

**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FUNGAL KATALAZ-FENOL OKSİDAZIN ÜRETİM VE KURUTMA
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suzan TURHAN

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

ARALIK 2023

**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FUNGAL KATALAZ-FENOL OKSİDAZIN ÜRETİM VE KURUTMA
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Suzan TURHAN
(200871111)**

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Didem SUTAY
Eş Danışman: Prof. Dr. Yalçın COŞKUNER**

ARALIK 2023

TEZ ONAYI

Suzan TURHAN tarafından hazırlanan **Fungal Katalaz-Fenol Oksidazın Üretim ve Kurutma Koşullarının Optimizasyonu** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. Didem SUTAY

İkinci Danışman:

Prof. Dr. Yalçın COŞKUNER

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem SUTAY

İmza:

Doç. Dr. Abdulvahit SAYASLAN

Doç. Dr. Nazife Işık SEMERCİ

Tez Savunma Tarihi: 12/12/2023

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Murat MAYDA
Enstitü Müdürü



BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Suzan TURHAN





Biricik aileme ve eşime,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi birikimini, tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel ve toplumsal alanda yönlendirerek hayata bakış açımın şekillenmesinde büyük katkısı olan, güler yüzü ve anlayışı ile sabırla yaklaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Didem SUTAY ve ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yalçın COŞKUNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında karşılaştığım zorluklarda yardımlarını ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra S. TİSKE İNAN'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ŞAHİN'e ve Sayın Arş. Gör. Dr. Fuat GÖKBEL'e teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma da sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında karbon kaynağı olarak kullanılan melasın teminini sağlayan Ilgın Şeker Fabrikası (Konya) yetkililerine ve bu çalışmaya 03-YL-22 numaralı proje kapsamında destek veren Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yüksek lisans eğitim sürecimde bursiyer olarak görev yaptığım 219O341 numaralı proje kapsamında burs desteği veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Son olarak teşekkürden daha fazlasını hakeden, hayatım boyunca beni hep destekleyen, dua ve sonsuz sevgiyle yanımda olan, en değerlilerim, annem Ayşe Dudu GİTMEZ'e, babam Salim GİTMEZ'e, en büyük mirasım kardeşim Sudenaz GİTMEZ'e, sabrından bir gün bile ödün vermeden destekleyen yoldaşım Beytullah TURHAN'a ve eşimin ailesine yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2023

Suzan TURHAN
Gıda Mühendisi



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1 Enzimler	5
2.1.1 Enzimlerin sınıflandırılması	6
2.1.2 Katalaz ve katalazların sınıflandırılması	7
2.1.3 Fenol oksidaz	8
2.1.4 KATFO'nun çift işlevselliği	9
2.1.5 <i>Scytalidium thermophilum</i> (<i>Mycothermus thermophilus</i>)	13
2.2 Enzim Üretimi	13
2.3 Melas	15
2.4 Enkapsülasyon	16
2.4.1 Maltodekstrin (MD)	17
2.4.2 Mannitol	18
2.4.3 Enkapsülasyon amacıyla kullanılan kurutma teknikleri	19
2.4.4 Dondurarak kurutma	20
2.5 Çalışmanın Amacı	23
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1 Materyal	25
3.2 Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları	26
3.3 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu İçin Ön Çalışmalar	26
3.4 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu	27
3.5 Sonuçların Doğrulanması	28
3.6 KATFO'nun Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	29
3.7 KATFO'nun Fenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	30
3.8 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu İçin Ön Çalışmalar	30
3.9 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi	31
3.9.1 Deney tasarımı ve besleme çözeltisi hazırlama	31
3.9.2 Dondurarak kurutma	32
3.9.3 Katalaz Aktivitesi Veriminin Hesaplanması	33
3.9.4 Sonuçların doğrulanması	33
3.10 Toz Formda Elde Edilen KATFO'ya Uygulanan Analizler	33
3.10.1 Yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk ve gerçek yoğunluk	33

3.10.2 Gözeneklilik, akabilirlik ve yapışkanlık.....	33
3.10.3 Higroskopisite	34
3.10.4 Çözünürlük	35
3.10.5 Nem ve su aktivitesi (a_w).....	35
3.10.6 Renk	36
3.10.7 KATFO'nun depolama verimliliği ve depolama stabilitesi	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular	37
4.2 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu	41
4.3 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular	50
4.4 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu	50
4.5 Fenol Oksidaz Aktivitesi	56
4.6 Toz Formda Elde Edilen KATFO'ya Uygulanan Analizlere Ait Bulgular	57
4.6.1 Yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk ve gerçek yoğunluk.....	57
4.6.2 Gözeneklilik, akabilirlik, yapışkanlık	60
4.6.3 Higroskopisite ve Çözünürlük.....	62
4.7 Raf Ömrü Boyunca Uygulanan Analizlere Ait Bulgular	63
4.7.1 Enzim aktivitesi ve depolama stabilitesi	63
4.7.2 Su aktivitesi (a_w) ve nem	65
4.7.3 Renk	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	89
ÖZGEÇMİŞ.....	93

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	: Varyans Analizi
ATP	: Adenozin Trifosfat
BBD	: Box-Behnken Deney Tasarımı
C-C	: Karbon-Karbon Bağ
C-N	: Karbon-Azot Bağ
C-O	: Karbon-Oksijen Bağ
DE	: Dekstroz Eşdeğerlik Parametresi
DP	: Polimerizasyon Derecesi
EC	: Enzim Sınıfı
H	: Hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₂O	: Su
KATFO	: Katalaz- Fenol Oksidaz
NaCl	: Sodyum Klorür
O₂	: Oksijen
MD	: Maltodekstrin
<i>M. thermophilus</i>	: <i>Mycothermus thermophilus</i>
RH	: Relative Humidity (Bağıl nem)
ROS	: Reaktif Oksijen Bileşiği
RNA	: Ribonükleik Asit
<i>S. thermophilum</i>	: <i>Scytalidium thermophilum</i>
T_g	: Camı Geçiş Sıcaklığı
TYM	: Tepki Yüzey Metodolojisi



SEMBOLLER

a/a	: Ağırlık/Ağırlık
a_w	: Su aktivitesi
a/h	: Ağırlık/Hacim
a*	: Kırmızılık (+)/Yeşillik (-) Değeri
b*	: Sarılık (+)/Mavilik (-) Değeri
cm	: Santimetre
cm³	: Santimetreküp
dk	: Dakika
g	: Gram
g/L	: Gram/Litre
h/h	: Hacim/Hacim
kDa	: Kilodalton
kg/m³	: Kilogram/Metreküp
kV	: Kilovolt
L	: Litre
L*	: Siyahlık (0)/Beyazlık (100) Değeri
mg/mL	: Miligram/Mililitre
mM	: Milimol
μmol	: Mikromol
mL	: Mililitre
m³	: Metreküp
mbar	: Milibar
nm	: Nanometre
rpm	: Dönüş/Devir sayısı
U/mL	: Enzim Aktivite Birimi/Mililitre
μL	: Mikrolitre
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece

ρ_b : Yığın yoğunluk
 ρ_{td} : Darbeli yoğunluk
 ρ_t : Gerçek yoğunluk



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : KATFO ile ilgili yayınlanmış çalışmalar.	11
Çizelge 3.1 : KATFO üretim optimizasyonu için BBD bağımsız değişkenleri ve seviyeleri.	28
Çizelge 3.2 : KATFO üretimi için deney tasarımı.	29
Çizelge 3.3 : Enkapsülasyon çalışması için bağımsız değişkenler ve seviyeleri.	31
Çizelge 3.4 : Enkapsülasyon çalışması için deney tasarımı.	32
Çizelge 3.5 : Toz ürünlerin akabilirlik (Carr Index) ve yapışkanlığının (Hausner Ratio) sınıflandırılması.	34
Çizelge 3.6 : Toz ürünlerin higroskopisitesinin sınıflandırılması.	35
Çizelge 4.1 : Fermantasyon ortamının optimizasyonu için deney tasarımı ve katalaz aktivitesi sonuçları.	42
Çizelge 4.2 : Fermantasyon ortamının optimizasyonu için bağımsız değişkenlere ait ANOVA tablosu.	43
Çizelge 4.3 : Fermantasyon ortamı için birinci optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.	48
Çizelge 4.4 : Fermantasyon ortamı optimizasyonuna ait birinci teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.	48
Çizelge 4.5 : Fermantasyon ortamı için ikinci optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.	49
Çizelge 4.6 : Fermantasyon ortamı optimizasyonuna ait ikinci teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.	49
Çizelge 4.7 : Dondurarak kurutma için ön çalışmaya ait katalaz aktivitesi sonuçları.	50
Çizelge 4.8 : Enkapsülasyon işleminin optimizasyonu için deney tasarımı ve verim sonuçları.	52
Çizelge 4.9 : Enkapsülasyon işleminin optimizasyonu için bağımsız değişkenlere ait ANOVA tablosu.	53
Çizelge 4.10 : Enkapsülasyon için optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.	55
Çizelge 4.11 : Enkapsülasyon için teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.	56
Çizelge 4.12 : Dondurarak kurutma öncesi ve sonrası katalaz ve fenol oksidaz verim sonuçları.	56
Çizelge 4.13 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO'nun yoğunluk değerleri.	58
Çizelge 4.14 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO ile tespit edilen gözeneklilik, akabilirlik ve yapışkanlık değerleri.	60
Çizelge 4.15 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO ile tespit edilen higroskopisite ve çözünürlük değerleri.	62



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Enzim kısımları.	6
Şekil 2.2 : <i>S. thermophilum</i> 'a ait ışık mikroskop görüntüsü.....	13
Şekil 3.1 : Çalışmada izlenen iş akış şeması.	25
Şekil 4.1 : KATFO aktivitesi üzerine H ₂ O ₂ konsantrasyonunun etkisi.	38
Şekil 4.2 : KATFO aktivitesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi.	39
Şekil 4.3 : KATFO aktivitesi üzerine pektin konsantrasyonunun etkisi.	40
Şekil 4.4 : Katalaz aktivitesi için artıkların dağılım grafiği.....	44
Şekil 4.5 : Sıcaklık ve glikoz konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (H ₂ O ₂ konsantrasyonu 0,025 mM'da ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).....	45
Şekil 4.6 : Sıcaklık ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (H ₂ O ₂ konsantrasyonu 0,025 mM'da ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L değerinde sabittir).	45
Şekil 4.7 : Glikoz ve H ₂ O ₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C'de ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).....	46
Şekil 4.8 : Sıcaklık değerinin ve H ₂ O ₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Glikoz konsantrasyonu 30 g/L'da ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).	46
Şekil 4.9 : Glikoz ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C'de ve H ₂ O ₂ konsantrasyonu 0,025 mM değerinde sabittir).	47
Şekil 4.10 : H ₂ O ₂ ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C'de ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L değerinde sabittir).	47
Şekil 4.11 : MD ve mannitol konsantrasyonunun katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Homojenizatör hızı 8000 rpm değerinde sabittir).	54
Şekil 4.12 : MD konsantrasyonunun ve homojenizatör hızının katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Mannitol konsantrasyonu 2 g mannitol/g kuru madde enzim değerinde sabittir). .	54
Şekil 4.13 : Mannitol konsantrasyonunun ve homojenizatör hızının katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (MD konsantrasyonu 2 g MD/g kuru madde enzim değerinde sabittir).	54
Şekil 4.14 : Katalaz aktivitesi verimi için artıkların dağılım grafiği.	55
Şekil 4.15 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş KATFO ile ham (sıvı) KATFO'nun depolama süresince bağlı katalaz aktivitesi (%) değişimi.	64
Şekil 4.16 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince su aktivitesi (a _w) değişimi..	65

- Şekil 4.17 :** Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince nem (%) değişimi..... **66**
- Şekil 4.18 :** Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince L^* (parlaklık) değişimi. **67**
- Şekil 4.19 :** Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince a^* (kırmızılık) değişimi. **68**
- Şekil 4.20 :** Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince b^* (sarılık) değişimi. **68**



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FUNGAL KATALAZ-FENOL OKSİDAZIN ÜRETİM VE KURUTMA KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Suzan TURHAN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Didem SUTAY
İkinci Danışman: Prof. Dr. Yalçın ÇOŞKUNER

Aralık, 2023, 93 sayfa

Bu çalışmada, *Scytalidium thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*) katalaz-fenol oksidazının (KATFO) üretim (fermantasyon) ve enkapsülasyon/dondurarak kurutma koşulları tepki yüzey metodolojisi (TYM) ve Box-Behnken deney tasarımı (BBD) ile istatistiksel olarak optimize edilmiştir. KATFO üretimi için optimum fermentasyon koşulu 40°C sıcaklık, 20 g/L glikoz konsantrasyonu ve %3 (a/h) melas konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Kültür ortamına H₂O₂ eklenmesi etkili bulunmamıştır. Optimum koşulda KATFO aktivitesi 692,4 U/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, başlangıç koşulunda elde edilen 221,8 U/mL seviyesindeki aktivitenin 3,1 katı olup, fermentasyon sürecinin optimizasyonun KATFO üretim verimi üzerindeki etkisini net olarak ortaya koymuştur.

KATFO'nun enkapsülasyon/dondurarak kurutma sürecinin optimizasyonu sonucunda en uygun koşul maltodekstrin (MD) konsantrasyonu için 1 g MD/g kuru madde enzim, mannitol konsantrasyonu için 1 g mannitol/g kuru madde enzim ve homojenizasyon hızı için 12000 rpm olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum noktada yapılan enkapsülasyonun toz KATFO'nun kalite parametreleri ve raf ömrü üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Toplam 13 hafta (91 gün) boyunca soğukta (+4°C) yapılan depolama sonunda enkapsüle edilmemiş toz KATFO'nun aktivitesinin sadece %7,6 seviyesinde korunduğu, buna karşılık enkapsüle edilmiş KATFO'nun aktivitesinin %89,4 seviyesinde korunduğu belirlenmiştir. Depolamanın ilk 4 haftası sonunda ham (sıvı) KATFO'nun aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, enkapsülasyon sayesinde toz KATFO'nun yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk, gerçek yoğunluk ve gözeneklilik değerlerinin stabil kaldığı, akabilirlik, yapışkanlık, su aktivitesi, nem, renk ve higroskopisite özelliklerinin ise iyileştiği belirlenmiştir. Tüm bunlara karşın, toz KATFO'nun çözünürlük performansının enkapsülasyondan olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar enkapsülasyonun dondurarak kurutulan KATFO için depolama süresince öncelikli kalite parametresi olan enzim aktivitesinin korunması ve bazı fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi için önemini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Scytalidium thermophilum*, *Mycothermus thermophilus*, katalaz, fenol oksidaz, KATFO, melas, optimizasyon, enkapsülasyon, dondurarak kurutma



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION AND DRYING CONDITIONS OF FUNGAL CATALASE-PHENOL OXIDASE

Suzan TURHAN

Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Didem SUTAY
Co-Supervisor: Prof. Dr. Yalçın COŞKUNER

December, 2023, 93 pages

In this study, the production (fermentation) and encapsulation/freeze drying conditions of *Scytalidium thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*) catalase-phenol oxidase (CATPO) were statistically optimized with response surface methodology (RSM) and Box-Behnken experimental design (BBD). The optimum fermentation condition of CATPO production was determined as 40°C temperature, 20 g/L glucose concentration and 3% (w/v) molasses concentration. Addition of H₂O₂ to the culture medium was not found to be effective. CATPO activity at optimum condition was determined as 692.4 U/mL. This result is 3.1-fold of the activity of 221.8 U/mL obtained under the initial condition, and the effect of optimization of the fermentation process on CATPO production efficiency is clearly demonstrated.

As a result of the optimization of the encapsulation/freeze drying process of CATPO, the optimum condition was determined as 1 g maltodextrin (MD)/g dry matter enzyme for MD concentration, 1 g mannitol/g dry matter enzyme for mannitol concentration and 12000 rpm for homogenization speed. The effects of encapsulation under the optimum condition on the quality parameters and shelf life of powder CATPO were examined comparatively. It was determined that only 7.6% of the activity of unencapsulated powder CATPO was preserved at the end of cold (+4°C) storage for a total of 13 weeks (91 days), whereas 89.4% of the activity of encapsulated CATPO was preserved. It was observed that crude (liquid) CATPO completely lost its activity at the end of the first 4 weeks of storage. In addition, it was determined that, owing to encapsulation, the bulk density, impact density, real density and porosity values of powder CATPO remained stable, and its flowability, stickiness, water activity, moisture, color and hygroscopicity properties improved. Despite all this, it has been predicted that the solubility performance of powder CATPO is negatively affected by encapsulation. The results obtained revealed the importance of encapsulation in preserving enzyme activity, which is the primary quality parameter during storage, and and improving some physical properties of freeze-dried CATPO.

Keywords: *Scytalidium thermophilum*, *Mycothermus thermophilus*, catalase, phenol oxidase, CATPO, molasses, optimization, encapsulation, freeze drying



1. GİRİŞ

Ekonomik, verimli ve çevre dostu tekniklere duyulan ihtiyaçlardan dolayı enzim teknolojisi sürekli bir gelişim içerisinde. Enzim teknolojisinin gelişme göstermesinin temel nedeni, ürünlerin uygulama alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin oldukça yüksek olmasıdır (Solomon ve diğerleri, 1996; Flickinger ve Drew, 1999). Biyoteknoloji alanında endüstriye yönelik enzimlerle ilgili yapılan çalışmalar öne çıkmaktadır. Biyoteknoloji sayesinde yeni ve farklı enzimlerin büyük ölçekte ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmaktadır (Van Beilen ve Li, 2002).

Endüstriyel enzimlerin üretiminde hayvan kaynaklı enzimler %8, bitki kaynaklı enzimler ise %4'lük kısmı oluşturmaktadır (Srivastava, 2019). Mikroorganizmaların bitki ve hayvan hücrelerine kıyasla genetik manipülasyona daha uygun olmaları, mevsime bağlı olmamaları ve hücre dışı üretimin mümkün olması gibi avantajları sayesinde büyük ölçekte düşük maliyet ve yüksek verimle enzim üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Fernandes ve Carvalho, 2016; Patel ve diğerleri, 2023). Mikroorganizmaların enzim üretiminde sağladığı avantajlardan dolayı endüstriyel enzimlerin %50'den fazlası küf ve mayalar, yaklaşık %30'u ise bakteriler kullanılarak üretilmektedir (Srivastava, 2019; Sutay Kocabaş, 2021).

Günümüzde 3000'e yakın farklı enzimin varlığı bilinmekte olup bu enzimlerden 150-170 kadarı endüstriyel ölçekte üretilmekte ve kullanılmaktadır. Enzimler yaklaşık 150 farklı endüstriyel proseste yer almaktadır. Endüstriyel ürünlerin 500'den fazlası ise enzimler yardımıyla üretilmektedir (Patel ve diğerleri, 2023). Küresel enzim pazarı incelendiğinde, endüstriyel enzimler pazar hacminin 2018 yılında 9,3 milyar ABD doları seviyesinde olduğu ve 2019-2025 yılları arasında %7,1'lik bir büyüme oranı ile 14,9 milyar ABD dolarına ulaşmasının beklendiği bilinmektedir (Sutay Kocabaş, 2021).

Bu tez çalışmasında toz formda elde edilmesi amaçlanan KATFO'nun üretim ve kurutma aşamaları için yapılan optimizasyon çalışmasında üretim maliyeti göz önünde bulundurulmuştur. KATFO'nun üretim aşamasında fermantasyon ortamının

optimizasyonunda önemli bir bileşen olan glikozun yerine şeker içeriği yüksek olan melasın karbon kaynağı olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bir yan ürün olarak açığa çıkan melasın katma değeri yüksek bir uygulamada değerlendirilmesi maliyetin düşürülmesi açısından avantaj yaratmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2019; Zhang ve diğerleri, 2021). Ayrıca, optimizasyon çalışmasında fermantasyon sıcaklığının düşürülmesi de hedeflenmiş olup, bu sayede üretim maliyetlerinin önemli bir kalemini teşkil eden enerji giderinin de düşürülmesi amaçlanmıştır.

Enzimlerin üretim sonrası biyolojik aktivitelerini korumak, depolamayı ve taşımayı kolaylaştırmak, depolama süresince kaliteyi korumak ve taşıma sırasında maliyeti düşürmek için kuru (toz) formda olmaları tercih edilmektedir. Toz formdaki ürünün muhafazası sırasında kullanılan ambalaj malzemesinin daha az miktarda olması, kapladığı alanın sıvı forma göre daha küçük olması ve en sonunda toz formdaki ürünün nakliyesinin sıvı forma göre daha ekonomik olması maliyeti doğrudan düşürmektedir (Fang ve Bhandari, 2012).

Kurutma işlemi genellikle bir dizi işlemin son aşamasıdır. Kurutucudan çıkan enzim son ürün halini almış ve paketlemeye hazır olarak kabul edilmektedir (Kovacı ve diğerleri, 2018; Özdemir ve diğerleri, 2021). Kurutma işlemi uygulanarak, sulu çözelti içerisinde kararsız durumdaki enzimler, kurutulmuş halde daha kolay muhafaza edilmektedir. Enzim moleküllerinin hareket serbestliği suyun uzaklaştırılması ile sağlanmaktadır. Kurutma işlemi sayesinde aktivite kaybına neden olan konformasyonel değişikliklerin önlenabilir olduğu bilinmektedir. Süreç şartlarına bağlı olarak kurutma sırasında az miktarda aktivite kaybı meydana gelebilmekte ve bu kaybı engellemek için uygun kaplama malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Koruyucu kaplama malzemeleri, hidrojen bağı yoluyla kurutma sırasında amorf bir faz oluşturarak protein yapısının korunmasına yardımcı olmaktadır (Depaz ve diğerleri, 2002). Koruyucu kaplama malzemeleri eklenmesi işlemi enkapsülasyon olarak isimlendirilmektedir. Enkapsülasyon, aktif bir maddeyi farklı bir madde içerisinde hapsederek çapı nanometreden milimetreye kadar değişen partiküller üretilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır (Nedovic ve diğerleri, 2011).

Enzimlerin aktivite kaybını en aza indirmek için düşük sıcaklık uygulaması ile vakum altında, düşük sıcaklığa sahip ortamda veya bir sprey kurutucuda hızlı bir şekilde kurutulması gerekmektedir (Fang ve Bhandari, 2012). Her enzimin en yüksek aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık değeri bulunmaktadır. Enzimin toz forma

dönüştürülmesinde kullanılacak olan kurutucu seçiminde ve enzime uygulanacak kurutma sıcaklığında enzim için kritik olarak kabul edilen bu sıcaklık değerine dikkat edilmektedir. Aksi takdirde enzimde denatürasyon meydana gelmektedir. Ayrıca enzime uygulanan sıcaklığın uzun süreli olması da enzimde aktivite kaybına neden olmaktadır. Vakum altında düşük sıcaklık uygulaması olan dondurarak kurutma, toz formda bir enzim elde etmek için kullanılan en yaygın tekniktir. Dondurarak kurutma buzun süblimleştirme prensibiyle çalıştığından, diğer kurutma yöntemleriyle karşılaştırıldığında genellikle enzim üzerinde daha az termal etkiye sahiptir (Ciurzynska ve Lenart, 2011).

Endüstriyel üretim süreçlerinde üretimin düşük maliyet ve yüksek verimle gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla süreç optimizasyonu için istatistiksel deney tasarımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kısa zamanda, daha az deney sayısı, güvenilir sonuçlar almak ve bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimleri açıklamak için istatistiksel deney tasarımları kullanılmaktadır (Nemeth, 2003).

Tepki yüzey metodolojisi (TYM), 1951 yılında Box ve Wilson tarafından ilk defa kullanılmıştır (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010). TYM, ürün ve süreç tasarımının geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimizasyonunda kullanılan istatistiksel bir yöntem olarak bilinmektedir. Tekniğin amacı, en yüksek performans ve kalite özelliklerinin sağlanması hedefine, bağımsız değişkenlerin farklı seviyelerde en az sayıda deneyle test edilmesi ile ulaşılmasıdır (Myers ve Montgomery, 2002). Elde edilen sonuçların uygun güven aralıklarında olması halinde optimum çalışma koşulu belirlenebilmektedir (Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006).

Literatürde çalışmalar incelendiğinde enzimlerin toz formda elde edilmesi üzerine yayınlanmış araştırma sayısının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*) kullanılarak çift fonksiyonlu bir enzim olan katalaz-fenol oksidazın (KATFO) üretim koşullarının optimize edilmesi, optimum şartlarda üretimini takiben enzimin enkapsülasyon süreci koşullarının optimize edilmesi ve toz formda elde edilmesi amaçlanmıştır.

KATFO, monofonksiyonel katalaz ailesine aittir. Fakat H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene katalize etmesiyle birlikte H_2O_2 yokluğunda fenolik bileşikler oksitleme yeteneğine de sahiptir (Vetrano ve diğerleri, 2005; Yüzügüllü ve diğerleri, 2013).

Literatür taraması sonucu 2004 yılında yapılan çalışmada *S. thermophilum*'dan fenol oksidaz enziminin biyoorganik sentezlerde kullanıldığı görülmüştür (Kaptan, 2004). Fakat 2007 yılında yapılan çalışmada *S. thermophilum*'un çoğalması sırasında ürettiği enzimin katalaz olduğu katalazla birlikte fenol oksidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Sutay, 2007). Bu sayede enzim KATFO olarak tanımlanmış ve günümüze kadar biyokimyasal özellikleri bakımından detaylı olarak detaylı incelenmiştir. Daha önceki çalışmalarda biyokimyasal açıdan detaylı şekilde karakterize edilmiş olan KATFO'nun ticari üretimi için laboratuvar ölçeğinde fermantasyon ve enkapsülasyon/kurutma optimizasyonunun yapılması amacıyla bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Enzimler

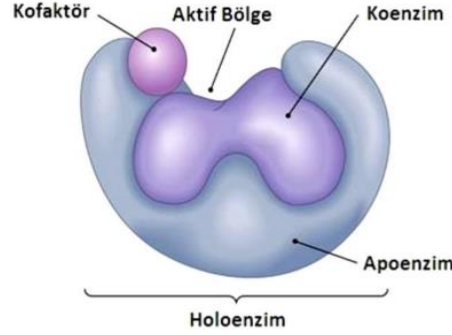
Enzimler, canlılarda yaşamsal fonksiyonların devamını sağlayan, küçük bir grup katalitik RNA molekülü (ribozimler) dışında genellikle proteinlerin yapısında bulunan biyokatalizörlerdir (Boyacıoğlu ve diğerleri, 2016; Aggarwal, 2021). Enzimler, biyolojik sistemlerde hücreler arası taşımayı sağlamak ve solunum, boşaltım gibi biyolojik olayları düzenleyerek insan sağlığı açısından önem taşımaktadır (Patel ve diğerleri, 2012). Bir kimyasal reaksiyonun termodinamik olarak hızlandırılması işlemi kataliz, katalizi sağlayan maddeler ise katalizör olarak tanımlanmaktadır. Katalizörler, denge sabiti ve dengeyi değiştirmeden dengeye varışı hızlandıran faktörler olarak bilinmektedir (Iyer ve Ananthanarayan, 2008). Bir başka ifade ile katalizörler, kendileri değişime uğramadan kimyasal reaksiyonları başlatan ve/veya hızlandıran maddelerdir (Sutay Kocabaş ve Grumet, 2019).

Enzimler; ekmek, peynir, bebek maması, alkollü içecek, meyve suyu, süt ve temizlik ürünleri üretiminin yanı sıra tıpta teşhis ve tedavi süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler kimya sektöründen, kağıt, nişasta ve biyoyakıta, fotoğrafçılıktan tarıma, kontakt lens temizleyicilerinden biyolojik savaşa kadar pek çok alanda uygulama alanı bulmaktadır. Özellikle enzim preparatları, gıda işleme, gıda katkı maddesi üretimi ve gıda muhafazasında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2021).

Enzimlerin etki ettiği (reaksiyonu katalize edilen) maddeler substrat olarak isimlendirilmektedir. Alman kimyager Emil Fischer, substrat-enzim ilişkisini ilk kez 1894'te anahtar-kilit ilişkisi olarak tanımlamıştır. Bu tanımlamada anahtar substratı, kilit ise enzimin aktif bölgesini temsil etmektedir (Solomons ve Fryhle, 2002). Enzimlerin üç boyutlu yapısı aktif bölgeye bağlanacak substrat için seçiciliğe sahiptir.

Enzimdeki protein yapılı kısım apoenzim olarak adlandırılmaktadır. Bazı enzimlerin katalitik etki gösterebilmesi için apoenzim dışında bir koenzim kısma da ihtiyacı olabilmektedir. Koenzim, metal iyonu veya protein olmayan inorganik bir yapıdır.

İhtiyaç duyulan organik yapıya ise kofaktör veya prostetik grup denmektedir. Koenzimler ve kofaktörler, enzimlerin yardımcı bölümleridir. Apoenzimler ile koenzim ve kofaktörlerin kompleks yapısına haloenzim adı verilmektedir (Şekil 2.1) (Patel ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.1 : Enzim kısımları (Holde, 2006).

2.1.1 Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim Komisyonu raporu ve Uluslararası Biyokimya Derneği Enzim Komitesi tarafından kabul edilen ilkelere göre enzimler katalizledikleri reaksiyonun türüne göre altı ana sınıfa ayrılmaktadır (Patel ve diğerleri, 2023; Boyacıoğlu ve diğerleri, 2016).

Oksidoredüktazlar: H, O₂ ve elektronun bir substrattan diğerine transferini sağlayan oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden tüm enzimleri içerir. Katalaz bu grupta yer almaktadır.

