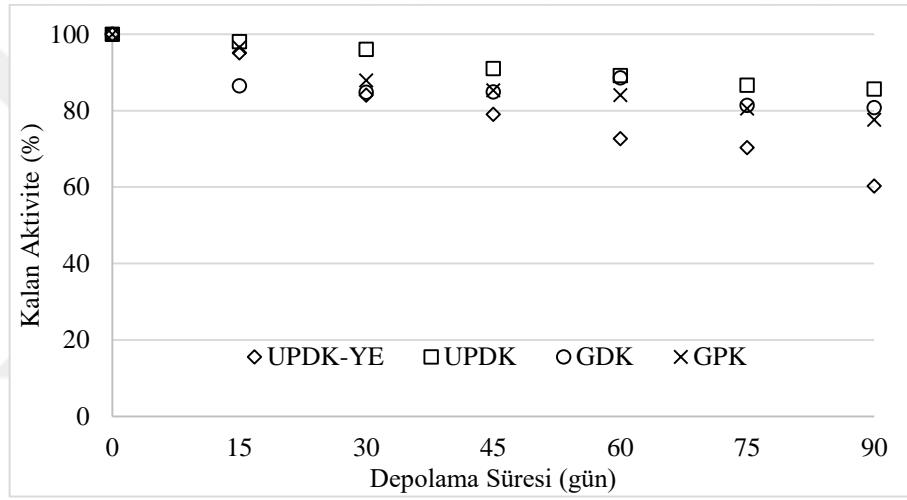


(c)

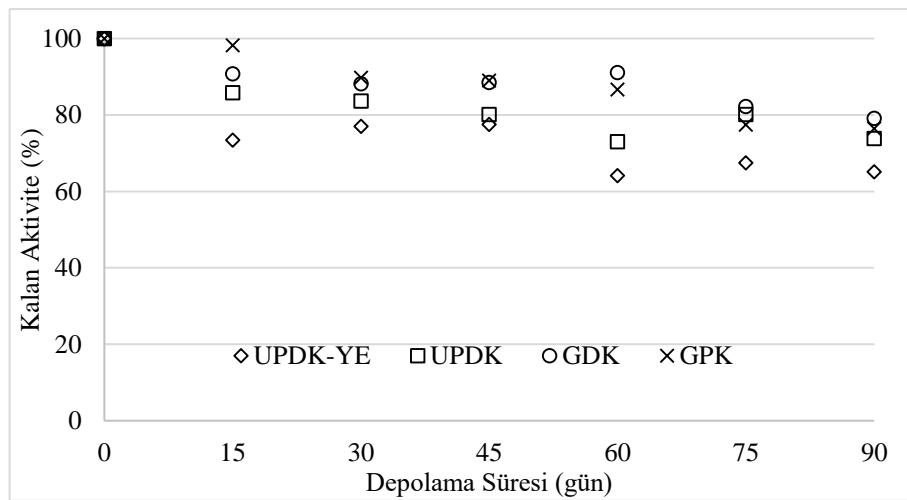
Şekil 4.19. 25°C %50 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta stabilitelemlerindeki değişim (a) pH 3.0 (b) pH 8.0 (c) 80°C



(a)

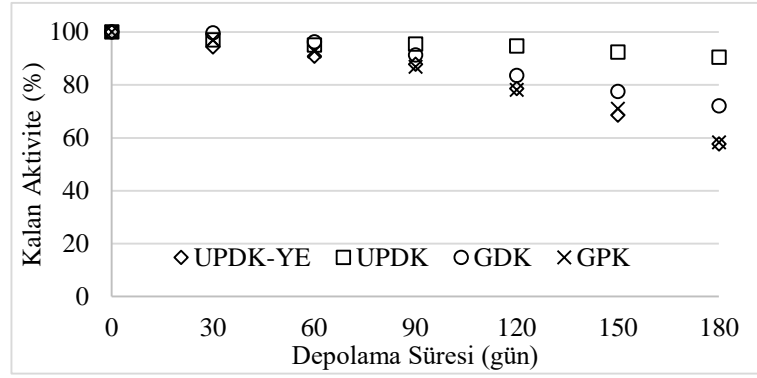


(b)

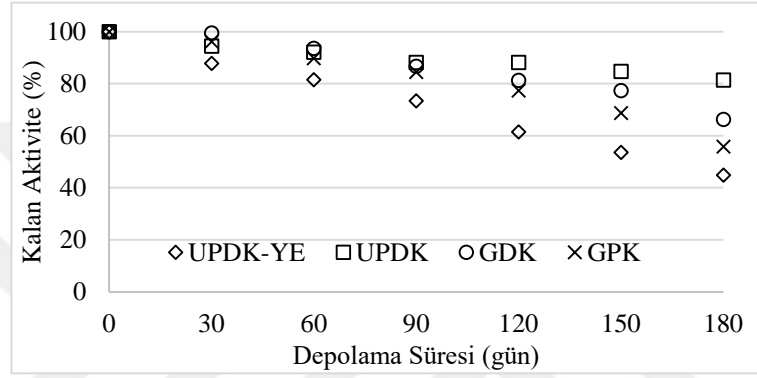


(c)

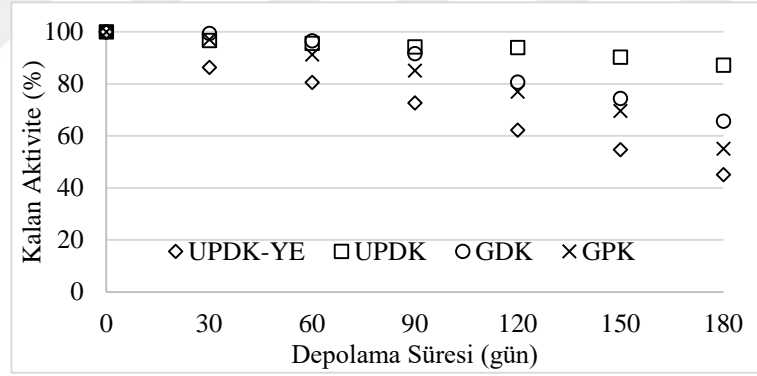
Şekil 4.20. 38°C %90 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve yüksek sıcaklıkta stabilitelemlerindeki değişim (a) pH 3.0 (b) pH 8.0 (c) 80°C



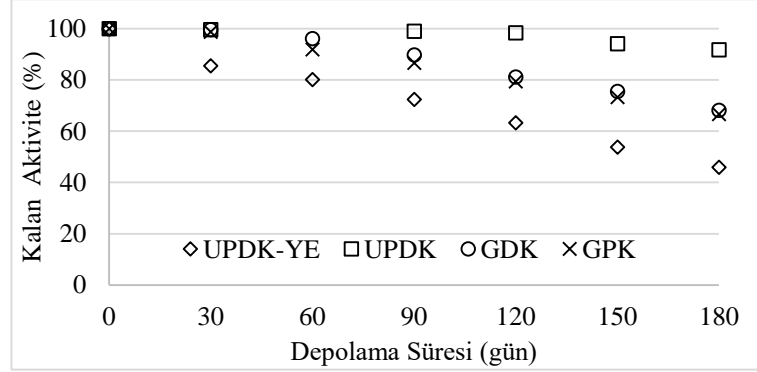
(a)



(b)

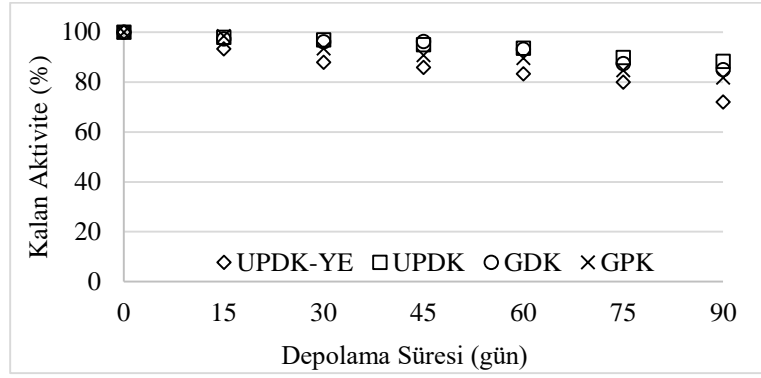


(c)

