

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA TEKNOLOJİSİ BİLİM DALI**

**ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE MAYALARIN KOMPOZİT NANOLİFLERE
ENKAPSÜLASYONU VE KONTROLLÜ SALIM ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

İNCİ ALP

Danışman

DR. ÖĞR. ÜYESİ İSMAİL EREN



MANİSA-2023

İNÇİ ALP

**TEZ ADI: ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE MAYALARIN KOMPOZİT NANOLİFLERE
ENKAPSÜLASYONU VE KONTROLÜ SALIM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ 2023**

TEZ ONAYI

İNCİ ALP tarafından hazırlanan " **ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE MAYALARIN KOMPOZİT NANOLİFLERE ENKAPSÜLASYONU VE KONTROLLÜ SALIM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ** " adlı tez çalışması 02/08/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi İsmail EREN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU

Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

İNCİ ALP



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Elektroegirme Teknolojisi.....	6
2.1.2. Elektroegirme Teknolojisi İşlem Parametreleri.....	9
2.2. Koaksiyel Sistem.....	12
2.3. Probiyotik Bakteriler ve Mayalar.....	13
2.4. Probiyotik Enkapsülasyonu ve Proteinlerin Kullanımı	15
3. DENEYSEL KISIM (MATERYAL VE YÖNTEMLER).....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Maya ve Proteinlerin Temini	22
3.1.2. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemelerin Temini	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Elektroegirme Sistemi	23
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu.....	23
3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	24
3.2.4. Elektroegirme Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	24
3.2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ‘nın Standardize Edilmesi.....	25
3.2.6. PVA/PASP, PVA/SK ve PVA/SJ Nanoliflerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu	25
3.2.7. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Viskozite Analizi	27
3.2.8. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Elektriksel İletkenlik (Kondüktivite) Analizi.....	28
3.2.9. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Analizi	29

3.2.10. Elektroğirme Prosesinin Mikroorganizma Canlılığına Etkisi ve Enkapsülasyon Verimliliği	30
3.2.11. Sindirim Sistemi Simülasyonu (İn-vitro)	32
3.2.12. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Depolama Analizi	37
3.2.13. İstatistiksel Analiz	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. Elektroğirme Çözeltilerinin Bileşimlerinin Belirlenmesi	39
4.2. Farklı Proteinler ile Kaplanmış Nanoliflerde SEM Görüntüleri ve Boyut Dağılımı	39
4.3. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde FTIR Analizi	42
4.4. Elektroğirme İşleminin Probiyotiklerin Canlı Kalma Oranlarına Etkisi	46
4.5. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Enkapsülasyon Verimliliği.....	47
4.6. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Sindirim Sistemi Simülasyonu ve Salım Kinetikleri.....	48
4.7. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Depolama Koşullarının Canlılığa Etkisi.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	60
EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PASP	Peynir Altı Suyu Proteini
SK	Sodyum Kazeinat
SJ	Sığır Jelatini
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
CFU	Colony Forming Units
KOB	Koloni Oluşturan Birim
PBS	Phosphate-buffered Saline
SA	Sodyum Aljinat
EA	Egg Albumen (Yumurta Akı)
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinilprolidon
PEO	Poli Etilen Oksit
EHD	Elektrohidrodinamik
MA	Moleküler Ağırlık
TCA	Trikloroasetik asit
TAME	p-toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
SEM	Scanning Electron Microscope
Au-Pd	Altın-Paladyum
GARAS	Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilir)
G	Gauge
EC	Electrical Conductivity (Elektriksel İletkenlik)
DRBC	Dichloron Rose Bengal Chloramphenicol
EV	Enkapsülasyon Verimliliği
SSF	Simulated Salive Fluid (Simüle Ağız Sıvısı)
SGF	Simulated Gastric Fluid (Simüle Mide Sıvısı)
SIF	Simulated Intestinal Fluid (Simüle Bağırsak Sıvısı)
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
SS, Std.	Standart Sapma
kv	Kilovolt
N	N Sayıda Birim
F	Sürekli Dağılım

SDF	Çözünür Diyet Lifleri
RS	Resistant Starch (Dayanıklı Nişasta)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Elektroğirme Sistemi genel hatları ve oluşan lif yapısı	6
Şekil 2. 2. (a) Bir dış sürücü ile eş eksenli Taylor koni jeti. (b) İç sürücülü koaksiyel Taylor koni jeti.	7
Şekil 2. 3. Elektroğirme (üstte) ve elektrosprey (altta)	8
Şekil 2. 4. Tek eksenli elektroğirme (A,B), Koaksiyel sistem (C,D), Çok eksenli elektrospinning (E), Her ikisi de çekirdek/kabuk nanolif yapısıyla sonuçlanmasına rağmen, koaksiyel iç içe geçmiş eş merkezli iğne, diğer işlemde tek iğne ile çalışma yapılmaktadır (F).	8
Şekil 2. 5. Rayleigh Dalgası	11
Şekil 2. 6. Koaksiyel elektroğirme sisteminin özet görünümü	12
Şekil 2. 7. Probiyotik mayaların hareket tarzları ile patojenlere karşı antagonistik aktivitesi	14
Şekil 3. 1. Laboratuvar ölçekli tasarlanan elektroğirme sistemi.....	26
Şekil 3. 2. Üretilen nanolifler	26
Şekil 3. 3. Brookfield LVDV-II + Viscometer.....	27
Şekil 3. 4. Spindle SC-18	28
Şekil 3. 5. Elektriksel İletkenlik Cihazı (Hanna Instruments EC/TDS Meter HI 99300)	29
Şekil 3. 6. Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (Attension Theta)	30
Şekil 4. 1. Nanoliflere ait boyut dağılımları (nm) a) PVA-Maya/PVA-PVA Kontrol Grubu b) PVA-Maya/PVA-PASP c) PVA-Maya/PVA-SK d) Maya/PVA-SJ	41
Şekil 4. 2. Kompozit Nanoliflerin FTIR-ATR Spektrumları ve Çapraz Bağlanmanın Etkisinin Isı Uygulanması/ Toz numune/ Kompozit Nanolif Şeklinde İncelenmesi, a) Kontrol grubu (PVA/PVA-Maya), b) PASP/Maya, c) SK/Maya, d) SJ/Maya	45
Şekil 4. 3. In vitro sindirim sırasında mide ve bağırsak sıvılarına Saccharomyces cerevisiae salım kinetiği	49
Şekil 4. 4. Ortam Koşullarında Depolanan Liflerdeki Saccharomyces cerevisiae Sayısı.....	54
Şekil 4. 5. Soğuk Koşullarda Depolanan Liflerdeki Saccharomyces cerevisiae Sayısı	55

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Elektroeğirme Sistemini Etkileyen Parametreler	10
Tablo 2. 2. Probiyotiklerin farklı kapsülleme teknolojilerinin artıları ve eksileri	16
Tablo 2. 3. Elektrosprey kullanılarak probiyotiklerin kapsülleme çalışmalarına genel bakış, kullanılan polimerler, çözücüler, konsantrasyon miktarları [27].	18
Tablo 2. 4. Elektrosprey kullanılarak probiyotiklerin kapsülleme çalışmalarına genel bakış, proses koşulları, ortalama çap.....	20
Tablo 4. 1. Elektroeğirme Sistemi ile Üretilen Nanoliflerin Boyut Dağılımı	40
Tablo 4. 2. Nanoliflerdeki Boyut Farklılığının İstatistiksel Analizi	42
Tablo 4. 3. Elektroeğirme İşleminin Mayaların Canlılığına Etkisi	46
Tablo 4. 4. % Enkapsülasyon Verimliliği	48
Tablo 4. 5. In vitro sindirim koşullarının süre ile etkisi.....	51
Tablo 4. 6. In vitro sindirim koşullarının protein ile etkisi	52
Tablo 4. 7. Koaksiyel Naoliflerde 4°C depolama koşullarında sürenin canlılığa etkisi	56
Tablo 4. 8. Koaksiyel Naoliflerde 4°C depolama koşullarında, kaplama materyalinin canlılığa etkisi.....	56
Tablo 4. 9. Koaksiyel Naoliflerde 25°C depolama koşullarında sürenin canlılığa etkisi	57
Tablo 4. 10. Koaksiyel Naoliflerde 25°C depolama koşullarında kaplama materyalinin canlılığa etkisi	57

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmail EREN' e,

Bilgi ve tecrübesi ile deneyimlerini bana aktaran, tezimin gelişiminde yoluma ışık tutan ve elektroğirme cihazı konusunda her türlü imkan ve desteği veren Sayın Öğr. Gör. Üzeyir KUZU' ya, FTIR-ATR analizlerimde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Yılmaz YÜREKLİ'ye, viskozimetre cihazı konusunda imkan ve desteğini esirgemeyen Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU'na, çalışmalarım esnasında manevi desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Gizem Simge KILINÇ, Seven YAYCI, Zeynep Tuba MAŞA, Tuba AYDIN'a,

Öğrenim hayatım boyunca tüm zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan ve maddi manevi desteği ile hep yanımda olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim, beni yüreklendiren ve bana güvenen biricik anneanneciğime, anneciğime, babacığıma, abiciğime ve Enes'ime sonsuz sevgi ve saygılarımla yürekten teşekkürü borç bilirim.

İNCİ ALP
Manisa, 2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail EREN

Gıda üretiminde enkapsülasyon uygulamaları ürüne fonksiyonellik, çeşitlilik ve daha uzun raf ömrü kazandırması nedeniyle araştırmacıların ve endüstrinin ilgisi çekmektedir. Özellikle fonksiyonel gıdaların üretiminde enkapsülasyon sonrası etken maddenin *in vitro* sindirimde kontrollü salım özelliklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların eksikliği dikkat çekmektedir. Bununla birlikte kapsüle edilen mikroorganizmaların canlılığını korumak ve depolama sürecini arttırmak gibi koşullar da araştırma konularını yakından ilgilendirmektedir.

Bu çalışmada elektroegirme yöntemi kullanılarak probiyotiklerin enkapsülasyonu için peynir altı suyu proteini, sodyum kazeinat, sığır jelatini proteinleri içeren kompozit nanolif üretimi ve *in vitro* sindirimde kontrollü salım özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak kaplama için kullanılacak elektroegirme çözeltisinin bileşimi yüzey gerilimi, viskozite ve elektriksel iletkenlik özelliklerinin dikkate alınarak optimize edilmiştir. Sistemden elde edilen nanoliflerde yapılan mikrobiyolojik ekimler doğrultusunda, enkapsülasyon verimliliği hesaplanarak sonuçlar tartışılmıştır. Elektroegirme sisteminde koaksiyel üretilen nanoliflerde FTIR-ATR bakılarak kapsülasyonda bulunan protein kabuk yapısının varlığının analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda elde edilen nanoliflerde SEM-EDX görüntüleri alınarak *Saccharomyces Cerevisiae*'nın kaplamasının görüntüleri ve protein kabuk yapısı varlığı bir kez daha test edilmiştir.

Koaksiyel nanoliflerde kontrollü salım özelliklerinin belirlenmesi için yapılan *in vitro* analizi sonuçları mikrobiyolojik ekimler sayesinde sonuçlandırılmış ve yorumlamaları yapılmıştır. Elektroegirme yöntemiyle koaksiyel şekilde elde edilen, çekirdek kısmında *Saccharomyces Cerevisiae*, kabuk kısmında peynir altı suyu proteini, sodyum kazeinat, sığır jelatini bulunan kompozit nanolifler sistemin optimum koşullarına göre 0,002 mL/sa debi ile elde edilmiştir. Enkapsülasyon verimliliği hesaplandığında %98.46 ile peynir altı suyu proteini, %99.70 ile sodyum kazeinat, %99.98 ile sığır jelatini sonucuna varılmıştır. Kontrollü salımı araştırma yolunda yapılan *in vitro* analizi sonuçlarına göre kullanılan proteinlerin gastrointestinal koşullardaki dirençleri anlamlı bir farklılık göstermiştir. 25°C ve 4°C koşullu iki sıcaklık belirlenerek yapılan depolama analizi sonucunda soğuk ortamda saklanan nanoliflerin oda koşulları ortamında saklanan nanoliflere göre çok daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enkapsülasyon, Koaksiyel, Nanolif, Kontrollü Salım, *In Vitro*, Probiyotik, Protein
2023, 88 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

İNÇİ ALP

Celal Bayar University
Faculty of Engineering/Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. İsmail EREN

Encapsulation applications in food production attract the attention of researchers and the industry, as they add functionality, diversity and longer shelf life to the product. The lack of *in vitro* studies on the development of controlled release properties of the active ingredient in the digestive system after encapsulation for functional foods is noteworthy. However, maintaining the viability of the encapsulated microorganisms and increasing the storage process are closely related to the research subjects.

In this study, it was aimed to produce composite nanofibers containing whey protein, sodium caseinate, bovine gelatin proteins for the encapsulation of probiotics using the electrospinning method and to determine the controlled release properties in *in vitro* digestion. Firstly, the composition of the electrospinning solution to be used for the coating was optimized considering the surface tension, viscosity and electrical conductivity properties. In line with the microbiological cultivation of nanofibers obtained from the system, the encapsulation efficiency was calculated and the results were discussed. The presence of protein shell structure in encapsulation was analyzed by looking at FTIR-ATR in nanofibers produced coaxially in the electrospinning system. At the same time, SEM-EDX images were taken in the obtained nanofibers, and the images of the coating of *Saccharomyces Cerevisiae* and the presence of protein shell structure were tested once again.

In vitro analysis results for the determination of controlled release properties in coaxial nanofibers were concluded and interpreted by microbiological cultivation. Composite nanofibers with *Saccharomyces Cerevisiae* in the core, whey protein, sodium caseinate, and bovine gelatin in the shell, obtained coaxially by electrospinning method, were obtained at a flow rate of 0.002 mL/h according to the optimum conditions of the system. When the encapsulation efficiency was calculated, it was concluded that whey protein was 98.46%, sodium caseinate was 99.70%, and beef gelatin was 99.98%. According to the results of the *in vitro* analysis conducted in the controlled release study route, the resistances of the proteins used in gastrointestinal conditions showed a significant difference. As a result of the storage analysis performed by determining two temperatures with 25°C and 4°C conditions, it has been revealed that nanofibers stored in cold environment are much more durable than nanofibers stored in room conditions.

Keywords: Encapsulation, Coaxial, Nanofiber, Controlled Release, *In Vitro*, Probiotic, Protein
2023, 88 pages

1. GİRİŞ

Enkapsülasyon bir maddenin veya karışımın çevresinin başka bir veya daha fazla madde veya sistem ile kaplanmasını, gıda bileşenlerinin korunmasını, stabilizasyonunu ve yavaş salımını sağlayan bir teknoloji olmakla birlikte günümüzde gıda, kimya, ziraat, yem, tıp, eczacılık, veterinerlik, biyoteknoloji, boya, kozmetik gibi birçok farklı sektörde kullanılan nispeten yeni bir teknolojidir [1].

Enkapsülasyon teknolojisi gıda alanında birçok amaçla kullanılmaktadır. Çevresel şartlara (sıcaklık, nem, hava ve ışık gibi) ve işleme koşullarına karşı hassas gıda materyallerinin korunmasını sağlayarak raf ömrünü uzatmak, buharlaşma ile kaybolmasını önlemek, fiziksel özelliklerinin daha iyi korunmasını sağlamak, başka bileşenlerle reaksiyona girmesini engellemek, gıda bileşenlerinin fonksiyonel özelliklerini geliştirip biyoyararlılığını arttırmak, az miktarlarda kullanım gerektiğinde homojen karışımların oluşturulmasını sağlamak, gıda bileşenlerinin gastrointestinal sistemde salımını yavaş ve kontrollü oranlarda gerçekleşmesini sağlamak, maddenin taşınması ve depolanmasını kolaylaştırmak, istenmeyen tat ve kokuyu maskelemek ve kaplanacak materyalin diğer bileşenlerle reaksiyona girmesini engellemek gibi birçok amaç bu duruma örnek gösterilebilmektedir. Enkapsülasyon işleminde kaplama materyali kabuk, duvar, membran, taşıyıcı veya enkapsulant olarak adlandırılırken kaplanacak olan materyal ise iç faz, çekirdek, aktif materyal veya dolgu olarak adlandırılmaktadır [2][3][4].

Enkapsülasyon, çevreye duyarlı hassas bileşenleri koruyarak aktif maddelerin zamanla salınmasına yardımcı olmaktadır. Bazı bileşenlerin enkapsüle edilmesi kolay olabilmektedir fakat bazı hassas bileşenlerin enkapsülasyonu çok zordur, bu nedenle kontrollü koruma ve salım gerekmektedir. Enkapsülasyonu bir başka deyişle en az bir aktif bileşenin en az bir çeşit kaplama materyali tarafından çeşitli teknikler kullanılarak koruma altına alınması olarak da tanımlanabilmektedir. Aktif bileşenin uygun koşullarda ve istenilen dozda salınması amacına dayanan bu işlemde, aktif bileşenin hangi malzeme kullanılarak hangi yöntemle kaplanacağı oldukça önemlidir. Kullanılacak malzemenin biyoyumlu ve biyobozunur olmasının yanı sıra aktif bileşenin stabil kalması da gerekmektedir. Genel olarak mikro ve nanoparçacıklar olarak isimlendirilen bu formlar çok çeşitli özellikte hidrofilik veya hidrofobik ilaçlar,

vitaminler, mineraller ve farklı besinler gibi aktif bileşenlerin taşıyıcısı olduğu bilinmektedir [5].

Kontrollü salım teknolojisinden en çok faydalanan bilim dalı farmakoloji olup, ilaçlar farklı yöntemlerle enkapsüle edilebilmektedir. Gıda bileşenleri, probiyotikler, aroma bileşenleri gibi özellikle yapıları çabuk bozulmaya yatkın bileşenler de koruma ve kontrollü salım amacıyla enkapsüle edilmektedir [5].

Enkapsülasyon tekniğinde kaplama materyalleri olarak genellikle proteinler, lipidler, gamlar, nişasta ve nişasta türevleri veya bu materyallerle yapılan çeşitli kombinasyonlardan yararlanılırken doğal ya da yapay tatlandırıcılar, probiyotikler, prebiyotikler, mineraller, vitaminler ve birçok katkı maddesi eklenebilmektedir [1][6]. Kapsülleri oluşturmak için sprej-kurutma, püskürtmeli soğutma, dondurarak-kurutma, ekstrüzyonla kaplama, akışkan yatak kaplama, lipozom yakalama (tutuklama), koaservasyon, ekstrüzyon ve emülsifikasyon, kokristalizasyon, moleküler kalıntı ve kümeleme gibi enkapsülasyon işlemleri sıklıkla kullanılmaktadır [6][4].

Enkapsülasyon tekniği zaman ve finansal kaynak gerektirdiğinden dolayı gıda işleme teknolojisine ek maliyetler çıkarabilmektedir. Bu maliyetler kullanılacak olan tekniğe ve ürünün hacmine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu duruma örnek olarak doğal polimerlerin (proteinler, polisakkaritler) kullanıldığı kapsülleme modellerinin diğer modellere göre daha maliyetli olduğu gösterilebilmektedir [6].

Son yıllarda gıdaların çeşitliliğini arttırmak ve doğallığını sağlamak gibi birçok faydası bulunmaktadır. Gelecekte, enkapsülasyon teknolojisi ile ilgili laboratuvar çalışmaları uygulamaya geçirilerek gıdaların fiziksel, kimyasal, biyolojik ve fonksiyonel özellikleri geliştirilebilecektir [1].

Enkapsülasyon tekniğinde kapsüle edilen materyaller boyutlarına göre makrokapsül ($>1000\mu\text{m}$), mikrokapsül ($1-1000\mu\text{m}$) ve nanokapsül ($<1\mu\text{m}$) olarak sınıflandırılmaktadır [2].

Mikroenkapsülasyon, 1-1000µm boyutlarındaki partikül veya damlacıkların birçok faydalı özellik kazanması amacıyla kaplanması işlemidir [1]. Mikroenkapsülasyon tekniği enkapsüle edilen materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olmakla beraber oluşan mikrokapsüller çoklu duvar yapısına da sahip olabilmektedirler. Mikrokapsül içerisindeki materyal öz (core-çekirdek), iç faz veya dolgu olarak ifade edilirken dış yapısındaki yapıya duvar, kabuk, kaplama veya membran adı verilmektedir [1]. Mikroenkapsülasyon yöntemindeki çekirdek yapı, çevresindeki ısı, enzimler, oksijen, ışık, pH gibi dış çevresel faktörlere karşı, bu çekirdek malzemelerin manipülasyonunu, taşınmasını, depolanmasını ve uygulanmasını kolaylaştıran fiziksel bir bariyer ve koruyucu tabaka sağlamaktadır [6].

Mikroenkapsülasyon ürünlerinin ortaya çıkışı 1950’lerde, yağ damlacıklarını çevreleyen kapsülleyici malzeme, kompleks jelleşmiş hidrofilik kolloid malzemeden yapılan kapsüllerin aksine, tek bir jelleşmiş hidrofilik kolloid malzemeden oluşmakta olan, basınca duyarlı karbonsuz kopya kağıdı üretilmesi yönünde gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda başlamıştır [7]. Ayrıca mikroenkapsülasyon tekniğinin gıda endüstrisindeki yeri de oldukça eskiye dayanmakla birlikte günümüzde de tüketicilerin fonksiyonel gıdalara olan ilgisi bu alanın daha da gelişmesini sağlamış bulunmaktadır [8].

Öz kısmın içeriği bir kristal, bir pürüzlü absorban partikül, bir emülsiyon, katıların bir süspansiyonu veya daha küçük kapsüllerin bir süspansiyonu, katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, vitaminler, mineraller, renk bileşenleri ve enzimler olabilir [1][4]. Membran kısmın içeriğinde ise çoğunlukla nişasta, maltodekstrin, pullulan, sakkaroz, maltoz gibi karbonhidratlar, jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein ve kazeinatlar gibi proteinler ve gam arabik gibi gamlar kullanılmaktadır [4]. Mikrokapsüllerin görünüşleri, mikroenkapsülasyon tekniğine, çekirdek materyalinin fizikokimyasal özelliklerine ve duvar materyalinin kompozisyonuna göre değişim göstermektedir [4].