Transferazlar: Metil, fosfat, açıl veya amino glikozil gibi bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder.

Hidrolazlar: Ester, asit, anhidrit, peptid, eter, glikoz, C-C, C-O, C-N bağları gibi bağların hidrolizini katalize eder.

Liyazlar: Yeni çift bağlar veya halka yapılar oluşturarak hidroliz ve oksidasyon dışındaki yöntemlerle çeşitli kimyasal bağları kırma yeteneğine sahiptir.

İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonunu yani bir molekül içindeki geometrik ya da yapısal düzenlemeleri katalize eder.

Ligazlar (Sentetazlar): ATP veya diğer fosfatlardan yararlanarak, bunlardaki pirofosfat bağının hidrolizi sonucu eşleşmiş olan iki molekül arasındaki bağların birleşmesine olanak sağlayan enzimlerdir (Patel ve diğerleri, 2023; Boyacıoğlu ve diğerleri, 2016).

2.1.2 Katalaz ve katalazların sınıflandırılması

Aerobik organizmalar, hücreleri reaktif oksijen bileşiklerine (ROS) karşı korumaktadır. Bu bileşiklerin parçalanmasını sağlamak için farklı enzim sistemleri geliştirilmiştir. Katalaz (EC 1.11.1.6), bazı durumlarda zararlı olarak bilinen hidrojen peroksite (H_2O_2) karşı koruma sağlayabilen enzimlerden birisidir (Kalko ve diğerleri, 2001). Katalazlar, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene parçalayan (Reaksiyon 2.1), antioksidan metalloenzimler grubuna ait olan ve canlı organizmaların hücre ömrünün uzatılmasına önemli katkı sağladığı bilinen enzimlerdir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013). Reaksiyon 2.1, reaktif oksijen bileşiklerinden (ROS) olan H_2O_2 'in birikimini engelleyerek hücreleri ROS'un zararlı etkilerinden korumaktadır (Mate ve diğerleri, 2001).



H_2O_2 aynı zamanda temizlik ve ağartma işleminde de kullanılan oksidan-redükthan bir madde olarak bilinmektedir. Meyve ve sebze sanayisinde klor yerine yüzey sterilizasyonunda, kuru kayısılardan kükürt dioksitin temizlenmesinde ve kuru incirlere parlak görünüm kazandırılmasında kullanılmaktadır. Süt sektöründe sütün ekşimesini geciktirmek ve aromalı peynir üretiminde laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklemek için soğuk sterilizasyon ajanı olarak kullanılan H_2O_2 , katalaz sayesinde ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Özkan ve Kırca, 2001; Er Demirhan ve Sarımehtetoğlu, 2009; Yüzügüllü ve Ögel, 2013; Upadhyay ve diğerleri, 2014; McSweeney, 2016). Ayrıca, aromalı peynirlerde aroma oluşumuna izin vermeyen laktik asit gelişiminin önlenmesinde kullanılmakta, küçük işletmelerde sütün işlenmesine kadar bozulmasını engellemek amacıyla süte eklenmektedir. Bahsedilen özelliklerin yanı sıra aseptik dolum ambalajı ve ekipmanlarının dezenfeksiyonunda da H_2O_2 kullanılmaktadır (Özkan ve Kırca, 2001). Endüstriyel proseslerde bahsedilen sebeplerden dolayı kullanılan H_2O_2 'in proses sonrası ortamdan temizlenmesi için de katalaz kullanılmaktadır.

Katalazın glikoz oksidaz ile glikoz içermeyen diyet içecek ve maltoz üretiminde, fruktoz içermeyen invert şeker eldesinde kullanıldığı bilinmektedir (Eskin, 1990; Hammer, 1993). Fırıncılık endüstrisinde kararmaya sebep olan glikozun okside olarak uzaklaştırılması için yeterli oksijeni sağlamak amacıyla katalaz ile glikoz oksidaz enzim kombinasyonunun H_2O_2 ile birlikte kullanılması tercih edilmektedir (Hammer,

1995; DeMan, 1999). Enzim kombinasyonunun kullanım alanları arasında cam şişelerdeki, konserve ve kutu içeceklerin ağız kısmındaki oksijenin uzaklaştırılması, şarap ve mayonezde gözlemlenen biyolojik olmayan kararmanın önlenmesi yer almaktadır (Uhlig, 1998; DeMan, 1999). Ayrıca bu iki enzimin kullanılmasıyla gıdaların çabuk bozulmasının engellendiği bildirilmiştir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Katalazlar, aktif bölgeleri, alt birimlerinin büyüklüğü ve sekans gruplarına göre üç genel gruba ayrılmaktadır (Loewen ve diğerleri, 2015). Bu grupları; demir/hem (*heme*, *haem*) grubu içeren ve tipik katalazlar olarak da bilinen monofonksiyonel katalazlar, hem grubu içeren ve çift aktivite gösteren katalaz-peroksidazlar ve demir/hem yerine mangan içeren katalazlar (Mn-katalaz) oluşturmaktadır.

Demir/hem grubu içeren monofonksiyonel katalazlar, molekül ağırlıklarına göre iki alt gruba ayrılmaktadır. Küçük alt birim katalazlar çoğunlukla 55 ile 65 kDa arasında değişen bir moleküler ağırlığa sahipken, büyük alt birimli katalazlar daha uzun bir karboksil terminal bölgesi (C-terminal) nedeniyle 75-80 kDa aralığında molekül ağırlığına sahiptir (Zárate-Romero ve diğerleri, 2013). Monofonksiyonel katalazlar, tetramerik bir yapıya sahip olup H_2O_2 'in parçalanmasını iki ayrı adımda gerçekleştirmektedir (Chelikani ve diğerleri, 2004; Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Bir başka katalaz grubu olan katalaz-peroksidazlar ortamda uygun bir organik elektron vericisi mevcut olduğunda, bu mevcudiyetin yanında H_2O_2 seviyesinin düşük olduğu durumlarda peroksidaz aktivitesi sergileyebilmektedir (Zamocky ve diğerleri, 2008; Chelikani ve diğerleri, 2004). Grup, homodimer yapıya ve 120-340 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip enzimlerden oluşmaktadır.

Mn-katalazlar, demir/hem grubu içermeyip Mn içerdiklerinden dolayı psödo-katalazlar olarak da adlandırılmaktadır. Bu grupta bulunan katalazların sayısı monofonksiyonel katalazlara göre daha azdır (Chelikani ve diğerleri, 2004).

2.1.3 Fenol oksidaz

Fenol oksidazlar canlı sistemlerde yaygın olarak metal iyonlarının ve fenolik maddelerin toksik etkilerini azaltmak ve antimikrobiyal korumaya katkıda bulunmak için üretilmektedir (Sinsabaugh, 2010). Fenol oksidaz aktivitesinden çay ve kakao üretimi gibi birçok endüstriyel proseste yararlanılmaktadır (Yılmaz ve Elmacı, 2018). Bunların yanı sıra enzimatik esmerleşmeden de sorumludurlar. Fenol oksidazlar meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşiklerin kahverengi pigmentlere

oksidasyonunu katalize eden ve bakır içeren bir enzim grubudur (Mayer, 1986). Enzimatik esmerleşme, organizmada bulunan fenolik bileşiklerin kinona dönüşmesi, ardından kinonların polimerleşmesi ve bunun sonucu olarak kahverengi, siyah ve kırmızı pigmentlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Bu olaylardan sorumlu olan enzimler polifenol oksidazlar [EC 1.14.18.1; difenol: oksijen oksidoredüktaz; polifenol oksidaz (PPO)] ismiyle bilinmekle birlikte; tirozinazlar, katekolazlar, krezolazlar ve fenolazlar olarak da adlandırılmaktadır (Cerrahoğlu ve Arabacı, 2016).

Fenol oksidazlar lakkaz, tirozinaz ve katekol oksidaz olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. Lakkazlar, çoklu bakır atomu bulunduran fenol oksidaz grubunun bir parçası olup moleküler oksijeni suya indirger. İndirgeme ile çeşitli *para-* (*p-*) ve *orto-* (*o-*) difenolik maddelerin oksidasyonunu kataliz eder (Endo ve diğerleri, 2003; Hoegger ve diğerleri, 2006). Tirozinazlar, monofenol bileşiklerinin *o*-difenollere hidroksilasyonunu ve ardından *o*-difenollerin moleküler oksijen ile *o*-kinona oksidasyonunu katalize ederek melanin sentezinde görev almaktadır (Decker ve diğerleri, 2006).

2.1.4 KATFO'nun çift işlevselliği

S. thermophilum katalazı her biri yaklaşık 80 kDa molekül ağırlığından meydana gelen tetramerik bir enzim olup her bir alt ünite de bir adet olmak üzere toplam da dört adet *d*-tipi demir/hem grubu içermektedir (Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008; Koclar Avcı ve diğerleri, 2013). KATFO, monofonksiyonel katalaz ailesine ait olmasına rağmen katalitik aktivitesine ek olarak H₂O₂ yokluğunda fenolik bileşikleri (*o*-difenolik bileşikler, özellikle katekol) oksitleme yeteneğine de sahiptir (Yüzügüllü ve diğerleri, 2013). KATFO'da gözlemlenen çift aktivitenin aynı aktif bölgede meydana gelip gelmediğini belirlemek için *catpo* geni klonlanıp aktif bölgeye yönelik mutagenезle araştırılmıştır. Sonuç olarak her iki aktivitenin de aynı merkeze bağlı olduğu tespit edilmiştir (Yüzügüllü ve diğerleri, 2013).

Monofonksiyonel katalazların çift aktivite yeteneği ilk olarak Vetrano ve diğerleri (2005) tarafından rapor edilmiştir. Memeli hücrelerinden elde edilen katalazın substratı olan H₂O₂'in yokluğunda oksidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiş olup memeli katalaz-oksidadı olarak adlandırılmıştır. Monofonksiyonel olarak sınıflandırılan katalazlarda ikincil (fenol) oksidaz aktivite varlığının tahmin edilenden

çok daha fazla olabileceği, hatta insanda bile olabileceği öngörülmüştür (Vetrano ve diğerleri, 2005; Yüzügüllü ve diğerleri, 2013).

KATFO ile ilgili çalışmalar Çizelge 2.1’de sunulduğu gibi ilk olarak Yelda KAPTAN isimli araştırmacının 2004 yılında yüksek lisans tezi ile başlamıştır (Kaptan, 2004). Bu yüksek lisans tezinde *S. thermophilum*’dan üretilen enzimin fenol oksidaz olduğu raporlanmıştır. 2006 yılında Yelda KAPTAN isimli araştırmacının da içinde bulunduğu Prof. Dr. Ufuk BAKIR ve Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL’in yönetimindeki araştırma grubu tarafından *S. thermophilum* kullanılarak üretilen enzimin fenol oksidaz olduğunu bildiren makale yayınlanmıştır (Ögel ve diğerleri, 2006).

Bu yayının akabinde, tamamlanan bu tez çalışmasının danışmanı da olan Prof. Dr. Didem SUTAY’ın doktora çalışmaları kapsamında Leeds Üniversitesi’nde (İngiltere) gerçekleştirdiği araştırmalarda enzimin aslında bir katalaz olduğu ancak fenol oksidaz aktivitesi de gösterdiği tespit edilmiştir. Tespit sonucu enzim katalaz-fenol oksidaz (KATFO) olarak isimlendirilmiş ve ardından ilk defa bu enzimin yapısal çözümlenmesine dair X-ışını kristalografi çalışmaları başlatılmıştır. Araştırma sonuçları hem araştırmacının doktora tezinde (Sutay, 2007), hem de makale olarak yayınlanmıştır (Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008; Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2009).

Bu keşfin üzerine enzimin biyokimyasal çalışmalarına hız verilmiş ve aynı çalışma grubundan farklı araştırmacılar KATFO’nun biyokimyasal özellikleri ve yapı çözümlenmesi için çalışma yapmaya yoğunlaşmıştır. 2010 yılında Yonca YÜZÜGÜLLÜ doktora tezinde, enzimin fonksiyonel ve yapısal analizini çalışmıştır (Yüzügüllü, 2010). Yüzügüllü ve diğerleri (2011) tarafından enzimin fenolik bileşikler varlığında üretimi ve tanımlanmasıyla ilgili makale de yayınlanmıştır.

Yüzügüllü ve diğerleri (2013) tarafından biyokimyasal ve yapısal çözümleme çalışmaları kapsamında, enzimin rekombinant olarak üretilmesi ve üretilen enzimin yapı çözümlenmesi ile ilgili çalışma yayınlanmıştır. Ardından 2013 yılında KATFO’nun ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi üzerine derleme makale Yüzügüllü ve Ögel (2013) tarafından yayınlanmıştır. Son olarak Yüzügüllü Karakuş ve diğerleri (2018) katalaz kompleksinin klasik katalaz inhibitörü 3-amino-1,2,4-triazol (3TR) ile kristal yapısının 1,95 Å çözünürlükte belirlenmesi üzerine bir makale yayınlanmıştır (Yüzügüllü Karakuş ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.1 : KATFO ile ilgili yayınlanmış çalışmalar.

Çalışmanın başlığı	Çalışmanın amacı	Çalışmanın sonucu	Kaynak
Utilization of <i>Scytalidium thermophilum</i> phenol oxidase in biorganic syntheses	Çalışmanın amacı <i>S. thermophilum</i> fenol oksidazının biyoorganik sentezlerde kullanılmasıdır.	Bazı organik çözügenlerin enzim üzerine etkisi incelenmiş ve DMSO, enzim üzerindeki aktivatör etkisi sebebiyle organik substratlar için daha uygun çözügen olarak saptanmıştır. Ayrıca kültür ortamında bulunan fenol oksidazların benzoin, hidrobenzoin ve benzoil benzoini oksitleyebildikleri saptanmıştır.	Kaptan, 2004
Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus <i>Scytalidium thermophilum</i>	Fungal fenol oksidaz olarak benzersiz özelliklere sahip <i>S. thermophilum</i> 'un hücre dışı fenol oksidazının üretimi ve hem kültür süpernatantları hem de kısmen saflaştırılmış enzimler kullanılarak bazı biyokimyasal ve katalitik özelliklerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.	<i>S. thermophilum</i> 'un fenol oksidaz üretebildiği ancak aktivitenin fenolik asitlerin varlığında indüklenebildiği tespit edilmiştir. Test edilen fenolik asitler arasında gallik asit ve tannik asitin en etkili indükleyiciler olduğu raporlanmıştır.	Ögel ve diğerleri, 2006
Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray structure determination of <i>Scytalidium thermophilum</i> bifunctional catalase and identification of its catechol oxidase activity	<i>S. thermophilum</i> 'un fenol oksidaz aktivitesi olan enziminin tanımlanması ve sınıflandırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, enzim üretimi, saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu ve yapısının X-ışını analizi ile belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma KATFO'nun biyokimyasal karakterizasyonunu ve ek fenol oksidaz aktivitesini tanımlamayı amaçlayan ilk çalışmadır.	Çalışmanın sonunda saflaştırma, aminoasit sekanslama ve yapı analizi deneyleri aşamasında, enzimin aslında katalaz olduğu, ancak bunun yanında fenol oksidaz (katekol oksidaz) aktivitesi de gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim KATFO olarak isimlendirilmiştir.	Sutay, 2007
Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from <i>Scytalidium thermophilum</i>	<i>S. thermophilum</i> 'dan çift aktiviteli bir enzim olan katalaz-fenol oksidazın (KATFO) tanımlanmasını açıklanmıştır. Ögel ve diğerleri'nin (2006) yaptığı çalışmada enzimin hücre dışı fenol oksidaz olduğunu bildirilmiştir. Fakat saflaştırma, karakterizasyon ve amino asit dizilimi sonrasında enzimin fenol oksidaz aktivitesi de sergileyen bir katalaz olduğu ortaya çıkmıştır.	Çalışmada KATFO, %46 verimle 10 kat saflaştırılmıştır. KATFO'nun moleküler ağırlığı (320 kDa) ve izoelektrik noktası (pI) 5.0 bulunmuştur. KATFO'ya ait N-terminal amino asit dizisi Ser-Gly-Gln-Ser-Pro-Leu-Ala-Ala-Tyr-Glu şeklinde raporlanmıştır. Katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri için stabilite ve kinetik analiz de gerçekleştirilmiştir.	Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008
Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bifunctional catalase-phenol oxidase from <i>Scytalidium thermophilum</i>	KATFO'nun yapısal çözümlenmesinin ilk kez amaçlandığı çalışmadır. KATFO ile kez X-ışını kristalografi tekniğiyle incelenmiştir.	KATFO'nun üç boyutlu yapısına dair ilk bulgular yayınlanmıştır.	Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2009

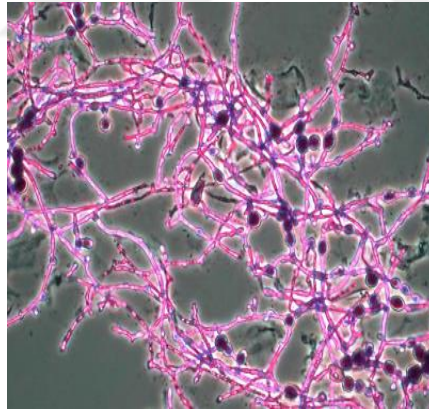
Çizelge 2.1 (devam) : KATFO ile ilgili yayınlanmış çalışmalar.

Çalışmanın başlığı	Çalışmanın amacı	Çalışmanın sonucu	Kaynak
Functional and structural analysis of catalase-phenol oxidase from <i>Scytalidium thermophilum</i>	Çalışmada KATFO'nun fonksiyonel ve yapısal analizinin incelenmesi için 15 farklı fenolik maddenin enzim üretimini etkileyebilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın başında saflaştırılmamış enzim kullanılarak gerçekleştirilen substrat seçiciliği ve inhibitör denemelerini, ileriki fonksiyonel ve yapısal analizler için üretim, saflaştırma, klonlama, ekspresyon, mutasyon ve kristallografi çalışmaları izlemiştir.	Enzim karakterizasyonu için gerçekleştirilen substrat seçiciliği ve inhibitör testleri, çalışmanın sonunda KATFO'nun fenol oksidaz yapısının daha çok katekol oksidaza benzediğini göstermiştir. Bazı fenolik bileşiklerin enzim üretimini artırdığı ve bu bileşiklerden katekol, resorsinol ve vanilik asidin KATFO üretimini baskıladığı; kafeik asit, mirisetin ve resveratrolün ise KATFO üretimini artırdığı raporlanmıştır.	Yüzügüllü, 2010
Production of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase of <i>Scytalidium thermophilum</i> in the presence of phenolic compounds	Çalışmada KATFO'nun fenolik bileşiklerle etkileşimini incelemek için 14 farklı fenolik maddenin KATFO üretimi üzerindeki etkileri test edilmiştir.	Çalışılan bazı fenolik maddelerin (katekol, kumarik asit, hidrokinon, kaempferol, mirisetin) çoğalma üzerinde olumsuz etki yaptığı, diğerlerinin ise çoğalmayı olumsuz yönde etkilemediği veya biyokütleyle en çok %50 artırarak büyümeyi artırdığı (kafeik asit, klorojenik asit, kateşin, gallik asit, resorsinol, vanilik asit) raporlanmıştır.	Yüzügüllü ve diğerleri, 2011
Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from <i>Scytalidium thermophilum</i>	KATFO'nun biyokimyasal ve yapısal çözümleme çalışmaları kapsamında, rekombinant olarak üretilmesi ve üretilen enzimin yapı çözümlemesi ile ilgili çalışmanın yapılması amaçlanmıştır.	Çalışmada kodon optimizasyonlu bir <i>catpo</i> geni klonlanmış ve <i>Escherichia coli</i> 'de ifade edilmiştir. KATFO'nun üretimi ve yapı çözümlemesinin ardından daha önce belirlenen katalaz yapılarına yüksek derecede yapısal benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Benzerliğin, katalaz aktivitesinin H ₂ O ₂ varlığında baskın olduğunu gösteren çalışmayı (Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008) desteklediği bildirilmiştir. H ₂ O ₂ 'in yokluğunda ise düşük seviyede fenol oksidaz aktivitesine dair açık kanıtlar gözlemlenmiştir.	Yüzügüllü ve diğerleri, 2013
Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazının ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi	Derleme çalışmasında, KATFO ve diğer katalazların gıda sanayisindeki öneminin vurgulanması amaçlanmıştır.	Çalışmanın sonunda katalazın keşfedilmiş ikincil oksidaz aktivitesinin enzimoloji açısından yeni bir bulgu olduğu raporlanmıştır. Bu çift aktivitenin daha ayrıntılı çalışılmasının düşük maliyetli ve yüksek verimli katalaz üretimine geniş ufuklar kazandıracağı düşünüldüğü bildirilmiştir.	Yüzügüllü ve Ögel, 2013
Identification of the site of oxidase substrate binding in <i>Scytalidium thermophilum</i> catalase	KATFO'nun klasik tek fonksiyonlu katalaz yapısına sahip olmasına rağmen, katekol ve fenol dahil olmak üzere bir dizi küçük organik maddeye karşı oksidaz aktivitesine de sahip olduğu bildirilmiştir. Katalaz kompleksinin klasik katalaz inhibitörü 3-amino-1,2,4-triazol (3TR) ile kristal yapısının 1,95 Å çözünürlükte belirlenmesi amaçlanmıştır.	Çalışmanın sonunda yapısal, mutasyon ve kinetik verilerine dayanarak, memeli katalazlarındaki NADPH'nin nikotinamid kısmı tarafından işgal edilen, yan kanalın girişindeki cebin, hem oksidaz substratının hem de 3TR bağlanmasının yeri olduğunu bildirilmiştir.	Yüzügüllü Karakuş ve diğerleri, 2018

Yapılan çalışmalardan yola çıkılarak, KATFO'nun keşfinden itibaren enzim hakkında farklı birçok açıdan araştırmaların gerçekleştirilmiş olduğu görülmektedir. Biyokimyasal açıdan detaylı şekilde çalışılmış ve karakterize edilmiş olan KATFO için bir sonraki aşamanın ticari üretim için ilk çalışmaların yapılması olduğu düşünülmüştür. Ticari üretim için de ilk basamakta besi yeri optimizasyonunun yapılması hem yüksek verim hem de düşük maliyet hedefi için önem arz etmektedir. Ayrıca, sıvı kültürde üretilen enzimin ticari son ürün haline gelebilmesi için toz formda elde edilmesi de önemlidir. Bu kapsamda tez çalışmasında laboratuvar ölçeğinde KATFO üretim (fermantasyon) koşullarının optimizasyonu ve üretilen enzimin kurutularak toz formda eldesi amaçlanmıştır.

2.1.5 *Scytalidium thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*)

Tez çalışmasında enzim üreticisi olarak kullanılan mikroorganizma *Humicola insolens*, *Torula thermophila*, *Humicola grisea* var. *Thermoida* ve yeni ismi ile *Mycothermus thermophilus* olarak da bilinen *Scytalidium thermophilum* (Şekil 2.3) isimli termofilik bir kültür (Tuomela ve diğerleri, 2000). *S. thermophilum*, gıda üretiminde kullanılan ve patojenik özellikte olmayan güvenli bir mikroorganizmadır.



Şekil 2.2 : *S. thermophilum*'a ait ışık mikroskop görüntüsü (Straatsma ve Samson, 1993).

2.2 Enzim Üretimi

Enzimler; hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Maliyetinin yüksek oluşu ve ekstraksiyonunun güçlüğü gibi nedenlerle hayvansal kaynaklar enzim üretiminde daha az tercih edilmektedir. Bitkisel kaynaklar da mevsime bağlı olarak değişken karakterde olmaları nedeniyle endüstriyel enzim üretiminde tercih

edilmemektedir. Mikroorganizmalar ise kısa sürede çoğalmaları, üretimlerinin verimli ve kolaylıkla kontrol edilebilmesi, ekstraksiyon yöntemlerinin kolaylığı, genetik müdahalelere uygun olmaları ve kararlı olmaları gibi nedenlerle en çok tercih edilen enzim kaynaklarıdır. Mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınan enzimlerin ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri de hayvansal ve bitkisel kaynaklara kıyasla daha kolaydır (Ogawa ve Shimizu, 2004). Endüstriyel boyutta enzim üretiminde kullanılan başlıca mikroorganizmalar bakteri ve küflerdir (Ponstein ve diğerleri, 2003). Bakteri ve küfler verimin yüksek olması, sürekli üretimin sağlanabilmesi, enzim aktivitesinin korunması ve ekonomik açıdan avantajlı olması gibi üstünlükler nedeniyle en çok tercih edilen kaynaklardır. Endüstriyel ihtiyaçları karşılayabilecek yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilen mikroorganizmaların araştırılması önemlidir. Termofilik koşullar altında çoğalabilen mikroorganizmaların ise endüstrinin talep ettiği enzimlerin elde edilmesinde önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir (Kıran ve diğerleri, 2006).

Tutuklanmış (immobilize) enzim kullanımı da sahip olduğu avantajlardan dolayı yaygınlaşmıştır (Swaigood, 2003; Boyacıoğlu ve diğerleri, 2016). Otomasyon kolaylığı, atık sorununun giderilmesi, kolaylıkla geri kazanım, aynı parti enzimin birden fazla kullanılabilmesi ve ürünün enzim ile kontamine olmaması bu avantajlar arasındadır (Tischer ve Kasche, 1999). Enzimlerin tutuklanmasında fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmakta olup, kullanılan teknikler tutunma ve hapsolme olarak ikiye ayrılmaktadır (De Paula ve diğerleri, 2008).

Enzim üretiminde besi yeri formülasyonu fermantasyon teknolojilerinde büyük öneme sahiptir. Uygun besi yeri formülasyonu düşük maliyetle en yüksek ürün oluşum hızına imkân verip yüksek biyokütle konsantrasyonu sağlamalıdır. Ayrıca istenmeyen ürünlerin oluşumuna engel olmalı ve sürekli bir kaliteye sahip olmalıdır (Madigan ve diğerleri, 2012). Besi yerileri (kültür ortamları) karmaşık ve tanımlı ortamlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Endüstriyel enzim üretiminde en yaygın kullanılan biyoreaktörler ise karıştırılmalı tank, hava kaldırmalı ve kabarcıklı kolon reaktörlerdir (Allman, 2006). Tüm biyoreaktörlerin sahip olması gereken temel özellikler mevcuttur. Bunlar genel olarak çalışılacak mikroorganizmanın gereksinim duyduğu havalandırma ve karıştırmayı sağlamak, sıcaklık ve pH kontrolü sağlamak, pilot ölçekli biyoreaktörle benzer yapıya sahip olmak ve en önemlisi en düşük maliyetle en verimli üretimin yapılmasının

mümkün olmasıdır (Yeşiladalı ve diğerleri, 2016). Bir fermantasyon prosesinin başarısı biyokütle ve ürün oluşumu için gerekli olan tanımlanmış çevresel koşulların devamlılığına bağlıdır. Bu nedenle sıcaklık, pH, karıştırma hızı, oksijen konsantrasyonu gibi çok sayıda parametrenin reaksiyon sırasında optimum düzeylerde tutulmaları gerekmektedir. Bu ölçümler ve kontroller sensörler yardımı ile yapılmaktadır (Reuss, 1994; Raj ve Karanth, 2005).

2.3 Melas

Bu tez çalışmasında *S. thermophilum*'dan KATFO üretim koşullarının optimizasyonu çalışmaları kapsamında maliyetin düşürülmesi amacıyla kültür ortamında karbon kaynağı olarak glikoz yerine melasın kullanılabilirliği araştırılmıştır. Melas, şeker (sakkaroz) üretim sürecinde kristalizasyon aşamasında ortaya çıkan, viskoz, koyu kahverengi ve zayıf akışkanlığa sahip sıvı bir yan üründür (Chauhan ve diğerleri, 2011). Melasın ana bileşenleri genel olarak karbonhidratlar ve sudur. Melas yüksek miktarda sakkaroz ve indirgen şeker bulundurmaktadır. Melasın şeker içeriği %40-60'a (a/a) ulaşırken, su içeriği %20'nin (a/a) altındadır (Pattanakittivorakul ve diğerleri, 2019).

Melas diğer karbon kaynaklarıyla kıyaslandığında yüksek miktarda şeker içerdiğinden katma değerli biyoürünlerin üretiminde ucuz bir ham madde olarak tercih edilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2019). Melas kullanılarak katma değerli ürünlerin elde edilmesi çevre kirliliğini ve atılan melasın sebep olduğu kaynak israfını azaltmanın yanı sıra, önemli ekonomik faydada da sağlamaktadır (Zhang ve diğerleri, 2021). Melas kullanılarak, laktaz, fitaz, inülinaz ve lipaz gibi birçok endüstriyel enzimin çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretiminin gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2021).

Germec ve Turhan (2020) tarafından yayınlanan çalışmada şeker pancarı melası kullanılarak *Aspergillus niger* inülinazının çalkalamalı inkübatörde (100 mL) ve karıştırmalı tank biyoreaktörlerinde (5 L ve 30 L) üretimi, saflaştırılması, enzim kinetiği ve karakterizasyon sonuçları raporlanmıştır. Godini ve diğerleri'nin (2017) yaptığı çalışmada ise *Kocuria* sp. ASB107 kullanılarak katalaz elde edilmiştir. Yapılan çalışmada fermantasyon ortamına karbon kaynağı olarak melas ve azot kaynağı olarak maya ekstraktı eklenmiştir. Melas %1-3 (h/h), maya ekstraktı ise %0,5-2,5 (a/h) aralığında katkılanmıştır. Ayrıca fermantasyon ortamının çalkalama hızı 100-200 rpm,

inokulum oranı ise %2,5-7,5 (h/h) aralığında çalışılmıştır. En yüksek katalaz aktivitesinin %3 (h/h) melas, %0,5 (a/h) maya ekstraktı, 200 rpm çalkalama hızı ve %7,5 (h/h) inokulum oranında 3399,08 U/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir.