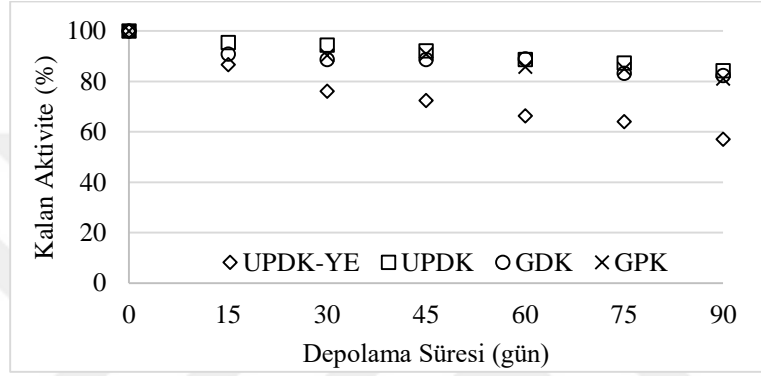


(d)

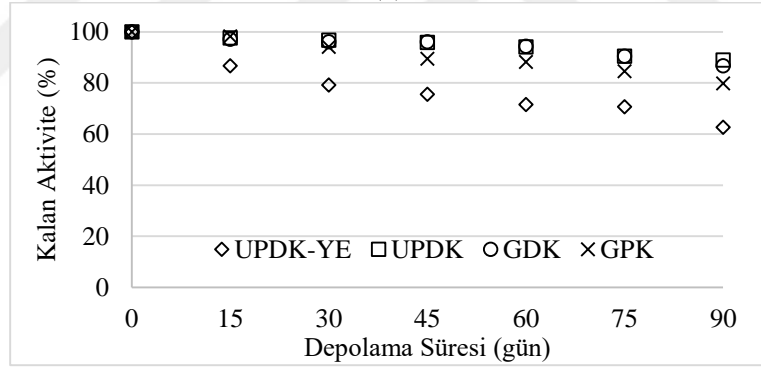
Şekil 4.21. 25°C %50 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında stabilitelerindeki değişim (a) EDTA (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺²



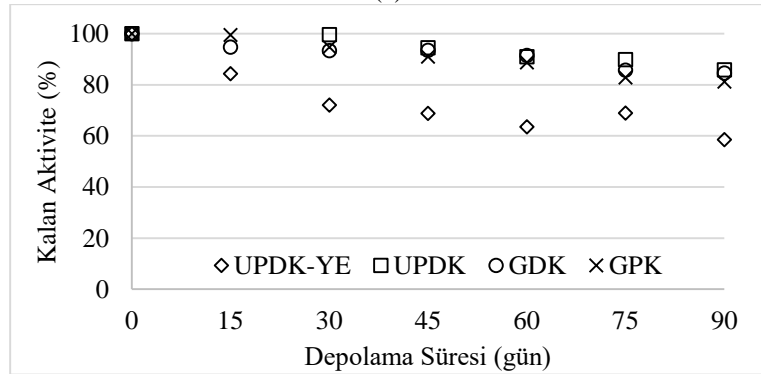
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.22. 38°C %90 RH koşulunda UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK işlemleri ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı metal iyonları ve EDTA varlığında stabilitelerindeki değişim (a) EDTA (b) Fe⁺² (c) Ca⁺² (d) Co⁺²

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, *Streptomyces mobaraensis* suşu tarafından üretilen mTG enziminin kısmi saflaştırılması gerçekleştirildikten sonra ilk olarak enzim UPDK işlemi ile kurutulmuş, daha sonra farklı kaplama materyalleri kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir. UPDK ile mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda belirlenen optimum kaplama materyali oranı ve optimum işlem koşulunda elde edilen örnekler enzim aktivitesi, fiziksel özellikler, ısıl stabilite ve depolama stabilitesi açısından geleneksel yöntemler ile mikroenkapsülenmiş örneklerle karşılaştırılmıştır.

Yalın mTG enziminin UPDK işlemi sırasında işlem basamaklarının (püskürtme, donma, kurutma) her birinin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış, maksimum enzim aktivitesini sağlayan optimum ultrasonik püskürtme işlem koşulu tek faktörlü dizayn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin ultrasonik püskürtme ve donma aşamasında azalmadığı, aksine tüm koşullarda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim aktivitesindeki düşüşün tamamen kurutma aşamasında gerçekleştiği, hesaplanan kurutma sonrası kalan aktivite değerleri ile belirlenmiştir. İşlem değişkenlerinden besleme debisi ve nozul frekansının kalan aktivite üzerine etkisi olduğu bulgulanmış, yüksek frekansta nozul (120 kHz) kullanıldığında artan mekanik stres sonucunda kalan aktivite değerlerinin azaldığı görülmüştür. Yalın enzimin UPDK işleminde optimum besleme debisi 6.37 ml/dak ve optimum nozul frekansı 48 kHz olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum nokta deneysel olarak doğrulanmış, tahminlenen kalan aktivite ile deneysel kalan aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

UPDK işlemi sırasında aktivite kayıplarının önlenmesi ve enzim stabilitesinin artırılması amacıyla mTG enziminin farklı kaplama materyalleri kullanılarak mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. UPDK işlemi ile elde edilen mikroenkapsüle mTG enzimi için optimum işlem koşulları D-optimal birleşik dizayn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir deneme sonrası aktivite üzerine farklı metal iyonları, pH ve yüksek sıcaklığın etkisi belirlenmiş ve tüm koşullarda fiziksel analizler (yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, renk, porozite, kekleşme, akabilirlik, nem, su aktivitesi, dağılılabilirlik, çözünübilirlik, ıslanabilirlik) gerçekleştirilmiştir. Kurutma

işlemi sonrasında maksimum aktivitenin sağlandığı koşul ise optimum nokta olarak saptanmıştır. Design Expert 7.0 paket programı kullanılarak “desirability” fonksiyonu yaklaşımı ile, kaplama materyalleri olarak gam arabik oranının %40, inülin oranının %60 olduğu, işlem koşulları olarak besleme debisinin 6.83 ml/dak ve nozul frekansının ise 48 kHz olduğu koşul optimum nokta olarak belirlenmiştir. Kalan aktivite için doğrulama denemelerinden elde edilen sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Farklı pH ve yüksek sıcaklık koşullarının enzim aktivitesine etkisi deneme desenine göre her koşulda belirlenmiş ve sonuçlar model yanıtı olarak incelenmiştir. Elde edilen mikroenkapsüle mTG enziminin asidik pH değerlerine (pH 3.0) karşı oldukça dirençli olduğu, alkali pH değerlerinde (pH 8.0) ise aktivitedeki düşüşün daha fazla olduğu belirlenmiştir. Mikroenkapsüle mTG enzim örneklerinin yüksek sıcaklığa (80°C) karşı stabilitesinin literatürde yer alan yalın enzim çalışmalarına oranla oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı metal iyonları ve EDTA varlığında, deneme desenine göre tüm koşullarda kalan aktivite değerleri belirlenmiş ve elde edilen değerler model yanıtı olarak incelenmiştir. Tüm koşullarda, EDTA şelatlaştırıcı özelliği ile enzim aktivitesini artırıcı etki göstermiş, ancak farklı metal iyonları (Fe^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2}) varlığında enzim aktivitesinde değişen oranlarda düşüş gözlenmiştir.

UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminde, deneme desenine göre farklı koşullarda elde edilen ürünlerin nem içeriği, a_w , renk değerleri (L^* , a^* , b^*), yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk, partikül yoğunluğu, porozite, kekleşme, akabilirlik gibi fiziksel özellikleri ile dağılıbilirlik, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik gibi yeniden yapılandırma özellikleri belirlenmiştir. Nem içeriği ve a_w değerlerinin kaplama materyali olarak inülin kullanıldığında azaldığı tespit edilmiştir. Renk değerlerinin kaplama materyallerinin farklı oranlarda kullanımı ile farklılık gösterdiği bulgulanmıştır. Elde edilen mikroenkapsüle örneklerin akabilirliğinin ve kekleşme özelliklerinin kötü, dağılıbilirlik, çözünebilirlik ve ıslanabilirlik gibi yeniden yapılandırma özelliklerinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir.

UPDK ile mikroenkapsülasyon işleminde belirlenen optimum noktada üretilen mikroenkapsüle mTG ile UPDK-YE, GDK ve GPK ile mikroenkapsüle edilen örnekler kalan aktivite, fiziksel özellikler, partikül boyutu, SYA, gözenek boyutu dağılımı ve

partikül morfolojisi açısından karşılaştırılmıştır. UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerinin geleneksel yöntemlerle elde edilen mikroenkapsüle örnekler ve UPDK-YE'e göre oldukça yüksek kalan aktivite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, düşük pH (pH 3.0) ve yüksek sıcaklık (80°C) koşullarında en yüksek kalan aktivite değerleri UPDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde tespit edilmiştir. Tüm örnekler fiziksel özellikler açısından incelendiğinde, yüksek çözünübilirlik ve dağılıbilirlik değerlerine ulaşılmıştır. Buna karşın tüm örneklerin akış özelliklerinin zayıf olduğu bulgulanmıştır. En düşük nem içeriğine ve a_w değerlerine sahip örneklerin GPK ile üretilen örnekler olduğu bulgulanmış, en yüksek değerler ise GDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde tespit edilmiştir. UPDK örneklerinin nem içeriği açısından da GDK örneklerine göre üstün olduğu belirlenmiştir. UPDK ile mikroenkapsüle edilmiş mTG örnekleri özellikle ıslanabilirlik açısından diğer örneklerle göre oldukça üstündür. Örneklerin partikül boyutu ve partikül boyut dağılımlarına bakıldığında, UPDK-YE örneklerinin GDK-YE örneklerine göre daha küçük partikül boyutuna ve daha dar bir aralıkta değişen partikül boyut dağılımına sahip olduğu tespit edilmiş, bu durum UPDK işleminde kullanılan püskürtme ve hızlı donma aşamaları ile ilişkilendirilmiştir. Benzer durum, UPDK ve GDK ile mikroenkapsüle edilen örneklerde de görülmüş, UPDK işleminin GDK işlemine göre daha üniform partikül boyut dağılımı sağladığı ortaya konmuştur. SYA ve gözeneklilik için elde edilen sonuçlar incelendiğinde, UPDK-YE örneklerinin diğer örneklerle göre yüksek SYA'na ve gözenek hacmine sahip olduğu belirlenmiştir. Oluşan oldukça gözenekli yapı SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK ile mikroenkapsüle edilen örneklerin farklı pH ve sıcaklık koşullarında ısıl stabiliteleri belirlenmiş ve farklı örnekler için enzim inaktivasyonu birinci derece reaksiyon kinetiği ile açıklanmıştır. Mikroenkapsülasyon işleminin enzimin ısıl stabilitesini artırdığı tespit edilmiş, özellikle UPDK ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilen mTG örneklerinin en yüksek stabiliteye sahip olduğu bulgulanmıştır. Ayrıca aktivasyon enerjisi (E_a , kJ/mol), aktivasyon entalpisi (ΔH , kJ/mol), Gibbs serbest enerjisi (ΔG , kJ/mol) ve aktivasyon entropisi (ΔS , J/mol.K) gibi aktivasyon parametreleri her bir örnek ve her bir koşul için hesaplanmıştır. pH 6.0 koşulunda tüm örnekler için elde edilen daha düşük E_a değerleri, örneklerin bu koşulda sıcaklık artışından daha az etkilendiğini ortaya koymuş, ΔH , ΔG ve ΔS gibi

parametreler ile de mikroenkapsülasyon işleminin sıcaklık uygulamasına karşı enzim aktivitesini daha iyi koruduğu desteklenmiştir.

UPDK-YE ile UPDK, GDK ve GPK ile mikroenkapsüle edilen örnekler 25°C ve %50 RH'da 6 ay, 38°C ve %90 RH'da 3 ay süre ile depolanarak iki farklı koşulda depolama stabiliteleri belirlenmiştir. Her iki koşulda da, en düşük kalan aktivite değerine sahip olan örneklerin UPDK-YE örnekleri olduğu görülmüştür. UPDK-YE partiküllerinin sahip olduğu yüksek SYA ve büyük hacimdeki gözenekler nedeniyle oksidasyona bağlı enzim inaktivasyonu gerçekleşerek kalan aktivite değerlerinin azaldığı düşünülmektedir. Her iki depolama koşulunda mikroenkapsüle örnekler içinde en yüksek kalan aktivite değerlerinin UPDK işlemi ile mikroenkapsüle edilen örneklerde olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, özellikle gıda teknolojisi alanında oldukça yeni bir yöntem olan UPDK işleminin geleneksel kurutma yöntemlerine göre mikroenkapsülasyon işlemindeki başarısı ortaya konmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler, farklı biyoteknolojik materyallerin UPDK işlemi ile mikroenkapsülasyonunda işlem parametrelerinin belirlenmesini ve son ürün özelliklerinin öngörülmesini sağlayacak niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- Adamiec, J., Kaminski W., Markowski A.S. ve Strumiłło, C., 2006. Drying of biotechnological products. Handbook of Industrial Drying, Ed: A.S. Mujumdar. Taylor & Francis Group, LLC, Florida, 905-926.
- Adams, G., 2007. The principles of freeze-drying. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (Second Edition), Eds: J.G. Day, G.N. Stacey. Humana Press Inc., Totowa, 15-38.
- Akamittath, J.G., ve Ball, H.R.J., 1992. Transglutaminase mediated polymerization of crude actomyosin refined from mechanically deboned poultry meat. J. Muscle Foods, 3, 1-14.
- Al-Hakim, K. ve Stapley, A.G.F., 2004. Morphology of spray-dried and spray-freeze-dried whey powders. Drying 2004-Proceedings of the 14th international drying symposium, 1720-1726.
- Al-Hakim, K., Wigley, G. ve Stapley, A.G.F., 2006. Phase doppler anemometry studies of spray freezing. Chem. Eng. Res. Des., 84(A12), 1142-1151.
- Ali, M.E. ve Lamprecht, A., 2014. Spray freeze drying for dry powder inhalation of nanoparticles. Eur. J. Pharm. Biopharm., 87, 510-517.
- Ali, M.E. ve Lamprecht, A., 2017. Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. Int. J. Pharm., 516 (1), 170-177.
- Allison, S.D., Chang, B., Randolph, T.W., ve Carpenter, J.F., 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. Arch. Biochem. Biophys., 365 (2), 289-298.
- Amid, M., Manap, Y. ve Zohdi, K.N., 2014. Microencapsulation of purified amylase enzyme from pitaya (*hylocereus polyrhizus*) peel in arabic gum-chitosan using freeze drying. Molecules, 19, 3731-3743.
- Amine, K.M., Champagne, C.P., Salmeri, S., Britten, M., St-Gelais D., Fustier P. ve Lacroix M., 2014. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. LWT - Food Sci. Technol., 56, 111-117.
- Amorij, J.P., Meulenaar, J., Hinrichs, W.L.J., Stegmann, T., Huckriede, A., Coenen, F., ve Frijlink, H.W., 2007. Rational design of an influenza subunit vaccine powder with sugar glass technology: preventing conformational changes of haemagglutinin during freezing and freeze-drying. Vaccine, 25 (35), 6447-6457.
- Anandharamakrishnan, C., 2008. Experimental and computational fluid dynamics studies on spray-freeze-drying and spray-drying of proteins. (Ph.D.Diss.), Loughborough University, Leicestershire, UK.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C.D. ve Stapley, A.G.F., 2010. Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. Dairy Sci. Technol., 90 (2-3), 321-334.
- Anchordoquy, T.J., Izutsu, K.I., Randolph, T.W. ve Carpenter, J.F., 2001. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. Arch. Biochem. Biophys., 390 (1), 35-41.
- Ando, H., Adachi, M. ve Umeda, K., 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Agr. Biol. Chem., 53, 2613-2617.