Tarihten günümüze çalışmalarının artış gösterdiği bir diğer yöntemi ise elektroegirme işlemidir. Web of Science veri tabanı incelendiğinde “elektrospinnig” teriminin kullanımının ilk kez Jayesh Doshi ve Darrell H. Reneker tarafından yazılan “Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers” makalesinde yer

aldığı gözlemlenmektedir [9]. Bu çalışmada yoğun elektrik alan varlığında sıvı jet üretiminin çeşitli endüstriyel uygulamaları bir diğer adıyla elektrospınlenmenin sürecini karakterize etme ve sistemi yöneten işlem parametrelerinin belirlenmesi araştırılmıştır [10]. Elektroegirme (electrospinning, electrospun) tekniği yüksek voltajlı güç kaynağı, kolektör, şırınga pompa ve metal nozul kullanılan enjektörlerden oluşan, sonucunda ürünün mikronaltı ve nanometre ölçeklerinde hem kapsül hem de lif formunda elde edildiği teknolojik bir sistemdir [9].

Son yıllarda, elektrospreyleme ve elektrospınleme teknikleri diğer yöntemlere nazaran daha az kaplama materyali kullanımı gerektirdiğinden yeni ve yenilebilir kaplama üretim yöntemleri olarak önem kazanmaktadır. Ayrıca kaplama kalınlığı kontrol edildiği için deliksiz ve deformasyonsuz üniform kaplamalar elde edilebilmektedir. Elektrosprey kaplama nem transferini azaltabilme etkisine sahiptir. Böylece diğer yöntemlere göre çevresel faktörlere ve mikrobiyal gelişimlere daha dayanıklı ürünler elde edilmektedir. Sarma etkisi nedeniyle hedefin sadece üst yüzeyi değil yan tarafları da kapatılmaktadır [11]. Geniş bir elektrik iletkenliği alanına sahip bu yöntemin enerji tüketimi de düşüktür [12].

Bu tez çalışması kapsamında, elektroegirme sistemi ile üretilen farklı biyopolimerlerin aynı konsantrasyonlarda elde edilen çözeltileri ile kaplanması sağlanan *Saccharomyces cerevisiae* nanoliflerinin gastrointestinal sistemindeki olumsuz şartlara karşı dayanıklılığının ölçülerek kontrollü salımı ile enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk aşamada enkapsülasyon sisteminin değişken yüksek voltajlı güç kaynağı (15-30 kV) ve 3D printer aracılığı ile baskısı yapılmış Arduino ve koaksiyel model adına ikili şırınga için iki hareketli silindir kolektör deney tasarımları belirlenmiştir. İkinci aşamada materyal olarak proteinlerden peynir altı suyu proteini, sodyum kazeinat ve jelatinin %5'lik konsantrasyonlarından hazırlanan çözeltiler, çekirdek yapısında *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak, çekirdek yapısına da dış kaplamaya da %6'lık PVA çözeltisi karıştırılarak, çift şırıngalı sistem ile iç çapı 14G ve dış çapı 16G olan tek bir nozulden metal levhaya lif atımı sağlamıştır. Üçüncü aşamada elde edilen liflerden ekimler yapılarak enkapsülasyon verimliliği hesaplanmıştır. Son olarak gastrointestinal sistemin zor şartlarına dayanıklılığını ölçmek adına elde edilen liflerin *in vitro* analizleri gerçekleştirilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca karşılaştırma amacıyla

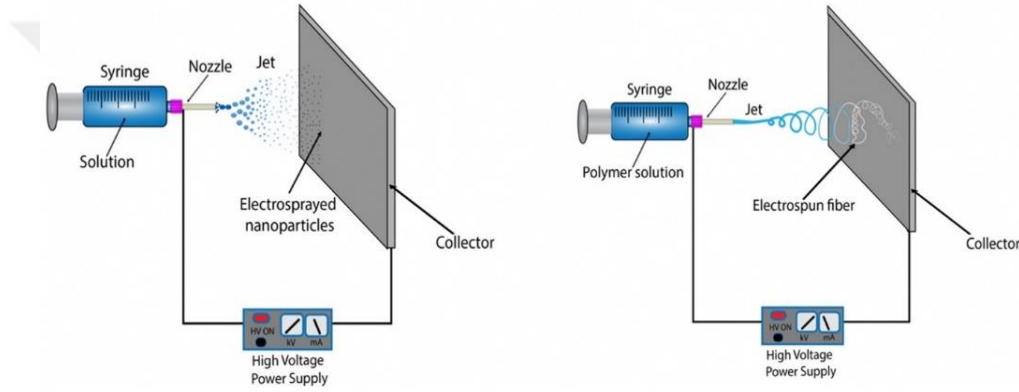
protein içeriği olmayan PVA-PVA-maya kontrol lifler elde edilmiştir. Yapılan analizler istatistiksel yöntemler ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektroeğirme Teknolojisi

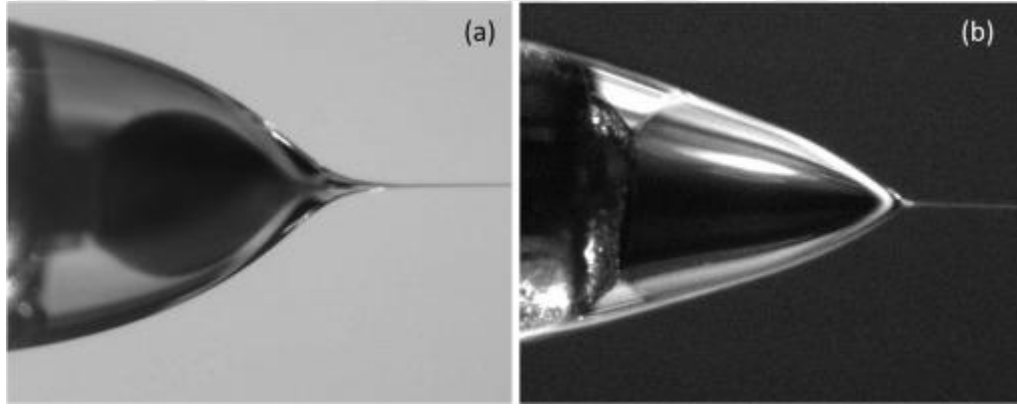
Elektroeğirme, mikron altı çapındaki liflerden (10-500 nm) oluşan birbirine bağlı zar benzeri bir ağ oluşturup çok katmanlı ürünler yapılması amacıyla yüksek voltajların kullanıldığı bir işlemdir [13]. Elektroeğirme prosesi (Şekil 2.1) yarım yüzyıldan fazla bir süredir bilinmesiyle beraber [14], proses ve ondan üretilen liflerin özelliklerini etkileyen parametreler günümüze kadar geliştirilmiş ve hala gelişmeye açık ve ihtiyacı olan bir sistemdir.



Şekil 2. 1. Elektroeğirme Sistemi genel hatları ve oluşan lif yapısı

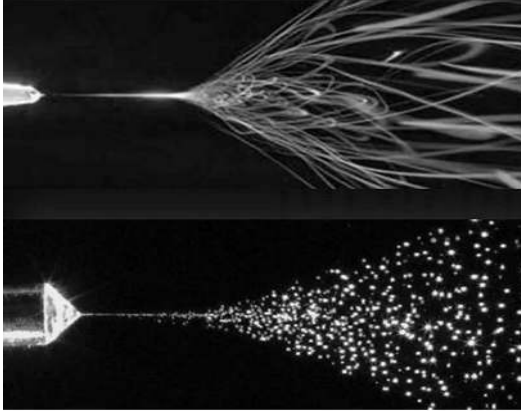
Elektroeğirme sistemindeki ana prensip elektrostatik bir kuvvetin sıvı damlasından bir elyaf demeti çekmesi ile kompozit nanolifler elde edilmesidir. Sistemde kullanılan yüksek voltaj, damlacıkta fazla elektrostatik yük birikmesine neden olmaktadır. Bu durumda damlacığa iki zıt kuvvet olan elektrostatik itme ve yüzey gerilimi aynı anda etki etmeye başlamaktadır. Bu iki kuvvet karşısında damlacık iğnenin ucunda asılı kalmaya başlayarak jet oluşturmaktadır ve Taylor konisi adı verilen (Şekil 2.2) konik bir şekle bürünerek en yakın yüzeye doğru bir sıvı akışı meydana getirmektedir. Bu sıvı akışında eğer moleküller yeterli kohezyona sahiplerse damlama oluşturmada birikecek olan yüzeye sürekli bir lif akışı meydana getirmektedirler. Kohezyon, uzun molekül yapıları için birbirine dolanma eğilimi ile veya glikoz gibi daha küçük biyomoleküller için hidrojen bağı gibi molekül içi kuvvetlerden kaynaklanmaktadır. Elektrostatik kuvvetlerin etki etmesi sonucu elektrohidrodinamik yöntemle üretilen malzemeler, biyoaktif maddelerin kontrollü ve uzun

sürekli salımına yönelik teknoloji olarak gıda endüstrisi açısından çok cazip bulunmaktadır. Ortam koşullarında çalışmasını sürdüren bu yöntem, gıda sınıfı hammaddelerine uygun olup hedef malzemeleri minimum oranla denatüre etme olasılığı ile güvenilir bir kapsülleme yöntemi olarak dikkat çekmektedir. Böylece biyoaktif içerikli malzemelerin stabilitesini en üst düzeye çıkararak potansiyel ürünlerin oluşturulup geliştirilmesinde çalışılması gereken önemli bir konu olmaktadır. Sonuç olarak, yüksek voltaja dayanıklı biyoaktif bileşenler ile çalışılarak istenilen ürünlerin elde edilmesini sağlayarak, bu ürünlerin biyoyararlılığı olan mikroorganizmaların kaplanmasında ve oluşturulan ürünlerin gastrointestinal koşullarda dayanıklılığının araştırılmasında, kaplama materyallerinin geliştirilmesinde potansiyel bir gelişim teknolojisidir [15].



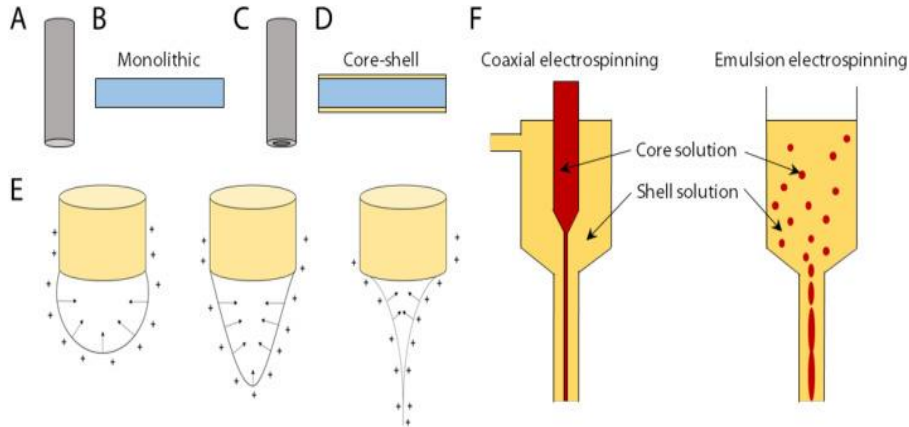
Şekil 2. 2. (a) Bir dış sürücü ile eş eksenli Taylor koni jeti. (b) İç sürücülü koaksiyel Taylor koni jeti.

Elektroeğirme sisteminde mikrometre cinsinden koaksiyel jetleri ilk kez 1998 yılında akış odaklama tekniği ile üretilmiştir. Sonrasında aynı düşünce, akış odaklı (mekanik) ve Taylor (elektrikli) koni jetleri arasındaki analogiler temelinde koaksiyel elektrikli jetler üretilmek amacıyla kullanılmıştır. Bu sonucun etkisi muhteşem sonuçlar göstermiştir ve o zamandan bu zamana kadar muhteşem gelişmeler yaşanmıştır. Buna örnek olarak koaksiyel Taylor koni jetleri temel olarak karmaşık liflerin üretilmesinden daha az ölçüde karmaşık liflerin üretilmesine geçilmesi gösterilebilmektedir. Elektroeğirmede kullanılan sıvıların elektriksel iletkenliği en yüksek olan sıvıya sürüş sıvısı denmektedir. Koaksiyel sistemde genellikle bu rolü dış ortamla (vakum, gaz veya dielektrik sıvı) temas halindeki sıvı oynamaktadır. Ancak orijinal koaksiyel modelinde bu görevi içteki sıvının üstlenmesi gerekmektedir [16].



Şekil 2. 3. Elektroëğirme (üstte) ve elektrosprey (altta)

Elektroëğirme teknolojisi, güçlü bir elektrik alanı (eriyikler de işlenebilir) uygulaması altında iletken bir düzenek içinden ekstrüde edilen polimer süspansiyonlarından, çözeltilerinden veya emülsiyonlardan sürekli halde liflerin üretilmesini ifade etmektedir. Çözelti özelliklerinin ve sisteme etki eden parametrelerin ayarlanması halinde lif yerine parçacıkların üretilmesine sebep olunarak işlemin adına elektrosprey (Şekil 2.3) denmektedir. Proses, tek bir iğne içeriyorsa tek eksenli elektroëğirme olarak adlandırılır ve tek bir çözeltilerden lif elde edilmiş olunur. Eğer proses eşmerkezli iç içe geçmiş iki iğne içeriyorsa iki ayrı sıvıyı çekirdek/kabuk şeklinde koaksiyel bir sisteme çevirmektedir. Bu durumlara alternatif olarak iç veya daha fazla sıvıyı işlemek de mümkün olmakla birlikte bu sisteme çok eksenli elektrospinning adı verilmektedir (Şekil 2.4) [17].



Şekil 2. 4. Tek eksenli elektroëğirme (A,B), Koaksiyel sistem (C,D), Çok eksenli elektrospinning (E), Her ikisi de çekirdek/kabuk nanolif yapısıyla sonuçlanmasına

rağmen, koaksiyel iç içe geçmiş eş merkezli iğne, diğer işlemde tek iğne ile çalışma yapılmaktadır (F).

Elektroeğrilen lifler, 10-500 nm arasında değişen çaplara sahip olarak küçük çap, yüzey alanı/hacim oranı ve yüksek uzunluk/çap oranı sağlamaktadır. Bu özellikler, ayırma zarları, yara pansuman malzemeleri, yapay kan damarları, tekstil ürünleri, kompozit nanolifler, dokunmamış kumaş, mikroorganizma içerikli gıda maddeleri gibi birçok uygulamada kullanılabilmeyle birlikte birçok yenilikçi fikrin de açığa çıkmasını sağlamaktadır. Ayrıca üretilen lifler, çeşitli enine kesit şekillerine ve uzunlukları boyunca varyasyonlara sahip olabilmektedirler [10]. Bununla birlikte proses büyük yüzey/hacim oranına ve nano ila mikro ölçeğine kadar değişebilen boyutlara sahip yüksek performanslı lifler, kapsüller, çubuklar, tüpler, spiraller, halkalar ve elde edilebilecek diğer şekilleri üretmek amacıyla kullanılabilir [18].

2.1.2. Elektroeğirme Teknolojisi İşlem Parametreleri

Elektroeğirme sistemi ile lif yapımını etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Parametreler prosese beslenecek olan çözeltilerin viskoziteleri, elektriksel iletkenlikleri ve yüzey gerilimleri olmak üzere üç çeşit; kılcal damardaki hidrostatik basınç, iğne ucundaki elektrik potansiyeli ve uç ile toplama yüzeyi arasındaki mesafe dahil kontrollü değişkenler; elektroeğirme cihazının bulunduğu ortamdaki sıcaklık, nem ve hava hızı gibi ortam parametreleri olarak şekillenmektedir. Bu parametreler bir veya daha fazlası uygun şekilde değiştirilerek sisteme verilebilmekte, böylece lifler suda çözünür polimerler, biyopolimerler ve sıvı kristal polimerler olarak şekillenebilmektedirler [18].

Tablo 2. 1. Elektroğirme Sistemini Etkileyen Parametreler

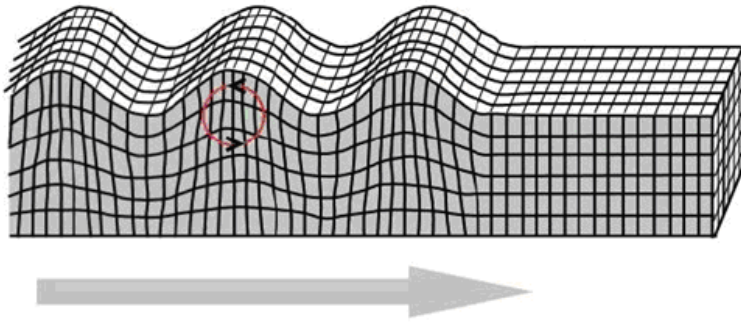
Elektroğirme Parametreleri
• Çözelti Özellikleri a. Molekül Ağırlığı b. Yüzey Gerilimi c. Elektriksel İletkenlik (Kondüktivite) d. Çözücülerin Etkisi • Proses İşleme Koşulları a. Voltaj b. Akış hızı c. İğne ucunun çapı d. Toplama yüzeyi ile iğne ucu arası mesafe • Ortam Koşulları a. Sıcaklık b. Nem

Düşük viskoziteli sıvılar söz konusu olduğunda, polimer çözeltileri elektrosprey olma eğilimindedirler ve yüzey geriliminin neden olduğu Rayleigh dengesizliği (Şekil 2.5) sebebiyle oluşan jet damlacıklara ayrılmaktadır. Sonucunda bu yüklü damlacıklar elektrostatik itme yüzünden kendiliğinden dağılmaktadır. Polimer çözeltilerin viskozitesi veya sıvıdaki moleküler zincir dolanması yeterince yüksek ise, oluşan jetin ucundaki Taylor konisinden gelen sıvı parçalanmak yerine jet şeklinde hareket etmeye devam eder. Sonrasında lifler, ‘‘whipping instability’’ olarak adlandırılan kararsızlığın, jet akımının oluşmasının ardından damlacığın uzayarak (yanal kuvvetler etkisi ile) düz bir lif oluşturma kararlılığının oluşmaması durumu, başlamasının ardından ilk düz uçuş yani lif yapımı oluşmaktadır ve toplanacak yüzeye aktarılmaktadır. Çözeltinin viskozitesi daha da artırıldıkça hem oluşan boncukların boyutu hem de lifler üzerindeki boncuk arasındaki ortalama mesafe artmaktadır ve boncuk şekli aynı anda kademeli olarak küreselden iğ benzeri bir şekle dönüşmektedir.

Bununla birlikte boncuklar ve boncuklu liflerin daha viskoz çözeltilerde oluşma olasılığı daha düşük olarak ifade edilmektedir. Uçan jet tarafından taşınan net yük yoğunluğu, uygulanan elektrostatik alan ve çözelti iletkenliğinden etkilenmektedir. Net yük yoğunluğu arttıkça, jet üzerine uygulanan kuvvetler, boncuk oluşumuna karşı çıkan ve daha ince jetleri destekleyen yüzey alanını arttırmaktadır. Ayrıca Zong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [19], daha yüksek bir yük yoğunluğuna atfedilen eğirme çözeltisine %1 iyonik tuz eklendiğinde liflerde iplik içinde boncuk yapılarının bulunmadığı doğrulanmış olmaktadır; tuz ilavesinin neden olduğu jet [20].

Yüzey gerilimi, jetleri kürelere dönüştürerek birim kütle başına yüzey alanını azaltmaktadır. Bu nedenle, yüzey gerilimindeki bir azalma, boncukların ve boncuklu liflerin oluşumunu da engelleyebilmektedir.

Rayleigh Dalgası



Şekil 2. 5. Rayleigh Dalgası

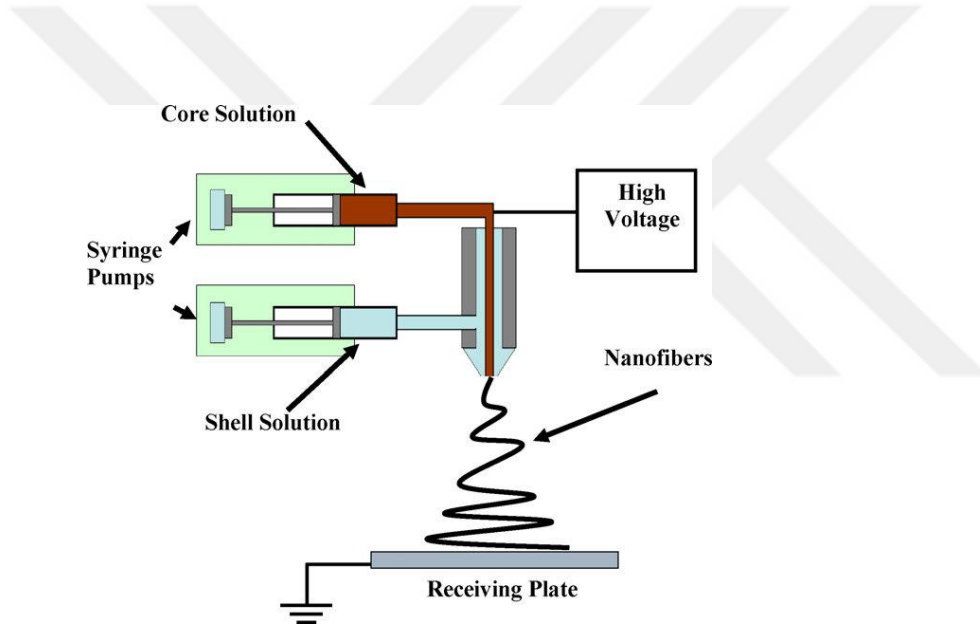
Ortamın nem seviyesi ile ilgili durumlarda nem seviyesi düşük ise iğnenin ucundan çıkan toplama materyaline kadar olan mesafede çözeltide kuruma veya aksi halde nem seviyesi yüksek ise damlamalar gözlenebilmektedir. Sıcaklık azaldıkça iğne ucunda sıvıda donmalar, aksi halde ise iğne ucunda damlamalar meydana gelebilmektedir.

Voltajın sistemdeki etkisi liflerin çekim gücü ile alakalıdır. Yüksek voltaj çekim etkisini arttırmakla beraber liflerin oluşmasında zaman tasarrufu da sağlamaktadır. Bununla birlikte voltaj toplama yüzeyi ile iğne ucu arası mesafeyi de etkilemektedir. Sistemin akış hızının yavaş olması saniyede oluşan lif miktarının

azalmasına da neden olmaktadır. İğne ucunun çapı ile lifin kalınlığı doğru orantılı haldedir.