2.4 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon ya da diğer ismiyle mikrokapsülleme, aktif haldeki bileşenlerin (çekirdek malzeme) çevredeki farklı bir malzeme (duvar, kaplama veya kapsülleme malzemesi) içerisine hapsedilerek, korunması ve iletilmesi için kullanılan tekniktir (Castro-Rosas ve diğerleri, 2017). Enkapsülasyon işlemiyle çekirdek malzeme ve dış ortam arasında fiziksel koruyucu bir çeper meydana gelmektedir. Çeper, aktif bileşenin dış etkenlerden korunmasına ve salınımının kontrol edilebilmesine yardımcı olurken, fiziksel ve kimyasal özelliklerine de olumlu bir etki sağlamaktadır. Hassas bileşenlerde ise uçucu kayıplarının en düşük seviyede tutulması amaçlanmaktadır. Enkapsülasyon işlemi genel olarak aktif bileşenin çevredeki bileşenlerle etkileşimine izin vermeyerek bileşiğin stabilitesine ve işlenebilirliğine yardımcı olmaktadır (Ribeiro ve diğerleri, 2020).

Günümüzde enkapsülasyon gıda, kozmetik, ilaç, tekstil, kağıt yapımı ve tarım gibi farklı endüstriyel alanlarda uygulama alanı bulmaktadır (Gökmen ve diğerleri, 2012; Ribeiro ve diğerleri, 2020). Enkapsüle edilecek olan maddenin, öncelikle maliyeti ve enkapsülasyon verimi göz önüne alınmalıdır. Enkapsüle edilecek maddenin sahip olduğu kuru maddenin boyut ve yoğunluk bilgisi, fizikokimyasal özellikleri, enkapsülasyon öncesi ve sonra depolama süresi ile depolama şartları enkapsülasyonun kullanılmasında karar verilecek önemli parametrelerdir (Gökmen ve diğerleri, 2012). Enkapsülasyon işleminde kullanılacak olan malzemenin hem ekonomik ve ulaşılabilir olması hem de kolay işlenmesi proses açısından önemlidir. Bahsedilen özelliklerin yanı sıra enkapsüle edilecek madde ile kaplama malzemesi arasında tepkime olmaması, çevresel koşullara karşı maddeye yüksek koruma sağlaması gerekmektedir (Desai ve Park, 2005).

Enkapsülasyon işleminin başarılı kabul edilebilmesi için bahsedilen özellikleri tek bir kaplama malzemesinin sağlayabilmesi zor olacağından çoğu zaman birkaç kaplama malzemesi bir arada kullanılır ya da fiziksel ve kimyasal özellikleri iyileştirilerek elde edilen modifiye kaplama malzemeleri kullanılmaktadır (Desai ve Park, 2005). Kaplama malzemelerinin seçiminde birçok farklı kriter bulunmaktadır. En önemli

kriterler, kaplama sonrasında pH değişimini ve elektrolit konsantrasyonunu en az seviyeye indirmek amacıyla kaplama malzemesinin enzimle tepkimeye girmemesi ve elektrolit konsantrasyonunun düşük seviyede olmasıdır. Kurutulmuş ürünün fiziksel durumu da önemlidir ve amorf durum kristal durumdan daha iyi stabilite sağlamaktadır (Capolongo ve diğerleri, 2002).

Mikroenkapsülasyon işleminde en çok kullanılan kaplama malzemelerinin film oluşturabilen şekerler, sentetik polimerler, gamlar, agar, doğal ve modifiye polisakkaritler, pektin, jelatin ve proteinler gibi maddeler olduğu bilinmektedir (Gökmen ve diğerleri, 2012). Kullanılan kaplama malzemelerinin düşük viskozite ve şeker içeriği yanında yüksek çözünürlüğe sahip olmaları enkapsülasyon işleminde avantaj sağlamaktadır (Avaltroni ve diğerleri, 2004). Bu tez çalışmasında enkapsülasyon malzemesi olarak MD ve mannitol birlikte kullanılmıştır.

2.4.1 Maltodekstrin (MD)

MD asit, asit/enzim veya çift enzim hidrolizi ile meydana gelen düşük maliyetli dönüştürülmüş nişasta ve mısır şurubu arasında bir ara üründür. Nişastanın aksine soğuk suda çözünabilen MD şurup gibi tatlı değildir. MD esas olarak α -(1,4) ve α -(1,6) bağlarıyla bağlanan D-glikoz polimerlerinden oluşan sakkarit polimerleridir (Dokic ve diğerleri, 1998; Goula ve Adanopoulos, 2012; Xiao ve diğerleri, 2022).

MD'deki nişasta bozunmasının değeri, indirgen uç gruplarının içeriğini değerlendiren Dekstroz Eşdeğerlik Parametresi (DE) ile gösterilmektedir (Garnero ve diğerleri, 2013). MD'ler DE değeri 2 ile 20 arasında değişen dönüştürülmüş nişasta ürünleridir. Polimerizasyon dereceleri (DP) oldukça geniş bir aralıktadır ve 3-20 glikoz molekülü içeren ortalama zincir uzunluğuna sahiptirler (Dokic ve diğerleri, 1998).

MD'ler gıda endüstrisinde gövde oluşturucu madde ve kaplama malzemesi olarak kullanılırken, kozmetikte aroma, koku ve kozmetik yağlar için taşıyıcı ajan olarak kullanılmaktadır (Dokic ve diğerleri, 1998; Xiao ve diğerleri, 2022). MD'ler gıda endüstrisinin yanı sıra çevreye karşı hassas olan maddeleri kapsüllemek için de kullanılmaktadır. Hassas maddelerden biri olan enzimler MD ile kapsüllendiği zaman enzimlere oksidatif ve termal stabilite kazandırılmaktadır. Görünür ve ultraviyole ışığa karşı gösterdiği stabilite ile de maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirmektedir (Shiga ve diğerleri, 2001; Xiao ve diğerleri, 2022).

MD yüksek çözünürlük, düşük viskozite ve emülsifikasyon gibi nitelikler açısından çok yönlü bir kaplama malzemesidir. Kaplama malzemesi hem yüzey aktif madde hem de kurutma matrisi olarak enzim kapsüllenmesinde ideal yapılar sergilemektedir (Shiga ve diğerleri, 2001). Kurutma ve depolama esnasında MD kullanılması ürünün higroskopikliğini, camsı geçiş sıcaklığını (T_g) ve enkapsülasyon verimliliğini de artırmaktadır (Xiao ve diğerleri, 2022).

Darvishi ve diğerleri (2012) tarafından yayınlanan bir çalışmada *Yarrowia lipolytica* kullanılarak lipaz üretilip dondurularak kurutma yoluyla toz formda depolanması incelenmiştir. Lipazın dondurularak kurutulmasından önce farklı konsantrasyonlarda (%0,5-1) MD ve gliserol kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır. Kaplama malzemesi kullanılarak kurutulan lipazın kaplama malzemesi kullanılmadan kurutulan lipaza göre kurutma veriminin 3,5 kat arttığı bildirilmiştir. MD ile kaplaması yapılarak kurutulan lipazın dehidrasyon işlemi sırasında iyi derecede korunduğu, ayrıca kurutma veriminin diğer formülasyonlardan daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Mehrnoush ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada mango kabuğundan saflaştırılmış pektinazın dondurularak kurutma koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Optimizasyon çalışması için mango kabuğundan ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen saflaştırılmış pektinazın farklı konsantrasyonlarına (10-50 mg/mL), arap zıncı (%1-8 (a/h)) ve MD (%2-6 (a/h)) eklemesi yapılmıştır. Çalışmanın sonunda pektinaz aktivitesi, verim ve depolama stabilitesi incelenmiştir. Arap zıncı ve MD'nin dondurularak kurutulmuş pektinazın enzimatik özelliklerini iyileştirdiği rapor edilmiştir.

2.4.2 Mannitol

Mannitol, fruktoz türevidir, altı karbonlu poliol veya şeker alkolüdür. Şeker alkolleri, şekerin karboniline (aldehit veya keton) karşılık gelen birincil veya ikincil hidroksil grubuna indirgendiği bir poliol sınıfıdır (Wisselink ve diğerleri, 2002; Song ve Vieille, 2009). Mannitol ticari olarak glikoz, sakkaroz ve nişastadan hidrojenizasyon yoluyla üretilmektedir (İşgören ve Sungur, 2019). Mannitolün susuz α -, β - ve δ - mannitol, metastabil ve amorf mannitol ve hemihidrat olmak üzere farklı formları mevcuttur. Mannitolün farklı formları kurutma ve depolama sırasında susuz formlara dönüşmektedir ve kurutulmuş ürünlerin kalitesi üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir (Cao ve diğerleri, 2013; Osanl   ve diğerleri, 2023).

Mannitolün, antioksidan (oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruma) ve metabolize edilemeyen bir tatlandırıcı olarak farklı olumlu etkilere sahip olduğu varsayılmaktadır (Wisselink ve diğerleri, 2002). Mannitol sıcaklık ve pH değişimlerine karşı kararlı ve hacim artırıcı bir maddedir (İşgören ve Sungur, 2019). Mannitol, özelliklerinden dolayı farmasötik ürünlerde, gıda endüstrisinde ve tıpta birçok uygulama alanı bulmaktadır (Song ve Vieille, 2009).

Dondurarak kurutma teknolojisinde yardımcı madde olarak tercih edilen mannitol, camsı geçiş sıcaklığını düşürmekte ve kurutma sırasında makroskobik çökmeye karşı direnç sağlayan kristal yapı iskeleti oluşturmaktadır. Oluşan yapı iskeleti kurutulan ürünü stabil hale getirmektedir (Izutsu ve diğerleri, 1994; Horn ve Friess, 2018; Adali ve Barrasi, 2023; Osanl o ve diğerleri, 2023).

Capolongo ve diğerleri (2002) lignin peroksidazın farklı kaplama malzemeleri ile enkapsüle edilmesi ile dondurarak kurutma işlemi ve sonrası depolama süresince kaplama malzemelerinin stabilite üzerinde etkisini çalışmıştır. Çalışmada, elektrolit (DMS tamponu), şeker (sakkaroz), protein (BSA), poli-alkol (mannitol) ve polimer (dekstran) gibi kimyasal olarak farklı kaplama malzemelerinin etkisi incelenmiştir. Mannitolün, kurutma sırasında enzim ile etkileşime girerek protein denatürasyonuna neden olduğu, depolama süresinde ise lignin peroksidaz aktivitesini inhibe ettiği raporlanmıştır.

Shiga ve diğerleri (2014) alkol dehidrojenazın kurutma işlemi sırasında termal denatürasyonunu sınırlamak için mannitol içerisinde kapsüllenmesini amaçlamıştır. Enzimin enkapsüle edilerek kurutulmuş toz formlarından hepsinin aktif olmadığı bildirilmiştir. Aktivite kaybının sebebinin kullanılan mannitolün hızlı kristalleşmesi nedeniyle kurutma öncesi forma göre enzim koruma yeteneğini bozmuş olması ihtimaline vurgu yapılmıştır. Mannitolün kristalizasyonunu azaltmak için MD ile beraber kullanılmasına ihtiyaç duyulduğu raporlanmıştır. Bu şekilde uygulanan enkapsülasyonda kristalizasyonun engellenebildiği ve enzim aktivitesinin korunduğu bildirilmiştir.

2.4.3 Enkapsülasyon amacıyla kullanılan kurutma teknikleri

Enkapsülasyon uygulamalarında kümeleme, ekstrüzyon, moleküler kalıntı, akışkan yatakta kaplama, ko-kristalizasyon gibi yöntemlerin yanı sıra en çok dondurarak kurutma ve püskürtmeli kurutma yöntemleri kullanılmaktadır (Gökmen ve diğerleri,

2012). Dondurarak kurutma ısıya karşı duyarlı malzemeler için oldukça etkili bir kurutma yöntemi olmasına rağmen püskürtmeli kurutma özellikle antosiyanince zengin malzemelerin enkapsülasyon uygulamasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir (Shahidi ve Han, 1993; DeZarn, 1995).

2.4.4 Dondurarak kurutma

Liyofilizasyon olarak da bilinen dondurarak kurutma maddenin önce dondurulduğu daha sonra süblimasyon ve ardından desorpsiyon yoluyla solvent miktarının düşürüldüğü bir tekniktir. Dondurarak kurutma solvent miktarının biyolojik ve/veya kimyasal tepkimeleri desteklemeyecek değerlere kadar azaltıldığı bir stabilizasyon işlemi olarak da tanımlanmaktadır. Dondurmanın amacı, formülasyonun sıcaklığının düşürülmesiyle çözücü ve çözünenin ayrıldığı bir matris ortaya çıkartmaktır (Karagül ve Altuntaş, 2018). Dondurarak kurutma işleminde, dondurulacak madde içerisindeki su vakum altında bir bölme içerisinde dondurulan maddeden süblimasyon yoluyla buhar olarak uzaklaştırılmaktadır. Oluşan buhar mekanik bir vakum pompası veya su buharı jet püskürtme sistemi kullanılarak uzaklaştırılmaktadır (Geankoplis, 2015).

Diğer kurutma yöntemleriyle karşılaştırıldığında en kaliteli ürün dondurarak kurutma ile elde edilmektedir. Önemli bir faktör olan yapısal sertlik, süblimleşmenin gerçekleştiği yüzeyin donmuş olmasıyla ilgilidir. Yapısal sertlik kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kurutulmuş maddenin şeklinin stabil kalmasına yardımcı olmaktadır. Dondurularak kurutulmuş maddeler büzülme olmamış gözenekli bir yapıya sahip olmaktadır. Bu yapı sayesinde, tekrar su eklendiğinde madde suyu hızla absorbe ederek (rehidrasyon) kurutma yapılmadan önceki yapısına benzer bir yapıya kavuşmaktadır (Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003; Geankoplis, 2015). Dondurarak kurutma işlemi üç basamakta gerçekleştirilmektedir:

- 1. Dondurma:** Düşük sıcaklık uygulamasıyla kurutulacak maddenin dondurulması (genellikle serbest su)
- 2. Kurutma:** Düşük basınç altında donmuş sıvının süblimleşmesi (birincil kurutma) ve bağlı sıvının (donmamış) kurutulacak maddeden uzaklaştırılması (ikincil kurutma)
- 3. Muhafaza:** Kontrollü şartlarda depolama (oksijen ve nem bulunmayan genellikle inert gaz ile doldurulmuş hava geçirmez depolarda muhafaza) (Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003).

Dondurarak kurutma işleminin birincil kurutma basamağında kurutulacak maddedeki serbest su, ikinci kurutma periyodunda ise bağlı su uzaklaştırılmaktadır (Sadıkoğlu ve Özdemir, 2003). Kurutma yapılmasının temel amacı, ürünün su aktivite değerini düşürerek mikrobiyal bozulmayı önlemek ve doğrudan raf ömrünü uzatmaktır. Kurutulan ürünün su aktivite değeri düştükçe ürün daha stabil bir hâl almaktadır. Ayrıca kurutma işlemi ile ürünün hacmi azalmakta ve nakliye, depolama gibi süreçlerinde kolaylık meydana gelmektedir. Benzer avantajlar enzim ürünleri için de geçerli olup toz forma dönüşen enzim ürünlerinde, ortamdan serbest su uzaklaştırılmaktadır. Böylece enzim moleküllerinin hareketi kısıtlanmakta ve bu sayede depolama süresi boyunca enzim aktivite kaybı da azalmış olmaktadır.

Kurutma basamağında birincil kurutma aşamasında cihazın hazne içerisinde bulunan basınç düşer ve dondurma basamağında meydana gelen buz kristallerinin süblimleşmesi için ısı uygulanır. Cihazın hazne içerisindeki bulunan basınç bir vakum pompası yardımıyla düşürülür. Vakumun uygulanması, su buharının donmuş kütleden serbestçe hareket etmesine olanak tanır. Süblimleşme devam ettikçe donmuş kütle, kek tipi bir yapı meydana getirir (Deepak ve Iqbal, 2015). Söz konusu süblimleşme, donmuş sıvının, sıvı faza geçmeden doğrudan gaz fazına geçişi olarak tanımlanabilmektedir (Gaidhani ve diğerleri, 2015).

Birincil kurutmanın ardından ikincil kurutmada sıcaklığın yükseltilmesiyle, donmuş solvent üründen uzaklaştırılmamış olursa erime gözlemlenebilir. Birincil kurutma işleminin bitirileceği noktanın belirlenmesi çok önemlidir. Birincil kurutma sırasında ürün sıcaklığı genellikle -35 ile -20°C arasında değişmektedir. Birincil kurutmadaki basınç değerleri sabit kalıp sadece sıcaklığın yükseltilmesi ile ürün matriksi içerisinde bulunan bağlı su uzaklaştırılır (Day ve Stacey, 2007).

Birincil kurutma sırasında kontrol edilebilen işlem parametreleri hazne basınç değeri ve raf sıcaklık değeridir (Day ve Stacey, 2007). Birincil kurutma aşamasında donmadan kalan sulu çözelti, ikincil kurutma aşamasında buz süblimasyon sınırına kadar liyofilize edilir. Buz süblimasyonu gerçekleşmeyen katı çözelti içinden sulu çözeltinin evaporasyon, desorpsiyon ve difüzyon ile uzaklaştırılması işlemi ikincil kurutma olarak bilinmektedir. İkincil kurutma, donmamış suyun çoğunu desorpsiyon yoluyla çözünen fazdan uzaklaştırılması için yüksek sıcaklık uygulamasıyla gerçekleştirilir (Roy ve Gupta, 2004).

Birincil kurutmanın asıl amacı, çözücünün, süblimasyon yoluyla matriksten uzaklaştırmak iken, ikincil kurutmanın asıl amacı, ürün içerisindeki nemi biyolojik aktivite veya kimyasal reaksiyonların gerçekleşmeyeceği bir düzeye indirmektedir. Liyofilizasyon prosesindeki bu adım aktif bileşenin kinetik aktivitesini yavaşlatmanın bir yolu olarak işlev görmektedir (Jennigs, 2008).

Mehrnoush ve diğerleri (2012) mango kabuğundan saflaştırılmış pektinaz için dondurarak kurutma yöntemi üzerinde farklı değişkenlerin etkisini gözlemlemeyi amaçlamıştır. Bağımsız değişken olarak pektinaz içeriği (10-50 mg/mL), arap zmkı (%1-8, a/h) ve MD (%2-6, a/h) seçilerek enzimin aktivite, verim ve depolama stabilitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda mango kabuğundan dondurularak kurutulmuş pektinaz için en uygun koşulların 30 mg/mL pektinaz için %4,5 (a/h) arap zmkı ve %4 (a/h) MD kullanılarak elde edildiği bildirmiştir. Bu koşullar altında, kapsüllenmiş pektinazın en yüksek aktivitesinin 11,12 U/mL, veriminin %86,4 ve depolama stabilitesinin %84,2 olarak elde edildiği raporlanmıştır.

Isleroglu ve diğerleri'nin (2019) yaptığı çalışmada transglutaminaz dondurarak kurutma tekniği kullanılarak mikrokapsüllenmiştir. Çalışmada homojenizasyon koşullarının ve kaplama malzemesi konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Transglutaminaz için kaplama malzemesi olarak mannitol, arap zmkı ve kazein seçilmiştir. Enzime farklı homojenizasyon süreleri (1-5 dk) ve homojenizasyon hızları (11.200-20.000 rpm) uygulanmıştır. En yüksek enzim aktivitesini sağlayan optimum koşullar sırasıyla 11.200 rpm homojenizasyon hızı, 1,27 dk homojenizasyon süresi ve sırasıyla %38,2, %40,2 ve %21,6 konsantrasyonlarında mannitol, arap zmkı ve kazein karışımı olduğu bildirilmiştir. Optimum şartlarda mikrokapsüllenenek kurutulan transglutaminazın kalan aktivitesi %93, aynı kurutma koşullarında kaplama malzemeleri olmadan kurutulan transglutaminazın kalan aktivitesi ise %64 olarak raporlanmıştır.

De Jesus ve Filho (2014) model enzim olarak α -amilazı seçerek püskürtmeli kurutucu ile kurutma ve dondurarak kurutma yönteminin enzim aktivitesi ve su aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesini amaçlamıştır. Dondurarak kurutma çalışmalarında üç dondurma yöntemi (dondurucu, aseton ve kuru buz, azot) kullanılmıştır. Dondurarak kurutma işlemi -90°C'de 0-24 saat arasında gerçekleştirilmiş, elde edilen örneklerin yüksek enzim aktivitesi ile düşük su aktivitesi sergilediği raporlamıştır.

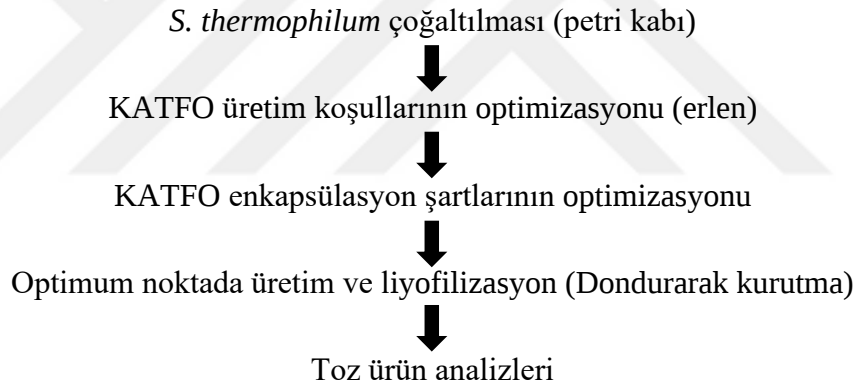
2.5 Çalışmanın Amacı

Çalışmanın amacı, ilk aşamada termofilik bir küf olan *S. thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*) kullanılarak çift fonksiyonlu KATFO'nun üretim (sıvı kültürde fermantasyon) koşullarının optimize edilmesidir. Bu amaçla, istatistiksel optimizasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak insan beslenmesi için önemli bir şeker olan glikoz yerine maliyeti düşük bir yan ürün olan melas kullanılmıştır. Ayrıca, KATFO üretimini indükleyici yönde potansiyel etkisi olan H_2O_2 'in varlığının etkisi de incelenmiştir. KATFO'nun optimum fermantasyon koşulunun belirlenmesi için 4 değişken ve 3 seviyeli Box-Behnken deney tasarımı (BBD) ve TYM kullanılmıştır. Sıcaklık (40-50°C), glikoz konsantrasyonu (20-40 g/L), H_2O_2 konsantrasyonu (0-0,05 mM) ve melas konsantrasyonu (%0-3, a/h) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Tepki olarak katalaz aktivitesi (U/mL) tespit edilmiş ve en yüksek enzim aktivitesi hedefiyle optimum koşul belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, optimum koşulda üretilen KATFO'nun enkapsülasyon ve dondurarak kurutma yöntemleri ile toz forma getirilmesi için en uygun koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak 3 değişken ve 3 seviyeli Box-Behnken deney tasarımı (Box ve Behnken, 1960) ve TYM kullanılmıştır. Enkapsülasyon işleminde MD konsantrasyonu (1-3 g MD/g kuru madde enzim) ve mannitol konsantrasyonu (1-3 g mannitol/g kuru madde enzim) ve homojenizatör hızı (4000-12000 rpm) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Optimizasyon çalışmasında katalaz aktivitesi verimi (%) tepki olarak seçilmiş, en yüksek verim hedefiyle optimum koşul belirlenmiştir. Optimum noktada enkapsülasyon yapılarak kurutulan KATFO, kontrol (enkapsüle edilmemiş) olarak kurutulan KATFO ve sıvı haldeki (ham) KATFO +4°C'de 13 haftalık (91 gün) raf ömrü analizlerine ve toz ürüne uygulanan analizlere tabi tutularak enkapsülasyon ve dondurarak kurutmanın KATFO'nun depolama stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu sayede, daha önceki çalışmalarda detaylı biyokimyasal karakterizasyonu yapılmış KATFO'nun ticari üretimi için ilk kez laboratuvar ölçeğinde fermantasyon ve enkapsülasyon/kurutma optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada termofilik bir küf olan *S. thermophilum*'dan (*M. thermophilus*) KATFO üretim (sıvı kültürde fermantasyon) koşulları optimize edilmiştir. İkinci aşamada ise optimum fermantasyon koşulunda üretilen KATFO kullanılarak en yüksek enzim aktivite verimliliğine sahip toz formdaki KATFO eldesi için koşullar optimize edilmiştir. Çalışmada izlenmiş olan iş akışı Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bu çalışma için hem üretim koşulları hem de enkapsülasyon/dondurarak kurutma koşulları BBD ve TYM kullanılarak optimize edilmiştir.



Şekil 3.1 : Çalışmada izlenen iş akış şeması.

3.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup MD Applichem Panreac ITW Companies firmasından, katekol Acros Organics B.V.B.A. firmasından, glikoz Isolab firmasından ve kullanılan diğer kimyasallar Sigma Aldrich, Merck Millipore ve VWR kimyasal şirketlerinden temin edilmiştir. Melas ise Konya'nın Ilgın ilçesinde faaliyet gösteren Ilgın Şeker Fabrikası tarafından sağlanmıştır.

3.2 Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları

S. thermophilum ATCC No.16454 (*Mycothermus thermophilus*), YpSs (maya özütli) agar (EK A) üzerinde 45°C sıcaklıkta 3 gün boyunca inkübe edilerek çoğaltılıp stok kültür olarak +4°C'de muhafaza edilmiştir. YpSs agardan alınan stok kültür ile ön kültür (EK A) hazırlanmıştır.

Ön kültür 50 ml'lik erlenlerde 20 ml besi yeri kullanılarak hazırlanmış ve 24 saat boyunca 45°C sıcaklık ve 155 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (IKA, İtalya) inkübe edilmiştir. Ön kültürden alınan inokulum %1 (h/h) oranıyla erlen içerisine hazırlanan 100 ml'lik ana kültüre (EK A) aşılanmıştır.

3.3 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu İçin Ön Çalışmalar

KATFO üretim koşulları optimizasyonu için besi yerine katalaz üretimini indüklediği bilinen tannik asit, Triton X-100 ve H₂O₂ eklenerek etkileri incelenmiş, ayrıca besi yeri bileşeni (düşük maliyetli karbon kaynağı) olarak melas ve pektin denemesi yapılmıştır.

Tannik asit için denemede referans konsantrasyon değeri olarak Prof. Dr. Didem SUTAY'ın doktora tezinde çalışılmış olan ve en yüksek KATFO aktivitesi sağlayan 0,6 g/L tannik asit konsantrasyonu kullanılmıştır (Sutay, 2007). Tannik asit çalışılan denemeler için 0,6 g/L orta değer olarak seçilmiş 0,4 g/L alt değer ve 0,8 g/L üst değer olarak belirlenmiştir. Triton X-100 için yapılan denemede ise referans konsantrasyon değeri Nishikawa ve diğerleri (1993) tarafından yayınlanmış olan çalışma temel alınarak belirlenmiştir. Denemelerde 1 mL Triton X-100/100 ml besi yeri değeri üst limit olarak, 0,1 mL Triton X-100/100 mL besi yeri alt limit ve 0,5 mL Triton X-100/100 mL besi yeri konsantrasyonu orta değer olarak belirlenmiştir.

Kültür ortamına H₂O₂ katkılanması denemesi için referans konsantrasyon değeri olarak Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ'nün doktora tezinde çalışılmış olan ve en yüksek KATFO aktivitesine ulaşılmasını sağlayan 0,1 mM H₂O₂ konsantrasyonu kullanılmıştır (Yüzügüllü, 2010). Bu değer referans alınarak gerçekleştirilen çalışmada 0,1, 0,05 ve 0,15 mM H₂O₂ konsantrasyonları denenmiştir.

S. thermophilum'dan KATFO üretimini artırmak için kültür ortamına karbon kaynağı olarak glikoz yerine çeşitli konsantrasyonlarda pektin ve melas eklenmiştir. Glikozun,

insan beslenmesi için monomer yapıda önemli bir şeker olması bu tez çalışmasında glikoz yerine farklı karbon kaynaklarını deneme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Glikoz yerine şeker içeriği yüksek melas ve pektin kullanılması tercih edilmiştir. Şeker fabrikalarının bir yan ürünü olan melas, bileşeninin yaklaşık %50'sinin şeker olması ve düşük maliyetli olmasından dolayı tercih edilmiştir.

Melas için referans konsantrasyon değeri olarak Bae ve Shoda (2004a) tarafından yayınlanan çalışmada kullanılmış olan yine Godini ve diğerleri'nin (2017) yaptığı çalışmada da orta değer olarak kullanılan %2 (a/h) melas konsantrasyonu kullanılmıştır. Melas için %2 (a/h) orta değer olarak seçilmiş ve %1-3 (a/h) konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. *S. thermophilum*'un çoğalabilmesi için gerekli olan ana kültür bileşenlerinden birisi 40 g/L glikoz konsantrasyonudur. Ön denemede kullanılan farklı melas konsantrasyonu (%1, 2 ve 3, a/h) denemeleri 40 g/L glikoz varlığında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, farklı bir denemede glikoz içermeyen ve %4 (a/h) melas katkılanan kültür ortamı ile çalışılmıştır.