- Anekella, K. ve Orsat, V., 2013. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Sci. Technol.*, 50 (1), 17-24.
- Anjani, K., Kailasapathy, K. ve Philips, M., 2007. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 17, 79–86.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O.E. ve Pilosof, A.M.R., 2012. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *J. Food Eng.* 108 (3), 463-472.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C. ve Young, B., 2001. Microencapsulation of food ingredients, *Food Aust.*, 53, 220-223.
- Balasubramani, P., Palaniswamy, P.T., Visvanathan, R., Thirupathi, V., Subbarayan, A. ve Maran, J.P., 2015. Microencapsulation of garlic oleoresin using maltodextrin as wallmaterial by spray drying technology. *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, 210-217.
- Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A. ve Mussatto, S.I., 2017. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chem.*, 237, 623-631.
- Banga, J.R., Balsa-Canto, E., Moles, C.G. ve Alonso, A.A., 2003. Improving food processing using modern optimization methods. *Trends Food Sci. Tech.*, 14 (4), 131-144.
- Barbosa-Cánovas, G., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H., 2005. *Food powders: physical properties, processing, and functionality*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., ve Petrovsky, N., 2010. Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *J. Excipients and Food Chem.*, 1 (3), 27-50.
- Barresi, A.A., Ghio, S., Fissore, D., ve Pisano, R., 2009. Freeze drying of pharmaceutical excipients close to collapse temperature: Influence of the process conditions on process time and product quality. *Dry. Technol.*, 27 (6), 805-816.
- Barron, M.K., Young, T.J., Johnston, K.P ve Williams, R.O., 2003. Investigation of processing parameters of spray freezing into liquid to prepare polyethylene glycol polymeric particles for drug delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 4 (2), 1-13.
- Beristain, C.I., Azuara, E., ve Vernon-Carter, E.J., 2002. Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis Juliflora*) as wall material. *J. Food Sci.*, 67 (1), 206-211.
- Bhandari, B.R., Patel K.C. ve Chen X.D., 2008. Spray drying of food materials - process and product characteristics. *Drying Technologies in Food Processing*, Eds: X.D. Chen, A.S. Mujumdar. Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, 113-157.
- Bhandari, B.R. ve Hartel, R.W., 2005. Phase transitions during food powder production and powder stability. *Encapsulated and powdered foods*, Ed: C. Onwulata. Taylor & Francis, New York, 261-292.
- Bhandari, B.R., D'Arc, B.R. ve Padukka, I., 1999. Encapsulation of lemon oil by paste method using β -cyclodextrin: Encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *J. Agr.Food Chem.*, 47 (12), 5194-5197.

- Bittner, B. ve Kissel T., 1999. Ultrasonic atomization for spray drying: a versatile technique for the preparation of protein loaded biodegradable microspheres, *J. Microencapsul.*, 16 (3), 325-341
- Bourneow, C., Benjakul, S. ve H-Kittikun A., 2012. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia sp.* C1112. *Asian J. Food Agr. Ind.*, 5 (3), 226-233.
- Box, J. ve Wilson, W., 1951. Central composites design. *J.R. Stat. Soc.*, 1, 1-35.
- Brady, J., Humistin, G.E. ve Heikkinen, H., 1980. Liquids and changes of state. *General Chemistry - Principles and Structure (2nd Ed.)*, Ed: J Brady, G.E. Humistin, H. Heikkinen. John Wiley, New York, 219-245.
- Breda, M., Vitolo, M., Duranti, M.A. ve Pitombo, R.N., 1992. Effect of freezing-thawing on invertase activity. *Cryobiology*, 29 (2), 281-290.
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B. ve Gremiao, M.P.D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int. J. Pharm.*, 264, 45-55.
- Burke, P.A., Klumb, L.A., Herberger, J.D., Nguyen, X.C., Harrell, R.A. ve Zordich, M., 2004. Poly (lactide-co-glycolide) microsphere formulations of darbepoetin alfa: spray drying is an alternative to encapsulation by spray-freeze drying. *Pharm. Res.*, 21 (3), 500-506.
- Busto, M.D., Apenten, R.O., Robinson, D.S., Wu, Z., Casey, R. ve Hughes, R.K., 1999. Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. *Food Chem.*, 65(3), 323-329.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M. ve Cal-Vidal, J., 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 6 (4), 420-428.
- Cano-Higueta, D.M., Malacrida, C.R. ve Telis, V.R.N., 2015. Stability of curcumin microencapsulated by spray and freeze drying in binary and ternary matrices of maltodextrin, gum arabic and modified starch. *J. Food Process. Pres.*, 39 (6), 2049-2060.
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z. ve Foster, P.R., 2003. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 82 (6), 684-690.
- Caparino, O.A., Tang, J., Nindo, C.I., Sablani, S.S., Powers, J.R. ve Fellman, J.K., 2012. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (*Philippine 'Carabao' var.*) powder. *J. Food Eng.*, 111 (1), 135-148.
- Capela, P., Hay, T.K.C. ve Shah, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* 39, 203-211.
- Carpenter, J.F. ve Crowe, J.H., 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28 (9), 3916-3922.
- Carr, R.L., 1965. Evaluating flow properties of solids. *Chem. Eng.* 72, 163-168.
- Ceballos, A.M., Giraldo, G.I. ve Orrego, C.E., 2012. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *J. Food Eng.*, 111 (2), 360-365.
- Christensen, K.L., Pedersen, G.P. ve Kristensen, H.G., 2001, Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *Int. J. Pharm.*, 212, 187-197.
- Claussen, I.C., Ustad, T.S., Strømmen, I. ve Walde, P.M., 2007. Atmospheric freeze drying-A review. *Dry. Technol.*, 25 (6), 947-957.