2.2. Koaksiyel Sistem

Koaksiyel elektroğirme çekirdek/kabuk prensibine dayanan bir elektroğirme yöntemidir. Diğer elektroğirme yöntemleriyle kıyaslanacak olursa, elektroçekim, nanolif membranlara daha geniş spesifik yüzey alanı, daha yüksek gözeneklilik ve daha yüksek uzunluk-çap oranı gibi benzersiz özellikler kazandırabilmektedir. Buna ek olarak, benzersiz çekirdek/kabuk yapısı, öz maddelerin stabilitesi daha da arttırabilmekte ve kontrollü salım sistemi kurabilmektedir [21].



Şekil 2. 6. Koaksiyel elektroğirme sisteminin özet görünümü

Koaksiyel elektroğirme sisteminde oluşması istenilen lifin yapısı, çekirdek/kabuk yapısının oluşması istenilen lifin içeriğindeki malzemelere göre şekillenmektedir. Bu durumda dış kısmın oluşmasını sağlayan kabuk yapısı çözeltisi dış şırınga sistemine bağlı olarak, iç kısmın oluşmasını sağlayan çekirdek yapısı ise iç şırınga sistemine bağlı olarak çalışmaktadır. Şırıngadan iğne ucuna gelindiğinde ise iğne uçları eş merkezli olacak şekilde birbirleri ile iç içe halde bulunmaktadır. Elektroğirme sistemini etkileyen tüm parametreler gibi voltajın da etkisiyle toplama levhasına alınan lifler kullanıma hazır halde bulunmaktadır. Bu kısımda genel elektroğirme parametrelerine ek olarak koaksiyel elektroğirme yönteminde iç iğne

ile dış iğnenin çapları lifin kalınlığına etki etmektedir. Bu durumda lifin çapına olan etkisiyle birlikte tüm parametreleri de doğrudan veya dolaylı olarak etkilemiş olmaktadır.

2.3. Probiyotik Bakteriler ve Mayalar

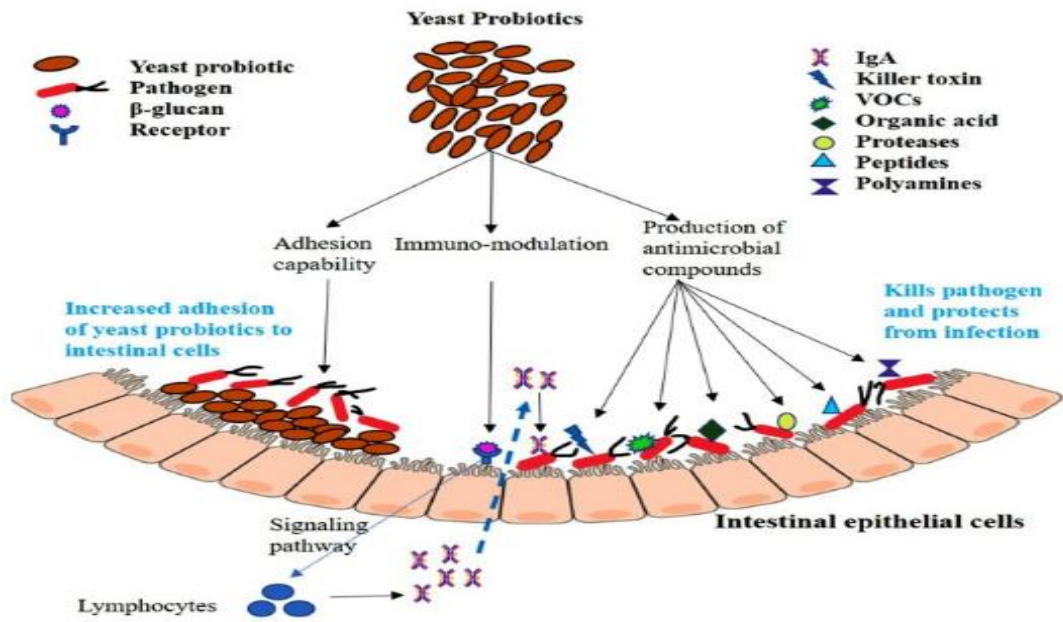
Antik Yunanca'da ‘‘yaşam için’’ anlamına gelen probiyotik terimi, tarihte fermente gıdaların tüketimi ile başlamış bulunmaktadır. Probiyotik terimini ilk defa 1953'te Kollath kullanmıştır, probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığındaki yararlı etkileri ise ilk kez Ellie Metchnikoff tarafından ortaya çıkarılmıştır [9]. Probiyotik bakterilerin yeterli miktarda alınması ile konakçının sağlığında olumlu yönde değişiklikler meydana getirdiği canlı mikroorganizmalar olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanmaktadır [22].

Probiyotik mikroorganizmaların büyükçe bir kısmı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerindendir. Fakat bu cinslerin yanında bazı laktik asit bakterisi olmayan türler, koklar, mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* (“*boulardii*”)) ve diğer türlerin (EcN, *Sporolactobacillus spp.*) probiyotik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir [9].

Probiyotikler, canlıda sağlık üzerinde yararlı bir etkiye sahip mikrobiyal hücre preparatları olarak bilinmektedirler. Probiyotik mayaların probiyotik bakterilere kıyasla bazı avantajlı özelliklere sahip oldukları öğrenilmiştir. Bu özelliklerden başta gelenler ise intestinal sistem koşullarına (düşük pH ve safraya) karşı daha dayanıklı olmaları; genetik madde transfer edilmemesi; insan ve hayvan sağlığında kullanılan birçok antibiyotığe karşı dirençli olmaları ve ortamdaki diğer mikroorganizmalar üzerinde sinerjistik etkilerinin olması olarak tanımlanabilmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* türlerinin dışında, diğer mayaların (*Kluyveromyces lactis*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa* ve *Pichia anomala*) da probiyotik özelliği gösterdiği bildirilmiş ve bu mayaların probiyotik potansiyellerinden yararlanarak gıda uygulamalarındaki kullanımlarına yönelik yoğun araştırmalar günümüzde de devam etmektedir [23].

Probiyotik bakterilerin antibakteriyel aktiviteleri birçok yazar tarafından çok iyi belgelenmektedir. Çoğu maya, otomatik agregasyon, koagregasyon ve adezyon yeteneği gibi dolaylı etki tarzı yoluyla patojenik bakterileri temizlemektedir. İmmünomodülasyon, patojeni öldürmek için probiyotik mayalar tarafından gerçekleştirilen eylem modlarından biri olduğu bilinmektedir. β -Glukanlar, bazı mayaların hücre duvarlarında görülen doğal olarak oluşan (1 $\rightarrow$ 3)- β -d- bağılı glikoz polimerleri olmaktadır. Potansiyel probiyotiğin önemli özelliklerinden biri antimikrobiyal özelliği olmasıdır ve bu patojeni öldürme özelliğinden dolayı başlangıç kültürleri olarak da kullanılabilirler. Bir organizmanın antimikrobiyal özelliği, patojenik bakteri büyümesini engellemektedir, mikrobiyal kolonilerin oluşumunu engellemektedir ve mikroorganizmaları yok edebilmektedir. Bu nedenle, bu probiyotik organizmalar, mide-bağırsak yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılabilir. Maya, organik asitler, poliaminler, proteazlar, mikosinler veya öldürücü toksinler gibi birkaç molekül üretir ve bunlar patojenik bakterileri yok eden antimikrobiyal bileşikler olarak işlev görmektedir (Şekil 2.7) [24].



Şekil 2. 7. Probiyotik mayaların hareket tarzları ile patojenlere karşı antagonistik aktivitesi

2.4. Probiyotik Enkapsülasyonu ve Proteinlerin Kullanımı

Probiyotikler, gastrointestinal florada bulunan canlı bakteri veya mayalar olarak adlandırılmaktadırlar [25].

Mikroorganizmaların en önemli gruplarından olan mayalar, milattan önce 3000'den fırıncılık, biracılık, şarapçılık gibi gıda ve biyoteknolojik endüstrilerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [26].

Probiyotiklerin sağlığı geliştirici etkileri, temel besinleri sağlama, sindirilmeyen bileşenleri metabolize etme ve fırsatçı patojen organizmaların kolonizasyonunu önleme yetenekleri bilinmektedir [25]. Probiyotiklerin sağlıklı faydaları nedeniyle kullanımı günümüzde genel halk arasında büyük ölçüde popüler hale gelmektedir. Probiyotikler büyük ölçüde süt ve süt ürünlerinde (yoğurt, dondurma, tatlılar) bulunmasına rağmen, daha az ölçüde çikolata, tahıllar ve meyve suyu gibi süt dışı ürünlere de dahil edilmektedir [18].

Gıdalarda, mevcut probiyotiklerin canlılığı, yararlı etkiler sağlamak için ürünün raf ömrü boyunca en az 10^6 koloni oluşturan birim/g (colony forming units (CFU)), (CFU/g) olmalıdır ayrıca günlük minimum terapötik dozun 10^8 - 10^9 hücre olduğu ve 10^6 - 10^7 canlı hücre/g içeren probiyotik ürünlerin 100 g/gün tüketilmesi ile elde edildiği ileri sürülmektedir. Bu durumda probiyotiklerin gıda ürünlerinde metabolik olarak aktif olmaları ve konakçıda kolonize olmak için mideden geçebilmeleri ve hayatta kalmaları gerekmektedir [18]. Bununla birlikte, birçok ticari probiyotiğin, işleme, depolama ve gastrointestinal kanaldan geçiş sırasında karşılaşılan olumsuz durumlara karşı sıklıkla duyarlı olduğu atfedilmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin maruz kalabilecekleri bu stresleri ortadan kaldırmak için etkili stratejilerin geliştirilmesi gerekliliği dikkat çekmektedir [25]. Bu bağlamda, probiyotik hücrelerin canlılığını korumak ve arttırmak amacıyla asit ve safraya daha dirençli probiyotik suşların seçilmesi, probiyotiklerin oksijenle temasını önlemek için oksijene dayanıklı kapların kullanılması, mikro besinlerin (örneğin fruktooligosakkaritler) kapsülasyon yardımıyla konuya dahil edilmesi gibi stratejiler ortaya sürülmüştür ve denenmiştir [18]. Bu stratejiler arasında probiyotik canlılığını korumak için yeni kapsülleme teknolojileri geliştirmek de bulunmaktadır. Bu bağlamda kapsülleme,

probiyotiklerin hedeflenen bir şekilde bağırsaklarda hayatta kalmasını iyileştirme yolunda etkili bir yöntem olmaktadır. Probiyotik hücreleri kapsüllemek mikroenkapsülasyon yöntemi tekniklerine dayanmaktadır. Canlı hücreleri kapsüllemek için mikroenkapsülasyon yöntemi kullanılsa da, biyoyararlanımlarını ve dolayısıyla probiyotiklerin hayatta kalma oranlarını ve vücut içerisindeki çeşitli bölgelere dağılımlarını arttırmak, partikül boyutu, partikülde kullanılan kimyasallar ve mikro yapısı, mikroorganizmanın suşundan doğrudan etkilenmektedir [25].

Tablo 2. 2. Probiyotiklerin farklı kapsülleme teknolojilerinin artıları ve eksileri

	Emülsifikasyon	Koaservasyon	Püskürtmeyle Kurutma	Dondurarak Kurutma	Ekstrüzyon	Elektrosprey / Elektroeğirme
Kapsülleme Verimliliği	+	++	+	-	++	+++
Hücre Canlılığı	++	+	++	++	+	++
Oda Sıcaklığı	++	+	-	-	-	+++
Düşük Yatırım	+	+	++	-	+	+
Malzeme Seçiminin Çok Yönlülüğü	-	+	+	+++	-	+++
Teknoloji Sanayileşme	+++	-	+++	+++	+++	+

+++ : Maksimum; - : Mevcut değil.

Nanoenkapsülasyon, gelecek vaat eden bir alternatif yaklaşım olmakla birlikte, biyoyararlanımı iyileştirme potansiyeline sahip, kontrollü salımı arttıran ve mikroenkapsülasyon tekniklerinden daha fazla miktarda canlı mikroorganizmanın doğru bir şekilde hedeflenmesini sağlamaktadır. Ayrıca nanoenkapsülasyon tekniği, geniş yüzey alanı nedeniyle immobilizasyon etkinliğinin artması ve hacimle birlikte azalan termal iletkenliğin bir sonucu olarak ısıtma işlemine karşı korumanın artması gibi

bazı yararları da beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda, elektroğirme tekniği, nano boyutta elyaf hasırların üretimi için iyi bilinen bir teknik olan, verimli ve uygun maliyetli bir tekniktir. Bu teknik, elektrostatik bir kuvvet uygulanarak çıkarılan yüklü polimer jetine dayalı olarak çalışmaktadır. Sonrasında oluşan bu jet, düz bir hat oluşturacak şekilde uzayarak plaka üzerinde toplanmaktadır [27].

Canlı mikroorganizmaların kapsüllenmesi ve immobilizasyon sonrasında hücre canlılığının değerlendirilmesi adına mayalar, elektroğirme teknolojisinde kolay ve etkili bir şekilde nanolif içerisinde kapsüllenmiştir. İlk olarak, kullanılacak olan elektroğirme çözeltilerinin kütle oranlarının bir fonksiyonu olarak elektriksel iletkenlikleri, viskoziteleri ve yüzey gerilimleri çok etkili parametreler oldukları için elektroğirmedeki immobilizasyonun optimum çözelti koşullarının belirlenmesi amacıyla belirlenmelidir [26].

Önceleri nanoenkapsülasyon teknolojisinde nişasta, arap zıkkı, jelatin gibi tekli polimerler veya peynir altı suyu protein izolatu kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ikili sistemlerin uygun seçimi ve kullanımı, kapsülleme verimliliklerinde artışa ve/veya daha yüksek hayatta kalma oranlarına yol açmakta olduğundan, son zamanlarda artış göstermiştir. Ek olarak bu ikili sistemlerin tek bileşenli sistemlere göre *in vitro* gastrointestinal koşullarında da üstün bir performans sergiledikleri bildirilmektedir [27].

Probiyotiklerin kapsülasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan diğer proteinler arasında soya, amarant proteinleri, kazein, kollajen, elastin, deniz ve yumurta proteinleri de bulunmaktadır. Proteinlerin polielektrolit doğası, elektrohidrodinamik işleminin stabilitesini azalttığından dolayı probiyotiklerin kapsüllenmesinde proteinlerin kullanımı zordur. Dolayısıyla bu durumda probiyotiklerin yaşayabilirliğini etkileyen faktörlerdendir. Bu nedenle sistem parametrelerinin bu duruma göre ayarlanması gerekmektedir. Ayrıca proteinlerin elektrohidrodinamik sistemlerde işlenmesine yönelik diğer zorluklar arasında, kararlı bir Taylor konisinin oluşumunu engelleyen sulu protein solüsyonlarının yüksek yüzey gerilimi ve probiyotikleri hareketsiz hale getirebilecek fibriller veya kapsüller yapılar üretmek amacıyla yeterli protein zinciri dolaşıklıklarının olmaması da yer almaktadır [28].

Tablo 2. 3. Elektrosprey kullanılarak probiyotiklerin kapsülleme çalışmalarına genel bakış, kullanılan polimerler, çözücüler, konsantrasyon miktarları [28].

Probiyotik Suş	Polimer	Çözücü	Konsantrasyon	Referans
<i>Bifidobacterium strains</i>	Peynir Altı Suyu Proteini Konsantresi (PASP); Pullulan	PBS; Yağsız Süt	PASP: %30–40 w/w Pullulan:(Mw 100 kDa) %15-20 w/w	[29]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aljinat	Su	Aljinat %1,4 a/h/Gliserol %8 a/h	[30]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sodyum Aljinat (SA); SA/ Sitrik Pektin	Su; Su/Sitrik Asit	SA: %3 ağırlık/hacim; SA/sitrik pektin: %4 ağırlık/hacim: %4 ağırlık/hacim	[31]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Peynir Altı Suyu Proteini Konsantresi (PASP)	Su; Yağsız Süt	PASP: 0,3 g/mL	[32]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ca- Aljinat (A)/ Kitosan (Ch)	A: su Ch: Asitlendirilmiş su (pH 3,5)	A: (orta viskozite) Ch: Mw: 70–300 kDa, DD: %75–95	[33]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Çekirdek: Aljinat (A)/Gliserol(G) Kabuk: Yumurta Akı (EA), Stearik Asit (SA)	Su	A: %2,5 ağırlık/hacim; G: %8 ağırlık/hacim; EA: %8 ağırlık/hacim	[34]
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> CECT 4552	Peynir Altı Suyu Proteini Konsantresi (PASP), Fibersol® (F) Maltodekstrin (M), Zein (Z); PVP	F, M: Su PASP: Yağsız Süt Zein: etanol PVP: Su	F ve M: %20 w/w PASP: %20 w/w Zein: %12 w/w PVP: %10 w/w	[35]
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014™ and <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	Aljinat (A)/kitosan (Ch), İnülin (I), dirençli Nişasta (RS)	Su	C: 50 mg/g; Mw 80–120 kDa Ch: 50 mg/g, MW: 70–300 kDa; DA: %75–95 I: Mw 4,0–6,5 kDa; DP ≥ 23 RS: 50 mg/g	[36]
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> Bb12	Polivinil alkol (PVA)	Yağsız süt (çekirdek) su (kabuk)	M w 146–186 kDa	[37]
Yoğurt Mayası	Tarım atıklarından elde edilen çözünür diyet lifleri (SDF) + PVA	Su	PVA: %8 ağırlık/hacim; Mw 85-124 kDa	[38]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Çekirdek: Gliserol (G) Kabuk: Nişasta (S)	Formik asit (kabuk)	G: %99,5 saflık S: %17 a/a	[39]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	PVA Sodyum aljinat (SA)	Su	PVA: %20 ağırlık/hacim SA: %3 ağırlık/hacim	[40]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sodyum aljinat (SA) PVA	Su	SA: %2 w/w PVA: %6 ve %8, w/w	[41]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 016	PVA Bakteriyel selüloz (BC)	Su/Triflor oasetik asit	BC: %5 w/w PVA: %5 w/w	[42]

Tablo 2. 4. Elektrosprey kullanılarak probiyotiklerin kapsülleme çalışmalarına genel bakış, kullanılan polimerler, çözücüler, konsantrasyon miktarları [28] (devam ediyor)

Probiyotik Suş	Polimer	Çözücü	Konsantrasyon	Referans
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb12</i>	Kitosan (Ch) Poli (vinilalkol) (PVA) İnülin (I)	Asetik asit Su	Ch: %1 ağırlık/ağırlık; orta Mw %75–85 DD PVA: %15 w/w; Mw: 89–98 kDa	[43]
<i>Lactobacillus plantarum ATCC 8014</i>	Poli etilen oksit (PEO) PEO/liyoprotektan (L)	Su	PEO: %4 ağırlık/ağırlık; Mw, 900 kDa L: %4 w/v	[44]
<i>Lactobacillus reuteri E81</i>	PVA	Su	Bahsedilmemiş	[45]
<i>Lactobacillus paracasei KS-199</i>	Sodyum aljinat (SA) PVA	Su	PVA: %20 ağırlık/ağırlık; Mw 130 kDa SA: %3 w/w, Mw: 60 kDa	[27]

Tablo 2.3'te de görüldüğü üzere polisakkaritler de probiyotiklerin kapsüllemesi için yaygın kullanılan biyoaktif maddelerdir. Polisakkaritler, glikozidik bağlarla bağlanan monosakkaritlerin tekrar eden birimleri tarafından oluşturulmuş olunan makromoleküllerdir. Elektrohıdrodinamik (EHD) işlemede polisakkaritlerin kullanımı, gıda ve diğer yaşam bilimi uygulamalarıyla ilgili özellikler olan düşük maliyetleri, kimyasal çeşitlilikleri, biyoyuymululukları, biyobozunurlukları ve nihai olarak biyolojik aktiviteleri nedeniyle artmakta olduğu bilinmektedir [28].

Polisakkaritlerin EHD işlemi (elektrosprey, elektroğırme) moleküler ağırlık, fonksiyonel gruplar ve yükler gibi kimyasal özelliklerine de bağılıdır. Bir diğer kritik parametreler ise polisakkarit çözeltilerinin iletkenliği, genleşme ve içsel viskozitesi, yüzey gerilimi ve buhar basıncıdır. Elektroğırme polisakkarit lifleri, önemli polimer zincir dolaşıklıkları ve zayıf kesme inceltme solüsyon özellikleri mevcut olduğunda kolaylıkla oluşturulabilir. Tek tek polisakaritlerin elektrospinlemesini kolaylaştırmak amacıyla PVA, PEO, pullulan gibi polimer taşıyıcılar da kullanılabilir [28].

Tablo 2. 5. Elektrosprey kullanılarak probiyotiklerin kapsülleme çalışmalarına genel bakış, proses koşulları, ortalama çap [28].