Pektinin karbon kaynağı olarak denenmesi için Gromada ve Fiedurek (1996) tarafından yayınlanmış olan çalışmada en yüksek enzim aktivitesi sağlayan 2 mg/mL pektin konsantrasyonu denemesi referans konsantrasyon değeri olarak kullanılmıştır. Orta değer olarak 2 mg/mL seçilmiş, alt limit 1 mg/mL ve üst limit 3 mg/mL olarak belirlenmiştir.

3.4 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu

KATFO üretiminin optimizasyonu için kültür ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşulları yapılan ön deneme sonuçlarına bağlı olarak 4 bağımsız değişken ve 3 seviyede belirlenmiş olup çalışma aralıkları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Çalışmada dört bağımsız değişken; sıcaklık (40-50°C), glikoz konsantrasyonu (20-40 g/L), H₂O₂ konsantrasyonu (0-0,05 mM) ve melas konsantrasyonu (%0-3, a/h) olarak belirlenmiştir. Sıcaklık ve glikoz konsantrasyonu için çalışma aralıkları önceki çalışmalar temel alınarak belirlenmiş olup, H₂O₂ ve melas konsantrasyonu için çalışma aralıkları literatür taraması ve yapılan ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1 : KATFO üretim optimizasyonu için BBD bağımsız değişkenleri ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Değişken Adı	Seviye		
		-1	0	1
X_1	Sıcaklık (°C)	40	45	50
X_2	Glikoz Konsantrasyonu (g/L)	20	30	40
X_3	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM)	0	0,025	0,05
X_4	Melas Konsantrasyonu (% a/h)	0	1,5	3

BBD ve TYM kullanılarak Çizelge 3.2’de verildiği gibi, her biri 2 tekrar ve 2 paralel olmak üzere toplamda 29 deney seti, 5 merkez noktalı analiz ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Minitab 18 programı (ABD) ile analiz edilerek optimum çalışma koşulu belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi (U/mL) hedeflenerek optimum fermantasyon koşulu belirlenmiştir. Regresyon ve varyans analizleri de (ANOVA) Minitab 18 programı (ABD) ile yapılmıştır. Çalışmada modellerin belirlenmesi ve test edilmesinde F ve p ($<0,05$) değerleri dikkate alınmıştır. Seçilen modelin uygun olup olmadığını tespit etmek için regresyon katsayıları incelenmiştir. Bu amaçla, istatistiksel değerlerden belirlilik katsayısı (R^2), düzeltilmiş belirlilik katsayısı (R^2 -adjusted), tahmin edilen belirlilik katsayısı (R^2 -predicted), model uyumsuzluğu (*lack of fit*) ve tahmini artık kareler toplamı (*PRESS*) tespit edilmiştir.

3.5 Sonuçların Doğrulanması

Elde edilen modelin doğrulanması (verifikasyonu) için TYM ile yapılan optimizasyon çalışması sonrası belirlenen optimum noktada enzim aktivitesi tayini yapılmış olup modelden elde edilen teorik sonuç ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.2 : KATFO üretimi için deney tasarımı.

Deney Numarası	Kod Değerleri				Kodlanmamış Değerler			
	X_1	X_2	X_3	X_4	Sıcaklık (°C)	Glikoz Konsantrasyonu (g/L)	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM)	Melas Konsantrasyonu (% a/h)
1	-1	-1	0	0	40	20	0,025	1,5
2	1	-1	0	0	50	20	0,025	1,5
3	-1	1	0	0	40	40	0,025	1,5
4	1	1	0	0	50	40	0,025	1,5
5	0	0	-1	-1	45	30	0	0
6	0	0	1	-1	45	30	0,05	0
7	0	0	-1	1	45	30	0	3
8	0	0	1	1	45	30	0,05	3
9	-1	0	0	-1	40	30	0,025	0
10	1	0	0	-1	50	30	0,025	0
11	-1	0	0	1	40	30	0,025	3
12	1	0	0	1	50	30	0,025	3
13	0	-1	-1	0	45	20	0	1,5
14	0	1	-1	0	45	40	0	1,5
15	0	-1	1	0	45	20	0,05	1,5
16	0	1	1	0	45	40	0,05	1,5
17	-1	0	-1	0	40	30	0	1,5
18	1	0	-1	0	50	30	0	1,5
19	-1	0	1	0	40	30	0,05	1,5
20	1	0	1	0	50	30	0,05	1,5
21	0	-1	0	-1	45	20	0,025	0
22	0	1	0	-1	45	40	0,025	0
23	0	-1	0	1	45	20	0,025	3
24	0	1	0	1	45	40	0,025	3
25	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5
26	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5
27	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5
28	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5
29	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5

3.6 KATFO'nun Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Ana kültür ortamlarından, optimizasyon çalışmaları için her gün, dondurarak kurutma çalışmaları için ise en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği 8. gün örnek alınmıştır. Alınan örnekler 11000 rpm'de 10 dakika boyunca çözünmemiş kısımlarından arındırılmak üzere santrifüjlenmiştir (Nüve, Türkiye). Pellet kısımları atılmış ve süpernatant kısımların katalaz aktivitesi Sutay Kocabaş ve diğerleri (2008) tarafından raporladığı şekilde incelenmek üzere ayrılmıştır. Aktivitenin belirlenmesi için substrat olarak 10 mM H₂O₂ kullanılmıştır. Katalaz aktivitesi, her ikisi de 60°C sıcaklıkta dengelenmiş; 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile uygun şekilde seyreltilmiş 10 µL enzim ve 1 mL substratın karıştırılması ile ölçülmüştür.

Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) 240 nm’de absorbansta meydana gelen azalma izlenmiş ve katalaz aktivitesi Eşitlik 3.1’e göre hesaplanmıştır. Bir enzim aktivite birimi, dakikada 1 µmol H₂O₂’nin parçalanmasını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008).

$$\text{Katalaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL}\right) = \left[\frac{\left(\frac{\Delta OD_{240}}{\Delta t}\right) \times \left(\frac{1}{\epsilon}\right) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (10^3)}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \right] \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (3.1)$$

3.7 KATFO’nun Fenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Fenol oksidaz aktivitesinin tayini için KATFO’nun katekol oksidasyon (katekol oksidaz) aktivitesi incelenmiş, bu amaçla ana kültür ortamlarından dondurarak kurutma çalışmaları için en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği 8. günde örnek alınmıştır. Alınan örnekler 11000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Nüve, Türkiye). Santrifüj sonrası süpernatant kısımların katekol oksidaz aktivitesi Sutay Kocabaş ve diğerleri (2008)’nin uyguladığı gibi gerçekleştirilmiştir. Katekol oksidaz tayini için 100 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde 0,5 mL 100 mM katekol çözeltisi, 0,5 mL enzim ve 1 mL 100 mM fosfat tamponundan (pH 7 ve 60°C) oluşan reaksiyon karışımının spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) 420 nm dalga boyunda absorban artışını takip edilmiş ve enzim aktivitesi Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Bir enzim aktivite birimi, dakikada 1 µmol ürün oluşumu için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sutay Kocabaş ve diğerleri, 2008).

$$\text{Katekol oksidaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL}\right) = \left[\frac{\left(\frac{\Delta OD_{420}}{\Delta t}\right) \times \left(\frac{1}{\epsilon}\right) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (10^6)}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \right] \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (3.2)$$

3.8 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu İçin Ön Çalışmalar

Çalışmanın ikinci aşamasında, birinci basamakta tespit edilmiş optimum fermentasyon koşulunda üretilen KATFO’nun en yüksek verimle toz formda elde edilmesi (enkapsülasyon ve dondurarak kurutma) için süreç koşullarının optimize edilmesi amaçlanmıştır.

Isleroglu ve diğerleri (2019) tarafından yapılmış olan çalışmada enkapsülasyon ajanı olarak mannitol, arap zımkı ve kazeinin farklı konsantrasyonları kullanılmış, 1-5 dk süre aralığı ve 11.200-20.000 rpm karıştırma hızı aralığı denenmiştir. Jamdar ve

diğerleri (2021) tarafından yapılmış olan çalışmada ise MD ve peynir altı suyu protein konsantrasyonunun 1:3, 2:2 ve 3:1 oranlarındaki katkısı ile lipaz ve asit fosfataz çalışılmıştır. Lipazın liyofilizatöre alınmadan önce enkapsülasyonunun manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Tez çalışması için yapılan literatür taraması sonucunda enkapsülasyon işleminde kaplama malzemesi olarak en çok kullanılan MD'in ve MD destekleyici malzeme olarak da mannitolün kullanılması tercih edilmiştir.

Referans alınan çalışmalardan yola çıkılarak KATFO ve MD 1:1 oranında hem manyetik karıştırıcı hem de homojenizatör kullanarak 3 dakika karıştırılmıştır. 1 saat -80°C'de (Thermo Scientific, ABD) bekletilen örnekler liyofilizatöre (Scanvac, Danimarka) yerleştirilerek -110°C'de 0,025 mbar basınçta 16 saat boyunca kurutulmuş ve toz formda KATFO elde edilmiştir.

3.9 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi

3.9.1 Deney tasarımı ve besleme çözeltisi hazırlama

Çalışma TYM kullanılarak Box-Behnken yöntemi ile 3 değişken ve 3 seviyede gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.3'te çalışılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri verilmiştir. Bağımsız değişkenler, MD konsantrasyonu (1-3 g MD/g kuru madde enzim) (X_5), mannitol konsantrasyonu (1-3 g mannitol/g kuru madde enzim) (X_6) ve homojenizatör hızı (4000-12000 rpm) (X_7) olarak belirlenmiştir. Karıştırma süresi sabit 3 dakika olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.4'te sunulduğu üzere toplam 18 deney seti ile çalışılmıştır. Deneme desenine uygun şekilde hazırlanan çözeltiler 3 dakika boyunca deneme deseninde belirtilen hızlarda homojenize edilerek (IKA T25 Ultra-turrax, Almanya) kurutma aşaması için hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 : Enkapsülasyon çalışması için bağımsız değişkenler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Değişken Adı	Seviye		
		-1	0	1
X_5	MD konsantrasyonu (g MD/g kuru madde enzim)	1	2	3
X_6	Mannitol konsantrasyonu (g Mannitol/g kuru madde enzim)	1	2	3
X_7	Homojenizatör hızı (rpm)	4000	8000	12000

3.9.2 Dondurarak kurutma

Besleme çözeltisi dondurarak kurutma öncesi -80°C 'de 1 saat dondurulup (Thermo Scientific, ABD) ardından liyofilizatöre (Scanvac, Danimarka) yerleştirilerek -110°C 0,025 mbar basınçta 16 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda toz formda enkapsüle edilmiş (kaplanmış) ve enkapsüle edilmemiş (kaplanmamış) KATFO elde edilmiştir.

KATFO'nun toz formda elde edilmesi çalışmasında da regresyon ve varyans analizleri (ANOVA) Minitab 18 programı (ABD) ile yapılmıştır. Çalışmada modellerin belirlenmesi ve test edilmesinde F ve p (0,05) değerleri dikkate alınmıştır. Seçilen modelin uyumluluğunun tespiti için regresyon katsayıları incelenmiştir. Belirlilik katsayısı (R^2), düzeltilmiş belirlilik katsayısı ($R^2\text{-adjusted}$) ve tahmin edilen belirlilik katsayısı ($R^2\text{-predicted}$) değerlerine bakılmıştır. Ayrıca model uyumsuzluğu, tahmini artık kareler toplamı (PRESS) değerlerine de dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.4 : Enkapsülasyon çalışması için deney tasarımı.

Deney Numarası	Kod Değerleri			Kodlanmamış Değerler		
	X_5	X_6	X_7	MD konsantrasyonu (g MD/g kuru madde enzim)	Mannitol konsantrasyonu (g mannitol/g kuru madde enzim)	Homojenizatör hızı (rpm)
1	-1	1	0	1	3	8000
2	0	-1	1	2	1	12000
3	1	0	-1	3	2	4000
4	0	0	0	2	2	8000
5	0	0	0	2	2	8000
6	-1	-1	0	1	1	8000
7	0	0	0	2	2	8000
8	1	0	1	3	2	12000
9	0	1	1	2	3	12000
10	0	0	0	2	2	8000
11	0	1	-1	2	3	4000
12	0	-1	-1	2	1	4000
13	1	-1	0	3	1	8000
14	-1	0	-1	1	2	4000
15	-1	0	1	1	2	12000
16	1	1	0	3	3	8000
17	0	0	0	2	2	8000

3.9.3 Katalaz Aktivitesi Veriminin Hesaplanması

Dondurarak kurutma sonrası elde edilen örneklerin katalaz aktiviteleri tayin edilmiş ve başlangıç aktivitesine göre değişimin belirlenmesi için katalaz aktivitesi verim değerleri (%) Eşitlik 3.3'e göre hesaplanmıştır. En yüksek katalaz aktivitesi verimi (%) hedefiyle optimum koşul belirlenmiştir.

$$\text{Katalaz Aktivitesi Verimi (\%)} = \left[\frac{\text{Kurutma sonrası katalaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL} \right)}{\text{Kurutma öncesi katalaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL} \right)} \right] \times 100 \quad (3.3)$$

3.9.4 Sonuçların doğrulanması

Deney tasarımı çalışmasının doğrulanması (verifikasyonu) için TYM ile yapılan optimizasyon şartları ile çalışılmıştır. Belirlenen optimum üretim ve enkapsülasyon/dondurarak kurutma koşullarında deneysel çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar modelden elde edilen teorik sonuç ile karşılaştırılmıştır.

3.10 Toz Formda Elde Edilen KATFO'ya Uygulanan Analizler

3.10.1 Yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk ve gerçek yoğunluk

Toz formda elde edilmiş olan KATFO'nun yığın yoğunluğunu (ρ_b) belirlemek için enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz enzimden 2 g tartılıp mezürde hacim belirlenmiş ve sonuç kütle/hacim olarak ifade edilmiştir (Santhalakshmy ve diğerleri, 2015). Darbeli yoğunluk (ρ_{td}) analizinde 2 g enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz KATFO mezür içine aktarılmış ve yaklaşık 10 cm yükseklikten 1000 kez masaya sertçe vurarak sıkıştırılmıştır. Elde edilen sonuç kütle (kg)/hacim (m^3) olarak ifade edilmiştir (Suhag ve diğerleri, 2016). Toz formdaki KATFO'nun gerçek yoğunluğu (ρ_t) (g/cm^3) gaz piknometresin (Accupyc 1340, Amerika) kullanılarak belirlenmiştir. Birimi g/cm^3 olarak okunmuş sonuç kg/m^3 olarak verilmiştir.

Yığın ve darbeli yoğunluk analizleri 3 paralel, gerçek yoğunluk analizi ise 5 paralel numune ile çalışılmıştır. Yoğunluk analiz sonuçlarının her biri ortalama değer $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

3.10.2 Gözeneklilik, akabilirlik ve yapışkanlık

Toz formdaki KATFO'nun gözenekliliği, akışkanlığı ve yapışkanlığı Jinapong ve diğerleri'ne (2008) göre sırasıyla Eşitlik 3.4, 3.5 ve 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

Formüllerde ρ_b , ρ_t ve ρ_{td} sırasıyla yığın yoğunluk, gerçek yoğunluğu ve darbeli yoğunluğu ifade etmektedir. Sonuçlar akabilirlik için Carr indeksi (CI), yapışkanlık için Hausner oranına (HR) (Çizelge 3.5)'e göre değerlendirilmiştir.

$$\varepsilon (\%) = \left[\frac{\rho_{td} - \rho_t}{\rho_{td}} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

$$CI (\%) = \left[\frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} \right] \times 100 \quad (3.5)$$

$$HR (\%) = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (3.6)$$

Çizelge 3.5 : Toz ürünlerin akabilirlik (Carr Index) ve yapışkanlığının (Hausner Ratio) sınıflandırılması (Carr, 1965; Hausner, 1967).

Parametre	Değer	Değerlendirme
CI	<15	Çok iyi
	15-20	İyi
	20-35	Orta
	35-45	Kötü
	>45	Çok kötü
HR	<1,2	Düşük
	1,2-1,4	Orta
	>1,4	Yüksek

3.10.3 Higroskopisite

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO'nun higroskopisitesi Dirim ve Talih'e (2018) göre belirlenmiştir. Bu amaçla, KATFO örneğinden 2 g tartılmış ve içerisinde doymuş NaCl çözeltisi (%75,29 RH) bulunan ağzı kapaklı kavanozların içerisine bırakılmıştır. İçerisinde örnek bulunan kavanozlar bir hafta boyunca oda sıcaklığındaki karanlık ortamda bekletilmiştir. Bir haftanın sonunda son kütlesi belirlenen örneklerden yola çıkılarak toz ürünün nem alışı (%) Eşitlik 3.7 kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

$$\text{Higroskopisite (\%)} = \frac{[\text{Analiz sonrası örnek kütlesi (g)} - \text{Analiz öncesi örnek kütlesi (g)}]}{\text{Analiz öncesi örnek kütlesi (g)}} \times 100 \quad (3.7)$$

Çizelge 3.6 : Toz ürünlerin higroskopisitesinin sınıflandırılması (Hilfiker ve Raumer, 2019).

Sınıflandırma	Avrupa farmakolojisi için kriter	Farmasötik yardımcı maddeler el kitabı için kriter (Callahan ve diğerleri, 1994)
Higroskopik olmayan	-	Bir haftada bağıl nem <%90 ise nem artışı yok; >%90 ise nem içeriğinde %20'den az (a/a) artış vardır.
Kısmen higroskopik	$0,2 \leq x < 2$ (%) (a/a)	Bir haftada bağıl nem <%80 ise nem artışı yok; >%80 ise nem içeriğinde %40'dan az (a/a) artış vardır.
Orta derecede higroskopik	$2 \leq x < 15$ (%) (a/a)	Bir haftada bağıl nem <%60 ise nem içeriği %>5'tir (a/a). >%80 ise nem içeriği %50'den (a/a) azdır.
Çok higroskopik	$x \geq 15$ (%) (a/a)	Bir haftada nem içeriği %40-50 bağıl neme kadar düşmüştür. >%90 bağıl nemde nem içeriğinde %20'den (a/a) fazla artış vardır.
Nem çekerek sıvılaştıran	Bir sıvı oluşturmak için yeterli su emilir.	-

3.10.4 Çözünürlük

Çözünürlük tayini için enkapsüle edilmiş ve edilmemiş olan toz formdaki KATFO'dan 1 g tartılarak 25 mL saf su içerisine ilave edilmiştir. Elde edilen örnek 750 rpm'de 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda (Wisestir, Kore) karıştırılarak santrifüj tüpüne alınmış ve 15 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj işlemi (Nüve, Türkiye) yapılmıştır.

Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısım darası alınmış alüminyum folyo plakalarına dökülmüş ve 105°C'deki etüvde (Nüve, Türkiye) 4 saat boyunca kurutulmuştur. Analiz 4 paralel örnek ile gerçekleştirilmiş olup çözünürlük değeri Eşitlik 3.8 kullanılarak hesaplanmıştır (İsleroglu ve diğerleri, 2018). Sonuçlar ise ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

$$\text{Çözünürlük (\%)} = \left[\frac{\text{Etüv sonrası KATFO kütlesi (g)}}{\text{Analizde kullanılan KATFO kütlesi (g)}} \right] \times 100 \quad (3.8)$$

3.10.5 Nem ve su aktivitesi (a_w)

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO'dan nem içeriği analizi 105°C'de nem analizi cihazı (Kern DBS, Almanya) kullanılarak 3 paralel şekilde yapılmıştır. Su aktivitesi (a_w) değeri ise, oda sıcaklığında su aktivitesi tayin cihazı (Nowasina Lab master, İsviçre) ile 3 paralel örnek ile belirlenmiştir. Nem ve su aktivitesi (a_w) değerlerine ait sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

3.10.6 Renk

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO'nun renk tayini, HunterLab cihazı (HunterLab Color Flex, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Renk tayininde L^* (parlaklık), a^* (kırmızılık) ve b^* (sarılık) parametreleri 3 paralel örnek ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

3.10.7 KATFO'nun depolama verimliliği ve depolama stabilitesi

Depolama verimliliği, depolamanın ilk ve son gününde hesaplanan katalaz aktivitesi verimi ile Eşitlik 3.9 kullanılarak hesaplanmıştır. Depolama stabilitesi ise Mehrnouch ve diğerleri'nin (2012) raporladığı metot referans alınarak depolamanın ilk ve son gününde elde edilen enzim aktivitesi ile Eşitlik 3.10 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Depolama verimliliği (\%)} = \left[\frac{\text{Depolamanın son günü hesaplanan katalaz aktivitesi verimi (\%)}}{\text{Depolamanın ilk günü hesaplanan katalaz aktivitesi verimi (\%)}} \right] \times 100 \quad (3.9)$$

$$\text{Depolama stabilitesi (\%)} = \left[\frac{\text{Depolamanın son günü hesaplanan katalaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL} \right)}{\text{Depolamanın ilk günü hesaplanan katalaz aktivitesi } \left(\frac{U}{mL} \right)} \right] \times 100 \quad (3.10)$$

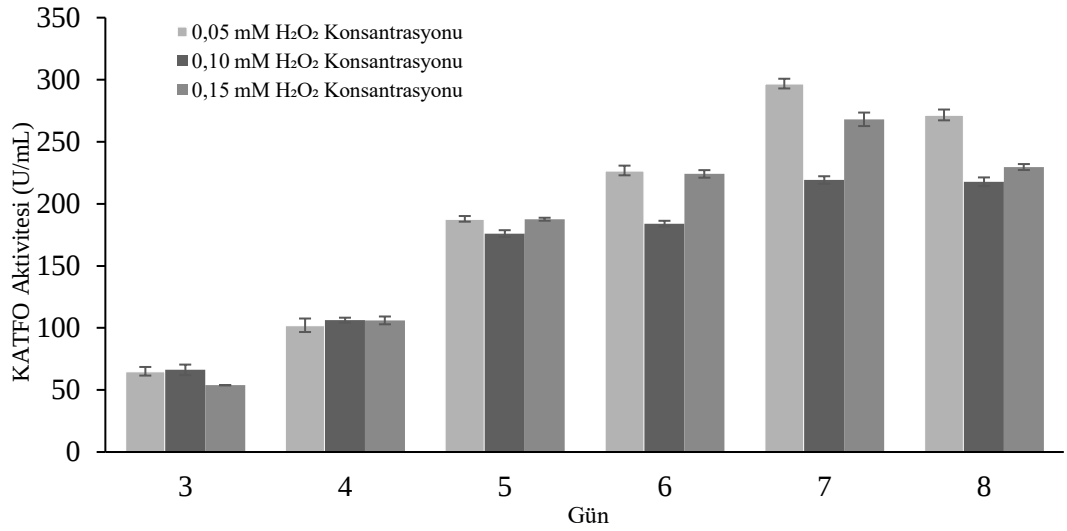
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular

Yapılan ön denemelere paralel olarak fermantasyon koşullarını sadece ana kültür bileşenlerinin (EK A) oluşturduğu kontrol örneğiyle de çalışılmıştır. *S. thermophilum*'un çoğalma verimi ve elde edilen KATFO aktivite seviyesi açısından ön denemeler kendi içerisinde ve kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Üretim koşullarının optimizasyonu için ilk aşamada kontrol örneğinden daha yüksek KATFO aktivitesi sağlayan kültür ortamı şartları seçilmiştir. İkinci aşamada ise, seçilen kültür kendi içerisinde farklı konsantrasyon değerlerinde çalışılmış ve en yüksek KATFO aktivitesi sağlayan koşul belirlenmiştir.

Yapılan tannik asit denemesi sonucunda *S. thermophilum*'un erlen içerisinde çoğalmadan kaldığı gözlemlenmiş ve tannik asit katkılanmış kültürden katalaz aktivitesi belirlenmesi aşamasında 240 nm absorbansta azalma gözlemlenmemiştir. Böylece tannik asitin *S. thermophilum*'un çoğalmasında indükleyici etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Triton X-100'ün de *S. thermophilum*'un çoğalmasında indükleyici olmadığı, aksine çoğalmayı inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır.

H₂O₂ çalışma aralıklarının *S. thermophilum*'un çoğalmasında indükleyici etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 5. gün aktivite değeri dahil 6, 7 ve 8. gün aktivite değerlerinde 0,05 mM katkılı çalışmanın kontrol örneklerine kıyasla daha yüksek KATFO aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. H₂O₂'in farklı konsantrasyonları kendi içerisinde değerlendirildiği zaman ise, yine 0,05 mM H₂O₂ katkılı fermantasyon koşulunun daha yüksek aktivite sağladığı belirlenmiştir (Şekil 4.1).



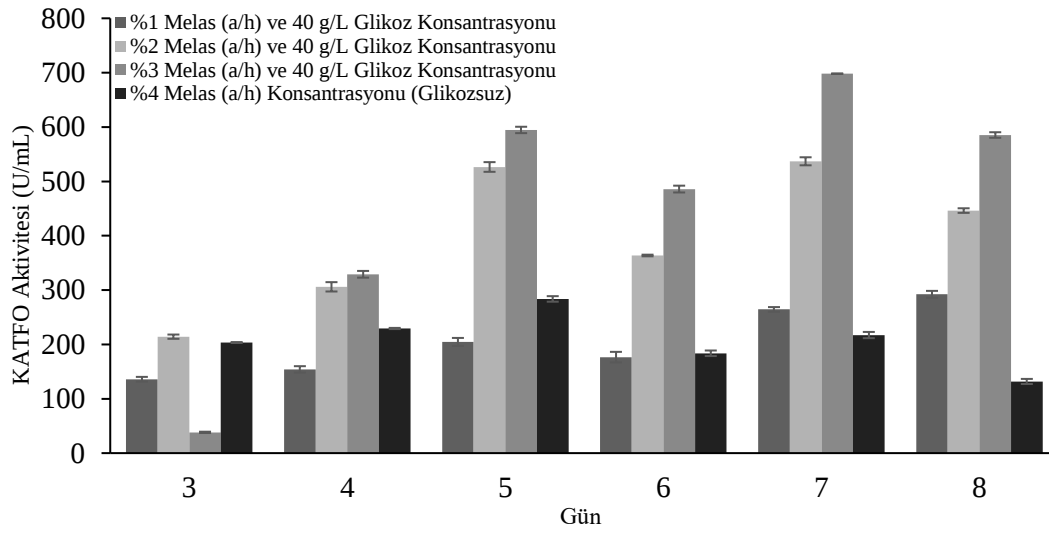
Şekil 4.1 : KATFO aktivitesi üzerine H₂O₂ konsantrasyonunun etkisi.

Katalaz üretiminin mikroorganizmanın durağan fazı aşamasında ya da H₂O₂ ilavesiyle logaritmik büyüme fazı aşamasında meydana geldiği bildirilmiştir (Mulvey ve diğerleri, 1990; Yüzügüllü, 2010). Katalaz sentezinin hücrelerin durağan faz aşamasına geçtiğinde ve H₂O₂'ten etkilenmediğinde arttığını, katalaz-fenol oksidaz sentezinin ise H₂O₂ varlığında oksidatif strese yanıt olarak arttığı raporlanmıştır (Yüzügüllü, 2010).

Martins ve English (2014) H₂O₂'in aerobik solunum sırasında hücreler tarafından üretilen inorganik bir madde olduğundan bahsetmiştir. Fermantasyon ortamında H₂O₂'in düşük konsantrasyonlarda bulunmasının ilgili proteinlerin aktivitesini artırarak oksidanlara karşı hücre direncini artırdığını bildirmiştir. Buna karşılık H₂O₂'in yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği redoks-aktif geçiş metallerinin varlığında hidroksil radikalleri ürettiği, hatta hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir (Martins ve English, 2014).

Aerobik mikroorganizmalar, solunum yoluyla enerji üretimi gibi çeşitli mekanizmalarla yaşamlarını sürdürmek için oksijeni metabolize etmektedir. Ayrıca solunum sırasında yan ürün olarak H₂O₂ gibi toksik reaktif oksijen bileşikleri (ROS'ler) ürettiği Takebe ve diğerleri (2007) tarafından yayınlanan çalışmada bildirilmiştir. Hücrelerde H₂O₂ varlığının metallerle etkileşime girdiğinde hidroksil radikalleri gibi daha da toksik ROS'lerin oluşmasına neden olduğu bu nedenle de aerobik mikroorganizmaların enzimleri, örneğin katalazı kullanarak H₂O₂'i ortadan kaldırdığı raporlanmıştır (Takebe ve diğerleri, 2007).

Melas ile yapılan ön çalışmalar sonucunda *S. thermophilum*'un çoğalmasında melasın olumlu yönde etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Melas katkısının %2 (a/h) ve %3 (a/h) olduğu kültürlerde elde edilen enzim aktivitesi, %1 (a/h) ve %4 (a/h) melas içeren kültürlerde elde edilen aktiviteden daha yüksektir (Şekil 4.2). En yüksek enzim aktivitesi değerine fermantasyonun 7. gününde %3 (a/h) melas katkısı ile ulaşılmıştır. Glikoz kullanılmadan sadece %4 (a/h) melas ile yapılan deneme sonucunda elde edilen KATFO aktivitesinin ise glikoz ile beraber %1, 2 ve 3 (a/h) melas kullanılan kültür ortamlarında elde edilen KATFO aktivitesinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek KATFO aktivitesi glikoz ile melasın birlikte kullanıldığı kültür ortamlarında elde edilmiştir (Şekil 4.2).