- Cobos, A. ve Estrada, P., 2003. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme Microb. Tech.*, 33 (6), 810-818.
- Constantino, H.R., Firouzabadian, L., Wu, C., Carrasquillo, K.G., Griebenow, K., Zale, S.E. ve Tracy, M.A., 2000. Protein spray freeze drying: Effect of formulation variables on particle size and stability. *J. Pharm. Sci.* 17 (11), 1374-1383.
- Costantino, H.R., Firouzabadian, L., Wu, C., Carrasquillo, K.G., Griebenow, K., Zale, S.E. ve Tracy, M.A., 2002. Protein spray freeze drying 2: Effect of formulation variables on particle size and stability. *J. Pharm. Sci.* 91 (2), 388-395.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D. ve Chen, J., 2008. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Bioresource Technol.*, 99 (9), 3794-3800.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H. ve Chen, J., 2007. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Food Chem.*, 105 (2), 612-618.
- Ćujić, N., Trifković, K., Bugarski, B., Ibrić, S., Pljevljakušić, D. ve Šavikin, K., 2016. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Ind. Crop. Prod.*, 86, 120-131.
- D'Addio, S.M., Chan, J.G.Y., Kwok, P.C.L., Prud'homme, R.K. ve Chan, H.K., 2012. Constant size, variable density aerosol particles by ultrasonic spray freeze drying. *Int. J. Pharm.*, 427 (2), 185-191.
- D'Addio, S.M., Chan, J.G.Y., Kwok, P.C.L., Benson, B.R., Prud'homme, R.K., Chan, H.K., 2013. Aerosol delivery of nanoparticles in uniform mannitol carriers formulated by ultrasonic spray freeze drying. *Pharm. Res.*, 30 (11), 2891-2901.
- Desai, K.G.H. ve Park, H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Dry. Technol.*, 23, 1361-1394.
- Desobry, A.S., Netto, M.F. ve Labuza, P.T., 1997. Comparison of spray drying, drum drying and freeze drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J. Food Sci.*, 62 (6), 1158-1162.
- Dezarn, T.G., 1995. Food ingredients encapsulation: An overview. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, Eds: S.J. Risch, G.A. Reineccius. ACS symposium series, Washington, DC: American Chemical Society, 74-86.
- Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L. ve Porta, R., 2011. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT -Food Sci. Technol.*, 44, 2324-2327.
- Dickinson, E., 1997. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends Food Sci. Tech.*, 8, 334-339.
- Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloid.*, 17, 25-39.
- Dima, C., Pătrașcu, L., Cantaragiu, A., Alexe, P. ve Dima, Ș., 2016. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. *Food Chem.*, 195, 39-48.
- Drooge, D.J.V., Hinrichs, W.L.J., Dickhoff, B.L.J., Elli, M.N.A., Visser, M.R., Zijlstra, G.S. ve Frijlink, H.W., 2005. Spray freeze drying to produce a stable Δ^9 -tetrahydrocannabinol containing inulin-based solid dispersion powder suitable for inhalation. *Eur. J. of Pharm. Sci.*, 26 (2), 231-240.
- Ekren, G.S., 2013. Production, purification and characterization of phytase from phytase producing fungus. (M.Sc. Thesis), Adnan Menderes University, Aydın.

- El-Hofi, M., Ismail, A., Nour, M. ve Ibrahim, O., 2014. Isolation, purification and characterisation of transglutaminase from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) leaves. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria*, 13 (3), 267-278.
- Engstrom, J.D., Simpson, D.T., Lai, E.S., Williams, R.O. ve Johnston, K.P., 2007. Morphology of protein particles produced by spray freezing of concentrated solutions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65 (2), 149-162.
- Eren, İ., 2004, Patateslerin osmotik dehidrasyonunun “response surface” metodu kullanılarak optimizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Eriksson, H.J.C., Hinrichs, W.L.J., van Veen, B., Somsen, G.W., de Jong, G.J. ve Frijlink, H.W., 2002. Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: I. Tablets prepared from stabilised alkaline phosphatase. *Int. J. Pharm.*, 249 (1), 59-70.
- Eriksson, H.J.C., Verweij, W.R., Poelstra, K., Hinrichs, W.L.J., de Jong, G.J., Somsen, G.W. ve Frijlink, H.W., 2003. Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: II: Delivery of an inulin-stabilised alkaline phosphatase in the intestinal lumen via the oral route. *Int. J. Pharm.*, 257 (1), 273-281.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C. ve Wold, S., 2008. *Design of Experiments. Principles and Applications*. Umetrics Academy, 459p, Sweden.
- Estevinho, B.N., Rocha F., Santos L. ve Alves A., 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. *Trends Food Sci. Tech.*, 31, 138-155.
- Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena B.S. ve Anandharamakrishnan, C., 2013. Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *J. Food Eng.*, 117, 513-520.
- Færgemand, M., Otte, J. ve Qvist, K.B., 1998. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *Int. Dairy J.*, 8 (8), 715-723.
- Fang, Z. ve Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols-A review. *Trends Food Sci. Tech.*, 21 (10), 510-523.
- Febriyenti, M.N., Mohamed, N., Hamdan, M.R., Salleh, S.N.M. ve bin Bai, S., 2014. Comparison of freeze drying and spray drying methods of Haruan extract. *Int. J. Drug Del.*, 6 (3), 286-291.
- Fellows, P.J., 2009. *Food processing technology: Principles and practice*. Woodhead Publishing Elsevier, 1152p, United Kingdom.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V. ve Weiss, J., 2011. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer Science and Business Media, 599p, New York, USA.
- Fernandes, R.V., Borges, S.V., ve Botrel, D.A., 2014. Gum arabic/starch /maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr. Polym.*, 101, 524-532.
- Fernandes, R.V., Botrel, D.A., Silva, E K., Borges, S.V., de Oliveira, C.R., Yoshida, M.I., Feitosa, J.P.A. ve de Paula, R.C.M., 2016. Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. *Carbohydr. Polym.*, 153, 133-142.
- Filkova, I., Huang, L.X. ve Mujumdar, A.S., 2006. *Industrial Spray Drying Systems. Handbook of Industrial Drying*, Ed: A.S. Mujumdar. Taylor & Francis Group, LLC, Florida, 215-254.