Probiyotik Suş	Proses Koşulları	Ortalama Çap	Referans
<i>Bifidobacterium strains</i>	12–14 kV 7 cm 0,3 mL/saat	658–1315 nm (Pullulan/süt) 259–2024 nm (PASP/süt)	[29]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4, 6, 10 kV 6 cm 10 mL/saat	259–543 deniz mili	[30]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24 kV 15 cm 2 mL/saat	SA 116 ± 13 µm SA/Pektin: 111 ± 13 µm	[31]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10–14 kV 10 cm 0,15 mL/saat	Belirtilmemiş	[32]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9,5 kV 100 mm 5 mL/saat	300–550 mikron	[33]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8 kV 6 cm 10 mL/saat	450 ± 50 mikron	[34]
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. infantis</i> CECT 4552	Belirtilmemiş	PASP: 2,47 ± 1,15 µm F: 87 ± 2,07 µm M: 1,95 ± 0,54 µm	[35]
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014™ and <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	9,5 kV 100 mm 5 mL/saat	460–710 mikron	[36]
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> Bb12	11 kV 13 cm 0,06–0,3 mL/saat	150 nm	[37]
Yoğurt Mayası	12 kV 15 cm 0,1 mL/saat	229–703 deniz mili	[38]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	21kV; 2 mL/saat(çekirdek) 5 mL/saat (kabuk) 10 cm	4,45 ± 0,91 mikron	[39]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22 kV; 10 cm 1,2 mL/saat	583,1 deniz mili	[40]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	16 kV 14 cm 0,4 mL/saat	270 ± 64 deniz mili	[41]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 016	20 kV 20 cm 0,5 mL/saat	450–800 deniz mili	[42]
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> Bb12	18 kV 15 cm 0,1 mL/saat	117,5 ± 70,6 ila 217,6 ± 62,7 nm	[43]
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	15 kV 15 cm 0,4 mL/saat	815 ± 115 deniz mili	[44]
<i>Lactobacillus reuteri</i> E81	25 kV 10 cm 0,4 mL/saat	381,83 ± 130,69 deniz mili	[45]
<i>Lactobacillus paracasei</i> KS- 199	15–27 kV 6–15 cm 1,2 mL/s	170–360 deniz mili	[27]

Çeşitli protein ve polisakkaritlerle kapsüllenebilen probiyotiklerin oluşturduğu EHD sistemlerinden olan elektroğirme yöntemiyle üretilen nanoliflerin çapı 100nm'den küçük olmasıyla bilinen basit bir işlemdir. Literatürde de birçok çalışmaya konu olan elektroğirme yöntemi ile üretilen nanolifler ayrıca nutrasötik ve tat salımı gibi gıda endüstrisi uygulamaları için yeni bir araç olarak vurgulanmaktadır [46].



3. DENEYSEL KISIM (MATERYAL VE YÖNTEMLER)

3.1. Materyal

3.1.1. Maya ve Proteinlerin Temini

Nanolif üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* ekmek mayası yaş halde ticari ürün olarak satın alınmıştır. Analizlerde mayalar her analiz için steril ve taze halde kullanılmıştır.

Mikroenkapsülasyon tekniğinde kullanılan polivinil alkol (PVA, M_A 85000-124000, %99+ hidrolize) ve proteinler olarak belirlenen peynir altı suyu proteini (whey protein), sodyum kazeinat ve sığır jelatini MERCK – Sigma Aldrich’ten (Almanya) temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemelerin Temini

Yapılan çalışmada kullanılan Etanol ($\geq$ %99.8), Hidroklorik asit (HCl) (%37), Sodyum klorür (NaCl) ($\geq$ %99.0), Potasyum klorür (KCl) ($\geq$ %99.0), Sodyum hidroksit (NaOH) ($\geq$ %98.0), Trikloroasetik asit (TCA) ($\geq$ %99.0), Kalsiyum klorür (CaCl_2) ($\geq$ %97.0), p-toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) (M_A 428.50), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trizma base) ($\geq$ %99.8), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (M_A 136.09), Sodyum bikarbonat (NaOHCO_3) (M_A 84.01), Magnezyum klorid dihidrat ($\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$) (M_A 203.30), Amonyum karbonat ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$) ($\geq$ %99.0), Hemoglobin, Pepsin, Pankreatin, Safra tuzu, Agar Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- FTIR-ATR Spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum Two TM, USA)
- SEM-EDX Cihazı
- Au-Pd Kaplama Cihazı
- pH Metre (WTW marka 7110 model, Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı (Labart SHT-5, USA)
- Vorteks Karıştırıcı (WiseMix VM-10)

- İnkübatör (Nüve)
- Otoklav (HMC Hirayama)
- Hassas Terazı (Mettler Toledo)
- Çalkalamalı İnkübatör (IKA KS 4000i)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- Buzdolabı (+4 ve -18°C) (Arçelik)
- Stomacher Cihazı
- Dijital Ayarlanabilir Otomatik Mikropipetler (Brand ve Capp marka)
- Derin Dondurucu (-86°C)
- Elektriksel İletkenlik Ölçüm Cihazı (Hanna HI 99300)
- Viskozimetre (Brookfield LVDV-II), Spindle SC4-18
- Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (Attension Theta)

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektroeğirme Sistemi

Laboratuvar ölçekli olarak tasarlanan elektroeğirme sisteminin tam bir hali Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Sistemde PASP, SK ve SJ olmak üzere üç çeşit proteinle ekmek mayasının koaksiyel olarak mikroenkapsülasyonu sağlanıp nanolif oluşumunun elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda sistemde değişken voltajlı güç kaynağı (15-20 kV) ve sabit plaka üzerine lif üretimi sağlanacak şekilde iki adet şırınga pompası, iki adet şırınga ve iki adet şırıngayı bağlayan kolonların birleştiği kısma metal nozuller değiştirilebilir özellikte sabitlenmiştir. Bu şekilde sistemin beslenmesi sağlanmıştır.

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) analizi öncesi elektroeğirme prosesinden elde edilen nanolifler parçalara ayrılmış ve ayrılan bu parçalardan rastgele seçimler yapıp karbon bantlar kullanılarak örnekler sabitlenmiştir. Sabitlenen örnekler iletken yüzey sağlamak amacıyla püskürtmeli altın-paladyum (Au-Pd) kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan

Inc., Pleasanton, CA,USA) kullanılarak 10nm kadar kaplandıktan sonra, SEM cihazına alınarak çeşitli boyutlarda görüntüler elde edilmiştir.

SEM cihazından elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı (NIH, Maryland, ABD) ile işlenerek nanoliflerin çap histogramları ve ortalama çap değerleri elde edilmiştir. Elde edilen ortalama çap ve standart sapma verileri en az 2000 ölçüm/mikrograf olacak şekilde belirlenmiştir.

3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Saf ve lif elde edilmiş protein örneklerinin ve PVA'nın FTIR spektrumları, ATR ve potasyum bromür (KBr) kaplı elmas kristal ve döteryum triglisin sülfat (DGTS) dedektörü ile donatılmış FTIR-ATR spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum Two™, FTIR Spectrometer, United States) kullanılarak üçlü ölçümler alınmıştır ve ortalama değerler kaydedilmiştir. Örneklerin FTIR-ATR spektrumları, 4 cm⁻¹ çözünürlükte, 400-4000 cm⁻¹ MIR aralığında belirlenmiştir. ATR kristali her örnek ölçümü sonrası etanol ile temizlenmiştir ve bir arka plan spektrumu toplamak üzere kurumaya bırakılmıştır.

3.2.4. Elektroeğirme Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Elektroeğirme yöntemi ile nanoliflerinin eldesi için GRAS (Generally Recognized as Safe- Genellikle Güvenli Kabul Edilir) listesinde yer alan PVA polimeri tercih edilmiştir. PASP, SK ve SJ her biri %5'lik konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır. Optimum konsantrasyonların belirlenmesi için %10, %8, &6 (a/h) oranında çözeltiler 55°C'de ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Karışımlardan elde edilen sonuçlardan %6'lık konsantrasyonlu PVA çözeltisi tercih edilip analizlere devam edilmiştir. PASP, SK ve SJ ile hazırlanan PVA karışımlarının karakterizasyonu için viskozite ve elektrik iletkenliği (kondüktivite) analizleri yapılmıştır.

Çözeltilerin viskozite analizi, viskozite değerlerine göre seçilmiş olan SC4-25 ve LV3 (63) milleri kullanılarak Brookfield Viscometer DV-II+Pro viskozimetresi (Brookfield Engineering Laboratories INC., Middleboro, MA, USA) ile yapılmıştır.

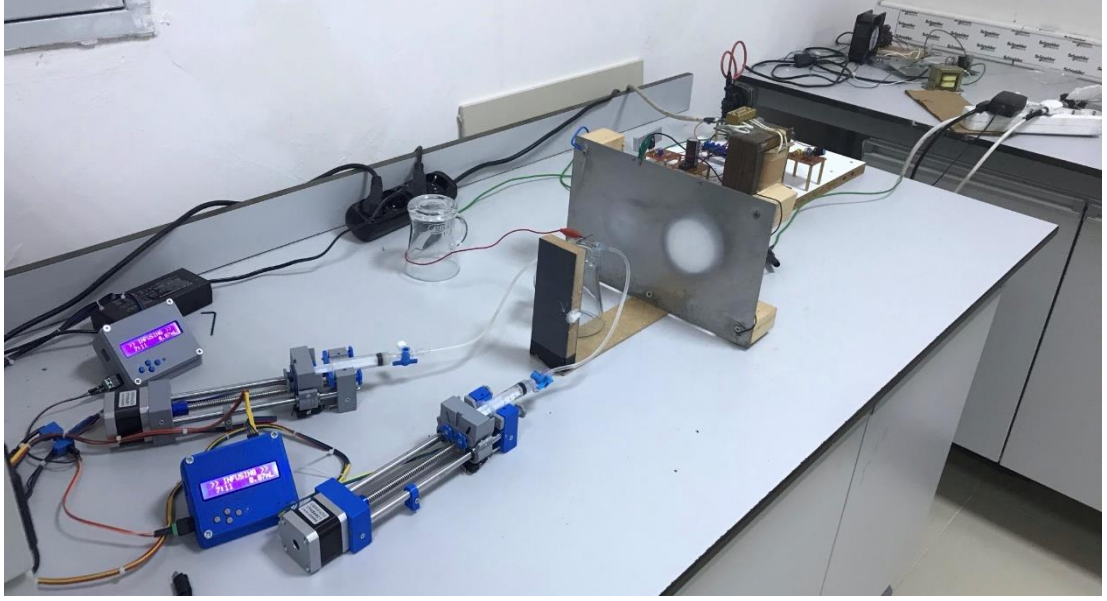
25°C’de yapılan ölçümlerde, kullanılan viskozimetrenin talimatlarına uygun olarak, % 10-90 tork aralığındaki (güvenilir ölçüm aralığı) viskozite değerleri kaydedilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin kondaktivite değerleri HI 8633 kondüktivimetre (Hanna Instruments, Woonsocket, A.B.D.) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. pH ve kondaktivite analizleri için yapılan ölçümlerde üç paralel kullanılmıştır.

3.2.5. *Saccharomycess cerevisiae* ‘nın Standardize Edilmesi

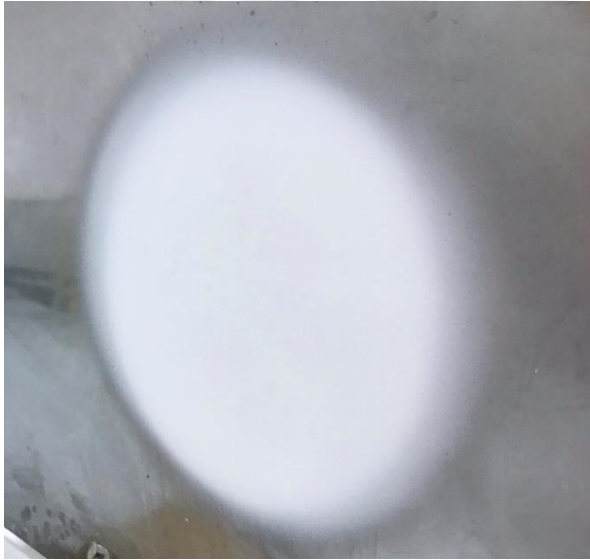
Saccharomycess cerevisia, elektroğirme sistemine enkapsülasyon amacıyla verilmeden önce belirli bir standardize işlemine alınmıştır. Standardize işlemi amacıyla kullanılan dilüsyonla sıvı hazırlanıp, her seferinde elektroğirme sistemine 11 log birimlik maya verildiğinden emin olunmuştur. Sistemin çekirdek kısmının çözeltileri hazırlanırken her seferinde mayaların en aktif olduğu sıcaklık ve sürede sisteme enjekte edilmeye özen gösterilmiştir. Mayaların standardizasyonunu sağlamak amacı ile mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilerek 11 log birimlik mayaların sisteme verildiğinden emin olunmuştur.

3.2.6. PVA/PASP, PVA/SK ve PVA/SJ Nanoliflerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Laboratuvar ölçekli tasarlanan elektroğirme sistemi (Şekil 3.1) kullanılarak hazırlanan nanolifler koaksiyel nozulden elde edilmiştir. Bu proseste nanolif üretimi için hazırlanan tüm çözeltiler sabit plaka ve metal nozul arasında 7cm mesafe olacak şekilde, şırınga pompa kullanılarak, 15-20 kV’de, iç yarıçapı 1.6mm (14 Gauge (14G)) olan metal nozulden PVA/maya karışımı, iç yarıçapı 1.2mm (16 Gauge (16G)) olan metal nozulden dış kaplama PVA/protein (PVA/PASP, PVA/SK, PVA/SJ) karışımları 0.002 mL/sa akış hızında sisteme beslenmiştir. Elektroğirme sistemindeki çözeltilere uygulanan yüksek voltaj ile oluşturulan elektrik alan sayesinde üretilen nanolifler (Şekil 3.2), dik açı ile koaksiyel halde sabit metal plaka üzerinde toplanmıştır.



Şekil 3. 1. Laboratuvar ölçekli tasarlanan elektroğirme sistemi



Şekil 3. 2. Üretilen nanolifler

Üretilen nanoliflerin SEM cihazı ile görüntüleri alınmış, ImageJ yazılımı ile işlenerek ortalama çapları ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca nanoliflerin FTIR analizi yapıp, saf protein ve PVA'nın FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.7. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Viskozite Analizi

Akışkanların bir özelliği olan viskozite sıvıların akmaya karşı gösterdikleri direnç veya iç sürtünmesi anlamına gelmektedir. Sıvı molekülleri birbirlerinin üzerinden kayarak hız kazanmalarını engellemeye çalışarak aralarında sürtünme oluşturmaktadırlar. Bu durumda sürtünme azalırsa akış hızı artar ve viskozitesi düşmektedir. Sıcaklık ve basınç viskoziteyi etkileyen parametrelerdir. Viskozite sıcaklık ile ters basınç ile doğru orantılı konumdadır. Basıncın artması sıvıların içerisindeki boşlukların azalmasına dolayısıyla sıvı moleküllerinin hareketinin yavaşlamasına neden olmaktadır.

Koaksiyel üretilen protein kaplı liflerin dış katmanındaki protein çözeltilerin viskozitesi Brookfield viscometer cihazı ve SC4-18 spindle (Şekil 3.1) ile ölçülmüştür. Bu analiz ile yapılan nanoliflerin dış katmanındaki PASP, SK ve SJ proteinleriyle belirli oranlarda karıştırılan PVA çözeltilerinin yapısının değerlendirilmesi ve viskozite değerlerinin akış hızına etkisinin bilinmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu analizde, sistemde kullanılan dış katmandaki çözeltiler %5 konsantrasyon protein çözeltileri ve %6 konsantrasyon PVA çözeltisi olacak şekilde birbirleri ile homojenize edilmiştir.



Şekil 3. 3. Brookfield LVDV-II + Viscometer



Şekil 3. 4. Spindle SC-18

Protein/PVA çözeltilerinin kayma hızına (1/s) karşılık kayma gerilimi (N/m²) grafiği çizdirilip eğime göre viskozitesi hesaplanarak oluşan eğrilerin akış türü belirlenmiştir. Analizdeki her bir örnek üçlü paralel halinde çalışılmıştır.

3.2.8. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Elektriksel İletkenlik (Kondüktivite) Analizi

Elektriksel iletkenlik, bir diğer adıyla elektriksel iletkenlik, suyun elektrik akımını iletebilme kapasitesinin belirlenmesidir. Saf su içerisinde başka hiçbir madde bulunmazken elektrik akımını iletemez haldedir ve yalıtkan malzeme olarak bilinmektedir. Saf suda başka maddeler çözündürüldüğünde yalıtkan halini terk etmektedir ve elektriksel iletkenlik kazanmaktadır. Suda çözünen maddelerin molekülleri yapıları itibarı ile tuz olup, elektriksel iletkenlik ölçen cihazların ölçümde verdiği EC (electrical conductivity) değeri solüsyonun tuzluluk miktarının göstergesi olmaktadır.

Bu analiz kapsamında koaksiyel nanoliflerin dış kaplama materyalleri olan üç farklı protein çeşidi ile ayrı çözeltileri hazırlanmış PVA'nın elektriksel iletkenlikleri üçer paralel olacak şekilde ölçümleri alınmıştır. Çözeltilerin konsantrasyon oranları viskozite analizindeki konsantrasyon oranları ile aynı miktarda çalışılmıştır. Çözeltilerin EC değerlerinin nanoenkapsülasyon sistemindeki etilerinin öğrenilmesi amaçlanmıştır. Analizde elektriksel iletkenlik ölçümünde Hanna Instruments EC/TDS Meter HI 99300 (Şekil 3.4) cihazı kullanılmıştır. Kullanılan bu cihazın 0 $\mu\text{S} / \text{cm}$ ile 3999 $\mu\text{S} / \text{cm}$ 'ye kadar çözünürlüğe geniş elektriksel iletkenlik ölçümleri yani EC

değeri alma kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda cihazın sıcaklık ayarlama değerleri 0,0 ila 60,0 ° C / 32,0 ila 140,0 ° F arasındaki genişliğe sahiptir. Analizde cihaz 25° C’de tutularak ölçümler alınmıştır. Çözeltilerin pH’ını belirlemek için özel bir sensör kullanılmıştır (yani, HI-11310 sensörü).

Her ölçüm setinden sonra Hanna Instruments EC/TDS Meter HI 99300 cihazına özgü özel kalibrasyon tuzları yardımıyla bir kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneysel verilerin tartışılması için değer kaydedilmiştir [49].



Şekil 3. 5. Elektriksel İletkenlik Cihazı (Hanna Instruments EC/TDS Meter HI 99300)

3.2.9. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Analizi

Sıvıların yüzeyindeki moleküller ile iç kısımlarındaki moleküller arasında oluşan elektriksel kuvvetlerin farklılık göstermesi ve yüzeydeki moleküllere etki eden elektriksel kuvvetlerin dengeli olmamasından kaynaklanan terime yüzey gerilimi denmektedir.

Nanoenkapsülasyon sisteminde elde edilen koaksiyel üretilen protein kaplı nanoliflerin dış katmanındaki protein çözeltilerinin temas açısı ve yüzey gerilimi ölçümleri Attension Theta cihazı (Şekil 3.5) ile yapılmıştır. Cihaz, beslendiği örnek çözeltilerin her birinden ayrı ayrı damla görüntülerini kaydederek zamanla damlanın şeklinde meydana gelen değişimleri analiz etmektedir. Damla şekli, sıvının yüzey

geriliminin ve buna bağı olarak sıvı ve sıvının bulunduğu ortam arasındaki yoğunluk farkının bir göstergesi olmaktadır.

Bu analizde nanoliflerin dış katmanındaki PASP, SK ve SJ proteinleriyle belirli oranlarda karıştırılan PVA çözeltileri viskozite ve elektriksel iletkenlik analizindeki oranlarıyla aynı şekilde hazırlanıp ölçülerek değerleri alınmıştır. Burada amaç dış kaplama materyali olan protein çözeltilerinin temas açısı ve yüzey gerilimlerinin nanoenkapsülasyon sistemine etkisinin bilinmesidir. Yapılan bu analizde, çözeltilerin her biri üçlü paraleller halinde çalışılmıştır.



Şekil 3. 6. Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (Attension Theta)

3.2.10. Elektroğirme Prosesinin Mikroorganizma Canlılığına Etkisi ve Enkapsülasyon Verimliliği

PVA-Maya/PVA-PVA, PVA-Maya/PVA-PASP, PVA-Maya/PVA-SK, PVA-Maya/PVA-SJ hibrit nanoliflerde öncelikli olarak elektroğirme işleminin canlılık üzerine etkisi araştırılmıştır.

İlk olarak elektroğirme prosesinin PVA/Protein-Maya nanolifleri üzerine etkisine bakılmıştır. Yapılan protein kaplamanın mayaların canlılığı üzerindeki olumsuz etkisi olup olmadığının kontrolü amacıyla PVA/PVA kontrol nanolifi ele alınarak mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.

Yapılan bu çalışmada teorik olarak sistemden elde edilen PVA-Protein/PVA-Maya nanolif içerisindeki ağırlıkça 10mg PVA nanolifine denk gelecek şekilde

Çözeltiden 84  L alınmış ve 1 mL ultra saf su kullanılarak süspanse edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiden seri dilüsyonlar hazırlanarak DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) Agar kullanılarak yüzeye yayma yöntemine uygun olarak ekimler yapılmıştır. Petri kapları 4 gün boyunca 25  C’de inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda oluşan mayalar sayılıp sonuçlar kaydedilmiştir. Aynı işlemler kontrol grubu olarak kullanılan PVA/PVA-Maya nanolifleri için de gerçekleştirilmiştir. Bu işlem elektro irme prosesindeki mayaların canlılığı üzerine etkisini vermiştir.

Bir diğer işlem sadece nanoliflerin yüzeyine tutunmuş olup enkapsüle olmayan mayaların tespiti için yapılan yıkama işlemidir. Bu amaçla her örnekten 10mg tartılıp her örnek üzerine 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) eklenmiştir. Süspanse edilen örnekler 10s vortekslelendikten sonra seri dilüsyonları hazırlanıp DRBD agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun halde ekimleri yapılmıştır. 4 gün boyunca 25 C’de inkübasyona bırakılan petrilere sayımlar alınıp sonuçlar kaydedilmiştir. Bu analiz sonucunda yıkaması yapılan süpernatanttan enkapsüle olmamış maya sayısı kob/mL olarak belirlenmiştir.

PVA-Protein/PVA-Maya ve PVA/PVA-Maya nanoliflerindeki toplam maya sayısını belirlemek amacıyla 10mg nanolif  rne i 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen çözelti içerisindeki maya salımı için oda sıcaklığında (~25 C) karıştırıcıda 4 saat boyunca çalkalanmıştır. Daha sonra örneklerin seri dilüsyonları hazırlanıp DRBC Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. 4 gün boyunca 25 C’de inkübasyona bırakılan petrilere sayımlar alınıp sonuçlar kaydedilmiştir.

Elektro irme işleminin mayaların canlılığına etkisinin tespiti için maya inoküle edilen PVA çözeltisinden alınan sayım sonuçları ile elektro irme işlemi sonucu elde edilen nanoliflerdeki toplam bakteri sayısı (kob/mL) karışlaştırılarak logaritmik düşüş olup olmadığı incelenmiştir.