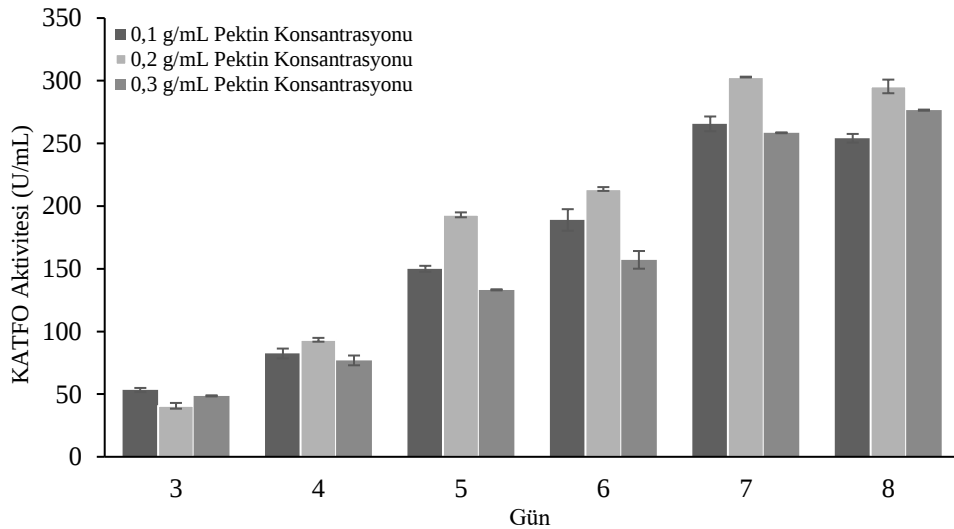


Şekil 4.2 : KATFO aktivitesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi.

Bae ve Shoda'nın (2004b) bakteriyel selüloz üretimi üzerine raporladığı çalışmada melasın mikrobiyal çoğalma veya metabolik inhibitör görevi gören birkaç madde içerdiği bildirilmiştir. Bakteriyel selüloz üretiminde melas kullanılması durumunda üretimin inhibitörlerden etkilenmemesi için melasın ısı ve/veya asitlendirme işlemine tâbi tutulduğu raporlanmıştır. Ayrıca melas içerisinde büyümeyi inhibe edici renklendirici maddeler, bilinmeyen ve istenmeyen bileşikler olduğu da raporlanmıştır. Asit (H_2SO_4) ile meydana gelen ısıl işlemin bakteriyel selüloz konsantrasyonunu ve verimini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Bae ve Shoda, 2004b). Artışın nedeninin ise asitle muamelede meydana gelen ısıl işlemin kullanılması ile ağır metallerin büyük ölçüde uzaklaştırılmış olması veya bazı inhibitör peptitlerin denatüre edilmiş olması ihtimali üzerinde durulmuştur (Bae ve Shoda, 2004b). Aynı çalışmada fermantasyon

ortamına eklenen fruktoz konsantrasyonunun 70 g/L olmasının 30 g/L konsantrasyona göre daha yüksek bakteriyel selüloz verimi ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Fruktoz konsantrasyonunun 70 g/L kullanılmasının H₂SO₄ ısıtma işlemine tabî tutulmuş melasın 20 g/L kullanılması ile çok yakın sonuç verdiği de çalışmanın sonuçlarından birisi olarak raporlanmıştır (Bae ve Shoda, 2004b). Bu varsayımdan yola çıkarak, bu tez çalışmasında besi yerinin sterilizasyonu aşamasında uygulanan ısıtmanın melasın içeriğinde bulunan inhibitör maddelerin inaktive edilmesine neden olduğu ve bunun sonucunda verimli bir mikrobiyal çoğalmanın gerçekleşerek yüksek KATFO aktivitesi elde edilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca melasın şeker ikamesi bir madde olduğu düşünüldüğünde, uygulanan ısıtmanın invertasyona sebep olup sakkarozu glikoz ve fruktoza parçaladığı böylece yüksek konsantrasyonda melas kullanıldığında elde edilen yüksek aktivitenin sebebinin invertasyona bağlanabileceği de düşünülmektedir.

Pektin ile yapılan ön deneme sonucunda pektinin *S. thermophilum*'un çoğalmasında olumlu yönde etkisi olduğu tespit edilmiştir. KATFO'nun 5, 6, 7 ve 8. gün aktivite değerlerinde 2 mg/mL pektin katkılı çalışmanın kontrol olarak çalışılan fermantasyon ortamlarından daha yüksek aktivite değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Pektinin alt, orta ve üst limit değerlerinin aktivite değerleri incelendiğinde yine orta limit değeri olan 2 mg/mL pektin katkılı fermantasyon ortamının daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 : KATFO aktivitesi üzerine pektin konsantrasyonunun etkisi.

Yapılan ön denemeler sonucunda karbon kaynağı olarak kullanılan melas ve pektinin KATFO aktivitesi üzerinde pozitif yönde bir etkisi olduğu görülmüştür. Pektin için orta değer olan 2 g/mL konsantrasyonda 7. gün aktivite sonucu 302,92 U/mL olarak bulunmuşken melas için orta değer olan %2 konsantrasyonda 7. gün aktivite sonucu 536,94 U/mL olarak bulunmuştur. Melas konsantrasyonunun %2'den %3'e (a/h) artırılması sonucu aktivite değeri de 536,94 U/mL'den 698,13 U/mL'ye yükselmiştir. Çalışmanın amacının en düşük maliyetli karbon kaynağı kullanılarak en yüksek KATFO aktivitesi elde etmek olduğu göz önünde bulundurulduğunda, çalışmaya melas ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2 KATFO Üretim Koşullarının Optimizasyonu

S. thermophilum'dan KATFO üretiminin istatistiksel optimizasyonunda kültür ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşulları yapılan ön deneme sonuçlarına bağlı olarak 4 bağımsız değişken ve 3 seviyede belirlenmiş olup, toplam 29 set deneyin çalışma koşulları ve bu koşullarda elde edilen aktivite değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 203,49-752,01 U/mL aralığında katalaz aktivite değerleri tespit edilmiştir. En düşük katalaz aktivite değeri sonucuna 45°C, 30 g/L glikoz konsantrasyonu, 0,05 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve %0 melas konsantrasyonu (Deney no.6) koşullarında ulaşılırken, en yüksek katalaz aktivitesine 45°C, 40 g/L glikoz konsantrasyonu, 0,025 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve %3 melas konsantrasyonu (Deney no.24) şartlarında ulaşılmıştır.

KATFO'nun katalaz aktivitesi değerinin lineer model ile modellenmesi sonucu elde edilen varyans analizi (ANOVA) tablosu Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. ANOVA tablosunda modelin belirlenmesinde bağımsız değişkenlerin *p* değerinin 0,05'ten küçük, model uyumluluğu değerinin ise 0,05'ten büyük olmasına dikkat edilmiştir. Çizelge 4.2'de sunulduğu gibi belirlenen lineer model dikkat edilen değerleri sağlayıp istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.1 : Fermantasyon ortamının optimizasyonu için deney tasarımı ve katalaz aktivitesi sonuçları.

Deney Numarası	Kod Değerleri				Kodlanmamış Değerler				Tepki
	X_1	X_2	X_3	X_4	Sıcaklık (°C) (X_1)	Glikoz Konsantrasyonu (g/L) (X_2)	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM) (X_3)	Melas Konsantrasyonu (%) (X_4)	KATFO Katalaz Aktivitesi (U/mL)
1	-1	-1	0	0	40	20	0,025	1,5	457,65
2	1	-1	0	0	50	20	0,025	1,5	416,66
3	-1	1	0	0	40	40	0,025	1,5	560,86
4	1	1	0	0	50	40	0,025	1,5	555,94
5	0	0	-1	-1	45	30	0	0	230,17
6	0	0	1	-1	45	30	0,05	0	203,49
7	0	0	-1	1	45	30	0	3	708,05
8	0	0	1	1	45	30	0,05	3	720,82
9	-1	0	0	-1	40	30	0,025	0	219,74
10	1	0	0	-1	50	30	0,025	0	216,86
11	-1	0	0	1	40	30	0,025	3	749,08
12	1	0	0	1	50	30	0,025	3	712,00
13	0	-1	-1	0	45	20	0	1,5	476,53
14	0	1	-1	0	45	40	0	1,5	568,68
15	0	-1	1	0	45	20	0,05	1,5	385,90
16	0	1	1	0	45	40	0,05	1,5	460,57
17	-1	0	-1	0	40	30	0	1,5	535,56
18	1	0	-1	0	50	30	0	1,5	483,16
19	-1	0	1	0	40	30	0,05	1,5	479,46
20	1	0	1	0	50	30	0,05	1,5	436,87
21	0	-1	0	-1	45	20	0,025	0	214,33
22	0	1	0	-1	45	40	0,025	0	328,76
23	0	-1	0	1	45	20	0,025	3	697,36
24	0	1	0	1	45	40	0,025	3	752,01
25	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5	461,96
26	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5	513,14
27	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5	482,03
28	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5	475,46
29	0	0	0	0	45	30	0,025	1,5	509,29

Her bir katsayının önemini ve değişkenler arasındaki etkileşimi belirlemek için yüksek F değeri ve genel olarak düşük p değeri ($<0,05$) hedeflenmiştir. Çizelge 4.2’de sunulan ANOVA sonuçları incelendiğinde, model için düşük p değeri ($p<0,05$) ve yüksek F değeri (266,25) tespit edilmiştir. Model uyumsuzluğu değerinin p değerinin beklendiği gibi $p>0,05$ olması (0,319) nedeniyle bu değer önemsiz bulunmuştur. Lineer terimlerin hepsinin (sıcaklık, glikoz konsantrasyonu, H₂O₂ konsantrasyonu ve melas konsantrasyonu) p değerleri 0,05’ten küçük olup, istatistiksel olarak önemli oldukları tespit edilmiştir. Lineer terimlerden sıcaklık (X_1) %95 güven aralığında anlamlı iken glikoz konsantrasyonu (X_2), H₂O₂ konsantrasyonu (X_3) ve melas konsantrasyonu (X_4) hem %95 hem de %99 güven aralığında anlamlıdır. Modelleme sonrası KATFO’nun katalaz aktivite değerini ifade eden denklem Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/mL)} = 256,3 - 3,01 X_1 + 4,820 X_2 - 1050 X_3 + 162,55 X_4 \quad (4.1)$$

Eksi işaretli olan lineer katsayılar; sıcaklık ve H₂O₂ konsantrasyonu tepki (katalaz aktivitesi) üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Diğer lineer katsayılar; karbon kaynağı (glikoz ve melas) konsantrasyonu artı işaretli katsayıları nedeniyle tepki üzerinde olumlu etkiye sahiptir.

Seçilen modelin matematiksel modele uygun olup olmadığını tespit etmek için regresyon katsayıları; belirlilik katsayısı (R^2), düzeltilmiş belirlilik katsayısı (R^2 -adjusted) ve tahmin edilen belirlilik katsayısı (R^2 -predicted) da incelenmiştir. Modelleme sonrası ANOVA çizelgesinde görüldüğü gibi belirlilik katsayısı (R^2) %98,07, düzeltilmiş belirlilik katsayısı (R^2 -adjusted) %97,74 ve tahmin edilen belirlilik katsayısı (R^2 -predicted) %97,07 olarak bulunmuştur. Bu katsayıların çalışmada olduğu gibi birbirlerine ve %100'e yakın bulunması gerekmektedir. Elde edilen sonuç, tepkideki (katalaz aktivitesi) toplam değişkenliğin %98,07 oranında kullanılan model eşitliği ifade edilebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2 : Fermantasyon ortamının optimizasyonu için bağımsız değişkenlere ait ANOVA tablosu.

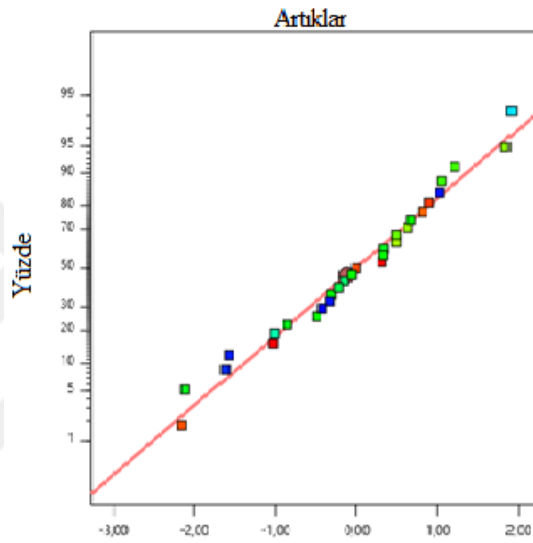
Model Terimi	KATFO Katalaz Aktivitesi (U/mL)				
	Kareler toplamı	DF	Kareler ortalaması	F	p
Model	764576	4	191144	266,25	0,000**
Lineer	764576	4	191144	266,25	0,000**
X_1	1985	1	1985	2,76	0,046*
X_2	27878	1	27878	38,83	0,000**
X_3	8271	1	8271	11,52	0,002**
X_4	726443	1	726443	1011,87	0,000**
Hata	17230	24	718		
Model Uyumsuzluğu	15690	20	784	2,04	0,319 ^δ
Saf Hata	1540	4	385		
Toplam	781806	28			
Belirlilik Katsayısı (R^2)	98,07				
Düzeltilmiş Belirlilik Katsayısı (R^2 -adjusted)	97,74				
Tahmin Edilen Belirlilik Katsayısı (R^2 -predicted)	97,07				
PRESS	55,62***				
Uyumluluk Düzeyi					

X_1 , Sıcaklık (°C); X_2 , Glikoz konsantrasyonu (g/L); X_3 , H₂O₂ konsantrasyonu (mM); X_4 , Melas konsantrasyonu (% a/h)

* $p < 0,05$ 'te önemli, ** $p < 0,01$ 'de önemli, *** Uyumluluk düzeyi 4'ten büyük olmalı

^δModel uyumsuzluğu $p < 0,05$ 'te önemli değil olmalı

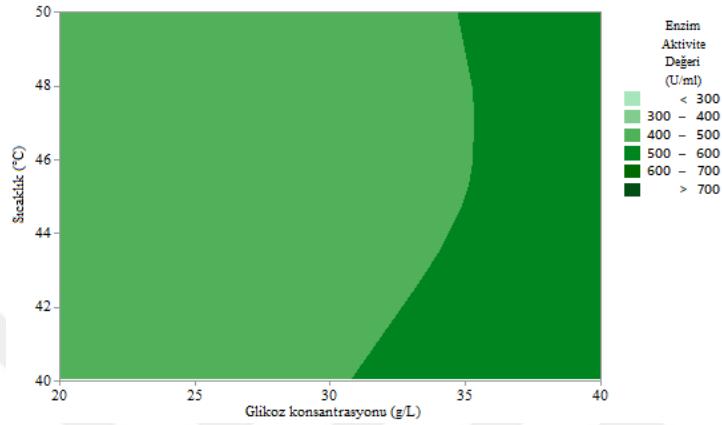
Model uyumsuzluğunun test edilmesinde son adım modelleme sonrası kalıntı analizi ve artık grafiklerin kontrol edilmesidir. Şekil 4.4'te sunulan grafik, kalıntı analizi sonrasında artıkların dağılımını göstermektedir. TYM'de kalıntı, hata veya artık terimleri birbirinin yerine kullanılmaktadır. Hata terimi; analiz sonucu bulunan değer ile beklenen değer arasındaki farkı göstermektedir. Kalıntılar yaklaşık olarak düz bir çizgi boyunca sıralanırsa artıkların dağılımı normal olarak değerlendirilmektedir. Grafikte de artıkların dağılımının normal dağılıma uygun olduğu görülmektedir. Dolayısıyla lineer modelin çalışılan TYM sürecini ifade etmek için uygun olduğu söylenebilir.



Şekil 4.4 : Katalaz aktivitesi için artıkların dağılım grafiği.

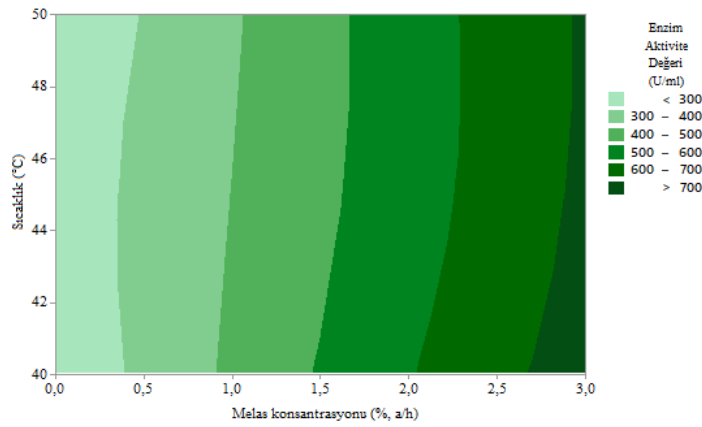
Enzim aktivitesine kültür ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşullarının etkisi Şekil 4.5-4.10'da sunulan grafiklerde verilmiştir. Çizelge 4.1 incelenip enzim aktivite sonuçları karşılaştırıldığında incelenen bağımsız değişken hariç diğer değişkenler orta noktada sabit tutulup (45°C sıcaklık, 30 g/L glikoz, 0,025 mM H_2O_2 ve %1,5 (a/h) melas konsantrasyonu) sıcaklık değerinin artması ile aktivite değerinin 457,65 U/mL'den 416,66 U/mL'ye (Deney no. 1 ve Deney no. 2), 479,46 U/ml'den 436,87 U/ml'ye düştüğü (Deney no. 19 ve Deney no. 20), H_2O_2 konsantrasyonunun artması ile aktivite değerinin 230,17 U/mL'den 203,49 U/mL'ye düştüğü (Deney no. 5 ve Deney no. 6), glikoz konsantrasyonu arttıkça aktivite değerinin 457,65 U/mL'den 560,86 U/mL'ye yükseldiği (Deney no. 1 ve Deney no. 3) ve melas konsantrasyonunun artması ile aktivite değerinin 219,74 U/mL'den 749,08 U/mL'ye (Deney no. 9 ve Deney no. 11), 214,33 U/mL'den 697,36 U/mL'ye yükseldiği (Deney no. 21 ve Deney no. 23) tespit edilmiştir.

Şekil 4.5'te gösterilen grafikte sıcaklık artışının katalaz aktivitesinde düşüşe, glikoz konsantrasyonundaki artışın ise katalaz aktivitesinde yükselişe sebep olduğu görülmektedir. Çizelge 4.1'de de verilmiş olduğu gibi, sıcaklık değerinin 40°C'den 50°C'ye artırılması ve glikoz konsantrasyonunun 20 g/L'den 40 g/L'ye artırılması sonucu katalaz aktivitesi 457,65 U/mL'den 555,94 U/mL'ye yükselmiştir (Deney no. 1 ve Deney no. 4).



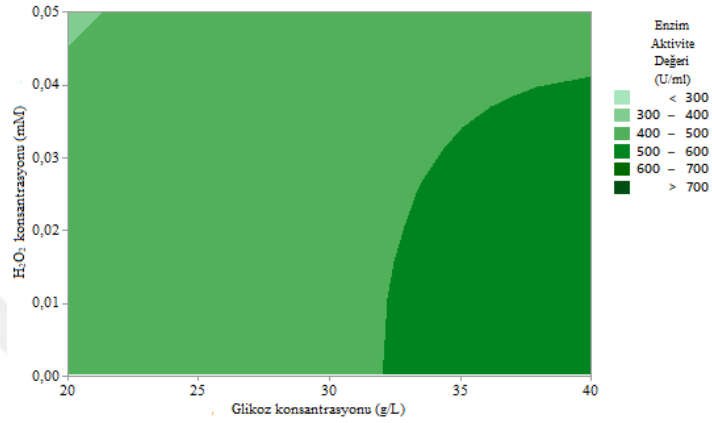
Şekil 4.5 : Sıcaklık ve glikoz konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (H_2O_2 konsantrasyonu 0,025 mM'da ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).

Çizelge 4.1'de gösterilmiş olan sıcaklık değerinin 40°C'den 45°C'ye; melas konsantrasyonunun %1,5'ten %3'e (a/h) artırılması sonucu katalaz aktivitesi 535,56 U/mL'den 708,05 U/mL'ye yükselmiştir (Deney no. 17 ve Deney no. 7). Şekil 4.6'da sunulmuş olan grafikte sıcaklık değerindeki artışın katalaz aktivitesinde düşüşe, melas konsantrasyonundaki artışın ise katalaz aktivitesinde yükselişe sebep olduğu görülmektedir.



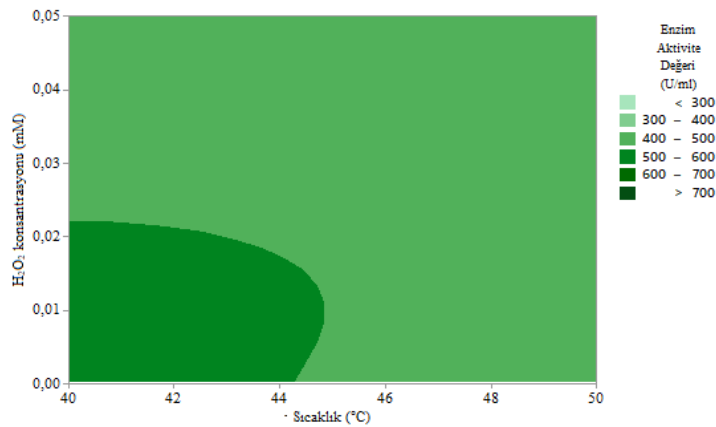
Şekil 4.6 : Sıcaklık ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (H_2O_2 konsantrasyonu 0,025 mM'da ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L değerinde sabittir).

Glikoz konsantrasyonundaki artışın katalaz aktivitesinde artışa, H_2O_2 konsantrasyonundaki artışın ise katalaz aktivitesinde düşüşe sebep olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). Çizelge 4.1’de Deney no. 14 ve Deney no. 15’e ait katalaz aktivitesi sonuçları incelendiği zaman glikoz konsantrasyonunun 20 g/L’den 40 g/L’ye attırılması ve H_2O_2 konsantrasyonunun 0,05 mM’dan 0 mM’a azaltılması sonucu katalaz aktivitesinin 385,9 U/mL’den 568,68 U/mL’ye yükseldiği tespit edilmiştir.



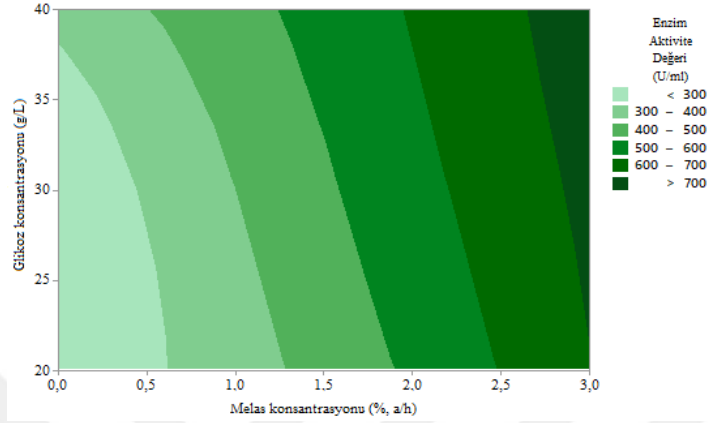
Şekil 4.7 : Glikoz ve H_2O_2 konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C’de ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).

Sıcaklık değerinde ve H_2O_2 konsantrasyonunda meydana gelen artışın katalaz aktivitesinde düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Gözlemlenen düşüş Çizelge 4.1’de verilmiş olan sıcaklık değerinin 50°C’den 45°C’ye ve H_2O_2 konsantrasyonunun 0,025 mM’dan 0 mM’a azaltılması sonucu katalaz aktivitesinin 416,66 U/mL’den 476,53 U/mL’ye yükselmesi ile desteklenmiştir (Deney no. 2 ve Deney no. 13).



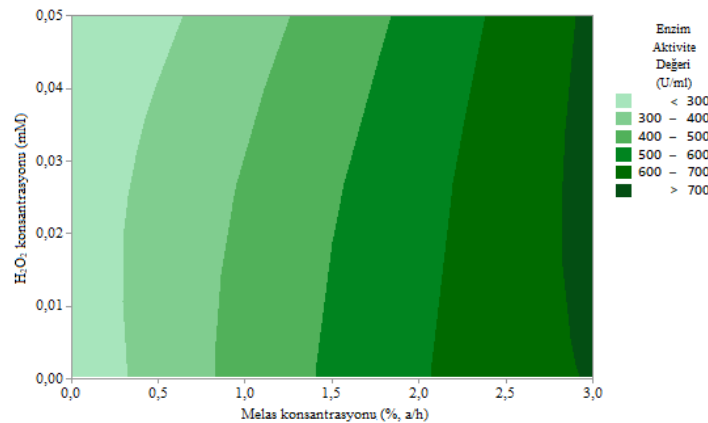
Şekil 4.8 : Sıcaklık değerinin ve H_2O_2 konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Glikoz konsantrasyonu 30 g/L’da ve melas konsantrasyonu %1,5 (a/h) değerinde sabittir).

Glikoz ve melas konsantrasyonundaki artışın katalaz aktivitesinde de artışa sebep olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Çizelge 4.1’de verildiği gibi glikoz konsantrasyonunun 20g/L’den 30 g/L’ye ve melas konsantrasyonunun %1,5’den %3’e (a/h) artırılması sonucu katalaz aktivitesi 457,65 U/mL’den 749,08 U/mL’ye yükselmiştir (Deney no. 1 ve Deney no. 11).



Şekil 4.9 : Glikoz ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C’de ve H₂O₂ konsantrasyonu 0,025 mM değerinde sabittir).

Şekil 4.10’da sunulmuş olan grafikte H₂O₂ konsantrasyonundaki azalışın ve melas konsantrasyonundaki artışın katalaz aktivitesinde artışa sebep olduğu görülmektedir. H₂O₂ konsantrasyonunun 0,05 mM’den 0 mM’a azaltılması ve melas konsantrasyonunun %0 (a/h)’den %3 (a/h)’e artırılması sonucu katalaz aktivitesinin 203,49 U/mL’den 708,05 U/mL’ye yükseldiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1), (Deney no. 6 ve Deney no. 7).



Şekil 4.10 : H₂O₂ ve melas konsantrasyonunun katalaz aktivitesi (U/mL) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Sıcaklık 45°C’de ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L değerinde sabittir).

Model verileri en yüksek enzim aktivitesini sağlayacak olan koşul için optimize edildiğinde Çizelge 4.3'te sunulmuş olduğu gibi 40°C sıcaklık, 40 g/L glikoz konsantrasyonu, 0 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve %3 (a/h) melas konsantrasyonu elde edilmiştir. Elde edilen bu noktada ulaşılması beklenen teorik enzim aktivitesi değeri ise 816,2 U/mL olarak hesaplanmıştır. Deneysel olarak yapılan doğrulama (verifikasyon) sonucunda enzim aktivitesi değeri Çizelge 4.4'te sunulduğu üzere 756,9 U/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3 : Fermantasyon ortamı için birinci optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.

	Alt limit	Üst limit	Optimum nokta değeri
Sıcaklık (°C)	40	50	40
Glikoz Konsantrasyonu (g/L)	20	40	40
H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM)	0	0,05	0
Melas Konsantrasyonu (% a/h)	0	3	3
Teorik Enzim Aktivitesi Değeri (U/mL)	816,2		

Çizelge 4.4 : Fermantasyon ortamı optimizasyonuna ait birinci teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.

Enzim Aktivitesi Değeri (U/ml)	
Teorik Değer	816,2
Deneysel Değer	756,9
Varyasyon (%)	3

KATFO üretimi için fermantasyon ortamının bileşenlerinden birisi olan glikozun daha düşük konsantrasyonda kullanılması tamamlanan tez çalışmasının amaçları arasında yer almaktadır. Bunun sebebi, glikozun insan beslenmesi için de önemli bir şeker olmasıdır. Endüstriyel enzim üretiminde gıda kaynakları yerine insan tüketimine uygun olmayan ve düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanılması anlamlıdır. Bu bağlamda glikoz konsantrasyonunun en düşük seviyede tutulması hedeflenerek yeni bir optimum nokta çalışması yapılmıştır. Bu hedefe uygun olarak yapılan optimum nokta çalışması sonucunda 40°C sıcaklık, 20 g/L glikoz konsantrasyonu, 0 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve %3 melas (a/h) konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu noktada ulaşılması beklenen teorik enzim aktivitesi değeri ise 719,8 U/mL olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Deneysel olarak yapılan doğrulama (verifikasyon) sonucunda enzim aktivitesi değeri Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi 692,4 U/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5 : Fermantasyon ortamı için ikinci optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.

	Alt limit	Üst limit	Optimum nokta değeri
Sıcaklık (°C)	40	50	40
Glikoz Konsantrasyonu (g/L)	20	40	20
H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM)	0	0,05	0
Melas Konsantrasyonu (% a/h)	0	3	3
Teorik Enzim Aktivitesi Değeri (U/mL)		719,8	

Çizelge 4.6 : Fermantasyon ortamı optimizasyonuna ait ikinci teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.