- Fissore, D., Pisano, R. ve Barresi, A., 2014. Applying quality-by-design to develop a coffee freeze-drying process. *J. Food Eng.*, 123, 179-187.
- Folk, J.E. ve Cole, P.W., 1965. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 240 (7), 2951-2960.
- Fongin, S., Kawai, K., Harnkarnsujarit, N. ve Hagura, Y., 2017. Effects of water and maltodextrin on the glass transition temperature of freeze-dried mango pulp and an empirical model to predict plasticizing effect of water on dried fruits. *J. Food Eng.*, 210, 91-97.
- French, A.D., 1988. Accessible conformations of the β -d-(2 \rightarrow 1)-and-(2 \rightarrow 6)-linked d-fructans inulin and levan. *Carbohyd. Res.*, 176 (1), 17-29.
- Fujii, S., Sakamoto, Y., Aso, T., Aktaş, T., Yoshimoto, N. ve Yamamoto, S., 2011. Drying of yeasts-Factors affecting inactivation during drying. *Dry. Technol.*, 29, 1981-1985.
- Furlán, L.T.R., Lecot, J., Padilla, A.P., Campderrós, M.E. ve Zaritzky, N., 2012. Stabilizing effect of saccharides on bovine plasma protein: A calorimetric study. *Meat Sci.*, 91 (4), 478-485.
- Gao, Y., Zhu, L.C., Zhang, X., Gan, L. ve Gan, Y., 2011. Lipid-polymer composite microspheres for colon-specific drug delivery prepared using an ultrasonic spray freeze-drying technique. *J. Microencapsul.*, 28 (6), 549-556.
- Garmise, R.J., Staats, H.F. ve Hickey, A.J., 2007. Novel dry powder preparations of whole inactivated influenza virus for nasal vaccination. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 8 (4), 2-10.
- Gaspar, A.L.C. ve Goes-Favoni, D.S.P., 2015. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chem.*, 171, 315-322.
- Gerrard, J.A., 2002. Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. *Trends Food Sci. Tech.*, 13, 389-397.
- Gharsallaoui, A., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40 (9), 1107-1121.
- Gieseler, H., 2004. Product morphology and drying behavior delineated by a new freeze-drying microbalance. (Ph.D.Diss.), Naturwissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Alexander, Universität Erlangen, Nürnberg.
- Glibowski, P. ve Pikus, S., 2011. Amorphous and crystal inulin behavior in a water environment. *Carbohyd. Polym.*, 83 (2), 635-639.
- Godshall, M.A., 1997. How carbohydrates influence food flavor. *J. Food Tech.*, 51, 63-67.
- Gombotz, W.R., Healy, M.S., Brown, L.R. ve Auer, H.E., 2003. U.S. Patent No. 6,569,458. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Grasmeijer, N., Stankovic, M., de Waard, H., Frijlink, H.W. ve Hinrichs, W.L. 2013. Unraveling protein stabilization mechanisms: Vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. *BBA-Proteins Proteom.*, 1834 (4), 763-769.
- Griffin, M., Casadio, R. ve Bergamini, C.M., 2002. Transglutaminases: Nature's biological glues, *Biochem. J.*, 368, 377-3962.
- Güngör, Ö., 2013. Zeytinyağının Püskürtmeli Kurutma Yöntemi ile Mikroenkapsülasyonunun D-Optimal Dizayn ile Optimizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Gusman, M.I. ve Johnson, S.M., 1990. U.S. Patent No. 4,975,415. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hausner, H.H., 1967. Friction conditions in a mass of metal powder. *Powder Metall.*, 13, 7-13.
- Heidebach, T., Först, P. ve Kulozik, U., 2009. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.*, 98, 309-316.
- Heinrich, Z., 2003. *Colour chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments.* (Third revised edition). Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, 637p, Weinheim, Germany.
- Heinzelmann, K., Franke, K., Jensen, B. ve Haahr, A.M., 2000. Protection of fish oil from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 102 (2), 114-121.
- Heinzen, C., 2002. Microencapsulation solve time dependent problems for foodmakers. *Eur. Food Drink Rev.*, 3, 27-30.
- Heller, M.C., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 1999. Protein formulation and lyophilization cycle design: Prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation. *Biotechnol. Bioeng.*, 63 (2), 166-174.
- Henczka, M., Bałdyga, J. ve Shekunov, B.Y., 2006. Modelling of spray-freezing with compressed carbon dioxide. *Chem. Eng. Sci.*, 61 (9), 2880-2887.
- Her, J.Y., Kim, M.M.S. ve Lee, K.G., 2015. Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. *J. Food Eng.* 150, 70-74.
- Her, J.Y., Song, C.S., Lee, S.J. ve Lee, K.G., 2010. Preparation of kanamycin powder by an optimized spray freeze-drying method. *Powder Technol.* 199, 159-164.
- Hinrichs, W.L.J., Prinsen, M.G. ve Frijlink, H.W., 2001. Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *Int. J. Pharm.*, 215 (1), 163-174.
- Ho, M.L., Leu, S.Z., Hsieh, J.F. ve Jiang, S.T., 2000. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovercillium ladakanum*. *J. Food Sci.*, 65 (1), 76-80.
- Hu, J., Johnston, K.P. ve Williams, R.O., 2003. Spray freezing into liquid (SFL) particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: organic solvent versus organic/aqueous co-solvent systems. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20 (3), 295-303, 2003.
- Hundre, S., Anandharamakrishnan, C. ve Karthik, P., 2015. Effect of whey protein isolate and cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chem.*, 174, 16-24.
- Imm, J.Y. ve Lee, C.M., 2000. Gelation and water binding properties of transglutaminase-teredated skim milk powder. *Food Chem. Toxicol.*, 65 (2), 200-205.
- Ishwarya, S.P. ve Anandharamakrishnan, C., 2015. Spray-freeze-drying approach for soluble coffee processing and its effect on quality characteristics. *J. Food Eng.*, 149, 171-180.
- Ishwarya, S.P., Anandharamakrishnan, C. ve Stapley, A.G.F, 2015. Spray-freeze-drying: a novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends Food Sci. Tech.* 41 (2), 161-181.
- Jangam S.V., 2011. An Overview of recent developments and some R&D challenges related to drying of foods. *Dry. Technol.*, 29, 1343-1357.

- Jaya, S. ve Das, H., 2004. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. *J. Food Eng.*, 63 (2), 125-134.
- Jinapong, N., Suphantharika, M. ve Jamnong, P., 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J. Food Eng.*, 84 (2), 194-205.
- Kaçar, A. ve Şahan, N., 2004. Yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen enerjisi azaltılmış dondurmaların kimyasal özellikleri. *Harran Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 8, 7-13.
- Kalušević, A.M., Lević, S.M., Čalija, B.R., Milić, J.R., Pavlović, V.B., Bugarski, B.M. ve Nedović, V.A., 2017. Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract. *J. Food Sci. Tech.*, 54 (11), 3411-3420.
- Karthik, P. ve Anandharamakrishnan, C., 2013. Microencapsulation of docosahexaenoic acid by spray-freeze drying method and comparison of its stability with spray-drying and freeze-drying methods. *Food Bioprocess. Technol.*, 6, 2780-2790.
- Kaushik, V. ve Roos, Y.H., 2007. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT-Food Sci. Technol.*, 40 (8):1381-1391.
- Kenyon, M.M., 1995. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, Eds: S.J. Risch, G.A. Reineccius. ACS symposium series, Washington, DC: American Chemical Society, 43-50.
- Khuri, A.I. ve Cornell, J.A., 1996. *Response Surfaces: Designs and Analyses*, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., 190p, New York, USA.
- Khwanpruk, K., Anandharamakrishnan, C., Rielly, C.D. ve Stapley, A.G.F., 2008. Volatiles retention during the sub-atmospheric spray freeze drying of coffee and maltodextrin. 16th International Drying Symposium (IDS 2008), 9-12th November 2008, Hyderabad, India.
- Kieliszek, M. ve Misiewicz, A., 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry: A review. *Folia Microbiol.*, 59 (3), 241-250.
- King, C.J., 1971. *Freeze-drying of foods*. Butterworth & Co.Ltd., 86p, London, United Kingdom.
- Knorr, D., 1998. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 9, 295-306.
- Koç, B., Koç, M., Güngör, Ö., Yılmaz, M.S., Kaymak-Ertekin, F., Susyal G. ve Bağdatlıoğlu, N., 2011. Effects of formulation on stability of spray-dried egg. *Dry. Technol.*, 30, 63-71.
- Koç, B., Sakin-Yılmaz, M., Kaymak-Ertekin, F. ve Balkır, P., 2014. Physical properties of yoghurt powder produced by spray drying. *J. Food Sci. Tech.*, 51 (7), 1377-1383.
- Koç, B., Yılmaz, M.S., Balkır, P. ve Kaymak-Ertekin, F., 2010. Moisture sorption isotherms and storage stability of spray-dried yogurt powder. *Dry. Technol.*, 28, 816-822, 2010.
- Koç, M., Sakin, M. ve Kaymak-Ertekin, F., 2010. Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniv. Müh. Bil. Dergisi*, 16 (1), 77-86.
- Krämer, B., Hübner, O., Vortisch, H., Wöste, L., Leisner, T., Schwell, M. ve Baumgärtel, H., 1999. Homogeneous nucleation rates of supercooled water measured in single levitated microdroplets. *J. Chem. Phys.*, 111 (14), 6521-6527.