Enkapsülasyon verimi (%EV) [9] ise nanoliflerdeki toplam maya sayısıyla, nanoliflere yapılan yıkama işlemi sonucunda elde edilen enkapsüle olmamış maya sayıları karışlaştırılarak hesaplanmıştır. Bu aşamadaki bütün analizler iki paralel ile gerçekleştirilmiştir.

Enkapsülasyon verimliliği şu formül ile hesaplanmıştır;

$$\%EV = \left(\frac{a-b}{a} \right) \times 100 \quad (\text{Eş. 3.1})$$

Eşitlik 3.1’ de a, PVA çözeltisindeki maya sayısını, b ise hibrit nanolifteki toplam maya sayısını ifade etmektedir.

Elektroegirme prosesinden elde edilen hibrit nanoliflerden alınan toplam maya sayılarıyla, yıkama işlemi yapılan hibrit nanoliflerden elde edilen enkapsüle olmamış maya sayıları karşılaştırarak enkapsülasyon verimliliği hesaplanmıştır. Bu aşamada yapılan tüm analizler iki paralel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon verimliliğinde kullanılan formül Eşitlik 3.1’de verilmiştir.

3.2.11. Sindirim Sistemi Simülasyonu (İn-vitro)

Uygulanan elektroegirme yönteminde kullanılan protein koaksiyel kaplama işleminin mayaları sindirim sistemi koşullarına karşı daha dirençli hale getirip getirmediği araştırılmıştır. Sindirim sistemi simülasyonunda ağız, mide ve bağırsak ortamları taklit edilerek Minekus ve arkadaşlarının [50] *in vitro* sindirim modelinin modifikasyonu ile hazırlanan SSF (Simulated Salive Fluid, Simüle Ağız Sıvısı), SGF (Simulated Gastric Fluid, Simüle Mide Sıvısı), SIF (Simulated Intestinal Fluid, Simüle Bağırsak Sıvısı) ‘nin bileşenleri kullanılmıştır. İn vitro analizi boyunca hazırlanan tüm çözeltiler günlük ve taze olmakla birlikte buz üzerinde tutulmuştur.

3.2.11.1. Pepsin Enzimi Aktivite Testi

Çalışma kapsamında *in vitro* analiz öncesinde kullanılan enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Pepsin enzimi aktivitesi için hemoglobin substrat olarak kullanılmıştır. Pepsin çözeltilerinin konsantrasyonları sırasıyla 0,01-0,02-0,03-0,04 ve 0,05 mg/mL olarak hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için deney tüplerine kör ve test örnekleri de hazırlanmıştır. Kör ve test örnekleri tüplerine 5 mL hemoglobin çözeltisi (%2,5) konulduktan sonra tüpler 37°C inkübatörde 10 dakika bekletilmiştir ve ardından test

tüpüne 1 mL enzim çözeltisi eklenip vortekslenerek 10 dakika daha 37°C inkübatörde bekletilmiştir.

Analizin devamında kör ve test tüplerine 10'ar mL %5'lik trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) eklenerek kör örnek tüpüne 1 mL enzim çözeltisi eklenmiştir. Tüpler vortekslenerek 37°C inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 6000 rpm de 30 dakika santrifüj edilerek hemoglobinin çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra kör ve test örnekleri 0,45 µm şırınga filtreden geçirilerek kuvars küvetlere alınmıştır. Her bir filtre edilmiş örnek, 280 nm'de havaya karşı spektrofotometrede absorbans değerleri kaydedilmiştir [51].

Hesaplama için kullanılan formül aşağıda verilmiştir;

$$\text{Ünite/mg enzim} = \frac{(A_{280} \text{ TEST} - A_{280} \text{ KÖR})(df)}{(10)(1)(0,001)} \quad (\text{Eş. 3.3})$$

Eşitlik 3.3'de df, seyreltme faktörü;10, denemedeki inkübasyon süresi (dk); 1: eklenen enzim miktarı (mL); 0,001, sabit (Tanıma göre, 37°C sıcaklıkta ve pH değeri 2'de bir ünite enzim, bir dakikada ΔA280 değerinde 0,001'lik bir değişime yol açmaktadır.)

3.2.11.2. Tripsin Enzimi Aktivite Testi

Tripsin enziminin aktivite testi, p-toluene-sulfonyl-L-arginin metil esterinin (TAME) 247 nm'deki (pH=8,1) kinetik olarak ölçümüne dayanmaktadır. 25 °C'de (pH=8,1) dakikada 1 µmol TAME'nin hidrolizi, 1 ünite enzim aktivitesi ile gerçekleştirilebilmektedir.

Pankreatin çözeltileri sırasıyla 0,25, 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kör ve test örnekler de kuvars küvetlere alınmıştır. Kör örneğin kuvars küveti içerisine 2,6 mL Tris-HCl tamponu (pH 8,1) ve 300 µL substrat (10 mM TAME) alınıp karıştırılmıştır ve 4dk boyunca 25°C'ye gelmesi için inkübatörde bekletilmiştir. Üzerine 100 µL 1 mM HCl eklenen kuvarsların 247 nm'de 10'ar saniye aralıklarla 5 dakika boyunca absorbans değerleri kaydedilmiştir. Test örnekleri için de

küvetin içerisine 2,6 mL Tris-HCl tamponu (pH 8,1) ve 300 µL substrat (10 mM TAME) alınıp karıştırılmış ve 25°C'ye gelmesi için 4 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Üzerine 100 µL enzim konularak 10'ar saniye aralıklarla 247 nm de absorbans değerleri alınmıştır [51].

Hesaplama için kullanılan formül aşağıda verilmiştir;

$$\text{Ünite/mg enzim} = \frac{(A_{247} \text{ TEST} - A_{247} \text{ KÖR})(1000)(3)}{(540 * X)} \quad (\text{Eş. 3.4})$$

Eşitlik 3.4. ΔA₂₄₇: Lineer eğrinin eğimi (absorbans/dakika), 540: TAME'nin 247 nanometredeki molar sönmüleme katsayısı, 3: reaksiyon karışımının hacmi (mL), X: reaksiyon karışımındaki pankreatinin ya da tripsinin miktarı (mg)

3.2.11.3. İn Vitro Analizinde Kullanılan Kimyasal ve Enzimlerin Hazırlanışı

In vitro sindirim sistemi simülasyonunda, analiz için izlenilen yol ağız, mide ve bağırsak şeklinde devam etmektedir.

Bu analizde sırasıyla her bir sindirim ortamı için ayrı sıvılar ve enzimler hazırlanmaktadır. Sırasıyla falkon tüplere hazırlanan çözeltiler ve enzimler şu şekildedir;

- SSF (Simulated Salive Fluid, Simüle ağız sıvısı);

1.5 mmol/L CaCl ₂ (H ₂ O) ₂
0.06 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃
0.15 mmol/L MgCl ₂ (H ₂ O) ₆
13.6 mmol/L NaHCO ₃
3.7 mmol/L KH ₂ PO ₄
15.1 mmol/L KCl

- SGF (Simulated Gastric Fluid, Simüle Mide Sıvısı);

0.15 mmol/L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$
0.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
0.1 mmol/L $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$
25 mmol/L NaHCO_3
0.9 mmol/L KH_2PO_4
6.9 mmol/L KCl
47.2 mmol/L NaCl

- SIF (Simulated Intestinal Fluid, Simüle Bağırsak Sıvısı);

0.6 mmol/L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$
0.33 mmol/L $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$
85 mmol/L NaHCO_3
0.8 mmol/L KH_2PO_4
6.8 mmol/L KCl
38.4 mmol/L NaCl

- Pepsin Enzimi Hazırlanışı;

Mide fazında 2000 U/mL aktivitesine göre hesaplanan miktar kadar pepsin tartılıp falkon tüpte 10 mL'ye ultra saf su ile tamamlanıp çözününceye kadar vortekslenmiştir.

- Pankreatin Enzimi Hazırlanışı;

Bağırsak fazında 100 U/mL aktivitesine göre hesaplanan miktar kadar pankreatin falkon tüpe tartılıp üzerine bağırsak sıvısı (SIF) da ilave edilmiştir. Tüp 25 mL'ye ultra saf su ile tamamlanıp çözününceye kadar vortekslenmiştir.

- Safra Tuzu Hazırlanışı;

Bağırsak fazında falkon tüpüne 1.997 gram safra tuzu tartılarak ultra saf su ile 25 mililitreye tamamlandıktan sonra vortekslenmiştir.

3.2.11.4. *In Vitro* Analizi Yapılışı

Sindirim işlemi için PASP, SK ve SJ kaplı koaksiyel nanoliflerden 50mg falkon tüplere alınarak üzerine 25 µL 0.3 M $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ eklenip 4 mL SSF ile karıştırılmıştır. Karıştırılmış örneklerin pH değeri 7 olacak şekilde ayarlanarak ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kör örnek olarak proteinsiz olarak pva-maya nanolifleri aynı şekilde ayarlanmış, ayrıca mayaların sindirimdeki salımını incelemek amacıyla 1 mL maya çözeltisi de aynı adımlardan geçecek şekilde örnekler arasına alınmıştır. Bu doğrultuda toplam 5 örnek 37 °C'de, 100 rpm'de, 2 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletilerek ağız sindirimi yapılmıştır. Minekus ve ark. tarafından yapılmış olan sindirim yöntemindeki ağız sindiriminde rol oynayan α -amilaz enzimi nanolif örneklerdeki nişasta miktarı yok denecek kadar az olduğundan kullanılmadan devam edilmiştir. Ayrıca Minekus ve arkadaşları [50] tarafından yapılmış olan sindirim sistemi yönteminin temel alınarak modifiye edildiği bir başka araştırma olarak Mackie ve arkadaşlarının [52] çalışması örnek gösterilebilir. 2 dakika sonunda her örnekten dilüsyon sıvıları hazırlanıp DRBS Agar ile petrilere yüzeye yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır.

Ağız sindirimindeki örnekler alındıktan hemen sonra süre kaybedilmeksizin mide sindirimi ile devam edilmiştir. Örnekler üzerine 5 µL 0.3 M $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ eklendikten sonra 8 mL SGF ile karıştırılmıştır. Karışan örnekler pH' ı 3 olacak şekilde 6 M HCl ile ayarlanmıştır. Sonrasında üzerlerine 1 mL pepsin enzim çözeltisi eklenip son hacim 20 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de, 100 rpm'de, 2 saat süresince mide sindirimine bırakılmıştır. Mide sindirimi boyunca her bir örnekten 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda örnekler alınıp dilüsyon sıvıları hazırlanarak DRBC Agar ile petrilere yüzeye yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır.

Bağırsak sindirimine mide sindiriminden hemen sonra vakit kaybetmeksizin başlanmıştır. Mide sindirimine uğramış örnekler 11 mL SIF ile karıştırılıp pH değeri 7 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanmıştır. Örnekler üzerine 40 µL 0.3 M $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ eklendikten sonra 160 mM safra çözeltisi de eklenerek karıştırılmıştır. Her bir örneğe 5 mL pankreatin çözeltisi de eklendikten sonra son hacim 40 mL olana kadar ultra saf su ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan örnekler çalkalamalı inkübatöre 100 rpm’de, 37 °C’de 2 saat boyunca sindirime bırakılmıştır. Bağırsak sindirimi boyunca her 5 örnekten 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda örnekler alınıp dilüsyon sıvıları hazırlanarak DRBC Agar ile petrilere yüzeye yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Minekus ve arkadaşları [50] tarafından önerilen sindirim yönteminde analiz sonu enzim reaksiyonlarının durdurulması amacı ile Pefabloc enzim inhibitörü ekleme kısmını bu çalışma doğrultusunda modifikasyona göre ihtiyaç olmadığından yok sayılmıştır.

Analiz boyunca yapılan ekimler 25°C’de 4 gün boyunca inkübatöre bırakılmıştır. Süre sonunda ekim sonuçları kaydedilmiştir. Sindirim sistemi analizi boyunca gerçekleştirilen tüm analizler ikili paralel şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Protein Kaplı Probiyotik Liflerin Depolama Analizi

Bu analiz kapsamında elektroeğirme yöntemiyle yapılan PVA-Maya/PVA-PASP, PVA-Maya/PVA-SK, PVA-Maya/PVA-SJ ve kontrol grubu olan PVA-Maya/PVA-PVA nanoliflerinin depolama koşullarının canlılığa etkisi araştırılmıştır. Depolama analizi koşullarında sıcaklıklar 4°C ve 25°C olarak belirlenmiştir ve nanoliflerdeki mayaların zamana bağlı canlılıklarındaki değişimleri incelenmiştir. Depolanan nanoliflerin 1 ay süresince periyodik olarak canlılık analizleri yapılmıştır.

Depolanan nanolifler yapıldığı gün dahil olmak üzere 1 aylık süre boyunca 5’er kez 7 gün tekrarlarla mikrobiyolojik ekimleri yapılmıştır. Nanolifler kontrol, PASP’lı, SK’lı ve SJ’li olarak 4 çeşit olup her bir mikrobiyolojik ekim analizleri iki paralel halinde çalışılmıştır. Ekimi yapılan numunelerin 25°C’de inkübatörde 4 günlük bekleme süresi sonucunda sayım sonuçları not edilmiştir. Sonuçları kaydedilen analizin % Canlılık oranı hesaplanıp kaydedilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel Analiz

Ortalama nanolif çapları, elektriksel iletkenlik, viskozite, %EV (Enkapsülasyon Verimliliği), *in vitro* sindirim sistemi simülasyonu ve FTIR analizi etkisinin araştırılması için yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizi için Tukey ve Duncan' ın çoklu karşılaştırma testleri ile birlikte tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. İstatistik analizi SPSS yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı fark $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Elektroegirme Çözeltilerinin Bileşimlerinin Belirlenmesi

Hibrit nanoliflerin eldesi için seçilen, biyouyumluluğu, protein yapışma eğiliminin düşük olması ve düşük toksisitesi nedeniyle suda çözünür sentetik bir polimer olan PVA'nın PASP, SK ve SJ proteinleriyle çözeltileri hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan PVA-protein çözeltilerinin farklı konsantrasyonlardaki yüzey gerilimi, viskozite (mPa·s) ve elektriksel iletkenlik (mS/cm) bakılmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan optimum konsantrasyonlar (a/h) belirlenmiştir. Başarılı lif yapısı olarak nitelendirilen, tek düze boyutlara sahip ve damlama kusuru olmayan nanoliflerin üretimi için çözeltilerin PVA (3-10% w/w), PASP (5-30 % w/w), SK (5-20 % w/w) ve SJ (5-20 % w/w) içerikleri değiştirilerek ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanolifler morfolojik özellikleri ve boyutları açısından benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Karakterizasyon sonuçlarının ışığında nanolif üretimi için en uygun PVA-PASP, PVA-SK ve PVA-SJ çözeltisi için bileşimde %6 PVA ve % 5 protein içermesi gerektiğine karar verilmiştir.

Brookfield viscometer cihazı ve SC4-18 spindle ile yapılan viskozite analizinde protein/PVA çözeltilerinin kayma hızına (1/s) karşılık kayma gerilimi (N/m²) grafiği çizdirilip eğime göre viskozitesi hesaplanarak bulunmuştur. Bu değerler kapsamında oluşan eğrilerin newtonian akışa yönelik olduğu belirlenmiştir (Ek-B).

Nanoliflerin dış katmanında yapılan elektriksel iletkenlik analizi kapsamında pH'ı farklı bir sensörle ölçülen çözeltilerin EC değerleri ölçülmüştür. Alınan ölçümler, pH için oda sıcaklığında (yani 293.15 K) yapılmıştır.

4.2. Farklı Proteinler ile Kaplanmış Nanoliflerde SEM Görüntüleri ve Boyut Dağılımı

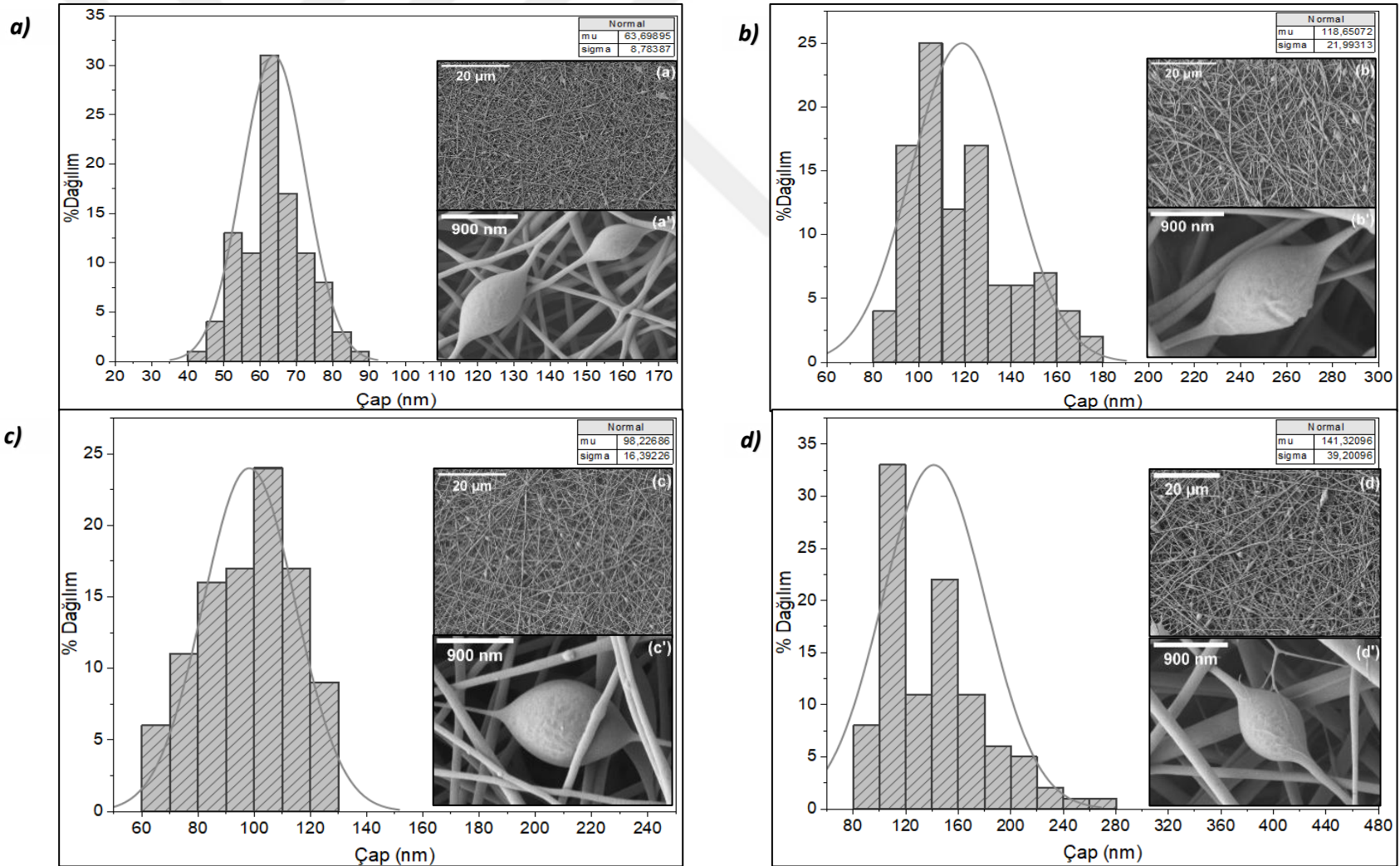
Optimum konsantrasyonların seçilmesi sonucu hazırlanan çözeltilerden oluşturulan nanolifler boyut analizi için SEM-EDX cihazında görüntülenmiştir. Alınan görüntülerdeki liflerin boyutları ImageJ programında incelenerek sonuçlardan elde edilen verilerin OriginLab 2023 Programında işlenmesi ile %Dağılım grafikleri

izdirilmiştir. SEM-EDX cihazından elde edilen görüntüler, çizdirilen grafikler ve elde edilen liflerin boyut dağılımları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4. 1. Elektroeğirme Sistemi ile üretilen Nanoliflerin Boyut Dağılımı

	N	Ortalama	Std. sapma	Std. hata	Ortalama için %95		Minimum	Maksimum
					güven aralığı			
					Alt sınır	Üst sınır		
PVA	2	117,0150	75,41294	53,32500	-560,543	794,5734	63,69	170,34
PASP	2	167,3650	68,89341	48,71500	-451,617	786,3478	118,65	216,08
SK	2	145,0100	66,17105	46,79000	-449,513	739,5333	98,22	191,80
SJ	2	155,8750	20,58388	14,55500	-29,0638	340,8138	141,32	170,43
Toplam	8	146,3163	50,74459	17,94092	103,8927	188,7398	63,69	216,08

Elektroeğirme sistemiyle elde edilen kompozit nanoliflerin boyut dağılımının ANOVA analizi sonucu istatistiksel değerleri PVA $117,02 \pm 75,41$ nm, PASP $167,37 \pm 68,89$ nm, SK $145,01 \pm 66,17$ nm , SJ $155,86 \pm 20,58$ nm olarak bulunmuştur. Tüm nanoliflerin ortalaması $146,32 \pm 50,75$ nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 1. Nanoliflere ait boyut dağılımları (nm) a) PVA-Maya/PVA-PVA Kontrol Grubu b) PVA-Maya/PVA-PASP c) PVA-Maya/PVA-SK d) Maya/PVA-SJ

Tablo 4. 2. Nanoliflerdeki Boyut Farklılığının İstatistiksel Analizi

	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Gruplar arası	2789,378	929,793	,244	,862
Grup içi	15235,718	3808,929		
Toplam	18025,096			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

4.3. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde FTIR Analizi

Nanokompozit liflerin kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla, çalışma kapsamında elde edilen PVA-Maya/PVA-PVA, PVA-Maya/PVA-PASP, PVA-Maya/PVA-SK, PVA-Maya/PVA-SJ hibrit liflerden ve ayrıca PVA, PASP, SK ve SJ'den toz halde alınan örneklerden oluşan veri setinde toplamda 8 adet örneğin FTIR-ATR analizi gerçekleştirilmiştir. Toz ve nanokompozit lif haldeki örneklerin FTIR spektrumları, özgüllüğü ve temel bant titreşimine duyarlılığı nedeni ile orta kızılötesi (MIR) bölgesinde olup, 4000 ile 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında toplanmıştır. Nanokompozit liflerin ve toz numunelerin FTIR-ATR spektrumları Şekil.'de verilmiştir. Ayrıca protein örneklerin parmak izi bölgesi olarak bilinen ve tamamen moleküle özgü, molekül yapısından etkilendiğinden bu isimle çağırılan IR bölgesi 1200 cm^{-1} - 700 cm^{-1} dalga sayısı aralığı gösterilmektedir.