Enzim Aktivitesi Değeri (U/mL)	
Teorik Değer	719,80
Deneysel Değer	692,4
Varyasyon (%)	3,81

Yapılan her iki verifikasyon sonucunda deneysel ve teorik değer birbirine yakın bulunmuştur. Bulunan her iki deneysel değer teorik sonuç ile %95 güven aralığında tutarlıdır. *S. thermophilum*'un çoğalması için kullanılan ana kültür bileşenlerinden biri olan glikoz konsantrasyonu kültür ortamında 40 g/L kullanılmaktadır. Optimizasyon yapılmadan ana kültür bileşenleri ile hazırlanıp kontrol olarak değerlendirilen fermantasyon ortamında en yüksek katalaz aktivitesi 221,8 U/mL olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucu %3 (a/h) melas konsantrasyonu katkılanması ve sıcaklık değerinin 45°C'den 40°C'ye düşürülmesi ile elde edilen katalaz aktivitesi 756,9 U/mL tespit edilmiştir. Yapılan verifikasyon çalışmasında optimum nokta şartlarının katalaz aktivitesini kontrol koşuluna göre %241,3 artırdığı tespit edilmiştir. Glikoz konsantrasyonu azaltılıp (20 g/L) tekrar verifikasyon çalışması yapıldığında ise katalaz aktivitesi 692,4 U/mL tespit edilmiş ve kontrole göre artış %212,2 olarak belirlenmiştir. Glikoz konsantrasyonun yarıya düşürülmesi katalaz aktivitesinde sadece %8,5 seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, her iki optimum noktada da sıcaklık değerinin 45°C'den 40°C'ye düşmüş olması enerji tüketiminin azaltılması açısından avantaj sağlamıştır.

Kültür ortamında 20g/L glikoz kullanılan ve 45°C sıcaklıktaki optimum koşulda yapılan üretim sonucunda ulaşılan KATFO aktivitesi (692,4 U/mL), optimize edilmemiş başlangıç koşulunda (H₂O₂ ve melas içermeyen kültür ortamı, 45°C sıcaklık, 40 g/L glikoz konsantrasyonu) elde edilen 221,8 U/mL katalaz aktivitesinin

3,1 katıdır. Dolayısıyla, tez çalışmasının ileri aşamaları için optimum fermantasyon koşulunda 20 g/L glikoz konsantrasyonu seçilerek KATFO üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.3 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular

Referans alınan çalışmalardan yola çıkılarak liyofilizatör sonrası elde edilen toz enzimlerin katalaz aktivitesi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Karıştırma için manyetik karıştırıcı kullanılarak elde edilen toz KATFO aktivitesi kontrole göre daha düşük bulunmuş olup, homojenizatör kullanılarak elde edilen KATFO aktivitesi ise kontrole yakın ya da daha yüksek bulunmuştur. Bu sebeple çalışmada yüksek KATFO aktivitesi elde etmek amacı göz önüne alındığında homojenizatör ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Dondurarak kurutma için ön çalışmaya ait katalaz aktivitesi sonuçları.

	Ham enzim	Manyetik karıştırıcı hızı (rpm)			Homojenizatör hızı (rpm)		
		250	750	1400	4000	8000	12000
Katalaz aktivitesi (U/mL)	542,02	490,26	486,95	485,88	542,71	550,71	506,19

Yapılan ön deneme sonucu elde edilen toz formdaki KATFO’nun istenilmeyen yapışkan bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yapışkan form fermantasyon ortamında bulunan melastan kaynaklanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda enkapsülasyon malzemesi konsantrasyonu artıkça yapışkan formun ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Endüstriyel boyutta üretim ve ambalajlama düşünüldüğü zaman bu iyileşmenin sürdürülebilirliği için enkapsülasyon malzemesi konsantrasyonlarında artış yapılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır.

4.4 Toz Formda KATFO Elde Edilmesi Koşullarının Optimizasyonu

KATFO için enkapsülasyon ve dondurarak kurutma süreç koşulları (MD konsantrasyonu, mannitol konsantrasyonu ve homojenizatör hızı) 3 bağımsız değişken ve 3 seviyede belirlenmiş olup, toplam 17 set deneyin çalışma koşulları Çizelge 4.8’da

gösterilmiştir. Çalışılan 17 set deney sonucuna ait toz KATFO görselleri EK B’de sunulmuştur. Çizelge 4.8’de sunulduğu üzere, optimizasyon çalışmaları kapsamında yapılan katalaz aktivitesi verimi hesaplamaları sonucunda %22,13 ve 124,44 arasında sonuçlara ulaşılmıştır. En düşük katalaz aktivitesi verimi sonucuna 3 g MD/g kuru madde enzim konsantrasyonu, 3 g mannitol/g kuru madde enzim konsantrasyonu ve 8000 rpm homojenizatör hızı (Deney no.16) şartlarında ulaşılrken, en yüksek katalaz aktivitesi verimi sonucuna 2 g MD/g kuru madde enzim konsantrasyonu, 1 g mannitol/g kuru madde enzim konsantrasyonu ve 12000 rpm homojenizatör hızı (Deney no.2) şartlarında ulaşılmıştır.

Katalaz aktivitesi verim değerine ait modelin lineer model olarak seçilmesi sonucu elde edilen varyans analiz (ANOVA) tablosu Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Değişkenler arasında meydana gelen etkileşimin ve katsayıların önemini tespit etmek için Çizelge 10’da sunulmuş olan yüksek F değeri (56,84) ve düşük p değeri ($<0,05$) arzu edilmektedir. Model uyumsuzluğu değerinin ise $p > 0,05$ olması (0,068) nedeniyle bu değer önemsiz bulunmuştur. MD ve mannitol konsantrasyonuna ait p değerleri 0,05’ten küçük olduğundan istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Modelleme sonrası katalaz aktivitesi verim değerini ifade eden denklem Eşitlik 4.2’de verilmiştir.

$$\text{Katalaz aktivitesi verimi (\%)} = 339,6 - 51,7 X_1 - 62,6 X_2 - 0,02978 X_3 + 3,25 X_1^2 + 6,34 X_2^2 + 0,00000 X_3^2 + 7,11 X_1 * X_2 - 0,00020 X_1 * X_3 - 0,00071 X_2 * X_3 \quad (4.2)$$

Eksi işaretli olan katsayılar; MD konsantrasyonu, mannitol konsantrasyonu, homojenizatör hızı, MD konsantrasyonu*homojenizatör hızı ve mannitol konsantrasyonu*homojenizatör hızı tepki üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Diğer katsayılar; MD konsantrasyonu*MD konsantrasyonu, mannitol konsantrasyonu*mannitol konsantrasyonu, homojenizatör hızı*homojenizatör hızı ve MD konsantrasyonu*mannitol konsantrasyonu artı işaretli katsayıları nedeniyle tepki üzerinde olumlu etkiye sahiptir.

Seçilen modelin matematiksel modele uygun olup olmadığını tespit etmek için regresyon katsayıları incelenmiştir. İncelenen katsayılar belirlilik katsayısı (R^2), düzeltilmiş belirlilik katsayısı (R -adjusted) ve tahmin edilen belirlilik katsayısıdır (R^2 -predicted). Modelleme sonrası ANOVA sonuçlarında (Çizelge 4.9) görüldüğü gibi belirlilik katsayısı (R^2) %97,15, düzeltilmiş belirlilik katsayısı (R^2 -adjusted) %93,48 ve tahmin edilen belirlilik katsayısı (R^2 -predicted) %62,47 olarak bulunmuştur. Elde

edilen sonuç, tepkideki (verim) toplam değişkenliğin %97,15 oranında kullanılan model eşitliği ifade edilebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.8 : Enkapsülasyon işleminin optimizasyonu için deney tasarımı ve verim sonuçları.

Deney Numarası	Kod Değerleri			Kodlanmamış Değerler			Tepki
	X_5	X_6	X_7	MD konsantrasyonu (g MD/g kuru madde enzim)	Mannitol konsantrasyonu (g mannitol/g kuru madde enzim)	Homojenizatör hızı (rpm)	Katalaz aktivitesi verimi (%)
1	-1	1	0	1	3	8000	53,07
2	0	-1	1	2	1	12000	124,44
3	1	0	-1	3	2	4000	56,00
4	0	0	0	2	2	8000	44,70
5	0	0	0	2	2	8000	47,50
6	-1	-1	0	1	1	8000	112,23
7	0	0	0	2	2	8000	51,06
8	1	0	1	3	2	12000	55,58
9	0	1	1	2	3	12000	49,37
10	0	0	0	2	2	8000	52,80
11	0	1	-1	2	3	4000	58,28
12	0	-1	-1	2	1	4000	122,02
13	1	-1	0	3	1	8000	53,32
14	-1	0	-1	1	2	4000	113,69
15	-1	0	1	1	2	12000	116,47
16	1	1	0	3	3	8000	22,13
17	0	0	0	2	2	8000	57,52

Çizelge 4.9 : Enkapsülasyon işleminin optimizasyonu için bağımsız değişkenlere ait ANOVA tablosu.

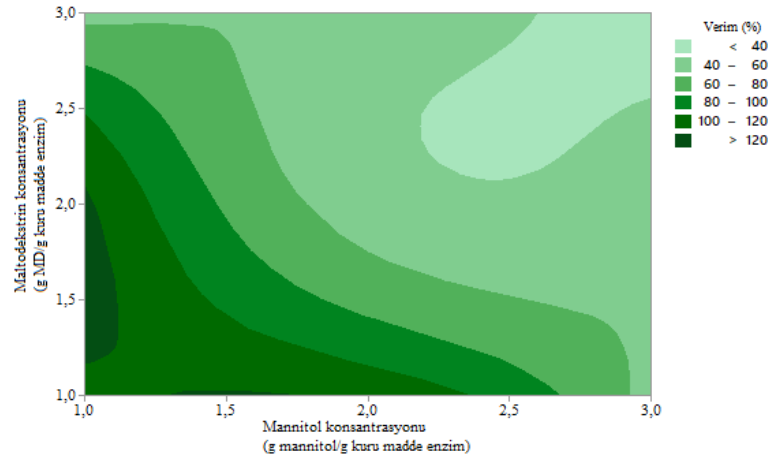
Model Terimi	Katalaz aktivitesi verimi (%)				
	Kareler toplamı	DF	Kareler ortalaması	F	p
Model	16847,5	9	1871,95	26,49	0,000**
Lineer	12049,4	3	4016,46	56,84	0,000**
X_5	5455,4	1	5455,42	77,21	0,000**
X_6	6591,8	1	6591,82	93,29	0,000**
X_7	2,1	1	2,13	0,03	0,867
Kuadratik	4561,1	3	1520,38	21,52	0,001**
X_5^2	44,5	1	44,46	0,63	0,454
X_6^2	169,4	1	169,35	2,40	0,166
X_7^2	4169,8	1	4169,81	59,01	0,000**
Etkileşim	237,0	3	79,00	1,12	0,404
$X_5 * X_6$	202,4	1	202,35	2,86	0,134
$X_5 * X_7$	2,6	1	2,56	0,04	0,854
$X_6 * X_7$	32,1	1	32,09	0,45	0,522
Hata	494,6	7	70,66		
Model Uyumsuzluğu	397,3	3	132,44	5,44	0,068 ^δ
Saf Hata	97,3	4	24,32		
Toplam	17342,1	16			
Belirlilik Katsayısı (R^2)	97,15				
Düzeltilmiş Belirlilik Katsayısı (R^2 -adjusted)	93,48				
Tahmin Edilen Belirlilik Katsayısı (R^2 -predicted)	62,47				
PRESS	16,81***				
Uyumluluk Düzeyi					

X_5 , MD konsantrasyonu (g MD/g kuru madde enzim); X_6 , Mannitol konsantrasyonu (g mannitol/g kuru madde enzim); X_7 , Homojenizatör hızı (rpm)

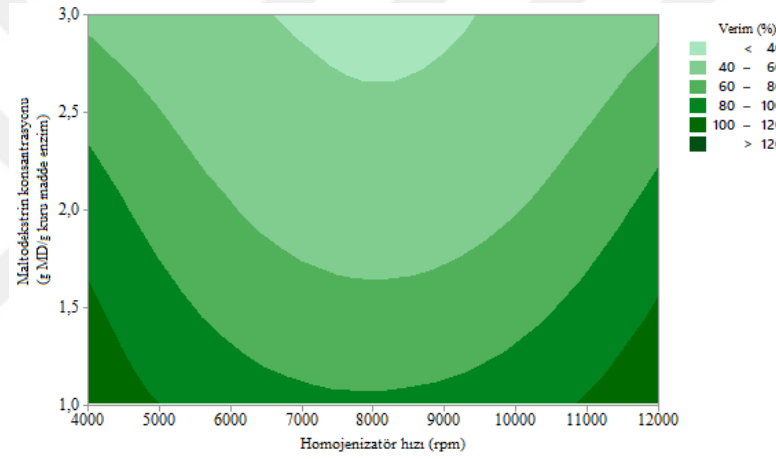
* $p < 0,05$ 'te önemli, ** $p < 0,01$ 'de önemli, *** Uyumluluk düzeyi 4'ten büyük olmalı

^δModel uyumsuzluğu $p < 0,05$ 'te önemli değil olmalı

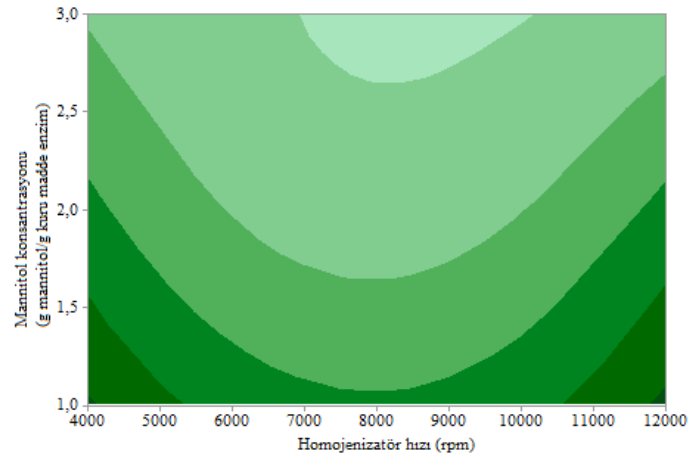
Toz formda elde edilmiş KATFO aktivitesinden elde edilen verime kurutma koşullarının etkisi Şekil 4.11-4.13'te sunulan grafiklerde verilmiştir. Çizelge 4.8'de sunulan katalaz aktivitesi verim değerleri karşılaştırıldığı zaman MD ve mannitol konsantrasyonunun artması ile katalaz aktivitesi veriminin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Homojenizatör hızının artmasıyla ise katalaz aktivitesi veriminde belirgin bir düşüş gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.11 : MD ve mannitol konsantrasyonunun katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Homojenizatör hızı 8000 rpm değerinde sabittir).

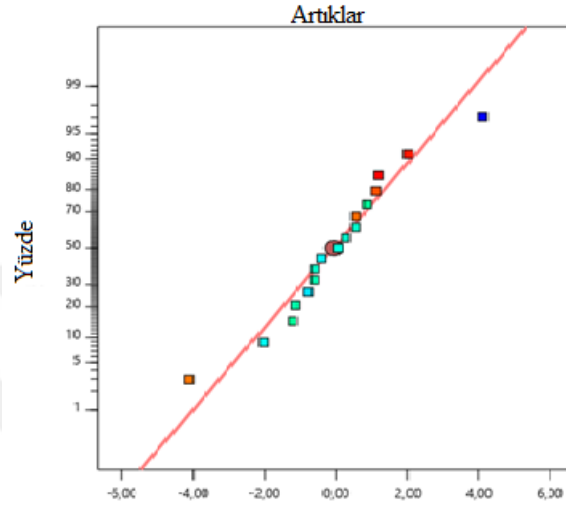


Şekil 4.12 : MD konsantrasyonunun ve homojenizatör hızının katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (Mannitol konsantrasyonu 2 g mannitol/g kuru madde enzim değerinde sabittir).



Şekil 4.13 : Mannitol konsantrasyonunun ve homojenizatör hızının katalaz aktivitesi verimi (%) üzerine etkisini gösteren tepki yüzey grafiği (MD konsantrasyonu 2 g MD/g kuru madde enzim değerinde sabittir).

Modelleme sonrası kalıntı analizi ve artık grafikleri incelenip model uyumluluğu test edilmiştir. Şekil 4.14'te sunulan grafik, kalıntı analizi sonrasında artıkların dağılımını göstermektedir. Şekil 4.14'te artıkların dağılımının normal dağılıma uygun olduğu görülmektedir. Bu değerlendirmeler ışığında kuadratik modelin toz formda KATFO elde edilmesine MD ve mannitol konsantrasyonunun ayrıca homojenizatör hızının katalaz aktivitesi verimine etkisini ifade etmek için uygun olduğu söylenebilir.



Şekil 4.14 : Katalaz aktivitesi verimi için artıkların dağılım grafiği.

Model verileri en yüksek verim değerini sağlayacak olan koşul için optimize edildiğinde Çizelge 4.10'da sunulmuş olduğu gibi 1 g MD/g kuru madde enzim konsantrasyonu, 1 g mannitol/g kuru madde enzim konsantrasyonu ve 12000 rpm homojenizatör hızı belirlenmiştir.

Belirlenen optimum şartlardan elde edilen ve depolaması yapılan toz formdaki KATFO'ya ait görseller EK C'de verilmiştir. Elde edilen bu noktada ulaşılması beklenen teorik verim değeri ise %156,82 olarak hesaplanmıştır. Deneysel olarak yapılan doğrulama (verifikasyon) sonucunda verim değeri Çizelge 4.11'de sunulduğu gibi % 112,13 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10 : Enkapsülasyon için optimizasyon şartları ve optimum nokta değerleri.

	Alt limit	Üst limit	Optimum nokta değeri
MD konsantrasyonu (g MD/g kuru madde enzim)	1	3	1
Mannitol konsantrasyonu (g mannitol/g kuru madde enzim)	1	3	1
Homojenizatör hızı (rpm)	4000	12000	12000
Teorik katalaz aktivitesi verimi (%)		156,82	

Çizelge 4.11 : Enkapsülasyon için teorik değer ve deneysel değer karşılaştırması.

Katalaz aktivitesi verimi (%)	
Teorik Değer	156,82
Deneysel Değer	112,13
Varyasyon (%)	28,50

4.5 Fenol Oksidaz Aktivitesi

Optimum şartlarda üretilen ve enkapsüle edilerek kurutulan KATFO'nun fenol oksidaz aktivitesi tespit edilmiş ve ham (sıvı) KATFO ile karşılaştırılmıştır. Katalaz aktivitesiyle olan benzerlik veya farkın tespit edilmesi için katalaz aktivite verimi değerleri ile de karşılaştırma yapılmıştır. Ham (sıvı) KATFO fenol oksidaz verimi %100 olarak temel alınmış, enkapsüle edilerek kurutulmuş KATFO'nun fenol oksidaz aktivite verim değeri (%69,51), enkapsüle edilmeden kurutulmuş KATFO'ya göre daha yüksek (%18,58) bulunmuştur (Çizelge 4.12). Benzer durum katalaz aktivitesi için de geçerlidir. Enkapsüle edilerek kurutulmuş KATFO'nun katalaz aktivite verim değeri (%108,33) enkapsüle edilmeden kurutulmuş KATFO'ya göre daha yüksek (%18,58) bulunmuştur.

Çizelge 4.12 : Dondurarak kurutma öncesi ve sonrası katalaz ve fenol oksidaz verim sonuçları.

	Fenol Oksidaz Aktivite Verimi (%)	Katalaz Aktivite Verimi (%)
Ham (sıvı) KATFO	100,00	100,00
Enkapsüle edilmiş toz formda KATFO	69,51	108,33
Enkapsüle edilmemiş toz formda KATFO	18,58	47,69

Elde edilen aktivite ve aktivitelere bağlı hesaplanan verimler üzerine ihtimaller değerlendirilmiştir. Homojenizatör kullanılarak yapılan karıştırma işleminde karıştırma hızının yüksek olması sıvı formdaki kültür üzerinde olumlu ya da olumsuz etki oluşturabilmektedir. Karıştırma hızının etkisiyle geçen sürede başlık ısınmaya başlar. Isınan başlığın düşük miktarda da olsa enzim aktivitesine olumsuz etki yapabilme olasılığı vardır. Bunun yanı sıra başlığın kesme etkisiyle tetramer yapıdaki enzimin aktif bölgesinde parçalanmalar olup enzimin daha yüksek enzim aktivitesi göstermesine yardımcı olabilme ihtimali de düşünülmüştür. Kurutulmak istenen sıvı formdaki enzimlerin oda sıcaklığından -80°C'ye alınması ardından dondurarak kurutmanın başında doğrudan soğuk havaya maruz kalması enzimlerin üzerinde şok etkisi meydana getirmiş olabilir. Enkapsüle edilmemiş toz formdaki enzimlerin

veriminin daha düşük olması bu ihtimali kuvvetlendirmiştir. Uygulanan yüksek ani basınç ve pH değerinde meydana gelen ani değişim enzimlerin denatürasyon nedenleri arasında olduğu düşünülünce elde edilen düşük verimlerinin sebepleri arasında yer alabileceği düşünülmüştür.

4.6 Toz Formda Elde Edilen KATFO'ya Uygulanan Analizlere Ait Bulgular

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş olarak kurutulan KATFO'ya toz ürün analizleri kapsamında yığın yoğunluk (ρ_b), darbeli yoğunluk (ρ_{td}), gerçek yoğunluk analizleri (ρ_t) gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin sonucu ile gözeneklilik, akabilirlik ve yapışkanlık değerleri hesaplanmıştır. Yoğunlukların yanı sıra higroskopisite ve çözünürlük analizi yapılmıştır.

Kurutulmuş enzimlerin depolama stabilitesini incelemek amacıyla katalaz ve fenol oksidaz enzim aktivitesi (U/mL) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi ile beraber nem, su aktivitesi (a_w) ve renk (L^* , a^* , b^*) analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.6.1 Yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk ve gerçek yoğunluk

Yığın yoğunluğu, toz boyutuna, şekline, yüzey özelliklerine ve parçacık boyutuna bağlı olan gıda özelliklerinden biridir; böylece pürüzsüz ve tek biçimli tozlar daha yüksek yığın yoğunluğuna sahip olmaktadır (Goula ve Adamopoulos, 2005; Sharifi ve diğerleri, 2015). Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formda KATFO'ya ait örneklerin depolama süresine bağlı olarak yoğunluk değerlerindeki değişim Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Özdemir ve diğerleri (2021)'ne göre toz ürünlerin tabî tutulduğu yoğunluk analizleri endüstriyel proseslerde işleme, paketlenme, depolama ve dağıtım koşullarının belirlenmesinde avantajlar sağlamaktadır. Ürünün sahip olduğu partikül boyut dağılımına ve çapına bağlıdır (Barbosa-Canovas ve diğerleri, 2005; Caliskan ve Dirim, 2016). Yığın yoğunluğunun düşük olması ambalaj hacmini artırdığı için arzu edilen bir durum değildir (Koç ve diğerleri, 2011). Düşük yığın yoğunluğuna sahip ürünler boşlukları arasında daha fazla hava içerdiğinden oksidasyon riski daha yüksek olup ürünün depolama stabilitesi azalmaktadır. Uzun bir depolama stabilitesi için yığın yoğunluk değerinin yüksek olması istenmektedir (Koç ve diğerleri, 2011). Enkapsüle edilmiş KATFO'nun son gün değeri ilk gün değerine göre belirgin bir artış ya da düşüş

göstermemekle beraber enkapsüle edilmemiş KATFO depolamanın sonunda ilk gününe göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Depolama süresi sonunda meydana gelen artışın da analiz öncesi zaman diliminde KATFO örneklerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenirken çevre koşullarındaki değişikliklerden (mevsim geçişine bağlı olarak sıcaklığın artması gibi) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.13 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO’nun yoğunluk değerleri.

İşlem/ Depolama	Yığın Yoğunluk (ρ_b) (kg/m ³)		Darbeli Yoğunluk (ρ_d) (kg/m ³)		Gerçek Yoğunluk (ρ_t) (kg/m ³)	
	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)
Enkapsüle edilerek kurutulmuş KATFO	258,9±0,06 ^a	247,9±0,07 ^c	274,0±0,06 ^b	267,7±0,06 ^c	1502,1±0,01 ^c	1457,5±0,02 ^d
Enkapsüle edilmeden kurutulmuş KATFO	177,1±0,08 ^d	254,4±0,06 ^b	230,0±0,09 ^d	324,1±0,06 ^a	1509,4±0,01 ^b	3742,4±0,02 ^a

Her satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan önemi ve farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Kurutma sırasında meydana gelen kristalizasyondan dolayı enkapsüle edilmemiş KATFO örnekleri hızlı ve biçimsiz kümeleşmeler göstermiştir. Analiz aşamasında kümeler arası boşluklar toz KATFO yerine hava ile dolup daha yüksek yığın yoğunluk değeri göstermiştir. Isleroglu ve diğerleri (2019) mikrokapsülleyip dondurarak kuruttukları transglutaminazın yığın yoğunluk değerlerinin 50,15 ile 288,50 kg/m³ aralığında değiştiğini ve enkapsülasyonda kaplama malzemesi olarak mannitolün tek başına kullanılmasının arap zıncı-kazein karışımı kullanılmasına göre daha yüksek yığın yoğunluğu değeri elde edilmesini sağladığı bildirmiştir.

Jamdar ve diğerleri (2021) tarafından yapılan çalışmada mikrokapsülleyip dondurarak kuruttukları lipaz ve asit fosfatazın en yüksek yığın yoğunluk değerinin 3:1 (a/a) oranında MD:peynir altı suyu protein konsantresi enkapsülasyonunda elde edildiğini ve kaplama malzemesi olan MD’nin molekül ağırlığının yüksek olmasının toz partiküllerin arasında oluşan boşluklara yerleşmesini kolaylaştırdığını bildirmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada kullanılan diğer kaplama malzemesi olan peynir altı suyu protein konsantresinin ise partiküller etrafında kabuk oluşumuna neden olarak partiküllerin birbirine tutunmasına engel olabileceğini bu sayede de yığın yoğunluk değerine olumsuz etki edeceği vurgulanmıştır.

Darbeli yoğunluk örneğın parçacıkları arasındaki boşlukları dikkate almamaktadır (Suhag ve diğerkleri, 2016). Ürün ağırlığının yüksek olması, parçacıklar arasındaki boşluklara kolaylıkla yerleşmesini sağlamaktadır. Darbeli yoğunluk değeri yüksek olan ürünlerin boşlukları arasında hava içermediğı varsayılarak oksidasyon riski daha düşük olup depolama stabilitesi daha uzundur. Depolama stabilitesi göz önüne alınınca darbeli yoğunluk değerinin düşük olması arzu edilmektedir. Enkapsüle edilmiş KATFO'nun ilk gün değeri ile son gün değerinin Çizelge 4.13'te sunulduğu gibi belirgin bir artış ya da azalış göstermediğı tespit edilmiştir. Enkapsüle edilmemiş KATFO'nun ise darbeli yoğunluk değerinde depolamanın sonunda ilk güne göre artış olduğu tespit edilmiştir. Darbeli yoğunlukta meydana gelen artışa yığın yoğunluk analizinde olduğu gibi ürünün biçimsiz bir şekilde topaklanması sebep olarak gösterilebilir. Yoğunluk değerinde gözlenen bu artış, depolamaya devam edilmesi halinde oksidasyon riskinin arttığını temsil etmektedir.

Isleroglu ve diğerkleri (2019) tarafından yapılan çalışmada dondurularak kurutulmuş transglutaminaza ait darbeli yoğunluk değerklerinin 71,71 ile 443,60 kg/m³ arasında bulunduğı raporlanmıştır. Gerçek yoğunlukta partikül yüzey alanındaki artış veya partikül boyutunun azalması kurutma işlemi sırasında aglomerasyona (kümeleşmeye) ya da neme karşı daha fazla bir afiniteye neden olmaktadır (Chindapan ve diğerkleri, 2018). Yüksek derecede higroskopik ürünler bulunduğı ortamdaki nemden etkilenme eğiliminde olacağından gerçek yoğunluğunun düşük olması arzu edilmektedir (Özdemir ve diğerkleri, 2021).

Gerçek yoğunluk için Çizelge 4.13'te sunulduğu gibi enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO'nun ilk gününde aynı değeri göstermiştir. Enkapsüle edilmiş KATFO'nun son gün değerklerinde ilk güne göre belirgin bir değışiklik gözlenmezken enkapsüle edilmemiş KATFO'nun son gün değerinde artış gözlemlenmiştir (Çizelge 13). Depolama süresi sonunda gerçek yoğunluğunda meydana gelen artışın ürünün nem alarak genleşmesi sebep olarak gösterilebilir. Isleroglu ve diğerkleri'nin (2019) yaptığı çalışmada kurutulan transglutaminazın gerçek yoğunluk değerkleri 1207-1476 kg/m³ aralığında bildirilmiştir. Yapılan denemeler arasında bulunan gerçek yoğunluğ değerklerinin mikrokapsülasyonda kullanılan kaplama malzemesi ile ilişkili olmadığını raporlamıştır. Tamamlanan bu tez çalışmasında depolamanın ilk günü enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO'ya ait yığın yoğunluk değerkleri Isleroglu ve diğerkleri'nin (2019) bulduğu sonuca daha yakındır. Bununla birlikte, enkapsüle

edilmemiş KATFO depolama süresince nem absorbe ettiği için gerçek yoğunluk değeri enkapsüle edilmiş KATFO'ya göre daha yüksek bulunmuştur.

Jamdar ve diğerleri (2021), kurutarak elde ettiği lipaz ve asit fosfatazin en yüksek gerçek yoğunluk değerini enkapsülasyon işleminde MD'nin yüksek konsantrasyonunda tespit ettiğini bildirmiştir. MD'nin enkapsülasyon işleminde ve kurutma aşamasında büyük parçacıklar oluşturduğunu raporlamıştır. Yoğunluk analizi sonuçlarından enkapsüle edilmiş ve edilmemiş enzimin 13 hafta sonundaki değerleri incelendiği zaman enkapsüle edilmiş enzim, enkapsüle edilmemiş enzime göre depolamanın ilk gün değerleri ile yakın sonuç vermiştir (Çizelge 4.13). Sonuçlardan yola çıkarak yapılan enkapsülasyon işleminde kullanılan MD ve mannitolün ürünü koruyup yoğunluğa olumlu etkisi olduğu söylenebilir.