- Kreilgaard, L., Frokjaer, S., Flink, J.M., Randolph, T.W. ve Carpenter, J.F., 1999. Effects of additives on the stability of *Humicola lanuginosa* lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *J. Pharm. Sci.*, 88 (3), 281-290.
- Kumar, R. ve Kar. A., 2014. Microencapsulation of nutraceuticals using spray freeze drying method: A brief review. *Indo Global J. Pharm. Sci.*, 4 (2), 47-51.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. ve Susa, Y., 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.*, 17 (2), 221-246.
- Kurozawa, L.E., Morassi, A.G., Vanzo, A.A., Park, K.J. ve Hubinger, M.D., 2009. Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. *Dry. Technol.*, 27 (11), 1248-1257.
- Lacerda, E.C.Q., de Araújo Calado, V.M., Monteiro, M., Finotelli, P.V., Torres, A.G. ve Perrone, D., 2016. Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohyd. Polym.*, 151, 500-510.
- Landy, P., Druaux, C. ve Voilley, A., 1995. Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chem.*, 54, 387-392.
- Lazić, Ž.R., 2004, Design of Experiments in Chemical Engineering. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 620p, Weinheim, Germany.
- Leuenberger, H., Plitzko, M. ve Puchkov, M., 2006. Spray freeze drying in a fluidized bed at normal and low pressure. *Dry. Technol.*, 24 (6), 711-719, 2006.
- Levi, G., ve Karel, M., 1995. Volumetric shrinkage (collapse) in freeze-dried carbohydrates above their glass transition temperature. *Food Res. Int.*, 28 (2), 145-151.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C. ve Chou, C.C., 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 79-86.
- Livingston, D.P., Hinch, D.K. ve Heyer, A.G., 2007. The relationship of fructan to abiotic stress tolerance in plants. Recent advances in fructooligosaccharides research. Trivandrum, India: Research Signpost, 181-199.
- Longo, M.A. ve Combes, D., 1999. Thermostability of modified enzymes: A detailed study. *J. Chem. Technol. Biot.*, 74 (1), 25-32.
- Maa, Y.F., Nguyen, P.A., Sweeney, T., Shire, S.J. ve Hsu, C.C., 1999. Protein inhalation powders: Spray drying vs spray freeze drying. *Pharm. Res.*, 16 (2), 249-254.
- Macedo, J.A., Cavallieri, A.L.F., Da Cunha, R.L. ve Sato, H.H., 2010. The effect of transglutaminase from *Streptomyces sp.* CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. *Int. Dairy J.*, 20 (10), 673-679.
- MacLeod, C., McKittrick, J., Hindmarsh, J., Johns, M. ve Wilson, D., 2006. Fundamentals of spray freezing of instant coffee. *J. Food Eng.*, 74 (4), 451-461.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release - A review. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 41, 1-21.
- Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Assadpoor, E. ve Dehnad, D., 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 85, 379-385.
- Marangoni, A.G., 2003. Enzyme kinetics: a modern approach. John Wiley & Sons, 240p, USA.
- Masters, K., 1991. Spray drying handbook (5th ed.). Harlow: Longman Scientific & Technical, 725p, New York, USA.

- Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Núñez-Ramírez, D.M., Bernad-Bernad M.J. ve Manero, O., 2016. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Ind. Crop. Prod.*, 90, 1-8.
- Menéndez, O., Rawel, H., Schwarzenbolz, U. ve Henle, T., 2006. Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *J. Agr. Food Chem.*, 54 (5), 1716-1721.
- Mensink, M.A., Frijlink, H.W., van der Voort Maarschalk, K. ve Hinrichs, W.L., 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 114, 288-295
- Meryman, H.T., 1959. Sublimation freeze-drying without vacuum. *Science*, 130 (3376), 628-629.
- Moore, M.M., Heinbockel M., Dockery, P., Ulmer, M.H., Arendt, E.K., 2006. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chem.*, 83, 8-36
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. ve Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microbiol. Meth.*, 66 (2), 183-193, 2006.
- Mossel, D.A.A. ve Ingram, M., 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Microbiol.*, 18 (2), 232-268.
- Motoki, M. ve Seguro, K., 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Tech.*, 9 (5), 204-210.
- Motoki, M. ve Kumazawa Y., 2000. Recent trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Sci. Technol. Res.*, 6, 151-160.
- Mueannoom, W., Srisongphan, A., Taylor, K.M., Hauschild, S. ve Gaisford, S., 2012. Thermal ink-jet spray freeze-drying for preparation of excipient-free salbutamol sulphate for inhalation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 80 (1), 149-155.
- Mujumdar, A.S., 2014. *Handbook of Industrial Drying*. CRC press, 1348p, USA.
- Mumenthaler, M. ve Leuenberger, H., 1991. Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. *Int. J. Pharm.*, 72 (2), 97-110, 1991.
- Myers, R.H. ve Montgomery, D.C., 1995, *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments* 2nd ed., John Wiley and Sons, 700p, New York, USA.
- Nagy, V. ve Szakacs, G., 2008. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47 (2), 122-127.
- Namaldı, A., Çalık, P. ve Uludağ, Y., 2006. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. *Dry. Technol.*, 24, 1495-1500.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. ve Bugarski, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.*, 1, 1806-1815.
- Nguyen, C.X., Herberger, J.D. ve Burke A.D., 2004. Protein powders for encapsulation: A comparison of spray-freeze drying and spray drying of darbepoetin alfa. *Pharm. Res.*, 21 (3), 507-513.
- Nielsen, P.M., 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase, review of literature and patents. *Food Biotech.*, 9, 119-156.

- Niwa, T., Shimabara, H. ve Danjo, K., 2010. Novel spray freeze-drying technique using four-fluid nozzle-development of organic solvent system to expand its application to poorly water soluble drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, 58 (2), 195-200.
- O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C. ve Norton, I., 2016. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocol.*, 53, 141-154.
- Özbek, B. ve Ülgen, K.Ö., 2000. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.*, 35 (9), 1037-1043.
- Özer, B, Kirmaci, H.A., Oztekin, S., Hayaloglu, A. ve Atamer, M., 2007. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yoğurt production. *Int. Dairy J.*, 17, 199-207
- Parthasarathi, S. ve Anandharamakrishnan, C., 2016. Enhancement of oral bioavailability of vitamin E by spray-freeze drying of whey protein microcapsules. *Food Bioprod. Process.*, 100, 469-476.
- Payne, C.T., 2009. Enzymes. *Ingredients in Meat Products-Properties, Functionality and Applications*, Ed: R., Tarte. Springer Science Business Media, LLC, New York, 173-197.
- Pedersen, G.P., Faldt, P., Bergenstahl, B. ve Kristensen, H.G., 1998. Solid state characterization of a dry emulsion: A potential drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, 171, 257-270.
- Pilosof, A.M.R. ve Sanchez, V.E., 2006. Drying of enzymes. *Handbook of Industrial Drying*, Ed: A.S. Mujumdar. Taylor & Francis Group, LLC, Florida, 981-990.
- Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A., Giosafatto, C.V., 2011. Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan-based edible films: A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 51, 223-38.
- Poshadri, A. ve Kuna, A., 2010. Microencapsulation technology: A review. *J.Res. Angra*, 38 (1), 86-102.
- Quintana, G., Gerbino, E. ve Gómez-Zavaglia, A., 2017. Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying, and storage. *Front. Microbiol.*, 8 (641), 1-9.
- Rahmati, M.R., Vatanara, A., Parsian, A.R., Gilani, K., Khosravi, K.M., Darabi, M. ve Najafabadi, A.R., 2013. Effect of formulation ingredients on the physical characteristics of salmeterol xinafoate microparticles tailored by spray freeze drying. *Adv. Powder Technol.* 24 (1), 36-42.
- Rajam, R. ve Anandharamakrishnan, C., 2015. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Eng.*, 166, 95-103.
- Ratti, C., 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *J. Food Eng.*, 49, 311-319.
- Rogers, S., Wu, W.D., Saunders, J. ve Chen, X.D., 2008. Characteristics of milk powders produced by spray freeze drying. *Dry. Technol.*, 26 (4), 404-412.
- Romeih, E. ve Walker, G., 2017. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends Food Sci. Tech.* 62, 133-140.
- Sabarez, H.T., 2015. Modelling of drying processes for food materials. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 285. Modeling Food Processing Operations*, 95-122.
- Sadikoğlu, H. ve Özdemir, M., 2003. Dondurarak kurutma teknolojisi ve evreleri. *Gıda*, 28 (6), 643-649.