Toz haldeki örneklerin, koaksiyel nanoliflerin bileşiminde kullanılan bileşenlerin kimyasal yapı elemanları arasındaki etkileşimleri incelemek amacıyla yapılan FTIR analizinde aynı zamanda nanoliflerin dış kapsülasyonunu sağlayan PVA-protein çözeltileri 90°C'de 30 dk boyunca ısıya maruz bırakılmıştır. Böylece

ısıtma işlemi ile PVA-protein bileşimleri arasında çapraz bağlanma oluşup elde edilen liflerin stabilitesinde bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

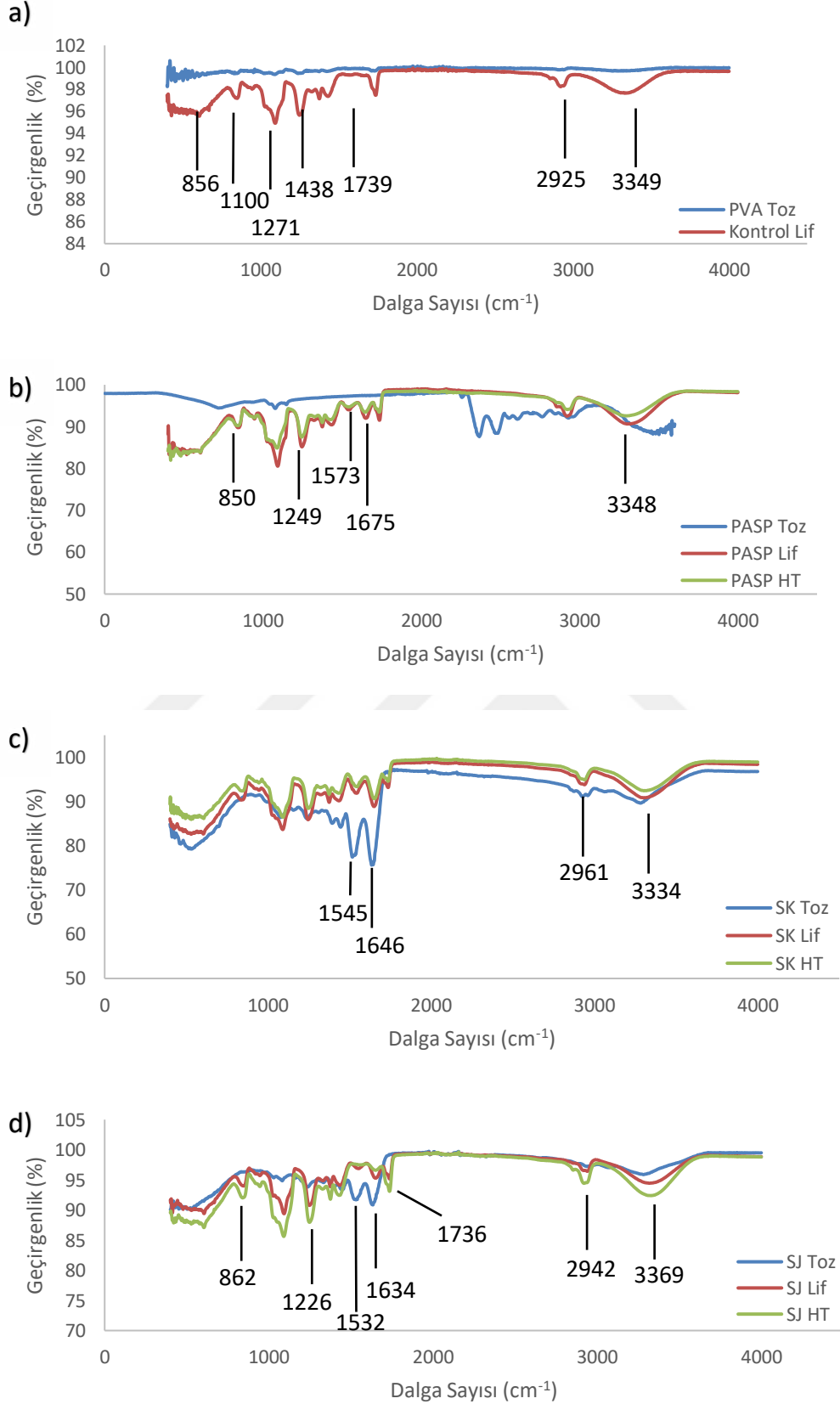
Şekil 4.2 'de (a) sunulan FT-IR analizi sonucunda saf PVA'nın [53] zirve yaptığı piki belirleyen 1271 cm^{-1} 'deki tepe noktası ile PVA kontrol lifindeki 1251 cm^{-1} 'deki tepe noktası hemen hemen eşit bir spekturuma sahip olduğu görüntülenmiştir. PVA kontrol grubu nanokompozit nanoliflerdeki 3349 cm^{-1} civarında pik veren 3000 cm^{-1} ve 3639 cm^{-1} aralığındaki geniş bant, molekül içi ve moleküller arası H bağlarından uzanan hidroksil gruplarının [54] O – H gerilme titreşimlerinin varlığını göstermektedir [43]. PVA kontrol nanoliflerinin 2925 cm^{-1} alkil gruplarının C – H gerilmesini göstermektedir [55]. 1739 cm^{-1} 'deki pik karbonilin asetat asetat grubundan gerilmesiyle ilişkili olarak [56] C-O çift bağını göstermektedir [55]. 1438 cm^{-1} PVA'da CH_2 bükülmesi [43] bir diğer tabirle CH_2 gerilme titreşimini [55] vermektedir. 1100 cm^{-1} PVA'da kalan asetat gruplarının C-O-C gerilmesini, 856 cm^{-1} piki C-C bükülme titreşimlerini vermektedir [55].

Şekil 4.2 'de (b) peynir altı suyu proteini (PASP) için FTIR spektrumları gösterilmektedir. 850 cm^{-1} 'deki geniş pik, S-S disülfid bağlarının varlığını göstermektedir. 1248 ile 1437 cm^{-1} aralığındaki üçüncü tip amid yapısı tepe noktaları, C–N'nin esneyen bağlanmasına ve N–H'nin bükülmesine bağlanmaktadır. 1573 cm^{-1} bölgesindeki ikinci tip amid yapı pikleri, proteinlerin ikincil yapısıyla ilgili olarak %60' ını N-H bükme gruplarından ve %40'ını diğer C-N germe gruplarından oluştuğunu göstermektedir. Birinci tip amid yapısı, 1675 cm^{-1} bölgesinde bir tepe noktası gösteren, proteinlerin ikincil yapısının tanımlanmasında en önemli spektrum durumundadır tanısı konulmuştur. Yoğunluğun 3642 cm^{-1} 'e kadar artması, hidrojen bağlarının sayısındaki artışa bağlanabilmektedir. Bu nedenle, bu hidrojen bağları, elektrosprey işlemi sırasında *Saccharomyces cerevisiae* yüklü elektrosprey partiküllerinin oluşumuna müdahale edebilir olarak düşünülmüştür. Protein ile oluşan yapıların hidrojen bağları ile stabilize edilmiş olması muhtemeldir denmektedir. Peynir altı suyu proteini izolatının FTIR spektrumu, daha önce bildirilen çalışmalarla da uyum içinde olduğu gözlemlenmiştir [57].

Şekil 4.2 'de (c) Sodyum kazeinat/PVA-Maya nanoliflerinin FTIR spektrumları literatüre uyumlu bir şekilde gözlemlenmiştir. –CONH– (amid I) 1646 cm^{-1} 'de, –NH–

(amid II) 1545 cm^{-1} 'de ve $-\text{CH}-$ ile birlikte karakteristik absorpsiyon bandını göstermektedir. SK/PVA elektrospun numunelerinde kazeinin 3321 cm^{-1} bandı, karışımdaki kazein içeriğindeki artışla birlikte, 1646 ve 1545 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandının yoğunlukları artmıştır, bu da SK/PVA elektrospun nanolifli matta kazeinin varlığını düşündürmektedir. SK/PVA karışımı IR spektrumunda, 3604 ve 2980 cm^{-1} arasında gözlenen geniş bant, N-H gerilmesiyle örtüşen moleküller arası ve moleküller arası hidrojen bağlarından uzanan O-H ile bağlantılıdır denilmiştir. Pik kademeli olarak genişletilebilmektedir ve karışımdaki PVA içeriği artırılarak daha düşük dalga sayısına kaydırılabilmektedir. Kazein/PVA nano lifli mat, gözenekli liflerde kazein ve PVA'nın varlığını gösteren hem kazein hem de PVA'nın karakteristik bantlarını göstermiştir [58]. Ayrıca sodyum kazeinatın FTIR ölçümlerine bakıldığında molekülün OH bağıyla ilgili olan pik 3136 cm^{-1} ve 3673 cm^{-1} aralığındaki güçlü bir bant olarak görülmektedir. Sodyum kazeinatların rastgele sarmal yapısından dolayı, geniş moleküller arası hidrojen bağı oluşturabilir olduğu bilinmektedir. Devam eden zirvelerden 2961 cm^{-1} dalga sayısındaki bant, alkil CH gerilme titreşimini göstermektedir. 1636 cm^{-1} ve 1517 cm^{-1} 'deki bantlar 1653 cm^{-1} ve 1546 cm^{-1} 'deki kayma ile ilişkilendirilmiştir, sebepleri sırasıyla amid I CO gerilme titreşimi ve amid II N-H bükülme / C-N gerilme titreşimi olarak adlandırılmıştır [55].

Sığır jelatinin karakteristik absorpsiyon bantlarının FTIR analizinden çıkarılan sonuçlarında gözlemlenen (Şekil 4.2, (d)) 3286 cm^{-1} ve 3369 cm^{-1} N-H (tekli bağ) sekonder amidin gerilmesine bağlı pikler kayda alınmıştır [56]. Ayrıca 1634 cm^{-1} 'de amid I C=O (çift bağ) esneme titreşimlerine bağlı bir zirve elde edilmiştir. 1532 cm^{-1} amid II C-H esneme ve N-H esneme titreşimleri, 1226 cm^{-1} amid III N-H eğilme titreşimlerine bağlı olarak çıkan pikler olduğu belirlenmiştir [54]. PVA/SJ nanoliflerinin FTIR analizi sonucu oluşturduğu tepe noktaları incelendiğinde 1634 cm^{-1} 'den 1653 cm^{-1} 'e olan kayma amid I, 1532 cm^{-1} 'den 1552 cm^{-1} 'ye olan kayma amid II, 1226 cm^{-1} 'den 1249 cm^{-1} 'ye olan kayma amid III gruplarının PVA ve sığır jelatini arasında moleküller arası etkileşimler olduğunun kanıtı olarak öne sürülmüştür [59]. 3356 cm^{-1} 'de pik veren PVA'dan yola çıkarak 3335 cm^{-1} 'ye olan kayma, absorpsiyon bandının sığır jelatini ilavesi ile bu hale geldiğinin bir göstergesi olmaktadır. Bunlarla birlikte 2942 cm^{-1} 'de pik veren PVA/SJ nanolifinin alkil gruplarına bağlı olarak C-H gerilmesinden kaynaklanan bir değişim olduğu gözlenmektedir. 1736 cm^{-1} 'deki pik karbonilin asetat grubundan gerilmesiyle ilişkilendirilmiştir. 1093 cm^{-1} 'deki zirve



Şekil 4. 2. Kompozit Nanoliflerin FTIR-ATR Spektrumları ve Çapraz Bağlanmanın Etkisinin Isı Uygulanması/ Toz numune/ Kompozit Nanolif Şeklinde İncelenmesi, a) Kontrol grubu (PVA/PVA-Maya), b) PASP/Maya, c) SK/Maya, d) SJ/Maya

C-O bağının esnediğini [56]/ikincil alkollü grupların C-O gerilmesine veya bir CH₂ eğilme titreşiminin sonucu [60] olarak görülmüştür. 946 cm⁻¹ ve 849 cm⁻¹'daki bantlar, düzlem dışı olan O-H ve C-H tepe noktalarına bağlı olduğu söylenmiştir [56]. Toz haldeki sığır jelatinin yapısıyla ilgili tepe noktaları, çalışmada elde edilen PVA/SJ nanoliflerinin tepe noktaları ile hemen hemen aynı noktalarda gözlemlenmiştir.

4.4. Elektroeğirme İşleminin Probiyotiklerin Canlı Kalma Oranlarına Etkisi

Elektroeğirme prosesi ile mayaların protein dış katmanlı koaksiyel nanoliflere enkapsülasyonunda sistem parametreleri optimum olarak belirlenmiştir. Maya inoküle edilmiş PVA çözeltisi sisteme dış katmanında sadece PVA çözeltisi bulunacak şekilde koaksiyel iğne ucundan her şırınga sistemi de 0,002 mL/sa hızda beslenmiştir. Elektro eğirme sistemi 25 kV 'de iğne ucu ile nanoliflerin toplandığı plaka arası 7cm olacak şekilde kullanılmıştır. Hem proses öncesi çözeltiden hem de proses sonrası nanoliflerden alınan örneklerden sayım sonuçları kaydedilmiştir. Bu aşamada elektroeğirme işleminin mayaların canlılığına olan etkisi gözlenmiştir.

Tablo 4. 3. Elektroeğirme İşleminin Mayaların Canlılığına Etkisi

	Canlılık Sonuçları (log,kob/mL)	
	Elektroeğirme Çözeltisi	Kompozit Nanolif
PVA/PVA-Maya	11,73 ± 0,05	10,37 ± 0,20
PVA/PASP-Maya	11,73 ± 0,05	8,48 ± 0,16
PVA/SK-Maya	11,73 ± 0,05	7,21 ± 0,21
PVA/SJ-Maya	11,73 ± 0,05	9,57 ± 0,05

Sonuçlar iki paralelin ortalaması ± SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p > 0.05).

Çalışmadaki bu analizde, elektroğirme çözeltisindeki ve proses sonucu elde edilen hibrit nanoliflerdeki sayım sonuçları Tablo 4.3'te listelenmiştir. Alınan tüm sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir.

Tablodaki listelenen sayım sonuçları incelendiğinde, PVA/PVA-Maya nanoliflerinde elektroğirme işlemi sonucu canlılıkta ~ 1 log (kob/mL) biriminde azalma olduğu görülmektedir. Ancak literatürdeki çalışmalarda bu seviyedeki ve üstündeki düşüşler dahi kabul edilebilir görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında tercih edilen parametrelerle yapılan elektroğirme işleminin mayaların canlılığını ciddi anlamda etkilemediği ve probiyotik enkapsülasyonu amacıyla uygulanabilir olduğu kabul edilmiştir. PVA/PASP-Maya nanoliflerinde ise bakteri canlılığında ~ 2 log (kob/mL) azalma tespit edilmiştir. PVA/SK-Maya nanoliflerinde ise bakteri canlılığında ~ 3 log (kob/mL) azalma tespit edilmiştir. PVA/SJ-Maya nanoliflerinde ise bakteri canlılığında ~ 2 log (kob/mL) azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında kullanılan proteinlerin ve çözeltilerin, mayalar üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığı ortaya konulmuştur. PVA/Protein-Maya nanoliflerinde ~ 9 log (kob/mL) düzeyinde canlı mikroorganizmanın bulunması, kurulan koaksiyel iğne uçlu elektroğirme sistemi ile mayaların probiyotik enkapsülasyonunda kullanılabilirliğini göstermektedir.

4.5. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Enkapsülasyon Verimliliği

Elektroğirme prosesinde kullanılan çözeltilerin etkinliğinin en iyi şekilde gözlenebilmesi için mayaların nanoliflerin yüzeyine immobilize halde değil nanolif içerisine koaksiyel halde enkapsüle olmaları gerekmektedir. Bu doğrultuda enkapsülasyon verimliliği nanoenkapsülasyon yöntemlerinin her birinde en önemli parametrelerden biri olarak görülmektedir.

Yapılan çalışma kapsamında, enkapsüle olmamış mayaların bulunması amacıyla prostenden elde edilen nanoliflerin yıkanması sonucu yapılan ekimlerle, nanoliflerdeki toplam maya sayısını bulmak amacıyla yapılan ekimlerden alınan toplam maya sayısı sonuçları %EV hesaplanmasında kullanılmıştır.

Tablo 4. 4. % Enkapsülasyon Verimliliği

Kompozit Nanolifler	%EV
PVA/PVA- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
PVA/PASP- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98,46
PVA/SK- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,71
PVA/SJ- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,98

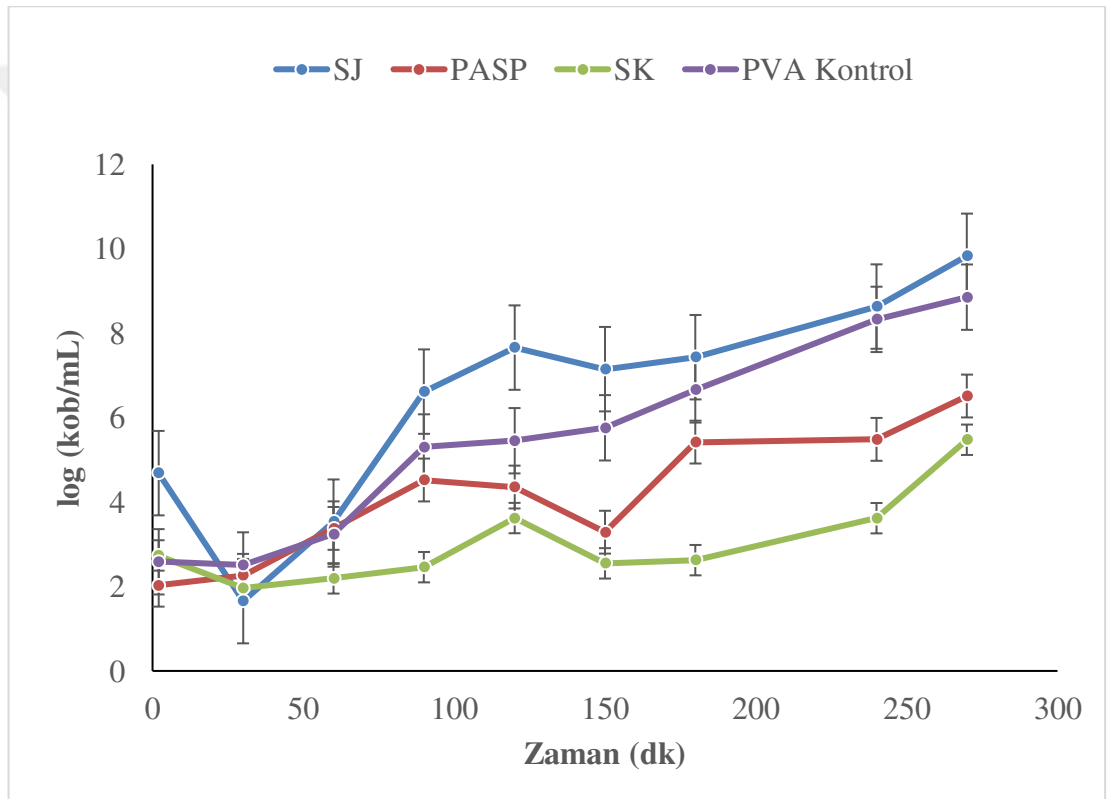
Bu analizde alınan sayım sonuçları Tablo 4.4’de verilmiştir. Alınan tüm sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir.

Sayım sonuçları incelendiğinde hem PVA-PVA/PVA-Maya hem de PVA-Protein/PVA-Maya nanoliflerinin yüksek enkapsülasyon verimliliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Farklı proteinlerle yapılan nanoliflerle kontrol grubu nanoliflerin enkapsülasyon verimlilikleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. PVA/PASP-Maya’nın daha düşük % EV’ye sahip olmasının nedeni, PASP’ın suda çözünür yapısından dolayı olduğu, hibrit nanoliflerde yıkama sırasında da düşük miktarda da olsa salımın gerçekleşmiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca diğer protein kaplı nanoliflerinde oransal veya konsantrasyon olarak bir fark olmamasına rağmen suda çözünürlüğü PASP’a göre daha zor olduğundan daha yüksek %EV sağlamış olabilir düşüncesi mevcuttur.

4.6. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Sindirim Sistemi Simülasyonu ve Salım Kinetikleri

Ağız, mide ve bağırsak ortamlarının simüle edildiği *in vitro* sindirim simülasyonu analizinde mayaların canlılığında elektroegirme prosesinin matrislerinin etkileri araştırılmıştır (Şekil 4.3).

Simüle edilmiş ağız, mide ve bağırsak ortamlarında yapılan sindirim simülasyonunda ~11 log (kob/mL) başlangıç yüküne sahip olan serbest formdaki mayalar, mide simülasyonunun 120. Dakikasında da baştaki canlılık oranını korumuş bulunmaktadır. Bağırsak simülasyonundan da başarıyla geçen serbest haldeki mayalar log birimlerinde azalma olmadan geçtiğinden, enzimlerden zarar görmediği gözlemlenmiştir. PASP ile kaplı nanoliflerin sindirim simülasyonunda ~11 log (kob/mL) başlangıç yüküne sahip iken ağız simülasyonunda ~3 log (kob/mL) birimlik bir yük açığa çıkmıştır. Bu değer mide sindiriminin 2. saati sonunda her yarım saatte bir alınan ekim sonuçlarına göre ~1'er log (kob/mL) kadar bir artış göstermiştir.



Şekil 4. 3. *In vitro* sindirim sırasında mide ve bağırsak sıvılarına *Saccharomyces cerevisiae* salım kinetiği

Bağırsak simülasyonuna geçildiğinde ilk yarım saatinde ~1 log (kob/mL) birimlik bir azalma gözlemlenirken, 1. saat sonunda ~2 log (kob/mL) birimlik artış ve 2 saatlik süre sonunda ise ~8 log (kob/mL)'luk birime ulaşmış görülmektedir. Bu durumda PASP'ın gastrointestinal koşullarda mayaları koruması ve kontrollü salımın gerçekleştirilmesi adına uygun bir numune olduğu gözlemlenmektedir.