4.6.2 Gözeneklilik, akabilirlik, yapışkanlık

Santhalakshym ve diğerleri'ne (2015) göre yüksek gözeneklilik değerleri, bozulma reaksiyonları için gerekli oksijeni içeren parçacıklar arasında daha fazla sayıda boşluğun varlığını gösterdiğinden örneklerin gözeneklilik değerinin düşük olması beklenmektedir. Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz enzimlerin Çizelge 4.14'te ilk ve son güne ait gözeneklilik değerleri incelendiğinde depolama süresince büyük bir değişiklik olmadığı fakat enzimin enkapsüle edilmeden kurutulması halinde gözeneklilik değerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Değerin yükselmesi ise enkapsüle edilmeden kurutulan enzimin oksidasyona maruz kalma riskinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.14 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO ile tespit edilen gözeneklilik, akabilirlik ve yapışkanlık değerleri.

İşlem/Depolama	Gözeneklilik (ϵ) (%)		Akabilirlik (CI) (%)		Yapışkanlık (HR) (%)	
	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)
Enkapsüle edilerek kurutulmuş toz formda KATFO	81,76±0,16	81,63±0,48	5,19±0,18 (çok iyi)	7,41±0,06 (çok iyi)	1,05±0,01 (düşük)	1,08±0,0 (düşük)
Enkapsüle edilmeden kurutulmuş toz formda KATFO	89,64±0,34	91,34±0,18	23,01±0,01 (orta)	21,52±0,01 (orta)	1,30±0,0 (orta)	1,27±0,0 (orta)

Isleroglu ve diğerkleri'nin (2019) yaptığı çalışmada; dondurularak kurutulmuş transglutaminazın gözeneklilik değerk aralığı %65,46–94,27 olarak bildirilmiştir. Enkapsülasyon işleminde kaplama malzemesi olarak sadece mannitolün kullanılmasının gözeneklilik değerkini düşürdüğü belirtilmiştir.

Toz ürünlerin akabilirliği, Carr indeks (CI) değerklerine göre; CI değerknin 15'ten küçük olması durumunda çok iyi, 15-20 arasında iyi, 20- 35 arasında zayıf, 35-45 arasında kötü, 45'ten büyük ise çok kötü olarak tanımlanmaktadır (Carr, 1965; Türker ve diğerkleri, 2018). Yapışkanlık değerk için Hausner Oranının 1,2'den küçük olduğu durumlarda toz ürünün akabilirliği yüksek, 1,2 ile 1,4 arasında orta, 1,4'ten büyük olduğunda ise düşük olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.5) (Hausner, 1967; Türker ve diğerkleri, 2018).

Akabilirlik için ilk ve son gün için sonuçlar Çizelge 4.14 ile karşılaştırıldığı zaman enkapsüle edilmemiş toz KATFO 'orta derece akabilir' ürün olarak sınıflandırılırken enkapsüle edilmiş toz KATFO 'çok iyi akabilir' ürün olarak sınıflandırılmıştır. Akabilirlik, Santhalakshym ve diğerkleri (2015)'ne göre kolayca hareket edebilme olarak tanımlanırken düşük değerkler elde edilmesi istenmektedir. Fermantasyon ortamında bulunan melasın neden olduğu yapışkanlık örneklerin kümeleşmesine sebep olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre meydana gelen kümeleşmenin örneklerin akabilirlik özelliğı üzerinde olumsuz etki gösterdiği gözlenmiştir.

Yapışkanlık değerk için Hausner Oranının 1,2'den küçük olduğu durumlarda toz ürünün akabilirliği yüksek, 1,2 ile 1,4 arasında orta, 1,4'ten büyük olduğunda ise düşük olarak tanımlanmaktadır (Hausner, 1967). Örneklerin Hausner oranı değerklerine göre İlk gün (1,30) ve son gün (1,27) yapışkanlık özelliğıne bakıldığında ise enkapsüle edilmemiş örneğın 'orta derece yapışkan', enkapsüle edilmiş örneğın ise 'düşük derece yapışkan' ürün olarak sınıflandırılabilceğı sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen ürünlerin akabilirlik ve yapışkanlık değerkleri paketleme ve kullanım sırasında ürünün kullanımını etkileyen faktörler olduğundan önem taşımaktadır (Santhalakshym ve diğerkleri, 2015). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre KATFO'nun yapışkanlık özelliğı üzerine enkapsülasyon işleminin olumlu etkisinin olduğu söylenebilir.

4.6.3 Higroskopisite ve Çözünürlük

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formda KATFO örneklerinin depolama süresine bağlı olarak higroskopisite ve çözünürlük değerlerindeki değişim Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15 : Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz formdaki KATFO ile tespit edilen higroskopisite ve çözünürlük değerleri.

İşlem/Depolama	Higroskopisite (%)		Çözünürlük (%)	
	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)	İlk gün (t=0)	Son gün (t=91. Gün)
Enkapsüle edilerek kurutulmuş toz formda KATFO	49,42 (kısmen higroskopik)	42,51 (kısmen higroskopik)	87	87,5
Enkapsüle edilmeden kurutulmuş toz formda KATFO	71,13 (çok higroskopik)	71,66 (çok higroskopik)	100	100

Herhangi bir maddenin bulunduğu ortamdan su alma ya da nem çekme yeteneği olarak bilinen higroskopisite analizi örneklerle depolamanın ilk günü ve son günü uygulanmıştır. Örneklerin depolama sırasında %75,3 bağıl neme sahip olduğu şartta muhafaza edilmesi durumunda depolamanın ilk günü enkapsüle edilmemiş örneğin %71,13 değeri ile ‘çok higroskopik’ özellikte bir ürün olduğu, enkapsüle edilince ise %49,42 değeri ile ‘kısmen higroskopik’ özellikte bir ürün olabileceği tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Enkapsüle edilerek kurutulan KATFO örneğinde depolamanın son gününde higroskopisite değeri %42,51 olarak belirlenmiştir. Depolamanın son gün değeri ilk gün değerine göre düşüş göstermiş olsa da sınıflandırma olarak ‘kısmen higroskopik’ özellik göstermektedir. Analiz sonucunda meydana gelen düşüş enkapsüle edilerek kurutulan KATFO’nun depolama süresince nem değerinin artması ile ilişkilendirilebilir. KATFO’nun nem değeri artıkça analiz süresi olan bir haftada nemin doygunluğuna ulaştığı düşünülmüştür. Literatürde toz ürünlerin higroskopisite değerinin nem içeriğiyle ters orantılı olduğu belirtilmektedir. Toz ürün ile ortam havası arasındaki nem farkının bu durumun nedeni olabileceği ve düşük nem içeriğinde hava ile toz ürün arasında oluşan yüksek konsantrasyon gradiyentinin daha fazla nemin absorbe edilmesine neden olduğu belirtilmiştir (Ferrari ve diğerleri, 2012). Enkapsüle edilmeden kurutulan KATFO örneğinde son gün higroskopisite değeri %71,66 olarak tespit edilip ‘çok higroskopik’ özellikte bir ürün olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.15). Depolamanın ilk gün higroskopisite değeri ile son gün higroskopisite değeri arasında değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen değerler analizin uygulandığı ortamın bağıl nem seviyesi olan %75,3’e yakın bulunmuştur. Depolama sonunda

değerlerin değişmeden çok higroskopik özellikte olması örneklerin ulaşabileceği en yüksek nem ile doygun hale gelmiş olacağı ile ilişkilendirilmiştir.

Şeker içeriği yüksek ürünlerin kurutulmasında, kurutma işlemi sırasında ya da sonrasında yapışma, yüksek nem çekişi (higroskopik) gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır (Bhandari ve diğerleri, 1997). Yapışkanlık sorununun nedeni olarak Suhag ve diğerleri (2016) tarafından ürünlerde bulunan düşük molekül ağırlıklı şekerlerin (fruktoz ve glikoz gibi) yüksek seviyede olmasının örneği higroskopik hale getirip yapışkan özellik kazandırması olarak bildirilmiştir.

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz KATFO örneklerinde depolamanın ilk ve son gününde çözünürlük tayini yapılmıştır. Depolama sürecinde her iki örnek için de sabit kalan çözünürlük değeri enkapsüle edilmiş KATFO örneklerinde %87,5, enkapsüle edilmemiş KATFO örneklerinde ise %100 bulunmuştur (Çizelge 4.15). Endüstriyel boyutta KATFO'nun kullanımı düşünüldüğünde ticari uygulamalarda yüksek çözünürlüğe sahip olması istenmektedir. KATFO'nun çözündürülmesi sırasında topaklanma meydana gelmesi, aktivite kaybına da sebep olabileceği için arzu edilmemektedir. Kaplama malzemesi olarak kullanılan MD ve mannitolün çözünürlük özelliğinin yüksek olması nedeniyle enkapsülasyon işleminde tercih edilmektedir. Bu çalışmada enkapsüle edilmemiş KATFO'nun çözünürlüğünün daha yüksek olması KATFO'nun çoğunluğunun glikoz ve melastan oluşması ile ilişkilendirilebilir. Şeker olarak nitelendirilebilen glikoz ve melasın MD ve mannitole göre çözünürlüğünün daha yüksek olduğu düşünülmüştür.

4.7 Raf Ömrü Boyunca Uygulanan Analizlere Ait Bulgular

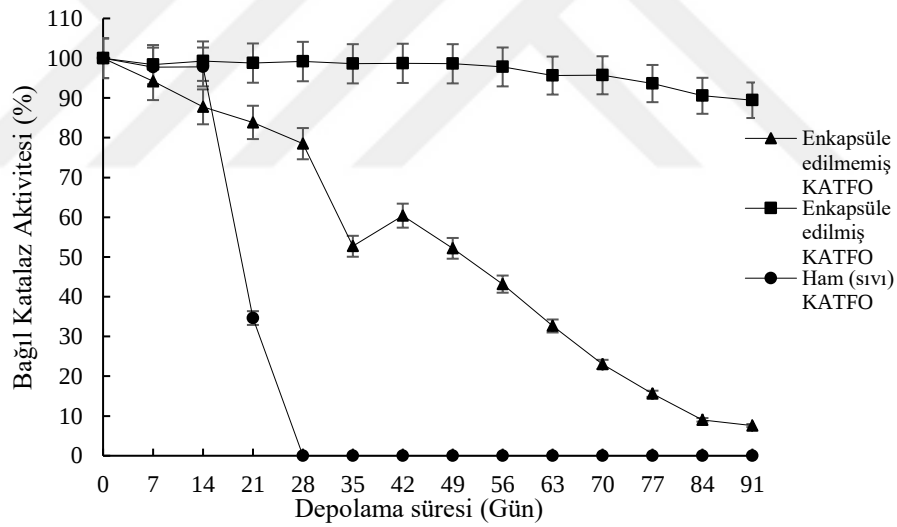
Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş olarak kurutulan KATFO 13 hafta (91 gün) +4°C 'de depolanmıştır. Depolama süresince enzim aktivitesi, su aktivitesi, nem ve renk değerleri için analizler yapılmıştır. Ham (sıvı) KATFO da kontrol örneği olarak çalışılmıştır.

4.7.1 Enzim aktivitesi ve depolama stabilitesi

Tez çalışmasında enzim aktivitesinin yüksek olması fermentasyon ve enkapsülasyon/kurutma basamaklarında göz önüne alınan en önemli kriterdir. Çalışmanın amacı olan toz formda KATFO eldesinin başarılı kabul edilebilmesi için enzim aktivitesinin mümkün olan en yüksek seviyede korunması önemlidir. Bu amaçla

uygulanan enkapsülasyon işleminin de korumayı artıracakı düşünülmüştür. Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş toz KATFO ile ham (sıvı) KATFO'nun depolama süresince bağıl katalaz aktivitesi (%) değişimi Şekil 4.15'te sunulmuştur.

Enkapsüle edilmeden kurutulmuş KATFO'nun katalaz aktivitesi ilk 28 günlük (4 hafta) depolama süresi sonunda %21,5'lik kayba uğramıştır. Ham (sıvı) KATFO ise aynı sürede aktivitesini tamamen yitirmiştir. Buna karşılık, ilk 28 günlük depolama sonunda enkapsüle edilmiş KATFO'nun aktivitesinin %99,2'sini koruduğu tespit edilmiştir. Raf ömrü çalışması toplam 13 hafta (91 gün) sürdürülmüş ve süre sonunda enkapsüle edilmemiş toz KATFO'nun aktivitesinin neredeyse tamamını kaybettiği (%7,6 seviyesinde korunduğu) belirlenmiştir. Süre zarfında sıvı numunede istenmeyen mikrobiyal gelişim olduğu da gözlemlenmiştir. Buna karşılık enkapsüle edilmiş KATFO'nun aktivitesi %89,4 seviyesinde korunmuştur. Bu sonuçlar, KATFO'nun toz halde depolanmasının ve toz hale getirilirken enkapsülasyon uygulanmasının KATFO aktivitesinin korunması açısından son derece önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır.



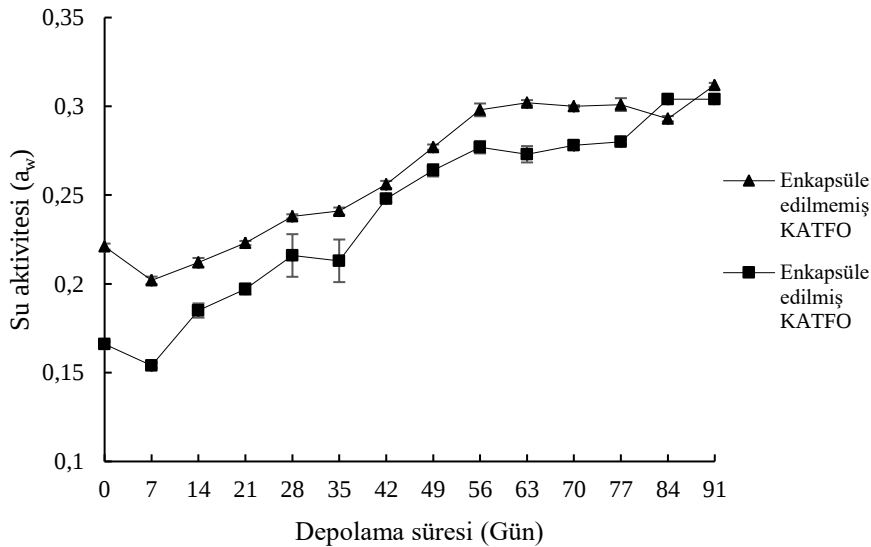
Şekil 4.15 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş KATFO ile ham (sıvı) KATFO'nun depolama süresince bağıl katalaz aktivitesi (%) değişimi.

Literatürde de benzer sonuçlara ulaşılan çalışmalar raporlanmıştır. Isleroglu ve diğerleri (2019) transglutaminazın enkapsüle edilerek ve edilmeyerek kurutulması sonrası enkapsülasyon işlemine tabî tutulan enzimin aktivitesinin %93 korunduğunu, buna karşılık enkapsülasyon uygulanmayan enzimin kalan aktivitesinin %64 seviyesinde kaldığını raporlamıştır. Jamdar ve diğerleri (2021) yaptığı çalışmada enkapsülasyon malzemelerinin (MD ve peynir altı suyu konsantresi) ve bu kaplama malzemelerinin farklı konsantrasyonlarının dondurarak kurutma sonrası lipaz ve asit

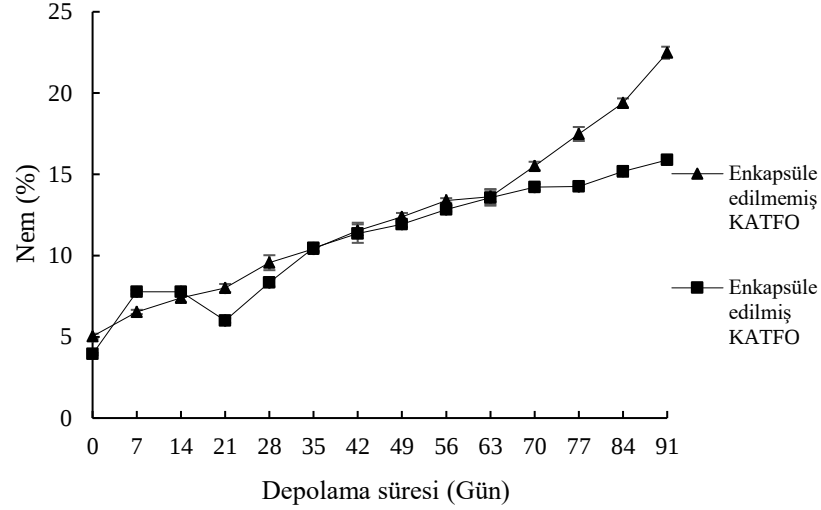
fosfataz enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiştir. Her iki enzim için de enkapsülasyon malzemesi olarak MD'nin peynir altı suyu konsantresine oranla daha yüksek konsantrasyonda (3:1, a/a) kullanılmasının enzim aktivitesini artırdığı bildirilmiştir.

4.7.2 Su aktivitesi (a_w) ve nem

Su aktivitesi (a_w) gıda maddelerinde biyokimyasal veya mikrobiyolojik reaksiyonların devam edebilmesini sağlayan serbest suyun varlığının bir göstergesidir. Su aktivitesi değerinin yüksek olması serbest suyun fazla bulunduğunu dolayısıyla daha kısa raf ömrünü göstermektedir. Nem içeriği, elde edilen toz ürünün kurutma verimliliğinin değerlendirilmesi için önemli bir kriterdir. Ürünün son halinin sahip olduğu nem değeri, akışkanlık, yapışkanlık ve depolama stabilitesinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir (Santhalakshym ve diğerleri, 2015). Enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulan KATFO'nun depolama süresince su aktivitesi (a_w) ve nem değerleri değişimi Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince su aktivitesi (a_w) değişimi.



Şekil 4.17 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO’nun depolama süresince nem (%) değişimi.

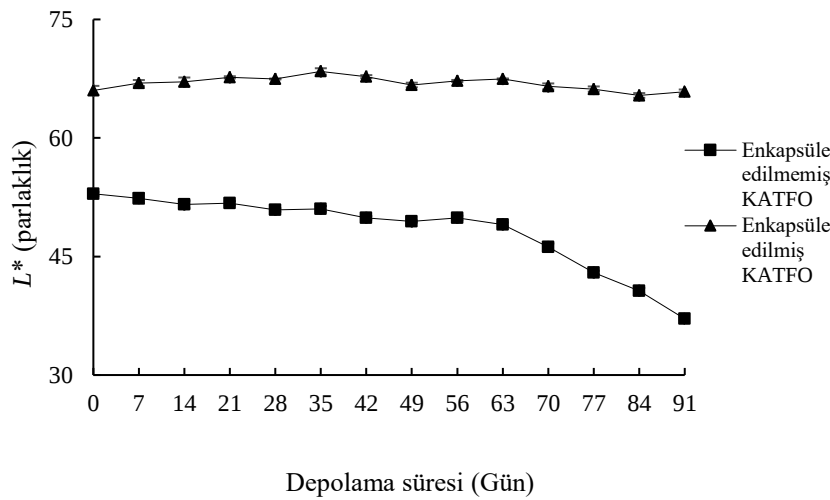
Su aktivitesi ve nem değerlerinin depolama süresince enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO’nun için genel olarak benzer eğilim gösterdiği, her iki numune için de artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). En yüksek a_w değeri depolamanın son gününde enkapsüle edilmemiş KATFO ile 0,312 olarak tespit edilmişken, en düşük a_w değeri ise depolamanın ilk gününde enkapsüle edilerek kurutulan KATFO örneğinde 0,154 olarak belirlenmiştir. En yüksek nem değeri ise a_w değerinde olduğu gibi depolamanın son gününde enkapsüle edilmemiş KATFO ile 22,48 olarak tespit edilmişken, en düşük nem değeri depolamanın ilk gününde enkapsüle edilerek kurutulan KATFO örneği ile 3,94 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

Depolama süresince toz KATFO örneklerinin muhafaza edilmesi amacıyla kullanılan polietilen poşetlerin çok düşük miktarda da olsa su buharı geçirgenliğine sahip özellikte olmasının ve depolama sürecinde çevresel faktörlerin etkilerinin toz örneklerin su aktivitesi ve nem miktarlarının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Tüm numunelerde depolama süresince a_w ve nem değerleri artmış olmakla beraber, enkapsülasyon işlemi sayesinde toz ürünlerde nispeten daha düşük a_w ve nem değerlerinin sağlanabileceği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, enkapsülasyonun raf ömrü boyunca ürün kalitesinin stabil kalması noktasında avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır.

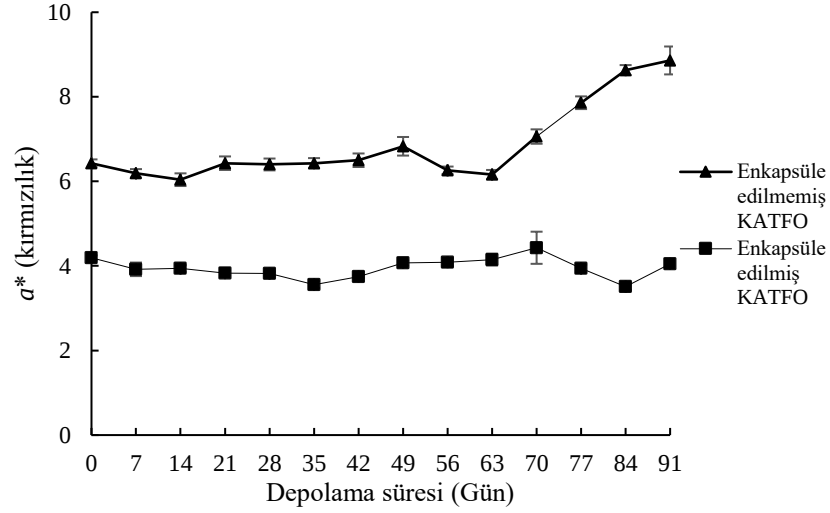
4.7.3 Renk

Gıdalarda renk, tüketici tercihi açısından gıdanın çekiciliğinde önemli rol oynamaktadır. Gıdanın duyuşal özellikleri yönünden tüketiciler alışık oldukları gıdaların belirli renkte olmasını arzulamaktadır. Bu tez çalışmasında elde edilen toz formdaki KATFO'nun endüstriyel üretimde kullanılması durumunda katkılındığı gıdanın rengini değıştirmemesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda toz formdaki KATFO depolama süresince renk analizine tabi tutulmuştur.

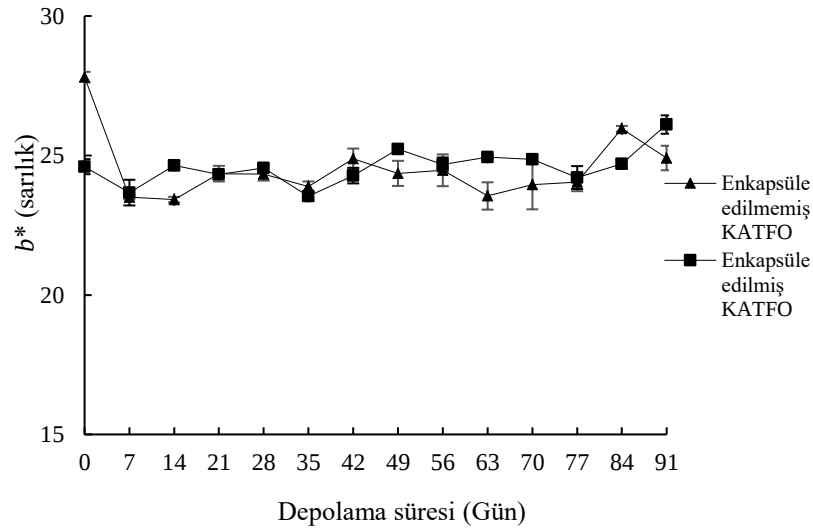
Enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulanan KATFO'nun depolama süresince renk değeri (L^* , a^* , b^*) değışimi Şekil 4.18-4.20'de sunulmuştur. Enkapsülasyon işleminin KATFO'nun L^* (parlaklık) değeriinde artışa (Şekil 4.18); a^* (kırmızılık) değeriinde düşüşe (Şekil 4.19) neden olduğu, b^* (sarılık) değeriinde ise belirgin bir fark yaratmadığı (Şekil 4.20) tespit edilmiştir.



Şekil 4.18 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince L^* (parlaklık) değışimi.



Şekil 4.19 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince a^* (kırmızılık) değişimi.



Şekil 4.20 : Optimum şartlarda enkapsüle edilerek ve edilmeden kurutulmuş toz formdaki KATFO'nun depolama süresince b^* (sarılık) değişimi.

Enkapsülasyonda kullanılan MD ve mannitol parlak ve beyaz renklidir. Bu nedenle KATFO'nun rengine ham (sıvı) örneğe göre daha yüksek parlaklığa (L^*) ve daha düşük kırmızılığa (a^*) neden olduğu düşünülmüştür. Literatürde de bu durumu destekleyici sonuçlar mevcuttur. Isleroglu ve diğerleri (2019) enkapsülasyon işlemi sırasında mannitolün kullanılması ve enkapsülasyon malzemesi miktarının artmasının L^* (parlaklık) değerini artırdığını bildirmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim uygulamaları gıdadan tekstile, deterjandan yeme kadar farklı endüstriyel alanlarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. İnsan sağlığı başta olmak üzere çevre ve sürdürülebilir ekonomiye katkı sağlaması nedeniyle endüstri alanında kullanılan enzimlerin gerekliliği ve önemi günden güne artış göstermektedir. KATFO da katalaz ve fenol oksidaz aktivitesine sahip olan ve bu yönüyle özgün olan bir enzimdir. Önceki çalışmalarda KATFO ile ilgili detaylı biyokimyasal çalışmalar yapılmış olup, bir sonraki aşamada ticarileşme hedefiyle bu tez çalışması kapsamında enzimin üretim (fermantasyon) koşullarının optimize edilmesi ve raf ömrü boyunca stabil bir ürün elde edilmesi için enzimin enkapsüle edilerek kurutulmasına çalışılmıştır. KATFO ile ilgili geçmişte yapılmış çalışmalarda kültür ortamında karbon kaynağı olarak yer alan glikoz yerine düşük maliyetli bir yan ürün olan melasın kullanılması sayesinde hem insan beslenmesinde kullanılan bir şeker olan glikozun besi yeri formülasyonundan çıkarılması hem de daha düşük maliyetli bir yan ürün olan melasın değerlendirilmesi mümkün olmuştur. KATFO'nun dondurarak kurutulması ve öncesinde enkapsüle edilmesi enzimin raf ömrü uzun bir ticari bir ürüne dönüştürülmesi açısından önemlidir. Enkapsülasyon işleminde en yaygın kullanılan ajanlardan birisi olan MD ve ikinci kaplama malzemesi olarak da mannitol çalışma kapsamında denenmiştir. Tez çalışması kapsamında hem KATFO fermentasyon koşulları hem de enkapsülasyon süreci istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Optimum koşulda üretilen ve kurutulan KATFO için karşılaştırmalı toz ürün analizleri ve raf ömrü analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, çalışmanın ilk basamağında, *S. thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*) kullanılarak KATFO'nun üretim koşullarının optimizasyonu için gerçekleştirilen ön denemelerde kültür ortamında tannik asit ve H₂O₂ konsantrasyonunun artırılmasının mikrobiyal çoğalmayı olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Eklenen Triton-X 100'ün çoğalmayı inhibe ettiği tespit edilirken, melas ve pektinin ise çoğalma üzerinde olumlu etkisi olduğu belirlemiştir.

Fermentasyon koşullarının istatistiksel optimizasyonu sonucunda en yüksek KATFO aktivitesi hedeflenerek 40°C sıcaklık, 20 g/L glikoz konsantrasyonu ve %3 melas (a/h) konsantrasyonu optimum nokta olarak tespit edilmiştir. Optimum noktada bağımsız değişkenlerden H₂O₂ konsantrasyonu sıfır olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda yapılan üretim sonucunda 692,4 U/mL katalaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bu değer optimize edilmemiş başlangıç koşulunda (H₂O₂ ve melas içermeyen kültür ortamı, 45°C sıcaklık, 40 g/L glikoz konsantrasyonu) elde edilen 221,8 U/mL katalaz aktivitesinin 3,1 katıdır. Bu sonuç, fermentasyon koşulunun optimize edilmesinin ve melas kullanımının sonuca katkısını açıkça ortaya koymuştur.

Çalışmanın ikinci basamağında, enzimin raf ömrü boyunca stabilitesinin korunması amacıyla gerçekleştirilen enkapsülasyon sürecinin istatistiksel olarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu hedefe yönelik olarak gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda enkapsülasyon sürecinde homojenizatör kullanımının manyetik karıştırıcı kullanımına göre daha yüksek enzim aktivitesi ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, enkapsülasyon süreci için MD ve mannitol konsantrasyonunun yanında homojenizasyon hızı da bağımsız olarak çalışılmıştır. En yüksek katalaz aktivitesi verimi hedefiyle gerçekleştirilen istatistiksel optimizasyon sonucunda 1 g MD/g kuru madde enzim MD konsantrasyonu, 1 g mannitol/g kuru madde enzim mannitol konsantrasyonu ve 12000 rpm homojenizatör hızı optimum nokta olarak tespit edilmiştir.

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO karşılaştırmalı olarak toz ürüne uygulanan analizler ve raf ömrü analizlerine tabî tutulmuştur. Ayrıca, kontrol örneği olarak ham (sıvı) KATFO ile de raf ömrü boyunca enzim aktivitesi takibi yapılmıştır.