- Sadikoğlu, H., 2010. Spray freeze drying. Spray Drying Technology-Volume 1, Eds: M.W. Woo, A.S. Mujumdar, W.R.W. Daud. Singapore, 157-182
- Saluja, V., Amorij, J.P., Kapteyn, J.C., de Boer, A.H., Frijlink, H.W. ve Hinrichs, W.L.J., 2010. A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation. *J. Control. Release*, 144 (2), 127-133.
- Samborska, K. ve Witrowa-Rajchert, D., 2005. Spray-drying of α -Amylase-The effect of process variables on the enzyme inactivation. *Dry. Technol.*, 23, 941-953.
- Schiffter, H., Condliffe, J. ve Vonhoff, S., 2010. Spray-freeze-drying of nanosuspensions: The manufacture of insulin particles for needle-free ballistic powder delivery. *J.R. Soc. Interface*, 7 (4), 483-500.
- Schorsch, C., Carrie H. ve Norton I.T., 2000. Crosslinking casein micelles by a microbial transglutaminase: Influence of crosslinks in acid-induced gelation. *Int. Dairy J.*, 10, 529-539.
- Seguro, K., Kumazawa Y., Ohtsuka T., Toiguchi S. ve Motoki M., 1995. Microbial transglutaminase and e-(g-glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of kamaboko gel. *J. Food Sci.*, 60, 305-311.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N. ve Shimoni, E., 2010. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Res. Int.*, 43, 193-202.
- Serdaroğlu, M. ve Turp, G.Y., 2003. Gıda işlemede transglutaminaz kullanımı. *Gıda*, 28 (2), 209-215.
- Sonner, C., Maa, Y.F. ve Lee, G., 2002. Spray-freeze-drying for protein powder preparation: Particle characterization and a case study with trypsinogen stability. *J. Pharm. Sci.*, 91 (10), 2122-2139.
- SonoTek, 2017. Ultrasonic atomization technology. <http://www.sonotek.com/ultrasonic-nozzletechnology/> (31.08.2017).
- Souza, A.C.P., Gurak, P.D. ve Marczak, L.D.F., 2017. Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food Bioprod. Process.*, 102, 186-194.
- Souza, C.F.V., Faccin, D.J.L., Mertins, O., Heck, J.X., da Silveira, N.P., Secchi, A.R., ve Ayub, M.A.Z., 2009. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. *J. Chem. Technol. Biot.*, 84 (10), 1567-1575.
- Stangierski, J. ve Baranowska, H.M., 2008. Analysis of texture and dynamics of water binding in enzymatically modified myofibrillar preparation obtained from washed mechanically recovered poultry meat. *Eur. Food Res. Technol.*, 226 (4), 857-860.
- Tang, X.C. ve Pikal, M.J., 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.*, 21 (2), 191-200.
- Teekamp, N., Tian, Y., Visser, J.C., Olinga, P., Frijlink, H.W., Woerdenbag, H.J. ve Hinrichs, W.L., 2017. Addition of pullulan to trehalose glasses improves the stability of β -galactosidase at high moisture conditions. *Carbohydr. Polym.*, 176, 374-380.
- Teixeira, C.C.C., de Freitas Cabral, T.P., Tacon, L.A., Villardi, I.L., Lanchote, A.D. ve de Freitas, L.A.P., 2017. Solid state stability of polyphenols from a plant extract after fluid bed atmospheric-spray-freeze-drying. *Powder Technol.*, 319, 494-504.

- Tonnis, W.F., Amorij, J.P., Vreeman, M.A., Frijlink, H.W., Kersten, G.F. ve Hinrichs, W.L.J., 2014. Improved storage stability and immunogenicity of hepatitis B vaccine after spray-freeze drying in presence of sugars. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 55, 36-45.
- Tonnis, W.F., Mensink, M.A., de Jager, A., van der Voort Maarschalk, K., Frijlink, H. W. ve Hinrichs, W.L.J., 2015. Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. *Mol. Pharmaceut.*, 12 (3), 684-694.
- Wang, L., Yu, X., Xu, H., Aguilar, Z.P. ve Wei, H., 2016. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. *LWT - Food Sci. Technol.*, 68, 8-13.
- Wang, Z. ve Finlay, W.H., 2006. U.S. Patent No. 7,007,406. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wanning, S., Süverkrüp, R. ve Lamprecht, A., 2015. Pharmaceutical spray freeze drying. *Int. J. Pharm.*, 488 (1), 136-153.
- Wanning, S., Süverkrüp, R. ve Lamprecht, A., 2017. Aerodynamic droplet stream expansion for the production of spray freeze-dried powders. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 18 (5), 1760-1769.
- Watanabe, M., Suzuki, T., Ikenzawa, Z. ve Arai, S., 1994. Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for producing of hypoallergenic flour. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 58, 388-390.
- Webb, S.D., Golledge, S.L., Cleland, J.L., Carpenter, J.F. ve Randolph, T.W., 2002. Surface adsorption of recombinant human interferon- γ in lyophilized and spray-lyophilized formulations. *J. Pharm. Sci.*, 91 (6), 1474-1487.
- Wei, S., Ma, Y., Luo, J., He, X., Yue, P., Guan, Z. ve Yang, M., 2017. Hydroxypropylcellulose as matrix carrier for novel cage-like microparticles prepared by spray-freeze-drying technology. *Carbohydr. Polym.*, 157, 953-961.
- Welti-Chanes, J., Bermúdez, D., Valdez-Fragoso, A., Mújica-Paz, H. ve Alzamora, S. M., 2004. Principles of freeze-concentration and freeze-drying. *Food Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 13-24.
- Yamashita, C., Chung, M.M.S., dos Santos, C., Mayer, C.R.M., Moraes, I.C.F. ve Branco, I.G., 2017. Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus spp.*) by-product extract by freeze-drying. *LWT - Food Sci. Technol.*, 84, 256-262.
- Yang, Z., Fujii, Y., Lee, F.K., Lam, C.H. ve Tsui, O.K., 2010. Glass transition dynamics and surface layer mobility in unentangled polystyrene films. *Science*, 328 (5986), 1676-1679.
- Ye, T., Yu, J., Luo, Q., Wang, S. ve Chan, H.K., 2017. Inhalable clarithromycin liposomal dry powders using ultrasonic spray freeze drying. *Powder Technol.*, 305, 63-70.
- Yeom, G.S. ve Song, C.S., 2010. Experimental and numerical investigation of the characteristics of spray-freeze drying for various parameters: Effects of product height, heating plate temperature, and wall temperature. *Drying Technol.*, 28 (2), 165-179, 2010.
- Yin, F., Guo, S., Gan, Y. ve Zhang, X., 2014. Preparation of redispersible liposomal dry powder using an ultrasonic spray freeze-drying technique for transdermal delivery of human epithelial growth factor. *Int. J. Nanomed.*, 9, 1665-1669.

- Yu, H, Tran, T.T., Teo, J. ve Hadinoto, K., 2016. Dry powder aerosols of curcumin-chitosan nanoparticle complex prepared by spray freeze drying and their antimicrobial efficacy against common respiratory bacterial pathogens. *Colloid Surface. A.*, 504, 34-42.
- Yu, Z., Johnston, K.P. ve Williams, R.O., 2006. Spray freezing into liquid versus spray-freeze drying: influence of atomization on protein aggregation and biological activity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27 (1), 9-18.
- Yüksel, Z. ve Erdem, Y.K., 2007. Gıda endüstrisinde transglutaminaz uygulamaları: 1-Enzimin genel özellikleri. *Gıda*, 32 (6), 287-292.
- Zhang, D., Zhu, Y. ve Chen, J., 2009. Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 26 (1), 205-222.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bruin, E.D. ve Bol, J., 1998. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 49, 251-257.

7. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Niksar/Tokat'ta doğmuştur. 2003 yılında Türk Eğitim Derneği Tam Eğitim Bursu kazanarak lise eğitimine başlamıştır. Lise eğitimini 2007 yılında TED Polatlı Koleji'nde tamamlayıp, 2012 yılında lisans eğitimini Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlamıştır. 2014 yılında askerlik yükümlülüğünü yerine getirdikten sonra, 2015 Şubat ayı içinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2015-2017 yılları arasında "Mikrobiyal Transglutaminaz Enziminin Ultrasonik Püskürtmeli-Dondurarak Kurutulması İşleminin Optimizasyonu ve Depolama Stabilesinin Belirlenmesi" isimli TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak görev yapmıştır.