SK ile kaplı nanoliflerin sindirim simülasyonunda $\sim 11 \log$ (kob/mL) başlangıç yüküne sahip iken ağız simülasyonunda $\sim 3 \log$ (kob/mL) birimlik bir yük açığa çıkmıştır. Bu değer mide sindiriminin 2. saati sonunda her yarım saatte bir alınan ekim sonuçlarına göre $\sim 3 \log$ (kob/mL)'lik bir artış göstermiştir. Bağırsak simülasyonuna geçildiğinde ilk yarım saatinde $\sim 1 \log$ (kob/mL) birimlik bir azalma gözlemlenirken, 1.5 saat sonunda $\sim 1 \log$ (kob/mL) birimlik artış ve 2 saatlik süre sonunda ise $\sim 7 \log$ (kob/mL)'luk birime ulaşmış görülmektedir. Bu durumda SK'nın gastrointestinal koşullarda mayaları koruması ve kontrollü salımın gerçekleştirilmesi adına uygun bir numune olduğu gözlemlenmektedir.

SJ ile kaplı nanoliflerin sindirim simülasyonunda $\sim 11 \log$ (kob/mL) başlangıç yüküne sahip iken ağız simülasyonunda $\sim 5 \log$ (kob/mL) birimlik bir yük açığa çıkmıştır. Bu değer mide sindiriminin 2. saati sonunda her yarım saatte bir alınan ekim sonuçlarına göre $\sim 3 \log$ (kob/mL)'lik bir artış göstermiştir. Bağırsak simülasyonuna geçildiğinde ilk yarım saatinde $\sim 1 \log$ (kob/mL) birimlik bir azalma gözlemlenirken, 1.5 saat sonunda $\sim 1 \log$ (kob/mL) birimlik artış ve 2 saatlik süre sonunda ise $\sim 11 \log$ (kob/mL)'luk birime ulaşmış görülmektedir. Bu durumda SK'nın gastrointestinal koşullarda mayaları koruması ve kontrollü salımın gerçekleştirilmesi adına uygun bir numune olduğu gözlemlenmektedir.

Mide simülasyonunun ve sindirim sistemi simülasyonunun sonunda yapılan istatistik analizleri, serbest Maya, PVA/PVA-Maya, PVA/PASP-Maya, PVA/SK-Maya ve PVA/SJ-Maya nanoliflerinden elde edilen dataların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar koaksiyel halde üç farklı protein kaplamanın sindirim sistemindeki avantajını sergilemektedir. Yapılan çalışmada kullanılan koaksiyel iğne uçlu elektroegirme işlemi ile kullanılan solventlerin herhangi bir toksik etkisine maruz kalmadan, mayaların sindirim sistemi koşullarına karşı direnç kazandırılabilceği anlaşılmıştır. Sonuç olarak koaksiyel elektroegirme sisteminde PVA ve protein kullanımıyla sindirim sistemi koşullarına dayanıklı enkapsülasyon materyallerinin üretilabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca aynı sistemle, hazırlanmasında toksik olabilecek solventlerin kullanıldığı polimerlerin bu etkilerinin bertaraf edilerek

avantajlarından yararlanılabileceği yeni enkapsülasyon materyallerinin de üretilebileceği gösterilmiş bulunmaktadır.

Bu analizde alınan sayım sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir. Alınan tüm sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir.

In vitro analizi sırasında proteinlerin mide ve bağırsakta ayrı iki şekilde incelenmesi sonucu aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmektedir (Tablo 4.6). Süre, sindirimin bir fonksiyonu olarak ifade edildiği için istatistiksel değerlendirmeler bu duruma göre yapılmıştır. Sindirim analizi parametrelerinden sürenin %95 güven seviyesinde anlamlı olduğu bulgulanmıştır. Mide ve bağırsak koşulları aralarındaki kıyaslamaya göre midedeki anlamlılık seviyesi daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4. 5. *In vitro* sindirim koşullarının süre ile etkisi

		Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Mide* süre	Gruplar arası	83,059	20,765	16,099	,000
	Grup içi	45,143	1,290		
	Toplam	128,202			
Bağırsak* süre	Gruplar arası	45,676	11,419	3,222	,024
	Grup içi	124,040	3,544		
	Toplam	169,716			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 4. 6. *In vitro* sindirim koşullarının protein ile etkisi

		Kareler	Ortalama	F	Anlamlılık
		Toplamı	kare		
Mide* protein	Gruplar	27,311	9,104	3,248	,033
	arası				
	Grup içi	100,891	2,803		
	Toplam	128,202			
Bağırsak* protein	Gruplar	117,346	39,115	26,888	,000
	arası				
	Grup içi	52,370	1,455		
	Toplam	169,716			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

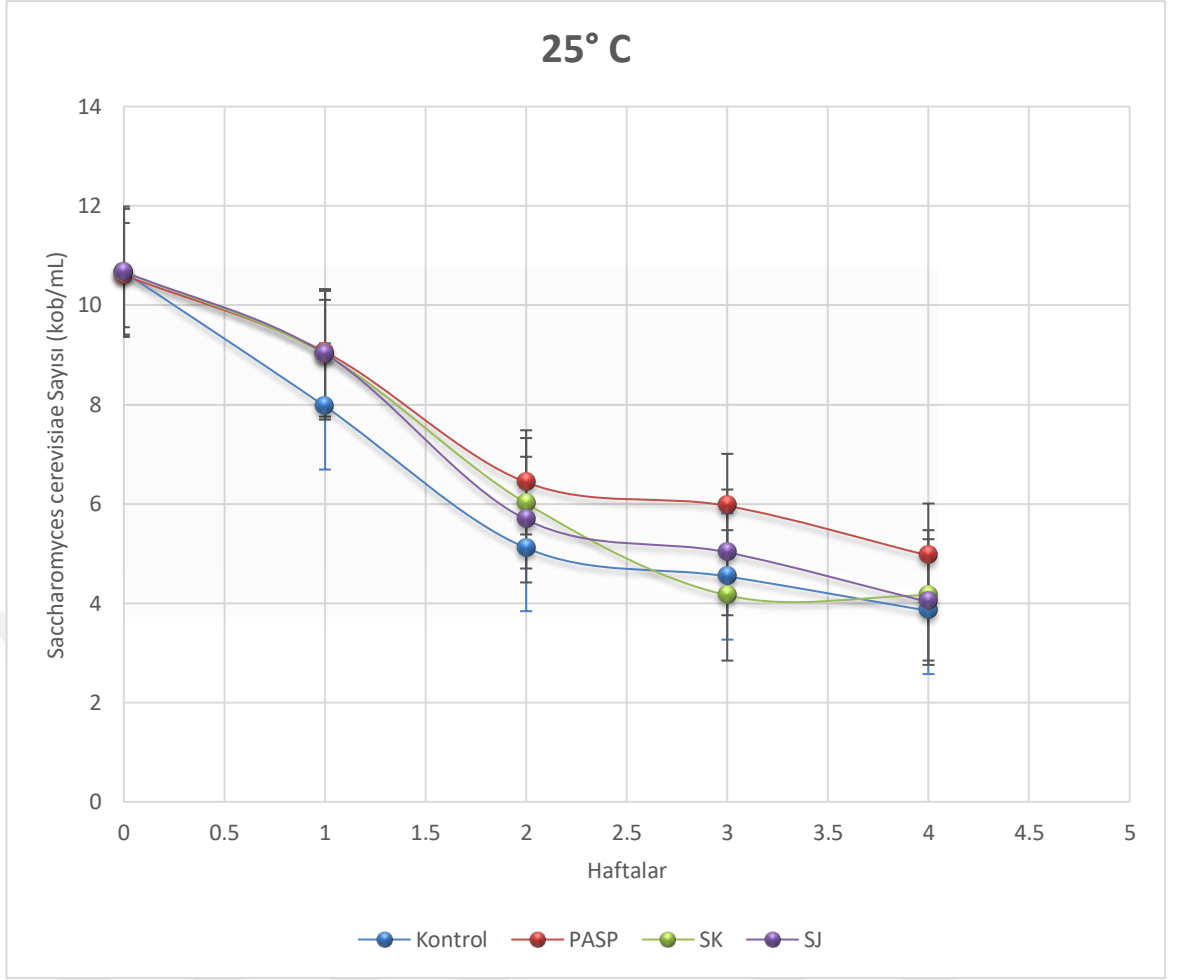
Bu analizde alınan sayım sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir. Alınan tüm sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir.

İn vitro analizi sırasında proteinlerin mide ve bağırsakta ayrı iki şekilde incelenmesi sonucu aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmektedir (Tablo 4.6). Protein, sindirimin bir fonksiyonu olarak ifade edildiği için istatistiksel değerlendirmeler bu duruma göre yapılmıştır. Sindirim analizi parametrelerinden proteinin %95 güven seviyesinde anlamlı olduğu bulgulanmıştır. Mide ve bağırsak koşulları aralarındaki kıyaslamaya göre midedeki anlamlılık seviyesi daha yüksek bulunmuştur.

4.7. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanoliflerde Depolama Koşullarının Canlılığa Etkisi

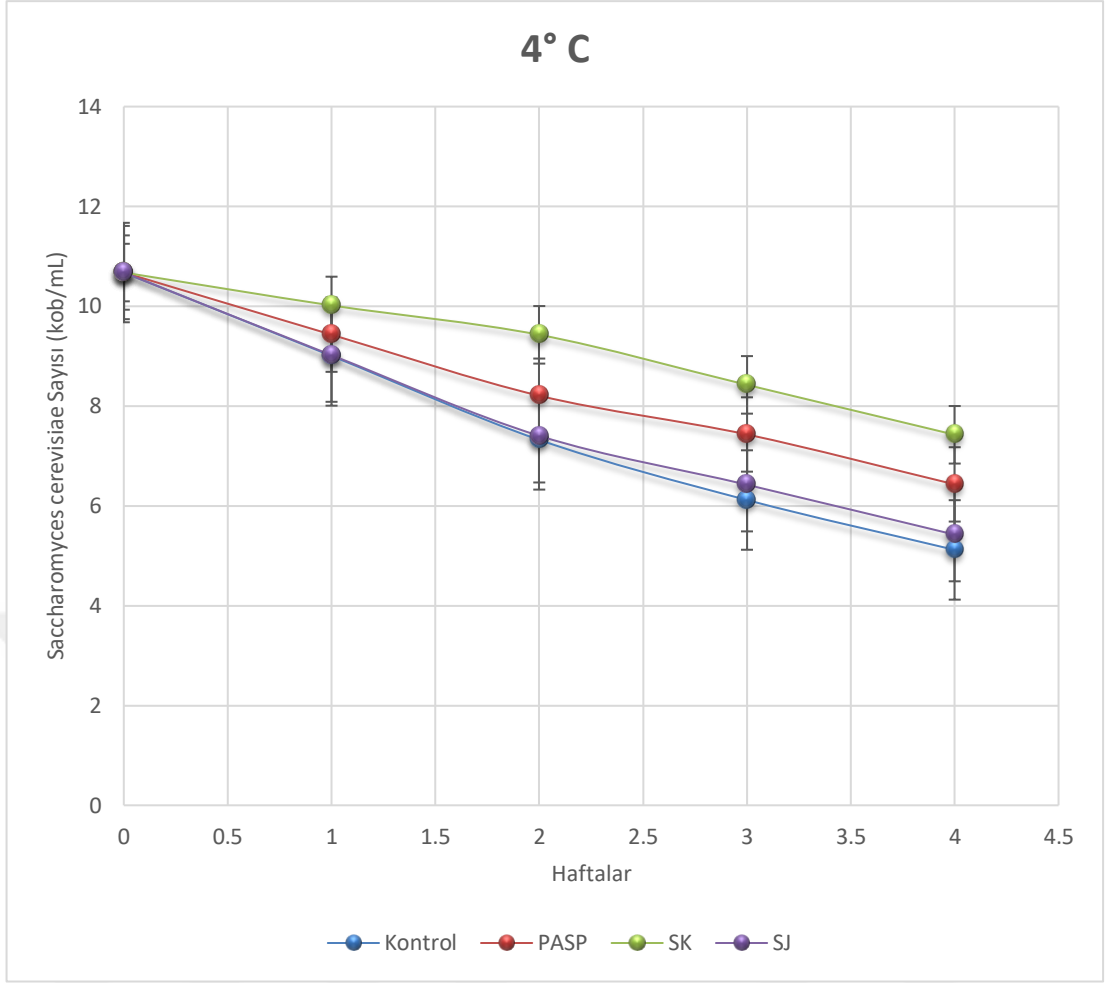
Depolama koşullarının mayaların canlılığı üzerine etkisinin araştırılması için yapılan bu analizde nanolifler 4°C ve 25°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta 1 ay boyunca depolanmıştır. Depolanan nanoliflerin her hafta mikrobiyolojik ekimleri yapıp 25°C’de inkübatörde 4 gün sonunda sayım sonuçları alınarak kaydedilmiştir. Nanoliflerin zamana bağlı maya canlılıklarındaki değişimleri incelenerek depolamadaki en uygun sıcaklık belirlenmiştir.

Nanoliflerin 4°C ve 25°C’de depolanması sonucu bir aylık süre boyunca canlılık devam etmektedir. 4°C’de depolanan nanolifler 25°C’de depolanan nanoliflere göre daha uzun süre canlılıklarını korumuşlardır. Koaksiyel nanoliflerin dış kaplama materyalindeki değişiklik gösteren proteinlere göre yapılan canlılık grafiklerinde (Şekil 4.5) de görüleceği gibi 4°C’deki sonuçlara göre PASP proteinli nanoliflerde depolama süresince ~3.2 log (kob/mL) azalma, SK proteinli nanoliflerde ~2.3 log (kob/mL) azalma, SJ proteinli nanoliflerde ~4.3 log (kob/mL) azalma ve kontrol grubu olan proteinsiz nanoliflerde ~4.6 log (kob/mL) azalma görülmüştür. Buna karşılık 25°C’deki sonuçlara göre PASP proteinli nanoliflerde depolama süresince ~4.6 log (kob/mL) azalma, SK proteinli nanoliflerde ~6.5 log (kob/mL) azalma, SJ proteinli nanoliflerde ~5.7 log (kob/mL) azalma ve kontrol grubu olan proteinsiz nanoliflerde ~6.1 log (kob/mL) azalma görülmüştür. Bu durumda 4°C’deki depolama işleminin 25°C’deki depolama işlemine göre daha etkili bir sıcaklık olduğu görülmüştür ve daha yüksek canlılık sonuçları elde edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4. 4. Ortam Koşullarında Depolanan Liflerdeki *Saccharomyces cerevisiae* Sayısı

Sonuçlar incelendiğinde 25°C’de yapılan depolamada, mayaların 1. gün ile 28. gün arasındaki canlılık sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). *Saccharomyces cerevisiae*’nın literatür araştırmalarına göre gram başına 1.7×10^{10} koloni oluşturan birim (cfu/g) maksimum kültür maya sayısı beklenmekte olduğu öğrenilmiştir [61].



Şekil 4. 5. Soğuk Koşullarda Depolanan Liflerdeki *Saccharomyces cerevisiae* Sayısı

Başlangıç yükü $10.67 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ olan *Saccharomyces cerevisiae* 'ların zamanla $4.02 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ 'a düştüğü SJ proteini kaplı olan nanoliflerde gözlemlenmiştir. Bu durum 4°C'de $5.11 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ olarak kontrol grubu nanoliflerinde görülmektedir. Uzun süreli depolama koşullarında oda sıcaklığı olarak referans alınan 25°C'nin mayaların canlılığı açısından pek de iyi bir derece olmadığı görülmektedir.

Tablo 4. 7. Koaksiyel Naoliflerde 4°C depolama koşullarında sürenin canlılığa etkisi

	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Gruplar arası	105,190	26,297	30,102	,000
Grup içi	30,577	,874		
Toplam	135,767			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 4. 8. Koaksiyel Naoliflerde 4°C depolama koşullarında, kaplama materyalinin canlılığa etkisi

	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Gruplar arası	15,030	5,010	1,494	,233
Grup içi	120,737	3,354		
Toplam	135,767			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Sonuçlar incelendiğinde 4°C’de yapılan depolamada, mayaların 1. gün ile 28. gün arasındaki canlılık sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p > 0.05$). Uzun süreli depolama koşullarında 4°C’nin referans alındığı bu durumda mayaların canlılığı göz önünde bulundurularak 25°C’deki canlılığın logaritmik düşüşüne göre çok daha etkili bir koruma yöntemi olduğu, üstelik -20°C gibi çok daha düşük sıcaklıklara gerek kalmaksızın bir aylık süre boyunca etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Tablo 4. 9. Koaksiyel Naoliflerde 25°C depolama koşullarında sürenin canlılığa etkisi

	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Gruplar arası	238,997	59,749	136,166	,000
Grup içi	15,358	,439		
Toplam	254,355			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 4. 10. Koaksiyel Naoliflerde 25°C depolama koşullarında kaplama materyalinin canlılığa etkisi

	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F Değeri	Anlamlılık
Gruplar arası	5,006	1,669	,241	,867
Grup içi	249,349	6,926		
Toplam	254,355			

Sonuçlar iki paralelin ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen nanolif boyutlarının arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

4°C ve 25°C’de yapılan depolama analizleri sonucunda elde edilen canlılık sonuçları incelendiğinde PVA-PVA/PVA-Maya, PVA-PASP/PVA-Maya, PVA-SK/PVA-Maya, PVA-SJ/PVA-Maya nanoliflerinin dört hafta sonundaki canlılıkları (log, kob/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmuştur ($p \leq 0.05$).

İstatistiksel olarak veriler incelendiğinde haftalara ve proteinlere bağı olarak tüm değişimler bulgulanmıştır. Bu durumda 4°C’de proteinlerin ayrı ayrı *Saccharomyces cerevisiae* ’nın 10.67 ± 0.1 log CFU/g değerinden kontrol grubu için 5.12 ± 0.1 log CFU/g, PASP için 6.43 ± 0.1 log CFU/g, SK için 7.42 ± 0.1 log CFU/g ve SJ için 5.42 ± 0.1 log CFU/g değerlerine düşüş olduğu bulunmuştur. Aynı durum 25°C’de ise *Saccharomyces cerevisiae* ’nın yine 10.67 ± 0.1 log CFU/g değerinden kontrol grubu için 3.85 ± 0.1 log CFU/g, PASP için 4.96 ± 0.1 log CFU/g, SK için 4.16 ± 0.1 log CFU/g ve SJ için 4.02 ± 0.1 log CFU/g değerlerine düşüş olduğu bulunmuştur.

Ürünlerin depolanması sürecinde proteinlerin ayrı ayrı bakıldığında ekstra bir koruyuculuk sağladığı açıkça görülmüştür. Ancak yapılan tez kapsamında proteinlerin koruyuculuğunun asıl gözlemlenmesi gereken nokta sindirim sistemi koşullarına daha dirençli bir kaplama materyali olmalarının geliştirilmesini sağlamaktır. Sindirim sistemi analizi sonuçlarına göre bu amaca ulaşıldığı gözlemlenmektedir. Ayrıca elektroğirme yöntemi ile mayaların enkapsülasyonu amacıyla en çok kullanılan materyallerden biri olan PVA’nın depolama sırasındaki koruyuculuğuna, üretilen PVA-PVA/PVA-Maya, PVA-PASP/PVA-Maya, PVA-SK/PVA-Maya, PVA-SJ/PVA-Maya nanolifleri ile denk bir koruyuculuk sağlanması, geliştirilen bu hibrit nanoliflerin de elektroğirme yönteminde probiyotik enkapsülasyonu amacıyla kullanılabilirliğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada probiyotik mayaların dışta protein içeren çift katmanlı olarak koaksiyel yapıda enkapsüle edilmesinde elektroğirme yöntemi kullanılmıştır. Farklı proteinler ile enkapsüle edilen proteinlerin ağız, mide ve bağırsak sindirimleri salım kinetikleri incelenmiştir. Elektroğirme yönteminde probiyotik mayaların enkapsülasyonunda % 99 canlılık ve % 95,90 enkapsülasyon verimliliği elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan koaksiyel enkapsülasyon yönteminin probiyotik mayaların gastrointestinal sistemde dayanımlarını arttırdığı ve ince bağırsakta probiyotik mayalar için tanımlanan 10^6 'dan büyük olma koşulunu sağlayabildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca yapılan depolama çalışmalarında soğukta depolanan nanoliflerdeki maya sayılarının 9 log CFU/g ve canlı kalma oranlarını % 80'den büyük olduğu belirlenmiştir. Oda koşullarında elde edilen değerlerden soğukta depolamanın daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Sindirim sistemi dayanımı ve salım kinetiklerinde elektroğirme işlem koşullarının (voltaj, iğne çapı, mesafe, vb.) optimize edilerek kaplama materyali kalınlıkları ve nanolif çapları ayarlanarak çalışmada elde edilen sonuçların bundan sonraki yapılacak olan çalışmalara öncülük ederek geliştirilebileceği görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] S. Gökmen, R. Palamutoğlu, and C. Sarıçoban, “Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları Applications of Encapsulation in Food Industry,” *Teknol. Araştırmalar*, vol. 7, no. 1, pp. 36–50, 2012.
- [2] İ. Tontul, “Gıda Endüstrisinde Nanoenkapsülasyon Teknikleri,” *Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol.*, vol. 7, no. 2, p. 220, 2019, doi: 10.24925/turjaf.v7i2.220-233.2205.
- [3] F. Tosya, “ENCAPSULATION OF FOOD BIOACTIVE COMPONENTS BY ELECTROSPINNING,” no. December, 2021.
- [4] M. Koç and M. Sakın, “Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı,” *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim. Derg.*, vol. 16, no. 1, pp. 77–86, 2010.
- [5] Ö. AYDIN and İ. ÜNLÜEL, “Enkapsülasyon Teknikleri ve Kontrollü Salım,” *Eur. J. Sci. Technol.*, no. 32, pp. 640–648, 2022, doi: 10.31590/ejosat.1039736.
- [6] S. TUTUN and O. YURDAKUL, “Enkapsülasyon Ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı (Encapsulation and Its Use in Food Technology),” *Vet. Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, vol. 13, pp. 99–119, 2022, doi: 10.38137/vftd.1096571.
- [7] B. K. Green, “July 5, 1955 B. K. GREEN,” no. 2, pp. 22–24, 1955.
- [8] B. Kunz, S. Krückeberg, and J. Weibbrodt, “Chancen und Grenzen der Mikroverkapselung in der modernen Lebensmittelverarbeitung,” *Chemie-Ingenieur-Technik*, vol. 75, no. 11, pp. 1733–1740, 2003, doi: 10.1002/cite.200306139.
- [9] N. E. Merve and Y. E. C. Dudak, “ASETAT Hİ BR İT FİBERLERE PROBİYOTİK ENKAPSÜLASYONU PROBIOTIC ENCAPSULATION IN ELECTROSPUN POLYVINYL ALCOHOL / CELLULOSE ACETATE HYBRID FIBERS,” 2020.
- [10] J. Doshi and D. H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers,” *Conf. Rec. - IAS Annu. Meet. (IEEE Ind. Appl. Soc.)*, vol. 3, pp. 1698–1703, 1993, doi: 10.1109/ias.1993.299067.
- [11] H. Cakmak, S. Kumcuoglu, and S. Tavman, “Electrospray coating of minimally processed strawberries and evaluation of the shelf-life quality properties,” *J. Food Process Eng.*, vol. 42, no. 5, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1111/jfpe.13082.
- [12] H. Cakmak, S. Kumcuoglu, and S. Tavman, “Production of edible coatings with twin-nozzle electrospraying equipment and the effects on shelf-life stability of fresh-cut apple slices,” *J. Food Process Eng.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1111/jfpe.12627.
- [13] P. Gibson, H. Schreuder-Gibson, and D. Rivin, “Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 187, no. 188, pp. 469–481, 2001, doi: 10.1016/S0927-7757(01)00616-1.
- [14] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. Beck Tan, “The effect of processing variables on the morphology of electrospun,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, pp. 261–272, 2001.
- [15] B. Ghorani, A. Alehosseini, and N. Tucker, *8 - Nanocapsule formation by electrospinning*. Elsevier Inc., 2017.