Enkapsülasyon sonrası gerçekleştirilen depolamanın ilk 28 günlük (4 hafta) kısmı sonunda ham (sıvı) KATFO aktivitesini tamamen yitirirken, enkapsüle edilmemiş KATFO'nun aktivitesini %78,5, enkapsüle edilmiş KATFO'nun ise aktivitesini %99,2 seviyesinde koruduğu tespit edilmiştir. Toplam 13 hafta (91 gün) sürdürülen raf ömrü çalışmasının sonunda enkapsüle edilmemiş toz KATFO'nun aktivitesinin sadece %7,6 seviyesinde korunduğu, buna karşılık enkapsüle edilmiş KATFO'nun aktivitesinin %89,4 seviyesinde korunduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ticari uygulamalarda KATFO'nun enkapsülasyon uygulanarak toz halde depolanmasının enzim aktivitesinin korunması açısından son derece önemli olduğunu göstermiştir.

Yapılan yığın yoğunluk, darbeli yoğunluk ve gerçek yoğunluk analizleri sonucunda, enkapsüle edilmiş KATFO'nun depolama süresince enkapsüle edilmemiş KATFO'ya göre yoğunluk analizlerinde daha kararlı davrandığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, enkapsüle edilmemiş KATFO'nun ise depolama süresi sonunda yoğunluk değerlerinde önemli artış olduğu belirlenmiştir.

KATFO numunelerinin gözeneklilik (ϵ) değerleri karşılaştırıldığında enkapsüle edilmiş örneğin gözeneklilik değerinin (%81,8) enkapsüle edilmemiş örneğe ait değerden (%89,6) daha düşük olduğu ve değerlerde 13 haftalık depolama süresi sonunda önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Akışkanlık ve yapışkanlık değerlerinde ise depolama süresinde önemli bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Enkapsülasyon sayesinde toz KATFO'nun akabilirlik derecesi 'orta' seviyesinden 'çok iyi' seviyesine yükselmiş, yapışkanlık özelliği ise hedeflendiği şekilde 'orta' seviyeden 'düşük' yapışkanlık seviyesine ulaşmıştır.

Benzer şekilde yapılan karşılaştırmalı higroskopisite ve çözünürlük analizleri sonucunda 'çok higroskopik' olarak değerlendirilen enkapsüle edilmemiş KATFO'nun enkapsülasyon sayesinde 'kısmen higroskopik' özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum toz enzimin raf ömrü süresince nemden daha az etkilenmesini sağlaması bakımından önemlidir. Buna karşılık, enkapsülasyon uygulamasının toz KATFO'nun çözünürlük performansını olumsuz etkilediği, çözünürlük (%) değerini %100'den %87 seviyesine düşürdüğü belirlenmiştir.

Depolama süresince su aktivitesi (a_w) ve nem değişim profili incelendiğinde, enkapsüle edilmiş toz KATFO'nun a_w ve nem değerlerinin enkapsüle edilmemiş KATFO'dan daha düşük olduğu, dolayısıyla enkapsülasyonun a_w ve nem açısından toz KATFO'nun stabilitesi için iyileşme sağladığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, enkapsülasyon sonucunda toz ürünün parlaklığının (L^*) arttığı, kırmızılığının (a^*) düştüğü, sarılığının (b^*) ise değişmediği tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında tamamlanan KATFO fermantasyon ve enkapsülasyon süreçlerine ait istatistiksel optimizasyon çalışmaları ve toz KATFO için karşılaştırmalı raf ömrü analizleri sayesinde enzimin ticari olarak üretimi yolunda bir adım daha atılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, belirlenen optimum fermantasyon koşulları için farklı bağımsız değişkenler de eklenerek biyoreaktör ölçeğinde üretim şartlarının çalışılması ve sonrasında pilot ölçeğe geçiş sürecinin planlanması önerilebilir. Ayrıca,

biyoreaktörde üretim sonrasında dondurarak kurutmanın yanı sıra püskürterek kurutma seçeneğinin de değerlendirilmesi sayesinde ticari üretim süreçleri için alternatif yaratılmasının önünü açacaktır.



KAYNAKLAR

- Adali, M. B., Barresi, A., Boccardo, G., Montalbano, G. ve Pisano, R. (2023). Ultrasonic spray freeze-drying of sucrose and mannitol-based formulations: Impact of the atomization conditions on the particle morphology and drying performance. *Drying Technology*, 41(2), 251-261. doi: 10.1080/07373937.2021.2024844.
- Aggarwal, S., Chakravarty, A. ve Ikram, S. (2021). A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 962-986. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.052.
- Allman, A. R. (2006). Fermentors: Design, Operation, and Applications. *Fermentation Microbiology and Biotechnology* içinde. New York: CRC Press Yayınevi.
- Amid, M., Manap, Y. ve Zohdi, N. K. (2014). Microencapsulation of purified amylase enzyme from pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel in arabic gum-chitosan using freeze drying. *Molecules*, 19(3), 3731-3743. doi: 10.3390/molecules19033731.
- Avaltroni, F., Bouquerand, P.E. ve Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 323-324. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.08.001.
- Bae, S. O. ve Shoda, M. (2004a). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 45-51. doi: 10.1007/s00253-004-1723-2.
- Bae, S. ve Shoda, M. (2004b). Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1366-1371. doi: 10.1021/bp0498490.
- Barbosa-Cánovas G.V., Ortega-Rivas E., Juliano P. ve Yan H. (2005). *Food Powders, Physical Properties, Processing, and Functionality*. New York: Springer Yayınevi.

- Bhandari, B. R., Datta, N. ve Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15(2), 671-684. doi: 10.1080/07373939708917253.
- Box, G. ve Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475. doi: 10.2307/1266454.
- Boyacıoğlu, D., Erdil, D. N. ve Güven Çapaloğlu, E. (2016). Enzimlerin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları. *Gıda Biyoteknolojisi* içinde. Ankara: Nobel Yayınevi.
- Cal, K. ve Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), 575-586. doi: 10.1002/jps.21886.
- Caliskan, G. ve Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314. doi: 10.1016/j.powtec.2015.10.019.
- Cao, W., Xie, Y., Krishnan, S., Lin, H. ve Ricci, M. (2013). Influence of process conditions on the crystallization and transition of metastable mannitol forms in protein formulations during lyophilization. *Pharmaceutical Research*, 30, 131-139. doi: 10.1007/s11095-012-0855-9.
- Capolongo, A., Barresi, A. A. ve Rovero, G. (2002). Freeze-drying of lignin peroxidase: influence of lyoprotectants on enzyme activity and stability. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(1), 56-63. doi: 10.1002/jctb.742.
- Carr, R. L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, 72, 163-168.
- Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A. ve Falfan-Cortes, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food-a review. *Food Research International*, 102, 575-587. doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.054.
- Cemeroğlu, B. S. (2017). *Gıda Mühendisliğinde Temel İşlemler*. Ankara: Bizim Grup Basımevi.
- Cerrahoğlu, E. ve Arabacı, G. (2016). Eflatun çiçekli ballıbabı (*lamium purpureum*) polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve inhibisyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 20(2), 245-250.

- Chauhan, M. K., Chaudhary, S. ve Kumar, S. (2011). Life cycle assessment of sugar industry: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(7), 3445-3453. doi: 10.1016/j.rser.2011.04.033.
- Chelikani, P., Fita, I. ve Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192-208. doi: 10.1007/s00018-003-3206-5.
- Chindapan, N., Niamnuy, C. ve Devahastin, S. (2018). Physical properties, morphology and saltiness of salt particles as affected by spray drying conditions and potassium chloride substitution. *Powder Technology*, 326, 265-271. doi: 10.1016/j.powtec.2017.12.014.
- Ciurzynska, A. ve Lenart, A. (2011). Freeze-drying-application in food processing and biotechnology-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 165-171. doi: 10.2478/v10222-011-0017-5.
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. ve Zarkesh-Esfahani, H. (2012). Effect of additives on freeze-drying and storage of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1101-1107. doi: 10.1007/s12010-012-9844-z.
- Day, J. G. ve Stacey, G. N. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. *Methods in Molecular Biology* içinde. Amerika Birleşik Devletleri: Humana Yayınevi. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2.
- Decker, H., Schweikardt, T. ve Tucek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(28), 4546-4550. doi: 10.1002/anie.200601255.
- Deepak, B. ve Iqbal, Z. (2015). Lyophilization-process and optimization for pharmaceuticals. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, 3(1), 30-40.
- Değirmencioglu, A. ve Yazgi, A. (2006). Tepki yüzeyleri metodolojisi optimizasyon esaslı çalışmalara ilişkin teorik esaslar ve tarımsal mekanizasyon uygulamaları. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2(2), 111-115.
- De Jesus, S. S. ve Maciel Filho, R. (2014). Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying- a comparative study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 625-631. doi: 10.1590/0104-6632.20140313s00002642.

- De Paula, F. C., Cazeta, M. C., Monti, R. ve Contiero, J. (2008). Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Food Chemistry*, 111(3), 691-695. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.039.
- DeMan, J. M. (1999). *Principles of Food Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold Yayınevi.
- Demirhan, E. ve Özbek, B. (2011). Color change kinetics of celery leaves undergoing microwave heating. *Chemical Engineering Communications*, 198(10), 1189-1205pp. doi: 10.1080/00986445.2010.525106.
- Depaz, R. A., Dale, D. A., Barnett, C. C., Carpenter J. F., Gaertner, A. L. ve Randolph, T. W. (2002). Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 765-774. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00173-4.
- Desai, K. G. H. ve Park H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. doi: 10.1081/DRT-200063478.
- DeZarn, T. J. (1995). Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. *Food Ingredient Encapsulation* içinde. Washington: American Chemical Society. doi: 10.1021/bk-1995-0590.ch007.
- Dirim, S. N. ve Talih, M. (2018). Kurutma yardımcı maddelerinin dondurarak kurutulmuş taflan tozlarının özellikleri üzerine etkisi. *Gıda*, 43(3), 461-475. doi: 10.15237/gida.GD17109.
- Dokic, P., Jakovljevic, J. ve Dokic-Baucal, Lj. (1998). Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(3), 435-440. doi: 10.1016/S0927-7757(97)00118-0.
- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T. ve Ueda, K. (2003). Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry*, 133(5), 671-677. doi: 10.1093/jb/mvg086.

- Er Demirhan, B. ve Sarımeahmetoğlu, B. (2009). Süt endüstrisinde mikrobiyal enzim kullanımı. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 80(1), 25-30.
- Eskin, M. N. A. (1990). *Biochemistry of Foods*. San Diego: Academic Press Yayınevi.
- Fang, Z. ve Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 73-109. doi: 10.1533/9780857095909.2.73.
- Fernandes, P. ve Carvalho, F. (2016). Enzymes in Food Processing. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production* içinde. İngiltere: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00008-3.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M. ve De Aguirre, J. M. (2012). Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Drying Technology*, 30(2), 154-163. doi: 10.1080/07373937.2011.628429.
- Flickinger, M. C. ve Drew, S. W. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Kanada: John Wiley & Sons Yayınevi.
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D. ve Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying-a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 516-543.
- Garnero, C., Aloisio, C., ve Longhi, M. (2013). Ibuprofen-maltodextrin interaction: study of enantiomeric recognition and complex characterization. *Pharmacology and Pharmacy*, 4(1), 18-30. doi: 10.4236/pp.2013.41003.
- Geankoplis, C. J. (2015). *Taşıma Süreçleri ve Ayırma Süreci İlkeleri (Temel İşlemleri içerir)*. İzmir: Güven Yayınevi.
- Germec, M. ve Turhan, I. (2020). Partial purification and characterization of *Aspergillus niger* inulinase produced from sugar-beet molasses in the shaking incubator and stirred-tank bioreactors, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3789-3799. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.032.
- Godini, E., Asgarani, E., Fooladi, J. ve Ghashghaei, T. (2017). Optimization of catalase production by *Kocuria* sp. ASB107 using response surface methodology and molasses as the carbon source. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(1), 519-525.

- Goula, A. M. ve Adamopoulos, K. G. (2005). Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. *Journal of Food Engineering*, 66(1), 35-42. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.02.031.
- Goula, A. M. ve Adamopoulos, K. G. (2012). A new technique for spray-dried encapsulation of lycopene. *Drying Technology*, 30(6), 641-652. doi: 10.1080/07373937.2012.655871.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C. (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. *Electronic Journal of Food Technologies*, 7(1), 36-50.
- Gromada, A. ve Fiedurek, J. (1996). Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* mutant. *Journal of Basic Microbiology*, 37(2), 85-91. doi: 10.1002/jobm.3620370203.
- Hammer, F. E. (1993). Oxidoreductases. *Enzymes in Food Processing* içinde. New York: Academic Press Yayınevi.
- Hammer, R. J. (1995). Enzymes in the Baking Industry. *Enzymes in Food Processing* içinde. Glasgow: Blackie Academic and Professional Yayınevi.
- Hausner, H. H. (1967). Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy*, 3, 7-13.
- Hilfiker, R. ve Raumer, M. (2019). *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry: Solid Form and Drug Development*. Amerika Birleşik Devletleri: John Wiley & Sons Yayınevi.
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R. ve Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*, 273(10), 2308-2326. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x.
- Horn, J. ve Friess, W. (2018). Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Frontiers in Chemistry*, 6, 4. doi: 10.3389/fchem.2018.00004.
- Isleroglu, H., Turker, I., Tokatli, M. ve Koc, B. (2018). Ultrasonic spray-freeze drying of partially purified microbial transglutaminase. *Food and Bioprocess Processing*, 111, 153-164. doi: 10.1016/j.fbp.2018.08.003.

- Isleroglu, H., Turker, I., Koc, B. ve Tokatli, M. (2019). Optimization of microencapsulation conditions of transglutaminase by freeze drying. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4925-4937. doi: 10.1007/s13197-019-03962-9.
- Iyer, P. V. ve Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032. doi: 10.1016/j.procbio.2008.06.004.
- Izutsu, K., Yoshioka, S. ve Terao, T. (1994). Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 5-8. doi: 10.1248/cpb.42.5.
- İşgören, A. ve Sungur, S. (2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific Journal of Health and Natural Sciences*, 3(1), 19-33.
- Jamdar, F., Ali Mortazavi, S., Reza Saiedi Asl, M. ve Sharifi, A. (2021). Physicochemical properties and enzymatic activity of wheat germ extract microencapsulated with spray and freeze drying. *Food Science and Nutrition*, 9(2), 1192-1201. doi: 10.1002/fsn3.2104.
- Jennings, T. A. (2008). *Lyophilization, Introduction and Basic Principles*. New York: CRC Press Yayınevi.
- Jinapong, N., Suphantharika, M. ve Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194-205. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032.
- Kalko, S. G., Gelpi, J. L., Fita, I. ve Orozco, M. (2001). Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *Journal of the American Chemical Society*, 123(39), 9665–9672. doi: 10.1021/ja010512t.
- Kaptan, Y. (2004). Utilization of *Scytalidium thermophilum* phenol oxidase in bioorganic syntheses. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Karagül, M. ve Altuntaş, B. (2018). Liyofilizasyon: genel proses değerlendirmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 29(1), 62-69. doi: 10.35864/evmd.513002.
- Kıran Eren, Ö., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*. 9(1), 12-18.

- Koclar Avci, G., Coruh, N., Bolukbasi, U. ve Ogel, Z. B. (2013). Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase-phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 661–672. doi: 10.1007/s00253-012-3950-2.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Koç, M., Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F. (2011). Toz gıdaların fiziksel karakterizasyon özellikleri. *Akademik Gıda*, 9(4), 60-70.
- Koç, M. ve Kaymak-Ertekin, F. (2016). Şeker içeriği yüksek gıdaların püskürtülerek kurutulması: ürün kazanımı ve toz ürün özelliklerinin geliştirilmesi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(5), 336-344. doi: 10.24925/turjaf.v4i5.336-344.584.
- Kovacı, T., Dikmen, E. ve Şencan Şahin, A. (2018). Kurutma sistemleri, enerji tüketimleri ve ürün kalitesine etkileri ve örnek sistem tasarımı. *Teknik Bilimler Dergisi*, 8(2), 25-39.
- Loewen, P. C., Villanueva, J., Switala, J., Donald, L. J. ve Ivancich, A. (2015). Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: Substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83(5), 853-866. doi: 10.1002/prot.24777.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. ve Clark, D. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson Education Yayınevi.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O. ve Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-and intermolecular pigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 170-176. doi: 10.1021/jf000791o.
- Martins, D., Titorenko, V. I. ve English, A. M. (2014). Cells with impaired mitochondrial H₂O₂ sensing generate less [•]OH radicals and live longer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(10), 1490-1503. doi: 10.1089/ars.2013.5575.
- Mayer, A. M. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26(1), 11-20. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81472-7.

- Mehrnoush, A., Tan, C. P., Hamed, M., Aziz, N. A. ve Ling, T. C. (2011). Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* cv. *Chokanan*) peel. *Food Chemistry*, 128(1), 158-164. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.012.
- Mehrnoush, A., Mustafa, S. ve Yazid, A. M. M. (2012). Optimization of freeze drying conditions for purified pectinase from mango (*Mangifera indica* cv. *Chokanan*) peel. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 2939-2950. doi: 10.3390/ijms13032939.
- McSweeney, P. L. H. (2016). Enzymes exogenous to milk in dairy technology: Catalase, glucose oxidase, glucose isomerase and hexose oxidase. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 301-303. doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00156-4.
- Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A. ve Loewen, P. C. (1990). Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172: 6713-6720. doi: 10.1128/jb.172.12.6713-6720.1990.
- Myers, R. H. ve Montgomery, D. C. (2002). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Design Experiments*. Kanada: John Wiley & Sons Yayınevi.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. ve Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.266.
- Nemeth, M. A. (2003). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. *Journal of Quality Technology*, 35(4), 428-429.
- Nishikawa, Y., Kawata, Y. ve Nagat, J. (1993). Effect of Triton X-100 on catalase production by *Aspergillus terreus* IFO6123. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(3), 235-236. doi: 10.1016/0922-338X(93)90016-2.
- Nicholls, P., Fita, I. ve Loewen, P. C. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51-106. doi: 10.1016/S0898-8838(00)51001-0.
- Ogawa, J. ve Shimizu, S. (2004). Enzymes. *Bioprocesses and Biotechnology for Functional and Nutraceuticals* içinde. New York: Marcel Dekker Yayınevi.

- Osanl o, D. T., Fransson, J., Bergenst hl, B. ve Millqvist-Fureby, A. (2023). Effects of drying methods on physical properties and morphology of trehalose/mannitol mixtures. *Drying Technology*, 41(4), 503-522. doi: 10.1080/07373937.2022.2103564.
-  gel, Z. B., Yüzügüllü, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D. ve Demir, A. S. (2006). Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 853–862. doi: 10.1007/s00253-005-0216-2.
-  zdemir, E. E., G rg  , A., Gen da , E. ve Yılmaz, F. M. (2021). Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinin temelleri ve bu yöntemler ile gıda atıklarından toz ürünlerin  retimi, *Gıda*, 46(3), 583-607. doi: 10.15237/gida.GD21009.
-  zkan, M. ve Kırca, A. (2001). Gıdalarda hidrojen peroksit uygulamaları, *Gıda*, 26(1), 17-24.
- Pattanakittivorakul, S., Lertwattanasakul, N., Yamada, M. ve Limtong, S. (2019). Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 112, 975-990. doi: 10.1007/s10482-019-01230-6.
- Patel, G. K., Kawale, A. A. ve Sharma, A. K. (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 104-111. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.12.004.
- Patel, A. K., Singhanıa, R. R. ve Pandey, A. (2023). Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes* içinde. İngiltere: Academic Press Yayınevi. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9.
- Ponstein, A. S., Beudeker, R. F. ve Pen, J., (2003). Transgenic Plants for Production of Enzymes. *Handbook of Food Enzymology* içinde. New York: Marcel Dekker Yayınevi.
- Raj, A. E. ve Karanth, N. G. (2005). Fermentation Technology and Bioreactor Design. *Food Biotechnology* içinde. New York: CRC Press Yayınevi.
- Reuss, M. (1994). *Stirred Tank Reactors-Bioreactor System Design*. New York: CRC Press Yayınevi.

- Ribeiro, A. M., Shahgol, M., Estevinho, B. N. ve Rocha, F. (2020). Microencapsulation of vitamin a by spray-drying, using binary and ternary blends of gum arabic, starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, (108), 106029. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106029.
- Roos, Y. H. (1997). Frozen state transitions in relation to freeze drying. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 48(3), 535-544. doi: 10.1007/bf01979500.
- Roy, I. ve Gupta, M. N. (2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(2), 165-177. doi: 10.1042/BA20030133.
- Sadıkoğlu, H. ve Özdemir, M. (2003). Dondurarak kurutma teknolojisi ve evreleri, *Gıda*, 28(6), 643-649.
- Santhalakshmy, S., Bosco, S., Francis, S. ve Sabeena, M. (2015). Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technology*, 274, 37-43. doi: 10.1016/j.powtec.2015.01.016.
- Schugerl, K. ve Hubert, A. 1994. *Pneumatically Agitated Bioreactors-Bioreactor System Design*. New York: CRC Press Yayınevi.
- Shahidi, F. ve Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547. doi: 10.1080/10408399309527645.
- Sharifi, A., Niakousari, M., Maskooki, A. ve Mortazavi, S. A. (2015). Effect of spray drying conditions on the physicochemical properties of barberry (*Berberis vulgaris*) extract powder. *International Food Research Journal*, 22(6), 2364-2370.
- Shiga, H., Joreau, H., Neoh, T. L., Furuta, T. ve Yoshii, H. (2014). Encapsulation of alcohol dehydrogenase in mannitol by spray drying. *Pharmaceutics*, 6(1), 185-194. doi: 10.3390/pharmaceutics6010185.
- Shiga H., Yoshii H., Nishiyama T., Furuta, T., Forssele, P., Poutanen, K. ve Linko, P. (2001). Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. *Drying Technolgy*, 19(7), 1385–1395. doi: 10.1081/DRT-100105295.
- Sinsabaugh, R. L. (2010). Phenol Oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 391-404. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.10.014.

- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. ve Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563-2606. doi: 10.1021/cr950046o.
- Solomons T. W. G. ve Fryhle C. B. (2002). *Organic Chemistry*. Amerika Birleşik Devletleri: John Wiley & Sons Yayınevi.
- Song, S. H. ve Vieille, C. (2009). Recent advances in the biological production of mannitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 55-62. doi: 10.1007/s00253-009-2086-5.
- Srivastava, N. (2019). Production of food-processing enzymes from recombinant microorganisms. *Enzymes in Food Biotechnology* içinde. Hindistan: Academic Press Yayınevi. doi: 10.1016/B978-0-12-813208-7.00043-8.
- Straatsma, G. ve Samson, R. A. (1993). Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. *Mycological Research*, 97(3), 321-328. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81129-5.
- Suhag, Y., Nayik, G.A. ve Nanda, V. (2016). Effect of gum arabic concentration and inlet temperature during spray drying on physical and antioxidant properties of honey powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(2), 350-356. doi: 10.1007/s11694-016-9313-4.
- Sutay, D. (2007). Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray structure determination of *Scytalidium thermophilum* bifunctional catalase and identification of its catechol oxidase activity. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Sutay Kocabaş, D., Bakir, U., Phillips, S. E. V., McPherson, M. J. ve Ogel, Z. B. (2008). Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 407-415. doi: 10.1007/s00253-008-1437-y.
- Sutay Kocabaş, D., Pearson, A. R., Phillips, S. E. V., Bakir, U., Ogel, Z. B., McPherson, M.J., Trinh, C.H. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bifunctional catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Acta Crystallographica Section F*, F65, 1-3. doi: 10.1107/S1744309109012007.
- Sutay Kocabaş, D. (2021). *Gıda Endüstrisinde Enzimlerin Rolü ve İlgili Yasal Düzenlemeler*. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi.

- Sutay Kocabaş, D. ve Grumet, R. (2019). Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 10(4), 191-207. doi: 10.1080/21645698.2019.1649531.
- Swaigood, H. E. (2003). Use Of Immobilized Enzymes in the Food Industry. *Handbook of Food Enzymology* içinde. New York: Marcel Dekker Yayınevi.
- Switala, J. ve Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2), 145–154. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00049-8.
- Takebe, F., Hara, I., Matsuyama, H. ve Yumoto, I. (2007). Effects of H₂O₂ under low- and high-aeration-level conditions on growth and catalase activity in *Exiguobacterium oxidotolerans* T-2-2T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), 464-469. doi: 10.1263/jbb.104.464.
- Tischer, W. ve Kasche, V. (1999). Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends in Biotechnology*, 17(8), 326-335. doi: 10.1016/S0167-7799(99)01322-0.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. ve Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169-183. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00104-2.
- Türker, İ., Koç, B. ve İşleroğlu, H. (2018). Püskürtmeli-dondurarak kurutma işleminin maltodekstrinin fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *Gıda*, 43(2), 197-210. doi: 10.153237/Gıda.GD17101.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*. Kanada: John Wiley & Sons Yayınevi.
- Upadhyay, N., Goyal, A., Kumar, A., Ghai, D. L. ve Singh, R. (2014). Preservation of milk and milk products for analytical purposes. *Food Reviews International*, 30(3), 203-224. doi: 10.1080/87559129.2014.913292.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J. ve Grobbs, G. J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 151-161. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00153-4.
- Xiao, Z., Xia, J., Zhao, Q., Niu, Y. ve Zhao, D. (2022). Maltodextrin as wall material for microcapsules: a review. *Carbohydrate Polymers*, 298, 120113. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120113.

- Van Beilen, J. B. ve Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338-344. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00334-8.
- Van Holde, K. E., Johnson, W. C., ve Ho, P. S. (2006). *Principles of Physical Biochemistry*. Amerika Birleşik Devletleri: Prentice Hall Yayınevi.
- Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L. ve Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372-35381. doi: 10.1074/jbc.M503991200.
- Yeşiladalı, K. S., Çakar, Z. P. ve Tamerler, C. (2016). Gıda Endüstrisinde Fermentasyon Teknolojileri. *Gıda Biyoteknolojisi* içinde. Ankara: Nobel Yayınevi.
- Yılmaz L. ve Elmacı, Y. (2018). Polyphenol oxidase enzyme and inactivation methods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(3), 333-345. doi: 10.24925/turjaf.v6i3.333-345.1727.
- Yüzügüllü Karakus, Y., Goc, G., Balci, S., Yorke, B. A., Trinh, C. H., McPherson, M. J. ve Pearson, A. R. (2018). Identification of the site of oxidase substrate binding in *Scytalidium thermophilum* catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(10), 979-985. doi: 10.1107/S2059798318010628.
- Yüzügüllü, Y. (2010). Functional and structural analysis of catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Yüzügüllü, Y., Ögel, Z. B., Bölükbaşı, U., Çoruh, N. ve Karakaş, G. (2011). Production of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase of *Scytalidium thermophilum* in the presence of phenolic compounds. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 697-704. doi: 10.3906/biy-1009-105.
- Yüzügüllü, Y., Trinh, C. H., Smith, M. A., Pearson, A. R., Phillips, S. E., Sutay Kocabaş, D., Bakır, U., Ögel, Z. B. ve McPherson, M. J. (2013). Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(3), 398-408. doi: 10.1107/S0907444912049001.
- Yüzügüllü, Y. ve Ögel, Z. B. (2013). Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazının ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi. *Gıda*, 38(2), 111-118.

- Zamocky, M., Furtmüller, P. G. ve Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1527-1548. doi: 10.1089/ars.2008.2046.
- Zárate-Romero, A., Stojanoff, V., Rojas-Trejo, S. P., Hansberg, W. ve Rudiño-Piñera, E. (2013). Conformational stability and crystal packing: polymorphism in *Neurospora crassa* CAT-3. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(7), 753-758. doi: 10.1107/S1744309113013468.
- Zhang, S., Jiang, H., Xue, S., Ge, N., Sun, Y., Chi, Z., Liu, G. ve Chi, Z. (2019). Efficient conversion of cane molasses into fructooligosaccharides by a glucose derepression mutant of *Aureobasidium melanogenum* with β -fructofuranosidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(49), 13665-13672. doi: 10.1021/acs.jafc.9b05826.
- Zhang, S., Wang, J. ve Jiang, H. (2021). Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food Chemistry*, 346, 128860. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128860.



EKLER

EK A

Katı Besi Yeri Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Nişasta	15
Agar	20

Ön Kültür Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Glikoz	10

Ana Kültür Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1
Glikoz*	40
Gallik asit	0,17

*: Bağımsız değişken

EK B: Toz formda elde edilmiş KATFO görselleri.



1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 g MD/g kuru madde enzim 3 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim 12000 rpm homojenizasyon	3 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 4000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	1 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	3 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 12000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 3 g mannitol/g kuru madde enzim 12000 rpm homojenizasyon



10	11	12	13	14	15	16	17
2 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 3 g mannitol/g kuru madde enzim 4000 rpm homojenizasyon	2 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim 4000 rpm homojenizasyon	3 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	1 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 4000 rpm homojenizasyon	1 g MD/g kuru madde enzim 2 g mannitol/g kuru madde enzim 12000 rpm homojenizasyon	3 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim 8000 rpm homojenizasyon	3 g MD/g kuru madde enzim 1 g mannitol/g kuru madde enzim homojenizasyon 8000 rpm

EK C: Depolaması yapılan enkapsüle edilmiş ve edilmemiş KATFO görselleri.



**Enkapsüle
edilmemiş
KATFO**

**Enkapsüle edilmiş
KATFO**
1 g MD/g kuru madde
1 g mannitol/g kuru madde
12000 rpm homojenizasyon
hızı



ÖZGEÇMİŞ