- [16] A. M. Gañán-Calvo, J. M. López-Herrera, M. A. Herrada, A. Ramos, and J. M. Montanero, "Review on the physics of electrospray: From electrokinetics to the operating conditions of single and coaxial Taylor cone-jets, and AC electrospray," *J. Aerosol Sci.*, vol. 125, no. May, pp. 32–56, 2018, doi: 10.1016/j.jaerosci.2018.05.002.
- [17] A. Moreira *et al.*, "Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying," *J. Control. Release*, vol. 329, no. July 2020, pp. 1172–1197, 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.10.046.
- [18] A. C. Mendes and I. S. Chronakis, "Electrohydrodynamic encapsulation of probiotics: A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 117, no. February, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106688.
- [19] V. O. Ikem, A. Menner, A. Bismarck, and L. R. Norman, "Liquid screen: A novel method to produce an in-situ gravel pack," *SPE J.*, vol. 19, no. 3, pp. 437–442, 2014, doi: 10.2118/141256-PA.
- [20] L. Xue, L. Zheng, H. Zhang, X. Jin, and J. Lin, "An ultrasensitive fluorescent biosensor using high gradient magnetic separation and quantum dots for fast detection of foodborne pathogenic bacteria," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 265, pp. 318–325, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.03.014.
- [21] T. Li, D. Wang, L. Ren, J. Mei, Y. Xu, and J. Li, "Preparation of pH-sensitive polylactic acid-naringin coaxial electrospun fiber membranes for maintaining and monitoring salmon freshness," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 188, no. August, pp. 708–718, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.087.
- [22] M. L. Palma *et al.*, "Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement?," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 16, pp. 6563–6570, 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6776-x.
- [23] B. Robert and E. B. Brown, "No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title," no. 1, pp. 1–14, 2004.
- [24] B. Shruthi, N. Deepa, R. Somashekaraiah, G. Adithi, S. Divyashree, and M. Y. Sreenivasa, "Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review," *Biotechnol. Reports*, vol. 34, no. January, p. e00716, 2022, doi: 10.1016/j.btre.2022.e00716.
- [25] M. T. Yilmaz, O. Taylan, C. Y. Karakas, and E. Dertli, "An alternative way to encapsulate probiotics within electrospun alginate nanofibers as monitored under simulated gastrointestinal conditions and in kefir," *Carbohydr. Polym.*, vol. 244, no. May, p. 116447, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116447.
- [26] Y. Fan *et al.*, "Materials Science & Engineering C Yeast encapsulation in nanofiber via electrospinning : Shape transformation , cell activity and immobilized efficiency," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 120, no. November 2020, p. 111747, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111747.
- [27] M. T. Yilmaz, O. Taylan, C. Y. Karakas, and E. Dertli, "An alternative way to encapsulate probiotics within electrospun alginate nanofibers as monitored under simulated gastrointestinal conditions and in kefir," *Carbohydr. Polym.*, vol. 244, no. April, p. 116447, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116447.
- [28] A. C. Mendes and I. S. Chronakis, "Food Hydrocolloids Electrohydrodynamic encapsulation of probiotics : A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 117, no. February, p. 106688, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106688.

- [29] A. López-Rubio, E. Sanchez, S. Wilkanowicz, Y. Sanz, and J. M. Lagaron, "Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids," *Food Hydrocoll.*, vol. 28, no. 1, pp. 159–167, 2012, doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.008.
- [30] N. Laelorspoen, S. Wongsasulak, T. Yoovidhya, and S. Devahastin, "Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying," *J. Funct. Foods*, vol. 7, no. 1, pp. 342–349, 2014, doi: 10.1016/j.jff.2014.01.026.
- [31] C. C. Coghetto, G. B. Brinques, N. M. Siqueira, J. Pletsch, R. M. D. Soares, and M. A. Z. Ayub, "Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids," *J. Funct. Foods*, vol. 24, pp. 316–326, 2016, doi: 10.1016/j.jff.2016.03.036.
- [32] L. G. Gomez-Mascaraque, R. C. Morfin, R. Pérez-Masiá, G. Sanchez, and A. Lopez-Rubio, "Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion," *Lwt*, vol. 69, pp. 438–446, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.071.
- [33] D. Zaeim, M. Sarabi-Jamab, B. Ghorani, R. Kadkhodae, and R. H. Tromp, "Electrospray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics," *Food Bioprod. Process.*, vol. 102, pp. 250–259, 2017, doi: 10.1016/j.fbp.2017.01.004.
- [34] P. Pitigraisorn, K. Srichaisupakit, N. Wongpadungkiat, and S. Wongsasulak, "Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules," *J. Food Eng.*, vol. 192, pp. 11–18, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.07.022.
- [35] C. M. Librán, S. Castro, and J. M. Lagaron, "Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 39, pp. 216–222, 2017, doi: 10.1016/j.ifset.2016.12.013.
- [36] D. Zaeim, M. Sarabi-Jamab, B. Ghorani, and R. Kadkhodae, "Double layer co-encapsulation of probiotics and prebiotics by electro-hydrodynamic atomization," *Lwt*, vol. 110, no. November 2018, pp. 102–109, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.04.040.
- [37] A. López-Rubio, E. Sanchez, Y. Sanz, and J. M. Lagaron, "Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 10, pp. 2823–2829, 2009, doi: 10.1021/bm900660b.
- [38] W. Y. Fung, K. H. Yuen, and M. T. Liong, "Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: Fabrication and characterization," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 15, pp. 8140–8147, 2011, doi: 10.1021/jf2009342.
- [39] A. Lancuški, A. A. Aiman, R. Avrahami, R. Vilensky, G. Vasilyev, and E. Zussman, "Design of starch-formate compound fibers as encapsulation platform for biotherapeutics," *Carbohydr. Polym.*, vol. 158, pp. 68–76, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.12.003.
- [40] Z. Ceylan, R. Meral, C. Y. Karakaş, E. Dertli, and M. T. Yilmaz, "A novel strategy for probiotic bacteria: Ensuring microbial stability of fish fillets using characterized probiotic bacteria-loaded nanofibers," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 48, no. February, pp. 212–218, 2018, doi: 10.1016/j.ifset.2018.07.002.

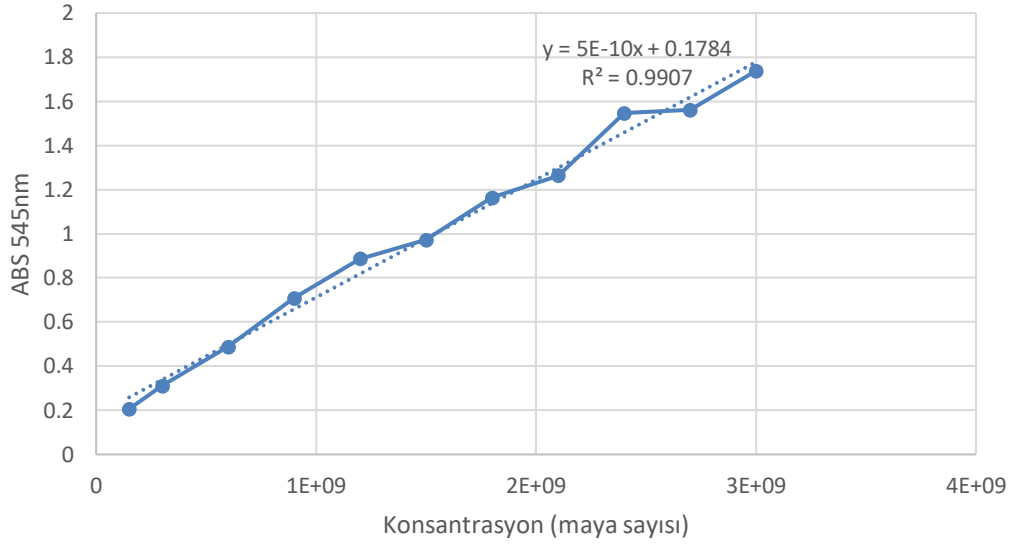
- [41] K. Feng *et al.*, “A novel route for double-layered encapsulation of probiotics with improved viability under adverse conditions,” *Food Chem.*, vol. 310, no. November 2019, p. 125977, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125977.
- [42] T. Jayani, B. Sanjeev, S. Marimuthu, and S. Uthandi, “Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 250, no. March, p. 116965, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116965.
- [43] S. J. Mojaveri, S. F. Hosseini, and A. Gharsallaoui, “Viability improvement of *Bifidobacterium animalis* Bb12 by encapsulation in chitosan/poly(vinyl alcohol) hybrid electrospun fiber mats,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 241, no. April, p. 116278, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116278.
- [44] K. Škrlec, Š. Zupančič, S. Prpar Mihevc, P. Kocbek, J. Kristl, and A. Berlec, “Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 136, no. January, pp. 108–119, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.01.013.
- [45] Z. Ceylan *et al.*, “A novel perspective for *Lactobacillus reuteri*: Nanoencapsulation to obtain functional fish fillets,” *Lwt*, vol. 115, no. May, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108427.
- [46] S. T. Sullivan, C. Tang, A. Kennedy, S. Talwar, and S. A. Khan, “Food Hydrocolloids Electrospinning and heat treatment of whey protein nano fibers,” *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 36–50, 2014, doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.023.
- [47] S. Dayalı, S. Yöntemleri, V. Gürgün, and A. K. Halkman, “Standarda Dayalı Sayım Yöntemleri 1,” no. 7, pp. 1–6, 1990.
- [48] E. I. Chereches and A. A. Minea, “Experiments on the Electrical Conductivity of PEG 400 Nanocolloids Enhanced with Two Oxide Nanoparticles,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 9, 2023, doi: 10.3390/nano13091555.
- [49] M. Minekus *et al.*, “A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 6, pp. 1113–1124, 2014, doi: 10.1039/c3fo60702j.
- [50] M. Berkel Kaşıkçı, “Salamuraya İşlenen Bazı Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi,” p. 140, 2018.
- [51] A. R. Mackie *et al.*, “Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus,” *Food Hydrocoll.*, vol. 52, pp. 749–755, 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.08.004.
- [52] E. İlhan *et al.*, “The Role of Multilayer Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Gelatin nanofibers loaded with Fluconazole and Cinnamaldehyde in the Potential Treatment of Fungal Keratitis,” *Eur. Polym. J.*, vol. 176, no. July, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111390.
- [53] F. Kazemianrad, A. Koocheki, and B. Ghorani, “Food Hydrocolloids Encapsulation of caffeine in sandwich structured *Alyssum homolocarpum* seed gum / PVA / gelatin nanofibers using electrospinning technique,” *Food Hydrocoll.*, vol. 140, no. September 2022, p. 108604, 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108604.
- [54] S. A. Ardestani, B. Ghanbarzadeh, and S. Moini, “The improvement of the sodium caseinate based electrospun nanofiber by modifying solvent system: Study of microstructure and physical properties,” *Food Hydrocoll.*, vol. 137, no. September 2022, p. 108387, 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108387.

- [55] V. Reisi-Vanani *et al.*, “Engineering of a core-shell polyvinyl alcohol/gelatin fibrous scaffold for dual delivery of *Thymus daenensis* essential oil and *Glycyrrhiza glabra* L. extract as an antibacterial and functional wound dressing,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 81, no. November 2022, p. 104282, 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2023.104282.
- [56] S. Amiri, M. J. Teymorlouei, M. R. Bari, and M. A. Khaledabad, “Development of *Lactobacillus acidophilus* LA5-loaded whey protein isolate/lactose bionanocomposite powder by electrospraying: A strategy for entrapment,” *Food Biosci.*, vol. 43, no. March, p. 101222, 2021, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101222.
- [57] S. Biranje, P. Madiwale, and R. V. Adivarekar, “Porous electrospun Casein/PVA nanofibrous mat for its potential application as wound dressing material,” *J. Porous Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–40, 2019, doi: 10.1007/s10934-018-0602-7.
- [58] V. Mosayebi, M. Fathi, M. Shahedi, and N. Soltanizadeh, “Food Bioscience Fast-dissolving antioxidant nanofibers based on *Spirulina* protein concentrate and gelatin developed using needleless electrospinning,” *Food Biosci.*, vol. 47, no. April, p. 101759, 2022, doi: 10.1016/j.fbio.2022.101759.
- [59] H. C. Oyeoka, C. M. Ewulonu, I. C. Nwuzor, C. M. Obele, and J. T. Nwabanne, “Packaging and degradability properties of polyvinyl alcohol/gelatin nanocomposite films filled water hyacinth cellulose nanocrystals,” *J. Bioresour. Bioprod.*, vol. 6, no. 2, pp. 168–185, 2021, doi: 10.1016/j.jobab.2021.02.009.
- [60] B. C. Viljoen and J. F. R. Lues, “The microbial populations associated with post-fermented dough and compressed baker’s yeast,” *Food Microbiology*, vol. 10, no. 5, pp. 379–386, 1993, doi: 10.1006/fmic.1993.1044.

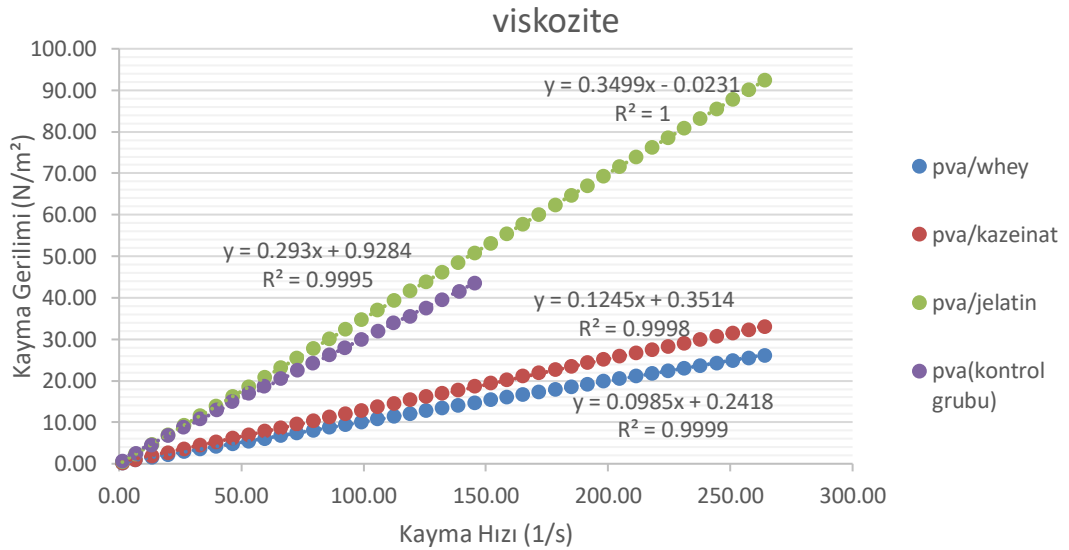
EKLER

EK A. (3.2.5. *Saccharomyces cerevisiae* 'nın Standardize Edilmesi)

McFarland Standartına göre Örnekler



EK B. (4.1. Elektroegirme Çözeltilerinin Bileşimlerinin Belirlenmesi)



EK C. (4.6. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanalıflerde Sindirim Sistemi Simülasyonu ve Salım Kinetikleri)

SÜRE		Mide	Bağırsak
0	Mean	6,3393	10,1782
	N	8	8
	Std. Deviation	1,18529	1,62937
30	Mean	6,7214	9,4722
	N	8	8
	Std. Deviation	,49303	1,96794
60	Mean	7,7283	10,1945
	N	8	8
	Std. Deviation	,75727	1,99006
90	Mean	9,0825	11,1330
	N	8	8
	Std. Deviation	1,25408	2,07599
120	Mean	10,1782	12,5674
	N	8	8
	Std. Deviation	1,62937	1,70946
Total	Mean	8,0100	10,7091
	N	40	40
	Std. Deviation	1,81307	2,08607

PROTEİN		Mide	Bağırsak
jelatin	Mean	9,1308	13,0412
	N	10	10
	Std. Deviation	2,33315	1,03576
kazein	Mean	6,7973	8,4139
	N	10	10
	Std. Deviation	1,24396	1,30494
kontrol	Mean	8,0468	11,4072
	N	10	10
	Std. Deviation	1,46594	1,32334
whey	Mean	8,0649	9,9740
	N	10	10
	Std. Deviation	1,43880	1,13669
Total	Mean	8,0100	10,7091
	N	40	40
	Std. Deviation	1,81307	2,08607

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1,000	40310,806 ^b	2,000	19,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	40310,806 ^b	2,000	19,000	,000
	Hotelling's Trace	4243,243	40310,806 ^b	2,000	19,000	,000
	Roy's Largest Root	4243,243	40310,806 ^b	2,000	19,000	,000
sure	Pillai's Trace	1,704	28,781	8,000	40,000	,000
	Wilks' Lambda	,006	56,499 ^b	8,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	47,220	106,244	8,000	36,000	,000
	Roy's Largest Root	44,571	222,855 ^c	4,000	20,000	,000
protein	Pillai's Trace	1,360	14,154	6,000	40,000	,000
	Wilks' Lambda	,006	78,164 ^b	6,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	111,992	335,975	6,000	36,000	,000
	Roy's Largest Root	111,408	742,720 ^c	3,000	20,000	,000
sure * protein	Pillai's Trace	1,561	5,933	24,000	40,000	,000
	Wilks' Lambda	,040	6,360 ^b	24,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	9,039	6,780	24,000	36,000	,000
	Roy's Largest Root	6,822	11,370 ^c	12,000	20,000	,000

a. Design: Intercept + sure + protein + sure * protein

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

MİDE/SÜRE

Testler	Süre	N	Alt kümeler			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^{a,b}	0	8	6,3393			
	30	8	6,7214			
	60	8		7,7283		
	90	8			9,0825	
	120	8				10,1782
	Sig.		,562	1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a,b}	0	8	6,3393			
	30	8	6,7214			
	60	8		7,7283		
	90	8			9,0825	
	120	8				10,1782
	Sig.		,144	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,252.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000. b. Alpha = ,05.

BAĞIRSAK/SÜRE

Testler	Süre	N	Alt kümeler			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^{a,b}	30	8	9,4722			
	0	8		10,1782		
	60	8		10,1945		
	90	8			11,1330	
	120	8				12,5674
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a,b}	30	8	9,4722			
	0	8		10,1782		
	60	8		10,1945		
	90	8			11,1330	
	120	8				12,5674
	Sig.		1,000	,890	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,054.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000. b. Alpha = ,05.

MİDE/PROTEİN

Testler	Protein	N	Alt kümeler		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}	SK	10	6,7973		
	Kontrol	10		8,0468	
	PASP	10		8,0649	
	SJ	10			9,1308
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a,b}	SK	10	6,7973		
	Kontrol	10		8,0468	
	PASP	10		8,0649	
	SJ	10			9,1308
	Sig.		1,000	,936	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,252.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000. b. Alpha = ,05.

BAĞIRSAK/PROTEİN

Testler	Protein	N	Alt kümeler			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^{a,b}	SK	10	8,4139			
	PASP	10		9,9740		
	Kontrol	10			11,4072	
	SJ	10				13,0412
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a,b}	SK	10	8,4139			
	PASP	10		9,9740		
	Kontrol	10			11,4072	
	SJ	10				13,0412
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,054.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000. b. Alpha = ,05.

EK D. (4.7. Farklı Proteinler ile Hazırlanmış Nanaliflerde Depolama Koşullarının Canlılığa Etkisi)

CFU/25°C				
Testler	Protein	N	Alt kümeler	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	PVA	10	6,4220	
	SK	10	6,7980	6,7980
	SJ	10	6,8820	6,8820
	PASP	10		7,4130
	Sig.		,310	,113
Duncan ^{a,b}	PVA	10	6,4220	
	SK	10	6,7980	
	SJ	10	6,8820	6,8820
	PASP	10		7,4130
	Sig.		,106	,053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000. b. Alpha = 0,05.

CFU/4°C					
Testler	Protein	N	Alt kümeler		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}	PVA	10	7,6420		
	SJ	10	7,7780		
	PASP	10	8,4260	8,4260	
	SK	10		9,1880	
	Sig.		,100	,114	
Duncan ^{a,b}	PVA	10	7,6420		
	SJ	10	7,7780	7,7780	
	PASP	10		8,4260	
	SK	10			9,1880
	Sig.		,676	,057	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,514.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000. b. Alpha = 0,05.